

INTRODUCCIÓN

ONC201 es una pequeña molécula actualmente en evaluación en humanos como agente anticancerígeno. Ha demostrado eficacia contra un tipo específico de glioma que tiene opciones de tratamiento limitadas. Curiosamente, el mecanismo de acción de este pequeño fármaco no se identificó hasta 2019, años después de que se hubiera aprobado para ensayos clínicos. ONC201 inhibe el crecimiento de las células tumorales activando una proteasa humana específica, la proteasa peptidasa caseinolítica (HsClpP), que se encuentra en las mitocondrias. La activación de esta proteasa provoca un desequilibrio en el proteoma de las células tumorales y provoca estrés celular que conduce a la inhibición del crecimiento. Basándose en su novedoso mecanismo de acción, FICIC y CEAMED están trabajando para desarrollar nuevos compuestos activadores de HsClpP con perfiles farmacológicos mejorados en comparación con ONC201.

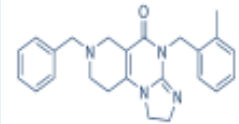


Figura 1. Estructura química del ONC201

OBJETIVOS

- Diseño y preparación de nuevos compuestos basados en activadores conocidos de HsClpP utilizando ayudas computacionales.
- Determinar los efectos de estos nuevos compuestos en el crecimiento de varios tipos de células cancerosas humanas.
- Medir los efectos de compuestos prometedores en ensayos de estabilidad y toxicidad *ex vivo* y compararlos con ONC201.

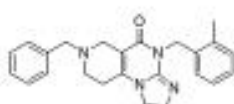
PLANES

- Visualizar, mediante estudios de acoplamiento *in silico*, qué pequeños cambios estructurales en dos activadores conocidos de HsClpP (ONC201 e IMP075) aumentarán su unión al sitio de activación en HsClpP.
- Sintetizar aquellos compuestos que se prevé que tengan los niveles de unión más altos.

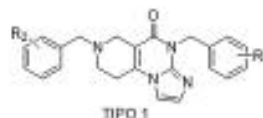
ESTUDIOS DE ACOPLAMIENTO

- Se conoce la estructura cristalina de ONC201 unido a HsCtpP (PDB: 6DL7). Después de retirar y volver a acoplar ONC201, se ha obtenido exactamente la misma posición de acoplamiento, lo que ha permitido realizar docking de nuevos compuestos *in silico* y evaluar si son dignos de síntesis.
- Se ha concluido que el intercambio del 4,5-dihidro-imidazol en ONC201 por un grupo imidazol era aceptable (Compuesto de tipo I), así como la transferencia del grupo bencilo al nitrógeno exo dando como resultado aquellos compuestos del tipo II.
- Además, aquellos conocidos como "binding scores" (energía de afinidad) mejoraron mediante la adición de grupos como F, Cl, CF₃ o -CN a posiciones específicas de los dos sustituyentes aromáticos en cada estructura.

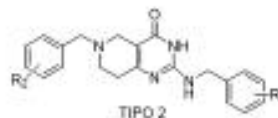
ESTRUCTURA ONC201



ESTRUCTURA TIPO I



ESTRUCTURA TIPO II

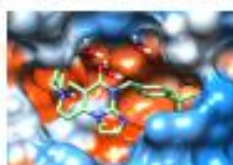


DOCKING DEL ONC201



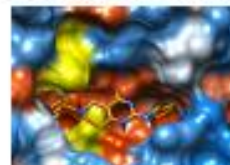
SCORE: -9.1

DOCKING DEL CM-1195



SCORE -11.3

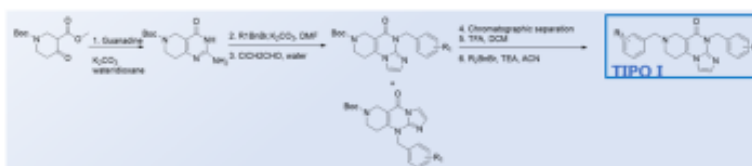
DOCKING DEL CM-1395



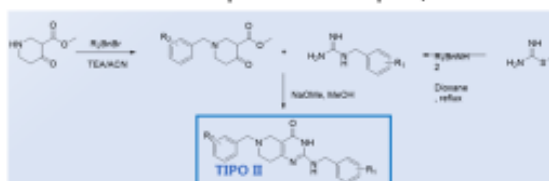
SCORE: -9.0

SÍNTESIS

En la preparación de los compuestos de tipo I se ha llevado a cabo una secuencia de reacciones que ha permitido establecer rápidamente una relación estructura-reactividad (SAR) para los sustituyentes R₁ y R₂.



Los compuestos de tipo II se han sintetizado fácilmente utilizando la secuencia de reacciones convergente que se muestra a continuación. Como ya los estudios de acoplamiento sugirieron, el grupo R₂ que mejor potencia muestra en los compuestos de tipo I, también se cumple en aquellos de tipo II.



RESULTADOS

ESTUDIOS DE VIABILIDAD CELULAR

Se han preparado 32 compuestos de tipo I y 17 de tipo II. Como se predijo a partir de estudios *in silico*, los grupos en la posición 4 en R₁ y en la posición 3 en R₂ aumentaron significativamente la capacidad de estos compuestos para activar HsClpP e inhibir el crecimiento de células cancerosas. Muchos de estos compuestos fueron entre 10 y 100 veces más potentes que ONC201 en varias líneas de células cancerosas. La Tabla 1 destaca algunos de los compuestos prometedores de estas dos familias de compuestos. Cabe destacar que todos los activadores selectivos de HsClpP son citostáticos en lugar de citotóxicos.

Tipo	Compuesto	R1	R2	MDA-MB231 (HsClpP) IC ₅₀ (nM)	U2OS (HsClpP) IC ₅₀ (nM)	U2OS (HsClpP) IC ₅₀ (nM)
REF	ONC-201	H	2-CH ₃	2288	1660	2448
1	CM-1154	H	H	1150	-	-
2	CM-1128	H	H	701	-	-
1	CM-1195	H	4-CF ₃	209	168	450
2	CM-1288	H	4-CF ₃	1020	-	-
1	CM-1214	H	4-F	202	55	255
2	CM-1201	H	4-F	200	<100	<100
1	CM-1243	3-CN	4-F	25	>100	>100
2	CM-1395	3-CN	4-F	45	<100	<100
1	CM-1262	3-CN	4-Cl	15	>100	>100
2	CM-1442	3-CN	4-Cl	38	21	<100

RESULTADOS

EVALUACIÓN DE POSIBLES INTERACCIONES FÁRMACO-FÁRMACO, TOXICIDAD CARDÍACA Y ESTABILIDAD METABÓLICA DE DOS DE NUESTROS COMPUESTOS

Se han evaluado dos de los compuestos más prometedores por su capacidad para:

- provocar interacciones farmacológicas (inhibición del CYP3A4),
- causar toxicidad cardíaca (inhibición del canal iónico cardíaco hERG)
- ser metabolizados por microsomas hepáticos humanos (medida de estabilidad)

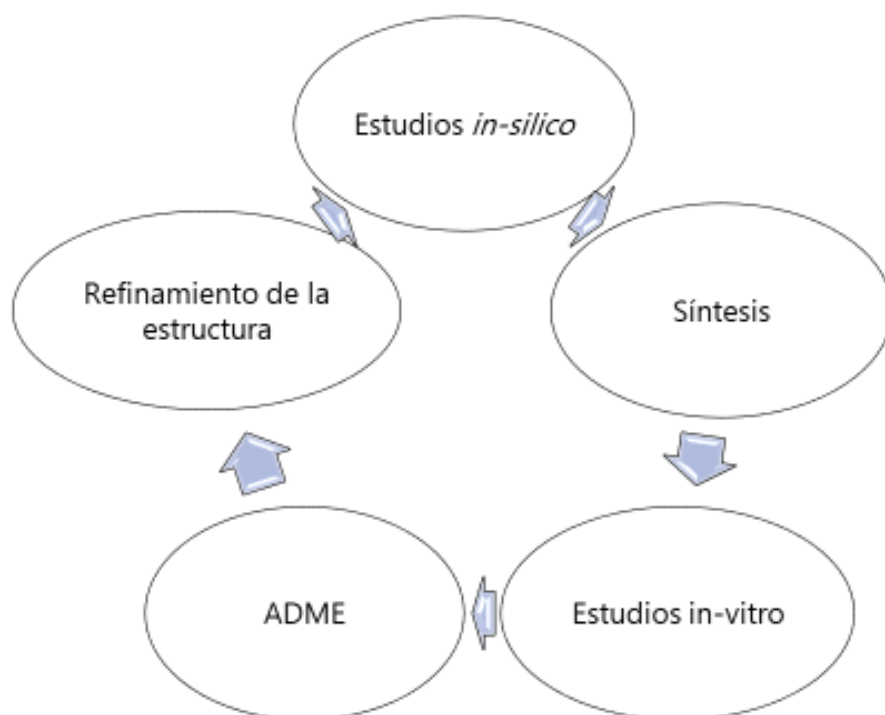
Ambos compuestos poseían mejores perfiles que ONC201 en los tres ensayos (tenían vidas medias más largas, menor inhibición de CYP3A4 y menores inhibiciones del canal iónico cardíaco hERG).

Tipo	Compuesto	Evaluación de la estabilidad del metabolismo hepática	Evaluación del potencial de interacción fármaco-fármaco	Evaluación de la toxicidad cardíaca
		Human Liver Microsomes (T ½, mins)	% Inhibition of CYP3A4 at 10 μM	% Inhibition of hERG at 10 μM
REF	ONC-201	<5	50	85
1	CM-1214	27	<10	65
2	CM-1395	64	<10	54

Tabla 2: Evaluación de la estabilidad and toxicidades de CM-1214 y CM-1395 en comparación con el ONC201

CONCLUSIONES

- Utilizando procedimientos de acoplamiento *in silico* se ha podido diseñar y predecir las potencias de dos nuevas series de compuestos que activan la proteína P de la proteasa caseinolítica humana (HsClpP).
- Se han desarrollado rutas sintéticas cortas y variables para estas dos nuevas familias de compuestos lo que ha generado una gran variedad de compuestos a escala de miligramos.
- Los datos de viabilidad celular (ensayo MTT) y crecimiento celular (ensayo SRB) demostraron que varios de los compuestos eran considerablemente más potentes que el compuesto clínico ONC201 en distintas líneas celulares cancerosas.
- Dos de estos compuestos se han evaluado en tres ensayos de ADME para evaluar su estabilidad, potencial para generar toxicidades cardíacas o interacciones fármaco-fármaco. Ambos compuestos presentaron perfiles mejorados en comparación con ONC201.
- CM-1214 ha demostrado eficacia en un modelo de ratón de xenoinjerto de cáncer de mama triple negativo (datos presentados por el Dr. Héctor Estévez-Silva en este Congreso). CM-1395 también continúa siendo evaluado como un posible candidato clínico.
- La estrategia descrita en este póster (Figura 2) ha generado con éxito varios compuestos que poseen mejores perfiles que el activador de HsClpP más avanzado que se encuentra actualmente en ensayos clínicos en humanos.



AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado en parte con subvenciones del Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN, nº. PLE2022-009507) y la Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información (ACIISI; nº. SD-22/17). AAG y AAR agradecen la subvención del Servicio Canario de Empleo que ha financiado el Programa Investigo, lo que ha permitido sus contrataciones a FICIC y CEAMED SA respectivamente (SCE nº. 38/2022-0201083143 y 60/1/2023-0207084648). HMES desea agradecer a la Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información (ACIISI; nº. IPI2021010038) que ha permitido su contratación en CEAMED SA.

