



Importancia de los ensayos fenotípicos en descubrimiento de fármacos

Zoraida Andreu¹, Esther Masiá^{1,2}, David Charbonnier¹, María J Vicent^{1,2}

¹Polymer Therapeutics Lab.

²Plataforma Cribado. Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF), Valencia.

INTRODUCCIÓN

Patologías como el cáncer, enfermedades neurodegenerativas y enfermedades raras, entre otras, necesitan nuevas perspectivas de estudio y estrategias de abordaje para el desarrollo de terapias efectivas. El CIPF es uno de los nodos españoles acreditado como centro especializado del ERIC (*European Research Infrastructure Consortium*) EU-OPENSSCREEN, dedicado al cribado en sistemas complejos. El desarrollo de fármacos es un proceso complicado y costoso que requiere, entre otros pasos, de un cribado masivo de librerías de miles de compuestos/moléculas candidato a posibles fármacos. Este cribado debe ser realizado en modelos preclínicos que recapitulen, al máximo posible, la fisiopatología de la enfermedad para evitar un fracaso posterior en el desarrollo del fármaco. En este sentido, los cultivos celulares tridimensionales (3D), conocidos

como modelos esferoides-organoides, mimetizan el microambiente de las células en el organismo mucho mejor que las células crecidas en monocapa (2D) y por ello constituyen una valiosa herramienta para determinar las causas y mecanismos moleculares que intervienen en las diferentes patologías. En muchas ocasiones la diana molecular del fármaco sólo se expresa en un contexto 3D por lo que la eficiencia de dicho fármaco únicamente puede identificarse testando el fármaco en estos modelos celulares complejos (*Ver punto 1*).

Por otro lado, el desarrollo de nuevas terapias efectivas requiere de la implementación y del ingenio de nuevas técnicas de cribado, así como de la búsqueda de nuevas dianas. En las últimas décadas los exosomas, vesículas de origen endosomal, y otro tipo de vesículas extracelulares (VEs) se han convertido en los protagonistas de muchas >>>

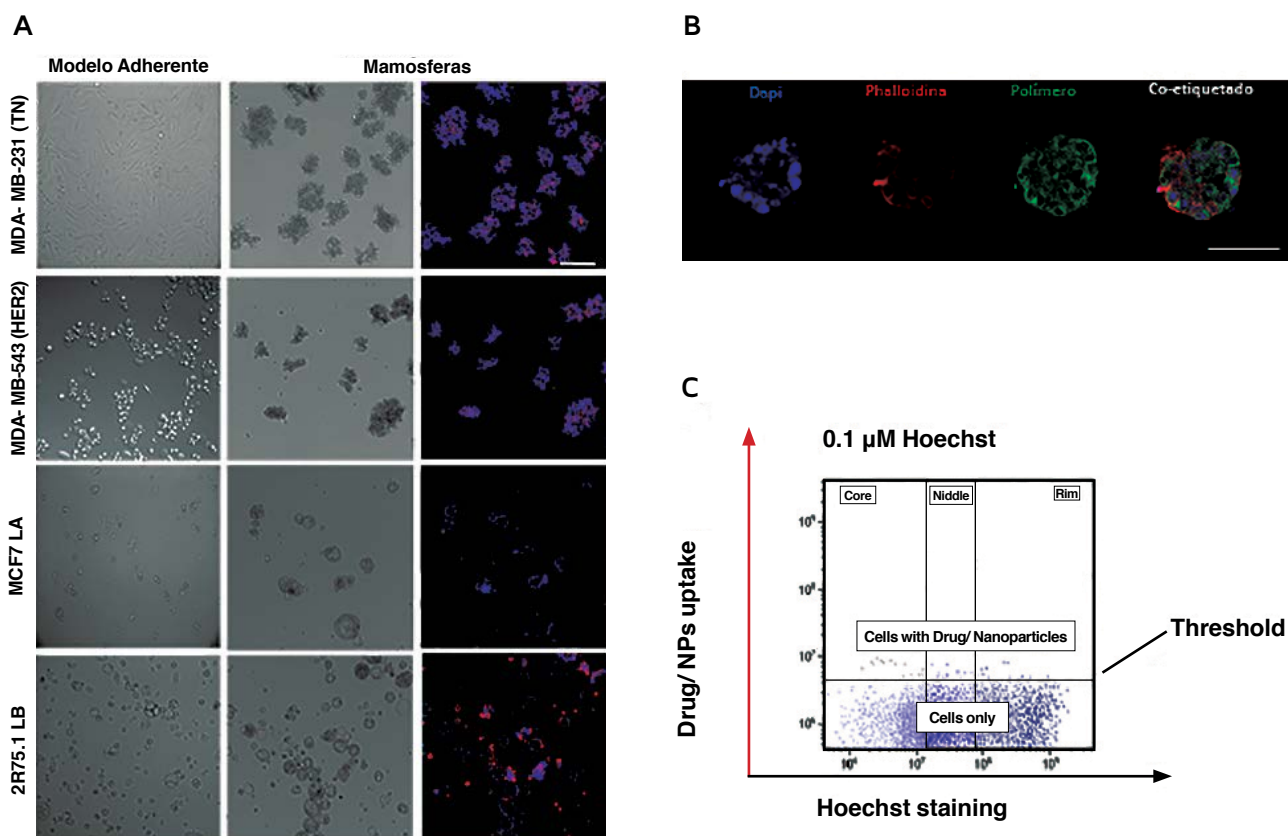


Figura 1

Ejemplo de Modelos 3D, esféricos de cáncer de mama (CM), para cribado de fármacos. A) Líneas celulares representativas de los subtipos en clínica de CM, se cultivaron en condiciones adherentes y en suspensión. Imágenes de campo brillante de cultivos adherentes y de mamosferas (panel izquierdo). Imágenes inmuno-fluorescentes de confocal (panel derecho) que muestran mamosferas con etiquetado nuclear Hoetchs (azul) y membrana celular (rojo intenso). Las mamosferas derivadas de las líneas celulares MDA-MB-231 y MDA-MB-453 presentan una apariencia de racimo de uva y estructuras mucho más flexibles en comparación con las derivadas de las líneas celulares MCF7 y ZR75.1, que presentan una estructura lobular y más compacta. Barra de escala de 200 μ m. B) Imágenes de microscopía confocal representativas de la absorción de polímeros en el modelo de mamosfera MCF7. Barra de escala 200 μ m. C) Gradiente de Hoetsch para seguir la absorción de fármacos.

>>> investigaciones. La importante carga genética y proteica de estas vesículas les confiere un papel primordial tanto en procesos fisiológicos como patológicos y son muchos los estudios que señalan la importancia de los exosomas en enfermedades infecciosas, en la progresión del cáncer y en enfermedades neurodegenerativas entre otras. Por este motivo estrategias eficientes de cribado masivo para monitorizar la modulación tanto de la liberación como de la biogénesis de exosomas se consideran herramientas muy útiles en el descubrimiento de nuevas terapias en estas devastadoras patologías (Ver punto 2).

Por último, no solo las células humanas son interesantes en este contexto, la utilización de células de insecto se lleva realizando desde hace más de un siglo con éxito, en concreto destaca el uso de células de *Drosophila*. Mu-

chas de estas investigaciones se sitúan en el campo de la neurobiología, tanto para el estudio de la biogénesis del sistema nervioso como para el estudio de enfermedades neurodegenerativas humanas debido a que estas células de mosca son capaces de reflejar las condiciones fisiopatológicas humanas (Ver punto 3).

ALGUNOS EJEMPLOS DE ENSAYOS FENOTÍPICOS ESPECIALIZADOS EN EL ÁMBITO DE CRIBADO

1. Utilización de modelos 3D. Aumentando la Complejidad desde esféricos a organoides.

Los modelos esféricos son ideales para la selección de fármacos de nuevo descubrimiento, pero también para reevaluar fármacos ya descritos, representando

una plataforma más precisa para la realización de estudios de penetrabilidad, biodistribución, eficiencia y resistencia a los fármacos en los tejidos, que contribuye tanto a una reducción costo-temporal como en el uso de animales de experimentación. Son muchas las diferentes técnicas descritas para generar esferoides como: matriz en la parte superior, matriz incrustada, encapsulación en matriz, matraces giratorios, placas de adherencia ultrabaja, gota colgante, levitación magnética e impresión 3D magnética. Cada técnica tiene sus ventajas e inconvenientes y los modelos generados presentan diferente complejidad, desde el esferoide más sencillo formado por un único tipo celular hasta los esferoides multicelulares o los organoides, como modelo 3D más complejo, representando más fielmente el escenario patológico clínico. La elección del modelo de trabajo más apropiado depende de los objetivos y del tipo de estudio. En nuestro grupo, se han optimizado diferentes modelos 3D derivados tanto de líneas comerciales como de biopsias de pacientes que representan sistemas muy interesantes para la identificación de nuevas terapias utilizando desde modelos más sencillos (esferoides) para un primer cribado masivo, a la comprobación de positivos con sistemas más complejos y que reflejan más adecuadamente las condiciones clínicas (organoides). Estos últimos son más complicados de utilizar en ensayos de alta densidad principalmente debido a su elevado coste y a los requisitos de su adecuada formación y crecimiento.

En concreto, para llevar a cabo la identificación de forma personalizada de combinaciones de fármacos antitumorales sinérgicos en cáncer de mama (CM), hemos desarrollado mamosferas derivadas de cuatro líneas celulares de CM, representativas de los 4 subtipos clínicos más relevantes: Luminal A: (ER+, PR+, HER-); Luminal B: (ER+, PR+, HER+); (Triple Negativo): (ER-, PR-, HER-); y HER2: (ER-, PR-, HER+). El modelo de mamosferas deriva de las células tumorales crecidas en suspensión, con factores de crecimiento apropiados, en placas de adherencia ultrabaja, constituyendo un modelo esferoide muy sencillo, rápido, relativamente económico y muy eficiente para el desarrollo de cribado de fármacos (*Figura 1A*). Tanto la confirmación del mejor candidato en cada subtipo de CM como sus evaluaciones secundarias se han llevado a cabo en organoides, siguiendo las pautas de las técnicas descritas por el grupo del Prof. Hans Clevers. Primeramente, en organoides derivados de cada una de las líneas comerciales y aquellas combinaciones seleccionadas para cada subtipo se han validado en organoides derivados de biopsias de pacientes del subtipo correspondiente para así llegar a identificar una terapia personalizada al menos para cada subtipo.

Una de las ventajas que ofrecen los ensayos fenotípicos de base celular es la capacidad de evaluar los posibles fármacos frente a varias de las barreras biológicas que se van a encontrar antes de interactuar con la diana molecular. Por lo tanto, son muy adecuados para estudios de internalización celular y distribución en el tejido de interés. Estos estudios son importantes en la fase de desarrollo de compuestos prototipo (“hit”) y su optimización a cabezas de serie (“leads”), en particular si los ‘leads’ son terapias avanzadas como nanofármacos. En este sentido, nuestro modelo sencillo de mamosferas constituye una buena alternativa para monitorizar en alta densidad la internalización de diferentes tipos de terapias con marcajes normalmente fluorescentes mediante microscopía confocal (*Figura 1B*), además de por citometría de flujo (*Figura 1C*). Para este fin hemos puesto a punto una estrategia, con la utilización de la citometría de flujo, basada en un gradiente de Hoechst que permite monitorizar fácilmente y con gran robustez la distribución en modelos 3D de los compuestos y/o nanofármacos marcados fluorescentemente. Este gradiente nos permite discriminar si el fármaco queda retenido en la periferia o es capaz de llegar hasta el “core” del esferoide u organoide.

Por último, mencionar que los modelos 3D, y sobre todo los organoides, ofrecen estrategias para el descubrimiento de fármacos que permiten ahorrar tiempo y costes a lo largo del camino desde la bancada al paciente. E incluso en algunos casos, debido a la ausencia de modelos animales adecuados, como ocurre en algunas enfermedades raras, los organoides derivados de paciente pueden suponer el último paso antes de los ensayos farmacológicos en humanos.

1. Ensayos a Nivel Subcelular. *Identificación de moduladores de vesículas extracelulares gracias a la combinación de la tecnología AlphaScreen™ e Inmunofluorescencia. ¿Qué ocurre dentro y fuera de la célula?*

Como se ha mencionado en la introducción las vesículas extracelulares, y en concreto los exosomas, representan dianas moleculares interesantes en la prevención y tratamiento de diferentes patologías, sin embargo, la inversión en tiempo necesaria y la complejidad de los métodos actualmente empleados para purificar y caracterizar exosomas representan una barrera significativa. Por este motivo, hemos puesto a punto una aproximación que combina la técnica de AlphaScreen™ (*Amplified Luminescence Proximity Homogeneous Assay*) con la inmunodetección de un lípido exosomal específico, ambas en alta densidad. Esta técnica permite llevar a cabo no sólo la identificación de fármacos capaces de modular la liberación de exosomas sin necesidad de su aislamiento y con muy poco volumen de muestra, sino que además permite delimitar si esa inhibición se produce por una modulación en la biogénesis o en los mecanismos de >>>

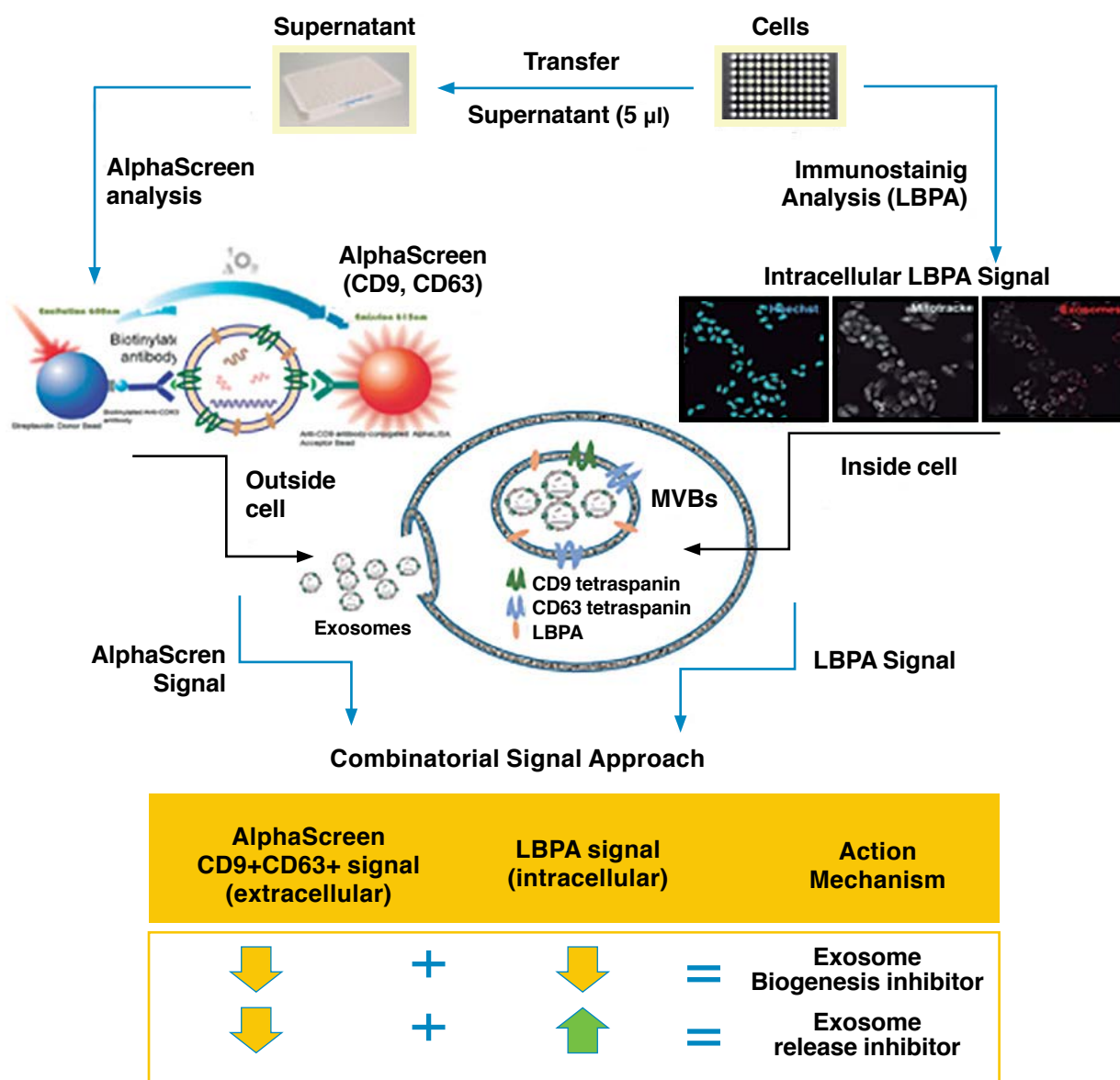


Figura 2

Resumen del enfoque combinatorio para la identificación y caracterización avanzada de moduladores de biogénesis y/o liberación de exosomas. La combinación de estas técnicas indica si los moduladores de exosomas afectan a la biogénesis o a liberación de exosomas. Es posible realizarlo en un formato de placa de 96 o 394 pocillos para cribados de alto rendimiento.

>>> secreción de exosomas desde la célula. En el ensayo, el sobrenadante (SN) es aprovechado para la medida en *Alphascreen*TM y las células adheridas en la misma placa para la inmunodetección del lípido (Figura 2).

La tecnología *ALPHA* utiliza dos pares de cuentas (“beads”) (dador y aceptor - “donor and acceptor beads”) para detectar la proximidad entre proteínas sin necesidad de lavados, generalmente con el fin

de estudiar interacciones, modificación de péptidos, etc. Si la distancia entre ambas “beads” es inferior a 200nm, cuando excitamos las ‘donor beads’ (680nm), se produce un intercambio del singlete de oxígeno y las ‘acceptor beads’ emiten una señal (615nm) que es captada por el detector. Los exosomas están descritos como vesículas de un tamaño comprendido entre 30 y 150 nm y enriquecidas en tetraspaninas, particularmente CD9 y CD63 de forma diferencial a otras vesículas

extracelulares. Con el fin de aprovechar estos marcadores, un anticuerpo anti-CD9 fue conjugado a las 'acceptor beads' y otro anticuerpo anti-CD63 fue biotinilado. Como resultado, la señal luminiscente es indicativa de vesículas doble positivas para CD9 y CD63 con un tamaño inferior a 200nm, lo que nos permite discriminar los exosomas dentro de muestras complejas.

Los ensayos con ALPHA son viables en varios tipos de muestras, como plasma, suero, orina, medio de cultivo... sin necesidad de purificación o lavados, y además el volumen de muestra necesario es de tan solo 5mL, ideal para casos donde hay limitación de muestras como son algunos fluidos de pacientes. Esta técnica es muy versátil y se puede acoplar a otros anticuerpos para detectar no sólo exosomas en general, sino una población particular, por ejemplo aquellos derivados de alguna patología o de una célula de origen determinado. En todos los casos, el epítipo debe estar expuesto en la superficie del exosoma. Por tanto, dentro de un fluido que contiene una mezcla de exosomas de procedencias diversas, se puede evaluar el efecto de una enfermedad o un fármaco sobre una población concreta de exosomas que tenga los marcadores establecidos. Cabe destacar la reducción del tiempo de ensayo y la cantidad de material necesario frente a otros métodos más convencionales de purificación (ultracentrifugación, cromatografía de exclusión por tamaño, etcétera) que no son técnicamente viables para el cribado masivo de fármacos.

En paralelo, para la inmunodetección se han usado tres marcadores celulares: nuclear (Hoechst), citoplásmico (Faloidina-TRITC) y específico de exosomas (anti-lipid-FITC). La adquisición de imágenes se realiza con el InCell Analyzer 2200 que emplea tres pares de filtros de excitación (exc)/emisión(emi): exc 390/18 y emi 432.5/48 para Hoechst, exc 542/27 y emi 597/45 para faloidina y exc 475/28 y emi 511.5/23 para FITC. Las imágenes se analizan con el *software Developer Toolbox*. El flujo de trabajo de análisis incluye la segmentación de núcleos y células basada en Hoechst y Faloidina, respectivamente. La señal del lípido se segmenta usando la señal FITC, y se combina con la segmentación celular para cuantificar los gránulos (exosomas) intracelulares y evitar el análisis de artefactos.

A nivel interpretativo, una señal intracelular elevada revela alta presencia de exosomas, que junto a una señal extracelular débil del *AlphaScreen*TM indica que el fármaco actúa como inhibidor de la liberación de exosomas. En cambio, una señal intracelular baja junto con una señal extracelular también baja nos indica que el fármaco es un inhibidor de la biogénesis (*Figura 2*). El conocimiento de las rutas afectadas por cada uno de los compuestos estudiados proporciona información adi-

cional que puede ser de gran utilidad para el diseño de la estrategia terapéutica.

2. Ensayos con células de insecto. *Identificación de factores genéticos involucrados en el silenciamiento transcripcional del gen frataxin (FXN) en Drosophila Schneider 2 (S2).*

La ataxia de Friedreich (FRDA) es una enfermedad neurodegenerativa hereditaria, catalogada como enfermedad rara, que afecta al sistema nervioso central y periférico, además también afecta a algunos órganos vitales como páncreas y corazón. Esta enfermedad se suele manifestar en la infancia o adolescencia y su progresión acaba dejando a los pacientes en sillas de ruedas y finalmente produce una muerte prematura. La FRDA es causada por una deficiencia en los niveles de la proteína mitocondrial frataxina, debido a una expansión repetida del triplete GAA anormal en el primer intrón del gen humano FXN. Se consideran normales un número de repeticiones de GAA de entre 7 y 38, mientras que un número de repeticiones superior a 66 se considera causante de enfermedad. Los pacientes con FRDA contienen un promedio de más de 600 repeticiones.

El gen FXN, conservado evolutivamente, presenta ortólogos esencialmente en todos los eucariotas y en algunos procariotas, lo que permite el desarrollo de modelos experimentales de esta enfermedad en diferentes organismos. Debido a la fácil manipulación genética de *Drosophila melanogaster* este organismo se ha vuelto muy valioso en la investigación de FRDA. El ortólogo de la proteína frataxina de mosca fue caracterizado hace ya más de 15 años. Está demostrado en cribados genéticos y farmacológicos sobre células de *Drosophila* que algunos de sus fenotipos fisiológicos, celulares y moleculares proporcionan información valiosa que no es fácilmente alcanzable con otros modelos de ensayo.

El silenciamiento génico a través del ARN de interferencia (RNAi) se ha convertido en una herramienta poderosa para comprender la función génica. Los cribados de RNAi se realizan principalmente utilizando pequeño ARN sintético de interferencia ("siRNA") o ARN de horquilla corta (shRNA). El ARN de interferencia (RNAi) es un mecanismo de silenciamiento de genes iniciado por un ARN corto de doble cadena (dsRNA) de una longitud aproximada de 21 nucleótidos. Dos clases principales de dsRNAs aprovechan esta vía para la regulación genética post-transcripcional, incluyendo siRNAs y microRNAs (miRNAs). Experimentalmente, la capacidad de aprovechar la vía del RNAi mediante el uso de siRNA/shRNA ha facilitado el camino para los cribados de alto rendimiento de todo el genoma.

Como ejemplo del alto valor terapéutico de esta aproximación, se describe un cribado genético >>>

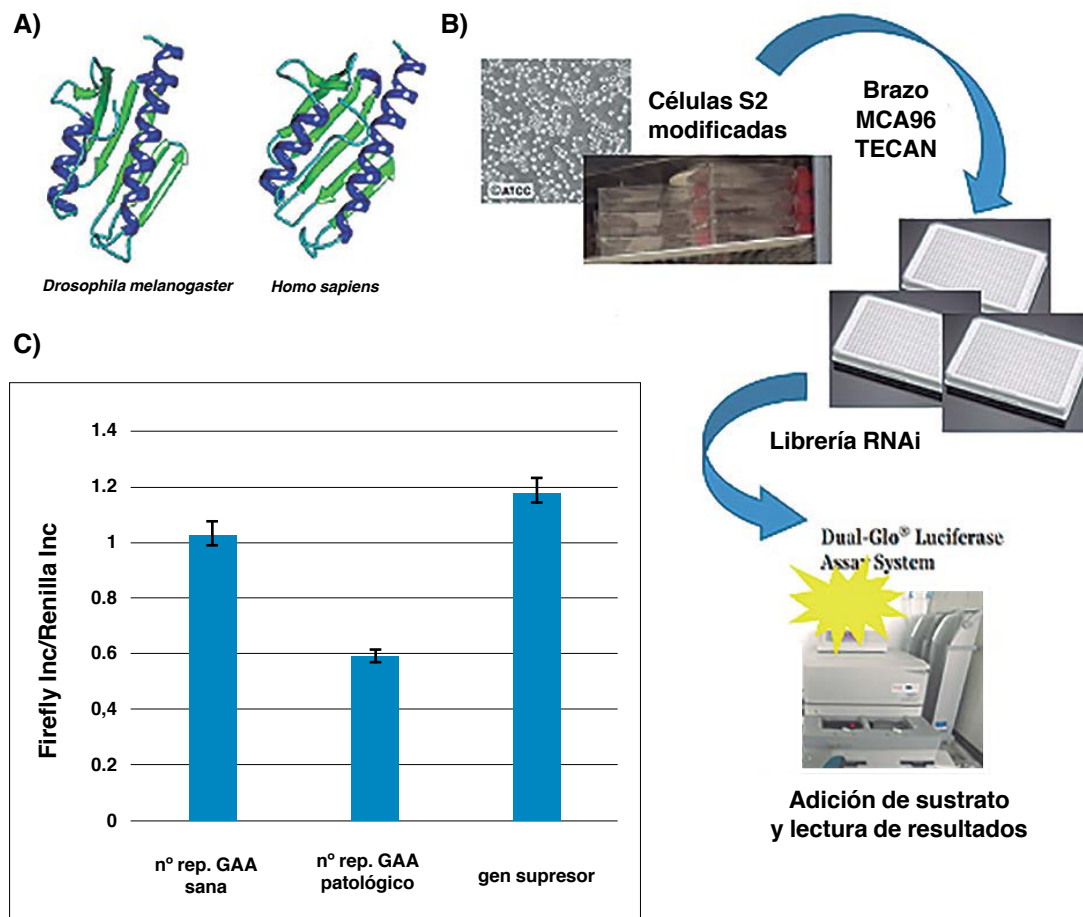


Figura 3. (A) Predicción de la estructura 3D de la proteína Frataxina usando el software *Phyre 2* y *Chimera 1.12*. (B) Diagrama de flujo del ensayo. Las Células S2 modificadas son añadidas con el brazo robótico *MCA96* de *TECAN*, a una concentración óptima, sobre la librería de RNAi. Tras el periodo de incubación establecido se añade de manera automatizada el sustrato *Dual-Glo Luciferase* en la placa gracias a los inyectores del lector multiplaca *ClarioStar* de *BMG Labtech*, siguiendo las recomendaciones del fabricante. La placa es leída en ese mismo equipo. (C) Ejemplo de representación de resultados.

>>> que llevamos a cabo sobre células modificadas de *Drosophila Schneider 2 (S2)*, que incorporan en su genoma un número patológico de repeticiones del triplete GAA, simulando la enfermedad de FDRA. Este número de repeticiones provoca una inhibición del gen reportero de la luciferasa (firefly) de forma similar al silenciamiento del gen *FXN* que ocurre en los pacientes de FDRA. El uso de este modelo celular S2 junto con una colección de RNAi (siRNA) nos permitió analizar el efecto de un gran número de genes sobre la represión transcripcional causada por la expansión de este triplete GAA gracias a la medición de la actividad luciferasa (firefly). En este ensayo se pretendía encontrar genes capaces de restaurar la señal de actividad luciferasa (firefly) acercándola a los niveles basales no patológicos, propios de las células S2 sanas (células modificadas con un número de repeticiones del triplete GAA no patológico). Es decir, genes capaces

de suprimir el efecto de la represión transcripcional mediada por GAA (Figura 3). ■

PARA LEER MÁS

- Andreu Z et al. "Identification of Exosome Biogenesis/Release Inhibitors in Breast Cancer Cells via Combined AlphaScreen and Immunocytochemical Analysis"; *JEV* (2020).
- Calap-Quintana P et al. "Drosophila melanogaster Models of Friedreich's Ataxia"; *BioMed Research International* (2018).
- Clevers H et al. "A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity"; *Cell* (2018).
- Sigrid A. "Three-Dimensional in Vitro Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning" *Front. Pharmacol.*; (2018).
- Sittampalam GS et al. editors. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004.
- Tchoryk A et al., "Penetration and Uptake of Nanoparticles in 3D Tumor Spheroids". *Bioconjug Chem.* (2019).