

# Modelado Molecular en el Descubrimiento de Fármacos Multidiana

## Molecular Docking in the Discovery of Multitarget Drugs

Cristina Font Mate

Tutor:

Giorgio Giorgi

Universidad Complutense de Madrid

### Resumen

Alzheimer y Parkinson son dos ejemplos de trastornos neurodegenerativos del sistema nervioso central (SNC), caracterizados por un proceso crónico y selectivo de muerte neuronal, con alteraciones de los movimientos, déficit cognitivo y demencia. Se ha demostrado que la inhibición de la Rho-kinasa (ROCK) en el SNC promueve la reparación de los tejidos alterados en Alzheimer, y en Parkinson protege las neuronas dopaminérgicas y mejora las capacidades de movimiento. Además, la inhibición de la MAO (monoaminoxidasa) incrementa indirectamente la transmisión dopaminérgica, esencial en el tratamiento del Parkinson, y reduce la formación de peróxidos, responsables del estrés oxidativo celular a nivel de sustancia nigra (responsable de la neurodegeneración). Uno de los retos actuales, es la obtención de fármacos multidiana, capaces de interactuar con más de una macromolécula y cuyo efecto farmacológico sea aditivo o sinérgico. Por eso, nos planteamos diseñar un fármaco multidiana capaz de inhibir ROCK y MAO. Para ello, decidimos unir al fasudil, un potente inhibidor de la ROCK, un sustituyente propargílico, fragmento farmacóforo de algunos inhibidores suicidas de la MAO. Antes de plantear la síntesis química, decidimos emplear el *docking* molecular, una técnica computacional que permite estudiar la interacción entre un ligando y un receptor, mediante el estudio de las energías de enlace entre ambas moléculas. A través de esta técnica, se comparó la interacción del fasudil-propargilo con la interacción de fasudil con ROCK, clorgilina con MAO A y rasagilina con MAO B. En todos, el fármaco multidiana resultó tener una afinidad comparable o mejor que la del fármaco de referencia.

*Palabras clave:* fármaco multidiana, MAO, modelado molecular, ROCK.

### Abstract

The Alzheimer's and Parkinson's diseases are two examples of neurodegenerative disorders of the central nervous system (CNS) characterized by a chronic and selective process of neuronal death manifested by alterations of movement, cognitive deficit and dementia. The inhibition of Rho-kinase (ROCK) in the CNS has been shown to promote the repair of altered tissues in Alzheimer's disease, and protects dopaminergic neurons and improves movement abilities in Parkinson's disease. In addition, the inhibition of MAO (monoamine oxidase) leads indirectly to an increase in the dopaminergic transmission which is essential to the treatment of Parkinson's, and reduces the formation of peroxides responsible for the formation of free radicals and cellular oxidative stress at the level of Substance nigra (responsible for neurodegeneration). One of the challenges of today is the production of multidiana drugs capable of interacting with more than one macromolecule, whose pharmacological effect is derived from their interaction in an additive or synergistic way. Therefore, this study aims to design a multidiana drug capable of inhibiting both ROCK and MAO. To do this, the Fasudil, a potent inhibitor of ROCK, a propargylic substituent, and a pharmacophore fragment of some MAO suicide inhibitors, such as clorgiline and rasagiline were binded. Before proposing the chemical synthesis, a molecular docking, a computational technique that allows to study the interaction between a ligand and a receptor by studying the binding energies between both molecules was used. Through this technique, the interaction of fasudil-propargyl with the interaction of fasudil with ROCK, clorgiline with MAO A and rasagiline with MAO B was compared. In all three cases, the multidose drug was found to have a comparable affinity, better than that of the reference drug.

*Keywords:* MAO, molecular docking, multi-target drug, ROCK.

---

Trabajo presentado en las XII Jornadas Complutenses, XI Congreso Nacional de Investigación en Ciencias de la Salud para Alumnos Pregraduados y XVI Congreso de Ciencias Veterinarias y Biomédicas.

En primer lugar, quiero agradecer a Giorgio Giorgi todo el tiempo que ha dedicado en tutorizarme el trabajo y en enseñarme a realizar el *docking* molecular, así como todos sus consejos y su ayuda. También quiero agradecer a Stefania di Pede su ayuda en el manejo de los software necesarios para el *docking*.

### Introducción

El modelado molecular es una técnica computacional que permite estudiar la interacción que existe entre un fármaco y su diana, mediante el empleo de programas informáticos que representen las estructuras y comportamiento de las moléculas (Qin, Lei, Xi, Liu y Yao, 2010). Para saber si existe interacción se estudian las energías de enlace. De esta forma, permite predecir si una molécula va a unirse a un receptor, y por lo tanto si puede ser un punto de partida para el diseño de fármacos. Una opción en el diseño de fármacos es el diseño de fármacos multi-target, es decir, una única molécula que sea capaz de unirse a dos dianas distintas, de forma que tenga dos actividades farmacológicas, entre ellas complementarias (Zimmermann, Lehar y Keith, 2007).

Rho kinasa (ROCK) es una enzima de tipo serina/treonina kinasa, pertenece a la superfamilia Ras. Se conocen dos isoformas de esta enzima: ROCK 1 y ROCK 2 (Abdelhafez, Amin, Ali, Abdalla, y Batran, 2013). Estas enzimas son importantes en la regulación de la proliferación celular, la diferenciación celular, la apoptosis y transformación oncogénica (Julian y Olson, 2014). Una anormal activación de las vías de señalización de ROCK puede producir patologías cardiovasculares, neurológicas (alzheimer, parkinson, dolor neuropático, epilepsia...), fibróticas, cáncer, etc (Julian y Olson, 2014). Debido a esto son interesantes como potenciales dianas terapéuticas para el tratamiento de diferentes enfermedades, como cáncer, hipertensión, isquemia, patologías renales y patologías neurodegenerativas. **Fasudil** fue el primer inhibidor de ROCK aprobado para uso humano. Es una molécula con estructura de isoquinolin-sulfonamida (Chen et al., 2013).

La monoamino oxidasa (MAO) es una flavoenzima que contiene FAD (flavin-adenosin-dinucleotide) como coenzima (Abdelhafez et al., 2013). Cataliza la desaminación oxidativa (procesos de transferencia de un único electrón) de neurotransmisores tipo catecolamina (noradrenalina, adrenalina y dopamina) y serotonina (5-HT). Se distinguen dos isoformas: MAO A y MAO B. Los inhibidores (IMAO) de la MAO A son útiles como antidepresivos, por su incremento de la actividad adrenérgica y serotoninérgica a nivel de SNC. Mientras que los IMAO B pueden usarse como fármacos antiparkinsonianos, por su aumento de la actividad dopaminérgica. Los IMAO pueden presentar diferentes estructuras químicas, una de ellas de tipo propargilamina como por ejemplo: pargilina, selegilina, rasagilina y clorgilina.

Por un lado, los inhibidores de ROCK necesitan en su estructura un grupo sulfonilo, un anillo de isoquinolina y un grupo amino. Por otro lado, los IMAO tienen estructura de propargilamina. Sabiendo que los inhibidores de ambas enzimas comparten un grupo amino, ¿sería posible desarrollar un fármaco que sea activo frente a ambos, es decir, un fármaco multidiana? Una opción sería añadir un

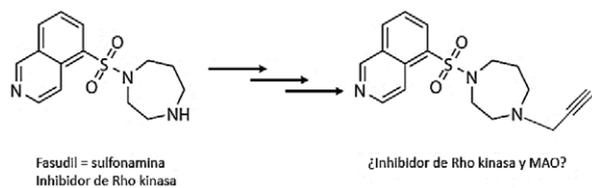


Figura 1. Diseño de un fármaco derivado del Fasudil® que sea capaz de inhibir la Rho-kinasa y la MAO.

radical propargílico en el grupo amino de la homopiperazina del Fasudil. De esta forma el compuesto tendría la propargilamina necesaria para actuar como IMAO, y el anillo de isoquinolina, el grupo sulfonilo y el grupo amino necesarios para actuar como inhibidor de ROCK. Mediante el modelado molecular se puede estudiar si la molécula derivada del fasudil(fasudil-propargilo) puede tener actividad como inhibidor de la ROCK y también de la MAO (figura 1). En este trabajo, vamos a aplicar las técnicas de modelado molecular para estudiar la interacción entre ligando y receptor.

### Material y métodos

Los software utilizados para realizar el *docking* molecular fueron: ChemSketch; AutoDockTools-1.5.6 y Chimeral.11rc.

El método seguido para llevar a cabo el modelado molecular es el siguiente:

1. Obtención de las proteínas de la base de datos **Protein Data Bank**.
2. Preparación de la proteína para el *docking*, eliminando de su estructura cristalizada, todos los componentes que no formaran parte de la propia proteína (ligando, disolvente...)
3. Búsqueda del sitio de unión ligando – proteína, es decir, conocer en qué posición interacciona el ligando con la proteína, para poder definir así el sitio de interacción, facilitando el proceso de *docking*.
4. Preparación del ligando: preparación de la molécula que va a ser utilizada posteriormente para estudiar su interacción con la proteína.
5. Generar archivo de grid: en extensión GPF (Grid Parameter File) para que luego el *docking* reconozca la región de la proteína donde estudiar la interacción
6. Generar archivo de dock: en extensión DPF (Dock Parameter File) en el que se incluyan los parámetros que deben utilizarse en el *docking*. Se realiza el *docking* en 10 conformaciones diferentes para cada ligando, de esta forma podremos ver las diferentes energía de unión en función de la conformación.
7. Ejecutar el *docking* utilizando los archivos generados anteriormente.
8. Recoger los resultados de energía de unión entre ligando y receptor.

Tabla 1

Energía de enlace (kJ/mol) entre los diferentes ligandos y enzimas utilizados en el docking.

ROCK		MAO A		MAO B	
Fasudil	Fasudil-propargilo	Clorgilina	Fasudil-propargilo	Rasagilina	Fasudil-Propargilo
-9,49	-9,62	-5,64	-8,79	-6,88	-7,7
-9,37	-8,64	-4,83	-7,71	-6,37	-7,54

## Resultados

Las enzimas utilizadas para realizar el *docking* fueron:

- PDB ID: 2ESM. Crystal Structure of ROCK 1 bound to fasudil
- PDB ID: 1S2Q. Crystal structure of MAOB in complex with N-propargyl-1(R)-aminoindan (Rasagiline)
- PDB ID: 2BXR. Human monoamine oxidase A in complex with clorgyline, crystal form A

Los resultados de energía de enlace (kJ/mol) entre ligando y receptor obtenidos tras la realización del docking son los que aparecen en la tabla 1.

## Discusión

Para realizar el *docking* seleccionamos los modelos de proteína de origen humano para poder probar así si el fasudil propargilamina es capaz de unirse a la enzima humana. Además elegimos aquellas enzimas cuya estructura había sido obtenida mediante cristalización de rayos-X, ya que así la estructura era rígida, evitando la posibilidad de movimiento que presenta la molécula en disolución. Además para saber cuál era el centro activo de la enzima, debíamos elegir la estructura que estuviera cristalizada junto con su inhibidor.

En el caso de las MAO (A y B) seleccionamos aquellas enzimas que estuvieran unidas a un inhibidor selectivo, para comprobar si había diferencia en la unión entre el fasudil propargilamina y ambas enzimas.

Para analizar los resultados seleccionamos los valores correspondientes a la conformación más estable (valor de menor energía de enlace) y a la conformación menos estable (valor de mayor energía de enlace).

En el caso de la unión entre MAO B y el fasudil-propargilo descartamos los valores de las 3 conformaciones de menor estabilidad, ya que entre la conformación nº 7 y la nº 8 existe un gran salto en la energía de unión (-7,54 / -3,56). De esta forma consideramos el valor de mayor energía el de -7,54.

Tras realizar el *docking* y analizar los resultados obtenidos se observa que para las 3 enzimas, la energía de enlace disminuye al unirse al fasudil propargilamina respecto a la energía de enlace que se obtiene al unirse a su inhibidor. Esto significa que el fasudil propargilamina tiene mayor ca-

pacidad para unirse al centro activo de dichas enzimas, con mayor fuerza que los inhibidores que se utilizan actualmente, lo que puede suponer una mayor eficacia.

## Conclusiones

El fasudil propargilamina tiene capacidad de unirse a ROCK, MAO A y MAO B, por lo que habría que hacer otros estudios que confirmen que esta unión presenta actividad biológica, como ensayos de inhibición enzimática *in vitro*. Si dichos ensayos confirman la actividad inhibitoria de fasudil propargilamina habría que realizar otros estudios de seguridad, toxicidad, farmacocinética, farmacodinamia etc.

Por tanto, el fasudil propargilamina podría suponer un avance terapéutico en el tratamiento de patologías neurodegenerativas como alzheimer o parkinson.

## Referencias

- Abdelhafez, O. M., Amin, K. M., Ali, H. I., Abdalla, M. M., & Batran, R. Z. (2013). Monoamine oxidase A and B inhibiting effect and molecular modeling of some synthesized coumarin derivatives. *Neurochemistry International*, 62, 198-209. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.11.005>
- Chen, M., Liu, A., Ouyang, Y., Huang, Y., Chao, X., & Pi, R. (2013). Fasudil and its analogs: A new powerful weapon in the long war against central nervous system disorders? *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 22(4), 537-550. <https://doi.org/10.1517/13543784.2013.778242>
- Julian, L., & Olson, M. F. (2014). Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK): Structure, regulation, and functions. *Small GTPases*, 5, e29846. <https://doi.org/10.4161/sgtp.29846>
- Qin, J., Lei, B., Xi, L., Liu, H., & Yao, X. (2010). Molecular modeling studies of Rho kinase inhibitors using molecular docking and 3D-QSAR analysis. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45, 2768-2776. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.02.059>
- Zimmermann, G. R., Lehár, J., & Keith, C. T. (2007). Multi-target therapeutics: When the whole is greater than the sum of the parts. *Drug Discovery Today*, 12(1-2), 34-42. <http://doi.org/10.1016/j.drudis.2006.11.008>