

Diseño y desarrollo de una novedosa estrategia profármaco basada en la enzima DPPIV/CD26

María José Camarasa, Sonia de Castro y Sonsoles Velázquez

Resumen: En el presente artículo se describe una novedosa aproximación profármaco, consistente en el desarrollo de conjugados péptido-fármaco, de compuestos portadores de grupos amino de distinta naturaleza o de grupos hidroxilo también de distinta naturaleza que son específicamente hidrolizados por la enzima endógena DPPIV/CD26. La aproximación es viable, versátil y útil no sólo para mejorar la solubilidad en agua tanto de moléculas lipófilas, como polares, sino también para producir aumentos muy notables de la biodisponibilidad oral *in vivo*.

Palabras clave: Profármacos, enzima DPPIV/CD26, conjugados péptido-fármaco, profármacos de compuestos con grupos amino, profármacos de compuestos con grupos hidroxilo.

Abstract: In the present paper a novel prodrug approach is described. The approach consists on the development of peptide-drug conjugates of compounds bearing amine groups of different nature or hydroxy-groups, also of different nature, which are specifically cleaved by DPPIV/CD26. This prodrug approach is viable, versatile and useful not only to ameliorate the water solubility of lipophilic or polar molecules, but also to highly increase the *in vivo* oral bioavailability of therapeutic agents.

Keywords: Prodrugs, DPPIV/CD26 enzyme, peptide-drug conjugates, amine-containing prodrugs, hydroxy-containing prodrugs.

INTRODUCCIÓN. ¿QUÉ ES UN PROFÁRMACO? Y ¿POR QUÉ DISEÑAR UN PROFÁRMACO?

Un profármaco es un precursor *inactivo* de un fármaco, que una vez administrado requiere una biotransformación metabólica (química o enzimática) para liberar el fármaco (agente biológicamente activo).^[1,2] El concepto profármaco fue introducido por Albert en el año 1958.^[3]

Los avances experimentados en las nuevas tecnologías tales como la química combinatoria, la química computacional así como los amplios programas y plataformas de cribado de alta eficacia han dado lugar al rápido descubrimiento de un número cada vez más numeroso de compuestos muy potentes *in vitro* (cabezas de serie) pero que desafortunadamente no presentan un buen perfil farmacológico, *in vivo*, lo que impide su progresión en el desarrollo tanto preclínico como clínico hacia su comercialización.^[4,5] Además, muchos de estos cabezas de serie presentan elementos estructurales tan restringidos que no es posible preparar análogos incorporando a la molécula ninguna propiedad "drug-like" sin comprometer su

afinidad por el receptor/diana. Es en este punto donde el diseño de profármacos cobra una gran importancia, ya que permite modificar propiedades del candidato clínico de forma temporal. El desarrollo de profármacos está siendo muy eficaz para resolver muchos de los problemas de dichos compuestos mejorando sus propiedades fisicoquímicas y farmacológicas, tales como: la solubilidad (se estima que aproximadamente un 40% de los cabezas de serie candidatos a fármaco obtenidos mediante las técnicas antes mencionadas presentan una baja solubilidad en agua), la estabilidad química y metabólica (vida media), las malas propiedades organolépticas (mal sabor u olor) con la consiguiente baja aceptación por parte de los pacientes, los perfiles farmacocinéticos desfavorables como una biodisponibilidad oral deficiente (aumentando la absorción oral del fármaco y/o disminuyendo el metabolismo presistémico), la falta de permeabilidad a través de la barrera hematoencefálica, etc.^[6-8] Además, muchas de las propiedades desfavorables mencionadas están interrelacionadas, con lo que modificando una se pueden variar otras, lo que le confiere al proceso de diseño de un profármaco una mayor complejidad. Así, por ejemplo, el aumento de la solubilidad acuosa de una molécula puede facilitar su absorción oral, mientras que mejorar la estabilidad química puede permitir su transporte selectivo a un órgano o tejido, etc.^[5a,b]

Actualmente, entre un 8 y un 10% de los fármacos aprobados en todo el mundo son profármacos, y aproximadamente un 15% de los nuevos fármacos aprobados pertenecen a este grupo.^[4a] Los profármacos se utilizan en diversas áreas terapéuticas y tratamientos como anti-influenza (oseltamivir), antihipertensivos (enalapril), ulcera péptica (omeprazol), antitumorales (capecitabina), antivirales (valaciclovir), etc.^[6c]

Un paso clave en el diseño de profármacos es la incorporación de un mecanismo de activación que convierta el profármaco en sus especies activas de manera eficiente y/o controlada hasta alcanzar una aplicación médica determi-



M. J. Camarasa



S. De Castro



S. Velázquez

Instituto de Química Médica (CSIC)
Juan de la Cierva 3
28006 Madrid
C-e: mj.camarasa@iqm.csic.es

Recibido: 01/07/2014. Aceptado: 26/08/2014.

nada. Dicha activación puede ser promovida por enzimas hidrolíticas o por procesos de oxido-reducción, aunque la activación de algunos profármacos puede transcurrir asimismo a través de procesos químicos no enzimáticos. Existen, no obstante, muy pocos ejemplos de profármacos activados exclusivamente mediante procesos no enzimáticos, posiblemente debido a la dificultad que supone descartar completamente una participación de alguna enzima en la activación de los mismos.^[4b,9]

En resumen, el diseño racional de profármacos de moléculas activas, por tanto, tiene como fin el superar las barreras farmacocinéticas, farmacodinámicas o psicológicas, que limitan su desarrollo como fármacos comercializables (Figura 1). Cabe destacar que la mayoría de los profármacos comercializados, o que se encuentran en fase de desarrollo clínico, han sido diseñados con dos objetivos principales: mejorar su biodisponibilidad y conseguir su acción en lugares específicos.^[4b,6c]

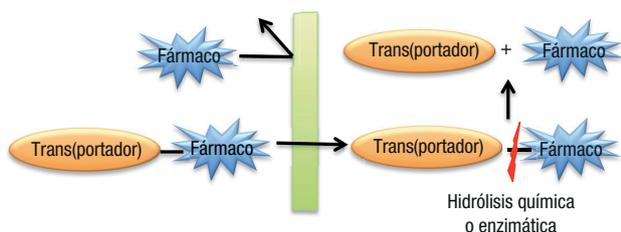


Figura 1. Ilustración del concepto de profármaco para superar o minimizar las barreras en el desarrollo de un fármaco

Un tipo de profármaco, ampliamente estudiado, es aquel donde el agente activo (el fármaco) se une a un transportador mediante un enlace covalente lábil (*carrier-linked prodrugs*), cuya activación en el organismo puede ser por vía química o por vía enzimática (Figura 2).^[2,4b,5a,10,11] Dicho enlace debe ser lo suficientemente lábil, y al mismo tiempo lo suficientemente estable, para permitir la liberación efectiva del fármaco *in vivo*. El transportador no debe ser tóxico una vez liberado el fármaco. Dentro de este tipo de profármacos, aquellos que utilizan como transportadores aminoácidos y péptidos unidos al fármaco, a través de un enlace covalente de tipo éster fácilmente hidrolizable por esterasas han sido bastante estudiados para mejorar la solubilidad y biodisponibilidad oral de fármacos. Como ejemplo de este grupo podemos citar los profármacos utilizados en clínica valaciclovir^[12] y valganciclovir^[13] (Figura 1), ésteres de l-valina de los agentes antiherpéticos aciclovir y penciclovir, respectivamente, con los que se ha conseguido un aumento de 3 a 5 veces en la biodisponibilidad oral del fármaco.^[14] Este aumento se explica por la afinidad de estos profármacos por el transportador peptídico hPEPT-1, localizado en la membrana del intestino delgado, debido a la presencia del residuo de Val.^[15] Sin embargo, estos profármacos poseen una baja estabilidad química debido a la labilidad del enlace éster.^[14]

Por otra parte, los profármacos que emplean aminoácidos o péptidos unidos a fármacos mediante enlaces amida han sido mucho menos utilizados debido a la gran

estabilidad metabólica del enlace amida. A menos que exista una enzima específica, las velocidades de hidrólisis de estos profármacos suelen ser bajas y no tiene lugar la liberación *in vivo* de niveles suficientes del fármaco.^[1,2,16]

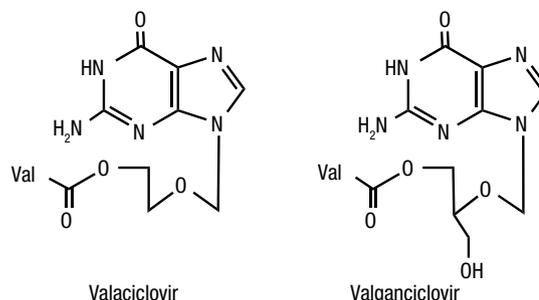


Figura 2. Profármacos de Aciclovir (Valaciclovir) y Ganciclovir (Valganciclovir)

A pesar de que se han descrito un gran número de estrategias profármaco, aún existe la necesidad de nuevas y mejores aproximaciones. En el presente artículo se describe una nueva aproximación profármaco, enteramente desarrollada por nuestro grupo de trabajo, consistente en la unión de secuencias oligopeptídicas a fármacos, que presentan perfiles farmacocinéticos y/o farmacodinámicos desfavorables, a través de enlaces amida, más estables que los enlaces de tipo éster, que son reconocidas específicamente por la enzima endógena dipeptidil-peptidasa IV (DPPiV/CD26) liberando así la forma activa del fármaco. A continuación, se recogen algunos aspectos generales de esta enzima que nos han ayudado en el diseño racional de los nuevos profármacos.

LA ENZIMA DIPEPTIDIL-PEPTIDASA TIPO IV (DPPiV/CD26)

La glicoproteína CD26 de la superficie de los linfocitos T pertenece a una clase única de peptidasas asociadas a membrana y es idéntica a la dipeptidil-peptidasa tipo IV (DPPiV, EC 3.4.14.5).^[18,19] La enzima DPPiV/CD26 es miembro de la familia de las prolil-oligopeptidasas, un grupo de serín-proteasas atípicas que hidrolizan secuencias dipeptídicas de péptidos naturales que contienen una prolina (Pro), o en menor medida una alanina (Ala), en la penúltima posición de su extremo N-terminal.^[20b]

DPPiV/CD26 se encuentra ampliamente distribuida en el organismo. En su forma asociada a membrana, se expresa principalmente en células epiteliales y endoteliales, localizándose, en concentraciones altas, principalmente en el riñón y en el hígado, así como en células leucocíticas del sistema inmunitario como los ya mencionados linfocitos T o los macrófagos, entre otros. Además, DPPiV/CD26 existe en forma soluble (sCD26),^[19a,20a] localizándose niveles mas bajos de sCD26 en fluidos seminales, y niveles de moderados a bajos en el plasma y en el fluido cerebroespinal, respectivamente.^[18-20b]

La enzima DPPiV/CD26 muestra una especificidad de sustrato única y relativamente restringida (Figura 3).^[18,21,22] Así, en cuanto a la penúltima posición del extremo N-terminal del oligopéptido, como ya se ha mencionado,

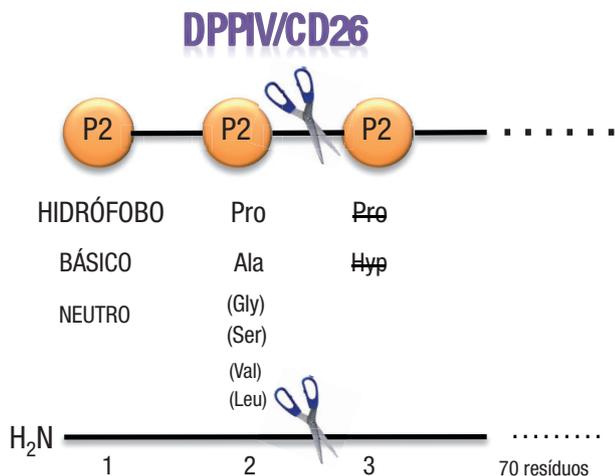


Figura 3. Especificidad de sustrato de la enzima DPPIV/CD26

la enzima reconoce específicamente los aminoácidos Pro o en menor medida Ala. Sin embargo, péptidos que poseen residuos de Pro o Hyp en la antepenúltima posición (P1') no son sustratos de DPPIV/CD26, comportándose como inhibidores de la enzima. En cuanto a la última posición del extremo *N*-terminal, la enzima reconoce una mayor variedad de aminoácidos. Así, sustratos con residuos hidrófobos (ej. Val, Ile, Ala, Phe) o básicos (ej. Lys, Arg, His) son hidrolizados mejor que los sustratos con residuos neutros o polares neutros (ej. Gly, Ser, Gln) o ácidos (ej. Asp) en dicha posición. En todos los casos, los aminoácidos de esta posición deben presentar el grupo amino terminal libre para ser reconocidos por la enzima.

UNA NOVEDOSA ESTRATEGIA PROFÁRMACO

En el año 2005 se demostró por primera vez que la enzima DPPIV/CD26 jugaba un papel regulador e indispensable en la actividad antirretroviral de una molécula sintética pequeña Gly-Pro-Gly-NH₂ (profármaco inactivo), liberando Gly-NH₂ (que es el fármaco activo) (Figura 4).^[23] En este estudio se demuestra que una molécula pequeña (Gly-Pro-Gly-NH₂) puede ser transformada en un fármaco antirretroviral (Gly-NH₂) por la acción específica de esta enzima. Este estudio fue la primera demostración de que CD26, abundantemente expresada en linfocitos-T, actúa como activador obligatorio y altamente específico de un profármaco antirretroviral sintético (Gly-Pro-Gly-NH₂) que es inactivo como tal. Estos resultados nos sirvieron como base para explorar el empleo de la actividad dipeptidil-

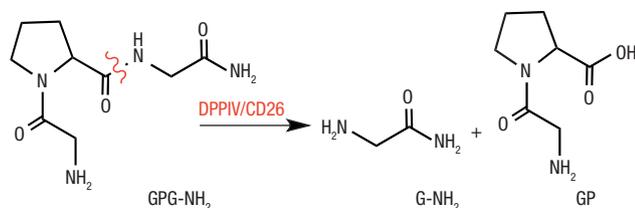


Figura 4. Activación de GPG-NH₂ a G-NH₂ por DPPIV/CD26

peptidasa de DPP-IV/CD26 como herramienta para el diseño racional de una nueva estrategia profármaco.

En nuestros laboratorios diseñamos y desarrollamos una nueva aproximación profármaco consistente en la unión de secuencias oligopeptídicas a fármacos, a través de enlaces amida, que son reconocidas específicamente por la enzima endógena dipeptidil-peptidasa IV (DPPIV/CD26), liberando así la forma activa del fármaco.^[24-26] Para ello, se diseñaron conjugados de fórmula general I de moléculas bioactivas con péptidos de secuencia (Xaa-Pro)_n desprotegidos en el extremo *N*-terminal (Figura 5).



Figura 5. Profármacos basados en la enzima DPPIV/CD26

Esta novedosa aproximación profármaco presenta la ventaja frente a otras aproximaciones, en que el péptido se une al fármaco mediante un enlace amida (más estable que el enlace éster, sensible a esterasas e incluso inestable a pH fisiológico en algunos casos), que es hidrolizado específicamente por DPPIV/CD26. Además la presencia de un residuo de Pro en la penúltima posición del extremo *N*-terminal protege a los compuestos frente a una degradación proteolítica no específica (exopeptidasas no especializadas no reconocen dichas secuencias), aspecto importante en la estabilidad del profármaco. Por último, el hecho de utilizar como transportadores oligopéptidos presenta la ventaja de que, tras la regeneración del fármaco patrón, se libera un producto natural (un di- u oligopéptido) que no es tóxico para el organismo.

PRUEBA DE CONCEPTO Y APLICACIÓN DE LA ESTRATEGIA A FÁRMACOS PORTADORES DE GRUPOS AMINO

Como prueba de concepto (*proof-of-concept*) de esta nueva estrategia profármaco elegimos la familia de derivados TSAO (compuestos muy lipófilos) que inhibe potente y selectivamente la replicación del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1).^[27-29] Este retrovirus HIV-1 infecta principalmente a los linfocitos T, células que expresan abundantemente DPP-IV/CD26 en su membrana celular. Además, el hecho de que los derivados TSAO sean moléculas extremadamente lipófilas, y por tanto, muy insolubles en agua, nos permitió estudiar si esta nueva aproximación profármaco podría dar lugar a moléculas TSAO que presentaran una mejor solubilidad en agua. En concreto, elegimos el *N*-3-aminopropil derivado portador de un grupo amino primario, donde anclar las secuencias peptídicas, denominado NAP-TSAO.^[29] (Figura 6).

En primer lugar se preparó el conjugado modelo [Val-Pro]-[NAP-TSAO-T] portador de la secuencia dipeptídica Val-Pro, fácilmente hidrolizada por la enzima en péptidos naturales.^[24] Los ensayos biológicos sobre este conjugado, tanto en presencia de la enzima purificada DPP-IV/CD26

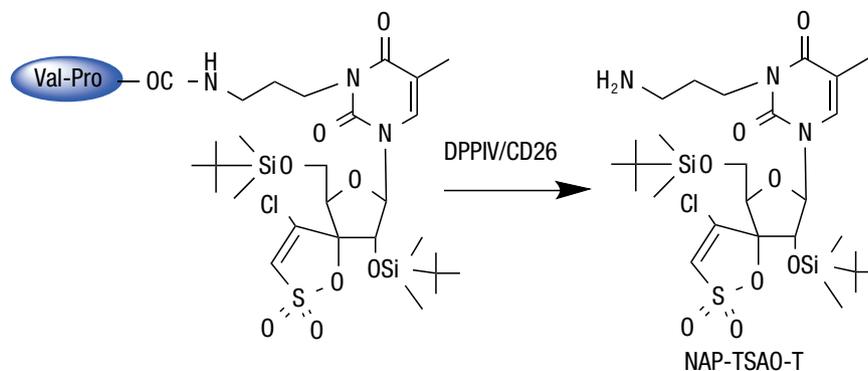


Figura 6. Activación del profármaco modelo [Val-Pro]-[NAP-TSAOT] a NAP-TSAO-T por la enzima DPP-IV/CD26

como en otros medios biológicos tales como suero humano, suero bovino o células linfocíticas T, mostraron que la enzima lo reconoce específicamente como sustrato, liberando de manera eficaz el compuesto activo NAP-TSAO-T.^[24,29] Los estudios de estabilidad enzimática del profármaco en presencia de un inhibidor de DPP-IV/CD26 (Vildagliptina) mostraron que la liberación del fármaco a partir del conjugado se debe, exclusivamente, a la acción de DPP-IV/CD26. Por tanto, se demuestra, por primera vez, que la enzima reconoce sustratos “artificiales” diferentes a los péptidos naturales, hidrolizando secuencias peptídicas unidas a moléculas orgánicas no peptídicas.

Se prepararon una gran variedad de conjugados de dipéptidos y tetrapéptidos, desprotegidos en su extremo N-terminal (Figura 7), variando la naturaleza y la longitud de la secuencia peptídica del profármaco con el fin de estudiar su influencia tanto en la velocidad de hidrólisis, y por tanto en su vida media, así como en sus propiedades fisicoquímicas. En primer lugar, se prepararon conjugados (serie 1, Figura 7) en los que se mantenía el residuo de Pro como penúltimo aminoácido (para ser reconocido por la enzima) y se introdujeron en la última posición (Xaa) aminoácidos de distinta naturaleza: hidrófobos (Ala, Phe y Tyr), básicos (Lys), neutros (Gly y Asn) y ácidos (Glu y Asp). Todos los conjugados fueron hidrolizados por la enzima liberando NAP-TSAO-T, observándose que la velocidad de hidrólisis variaba con la secuencia peptídica. La tasa de conversión respecto a

la secuencia modelo Val-Pro es mayor para aminoácidos básicos, seguida de residuos hidrófobos y neutros, mientras que aminoácidos ácidos dan lugar a hidrólisis mucho más lentas.^[24,25]

Por otro lado, se prepararon conjugados (serie 2, Figura 7) en los que se sustituyó la Pro de la penúltima posición por otros aminoácidos. Al igual que en los péptidos naturales los conjugados portadores en dicha posición de una Pro o una Ala fueron eficientemente reconocidos por la enzima. Asimismo fue activado por la enzima el profármaco portador de una hidroxiprolina en esa posición. Los resultados de los estudios indican que, la naturaleza de los aminoácidos en el extremo N-terminal, así como la presencia de una prolina, una hidroxiprolina o una alanina en la penúltima posición de la secuencia peptídica del profármaco permite modular la vida media del mismo en el plasma.^[24,25]

Asimismo, la vida media puede modularse modificando tanto la naturaleza como la longitud de la secuencia peptídica. Los conjugados tetrapeptídicos (serie 3, Figura 7) liberaron eficientemente en dos etapas sucesivas el compuesto patrón (NAP-TSAO-T). La velocidad de conversión varía con la naturaleza de dicha secuencia peptídica, siendo el conjugado [ValProValPro]-[NAP-TSAO-T] el que se hidroliza más rápidamente (a las 4 h de incubación con CD26 se observa un 80 % de conversión a NAP-TSAO-T), no detectándose el conjugado intermedio [ValPro]-[NAP-TSAO-T] y el [LysProAspPro]-[NAP-TSAO-T] el que se libera más lentamente (a las 48 h se observa un 50% de conversión al compuesto patrón). En este segundo caso a los 15 min se detecta el intermedio [AspPro]-[NAP-TSAO-T].

Finalmente, la secuencia peptídica, y en particular la naturaleza del aminoácido terminal, permite modular también la lipofilia (cLogP entre 3.88 y -0.69) y aumentar la solubilidad acuosa de los profármacos con respecto a los fármacos correspondientes, lo que podría permitir una formulación más eficiente y optimizada.

En resumen, la naturaleza y la longitud de la secuencia peptídica empleada en los profármacos sintetizados [(Xaa-Yaa)_n]-[NAP-TSAO-T] permite modular tanto la velocidad de hidrólisis del profármaco, y por tanto su vida media, como mejorar las propiedades fisicoquímicas de los compuestos preparados, lo que permitiría modular la liberación del fármaco en función de las necesidades.

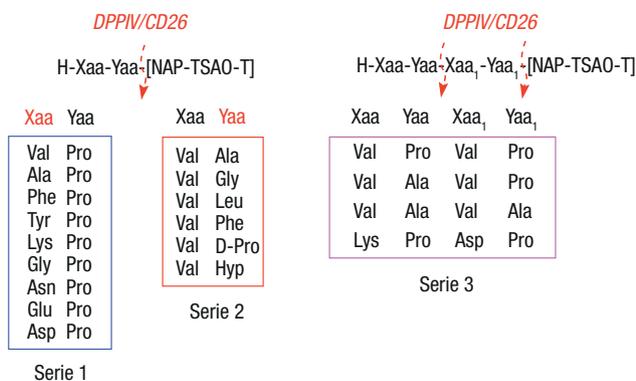


Figura 7. Profármacos dipeptídicos y tetrapeptídicos de NAP-TSAO-T activados por la enzima DPP-IV/CD26

EXTENSIÓN DE LA ESTRATEGIA A OTROS COMPUESTOS PORTADORES DE GRUPOS AMINO

Una vez demostrada la validez de la aproximación profármaco en los derivados TSAO, ésta se extendió a otros compuestos portadores de grupos amino de distinta naturaleza donde se ancló la secuencia peptídica modelo (Val-Pro). Se prepararon conjugados de compuestos con grupos amino primarios unidos a anillos aromáticos (6-aminoquinolina), a carbohidratos (doxorubicina) y a nucleósidos de pirimidinas (TSAO- m^3C , ara-C) o purina (ara-A) (Figura 8).^[26] Todos los profármacos liberaron eficientemente los fármacos respectivos, por acción de la enzima DPPIV/CD26, tanto en su forma purificada como soluble (presente en suero humano y suero bovino). Además, los profármacos de 6-aminoquinolina, de vidarabina y de aciclovir mostraron un aumento muy considerable de su solubilidad acuosa con respecto a sus fármacos correspondientes.

Hay que destacar, sin embargo, que cuando el grupo amino, en el que anclar la secuencia peptídica, está presente en un anillo de pirimidina o de purina, los conjugados dipeptídicos son químicamente inestables en disolución, liberando el fármaco por la formación de dicetopiperazinas (Figura 9).^[26] Sin embargo, los conjugados tetrapeptídicos [H-Xaa-Pro-Xaa₁-Pro]- [TSAO- m^3C , ara-C o ara-A] son mucho más estables en disolución y liberan eficientemente sus correspondientes fármacos por la acción de DPPIV/CD26.

Por tanto, nuestros estudios indican que esta aproximación profármaco es viable en compuestos con grupos amino primarios de distinta naturaleza (alifáticos, aromáticos, carbohidratos, etc.) y puede ser aplicada para modular el tiempo de vida media y la lipofilia, así como para mejorar la solubilidad de una gran variedad de fármacos. Los heterociclos de naturaleza púrica o pirimidínica pueden ser derivatizados con dipéptidos (inestables) o tetrapeptídicos (estables) comportándose estos últimos como sustratos eficientes de la actividad dipeptidil peptidasa de DPPIV/CD26. Estos resultados avalan el gran potencial de esta nueva aproximación profármaco.

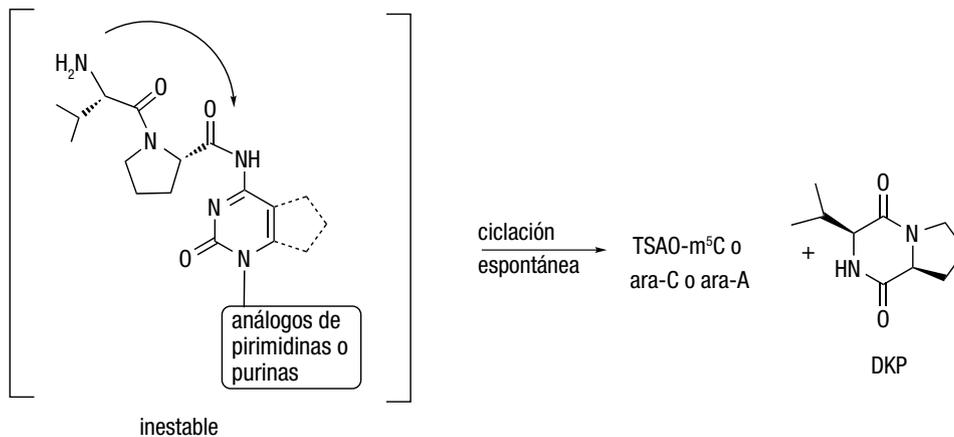


Figura 9. Inestabilidad de profármacos dipeptídicos de purinas y pirimidinas debido a la formación espontánea de dicetopiperazinas

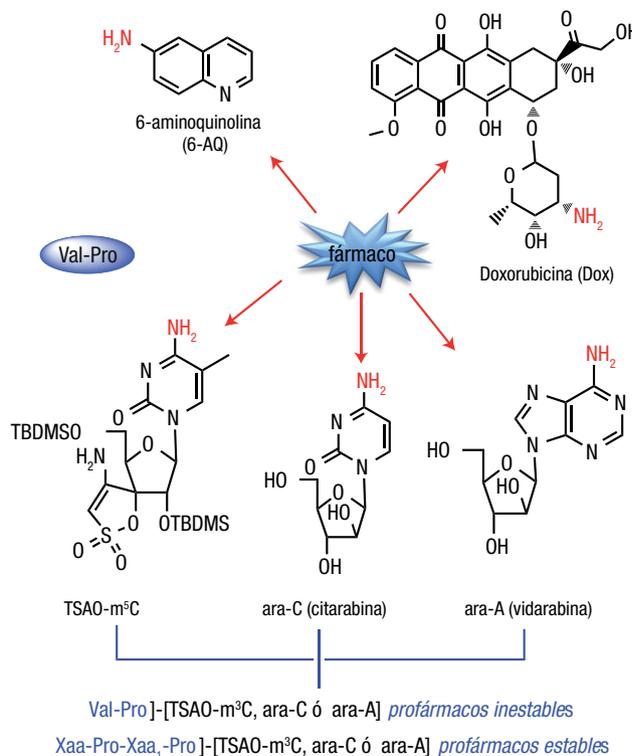


Figura 8. Profármacos activados por DPPIV/CD26 de compuestos portadores de grupos amino de distinta naturaleza

PROFÁRMACOS DE COMPUESTOS PORTADORES DE GRUPOS HIDROXILO

En base a los buenos resultados obtenidos con los profármacos de compuestos portadores de grupos amino de distinta naturaleza consideramos interesante profundizar en el potencial de nuestra estrategia profármaco y extender su estudio a fármacos portadores de grupos hidroxilo.^[30,31]

A la hora de aplicar nuestra estrategia profármaco a este tipo de compuestos hay que tener en cuenta que la se-

cuencia peptídica hidrolizable por la enzima no puede ser unida directamente al grupo hidroxilo del fármaco, ya que el enlace formado de tipo éster no sería reconocido por la enzima y, por tanto, el fármaco no sería liberado. Así, a diferencia de lo que ocurre en el caso de fármacos portadores de grupos amino, en los que la unión de la secuencia peptídica al fármaco se realiza directamente mediante un enlace amida, ahora la secuencia peptídica reconocida por DPPIV/CD26 debe ser anclada al grupo hidroxilo del fármaco a través de un espaciador adecuado. Dicho espaciador debe poseer naturaleza heterobifuncional, es decir, debe contener un grupo amino primario terminal al que anclar la secuencia peptídica hidrolizable por la enzima, y en su otro extremo un grupo carboxilo que permita la unión al hidroxilo del fármaco mediante un enlace covalente que pueda ser hidrolizado bien por vía química o bien por vía enzimática. El mecanismo mediante el cual se liberaría el fármaco a partir del conjugado propuesto constaría de dos etapas (Figura 10): (1) hidrólisis de la secuencia peptídica por acción de DPPIV/CD26 y (2) eliminación del espaciador por vía química o enzimática liberando finalmente el fármaco.

La viabilidad de la estrategia se estudió sobre compuestos portadores de grupos OH de distinta naturaleza y que presentaban propiedades farmacocinéticas poco favorables como fármacos (baja solubilidad, baja biodisponibilidad oral, penetración limitada a través de la barrera hematoencefálica, etc). Como modelo de compuestos se eligieron: el nucleósido anti-retroviral didanosina (ddI) y el antiherpético aciclovir como modelo de compuestos portadores de un OH primario; el paracetamol (analgésico, antipirético) como compuesto aromático portador de un OH; el propanolol (bloqueante β -adrenérgico) y la camptotecina (antitumoral) como fármacos portadores de OHs secundario y terciario, respectivamente (Figura 11).^[30,31] Como secuencia peptídica reconocida por DPPIV/CD26 se eligió Val-Pro, hidrolizada satisfactoriamente por la enzima en los conjugados portadores de grupos amino. Como espaciador (conector) heterobifuncional se eligió la valina, que permite, anclar la secuencia peptídica (Val-Pro) a través de su grupo amino, y a través de su grupo carboxilo la unión al grupo hidroxilo del fármaco mediante un enlace covalente de tipo éster susceptible de hidrólisis por esterasas.

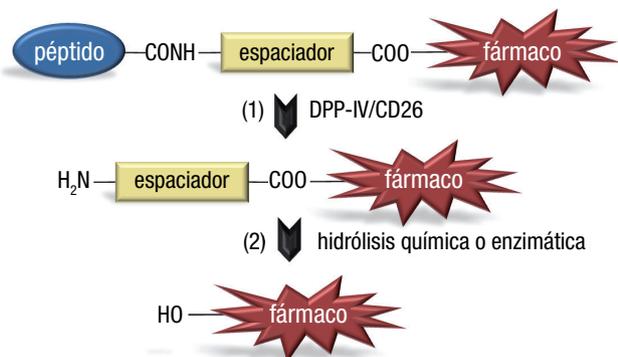


Figura 10. Mecanismo en dos etapas propuesto para la liberación del fármaco a partir del profármaco

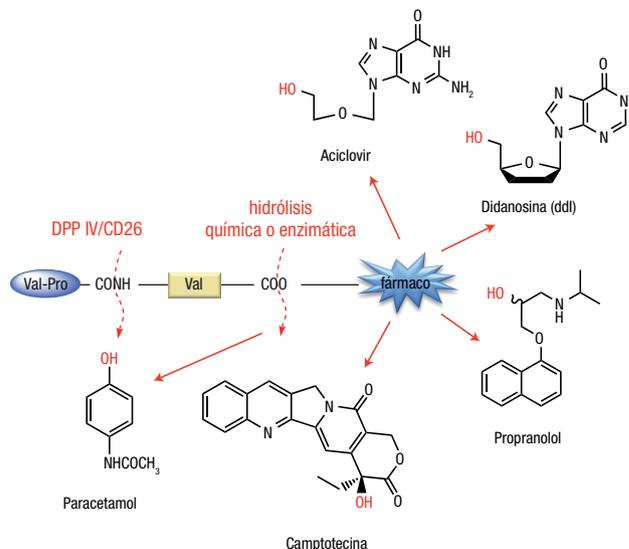


Figura 11. Profármacos activados por DPPIV/CD26 de compuestos portadores de grupos hidroxilo de distinta naturaleza

En general, y a excepción del profármaco de propranolol, todos los profármacos tripeptídicos sintetizados resultaron estables químicamente en PBS. Se observaron diferencias importantes en la estabilidad química del enlace éster, generado entre el espaciador valina y el grupo hidroxilo del fármaco, de los valil intermedios que dependen, no sólo de cada tipo de hidroxilo, sino de la estructura química de cada fármaco en particular, aumentando la estabilidad química en el orden: propranolol < paracetamol < didanosina < aciclovir. Independientemente de la naturaleza del grupo hidroxilo, DPPIV/CD26 hidrolizó eficazmente los profármacos liberando los fármacos respectivos. La velocidad de hidrólisis y la estabilidad de los conjugados tripeptídicos depende de la naturaleza de los OH a los que se ancla la secuencia. Así, los profármacos de compuestos con OH primarios (ddI, Aciclovir), o unidos a un anillo aromático (paracetamol) fueron los conjugados que liberaron más eficazmente los correspondientes fármacos. El conjugado sobre un OH terciario (camptotecina), fue liberado más lentamente. Todos los profármacos experimentaron aumentos en su solubilidad acuosa notables con respecto a sus fármacos correspondientes.

PROFÁRMACOS DEL ANTIVIRAL CF1743. UN ESPECTACULAR AUMENTO DE SOLUBILIDAD Y BIODISPONIBILIDAD ORAL

Finalmente destacar la aplicación de esta estrategia, con notable éxito, a una familia de análogos bicíclicos de nucleosidos de furanopirimidina (BCNAs) que muestran una gran potencia y una inusual selectividad como inhibidores del virus varicela zóster (VZV).^[32] El compuesto más potente es el que se ha identificado como Cf1743, muestra actividad en el rango nanomolar bajo y no es tóxico. Sin embargo, su elevada lipofilia limita su potencial clínico, debido a su biodisponibilidad oral muy baja (inferior al 10%) y a una solubilidad en agua muy baja.^[33,34]

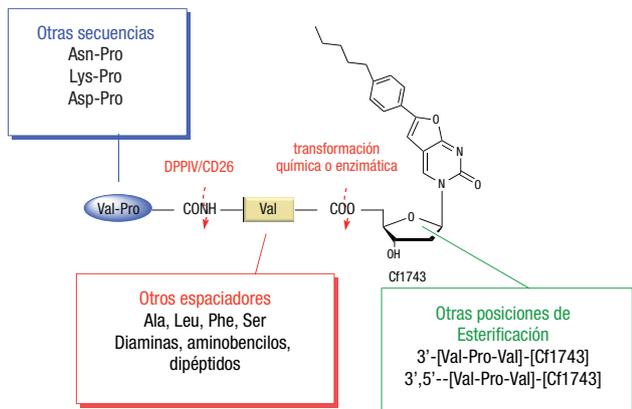


Figura 12. Profármacos de Cf1743

Con el fin de mejorar sus propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas, diseñamos y sintetizamos una amplia variedad de profármacos de Cf1743 (Figura 12), en los que se mantuvo la valina como espaciador heterobifuncional y se estudió tanto el lugar de anclaje (5'-OH, 3'-OH y 3',5'-OH) y el número de péptidos transportadores (1 ó 2), como la naturaleza del residuo *N*-terminal de la secuencia dipeptídica reconocida por DPPIV/CD26.

Se estudiaron asimismo, profármacos de Cf1743 en los que se modificó también la naturaleza del espaciador, empleando otros aminoácidos (Val, Ala, Phe, Leu). Estas modificaciones han permitido modular el tiempo de vida media de los correspondientes conjugados en los ensayos de estabilidad realizados, así como un aumento en la solubilidad de los mismos.^[35] La naturaleza del aminoácido empleado como espaciador influye enormemente en la estabilidad química del enlace éster formado entre el tripeptido y el grupo hidroxilo del nucleósido, siendo el enlace más estable cuando el espaciador es una Val, seguido de Ala y Leu, y el más inestable una Phe.^[35] Asimismo, se emplearon espaciadores auto-hidrolizables (*self-cleaving*): dipéptidos, diaminas, aminobencilos (Figura 13),^[36] que

podrían liberar el fármaco mediante un mecanismo no enzimático intramolecular de ciclación-eliminación. Así estos profármacos liberarían el fármaco patrón en dos etapas, una primera de hidrólisis enzimática, catalizada por DPPIV/CD26, seguida de una ciclación-eliminación espontánea eliminando el conector "*self cleaving*" mediante la formación de ureas [diaminas *a*] dicetopiperacinas [dipéptidos *b*] o por un mecanismo de cascada electrónica (eliminación 1,6) [aminobencilos *c*].^[37-39]

Respecto a estos espaciadores "*self-cleaving*", el empleo de diaminas alquílicas unidas al grupo hidroxilo de Cf1743 a través de un enlace carbamato, condujo a profármacos que, aunque fueron buenos sustratos de DPP-IV/CD26, dieron lugar a profármacos intermedios que resultaron demasiado estables y no regeneraron el compuesto patrón mediante un mecanismo de ciclación-eliminación. El empleo de espaciadores de tipo aminobencílico, unidos al grupo hidroxilo del nucleósido, a través de un enlace carbonato, dió lugar a conjugados de Cf1743 muy inestables químicamente y que no pudieron ser aislados. Sin embargo, el empleo de espaciadores dipeptídicos condujo a buenos resultados liberando el fármaco patrón eficientemente. De ellos el profármaco tetrapeptídico [Val-Pro-Val-Pro]-[Cf1743] resultó ser estable químicamente y liberó Cf1743 de manera rápida y efectiva tanto en ensayos enzimáticos directos como en suero humano y suero bovino. Sin embargo se observó una liberación mucho más lenta con el profármaco [ValProValVal]-[Cf1743].

Todos los conjugados preparados mostraron un espectacular aumento de la solubilidad en agua respecto al fármaco patrón (Figura 14), de naturaleza altamente lipófila, siendo especialmente notables los profármacos 3',5'-[Val-Pro-Val]-[Cf1743] y 5'-[Lys-Pro-Val]-[Cf1743], que fueron 4.000 y 3.000 veces más solubles que Cf1743, respectivamente. Esta gran mejora de la solubilidad en agua podría deberse tanto a la introducción de grupos polares e ionizables en los profármacos, como a la disminución del empacamiento cristalino de los conjugados

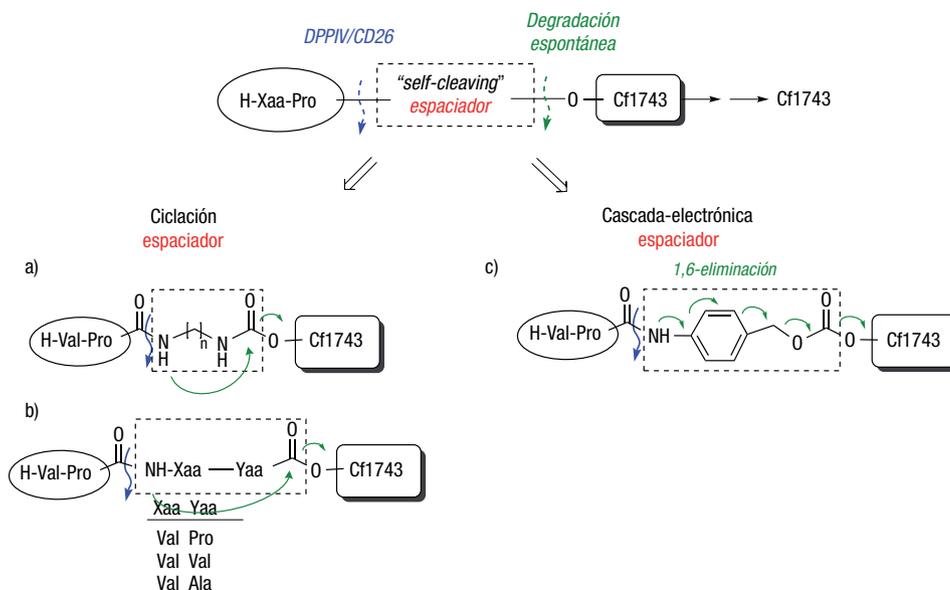


Figura 13. Profármacos de Cf1743 activados por CD26 portadores de espaciadores "*self-cleaving*"

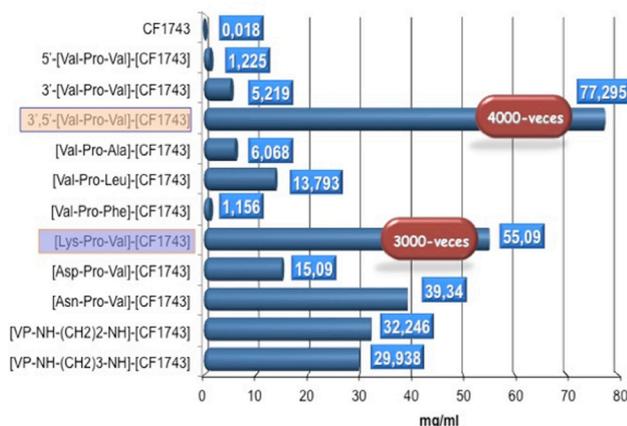


Figura 14. Solubilidad acuosa experimental de los profármacos de Cf1743

respecto al fármaco patrón. Cabe señalar que los correspondientes profármacos tetrapeptídicos (*“self-cleaving”*) vieron incrementada su solubilidad con respecto al fármaco patrón entre 434- y 1.800 veces.^[35,36]

Finalmente, se llevaron a cabo ensayos en ratones con los conjugados más prometedores (Figura 15) que mostraron, por primera vez, una liberación eficiente *in vivo* del fármaco patrón a partir de los profármacos. Asimismo, en estos estudios se ha observado un aumento muy significativo de los niveles de Cf1743 en el plasma de los ratones respecto al compuesto patrón, alcanzándose los niveles máximos con los profármacos 5'-[Val-Pro-Val]-[Cf1743] y [Lys-Pro-Val]-[Cf1743], en los que se detectan áreas bajo la curva 20 veces superiores a las del compuesto patrón Cf1743 y 4 veces superiores a las del valil intermedio de Cf1743. La biodisponibilidad oral *in vivo* del derivado tetrapeptídico [Val-Pro-Val-Pro]-Cf1743 (*“self-cleaving”*) resultó 15-20 veces superior a la del fármaco patrón y unas dos veces mayor que la de los derivados tripeptídicos comentados.^[35,36]

Por tanto, los profármacos tri y tetrapeptídicos de Cf1743 representan dos nuevos tipos de profármacos activados por DPPIV/CD26 que aumentan de manera espectacular la solubilidad en agua y la biodisponibilidad oral respecto al fármaco patrón (Cf1743).

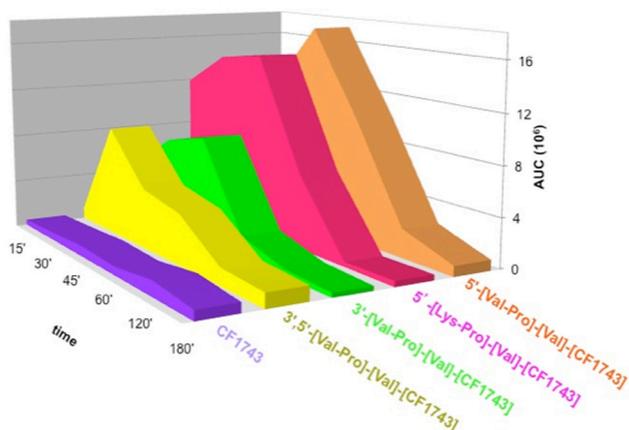


Figura 15. Niveles de Cf1743 en plasma de ratón tras administración oral

CONCLUSIONES

En este artículo se recoge una aproximación profármaco novedosa, enteramente desarrollada en nuestro grupo de trabajo del Instituto de Química Médica (IQM-CSIC) en colaboración con el equipo del Prof. Jan Balzarini del Rega Institute for Medical Research (KU Leuven) en Bélgica, consistente en el desarrollo de conjugados péptido-fármaco que son específicamente hidrolizados por la enzima endógena DPPIV/CD26. Nuestra aproximación profármaco ha mostrado su utilidad en la mejora de propiedades desfavorables fisicoquímicas y/o biofarmacéuticas de fármacos. Nuestros estudios han permitido demostrar que: a) La enzima DPP IV/CD26 reconoce sustratos artificiales diferentes a los péptidos naturales, hidrolizando secuencias peptídicas que están unidas a moléculas orgánicas no peptídicas. b) La naturaleza y la longitud de la secuencia peptídica en los conjugados permite modular tanto la velocidad de hidrólisis, y por tanto la vida media de los profármacos, como las propiedades fisicoquímicas y farmacológicas (solubilidad en agua y biodisponibilidad oral) de los mismos.

Los resultados expuestos avalan que la aproximación profármaco basada en la enzima DPPIV/CD26 es viable, versátil y aplicable a fármacos tanto con grupos amino como con grupos hidroxilo. Se ha demostrado por primera vez que esta estrategia es útil no sólo para mejorar la solubilidad en agua tanto de moléculas lipófilas (TSAO, Cf1743, etc.) como polares (ara-A, aciclovir, etc.) sino también para producir aumentos muy notables de la biodisponibilidad oral (por ej. del antiviral Cf1743) en ensayos *in vivo*.

AGRADECIMIENTOS

Quisieramos agradecer a Carlos García-Aparicio, Alberto Díez-Torrubia, Gwenn Mulder y Silvia Cabrera por su contribución en la preparación de profármacos. Al Prof. Jan Balzarini por los ensayos biológicos. Asimismo agradecemos al MICINN/MINECO (proyectos SAF2009-13914-C02-01 y SAF2012-39760-C02-01) y a la Comunidad de Madrid (proyectos S-BIO-0214-2006 y BIPEDD-2-CM S2010/BMD 2457) por la financiación económica recibida.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] V. J. Stella, R. T. Borchardt, M. J. Hageman, R. Oliyai, Maag, H. J. W. Tilley *Prodrugs: challenges and rewards*. Parts 1 and 2; AAPS Press/Springer: New York, 2007.
- [2] C. G. Wermuth In *The practice of medicinal chemistry*. (Ed.: C. G. Wermuth), Academic Press, London 2003. (b) R. T. Borchardt, E. H. Kerns, M. J. Hageman, D. R. Thakker, J. L. Stevens, In *Optimizing the “Drug-Like” properties of leads in drug discovery*. AAPS Press/Springer: New York, 2006, pp. 561-582.
- [3] A. Albert, *Nature*, 1958, 182, 421-422.
- [4] (a) J. Rautio, H. Kumpulainen, T. Heimbach, R. Oliyai, D. Oh, Järvinen, T. Savolainen, J. Nat. Rev. *Drug Discov.* 2008, 7, 255-270. (b) P. Ettmayer, G. L. Amidon, B. Clement, B. Testa, J. *Med.*

- Chem.* **2004**, *47*, 2393-2404. (c) V. J. Stella, *Expert Opin. Ther. Pat.* **2004**, *14*, 277-280.
- [5] (a) B. Testa, *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *68*, 2097-2106. (b) B. Testa, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 338-344. (c) J. B. Zawilska, J. Wojcieszak, A. B. Olejniczak, *Pharmacol. Reports*, **2013**, *65*, 1-14.
- [6] (a) S. Jana, S. Mandekar, P. Marathe, *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 3874-3908. (b) S. D. Clas, R. I. Sánchez, R. Nofsinger, *Drug Discov. Today*, **2014**, *19*, 79-87. (c) P. Hsieh, C. Hung, J. Fang, *Curr. Pharm. Des.* **2009**, *15*, 2236-2250.
- [7] V. J. Stella, *J. Pharm. Sci.* **2010**, *99*, 4755-4765. (b) K. M. Huttunen, H. Raunio, J. Rautio, *Pharmacol. Rev.* **2011**, *63*, 750-771. (c) V. J. Stella, K. W. Nti-Addae, *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2007**, *59*, 677-694.
- [8] B. Testa, In *Comprehensive Medicinal Chemistry II*. Vol. 5 (Eds.: B. Testa, H. Van de Waterbeemd), Elsevier, Oxford, UK, **2007**, pp. 1009-1041. (b) Y. X. Zhang, J. Sun, Y. B. Sun, Y. J. Wang, Z. G. He, *Curr. Drug Metabolism*, **2013**, *14*, 675-687.
- [9] Y-h. Yang, H. Aloysius, D. Inoyama, Y. Chen, L-q. Hu, *Acata Pharm, Sinica B* **2011**, *1*, 143-159.
- [10] (a) L. P. Balant, In *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*. (Ed: D. J. Abraham), John Wiley and Sons, New Jersey, **2003**, pp. 499. (b) R. B. Silverman, In *The organic chemistry of drug design and drug action*. Academic Press, San Diego, **2004**, pp. 497-549.
- [11] H. K. Han, G. L. Amidon, *AAPS PharmaSci.* **2000**, *2*, E6.
- [12] (a) L. Colla, E. De Clercq, R. Busson, H. Vanderhaeghe, *J. Med. Chem.* **1983**, *26*, 602-604. (b) L. M. Beauchamp, G. F. Orr, P. De Miranda, T. Burnette, T. A. Krenitsky, *Antiviral Chem. Chemother.* **1992**, *3*, 157-164.
- [13] J. M. Cocohoba, I. R. McNicholl, *Ann. Pharmacother.* **2002**, *6*, 1075-1079.
- [14] (a) K. R. Beutner, *Antiviral Res.* **1995**, *28*, 281-290. (b) C. MacDougall, B. J. Guglielmo, *J. Antimicrob. Chem.* **2004**, *53*, 899-901.
- [15] (a) M. E. Ganapathy, W. Huang, V. Ganapathy, F. H. Leibach, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *246*, 470-475. (b) P. V. Balimane, I. Tamai, A. Guo, T. Nakanishi, H. Kitada, F. H. Leibach, A. Tsuji, P. J. Sinko, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *250*, 246-251.
- [16] A. L. Simplício, J. M. Clancy, J. F. Gilmer, *Molecules* **2008**, *13*, 519-547.
- [17] J. Balzarini, M. J. Camarasa, S. Velázquez, *Prodrugs cleavable by CD26*. US 10/555930 May 10, **2003**.
- [18] (a) I. De Meester, S. Korom, J. Van Damme, S. Scharpé, *Immunol. Today* **1999**, *20*, 367-375. (b) D. A. Fox, R. E. Hussey, K. A. Fitzgerald, O. Acuto, C. Poole, L. Palley, J. F. Daley, S. F. Schossman, E. L. Reinhert, *J. Immunol.* **1984**, *133*, 1250-1256.
- [19] (a) I. De Meester, G. Vanhoof, A. M. Lambeir, S. Scharpe, *Immunology Today* **1999**, *20*, 367-375. (b) A. M. Lambeir, C. Durinx, S. Scharpe, I. De Meester, *Crit. Rev. Cl. Lab. Sci.* **2003**, *40*, 209-294. (b) A. Yaron, F. Naider, *Crit. Rev. Biochem. Mol.* **1993**, *28*, 31-81. (c) R. Mentlein, *Regul. Pept.* **1999**, *85*, 9-24.
- [20] (a) C. Abbott, G. W. McCaughan, E. Baker, G. R. Sutherland, *Immunogenetics* **1994**, *40*, 331-338. (b) I. De Meester, A.-M. Lambeir, P. Proost, S. Scharpé, In *Dipeptidyl aminopeptidases in health and disease* (Eds.: M. Hildebrandt, B. Klapp, T. Hoffmann, H.-U. Demuth), Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York, **2003**.
- [21] R. Mentlein, *Regul. Pept.* **1999**, *85*, 9-24.
- [22] A.-M. Lambeir, C. Durinx, S. Scharpé, I. De Meester, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **2003**, *40*, 209-294.
- [23] J. Balzarini, E. Andersson, D. Scholsa, P. Proosta, J. V. Dammea, B. Svennerholmb, P. Horalb, A. Vahlne, *Int. J. Biochem. Cell B* **2004**, *36*, 1848-1859.
- [24] C. García-Aparicio, M.-C. Bonache, I. De Meester, A. San-Félix, J. Balzarini, M.-J. Camarasa, S. Velázquez, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5339-5351.
- [25] (a) J. Balzarini, M. J. Camarasa, S. Velázquez, *Prodrugs cleavable by CD26*. PCT/BE2004/000069, **2005**. (b) C. García-Aparicio, A. Diez-Torrubia, J. Balzarini, A.-M. Lambeir, S. Velázquez, M.-J. Camarasa, *Antiviral Res.* **2007**, *76*, 130-139.
- [26] A. Diez-Torrubia, C. García-Aparicio, S. Cabrera, I. De Meester, J. Balzarini, M. J. Camarasa, S. Velázquez, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 559-572.
- [27] J. Balzarini, M. J. Pérez-Pérez, A. San-Félix, D. Schols, C. F. Perno, A. M. Vandamme, M. J. Camarasa, E. De Clercq, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 4392-4396.
- [28] (a) M. J. Camarasa, M. J. Pérez-Pérez, A. San-Félix, J. Balzarini, E. De Clercq, *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 2721-2727. (b) M. J. Camarasa, A. San-Félix, S. Velázquez, M. J. Pérez-Pérez, F. Gago, J. Balzarini, *Curr. Top. Med. Chem.* **2004**, *4*, 945-963.
- [29] M. C. Bonache, C. Chamorro, S. Velázquez, E. De Clercq, J. Balzarini, F. Rodríguez Barrios, F. Gago, M. J. Camarasa, A. San-Félix, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6653-6660.
- [30] A. Diez-Torrubia, S. Cabrera, A. M. Lambeir, J. Balzarini, M. J. Camarasa, S. Velázquez, *ChemMedChem* **2012**, *7*, 618-628.
- [31] A. Diez-Torrubia, S. Cabrera, S. de Castro, C. García-Aparicio, G. Mulder, I. De Meester, M. J. Camarasa, J. Balzarini, S. Velázquez, *Eur. J. Med. Chem.*, **2013**, *70*, 456-468.
- [32] C. McGuigan, C. J. Yarnold, G. Jones, S. Velázquez, H. Barucki, A. Brancalle, G. Andrei, R. Snoeck, E. De Clercq, J. Balzarini, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4479-4484.
- [33] C. McGuigan, H. Barucki, S. Blewet, A. Carangio, J. T. Erichsen, G. Andrei, R. Snoeck, E. De Clercq, J. Balzarini, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4993-4997.
- [34] C. Mc Guigan, J. Balzarini, *Antiviral Res.* **2006**, *71*, 149-153.
- [35] A. Diez-Torrubia, J. Balzarini, G. Andrei, R. Snoeck, I. De Meester, M. J. Camarasa, S. Velázquez, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 1927-1942.
- [36] A. Diez-Torrubia, S. Cabrera, I. De Meester, M. J. Camarasa, J. Balzarini, S. Velázquez, *ChemMedChem* **2012**, *7*, 1612-1622.
- [37] (a) F. M. H. De Groot, L. W. A. Van Berkomp, H. W. Scheeren, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3093-3102. (b) W. S. Saari, J. E. Schwering, P. A. Lyle, S. J. Smith, E. L. Engelhardt, *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 97-101.
- [38] (a) C. Santos, M. L. Mateus, A. P. Santos, R. Moreira, E. Oliveira, P. Gomes, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 1595-1598. (b) C. Santos, J. Morais, L. Gouveia, E. De Clercq, C. Pannecouque, C. U. Nielsen, B. Steffansen, R. Moreira, P. Gomes, *ChemMedChem* **2008**, *3*, 970-978. (c) C. R. Santos, R. Capela, C. S. G. P. Pereira, E. Valente, L. Gouveia, C. Pannecouque, E. De Clercq, R. Moreira, P. Gomes, *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 2339-2346.
- [39] (a) Y. Tsume, J. H. Hilfinger, G. L. Amidon, *Mol. Pharmaceut.* **2008**, *5*, 717-727. (b) R. Jain, S. Duvvuri, V. Kansara, N. S. Mandava, A. K. Mitra, *Int. J. Pharm.* **2007**, *336*, 233-240 and references therein. (c) R. S. Talluri, S. K. Samanta, R. Gaudana, A. K. Mitra, *Int. J. Pharm.* **2008**, *361*, 118-124. (d) S. Capasso, A. Vergara, L. Mazzarella, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1990-1995.