

Aplicaciones de la RMN al estudio de interacciones entre moléculas

INTRODUCCIÓN

Es bien conocido por un gran número de químicos que, mediante el uso de técnicas modernas de espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), es posible caracterizar tanto la estructura primaria como la conformación y las características dinámicas de moléculas orgánicas, inorgánicas y biomoléculas en disolución [1]. Más aún, tras los últimos avances en desarrollo de secuencias de pulsos e instrumentación, es posible investigar, con cierto detalle, las mismas características en entidades supramoleculares [2].

En este sentido, en este artículo intentaré mostrar algunos ejemplos de la aplicación de la RMN al estudio de interacciones entre moléculas, haciendo énfasis en la posible aplicación al diseño de moléculas pequeñas, ligandos que interactúan con un receptor macromolecular determinado [3, 4]. Este campo de investigación tiene implicaciones obvias en el diseño de fármacos basado en el conocimiento de las estructuras/conformaciones del ligando, del receptor o de ambos [5]. De hecho, numerosas empresas farmacéuticas han incorporado estrategias basadas en RMN en sus programas de descubrimiento y diseño de fármacos, para realizar el cribado (*screening*) de los compuestos provenientes de los laboratorios o de fuentes naturales. Esta aproximación se deriva del hecho de que estos análisis y cribados basados en RMN son extraordinariamente compatibles y sinérgicos con la química médica y la química combinatoria [6], con el diseño basado en estructura y con la genómica estructural. De hecho, y



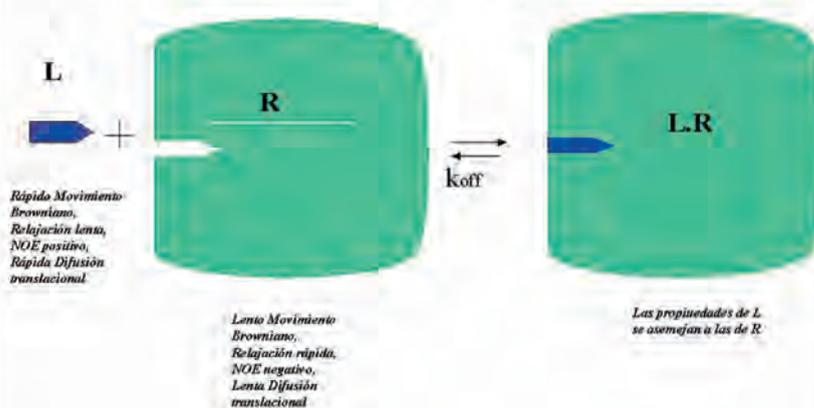
Jesús Jiménez-Barbero
Centro de Investigaciones Biológicas,
CSIC, Ramiro de Maeztu 9,
28040 Madrid
jjbarbero@cib.csic.es

como veremos a continuación, mediante RMN, puede ser posible detectar la existencia de reconocimiento molecular entre dos moléculas, conocer entre qué regiones del ligando y del receptor tiene lugar la interacción e incluso cuáles son las conformaciones bioactivas de ambas entidades [7]. Asimismo, puede obtenerse la estructura tridimensional del complejo supramolecular, sus características dinámicas y estimar, al menos cualitativamente, las energías libres asociadas al proce-

so. (Figura 1).

En principio, todos los parámetros de RMN pueden servir para detectar la existencia de interacción entre una molécula pequeña y un receptor macromolecular. Sin embargo, desde un punto de vista práctico, solamente pueden usarse aquellos parámetros que pueden obtenerse fácilmente y con gran sensibilidad, especialmente usando experimentos que sean fáciles de implementar y que sean reproducibles. Las variaciones de parámetros conocidos por todos nosotros, en mayor o menor escala, como desplazamientos químicos, tiempos de relajación, constantes de difusión, intercambio o transferencia de saturación y de magnetización, incluyendo los efectos Overhauser nucleares (NOEs), proporcionan información fidedigna sobre la existencia, o no, de reconocimiento molecular. En general, existen dos aproximaciones

Figura 1. Identificación de la existencia de interacción entre ligando y receptor mediante RMN. Numerosos parámetros químico-físicos del ligando (difusión translacional y rotacional, relajación longitudinal y transversal) se afectan al asociarse a su receptor biológico.



PROPIEDADES DE RMN DE MOLECULAR PEQUEÑAS Y DE RECEPTORES MACROMOLECULARES
Cuando una molécula pequeña (ligando, L) se une a una macromolécula (receptor, R), L comparte las propiedades dinámicas de R y, por consiguiente, los parámetros de RMN de L se alteran, pareciéndose a los de R. k_{off} es la constante de velocidad de disociación del mismo.

generales para evaluar la formación de complejos intermoleculares. La primera se centra en seguir las variaciones de parámetros de RMN del ligando, especialmente los cambios que se producen en sus propiedades de relajación y de difusión al pasar del estado libre al asociado. La segunda explora las variaciones de desplazamiento químico de los núcleos de la macromolécula al asociarse a la molécula pequeña. Como veremos a continuación, las dos aproximaciones son complementarias, tienen rangos de aplicación diferentes y ventajas e inconvenientes. Un resumen de las condiciones experimentales y de los

requerimientos para el uso de la RMN en cribado y análisis de interacciones entre ligandos pequeños y receptores biomacromoleculares se dan en la **Tabla 1**.

MÉTODOS DE RMN QUE PERMITEN DETECTAR LA EXISTENCIA DE INTERACCIÓN SIGUIENDO LAS SEÑALES DEL LIGANDO

Relajación transversal

La velocidad de la relajación de los espines nucleares determina la sensibilidad y la resolución de los experimentos de RMN. Las caracte-

terísticas de la relajación entre los núcleos magnéticos dependen de la distancia entre ellos, del campo magnético externo y de los movimientos moleculares. Existen dos fuentes fundamentales para la relajación: que tienen que ver con la modulación, por los movimientos Brownianos, de las interacciones dipolo-dipolo (que se dan a través del espacio) y de la anisotropía de desplazamiento químico (que tiene que ver con la orientación de la molécula con respecto al campo magnético externo). Las moléculas pequeñas, que se mueven rápidamente en disolución, tienen velocidades de relajación mucho más

TABLA 1 Técnicas de RMN adecuadas para la identificación y el estudio de interacciones entre ligandos y proteínas (adaptada de la ref. 5).

	Relajación transversal: Etiquetado con espines paramagnéticos	Difusión	Transferencia de magnetización: TR-NOE	Transferencia de magnetización: STD	Transferencia de magnetización: bombeo de NOE	Water-LOGSY	SAR by NMR
Proteína grande (>30 kDa)	Sí	Sí/No	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí/No
Proteína pequeña (<10 kDa)	Sí	Sí	No	No	No	No	Sí
Marcaje de la proteína con ^{15}N (ó ^{13}C)	No	No	No	No	No	No	Sí
Epitopo de la proteína	No	No	No	No	No	No	Sí
Epitopo del ligando	No	No	Sí/No	Sí	Sí/No	Sí/No	No
Cantidad de proteína requerida a 500 MHz (nmol)	ca. 1	ca. 100	ca. 1	0.1	ca. 25	ca. 25	ca. 25
Kd. Asociación fuerte	100 pM	100 nm	ca. 10 mM	100 pM	1 nm	100 pM	Sin límite
Kd. Asociación débil	ca. 10 mM	1 mM	10 mM	10 mM	1 mM	10 mM	1 mM
Identificación del ligando	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	No
Comentarios	Puede ser ambiguo dependiendo del número de lisinas	No es trivial de poner a punto	Depende mucho de la constante de disociación	Muy eficiente	No es trivial de optimizar	Bueno para ligandos no muy hidrófobos	Muy eficiente

lentas que las moléculas grandes, que se reorientan muy lentamente. La anchura de línea de las señales de resonancia es directamente proporcional a la velocidad de relajación transversal (R_2) y, de hecho, la existencia de R_2 muy grandes ha supuesto una gran limitación para determinar la estructura de macromoléculas mediante RMN. En cambio, puesto que el tiempo de relajación transversal T_2 (el inverso de la velocidad de relajación transversal R_2) es generalmente bastante largo, las señales de RMN de las moléculas pequeñas son generalmente estrechas. Esta diferencia de anchura puede explotarse para detectar la existencia de unión de uno o varios ligandos a un receptor macromolecular. La existencia de ensanchamiento de las líneas de las moléculas pequeñas al añadir el receptor potencial demuestran inequívocamente la existencia de interacción. El ensanchamiento depende obviamente del tamaño del receptor, de la relación molar entre ligando y receptor y de la constante de disociación del complejo. (Figura 2)

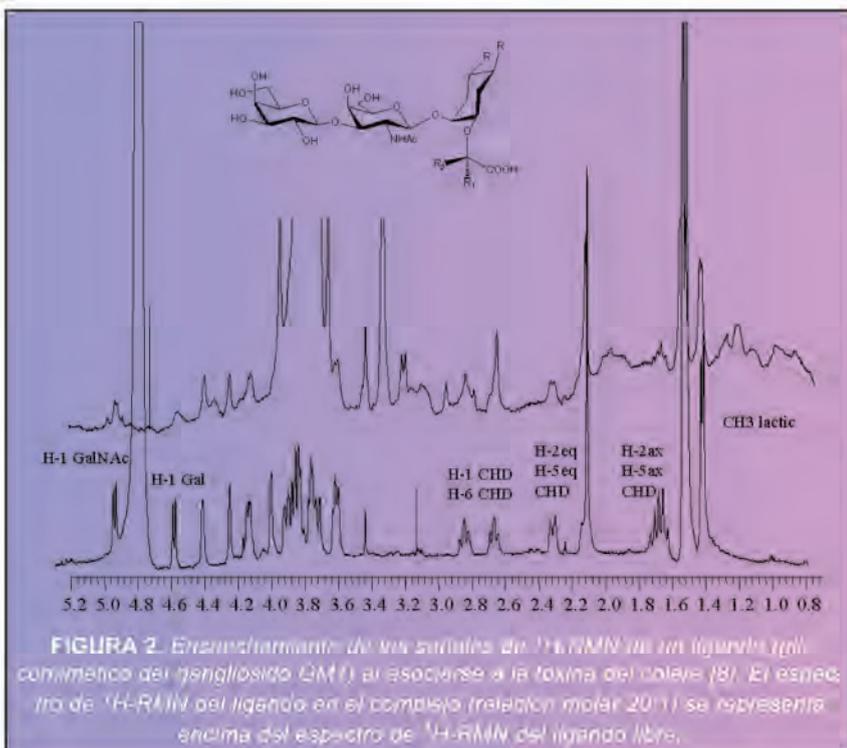
Este concepto se ha extendido para realizar el cribado de bibliotecas de moléculas como potenciales ligandos de un determinado receptor

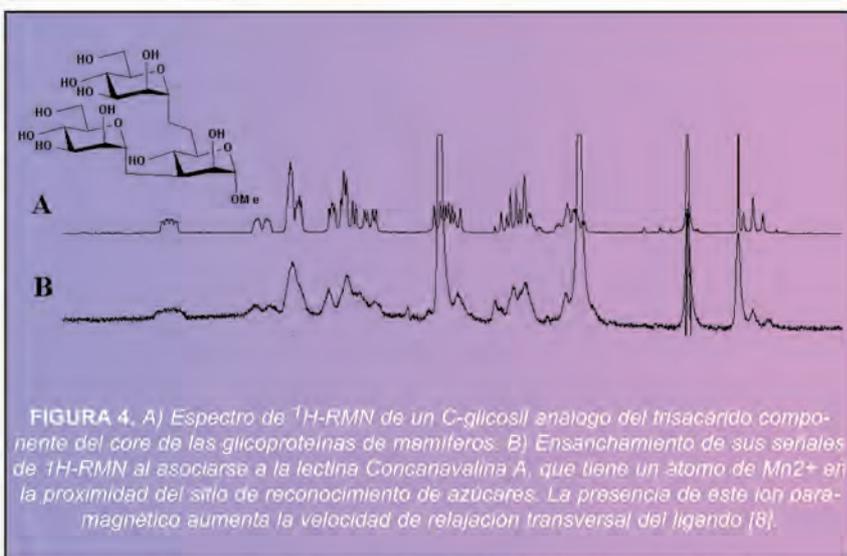
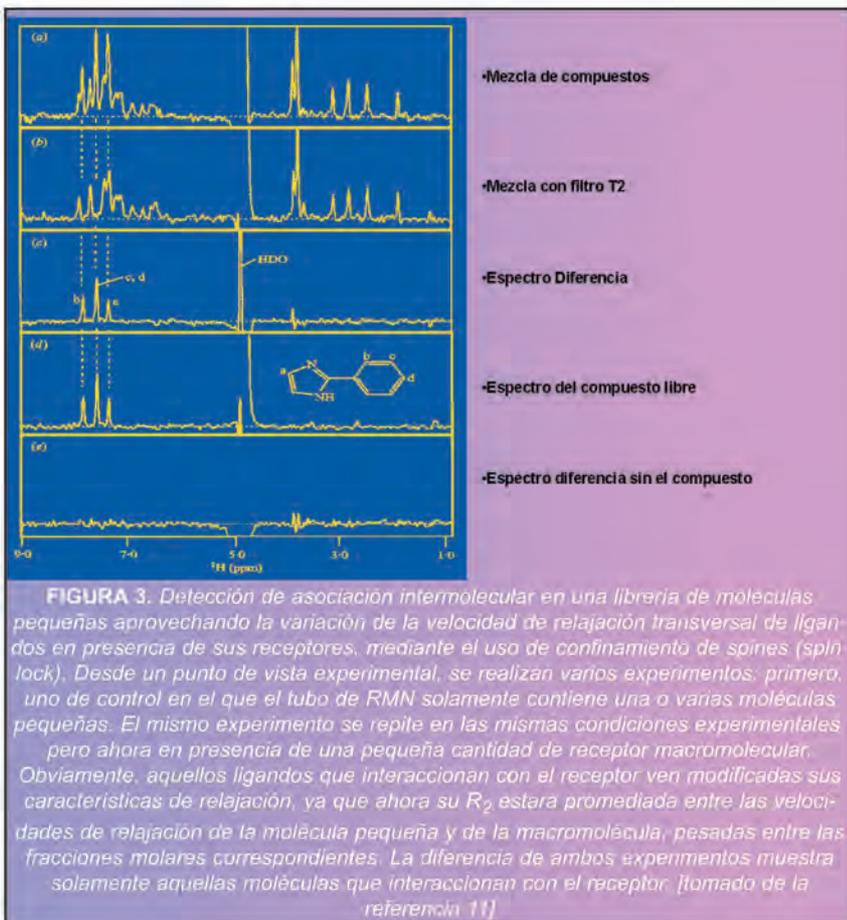
[10]. El método es muy simple: en el tubo de RMN, además de una pequeña cantidad del receptor, se incluyen dos moléculas conocidas. Una de ellas no se une al receptor en absoluto y sirve como referencia negativa. La segunda, molécula sonda, es un ligando de baja afinidad, alrededor de mM, por lo que sus señales de RMN están ligeramente ensanchadas respecto a su anchura en su estado libre. A continuación se añade la biblioteca de con los ligandos potenciales. En el caso de que alguna de las moléculas añadidas muestre afinidad con el receptor, competirá con la molécula sonda por el sitio de reconocimiento, desplazándola a la disolución y produciendo el consiguiente estrechamiento de sus señales y aumento de su intensidad. Dependiendo de la afinidad relativa de la molécula añadida y de la sonda, el estrechamiento será mayor o menor, pero siempre detectable, ya que puede medirse respecto a la molécula referencia, que no se une al receptor.

En el caso de ligandos que se unen débilmente, o para ciertas relaciones molares entre proteína y ligando, puede suceder que solamente se produzca un ligero aumento de la relajación, por lo que es necesario aumentar la sensibili-

dad de la detección de los efectos deseados mediante el uso de filtros de relajación transversal que maximizan los efectos de la relajación (filtros de bloqueo o confinamiento de espines, *spin-lock*) [11]. Desde un punto de vista experimental, se realizan varios experimentos: primero, uno de control en el que el tubo de RMN solamente contiene una o varias moléculas pequeñas. El mismo experimento se repite en las mismas condiciones experimentales, pero ahora en presencia de una pequeña cantidad de receptor macromolecular. Obviamente, aquellos ligandos que interactúan con el receptor ven modificadas sus características de relajación, ya que ahora su R_2 estará promediada entre las velocidades de relajación de la molécula pequeña y de la macromolécula, pesadas entre las fracciones molares correspondientes. La diferencia de ambos experimentos muestra solamente aquellas moléculas que interactúan con el receptor. (Figura 3)

Los efectos de la relajación transversal pueden maximizarse ya que los T_2 ($1/R_2$) están relacionados con las constantes giromagnéticas (γ) de los espines que interactúan. Puesto que la γ de un electrón desapareado es 658 veces superior que la del protón, la relajación de los espines próximos a un centro paramagnético está dominada por las interacciones con el electrón. Por tanto, la presencia de etiquetas paramagnéticas (*spin labels*) en el receptor producen enormes efectos en la relajación de los ligandos que interactúan con el mismo, dependiendo de la proximidad espacial entre el centro paramagnético y el sitio de reconocimiento de ligandos. El centro paramagnético puede ser un metal (Mn^{2+}) o en el caso de proteínas independientes de metales, pueden unirse nitróxidos como el TEMPO (2,3,4,6-tetrametil piperidina-1-oxyl), mediante enlace químico a ciertas cadenas laterales. Este es el principio del método SLAPSTIC (*spin labels attached to protein side chains as a tool to identify interacting compounds*), [12] que requiere muy poca cantidad de macromolécula, y que se ha utilizado





recientemente para el cribado de librerías frente a la proteína FKBP, usada como modelo de receptor. Asimismo, un ligando conocido al que se le ha unido un centro paramagnético puede servir para identificar moléculas que se unen simultáneamente al mismo receptor, en un lugar próximo al del ligando conocido [13]. (Figura 4)

Relajación longitudinal

Las variaciones de los tiempos de relajación longitudinales T_1 o de sus inversas las velocidades de relajación, R_1 ($1/T_1$), utilizando sus versiones selectivas ($T_{1,S}$) pueden también utilizarse para detectar la existencia de entidades supramoleculares en disolución [15]. De hecho, existe una contribución muy importante del tiempo de correlación τ_c al

valor de $T_{1,S}$, con lo que la medida de este parámetro también proporciona información muy útil sobre la existencia o no de reconocimiento. Así, las medidas de $T_{1,S}$ se han utilizado en experimentos de cribado de moléculas mediante RMN, e incluso se han utilizado para determinar constantes de disociación en experimentos de titulación.

Difusión

Las medidas de la velocidad de difusión traslacional (D) también pueden emplearse para detectar la formación de complejos ligando-receptor. Sin intentar ser exhaustivo, para una esfera de radio r en un medio de viscosidad η , la D está determinada por la ecuación de Stokes-Einstein, $D=KT/6r\eta\pi$.

Debido a esta dependencia $1/r$, las moléculas pequeñas tienen D s que son al menos un orden de magnitud mayores que las de las macromoléculas. Por tanto, cuando se unen a un receptor y adoptan, al menos de manera transitoria, las propiedades traslacionales de este, las variaciones de D pueden usarse para determinar la existencia de interacción. Incluso, en casos favorables, sirven para determinar las constantes de disociación de los complejos formados. En el caso de la existencia de interacción, donde el intercambio de las señales del ligando es rápida en la escala de tiempos de los δ , la D observada estará promediada entre las velocidades de difusión de la molécula pequeña y de la macromolécula, pesadas con las fracciones molares correspondientes:

$$D_{\text{obs}} = D_{\text{asociado}}([LR]/[LTOT]) + D_{\text{libre}}(1-[LR]/[LTOT])$$

Las D_{obs} pueden medirse fácilmente mediante experimentos de ecos de espín que incorporen pulsos de gradientes de campo (PFG-STE) [11, 16, 17]. En general, el uso de estos experimentos, para una determinada intensidad y duración del pulso de los gradientes de campo y del tiempo de evolución, permite eliminar las señales de RMN de las moléculas pequeñas, que difunden

muy rápidamente, mientras que las intensidades de las señales de las macromoléculas solamente disminuyen, siendo menor la disminución de las intensidades cuanto mayor es la macromolécula y cuanto menor son la potencia y la duración de los gradientes, y el tiempo de evolución. Aunque puede realizarse un análisis cuantitativo, mediante el análisis de las ecuaciones correspondientes, el simple análisis cualitativo permite determinar, en un conjunto de moléculas provenientes de una biblioteca o de métodos clásicos de síntesis, cuáles son los compuestos que se unen a un receptor [11, 18].

Primero, se realiza un espectro PFG-STE de la mezcla de moléculas pequeñas en ausencia de la proteína usando gradientes de baja potencia (A). A continuación se realizan dos espectros para la misma mezcla, pero en presencia de la proteína. El primero (B), con gradientes de baja potencia y el segundo con gradientes de alta potencia (C). La sustracción B-C produce un espectro D que contiene las señales de los compuestos que no interactúan con la proteína. La resta de D-A

produce el espectro que solo contiene las señales de la o las moléculas que interactúan con el receptor. (Figura 5).

Transferencia de magnetización

Intramolecular

El efecto Overhauser nuclear transferido (TR-NOE) se utiliza para determinar la estructura tridimensional de ligandos en el sitio de reconocimiento de sus receptores y los cambios conformacionales existentes respecto a la conformación en estado libre [19]. Este método, por los motivos que veremos a continuación, es también útil para realizar el cribado de moléculas mediante RMN, con la salvedad de que su afinidad por el receptor tiene que ser débil o moderada. Si consideramos una molécula de ligando (L) en equilibrio entre sus estados libre y asociada a su receptor (R). La constante de velocidad de relajación cruzada observada (σ_{obs} , básicamente, el efecto Overhauser nuclear entre una pareja de protones dada) será, como siempre, un

promedio entre las velocidades de la molécula pequeña y de la macromolécula, pesadas con las fracciones molares correspondientes

$$\sigma_{obs} = \sigma_{asociado}([LR]/[LTOT]) + \sigma_{libre}(1-[LR]/[LTOT])$$

Figura 6.

El NOE (y la σ) está también íntimamente ligado a los movimientos Brownianos de las moléculas. En el caso de moléculas pequeñas, con movimientos rápidos (tiempos de correlación en la escala de los picosegundos), los NOEs (y la σ) son positivos en experimentos NOESY (de distinto signo de los picos diagonales) con un aumento relativo de la intensidad de la señal siempre sensiblemente menor del 50%. En cambio, para macromoléculas, en las que los movimientos moleculares son muy lentos (por encima de nanosegundos), los NOEs (y la σ) son negativos (del mismo signo de los picos diagonales), pudiendo alcanzar una intensidad del -100%. Por tanto, al realizar un experimento NOESY, la existencia de NOEs negativos para moléculas orgánicas pequeñas (ligandos) en presencia de una macromolécula receptora (proteína, ácido nucleico) indica inequívocamente la existencia de interacción ligando-receptor.

Es decir, además del cambio de signo al pasar de moléculas pequeñas a grandes, la magnitud, en valor absoluto, de la σ es mucho mayor para macromoléculas. Por tanto, en un equilibrio entre estados libre y asociado, el NOE observado está dominado por la forma asociada. Es bien conocido que el espectroscopía NOESY representa la base de la determinación de la estructura 3D de macromoléculas [20]. En este sentido, el uso de NOESYs permite determinar la geometría interna de ligandos asociados a sus receptores, ya que es posible medir las distancias protón-protón, tanto intra-ligando como entre el ligando y la proteína. Así, es posible obtener datos clave para el diseño de fármacos basado en estructura. Es decir, el uso de TR-NOE permite determinar si existe

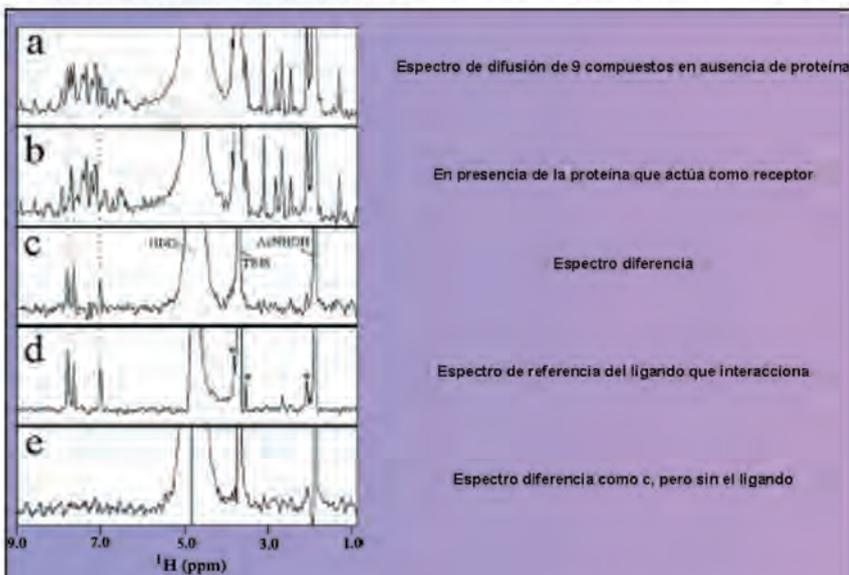


FIGURA 5. Detección de asociación intermolecular en una librería de moléculas pequeñas aprovechando la variación de la velocidad de difusión de ligandos en presencia de sus receptores, mediante el uso de experimentos de gradientes. Primero, se realiza un espectro PFG-STE (pulse field gradient-stimulated echo) de la mezcla de moléculas pequeñas en ausencia de la proteína usando gradientes de baja potencia (A). A continuación se realizan dos espectros para la misma mezcla, pero en presencia de la proteína. El primero (B), con gradientes de baja potencia y el segundo con gradientes de alta potencia (C). La sustracción B-C produce un espectro D que contiene las señales de los compuestos que no interactúan con la proteína. La resta de D-A produce el espectro que solo contiene las señales de la o las moléculas que interactúan con el receptor, formado de la referencia (1).

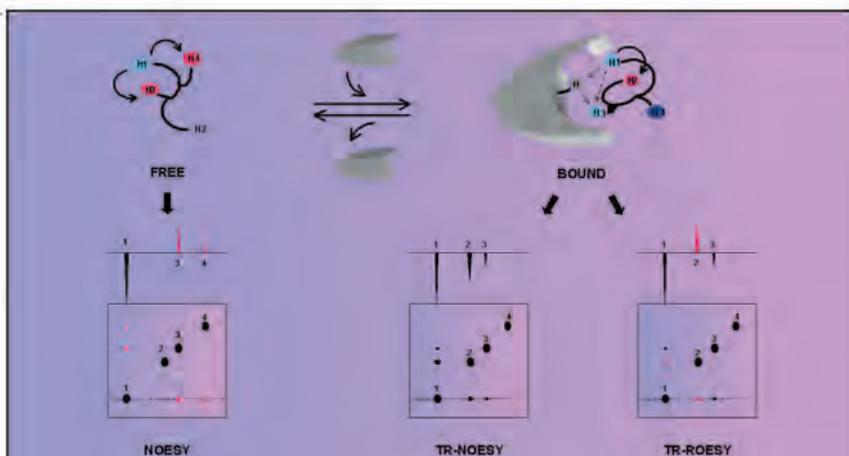


FIGURA 6. El experimento TR-NOESY proporciona información sobre la conformación asociada de un ligando en el sitio de reconocimiento de un receptor macromolecular. Las moléculas pequeñas se mueven rápidamente en disolución y, por ello, sus picos de cruce NOE son positivos (de distinto signo de los picos diagonales). Los espectros NOESY permiten deducir su conformación en estado libre. En cambio, las macromoléculas se mueven lentamente en disolución y sus picos de cruce tienen signo negativo (igual que los picos de cruce). Las moléculas pequeñas enlazadas a biomoléculas adoptan las propiedades de movimiento de sus anfitriones y, por tanto, proporcionan picos de NOE negativos, característicos de moléculas grandes. El análisis de los picos de cruce de los ligandos en presencia de sus receptores proporciona información sobre su conformación asociada. Desde un punto de vista experimental, es conveniente complementar los experimentos TRNOE con experimentos TR-ROESY, que permiten detectar la presencia de fenómenos de transferencia indirecta de la magnetización.

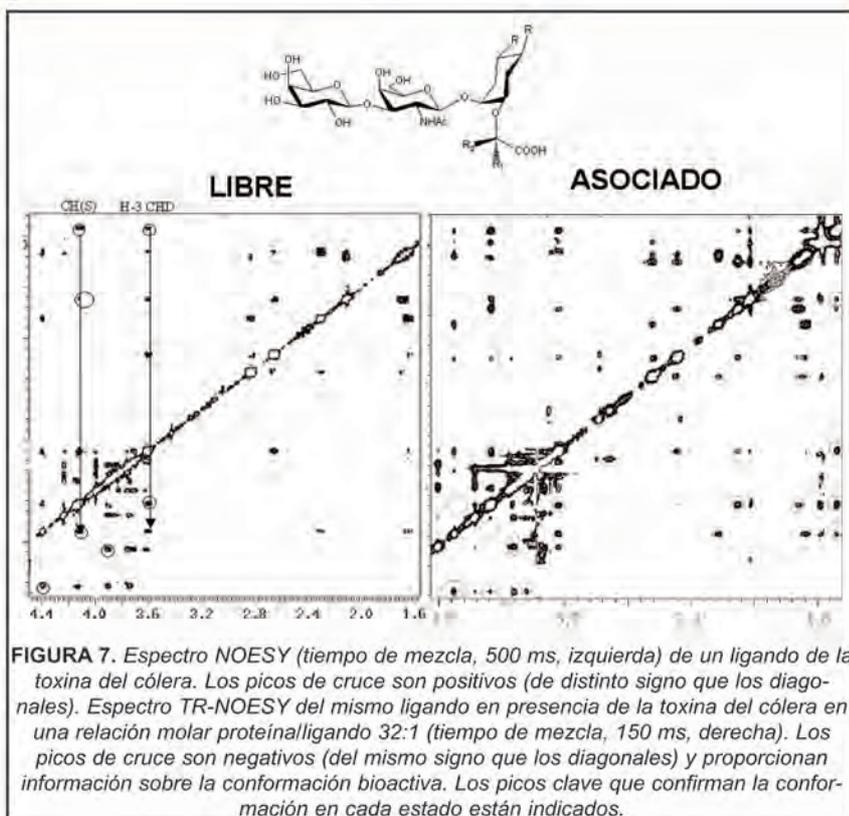


FIGURA 7. Espectro NOESY (tiempo de mezcla, 500 ms, izquierda) de un ligando de la toxina del cólera. Los picos de cruce son positivos (de distinto signo que los diagonales). Espectro TR-NOESY del mismo ligando en presencia de la toxina del cólera en una relación molar proteína/ligando 32:1 (tiempo de mezcla, 150 ms, derecha). Los picos de cruce son negativos (del mismo signo que los diagonales) y proporcionan información sobre la conformación bioactiva. Los picos clave que confirman la conformación en cada estado están indicados.

asociación y, además, identifica la estructura tridimensional del ligando en el sitio activo del receptor. En el caso de ligandos flexibles, permite determinar cuál de las conformaciones existentes en disolución es reconocida por un determinado

receptor. Como ejemplo ilustrativo, hemos demostrado que un análogo sintético de lactosa, muy flexible, es reconocido por tres proteínas diferentes (dos lectinas y una enzima) en tres conformaciones distintas [21]. Más aún, pese a la similitud

estructural, en algunos casos, la conformación asociada del análogo es distinta a aquella del compuesto natural [22]. Este hecho evidencia la importancia del conocimiento de la conformación bioactiva para el diseño racional de fármacos.

En el caso de una mezcla de moléculas pequeñas, también puede usarse como método de cribado, ya que los picos de cruce NOESY de aquellas moléculas que sean asociadas por el receptor cambiarán de signo (de positivo a negativo), mientras que las moléculas no reconocidas darán lugar a picos de cruce del mismo signo positivo en ausencia y presencia del receptor [23]. (Figura 7)

Intermolecular

Transferencia de Saturación

Estos experimentos son posiblemente los más adecuados para realizar el cribado de moléculas mediante RMN. Son muy simples de implementar y realizar ya que se aplica una radiofrecuencia selectiva de baja potencia a algunos protones del receptor (en una región en la que no haya señales de los protones del ligando o ligandos potenciales). En macromoléculas, la transferencia de magnetización es muy eficiente (directamente proporcional al tamaño de la misma, más correctamente al tiempo de correlación, τ_c) y, por tanto, los efectos de la radiofrecuencia aplicada se expanden a lo largo de la proteína, alcanzando también el sitio de reconocimiento de ligandos [24]. En estas condiciones, cualquier ligando que interactúe con este sitio también sentirá los efectos de la radiofrecuencia, con la consiguiente perturbación de las intensidades de sus señales de RMN. Evidentemente, en una mezcla de ligandos, solamente verán afectadas sus intensidades aquellos que interactúen con el receptor, por lo que el método es útil.

En realidad, desde un punto de vista experimental, la mejor manera de detectar las variaciones de intensidad del ligando o de la mezcla de

ligandos es realizando experimentos de diferencia de saturación (STD, *saturation transfer difference*) en una muestra que contiene un gran exceso de ligando frente a proteína (ca. 50-100:1). En un experimento A se realiza la saturación selectiva de algunos protones de la proteína, típicamente en la región aromática o en la región alifática de campo alto (ca -2 ppm), donde no existan protones de las moléculas pequeñas. En un experimento B se aplica la saturación en una región donde no hay protones ni del receptor ni del ligando (ca 30 ppm). El espectro STD, que es la resta de los espectros A-B, contiene solamente las señales de las moléculas que interactúan con la proteína. Las señales anchas (R_2 muy grande) del receptor pueden eliminarse fácilmente mediante el uso de un filtro de relajación transversal (*spin lock*), como se describió anteriormente en el apartado de relajación.

Este método se ha utilizado para determinar afinidades absolutas y relativas mediante experimentos de competición y de titulación. Pero quizá, un aspecto más elegante del método STD es que también permite conocer la región del ligando que está en contacto más íntimo con el receptor (el epitopo) [25]. Eligiendo adecuadamente la duración del pulso de saturación y cuantificando los distintos aumentos de intensidad de los diferentes protones del ligando, es posible conocer qué región de éste, siente antes la perturbación que proviene del receptor y por tanto, cuál es la región en contacto directo con la macromolécula.

Como ejemplo de la importancia de conocer la conformación bioactiva de un ligando, así como su zona de interacción, la combinación de TR-NOESY y STD y métodos de modelización molecular nos ha permitido recientemente diseñar y evaluar positivamente familias de glicomiméticos muy simples, capaces de mimetizar, muy eficientemente, la interacción del gangliósido GM1 (un glicolípido pentasacárido) con la toxina del cólera. (Figura 8) (Figura 9).



FIGURA 8. El experimento de diferencia de transferencia de saturación (STD) permite determinar la existencia de asociación de un ligando a un receptor en disolución. Puede aplicarse tanto a ligandos individuales como a una mezcla compleja de varios. El experimento es muy simple y consiste en la aplicación de un tren de pulsos selectivos a una región del espectro en el que no existen señales de RMN de los posibles ligandos. Por ejemplo, la región aromática (ca. 7-8 ppm) o la alifática de muy alto campo (ca. -1 ppm). La saturación se mantiene durante un determinado periodo de tiempo (de centenas de milisegundos a unos pocos segundos) y en este intervalo, la magnetización se transfiere a través del espacio a todos los protones de la proteína. Si un ligando interactúa con la proteína, sus protones también sentirán la transferencia desde los núcleos del polipéptido y, por tanto, se afectarán sus intensidades. Si el experimento STD se realiza con una biblioteca de moléculas pequeñas, solamente se afectarán las señales de RMN de aquellas que interactúen con el receptor. Desde un punto de vista experimental, el experimento se realiza en el modo de diferencia. Es decir, al espectro resultante de la saturación mencionada antes, se le resta el obtenido mediante saturación en una región del espectro sin señales (ca. 40 ppm). El espectro diferencia sólo muestra las señales de los ligandos que interactúan con el receptor. Además, dependiendo del tiempo de saturación y de la velocidad de disociación del complejo, los protones del ligando que mostrarán mayor transferencia de saturación serán aquellos que estén más cerca de los protones del receptor, lo que puede permitir deducir el epitopo del ligando.

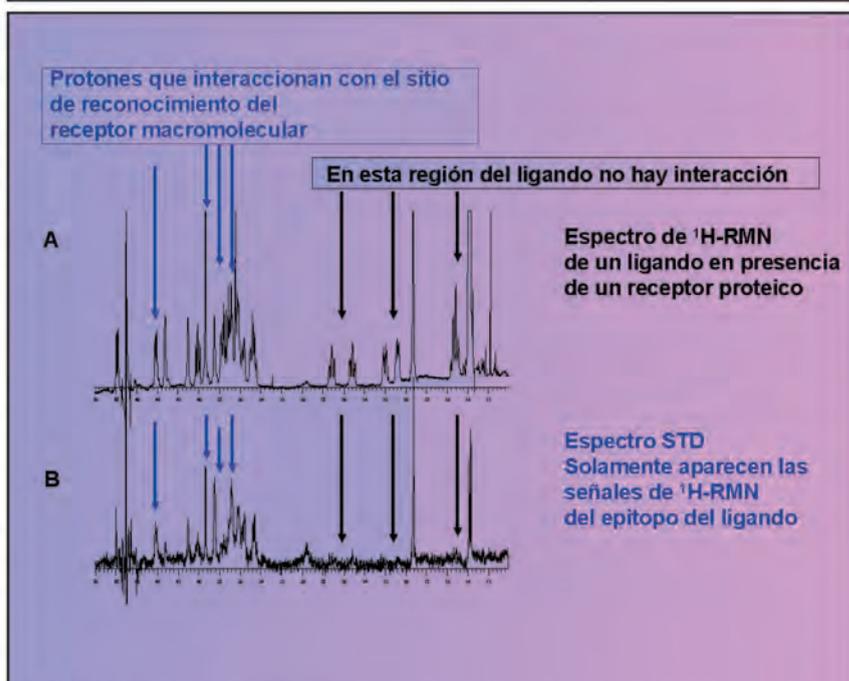


FIGURA 9. Experimento STD (600 ms de tiempo de saturación) realizado para el ligando de la Figura 7 en presencia de la toxina del cólera en una relación molar proteína/ligando 32:1. En estas condiciones, es posible deducir el epitopo del ligando. Es decir, aquellos protones del mismo que están más próximos a la proteína.

WaterLOGSY

El método waterLOGSY (*water ligand observed via gradient spectroscopy*) utiliza la señal intensa del agua del medio para transferir magnetización al ligando por medio del complejo proteína/ligando [26]. Puesto que los ligandos libres también están solvatados, también sienten la perturbación, pero en el waterLOGSY, los picos de RMN de los ligandos libres son de signo diferente de los de los ligandos asociados. De nuevo, este hecho tiene que ver con los signos negativos de los efectos Overhauser nucleares para macromoléculas o complejos agua/proteína/ligando y positivos para ligandos pequeños o asociaciones intermoleculares agua/ligando.

Es conocido que en muchos complejos proteína/ligando, existen moléculas de agua que unen el ligando a la proteína. Además, existen otras moléculas de agua que ocupan sitios amfífilos en las proximidades del sitio de unión, con tiempos de residencia que oscilan entre los centenares de microsegundos a los nanosegundos. Puesto que el paso de NOEs positivos a negativos a una frecuencia de 500 MHz se produce para un tiempo de correlación del orden de 350 ps (la condición de NOE cero viene dada por el producto de frecuencia del espectrómetro por el tiempo de correlación de la molécula o complejo, $\omega\tau_c$ de ca 1.1), la perturbación de las señales del agua producirá NOEs intermoleculares agua-receptor de signo negativo. También se perturbarán las señales intercambiables de los protones de las cadenas laterales de la proteína: amonio, guanidinio, hidroxilo, etc, debido al intercambio químico con el agua y produciendo picos de intercambio, también negativos. Estas perturbaciones se transmiten a los ligandos en contacto con el receptor vía NOE, manteniendo el signo negativo en el pico del ligando. Los ligandos no asociados, solvatados en menor extensión con moléculas de agua con tiempos de residencia del orden de decenas de picosegundos o menores, darán

lugar a picos débiles y positivos, con lo que en una mezcla de moléculas pueden diferenciarse fácilmente los ligandos de los que no lo son. El waterLOGSY también se ha empleado cuantitativamente en experimentos de competición para determinar afinidades relativas [27].

Bombeo de NOE

El método de bombeo de NOE es una técnica en la que se produce transferencia de magnetización desde el receptor al ligando [28]. La diferencia respecto al STD es que en el bombeo de NOE se introduce un filtro de difusión que elimina la magnetización de todas las moléculas pequeñas (véase arriba en difusión), preservando la del receptor antes de la generación de NOE. Sin embargo, durante el tiempo de mezcla del NOESY, tiene lugar transferencia de magnetización intermolecular desde el receptor a las moléculas pequeñas que se asocian a él y solamente a ellas. Por tanto, las señales de los ligandos aparecen en el espectro de bombeo de NOE, mientras que las de las moléculas que no son ligandos no son visibles. Existe un método alternativo, que se basa en la transferencia desde el ligando al receptor, que se denomina bombeo de NOE reverso [29].

MÉTODOS DE RMN QUE PERMITEN DETECTAR LA EXISTENCIA DE INTERACCIÓN SIGUIENDO LAS SEÑALES DEL RECEPTOR

Perturbaciones de desplazamiento químico

El desplazamiento químico (δ) de un núcleo dado es una medida de la dependencia de su frecuencia de resonancia del entorno químico. Obviamente, la existencia de interacción entre un ligando y un receptor altera el entorno químico de ambos y, por tanto, perturba los δ de todos los núcleos activos a la RMN (^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{31}P , ..., etc), especialmente en el sitio de reconocimiento y en sus alrededores. Estas variaciones de δ pueden evaluarse mediante méto-

dos mono o bidimensionales (COSY, TOCSY, HSQC). La mera existencia de variaciones de δ es ya un indicio de la existencia de interacción, incluso sin el conocimiento de a qué núcleos corresponden los picos cuyo δ varía. Sin embargo, si se conocen las asignaciones de los picos del receptor, las perturbaciones en δ de dichos picos al añadir el ligando permiten identificar, de manera inequívoca, el sitio de reconocimiento del receptor. Más aún, es posible seguir las variaciones de δ de los picos del receptor en función de la concentración del ligando en experimentos de titulación [30]. Así, si la constante de velocidad de disociación es rápida en la escala de tiempos de los δ , es así posible determinar la constante de disociación del complejo (K_d), ya que el δ observado en cada punto de la titulación es función de las fracciones molares de receptor libre y asociado, de los δ en los estados libre y asociado, y de dicha K_d . (Figura 10) (Figura 11).

Diseño de fármacos mediante RMN: SAR BY NMR, SHAPES, SOLVE-NMR

Un método de diseño de fármacos basado en RMN está basado en perturbaciones de desplazamiento químico. El método relación estructura-actividad mediante resonancia magnética nuclear (*SAR by NMR*) [33] ha encontrado una amplia aplicación en algunas empresas farmacéuticas. Una representación esquemática del método se da en la figura. Primero se realiza la asignación de las señales del espectro ^1H - ^{15}N HSQC del receptor. Este análisis, que es la base del cribado de moléculas, es la primera fase del *SAR by NMR*, y requiere cierta experiencia en RMN de proteínas. La unión de ligandos se detecta mediante perturbaciones de δ . Es decir, se comparan los HSQC de la proteína en presencia y ausencia de ligandos. Esta fase puede realizarse usando mezclas de 10 ó más moléculas pequeñas simultáneamente. Las mezclas que contienen ligandos reales se analizan posteriormente para identificarlos y se optimiza la estructura del ligando

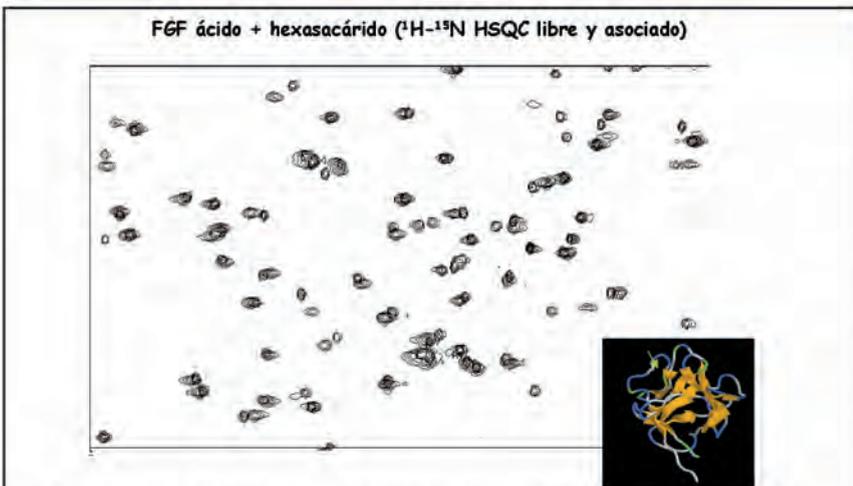
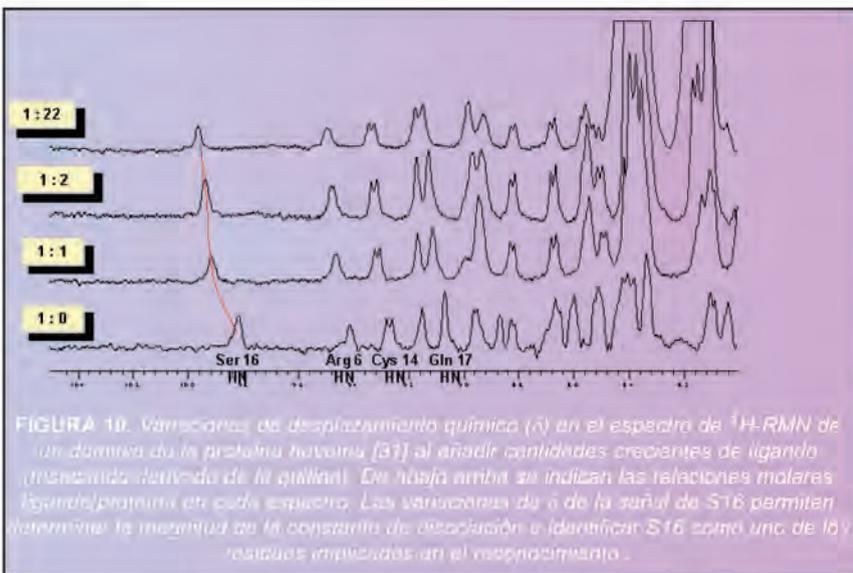
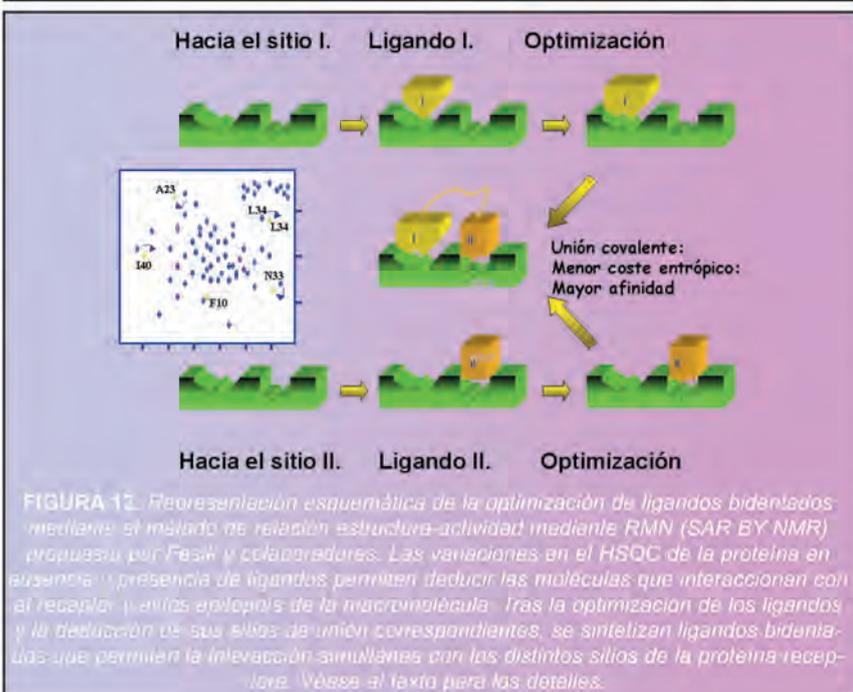


FIGURA 11. Variaciones de δ en el espectro de correlación HSQC ^1H - ^{15}N del factor ácido de crecimiento de fibroblastos humano en ausencia y presencia de ligando (hexasacárido análogo de la heparina). Las variaciones de δ de las parejas N-H de algunos aminoácidos permiten determinar el sitio de reconocimiento [32].



que produce una mayor afinidad a partir de aquellos identificados. Evidentemente, el lugar de perturbación de la proteína se caracteriza, ya que se conoce cuáles son los picos de cruce ^1H - ^{15}N que modifican su δ . A continuación, se identifican otros ligandos que se unen a otra región de la proteína. Es decir, se buscan ligandos que perturben los δ de otros picos de cruce en el HSQC, se detectan y se optimizan. A continuación, usando síntesis orgánica, las dos moléculas que se asocian a las diferentes regiones de la proteína se unen mediante un espaciador, formando un ligando bidentado, que mantiene las orientaciones especiales de los dos ligandos aislados y su posición respecto a la proteína. De esta manera, se minimizan los efectos entrópicos de la asociación supramolecular y se obtiene un ligando de afinidad muy alta. (Fig. 16) Se ha descrito que usando este método se han cribado más de mil moléculas pequeñas (de peso molecular entre 100 y 300 D) en unas pocas horas, usando una concentración 0.3 mM de proteína [34]. El principal inconveniente es la necesidad de marcaje isotópico de la proteína. Como variante del método, también se ha descrito el uso de marcajes isotópicos parciales, especialmente con ^{13}C en algunos o todos los grupos metilo de las cadenas laterales de las proteínas [35]. (Figura 12).

Otro método que utiliza RMN para el diseño de fármacos es SHAPES [36], que usa métodos de detección de afinidad basados en observar las señales del ligando, principalmente STD. El punto de partida es el uso de una o varias bibliotecas de gran diversidad estructural, basadas en fragmentos comunes en fármacos existentes. Una vez detectado un ligando, este se optimiza mediante métodos de química médica, en ocasiones apoyados por técnicas de cribado virtual. Por supuesto, la combinación SAR by NMR/SHAPES también se ha aplicado con éxito, evitando la necesidad de marcaje isotópico de la proteína.

Finalmente, el método NMR-SOLVE

[37] se ha aplicado para detectar ligandos capaces de interactuar con una familia de receptores estructuralmente relacionados. Está basado en un etiquetado con ^{15}N ó ^{13}C parcial y fundamentalmente, se ha aplicado al cribado de moléculas frente a receptores que tienen un sitio de unión común y otro variable.

Un resumen de las condiciones experimentales y de los requerimientos para el uso de la RMN en cribado y análisis de interacciones entre ligandos pequeños y receptores biomoleculares se dan en la **Tabla 1**.

PERSPECTIVAS

En este artículo no he pretendido ser exhaustivo, sino simplemente exponer los conceptos subyacentes en la aplicación de la RMN al estudio entre interacciones entre moléculas. No cabe duda que el acceso a espectrómetros de mayor campo, la posibilidad de utilizar receptores muy grandes, incluso células enteras, el desarrollo de los métodos automatización, la accesibilidad a las sondas criogénicas, que permiten aumentar extraordinariamente la sensibilidad de los experimentos, junto con el desarrollo de nuevos métodos permitirán expandir el ámbito de aplicación de

la RMN en este campo. No cabe duda de que la RMN ya es parte esencial en el diseño racional de fármacos basado en el conocimiento de la estructura.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco especialmente a Javier Cañada, Juan Luis Asensio y a todos los miembros de nuestro grupo, pasados y actuales, que han contribuido a nuestra investigación, así como a nuestros colaboradores en España y en el exterior, cuya ayuda ha sido siempre inestimable y cuyos nombres están en las referencias citadas a continuación.

REFERENCIAS

- [1] Por ejemplo, véase NMR Spectroscopy of Glyconjugates. J. Jiménez-Barbero y T. Peters, Eds. Wiley-VCH, Weinheim, 2002
- [2] BioNMR in Drug Research. O. Zerbe, Ed. Wiley-VCH, Weinheim, 2002
- [3] B. J. Stockman, C. Dalvit, Prog. NMR Spectroscopy, 41 (2002) 187-231
- [4] M. Pellecchia, D. S. Sem, K. Wüthrich, Nature Reviews. Drug Discovery, 1 (2002) 211-219
- [5] T. Peters, B. Meyer, Angew. Chem. Int. Ed. 42 (2003) 864-890
- [6] R. C. Anderson, M. Lin, M.J. Shapiro, J. Comb. Chem. 1 (1999) 69-78
- [7] H. Kogelberg, D. Solís, J. Jiménez-Barbero, Curr. Opin. Struct. Biol. 13 (2003) Octubre
- [8] (a) A. Bernardi, D. Potenza, A. M. Capelli, A. García-Herrero, F. J. Cañada, J. Jiménez-Barbero, Chem. Eur. J. 8 (2002) 4597-4612. (b) A. Bernardi, D. Arosio, L. Manzoni, D. Monti, H. Posterl, D. Potenza, S. Mari, J. Jiménez-Barbero, Org. Biomol Chem. 1 (2003) 785-792
- [9] M. A. Canales, J. Jiménez-Barbero, en preparación
- [10] A. H. Siriwardena, F. Tian, S. Noble, J. H. Prestegard, Angew. Chem. Int. Ed. 41 (2002) 3454-3457
- [11] P. J. Hajduk, E. T. Olejniczak, S. W. Fesik, J. Am. Chem. Soc. 119 (1997) 12257-12261
- [12] W. Jahnke, S. Rudisser, M. Zurini, J. Am. Chem. Soc. 123 (2001) 3149-3150
- [13] N. U. Jain, A. Venot, K. Umemoto, H. Leffler, J. H. Prestegard, Protein Sci. 2001, 10, 2393-2400.
- [14] L. M. Mikkelsen, M. J. Hernáiz, M. Martín-Pastor, T. Skrydstrup, J. Jiménez-Barbero, J. Am Chem Soc 2002, 124:14940-14951.
- [15] M. Delfini, G. Gianferri, V. Dubbini, C. Manetti, E. Gagelli, G. Valensin, J. Magn. Reson. 144 (2000) 129-135.
- [16] C. S. Johnson Jr. Prog. NMR Spectrosc. 34 (1999) 203-284.
- [17] M. Lin, M. J. Shapiro, J. R. Wareing, J. Am. Chem. Soc. 119 (1997) 5249-5357.
- [18] Para una visión completa de medidas de difusión por RMN y sus aplicaciones, véase el suplemento monográfico de Magn. Reson. Chem. 40 (2002) del mes de diciembre.
- [19] A. Poveda, J. Jiménez-Barbero, Chem. Soc. Rev. 27 (1998) 133-143
- [20] Ernest Giralto proporciona una perspectiva de las aplicaciones de la RMN para la determinación de la estructura de biomoléculas, en este mismo número de Anales de Química.
- [21] (a) J. F. Espinosa, J. L. Asensio, J. Cañada, M. Martín-Pastor, H. Dietrich, M. Martín-Lomas, R. R. Schmidt, J. Jiménez-Barbero, J. Am. Chem. Soc., (1996) 118, 10862-10871. (b) J. F. Espinosa, E. Montero, A. Vian, J. L. García, H. Dietrich, R. R. Schmidt, M. Martín-Lomas, A. Imberty, J. Cañada, J. Jiménez-Barbero J. Am Chem Soc. (1998) 120, 1309-1316. (c) J. L. Asensio, J. F. Espinosa, H. Dietrich, J. Cañada, R. Schmidt, M. Martín-Lomas, S. André, H. Gabius, J. Jiménez-Barbero J. Am. Chem. Soc., (1999) 121, 8995-9000
- [22] (a) J. F. Espinosa, J. L. Asensio, J. Cañada, H. Dietrich, M. Martín-Lomas, R.R. Schmidt, J. Jiménez-Barbero Angew. Chem. Int. Edit. (1996) 35, 303-306 (b) A. García-Herrero, E. Montero, J. L. Muñoz, J. F. Espinosa, A. Vian, J. L. García, J. L. Asensio, F. J. Cañada, J. Jiménez-Barbero, J. Am Chem Soc 2002, 124, 4804-4810.
- [23] D. Henrichsen, B. Ernst, J. L. Magnani, W. T. Wang, B. Meyer, T. Peters, Angew. Chem. Int. Edit. (1999) 38, 98-101
- [24] M. Mayer, B. Meyer Angew. Chem Int Ed 1999, 38:1784-1788.
- [25] M. Mayer, B. Meyer J Am Chem Soc 2001, 123:6108-6117.
- [26] C. Dalvit, P. Pevarello, M. Tato, M. Veronesi, A. Vulpetti, M. Sündstrom, J. Biomol. NMR 18 (2000) 65-72.
- [27] C. Dalvit, G. P. Fogliatto, A. Stewart, M. Veronesi, B. Stockman,

REFERENCIAS

- [28] A. Chen, M. J. Shapiro, J. Am. Chem. Soc. 120 (1998) 10258-10259
- [29] A. Chen, M. J. Shapiro, J. Am. Chem. Soc. 122 (2000) 414-415
- [30] Por ejemplo, véase: J. L. Asensio, F.J. Cañada, M. Bruix, A. R. Romero, J. Jimenez-Barbero, *Eur. J. Biochem.* (1995) **230**, 621-633
- [31] J. L. Asensio, F. Cañada, H. C. Siebert, J. Laynez, A. Poveda, J. Beintema, H. J. Gabius, J. Jiménez-Barbero, *Chemistry and Biology*, 7: (2000), 529-543
- [32] Resultados sin publicar
- [33] S. B. Shuker, P. J. Hajduk, R. P. Meadows, S. W. Fesik, *Science*, 1996, 274, 1531-1536.
- [34] P. J. Hajduk, S. W. Fesik, et al., *J. Med. Chem.* 42 (1999) 2315-2317
- [35] P. J. Hajduk, S. W. Fesik, et al., *J. Am. Chem. Soc.* 122 (2000) 7898-7904
- [36] J. Fejzo, C. A. Lepre, J. W. Peng, G. W. Bemis, M. A. Ajay, J. M. Murcko, J. M. Moore, *Chemistry and Biology*, 6: (1999), 755-762.
- [37] M. Pellecchia et al., *J. Biomol NMR* 22 (2002) 166-173.