

INTRODUCCIÓN GENERAL

Tradicionalmente los sistemas bioquímicos estudiados desde el punto de vista farmacológico comprendían un receptor con uno o varios pequeños ligandos bien definidos. Las razones de esto eran varias: por un lado fueron los receptores que se descubrieron primero, por otro las acciones estaban claramente definidas y la química era relativamente sencilla.

Durante la última década, debido a los avances en las técnicas para estudiar los receptores, se han incorporado un nuevo grupo: los receptores peptídicos o proteínicos¹, llamados así por la naturaleza de sus ligandos.

A *priori* este estudio puede resultar tedioso; los ligandos tienen miles de aminoácidos y muchas veces la secuencia de aminoácidos de la unión (o *binding*) no es lineal sino que ésta se debe a la estructura tridimensional de la proteína.

Existen muchas familias de receptores proteínicos, pero las más estudiadas como potenciales dianas terapéuticas en *Drug Discovery*² han sido las INTEGRINAS,³ debido principalmente a la clara implicación de muchas de ellas en un gran número de procesos patológicos.

Las integrinas forman la principal familia de los receptores de adhesión celular. Se encuentran en la superficie celular y son el principal recurso que tienen las células para interactuar con la matriz extracelular o entre las mismas células.⁴

Las reacciones de adhesión constituyen funciones celulares de gran importancia para llevar a cabo ciertos procesos fisiológicos tales como la migración celular, la proliferación, la diferenciación, y la activación celular.^{5,6} Así, la adhesión celular interviene en procesos como el desarrollo embrionario⁷, la angiogénesis¹ o la agregación plaquetaria⁸ y está implicada en procesos patológicos, como son la inflamación⁹ y la metástasis.¹⁰

Las integrinas están ampliamente distribuidas e interactúan con todas las proteínas claves de la matriz extracelular¹ (colágeno, fibronectina, fibrinógeno, laminina, vitronectina, etc...) que constituyen sus ligandos.

¹ Cox, D; *Drug News & Perspectives* 8 (4), **1995**, 197-205

² *Drug Discovery*, término anglosajón empleado en Química Médica para denominar la disciplina que engloba todos los estudios necesarios para encontrar y caracterizar un fármaco nuevo *in vivo* (Alfred Burger, *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, John Wiley & Sons Inc. 5th Ed. **1995**).

³ Humphries, M.J.; *Biochemical Society Transactions*, Vol. 28, **2000**, 311-340

⁴ Para reviews: a) Butcher, E.C.; *Cell*, 67, **1991**, 1033, b) Springer, T.A.; *Cell*, 76, **1994**, 301, c) Cox, D. Et al.; *Medicinal Research Rev.*, 14, **1994**, 195

⁵ Hynes, R.O.; *Cell*, 69, **1992**, 11-25

⁶ Rouslashti, E., *J. Clin. Invest.*, 87, **1991**, 1-5

⁷ Yamada, S., Brown K.E., Yamada, K.M.; *Cell Adhes. Commun.* (4), **1995**, 311-325

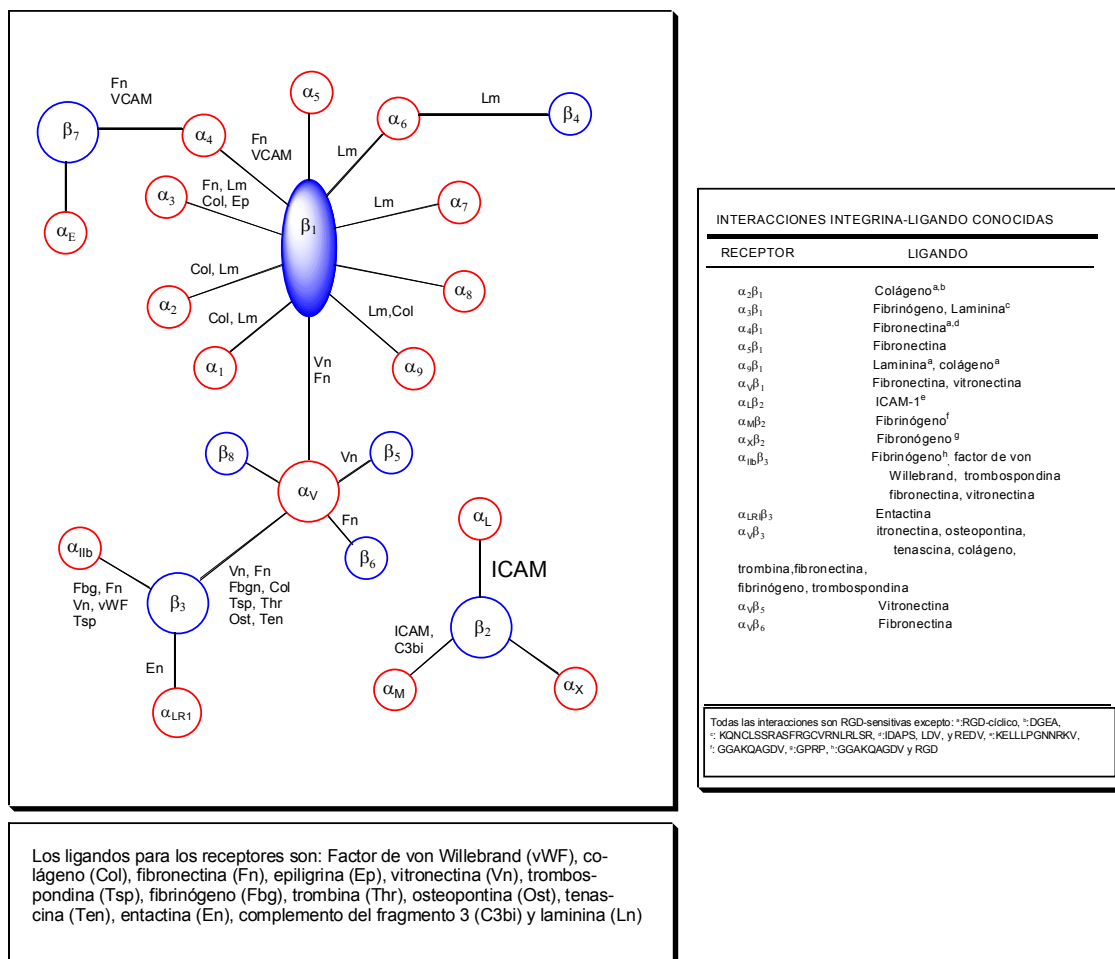
⁸ Wong, C.H.; *Bioorg. Med. Chem.* 3 (4), **1995**, 337-360

⁹ Zimmerman, C.J.; ; *Exp. Opin. Ther. Patents* 9 (2), **1999**, 129-133

Algunos receptores son muy específicos para un solo ligando, como la $\alpha_5\beta_1$ (ó VLA-5) con la fibronectina, mientras que otros como la $\alpha_v\beta_3$ tienen al menos 9 ligandos (Fig. 1). Muchas veces esta especificidad por el ligando del receptor depende del tipo de célula en la cual está presente.

Las integrinas son receptores proteínicos que consisten en dos subunidades, una glicoproteína transmembrana α y otra β que forman un complejo no covalente. Cada subunidad contiene un gran dominio extracelular y otro pequeño citoplasmático. Ambas subunidades contienen centros activos y contribuyen a la unión. Actualmente se conocen 16 tipos de subunidades α y 8 de tipo β , la combinación de las cuales genera las 22 integrinas conocidas.

Fig.1¹



El interés de la comunidad científica por cada una de las integrinas ha ido íntimamente ligado al establecimiento de las implicaciones de cada una de ellas en diferentes procesos patológicos y por lo tanto al ser incorporada como diana terapéutica.

¹⁰ Kerr, S.J., Slee, A. M., Mousa, S.A.; *Exp. Opin. Invest. Drugs* 9 (6), 2000, 1271-1279

La primera integrina considerada como diana en *Drug Discovery* fue la $\alpha_{IIb}\beta_3$ ¹¹ o glicoproteína GPIIb-IIIa, debido a su claramente establecido papel mediador en la agregación plaquetaria y consecuentemente en la trombosis arterial y sus patologías relacionadas.

El siguiente receptor que despertó interés fue la $\alpha_V\beta_3$ ¹² que participa en diversas funciones biológicas tal y como ha sido demostrado. Estas se podrían englobar dentro de las siguientes áreas: biología vascular (reparación de heridas y angiogénesis), crecimiento tumoral y metástasis, y resorción ósea mediada por osteoclastos.

La $\alpha_4\beta_1$ (ó VLA-4, *very late antigen 4*, CD49d/CD29)¹³ ha sido otra de las integrinas más ampliamente estudiada en los últimos años, dada su implicación en funciones reguladoras de procesos inflamatorios en enfermedades autoinmunes.

Otras integrinas validadas como dianas terapéuticas han sido la $\alpha_4\beta_7$ ¹⁴ y la $\alpha_L\beta_2$ ¹⁵ (o LFA-1) que ya se encuentran en fases iniciales de desarrollo.

1. INTEGRINA $\alpha_{IIb}\beta_3$ (ó GPIIb-IIIa)

La $\alpha_{IIb}\beta_3$ es la integrina mejor estudiada y sus antagonistas fueron los primeros en aparecer debido principalmente a que fue determinado inequívocamente su papel esencial en el proceso de agregación plaquetaria.¹⁶

Estos receptores, también llamados glicoproteínas IIb-IIIa o abreviadamente GPIIb-IIIa, se hallan principalmente en la membrana externa de las plaquetas aunque también se han detectado en sus precursores megacarióticos.¹⁷

El fibrinógeno, una proteína plasmática divalente, es el ligando natural de la GPIIb-IIIa y su unión a esta integrina provoca que las plaquetas se adhieran a los vasos sanguíneos y luego entre sí para detener las hemorragias, o en casos patofisiológicos provocar la trombosis. Así pues, la agregación plaquetaria juega un papel crucial, no sólo en los procesos hemostáticos, sino también en varias patologías cardiovasculares donde se produzca una alteración del endotelio vascular como la angina inestable, el infarto de miocardio, accidentes cerebrovasculares o reestenosis post-angioplastia.¹⁸

¹¹ Scarborough, R.M., Gretler, D.D.; *J. Med. Chem.* 43, **2000**, 3453-3473

¹² Dresner-Pollack, R. et al.; *J. Cell. Biochem* 56, **1994**, 323-330

¹³ Hemler, M.E.; *Ann. Rev. Immunol.*, 8, **1990**, 365

¹⁴ Kessler, H. et al.; *J. Med. Chem.* 44, **2001**, 2586-2592

¹⁵ Pei, Z. et al. *J. Med. Chem.* 44, **2001**, 2913-2920

¹⁶ Ferguson, J. J., Zaqq, M.; *Drugs*, **1999**, 56 (6), 965-982

¹⁷ Cook, S. N., Kottirsch, G., Zerwes, H.; *Drugs of the future*, **1994**, 19 (2), 135-159

¹⁸ Zablocki, J.A. et. al.; *Current Pharmaceutical Design*, **1995**, 1, 533-58

Dentro de la secuencia de procesos en la hemostasis, la unión del fibrinógeno a la GP IIb-IIIa tiene lugar al final de la cascada. Por lo tanto, esta es la característica básica de los antagonistas de los receptores (GPIIb-IIIa) del fibrinógeno que pueden bloquear el proceso de agregación plaquetaria independientemente de cual sea el agente agregante.

Los antagonistas de los receptores del fibrinógeno podrían superar dos de los problemas de los antiagregantes actuales:

- Son específicos para la plaqueta, en cambio por ej. la aspirina actúa a otros niveles y tiene efectos secundarios como la ulceración gástrica.
- Inhiben el paso final de la agregación plaquetaria independientemente de cual sea el inductor. La aspirina acetila la COX-1 plaquetaria lo que produce una inhibición de la producción de tromboxanos pero esta es únicamente una de las muchas vías existentes.

En 1999, el área de I+D de J. Uriach & Cía S.A. decidió abordar un *screening* o cribado farmacológico en antagonistas de los receptores del fibrinógeno aprovechando la experiencia de la compañía en el campo de los antiagregantes plaquetarios. Como resultado de este trabajo se presentaron una serie de patentes¹⁹ y se seleccionó una molécula, el **UR-12947**, para su estudio clínico. Parte del primer *screening* se halla detallado en la memoria realizada con motivo de la presentación del Máster en Química Experimental²⁰ en febrero de 2000, mientras que en la primera parte de esta Tesis Doctoral se presentan los estudios que se llevaron a cabo para optimizar la síntesis del **UR-12947**.

2. INTEGRINA $\alpha_4\beta_1$ (ó VLA-4)

En el sistema inmune, las integrinas se ven envueltas en el transporte, adhesión e infiltración de los leucocitos durante los procesos inflamatorios. Las integrinas VLA-4 y LFA-1 han demostrado ser esenciales en la adhesión de los leucocitos al endotelio, paso imprescindible para la migración de estas células al área de inflamación.²¹

La subunidad α_4 se combina exclusivamente con las subunidades β_1 y β_7 dando lugar a las integrinas $\alpha_4\beta_1$ y $\alpha_4\beta_7$.¹

¹⁹ a) Carceller, E., Salas, J. Jiménez, P.J.; WO 98/46599, b) Carceller, E., Salas, J. Jiménez, P.J.; WO 99/20606, c) Carceller, E., Salas, J. Jiménez, P.J.; ES 99/00942

²⁰ Salas, J; *Síntesis de nuevos antagonistas de los receptores del fibrinógeno*, Máster en Química Experimental, **2000**

²¹ Jackson et. al.; *J. Med. Chem.*, 40, **1997**, 3359-68

La integrina $\alpha_4\beta_1$ (ó VLA-4) es un receptor de membrana que se expresa constitutivamente en alto grado en leucocitos mononucleares, monocitos, linfocitos, eosinófilos, basófilos y macrófagos. Aunque no se expresa en neutrófilos o PMN (polimorfonucleares) estudios recientes sugieren que pueden ser expresadas bajo ciertas condiciones estimulatorias.²²

Esta integrina media la adhesión célula-célula a la molécula de adhesión de células vasculares (VCAM-1), así como la adhesión célula-matriz extracelular mediante la unión a la fibronectina, más concretamente al residuo CS-1.²³ Estudios recientes indican que también se une al fragmento N-terminal de una matriz recientemente descubierta, la osteopontina, una fosfoproteína con funciones múltiples derivada de la rotura de la trombina.²¹

La VLA-4 se ve involucrada en dos vías de transducción de señales. Por un lado el pequeño fragmento citoplasmático de la VLA-4 se une a las proteínas intracelulares del citoesqueleto, como las quinasas. Pero si bien los detalles de ese proceso de trasducción no es muy conocido, lo que sí sabemos es que la afinidad de la VLA-4 por sus ligandos puede ser modulada mediante cascadas intracelulares conectadas a interacciones entre quimioquinas con receptores proteínicos G-acoplados en los leucocitos en un proceso llamado transducción de señal "dentro-fuera". Por otra parte la unión de los leucocitos al VCAM-1 o a la fibronectina produce cambios significativos en la morfología celular y es crucial en la regulación de la movilidad (señal fuera-dentro).²⁴

Mediante el tratamiento directo con anticuerpos monoclonales contra la VLA-4 o el VCAM-1, se ha descrito con claridad el papel central de la VLA-4 en modelos animales de enfermedades inflamatorias crónicas como la enfermedad pulmonar alérgica, lo que sugiere que podría ser una diana en el tratamiento del asma humano, en artritis reumatoidea y en la enfermedad inflamatoria del intestino.²⁰ Además se abren otras posibilidades terapéuticas como la esclerosis múltiple.²¹

Recientemente se han publicado resultados clínicos positivos del tratamiento con el anticuerpo monoclonal **Natalizumab** (Antegren®) de la esclerosis múltiple²⁵ y la enfermedad de Crohn.²⁶ Parece posible entonces, que los compuestos que antagonicen la acción de estas integrinas podrían ser por tanto de utilidad en el tratamiento o prevención de dichas patologías.

²² Lobb, R.R., Adams, S.P.; *Exp. Opin. Invest. Drugs*, 8(7), 1999, 935-4

²³ Makarem, R. et al; *J. Biol. Chem.*, 269, 1994, 4005-11

²⁴ Tilley, J.W, Sidduri, A.; *Drugs of Future*, 26 (10), 2001, 985-998

²⁵ Miller, D.H., et al.; *N.Engl.J.Med.*, 348, 2003, 15-23

²⁶ Ghosh, S., et al.; *N.Engl.J.Med.*, 348, 2003, 24-32

Dado el alto interés de esta diana terapéutica, Uriach decidió dedicar un equipo de investigación al descubrimiento de nuevos antagonistas de la VLA-4. La segunda parte de la presente Tesis Doctoral se centró en el desarrollo de una de las familias de estos compuestos.