

Aplicación de un sistema *in silico* múltiple para la priorización en la selección de compuestos antimaláricos

Castañeda-Casado P*¹, Gresham S², Jimenez-Navarro E¹, Giddings A², Muñoz-Muriedas J³, Hattotuwigama C⁴, Harvey J², Robinson S².

¹DDW Discovery Performance Unit, GSK Spain. C/ Severo Ochoa, 2. 28760 Tres Cantos (Madrid, Spain); ²Safety Assessment, GSK Ware UK; ³Computational Chemistry, GSK Stevenage UK; ⁴Scinovo, GSK Stevenage UK.

Recibido 28 octubre de 2014 / Aceptado 11 noviembre 2014

Resumen. Introducción: Como parte del compromiso de GSK en la reducción del fracaso en las fases de desarrollo clínico y preclínico, se ha implementado en las fases más tempranas de desarrollo una estrategia para evitar los problemas de genotoxicidad que son los que, en mayor manera, pueden obstaculizar la progresión a fases más avanzadas. El objetivo de este trabajo es aplicar la nueva estrategia de GSK para la priorización de compuestos que permita seleccionar aquellas estructuras con menor riesgo de genotoxicidad utilizando una combinación de herramientas computacionales que predice el resultado del test de Ames. Materiales y Métodos: Compuestos de la colección de GSK, activos en el screening fenotípico frente a *P. falciparum*, fueron utilizados en este estudio. Tres modelos, Derek Nexus (Lhasa Limited, Leeds, UK), Leadscape y un método de mecánica cuántica desarrollado internamente se utilizaron para las predicciones *in silico*. Resultados: La combinación de los tres modelos de predicción tuvo un porcentaje de éxito del 75% con sólo 1 falso positivo. Conclusiones: Moléculas con 2 o más alertas de genotoxicidad generadas por este sistema múltiple deberían ser depriorizadas o ensayadas experimentalmente cuanto antes para descartar su riesgo de genotoxicidad.

Palabras clave: *In silico*, antimaláricos, priorización, 3Rs, SAR

Abstract: Multiple *in silico* genetic toxicity alerting tools for antimalarial compounds prioritization. Introduction. As part of the commitment of GSK in reducing attrition rate in clinical and preclinical stages, it has been set up in early stages of development (H2L, Lead Op) a candidate quality strategy to avoid genotoxicity liabilities that mainly can stop the progression of compound towards advanced stages. The aim of the study is to apply the new strategy in order to triage structures with less genotoxicity risk by means an *in silico* multiple system that predicts the outcome of Ames test. Material & Methods. Active compounds against *P. falciparum* phenotypic screening from GSK collection were used. Three different models: Derek Nexus (Lhasa Limited, Leeds, UK), Leadscape and a quantum mechanics method developed internally were used for *in silico* predictions. Results. The use of three models have an accurately success rate, greater than 75% with only 1 false positives. Conclusions. Those molecules that fire 2 or more genotoxicity alerts should be deprioritised or tested experimentally in Ames test to confirm or discharge the genotoxicity risk.

Key words: *In silico*, antimalarial, prioritization, 3Rs, SAR

Introducción

La malaria es una de las enfermedades infecciosas con mayor

impacto en la salud humana, sobre todo en países en vías de desarrollo. Está causada por los estadios eritrocíticos de protozoos del género *Plasmodium* y es transmitida a humanos a través de la picadura de las hembras del mosquito *Anopheles*.

El desarrollo de nuevos fármacos, seguros, eficaces y asequibles, es uno de los elementos más importantes de la estrategia global frente a la malaria. GlaxoSmithKline hace unos diez años dedicó un centro de investigación, denominado Diseases of the Developing World (DDW), al descubrimiento de nuevos fármacos para el tratamiento de la malaria, así como la tuberculosis y enfermedades producidas por kinetoplastidos (chagas, enfermedad del sueño...) La labor que se desarrolla en este centro incluye el desarrollo de nuevas tecnologías que permitan encontrar mejores medicamentos para erradicar la malaria.

Así, en 2009 se realizó una campaña de screening donde se investigó la eficacia de casi dos millones de compuestos, procedentes de la colección de GSK para inhibir el crecimiento de *P. falciparum* 3D7 *in vitro*. En este proyecto se identificaron 19.451 *hits* primarios que inhibían el crecimiento del parásito en más de un 80%. Estos *hits* fueron ensayados posteriormente en dos ensayos independientes. De ellos, 13.533 compuestos con actividad antimalárica, fueron confirmados, con un ratio de confirmación alrededor del 70%, aquellos que alcanzaron una inhibición mayor o igual al 80% en al menos dos de los tres ensayos fueron seleccionados. Este set de compuestos ha sido recientemente ampliado por otras 2500 nuevas estructuras para aumentar la diversidad química y mejorar las propiedades físico-químicas, partiendo, entonces, de un total de 15114 compuestos.

Todas las estructuras químicas y datos asociados se han publicado y están disponibles para la comunidad científica en un intento de incentivar la investigación en este campo [1].

Históricamente, los compuestos que son considerados positivos en los ensayos que evalúan la potencial genotoxicidad de una nueva molécula son eliminados del proceso de selección de candidatos, pero cuando ya se han realizado numerosos ensayos *in vivo*, de eficacia, farmacocinética y se han utilizado numerosos recursos (Fig. 1).

El objetivo de este trabajo fue conseguir un sistema de priorización de compuestos que permitiera seleccionar aquellas estructuras con menor riesgo de genotoxicidad. Una aproximación *in silico* fue la que se seleccionó para predecir potencial genotoxicidad en fases iniciales del desarrollo (H2L) antes de que los compuestos requieran un mayor uso de recursos para completar sus perfiles, evitar un innecesario uso de animales y reducir los ciclos de tiempo.

* e-mail: Pablo.c.castaneda@gsk.com

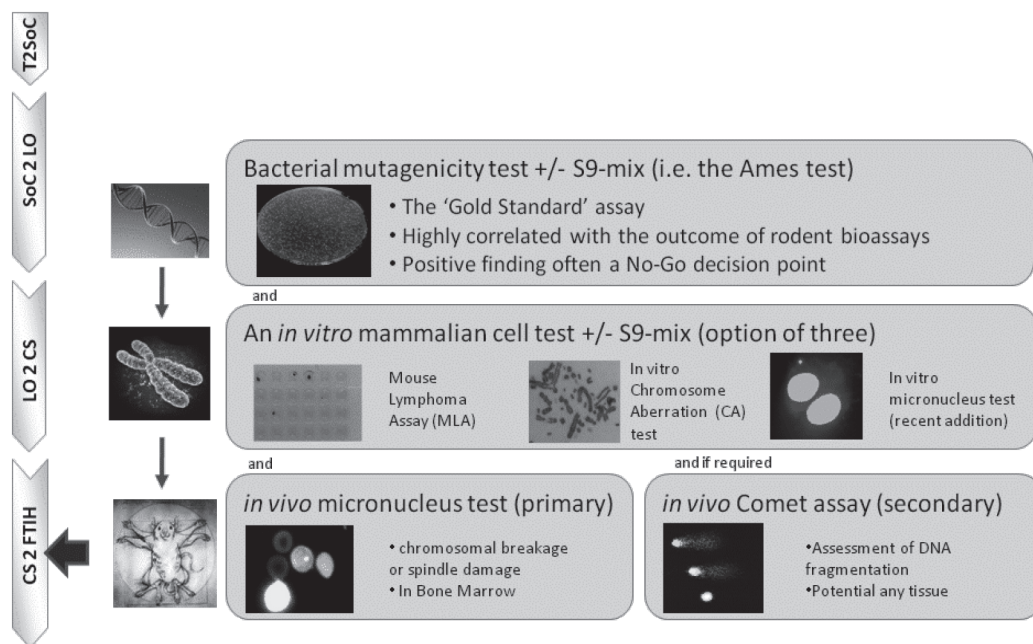


Figura 1. La progresión de candidatos a través de las alertas de genotoxicidad está fijada por los requerimientos regulatorios (ICH S2(R1)). La caracterización del riesgo carcinogénico y genotóxico está basada en una batería de pruebas ya que un test único no es capaz de detectar todos los posibles mecanismos de genotoxicidad.

Material y métodos

Compuestos

Todos los compuestos provienen de la colección particular de GSK que fueron positivos en el screening contra malaria.

Tras el ensayo fenotípico en célula entera para identificar aquellos compuestos con actividad antimalárica, se aplicaron diferentes filtros asociados a propiedades fisicoquímicas. Solo aquellos compuestos que cumplían con todos los criterios establecidos fueron seleccionados: 379 compuestos. Las moléculas seleccionadas, se agruparon en familias químicas utilizando el índice de Tanimoto obteniendo 118 clusters y seleccionamos dos o tres compuestos de cada cluster. (Fig. 3)

Test de Ames

El test de Ames se realizó de acuerdo a la guía ICH S2 [2] con ligeras modificaciones: sólo se utilizaron 3 cepas de *S. typhimurium* TA1537, TA98 y TA100 [3]. Los compuestos se ensayaron en presencia y ausencia de fracción S9 y a una concentración máxima de 1500 µg/mL. Para el test de Ames los compuestos se disolvieron en una solución madre de DMSO al 100% (v/v) a una concentración máxima de 10 mM, a partir de las cuales se obtuvieron las diluciones siguientes.

Herramientas computacionales

La predicción *in silico* consiste en establecer, mediante técnicas computacionales, la correlación de determinadas características biológicas con la estructura de nuevas entidades químicas. En el caso particular que nos compete, se busca la correlación entre el resultado del test de Ames, como principal marcador de mutagenicidad, y determinadas propiedades fisicoquímicas y características estructurales de las moléculas de interés.

La evaluación de la relación estructura-actividad (SAR) del potencial genotóxico incluye una serie de predicciones hechas a través de lo que

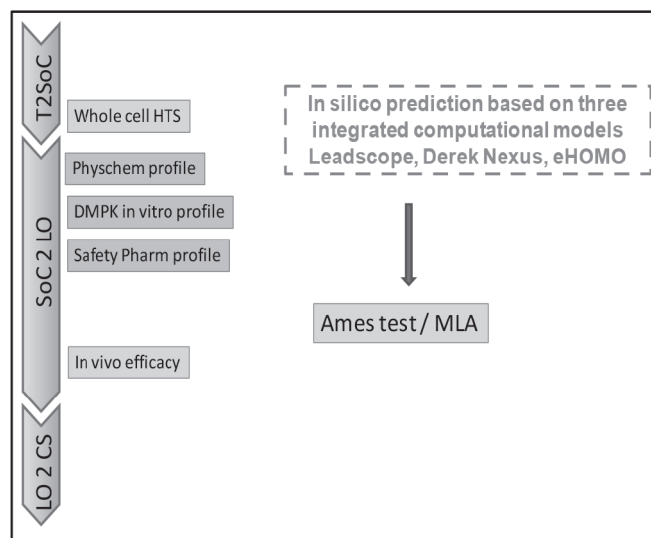


Figura 2. Nueva estrategia propuesta para la rápida progresión de compuestos. En este estudio se utilizó la selección de antimaláricos (TCAMS) para validar la reciente estrategia para mejorar la calidad de los candidatos que se ha puesto en marcha recientemente en GSK, e interrumpir el desarrollo de compuestos con serias debilidades antes de considerarlos posibles candidatos.

se conocen como sistemas expertos que son capaces de detectar alertas estructurales (toxicóforo) y modelos de predicción basados en la propia experiencia y de la base de datos de partida, entre los que se pueden incluir los de la compañía para su enriquecimiento.

Las herramientas utilizadas han sido:

1.- Derek Nexus v4.0.5 (Derek KB 2014.1.0) : es un potente sistema experto basado en el conocimiento que permite predecir la toxicidad de una nueva molécula de acuerdo a su estructura

PROPOSAL OF THE IDEAL PATH FOR SELECTING COMPOUNDS

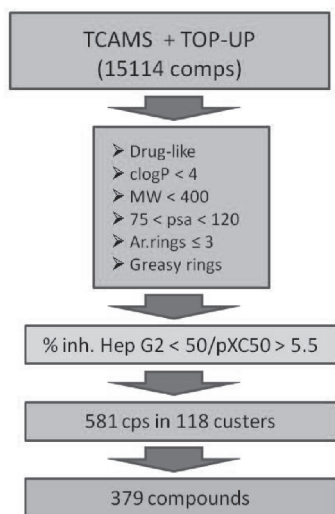


Figura 3. Criterios de calidad para la priorización de compuestos

(<http://www.lhasalimited.org/products/derek-nexus.htm>). Además Derek Nexus es una herramienta especificada en la guía ICH M7, guía para la detección de impurezas genotóxicas [4].

2.- Leadscope v1.8 (Esta versión incluye la predicción en cepas de *Salmonella* y *E.Coli*): Sistema estadístico que permite encontrar, entre posibles degradantes o metabolitos de la estructura a evaluar, aquellos que son genotóxicos (<http://www.leadscope.com/>). Esta herramienta también aparece especificada en la guía ICH M7

3.- eHOMO: es un descriptor de mecánica cuántica que mediante la medición de la energía del orbital molecular con mayor ocupación, la correlaciona con la reactividad de una molécula hacia la oxidación. Se ha demostrado que existe una correlación significativa entre el riesgo de obtener un positivo en el test de Ames y el valor de eHOMO, especialmente en aquellos compuestos que requieren activación metabólica para convertirse en genotóxicos. De acuerdo a nuestros estándares internos, los compuestos se clasifican como posiblemente no genotóxicos (baja energía HOMO) o potencialmente genotóxicos (alta energía HOMO).

Diseño experimental

De los compuestos seleccionados (118 clusters, 379 compuestos), se escogieron aquellos que cubrieran un amplio abanico de diversidad química y se analizaron con las tres herramientas *in silico* descritas anteriormente, Derek, Leadscope y eHOMO. Los compuestos se ordenaron de acuerdo a la siguiente clasificación:

1. Predicción Negativa en todas las herramientas usadas (n=17)
2. Positivos solo en Leadscope (n=2)
3. Positivos en eHOMO - SAR negativo. Se considera una alerta compuesto dependiente el resto de derivados tiene una predicción negativa (n=5)
4. Positivos en eHOMO - SAR positivo, los derivados de la misma serie también son positivos. (n=5)
5. Predicción *in silico* del test de Ames Positivo en los tres modelos. (n=5)

Se eligieron al menos dos compuestos disponibles en estado de sólido dentro de la colección interna de la compañía y que entrasen dentro de cada una de las categorías anteriores para ser ensayados

experimentalmente en una versión reducida del test de Ames. En total se seleccionaron 34 compuestos.

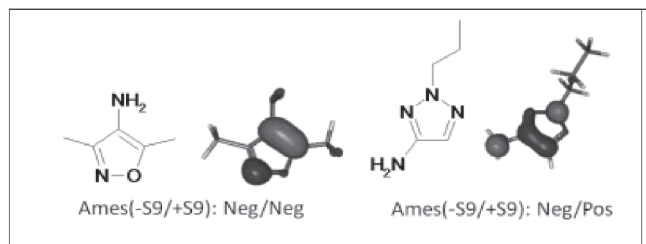


Figura 4. Ejemplo de distribución de la energía por el modelo eHOMO, dos moléculas muy parecidas, pueden tener una distribución de la energía muy diferente.

Resultados

De los 34 compuestos solo 20 compuestos pudieron finalmente ser analizados en el test de Ames reducido. En la tabla 1 se muestra el resultado del test de Ames junto con las tres predicciones de las herramientas *in silico*.

Tabla 1. Comparación de los resultados en el test de Ames con las predicciones *in silico*.

Compuesto	Test de Ames	Leadscope	eHOMO	Derek Nexus
1	Negativo	Negativo	Baja Energía	No alerta
2	Citotóxico	Negativo	Alta Energía	No alerta
3	Citotóxico	Negativo	Alta Energía	No alerta
4	Negativo	Not in domain	Baja Energía	No alerta
5	Citotóxico	Not in domain	Alta Energía	No alerta
6	Citotóxico	Positivo	Alta Energía	Quinolina
7	Positivo	Positivo	Alta Energía	No alerta
8	Negativo	Negativo	Baja Energía	No alerta
9	Negativo	Negativo	Baja Energía	No alerta
10	Negativo	Negativo	Baja Energía	No alerta
11	Negativo	Negativo	Baja Energía	No alerta
12	Negativo	Positivo	Baja Energía	No alerta
13	Negativo	Positivo	Baja Energía	No alerta
14	Negativo	Positivo	Alta Energía	No alerta
15	Negativo	Negativo	Alta Energía	No alerta
16	Negativo	Negativo	Baja Energía	No alerta
17	Negativo	Negativo	Alta Energía	No alerta
18	Negativo	Negativo	Alta Energía	No alerta
19	Negativo	Negativo	Baja Energía	No alerta
20	Negativo	Negativo	Baja Energía	No alerta
21	Negativo	Negativo	Baja Energía	No alerta
22	Negativo	Not in domain	Baja Energía	No alerta
23	Positivo	Positivo	Alta Energía	Oxima
24	Positivo	Positivo	Alta Energía	Nitro aromático

Discusión

Dentro del subset de moléculas probadas en el mini-Ames podemos ver que la aplicación de las tres herramientas *in silico* predice correctamente con éxito un 75%. Este sistema nos da una alta sensibilidad, con solo una predicción incorrecta de un falso positivo que resultó negativo experimentalmente. La tabla 2 resume los porcentajes de cada una de las predicciones: el sistema múltiple, dio

una gran sensibilidad, perdiendo sólo un compuesto que fue negativo en el test de Ames y había sido predicho como positivo.

Tabla 2. Porcentajes de correlación entre los valores experimentales y los predichos

Verdadero Positivo	Falso Positivo	Verdadero Negativo	Falso Negativo
75%	25%	100%	0%
(3/4)	(1/4)	(16/16)	(0/16)

Conclusiones

Actualmente como parte del compromiso de GSK en la reducción del fracaso en fases posteriores a la selección de candidato, se ha implementado en las más tempranas fases de desarrollo (H2L, Lead Op) una serie de filtros en cascada para eludir los problemas de genotoxicidad que son los que pueden obstaculizar, en mayor manera, el proceso de desarrollo.

Basándonos en estos datos se puede concluir que al menos con la predicción de dos positivos, de las tres herramientas utilizadas, se traduce en una alta probabilidad de ser positivo en el test de Ames.

Estos datos apoyan la estrategia general que recomienda el uso de herramientas *in silico* para seleccionar compuestos y series químicas y focalizar el proceso de *lead optimization* en las moléculas más “limpias” desde el punto de vista toxicológico. La naturaleza de la evaluación *in silico* permite integrarla desde las más tempranas fases de desarrollo, y a todo lo largo del mismo, en el proceso de toma de decisiones llegando incluso a ser de utilidad en el diseño de las nuevas moléculas.

La aplicación de estas herramientas, ha permitido al DDW progresar hasta 3 moléculas este último año hacia Preclínica, así como mantener un poblado portfolio en la fase exploratoria.

Como consecuencia de este trabajo, esta estrategia está actualmente siguiéndose también en los proyectos para tuberculosis en los que el DDW también está involucrado para crear un set de hasta 500 moléculas con actividad antituberculosa con mínimo riesgo de genotoxicidad.

Agradecimientos

Se agradece al departamento de Genetic Toxicology and Computational Chemistry de GSK R6D, y al departamento de Química del DDW (Malaria DPU) por la aplicación de los filtros físico-químicos y selección de compuestos.

Bibliografía

1. Gamo FJ, Sanz LM, Vidal J, de Cozar C, Alvarez E, Lavandera JL, Vanderwall DE, Green DV, Kumar V, Hasan S, Brown JR, Peishoff CE, Cardon LR, Garcia-Bustos JF (2010) Thousands of chemical starting points for antimalarial lead identification. *Nature* 465:305-310.
2. ICH (2011) ICH S2(R1) Guidance on Genotoxicity and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Adopted EMA/CHMP/ICH/126642/2008. December 2011.
3. Jacobson-Kram D, Contrera JF (2007) Genetic Toxicity Assessment: Employing the Best Science for Human Safety Evaluation Part I: Early Screening for Potential Human Mutagens. *Tox Sci* 96:16-20.
4. ICH (2014) ICH M7 Guideline on Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk reached. Step 4 version. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use.