

DESCUBRIMIENTO DE FÁRMACOS EN UN LABORATORIO ACADÉMICO

DRUG DISCOVERY IN AN ACADEMIC LABORATORY

Adrián Velázquez-Campoy^{1,2,3,4}

1. Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Medicina de España

2. Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos (BIFI), Universidad de Zaragoza, España

3. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Universidad de Zaragoza, España

4. Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón (IIS-A), Zaragoza, España

Palabras clave:

Descubrimiento de fármacos;
Cribado molecular experimental;
Proteína diana;
Interacciones en proteínas;
Estabilidad de proteínas;
Proteínas intrínsecamente desordenadas.

Keywords:

Drug discovery;
Experimental molecular screening;
Protein target;
Protein interactions;
Protein stability;
Intrinsically disordered proteins.

Resumen

Existe una necesidad constante de nuevos medicamentos. La industria farmacéutica ha reducido paulatinamente su atención a la búsqueda de nuevos fármacos basados en moléculas pequeñas para centrarse en el desarrollo de fármacos biológicos o biofarmacéuticos. Además, su interés está claramente sesgado hacia determinadas enfermedades que afectan predominantemente a los países desarrollados. Por tanto, existe una oportunidad para que los laboratorios académicos, con menos recursos humanos, materiales y económicos, jueguen un papel relevante en las etapas tempranas de descubrimiento de nuevos fármacos. En este trabajo se describen de forma cronológica algunos programas llevados a cabo por un grupo de investigación académico, en colaboración con otros equipos, para la identificación de compuestos químicos bioactivos con capacidad para modular la conformación y la función de proteínas diana implicadas en ciertas enfermedades y que, por tanto, constituyen puntos de partida para el desarrollo de novedosas estrategias terapéuticas.

Abstract

There is a constant need for new therapeutic agents. The pharmaceutical industry has gradually reduced its attention to the search for new small molecule-based drugs in order to focus on the development of biologics or biopharmaceuticals. Moreover, its interest is clearly biased towards certain diseases that predominantly affect developed countries. Therefore, there is an opportunity for academic laboratories, with fewer human, material and economic resources, to play a relevant role in the early stages of new drug discovery. This paper describes chronologically some programs carried out by an academic research group, in collaboration with other teams, for the identification of bioactive chemical compounds with the capacity to modulate the conformation and function of protein targets involved in certain diseases and which, therefore, constitute starting points for the development of novel therapeutic strategies.

LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA Y LOS LABORATORIOS ACADÉMICOS

Existe una necesidad constante de nuevos medicamentos debido a muy diferentes causas: 1) ausencia de un tratamiento eficaz para enfermedades desatendidas; 2) aparición de resistencia a fármacos y reducción de eficacia de tratamientos actuales frente a algunas enfermedades; 3) incremento de efectos secundarios y de interacciones entre fármacos debido a multimedicación; y 4) aparición de nuevas enfermedades emergentes. Además, estos problemas pueden estar asociados a determinados sectores poblacionales dando lugar a una situación continuada de falta de atención en una sociedad que hoy día busca constantemente un

futuro más igualitario en cuanto a oportunidades en los distintos ámbitos sociales.

Ante este panorama, la industria farmacéutica tiene un papel fundamental en el desarrollo de fármacos, ya que dispone de los recursos materiales y humanos necesarios para poder abordar costosos programas de desarrollo de fármacos que involucran a los necesarios ensayos clínicos que proporcionan evidencia científica sobre los parámetros de eficacia y seguridad sanitaria de nuevos fármacos. Sin embargo, la industria farmacéutica nunca olvida su idiosincrasia empresarial. Y quizás debido a ello, la situación actual presenta ciertas deficiencias que podrían ser corregidas mediante la acción conjunta de todas las partes interesadas.

Autor para la correspondencia

Adrián Velázquez-Campoy

Real Academia Nacional de Medicina de España

C/ Arrieta, 12 · 28013 Madrid

Tlf.: +34 91 547 03 18 | E-Mail: secretaria@ranm.es

DESCUBRIMIENTO DE FÁRMACOS: PERSPECTIVA ACADÉMICA

Velázquez-Campoy A

An RANM. 2023;140(03): 270 - 276

En primer lugar, la industria farmacéutica ha reducido paulatinamente su atención a la búsqueda de nuevos fármacos basados en moléculas pequeñas para centrarse en el desarrollo de fármacos biológicos (1). Hasta muy recientemente, el arsenal terapéutico ha estado dominado por los fármacos de moléculas pequeñas. Los avances recientes en biotecnología han permitido la fabricación de productos biológicos terapéuticos (o biofarmacéuticos) con propiedades novedosas y ventajas considerables respecto a las moléculas pequeñas: vacunas, factores de crecimiento e inmunomoduladores, así como productos derivados de la sangre y el plasma humanos. El auge de los productos biológicos en los últimos años ha sido impresionante. En 2022 siete de los diez fármacos más vendidos eran biológicos (2).

Si bien la definición de molécula pequeña es muy clara, la definición de biológico es mucho más laxa; en general, un biológico es cualquier producto farmacéutico fabricado, extraído sintéticamente o semisintéticamente a partir de fuentes biológicas. El ámbito de los productos biológicos es muy variado, desde las proteínas recombinantes (ej. péptidos, anticuerpos, enzimas, interleucinas) hasta ácidos nucleicos (ej. RNAi, terapia génica, edición génica), componentes sanguíneos, y terapias celulares y tisulares (ej. terapia con células CAR-T, trasplantes alogénicos). Las moléculas pequeñas y los biológicos difieren sustancialmente en sus propiedades fisicoquímicas, que determinan su mecanismo de acción, farmacodinámica y farmacocinética, y gobiernan también su seguridad y eficacia, e incluso condicionan su elaboración y estándares de calidad.

Los fármacos basados en moléculas pequeñas son compuestos químicos relativamente sencillos que pueden fabricarse mediante síntesis química, y tienen una masa molecular inferior a 1 kDa. Pueden administrarse por diversas vías, incluida la oral, siendo su biodisponibilidad oral la ventaja más obvia sobre los biológicos. Los biológicos suelen requerir vías de administración sistémicas, que añaden cierta complicación en su formulación y administración. Las moléculas pequeñas tienen mayor potencial de inducir efectos secundarios no deseados en mayor medida debido a su, en general, menor especificidad que los biológicos. Aun así, los biológicos no están exentos de riesgos importantes (ej. inmunogenicidad). También existen diferencias importantes entre moléculas pequeñas y biológicos relacionadas con propiedades ADME: debido a las diferentes propiedades físico-químicas, las diferentes vías de administración, y los procesos que sufren en el organismo, los biológicos presentan generalmente una semivida más larga, un volumen de distribución más limitado y un tiempo más largo para alcanzar la concentración máxima. Por otro lado, las interacciones fármaco-fármaco son menos frecuentes en el caso de los biológicos gracias a su mayor especificidad. Y, en cuanto a la manufactura de los biológicos, las medidas de control de calidad suelen ser incluso más rigurosas que en moléculas pequeñas, debido a una mayor variabilidad biológica, química y de producción.

Los tratamientos basados en moléculas pequeñas suelen ser mucho menos costosos y más accesibles que los tratamientos basados en biológicos, ya que la manufactura, el control de calidad, el sistema de administración y la vigilancia farmacológica son mucho más sencillos y requieren menos recursos. Es urgente una reasignación de prioridades para que más pacientes puedan disfrutar de los beneficios que aportan los medicamentos de última generación, muchos de ellos de origen biológico, pero extremadamente caros. El éxito real en el descubrimiento y desarrollo de fármacos debe medirse no sólo por la magnitud de los avances científicos, sino también por el nivel de accesibilidad para los pacientes.

En segundo lugar, el interés de la industria farmacéutica está claramente sesgado hacia determinadas enfermedades que afectan predominantemente a los países desarrollados y que, por tanto, proporcionan un mercado óptimo para su producción: enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurológicas, cáncer, dolor (3). Por otro lado, las empresas farmacéuticas son reacias a invertir en I+D sobre enfermedades raras y enfermedades que afectan principalmente a los países de ingresos bajo y mediano, principalmente enfermedades infecciosas como la malaria, el SIDA y la tuberculosis, que socavan y reducen gradualmente las perspectivas de futuro de muchos países, de modo que los escasos esfuerzos para abordar dichas enfermedades están sufragados por instituciones gubernamentales y entidades filantrópicas (4).

Además, la externalización de servicios y recursos por parte de la industria farmacéutica ha aumentado en un escenario de gran incertidumbre y volatilidad económica, implementando reducciones de costes, globalización, desarrollo acelerado de fármacos, modelos empresariales innovadores, y avances tecnológicos. El descubrimiento y el desarrollo de nuevos fármacos tienen un alto riesgo y un elevado coste. De cada 10.000 nuevas entidades moleculares que se preparan, sólo 1 llega al mercado (representando el 10% de los candidatos que se evalúan finalmente en ensayos clínicos), y el proceso suele durar más de 10 años. Muy pocos medicamentos comercializados llegan a recuperar la importante inversión en I+D+i necesaria para llevarlos a los pacientes que puede superar los 800 millones de dólares. El coste de desarrollo y la alta tasa de abandono de candidatos aumenta progresivamente debido a un procedimiento que aplica filtros cada vez más restrictivos para garantizar la seguridad sanitaria y evitar problemas a medio y largo plazo. En este contexto, la proporción del gasto dedicado a la externalización ha aumentado en los últimos años, sobre todo en la fase exploratoria del descubrimiento de fármacos, destacando la creciente tendencia a recurrir a soluciones de investigación externas en una fase temprana del proceso de descubrimiento de fármacos a través de un enfoque práctico que consiste en identificar servicios y tecnologías especializados y puntuales buscando abordajes y perspectivas innovadoras.

De estas consideraciones previas se puede concluir que existe una gran oportunidad para que los laboratorios académicos, con menos recursos humanos, materiales y económicos, pero con una experiencia, conocimiento, desarrollo científico y tecnológico de alto nivel, jueguen un papel relevante en las etapas tempranas de descubrimiento de nuevos fármacos.

En este trabajo se describen algunos de los programas, llevados a cabo por un grupo de investigación académico en colaboración con otros equipos para la identificación de compuestos químicos bioactivos con capacidad para modular la conformación y la función de proteínas diana implicadas en ciertas enfermedades y que, por tanto, constituyen puntos de partida para el desarrollo de novedosas estrategias terapéuticas basadas en moléculas pequeñas.

CONSIDERACIONES IMPORTANTES PARA AFRONTAR EL DESCUBRIMIENTO DE FÁRMACOS

La primera decisión en un proyecto de descubrimiento de fármacos concierne a la selección de la necesidad médica no cubierta: una enfermedad frente a la que se quieren desarrollar agentes terapéuticos que reviertan la condición patológica. Dicha enfermedad puede tener interés por diferentes causas, como se ha mencionado anteriormente.

Y una vez seleccionada esa enfermedad, se debe seleccionar una diana (lugar o elemento de un organismo donde o sobre el que un fármaco ejerce su acción y produce una respuesta celular) apropiada: que esté implicada en el proceso patológico, que sea “*tratable*” (es decir, manejable, manipulable) y que sea “*druggable*” (capaz de interactuar con y responder a fármacos). Las dianas de fármacos más frecuentes son proteínas, ya que son elementos ubicuos y realizan funciones esenciales para el buen funcionamiento de un organismo (transporte, catálisis, movimiento, regulación y señalización, etc.). Mutaciones que alteran la estructura y la función de una proteína pueden dar lugar a problemas de actividad, localización, degradación, agregación, etc. que se manifiestan como una desregulación o funcionamiento anormal conducente a un estado patológico. La selección de una diana adecuada es crucial y determinante para el éxito del proyecto, pudiendo ser un proceso muy complejo y difícil en enfermedades poligénicas, aunque muchas enfermedades son monogénicas.

Las enfermedades se pueden clasificar grosso modo en enfermedades genéticas (hereditarias o congénitas) que están asociadas a una ganancia de función (ej. proteína constitutivamente activa o proteína que agrega formando ensamblados tóxicos) o a una pérdida de función (ej. proteína constitutivamente inactiva o que se degrada de forma muy temprana), y enfermedades invasivas causadas por la infección de un microorganismo

patógeno (virus, bacteria o parásito) o la intoxicación o envenenamiento por una sustancia nociva. Aparte de otros enfoques alternativos, un abordaje terapéutico común a todos estos casos consiste en una molécula pequeña (fármaco) que interacciona con una molécula diana implicada en la enfermedad y que modifica la estructura o función de dicha diana iniciando una respuesta conducente a revertir la situación patológica. Así, una molécula pequeña puede unirse a una proteína endógena asociada con una enfermedad en un sitio de interacción específico y actuar como inhibidor o como rescatador de función, o puede unirse a una proteína exógena propia de un microorganismo patógeno y actuar como inhibidor, bloqueando una ruta clave del patógeno y causándole una “enfermedad” y provocando una pérdida de viabilidad.

El proceso de descubrimiento de fármacos se puede dividir en etapas elementales:

1. Selección de la diana farmacológica. La diana debe estar validada y debe ser esencial para el proceso patológico.
2. Caracterización biofísica de la molécula diana. El descubrimiento de fármacos se ve beneficiado si se dispone de información relevante sobre la estructura y el comportamiento de la molécula diana (ej. paisaje conformacional y funcional, mecanismos de regulación, biomoléculas interaccionantes).
3. Selección de ligandos que interactúan con la molécula diana. Esto se puede realizar computacionalmente o experimentalmente, empleando colecciones de compuestos (quimiotecas) de diferente tamaño y con diferente diversidad química. Se pueden realizar cribados experimentales moleculares con dianas purificadas *in vitro*, o cribados fenotípicos con sistemas celulares u organismos. En el caso de dianas proteicas el objetivo es diseñar un ensayo rápido y sencillo que proporcione una respuesta simple (¿hay interacción?) empleando técnicas que proporcionan información sobre tamaño molecular, conformación estructural y función, y permita descartar una gran cantidad de compuestos químicos, basado en una propiedad específica de una molécula diana particular (ej. inhibición de una actividad proteasa o una actividad quinasa) o en una propiedad general de las proteínas (ej. efecto estabilizador frente a la desnaturalización térmica en una proteína inducido por la interacción con un ligando o aumento de tamaño molecular aparente debido a agregación molecular).
4. Evaluación de candidatos seleccionados. Ensayos adicionales proporcionan información valiosa sobre la interacción directa de las moléculas seleccionadas con la diana (*target engagement*) y se determinan parámetros de interacción (afinidad, selectividad) y toxicidad en ensayos *in vitro* e *in cellulo*, además de obtener información relevante sobre el

mecanismo de acción del potencial fármaco. La evaluación de posibles efectos secundarios o tóxicos es crucial para abandonar rápidamente candidatos no idóneos, evitando un coste posterior adicional considerable.

- Optimización de candidatos. Mediante un procedimiento en el que, partiendo de derivados funcionales de los candidatos seleccionados, se repiten los pasos 4 y 5 de forma iterativa, se obtienen moléculas optimizadas según un criterio múltiple (afinidad, selectividad, toxicidad, solubilidad, etc.) sin olvidar que el mejor fármaco es el que presenta buenas características físicas, químicas y biológicas de forma conjunta, sin necesidad de destacar en una sola de ellas. Los ensayos clínicos se iniciarán con el candidato óptimo.

LAS PROTEÍNAS INTRÍNECAMENTE DESORDENADAS COMO DIANAS FARMACOLÓGICAS

Ya se ha mencionado que las proteínas constituyen una clase muy importante de moléculas diana. Las proteínas son polímeros lineales de aminoácidos (veinte, o veintitrés según se considere, aminoácidos proteinogénicos, que posteriormente pueden ser modificados postraduccionalmente). En general, de forma espontánea adoptan una estructura tridimensional o conformación bien definida y ordenada en condiciones “nativas”, es decir, condiciones fisiológicas normales, denominado estado nativo y que es requerido para que la proteína sea funcionalmente activa. Según observó Anfinsen (5), en un contexto dado (es decir, según las condiciones ambientales), la secuencia de la proteína (estructura primaria) determina la conformación de la macromolécula. El estado nativo, estructurado y plegado, es el predominante y corresponde a un mínimo energético que está determinado por la secuencia (estructura primaria) de cada proteína y condiciones ambientales nativas, mientras que debido a alteraciones en las condiciones ambientales (temperatura, pH, fuerza iónica, presencia de otras biomoléculas) la proteína puede adoptar otros estados alternativos que pueden ser relevantes (fisiológicamente o patológicamente) por sus características estructurales y funcionales.

Estas afirmaciones anteriores deben ser matizadas, ya que, si bien es verdad que gran parte de las proteínas se comportan de esta manera, también es verdad que un gran porcentaje de proteínas no se pliegan de forma espontánea, sino que necesitan la ayuda de las llamadas “chaperonas proteicas”, proteínas que evitan la agregación de proteínas en episodios de estrés celular o ayudan al plegamiento de proteínas. Asimismo, es importante destacar que hay muchas proteínas que, siendo funcionalmente activas, no presentan un estado nativo estructurado y bien plegado, sino que adoptan una multitud de conformaciones interconvertibles de forma muy dinámica. Estas proteínas se denominan “proteínas intrínsecamente desordenadas”, de modo que

pueden estar completamente desordenadas (IDP) o contener una región o dominio estructural intrínsecamente desordenado (IDR). Las IDPs no adoptan una estructura ordenada porque su secuencia y el contexto usual (disolvente, iones...) no son suficientes para que tenga lugar el proceso de plegamiento. Es la interacción con alguna biomolécula adicional la que aporta el contexto adicional apropiado para que muchas IDPs se plieguen al menos parcialmente (*folding-by-binding*), aunque algunas permanecen desordenadas incluso al interactuar con otras biomoléculas.

El estudio de las IDPs supone un desafío, ya que son proteínas con una gran flexibilidad y plasticidad estructural, tienen la capacidad para interactuar con muchas otras biomoléculas con baja afinidad y elevada especificidad a través de interacciones transitorias y dinámicas, de modo que suelen ser multifuncionales, y exhiben un comportamiento muy dinámico y muy dependiente de las condiciones fisiológicas o patológicas, estando implicadas en la transducción de señales en redes de interacción intracelulares y actuando como nodos de interacción centrales en dichas redes. Debido a estas características, muchas IDPs han sido consideradas como dianas farmacológicas relevantes, pero, debido a las mencionadas características, durante mucho tiempo se consideró que las IDPs eran dianas con poco potencial práctico terapéutico (6).

PROTEÍNAS DIANA DEPENDIENTES DE ZINC: HEPATITIS C E INFLAMACIÓN Y CÁNCER COLORRECTAL

El primer proyecto de descubrimiento de fármacos de nuestro grupo, que se inició cuando me incorporé en 2003 al Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos de la Universidad de Zaragoza, tras regresar de mi estancia posdoctoral en el Departamento de Biología de The Johns Hopkins University (Baltimore, USA), se centró en la identificación de fármacos para la hepatitis C. En ese momento, aún no había fármacos eficaces frente a esta enfermedad, cuyo tratamiento (básicamente, ribavirina e interferón) causaba graves efectos secundarios en los pacientes. Aprovechando mi experiencia con la proteasa aspártica del virus VIH-1, decidimos seleccionar la proteasa NS3 del virus de la hepatitis C como diana farmacológica. Esta proteasa de serina es en realidad un dominio de la proteína NS3 (proteína no estructural 3) del virus y es responsable del procesamiento de la poliproteína viral que se expresa en células infectadas para producir las proteínas virales individuales necesarias para que el ciclo viral avance y se formen partículas víricas infecciosas (7).

Un aspecto muy interesante, y con importantes consecuencias para el proyecto, de esta proteína es el hecho de que, además del cofactor viral NS4A (proteína viral accesoria que activa a la proteasa NS3), la proteasa NS3 necesita un átomo de zinc como cofactor adicional (8). Como es una proteína intracelular, no presenta enlaces

disulfuro para mantener su estructura, como sí ocurre en proteasas estructuralmente similares (ej. quimotripsina), sino que el átomo de zinc es el elemento clave cohesionador de su estructura: en ausencia de zinc la proteasa NS3 se despliega considerablemente (alrededor de la mitad de la estructura se desordena) y en presencia de zinc adopta una estructura completamente plegada, e incluso razonablemente activa en ausencia de NS4A (9-11). La interacción con el cofactor zinc proporciona casi el 80% de la energía de estabilización de la estructura molecular de NS3.

El hecho de que la proteasa NS3 presente un estado parcialmente desplegado en ausencia de zinc no es una mera curiosidad, sino que es un hecho con importantes consecuencias fisiológicas. Debido a la baja concentración intracelular de zinc libre (12) y a que la proteasa NS3 debe plegarse en ese ambiente desfavorable una vez sintetizada en el ribosoma, el estado parcialmente desplegado e inactivo en ausencia de zinc constituye un punto débil de esta diana y una ventana de oportunidad para actuar sobre ella con compuestos bioactivos: moléculas pequeñas que interaccionen con y estabilicen el estado alternativo no nativo, parcialmente desplegado, inactivo que predomina en ausencia de zinc bloquearán la acción de la proteína actuando como inhibidores alostéricos.

Teniendo en cuenta esta estrategia, realizamos un cribado experimental de una quimioteca de 1200 compuestos aprobados por la FDA (Prestwick Chemical Library) considerando NS3 desprovista de zinc como diana y detectando alteraciones en el perfil de desplegamiento térmico (estabilidad conformacional) de la diana inducidas por la presencia de compuestos. Mediante este procedimiento fuimos capaces de identificar fármacos conocidos (reposicionamiento de fármacos) que interaccionan con la proteasa NS3 libre de zinc, atrapan y estabilizan la proteína inactiva y bloquean el ciclo viral (13). La eficacia de estos compuestos fue confirmada en ensayos con células empleando un sistema replicón (pseudovirus que mimetiza la replicación viral y permite cuantificar con la tasa de replicación mediante actividad luciferasa). La eficacia y citotoxicidad de estos compuestos mostraron características prometedoras: bajo peso molecular, potencia moderada-alta (EC50 entre micromolar y nanomolar), y citotoxicidad moderada-baja. Como estos inhibidores mostraban un nuevo mecanismo de acción, podrían combinarse con los inhibidores competitivos que estaban en desarrollo para diseñar una terapia combinada antiviral altamente activa. Una ventaja adicional de estos inhibidores alostéricos es que no se verían afectados por mutaciones de resistencia usuales que afectan a inhibidores competitivos (ortostéricos), como pudimos comprobar. Como curiosidad, también realizamos un cribado experimental utilizando la proteasa NS3 con zinc (activa) detectando reducción en la actividad proteasa empleando un sustrato peptídico FRET (*Förster resonance energy transfer*) inducida por la presencia de compuestos. pero los resultados no fueron tan destacables (potencia de inhibición moderada).

Estos compuestos fueron protegidos mediante una patente internacional e incluso iniciamos algunos ensayos en ratones infectados con el virus de la hepatitis C. Desafortunadamente para nosotros, y afortunadamente para todos, para ese momento ya había varios fármacos basados en inhibidores de la proteasa NS3 con una alta eficacia y elevados niveles de seguridad que han permitido la curación de esta grave enfermedad, de modo que nuestro trabajo, aun siendo interesante desde el punto de vista académico, había perdido su relevancia terapéutica.

Este proyecto nos hizo recapacitar sobre otras proteínas dependientes de zinc susceptibles de ser abordadas con esa misma estrategia experimental, y seleccionamos BFT-3, *Bacteroides fragilis toxin 3* o fragilisina. BFT-3 es una metaloproteasa dependiente de zinc que es secretada por *B. fragilis* y constituye el único factor de virulencia de esta bacteria (14). *B. fragilis* es uno de los principales comensales en el tracto digestivo humano. Normalmente inofensivo, en condiciones disbióticas puede causar diarrea, abscesos, inflamación crónica, y cáncer colorrectal. Por tanto, realizamos un cribado experimental con la quimioteca Prestwick considerando BFT-3 desprovista de zinc como diana y detectando alteraciones en el perfil de desplegamiento térmico (estabilidad conformacional) de la diana inducidas por la presencia de compuestos. De nuevo, fuimos capaces de identificar fármacos conocidos (reposicionamiento de fármacos) que interaccionan con BFT-3 libre de zinc, atrapan y estabilizan la proteína inactiva, bloqueando la actividad de la toxina (15). La eficacia de estos compuestos fue confirmada en ensayos in vitro e in cellulo, e incluso pudimos obtener la estructura cristalográfica de varios complejos enzima-inhibidor, en colaboración con el grupo de F. Xavier Gomis-Rüth (IBMB, Institute of Molecular Biology of Barcelona), en los que se pudo observar la interacción de estos compuestos localizados en un exosítio (alostérico) alejado del sitio activo de la toxina (pdb: 7POL, 7POO, 7POQ, 7POU).

UN CASO EXITOSO DE FÁRMACOS FRENTE A UNA IDP: CÁNCER PANCREÁTICO

En 2013 nuestro grupo inició una colaboración con Juan Iovanna (CRCM, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille) y José Luis Neira (UMH Universidad Miguel Hernández, Elche) para estudiar interacciones de la proteína NuPR1 (también conocida como p8 y COM1) con otras biomoléculas. Juan Iovanna es un experto mundialmente reconocido en cáncer pancreático y descubridor de NuPR1 como proteína de estrés celular que promueve crecimiento, proliferación, migración e invasión celular, y progresión tumoral, así como reparación de DNA entre otras muchas funciones, que aparece sobreexpresada en pancreatitis aguda y adenocarcinoma ductal de páncreas (PDAC) (16,17). El silenciamiento o la pérdida de NUPR1 provocan la reducción de proliferación, migración,

invasión, metástasis y, en resumen, detención del proceso neoplásico. Por tanto, pudimos concluir que NuPR1 representaba una diana apropiada para abordar el descubrimiento de fármacos frente a PDAC basados en moléculas pequeñas que interactúan con y bloquean NuPR1. PDAC es un tipo de cáncer muy agresivo, con una tasa de supervivencia muy baja, con un diagnóstico tardío y difícil. Muy pocos pacientes pueden optar por resección quirúrgica y las terapias actuales frente a PDAC son muy agresivas y poco eficaces.

Uno de los principales retos a los que nos enfrentamos en ese momento fue el hecho de que NuPR1 es una proteína de unos 8 kDa completamente desordenada (IDP) e interactúa con muchísimas otras proteínas (ej. MSL1, protomiosina alfa). Por tanto, en principio no se podrían aplicar herramientas tradicionales desarrolladas para proteínas plegadas, ni había garantía alguna de que, una vez identificada una molécula pequeña que bloquease una interacción proteína-proteína que implicase a NuPR1, también bloquease su interacción con otras biomoléculas. Sin embargo, nuestra hipótesis consistió en suponer que, si una molécula pequeña interactúa con NuPR1, podría inducir una pequeña estructuración (como ocurre cuando NuPR1 interactúa con otras proteínas) que se podría observar mediante un cambio del perfil de desnaturalización térmica. Por tanto, realizamos un cribado experimental con la quimioteca Prestwick considerando NuPR1 como diana y detectando alteraciones en el perfil de desplegamiento térmico de la diana inducidas por la presencia de compuestos. Fuimos capaces de identificar 15 compuestos que interactuaban con NuPR1 con afinidad moderada (constante de disociación en el rango micromolar), similar a la afinidad de interacción de NuPR1 con otras proteínas (18). Incluso, estos compuestos interactuaban con dos aminoácidos concretos de NuPR1: Ala33 y Thr68, de modo similar a otras proteínas. En particular, uno de los compuestos, trifluoperazina (TFP), en ensayos celulares con células tumorales mostraba un efecto citotóxico dependiente de la presencia de NuPR1. Mediante ensayos *in vitro* e *in cellulo* pudimos comprobar cómo TFP inhibía interacciones de NuPR1. Además, en ratones con tumores humanos xenoinjertados se observó la paralización del crecimiento del tumor con una dosis de 10 mg/kg. Desafortunadamente, TFP presentaba efectos secundarios.

A pesar de estos efectos secundarios, este resultado constituyó un éxito que fue señalado en un informe del *World Economic Forum* (conocido coloquialmente como Foro de Davos) de 2019, donde se menciona que científicos de España y Francia habían demostrado que era posible encontrar un potencial fármaco (TFP) frente a una IDP (NuPR1), un hito reconocido como una de las 10 Tecnologías Emergentes Más Destacadas de 2019 (19). Por tanto, teniendo ya una colaboración en marcha entre nuestros laboratorios y teniendo resultados muy positivos, quisimos seguir avanzando. Para ello fue esencial la colaboración con Yi Xia (Chongqing University), Ling Peng (CINaM, Centre Interdisciplinaire de Nanoscience de Marseille, Marseille) y Bruno Rizzuti (NANOTEC, Institute of Nanote-

chnology of the National Research Council, CNR), expertos en síntesis química, evaluación de toxicidad celular y animal, y modelización computacional de biomoléculas, respectivamente. Varios derivados funcionales de TFP fueron sintetizados y uno de ellos, ZZW-115, demostró una mayor afinidad en ensayos *in vitro* y una mayor eficacia biológica en ensayos con líneas celulares de diversos tipos de cáncer, no sólo PDAC (NuPR1 se sobreexpresa en muchos otros tipos de cáncer) (20,21). Sorprendentemente, ZZW-115 eliminaba el tumor con una dosis de 5 mg/kg en ratones xenoinjertados.

La acción biológica de ZZW-115 demostró tener múltiples facetas. Por un lado, ZZW-115 interactúa con la secuencia NLS de NuPR1, impidiendo la interacción con importina α y la internalización nuclear, siendo el núcleo su localización natural de acción. Debido a esto, NuPR1 no puede participar en la reparación del DNA, reforzándose de esta manera la acción quimioterápica de agentes genotóxicos antineoplásicos. Además, ZZW-115 induce muerte celular por necroptosis y por apoptosis, además de catástrofe metabólica reflejada en una reducción considerable de síntesis de ATP.

ZZW-115 fue protegido mediante patente internacional, pero fue abandonada al surgir nuevamente un problema recurrente en descubrimiento de fármacos: los efectos secundarios. ZZW-115 interactúa con el canal de potasio hERG, con un posible efecto retardante de la repolarización del intervalo QT del potencial de acción cardíaco y que puede conducir a arritmias (*torsades de pointes*) y desenlace fatal. Aunque muchos fármacos en uso presentan efectos secundarios considerables, en particular, muchos fármacos antineoplásicos presentan cardiotoxicidad, tuvimos que reconocer que no sería posible continuar con el desarrollo de ZZW-115. La toxicidad cardiovascular sigue siendo una de las principales causas de abandono durante el desarrollo preclínico y clínico, además de contribuir a la retirada de fármacos tras su aprobación.

En la actualidad seguimos trabajando en la identificación de nuevas estructuras moleculares para moléculas pequeñas que sirvan como punto de partida para descubrir nuevos fármacos frente a PDAC, que permitan aliviar la carga sanitaria, social y económica de esta enfermedad. Pero esto forma parte de otra historia...

CONCLUSIONES

Se han descrito brevemente tres ejemplos de descubrimiento de fármacos frente a proteínas diana asociadas con enfermedades relevantes: hepatitis C, inflamación y cáncer colorrectal, y cáncer pancreático. Además, estas dianas son proteínas intrínsecamente desordenadas, lo que añade una enorme dificultad al reto de identificar potenciales fármacos. Hasta hace pocos años, las IDPs se habían considerado como dianas inabordables farmacológicamente (*undruggable*), y nuestro

grupo, en colaboración con otros investigadores, ha proporcionado uno de los primeros ejemplos de potenciales fármacos eficaces frente a una IDP relevante. Con estos ejemplos se pone en evidencia cómo los laboratorios académicos pueden tener un papel clave en el descubrimiento de fármacos, desde la caracterización de la diana hasta la realización de ensayos preclínicos necesarios para poder avanzar hacia la fase clínica con candidatos con una mínima garantía de éxito. Además, se han descrito dos estrategias terapéuticas novedosas para bloquear la función de una proteína diana basadas en moléculas pequeñas: estabilización de conformaciones inactivas alternativas al estado nativo en la proteína diana, e inhibición de la internalización nuclear de la proteína diana empleando como blanco su secuencia de localización nuclear (NLS).

DECLARACIÓN DE TRANSPARENCIA

El autor/a de este artículo declara no tener ningún tipo de conflicto de intereses respecto a lo expuesto en el presente trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Todo lo descrito en este trabajo no hubiera sido posible sin la colaboración inestimable de otros investigadores, además de los ya citados: Olga Abian (Universidad de Zaragoza, Zaragoza), Sonia Vega (Universidad de Zaragoza, Zaragoza), Patricia Santofimia-Castaño (CRCM, Marseille), y Ulrich Eckhard (IBMB, Barcelona). Y, por supuesto, ha sido esencial la financiación obtenida de diferentes entidades: Ministerio de Ciencia e Innovación, Ministerio de Economía y Competitividad, Gobierno de Aragón, y Universidad de Zaragoza.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ngo HX, Garneau-Tsodikova S. What are the drugs of the future? *Medchemcomm*. 2018; 9(5): 757-758.
2. Evaluate Vantage Report Preview 2022. <https://www.evaluate.com/thought-leadership/vantage/evaluate-vantage-2022-preview-report>
3. Ahmadiani S, Nikfar S. Challenges of access to medicine and the responsibility of pharmaceutical companies: a legal perspective. *Daru*. 2016; 24(1): 13.
4. Kremer M. Pharmaceuticals and the developing world. *J Econ Perspect*. 2002; 16(4): 67-90.
5. Anfinsen CB, Haber E, Sela M, White FH Jr. The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1961; 47: 1309-1314.
6. Samarasinghe KTG, Crews CM. Targeted protein degradation: a promise for undruggable

7. proteins. *Cell Chem Biol*. 2021; 28(7): 934-951.
7. Bartenschlager R, Ahlborn-Laake L, Mous J, Jacobsen H. Kinetic and structural analysis of hepatitis C virus polyprotein processing. *J Virol*. 1994; 68: 5045-5055.
8. Love RA, Parge HE, Wickersham JA et al. The crystal structure of hepatitis C virus NS3 protease reveals a trypsin-like fold and a structural zinc binding site. *Cell*. 1996; 87: 331-342.
9. Abian O, Neira JL, Velázquez-Campoy A. Thermodynamics of zinc binding to hepatitis C virus NS3 protease: a folding by binding event. *Proteins*. 2009; 77(3): 624-636.
10. Abian O, Vega S, Neira JL, Velázquez-Campoy A. Conformational stability of hepatitis C virus NS3 protease. *Biophys J*. 2010; 99(11): 3811-3820.
11. Vega S, Neira JL, Marcuello C, Lostao A, Abian O, Velázquez-Campoy A. NS3 protease from hepatitis C virus: biophysical studies on an intrinsically disordered protein domain. *Int J Mol Sci*. 2013; 14(7): 13282-13306.
12. Outten CE, O'Halloran TV. Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science*. 2001; 292: 2488-2492.
13. Abian O, Vega S, Sancho J, Velázquez-Campoy A. Allosteric inhibitors of the NS3 protease from the hepatitis C virus. *PLoS One*. 2013; 8(7): e69773.
14. Goulas T, Arolas JL, Gomis-Rüth FX. Structure, function and latency regulation of a bacterial enterotoxin potentially derived from a mammalian adamalysin/ADAM xenolog. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108(5): 1856-1861.
15. Jiménez-Alesanco A, Eckhard U, Asencio Del Rio M et al. Repositioning small molecule drugs as allosteric inhibitors of the BFT-3 toxin from enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*. *Protein Sci*. 2022; 31(10): e4427.
16. Encinar JA, Mallo GV, Mizyrycki C et al. Human p8 is a HMG-I/Y-like protein with DNA binding activity enhanced by phosphorylation. *J Biol Chem*. 2001; 276(4): 2742-2751.
17. Sandi MJ, Hamidi T, Malicet C et al. p8 expression controls pancreatic cancer cell migration, invasion, adhesion, and tumorigenesis. *J Cell Physiol*. 2011; 226(12): 3442-3451.
18. Neira JL, Bintz J, Arruebo M et al. Identification of a drug targeting an intrinsically disordered protein involved in pancreatic adenocarcinoma. *Sci Rep*. 2017; 7: 39732.
19. Top 10 Emerging Technologies of 2019. *Sci Am*. 2019; 321(6): 26-37.
20. Santofimia-Castaño P, Xia Y, Lan W et al. Ligand-based design identifies a potent NUPR1 inhibitor exerting anticancer activity via necroptosis. *J Clin Invest*. 2019; 129(6): 2500-2513.
21. Lan W, Santofimia-Castaño P, Swayden M et al. ZZW-115-dependent inhibition of NUPR1 nuclear translocation sensitizes cancer cells to genotoxic agents. *JCI Insight*. 2020; 5(18): e138117.

Si desea citar nuestro artículo:

Velázquez-Campoy A. Descubrimiento de fármacos en un laboratorio académico. *An RANM*. 2023;140(03): 270-276. DOI: 10.32440/ar.2023.140.03.rev05