

## DISEÑO Y SINTESIS DE MOLECULAS PEQUEÑAS. DESARROLLO DE AGENTES ANTITUMORALES

Comin, M.J.; Garcia, C.L.; <sup>1</sup> Ciarlantini, M.;<sup>1</sup> Gandolfi Donadío, L.;<sup>1</sup> Hornos, L.;<sup>1</sup> Cardama, G.;<sup>2</sup> Lorenzano Menna, P.; <sup>2</sup> Gonzalez, N.;<sup>2</sup> Alonso, D. F.;<sup>2</sup> Gomez, D. E.;<sup>2</sup> Defelipe, L.;<sup>3</sup> Turjanski, A.G.;<sup>3</sup> Blumberg, P.M.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>INTI Química, <sup>2</sup>Universidad Nacional de Quilmes, <sup>3</sup>FCEyN-UBA, <sup>4</sup>National Cancer Institute-EEUU

jcomin@inti.gob.ar

### **OBJETIVO**

*Objetivos Generales:* Diseñar y desarrollar nuevas moléculas como potenciales candidatas a drogas antitumorales y como herramientas para el estudio de los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo del cáncer.

Este objetivo se aborda a través del desarrollo de dos líneas de trabajo diferenciadas según los blancos moleculares que se toman en cada una. Se denomina blanco molecular a la macromolécula cuya función se identifica con el desarrollo de la enfermedad en estudio. Las nuevas moléculas desarrolladas apuntan a interferir de alguna manera con la función que cumplen los blancos moleculares en el desarrollo de la enfermedad. Las vías de señalización intracelular son mecanismos a través de los cuales las células responden a estímulos externos regulando procesos como la diferenciación, proliferación, migración y apoptosis los cuales suelen estar descontrolados en tejidos cancerosos. En este trabajo, nos centramos en la búsqueda de nuevas moléculas que interfieran en la función de dos blancos moleculares involucrados en estas vías:

#### *Objetivos específicos*

- Diseño, síntesis y evaluación biológica de activantes selectivos de la proteína RasGRP.
- Diseño, síntesis y evaluación biológica de Inhibidores de Rac1.

### **DESCRIPCIÓN**

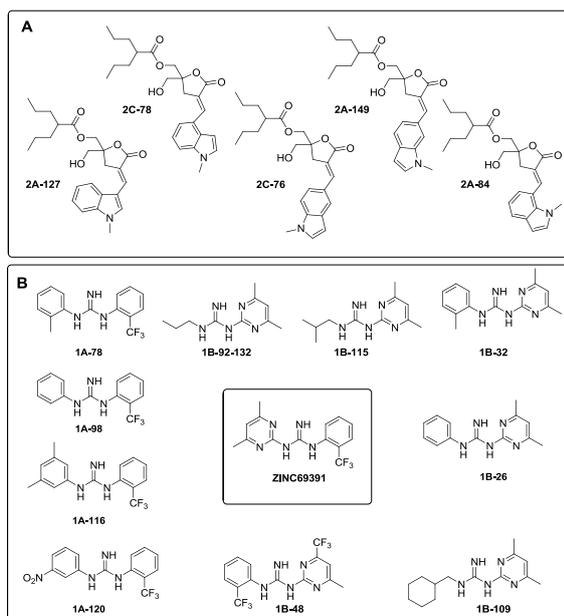
En las últimas décadas, los determinantes moleculares del comportamiento tumoral han podido ser paulatinamente comprendidos. El avance del conocimiento en este campo produjo un cambio de paradigma en el proceso de descubrimiento de agentes antineoplásicos, que llevó a la identificación de nuevas terapias para combatir el cáncer. En este sentido, en el año 2001, la FDA aprobó por primera vez la utilización de un inhibidor de transducción de señales, el Imatinib mesilato (Gleevec®), cuyo blanco es una proteína quinasa. Este hecho revolucionó el tratamiento de leucemias mieloides crónicas y de tumores de estroma gastrointestinal (GIST) (Lyseng-Williamson & Jarvis, 2001). El nuevo "paradigma molecular" se focaliza en blancos que sostienen el

comportamiento aberrante de las células cancerosas. Los distintos tipos de cáncer comparten atributos que resultan cruciales para el fenotipo de los tejidos tumorales: proliferación en ausencia de estímulos externos, replicación indefinida y ausencia de mecanismos de apoptosis, formación de nuevos vasos sanguíneos, y habilidad para invadir tejidos vecinos entre otros.

Este trabajo se encaró de manera multidisciplinaria en colaboración con grupos de especialistas en el estudio de procesos celulares relacionados con el desarrollo de cáncer y previendo todas las etapas necesarias para el desarrollo de un nuevo fármaco (descubrimiento, ensayos pre-clínicos, clínicos y comercialización). En el laboratorio de síntesis orgánica del INTI diseñamos y sintetizamos las moléculas. En todos los casos se tratan de moléculas originales, para las cuales se desarrollan caminos sintéticos nuevos y cuyas estructuras se confirman con técnicas como la resonancia magnética nuclear, espectrometría de masa y análisis elemental. Las rutas de síntesis se diseñan teniendo en cuenta el material de partida comercialmente asequible y buscando la máxima eficiencia del proceso.

*Elección del blanco molecular.* RasGRP es un blanco molecular validado en cáncer de próstata, melanoma y linfoma (Stone, 2011). Rac1 es una proteína que se encuentra sobreexpresada e hiperactivada en tumores (mama, colo-rectal, gástricos, testiculares, pulmonares y cerebrales) y es un blanco molecular validado (Fritz & Kaina, 2006).

*Diseño de compuestos.* En la figura 1 se muestran las estructuras de los compuestos diseñados para interactuar con los blancos moleculares. En el caso de RasGRP la estrategia de diseño es la de imitar al sustrato natural de estas proteínas (el segundo mensajero diacilglicerol (DAG)). Las "DAG-lactonas" se diseñaron como análogos de estructura rígida y de mayor afinidad por su receptor. Los inhibidores del Rac1 se diseñaron a partir de un compuesto líder (**ZINC69391**) hallado por screening virtual (búsqueda *in silico* de moléculas capaces de interactuar con el blanco molecular seleccionado).



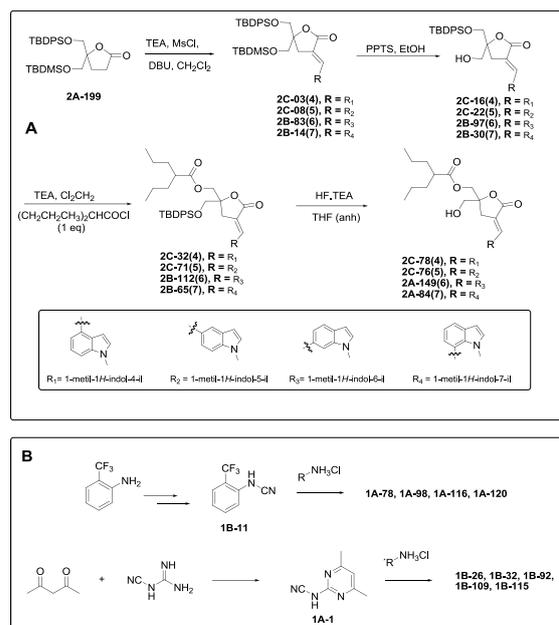
**Figura 1:** compuestos diseñados para la interacción con blancos moleculares (A) RasGRP y (B) Rac1.

## RESULTADOS

La síntesis de las DAG-lactonas unidas a anillos indólicos en posiciones diferentes a la 3, requirió de un desarrollo sintético particular dada la alta reactividad química de la posición 3 libre del indol. Los análogos de **ZINC69391** se sintetizaron a través de la preparación de las cianamidas **1B-11** y **1A-1** las cuales por reacción con diferentes aminas condujeron a los derivados deseados (Figura 2). En la Tabla 1 se presentan los valores de afinidad de los compuestos sintetizados como activantes de proteínas con dominio C1. La Figura 3 muestra la potencia como agente antiproliferativo en células F3II de **1A-116** ( $IC_{50}$  4  $\mu$ M) respecto del líder **ZINC69391** ( $IC_{50}$  41  $\mu$ M) y la disminución de Rac1 activo por acción de **1A-116**.

## CONCLUSIONES

- Se sintetizaron compuestos que mostraron alta potencia como activantes de PKC (proteína quinasa C) y RasGRP. En particular, **2A-127** presentó una buena selectividad por RasGRP lo que podría resultar ventajoso para el diseño de fármacos por presentar menos interferencias por la interacción con otras vías y es una herramienta importante para el entendimiento de los procesos celulares involucrados en el desarrollo de tumores.
- El compuestos **1A-116** presentó una actividad promisorio en ensayos *in vitro* en células e *in vivo* en ratones. Se está trabajando en estudios de toxicidad y en ensayos preclínicos en ratones para cáncer de mama y glioma. Se presentó en USA una patente provisional conjunta (Lorenzano Menna, 2011).

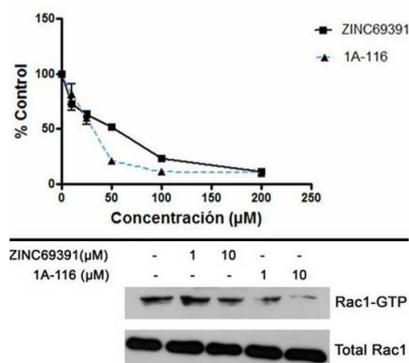


**Figura 2:** procesos sintéticos desarrollados (A) RasGRP y (B) Rac1.

**Tabla 1:** Afinidad de unión a PKC $\alpha$ , RasGRP1 y RasGRP3.

	PKC $\alpha$	RasGRP3	PKC $\alpha$ / RasGRP3	RasGRP1	PKC $\alpha$ / RasGRP1
[ <sup>3</sup> H]PBDu	0,17 $\pm$ 0,02	0,42 $\pm$ 0,03	4,4	0,12 $\pm$ 0,01	1,4
<b>2A-127</b>	16,2 $\pm$ 1,0	0,33 $\pm$ 0,06	<b>49</b>	0,25 $\pm$ 0,10	<b>65</b>
<b>2C-78</b>	17,8 $\pm$ 2,0	1,63 $\pm$ 0,18	11	1,55 $\pm$ 0,10	10
<b>2C-76</b>	8,3 $\pm$ 0,9	0,34 $\pm$ 0,01	24	0,41 $\pm$ 0,10	24
<b>2A-149</b>	7,5 $\pm$ 1,0	1,22 $\pm$ 0,21	6	0,87 $\pm$ 0,04	9
<b>2A-84</b>	12,9 $\pm$ 1,4	1,12 $\pm$ 0,05	12	0,69 $\pm$ 0,14	19

La interacción de los compuestos sintetizados con las proteínas se analizó comparando la capacidad de los mismos de desplazar al [<sup>3</sup>H]PBDu en proteínas recombinantes.



**Figura 3:** a. comparación de actividad antiproliferativa de 1A-116 vs ZINC69391; b. Resultados de ensayo de precipitación de Rac activo (Rac-GTP).

## BIBLIOGRAFÍA

- Fritz, G., & Kaina, B. (2006). Rho GTPases: Promising cellular targets for novel anticancer drugs. *Current Cancer Drug Targets*, 6(1), 1–14.
- Lorenzano Mena, P., Alonso, D., Gomez, D. Comin, M.J. Phenyl-guanidine derivatives. Patente provisional en USA. Application Number: 61545804 (2011).
- Lyseng-Williamson, K., & Jarvis, B. (2001). Imatinib. *Drugs*, 61(12), 1765–1774.
- Stone, J. C. (2011). Regulation and function of the rasGRP family of ras activators in blood cells. *Genes and Cancer*, 2(3), 320–334.