

# Biotecnología



Dr. Juan Aymami, Director Científico y co-fundador de Crystax Pharmaceuticals S.L.; y Dr. Marc Martinell, Director de Biofísica de Crystax Pharmaceuticals S.L.

Crystax Pharmaceuticals desarrolla nuevos fármacos a través de su plataforma integrada llamada B2D2™ (Biophysics-Based Drug Discovery). Esta plataforma se basa en la combinación de las herramientas del “Structure-Based Drug Design” con la estrategia del “fragment screening” y la información generada mediante diversas técnicas biofísicas.

## B2D2™, la **integración de las técnicas biofísicas** en el descubrimiento de nuevos fármacos

Diseñar un buen fármaco no es cosa fácil. De hecho en los últimos años la productividad global de la industria farmacéutica ha disminuido notablemente. Una de las principales causas de esta dificultad es la gran cantidad de parámetros que hay que considerar simultáneamente. Se hace muy difícil conseguir un compuesto con suficiente potencia al mismo tiempo que un buen perfil farmacológico.

Es indudable que como punto de partida, es importante disponer de compuestos que tengan una buena afinidad para la diana terapéutica de interés. En este sentido, el campo del diseño de fármacos basado en la estructura de las proteínas ha conseguido grandes éxitos y ha generado información muy útil para el desarrollo de las herramientas usadas en el modelado molecular. Recientemente, también se han producido grandes avances técnicos en un conjunto de técnicas biofísicas que permiten obtener una gran cantidad de información para comprender el proceso de interacción entre los potenciales fármacos y las dianas terapéuticas. Gracias a estos avances hoy en día es posible obtener esta información para un

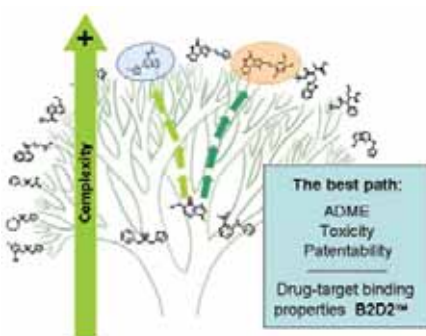


Figura 1: Representación esquemática del espacio químico en función de la complejidad. Los puntos de partida son moléculas poco complejas (fragmentos) que son evolucionados hacia candidatos a fármacos mediante la combinación de criterios ADMETox, IP, etc. con la información generada mediante las técnicas biofísicas de la plataforma B2D2™.

mayor número de compuestos en unos tiempos más reducidos y con un menor consumo de material.

En Crystax Pharmaceuticals, se han integrado las herramientas del diseño de fármacos basados en la estructura (Structure-based drug design) con un conjunto de herramientas biofísicas de última generación

y la emergente estrategia del “fragment screening” para desarrollar nuevos fármacos bajo la plataforma integrada denominada Biophysics-based Drug Discovery (B2D2™). La aproximación usada en Crystax, consta de las siguientes etapas:

### Obtención de la diana terapéutica

Para poder aplicar las técnicas usadas en la plataforma B2D2™ es esencial poder disponer de la diana terapéutica en elevadas cantidades y con gran calidad. Con este fin Crystax en cada proyecto explora distintos sistemas de expresión así como distintas variantes de la diana de interés. Se trata de conseguir la proteína que es diana farmacológica en la versión más adecuada para cada técnica experimental a escala de miligramos.

### Fragment screening

Durante los últimos años el fragment screening ha surgido como una estrategia alternativa al HTS (High-Throughput Screening). La idea principal de esta aproximación, es la de partir de moléculas de un peso molecular más pequeño a las usadas en HTS de modo que el espacio químico a explorar es

mucho menor y los puntos de partida (hits) son menos complejos.

Si se visualiza el espacio químico como un árbol (Figura 1), a medida que va aumentando la complejidad de las moléculas, también aumentan las ramas del árbol, de modo que en el espacio químico correspondiente a las moléculas "drug-like" el número de posibilidades (ramas) es enorme. De hecho, se estima que si se quisieran preparar unos pocos miligramos de cada uno de los posibles compuestos dentro de este espacio, esto equivaldría a una masa superior a la del universo. Está claro que es del todo imposible explorar todo el espacio químico. Mediante herramientas computacionales y agrupación de las moléculas en familias se consigue cribar parte de este espacio químico. Una posibilidad más efectiva es la de trabajar en regiones donde el número de ramas es menor, es decir zonas donde las moléculas son menos complejas y que corresponden al espacio químico de los fragmentos. Otra gran ventaja del uso de fragmentos como punto de partida es que se parte de moléculas con una complejidad química menor y, aunque inicialmente son poco potentes tienen una gran eficiencia de unión, 1 por lo que es más sencillo optimizar estos puntos de partida.

Crystax hoy en día dispone de una librería de alrededor 1000 fragmentos que se están usando en sus proyectos de investigación así como colaboraciones. Esta librería de fragmentos se ha seleccionado en Crystax a partir de una compilación de los compuestos comerciales existentes (> 3 millones) y mediante la aplicación de una serie de filtros que consideran tanto las propiedades fisico-químicas y estructurales de las moléculas como la presencia de determinados grupos funcionales. Como última etapa, las moléculas que han superado los filtros se han agrupado en familias (clusters) y se han seleccionado compuestos representativos de cada cluster. Finalmente, estos compuestos son sometidos a distintos controles de calidad antes de ser introducidos en la librería. El proceso de selección se ha basado en tener la mayor diversidad posible y la misma librería se puede usar para identificar "hits" para dianas terapéuticas de todo tipo. De hecho, estos 1000 fragmentos exploran mejor el espacio químico disponible que 1 millón de los compuestos usados en un HTS clásico. A pesar de todas sus ventajas, el hecho de usar fragmentos tiene la dificultad que al ser poco potentes es difícil identificar los fragmentos que se unen con la diana de interés

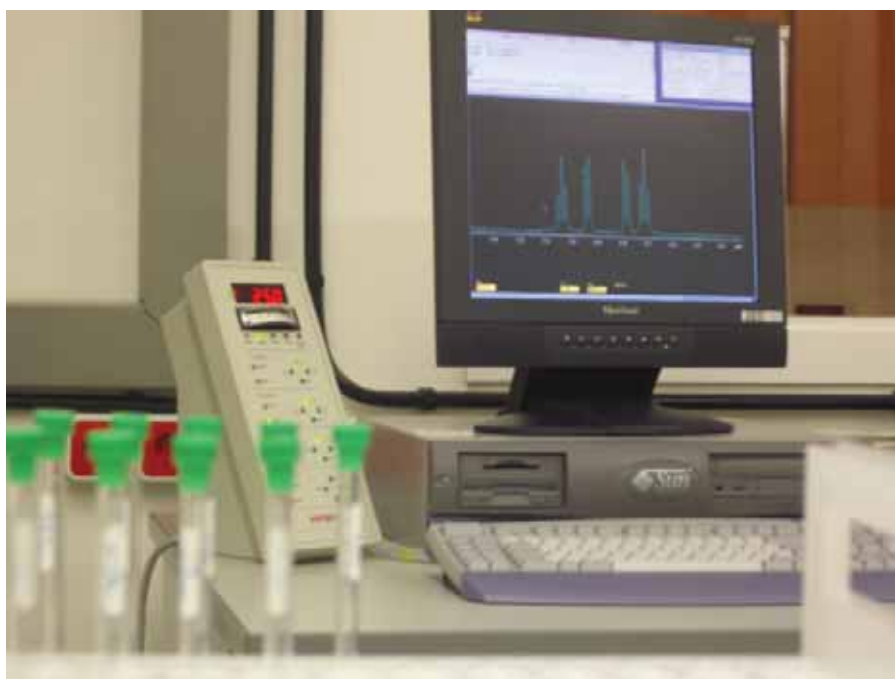


Figura 2 - El screening inicial de la librería de fragmentos se lleva a cabo mediante técnicas de resonancia magnética nuclear.

mediante ensayos bioquímicos estándar, y es necesario disponer de técnicas con una mayor sensibilidad. Es en esta primera etapa de identificación de "fragment hits" donde las técnicas biofísicas juegan un papel determinante en la aproximación usada en Crystax.

**EL CAMPO DEL DISEÑO DE FÁRMACOS BASADO EN LA ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS HA CONSEGUIDO GRANDES ÉXITOS Y HA GENERADO INFORMACIÓN MUY ÚTIL**

#### Resonancia magnética nuclear

Para llevar a cabo el "screening" inicial de la librería de fragmentos, en Crystax se usa la resonancia magnética nuclear. Esta técnica permite identificar los compuestos que se unen a la diana terapéutica con un consumo mínimo de proteína y de forma muy rápida. En esta etapa inicial, existen diversas posibilidades en función de si se usan técnicas basadas en la observación de los señales de

la proteína o técnicas basadas en la observación de los señales de los ligandos. En Crystax, se usan estas últimas, ya que implica un consumo mucho menor de proteína y además permiten identificar los hits dentro de una mezcla de forma directa sin necesidad de una deconvolución posterior (Figura 2).

A partir del screening mediante resonancia magnética nuclear, se obtiene el listado de fragmentos que interactúan con la proteína de interés. Adicionalmente, esta selección de fragmentos se puede refinar mediante el uso de experimentos de competición con inhibidores conocidos y/o el uso de proteínas con mutaciones que impidan la unión a sitios específicos de esta. Habitualmente, el porcentaje de hits de este primer screening se encuentra entre el 3 y el 10%, de modo que se dispone de un primer listado de al menos 30 fragmentos capaces de interactuar con la proteína de interés. Porcentajes menores, a menudo son indicativos de que la proteína no contiene ninguna cavidad apta para la unión de moléculas pequeñas y que por tanto, es poco "drogable".

#### Cristalografía de rayos X

Gracias a la experiencia de los fundadores de la compañía uno de los puntales de Crystax es el uso de la cristalografía de biomoléculas. En el caso del "fragment screening", la posibilidad de tener la estructura del complejo fragmento-proteína aumenta

# Biotecnología

enormemente las posibilidades de optimizar eficientemente el fragmento inicial, ya que acota las regiones de la molécula a optimizar (Figura 3).

De cara a poder llevar a cabo el estudio de algunas decenas de fragmentos, a menudo no es suficiente con disponer de cristales de la proteína de interés, si no que es necesario desarrollar un sistema que permita aplicar una aproximación tipo High-throughput. En este sentido, Crystax lleva a cabo una exploración sistemática de más de 1000 condiciones cristalográficas en busca del sistema que sea suficientemente robusto (Figura 4).

Idealmente, se buscan condiciones que permitan obtener cristales de la proteína que no contengan ningún ligando en el sitio activo, así se puede estudiar cada uno de los fragmentos identificados mediante RMN a través de la técnica del "soaking". Esta técnica consiste en poner el cristal en contacto con una solución del fragmento y posteriormente llevar a cabo la resolución de la estructura. En algunos casos esta técnica no se pueda utilizar debido al empaquetamiento del cristal o por los cambios conformacionales que se producen cuando la proteína interacciona con el fragmento. Entonces es necesario llevar a cabo estudios de co-cristalización con cada uno de los fragmentos.

En general, con alrededor del 40-50 % de los fragmentos identificados mediante RMN se obtiene una estructura cristalográfica. El aparentemente elevado porcentaje de compuestos para los cuales no se obtiene una estructura, se debe principalmente a que las condiciones de cristalización (pH, concentración de precipitante, etc.) en algunos casos pueden afectar a la unión con la proteína.

La etapa cristalográfica, al permitir visualizar en 3D la unión de la diana con los ligandos añade una gran cantidad de información estructural. Esta no se limita a nuevas estructuras químicas interesantes, si no también información de las aguas estructurales de la proteína, la flexibilidad de los distintos residuos y los principales puntos de reconocimiento de moléculas (hot-spots). Toda esta información es esencial para definir cuales son los fragmentos más interesantes y ver cual puede ser el camino más óptimo para su optimización.

## Optimización de los fragmentos

Existen diversas maneras de plantear la optimización de los fragmentos identificados inicialmente. Básicamente hay tres posibilidades: unión de dos fragmentos entre sí



Figura 3 - La difracción de los cristales por los rayos X puede realizarse en un difractómetro convencional o mediante la radiación sincrotrónica mucho más potente..

("linking"), fusión de dos fragmentos a través de una parte común ("merging"), y finalmente crecimiento del fragmento de partida hacia las partes del centro activo no ocupadas por este ("growing").<sup>2</sup>

El resultado final de este proceso es la identificación de una serie de estructuras químicas (scaffolds) que serán el punto de partida para el proceso posterior de optimización.

El "fragment screening" se inició a finales de los años 90 y ha ido ganando aceptación, no solo por su eficacia sino también por los éxitos conseguidos por las compañías que lo están aplicando.<sup>3</sup> Gracias a esta creciente aceptación y a las diversas técnicas que se van desarrollando, llegará un momento en que se acabará estableciendo como un proceso estándar.

De hecho, la dificultad del fragment screening, no recae tanto en la capacidad de detectar los fragmentos sino en como usar toda la información generada para optimizar el compuesto de partida. Es decir en como evolucionar este compuesto a medida que vamos aumentando su complejidad, y por lo tanto, vamos subiendo en el árbol de complejidad química.

En Crystax, aprovechamos la capacidad que tenemos en el área de biología estructural para obtener las proteínas de interés en calidad y cantidad suficientes para aplicar sistemáticamente el uso de distintas técnicas biofísicas en todo el proceso de optimización de los fragmentos o scaffolds de partida. Esta aproximación permite reducir el número de compuestos a sintetizar. En todo



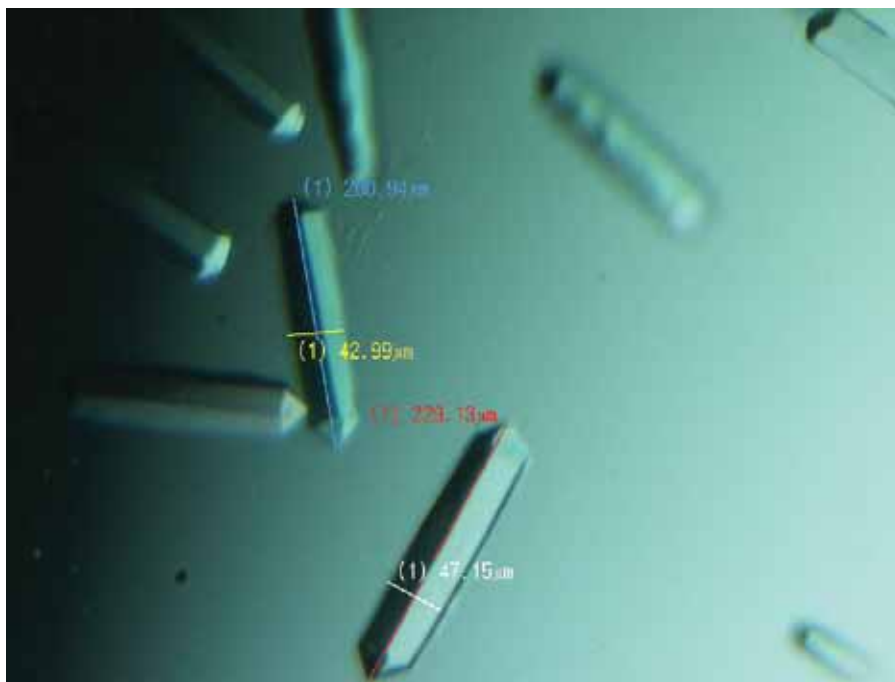


Figura 4 - Para poder aplicar la cristalografía de forma sistemática es necesario poner a punto un sistema cristalográfico robusto.

el proceso de optimización la información generada mediante estas técnicas biofísicas se combina con la información estructural con otros criterios más habituales como la caracterización de las propiedades ADME-Tox, los ensayos de actividad, ensayos celulares y criterios de química métrica y propiedad intelectual. Todo este proceso de diseño que podemos considerar "de novo" está apoyado por el modelaje molecular pero está basado en técnicas experimentales por lo que lo podríamos llamar "experimental de novo drug design" (Figura 1).

Entre las técnicas biofísicas aplicadas en Crystax, destacan la resonancia de plasmón superficial (SPR) y la microcalorimetría. En el caso de la SPR (más conocida como Biacore, la marca comercial de uno de los equipos) se puede obtener información de la cinética de unión. Este hecho en algunos casos puede ser fundamental para discriminar entre compuestos con afinidades parecidas pero comportamientos cinéticos diferenciados. Así pues, en algunas indicaciones es interesante identificar compuestos con una disociación más lenta ya que tienen una duración de acción más prolongada. En otros casos, interesan compuestos con un perfil de asociación muy rápida ya que tendrán un efecto más inmediato. Sea como sea, a menudo este tipo de información es muy difícil de obtener mediante otras técnicas distintas al Biacore y además es un criterio que cuando más compleja es la molécula más difícil es de modular.

En el caso de la microcalorimetría, podemos obtener información de la termodinámica de la unión (desglose de la componente entálpica y entrópica de la interacción). La obtención sistemática de esta información permite comprender mucho mejor el proceso de reconocimiento entre la proteína y

**DURANTE EL AÑO 2007  
CRYSTAX RECIBIÓ EL  
PREMIO DE LA PRIMERA  
CONVOCATORIA  
EMPRENDEDOR XXI EN  
CATALUÑA A LA EMPRESA  
CON MAYOR POTENCIAL  
DE CRECIMIENTO**

los compuestos que si simplemente se usa la estructura de los correspondientes complejos. En las etapas iniciales se puede usar para identificar los scaffolds más prometedores, ya que serán aquellos que tengan una componente entálpica más grande.<sup>4</sup> Tanto la SPR como la microcalorimetría, son técnicas que siempre se han valorado mucho y se han reconocido por su potencial, pero que hasta hace poco no se habían aplicado de forma sistemática debido a las dificultades de carácter técnico que conllevan. Por esta razón, habitualmente estas téc-

nicas hasta ahora se han usado en las etapas finales del desarrollo de fármacos, hecho que ha permitido entender mejor como actúan muchas moléculas pero que por ser aplicado en las etapas finales, no se ha podido usar para tomar decisiones de que moléculas optimizar y en que dirección.

En Crystax, las capacidades técnicas permiten la integración de todas las áreas en la plataforma integrada B2D2™ de modo que se puede sistematizar el uso de estas técnicas desde el inicio del desarrollo de un fármaco. Esto permite mejorar el proceso de la optimización de los fragmentos de partida. Esta será la clave futura en el uso del "fragment screening", elegir el mejor camino en el inmenso espacio químico para evolucionar los fragmentos.

#### Aplicación de la plataforma B2D2™ en Crystax

Crystax usa esta plataforma tanto para el desarrollo de sus propios proyectos de investigación como para llevar a cabo colaboraciones con otras empresas del sector. Desde el inicio de la etapa de fragment screening en 2005, en Crystax se han evaluado más de 10 dianas terapéuticas, hecho que ha permitido observar como el porcentaje de hits efectivamente está correlacionado con la arquitectura del centro activo.

Por otra parte, gracias a la información generada mediante la plataforma B2D2™ Crystax ha sido capaz de identificar nuevas series de inhibidores para distintos proyectos de investigación internos, que han colocado la compañía en una situación muy competitiva en dianas muy relevantes en el campo de la investigación oncológica.

Fruto de estas innovaciones tecnológicas, durante el año 2007 Crystax recibió el premio de la primera convocatoria Emprendedor XXI en Cataluña a la empresa con mayor potencial de crecimiento y el premio ENISA de innovación en el apartado de Ciencias de la vida.

- 1 Hopkins, A.L., Groom, C.R and Alex, A. (2004) Ligand efficiency: a useful metric for lead selection Drug Discovery Today 9, 430-431
- 2 Carr, R and Jhoti, H. (2002) Structure-based screening of low-affinity compounds Drug Discovery Today 7, 522-527
- 3 Alex, A.A. and Flocco, M.M. (2007) Fragment-based drug discovery: what has it achieved so far? Curr.Top.Med.Chem. 7, 1544-1567
- 4 Velázquez-Campoy, A. and Freire, E. (2005) ITC in the post-genomic era...? Priceless Biophys. Chem. 115, 115-124