

Espectroscopía RMN de Diferencia de Transferencia de Saturación (STD NMR). Aplicaciones en Química del Reconocimiento Molecular

Jesús Angulo, Pedro M. Nieto

Resumen: La espectroscopía RMN de Diferencia de Transferencia de Saturación (STD NMR) constituye una de las aproximaciones de RMN más potentes para detectar y caracterizar interacciones receptor-ligando en disolución, observando las señales de la molécula pequeña (ligando), que presentan propiedades espectroscópicas apropiadas para estudios a alta resolución, con independencia del tamaño del receptor. Tras poco más de una década transcurrida desde sus inicios, la técnica ha alcanzado su madurez, mostrando unas elevadas robustez y utilidad. El presente artículo pretende hacer una revisión general del estado actual y futuras evoluciones de esta potente técnica espectroscópica en el marco de la química del reconocimiento molecular.

Palabras clave: Reconocimiento Molecular, Espectroscopía RMN, STD NMR, Interacciones Receptor-Ligando.

Abstract: Saturation Transfer Difference spectroscopy (STD NMR) is one of the most powerful NMR approaches to detect and characterize receptor-ligand interactions in solution, by observing the signals of the small molecule (ligand), that exhibit proper spectroscopic properties for high resolution studies, independently of the receptor size. Roughly one decade after its introduction, the technique has reached maturity, demonstrating high robustness and usefulness. The present article aims to review the present status as well as the future evolution of this powerful technique in the framework of molecular recognition chemistry.

Keywords: Molecular Recognition, NMR Spectroscopy, STD NMR, Receptor-Ligand Interactions.

Introducción

Las interacciones específicas entre moléculas en disolución a través de fuerzas no covalentes constituyen la base fundamental de la química del reconocimiento molecular, tanto en su vertiente biológica (química biológica) como en la puramente química (química supramolecular). En todos los casos, la especificidad del reconocimiento receptor-ligando (*host-guest*) se fundamenta en la complementariedad estructural y funcional de las moléculas (normalmente sólo parte de ellas) participantes en el equilibrio de interacción. Es, precisamente, esta complementariedad molecular la que concede un formidable potencial a la química sintética que, fundamentándose en un conocimiento estructural a nivel atómico de los procesos de reconocimiento molecular en disolución, puede aportar nuevas soluciones optimizadas en forma de modificaciones químicas, para incrementar o disminuir las afinidades entre las moléculas participantes, estableciendo el marco para el diseño racional de ligandos.

La resonancia magnética nuclear (RMN) ha demostrado, a lo largo de los años, su capacidad de aportar dicha información estructural a nivel atómico de los procesos de reconocimiento molecular en disolución, y se ha desarrollado un número significativo de experimentos, aplicados con notable éxito a diferentes sistemas, particularmente aquellos implicando interacciones receptor-ligando de interés biológico.¹ De forma muy genérica se pueden considerar dos grandes aproximaciones en espectroscopía de RMN de interacciones: (i) detección y caracterización de las señales del receptor (estrictamente necesario cuando la cinética de la interacción es lenta, $k_{off} < 1 \text{ Hz}$), y (ii) monitorización de las señales de la molécula pequeña (sólo aplicable para cinéticas rápidas).²

Entre las técnicas de RMN de observación de la molécula pequeña (ligando), particularmente una, la espectroscopía de diferencia de transferencia de saturación (STD NMR) se ha convertido en una de las más potentes, y versátiles, con una creciente aplicación tanto en investigaciones académicas como en la industria farmacéutica, en estrategias para el descubrimiento, diseño, y optimización de fármacos.^{1b,2-3} No sólo sus aplicaciones han seguido una trayectoria creciente en la década transcurrida desde su concepción inicial, sino que también lo han hecho sus evoluciones metodológicas, de forma que ha aparecido un número variado de modificaciones (bien de secuencias de pulso, bien de protocolos de medida o preparación experimental) que han incrementado de forma significativa la aplicabilidad de dicha técnica.

Desde el punto de vista espectroscópico, el experimento STD NMR es extremadamente sencillo.³ Partimos de una muestra conteniendo una baja concentración de una proteína de interés (en el orden de bajo micromolar, o alto nanomolar), en presencia de un exceso (desde 1:10 hasta 1:1000) de un conjunto de moléculas pequeñas (*pool*) del que se quieren



J. Angulo



P. M. Nieto

Instituto de Investigaciones Químicas, CSIC-US.
C/ Américo Vespucio, 49, 41092, Sevilla.
C-e: jesus@iiq.csic.es, pedro.nieto@iiq.csic.es

Recibido: 13/12/2010. Aceptado: 03/02/2011.

identificar los posibles ligandos de dicho receptor. Se realizan dos experimentos: (i) un experimento 1D ^1H NMR en condiciones de equilibrio térmico para las magnetizaciones de ^1H de todas las especies presentes, que denominamos “espectro de referencia” o “experimento *off-resonance*” (a fin de eliminar posibles artefactos, en la práctica, se aplica una radiofrecuencia similar a la del segundo experimento, pero fuera de resonancia respecto a las señales de las moléculas en la muestra); (ii) un segundo experimento 1D ^1H NMR en el que las señales ^1H de la proteína son selectivamente perturbadas (saturadas; se generan poblaciones de estados de spin de “no equilibrio”) mediante la aplicación de una radiofrecuencia de baja potencia y larga duración (en la escala de segundos) en una zona espectral conteniendo exclusivamente señales del receptor proteico (“experimento *on-resonance*”).

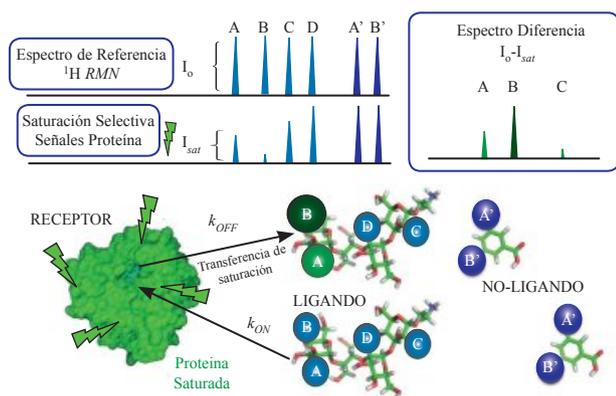


Figura 1. Representación esquemática del experimento 1D STD NMR en una muestra conteniendo proteína en presencia de un exceso de moléculas pequeñas potenciales ligandos. Se realizan dos experimentos: un 1D ^1H NMR estándar (Referencia), y un 1D ^1H NMR en el cual la proteína ha sido presaturada selectivamente. Las moléculas que interactuon con la proteína recibirán parte de dicha saturación por NOE-intermolecular en el estado enlazado. La diferencia entre ambos espectros revela exclusivamente las señales del ligando.

Aquellas moléculas pequeñas que interactuon específicamente con la proteína tendrán todos o algunos de sus núcleos ^1H a distancias muy cortas de aquellos de la proteína, durante el tiempo de residencia en el estado enlazado. A distancias ^1H - ^1H muy cortas ($d < 4\text{-}5 \text{ \AA}$), si alguno de los protones presenta magnetizaciones (poblaciones) fuera del equilibrio, tiene lugar el fenómeno de transferencia de magnetización denominado *Efecto Overhauser Nuclear (NOE)*.⁴ Así, en el experimento *on-resonance*, la saturación de los protones de la proteína hace que se produzca dicha transferencia de magnetización “intermolecular” proteína-ligando. Si la cinética del intercambio entre los estados enlazado y libre del ligando es rápida (en la escala de relajación de RMN), las moléculas de ligando con intensidades “perturbadas” se acumularán en disolución, lo que hace posible que detectemos el efecto del NOE intermolecular en las intensidades del ligando libre, que son las que se observan en el experimento. La cantidad de ligando saturado que se acumule en disolución va a depender sensiblemente, entre otras cosas (temperatura, etc...), del tiempo durante el cual se aplica el tren de radiofrecuencias para la saturación del receptor, denominado “tiempo de saturación”. Tradicionalmente, en experimentos de

cribado se ha empleado un valor de 2 s, mientras que, como se verá más adelante, para la obtención de información estructural precisa, se ha demostrado que es mucho mejor llevar a cabo una serie de experimentos STD NMR a diferentes tiempos de saturación (curva de crecimiento del STD).

Como el estado enlazado (complejo proteína-ligando) está caracterizado por un movimiento hidrodinámico global lento, típico de una molécula grande, el NOE intermolecular es de signo negativo, lo que quiere decir que se produce una reducción en las intensidades de las señales de los núcleos ^1H del ligando, en comparación con la situación en el experimento *off-resonance*, en el que no hay efecto NOE (Figura 1). Por otro lado, el resto de moléculas, que no interactuon con dicha proteína, no verán afectadas sus intensidades en el experimento *on-resonance*. De esta forma, la diferencia entre ambos espectros (*off-resonance*–*on-resonance*) llevará a una cancelación completa de las señales de las moléculas que no se asocian a la proteína, mientras que “sobrevivirán” solamente aquellas que correspondan al ligando. Por todo esto, el experimento STD NMR constituye un potente y sencillo método para poder detectar interacciones ligando-proteína en disolución, incluso en presencia de otras moléculas que no interactuon con el receptor.

Aplicaciones de la espectroscopía STD NMR

Cribado de ligandos

Los bajos requerimientos en términos de concentración de proteína, sin necesidad de marcaje isotópico, la práctica ausencia de un límite superior de tamaño del receptor, así como la eficaz cancelación de las señales del resto de moléculas presentes que no interactuon, han hecho del experimento STD NMR una potente técnica de uso en el cribado de librerías de compuestos para la interacción con una determinada diana terapéutica. Esto hace que la espectroscopía STD NMR encuentre amplia aplicación en la industria farmacéutica, en las primeras etapas de identificación y validación de moléculas líderes para las subsiguientes etapas de optimización.^{1b, 2b, 5}

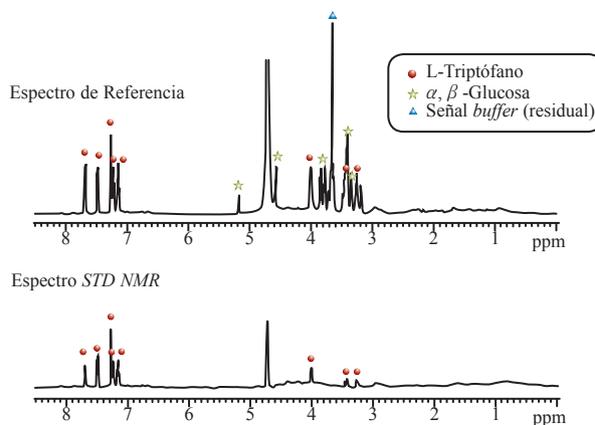


Figura 2. Cribado de ligandos por 1D STD NMR. La muestra contenía Albúmina de Suero Bovino (BSA), en presencia de un exceso del aminoácido L-triptófano, y de una mezcla de los dos anómeros (α y β) del azúcar D-glucosa. El experimento de referencia (superior) muestra las señales de todos los componentes de la muestra (la proteína prácticamente no se ve). El experimento STD NMR (inferior) revela con claridad que sólo el aminoácido interactúa con la proteína en disolución.

En la Figura 2, a modo de ejemplo didáctico, se muestra la aplicación del experimento *STD NMR* para la identificación de un ligando mediante su cribado a partir de una muestra compuesta. En este caso, el más sencillo, se trata de una muestra conteniendo el receptor (albúmina bovina, BSA), el ligando (L-triptófano), y una molécula que no interacciona (D-glucosa). El espectro *STD NMR*, registrado en menos de un minuto, permite sin ambigüedades identificar cuál es el ligando de la proteína en la muestra.

Información Estructural del Ligando: Mapa del Epítipo

De forma muy genérica, se puede considerar que la transferencia de magnetización ^1H - ^1H proteína-ligando por *NOE* intermolecular (en el estado enlazado) presenta una dependencia de la inversa de la sexta potencia de la distancia interprotónica entre dos núcleos cualesquiera (de proteína y ligando, respectivamente) considerados.⁴ Así, se puede considerar que las cantidades de saturación recibidas por los diferentes protones del ligando están íntimamente relacionadas con sus proximidades a otros protones de la proteína en el estado enlazado. Es decir, aquellas señales que presenten mayor saturación en el espectro *STD NMR* serán indicativas de aquellas regiones del ligando que presentan mayor proximidad a la superficie de la proteína en el estado enlazado (menores distancias ^1H - ^1H intermoleculares).

Una imagen más o menos semicuantitativa (aunque ciertamente más de valor cualitativo) sobre los “puntos calientes” de un determinado ligando de un receptor dado, se puede obtener

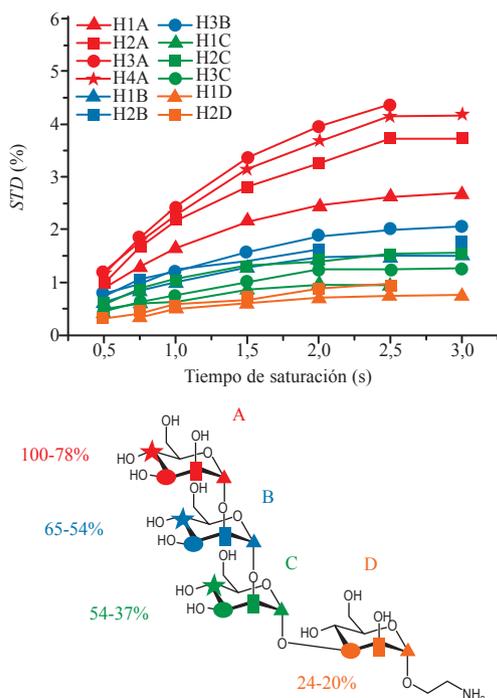


Figura 3. Mapeo del epítipo del ligando por 1D *STD NMR*. Arriba: Curvas de crecimiento de *STD* para la interacción de un tetranósidio sintético (mimético del “high-mannose” natural presente en la cubierta del VIH) con el anticuerpo humano anti-HIV-1 denominado 2G12. Abajo: mapa del epítipo por normalización de las pendientes iniciales de las curvas anteriores (ver texto). La distribución relativa de saturación indica que el ligando interacciona con la proteína a través del residuo de azúcar del extremo “no-reductor” (anillo de manosa A).⁶

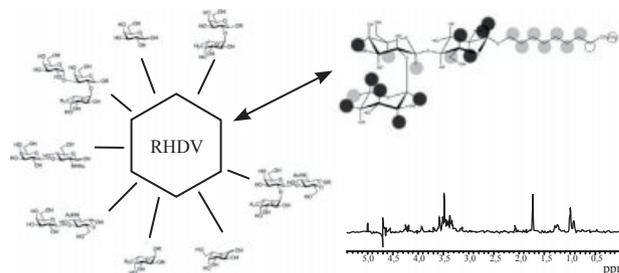


Figura 4. Estudio por *STD NMR* de las interacciones de un conjunto de ligandos tipo antígenos histológicos sanguíneos por “partículas tipo virus” (*Virus-Like Particles*, VLPs) correspondientes a la cápside del virus de la hemorragia en conejos (RHDV: *Rabbit Hemorrhagic Disease Virus*). Se determinó la importancia del residuo de L-fucosa, información clave para el desarrollo de inhibidores de entrada vírica. (Reproducido, con permiso, de Rademacher *et al.*⁸)

mediante la normalización de todas las intensidades de *STD* medidas para cada uno de los distintos protones del ligando.⁷ Así, todos los valores de *STD* se dividen por el más intenso, al cual se le asigna arbitrariamente un valor de 100%, para establecer una escala relativa de saturaciones de 0 a 100 (Figura 3).

Si el mapa del epítipo del ligando se obtiene a partir de un único experimento *STD NMR* a un determinado tiempo de saturación (p. ej., 2 s), se corre el riesgo de que pasen inadvertidos posibles artefactos como consecuencia de las diferentes “capacidades” para acumular saturación en disolución de los diferentes protones del ligando.⁹ De forma genérica, si existen diferencias significativas en los tiempos de relajación longitudinal (T_1) de los protones del ligando, a tiempos de saturación mayores que el menor T_1 se producirán sobreestimaciones en los *STD* de los protones de mayor T_1 . Así, por ejemplo, la presencia de protones aromáticos (característicamente T_1 largo) junto con protones metilénicos (T_1 corto) en un mismo ligando, podrá llevar, a tiempos de saturación largos, a un epítipo con sobreestimación de la importancia del residuo aromático del ligando en la interacción con la proteína.

Mayer y James propusieron la solución a dichos problemas: registrar curvas de crecimiento de *STD* para cada protón, y obtener la pendiente inicial de crecimiento mediante un ajuste matemático a una ecuación mono-exponencial.¹⁰ Una vez obtenidas las pendientes iniciales, el epítipo se obtiene por normalización de éstas, tal y como se indicó anteriormente (Figura 3).

La importancia y potencialidad de este experimento se puede ilustrar por el hecho de que el número y tipo de sistemas de interacción objeto de estudio por espectroscopía *STD NMR* ha ido sistemáticamente incrementándose en la primera década transcurrida desde su publicación inicial por Mayer y Meyer. Aunque inicialmente aplicado intensivamente a interacciones proteína-carbohidrato,¹¹ el experimento *STD NMR* ha sido aplicado con éxito en la caracterización de interacciones proteína-péptido,¹² microtúbulos-agentes estabilizantes,¹³ ácidos nucleicos-ligandos,^{10,14} proteína-proteína¹⁵ (mediante el uso de moléculas pequeñas “espías”), virus-ligandos,¹⁶ identificación de ligandos en sistemas combinatorios dinámicos,¹⁷ e incluso en la caracterización de procesos de autoasociación de péptidos amiloidogénicos,¹⁸ mediante la irradiación del ligando, en este caso, en lugar del receptor macromolecular.

Aparte de sistemas biológicos naturales, el concepto de la espectroscopia *STD NMR* es, en principio, aplicable a todo sistema de moléculas que interaccionen constituido por una molécula grande y otra, u otras, pequeña/s, con una cinética de intercambio rápida (en la escala de relajación de *RMN*). Así, se ha aplicado con relativo éxito al estudio de interacciones entre partículas dispersantes y pigmentos,¹⁹ o al estudio de las interacciones entre fármacos y dendrímeros (aplicados en *drug-delivery*).²⁰

Edición con isótopos

Uno de los problemas, desde el punto de vista técnico, que puede presentarse a la hora de la realización de un experimento *STD NMR* en un determinado sistema receptor-ligando, es la existencia de solapamiento continuo de señales ligando-proteína. Esto es frecuente cuando el receptor es una proteína pequeña, cuya irradiación fuera del ancho espectral típico de ligandos es ineficaz, y sólo se alcanza un nivel de saturación aceptable irradiando la zona característica de la banda intensa de los protones alifáticos, en la que no es raro encontrar señales de la/s molécula/s pequeña/s.

En estos casos, la utilización de experimentos *STD NMR* de ¹⁵N, (¹⁵N-*GS STD*) ha demostrado resolver dicho problema, si se dispone de la proteína enriquecida en dicho isótopo.²¹ Sólo los protones de amida (N-H) de la proteína son selectivamente saturados, mientras que los restantes permanecen inalterados. La irradiación directa y homogénea del receptor permite la saturación de proteínas particularmente problemáticas para *STD NMR*, por ejemplo pequeñas (< 10-15 kDa), o con elevada dinámica interna (proteínas intrínsecamente desestructuradas).²¹⁻²² Por otro lado, el marcaje con ¹³C del ligando permite la realización de experimentos de competición entre diferentes moléculas de composición química parecida, y con gran solapamiento de señales entre ellos. Así, mediante experimentos *STD NMR* editados/filtrados en el isótopo correspondiente se pueden determinar las afinidades relativas de una serie homóloga de compuestos si se dispone de uno de ellos (referencia) enriquecido en dicho isótopo (incluso una sola etiqueta es suficiente).²³ Además, la presencia de isótopos heteronucleares en el ligando puede permitir la detección de las señales de transferencia de saturación en el heteronúcleo. Esta aproximación, de importancia igualmente para señales solapadas, así como para muestras con elevado contenido de agua no deuterada residual, ha sido demostrada con éxito en experimentos *STD* detectados en ¹⁹F,²⁴ así como en ¹³C.²⁵

Finalmente, desde el punto de vista espectroscópico, otro aspecto a destacar es que la secuencia de pulsos de radiofrecuencia del experimento *STD NMR* puede considerarse como un módulo relativamente independiente que podría incluirse, como etapa de inicio, en diferentes esquemas de experimentos de *RMN* multidimensionales. Así, se han llevado a cabo estudios de espectroscopía 2D *STD NMR*, mediante experimentos *STD-TOCSY*, o *STD-HSQC*.^{2a} No obstante sus potencialidades se han visto más o menos impedidas por sus largos requerimientos en términos de tiempos de medida, lo que ha hecho que su desarrollo no haya sido el inicialmente esperado.

Experimentos con células vivas (*In-Cell STD NMR*)

Aunque las cantidades de proteína requeridas para los experimentos *STD NMR* son muy bajas, la obtención de algunas proteínas con suficiente pureza puede resultar extremadamente complicada. Esto es particularmente cierto en el caso de proteínas enlazadas a la membrana plasmática, como es el caso de algunos receptores transmembranales tipo lectina, o los receptores acoplados a proteína G (GPCRs), ambos considerados dianas de enorme importancia en el desarrollo de moléculas bioactivas (potenciales fármacos) para una diversidad de patologías. Las mayores pérdidas durante el proceso de sobre-expresión de este tipo de proteínas se producen fundamentalmente en las etapas de purificación.

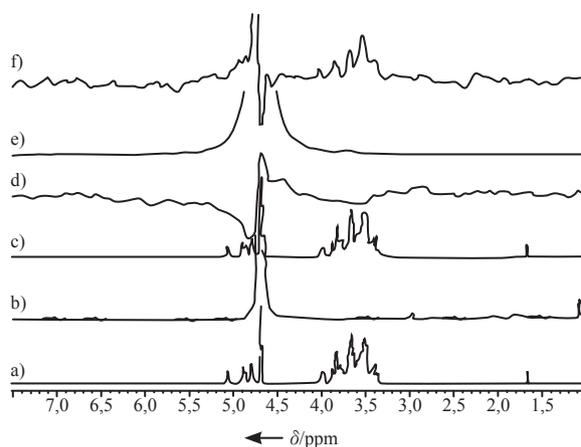


Figura 5. *STD NMR* de células vivas. Interacción del polisacárido manano con el receptor DC-SIGN sobreexpresado en células K562-CD209, detectada en el espectro f). Espectros d) y e) constituyen experimentos de control con ligando, o con las células, respectivamente. Espectros a-c) son ¹H *RMN* del ligando, de las células, y de la mezcla células-ligando, respectivamente. (Reproducido, con permiso, de Mari *et al.*²⁶)

Sin embargo hay dos aspectos muy interesantes para un uso potencial de *STD NMR* sobre células vivas, evitando dichas etapas de purificación posteriores: (i) los sitios de reconocimiento de estas proteínas están siempre orientados hacia la región externa de la membrana celular, es decir, hacia el seno de la disolución que contiene el ligando y, (ii) la célula completa (más en concreto la membrana celular) se puede considerar como un “soporte macromolecular” inerte cuyo efecto será la ralentización de los movimientos hidrodinámicos de éstas proteínas. Así, en una muestra de *RMN* conteniendo las células vivas que sobreexpresan el receptor, más el ligando de tipo molécula pequeña, se cumplirán todas las condiciones para la ejecución de experimentos *STD NMR*.

La validez de esta aproximación *in-cell* se demostró en el caso de ambos receptores, tanto de tipo lectina, como de tipo GPCR. Así, mediante *STD NMR* se pudo estudiar la interacción de oligomanósidos con la lectina DC-SIGN, directamente utilizando las células vivas con el receptor sobreexpresado en su superficie (Figura 5).²⁶ Por otro lado, se ha podido estudiar también la interacción de un pentapéptido con la integrina α IIb β 3 directamente en su entorno natural, es decir, en plaquetas humanas. Este estudio supuso, además, el desarrollo de un nuevo protocolo de utilización del experimento *STD NMR*, basado en el uso de una doble diferencia de espec-

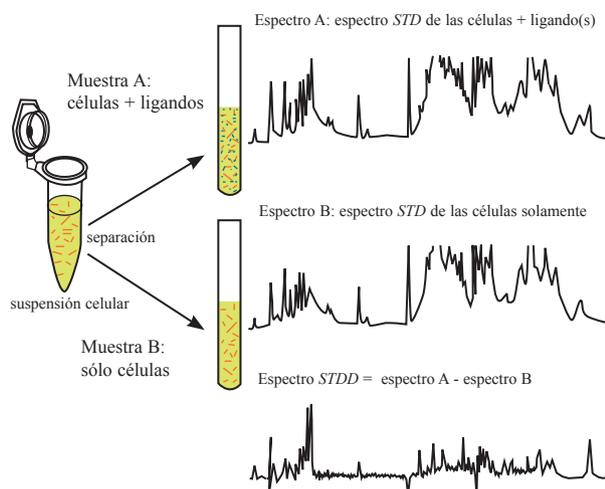


Figura 6. Representación esquemática del método *STDD-NMR*. Una suspensión celular se divide en dos muestras (A y B). El ligando se añade sólo a una muestra (A), mientras que la otra (B) contendrá sólo las células. Se registra un experimento *STD NMR* a cada muestra. El superior muestra señales de interacción del ligando con el receptor de membrana, además de otras señales que se originan por otros procesos de reconocimiento molecular ubicuos de la superficie celular. Al sustraer los dos espectros *STD*, se obtiene un espectro (inferior) que contiene solamente la información de la interacción del ligando con el receptor específico. (Reproducido, con permiso, de Claasen *et al.*²⁷)

tros *STD* (técnica denominada *STDD NMR*) de dos muestras conteniendo las células, con sólo una de ellas conteniendo el ligando (Figura 6).²⁷ Diversos trabajos posteriores han confirmado la utilidad de esta metodología.²⁸

Análisis estructural cuantitativo de complejos proteína-ligando. Teoría CORCEMA-ST

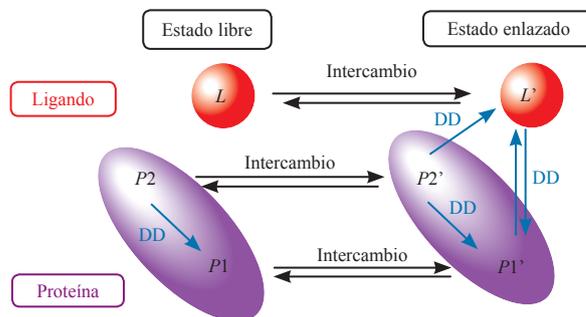
El marco teórico para el análisis cuantitativo de los experimentos *STD NMR* ha sido desarrollado en el laboratorio del Prof. N. Rama Krishna.²⁹ Éste se basa en una modificación de la teoría de la matriz de relajación completa e intercambio conformacional (CORCEMA) descrita para el análisis de experimentos de *NOE* transferido por intercambio.³⁰ La aplicación de dicha teoría a los experimentos *STD NMR* (CORCEMA-ST) permite predecir las intensidades *STD* a partir de las coordenadas cartesianas atómicas del complejo proteína-ligando. El esquema general del proceso de intercambio en CORCEMA-ST se muestra en el Esquema 1.

Dos especies moleculares (P=proteína, L=ligando) se intercambian entre los estados libre y enlazado. Los protones de la proteína son subdivididos de forma general en dos conjuntos, *P1* y *P2*. Los protones *P2* son aquellos irradiados de forma selectiva por el tren de radiofrecuencias utilizado para alcanzar la saturación, y *P1* todos los demás. En la proteína, por tanto, la saturación se origina en *P2*, por difusión de spin se extiende a todo el conjunto *P1*, y al ligando instantáneamente enlazado, el cual, por intercambio químico rápido la transfiere, y acumula, en el seno de la disolución (ligando libre). En flechas negras se muestran las etapas de transferencia de saturación por intercambio químico, mientras que en azul, aquellas que se producen por *NOE*

(relajación cruzada dipolo-dipolo, DD). Bajo el Esquema 1, las intensidades de protón observables, vienen dadas por la ecuación general:

$$I(t) = I_0 + [1 - \exp\{-(R + K)t\}](R + K)^{-1}Q$$

Donde $R+K$ es la matriz dinámica (relajación + intercambio) y Q es una matriz que cuantifica la relajación cruzada de los protones del ligando con los protones de la proteína saturados directamente por la radiofrecuencia en el experimento *on-resonance*.



Esquema 1. Modelo cinético de dos estados sobre el que se basa la formulación de la teoría CORCEMA-ST para la predicción teórica de datos de *STD*. Adaptado de la referencia 29.

Así se puede analizar, de una manera cuantitativa, la compatibilidad de un modelo molecular del complejo proteína-ligando (obtenido a partir de datos cristalográficos, o generado computacionalmente) con las intensidades observadas experimentalmente en los espectros *STD NMR* de la muestra en disolución.

En una extensión posterior del programa inicial, Rama Krishna y colaboradores³¹ demostraron que la teoría puede ser empleada para refinar la conformación del ligando enlazado. En el protocolo extendido (SICO: *STD Intensity-restrained CORCEMA Optimization*³¹), el mínimo global para la conformación enlazada del ligando se obtiene optimizando aquellos ángulos de torsión clave en la geometría del ligando, mediante la combinación de un proceso de “templado simulado” para generar diversidad de conformaciones, las intensidades *STD* teóricas (CORCEMA-ST) de éstas, y las intensidades *STD* experimentales. El resultado es aquella conformación del ligando que origina el mejor ajuste matemático con los datos experimentales, medido mediante el factor de ajuste *R-NOE*, que es la función objetivo a minimizar durante el proceso.

$$\text{Factor } -R \text{ NOE} = \sqrt{\frac{\sum W_k (STD_{\text{exp},k} - STD_{\text{cal},k})^2}{\sum W_k (STD_{\text{exp},k})^2}}$$

En esta expresión $STD_{\text{exp},k}$ y $STD_{\text{cal},k}$ son las intensidades experimentales y calculadas del protón k , respectivamente, y se introduce un factor W_k (proporcional a $1/STD_{\text{exp},k}$) que hace que el factor *R-NOE* sea sensible tanto a variaciones significativas en valores *STD* pequeños como a desviaciones en valores grandes de *STD*. En general, se puede considerar que valores inferiores a 0,2 indican que el modelo del complejo proteína-ligando considerado

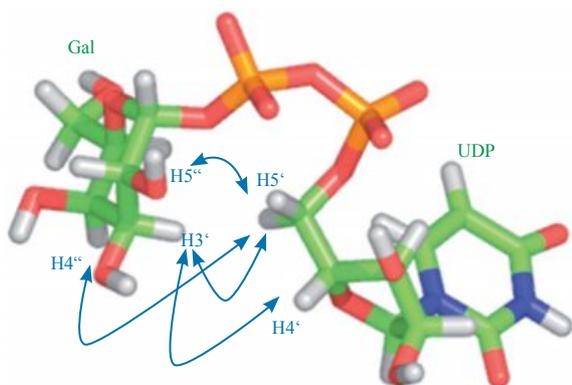


Figura 7. Conformación del nucleótido de azúcar UDP-Gal en el sitio de reconocimiento del donador de la enzima humana GTB, determinada por combinación de cálculos de *docking* molecular y cálculos CORCEMA-ST. Las flechas azules indican los contactos espaciales que se dan solamente en el estado enlazado. La comparación de los STDs teóricos con los experimentales originó un factor de ajuste, *R-NOE*, de 0,19. (Reproducido, con permiso, de Angulo *et al.*³²).

reproduce de forma excelente los datos de *STD NMR* en disolución. Es importante resaltar la importancia de disponer de datos a varios tiempos de saturación, para calcular el factor *R-NOE* global, ya que la escala de valores de este factor es difícil de racionalizar, y ajustes a un solo tiempo de saturación pueden originar artefactualmente valores aparentemente bajos.

La aplicación de la metodología CORCEMA-ST ha permitido la cuantificación a resolución atómica de epítomos de asociación de moléculas bioactivas en diversos complejos proteína-ligando de interés biológico.^{2a} En la Figura 7 se muestra la conformación del nucleótido de azúcar UDP-Gal en el sitio de reconocimiento del donador de la enzima humana galactosiltransferasa GTB, responsable de la síntesis del antígeno del grupo sanguíneo B. La determinación se basó en una combinación de datos previos de cristalografía, cálculos de homología, *docking* molecular, y datos de *RMN* (*NOE* transferido y *STD NMR* unidos a cálculos de CORCEMA-ST).³² Dicha estructura sugería un cambio conformacional significativo del ligando con respecto al estado libre, plegándose alrededor del puente pirofosfato, y estableciendo contactos entre los anillos de ribosa y galactosa (Figura 7).

Asimismo, en dicho trabajo,³² la comparación de los datos de *STD* experimentales con las predicciones teóricas de CORCEMA-ST realizadas en serie, en función de las constantes cinéticas de la interacción (k_{on} y k_{off}), permitió obtener la constante de velocidad de disociación, k_{off} , en disolución a partir de los experimentos *STD NMR*, tanto para el ligando donador como para el aceptor. Así se pudieron obtener, por primera vez, datos cinéticos de la interacción de ambos substratos de esta importante enzima, clave en la síntesis de uno de los antígenos de los distintos grupos sanguíneos (grupo sanguíneo B). Los datos confirmaron un mecanismo ordenado de asociación (primero donador, después aceptor) para la transferencia del residuo de galactosa.

Detección y caracterización de múltiples modos de asociación por *STD NMR* y CORCEMA-ST

La metodología CORCEMA-ST ha permitido también demostrar la capacidad de los experimentos *STD NMR* de detectar, y caracterizar, modos de asociación múltiples en un mismo sitio de reconocimiento. En interacciones biomoleculares transitorias (débiles), del tipo lectina-carbohidrato, es común encontrar sitios de reconocimiento en la proteína con geometrías relativamente planas, en comparación con sitios de mayor concavidad (con mayores requerimientos de complementariedad), típicamente presentes en receptores implicados en procesos de reconocimiento molecular fuertes. En este tipo de interacciones débiles no es infrecuente la presencia de cierta multiplicidad en los modos de asociación del ligando.

Así, por ejemplo, se pudo confirmar por *STD NMR* la existencia de una asociación bimodal de un disacárido de manosas (Man α 1 \rightarrow 2Man) en el sitio de reconocimiento de la lectina DC-SIGN.³³ En dicho trabajo, el análisis de las pendientes iniciales (STD_0) de curvas de crecimiento de *STD* experimentales, y su comparación con las pendientes teóricas predichas por CORCEMA-ST, permitió hacer una cuantificación libre de artefactos provenientes de reasociación rápida del ligando en la escala de tiempo de relajación (ms-s). Esto es así porque sólo mediante el uso de las pendientes iniciales, se puede asegurar la validez de la ecuación:

$$STD_0(\text{asociación múltiple}) = \frac{I_0 - I_{sat}^{exp}}{I_0} \Big|_{t_{sat} \rightarrow 0} = \frac{\sum_i (I_0 - I_{sat}^i)}{I_0} \Big|_{t_{sat} \rightarrow 0} = \sum_i STD_0^i$$

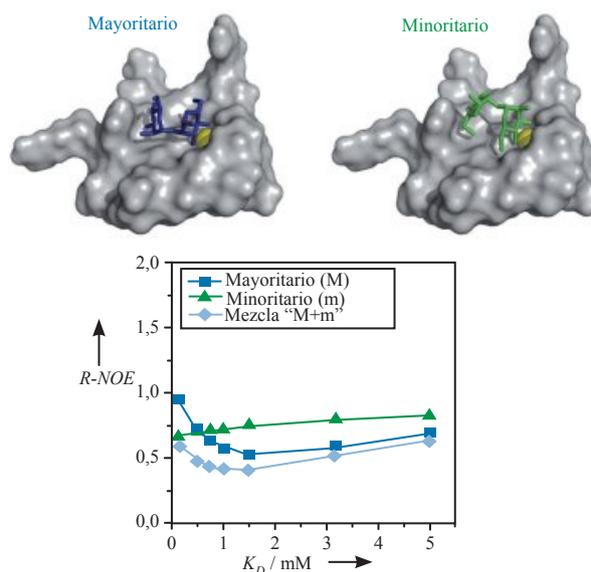


Figura 8. Dos estructuras contribuyen al complejo de la lectina DCSIGN con el disacárido Man α 1,2Man. Cálculos de CORCEMA-ST permitieron caracterizar estructuralmente el complejo minoritario, ya que originó el menor factor *R-NOE* (gráfico inferior) en una mezcla 75:25 mayoritario:minoritario.³³ Dicho complejo no pudo ser caracterizado en estudios cristalográficos previos.³⁴

Es decir, sólo mediante el uso de las pendientes iniciales se asegura que la señal STD_0 observada es la suma de todas las contribuciones de los valores de STD_0 provenientes de cada uno de los diferentes modos de asociación del mismo ligando en el sitio de reconocimiento de la proteína. Si se emplearan las intensidades STD a tiempos de saturación finitos, cada contribución dada al STD global estaría afectada por asociaciones previas del ligando.

De esta forma, se caracterizó con precisión el segundo modo de asociación, que no había podido ser determinado en estudios cristalográficos previos.³⁴ Este tipo de información estructural resulta de relevancia en procesos posteriores de optimización de ligandos iniciales de una determinada diana terapéutica, que presentasen este tipo de asociación bimodal. Así, por ejemplo, la introducción de un espaciador en un determinado punto del ligando podría llevar a la desestabilización de uno de los modos de asociación, de ambos, o, por el contrario, el conocimiento de ambos modos podría ayudar a diseñar una funcionalización de la molécula que, en principio, no afectase a ninguna de las dos orientaciones posibles del ligando en el estado enlazado.

Afinidades proteína-ligando por espectroscopía $STD-NMR$: “isoterma de asociación de pendientes iniciales de STD ”

Desde la concepción inicial del experimento $STD NMR$ quedaba patente la dependencia de las intensidades de las señales resultantes con la concentración de complejo proteína-ligando presentes en la disolución. Mayer y Meyer propusieron una conversión simple de las intensidades observadas experimentales a un parámetro que denominaron “factor de amplificación del STD ”, mediante el producto del factor STD observado y el exceso molar de ligando sobre proteína. Este procedimiento permitía convertir la intensidad STD , dependiente de la fracción de ligando enlazado, en un factor ($STD-AF$) dependiente de la fracción de proteína enlazada. De esta forma, el seguimiento de la evolución de dicho parámetro en función de la concentración de ligando añadido a lo largo de un experimento de titulación permitiría la obtención de una curva de saturación del sitio de

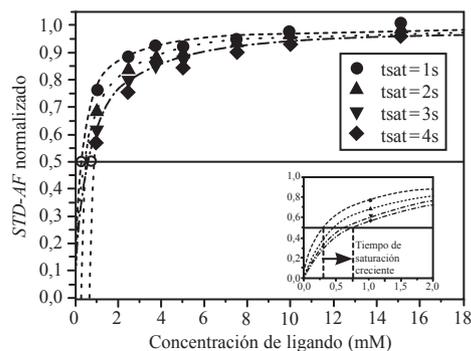


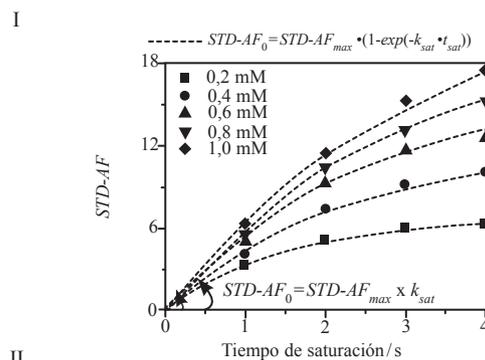
Figura 9. Isoterma de asociación para el sistema WGA-quitobiosa, obtenida a partir de los factores de amplificación ($STD-AF$) normalizados de un solo protón del ligando, a diferentes tiempos de saturación de la proteína (círculo: 1s, triángulo: 2s, triángulo invertido: 3s, rombo: 4s). Aparece una evidente sobrevaloración de la constante K_D (subestimación de la afinidad) al aumentar el tiempo de saturación (curva ampliada interior). Adaptado de la referencia 35.

reconocimiento de la proteína con ligando (curva tipo “isoterma de asociación”). Dicha curva se podría ajustar a una ecuación de tipo Langmuir:

$$f_p' = \frac{[L]}{K_D + [L]}$$

donde f_p' es la fracción de proteína enlazada, $[L]$ es la concentración de ligando libre, y K_D la constante de disociación. De esta forma se extraería el valor de K_D para el sistema proteína-ligando estudiado.

Sin embargo, diferentes trabajos en la literatura han señalado una marcada dependencia de la constante “aparente” determinada por titulación STD (K_D^{ap}) con las condiciones experimentales (tiempo de saturación, tipo de protón del



II

Concentración de ligando [mM]	$STD-AF_{max}$	k_{sat} [s ⁻¹]	$STD-AF_0$ ($STD-AF_{max} \times k_{sat}$)
0,2	6,8 (±0,2)	0,68 (±0,04)	4,6 (±0,4)
0,4	12,3 (±0,7)	0,44 (±0,05)	5,5 (±0,9)
0,6	16 (±1,0)	0,43 (±0,07)	7,0 (±1,5)
0,8	21 (±1,0)	0,34 (±0,04)	7,1 (±1,2)
1,0	25 (±1,5)	0,30 (±0,03)	7,2 (±1,5)

III

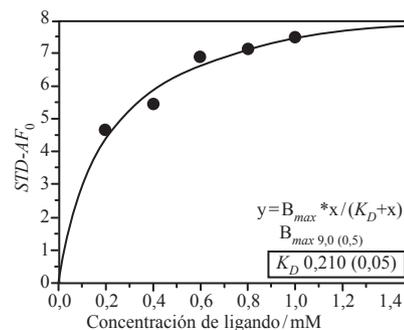


Figura 10. Protocolo “Isoterma de Asociación de Pendientes Iniciales de $STD NMR$ ”. (I) Se obtienen espectros STD a diferentes tiempos de saturación, y se construye la curva de crecimiento para cada concentración de ligando añadido. (II) Se obtienen matemáticamente de cada curva las pendientes iniciales ($STD-AF_0$, última columna) en función de la concentración de ligando (primera columna). (III) Se obtiene la curva de asociación. (Reproducido con permiso de Angulo et al.³⁵)

ligando monitorizado,...).^{12a} En la Figura 9 se muestran los resultados de la titulación de la proteína *aglutinina del germen de trigo* (WGA) con el disacárido quitobiosa, llevada a cabo en nuestro laboratorio.

Cada curva corresponde a intensidades *STD* obtenidas a cuatro tiempos de saturación diferentes (1, 2, 3, y 4 s). Como todas las curvas de asociación se normalizaron a su valor máximo (*plateau*), la gráfica permite ilustrar con claridad el diferente comportamiento de cada una, dependiendo del tiempo de saturación del experimento. Así, las constantes K_D obtenidas crecen de forma monotónica con el tiempo de saturación. En este trabajo también se verificó la dependencia con el tipo de protón del ligando seleccionado.³⁵

La magnitud del error que se comete en la determinación de la K_D va a depender de varios factores (intensidad *STD*, cinética de la interacción,...), pero los experimentos indican que: (i) la K_D que se obtiene por titulación monitorizada por *STD NMR* a un solo tiempo de saturación es siempre una “cota superior” de la K_D termodinámica ($K_D^{ap} \geq K_D(\text{real})$); (ii) el error es tanto mayor cuanto más intensa sea la señal *STD* elegida; y (iii) este error es también mayor cuanto mayor sea la concentración de la proteína a la que se realiza la titulación.

De todo lo anterior se deduce que, a fin de obtener la mejor aproximación a la K_D termodinámica por *STD NMR*, uno debería hacer uso precisamente de las condiciones más inapropiadas para tener buenas relaciones señal/ruido de los espectros, esto es, bajos tiempos de saturación, bajas intensidades *STD*, y poca concentración de proteína.

Un estudio minucioso permitió identificar la reasociación del ligando, rápida en la escala de tiempos de relajación de la molécula pequeña, como la principal responsable de las desviaciones. Esto permitió proponer un nuevo protocolo para las titulaciones proteína-ligando por *STD NMR*. En este protocolo de “*Isotermas de Asociación de Pendientes Iniciales de STD*” se determinan experimentalmente las velocidades iniciales de crecimiento de los *STD*, mediante el registro de curvas de crecimiento, y la isoterma de asociación se construye con estos valores en función de la concentración de ligando añadido. La K_D se obtiene por ajuste matemático a

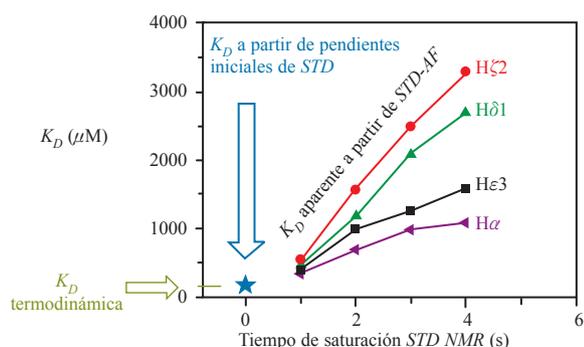


Figura 11. Constantes de disociación aparentes determinadas por *STD NMR* (en función del tiempo de saturación), tras la titulación de la proteína BSA con L-triptófano.³⁵ La Figura refleja con claridad la dependencia de K_D^{ap} con el tiempo de saturación, así como con el tipo de protón del ligando elegido. Asimismo, se representan los valores obtenidos mediante la aproximación de “pendientes iniciales de *STD*” para todos los protones, que convergen de forma excelente (estrella azul) hacia la K_D termodinámica.³⁵

una ecuación de Langmuir.³⁵ El proceso se representa esquemáticamente en la Figura 10.

La nueva aproximación elimina los artefactos descritos anteriormente y da lugar a la mejor determinación de la K_D por *STD NMR*. En la Figura 11 se muestran los valores de constante de disociación aparentes (K_D^{ap}) determinados a distintos tiempos de saturación y eligiendo distintas señales del ligando (triptófano), en un experimento de titulación de la albúmina del suero bovino (BSA).

Conclusiones

En apenas diez años desde sus inicios, la espectroscopia de *RMN* de diferencia de transferencia de saturación (*STD NMR*) se ha convertido en una de las más potentes técnicas espectroscópicas para la detección y caracterización estructural, a nivel atómico, de interacciones receptor-ligando en disolución. Su aplicación se ha extendido no sólo en el mundo académico, sino que ha demostrado ser de gran utilidad en las primeras etapas de descubrimiento y optimización de fármacos en la industria farmacéutica. Sus bajos requerimientos en términos de cantidad de proteína, las posibilidades de variaciones metodológicas optimizadas comentadas en el presente artículo, así como la capacidad de combinarse con cálculos teóricos de modelos moleculares de los complejos, hacen prever una extensa aplicabilidad en el futuro de esta útil metodología espectroscópica. Nos atrevemos incluso a augurar todavía un aumento de sus potencialidades mediante nuevos desarrollos metodológicos todavía por explotar.

Agradecimientos

Parte de las investigaciones recogidas en este resumen realizadas en nuestro laboratorio han sido financiadas por el MICINN (CTQ2006–01123), y la Junta de Andalucía (proyecto de excelencia P07-FQM-02969). J. A. agradece al MICINN la concesión de un contrato “Ramón y Cajal”.

Bibliografía

1. a) M. Pellecchia, D. S. Sem, K. Wuthrich, *Nature Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 211–219; b) M. Pellecchia, I. Bertini, D. Cowburn, C. Dalvit, E. Giralt, W. Jahnke, T. L. James, S. W. Homans, H. Kessler, C. Luchinat, B. Meyer, H. Oschkinat, J. Peng, H. Schwalbe, G. Siegal, *Nature Rev. Drug Discov.* **2008**, *7*, 738–745.
2. a) B. Meyer, T. Peters, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 864–890; b) C. A. Lepre, J. M. Moore, J. W. Peng, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3641–3675.
3. M. Mayer, B. Meyer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1784–1788.
4. D. Neuhaus, M. P. Williamson, *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*, Wiley-VCH, New York, **2000**.
5. A. L. Skinner, J. S. Laurence, *J. Pharm. Sci.* **2008**, *97*, 4670–4695.
6. P. M. Enriquez-Navas, M. Marradi, D. Padro, J. Angulo, S. Penades, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 1547–1560.
7. M. Mayer, B. Meyer, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6108–6117.
8. C. Rademacher, N. R. Krishna, M. Palcic, F. Parra, T. Peters, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 3669–3675.
9. J. L. Yan, A. D. Kline, H. P. Mo, M. J. Shapiro, E. R. Zartler, *J. Magn. Reson.* **2003**, *163*, 270–276.

10. M. Mayer, T. L. James, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4453–4460.
11. a) M. Vogtherr, T. Peters, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6093–6099; b) H. Maaheimo, P. Kosma, L. Brade, H. Brade, T. Peters, *Biochemistry* **2000**, *39*, 12778–12788; c) J. Jimenez-Barbero, T. Peters, *NMR spectroscopy of glycoconjugates*, Wiley-VCH, Weinheim, **2002**.
12. a) A. T. Neffe, M. Bilang, I. Gruneberg, B. Meyer, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 3482–3488; b) A. T. Neffe, M. Bilang, B. Meyer, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 3259–3267.
13. A. Canales, R. Matesanz, N. M. Gardner, J. M. Andreu, I. Paterson, J. F. Díaz, J. Jiménez-Barbero, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 7557–7569.
14. a) M. Mayer, T. L. James, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 13376–13377; b) S. Di Micco, C. Bassarello, G. Bifulco, R. Riccio, L. Gomez-Paloma, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 224–228; c) J. N. Martin, E. M. Munoz, C. Schwergold, F. Souard, J. L. Asensio, J. Jimenez-Barbero, J. Canada, C. Vicent, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9518–9533; d) F. Souard, E. Muñoz, P. Peñalver, C. Badía, R. del Villar-Guerra, J. L. Asensio, J. Jiménez-Barbero, C. Vicent, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 2435–2442.
15. J. Blobel, R. Fayos, J. García, O. Marimon, Y. Pérez, M. Pons, *Comptes Rendus Chimie* **2008**, *11*, 499–505.
16. a) C. Rademacher, T. Peters en *Molecular Recognition of Ligands by Native Viruses and Virus-Like Particles as Studied by NMR Experiments*, Vol. 273 (Ed. T. Peters), Springer Berlin/Heidelberg, **2008**, pp. 183–202; b) T. Haselhorst, J. M. Garcia, T. Islam, J. C. Lai, F. C. Rose, J. M. Nicholls, J. S. Peiris, M. Itzstein, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1910–1912.
17. R. Caraballo, H. Dong, J. P. Ribeiro, J. Jiménez-Barbero, O. Ramström, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 589–593.
18. H. Huang, J. Milojevic, G. Melacini, *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 5795–5802.
19. A. Szczygiel, L. Timmermans, B. Fritzing, J. C. Martins, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17756–17758.
20. L. Zhao, Q. Wu, Y. Cheng, J. Zhang, J. Wu, T. Xu, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 13182–13184.
21. K. E. Kover, P. Groves, J. Jiménez-Barbero, G. Batta, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11579–11582.
22. K. E. Kövér, E. Wéber, T. A. Martinek, É. Monostori, G. Batta, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 2182–2187.
23. K. Feher, P. Groves, G. Batta, J. Jiménez-Barbero, C. Muhle-Goll, K. E. Kover, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 17148–17153.
24. T. Diercks, J. P. Ribeiro, F. J. Cañada, S. André, J. Jiménez-Barbero, H. J. Gabius, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 5666–5668.
25. C. Räuber, S. Berger, *Magn. Reson. Chem.* **2010**, *48*, 91–93.
26. S. Mari, D. Serrano-Gomez, F. J. Canada, A. L. Corbi, J. Jiménez-Barbero, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 296–298.
27. B. Claasen, M. Axmann, R. Meinecke, B. Meyer, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 916–919.
28. a) F. M. Assadi-Porter, M. Tonelli, E. Maillet, K. Hallenga, O. Benard, M. Max, J. L. Markley, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7212–7213; b) A. Pereira, T. A. Pfeifer, T. A. Grigliatti, R. J. Andersen, *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 139–144; c) T. Haselhorst, A. K. Munster-Kuhnel, M. Oschlies, J. Tiralongo, R. Gerardy-Schahn, M. von Itzstein, *Biochem. Biophys. Res. Co.* **2007**, *359*, 866–870.
29. V. Jayalakshmi, N. R. Krishna, *J. Magn. Reson.* **2002**, *155*, 106–118.
30. H. N. B. Moseley, E. V. Curto, N. R. Krishna, *J. Magn. Reson. Series B* **1995**, *108*, 243–261.
31. V. Jayalakshmi, N. R. Krishna, *J. Magn. Reson.* **2004**, *168*, 36–45.
32. J. Angulo, B. Langpap, A. Blume, T. Biet, B. Meyer, N. R. Krishna, H. Peters, M. M. Palcic, T. Peters, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13529–13538.
33. J. Angulo, I. Diaz, J. J. Reina, G. Tabarani, F. Fieschi, J. Rojo, P. M. Nieto, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2225–2227.
34. H. Feinberg, R. Castelli, K. Drickamer, P. H. Seeberger, W. I. Weis, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 4202–4209.
35. J. Angulo, P. M. Enríquez-Navas, P. M. Nieto, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 7803–7812.

XXXIV REUNIÓN BIENAL DE QUÍMICA ORGÁNICA



11 al 13 de julio de 2012

DONOSTIA-SAN SEBASTIÁN

www.ehu.es/bienalQO/