

Uso de la Cristalografía de Rayos X en el Drug Discovery



Dra. Irena Bonin, Directora de Biología Estructural de Crystax Pharmaceuticals S.L.

Dr. Marc Martinell Director de Biofísica de Crystax Pharmaceuticals S.L.

Dr. Juan Aymamí, Director Científico y Cofundador de Crystax Pharmaceuticals S.L.

LAS DOS EMPRESAS estadounidenses, Structural GenomiX (SGX) y Syrrx, adquiridas respectivamente por Lilly y Takeda fueron pioneras en el desarrollo de una tecnología innovadora que tenía como meta cristalizar rápidamente un gran número de proteínas diana y hacer posible el descubrimiento de nuevos productos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades humanas.

Esas empresas se fundaron basándose en una aproximación gene-to-structure con la posibilidad de purificar hasta 100 proteínas en unos tiempos muy cortos y obtener la información estructural partiendo de una cantidad reducida de proteína. El enfoque de Syrrx fue que con la información estructural se podía reducir el número de compuestos a sintetizar de unos mil a unos pocos centenares. Dentro de las tecnologías desarrolladas cabe destacar la biología molecular automatizada, la ingeniería de proteínas, la cristalización

de alta productividad y la determinación automatizada de estructuras, así como nuevas herramientas bioinformáticas para el diseño de nuevos compuestos.

Estas empresas desarrollaron los procesos de optimización utilizando una determinación interactiva de estructuras co-cristalinas que revelaban el modo de unión de pequeñas moléculas (hits) a dianas terapéuticas. Las dos compañías disponían para la difracción de cristales de una línea propia de sincrotrón de tercera generación en el Advanced Photon Source de Chicago.

Los avances de la Genómica Estructural no solo han ayudado a entender las funciones y el rol de las proteínas en enfermedades genéticas, epigenéticas o asociadas a enfermedades como la diabetes o los procesos inflamatorios sino que han tenido y tienen un gran impacto en el descubrimiento de nuevos fármacos.

En los últimos años, el uso de la información estructural en el Drug Discovery ha llegado a un alto grado de madurez aplicándose a todos los campos

desde la identificación de nuevas dianas terapéuticas provenientes de la secuenciación del genoma humano hasta la selección de los compuestos candidatos a ser fármacos. En este sentido disponer de esta tecnología consigue una mejoría en la calidad de los fármacos y una posible disminución en el tiempo y los recursos asociados al proceso de optimización que va de la idea al inicio de la fase clínica.

Un excelente ejemplo del uso combinado de la Genómica Estructural con la química computacional es el diseño racional de nuevos fármacos inhibidores de la proteasa del virus de la Inmunodeficiencia Humana o virus del SIDA. Esta proteína es la responsable de la maduración de nuevas partículas virales. Los inhibidores se unen al sitio activo impidiendo la unión al sustrato polipeptídico viral y por lo tanto impiden la producción de nuevas partículas virales infecciosas. Las primeras series de inhibidores de proteasa se basaban en péptido-miméticos, y tenían el inconveniente de tener un perfil fármaco-cinético deficiente

junto a una interacción significativa con otros fármacos y las proteínas plasmáticas. Posteriormente a partir de las estructuras cristalinas fue posible diseñar inhibidores no peptídicos y de series que eran capaces de unirse a la proteasa con un modo de unión novedoso. La información cristalográfica, sirvió como demostración de la complejidad del mecanismo y de la necesidad de las estructuras como guía en el desarrollo de los inhibidores. En las series diseñadas sucesivamente los compuestos se modificaron focalizando los esfuerzos en la mejoría de las propiedades drug-like de los inhibidores y disminuyendo su unión a las proteínas plasmáticas, hecho que resultó en un incremento en la eficacia y biodisponibilidad.

El Structure-based Drug Discovery también contribuyó al desarrollo de inhibidores de la renina para el tratamiento de la hipertensión arterial. Muchas de las grandes empresas farmacéuticas dedicaron grandes esfuerzos durante varios años a desarrollar nuevos fármacos inhibidores de esta

••• La cristalografía de rayos X se ha utilizado en el Drug Discovery desde los años 80 pero más recientemente con el auge de la genómica estructural, ha resurgido de forma importante. Este hecho se puede atribuir a la fundación de empresas como Syrrx, Astex o Structural GenomiX, que en los años 90, gracias al uso de tecnologías avanzadas impulsaron y dieron nuevo brillo al denominado Structure-based Drug Discover.

diana. La estructura cristalográfica de la renina murina se pudo resolver en el 1984 y en el 1989 se obtuvo la estructura de la proteína humana. Antes de esta fecha los programas de Drug Discovery utilizaban modelos de homología basados en las estructuras de otras proteasas como la endotiapepsina, la penicillopepsina o la rhizopuspepsina.

Con la estructura cristalográfica como guía en el desarrollo de compuestos se esperaba obtener pronto un fármaco que actuara inhibiendo esta diana terapéutica. Al principio se obtuvieron compuestos potentes pero con una biodisponibilidad variable y/o unos costes de producción excesivamente altos. En este sentido el disponer de una estructura cristalográfica inicialmente no ayudó en el diseño de inhibidores con propiedades farmacocinéticas aceptables. Pero posteriormente la estructura tridimensional de la renina reveló la existencia de una cavidad extra no utilizada por el sustrato ni por los inhibidores de tipo peptídicos. La estructura y los estudios de relación estructura-actividad sugirieron que la posibilidad de ocupar esta nueva cavidad era clave para la afinidad de los inhibidores. En base a estos descubrimientos, en 2007 Novartis llegó a comercializar en EE.UU. el fármaco Tekturna® para el tratamiento de la hipertensión. Por lo tanto, en el caso de la renina, la estructura tridimensional reveló ciertas características estructurales de la proteína y permitió un novedoso diseño de inhibidores más potentes.

Diseñar un buen fármaco no es cosa fácil y en los últimos años la productividad global de la industria farmacéutica ha disminuido notablemente. En el Ligand Design se puede optimizar la potencia de los inhibidores en un ensayo *in vitro*, pero es en el Drug Design en sí donde se tiene que considerar

una gran cantidad de parámetros a optimizar simultáneamente. Se hace muy difícil conseguir un compuesto con suficiente potencia y al mismo tiempo con 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 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™).

Fragment Screening

Durante los últimos años ha crecido notablemente el interés hacia el Fragment Screening como técnica complementaria al *Structure-based Drug Design* y muchas compañías han invertido en diferentes tecnologías de screening de fragmentos. Cabe destacar compañías como Abbott, Astex Pharmaceuticals, Vernalis y Astrazeneca que han hecho del *Fragment Screening* una parte importante del proceso de diseño de compuestos utilizando las estructuras de rayos X o de RMN como guía en el desarrollo. En la actualidad hay 15 compuestos derivados de fragmentos en investigación clínica y preclínica.

La idea principal de esta aproximación, es la de partir de moléculas de un peso molecular más pequeño a las usadas en High-Throughput Screening (HTS) de modo que el espacio químico a explorar es mucho menor y los puntos de partida (hits) son menos complejos. Los fragmentos, al ser más pequeños es más probable que puedan interactuar con alguna de las cavidades o subcavidades que hay en el centro

activo de una diana terapéutica. Esto hace que el porcentaje de hits que se encuentran en una campaña de Fragment Screening es notablemente más alto que en el caso del HTS.

En la actualidad se utilizan varias técnicas para identificar los fragment hits, desde el screening enzimático a las técnicas biofísicas como la RMN, la cristalografía de rayos X o el Biacore. En el caso de Crystax se usan técnicas de RMN, ya que son las que permiten una aplicación más generalizable. De hecho, la dificultad del Fragment Screening no recae tanto en la capacidad de detectar los fragmentos, sino en cómo usar toda la información generada para optimizar el compuesto de partida. Esto es debido al hecho que los fragmentos son moléculas pequeñas, poco elaboradas y poco potentes. Así, el modo de unión y las relaciones SAR pueden ser difíciles de establecer por la química médica tradicional o el modelado molecular, y sólo cuando se dispone de la estructura tridimensional se puede acotar mucho el campo de optimización. De todos modos, la información estructural se ha de complementar con otros criterios y hoy en día son necesarias estrategias que permitan llevar el proceso de optimización de forma sistemática.

Aunque inicialmente los

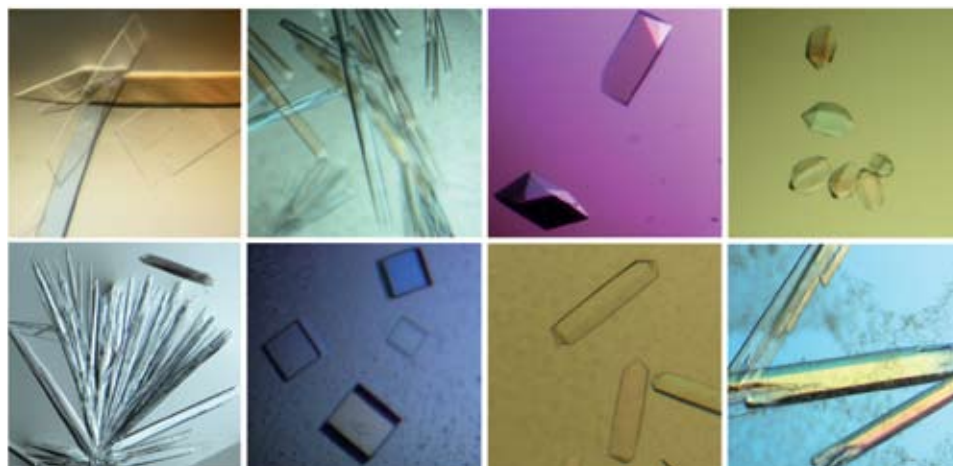


Figura 1 – Para poder aplicar la cristalografía de forma sistemática es necesario poner a punto un sistema cristalográfico robusto

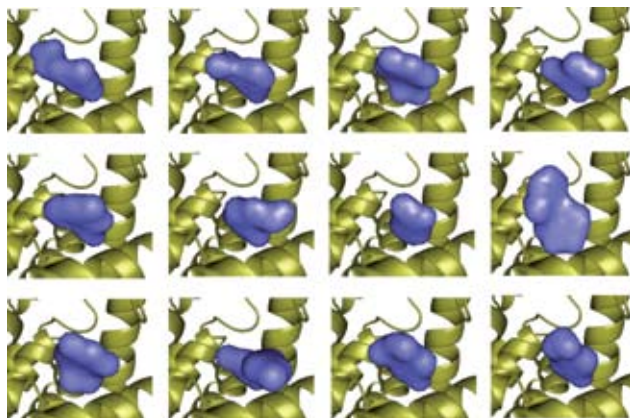


Figura 2 – El Fragment Screening genera un elevado número de información estructural, incrementado la eficiencia del proceso hit-to-lead

fragmentos son poco potentes, tratándose de moléculas con una complejidad química menor, tienen una gran eficiencia de unión (ligand efficiency), por lo que son puntos de partida más óptimos de cara en hacer un proceso de optimización.

Una vez identificados los hits de partida, existen distintas estrategias de optimización. En los primeros trabajos de Fragment Screening, se planteaba básicamente la idea de identificar dos fragmentos que se uniesen en subcavidades contiguas y unirlos mediante un linker (linking). Hoy en día, esta aproximación es poco generalizable ya que se ha visto que algunos linkers pueden causar una pérdida de potencia de entre uno y dos órdenes de magnitud. Estrategias más eficientes son la fusión de las partes que tengan en común dos fragment hits o merging. El merging es una estrategia muy útil ya que también permite hacer scaffold hopping que consiste en modificar el scaffold químico del fragmento manteniendo la ligand efficiency y las interacciones claves con la diana.

Finalmente la optimización del fragmento de partida se puede basar en el crecimiento hacia las partes del centro activo no ocupadas por este (growing). En todo caso, el resultado final de este proceso es

la identificación de una serie de estructuras químicas que serán el punto de partida para el proceso posterior de optimización.

Sea cual sea la estrategia escogida es notoria la importancia de la información estructural, complementada con métodos in-silico y otros ensayos biofísicos, como base fundamental para decidir en qué dirección hacer crecer el fragmento para llegar a moléculas más complejas y más potentes.

Obtención de la diana terapéutica

Para poder aplicar la cristalografía de rayos X es esencial poder disponer de la diana terapéutica en forma soluble, en elevada cantidad y en la versión más adecuada. Con este fin Crystax en cada proyecto explora distintos sistemas de expresión, principalmente *E. coli* y células de insecto/baculovirus, así como distintas variantes de la diana de interés. En concreto para poder cristalizar una diana terapéutica se necesita de una muestra de excelente calidad que cumpla con los siguientes criterios: gran cantidad (idealmente varios miligramos), homogénea, con un elevado grado de pureza (>95%) y bien plegada. Por ello aplicamos una serie de técnicas para caracterizar la muestra proteica antes de la etapa cristalográfica.

Para determinar el correcto plegamiento de la proteína mediante resonancia magnética nuclear (RMN) se adquiere un espectro monodimensional de protón. El nivel de dispersión de las señales así como la evaluación cualitativa de la anchura de éstas, permite detectar la presencia de estructuras desorganizadas o agregadas. Con los espectros de dicroísmo circular en el UV lejano también se obtiene información sobre el correcto plegamiento de la proteína además de los contenidos de estructuras secundarias. Mediante la dispersión dinámica de la luz o DLS basada en el análisis de los tamaños de las partículas en solución, a parte de la medición del peso molecular, es posible determinar la presencia de agregados, de varios estados oligoméricos de la proteína y/o la presencia de impurezas que pueden dificultar la obtención de cristales. La espectrometría de masa MALDI-TOF permite determinar el peso molecular exacto de la proteína y al mismo tiempo identificar y cuantificar las modificaciones post-translacionales. Finalmente, mediante la desnaturalización térmica se puede obtener información sobre la estabilidad de la proteína, aunque también se puede usar como método de screening de condiciones estabilizantes para la proteína sola y/o en presencia de ligandos.

Resolución de la estructura tridimensional del complejo fragmento-diana

Para poder llevar a cabo el estudio de un número apreciable de estructuras tridimensionales, 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 ya que se requiere obtener una gran cantidad de cristales de proteína de manera reproducible y con ciertas

características de tamaño y calidad.

Idealmente, se buscan condiciones que permitan obtener cristales de la proteína que no contengan ningún ligando en el sitio activo, llamados cristales apo. Así se pueden 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 en DMSO del fragmento y posteriormente llevar a cabo la resolución de la estructura. Cuando 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, se llevan a cabo estudios de co-cristalización con cada uno de los fragmentos. En este último caso, es necesario identificar las condiciones de cristalización para cada uno de los complejos ya que los cristales de complejos proteína-ligando frecuentemente cristalizan en condiciones diferentes a los cristales apo. Independientemente de la técnica se ha de llevar a cabo una exploración sistemática de más de 1000 condiciones cristalográficas en busca del sistema que sea suficientemente robusto.

En general, con alrededor del 40-50% de los fragmentos identificados mediante RMN se consigue obtener 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.

Para obtener las estructuras de la diana terapéutica en presencia de los fragmentos es necesario usar una plataforma de alto rendimiento para la manipulación y difracción de los cristales. En la actualidad Cryst-



Figura 3 – El sincrotrón ALBA de próxima construcción en Cerdanyola del Vallès (imagen cedida por Jordi Juanhuix Gibert)

tax dispone de unos equipos de última generación ubicados en el Parc Científic de Barcelona y acude a los sincrotrones equipados con intercambiadores automáticos que permiten montar y difractar los cristales de proteínas con ligando casi sin intervención humana. Actualmente todo el procedimiento está optimizado para obtener hasta 60 estructuras cristalográficas en un turno de ocho horas de toma de datos.

Crystax Pharmaceuticals es la primera empresa española que ha declarado públicamente su interés el uso de la línea de cristalografía de macromoléculas (XALOC) en el sincrotrón ALBA que actualmente se construye en Cerdanyola del Vallès, Barcelona

La eficiencia en la cristalización y en la difracción tiene que complementarse con una igual eficiencia en el procesado y análisis de los datos. En Crystax el proceso de resolución de estructura es completamente automático, hecho que nos permite el procesamiento de un gran número de datos en pocos minutos. Un paso importante en este sentido es el correcto posicionamiento del fragmento en la densidad electrónica

Esto requiere el uso de una scoring function que refleje el acuerdo entre el posicionamiento del ligando y la densidad electrónica también teniendo en cuenta las posibles interaccio-

nes con los residuos proteicos como por ejemplo la formación de puentes hidrogeno.

La cristalografía permite visualizar las moléculas a nivel atómico, pero el método no es directo como puede ser un microscopio o un telescopio óptico sino que primero se han de tomar datos en el sincrotrón y luego analizarlos. Sería parecido a un radiotelescopio donde primero se toman datos de señales de radio provenientes del espacio y de su análisis se puede visualizar las estrellas y nebulosas.

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 cuáles son los fragmentos más interesantes y seguir en su optimización.

Gracias a la obtención de estructuras a elevada resolución se pueden identificar las interacciones clave fragmento/diana y al mismo tiempo nos ofrece la oportunidad para diseñar nuevos fragmentos con el mismo modo de unión y afinidades parecidas al fragment hit.

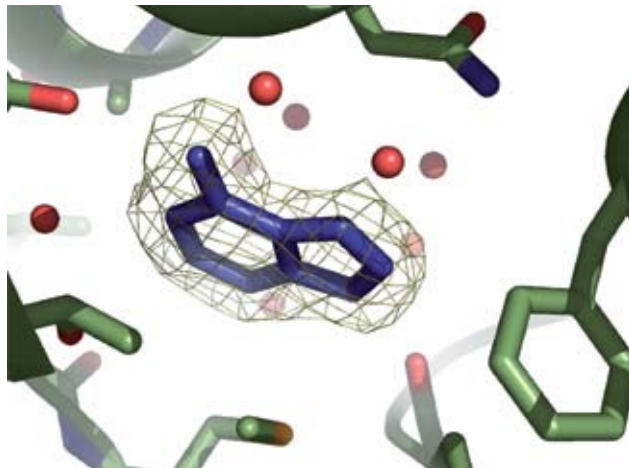


Figura 4 – Detalle de la estructura resuelta para uno de los fragmentos identificados en Crystax con una diana de gran interés en el campo oncológico.

Aplicación del Fragment Screening

El Fragment Screening es una estrategia que cada día va ganando más aceptación en la industria farmacéutica gracias a los buenos resultados que va generando. Tanto es así, que durante los próximos años veremos cómo se afianza en la mayoría de empresas como herramienta complementaria a otras aproximaciones y la identificación de fragment hits se convertirá en un proceso relativamente estándar.

En este sentido, el próximo reto está en cómo usar toda la información generada e identificar las estrategias y criterios que permitan optimizar los fragmentos de partida de la forma más eficiente y sistemática posible. En este sentido, la aproximación utilizada en Crystax busca establecer las bases para poder llevar a cabo este proceso mediante la integración de distintas áreas como son la biología estructural, la biofísica, la química médica y las propiedades ADMETox.

Hemos empleado la tecnología del Fragment Screening en más de 10 dianas relacionadas con distintas áreas terapéuticas, hecho que ha permitido generar una sólida experiencia. Hoy en día Crystax es la única empresa española con el know-how necesario para llevar a

cabo esta aproximación de forma sistemática.

Por otra lado, gracias a la información generada mediante el conjunto de la plataforma B2D2™ hemos sido capaces de identificar nuevas series de inhibidores para distintos proyectos de investigación internos. Estos programas han generado diversas patentes en el campo de la investigación oncológica.

Gracias a la fusión con Oryzon Genomics y a las sinergias entre las tecnologías y los equipos de investigación de ambas compañías, en los próximos años se podrá aplicar esta aproximación al desarrollo de nuevos fármacos destinados a tratar patologías como el cáncer y las enfermedades neurodegenerativas. •

¹ Davis, A.M., Teague, S.J and Kleywegt G.J. (2003) Application and Limitations of X-ray Crystallographic Data in Structure-Based Ligand and Drug Design. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 42, 2718- 2736

² Stoll V.S. (2008) Diversity breeds leads. *Drug Discovery & Development Magazine* 11, 16-20

³ Congreve, M., Chessari, G., Tisi, D. and Woodhead A.J. (2008) Recent developments in fragment-based drug discovery. *J. Med. Chem.* 51, 3661-3680

⁴ Hopkins, A.L., Groom, C.R. and Alex, A. (2004) Ligand efficiency: a useful metric for lead selection. *Drug Discovery Today* 9, 430-431

⁵ Carr, R. and Jhoti, H. (2002) Structure-based screening of low-affinity compounds. *Drug Discovery Today* 7, 522-527

⁶ 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