

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 407 090**

51 Int. Cl.:

C07D 307/48 (2006.01)

A61P 7/00 (2006.01)

A61K 31/341 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2003 E 10152353 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.02.2013 EP 2179987**

54 Título: **Uso de derivados heterocíclicos de carbaldehído contra la anemia de células falciformes**

30 Prioridad:

04.12.2002 US 430681 P

17.10.2003 US 511671 P

20.10.2003 US 512187 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

11.06.2013

73 Titular/es:

**VIRGINIA COMMONWEALTH UNIVERSITY
(100.0%)
800 E. LEIGH STREET, SUITE 113
RICHMOND, VA 23298, US**

72 Inventor/es:

**SAFO, MARTIN K.;
DANSO-DANQUAH, RICHMOND;
NOKURI, SAMUEL;
MUSAYEV, FAIK N.;
JOSHI, GAJANAN S.;
BURNETT, JAMES C. y
ABRAHAM, DONALD J.**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 407 090 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso de derivados heterocíclicos de carbaldehído contra la anemia de células falciformes

ANTECEDENTES DEL INVENTO

Campo del invento

- 5 El invento se refiere en términos generales a unos agentes para el tratamiento de una enfermedad de células falciformes. En particular, el invento proporciona unos agentes antitrepanocíticos heterocíclicos de 5 miembros, que son altamente efectivos y no tóxicos, para su uso en el tratamiento de una enfermedad de células falciformes.

Antecedentes del invento

- 10 Una enfermedad de células falciformes es uno de los trastornos genéticos hematológicos más prevalentes en el mundo (Ingram, 1956; Pauling, y colaboradores 1949) que aparece como resultado de una mutación de un único punto desde Glu6 en Hb hasta Val6 en una hemoglobina falciforme (HbS). Se conocen dos estructuras cuaternarias para una Hb, la conformación desoxi (tensa) y la conformación oxigenada (relajada). Cuando el equilibrio alostérico se desplaza en dirección al estado relajado, se obtiene una Hb de alta afinidad que fija y retiene con facilidad al oxígeno, mientras que el caso inverso es verdadero para el estado tenso. Perutz (1970) y Baldwin & Chothia (1979) explicaron con una resolución atómica las estructuras tetraméricas de las formas tensa (T) y relajada (R) de una Hb. El tetrámero se compone de dos dímeros $\alpha\beta$ que están dispuestos en torno a un doble eje de simetría. Esta disposición proporciona una cavidad central de agua, con dos orificios; las hendiduras α y β . La fuente de la tensión en el estado T es debida a unos puentes salinos reticuladores y a unos enlaces de hidrógeno entre las subunidades, así como a una fijación preferente de un efector alostérico indígena de una Hb, el 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG), que estabiliza al estado T por formación de puentes salinos entre las dos subunidades β (Arnone, 1992). La transición de T a R se produce como resultado de la asimilación de oxígeno que conduce a la rotura de muchas de las interacciones entre subunidades del estado T, así como a una expulsión del 2,3-DPG. La transición alostérica da como resultado una rotación de 12-15° del dímero $\alpha\beta$ 1 en relación con el dímero $\alpha\beta$ 2 (Baldwin & Chothia, 1979). La estructura del estado R tiene una cavidad central de agua más pequeña, así como menos puentes salinos y enlaces de hidrógeno entre subunidades. Durante un largo período de tiempo, se creía que el equilibrio alostérico de una Hb, encarnado en el modelo MWC de dos estados (Monod, y colaboradores, 1965) implicaba solamente la transición de T a R, y se creía que la estructura cuaternaria del estado R era el único conformador relajado. Sin embargo, unos recientes estudios cristalográficos y otros han revelado la existencia de múltiples estados relajados de una Hb, incluyendo el R2 y otros que existen en solución con R (Silva, y colaboradores 1992; Smith, y colaboradores 1991; Mueser, y colaboradores, 2000). Todavía hay una controversia acerca de la importancia fisiológica de todos estos estados relajados, y de cómo se relacionan ellos unos con otros en la alosteria de una Hb. Silva y colaboradores, (1992) y Smith y colaboradores, (1991) sugirieron que la estructura cuaternaria del R2 es una intermedia entre las estructuras T y R. Unos análisis adicionales han mostrado que la de R2 no es una estructura intermedia en la transición de T a R sino que, en vez de ello, es otra estructura relajada en el estado final (Janin & Wodak, 1993; Doyle, y colaboradores, 1992). Srinivasan & Rose (1994) han sugerido adicionalmente que el R2 puede ser el estado final relevante fisiológicamente y que la estructura de R es una estructura intermedia atrapada entre los estados R2 y T por las condiciones de cristalización con alto contenido de sal. En contraste, se cree que la formación de la estructura de R2 es favorecida por el bajo contenido de sal que imita a una condición *in vivo* (Silva y colaboradores, 1992; Srinivasan & Rose, 1994).
- 40 Las Hb y HbS tienen unas posiciones casi idénticas para todos los aminoácidos, incluso en la hélice A de las cadenas donde se produce la mutación. La presencia del Val6 da como resultado una interacción hidrófoba entre la región de mutación de una molécula de Hb y una región definida por Phe85 y Leu88 en la bolsa del heme de otra molécula de Hb. Esta interacción se produce solamente en una HbS desoxigenada (desoxi HbS), e induce una polimerización de las moléculas de desoxi HbS para formar fibras. La formación de polímeros de una HbS hace que los glóbulos rojos normalmente flexibles adopten unas formas rígidas del tipo de una hoz (falciformes) que bloquean a pequeños capilares y causan tanto un daño local para el tejido como un grave dolor. La enfermedad está caracterizada por otros síntomas, incluyendo una hemólisis, que da lugar a una anemia y una ictericia, una elevación del nivel de bilirrubina que conduce a una alta incidencia de piedras (cálculos) biliares y a un perjuicio de la función excretora hepática. Otras características clínicas incluyen una ulceración de las piernas, una neumonía, y un hígado y un bazo agrandados. Otros estudios acerca de la gelificación de la desoxi HbS y de diversas variantes de la Hb han proporcionado también una información crucial acerca de otros puntos de contacto en la Hb que son importantes para estabilizar a la fibra de HbS (Adachi & Asakura, 1980; Bunn, E y colaboradores, 1986). Hay diversas estrategias terapéuticas para tratar una enfermedad de células falciformes (SCD, acrónimo de sickle cell disease), que incluyen (1) *Modulación farmacológica de una hemoglobina fetal (HbF)*: Se ha mostrado que una HbF disminuye la polimerización de una HbS y hay diversos agentes que son conocidos por inducir la formación de HbF posiblemente por reactivación del cambio genético para una HbF (Olivieri & Weatherall, 1998). Ejemplos de tales agentes incluyen la 5-aza-citidina, la hidroxiourea y el citosina arabinósido (Mehanna, 2001). Desafortunadamente, hay unos graves efectos colaterales tóxicos asociados con esta terapia como un resultado de las altas dosis y de la frecuencia de administración (Edelstein, 1985), (2) *Trasplante de médula ósea*: Se ha usado también un trasplante de médula ósea como una terapia de reemplazo total de genes para una HbS en casos extremos (Hillery, 1998,

Johnson, 1985). Este enfoque es muy caro y tiene sus toxicidades y riesgos inherentes propias/os (Hillery, 1998), (3) *Transfusión de sangre*: Ésta es una de las terapias más corrientes de una SCD, pero se conoce que unas transfusiones de sangre repetidas están asociadas con los riesgos de enfermedades infecciosas, de sobrecarga con hierro y de reacciones alérgicas (Ballas, 1999), (4) *Analgésicos opioides*: Esta terapia es necesaria para ocuparse de una crisis de dolor, pero una terapia con opioides da como resultado frecuentemente una adicción y/o ataques y/o una depresión, (Ballas, 1999), (5) *Agentes que actúan sobre las membranas de los eritrocitos*: Puesto que el proceso de la degeneración falciforme es dependiente parcialmente de la concentración intracelular de una Hb falciforme, unos agentes que inducen un hinchamiento de las células (Asakura, 1980) o inhiben una deshidratación de las células (Orringer & Berkwitz, 1986) podrían disminuir la concentración de HbS y ayudar a retrasar el proceso de polimerización, y (6) *Un agente antigelificante o modificadores de HbS*: Estos compuestos interfieren con el mecanismo de polimerización o bien fijándose directamente a o cerca del o los sitio(s) de contacto de la desoxi HbS para inhibir el proceso de polimerización o actuar directamente sobre una HbS para desplazar el equilibrio alostérico hacia una HbS de alta afinidad, que es más soluble.

En la sangre, la Hb está en equilibrio entre el estado T y los estados relajados. La Hb suministra oxígeno a través de un mecanismo alostérico, y la capacidad de que la Hb libere o recoja oxígeno puede ser regulada por unos efectores alostéricos. El equilibrio alostérico entre el estado T y los estados relajados (Figura 1) muestra una típica curva del equilibrio de oxígeno (OEC, acrónimo de oxygen equilibrium curve) para la Hb, es decir una representación gráfica del porcentaje de oxígeno fijado por la Hb en función de la presión parcial de oxígeno. Cuando el equilibrio alostérico es desplazado hacia el estado relajado (desplazamiento hacia la izquierda de la curva), se obtiene una Hb de alta afinidad que fija y retiene al oxígeno con mayor facilidad, mientras que un desplazamiento hacia el estado T (desplazamiento hacia la derecha de la curva) da como resultado una Hb de baja afinidad que libera oxígeno con mayor facilidad. Un aumento en el efector alostérico que se presenta en la naturaleza, 2,3-DPG, en los glóbulos rojos desplaza a la OEC hacia la derecha, igual a como lo hacen un aumento en la temperatura y una disminución en el pH (Reeves, 1980). Un aumento en el pH y una disminución de la temperatura y de los niveles del DPG desplaza a la OEC hacia la izquierda. El grado de desplazamiento en la OEC es informado como un aumento o una disminución en la P_{50} (es decir la presión parcial de oxígeno con una saturación con Hb del 50 %). El hecho de regular el equilibrio alostérico hacia la conformación relajada ha presentado interés en la medicina. En particular, la identificación de unos compuestos no tóxicos que fijen eficientemente a una HbS y produzcan una HbS de alta afinidad, que no se polimerice, ha hecho que éstos sean evaluados clínicamente como agentes antidrepanocíticos para tratar una SCD. Se está desarrollando una necesidad de identificar aquellos compuestos que se hayan de usar como agentes antidrepanocíticos para tratar una anemia de células falciformes. Véase, por ejemplo, el uso de vainillina (Abraham, 1991), de 12C79 (Fitzharris, 1985), de furfural (Zaugg, y colaboradores, 1997), y de isotiocianatos sustituidos (Park, y colaboradores, 2003).

Entre una técnica anterior adicional, Lee y colaboradores, en Kor. J. Herbology, volumen 17(2), páginas 145-149 (2002) describen la determinación cuantitativa de 5-hidroxi-2-furaldehído (5-HMF) a partir de preparados de raíces de *Rehmannia* (con el nombre científico de *Rehmanniae Radix Preparata*) de acuerdo con diversos métodos de tratamiento.

Similarmente, Hwang y colaboradores, en Kor. J. Pharmacogn., volumen 32(2), páginas 116-120 (2001) describen que el 5-HMF procedente de preparados de raíces de *Rehmannia* se aisló a partir de la fracción de EtOAc y lo identificaron en diversas etapas de tratamiento, revelando que las muestras tratadas bajo una hasta nueve tandas de cocción mostraron unas pautas crecientes en el contenido de 5-HMF.

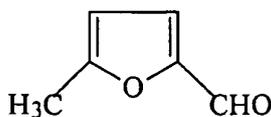
Entre una técnica anterior adicional, el documento de solicitud de patente japonesa JP 92-16821A describe un agente mejorador del flujo sanguíneo que tiene un efecto farmacéutico estable por uso de un derivado específico de 5-hidroximetil-furano para curar enfermedades causadas por un fallo de la circulación periférica.

Entre una técnica anterior adicional, el documento de solicitud de patente china CN 1302657 A describe una medicina china que contiene preparados de raíces de *Rehmannia* para tratar un tumor del sistema hematopoyético tal como una leucemia, una beta-talasemia y una anemia de células falciformes.

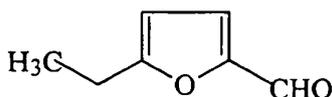
SUMARIO DEL INVENTO

El presente invento proporciona unos agentes antidrepanocíticos altamente efectivos, específicos y no tóxicos, para un uso médico específico. Los compuestos están relacionados con el 5-hidroximetil-2-furfuraldehído (5HMF o AMS-13) y el 2-furfuraldehído (FUF) que se presentan en la naturaleza e incluyen el 5-etil-furfuraldehído (5EF) y el 5-metil-furfuraldehído (5 MF) que se usan para tratar una enfermedad de células falciformes.

De acuerdo con el invento, el compuesto se selecciona entre



y



- 5 El invento considera los compuestos antes mencionados para su uso con el fin de tratar los síntomas de pacientes que padecen de la anemia de células falciformes, tales como una ictericia y unos niveles elevados de bilirrubina.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- Figura 1.** Los efectos de la temperatura, el pH y los niveles de DPG sobre la curva del equilibrio de oxígeno de la Hb.
- 10 **Figura 2.** Estructuras de algunos compuestos furánicos así como de otros compuestos discutidos en la solicitud.
- Figura 3.** Curvas del equilibrio de oxígeno de suspensiones de células SS en la ausencia (1) y en la presencia de vainillina (2), FUF (3) y 5HMF (4) 5 mM. Obsérvese el importante desplazamiento hacia la izquierda causado por la adición de 5HMF (comparativo).
- 15 **Figura 4.** Estudios de HPLC (cromatografía de fase líquida de alto rendimiento) con intercambio de cationes del material hemolizado procedente de las células SS que han reaccionado con el 5HMF. El pico 1 es una HbS normal, mientras que el pico 3 es la HbS modificada. El pico 2 representa a la HbS1, que es un componente secundario que se separa y eluye antes a partir del pico principal de HbS (comparativo).
- Figura 5.** Representación gráfica de la supervivencia según Kaplan-Meier de ratones Tg enfermos de drepanocitosis, testigos y tratados con 5HMF (AMS-13) (comparativo)
- 20 **Figura 6.** Período de tiempo medio de supervivencia de ratones Tg enfermos de drepanocitosis, testigos y tratados con 5HMF (AMS-13) (comparativo).
- Figura 7.** El efecto del 5HMF (AMS-13) sobre el porcentaje de células degeneradas a falciformes en la sangre arterial de ratones Tg enfermos de drepanocitosis, que fueron expuestos a una severa hipoxia (con oxígeno al 5 %). Sin ningún tratamiento (testigo), el porcentaje de células degeneradas a falciformes aumentó agudamente y el animal murió en el transcurso de 15 minutos. Un tratamiento previo del ratón con el 5HMF prolongó de una manera importante el período de tiempo de supervivencia. El fármaco redujo también el porcentaje de células degeneradas a falciformes (comparativo).
- 25

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS FORMAS PREFERIDAS DE REALIZACIÓN DEL INVENTO

- 30 El presente invento proporciona unos agentes antidrepanocíticos para un uso médico. Los agentes son unos compuestos heterocíclicos de 5 miembros que son las sustancias 5EF y 5MF que se presentan en la naturaleza.

Los compuestos del presente invento exhiben una actividad antidrepanocítica y una especificidad altas, y una muy baja toxicidad.

- 35 El presente invento proporciona los compuestos de la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de una enfermedad de células falciformes.

- Los compuestos del presente invento son unos potentes agentes antidrepanocíticos. Los que poseen experiencia en la especialidad reconocerán que la cantidad de tal agente, que se puede administrar a un paciente, variará dependiendo de varios factores, incluyendo, pero sin limitarse a, el volumen de sangre, el hematocrito, la edad del paciente, el género, el peso, la salud física global, la presencia de otras condiciones patológicas, el compuesto particular que se esté administrando, y de factores similares. Sin embargo, la cantidad puede estar situada generalmente en el intervalo de desde aproximadamente 50 a aproximadamente 1.000 mg/kg y más preferiblemente en el intervalo de desde aproximadamente 100 a aproximadamente 750 mg/kg. Por ejemplo, un paciente adulto de una enfermedad de células falciformes con un volumen de sangre de 4 l (litros) y un hematocrito de 25 %, necesitará
- 40

alrededor de 378-630 mg/kg del compuesto más potente, el 5HMF, y más preferiblemente la dosis estará situada en el intervalo de 200-630 mg/kg.

Los compuestos del presente invento se pueden administrar en cualquier forma que sea apropiada para suministrar una cantidad activa del compuesto al paciente que se esté tratando. Por ejemplo, el compuesto se puede administrar en forma de píldoras o cápsulas sólidas, líquidos para la administración por vía oral, formulaciones inyectables, etc. Los compuestos se pueden proporcionar a solas o en combinación con otros constituyentes, y se pueden proporcionar en una forma pura o en la de sales (p.ej., sales orgánicas o inorgánicas, etc.). Además, los compuestos se pueden formular con unos vehículos tales como vehículos acuosos o basados en aceite, y pueden ser acompañados por agentes conservantes (p.ej. metil parabeno o cloruro de bencilalconio (BAK)), agentes tensioactivos (p.ej. ácido oleico), disolventes, elixires, agentes aromatizantes (en el caso del suministro por vía oral) un almidón, y otros materiales (preferiblemente los que generalmente se consideran como seguros (GRAS, acrónimo de generally regarded as safe)). En una forma preferida de realización, el compuesto se administrará como una formulación para la administración por vía oral en un vehículo basado en un alcohol o basado en una fase acuosa.

Similarmente, el método de administración puede ser cualquiera entre una amplia variedad de métodos que son bien conocidos para los que poseen experiencia en la especialidad, tales como los de inyección intravenosa o intradérmica, inyección subcutánea, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal; suministro por las vías oral, rectal y bucal; suministro transdérmico, inhalación; etc. El método de administración puede ser el de suministro por vía oral. Además, los compuestos del presente invento se pueden administrar en conjunción con otros conocidos tratamientos de una enfermedad de células falciformes, o con tratamientos para otras condiciones patológicas relacionadas o no relacionadas (p.ej. el tratamiento de una anemia), y con otros regímenes subsidiarios beneficiosos tales como suplementos dietéticos, regímenes de ejercicio y similares.

Mientras que un uso primario de los agentes antidrepanocíticos del presente invento es el de tratar una enfermedad de células falciformes, ellos se pueden usar también en otras aplicaciones para las que sea beneficioso causar una desestabilización de los estados tensos (T) de la hemoglobina, y el cambio del equilibrio alostérico en favor de una Hb de alta afinidad en la forma de una Hb en el estado R2. Este aspecto del invento es ilustrado adicionalmente en el Ejemplo 5 presentado más adelante. Uno o más de los compuestos se administrarían a un paciente en una cantidad suficiente para cambiar la capacidad transportadora de oxígeno de la sangre a un estado beneficioso para erradicar el cáncer. Además, de un modo similar a los métodos descritos en la patente de los EE.UU. 5.705.521 concedida a Abraham, los compuestos de este invento se pueden administrar a un paciente que esté o vaya a ser sometido a una terapia por radiaciones para ayudar a la efectividad de la radiación para destruir el cáncer.

Los compuestos se pueden usar también para finalidades de investigación. En particular, los compuestos genéricos pueden servir como estructuras progenitoras para un diseño racional como fármacos de derivados adicionales y compuestos análogos. Unos ejemplos de ellos incluyen, pero no se limitan a, otras formas de los compuestos que son más o menos activas, o más o menos estables; que tienen propiedades alteradas de solubilidad; o que tienen unos radicales que sirven para dirigir los compuestos hacia un lugar deseado, p.ej. a través de la membrana celular. Alternativamente, los compuestos aquí proporcionados pueden servir como estructuras progenitoras para el diseño de otras formas de profármacos.

Los compuestos usados en la práctica del presente invento son el 5-etil-2-furfuraldehído (5EF) y el 5-metil-2-furfuraldehído (5MF) presentes en la naturaleza (véase la Figura 2).

Se describen aquí también unos métodos para sintetizar los compuestos profármacos del presente invento, siendo dados unos esquemas de síntesis ilustrativos en el Ejemplo 4 siguiente. Dichos métodos de síntesis orgánicas para proteger aldehídos son bien conocidos por los expertos en la especialidad.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: Base estructural para el potente efecto antidrepanocítico de una nueva clase de compuestos aldehídicos heterocíclicos de 5 miembros: ensayos *in vitro* y estudios cristalográficos de rayos X de los compuestos furánicos, 5HMF (comparativo), 5MF, 5EF y FUF (comparativo).

Las estructuras químicas de 5HMF, 5MF, 5EF y FUF se muestran en la Figura 2.

El recurso de regular el equilibrio alostérico de una Hb hacia la conformación relajada ha presentado interés en medicina, puesto que los compuestos que se fijan a una HbS y que producen una HbS de alta afinidad, la cual no se polimeriza, han sido evaluados clínicamente como agentes antidrepanocíticos para tratar una anemia de células falciformes. Dos de dichos compuestos son la vainillina (Abraham, y colaboradores, 1991) y el 12C79 (Beddell, y colaboradores, 1984; Fitzharris, y colaboradores, 1985; Orringer, y colaboradores, 1986). Ambos compuestos son aldehídos y forman con una Hb unos aductos de bases de Schiff. Los estudios clínicos con el 12C79 (Figura 2) mostraron que la infusión intravenosa de este compuesto (40 mg/kg) en pacientes con una SCD dio como resultado la formación de aductos del compuesto y de una Hb a niveles de más que un 30 % sin ningún efecto desfavorable (Orringer, y colaboradores, 1988). La vainillina (Figura 2) es un compuesto aromatizante de alimentos, y puesto que es relativamente no tóxica, esto la convierte en un agente terapéutico muy atractivo para una SCD. Una estructura

de baja resolución de una Hb en el estado T que ha formado un complejo con vainillina, mostró que el compuesto se fija a dos sitios diferentes: un sitio primario cerca de His103, Cys104 y Gln131, y un sitio secundario situado entre His116 y His117 (Abraham, y colaboradores, 1991). Basándose en los resultados del análisis por cristalografía con rayos X y en estudios funcionales, Abraham y colaboradores, (1991) sugirieron que la vainillina actúa para disminuir la polimerización de una HbS por desplazamiento del equilibrio alostérico hacia la molécula de una HbS de alta afinidad en la forma del estado R; así como efectúa una inhibición estereoespecífica de la polimerización de una HbS en el estado T. Unos estudios adicionales de diversos compuestos análogos a la vainillina, efectuados por Abraham y colaboradores, (1995) y Boyiri y colaboradores, (1995), mostraron que estos compuestos, a diferencia de la vainillina, se fijan al Val1 terminal de N de una Hb en el estado T, y sorprendentemente efectúan desplazamientos opuestos en la OEC. Unos agentes tales como el ácido 5-formil-salicílico (FSA, Figura 2), que forma interacciones de bases de Schiff con el nitrógeno de Val1 terminal de N, y proporciona grupos tanto para puentes salinos como para la unión por enlaces de hidrógeno con el dímero opuesto (a través del eje doble de una Hb), desplazan a la OEC hacia la derecha. En contraste, unos agentes tales como el 3,5-dimetil-4-hidroxi-benzaldehído (DMHB, Figura 2), que se fijan también al residuo Val terminal de N de una Hb en el estado T de una manera similar a la del FSA sin ningunas interacciones de puentes salinos con el dímero opuesto, desplazan a la OEC hacia la izquierda.

En los actuales estudios, nosotros hemos combinado el uso de modificadores covalentes aldehídicos de una Hb con nuestro conocimiento de la regulación molecular del equilibrio alostérico para producir unos potentes compuestos antidrepanocíticos que deberían ser clínicamente seguros. Específicamente, hemos examinado el 5-hidroxi-metil-2-furfural (5HMF) (para finalidades comparativas) y varios de sus compuestos análogos, incluyendo el furfural (FUF) (para finalidades comparativas), el 5-metil-2-furfural (5MF) y el 5-etil-2-furfural (5EF) (todos ellos están mostrados en la Figura 2), en cuanto a sus potencias antidrepanocíticas. Se encontró que estos compuestos desplazan significativamente el equilibrio alostérico hacia la Hb de alta afinidad, y también actúan como potentes agentes inhibidores de la degeneración falciforme de glóbulos rojos falciformes homocigóticos (SS). Como un ejemplo comparativo, el 5HMF modifica a una HbS en un 70 %, en comparación con un 15 % para la vainillina. El 5HMF inhibe también a la degeneración falciforme de células SS *in vitro* en un 90 %, cuatro veces más que para la vainillina. También, unos estudios *in vivo* contra la drepanocitosis usando ratones transgénicos (tg) con células falciformes muestran que el 5HMF prolonga la vida de los ratones hipóxicos durante aproximadamente un tiempo cuatro veces más largo, en comparación con un testigo. El 5HMF es hallado en alimentos de uso diario, y tiene una DL₅₀ (dosis letal del 50 %) de 2,5-5,0 g/kg (US EPA, 1992) en comparación con la de 1,58 para la vainillina. Por lo tanto, tenemos ahora un compuesto que es seguro, más potente que cualquier agente antidrepanocítico aldehídico conocido, capaz de atravesar los glóbulos rojos de la sangre para reaccionar con una HbS y modificarla. Además, el 5HMF constituye un andamio ideal a través del cual se pueden construir compuestos más potentes y seguros.

Los estudios por cristalografía de rayos X de una Hb que ha formado complejo con estos compuestos, indican que ellos forman aductos de bases de Schiff de una manera asimétrica con los nitrógenos del α Val1 terminal de N de una Hb. Notablemente, se aislaron dos tipos de cristales conjuntos durante estos experimentos: se encontró que un tipo de cristales se componía de la estructura cuaternaria de una Hb en el estado de baja afinidad o tenso (T) en un complejo con los compuestos; el otro tipo de cristales se componía de una Hb en el estado de alta afinidad o relajado (con una estructura cuaternaria de R2) en un complejo con los compuestos. Además, se encontró que los aldehídos heterocíclicos examinados se fijan fuertemente al estado R2, pero débilmente al estado T. Una cristalización de los mismos compuestos con una Hb unida con ligandos, dio como resultado solamente cristales en el estado R relajado, que indicaba también una débil fijación al compuesto. Estos resultados sugieren que los aldehídos heterocíclicos examinados impiden la polimerización de una hemoglobina falciforme (HbS) e inhiben la degeneración falciforme de células SS por estabilización de una HbS en el estado R2 de alta afinidad. Una comparación de las estructuras cristalinas con alta resolución del 5HMF y de la vainillina fijada a una Hb, muestra que el 5HMF se fija mucho más fuertemente, lo que es una indicación de que el 5HMF puede residir durante más largo tiempo en el sitio de fijación. Esto explica porqué el 5HMF es muchas veces más potente que la vainillina. De un modo sumamente importante, la fijación más fuerte del 5HMF a una Hb puede traducirse en un período de tiempo de vida mitad (semivida) incluso más largo y en una biodisponibilidad aumentada para el 5HMF en comparación con la vainillina, con una disminución concomitante en la dosificación que se necesita para una terapia. Los estudios biológicos, así como cristalográficos, de los compuestos furánicos revelan por primera vez el mecanismo molecular exacto de los efectos antidrepanocíticos, de modificar covalentemente a unos aldehídos que se fijan a los nitrógenos de α Val1 terminal de N de una Hb. Estos compuestos examinados representan también una nueva clase de agentes potencialmente terapéuticos para tratar una enfermedad de células falciformes (SCD).

Proceso experimental

Materiales y procesos generales. Los siguientes compuestos: vainillina, FUF, 5MF, 5EF y 5HMF se adquirieron de Aldrich Chemical Company. Unos glóbulos rojos normales (AA) se recogieron a partir de donantes adultos. Unas células SS se obtuvieron a partir de pacientes con una SCD. Una Hb purificada de un ser humano adulto, en un tampón Bis Tris 50 mM, de pH 6,8, se preparó a partir de una sangre humana desechada, tal como se ha descrito anteriormente (Safo y Abraham, 2003).

Estudios del equilibrio de oxígeno con una sangre entera normal. Unas muestras de sangre normal (hematocrito de 40 %) en la presencia de vainillina*, FUF*, 5MF, 5EF y 5HMF* 5 mM (en estado solubilizado con DMSO) se equilibraron a 37 °C durante 1 h. Las muestras fueron luego incubadas en tonómetros IL 237 (de Instrumentation

Laboratories, Inc. Lexington, MA) durante aproximadamente 10 min a 37 °C, y se permitieron equilibrar a unas tensiones de oxígeno de 7, 20 y 60 mm de Hg. Las muestras fueron aspiradas dentro un Aparato Automático Analizador de los Gases en Sangre IL 1420 y en un Co-oxímetro IL 482 o IL 682 (de Instrumentation Laboratories) para determinar los valores de pH, pCO₂, pO₂ y de saturación con oxígeno de una Hb (sO₂). Los valores de pO₂ y de sO₂ en cada uno de los niveles de saturación con oxígeno se sometieron luego a un análisis de regresión no lineal usando el programa Scientist (de Micromath, Salt Lake City, UT) para calcular los valores de P₅₀ y del coeficiente de Hill (n₅₀). La P₅₀ es la presión de oxígeno en mm de Hg con la que una Hb está saturada con oxígeno en un 50 %. Un estudio de respuestas a dosis con el 5HMF se realizó en unas concentraciones finales de 1 y 2 mM del compuesto.

10 *Estudios del equilibrio de oxígeno con glóbulos rojos falciformes homocigóticos.* Unas células SS fueron suspendidas en una PBS (solución salina tamponada con fosfato) hasta llegar a un hematocrito final de 10 %. Se añadieron a esta suspensión vainillina, FUF, 5HMF (solubilizados en DMSO) en unas concentraciones finales de 5 mM y se incubaron a 37 °C durante 1 h. Una parte alícuota de 40 µl de esta suspensión se añadió a 4 ml de un tampón Hemox y se sometieron a un análisis del equilibrio de oxígeno (a 37 °C) usando un analizador Hemox (de TCS Scientific Corp., Southampton, PA) (Asakura, 1979).

15 *Transporte a través de una membrana de glóbulo rojo falciforme homocigótico y reacción con una HbS.* Las células SS tratadas con el compuesto, obtenidas en el experimento precedente (estudios del equilibrio de oxígeno con células SS) fueron hemolizadas añadiendo 5 volúmenes de un tampón de fosfato de potasio 5 mM de pH 7,4, que contenía EDTA 0,5 mM. Después de una centrifugación, el material hemolizado se sometió tanto a un análisis del equilibrio de oxígeno usando el aparato analizador Hemox como a un análisis por HPLC con intercambio de cationes, usando un aparato de Hitachi para HPLC (modelo D-7000 Series) y una columna de Swift WCX (Swift® WCX-PEEK: de 50 mm x 4,6 mm, Isco, Inc., Lincoln, NE). La columna fue revelada usando un gradiente lineal de la fase B de desde 25 % hasta 90 % a 410 nm (Fase Móvil A: Bis-Tris 40 mM, EDTA 5 mM, de pH 6,5; Fase B: Bis-Tris 40 mM, EDTA 5 mM, cloruro de sodio 0,2 M, de pH 6,5). Los valores de formación de aductos con una HbS (modificación de HbS) se expresan en porcentajes, usando la siguiente fórmula:

$$\text{Mod. de Hb (\%)} = \frac{\text{área de pico de Hb modificada} \times 100}{(\text{área de pico de Hb modificada} + \text{área de pico de Hb sin modificar})}$$

30 *Estudios antirepanocíticos con glóbulos rojos falciformes homocigóticos.* Para finalidades comparativas, los efectos de la vainillina, del FUF y del 5HMF sobre la inhibición de la degeneración falciforme de células SS se evaluaron tal como se ha descrito con anterioridad (Asakura & Mayberry, 1984). Expresado brevemente, unas células SS suspendidas en una solución salina tamponada, de pH 7,4, (con un hematocrito de 10 %) se incubaron a 37 °C con oxígeno al 4 % en la presencia del compuesto 5 mM. Unas partes alícuotas (de 10 µl) de las suspensiones se obtuvieron después de 5 h y se fijaron con una solución al 2 % de glutaraldehído, sin exposición al aire. Los análisis morfológicos y el porcentaje de células SS que no se habían degenerado a falciformes se realizaron usando un sistema de análisis de imágenes asistido por computador, tal como se describe en otro lugar (Hijiya, 1991). Se realizaron también unos estudios de respuesta a las dosis de los FUF y 5HMF en unas concentraciones del compuesto de 1 y 2 mM.

40 *El efecto de compuestos sobre el tamaño de glóbulos rojos falciformes homocigóticos.* Para estudiar el efecto de los compuestos sobre el grado de hidratación/deshidratación de células SS, las células SS tratadas con un compuesto, obtenidas en el precedente experimento (estudios antirepanocíticos con células SS), se evaluaron con un Aparato Analizador de Células Hemavet para determinar el volumen corpuscular medio (MCV = acrónimo de mean corpuscular volume).

45 *Experimentos de cristalización.* Para finalidades comparativas, se realizaron con el FUF y el 5HMF unos experimentos de cristalización para obtener cristales en los estados T y R. Los experimentos implicaron un exceso 4 - 25 molar de los compuestos con respecto a una Hb (tetrámero). Para el experimento de cristalización en el estado T, los compuestos solubilizados en DMSO fueron incubados con desoxi Hb (60 mg/ml de proteína) durante al menos 1 hora para formar el aducto de base de Schiff. El cianoborohidruro de sodio, en un exceso 4 - 25 molar de Hb, se añadió para reducir al aducto de base de Schiff reversible para formar el correspondiente enlace covalente de alquilamina. La subsiguiente cristalización de las soluciones del complejo de compuesto y desoxi Hb en tubos de ensayo con una capacidad de 10 ml usando un agente precipitante de sulfato/fosfato 3,2-3,6 M (de pH 6,5) se realizó en una caja de guantes bajo una atmósfera de nitrógeno como anteriormente se ha descrito (Safo, y colaboradores, 2003; Perutz, 1968) para obtener cristales en el estado T con un alto contenido de sal. La reducción del aducto de base de Schiff es necesaria para observar cristalográficamente al compuesto fijado (Boyiri, y colaboradores, 1995). Inesperadamente, el experimento dio como resultado dos diferentes cristales - un cristal rectangular (grupo espacial P2₁), que es isomorfo con un cristal nativo en el estado T, y un cristal trigonal (grupo espacial P3₂21), del que posteriormente se determinó que tiene una conformación en el estado relajado en la forma de una estructura cuaternaria R2. Los cristales en el estado T crecieron entre 2-10 días, mientras que los cristales en el estado R2 crecieron entre 7-30 días.

55 Se diseñó otro experimento para cristalizar los complejos de un compuesto y una Hb en el estado R usando una carbonomonoxi Hb (COHb), siguiendo un proceso que se ha descrito con anterioridad (Safo, y colaboradores, 2003; Perutz, 1968). Una solución de Hb oxigenada fue puesta en vacío durante aproximadamente 10 minutos, y la resultante solución de desoxi Hb fue saturada completamente con CO para generar una COHb. Los compuestos

solubilizados en DMSO se hicieron reaccionar luego con la COHb, lo que fue seguido por una adición de cianoborohidruro de sodio para reducir el aducto de base de Schiff. La cristalización se llevó a cabo con una solución de 30-50 mg/ml de proteína, de fosfato de Na^+/K^+ 3,2-3,4 M, de pH 6,4, y dos gotas de tolueno en unos tubos de ensayo con una capacidad de 10 ml. Los procesos experimentales se realizaron en una condición aerobia y dieron como resultado unos cristales conjuntos (4-30 días) isomorfos con cristales nativos en el estado R (grupo espacial P4_12_12).

Recogida de datos, tratamiento y refinamiento de la estructura. Los conjuntos de datos de difracción de rayos X para los cristales conjuntos en los estados R, R2 y T se recogieron a 100 °K usando un Sistema Enfriador Criogénico de Corrientes de Molecular Structure Corporation (MSC) (de MSC, The Woodlands, TX), un detector de placa de imágenes II de Eje R equipado con espejos OSMIC, y un generador RU-200 de Rigaku que funcionaba a 50 kV y 100 mA. Antes del uso en una difracción, los cristales fueron primeramente lavados en una solución crioprotectora que contenía 50 μl de aguas madres y 10-12 μl de glicerol. Los conjuntos de datos fueron elaborados con un programa lógico software MSC BIOTEX. Todos los refinamientos de estructura y los mapas de omisiones se realizaron con el programa CNS (Brunger, y *colaboradores.*, 1998). La construcción y la corrección de los modelos se llevaron a cabo usando el programa gráfico TOM (Cambillau & Horjales, 1987).

Determinaciones de estructuras y refinamientos de las estructuras de complejos en el estado R2. La estructura del complejo de FUF y una Hb en el cristal en el estado R2 fue la primera en ser determinada por el método del reemplazo molecular (Navaza, 1994) usando la estructura de Hb nativa en el estado R2 de $\alpha 1\beta 1-\alpha 2\beta 2$ (código 1BBB de PDB) como un modelo de investigación. La función de traducción usando el grupo espacial P3_221 dio una solución de un tetrámero en la unidad asimétrica con un coeficiente de correlación final de 69,2 y un R-factor de 35,5 % para datos situados entre 8,0 - 4,0 Å. Antes de usar la estructura R2 como un modelo de investigación, nosotros supusimos que el cristal era de una Hb en el estado T en otra forma cristalina. Sin embargo, el uso de una estructura en el estado T (código 2HHB de PDB) como un modelo de investigación no fue capaz de dar una solución clara. Una investigación similar con una estructura en el estado R, (código 1AJ9 de PDB) tampoco fue capaz de dar una solución clara. El modelo del reemplazo molecular fue sometido a un refinamiento por cuerpo rígido, seguido por una minimización de gradiente conjugado y un reanillamiento simulado. Se identificaron unas densidades fuertes y claras para dos moléculas de FUF unidas por los residuos αVal1 terminales de N de una manera relacionada con la simetría. El sitio de fijación del αVal1 terminal de N está situado en la cavidad central de agua de una Hb cerca de la boca de la hendidura α . La densidad de electrones procedentes del compuesto fijado se solapaba con la del nitrógeno del αVal1 , sugiriendo una interacción covalente entre el FUF y el nitrógeno. El mapa de densidad de electrones mostró también una ligación de los cuatro átomos de Fe del heme y unos ligandos de agua fueron acoplados con la densidad. Un acoplamiento alternado de ligandos de O_2 produjo una geometría deformada de los enlaces y del ángulo de Fe-O-O. Varias rondas alternadas de minimización de gradiente conjugado, de reanillamiento simulado, de refinamientos individuales del factor B, y la adición de 7 aniones de sulfato y 297 moléculas de agua, con correcciones manuales del modelo, llevó el R-factor final a 21,7 % y el R-libre final a 27,4 % con una resolución de 2,25 Å. Los datos cristalográficos para la estructura se recopilan en la Tabla 1.

El modelo de partida para el refinamiento de la estructura del complejo de 5HMF y una Hb fue la estructura de FUF-Hb - después de una supresión del FUF, de las moléculas de agua y de los aniones de sulfato. Una ronda de refinamientos por cuerpo rígido, de minimización de gradiente conjugado y de reanillamiento simulado mostró también dos 5HMF, fijados a los dos nitrógenos del αVal1 terminal de N relacionados en simetría. En contraste con la estructura de un FUF-Hb, unas moléculas de O_2 estaban ligadas a los átomos de Fe. Varias rondas alternadas de minimización de gradiente conjugado, de reanillamiento simulado, de refinamientos individuales del factor B, y la adición de 7 aniones de sulfato y de 538 moléculas de agua con correcciones intermitentes de los modelos manuales, llevaron el R-factor final a 18,3 % y el R-libre final a 22,3 % con una resolución de 1,85 Å. Los datos cristalográficos para la estructura de una 5HMF-Hb se recopilan en la Tabla 1. Las coordenadas atómicas y los factores de estructura se han depositado en el Banco de Datos de Proteínas RCSB con los códigos de acceso 1 QXD y 1 QXE para las estructuras de FUF- y de 5HMF-Hb respectivamente.

Determinaciones de estructura y refinamientos de las estructuras de complejos en el estado T. El modelo de partida para el refinamiento de la estructura de 5HMF-Hb en el estado T fue la estructura nativa en el estado T $\alpha 1\beta 1-\alpha 2\beta 2$ isomorfo (código 2HHB de PDB). Después de un refinamiento de cuerpo rígido y de una minimización de gradiente y de un reanillamiento simulado subsiguientes, los mapas de densidades de electrones para la estructura, a diferencia de los de las estructuras del complejo en el estado R2 revelaron solamente unas densidades débiles e indefinidas en los sitios de fijación en el αVal1 terminal de N. Unos ciclos repetidos de refinamientos, de adición de moléculas de agua y de construcción de modelos no muestran una densidad mejorada en el sitio de fijación para un modelo de 5HMF satisfactorio. No había otros sitios de fijación aparente. Los R-factor y R-libre finales para las estructuras de 5HMF-Hb son de 16,3 y 20,7 % con una resolución de 1,86 Å. Otros datos estadísticos para el cristal se informan en la Tabla 1.

Tabla 1: información acerca de los cristales, recogida de datos y parámetros de refinamiento para las estructuras de complejos de Hb

	FUF (en el estado R2)	5HMF (en el estado R2)	5HMF (en el estado T)	FUF (en el estado R)
Recogida de datos				
Grupo espacial	P3 ₂ 21	P3 ₂ 21	P2 ₁	P4 ₁ 2 ₁ 2
Dimensiones de celdas (Å)	91,40	91,86	62,61	53,46
	91,40	91,86	82,47	53,46
	142,00	143,53	53,46	192,88
			99,52	
Moles/unidad asimétrica	1 tetramero	1 tetramero	1 tetramero	1 dímero
Resolución (Å)	69,1-2,25	69,6-1,85	82,5-1,86	84,0-2,0
Nº de reflexiones medidas	124.853	286.747	108.495	105.005
Reflexiones únicas	32.647	56.802	41.917	18.357
I/sigma I	7,0	12,5	15,8	13,2
Compleción (%)	97,0	93,1	90,7	92,0
R-combinado (%) ^a	7,5	6,9	6,5	6,9
Refinamiento				
Resolución (Å)	69,1-2,25	69,6-1,85	52,7-1,86	51,5-2,0
Sigma de corte (F)	0,0	0,0	0,0	0,0
Nº de reflexiones	32.645	56.780	41.895	18.316
R-factor (%)	21,7	18,4	16,3	21,3
R-libre (%) ^b	27,4	22,3	20,7	26,3
Desviación típica cuadrática media geométrica (= rmsd)				
Longitudes de enlaces (Å)	0,011	0,013	0,015	0,012
Ángulos de enlaces (°)	1,87	1,89	1,72	1,90
Ángulos diédricos				
Regiones más favorecidas	91,4	92,8	93,6	92,8
Regiones adicionales	8,6	7,2	6,4	7,2

^a R-combinado = $\sum \langle I \rangle - I / \sum I$. ^b se excluyó del refinamiento un 5 % de la reflexión, que se usó para el cálculo de R-libre.

5 La estructura de un 5HMF-Hb, sin agua ni ligandos, se usó como un modelo de partida para el refinamiento de la estructura de un FUF-Hb. De un modo similar a la estructura de un 5HMF-Hb, los refinamientos de la estructura de un FUF-Hb no dan como resultado ninguna densidad interpretable junto a la bolsa de fijación. La estructura no fue refinada hasta completarse, y no se informan en la Tabla 1 estadísticas detalladas para el cristal.

10 *Determinaciones de estructura y refinamientos de las estructuras de complejos en el estado R.* La estructura en el estado R del dímero $\alpha\beta 1$ isomorfo (1LJW) después de una supresión de las moléculas de agua y de los aniones de fosfato se usó como el modelo de partida para refinar la estructura de un FUF-Hb. De modo similar a los complejos en el estado T, unos refinamientos repetidos de la estructura de un FUF-Hb con construcción de modelos mostraron solamente una densidad débil e imposible de interpretar en la bolsa de fijación del $\alpha\text{Val}1$ terminal de N. Los R-factor y R-libre finales son de 21,3 y 26,3 con una resolución de 2,0 Å, y se informan en la Tabla 1 unas estadísticas detalladas para el cristal.

15 La estructura de un FUF-Hb, sin agua ni ligandos, se usó como un modelo de partida para el refinamiento de la estructura de un 5HMF-Hb. De un modo similar a los del cristal de FUF, los refinamientos mostraron también una densidad imposible de interpretar en la bolsa de fijación, y fracasó el refinamiento. No se informan en la Tabla 1 estadísticas detalladas para el cristal.

Resultados

20 Como un ejemplo comparativo, la vainillina ha sido ensayada clínicamente para la terapia de una SCD, y se estudió con los aldehídos heterocíclicos examinados, también referidos como compuestos furánicos. Nosotros (los autores del invento) hemos publicado también con anterioridad propiedades funcionales y antitrepanocíticas detalladas de la vainillina (Abraham, y *colaboradores*, 1991). Adicionalmente, se usaron unas concentraciones relativamente altas de los compuestos (5-10 mM) para asegurar una reacción completa con una Hb en los actuales estudios. Esto es necesario, puesto que la concentración de una Hb dentro de los RBCs (glóbulos rojos) es de aproximadamente 5 mmol/l, y a un hematocrito de 25 % con un volumen de sangre de 4 l, se necesitan 10 mmol/l del compuesto para producir un aducto 2:1 del compuesto y de una Hb. Hay dos sitios de fijación idénticos en una Hb, puesto que ésta posee un doble eje de simetría.

30 *Estudios del equilibrio de oxígeno con sangre entera normal.* La Tabla 2 recopila los efectos de cuatro compuestos furánicos y de la vainillina (en unas concentraciones de 5 mM) sobre células AA. Los efectores alostéricos que aumentan la afinidad para el oxígeno de una Hb disminuyen la P₅₀ (desplazamiento hacia la izquierda de la OEC) - con relación al testigo. Esto da como resultado un valor negativo de la ΔP_{50} . El compuesto más potente es el 5HMF

($\Delta P_{50} = -17,52$ mm de Hg), seguido por el 5MF ($\Delta P_{50} = -16,16$ mm de Hg), el 5EF ($\Delta P_{50} = -15,71$ mm de Hg), y el FUF ($\Delta P_{50} = -11,35$ mm de Hg). El compuesto con el más pequeño desplazamiento hacia la izquierda es la vainillina ($-6,78$ mm de Hg). La Tabla 2 muestra también que el 5HMF desplaza hacia la izquierda a la OEC de una manera dependiente de la dosis. Los coeficientes de Hill de las Hbs modificadas, con la excepción del del FUF son menores en comparación con los de las células AA a solas.

5

Tabla 2: Estudio del equilibrio de oxígeno con sangre entera normal^a

Compuesto ^b	P_{50} (mm de Hg) ^c	ΔP_{50} (mm de Hg) ^d	n_{50} ^e
Testigo	25,84 ± 0,01	-	2,27 ± 0,20
Vainillina 5 mM ^{c*}	19,06 ± 1,98	-6,78	1,98 ± 0,23
FUF 5 mM [*]	14,49 ± 0,06	-11,35	2,30 ± 0,01
5MF 5 mM	9,68 ± 0,24	-16,16	1,70 ± 0,06
5EF 5 mM	10,13 ± 0,75	-15,71	1,77 ± 0,14
5HMF 1 mM [*]	19,19 ± 1,51	-6,65	2,08 ± 0,14
5HMF 2 mM [*]	15,04 ± 0,51	-10,80	1,98 ± 0,08
5HMF 5mM [*]	8,32 ± 0,40	- 17,52	1,88 ± 0,06

^a Los resultados son la media ± el error típico (S.E.) para 2 mediciones. ^b Las relaciones del compuesto a la Hb con unas concentraciones del compuesto de 1 mM, 2mM y 5mM son de 0,8, 1,6 y 4, respectivamente.

^c P_{50} es la presión de oxígeno en la que las células AA (con un hematocrito de 40 %) en la ausencia o presencia de compuesto están saturadas en un 50 % con oxígeno. ^d ΔP_{50} es la P_{50} de las células AA tratadas con el compuesto - la P_{50} del testigo. ^e n_{50} es el coeficiente de Hill con una saturación con oxígeno

^{*}(con finalidades comparativas).

Estudios del equilibrio de oxígeno con glóbulos rojos falciformes homocigóticos (experimento comparativo). La Tabla 3 (columnas 2 y 3) recopila los cambios en las P_{50} y ΔP_{50} para células SS tratadas con vainillina, FUF y 5HMF en una concentración de 5 mM. Todos los compuestos desplazan a la OEC hacia la izquierda, y tal como se observa en los estudios del equilibrio de oxígeno con células AA, el 5HMF es alostéricamente el compuesto más potente ($\Delta P_{50} = -25,2$ mm de Hg), seguido por el FUF ($\Delta P_{50} = -15,8$ mm de Hg), y en último lugar por la vainillina ($\Delta P_{50} = -13,5$ mm de Hg). La Figura 3 muestra la curva OEC para estos tres compuestos en una concentración de 5 mM, y muestra que la del 5HMF es desplazada significativamente hacia la izquierda en comparación con las OEC tanto del FUF como de la vainillina. Como se ha observado previamente para la vainillina con células tanto AA como SS (Abraham, y colaboradores, 1991), unas concentraciones más altas de los compuestos ensayados dieron como resultado una OEC más hiperbólica a partir de la curva con forma sigmoidea normal.

10

15

Tabla 3: Estudios del equilibrio de oxígeno y de la formación de aductos con glóbulos rojos falciformes homocigóticos^{a*}

Compuesto	Células SS P_{50} (mm de Hg) ^b	Células SS ΔP_{50} (mm de Hg) ^c	P_{50} del material hemolizado (mm de Hg)	ΔP_{50} del material hemolizado (mm de Hg) ^d	Aducto con HbS (%) ^e
Testigo	31,2 ± 1,0	-	11,2 ± 0,2	-	-
Vainillina	17,7 ± 2,2	-13,5	8,1 ± 1,1	-3,1	15 ± 3,6
FUF	15,4 ± 1,7	-15,8	5,3 ± 0,6	-5,9	24 ± 5,7
5HMF	6,0 ± 1,2	-25,2	1,8 ± 0,3	-9,4	70 ± 10,0

^a Los resultados son la media ± el error típico para 2 mediciones. ^b P_{50} es la presión de oxígeno con la que unas células SS (hematocrito 10 %) o un material hemolizado (en la ausencia o presencia de un compuesto solubilizado en DMSO) están saturadas con oxígeno en un 50 %. ^c ΔP_{50} es la P_{50} de las células SS tratadas con el compuesto o material hemolizado - la P_{50} del testigo. ^d Los valores de P_{50} se obtuvieron a partir de un material hemolizado después de una incubación de los compuestos con las células SS. ^e Valores de los aductos con HbS obtenidos a partir de los modelos de elución de HPLC del material hemolizado después de una incubación de los compuestos con las células SS

^{*}(Solamente para finalidades comparativas).

Transporte a través de las membranas de glóbulos rojos falciformes homocigóticos y reacción con una HbS. Estos experimentos se emprendieron para determinar si el desplazamiento hacia la izquierda observado para las células SS tratadas con el compuesto es el resultado de una interacción directa del compuesto con una HbS, y también para determinar si los cambios en la P_{50} observados en células SS tratadas con los compuestos de ensayo son atribuidos a la formación de diferentes niveles del aducto del compuesto y de la HbS. Los resultados están recopilados en la Tabla 3 (columnas 4-6). Cada uno de los compuestos ensayados produce un nuevo pico de la HbS modificada, que se eluye antes del pico de la HbS progenitora, indicando la formación de aductos con HbS modificados covalentemente. El 5HMF modificaba a la HbS en el grado más grande (70 %), seguido por el FUF (24 %), y en último lugar la vainillina (15 %). La Figura 4 muestra los estudios por HPLC con intercambio de cationes del material hemolizado procedente de las células SS que habían reaccionado con el 5HMF en una concentración de 5 mM. Los compuestos desplazaban también hacia la izquierda a la OEC del material hemolizado. Estos desplazamientos siguen la misma tendencia observada durante los estudios con una sangre entera normal. El 5HMF causa el mayor

20

25

desplazamiento hacia la izquierda de la Hb (ΔP_{50} de - 9,4 mm de Hg), seguido por el FUF (ΔP_{50} = - 5,9 mm de Hg) y en último lugar la vainillina (ΔP_{50} = - 3,1 mm de Hg).

5 *Estudios antidrepanocíticos de unos compuestos con glóbulos rojos falciformes homocigóticos.* Después de una exposición de las suspensiones de células SS a oxígeno solamente al 4 %, en la ausencia de compuestos de ensayo, todas las células sufrieron degradación falciforme. En la presencia de vainillina, FUF y 5HMF (en unas concentraciones de 5 mM) el porcentaje de células SS disminuye por 20, 30, y 90 %, respectivamente (Tabla 4, columnas 2 y 3). El 5HMF inhibía la degradación falciforme en el mayor grado, seguido con el FUF y por la vainillina. Estos resultados siguen la misma tendencia observada en el desplazamiento hacia la izquierda de la OEC, así como la formación de aductos de los compuestos y la HbS. La Tabla 4 muestra también los resultados del efecto
10 antidrepanocítico dependiente de la dosis de FUF y de 5HMF. Diferentes concentraciones de estos compuestos disminuían la formación de células SS de una manera dependiente de la dosis. Sin embargo, a diferencia del 5HMF, el FUF no inhibe la degradación falciforme de células a más bajas concentraciones del compuesto (1 y 2 mM).

Tabla 4: Estudios antidrepanocíticos con glóbulos rojos falciformes homocigóticos ^{a,b}

Compuesto	Degradación falciforme de células SS (%)	Inhibición de la degradación falciforme de células SS (%)	MCV ^c (fl)
Testigo	100	0	61,5
Vainillina 5 mM	80	20 ± 6,5	61,0
FUF 1 mM	100	0	60,3
FUF 2 mM	100	0	60,0
FUF 5 mM	70	30 ± 7,0	62,8
5HMF 1 mM	87	13	62,5
5HMF 2 mM	58	42 ± 1,0	61,0
5HMF 5 mM	10	90 ± 5,0	61,4

^a Los resultados son la media ± el error típico para 2 mediciones. ^b Estudios antidrepanocíticos con células SS (hematocrito de 10 %) bajo oxígeno al 4 % ^c El MCV es el volumen corpuscular medio (acrónimo de mean corpuscular volume)

* (Solamente con finalidades comparativas)

15 *El efecto de compuestos sobre el tamaño de los glóbulos rojos falciformes homocigóticos* - Como se muestra en la Tabla 4 (columna 4) la incubación de células SS con FUF o 5HMF 1, 2 y 5 mM no da como resultado cambios en los volúmenes de las células.

20 *Estudios de cristalización.* Una Hb desoxigenada que había formado un complejo o bien con FUF o con 5HMF cristalizó en las conformaciones de los estados tanto T como R2. El estado T cristalizado conjuntamente con FUF y 5HMF muestra solamente una débil fijación de estos compuestos, mientras que el estado R2 cristalizado conjuntamente con estos compuestos muestra una fijación muy fuerte. Con unas relaciones del compuesto a la Hb de 4:1, hemos observado cristales en ambos estados T y R2 en los mismos tubos de cristalización. De modo interesante, para el 5HMF, se observaron siempre más cristales en el estado R2 que en el estado T; para el FUF era verdadero generalmente el caso opuesto. Sin embargo, si se usa un gran exceso del compuesto (exceso molar ≥ 10), casi todos los experimentos de cristalización conjunta con los FUF y 5HMF dieron como resultado solamente
25 cristales en el estado R2. Estos resultados sugieren que el 5HMF es más potente alostéricamente que el FUF, lo cual es compatible con los resultados biológicos.

30 Unos cristales nativos en el estado R2 han sido cristalizados previamente en condiciones de bajo contenido de sal (Silva, y colaboradores, 1992), pero no en condiciones de alto contenido de sal. Las estructuras consiguientes de los cristales conjuntos en el estado R2, como ya se ha puntualizado, tienen moléculas de agua o de O₂ (complejos de FUF y 5HMF con Hb, respectivamente) coordinadas con los átomos de Fe. En realidad, se establece la hipótesis de que los ligandos son realmente una mezcla de O₂, CO y agua, puesto que los análisis de los complejos en el estado R2 mostraron la presencia de COHb, metHb y oxiHb (en 60-85 %), frente a aproximadamente 16 % para los cristales conjuntos en el estado T. La presencia de los ligandos en los cristales conjuntos en el estado R2 podría ser debida
35 al hecho de que la cámara anaerobia usada en estos experimentos puede no haber sido completamente desprovista de oxígeno durante el desarrollo de la cristalización. De modo interesante, los cristales conjuntos en el estado T que aparecieron en las mismas soluciones que los cristales conjuntos en el estado R2 no muestran ninguna densidad residual para la fijación de los ligandos al Fe. Estas observaciones subrayan la naturaleza de alta afinidad de una Hb en el estado relajado en comparación con una Hb en el estado tenso. Estos resultados muestran también con claridad que la estructura cuaternaria del R2 es fisiológicamente importante, como se ha puntualizado con anterioridad (Srinivasan & Rose, 1994).

40 A diferencia de los resultados de la cristalización en los estados T y R2, y de modo bastante significativo, los experimentos repetidos de cristalización en el estado R no dan como resultado cristales conjuntos de ningún tipo, especialmente con altas concentraciones de los compuestos (un exceso molar de ≥ 5 para el tetrámero de Hb). Sin embargo, si se usaron bajas concentraciones de los compuestos (un exceso molar de 4 con respecto al tetrámero de Hb) se observaron muy pocos cristales conjuntos en el estado R tanto para el FUF como para el 5HMF, permaneciendo en solución la mayor parte del complejo. Deberíamos puntualizar que nosotros fuimos capaces de

obtener con facilidad cristales nativos en el estado R (experimento testigo sin la adición de ningún compuesto) en las mismas condiciones de cristalización.

Descripciones de las estructuras de complejos en el estado R2. Las estructuras de los complejos tanto FUF-Hb como 5HMF-Hb contienen un tetrámero $\alpha 1\beta 1-\alpha 2\beta 2$ en la unidad asimétrica. Los complejos en el estado R2 y el estado nativo R2 tienen esencialmente las mismas estructuras cuaternarias de Hb (rmsds de $\sim 0,4$ Å). Sin embargo, una comparación de las estructuras de los complejos en el estado R2 con estructuras de Hb nativa en los estados R (código 1AJ9 de PDB) y T (código 2HHB de PDB) muestran unas diferencias estructurales cuaternarias muy significativas, con unas rmsd de $\sim 1,8$ Å y $\sim 3,3$ Å, respectivamente. Como fue previamente analizado e informado por Silva y colaboradores, (1992) para estructuras de Hb nativa en los estados R, T y R2, las transiciones alostéricas entre las estructuras del complejo en el estado R2 y las de las estructuras R y T muestran una extensa reorganización de las interfases $\alpha 1\beta 2$, $\alpha 1\alpha 2$ y $\beta 1\beta 2$ en los tres estados de la Hb. Las estructuras fueron superpuestas usando el dímero $\alpha 1\beta 1$ invariable (residuos Ca) en el marco de BGH como fue definido por Baldwin & Chothia (1979).

Para finalidades comparativas, a continuación se detallan unas descripciones de las interacciones entre una Hb en el estado R2 y los dos compuestos, FUF y 5HMF. Ambos compuestos furánicos están bien ordenados con unas ocupaciones de aproximadamente 100 %. Los compuestos se fijan de una manera relacionada con la simetría en la hendidura α para los dos α Val1 terminales de N, formando el grupo funcional de aldehído un enlace covalente con el nitrógeno libre de la valina. Unas interacciones específicas entre los compuestos y la proteína serán discutidas solamente para el sitio de fijación de $\alpha 1$ Val1, puesto que la otra molécula relacionada con la simetría se implica en unas interacciones similares pero opuestas en el sitio de fijación de $\alpha 2$ Val1. Una interacción covalente entre el aldehído y el nitrógeno de $\alpha 1$ Val1 dirige al anillo de furano de los compuestos hacia la cavidad central de agua. En la estructura de FUF-Hb, parece ser que el compuesto fijado tiene dos conformaciones alternadas que difieren en casi 180° . El oxígeno aromático se implica en un muy débil enlace de hidrógeno entre subunidades con el $\alpha 2$ Ser138 OG (a $3,6$ Å), que sirve para unir entre sí a las dos subunidades α . De modo interesante, si el compuesto es hecho girar a su conformación alternada, el oxígeno se enfrenta a la cavidad de agua y se implica en un débil enlace de hidrógeno entre subunidades con el $\alpha 1$ Ser131 OG ($3,5$ Å). Hay muy pocas interacciones hidrófobas ($< 3,8$ Å) entre el anillo de furano y los residuos Lys127 y Ala130.

A diferencia del FUF, no hay evidencia de ninguna rotación del compuesto de la molécula de 5HMF fijado, y éste adopta una conformación con el oxígeno de anillo enfrentado a la cavidad de agua. La interacción observada entre el FUF y el α Ser138 OG está por lo tanto ausente en la estructura del complejo de 5HMF-Hb. De modo similar al FUF, el oxígeno de anillo del 5HMF se implica en un más fuerte enlace de hidrógeno entre subunidades con $\alpha 1$ Ser131 OG ($3,1$ Å), en comparación con la fijación del FUF. Además, el sustituyente 5-hidroximetilo del 5HMF también efectúa una fuerte interacción de enlaces de hidrógeno entre subunidades con el $\alpha 1$ Thr134 OG1 ($2,6$ Å); esta interacción está ausente en la estructura del complejo de FUF-Hb. Mientras que el FUF une a las dos subunidades α conjuntamente, produciendo un débil enlace de hidrógeno entre subunidades con el $\alpha 2$ Ser138 OG, las dos moléculas de 5HMF son unidas entre sí por una fuerte red de seis enlaces de hidrógeno mediados por agua, a través de los radicales del hidroxilo y del oxígeno de anillo que unen a las dos subunidades α conjuntamente. Algunas de estas moléculas de agua se conservan en la bolsa de fijación del FUF, pero ellas son móviles y no se implican en un contacto de unión por enlace de hidrógeno con las moléculas de FUF. De modo similar a la estructura de FUF-Hb, hay muy pocas interacciones hidrófobas ($< 3,8$ Å) entre el 5HMF y la Hb. El número aumentado de interacciones entre el 5HMF y los residuos de proteínas (en comparación con el FUF), así como los fuertes enlaces de hidrógeno mediados por agua que unen a las dos subunidades α conjuntamente en la estructura del complejo con 5HMF, pueden explicar en parte porqué el 5HMF es alostéricamente más potente que el FUF.

Descripciones de las estructuras de complejos en los estados T. Ambas estructuras de los complejos FUF-Hb y 5HMF-Hb contienen un tetrámero $\alpha 1\beta 1-\alpha 2\beta 2$ en la unidad asimétrica. A diferencia de las estructuras de complejos en el estado R2, los complejos en el estado T no muestran una fijación del compuesto definida con claridad. Algunos cristales conjuntos examinados muestran más densidad del compuesto que otros; sin embargo una construcción repetida de los modelos para mejorar la densidad del compuesto no fue suficientemente satisfactoria para permitir un acoplamiento confiable del compuesto. Los complejos en el estado T y la estructura nativa en el estado T tienen esencialmente las mismas estructuras cuaternarias de la Hb (rmsds de $\sim 0,4$ Å). Una superposición de los sitios de fijación de α Val1 muestra también muy pocas diferencias estructurales. Además, deberíamos puntualizar que en nuestro laboratorio hemos sido capaces de aislar con facilidad estructuras en el estado T que tienen compuestos enlazados covalentemente, con una densidad de electrones claramente definida en el α Val1 terminal de N usando las mismas condiciones de cristalización en el estado T que se han descrito más arriba (Abraham y colaboradores, 1995; Boyiri y colaboradores, 1995).

Descripciones de las estructuras de complejos en el estado R: Ambas estructuras de los complejos FUF-Hb y 5HMF-Hb contienen un dímero de $\alpha 1\beta 1$ en la unidad asimétrica. De modo sorprendente, los pocos cristales en el estado R que se obtuvieron durante estos experimentos muestran una densidad solamente escasa en los sitios de fijación del α Val1 terminal de N. Incluso aunque el complejo de R y las estructuras cuaternarias nativas son indistinguibles (rmsds $\sim 0,4$ Å), los terminales de C (residuos Trp140 y Arg41) presentan unas importantes diferencias de posiciones. En las estructuras de los complejos, estos residuos han girado hacia fuera en el α Lys139, desplazando al α Arg141 por casi 180° desde su posición en la estructura nativa, mientras que el α Tyr140 se ha orientado hacia fuera por ~ 2 Å. El α Tyr140 OH se implica ahora en enlaces de hidrógeno con α Val93 O y α Pro95 N en las estructuras

de los complejos, frente a los enlaces de hidrógeno de la estructura nativa en el estado R de diagnóstico con los α Val93 N y O. La reorientación del terminal de C ha conducido a una hendidura de fijación mucho más grande en las estructuras de los complejos en el estado R para permitir una fijación del compuesto, aunque sea débil. Esto contrasta con la estructura nativa, en la que se ha encontrado que los residuos terminales de C bloquean estéricamente a este sitio de fijación.

Discusión

Estos estudios han identificado unos derivados basados en furano que se presentan de un modo natural en un cierto número de alimentos, como nuevos agentes terapéuticos potenciales para tratar una SCD. Los resultados de estos estudios indican con claridad que estos compuestos poseen la capacidad de: (1) pasar a través de las membranas de los RBC; (2) reaccionar con una HbS; y (3) desplazar alostéricamente a la OEC de una Hb hacia el estado de alta afinidad, que no forma polímeros de HbS. Además, hemos encontrado que el cambio en la afinidad para el oxígeno de las suspensiones de células SS, causado por estos compuestos, depende del grado de la fijación a una HbS; el 5HMF mostró la más alta cantidad de aducto del compuesto y la HbS y, como se esperaba, era el más potente desplazador hacia la izquierda de la OEC. También, los resultados sugieren claramente que la sustitución, así como el tipo de sustitución en la posición 5 del anillo central de furano, son importantes para las actividades biológicas. El 5HMF, que posee un alcohol alquílico en la posición 5 del anillo de furano, es más potente que cualquiera de los 5MF o 5EF (Figura 2), ambos de los cuales poseen unos radicales hidrófobos en esta posición. El FUF, sin ninguna sustitución, es el menos potente. Esto es compatible con los resultados cristalográficos, que indican que el radical hidroxilo del 5HMF está implicado íntimamente en unas interacciones que estabilizan al estado relajado. Los coeficientes de Hill de las Hbs modificadas son relativamente más pequeños en comparación con el de la Hb sin modificar, sugiriendo una disminución en la cooperatividad. Esto es esperado, puesto que la debilitación aparente de las interacciones entre dímeros por la fijación de los compuestos al estado T, que conduce a una afinidad aumentada con oxígeno, a una cooperatividad reducida y a un desplazamiento hacia la Hb de alta afinidad.

Actividades antitrepanocíticas de los compuestos furánicos. Los resultados del escrutinio del FUF y del 5HMF con células SS muestran que estos compuestos tienen fuertes propiedades antitrepanocíticas, más fuertes que las de otros conocidos aldehídos antitrepanocíticos. En una concentración de 5 mM, el 5HMF inhibía la degradación falciforme de células aproximadamente 4 y 2,5 veces más que la vainillina y el FUF, respectivamente. Como detalle digno de mención, incluso en una concentración de 2 mM, el 5HMF reduce la degradación falciforme de las células por un 42 %, dos veces más que la vainillina en una concentración de 5 mM. El 5HMF, que modifica en el mayor grado a una HbS, es el más potente compuesto desplazador hacia la izquierda, así como el agente antitrepanocítico más potente; lo inverso es verdadero para la vainillina. Por lo tanto, parece ser que la acción antitrepanocítica de estos compuestos resulta de su capacidad de fijarse a una HbS y de desplazar hacia la izquierda a la OEC hacia el estado de alta afinidad. E incluso aunque no se han determinado las actividades antitrepanocíticas de los 5MF y 5EF (Figura 2), basándonos en las relaciones de estructura y actividad, nosotros predecimos que ambos compuestos exhibirán unas actividades antitrepanocíticas que estarán situadas entre las de los FUF y 5HMF.

También es importante el hecho de que los compuestos no deshidratan a las células SS. La polimerización de una HbS y la degradación falciforme de células SS están vinculadas con la concentración intracelular de la HbS, por lo tanto, cualquier agente que cause una deshidratación de los RBCs aumentaría la concentración molar de la HbS, y presumiblemente aumentaría la formación de polímeros. Además, aunque no se informa, los compuestos no favorecen la formación de una metHb o de una Hb desnaturalizada asociada con membranas.

Mecanismo para las actividades antitrepanocíticas de los compuestos furánicos. Los resultados de estos estudios muestran con claridad que los compuestos furánicos se fijan covalentemente con, y desestabilizan a, la HbS en el estado T y/o estabilizan a la HbS en el estado relajado. Como resultado de esto, el equilibrio alostérico se desplaza hacia la izquierda en dirección a la HbS de alta afinidad más soluble en la forma de la conformación R2. Por lo que conocemos, ésta es la primera de dichas observaciones informadas en la bibliografía, que muestra que un compuesto inducía un cambio conformacional desde una Hb en el estado T a una Hb en el estado R2, conduciendo a un aislamiento de cristales conjuntos de R2 a partir de una solución de desoxi Hb. Hemos establecido la hipótesis de que ésta es la causa subyacente de las actividades antitrepanocíticas observadas. Para comprender el mecanismo al nivel atómico que impulsa las actividades biológicas observadas de los compuestos, nosotros nos referimos a dos publicaciones hitos del grupo de Abraham (Abraham y colaboradores, 1995; Boyiri y colaboradores, 1995) en las que los autores establecieron la hipótesis de que unos agentes tales como el FSA (Figura 2), que forma aductos de bases de Schiff con el nitrógeno del α Val1 terminal de N en el estado T, y proporciona grupos para formar tanto puentes salinos como enlaces de hidrógeno con el dímero opuesto (a través del eje doble), añaden más restricciones para el estado T. Estas restricciones añadidas desplazan el equilibrio alostérico hacia el estado T de baja afinidad. En contraste, unos agentes tales como el DMHB (Figura 2) que se fijan al estado T de una manera similar, pero no se implican en ningún tipo de interacciones de unión por puentes salinos o enlaces de hidrógeno con el dímero opuesto, desplazan hacia la izquierda a la OEC. Se establece la hipótesis de que estos agentes rompen un enlace mediado por agua entre el α Val1 terminal de N y el α Arg141 terminal de C del dímero opuesto, lo que conduce a la desestabilización del estado T, y como resultado de ello el equilibrio alostérico es desplazado hacia el estado R de alta afinidad. A diferencia del FSA, los compuestos furánicos carecen de un sustituyente carboxilato que se implicaría en interacciones estabilizadoras entre subunidades cuando se fije al estado T. Lo que no está esclarecido es cómo estos compuestos se fijan al estado T, puesto que los estudios cristalográficos muestran una densidad del compuesto solamente débil e indefinida. Sin embargo, si suponemos que los compuestos se fijan con

la misma orientación que se ha observado en las estructuras de los complejos en el estado R2, un acoplamiento hipotético del 5HMF en el sitio de fijación de la α Val1 terminal de N en el estado T (con la ayuda de la débil densidad del compuesto) muestra que este compuesto se implica solamente en interacciones entre subunidades con α Thr134 OG1 y α Ser131 OG. Por lo tanto, parece ser que los compuestos furánicos se fijan al sitio de α Val1 terminal de N en el estado T, rompen el enlace de hidrógeno nativo mediado por agua, entre α Val1 y α Arg141, y desestabilizan al estado T. El resultado de esta desestabilización es un desplazamiento alostérico hacia una Hb relajada de alta afinidad en la forma del estado R2. Este mecanismo es compatible con el hecho de que: (1) se formaron cristales en el estado R2 a partir de una solución del complejo de la desoxi Hb y el compuesto furánico y (2) una cristalización en el estado T en la ausencia del compuesto furánico no da como resultado cristales en el estado R2. De hecho, todos los cristales en el estado T que fueron aislados en conjunción con los cristales en el estado R2 tenían solamente una débil densidad de compuesto - claramente, estos cristales en el estado T no tienen una suficiente cantidad del compuesto fijado para efectuar el desplazamiento alostérico. Es compatible con esta observación el hecho de que la adición de un gran exceso del compuesto furánico dio como resultado una formación del 100 % de cristales conjuntos en el estado R2 a partir de la solución del complejo con desoxi Hb - debido a una saturación del sitio de fijación de todas las moléculas de desoxi Hb.

Los resultados funcionales y cristalográficos observados así como el mecanismo propuesto, suscitan una interesante cuestión. de porqué unos cristales en el estado R2 y no unos cristales en el estado R se forman durante el experimento de cristalización en el estado T. Los análisis visuales y los estudios del anclaje molecular de las bolsas de fijación del α Val1 terminal de N de conocidas estructuras de una Hb nativa en los estados T, R y R2 pueden arrojar luz sobre la pregunta anterior. Las estructuras nativas se superpusieron usando el dímero α 1 β 1 invariante (residuos C α) en el marco del BGH (Baldwin & Chothia, 1979). En los estados tanto T como R2, las bolsas de fijación de Hb son notablemente mayores que las del estado R. Unos estudios del anclaje muestran que el 5HMF se puede acoplar con facilidad a las bolsas de fijación de los estados T y R2 sin ninguna interferencia estérica; en contraste con ello, la bolsa de fijación de α Val1 terminal de N de una Hb nativa en el estado R está amontonada estéricamente debido a la presencia de los residuos terminales de C de Tyr140 y Arg141. Por lo tanto, para que el 5HMF sea capaz de fijar al estado R, deben de haber unas transposiciones de los residuos de la bolsa de fijación. Esto es exactamente lo que ocurre en las estructuras de los complejos en el estado R, que muestran unas bolsas de fijación mayores en comparación con la estructura nativa. Parece ser razonable que la penalidad para una transposición de los residuos de las bolsas de fijación en el estado R debería decelerar considerablemente la incorporación del compuesto dentro del sitio de fijación (comparado con los estados T y R2). Estas observaciones pueden explicar parcialmente porqué la fijación de los compuestos furánicos a una desoxi Hb desestabilizaba a esta proteína al estado R2 y no al estado R. También, podemos suponer razonablemente que estos compuestos se fijan directamente y con una afinidad más alta al estado R2 en comparación con el estado R, y los aductos del compuesto y de una HbS, observados durante los análisis por HPLC de células SS, son debidos en su mayor parte a la incorporación de los compuestos dentro del estado R2. Deberíamos puntualizar que no hay una explicación evidente de porqué nosotros no hemos observado cristales en el estado R a partir de la cristalización aerobia de una solución del complejo del compuesto y la COHb. Sin embargo, es bastante posible que el complejo en el estado R2 existía en solución pero no era capaz de separarse por cristalización. Esto es compatible con el hecho de que casi todos los experimentos de cristalización aerobia no dan como resultado cristales, y de que los pocos que lo hacen solamente producen unos pocos cristales en el estado R quedando en solución la mayoría de la especie convertida en complejo.

Basándose en los resultados, se establece la hipótesis de que las diferencias observadas en las actividades biológicas de los compuestos furánicos examinados son debidas a sus modos de fijación tanto al estado T como al estado R2. En las estructuras de complejos en el estado R2, el 5HMF posee la capacidad de estabilizar a la conformación relajada en un mayor grado que el FUF (como se ha discutido anteriormente) La modelación de los dos compuestos dentro del estado T indica también que el 5HMF se fijaría más apretadamente al estado T que el FUF. Por lo tanto, en la ausencia de interacciones de puentes salinos entre subunidades por estos compuestos en el estado T, se espera que el 5HMF desestabilice al estado T más que el FUF.

Los estudios de Abraham y colaboradores, con vainillina (1991), de Johnson y colaboradores, con piridoxal (1985), y de Park y colaboradores, con isotiocianatos sustituidos, (2003), han sugerido que los efectos antidrepanocíticos de estos compuestos son debidos a la inhibición directa de la formación de polímeros en el estado T y/o a una formación acrecentada de moléculas en el estado R. Estos estudios supusieron la formación de una Hb en el estado R a partir de la capacidad de los compuestos para desplazar a la OEC hacia la izquierda. Claramente, nuestros estudios muestran inequívocamente que es el estado R2, en vez del estado R, el que se forma cuando la OEC es desplazada hacia la Hb de alta afinidad. Así, el modo de acción de los compuestos furánicos parece ser diferente que el de los otros compuestos antidrepanocíticos.

Conclusiones. Un homocigoto de HbS con un volumen de sangre de 4 l y un hematocrito de 25 % tiene aproximadamente 5 mmol de HbS. Para una modificación completa de una HbS con 5HMF (peso molecular = 126), se necesitarán 10 mmol, puesto que dos moléculas se fijan a una Hb, traducándose en 1,26 g del compuesto. Puesto que una modificación del 30 % de una HbS sería suficiente para conseguir un beneficio clínico, en principio, nosotros necesitamos administrar solamente 378 mg de este compuesto (suponiendo que el fármaco se dirige hacia la diana de HbS solamente). Para un compuesto tal como el 5HMF, que no es tóxico, puede ser aceptable una gran

dosificación, puesto que ciertos alimentos que se consumen sobre una base diaria, tales como café y productos de caramelos, poseen una concentración de 5HMF que algunas veces supera los 6 g/kg (Janowski, 2000). En ratas, la DL₅₀ oral aguda del 5HMF es de 2,5 g/kg para los machos y de 2,5-5,0 g/kg para las hembras (US EPA, 1992). En comparación, la vainillina, que es considerada como no tóxica, tiene una DL₅₀ oral aguda de 1,58 g/kg. Los otros compuestos furánicos se presentan también en la naturaleza y, con la excepción del FUF, no hay informes acerca de posibles efectos desfavorables del MF y del EF. Los agentes antidrepanocíticos, vainillina y 12C79, también se fijan covalentemente a una Hb, y ambos han mostrado que son clínicamente no tóxicos (Fitzharris y colaboradores, 1985; Orringer, y colaboradores, 1988). De modo notable, el 5HMF es más de cuatro veces tan eficaz en comparación con la vainillina, que actualmente se encuentra sometida a estudios clínicos para el tratamiento de una SCD. Por lo tanto, los compuestos furánicos pueden también ser unas viables moléculas de fármacos. Los resultados de este estudio presentan también una imagen coherente de las potencias antidrepanocíticas y de los mecanismos al nivel atómico de los nuevos agentes antidrepanocíticos. Con esta información, será posible realizar estudios de estructura y actividad, que darán como resultado el desarrollo de compuestos análogos con una potencia aumentada.

15 EJEMPLO 2. Efecto antidrepanocítico in vivo de 5HMF (Comparativo)

El efecto antidrepanocítico *in vivo* del 5 HMF fue investigado usando ratones transgénicos (Tg) que producen HbS humana. Puesto que la sangre de ratones de tipo silvestre tiene una OEC desplazada extremadamente hacia la derecha (P₅₀ de la sangre de ratón: 40-44 mm de Hg) en comparación con la OEC de sangre humana (P₅₀ de células AA: 26,5 mm de Hg; y de células SS: 32 mm de Hg). Se usaron en este estudio unos ratones Tg enfermos de drepanocitosis, que producen cantidades aproximadamente iguales de β-globina humana y de ratón y 100 % de β^s-globina humana. Las P₅₀ de estos ratones están entre 26 y 34 mm de Hg, dependiendo del porcentaje de β-globina de ratón. Hemos usado oxígeno al 5 % (5% de O₂, 95% de N₂), puesto que ellos desarrollan un secuestro pulmonar casi exclusivamente después de una exposición de estos ratones a O₂ al 5 %. Aunque se producen cambios similares bajo unas presiones de oxígeno situadas entre 6 y 10 mm de Hg, no todos los ratones desarrollan un secuestro pulmonar inducido por una hipoxia, indicando que se necesitan unos altos números de ratones Tg enfermos de drepanocitosis para obtener unos resultados estadísticamente significativos. Después de una exposición a una hipoxia, hemos determinado el porcentaje de ratones enfermos de drepanocitosis en la sangre así como el período de tiempo de supervivencia. El 5HMF (a razón de 100 mg/kg de peso corporal) disuelto en un pequeño volumen de DMSO, fue diluido con una solución salina antes de una inyección i.p. (intraperitoneal). En los experimentos de hipoxia, los ratones Tg enfermos de drepanocitosis fueron expuestos a una hipoxia hasta durante 1 h; cualquiera de los ratones que habían sobrevivido a la 1 h fueron sacrificados eutanásicamente por dislocación cervical bajo anestesia. En todos los casos, después de que hubo muerto el ratón, éste fue disecado inmediatamente. El corazón, los pulmones, el cerebro, el hígado, el bazo y los riñones fueron fijados en formalina tamponada con fosfato al 10 %. Las muestras de tejido fueron embebidas en parafina de acuerdo con métodos clásicos. Se cortaron unas secciones y se tiñeron con una solución de hematoxilina-eosina para microscopía óptica.

Resultados

La Figura 5 muestra la representación gráfica de la supervivencia de Kaplan-Meier para ratones testigos y ratones Tg enfermos de drepanocitosis tratados previamente con 5HMF. Sin ningún tratamiento, los ratones Tg enfermos de drepanocitosis expuestos a oxígeno al 5 % mueren en el transcurso de 15 min debido a un secuestro pulmonar. Después de un tratamiento previo de ratones Tg enfermos de drepanocitosis con 5HMF, más de la mitad de los ratones sobrevivieron durante más tiempo que 25 min. Como se muestra en la Figura 6, el período de tiempo medio de supervivencia de ratones testigos fue de 9,6 ± 3,7 (N = 13), mientras que el período de tiempo medio de supervivencia de ratones tratados previamente con 5HMF fue de 38,4 (n = 8). Se investigaron las morfologías de células SS en la sangre arterial en los momentos 0, 10, 20, 30, 40, 55 y 60 min. El transcurso en el tiempo del porcentaje de células falciformes en la arteria caudal de ratones testigos y tratados con 5HMF se muestra en la Figura 7. Se investigaron los cambios en el porcentaje de células falciformes en la sangre arterial de uno de los ratones Tg enfermos de drepanocitosis que fueron expuestos a una hipoxia (oxígeno al 5 %). El porcentaje de un ratón sin tratar aumentó desde casi un porcentaje cero hasta más de 30 % y el animal murió en 15 min. Unos estudios histopatológicos mostraron que los capilares y los vasos sanguíneos pequeños en los pulmones de estos ratones fueron empaquetados por células degeneradas a falciformes. El porcentaje de células degeneradas a falciformes en uno de los ratones tratados con 5HMF (100 mg/kg del peso corporal) mostraron que aunque había aumentado el porcentaje de células degeneradas a falciformes, las células degeneradas a falciformes son las denominadas células degeneradas a falciformes parcialmente oxigenadas (POSCs acrónimo de partially oxygenated sickled cells) con bordes romos (Asakura, 1994). Estas células son flexibles y pueden pasar a través de los capilares. Después de una conversión de las POSCs en células degeneradas a falciformes parcialmente desoxigenadas (PDSCs acrónimo de partially oxygenated sickled cells), ellas son rígidas y están atrapadas en los capilares encontrados. El 5HMF no solamente reduce la formación de las POSCs, sino también impedía la conversión de las POSCs flexibles en PDSCs rígidas.

Conclusión

Por lo tanto, unos experimentos in vivo utilizando ratones transgénicos enfermos de drepanocitosis que producen una Hb falciforme humana mostraron que un tratamiento previo de los ratones con 5HMF (administración por vía intraperitoneal) prolongó significativamente el período de tiempo de supervivencia en severas condiciones hipóxicas (con oxígeno al 5 %). Estos estudios indican que el 5HMF es un nuevo agente antidrepanocítico que puede pasar a través de las membranas de glóbulos rojos, forma un aducto con una Hb e inhibe la degradación falciforme inducida por una hipoxia de células SS.

Referencias

1. Abraham, D.J., Mehanna, A.S., Wireko, F.C., Whitney, J., Thomas, R.P. y Orringer, E.P. (1991) Vanillin, a potential agent for the treatment of sickle cell anemia (Vainillina, un agente potencial para el tratamiento de una anemia de células falciformes), *Blood* 77, 1334.
2. Abraham, D. J., Safo, M. K., Boyiri, T., Danso Danquah, R., Kister, J., y Poyart, C. (1995) How allosteric effectors can bind to the same protein residue and produce opposite shifts in the allosteric equilibrium (Cómo unos efectores alostéricos pueden fijarse al mismo residuo de proteína y producir desplazamientos opuestos en el equilibrio alostérico), *Biochemistry* 34, 15006.
3. Adachi, K., y Asakura, T. (1980) Polymerization of deoxyhemoglobin C (Polimerización de desoxihemoglobina C) Harlem ($\beta 6\text{Glu-Val}$, $\beta 73\text{Asp-Asn}$), *J. Mol. Biol.*, 144, 467.
4. Arnone, A. (1992) X-ray diffraction study of binding of 2,3-diphosphoglycerate to human deoxyhaemoglobin (Estudio por difracción de rayos X de la fijación de 2,3-difosfoglicerato a una desoxidemoglobina humana), *Nature* 237, 146.
5. Asakura, T. (1979) Automated method for determination of oxygen equilibrium curves of red cell suspensions under controlled buffer conditions and its clinical applications (Método automático para la determinación de curvas del equilibrio de oxígeno en condiciones controladas del tampón y sus aplicaciones clínicas), *Crit. Care Med.* 7, 391.
6. Asakura, T., Ohnishi, S. T., Adachi, K., Ozgul, M., Hashimoto, M., Singer, M., Russell, M.O., Schwartz, E. (1980) Effect of cetiedil on erythrocyte sickling: new type of antisickling agent that may affect erythrocyte membranes (Efecto del cetiedilo sobre la degeneración falciforme de eritrocitos: un nuevo tipo de agente antidrepanocítico que puede afectar a las membranas de los eritrocitos). *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 77, 2955.
7. Asakura, T. y Mayberry, J. (1984) Relationship between morphologic characteristics of sickle cells and method of deoxygenation (Relación entre características morfológicas de células falciformes y método de desoxigenación), *J. Lab Clin. Med.* 104, 987.
8. Asakura T, Mattiello JA, Obata K, Asakura K, Reilly MP, Tomassini N, Schwartz E, Ohene-Frempong K. (1994) Partially oxygenated sickled cells: sickle-shaped red cells found in circulating blood of patients with sickle cell disease (Células degeneradas a falciformes, parcialmente desoxigenadas: Glóbulos rojos con la forma de una hoz, encontrados en la sangre circulante de pacientes con una enfermedad de células falciformes). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91:12589.
9. Baldwin, J. y Chothia, C. (1979) Haemoglobin: the structural changes related to ligand binding and its allosteric mechanism (Hemoglobina: los cambios estructurales relacionados con la fijación a ligandos y su mecanismo alostérico), *J. Mol. Biol.* 129, 175.
10. Ballas, S. K. (1999) Complications of sickle cell anemia in adults: guidelines for effective management (Complicaciones de una anemia de células falciformes en adultos: pautas de guía para una administración efectiva;. *Clev. Clin. J. Med.*, 66, 48.
11. Beddell, C.R., Goodford, P.J., Kneen, G., White, R.D. y Wilkinson, S., y colaboradores (1984) Substituted benzaldehydes designed to increase the oxygen affinity of human haemoglobin and inhibit the sickling of sickled erythrocytes (Benzaldehídos sustituidos, diseñados para aumentar la afinidad para el oxígeno de una hemoglobina humana e inhibir la degeneración falciforme de eritrocitos degenerados a falciformes), *Br. J. Pharmacol.* 82, 397.
12. Boyiri, T., Safo, M. K., Danso Danquah, R., Kister, J., Poyart, C. y Abraham, D. J. (1995) Bisaldehyde allosteric effectors as molecular ratchets and probes (Efectores alostéricos de bisaldehídos como trinquetes y sondas moleculares), *Biochemistry* 34, 15021.
13. Brunger, A.T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P. y Grosse-Kunstleve, R. W., y colaboradores (1998) Crystallography & NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination (Sistema de cristalografía y RMN: un nuevo acompañamiento de software para la determinación de estructuras macromoleculares), *Acta Crystallogr.* D54, 905.
14. Bunn, H. F. y Forget, G. B. (1986) Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects (Hemoglobina, aspectos moleculares, genéticos y clínicos), página 462, W. B. Saunders Company.
15. Cambillau, C. y Horjales, E. (1987) TOM: A Frodo subpackage for protein-ligand fitting with interactive energy minimization (TOM: Un subpaquete Frodo para el acoplamiento de proteínas y ligandos con una minimización de la energía interactiva), *J. Mol. Graph.* 5, 174.
16. Doyle, M.L., Lew, G., Turner, G.J., Rucknagel, D. y Ackers, GK. (1992) Regulation of oxygen affinity by quaternary enhancement: Does hemoglobin Ypsilanti represent an allosteric intermediate? (Regulación de la afinidad para el oxígeno por intensificación cuaternaria: ¿representa la hemoglobina de Ypsilanti un intermedio alostérico? *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 14, 351.
17. Edelstein, S.J. Capítulo 25, Sickle Cell Anemia (Anemia de células falciformes) en *Ann. Reports in Med. Chem.* Bailey, D.M., coordinador de edición; Academic Press, Inc. 20, 247, (1985).
18. Fitzharris, P., McLean, A.E., Sparks, R.G., Weatherley, B.C., White, R.D. y Wootton, R. (1985) The effects in volunteers of BW12C, a compound designed to left-shift the blood-oxygen saturation curve (Los efectos en

- voluntarios del BW12C, un compuesto diseñado para desplazar hacia la izquierda a la curva de saturación de oxígeno en sangre) *Br. J. Clin. Pharmacol.* 19, 471.
19. Hijjiya, N., Horiuchi, K. y Asakura, T. (1991) Morphology of sickle cells produced in solutions of varying osmolarities (Morfología de células falciformes producidas en soluciones de osmolaridades variables), *J. Lab. Clin. Med.* 117, 60
20. Hillery, C. A. (1998) Potential therapeutic approaches for the treatment of vaso-occlusion in sickle cell disease (Potenciales enfoques terapéuticos para el tratamiento de una oclusión de vasos en una enfermedad de células falciformes). *Curr. Opin. Hematol.*, 5, 151.
21. Ingram, V.M. (1956) A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anaemia haemoglobin (Una diferencia química específica entre las globinas de una hemoglobina humana normal y una hemoglobina con anemia de células falciformes), *Nature* 178, 792.
22. Janin J. y Wodak S.J. (1993) The quaternary structure of carbonmonoxy Hb Ypsilanti (La estructura cuaternaria de la carbonmonoxi Hb de Ypsilanti), *Proteins* 15, 1.
23. Janzowski, C., Glaab, V., Samimi, E., Schlatter, J. y Eisenbrand, G. (2000) 5-Hydroxymethylfurfural: assessment of mutagenicity, DNA-damaging potential and reactivity towards cellular glutathione (5-hidroximetilfurfural: comprobación de la mutagenicidad, el potencial de dañar al ADN y la reactividad hacia el glutatión celular), *Food Chem. Toxicol.* 38, 801.
24. Johnson, R. M, Feo, C. J., Nossal, M. y Dobo, I. (1985) Evaluation of covalent antisickling compounds by PO2 scan ektacytometry (Evaluación de compuestos antidrepanocíticos covalentes por ektacitometria de exploración con PO2), *Blood* 66, 432.
25. Johnson, F.L. (1985) Bone marrow transplantation in the treatment of sickle cell anemia (Trasplante de médula ósea en el tratamiento de una anemia de células falciformes). *Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 7, 254.
26. Mehanna, A.S. Sickle cell anemia and antisickling agents then and now (Anemia de células falciformes y agentes anidrepanocíticos entonces y ahora). (2001) *Curr. Med. Chem.* 8, 79.
27. Monod, J., Wyman, J. y Changeux, J. -P. (1965) On the nature of allosteric transitions: A plausible model (Acerca de la naturaleza de las transiciones alostéricas. Un modelo plausible), *J. Mol. Biol.* 12, 88.
28. Mueser, T. M., Rogers, P. H. y Arnone, A. (2000) Interface sliding as illustrated by the multiple quaternary structures of liganded hemoglobin (Deslizamiento de la interfase como se ilustra por las múltiples estructuras cuaternarias de una hemoglobina con ligandos), *Biochemistry* 39, 15353.
29. Navaza, J. (1994) AMoRe: an automated package for molecular replacement (AMoRe: un paquete automático para un reemplazo molecular), *Acta Crystallogr.* D50, 157.
30. Olivieri, N.F., Weatherall, D.J. (1998). The therapeutic reactivation of fetal haemoglobin (La reactivación terapéutica de una hemoglobina fetal). *Hum. Mol. Genet.* 7, 1655.
31. Orringer, E. P., Berkwitz, L. R. (1986) In Approaches to the therapy of sickle cell anemia (en enfoques para la terapia de una anemia de células falciformes), Beuzard, Y.; Charache, S., Galacteros, F., coordinadores de edición; Les Edition Inserum: Paris, 141, 301.
32. Orringer, E.P., Binder, E.A., Thomas, R.P., Blythe, D.S. y Bustrack, J.A., y colaboradores (1988) Phase I study of BW 12C in sickle cell disease (SCD) patients not in crises (Estudio en la fase I de BW 12C en pacientes de una enfermedad de células falciformes (SCD) que no están en crisis, *Blood*, 72, 69, (suplemento).
33. Pauling, L., Itano, H.A., Singer, S.J. y Wells, I.C. (1949) Sickle Cell Anemia, a Molecular Disease (Anemia de células falciformes, una enfermedad molecular), *Science* 110, 543.
34. Park, S., Hayes, B.L., Marankan, F., Mulhearn, D.C., Wanna, L., Mesecar, A.D., Santarsiero, B.D., Johnson, M.E. y Venton, D.L. (2003) Regioselective covalent modification of hemoglobin in search of antisickling agents (Modificación covalente regioselectiva de una hemoglobina en la búsqueda de agentes antidrepanocíticos), *J Med. Chem.* 46, 936.
35. Perutz, M.F. (1968) Preparation of Hb crystals (Preparación de cristales de Hb), *J Crystal Growth* 2, 54.
36. Perutz, M.F. (1970) Stereochemistry of cooperative effects in hemoglobin (Estereoquímica de efectos cooperativos en una hemoglobina), *Nature* 228, 726-734.
37. Reeves, R. B. (1980) The effect of temperature on the oxygen equilibrium curve of human blood (El efecto de la temperatura sobre la curva de equilibrio de oxígeno de una sangre humana), *Resir. Physiol.*, 42, 317.
38. Safo, M.K. y Abraham, D.J. (2003) en Ronald L. Nagel, coordinador de edición., *Methods in Molecular Medicine: Hemoglobin Disorders, Molecular Methods and Protocols* (Métodos en medicina molecular: Trastornos de la hemoglobina. Métodos y protocolos moleculares), Vol. 82, p.1. Humana Press Inc, Totowa, NJ.
39. Silva, M.M., Rogers, P.H. y Arnone, A. (1992) A third quaternary structure of human Hb at 1.7 Å resolution (Una tercera estructura cuaternaria de una Hb humana con una resolución de 1,7 Å), *J. Biol. Chem.* 267, 17248.
40. Smith, F.R., Lattman, E.E. y Carter, C.W.R. (1991) The mutation $\beta 99$ Asp-Tyr stabilizes a new composite quaternary state of human Hb (La mutación $\beta 99$ Asp-Tyr estabiliza a un nuevo estado cuaternario compuesto de una Hb humana), *Proteins* 10, 81.
41. Srinivasan, R. y Rose, G.D. (1994) The T-to-R transformation in Hb: a re-valuation (La transformación de T a R en una Hb: una re-evaluación), *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 11113.
42. Zaugg, R.H, Walder, J. A. y Klotz, I. M. (1977) Schiff Base Adducts of Hemoglobin Modifications that inhibit erythrocyte sickling (Aductos de bases de Schiff de modificaciones de hemoglobina que inhiben la degeneración falciforme de eritrocitos), *J. Biol. Chem.* 252, 8542.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto seleccionado entre el conjunto, que consiste en:



para su uso en el tratamiento de una enfermedad de células falciformes en un paciente que necesita de éste.

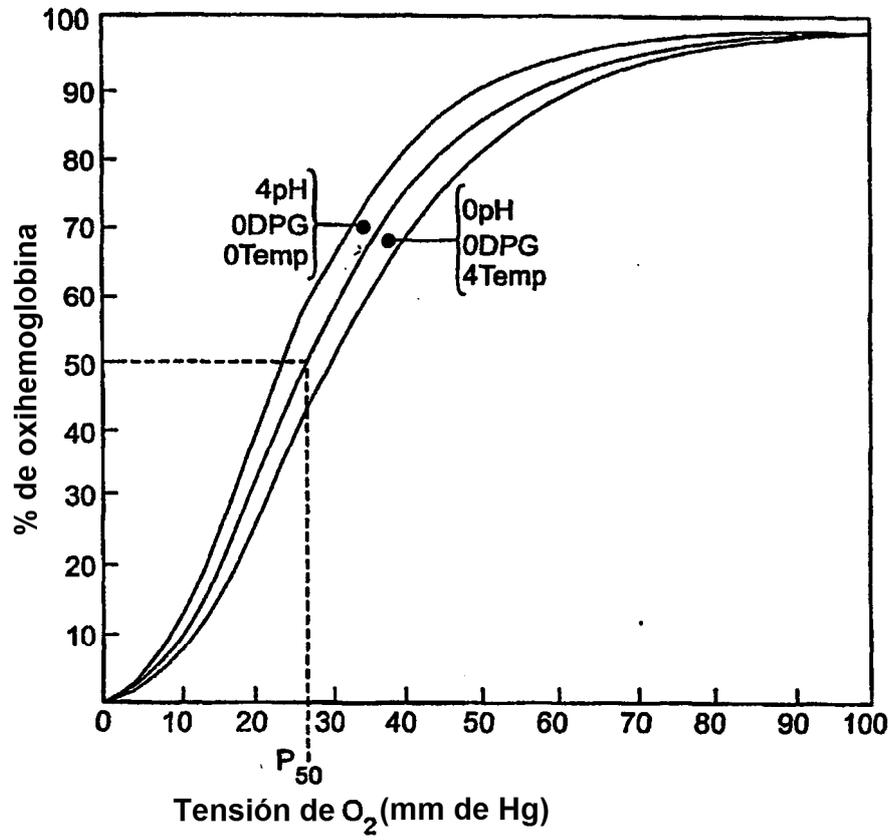


Figura 1

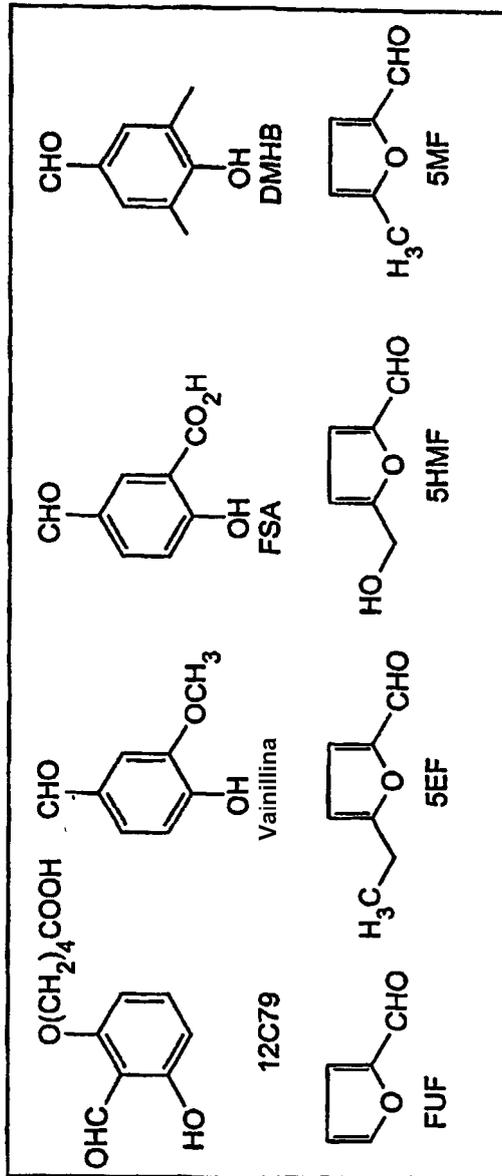


Figura 2

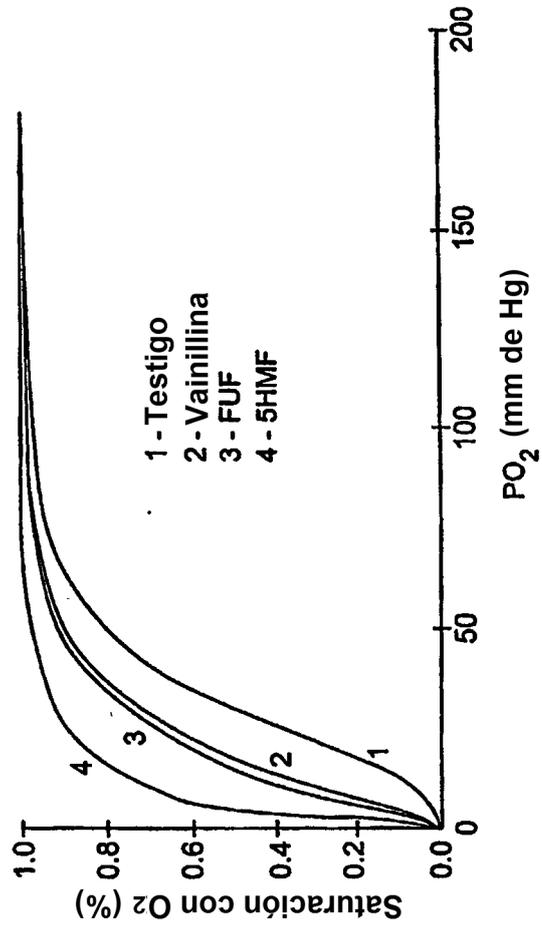


Figura 3

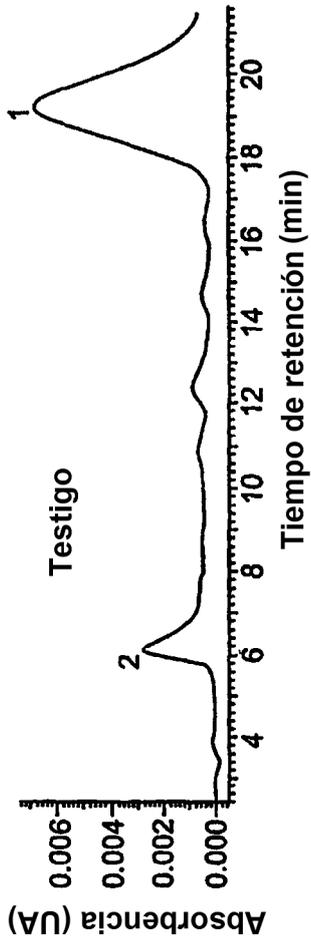


Figura 4A

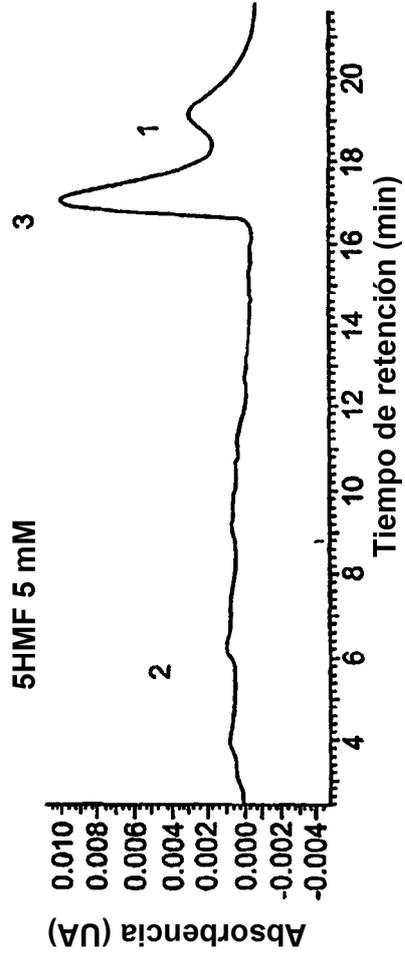


Figura 4B

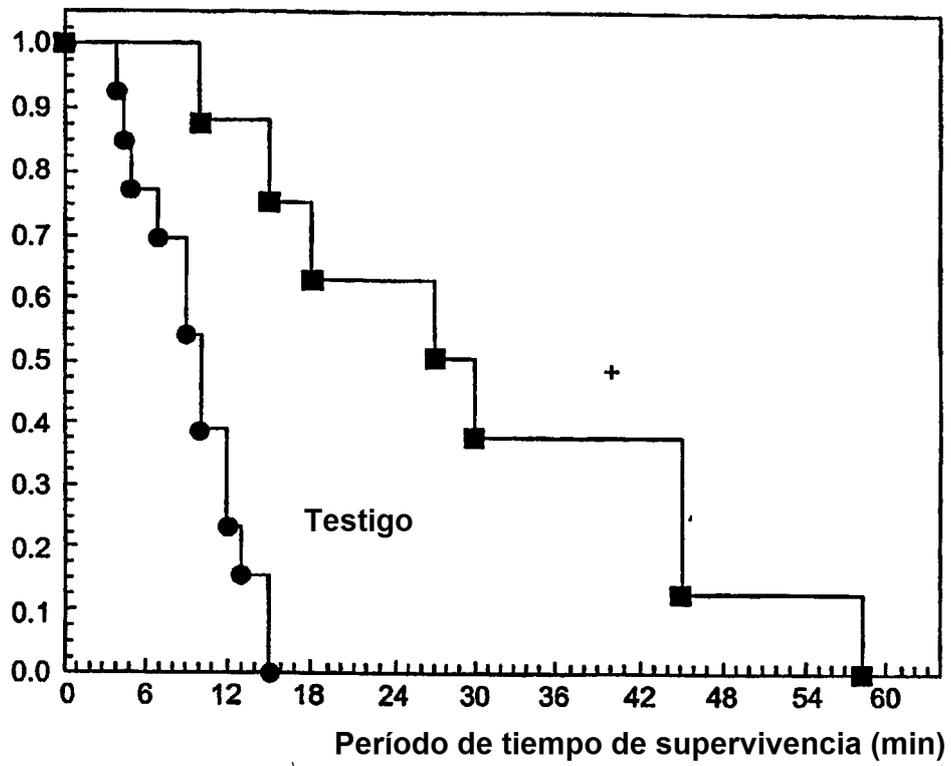


Figura 5

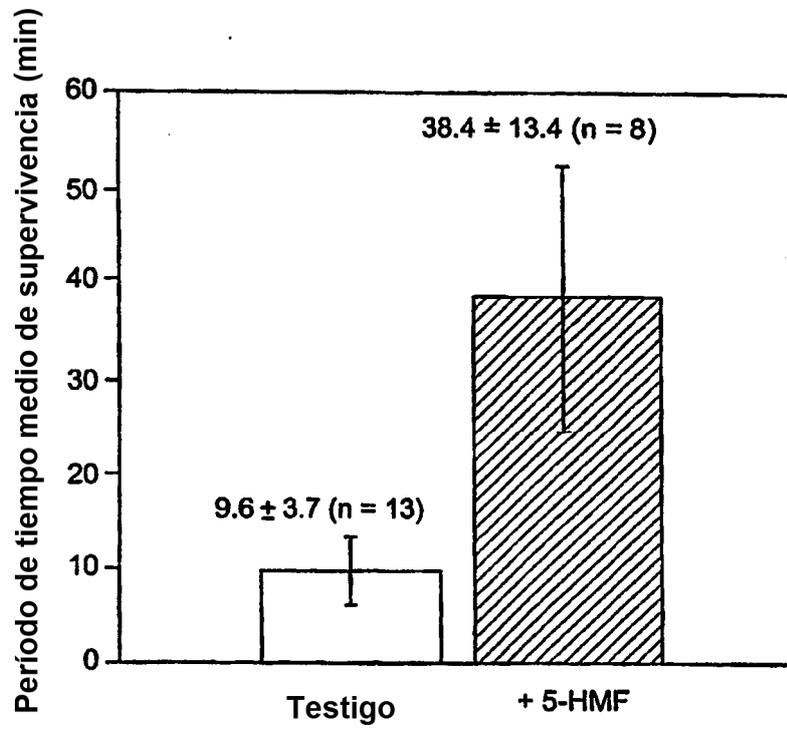


Figura 6

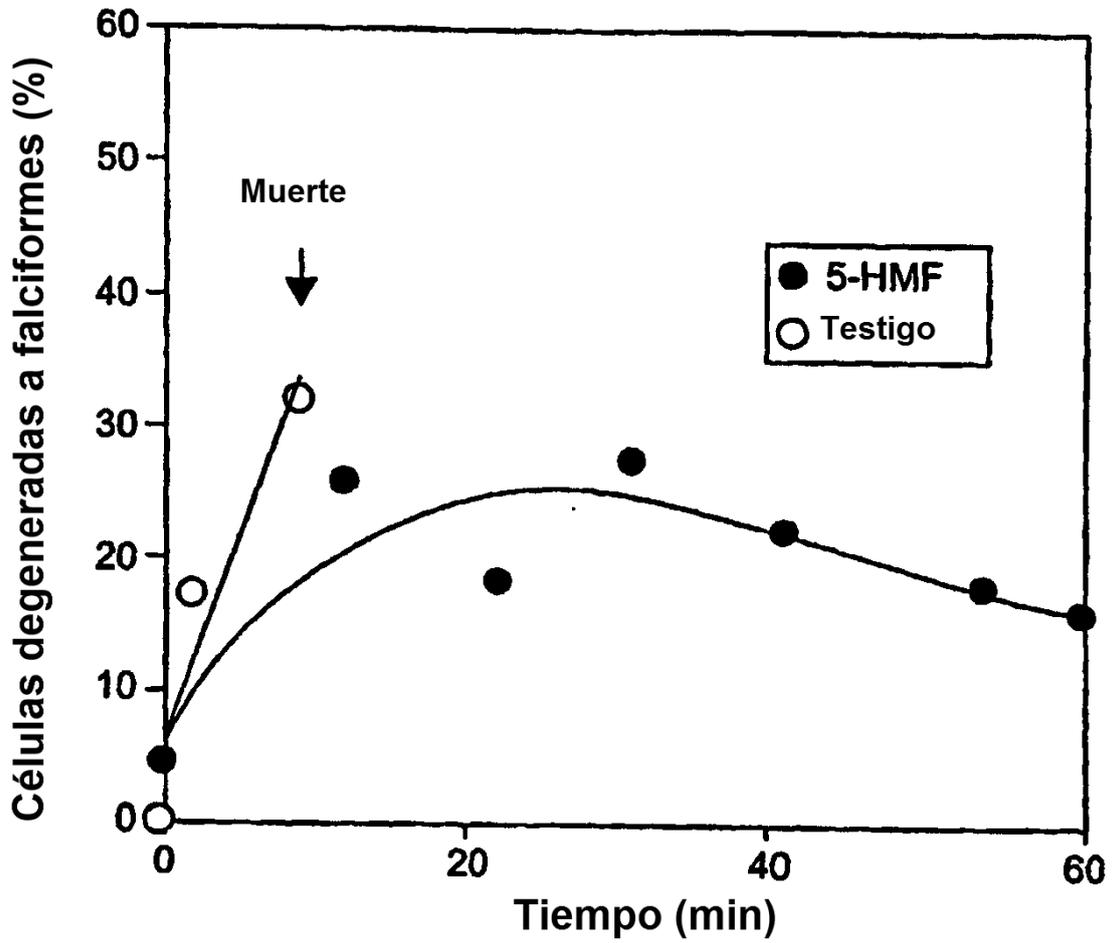


Figura 7