

NOTICIAS CIENTÍFICAS: ANÁLISIS



Mª del Carmen Avendaño López

Académica de número de la Real Academia Nacional de Farmacia
e-mail: edicion@ranf.com

“Diversity-Oriented Synthesis Yields a Novel Lead for the Treatment of Malaria” (1)

La noticia es esta: Se ha descubierto un nuevo fármaco antimalárico a través del cribado fenotípico de una colección de compuestos obtenidos utilizando la “síntesis orientada a la diversidad” en parásitos de *Plasmodium falciparum* sanguíneos. Una vez seleccionado el primer compuesto activo (“hit”), las relaciones estructura-actividad guiaron la síntesis de compuestos con mayor potencia y solubilidad acuosa (1).

A nuestro juicio, esta noticia permite reflexionar sobre varios aspectos del desarrollo de nuevos fármacos que en la actualidad tienen gran interés.

1) Importancia creciente de los Grandes Proyectos financiados con fondos mayoritariamente públicos.

El trabajo de la noticia que nos ocupa se ha financiado a través del programa NIH-MLPCN (National Institutes of Health-Molecular Libraries Probe Production Centers), y algunos de los ensayos específicos por la compañía de Biotecnología Genzyme.

Si se analizan las páginas Web de instituciones y organizaciones tales como Medicines for Malaria Venture (MMV), Drugs for Neglected Diseases Initiative (DNDi), o Global Alliance for TB Drug Development (TB Alliance), se descubre que varios equipos de investigación y desarrollo muy motivados están alcanzando éxitos importantes en el hallazgo de fármacos dirigidos a graves problemas de salud que afectan fundamentalmente a los países pobres (2). Por ejemplo, la organización MMV ha descubierto en los últimos 6 años 9 moléculas que actúan al menos a través de 6 nuevos mecanismos de acción, por lo que es de esperar que estos compuestos formen parte de combinaciones para el tratamiento de la malaria en el futuro.

La malaria sigue siendo una enfermedad que afecta a millones de personas y se cobra muchas miles de muertes al año, afectando principalmente a naciones

subdesarrolladas altamente pobladas y con pocos recursos. El tratamiento quimioterápico utilizado durante décadas ha contribuido en gran medida a la existencia de parásitos genéticamente muy diversos, y a la consiguiente aparición de resistencias. Actualmente, la mejor opción es combinar los agentes antimaláricos con fármacos de la familia de la artemisinina (3), pero es evidente que se necesitan antimaláricos que actúen a través de nuevos mecanismos de acción.

2) ¿Buscar compuestos o buscar dianas?

La farmacología clásica ha utilizado el cribado fenotípico para identificar compuestos que alteren de una determinada (y deseada) manera el fenotipo de una célula u organismo, de forma que la diana biológica de los compuestos activos se determina, si es posible, posteriormente. Este proceso se conoce como “phenotypic drug discovery”. Hace algunos años se impuso por ser “más científico” el proceso inverso, denominado “target based drug discovery”, en el que se criban compuestos para identificar cuáles modulan la actividad de una diana específica supuestamente implicada en la patogénesis de una enfermedad. A continuación es necesario realizar ensayos con animales modelo para ver si se produce en ellos el efecto esperado (y deseado).

La secuenciación del genoma humano y el desarrollo de tecnologías de cribado de alto rendimiento, han motivado que el “target based drug discovery” haya sido la estrategia más utilizada en los últimos 20 años por la mayoría de las empresas farmacéuticas, con la ventaja añadida de que los métodos *in silico* y la informática han colaborado enormemente al diseño, selección, u optimización de una molécula para su interacción específica con una enzima, receptor o proteína bioactiva. Sin embargo, el interés por el “phenotypic drug discovery” ha resurgido debido a que permite identificar compuestos que pueden interaccionar con una o más dianas o rutas bioquímicas que no estaban previstas, a que la conexión entre la acción de un compuesto con los fenotipos relevantes en una enfermedad puede establecerse más rápidamente, y a que permite evaluar nuevos usos de fármacos que ya se han aprobado o que se encuentran en fases avanzadas de su desarrollo para otros fines terapéuticos. Es cierto que el entendimiento de los posibles mecanismos de acción puede ser complejo, pero esta tarea se ha facilitado con el desarrollo de técnicas de ensayo avanzadas (4) y el empleo de herramientas informáticas (5).

Según los expertos, una de las duras lecciones que ha tenido que aprender la industria farmacéutica en los últimos años es que es más interesante buscar compuestos que buscar dianas. Por ejemplo, desde principios del año 2000 esta industria ha encontrado una gran cantidad de dianas para la obesidad, muchas de ellas validadas por estudios quimiogenómicos (6) en modelos animales. Sin embargo los compuestos fracasaron en su posterior desarrollo clínico (7).

3) Los compuestos de una colección pueden ser precompetitivos, y más vale compartirlos que esconderlos.

El desarrollo de metodologías de síntesis orgánica se ha orientado en los últimos años a facilitar el hallazgo de moléculas pequeñas que posean una actividad biológica de interés (compuestos líder o hit compounds), que puedan optimizarse posteriormente tanto en su potencia como en su farmacocinética, y que puedan prepararse a escala industrial si alcanzan la fase de desarrollo. Para estos propósitos han surgido diversas estrategias, como por ejemplo la “síntesis orientada a la biología” y la “síntesis orientada a la diversidad”.

La primera estrategia ha puesto el énfasis en que los productos naturales (PNs) son el resultado de la selección que ha realizado la naturaleza a lo largo de siglos, por lo que poseen esqueletos privilegiados con las propiedades que se requieren para enlazarse a proteínas. En consecuencia, las colecciones de compuestos diseñados sobre la base de la estructura de los PNs deben poseer mayor interés desde el punto de vista de su actividad biológica. Este método ha elaborado una clasificación estructural de los PNs que facilita la selección de los mismos (8, 9), y ha coleccionado las transformaciones más utilizadas en su química a fin de disponer de lo que se ha denominado como la “toolbox of a NPs chemist” (10).

La estrategia denominada “síntesis orientada a la diversidad” (DOS), que es la que se ha utilizado en este trabajo, pretende encontrar síntesis cortas, de pocos pasos, que permitan obtener pequeñas moléculas estructuralmente complejas con esqueletos y estereoquímica diversos. Dentro de ésta, es particularmente interesante la estrategia B/C/P (Build/Couple/Pair), en la que los compuestos se construyen sobre módulos que poseen brazos químicamente ortogonales (11,12).

La búsqueda de nuevos antimaláricos comenzó aquí con el cribado de alto rendimiento de una colección de 8.000 compuestos seleccionados computacionalmente para que tuvieran la máxima diversidad estructural, utilizando concentraciones 5 mM en un ensayo fenotípico de malaria con la cepa Dd2 de *P. falciparum* resistente a múltiples fármacos (13).

De los 560 compuestos que mostraron una inhibición del crecimiento >90% se repitieron los ensayos a concentraciones menores, lo que condujo a 26 compuestos que produjeron una inhibición del crecimiento >50% a una concentración 280 nM. De estos compuestos, 20 pertenecían a una colección preparada por reacciones de metátesis (ring-closing metathesis, RCM).

El más activo de estos 20 compuestos fue el compuesto 1, que también se estudió para la cepa 3d7, sensible al tratamiento con fármacos (Figura 1). El análisis de sus 16 posibles estereoisómeros demostró que la actividad biológica

residía predominantemente en el estereoisómero 2S,5R,6R/12S (GI₅₀ = 120 nM para ambas cepas), y por tanto se seleccionó como hit compound.

Los estudios SAR (structure-activity relationship) se realizaron con análogos disponibles en la gran colección de compuestos que posee esta organización, y así se analizaron los efectos que produce en la actividad biológica las variaciones de los sustituyentes R₁ y R₂. Sin embargo, en este estudio no se encontró ninguna sustituyente que aumentara la potencia del compuesto 1. Entonces se investigaron nuevas modificaciones para aumentar la potencia y la solubilidad acuosa de los compuestos, partiendo del intermedio 10.

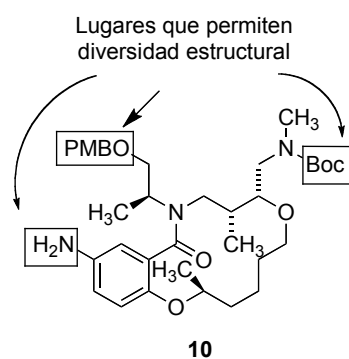
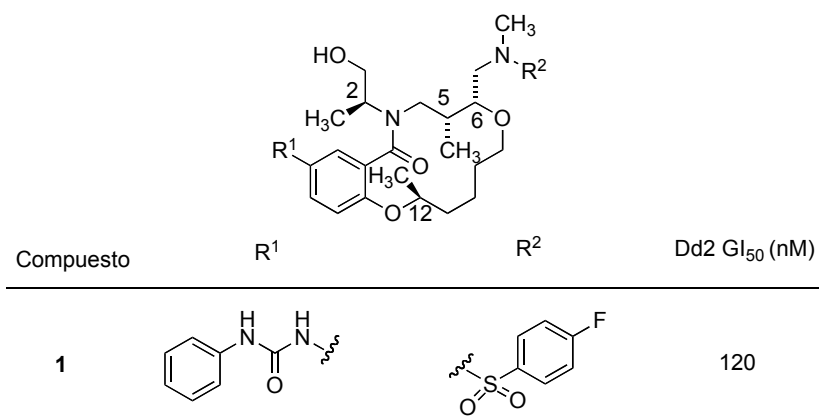
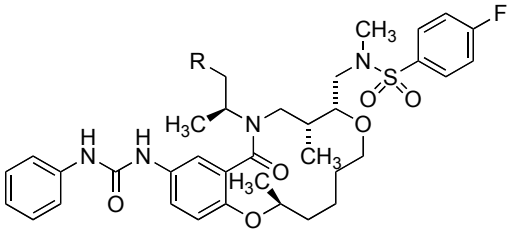



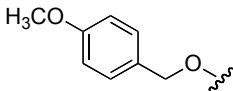


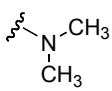
Figura 1. Estructura del hit compound 1 y del intermedio 10 utilizado para introducir diversidad estructural.

A través de la desprotección selectiva de sus grupos protectores (p-metoxibenciloxi y tertbutiloxicarbonil, y cuando se quiso enmascarar el grupo anilina se utilizó el grupo protector Fmoc: 9-fluorenometiloxicarbonil) y posteriores reacciones, se introdujo gran diversidad estructural. Así se sustituyó, por ejemplo, el agrupamiento N,N-diaril urea por diversos grupos, entre ellos por un grupo amino o amino sustituido, encontrándose algunos compuestos más solubles en agua aunque con poca potencia. En la exploración de los sustituyentes sobre el átomo de nitrógeno de la función lactama se encontraron compuestos muy potentes, como el compuesto 20 (Tabla 1), pero poco solubles en agua. El

desplazamiento del grupo hidroxilo en el compuesto 1 por un grupo azida (condiciones de Mitsunobu) produjo el compuesto 24, muy potente, que permitía además acceder a otros grupos funcionales con mayor solubilidad acuosa. Su reducción originó la amina primaria soluble 25 y su N-dimetilamino derivado 27 mostró tanto una potencia nanomolar como una buena solubilidad en agua.

Tabla 1. Algunos productos obtenidos por modificación del sustituyente en el átomo de nitrógeno de la función lactama.



Compuesto	R	Dd2 GI ₅₀ (nM)	Solubilidad en agua (μM)
1		120	<0,5
20		0,18	<0,5
24		8.2	<0,5
25		3,2	<0,5
27		0,54	120

Tras estudiar otros compuestos, se analizó especialmente la influencia del centro estereogénico en la cadena lateral del grupo amida del compuesto 27, y se tuvo el convencimiento de que éste poseía la estereoquímica óptima en dicho centro. Se le denominó compuesto ML238 y se sometió a posteriores ensayos. En ellos mostró la misma actividad en dos cepas diferentes de *P. Falciparum*, poseyendo una potencia similar a la atovoquona y siendo más potente que la cloroquina o el artesunato (los tres fármacos citados son antimaláricos que se utilizan como control). El compuesto ML238 no es tóxico para los eritrocitos ni para las células HepG2 de carcinoma hepático, se une a proteínas en el plasma, y es estable en él durante 5 horas. Actualmente se están llevando a cabo estudios para determinar su mecanismo de acción, y está disponible para su estudio a través de la plataforma MLPCN (Molecular Libraries Probe Production Centers).

4) Perseverar en la búsqueda de soluciones hasta que un problema se resuelva.

Siguiendo con el ejemplo de la plataforma Medicines for Malaria Venture (MMV), cuando ésta se creó en 1999 la lista de fármacos en desarrollo contra la malaria estaba prácticamente vacía. Debido a la escalada de la resistencia a los

fármacos utilizados hasta ese momento, esta enfermedad seguía matando de 1 a 2 millones de personas al año, niños en su mayoría, pero el beneficio económico que podía esperarse de un nuevo fármaco era demasiado pequeño para que este desafío se afrontase desde la industria farmacéutica.

Pues bien, esta organización, gobernada por expertos en investigación sobre malaria que poseen experiencia industrial y financiera, ha desarrollado junto con la empresa italiana Sigma-Tau la combinación Eurartesima® [dihidroartemisinina piperquina (DHA-PQP), Figura 2, una terapia de combinación con artemisinina que fue aprobada en noviembre de 2011 por la EMA (European Medicines Agency) para el tratamiento de la malaria sin complicaciones adicionales. Eurartesima® ofrece ventajas importantes en relación a otras terapias de combinación con artemisinina, ya que es más fácil de administrar (una vez al día durante 3 días), protege del parásito durante más tiempo debido a la mayor vida media de la piperquina, y sus formulaciones pueden almacenarse sin problemas durante dos años incluso en los países tropicales.

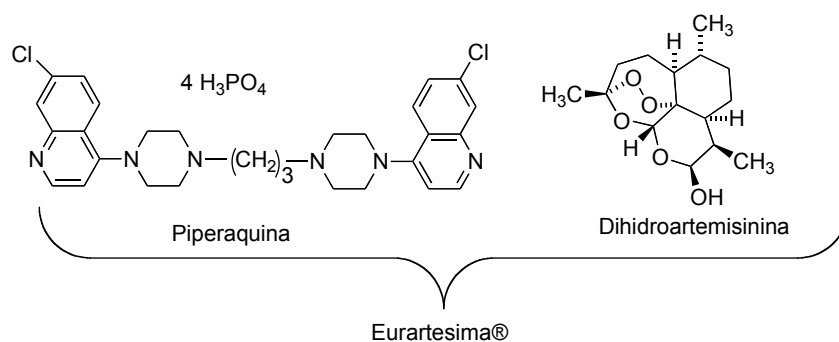


Figura 2. Estructura de Eurartesima®.

Referencias

1. Heidebrecht, R. W.; Mulrooney, C.; Austin, Ch. P.; Barker, R. H.; Beaudoin, J. A.; et al, (2012) "Diversity-Oriented Synthesis Yields a Novel Lead for the Treatment of Malaria", ACS Med. Chem. Lett., 3, 112-117.
2. Elliott, R. L., (2012) "Four lessons from Global Health Drug Discovery: Medicine for an Ailing Industry?", ACS Med. Chem. Lett., 3, 688-690.
3. Eastman, R. T.; Fidock, D. A., (2009) Nature Rev. Microbiol., 7, 864-874.
4. McNamara, C.; Winzeler, E. A., (2011) "Target identification and validation of novel antimalarials", Future Microbiol., 6, 693-704.
5. Lee, J. A.; Uhlik, M. T.; Moxham, C. M.; Tomando, D.; Sall, D., (2012) "Modern phenotypic drug discovery is a viable, neoclassic pharma strategy", J. J. Med. Chem. 55, 4527-4538.
6. Harris, C. J.; Stevens, A. P., (2006) "Chemogenomics: structuring the drug discovery process to gene families", Drug Discov. Today, 11, 880-888.

7. Yao, F.; MacKenzie, R. G., (2010) "Obesity Drug Update: The Lost Decade?" *Pharmaceuticals*, 3, 3494-3521.
8. Nören-Müller, A.; Reis-Corrêa, I.; Prinz, H.; Rosenbaum, C.; Saxena, K.; Schwalbe, H. J.; Vestweber, D.; Cagna, G.; Schunk, S.; Schwarz, O.; Schiewe, H.; Waldmann, H., (2006) "Discovery of protein phosphatase inhibitor classes by biology-oriented síntesis", *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 103,10606-10611.
9. Lachance, H.; Wetzel, S.; Kumar, K.; Waldmann, H., (2012) "Charting, Navigating, and Populating Natural Product Chemical Space for Drug Discovery", *J. Med. Chem.*, 55, 5989-6001.
10. Vasilevich, N. I.; Kombarov, R. V.; Genis, D. V.; Kirpichenok, M. A., (2012) "Lessons from Natural Products Chemistry Can Offer Novel Approaches for Synthetic Chemistry in Drug Discovery", *J. Med. Chem.*, 55, 7003-7009.
11. Schreiber, S. L., (2000) "Target-oriented and diversity-oriented organic synthesis in drug discovery", *Science*, 287, 1964-1969.
12. Nielsen, T. E.; Schreiber, S. L., (2008) "Towards the Optimal Screening Collection: A Synthesis Strategy", *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 47, 48-56.
13. Baniecki, M. L.; Wirth, D. F.; Clardy, J., (2007) "High-throughput Plasmodium falciparum growth assay for malaria drug discovery", *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51, 716-723.