

COLABORACIONES EN QUÍMICA

PRIMEROS PASOS EN EL DESCUBRIMIENTO DE NUEVOS FÁRMACOS ANTICANCERÍGENOS

INTRODUCCIÓN

El Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) es un centro multidisciplinar y dinámico que trabaja en la investigación del cáncer. El cáncer es una enfermedad que mata a 93000 personas y se descubren 150000 casos nuevos cada año en España. Esta enfermedad afecta a todas las edades, no distingue entre sexos y además es difícil de curar.

Los objetivos del CNIO son desarrollar una investigación que permita obtener nuevos y más eficaces métodos de diagnóstico y tratamiento de enfermedades oncológicas y trasladar estos conocimientos científicos a la práctica clínica consiguiendo que los avances científicos repercutan lo antes posible en el bienestar de los pacientes enfermos de cáncer.

El CNIO está formado por 8 Programas de Investigación, entre los cuales se encuentra el Programa de Terapias Experimentales (ETP). ETP es un programa totalmente integrado en la estructura del CNIO y juega un papel muy importante dentro de este centro porque rellena el hueco existente entre la Investigación Básica y la Investigación Aplicada. El objetivo del Programa de

Terapias Experimentales es la investigación para el descubrimiento de nuevos fármacos anticancerígenos que puedan curar a los pacientes enfermos.

La investigación para el desarrollo de nuevos fármacos es un proceso largo (se tarda en desarrollar un nuevo fármaco entre 10 y 15 años), costoso (el coste total está estimado entre 800 y 1000 millones de dólares) y de "tipo embudo" (se parte de 5000-10000 compuestos por cada fármaco que llega al mercado). El proceso de desarrollo de un fármaco está dividido en diferentes etapas (Figura 1):

1. La primera fase o Pre-Descubrimiento (Pre-Discovery) consiste en identificar y validar una diana terapéutica (gen, proteína, canal iónico), molécula íntimamente relacionada con la enfermedad.
2. A continuación se entra en una segunda etapa de Descubrimiento de Fármacos (Drug Discovery) en la que se identifican moléculas activas (Hits) con una acción terapéutica sobre la diana. Estos compuestos son el punto de partida para el desarrollo masivo de moléculas relacionadas (5000-10000) hasta la obtención inicialmente de unos compuestos cabeza de serie (Lead Compounds) y finalmente de una serie de candidatos con un buen perfil farmacológico.
3. Con estos candidatos (~250) se trabaja en fases preclínicas. En esta etapa los estudios se realizan a nivel celular y en animales y se estudian propiedades físico-químicas, solubilidad, estabilidad,

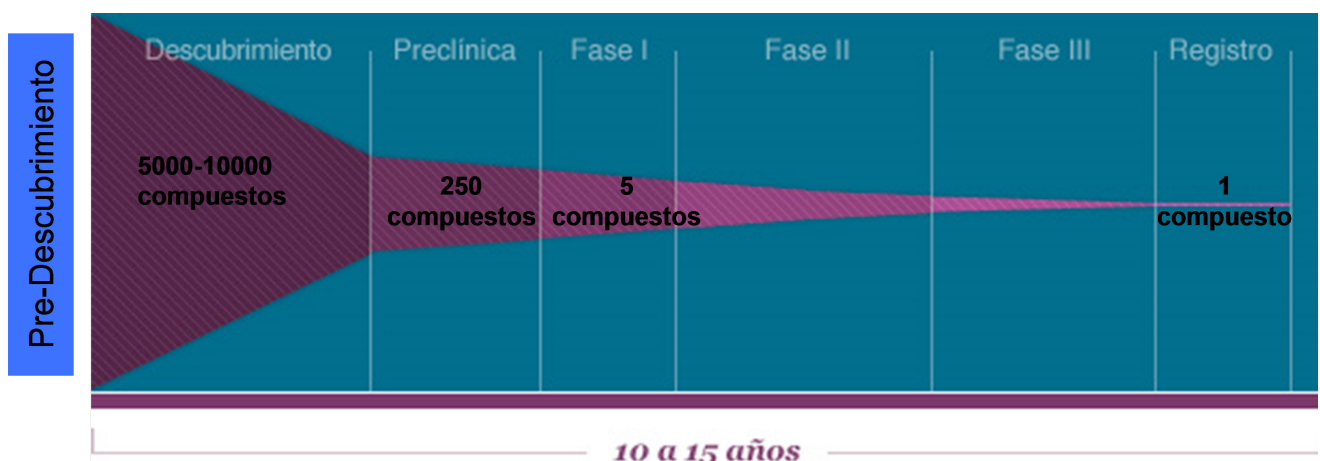


Figura 1: Proceso de desarrollo de un fármaco.

toxicología... reduciéndose el número de compuestos que pasan todos los filtros (~5)

4. En la fase clínica (dividida en diferentes etapas) se realizan los estudios en humanos para determinar la seguridad, la eficacia, los efectos de su uso a largo plazo... sólo 1-2 compuestos cumplirán todos los requisitos para finalmente ser evaluados por las autoridades sanitarias las cuales son las que autorizan y aprueban la puesta en el mercado y la comercialización del nuevo fármaco.

MODUS OPERANDI DE ETP EN EL DESCUBRIMIENTO DE FÁRMACOS

De todo este largo proceso de desarrollo de un fármaco, el grupo de Terapias Experimentales del CNIO trabaja únicamente en fases tempranas de *Descubrimiento de Fármacos* teniendo como objetivo el demostrar con un producto diseñado y sintetizado en el grupo de Terapias Experimentales la prueba de concepto *in vivo* (PoC).

ETP está dividido en dos secciones que trabajan de forma coordinada:

- Sección de Química Médica, en la cual se desarrolla el diseño, la síntesis y la caracterización de nuevos compuestos.
- Sección de Biología en la que se analizan los compuestos anteriormente sintetizados en diferentes ensayos farmacológicos tanto *in vitro* como *in vivo*.

El Programa de Terapias Experimentales sigue una serie de etapas para llevar a cabo el proceso de descubrimiento de fármacos (Figura 2).

1. Una vez seleccionada la diana terapéutica, hay dos métodos para identificar los hits o compuestos activos biológicamente frente a la diana:

- Mediante el programa de cribado farmacológico de alto rendimiento (High-Throughput-Screening ó HTS), el cual testa de una forma muy rápida miles de sustancias químicas de la librería de compuestos de ETP frente a la diana.
- Mediante el diseño racional basado en ligandos conocidos descritos en literatura o bien en la estructura de rayos X de la proteína.

Una vez seleccionados los compuestos activos, hits, en la sección de Química Médica se realiza en primer lugar una fase de validación del hit, que conlleva en algunos casos la resíntesis del producto para ensayarlo biológicamente y la síntesis de algunos análogos para evaluar si existen posibilidades de modificar su actividad biológica mediante modificaciones estructurales en las moléculas. En la selección de hits y su diseño es importante tener en cuenta si el espacio químico que cubren está libre o bien cae dentro de alguna patente, ya que es importante poder proteger la propiedad intelectual de estas moléculas una vez avanzadas.

2. A continuación pasamos a una segunda etapa cuya finalidad es generar compuestos cabeza de serie con mejores datos farmacológicos (Hit to Lead), que consiste en explorar mediante modificaciones químicas de las moléculas, las relaciones estructura actividad de los compuestos frente a la diana biológica (SAR) así como las relaciones estructura-propiedades (SPR) para poder anticipar potenciales alertas de cara a la optimización de los compuestos para ser administrados una vez optimizados *in vivo*. En la sección de Química Médica se estudia cual es la porción mínima de la molécula del hit que le confiere la actividad al compuesto (puede ser desde un heterociclo a un grupo funcional en una posición determinada...), o bien se define el farmacóforo,

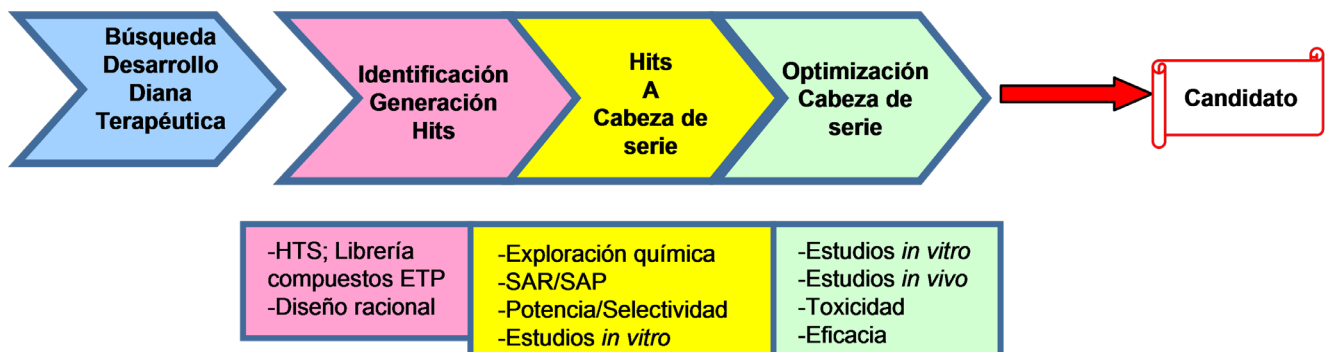


Figura 2: Etapas del Proceso de Descubrimiento de Fármacos.

interacciones clave para la actividad de los compuestos. Esta parte de la molécula se deja fija y se realizan variaciones estructurales en el resto de la molécula, como son: sustituciones de grupos bioisómeros (que son grupos que se asemejan en sus propiedades físicas, químicas o biológicas); cambios o adicciones de determinados grupos funcionales, heterociclos o átomos que le confieren al compuesto una mayor solubilidad, permeabilidad, potencia, selectividad....; simplificaciones de la molécula; transformaciones de cadenas alquílicas en ciclos...

En la sección de Biología se realizan los ensayos farmacológicos de todos los compuestos sintetizados. En esta fase se buscan compuestos que presenten: una alta potencia; alta selectividad frente a otras dianas; propiedades *in vitro* ADME-tox (que miden la capacidad que tiene el compuesto para Absorberse, Distribuirse en los diferentes tejidos, su Metabolismo, Excreción o eliminación del organismo y Toxicidad).

En esta fase se estudia en profundidad la relación de la estructura química de los compuestos con su actividad farmacológica (SAR) y la relación de la estructura química con sus propiedades ADME (SPR). Además se realiza el mecanismo de acción (MoA) en líneas celulares de los compuestos más activos.

Este proceso de generación y optimización de la estructura química con la actividad terapéutica se repite hasta que tengamos una serie de compuestos cabeza de serie que presenten un buen perfil farmacológico *in vitro*.

3. El objetivo de esta última fase es la optimización de los compuestos cabeza de serie para obtener un candidato para la fase preclínica (Lead Optimization). Para ello se explora más en detalle los cabezas de serie por modificaciones químicas más enfocadas y

se refina no sólo la potencia de los compuestos sino también sus propiedades farmacológicas (solubilidad, permeabilidad, estabilidad metabólica e interacciones con citocromos; este último punto es importante para poder definir las interacciones entre fármacos en el caso que se lleve a cabo una terapia combinada).

Estos compuestos generados son ensayados en la Sección de Biología a nivel *in vivo* para conocer sus propiedades farmacocinéticas (qué le sucede al fármaco a su paso por el organismo) y farmacodinámicas (qué le sucede al organismo por la acción del fármaco).

La farmacocinética (pK) estudia las propiedades *in vivo* LADME (liberación; absorción, distribución, metabolismo y excreción). Sólo los compuestos que pasan con éxito los anteriores ensayos farmacocinéticos son seleccionados para ensayos farmacodinámicos para determinar: relación dosis/respuesta; mecanismo de acción (MoA) *in vivo* por administración oral; eficacia en modelos de ratón tumorales.

Los compuestos que pasen con éxito estos ensayos serán candidatos para pasar a la siguiente fase de ensayos preclínicos.

En este proceso de desarrollo de un fármaco se van sucediendo y repitiendo las diferentes etapas tanto en la síntesis de compuestos como en los ensayos farmacológicos, por tanto esta metodología se convierte en un proceso reiterativo de generar compuestos y optimizar estructura/actividad/propiedades, lo que permite al grupo de ETP establecer continuamente nuevas hipótesis para optimizar tanto las propiedades químicas como las farmacológicas de los compuestos que se van sintetizando (Figura 3). Este largo proceso permite generar una gran cantidad de compuestos químicos y de datos tanto químicos como farmacológicos.

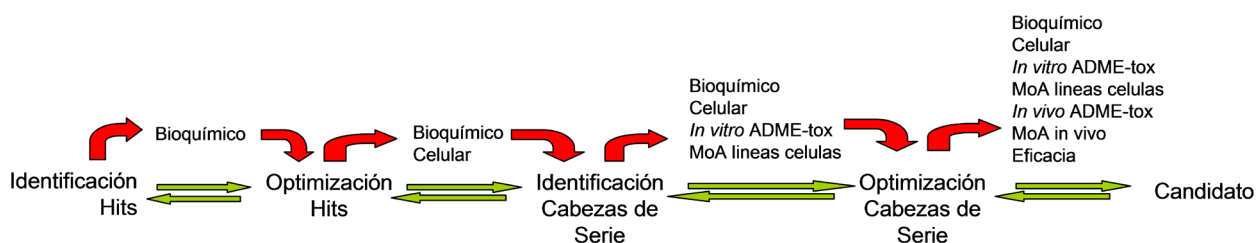


Figura 3: Relación entre los ensayos farmacológicos con la síntesis de los compuestos en las diferentes etapas de desarrollo de un fármaco.

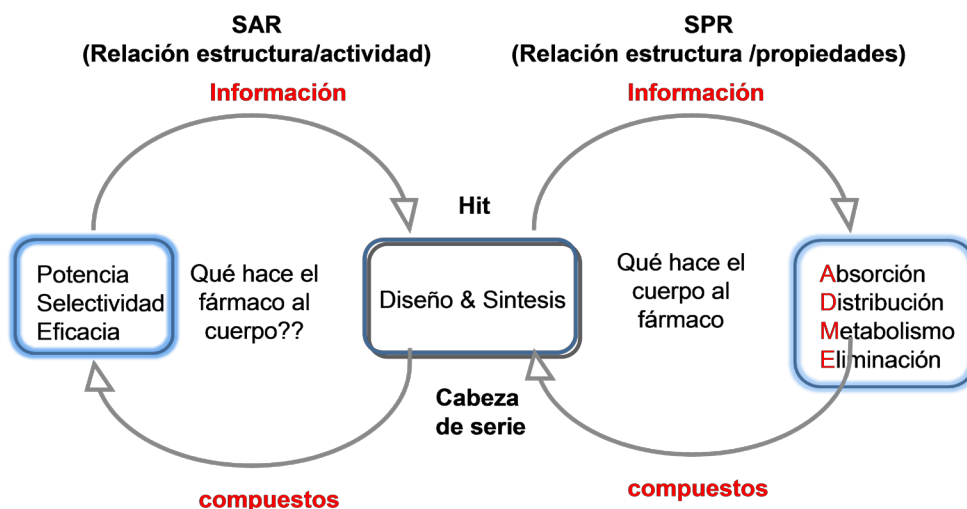


Figura 4: Balance entre la potencia/selectividad/eficacia y las propiedades ADME en el proceso de desarrollo de un fármaco.

El compuesto más activo y/o selectivo no tiene porque ser el mejor compuesto porque puede presentar limitaciones en las propiedades ADME, por tanto la selección del mejor candidato se basa en un balance entre su potencia/selectividad y las propiedades ADME-tox (tanto in vitro como in vivo) (Figura 4).

DESARROLLO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PI3K EN ETP

El grupo de Terapias Experimentales se ha centrado en el estudio de nuevos inhibidores de kinasas. Las kinasas son la llave en diferentes procesos tumorales. Uno de los proyectos más avanzados es el Proyecto de PI3K (fosfatidilinositol-3-kinasa). Los inhibidores de la vía de señalización de PI3K tienen un gran interés terapéutico en oncología, ya que esta ruta está implicada en el desarrollo de numerosos tumores [1-3], lo que hace de esta kinasa una buena diana terapéutica en la investigación del cáncer. Este proyecto de PI3K es un proyecto muy competitivo en la industria farmacéutica porque diferentes compuestos ya se encuentran en estudios preclínicos y clínicos [4,5].

La serie química que aquí se describe se inició con la generación del hit a través de un diseño racional y de la plataforma de HTS [6]. En la bibliografía se disponía de la estructura de RX de la interacción de un compuesto de referencia GDC-0941 [7], inhibidor de PI3K, con la proteína. Los datos cristalográficos apuntaban a ciertas interacciones claves: enlace de hidrógeno entre el oxígeno de la morfolina del compuesto GDC-0941 y la

valina 882 de la enzima; enlaces de hidrógeno entre los nitrógenos del indazol y la tirosina 867 y el ácido aspártico 841; y un grupo 4-metanosulfonylpiperazin-1-metilo

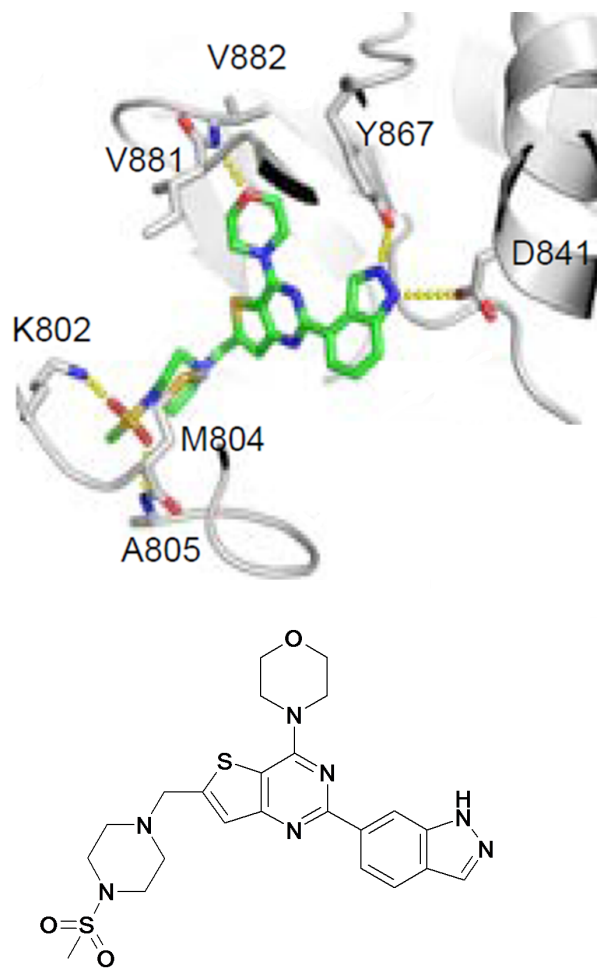


Figura 5: Estructura cristalina de los enlaces entre el compuesto GDC-0941 con la enzima

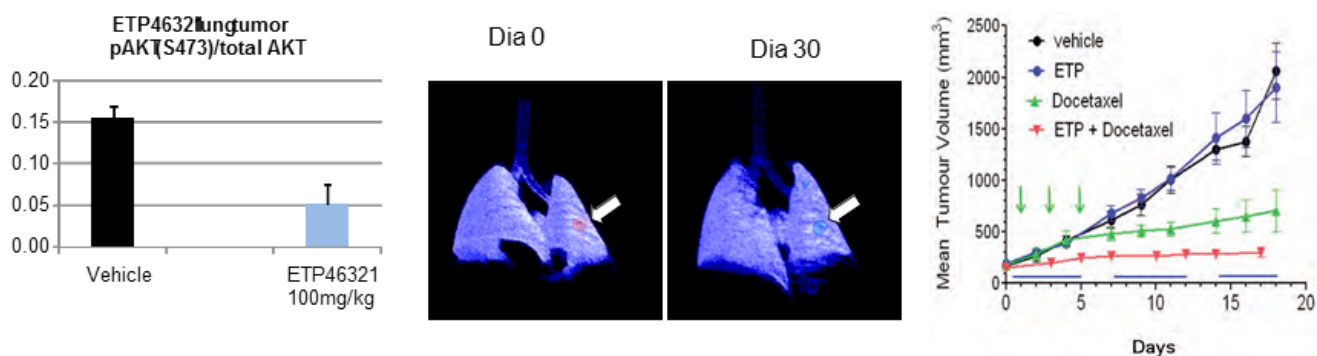


Figura 12: Representación de la disminución del volumen tumoral con la administración de ETP-46321 (izquierda); Representación de la actividad metabólica tumoral en pulmón. Antes del tratamiento (se observa el color) y después (se observa como decrece el color rojo) (centro); Representación del volumen de tumor frente a los días de administración de ETP-46321/Docetaxel/ETP-46321- Docetaxel (derecha).

Por lo tanto, el Programa de Terapias Experimentales identificó y caracterizó un nuevo inhibidor de PI3K (ETP-46321) que es capaz de impedir la señalización de PI3K y detener el ciclo celular en distintas líneas tumorales.

Este proyecto de PI3K generó también un segundo candidato (ETP-46444) [14] que presenta una alta potencia/selectividad y buenas propiedades ADME, además se ha visto que es un potencial agente en la prevención de la obesidad, lo que ha llevado a Terapias Experimentales a colaborar con el Grupo de Manuel Serrano (CNIO) para el desarrollo de este compuesto en dos áreas: cáncer y obesidad. Actualmente se sigue trabajando con este compuesto en escala de multigramo para su evaluación in vivo para estudios en ratón y mono.

PROYECTOS ACTUALES EN ETP

El grupo de Terapias Experimentales trabaja actualmente en diferentes proyectos de investigación, cuya diana terapéutica son diferentes kinasas de proteína serina/

treonina. Cada proyecto se encuentra en fases diferentes de desarrollo (Figura 14):

- PIM (proto-oncogen proteína kinasa serina/treonina); PIM/PI3K/m-TOR (diana mamífera de rapamicina). Se han obtenido una serie de inhibidores con buenas actividades farmacológicas, selectivos y con propiedades ADME-Tox, estos productos se han sintetizado a escala de multigramo para ensayos de caracterización in vivo demostrando efectos antitumorales en modelos de ratón. Estos proyectos se han licenciado a Inflection Biosciences Ltd. para su posterior desarrollo a la fase de preclínica.
- ATR (Ataxia telangiectasia-Rad3 relacionada): Se han generado tres cabezas de serie con buenos perfiles en términos de potencia/selectividad y propiedades ADME-tox de dos series químicas diferentes. Estos compuestos se han ensayado para estudios in vivo demostrando buenos perfiles como inhibidor de ATR en modelos tumorales. El proyecto ha sido licenciado a Merck Serono para el posterior desarrollo de estas moléculas.

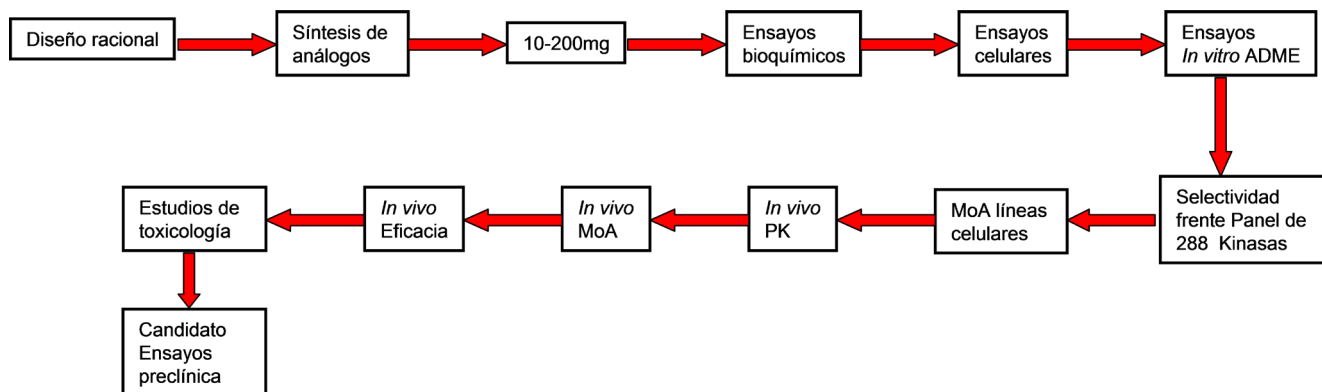


Figura 13: Representación esquemática del diagrama para el Proyecto de PI3K.

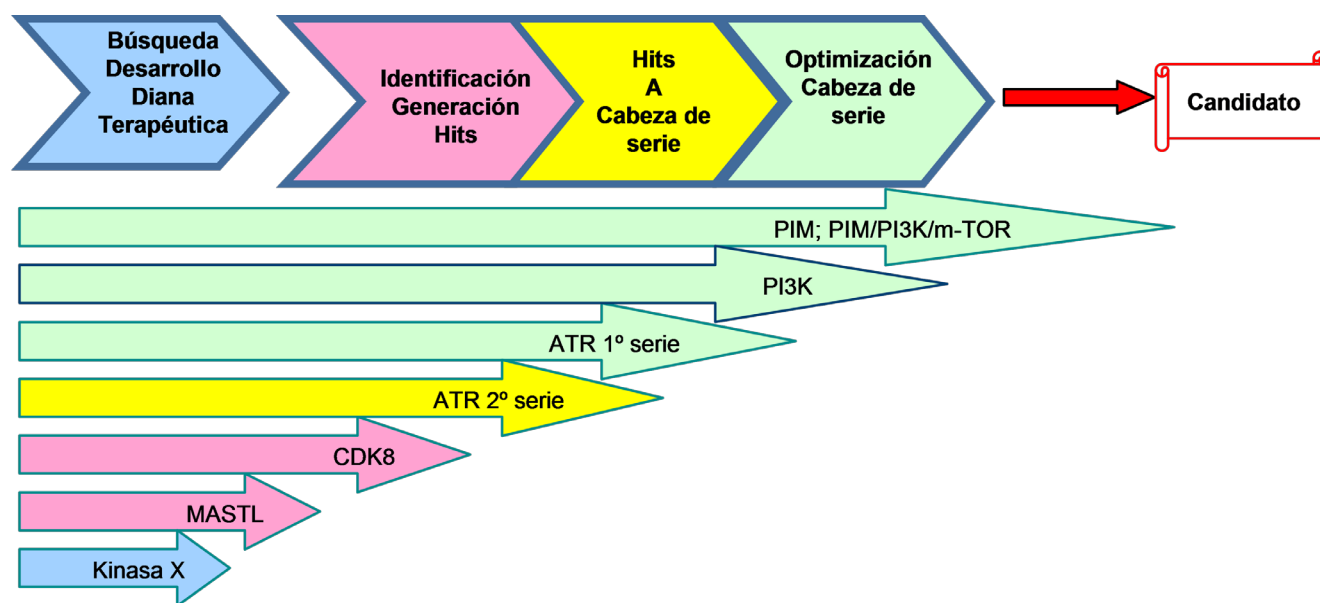


Figura 14: Status de los proyectos en 2014.

- CDK8 (división celular de la kinasa 8): Este proyecto se encuentra en fase de hit to Lead, donde se han diseñado e identificado diferentes hits que actualmente se están explorando.
- MASTL (Microtúbulos asociados de kinasa proteína serina/treonina): Este proyecto se ha efectuado un cribado con la librería de compuestos de ETP. Se han detectado cinco hits que actualmente se están validando.
- Kinasa X: Este proyecto se está realizando en colaboración con VIB Research Center. Realizada una campaña de screening en el grupo se han identificado unos hits que están actualmente bajo exploración química de hit to Lead.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Samuels Y *and col.* Science, 304, 554 (2004).
- [2] Parsons DW *and col.* Nature, 436, 792 (2005).
- [3] Yuan TL; Cantley LC. Oncogene, 5497 (2008).
- [4] Burger MT *and col.* Chem. Lett., 10, 774 (2011).
- [5] Berndt A *and col.* Nat. Chem. Biol., 117 (2010).
- [6] Link W *and col.* J. Biol. Chem., 284, 28392 (2009).
- [7] Folkes AJ *and col.* J. Med. Chem., 51, 5522 (2008).
- [8] Martínez González S *and col.* Bioorg. Med. Chem. Lett., 22, 1874 (2012).
- [9] Martínez González S *and col.* Bioorg. Med. Chem. Lett., 22, 3460 (2012).
- [10] Martínez González S *and col.* Bioorg. Med. Chem. Lett., 22, 5208 (2012).
- [11] Pastor J; Martínez González S; Oyarzabal J. (CNIO); WO2010119264.
- [12] Pastor J; Martínez González S; Oyarzabal J. (CNIO); WO2012052745.
- [13] Granada T *and col.* Invest New Drugs, 66 (2013).
- [14] Pastor J *and col.* (CNIO); WO2012052730.

Cristina Gómez de la Oliva
 Investigadora del Programa de Terapias Experimentales (CNIO)
 Tutora de Bioquímica y Química Bio-Orgánica y
 Productos Naturales (UNED)