

Julio 2020 |

COMPUESTOS CEAMED COMO POSIBLE TRATAMIENTO PARA PACIENTES CON COVID-19

CEAMED.S.A.

Dossier informativo



Avenida Trinidad n° 61, 7ª Planta. San Cristóbal de La Laguna 38204

Tel: 822 102 653

www.ceamedsa.com

CONTENIDO

1.1 Evidencias científicas: Los inhibidores de la activación de STAT3 como medio para reducir los efectos perjudiciales de la tormenta de citoquinas en pacientes con infección grave por COVID-19	3
1.2 Información del compuesto: CM-978	8
1.2.1 Especificaciones del compuesto.....	8
1.2.2 Síntesis química	8
1.3 Patentabilidad, panorama de patentes o planteamiento de patentes.....	8
1.4 Ensayo de CM-978 como inhibidor de la vía STAT dependiente de interleucinas (IL).....	9
1.4.1 Identificación del CM-978 como inhibidor de la vía STAT5 dependiente de IL-3.....	9
1.4.2 Identificación del CM-978 como inhibidor de la vía STAT3 dependiente de IL-6.....	9
1.4.3 Análisis por western blot.....	10
1.5 Evaluación de la actividad del CM-978 en cánceres dependientes de STAT3... 11	11
1.6 Estudios de toxicidad in vivo..... 11	11
1.6.1 Test de Irwin (administración por vía intraperitoneal)	11
1.6.2 Test de Irwin (administración por vía oral)	12
1.7 Estudios de farmacocinética y metabolización hepática..... 13	13
1.7.1 Farmacocinética en ratas.....	13
1.7.2 Farmacocinética en ratones.....	14
1.7.3 Metabolización hepática.....	15
1.8 Conclusiones..... 16	16
1.9 Perspectivas	16

1.1 Evidencias científicas: Los inhibidores de la activación de STAT3 como bloqueantes de la tormenta de citoquinas en pacientes con infección grave por COVID-19

COVID19, la enfermedad causada por la infección del nuevo coronavirus SARS-CoV-2, es una pandemia de rápida expansión a nivel global con una urgente necesidad de tratamiento. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha declarado la enfermedad por coronavirus (COVID-19) como una emergencia pública de importancia internacional.

El brote de COVID-19 se produce en consecuencia al síndrome respiratorio agudo severo (SARS) asociado al coronavirus 2 (SARS-CoV-2), un nuevo beta-coronavirus envuelto en RNA. Actualmente no existen ni vacunas ni antivirales disponibles con eficacia demostrada para la prevención o el tratamiento del SARS-CoV-2, el cual presenta una tasa de mortalidad de entre el 1-5%. Mientras la mayoría de la población infectada con este virus desarrolla una forma de la enfermedad leve o controlable, aproximadamente el 15% presenta una forma severa de la enfermedad, necesitando hospitalización y ayuda respiratoria con aporte de oxígeno. En muchos casos, la COVID-19 puede complicarse por la manifestación de un síndrome de distrés respiratorio agudo (ARDS), sepsis y/o fallo multi-órgano (MOF) (ver figura 1). Una gran parte de los pacientes con enfermedad respiratoria severa debida a COVID-19 presentan características compatibles con el síndrome de liberación de citoquinas (CRS) (también llamado “tormenta de citoquinas”).

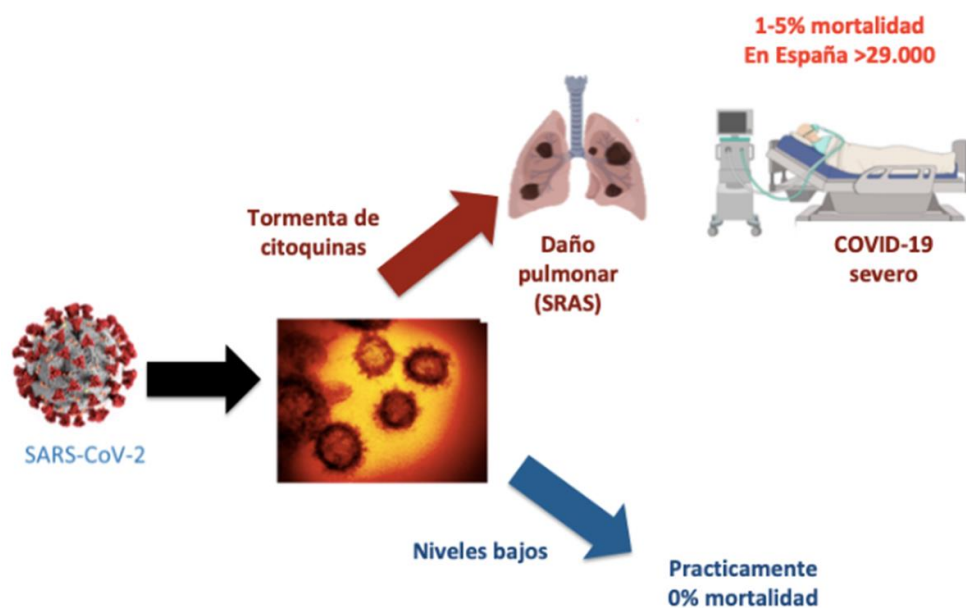


Figura 1: los síntomas severos de la COVID-19 son desencadenados por la “tormenta de citoquinas” que causan el ARDS.

Las investigaciones realizadas en laboratorios tienen como objetivo poder distinguir entre las formas severas y leves de la enfermedad, sugiriendo que los marcadores de inflamación circulantes, incluyendo interleucina (IL-6), están muy relacionados con la forma severa de la COVID-19. El virus SARS-CoV-2 se introduce en las células a través de la enzima transmembrana ACE2, infectando así estas células. Esto se traduce en una reducción de la actividad enzimática de ACE2 y, en consecuencia, en un incremento de los niveles de Angiotensina II (AngII). De esa forma, los altos niveles de AngII resultan en la activación de la ruta de señalización de IL-6/JAK/STAT3, que culmina en una amplificación adicional de IL-6 (y otras interleucinas), causando así la previamente mencionada tormenta de citoquinas (figura 2).

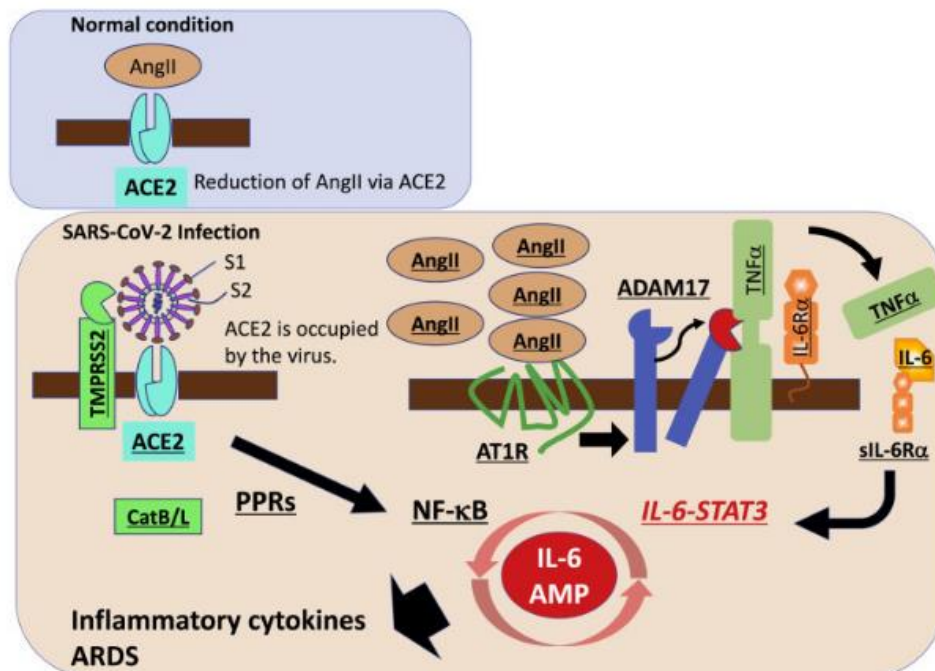


Figura 2. Infección por SARS-CoV-2 genera altos niveles de angiotensina II (AngII) resultando en la activación de la vía IL-6/JAK/STAT3 y eventualmente produce la respuesta inflamatoria por citoquinas y el síndrome de dificultad respiratoria aguda (en inglés ARDS) .¹

Debido al aumento en la activación de la vía IL-6/JAK/STAT3 se ha considerado que los inhibidores de esta ruta podrían constituir un tratamiento potencial para estos pacientes (figura 3). Actualmente se están realizando ensayos clínicos usando un anticuerpo contra IL-6 (Siltuximab) e inhibidores de JAK1-2 (Ruxolitinib). Recientemente, las autoridades sanitarias españolas han aprobado el uso simultáneo de ambos fármacos para pacientes con síntomas

¹ Hirano, T., & Murakami, M. (2020). COVID-19: A New Virus, but a Familiar Receptor and Cytokine Release Syndrome. *Immunity*, 52(5), 731–733.

severos de COVID-19. Asimismo, en España se buscan pacientes de COVID-19 para la realización de ensayos clínicos con el producto natural Silibinin, un inhibidor de STAT3.

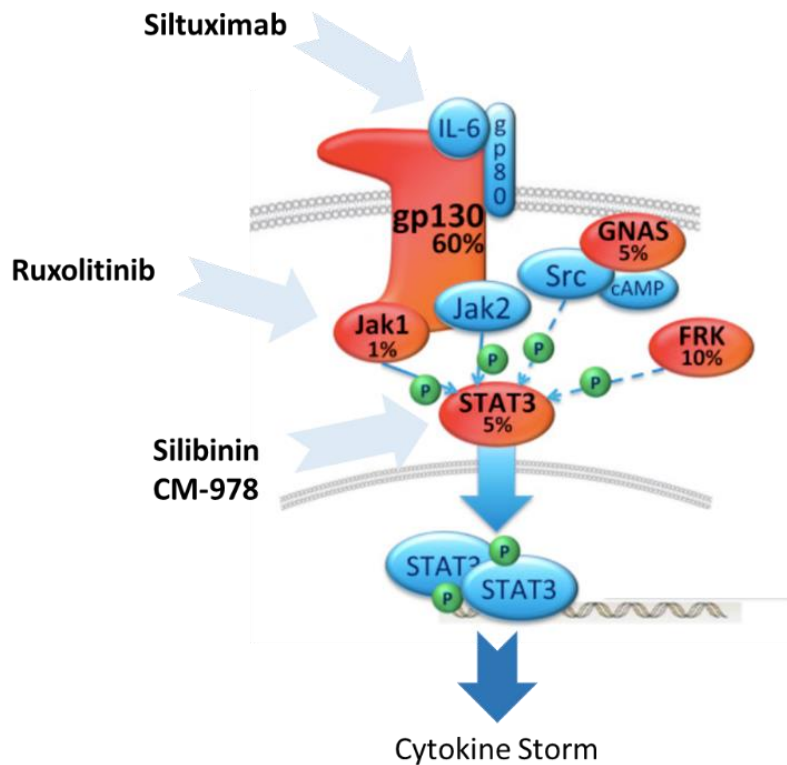


Figura 3. Los inhibidores de las vías de señalización IL-6/JAK/STAT3 como potenciales tratamientos para pacientes con infección grave por COVID-19.

En la división I+D de CEAMED hemos desarrollado pequeñas moléculas capaces de inhibir STAT3 como posible tratamiento para los cánceres de mama triple negativos (CMTNs), en los cuales el crecimiento tumoral y la metástasis depende de manera importante de la activación de STAT3. CEAMED tiene a disposición varias familias de compuestos que potencialmente reducen los niveles de STAT3 activado de manera dependiente de IL-6. Cabe destacar, que nuestros compuestos actúan con valores de IC_{50} inferiores a $1 \mu M$, unos niveles importantes si lo comparamos con el compuesto Silibinin cuya IC_{50} está en torno a $100 \mu M$.²

² Bosch-Barrera, J., Martín-Castillo, B., Buxó, M., Brunet, J., Encinar, J. A., & Menendez, J. A. (2020). Silibinin and SARS-CoV-2: Dual Targeting of Host Cytokine Storm and Virus Replication Machinery for Clinical Management of COVID-19 Patients. *Journal of clinical medicine*, 9(6), E1770

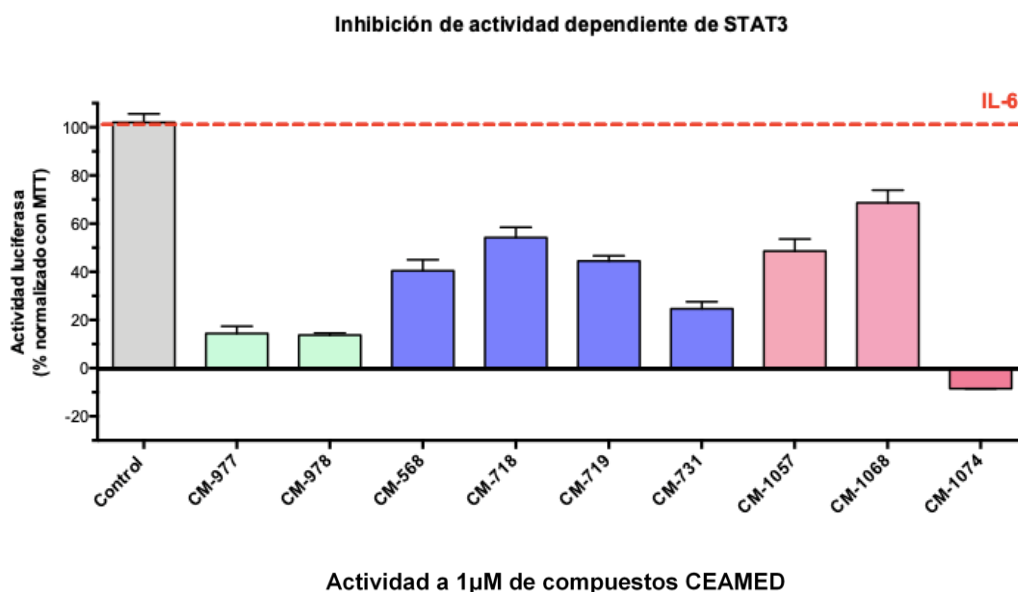


Figura 4. Inhibición de la actividad STAT3 inducida por IL-6 mediante compuestos de distintas familias químicas diseñados en CEAMED a 1 μM.

Entre los compuestos de CEAMED, resulta de particular interés el perfil *in vitro* e *in vivo* del compuesto **CM-978**:

- Es un potente inhibidor de la activación de STAT3 inducida por IL6 ($IC_{50} \sim 0.6 \mu M$).
- Su administración por vía oral es bien tolerada en ratones BALB/c (a dosis de 50 mg/Kg durante 5 días, y a dosis de 30 mg/Kg durante 21 días).
- Los estudios de farmacocinética en ratas y ratones indican que el compuesto tiene buena vida media, alto volumen de distribución y alta biodisponibilidad tras ser administrado por vía oral.
- Los estudios de metabolización hepática en microsomas hepáticos humanos indican que el compuesto es estable.

Aunque el compuesto CM-978 no ha sido testado frente a canales iónicos cardiacos, otros compuestos de esta familia han sido testados y ninguno de ellos ha mostrado inhibición de estos canales.

Dada su potencia frente a la activación de STAT3 en células humanas, su biodisponibilidad en roedores y la actual ausencia de tratamiento en los casos graves de COVID-19, el compuesto CM-978 podría ser un candidato a incluir en futuros estudios *in vitro* e *in vivo* en los que se

explore su potencial uso como tratamiento para prevenir y/o reducir la tormenta de citoquinas y el síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS).

Como mencionamos anteriormente, CEAMED está también desarrollando otras familias de compuestos que inhiben la activación de STAT-3 inducida por la IL-6. El compuesto CM-1074 (ver figura 4) es posiblemente el inhibidor de la activación de STAT-3 más potente que hemos desarrollado, con una IC_{50} de 50 nM. Actualmente este compuesto progresa hacia los estudios de farmacocinética in vitro e in vivo. Más información sobre este y otros compuestos de la familia estará disponible próximamente tras el desarrollo de futuros estudios.

El resto de este informe se centrará en las propiedades químicas y biológicas del compuesto CM-978.

1.2 Aspectos químicos del compuesto CM-978

1.2.1 Especificaciones del compuesto

Nombre del compuesto (CEAMED): CM-978

Propiedades químicas

Fórmula molecular: C ₂₄ H ₁₉ NO ₄	Peso molecular: 385.4
Área de superficie polar: 73.3	ClogP: 3.20
# enlaces de H aceptores: 5	
# enlaces de H donadores: 0	
# enlaces rotables: 1	

Predicción in-silico de las medidas de biodisponibilidad

Conforms to Lipinski's rule of 5: Yes Conforms to Ghose's "drug-likeness": Yes Predicted oral bioavailability (Veber rule): Good PAINS: 1 alert (quinone)
--

1.2.2 Síntesis química

- Proceso de conversión en dos pasos.
- Los reactivos están disponibles comercialmente o pueden ser fácilmente preparados a escala. Reactivos baratos.
- Los rendimientos se encuentran típicamente entre el 27-33% (cantidades multi-gramo)
- El compuesto CM-978 es un sólido cristalino.
- Purificación por cristalización.
- El CM-978 es una mezcla racémica de enantiómeros. Hasta el momento no se han desarrollado estudios para preparar o separar los dos enantiómeros.

1.3 Patentabilidad de CM-978

Se no has concedido una patente europea que incluye al compuesto CM-978 (EP 2690094) para su uso como mediador en el tratamiento de enfermedades caracterizadas por una actividad anormal en la vía de señalización JAK-STAT.

1.4 Ensayo de CM-978 como inhibidor de la vía STAT dependiente de interleucinas (IL).

1.4.1 Identificación de CM-978 como inhibidor de la vía STAT5 dependiente de IL-3

Usando el ensayo de actividad luciferasa, empleando el gen reportero de STAT-5 (en células BaF3, células pro-B murinas dependientes de IL-3), demostramos que el compuesto CM-978 reduce rápidamente (6 horas de incubación) la actividad transcripcional de STAT5 inducida por IL-3. Esta respuesta de inhibición fue dependiente de la concentración del compuesto, siendo su IC₅₀ próxima a 0,7 μ M.

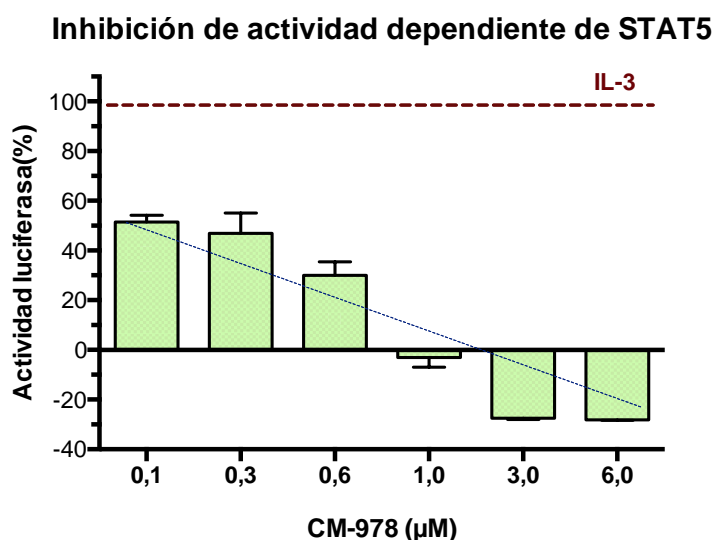


Figura 5. Inhibición de la actividad de STAT5 inducida por IL-3 por el compuesto CM-978 de forma dependiente de la concentración.

1.4.2 Identificación del CM-978 como inhibidor de la vía STAT3 dependiente de IL-6

Usando el ensayo de actividad luciferasa, empleando un ensayo con el gen reportero de STAT-3 (en células BaF3, células pro-B murinas dependientes de IL-3), demostramos que el compuesto CM-978 reduce rápidamente (6 horas de incubación) la actividad transcripcional de STAT3 inducida por IL-6. Esta respuesta de inhibición fue dependiente de la concentración del compuesto, siendo su IC₅₀ próxima a 0,7 μ M.

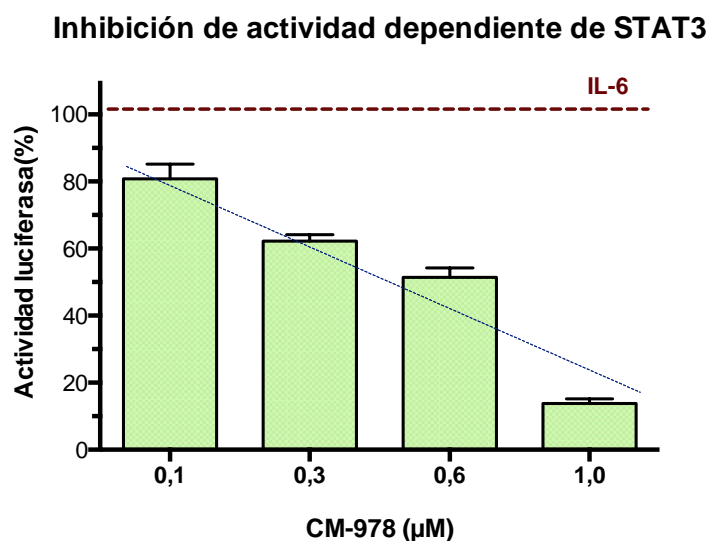


Figura 6. Inhibición de la actividad de STAT3 inducida por IL-6 por el compuesto CM-978 de forma dependiente de la concentración.

1.4.3 Análisis por western blot

La línea celular BT549, derivada de cáncer de mama triple negativo humano (CMTN), expresa de forma constitutiva STAT3 (PY-STAT3). Tras la incubación de estas células con el compuesto CM-978 a 5 µM durante sólo 3 h, se produce una drástica reducción de la activación de STAT3, cómo revelan los resultados del análisis por western blot. Un efecto similar se ha observado en otra línea celular de CMTN (HS578T), que también expresa de forma constitutiva STAT3 activado (ver figuras 7 y 8).

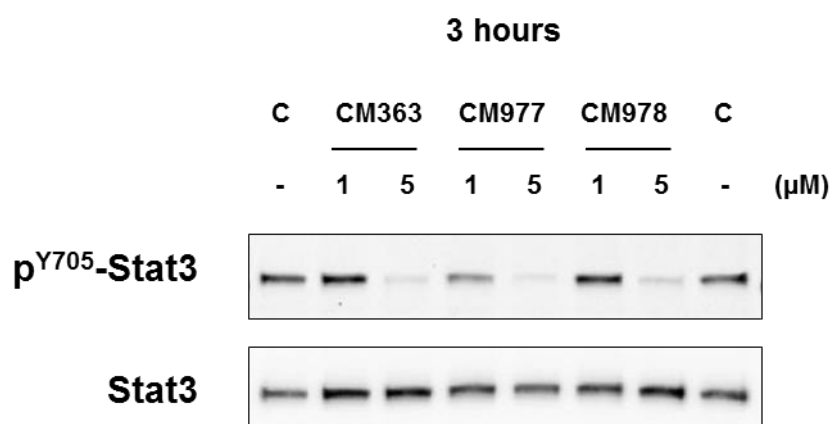


Figura 7. Inhibición de la activación de STAT3 por los compuestos CM-363, CM-977 y CM-978 en la línea de cáncer de mama triple negativo BT-549.

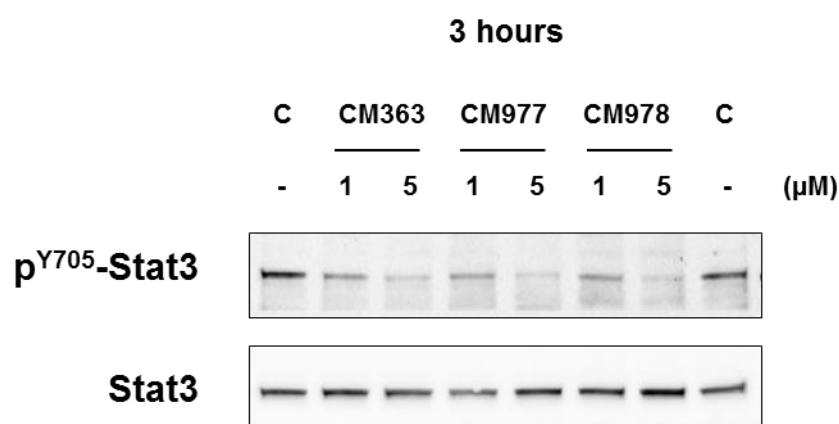


Figura 8. Inhibición de la activación de STAT3 por los compuestos CM-363, CM-977 y CM-978 en la línea de cáncer de mama triple negativo HS-578T.

1.5 Evaluación de la actividad del CM-978 en cánceres dependientes de STAT3.

El CM-978 ha demostrado reducir la viabilidad de múltiples líneas tumorales dependientes de STAT3, con valores de IC₅₀ entre 1-4 μM (ver **Tabla 1**). Estos resultados demuestran que el CM-978 es un agente citotóxico muy potente.

Cáncer de mama		Próstata	Pulmón	Colon
MDA-MB-231	T47D	DU-145	NCI-1299	HT-29
0.7	0.9	2.0	1.1	4.0

Tabla 1. Datos de IC₅₀ (μM) para el CM-978 en varios cánceres no hematológicos. Datos de ensayos de viabilidad celular con MTT a 48h.

1.6 Estudios de toxicidad in vivo.

Se realizaron estudios de toxicidad aguda (Test de Irwin) para el compuesto CM-978, tanto por vía intraperitoneal como por vía oral.

1.6.1 Test de Irwin (administración por vía intraperitoneal)

Diseño del estudio:

- Animales: ratones FVB (hembras de 6 semanas de edad)
- Dosis: 20 mg/kg de CM-978
- Tiempo de administración: 5 días consecutivos.

Resultados del estudio de toxicidad por vía intraperitoneal (Figura 9):

Observaciones externas:

- No se observaron signos significativos de toxicidad.
- El peso corporal se mantiene.
- La observación más constante fue la piloerección, que fue reversible generalmente 90 minutos tras la administración.

Observaciones internas:

- No se observaron daños en órganos internos.

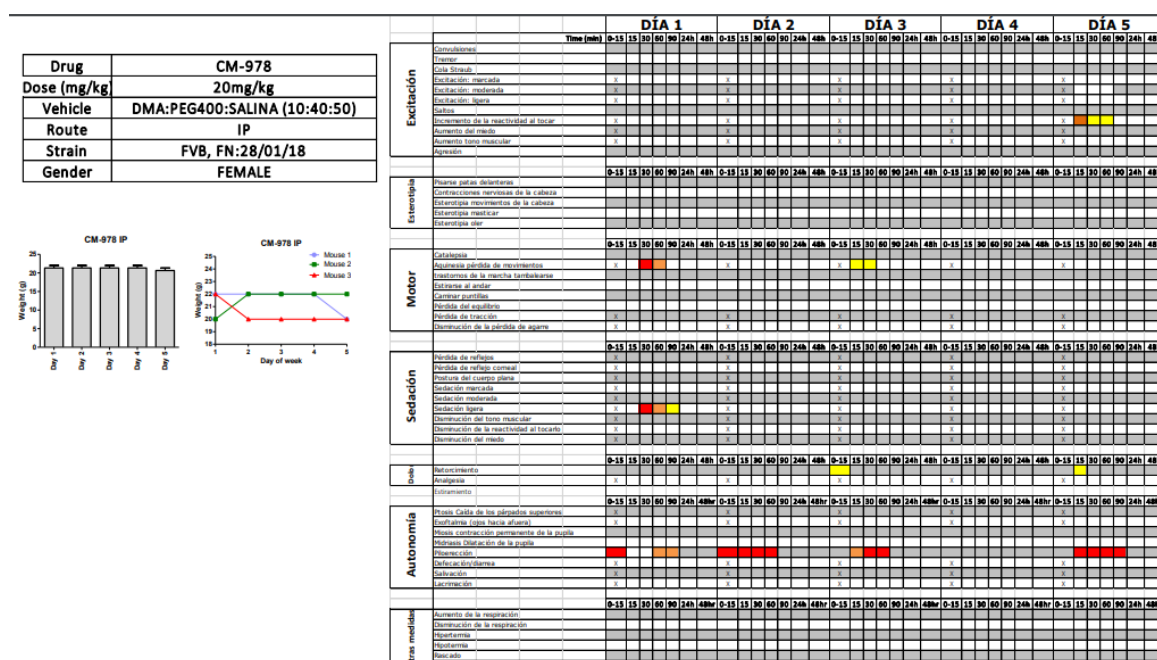


Figura 9. Observaciones diarias tras la administración de ratones FVB con CM-978 por vía intraperitoneal.

1.6.2 Test de Irwin (administración por vía oral)

Diseño del estudio:

- Animales: ratones FVB (hembras de 6 semanas de edad)
- Dosis: 50 mg/kg de CM-978
- Tiempo de administración: 5 días consecutivos.

Resultados del estudio de toxicidad por vía oral (Figura 10):

Observaciones externas:

- No se observaron signos significativos de toxicidad.
- El peso corporal se mantiene.

Observaciones internas:

- No se observaron daños en órganos internos.
- Posibles signos de restos del compuesto a nivel estomacal.

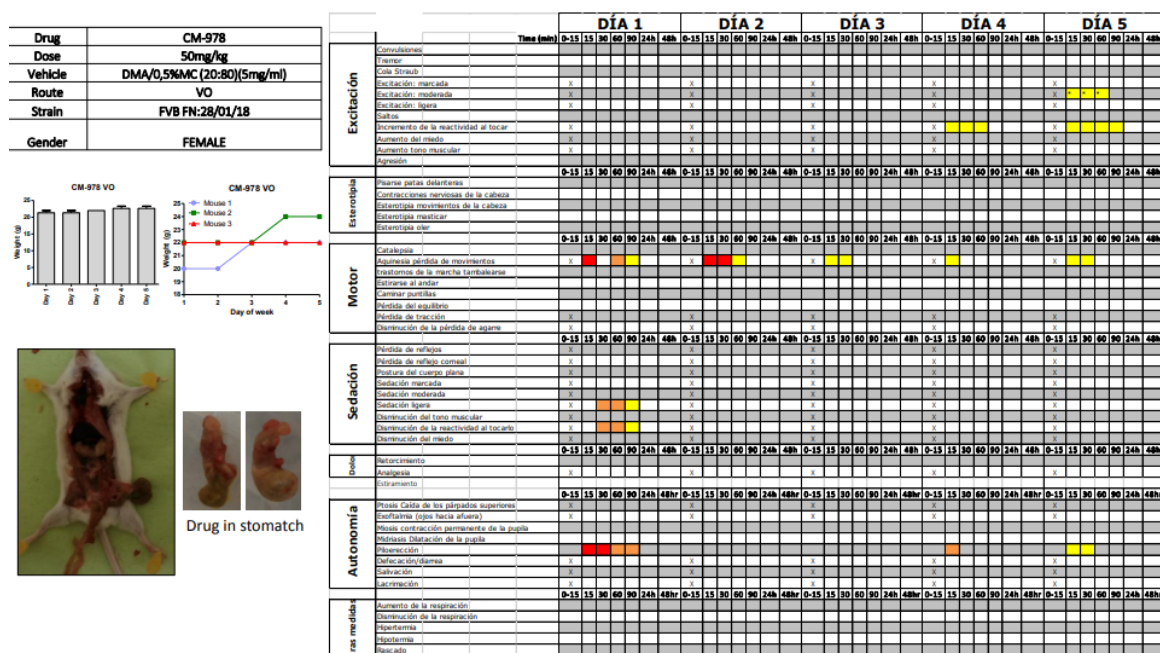


Figura 10. Observaciones diarias tras la administración de ratones FVB con CM-978 por vía oral.

Conclusiones

El test de toxicidad aguda (5 días) para el CM-978 muestra que el compuesto es bien tolerado durante un periodo de 5 días, tanto por vía oral como por vía intraperitoneal.

1.7 Estudios de farmacocinética y metabolización hepática

1.7.1 Farmacocinética en ratas

Este estudio fue desarrollado en la empresa Advinus Eurofins.

Diseño del estudio:

- Animales: Ratas macho Sprague-Dawley.
- Vías de administración: Intravenosa (IV) y oral (VO).
- Dosis: (IV: 1 mg/kg y VO: 10 mg/kg)

Resultados (Ver figura 11 y tabla 2):

- CM-978 está biodisponible tras la administración por vía oral (%F= 95)
- La vida media tras la administración por vía intravenosa (IV) es buena (1,8 h)
- La tasa de aclaramiento es baja y el nivel de distribución es alto.
- La concentración máxima obtenida (C_{max}) tras la administración oral (10 mg/kg) es mayor de 1 μM, IC₅₀ tras 5 h.

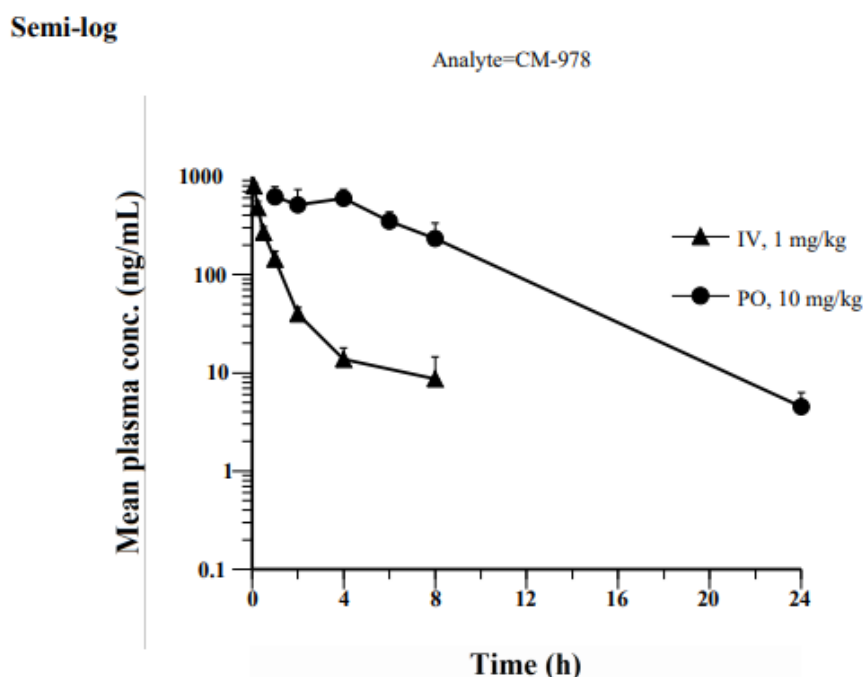


Figura 11. Concentración plasmática de CM-978 en ratas tras la administración IV y VO.

Treatment	Route/ Dose (mg/kg)	T _{max} ^a (h)	C ₀ /C _{max} (ng/mL)	AUC _{last} (ng.h/mL)	CL (mL/min/kg)	V _{ss} (L/kg)	T _{1/2} (h)	%F ^b
CM-978	IV / 1	NA	1030 ± 67.6	568 ± 88.4	28.8 ± 4.61	2.38 ± 0.295	1.84 ± 0.482	NA
	PO/ 10	4.00 (2.00- 4.00)	632 ± 145	5400 ± 1480	NA	NA	5.29 ^d ± 0.643	95

Tabla 2. Propiedades farmacocinéticas del CM-978 tras la administración por vía oral e intravenosa.

1.7.2 Farmacocinética en ratones

Estudio desarrollado en Advinus Eurofins.

- Animales: ratones hembras BALB/c
- Rutas de administración: VO
- Dosis: 5, 10 y 30 mg/kg
- Frecuencia: una vez al día durante 5 días consecutivos.

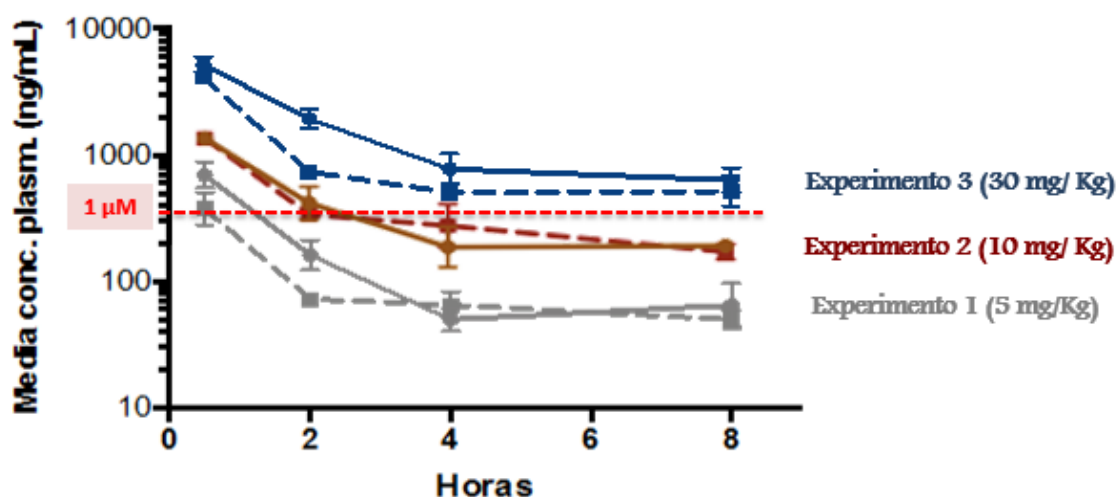


Figura 12. Concentración plasmática de CM-978 en ratones tras la administración por vía oral a distintas dosis. Líneas sólidas (día 1), líneas discontinuas (día 5).

Resultados:

El CM-978 está biodisponible en ratones. El parámetro AUC (área bajo la curva) aumenta con la dosis, y no se observan signos de acumulación. Los niveles del compuesto en sangre por encima de $1\mu\text{M}$ se mantienen al menos durante ocho horas a una concentración de 30 mg/kg de CM-978.

1.7.3 Metabolización hepática

Diseño del estudio: El compuesto CM-978 se incubó a una concentración de $10 \cdot 10^{-7}$ con microsomas hepáticos humanos y se determinó la cantidad de CM-978 a distintos tiempos (T = 0, 15, 45 y 60 minutos) mediante cuantificación por LC/MS/MS.

Tiempo (min)	CM-978 remaining (%)	CM-978 remaining (%) n = 2
0	100.0	100.0
15	101.3	101.3
30	96.8	100.0
45	96.2	96.0
60	91.7	92.0

Los valores resultantes de vida media fueron superiores a 60 minutos y los valores de C_{int} (*Intrinsic clearance*) fueron inferiores a $115 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$, indicando que el CM-978 es estable en el metabolismo de microsomas hepáticos humanos.

El compuesto CM-978 es biodisponible por vía oral, tiene elevados niveles de distribución y una buena vida media en ratas. En ratones, se mantienen de forma sostenida los niveles del compuesto en plasma por encima de 1 μM , pueden mantenerse por más de 8 horas tras la administración oral a 30 mg/kg.

1.8 Conclusiones

- CM-978 es un inhibidor de la activación STAT5 dependiente de IL3, y de la activación de STAT3 dependiente de IL-6 a valores $\text{IC}_{50} < 1 \mu\text{M}$. Esto implica que su actividad es **100 veces más potente** que la del compuesto natural silibinin y con similares efectos a los observados con Ruxolitinib.
- CM-978 reduce significativamente los niveles de STAT3 activado (PY-STAT3) en células de cáncer donde STAT3 está constitutivamente activo, lo que se traduce en una disminución en la viabilidad de las células tumorales.
- El compuesto CM-978 está altamente biodisponible tras la administración oral y posee una buena farmacocinética en ratas y ratones.
- Los datos extraídos de microsomas hepáticos sugieren que el compuesto puede ser estable frente al metabolismo hepático humano.

1.9 Perspectivas

- Estudio del compuesto CM-978 en la respuesta inflamatoria asociada a la tormenta de citoquinas en modelos *in vitro* e *in vivo*.
- Estudio del compuesto CM-978, así como otros compuestos de esta u otras líneas de la empresa, como posibles agentes anti-virales (SARS-CoV-2).

En base a los datos actualmente disponibles, el compuesto CM-978 tiene características favorables para ser contemplado en futuros estudios para evaluar su rol potencial en la inhibición de la señalización de STAT3 inducida por IL-6 que tiene lugar en casos severos de COVID-19.