

OPTIMIZACIÓN Y ESCALADO DE PROCESO DE SÍNTESIS QUÍMICA DE NUEVAS MOLÉCULAS CANDIDATAS A DROGAS PARA HEPATOCARCINOMA

D. Vera⁽¹⁾, M. Ciarlantini⁽¹⁾, J. Bayo⁽²⁾, E. Fiore⁽²⁾, L. Gandolfi Donadio^(1,5), M. Manzi⁽³⁾, J. Ramirez⁽⁴⁾, G. Mazzolini⁽²⁾; M.J. Comin^(1,5)

dvera@inti.gob.ar

⁽¹⁾ Dto. Ingredientes Activos y Biorrefinería-SOlyS-GODTel-INTI

⁽²⁾ Laboratorio de Terapia Génica, Instituto de Investigaciones en Medicina Traslacional, Facultad de Ciencias Biomédicas, Universidad Austral-CONICET

⁽³⁾ Dto. Desarrollo Analítico y Control de Procesos-SOlyS-GODTel-INTI

⁽⁴⁾ Dto. Química Orgánica, FCEN-UBA- UMYMFOR-CONICET

⁽⁵⁾ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

Palabras Clave: Cáncer; Interacciones proteína-proteína; Rac1; Reacción multicomponente de Ugi.

INTRODUCCIÓN

Las interacciones proteína-proteína (IPP) gobiernan tres aspectos claves de la vida celular: el crecimiento, la supervivencia y la diferenciación, y su estudio ha resultado de sumo valor para explicar procesos biológicos complejos y comenzar a entender la relación entre las proteínas y las enfermedades. Las interfaces de las IPP son complejas y diversas, por lo que drogas dirigidas a este tipo de blancos ofrecen mayor selectividad y eficiencia en comparación con las drogas clásicas.

En la búsqueda de nuevas moléculas cuyos blancos moleculares sean proteínas validadas como blancos terapéuticos para el tratamiento del cáncer, se ha señalado a la proteína Rac1 de la familia de las GTPasas como un atractivo blanco molecular, ya que se encuentra hiperactivada en tumores de mama, colon-rectal, gástricos, testiculares, pulmonares y cerebrales. Rac1 puede encontrarse en un estado inactivo unido a GDP, o un estado activo unido a GTP. El ciclo entre estos dos estados es regulado por su interacción con los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs), y con las proteínas aceleradoras de la actividad GTPasa (GAPs).

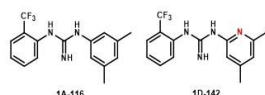


Figura 1: Estructuras de inhibidores desarrollados.

Previamente desarrollamos los compuestos 1A-116 y 1D-142 (Fig. 1) selectivos de Rac1 con actividad en modelos animales de cáncer y de fibrosis hepática, inhibiendo la IPP de Rac1 con su activante específico Tiam1 (GEF) [1],[2].

En este trabajo se presentan los avances en el desarrollo de inhibidores novedosos y más potentes que el compuesto líder, con potencial uso como agentes antitumorales.

OBJETIVOS

Objetivo general. Producir lotes validados de candidatos a drogas para uso en ensayos preclínicos y clínicos.

Objetivo específico: Estudiar alternativas sintéticas, seleccionar el proceso más eficiente de síntesis de **1G-55** y escalarlo a cientos de gramos para abastecer estudios preclínicos y clínicos.

DESARROLLO

El derivado **1G-55** se seleccionó como representante más promisorio de una nueva familia de compuestos, derivados de **1A-116**. La estrategia general de síntesis de la familia se basó en la reacción multicomponente de Ugi (U-4CR), que genera una α -aminoacilamida por condensación de un ácido carboxílico, una amina, un isonitrilo y un compuesto carbonílico (aldehído o cetona) (Fig. 2).



Figura 2: Reacción multicomponente de Ugi (U-4CR) empleada para el diseño de la familia de compuestos.

Esta reacción permite crear diversidad en un único paso de síntesis, a partir del uso de diferentes combinaciones de componentes de partida. En este trabajo se presentan los estudios sintéticos realizados hasta el momento.

RESULTADOS

Inicialmente, se sintetizaron y caracterizaron 13 compuestos novedosos, con una pureza superior a 95%. Los miembros de esta nueva familia fueron evaluados biológicamente en ensayos de proliferación celular en líneas celulares tumorales humanas. Se detectaron 6 compuestos capaces de inhibir la proliferación celular de manera dependiente de la dosis, y con actividad más potente que los inhibidores conocidos hasta el momento (Fig. 3). Se verificó por medio de la tecnología Alpha Screen [3] que estos compuestos inhibieron la interacción entre Rac1 y su GEF Tiam1.

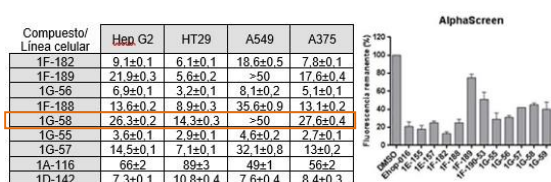


Figura 3: Actividad Antiproliferativa (IC₅₀ [μM]) y resultados Alphascreen de compuestos seleccionados.

Se seleccionó el compuesto **1G-55** por su alta potencia antiproliferativa en cultivos celulares (IC₅₀ 2-4 mM) y por su capacidad para inhibir la interacción entre Rac1 y su activante Tiam1.

Las estrategias sintéticas ensayadas para la obtención del compuesto fueron tres, y se representan en la Figura 4.

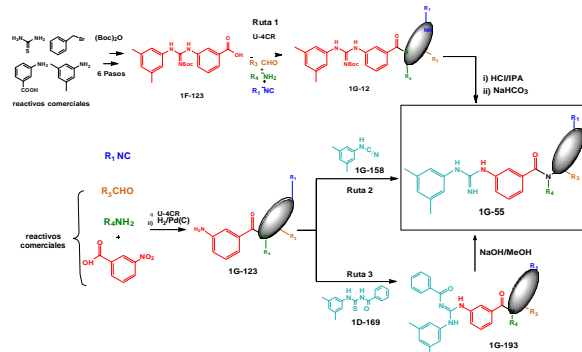


Figura 4: Estrategias sintéticas para obtener 1G-55.

En la Ruta 1, la *N,N'*-diarilguanidina protegida 1F-123 participa en la reacción U-4CR. El grupo *t*-butilcarbamato (Boc) protector es removido posteriormente por tratamiento en condiciones ácidas.

Las Rutas 2 y 3 difieren de la primera en que el grupo guanidina se forma en una etapa posterior a la U-4CR. Para tal fin, la Ruta 2 emplea un acoplamiento con cianamida (1G-158), mientras que en la Ruta 3, el acoplamiento es con tiourea (1D-169) en presencia de EDCI, seguida de hidrólisis en medio básico. Estas alternativas requieren un menor número de pasos de reacción, y en el caso de la Ruta 3, el producto pudo ser recristalizado en el mismo medio de

reacción, evitando el uso de columna cromatográfica o el cambio de solvente para la purificación.

Actualmente se está trabajando en la optimización de una ruta de síntesis escalable que permita proveer el candidato **1G-55** con calidad uniforme, estudiando cada paso de las secuencias sintéticas en profundidad para determinar los parámetros claves.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

- Se sintetizaron 13 compuestos, de los cuales 6 mostraron actividad inhibitoria más potente que los compuestos conocidos hasta el momento. Se verificó que el mecanismo de acción es a partir del bloqueo de la IPP entre Rac1 y su GEF, Tiam1. En particular, el candidato **1G-55** resultó ser considerablemente más potente que el compuesto líder.

- Se estudiaron 3 alternativas de síntesis seleccionándose la ruta 3 por ser más compatible con el escalado.

- Se utilizó esta secuencia para producir un lote a escala 1g el cual está siendo usado para estudios preclínicos para el tratamiento de hepatocarcinoma estudiado.

- Se están estudiando distintas estrategias para optimizar las condiciones de reacción de obtención de **1G-55** con el objetivo de lograr un proceso robusto, eficiente, escalable seguro y amigable con el medio ambiente cumpliendo los requerimientos establecidos por la normativa vigente.

Índice TRL: 4

AGRADECIMIENTOS

Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Agencia de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) e Instituto de Calidad Industrial (INCALIN-UNSAM)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Cardama GA et al. "Preclinical Development of Novel Rac1-GEF Signaling Inhibitors using a Rational Design Approach in Highly Aggressive Breast Cancer Cell Lines". *Anticancer Agents Med. Chem.*, 14, 2014, 840-851.

[2] Ciarlantini, MS et al. "Development of an Improved Guanidine-Based Rac1 Inhibitor with in vivo Activity against Non-Small Cell Lung Cancer" *ChemMedChem*, 16 (6), 2021, 1011-1021.

[3] Ullman, E. F et al. "Luminescent oxygen channeling immunoassay: measurement of particle binding kinetics by chemiluminescence" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 91 (12), 1994, 5426-5430.