



FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia

DESCUBRIMIENTO Y DESARROLLO DE EZETIMIBA

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Junio 2015

Autor: Laura Martínez Orts

Modalidad: Artículos científicos SCI

Tutor/es: Dr. Juan Javier Ortiz Carricondo

ÍNDICE

1. RESUMEN

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Aterosclerosis

2.2. Homeostasis del colesterol

2.3. Colesterol, triglicéridos y lipoproteínas en circulación

2.3.1. Quilomicrones y residuos

2.3.2. Lipoproteínas de muy baja densidad

2.3.3. Lipoproteínas de baja densidad

2.3.4. Lipoproteínas de alta densidad

2.3.5. Lipoproteínas de densidad intermedia

2.4. Fuentes de colesterol circulante e importancia de la bilis

3. PREVENCIÓN DE LA ATEROSCLEROSIS

3.1. Evolución de los fármacos hipolipemiantes

3.1.1. Elevación de la circulación de HDL: ácido nicotínico o niacina

3.1.2. Inhibición de la reabsorción de colesterol en el intestino: resinas de intercambio iónico

3.1.3. Elevación de la actividad lipoproteína lipasa: los fibratos

3.1.4. Inhibición de la biosíntesis de colesterol: las estatinas

4. DESCUBRIMIENTO Y DESARROLLO DE 21: EL PROTOTIPO DE AZETIDINA CAPAZ DE INHIBIR LA ABSORCIÓN DE COLESTEROL

4.1. Relaciones Estructura-Actividad

4.1.1. Cambios en la posición C4

4.1.2. Cambios en la posición N1

4.1.3. Cambios en la posición C3

5. EL DESCUBRIMIENTO DE LA AZETIMIBA

5.1. Importancia de los metabolitos activos

5.2. Diseño final

5.3. Síntesis de descubrimiento

6. FARMACOCINÉTICA DE LA EZETIMIBA

7. EZETIMIBA Y ESTATINAS

8. ENSAYOS CLÍNICOS

9. DESCUBRIMIENTO DE LA DIANA MOLECULAR

10. CONCLUSIONES

11. ANEXO 1. PROTOCOLO DE EXPERIMENTACIÓN IN VIVO



1. RESUMEN

La hiperlipidemia es una importante causa de aterosclerosis y de enfermedades vinculadas con esta última como cardiopatía coronaria. A finales de la década de los 80' ya se habían desarrollado varios tipos de fármacos hipolipemiantes, pero ninguno de ellos actuaba impidiendo la absorción intestinal de colesterol. Los laboratorios de investigación de la compañía Schering-Plough comenzaron un programa para descubrir nuevos inhibidores de acil-CoA-colesterol-O-aciltransferasa (ACAT), enzima que inhibe la absorción de colesterol en roedores. Para evaluar las moléculas candidatas contaban con un ensayo in vitro (modelo microsomal de inhibición de la ACAT) y con un modelo in vivo (hámster alimentado con colesterol) al que medían las concentraciones de colesterol sérico y hepático.

Partiendo de una *N*-arilamida alifática, conocida por su capacidad inhibitoria de ACAT, llegaron a un grupo de 2-azetidionas (**10**) que, siendo débiles inhibidores de ACAT, mostraban una reducción consistente de los niveles de colesterol sérico y hepático. Se hizo un estudio sistemático de las relaciones estructura-actividad de estos compuestos y se obtuvo la azetidionona optimizada **21**, que conseguía disminuciones de colesterol sérico y hepático del 43% y 93% respectivamente. Se observó que la actividad in vivo no se correlaciona con la actividad in vitro, clara señal de que la diana principal de estos inhibidores in vivo no era ACAT.

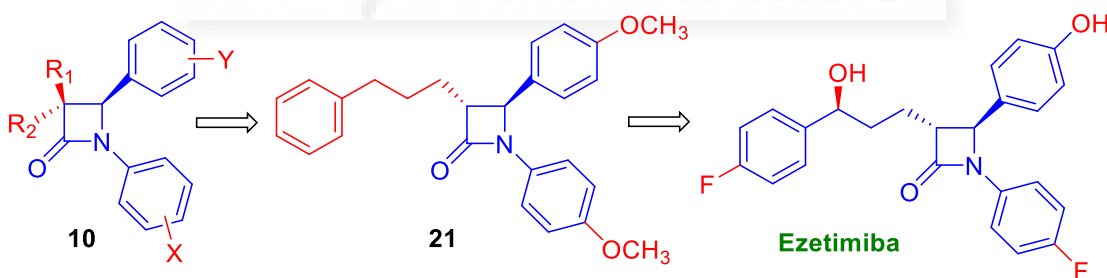


Figura 1. Progreso del programa de descubrimiento de la ezetimiba

A continuación se estudiaron los metabolitos de **21** y se descubrió que tenían una actividad variable (algunos eran más activos y otros prácticamente inactivos). Utilizando esta información se premetabolizaron las posiciones que mejoraban la actividad y se bloqueó el metabolismo de las posiciones que la empeoraban. Así se llegó a la estructura final de la **ezetimiba**, que es cincuenta veces más potente que el compuesto **21**.

2. INTRODUCCIÓN

La hiperlipidemia es una importante causa de aterosclerosis y de enfermedades vinculadas con esta última, como cardiopatía coronaria (*coronary heart disease*, CHD), enfermedad cerebrovascular de origen isquémico y vasculopatía periférica. Estas enfermedades originan la mayor parte de la morbilidad y mortalidad en los países occidentales. Las dislipemias, entre ellas hipercolesterolemia y bajas concentraciones de lipoproteínas de alta densidad (*high-density-lipoprotein cholesterol*, HDL-C), son causas importantes de un riesgo aterógeno mayor. Ambos trastornos genéticos y el estilo de vida (conducta sedentaria y dietas altas en calorías, grasa saturada y colesterol) contribuyen a las dislipemias que se observan en los países desarrollados de todo el mundo.

A pesar de una reducción continua de la incidencia de muertes relacionadas con aterosclerosis, durante los últimos 39 años las muertes por CHD, enfermedad cerebrovascular y vasculopatía periférica constituyeron el 38'5 % de los 2'4 millones de muertes en Estados Unidos en 2001. El 66% de las muertes por aterosclerosis se debió a CHD.

Dichas estadísticas ilustran la importancia de identificar y tratar los factores de riesgo para CHD. Los principales factores de riesgo conocidos son: LDL-C alto, HDL-C reducido, tabaquismo, hipertensión arterial, diabetes tipo 2, edad avanzada, estrés y antecedentes familiares que hayan sufrido CHD. Debido a este carácter multifactorial, en su prevención, será preciso abordar todos y cada uno de los factores de riesgo identificados en el sujeto y que sean susceptibles de ser modificados.¹

2.1. Aterosclerosis

Las enfermedades cardiovasculares constituyen la primera causa de mortalidad en todos los países industrializados, siendo la aterosclerosis la responsable de 50% de las muertes que se registran en occidente.

¹ Brunton Laurence L., Lazo John S., Parker Keith L. Las bases farmacológicas de la Terapéutica. Undécima Edición. España; Editorial McGraw Hill; 2006.

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica y generalizada que se localiza en la pared arterial. Se caracteriza por la combinación de cambios patológicos que afectan a la íntima por acumulación de lípidos, especialmente colesterol, y a la media por formación de tejido fibroso y calcificaciones. En la íntima, el colesterol (en forma de LDL) se acumula formando voluminosas placas, que dificultan el flujo de la sangre y favorecen la formación de trombos. A su vez, la obstrucción de la arteria provoca un deterioro progresivo de la misma, derivando en un posible ataque cardíaco o apoplejía. Las alteraciones ateroscleróticas que afectan a las arterias coronarias son la causa principal de procesos como el infarto de miocardio o la angina de pecho.

Numerosas investigaciones han confirmado que la reducción del colesterol total y de LDL, junto con un aumento de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), reduce la incidencia de cardiopatía coronaria y sus consecuencias, especialmente el infarto agudo de miocardio.²

Las características esenciales de la aterosclerosis son:

1) afectación del árbol arterial, que daña principalmente el revestimiento interno de las arterias medianas y grandes.

2) la formación de una placa fibrosa (ateroma), que reduce tanto el interior del lumen como el flujo sanguíneo.

3) el peligro de que una placa rota pueda actuar como foco para la formación de trombos.

Todas estas particularidades están íntimamente relacionadas con los niveles y la naturaleza del colesterol, un aspecto que debe ser revisado antes de evaluar las fases de iniciación y de maduración del ateroma con más detalle.³

² J. Díaz Portillo, M.T. Fernández del Barrio, F. Parede Salido. Aspectos básicos de bioquímica clínica. Madrid, España; Díaz de Santos: **1997**.

³ M. Boarder, D. Newby, P. Navti. Pharmacology for pharmacy and the health sciences, a patient-centred approach. New York, USA; Oxford University Press: **2010**.

2.2. Homeostasis del colesterol

El colesterol es una molécula indispensable para la vida, desempeña funciones estructurales y metabólicas que son esenciales para el ser humano. Tiene un papel fundamental como precursor de hormonas esteroideas, ácidos biliares y vitamina D. El colesterol es sintetizado principalmente en el hígado a través de una amplia serie de reacciones (figura 2). La HMG-CoA reductasa cataliza la etapa determinante de la velocidad de esta ruta biosintética y está regulada por mecanismos de competencia y alostéricos, por fosforilación/desfosforilación y por regulación a largo plazo.

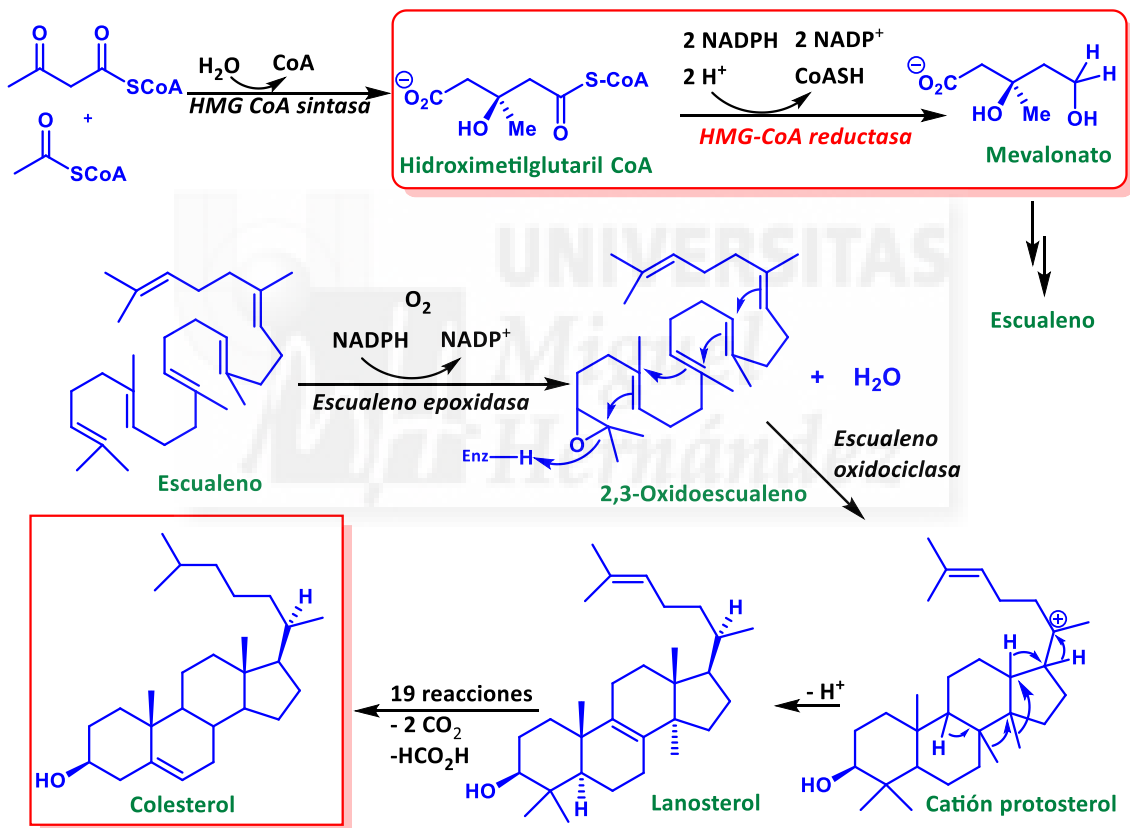


Figura 2. Resumen de la biosíntesis del colesterol

En la figura 3 se esquematizan las interacciones entre los tejidos periféricos, el hígado y el intestino en el mantenimiento de la homeostasis del colesterol. El hígado representa un papel central en la regulación del metabolismo del colesterol y de las cifras séricas de C-LDL. En situaciones de equilibrio homeostático, la cantidad de colesterol excretada diariamente en las

heces es igual a la suma del sintetizado por los tejidos y del aportado por las comidas.

El equilibrio del colesterol es regulado por mecanismos de retroalimentación entre las vías endógenas y exógenas del metabolismo del colesterol. Una reducción de la entrada de colesterol intestinal por inhibición de su absorción aumenta la actividad de la HMG-CoA reductasa e intensifica la síntesis de colesterol. En cambio, una captación intestinal elevada de colesterol inhibe la HMG-CoA reductasa, reduce la síntesis hepática y produce una regulación a la baja de los rLDL.

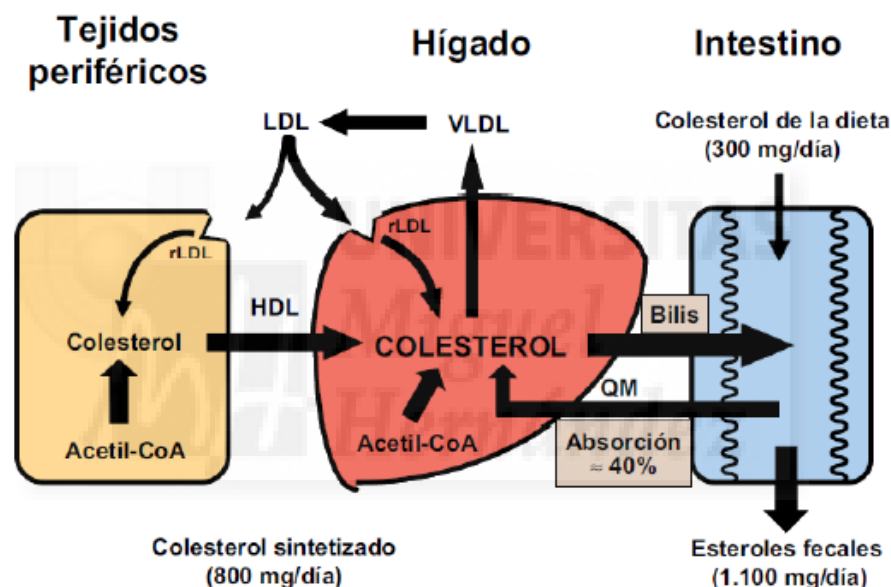


Figura 3. Homeostasis general del colesterol en el organismo. HDL: Lipoproteínas de Alta Densidad; rLDL: Receptor para las Lipoproteínas de Baja Densidad (LDL); QM: Quilomicrones; VLDL: Lipoproteínas de Muy Baja Densidad.

Por el contrario, cuando existe una depleción de colesterol, los rLDL son regulados al alza y dan lugar a un aumento de la eliminación de partículas de LDL de la sangre así como a una disminución de las concentraciones plasmáticas de LDL-C. Este equilibrio determina que para obtener una eficacia máxima en la reducción de colesterol sea necesario un doble mecanismo de acción, por un lado inhibiendo la síntesis de colesterol mediante bloqueo de la

HMG-CoA reductasa y, por otro, bloqueando la absorción del colesterol intestinal.⁴

2.3. Colesterol, triglicéridos y lipoproteínas en circulación

Tanto el colesterol como los triglicéridos son moléculas muy lipófilas insolubles en medios acuosos como la sangre, de manera que deben ser empaquetados en partículas de lipoproteína para su transporte sanguíneo.⁵

Los triglicéridos se obtienen de la dieta y además son producidos en el hígado a consecuencia del metabolismo de hidratos de carbono, alcohol, azúcar, grasas y colesterol. Son una fuente de energía importante y también son transportados en sangre dentro de lipoproteínas.

En la figura 4 se observa cómo las lipoproteínas están compuestas por una combinación específica de colesterol y triglicéridos para producir partículas de diferente tamaño y densidad. Cada lipoproteína tiene asociada una parte proteica (apolipoproteínas) que permiten la unión de las mismas a receptores específicos. Estos últimos activarán una función enzimática, la cual autoriza la degradación de las grasas contenidas en la lipoproteína. Tienen un papel fundamental en el metabolismo lipídico.⁶ Las lipoproteínas se clasifican en cinco grandes grupos en función de sus densidades. Dentro de las lipoproteínas de mayor importancia clínica encontramos las de alta densidad (*high-density lipoprotein*, HDL), de baja densidad (*low-density lipoprotein*, LDL), de muy baja densidad (*very low-density lipoprotein*, VLDL), de densidad intermedia (*intermediate-density lipoprotein*, IDL) y los quilomicrones (QM). Según los niveles plasmáticos de las diferentes lipoproteínas se pueden llevar a cabo diversas estrategias terapéuticas. A continuación se va a realizar un pequeño resumen con las principales clases de lipoproteínas y varias de sus funciones.

2.3.1. Quilomicrones y residuos. Se sintetizan en el intestino a partir de los triglicéridos y colesterol absorbidos en la dieta. Después de entrar en la

⁴ O. Maldonado, I. Ramírez, J.R. García, G.M. Ceballos, E. Méndez. Colesterol: Función biológica e implicaciones médicas. *Rev mex cienc Farm.* **2012**; 43(2): 7-22.

⁵ Cofan Pujol M. Mecanismos básicos. Absorción y excreción de colesterol y otros esteroides. *Clin Invest Arteriosc.* **2014**; 2-6.

⁶ K.S. Jain, M.K. Kathiravan, R.S. Somani, C.J. Shishoo. The biology and chemistry of hyperlipidemia. *Bioorg Med Chem.* **2007**; 15: 4674-4699.

circulación, los quilomicrones se metabolizan al principio en la superficie luminal de los capilares de tejidos, que sintetizan lipoproteína lipasa (LPL), una hidrolasa de triglicéridos. A medida que los triglicéridos son hidrolizados por la LPL, los tejidos adyacentes captan los ácidos grasos libres resultantes y los utilizan como fuente de energía. La interacción de quilomicrones y LPL requiere apoC-II como un cofactor absoluto. La concentración de quilomicrones sólo puede controlarse al reducir el consumo de grasa en la dieta.

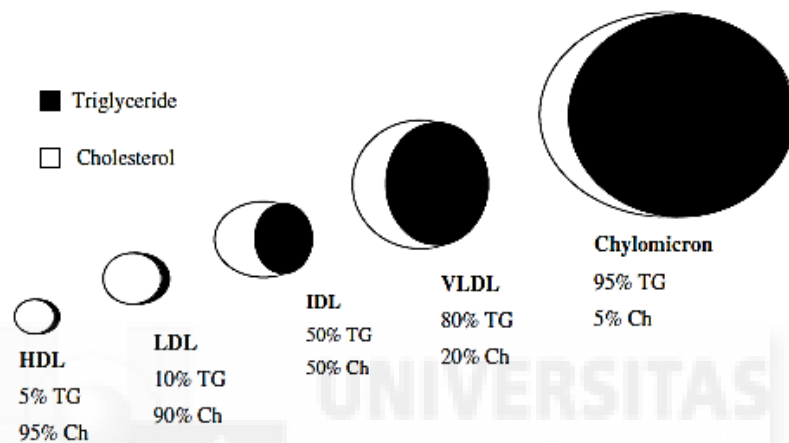


Figura 4. Clasificación de las lipoproteínas.

2.3.2. Lipoproteínas de muy baja densidad. Las VLDL se forman en el hígado cuando se estimula la producción de triglicéridos “endógenos” o hepáticos. Las partículas de VLDL son lo bastante grandes para enturbiar el plasma, pero a diferencia de los quilomicrones no flotan espontáneamente hasta la parte superior de un tubo de plasma en reposo. Tienen la misma función que los quilomicrones: hidrolizar los triglicéridos mediante la LPL.

La apoB-100, apoE, así como apoC-I, apoC-II y apoC-III se sintetizan de manera consecutiva en el hígado y se incorporan a las VLDL.

2.3.3. Lipoproteínas de baja densidad. Las partículas de LDL son sintetizadas en el hígado. Tienen una concentración elevada de colesterol y moderada en fosfolípidos y no contienen triglicéridos. Su apolipoproteína asociada de mayor importancia es apoB-100, indispensable para unirse a su rLDL. Nuestro organismo cuenta con receptores específicos para las LDL en casi todas las membranas celulares, que identifican, captan e interiorizan las LDL. Es de gran interés clínico ya que posee una alta aterogenicidad,

típicamente representa entre 60-70% del colesterol sérico total y su función es transportar el colesterol desde el hígado hacia los tejidos periféricos.

2.3.4. Lipoproteínas de alta densidad. El C-HDL es conocido por ser protector contra las enfermedades cardiovasculares. Su principal función es extraer colesterol de las lesiones ateroscleróticas y transportarlo hacia el hígado para su posterior metabolismo. La principal proteína de las HDL es la apo A-1, encargada del destino de las HDL. Otras proteínas que se encuentran en menores cantidades son la apoA-II, apoC-I, apoC-II, apoC-III y apoE. En el plasma, el C-HDL se convierte en un éster de colesterol por acción de la Lecitin Colesterol Acil Transferasa (LCAT). Mientras que circulan en el torrente sanguíneo, las partículas de C-HDL adquieren más colesterol del torrente sanguíneo. Además, éstas van a eliminar el colesterol a través de un proceso de Transporte Inverso de Colesterol (TIC) desde los tejidos periféricos y de ateroma en las arterias hasta el hígado, llevando aproximadamente el 30% del colesterol sérico.

2.3.5. Lipoproteínas de densidad intermedia. Las IDL tienen altas concentraciones de colesterol y fosfolípidos, pues provienen del proceso de degradación de las VLDL y de la hidrólisis de los triglicéridos. Por lo tanto son partículas más heterogéneas, porque la LPL continúa catalizando la degradación de TG y produciendo ácidos grasos libres y glicerol, en tanto esté ligada a la VLDL por la apoC-II.⁷

2.4. Fuentes de colesterol circulante e importancia de la bilis

Hay dos vías de obtención de colesterol. Una de ellas es la dieta, donde el colesterol exógeno es absorbido desde el intestino y es transportado en el interior de los quilomicrones hasta llegar finalmente al hígado. La otra es la síntesis de novo en el hígado (colesterol endógeno).

La bilis se produce en el hígado y pasa a través del conducto biliar a los intestinos. Está formada por ácidos biliares conjugados con aminoácidos como

⁷ O. Maldonado, I. Ramírez, J.R. García, G.M. Ceballos, E. Méndez. Colesterol: Función biológica e implicaciones médicas. Rev mex cienc Farm. **2012**; 43(2): 7-22.

glicina y taurina (ver figura 5). Actúan como agentes emulsionantes que solubilizan los lípidos de la dieta, facilitando su absorción. Es importante destacar que estos detergentes son derivados parcialmente oxidados de colesterol. El colesterol del hígado es incorporado en la bilis, a continuación pasa al interior del intestino, y se reabsorbe finalmente en el torrente sanguíneo junto con las grasas de la dieta. De este modo, la inhibición de la reabsorción de la bilis podría reducir tanto el colesterol obtenido de la dieta como el colesterol sintetizado de novo en el hígado.³

3. PREVENCIÓN DE LA ATEROSCLEROSIS

El objetivo principal del tratamiento de las dislipemias será evitar la aparición de eventos cardiovasculares y retrasar la morbilidad y mortalidad del paciente. La relación entre las concentraciones séricas de colesterol y enfermedad coronaria es conocida desde hace muchos años.

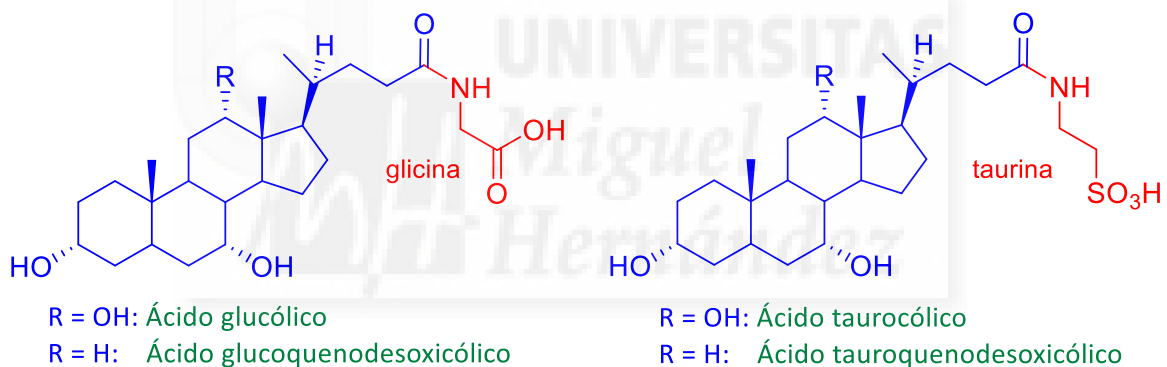


Figura 5. Componentes principales de la bilis.

El primer gran estudio clínico de prevención cardiovascular realizado con un fármaco hipocolesterolemiante (la colestiramina) hace 20 años (*Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial*) confirmó la reducción de la incidencia de enfermedad cardíaca coronaria al disminuir las cifras de colesterol. Desde entonces, numerosos estudios epidemiológicos y clínicos han confirmado la asociación positiva entre colesterol total y C-LDL y el riesgo de desarrollar arteriosclerosis y enfermedad cardíaca coronaria.⁸

⁸ Cofan Pujol M. Mecanismos básicos. Absorción y excreción de colesterol y otros esteroides. *Clin Invest Arteriosc.* 2014; 2-6.

3.1. Evolución de los fármacos hipolipemiantes

Se han desarrollado cuatro estrategias farmacológicas diferentes para conseguir un mejor control de los niveles lipídicos en sangre. Éstas se clasifican de acuerdo a los principales mecanismos de acción.

3.1.1. Elevación de la circulación de HDL: ácido nicotínico o niacina

Una de las primeras sustancias utilizadas para disminuir el colesterol fue el ácido nicotínico o niacina (ver figura 6), fármaco aún en uso y con un excelente perfil hipolipemiante, que produce reducciones marcadas tanto del C-LDL como de los TG, además de una elevación del C-HDL. Recientemente se han cumplido 50 años del descubrimiento de sus acciones en el metabolismo lipídico, las cuales datan de principios de la década de 1950.

Requieren dosis altas y mantenidas para conseguir un buen efecto hipolipemiante, por lo que son frecuentes las reacciones adversas que obstaculizan el buen cumplimiento terapéutico. Entre ellas destacan vasodilatación cutánea y alteraciones hepáticas con leve aumento de transaminasas y fosfatasa. Está contraindicado si existe úlcera péptica, gota, diabetes o enfermedad hepática.⁹

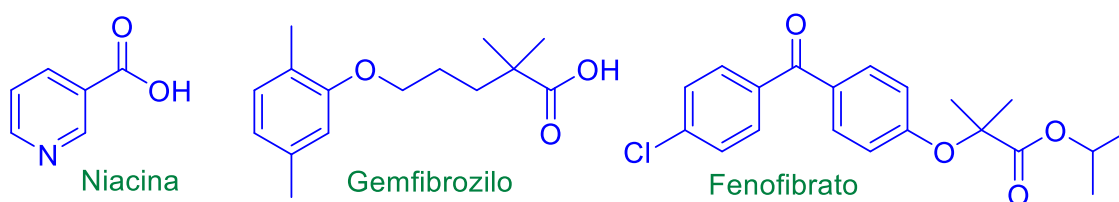


Figura 6. Estructuras de varios hipolipemiantes

3.1.2. Inhibición de la reabsorción de colesterol en el intestino: resinas de intercambio iónico.

Las resinas son de los hipolipidémicos más antiguos y tal vez los más seguros. Estas sustancias evitan el ascenso del colesterol sérico derivado de una comida rica en colesterol, presumiblemente por la precipitación intestinal

⁹ J. Flórez, J.A Armijo, Á. Mediavilla. Farmacología humana. Barcelona, España; Editorial Masson; 2003.

de las sales biliares. Las resinas de intercambio iónico se desarrollaron a principios de la década de 1960, siendo la primera de ellas, la colestiramina.

Se trata de compuestos insolubles y no se absorben en el intestino; de ahí que administradas por vía oral tengan una especial capacidad de fijar sales biliares, impedir que éstas se reabsorban y facilitar su eliminación por las heces. Esto altera el metabolismo del colesterol y en consecuencia, disminuyen el contenido de colesterol hepático, regulan positivamente la expresión de receptores LDL en el hígado y aumentan la depuración de C-LDL. Las dosis máximas podrían llegar a reducir el C-LDL hasta en un 25%, pero causan efectos gastrointestinales como estreñimiento y dispepsia y los pacientes no las toleran demasiado bien. Además, interfieren con la absorción de algunos fármacos como la warfarina y la digoxina, por ello la toma de algunos fármacos debe adelantarse dos horas o retrasarse al menos 4 horas.¹⁰

3.1.3. Elevación de la actividad lipoproteína lipasa: los fibratos

El clofibrato se descubrió en 1962 en Reino Unido tras una serie de estudios experimentales en ratas para evaluar el efecto de compuestos isobutirados sobre la concentración sérica de colesterol. Pronto pasó a ser uno de los fármacos empleados de forma más habitual para el tratamiento de las dislipemias. Sin embargo, tras la realización de los primeros ensayos clínicos en Europa se observó que producía un incremento de la mortalidad, lo que condujo a su sustitución por nuevos fármacos de esta familia como el gemfibrozilo, fenofibrato y bezafibrato (ver figura 6).

Los fibratos tienen efectos complejos sobre la regulación lipídica. Todos estos fármacos reducen principalmente los triglicéridos del plasma y en mucho menos grado y de forma más inconstante el colesterol. Son compuestos generalmente bien tolerados, pero causan miopatía potencialmente grave asociada a la inflamación y a la ruptura de las fibras musculares. Dado que

¹⁰ O. Maldonado, I. Ramírez, J.R. García, G.M. Ceballos, E. Méndez. Colesterol: Función biológica e implicaciones médicas. *Rev mex cienc Farm.* **2012**; 43(2): 7-22.

poseen los mismos efectos adversos que las estatinas, estos dos medicamentos rara vez se utilizan juntos, y sólo con gran precaución.

3.1.4. Inhibición de la biosíntesis de colesterol: las estatinas

En 1976, Endo y col., aislaron las estatinas a partir de un moho, *Penicillium citrinum*, y las identificaron como inhibidores de la síntesis de colesterol. Posteriormente, Brown y Goldstein establecieron que las estatinas actúan al inhibir la reductasa de HMG-CoA. La primera estatina estudiada fue la *mevastatina*, que demostró el potencial terapéutico de esta clase de fármacos. Sin embargo, Alberts y col., crearon la primera estatina, lovastatina, que se aprobó para uso en seres humanos en 1987, y que se aisló a partir de *Aspergillus terreus*.

Actualmente son los fármacos de primera elección para el tratamiento de pacientes en que predomina el incremento de colesterol plasmático. Son inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa), enzima limitante en la biosíntesis de colesterol. Son los compuestos más eficaces y mejor tolerados. Aunque está claro que las estatinas ejercen sus principales efectos sobre la CHD al disminuir el C-LDL y mejorar el perfil de lípidos según se expresa en las concentraciones plasmáticas de colesterol, se han atribuido a estos fármacos muchísimos efectos cardioprotectores y antiinflamatorios en la aterosclerosis (Libby y Aikawa, 2003).¹¹

El principal efecto adverso de importancia clínica relacionado con el uso de estatinas es la miopatía (inflamación de los músculos). Hace unos años la FDA registró varias muertes por rabdomiólisis (degeneración de las fibras musculares esqueléticas) inducida por estatinas. La incidencia de miopatía es muy baja, pero el riesgo de miopatía y rabdomiólisis aumenta en proporción con las concentraciones de estatinas en plasma.

En cuanto a las aplicaciones terapéuticas, cada estatina tiene una dosis inicial baja recomendada que reduce el C-LDL un 20 a 30%. Por esta razón es

¹¹ K. Shimizu, M. Aikawa, K. Takayama, P. Libby and R.N. Mitchell. Direct Anti-Inflammatory Mechanisms Contribute to Attenuation of Experimental Allograft Arteriosclerosis by Statins. *Circulation*. **2003**; 108:2113-2120.

aconsejable iniciar a cada enfermo con una dosis que logrará disminuir su C-LDL según los objetivos terapéuticos deseados.

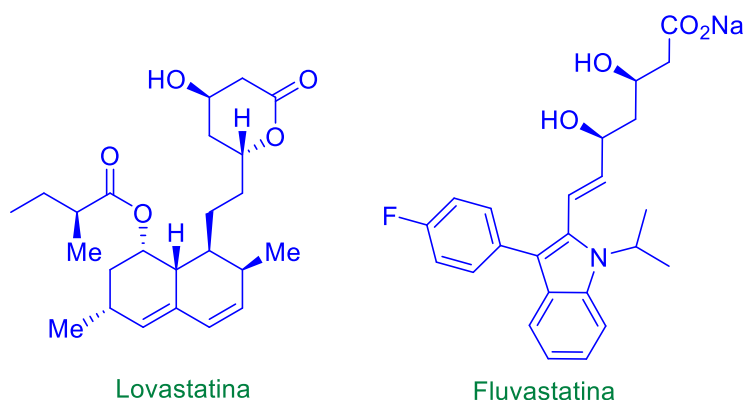


Figura 7. Estatinas naturales y sintéticas.

4. DESCUBRIMIENTO Y DESARROLLO DE 21: EL PROTOTIPO DE AZETIDINA CAPAZ DE INHIBIR LA ABSORCIÓN DE COLESTEROL

El programa de descubrimiento que condujo en última instancia a la ezetimiba comenzó a finales de la década de los 80' en los laboratorios de investigación de la compañía Schering-Plough en New Jersey.¹² Su objetivo era descubrir nuevos inhibidores del enzima acil-CoA-colesterol-O-aciltransferasa (ACAT) para desarrollar un fármaco que impidiera la absorción intestinal de colesterol. Se sabía que este enzima era importante en el tráfico de colesterol, incluyendo su absorción, en roedores, aunque no estaba clara su importancia en otras especies.¹³ No obstante, sí eran conocidos una serie de compuestos que actuaban como potentes inhibidores de la ACAT in vitro, que además mostraban actividad en modelos animales in vivo disminuyendo sus niveles de colesterol. Entre estos modelos se encuentra el *hámster alimentado con colesterol*.¹⁴ Una dieta rica en colesterol aumenta drásticamente sus niveles de ésteres de colesterol hepático (CE), haciendo que estos animales sean especialmente sensibles a la inhibición de la ACAT. Por el contrario, los niveles

¹² J.W. Clader. The Discovery of Ezetimibe: A View from Outside the Receptor. J Med Chem. 2004; 47: 1-9.

¹³ Hoy en día se conoce la función de esta enzima: cataliza la formación de ésteres de colesterol para su incorporación a lipoproteínas VLDL o para su almacenamiento celular

¹⁴ Ver anexo 1

de colesterol sérico (SC) no cambian tras la administración de este tipo de dietas, de manera que la mayoría de los inhibidores de la ACAT muestran un mínimo efecto en los niveles de colesterol en suero.

La investigación tomó como punto de partida el compuesto **3**, conocido inhibidor de ACAT. En la figura 8 se muestran los perfiles in vivo e in vitro de **1** y **2**, compuestos diseñados a partir de **3**. Estos inhibidores mostraron relaciones estructura-actividad claramente definidas, consistentes con una diana molecular bien definida. La restricción conformacional de **1** condujo al indano **2**, que mostró tanto un aumento significativo en la potencia in vitro como en el modelo in vivo.¹⁵

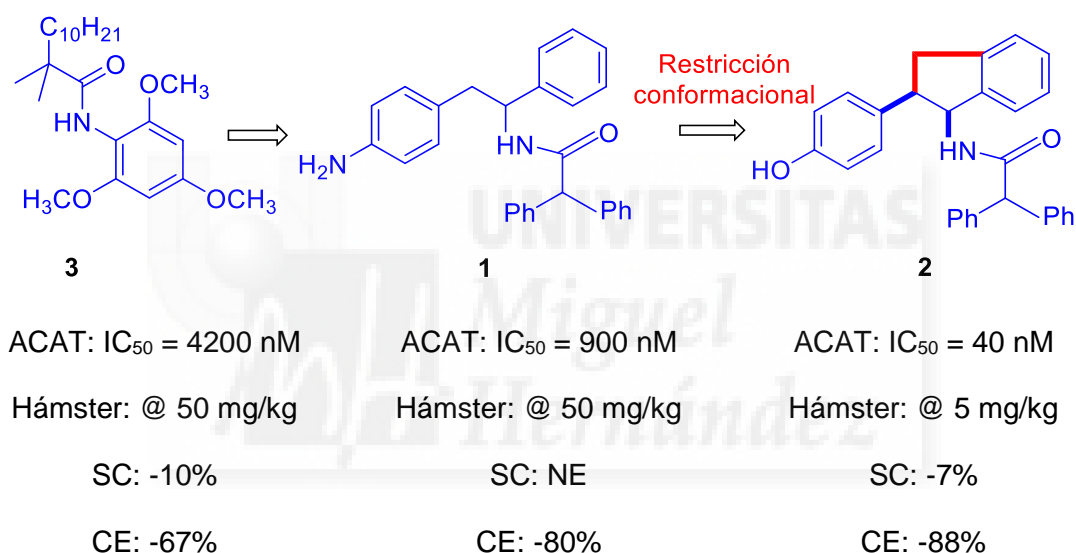
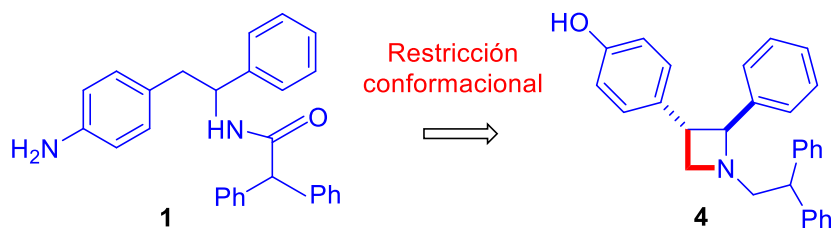


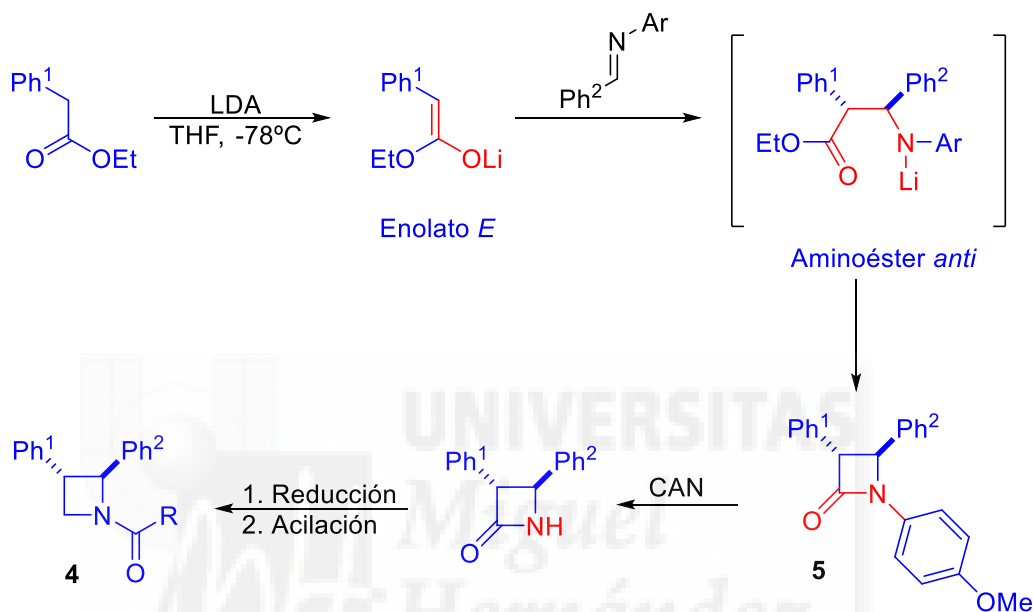
Figura 8. Primeros Inhibidores de la ACAT.

Además de **2**, otros análogos con restricciones conformacionales fueron preparados para evaluar su impacto in vitro e in vivo. Entre ellos estaba la *N*-acilazetidina **4** propuesta por Burnett y col. Estos compuestos se prepararon mediante una condensación entre el enolato de litio de un éster y una imina para dar la azetidionona **5**, que tras ser desprotegida y reducida se aciló con una variedad de ácidos (Esquema 1).

¹⁵ D. A. Burnett, M.A. Caplen, H.R. Davis, R.E. Burrier, J.W. Calder. 2-Azetidinones as Inhibitors of Cholesterol Absorption. *J. Med. Chem.* **1994**; 37: 1733-1736.



Síntesis de azetidinas



Esquema 1. Diseño y síntesis de las primeras azetidinas.

En la práctica, la condensación éster-imina dio lugar a un modesto rendimiento de la deseada azetidina **5**, acompañada por una pequeña cantidad de subproducto **6**. Se probó la actividad de los tres azetidinas (**4**, **5** y **6**) que fueron evaluadas tanto in vitro (capacidad inhibitoria de la ACAT) como in vivo (reducción del colesterol sérico y hepático en hámsteres alimentados con colesterol) (ver figura 9).

Ninguno de los compuestos era un potente inhibidor de la ACAT, aunque el compuesto **6** mostró cierta actividad con una IC_{50} de aproximadamente $7\mu M$. A pesar de esta insignificante actividad, **6** evidenció una mejora en la actividad del modelo in vivo. Esto quedó reflejado con un descenso tanto del colesterol hepático como del colesterol sérico. Un seguimiento inicial de este compuesto por Burnett y col. demostraron que no era un hallazgo aislado, ya que varios

análogos de **6** presentaron un perfil similar de débil actividad ACAT acompañado de un efecto modesto, pero reproducible en el CE y el SC de los hámsteres (ver de nuevo figura 9).

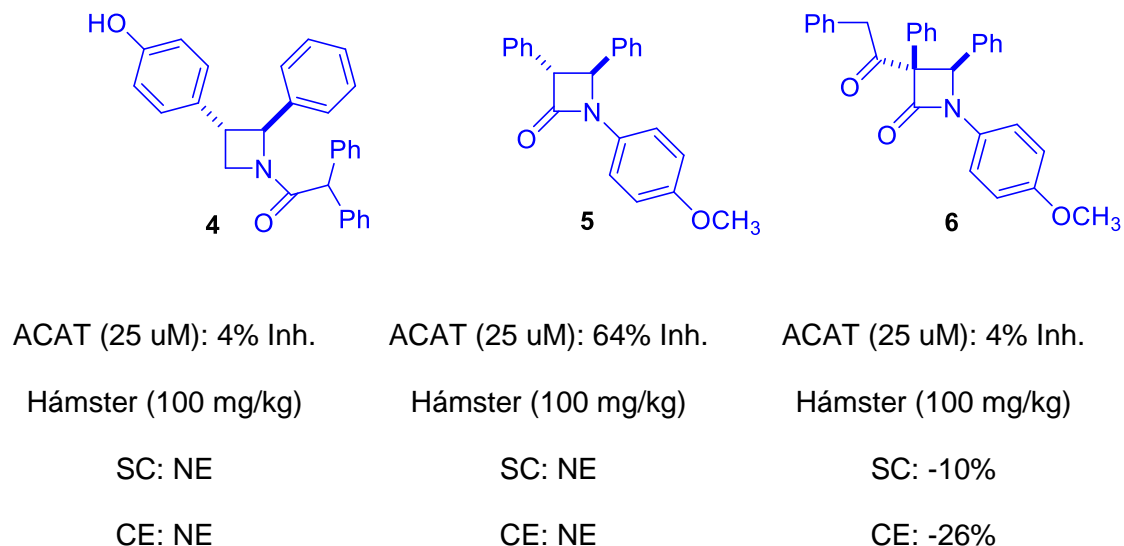


Figura 9. Actividad in vivo e in vitro de las primeras azetidionas.

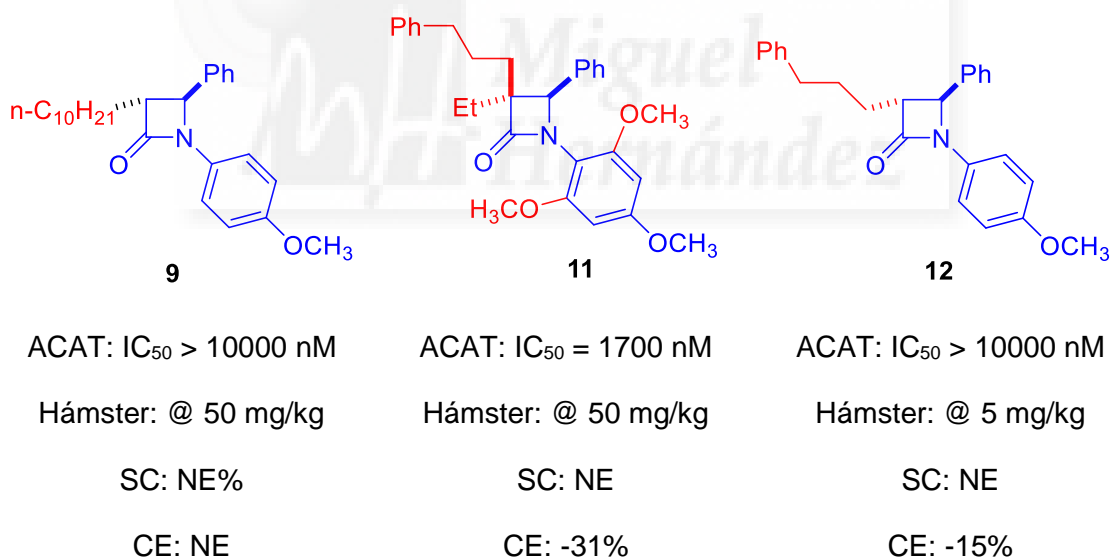


Figura 10. Relaciones estructura-actividad de las primeras azetidionas.

4.1. Relaciones Estructura-Actividad

Incluso en esta primera etapa de descubrimiento de las primeras azetidionas, las relaciones estructura-actividad eran más que evidentes como por ejemplo la pérdida de actividad con el derivado alifático **9**. La mejora de la inhibición de la ACAT de estos compuestos, tal y como ocurre con el

compuesto **11** que porta dos grupos metoxilo adicionales respecto a **3**, tuvo poco o ningún impacto en la actividad in vivo de los compuestos (figura 10). *Burnet y col., viendo que estos compuestos no tenían prácticamente actividad in vivo, pero sí in vitro, optaron por desprestigiar la capacidad inhibitoria de la ACAT y se centraron en optimizar su actividad in vivo.*¹⁶

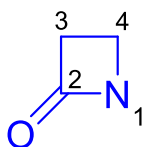


Figura 11. Numeración de azetidiononas

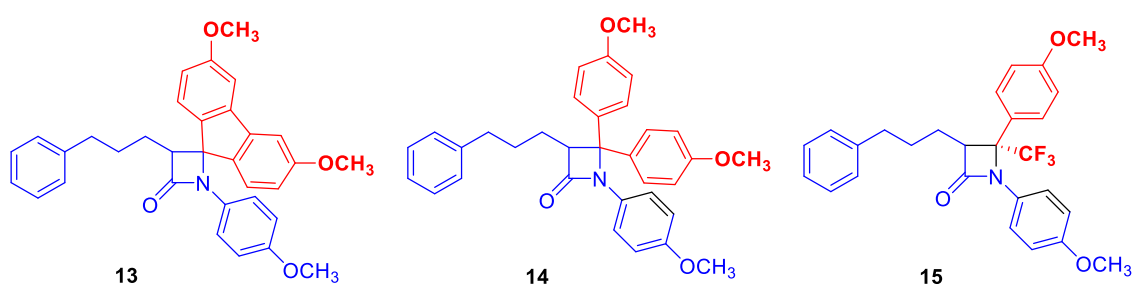
4.1.1. Cambios en la posición C4.

En primer lugar, a partir del ensayo in vivo, se investigaron las relaciones estructura-actividad en la posición C4 (ver figura 11). En un estudio de seguimiento limitado (Figura 12), se prepararon varios compuestos disustituidos en C4, incluyendo dos compuestos simétricos, **13** y **14**, los cuales combinan la configuración 4*S*- y 4*R*- *p*-metoxifenilo en una sola molécula. Ninguno de los compuestos mostró una actividad significativa en el hámster alimentado con colesterol. El compuesto **15**, que porta un grupo trifluorometilo en C4, también estaba casi desprovisto de actividad, lo que sugiere que la disustitución en C4 no es bien tolerada en las azetidiononas.

Establecida la importancia de los sustituyentes en C4 se inició un estudio detallado de posibles sustituyentes del fenilo en C4 para observar los resultados de la actividad in vivo e in vitro. Los resultados de este estudio muestran que *la actividad es extremadamente sensible tanto a la naturaleza como al tipo de sustituyentes en C4*. Por ejemplo, los análogos 3-metoxifenilo **16b**, 3,4-dimetoxifenilo **16c** y 3,4-(metilendioxi)fenilo **16d** fueron menos activos que el compuesto padre **16a** (figura 13). Por otro lado, el derivado 2,4-dimetoxi **16e** tiene una actividad parecida al compuesto padre, a excepción del bencil éter **16f** y otra variedad de éteres que son bien tolerados. Los derivados

¹⁶ J.W. Clader, D.A. Burnett, M.A. Caplen, M.S. Domalski, S. Dugar, W. Vaccaro, et al. 2-Azetidinone Cholesterol Absorption Inhibitors: Structure-Activity Relationships on the Heterocyclic Nucleus. *J Med Chem.* **1996**; 39: 3684-3693

fenólicos **16g** son ligeramente menos activos que los análogos metilados. Esto puede deberse a la reducción de la absorción de estos compuestos poco solubles. El trifluorometil éter **16h** es significativamente menos activo que el compuesto padre. El grupo hidroximetilo **16i** o metoximetilo **16j** también reducen la actividad de las azetidinas. Estos datos sugirieron *la importancia del grupo p-metoxilo en C4 y que es crítico para la actividad de la azetidina la formación de, al menos, un enlace de hidrógeno aceptor en esta posición.*



Compuestos	% Cambio en Colesterol Sérico (SC)	% Cambio en Ésteres de Colesterol Hepático (CE)
13	-9	0
14	-22	-22
15	0	-11

Figura 12. Compuestos disustituídos en C4.

Los estudios sobre la estereoquímica del compuesto padre y compuestos ópticamente puros han indicado que *la actividad reside predominantemente en una estereoquímica absoluta de C4, 4S*. También se investigó la importancia de la estereoquímica relativa entre C3 y C4. Los datos obtenidos muestran que no hay preferencia consistente para la estereoquímica entre C3 y C4. Diversos estudios mostraron mejores curvas dosis-respuestas en la serie *trans*-(3R,4S), por ello, la mayoría de los trabajos que se realizaron a partir de ese momento se centraron en isómeros *trans* con un grupo *p*-metoxifenilo en C4.

En la gráfica 1 se compara la actividad inhibitoria de la ACAT de los compuestos detallados anteriormente con su actividad en el modelo de hámsteres alimentados con colesterol. En ella se observa que la actividad in

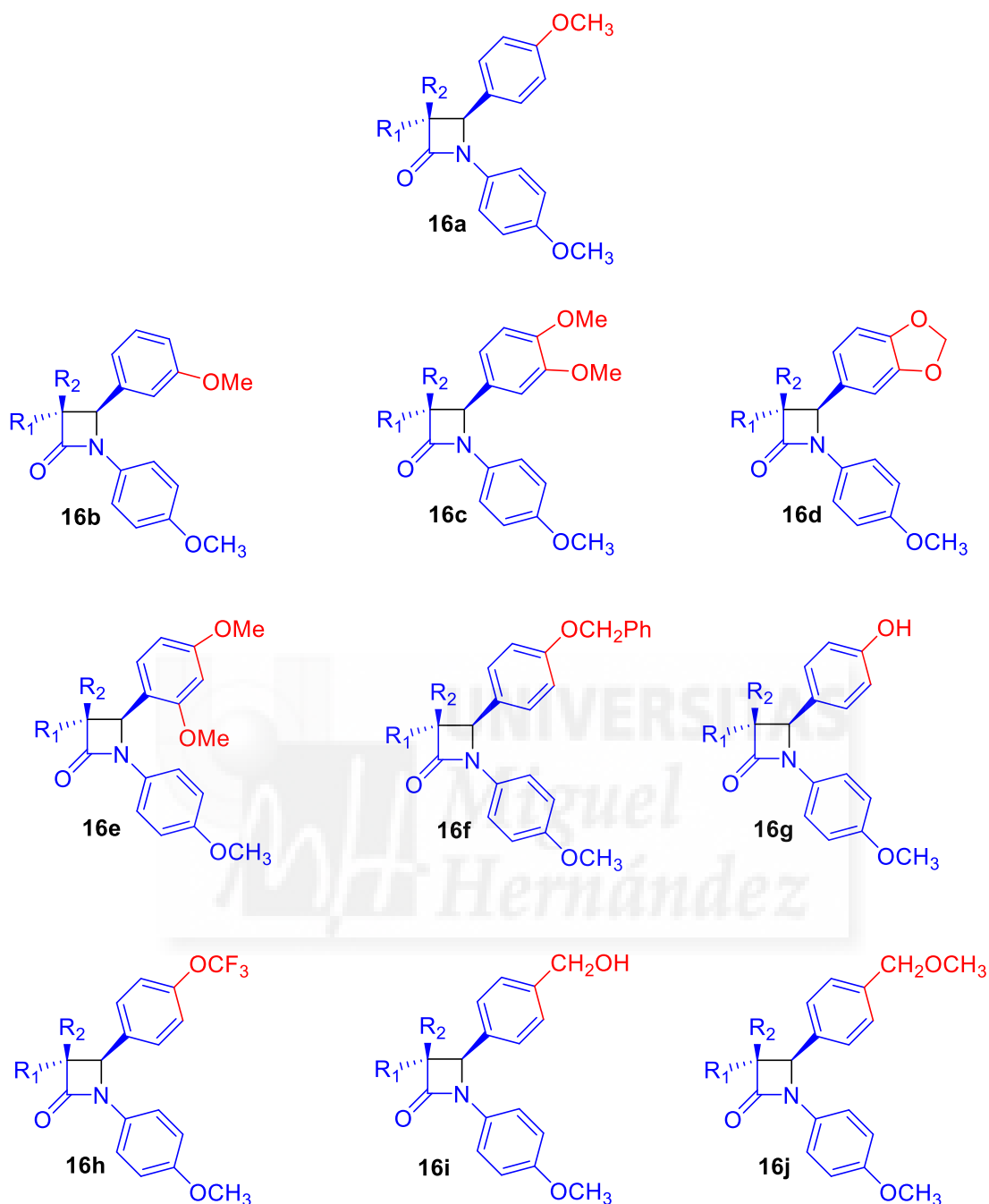
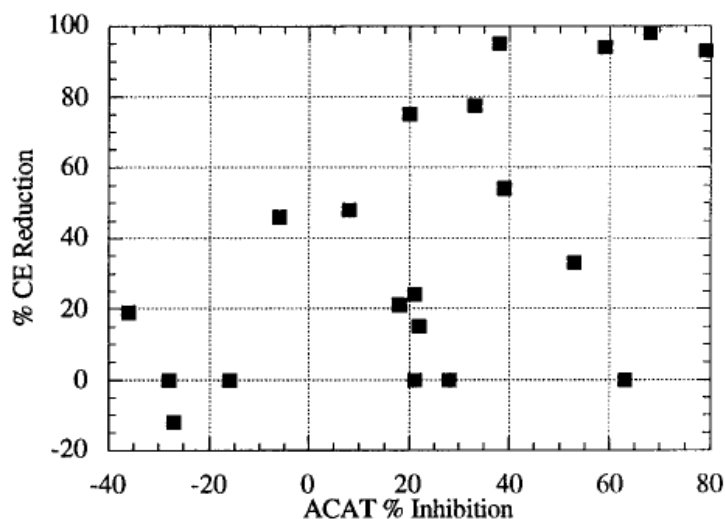


Figura 13. Efecto de la sustitución en el fenilo de la posición C4.

vivo no se correlaciona con la actividad in vitro y que, en muchos casos, la actividad de la ACAT in vitro es incompatible con cualquier nivel de actividad posible in vivo. Finalmente, *la actividad de la ACAT no fue determinada de forma rutinaria, y los estudios posteriores sobre relaciones estructura-actividad se centraron exclusivamente en la actividad in vivo.*



Gráfica 1. Comparación de la actividad in vivo e in vitro de los análogos del compuesto padre estudiados. La actividad in vitro está expresada como porcentaje de inhibición de la ACAT a 10 μ M. La actividad in vivo está reflejada como porcentaje de reducción en los ésteres de colesterol hepático (CE) a 50mg/kg.

4.1.2. Cambios en la posición N1

En segundo lugar, se estudiaron las relaciones estructura-actividad en la posición N1, tomando como referencia el compuesto **17a** de la figura 14. Al contrario de lo observado en la posición C4, se descubrió que el grupo fenilo del nitrógeno podía tolerar una variedad de sustituyentes o incluso podía no sustituirse sin observarse una pérdida de actividad. Por ejemplo, los derivados 2- y 3-metoxifenilo **17b** y **17c**, así como el fenilo no sustituido **17d** son tan activos como el compuesto de referencia. Los enlaces de hidrógeno no parecen tener relevancia tal y como muestran los derivados 4-(trifluorometoxi)fenilo **17e**, 4-fluorofenilo **17f** y 4-metilfenilo **17g**. Por otro lado, la actividad reducida del 4-fenoxifenilo **17h** sugiere algunas limitaciones estéricas en el grupo N-arilo.

Mientras que una variedad de grupos fenilo sustituidos son tolerados en el nitrógeno, el resto arilo es crítico para la actividad. El análogo **18a** que no tiene el grupo fenilo es completamente inactivo. Los compuestos con grupos alquilo pequeños **18b**, bencilo **18c** o análogos cicloalquilo grandes **18d** en el nitrógeno son débiles o inactivos (figura 15). Estos datos evidencian que el resto aromático en el nitrógeno es una parte esencial del farmacóforo.

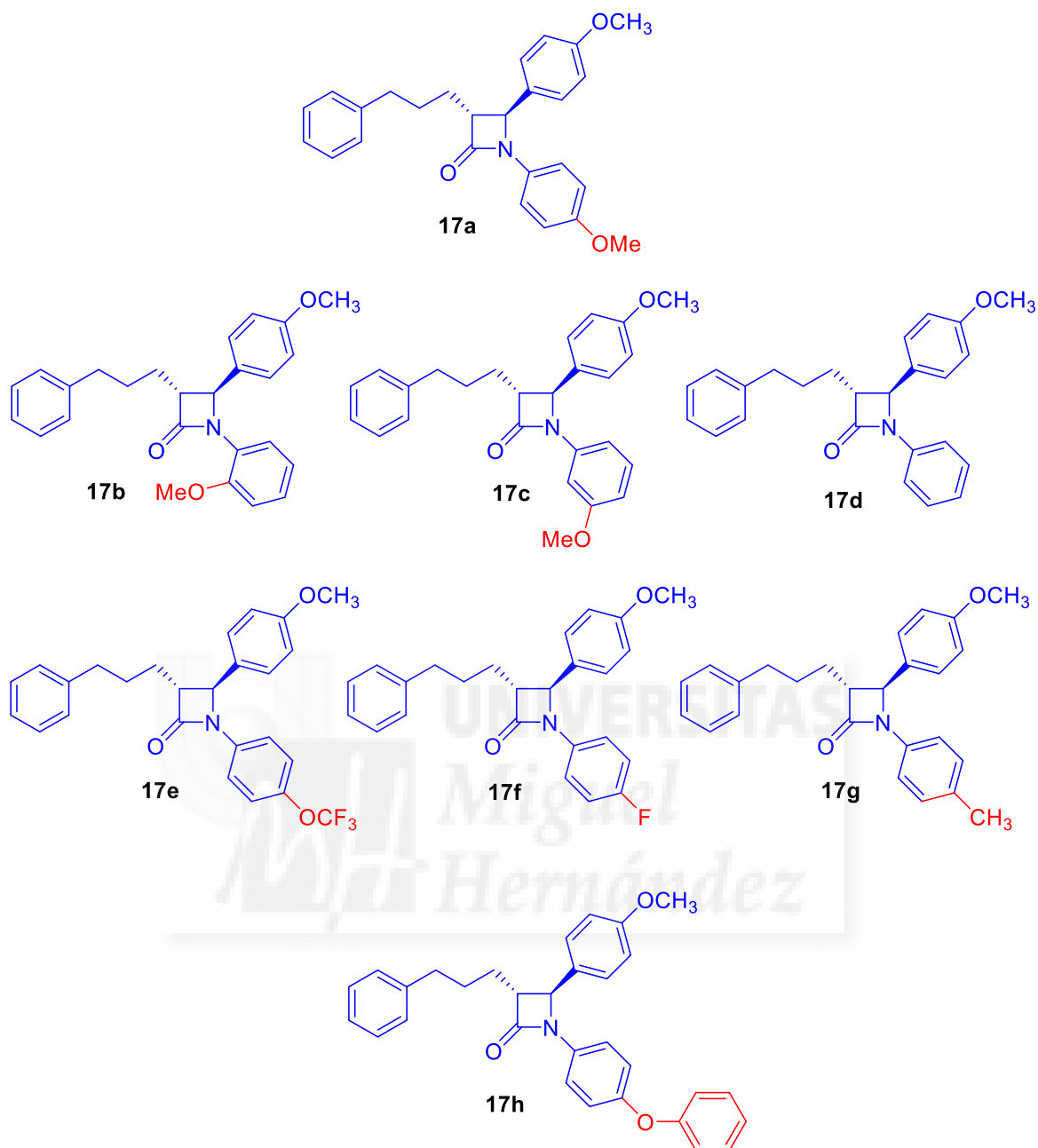


Figura 14. Sustitución en el anillo aromático de N1.

4.1.3. Cambio en la posición C3

Finalmente se investigaron las relaciones estructura-actividad en la posición C3. El compuesto que sirvió de referencia fue **19a** (figura 16). Se examinó tanto la naturaleza del sustituyente como el grado de sustitución en la posición C3.

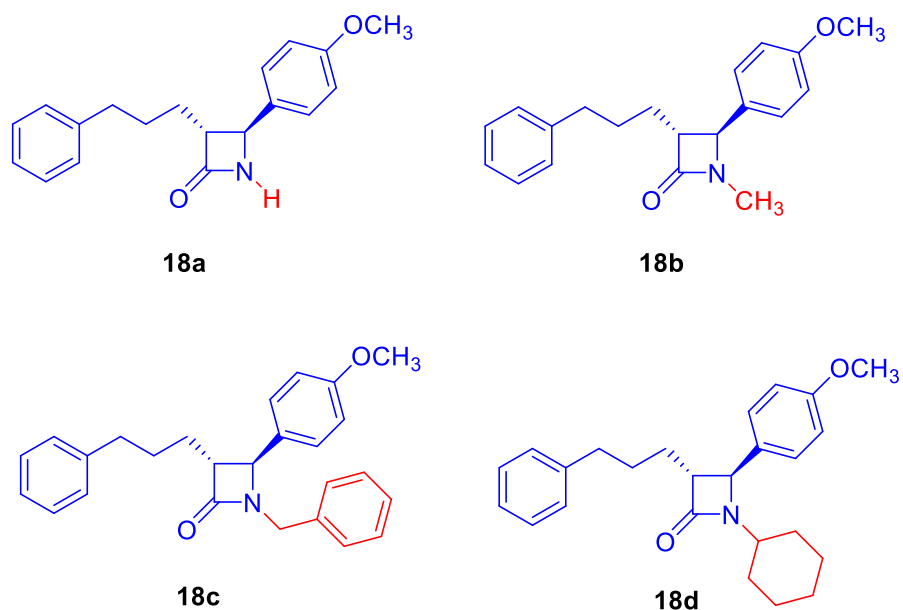


Figura 15. Derivados alquilados en N1.

Los cambios que se realizaron en la posición C3 fueron una disminución de la longitud de la cadena fenilalquilo **19b**, el aumento de la longitud de la cadena en 1 ó 3 carbonos **19c** o **19d**, la sustitución del grupo fenilalquilo por un grupo alquilo lineal **19e** y, por último, la saturación del grupo fenilo **19f**. Todos estos compuestos mostraron una reducción en la actividad de las azetidinas. Estos resultados sugieren que *la posición del grupo fenilalquilo en C3 es una parte importante del farmacóforo*.

A continuación se prepararon varios derivados disustituídos. En casi todos los casos, la disustitución causó una reducción marcada de la actividad, siendo la única excepción el análogo fluorado **19g** (ver figura 16). Esta intolerancia a la disustitución probablemente refleja la importancia de este grupo en el farmacóforo. *Posteriores estudios sobre estructura-actividad han evidenciado la importancia de la estereoquímica cuando C3 está disustituído. Sin embargo, cuando C3 está monosustituído la conformación óptima es accesible a cualquier estereoquímica.*

Todos estos esfuerzos culminaron con el descubrimiento de la azetidionona **20** y su forma enantioméricamente pura (3*R*,4*S*)-**21**, el prototipo de azetidionona capaz de inhibir la absorción de colesterol, a partir de la cual continuaron las investigaciones (figura 17).

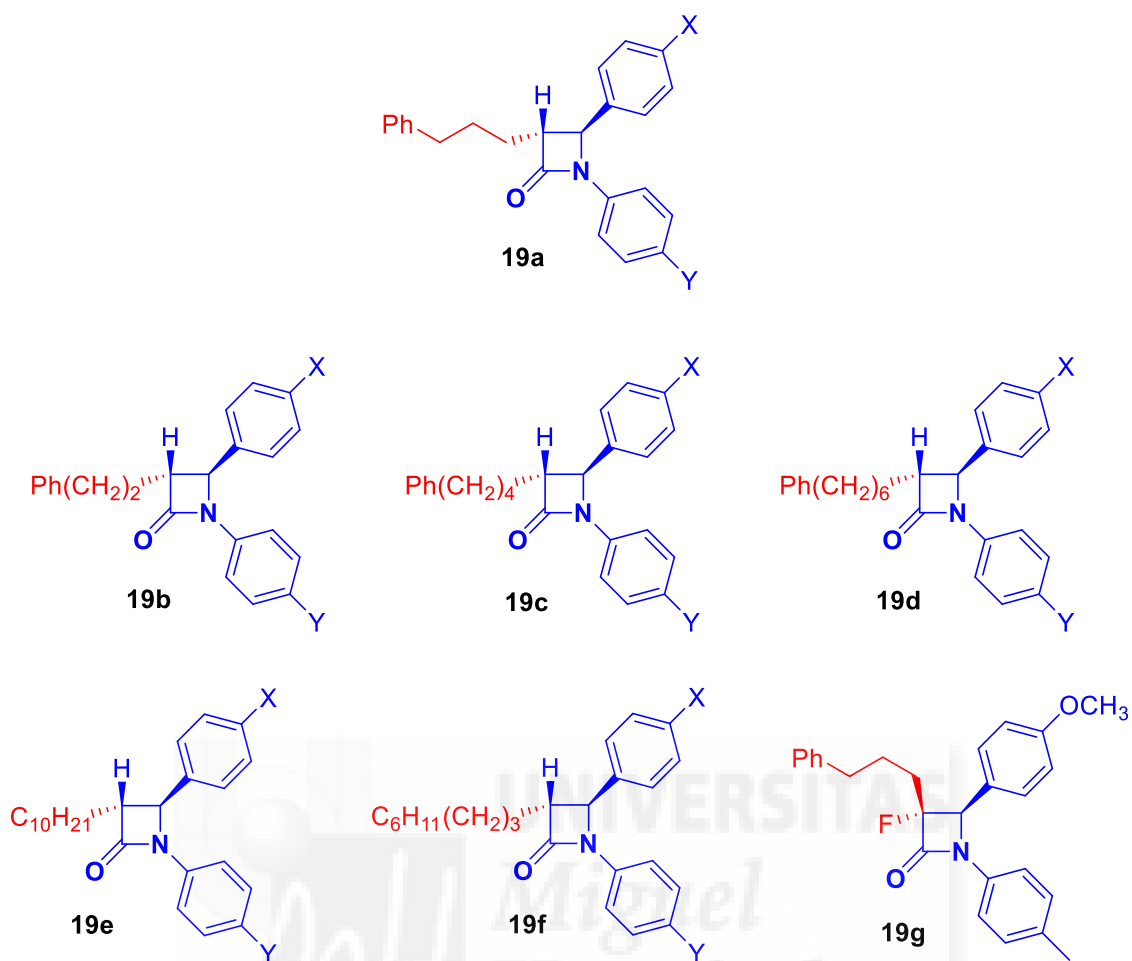


Figura 16. Derivados modificados en la posición C3.

En la figura 18 se recogen todas las relaciones estructura-actividad deducidas.

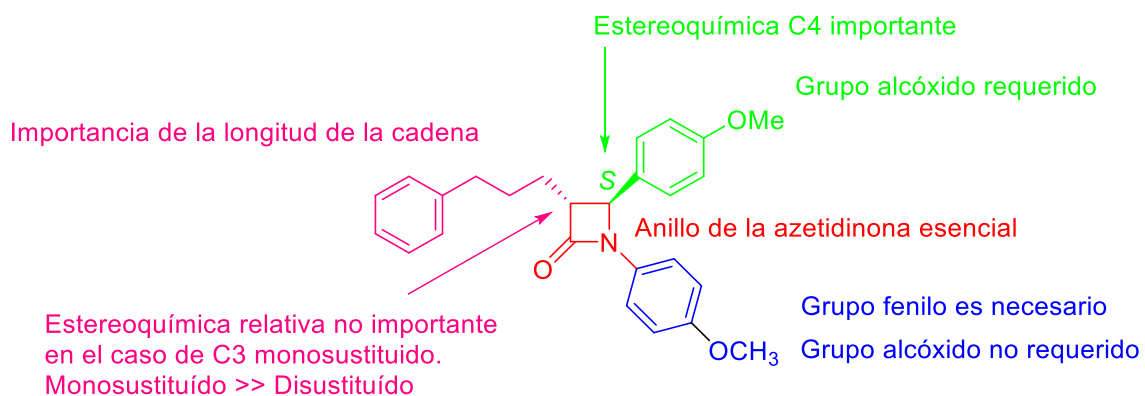
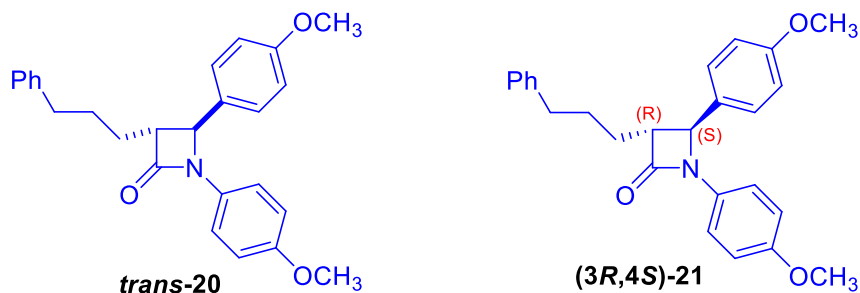


Figura 18. Relaciones estructura-actividad de la 2-azetidinona.¹⁶



Trans, Mezcla racémica

Trans, enantiómero puro

ACAT: IC₅₀ = 18000 nM

ACAT: IC₅₀ = 26000 nM

Hámster: @ 10 mg/kg

Hámster: @ 10 mg/kg

SC: -21%

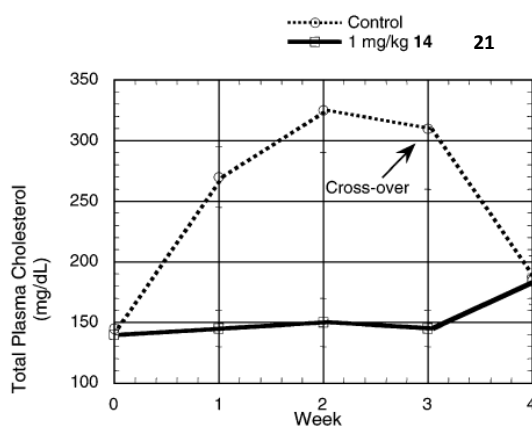
SC: -43%

CE: -60%

CE: -93%

Figura 17. Azetidionas optimizadas inhibitoras de la absorción de colesterol.

El perfil in vivo de **21** refleja una reducción del colesterol sérico en ratas, perros y monos alimentados con colesterol, aunque de manera más espectacular en el mono rhesus. En la gráfica 2 se muestran los efectos de **21** en monos rhesus alimentados con colesterol durante cuatro semanas. Los animales control muestran una profunda hipercolesterolemia después de tres semanas, que queda completamente bloqueada tras la administración de 1 mg/kg de **21**. Los niveles de colesterol regresan a la línea de base en una semana, mientras que la retirada del fármaco provoca un aumento gradual en los niveles de colesterol durante el mismo período de tiempo.



Gráfica 2. Efectos de **21** en monos rhesus alimentados con colesterol.

Salisbury y col. demostraron que los inhibidores de la ACAT y **21** tienen efectos diferentes sobre los niveles intracelulares de ésteres de colesterol. En estos experimentos, el inhibidor de la ACAT **3** bloqueó la acumulación de ésteres de colesterol pero no tuvo efecto en el colesterol libre de la pared intestinal de los hámsters alimentados con colesterol. Por el contrario, **21** inhibió la acumulación de colesterol esterificado y sin esterificar. Así, los datos in vitro y la farmacología in vivo sugieren que *las azetidionas actúan a través de un mecanismo único que es distinto al de los inhibidores de la ACAT.*

5. EL DESCUBRIMIENTO DE LA EZETIMIBA

Se procedió a investigar diferentes análogos (**22-25**) del compuesto **21** y se evaluó la actividad de cada uno de ellos en un modelo in vivo (figura 19).¹⁸ Se restringió la libertad conformacional de la cadena lateral en C3 y se observó que los derivados *trans* no presentaban actividad. Esto junto con la importancia de la estereoquímica en C4 llevó a pensar que *estos compuestos interaccionan con una diana molecular bien definida, pero todavía por descubrir.* Los compuestos **22** y **24** mostraron buenos resultados, reduciendo de forma notable el colesterol sérico y hepático. Sin embargo, los compuestos **23** y **25** no mostraron evidencia alguna.

5.1. Importancia de los metabolitos activos

Los resultados obtenidos de la actividad de los análogos del compuesto **21**, junto con la ausencia de un ensayo in vitro, planteó *la posibilidad de que fueran los metabolitos activos de 21 quienes contribuyeran a reducir el colesterol sérico y hepático de los hámsters, y no el propio compuesto 21.* Van Heek y col.¹⁷ realizaron una serie de experimentos para determinar si el compuesto **21** daba lugar a metabolitos activos y cómo éstos contribuían al perfil in vivo del mismo. El experimento consistía en administrar el compuesto **21** marcado con tritio, ³H-**21**, por vía intraduodenal a los animales. La bilis de estos animales se recolectaba porque se sabía por experimentos previos que contiene la mayoría de los metabolitos de **21**. Al mismo tiempo, a los animales

¹⁷ M. V. Heek, C. F. France, D. S. Compton, R. L. McLeod, N. P. Yumibe, K. B. Alton, et al. In vivo metabolism-based discovery of a potent cholesterol absorption inhibitor, SCH 58235, in the rat and rhesus monkey through identification of the active metabolites of SCH 48461. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1997**; 283: 157-163.

control se les administraba el vehículo, se recogía su bilis y se le añadía ^3H -**21** hasta alcanzar la misma actividad que la bilis que contenía metabolitos. Esta se denominó bilis madre.

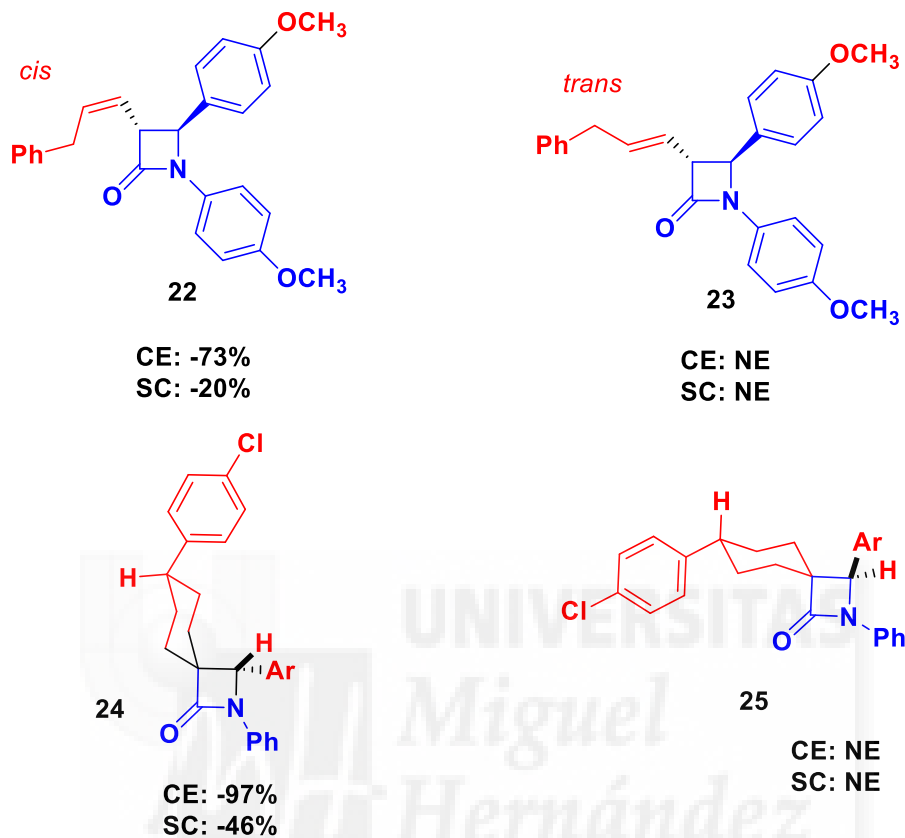


Figura 19. Análogos de **21** con restricciones conformacionales.

En la segunda parte del experimento tanto la bilis con metabolitos como la bilis madre fueron administradas intraduodenalmente a un segundo grupo de animales junto con colesterol marcado con carbono catorce, ^{14}C -colesterol. Se determinó el contenido de ^{14}C y ^3H en varios tejidos. Así, tanto los efectos farmacológicos como la distribución del fármaco pudieron ser determinados en un solo experimento según el contenido de ^{14}C y ^3H , respectivamente.

Mientras que la bilis madre redujo la aparición de ^{14}C -colesterol tanto en el plasma como en el hígado, la bilis con metabolitos fue claramente más eficaz y redujo los niveles de ^{14}C -colesterol tanto como el compuesto **21** en animales intactos. Además, el tritio de **21** fue recuperado en la bilis, mientras que el tritio de los metabolitos activos permaneció en el lumen y las paredes intestinales. Lo que llevó a concluir que *los metabolitos activos, aparte de ser más efectivos*

que **21**, se localizan más eficientemente en su lugar de acción: la pared intestinal.¹² Para abordar estos increíbles resultados, los metabolitos activos se sometieron a la técnica de HPLC que consiste en separar los componentes de una mezcla teniendo en cuenta las interacciones químicas de las sustancias y la columna cromatográfica. Se concluyó que la fracción 6 era la que abarcaba el grueso de la actividad. Esta fracción estaba compuesta principalmente por el glucurónido del compuesto **26** (ver figura 20).

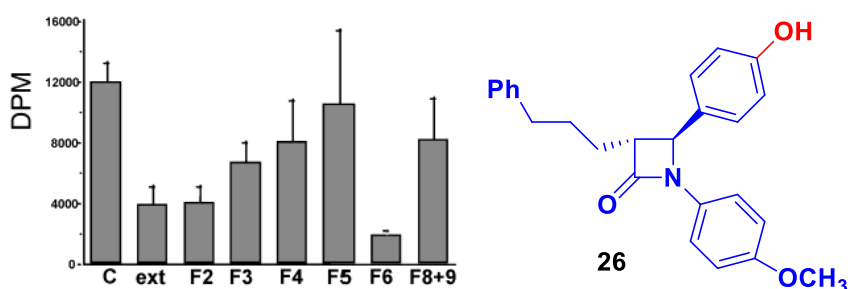


Figura 20. Actividad y estructura del metabolito más activo de **21**

A continuación se evaluó la eficacia in vivo de la fracción 6 frente al metabolito activo **26** y ambos mostraban prácticamente la misma actividad, mucho mayor que la proporcionada por la mezcla en bruto de metabolitos. Esto invitó a pensar que mucha de la actividad in vivo de **21** fue debida a la formación del metabolito **26**. No obstante, se conocía también la existencia de otros metabolitos cuya formación no contribuía a la actividad in vivo de **21** o incluso hacía disminuir su actividad. Rosenblum y col. prepararon numerosos metabolitos que fueron evaluados en el modelo in vivo (figura 21).

Tanto el fenol **27** como el bisfenol **28** mostraron actividad sustancial, aunque menos que los compuestos **21** y **26**. Por otro lado, el fenol **29** fue menos activo, indicando que la ruta metabólica de hidroxilación fenólica no era la idónea. A parte de los fenoles, otra ruta metabólica involucrada fue la hidroxilación y posterior oxidación de la cadena lateral 3-fenilpropilo para producir alcoholes y cetonas. El (*S*)-alcohol **30** fue más activo que **21**, mientras que su epímero (*R*)-**31** fue menos activo y la cetona correspondiente **32** tuvo actividad intermedia. La conclusión fue que *la hidroxilación del metileno*

bencílico de la cadena lateral que genera el alcohol con configuración *S* mejora la actividad del compuesto.

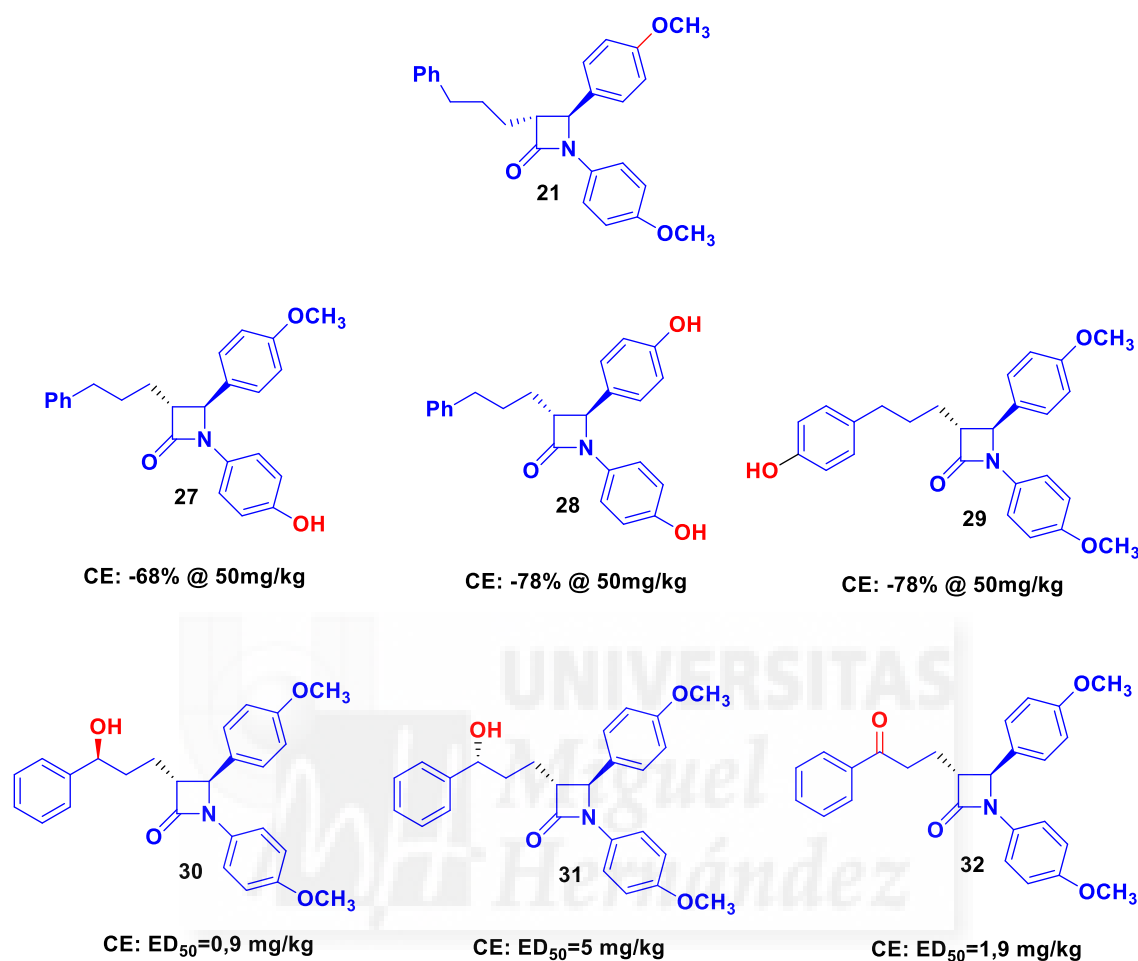
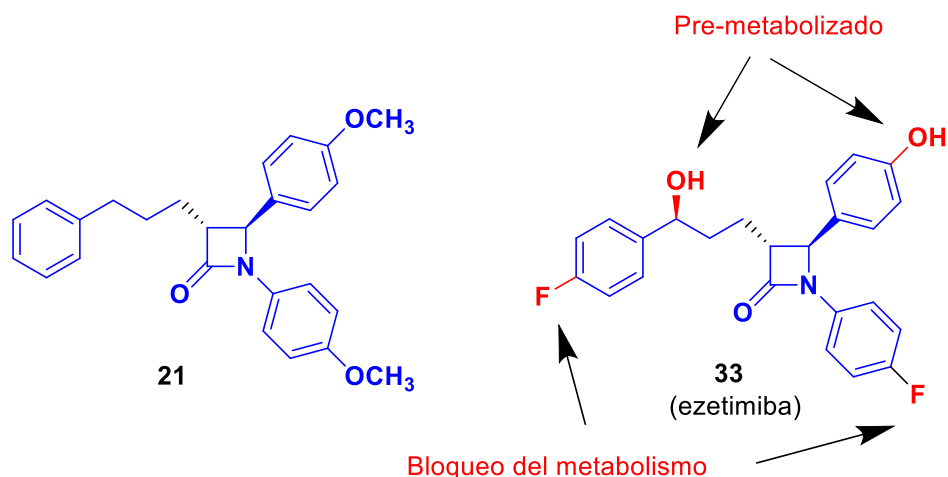


Figura 21. Estructura molecular y actividad de metabolitos del compuesto 21.

5.2. Diseño final de la Ezetimiba

Tras la evaluación de los resultados experimentales, emergieron nuevas estrategias para diseñar una segunda generación de compuestos. La primera consiste en *premetabolizar sitios rentables del metabolismo del C4 aril o de la cadena fenilpropílica para mejorar la actividad* (como ocurre con el compuesto alcohol **30**). La segunda se fundamenta en *bloquear sitios no rentables del metabolismo para maximizar la actividad y limitar el metabolismo oxidativo posterior*. Estas estrategias fueron aplicadas a una serie de derivados de **21**, pero sin duda, la más exitosa fue llevada a cabo por Rosenblum y col. para dar lugar a la azetidionona **33**, ahora conocida como **ezetimiba**.

En la tabla 1 se compara la actividad de la **ezetimiba** y de **21** en animales alimentados con dietas ricas en colesterol. En cada caso, pero más dramáticamente en el mono, la **ezetimiba** es más activa que **21** y reduce de manera significativa los niveles de colesterol plasmático.



ED ₅₀	21	Ezetimiba
Hamster	2,2 mg/kg	0,04 mg/kg
Rata	2,0 mg/kg	0,03 mg/kg
Mono	0,2 mg/kg	0,0005 mg/kg
Perro	0,1 mg/kg	0,007 mg/kg
Niveles sanguíneos		<<14

Tabla 1. Comparación de la estructura y del perfil in vivo de **21** y **ezetimiba**.

5.3. Síntesis de descubrimiento de Ezetimiba

El nombre sistemático de la ezetimiba es 1-(4-fluorofenil)-(3R)-[(3S)-(4-fluorofenil)-3-hidroxiopropil]-(4S)-(4-hidroxifenil)-2-azetidinone. Es una molécula con tres carbonos asimétricos que tiene ocho posibles estereoisómeros. Hay que sintetizar el estereoisómero más activo. No es una tarea sencilla. La primera síntesis que se llevó a cabo fue un proceso no optimizado que permitió conseguir unos cientos de miligramos para realizar los primeros ensayos (figura 22). El núcleo de la molécula, la 2-azetidinona, se preparó mediante una condensación tipo Staudinger entre el cloruro de ácido **34** y la imina **35**. El producto mayoritario es el estereoisómero *trans* que es una mezcla de dos

enantiómeros, que se separaron cromatográficamente con una columna quiral, obteniendo el estereoisómero (3*R*,4*S*)-**36**. A continuación se hidrolizó el éster

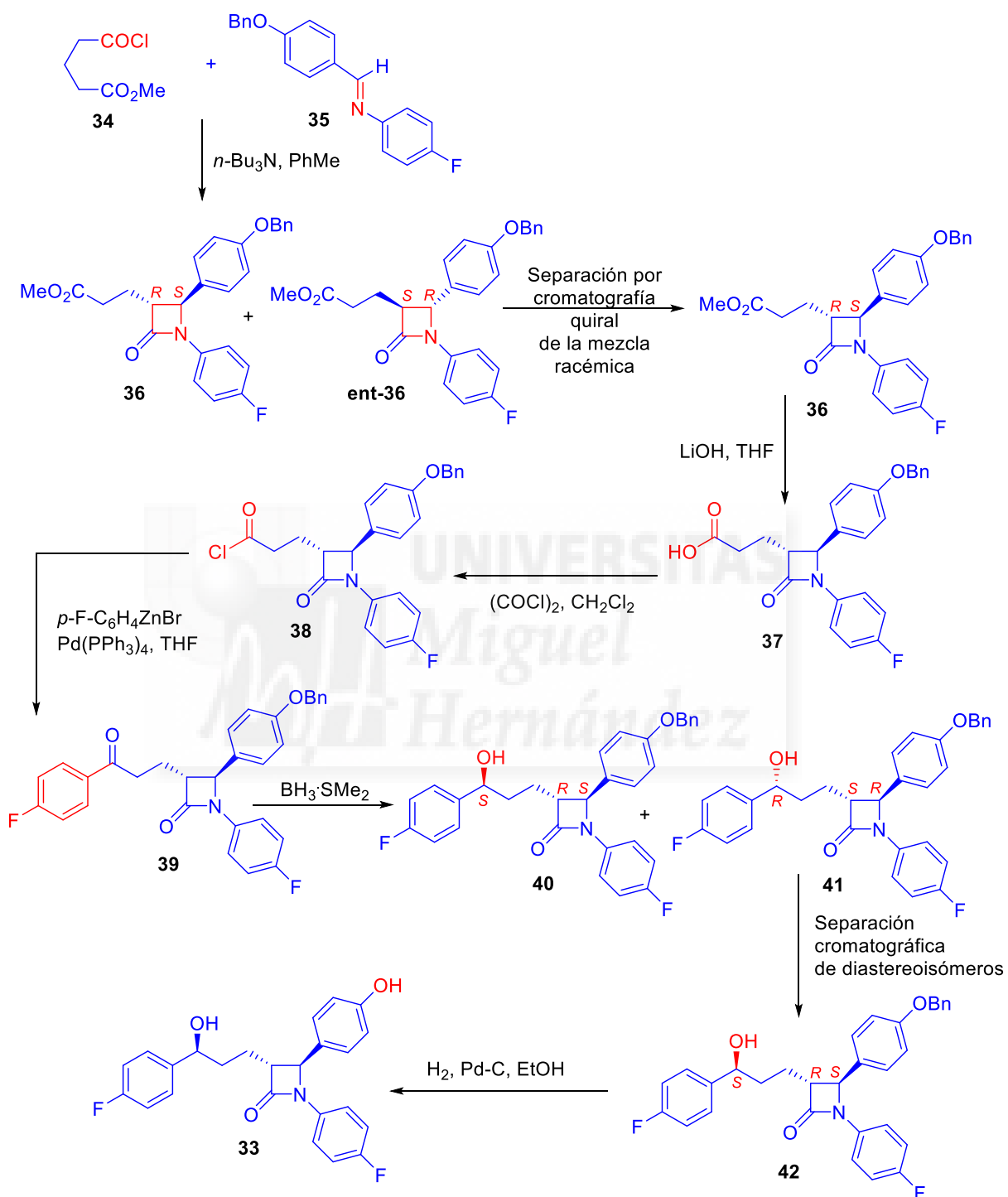


Figura 22. Primera síntesis de la ezetimiba.

metílico selectivamente en presencia de la 2-azetidinona. El ácido carboxílico obtenido, **37**, se transformó en el cloruro de ácido **38** con cloruro de oxalilo. La unión del resto *p*-fluorofenilo se llevó a cabo mediante un acoplamiento de Negishi catalizado por paladio con el bromuro de arilcinc correspondiente. Así se obtuvo la fenona **39** que fue reducida no estereoselectivamente con el complejo borano-dimetilsulfuro a la mezcla de alcoholes diastereoméricos **40** y **41**, que se separaron cromatográficamente. El estereoisomero **42** fue desbencilado con una hidrogenación catalítica para rendir finalmente **33**, ezetimiba.¹⁸

6. FARMACOCINÉTICA DE LA EZETIMIBA

La determinación de propiedades relacionadas con la farmacocinética, tales como absorción, distribución, metabolismo y excreción (propiedades ADME) son muy importantes. Un gran número de compuestos químicos no superan los ensayos clínicos debido a problemas de toxicidad y farmacocinética. Por ello, Lipinski y col. propusieron una serie de reglas conocidas como la “regla de los cinco de Lipinski”¹⁹ como una guía para mejorar la biodisponibilidad oral durante la modificación del compuesto prototipo. Extraordinariamente la ezetimiba cumple con las cuatro consideraciones de esta regla como bien se refleja en la figura 23.

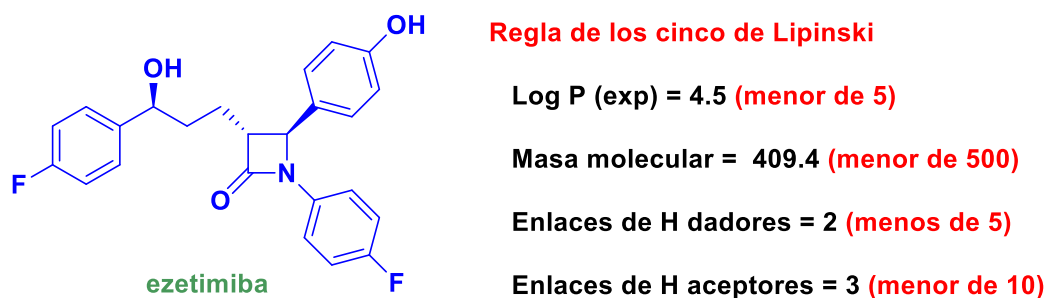


Figura 23. Relación de ezetimiba y regla de los cinco de Lipinski.

Veber y col. afinaron un poco más. Midieron la biodisponibilidad oral de numerosos compuestos químicos y encontraron que: si su flexibilidad molecular

¹⁸ S. B. Rosenblum, T. Huynh, A. Alfonso, H.R. Davis, J.N. Yumibe, J.W. Clader, et al. Discovery of 1-(4-Fluorophenyl)-(3*R*)-[3-(4-fluorophenyl)-(3*S*)-hydroxypropyl]-(4*S*)-(4-hydroxyphenyl)-2-azetidinone (SCH 58235): A Designed, Potent, Orally Active Inhibitor of Cholesterol Absorption. *J. Med. Chem.* **1998**; *41*: 973-980.

¹⁹ C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy y P. J. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**; *46*: 3–26.

era demasiado grande, medida por el número de enlaces rotables que dan lugar a conformaciones diferentes, y, su área de superficie polar era mayor de 140 Å², no tendrían buena biodisponibilidad oral, independientemente de su masa molecular.²⁰ La ezetimiba, como bien se muestra en la figura 24, también cumple con las dos reglas de Veber. Es decir, se trata de una molécula de la que se espera buena biodisponibilidad oral.

Reglas de Veber

Enlaces que pueden rotar = 6 (menor de 10)

Area de superficie polar = 60.8 (menor de 140 Å)

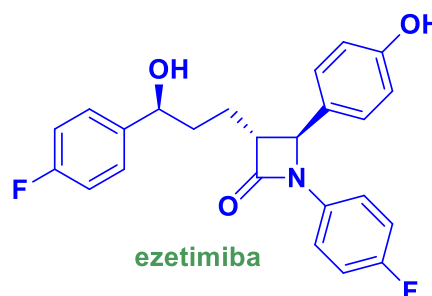


Figura 24. Reglas de Veber para la ezetimiba.

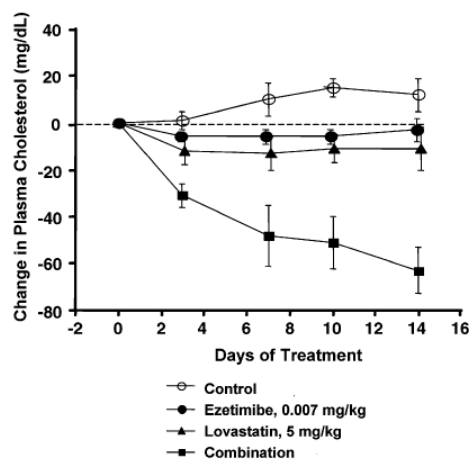
7. EZETIMIBA Y ESTATINAS

Mientras que la actividad de la ezetimiba era fascinante en modelos animales alimentados con colesterol, cabe destacar que tanto ella como otras azetidinas no tuvieron tanto impacto en animales que recibían dietas bajas en grasa y colesterol. Ninguno de los compuestos desarrollados hasta el momento mostraba una reducción significativa de los niveles de colesterol plasmático. Davis razonó que quizá la inhibición de la absorción de colesterol podría estimular la actividad de la HMG-CoA reductasa hepática. Se trataría de un mecanismo compensatorio del organismo. Si esto fuese así, la coadministración de un inhibidor de la absorción de colesterol y un inhibidor de la HMG-CoA reductasa podría reducir finalmente el colesterol sérico. Para comprobar si esta hipótesis inicial era correcta, Davis y col. administraron ezetimiba (0'007 mg/kg) o lovastatina (5 mg/kg) a perros alimentados con una dieta baja en grasa y colesterol durante 14 días.²¹ Tal y como se aprecia en la gráfica 3, ninguno de los compuestos produjo el efecto deseado en

²⁰ D. F. Veber, S. R. Johnson, H.-Y. Cheng, B. R. Smith, K. W. Ward y K. D. Kopple Molecular Properties that Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *J. Med. Chem.* **2002** (45): 2615-2623.

²¹ H. R. Davis Jr., K. K. Pula, K. B. Alton, R. E. Burrier, R. W. Watkins. The synergistic hypocholesterolemic activity of the potent cholesterol absorption inhibitor, ezetimibe, in combination with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in dogs. *Metab., Clin. Exp.* **2001** (50): 1234-1241.

monoterapia, mientras que su coadministración mostró una marcada reducción del colesterol sérico.



Gráfica 3. Efecto de la ezetimiba y lovastatina en perros alimentados con una dieta baja en grasas y colesterol.

Estudios similares demostraron efectos comparables en otras especies y con otras estatinas. Estos datos sugirieron que la ezetimiba era eficaz en la reducción de los niveles de colesterol en los seres humanos y, que sería particularmente efectiva en combinación con inhibidores de la HMG-CoA reductasa.

8. ENSAYOS CLÍNICOS

Se realizaron varios ensayos clínicos en humanos con ezetimiba tanto en monoterapia como en combinación con estatinas. Éstos mantuvieron las mismas expectativas que los modelos in vivo realizados en animales. La ezetimiba produjo una marcada reducción del LDL-C, colesterol total y triglicéridos, así como un pequeño aumento en el HDL-C. La coadministración de ezetimiba con diversas estatinas supuso una disminución de los valores de LDL-C de un 15-18% más que la alcanzada con una simple estatina.

También se realizaron ensayos clínicos en los que se medía la actividad de la ezetimiba asociada a dosis altas y bajas de estatina. Se obtuvo como resultado que la ezetimiba y una dosis baja de estatina producen aproximadamente la misma reducción de LDL-C que una estatina administrada a dosis elevadas.

Estos datos demuestran que la ezetimiba (en monoterapia o administrada con estatinas) produce una mejora de los parámetros lipídicos en pacientes con hipercolesterolemia.¹²

La comercialización de la ezetimiba fue aprobada con facilidad por la FDA en octubre de 2002 y su combinación con estatinas en julio de 2004. Puede ser utilizada sola (comercializada como Zetia o Ezetrol) o junto con estatinas (por ejemplo, ezetimiba/simvastatina), comercializada como Inegy y Vytorin.

9. DESCUBRIMIENTO DE LA DIANA MOLECULAR

Durante el desarrollo y descubrimiento de la ezetimiba no se conocía su diana molecular. Fue en 2004 cuando Altman y col.²² identificaron a la *Niemann-Pick C1-like protein 1 (NPC1L1)* como una proteína crítica en la absorción intestinal del colesterol de la dieta, al comprobar que la depleción de NPC1L1 en ratones producía una dramática reducción de la absorción de colesterol. Posteriormente García-Calvo y col.²³ demostraron que el transportador intestinal del colesterol situado en el cepillo de los enterocitos, NPC1L1, era la diana molecular de la ezetimiba. A pesar de que se sabe que la ezetimiba bloquea la NPC1L1, el mecanismo de acción está todavía por definir.

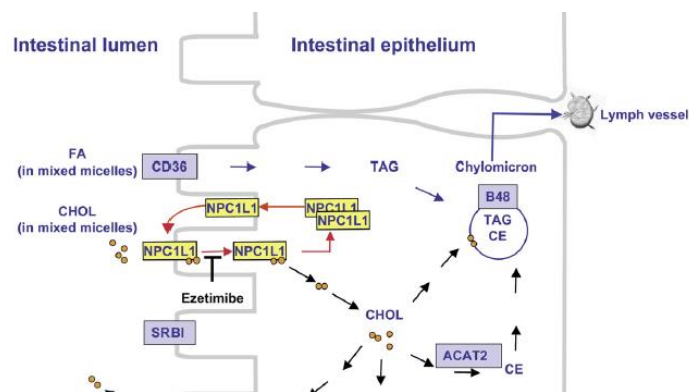


Figura 25. Internalización de la NPC1L1 y colesterol en los enterocitos de la pared intestinal y bloqueo de este proceso por la ezetimiba.

²² S. W. Altmann, H.R. Davis, L. J. Zhu, X. Yao, L.M. Hoos, G. Tetzloff, et al. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science*. **2004**;303:1201-4.

²³ M. G. Calvo, J.M. Lisnock, H. G. Bull, B. E. Hawes, D. A. Burnett, M. P. Braun, et al. The target of ezetimibe is Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1). *Proc Natl Acad Sci*. **2005** ;102: 8132–8137.

Un nuevo estudio realizado por Ge, Wang y col.²⁴ manifiesta que NPC1L1 media la absorción de colesterol a través de la endocitosis vesicular (ver figura 25) y que la ezetimiba inhibe la absorción de colesterol mediando el bloqueo de la internalización de NPC1L1.²⁵

10. CONCLUSIONES

La ezetimiba es un fármaco que se desarrolló a contracorriente. En los años 90' ya estaba vigente el modelo de "diseño racional de fármacos", que se basa en el conocimiento de la estructura y función de la diana a la que se dirige el fármaco. Para ello, casi siempre es necesaria la más alta tecnología disponible. La estructura del fármaco se diseña para que la interacción con su diana sea óptima, teniendo en cuenta sus limitaciones farmacocinéticas.

Cuando se inició el programa de investigación que condujo a la ezetimiba no se conocía la naturaleza de la supuesta diana terapéutica (ACAT), ni siquiera se conocía la existencia de la verdadera diana, NPC1L1. La naturaleza de este receptor se fue conociendo producto del patrón de relaciones estructura-actividad resuelto en los ensayos in vivo con las moléculas candidatas. La ausencia de un ensayo in vitro dificultó mucho el avance del programa, ya que no se podía distinguir si los efectos observados se debían a causas farmacodinámicas o farmacocinéticas. Aun así se llegó a la azetidinona 21 como prototipo avanzado. El estudio de sus metabolitos fue muy importante porque proporcionó valiosa información para mejorar su actividad y dificultar su degradación. El proceso global desde el principio hasta el descubrimiento de la ezetimiba consumió solo seis años, tiempo muy aceptable incluso desde el punto de vista de las técnicas más modernas.

Tal vez, la enseñanza más importante que se puede obtener de este proyecto es que, mientras que los avances científico-tecnológicos del periodo 1995-2005 han tenido un profundo y positivo impacto en el proceso de descubrimiento, no han reducido la importancia del factor humano, de la

²⁴ L. Ge, J. Wang, W. Qi, H. Miao, J. Cao, Y. Qu, et al. The Cholesterol Absorption Inhibitor Ezetimibe Acts by Blocking the Sterol-Induced Internalization of NPC1L1. *Cell Metabolism*. **2008**; 7:508-519.

²⁵ C. Garcés. Regulación de la absorción intestinal de colesterol: el papel protagonista de NPC1L1 y sus polimorfismos funcionales. *Clin Invest Arterioscl*. **2008**;20:207-9.

participación decisiva del científico en moldear y guiar el proceso. El descubrimiento de fármacos sigue siendo una ciencia experimental, una aventura arriesgada donde la serendipia y la habilidad para capitalizarla es todavía indispensable.

11. ANEXO 1. PROTOCOLO DE EXPERIMENTACIÓN IN VIVO

Todos los animales utilizados en estos estudios fueron alojados, tratados y atendidos según las directrices del *National Institutes of Health (NIH)* y la Ley de Bienestar Animal. El programa fue acreditado por la Asociación Americana para el cuidado de animales de laboratorio.

El modelo animal sobre el que se desarrollaron estos ensayos fueron Hámsteres dorados Sirios (Charles River Labs, Wilmington, MA) de 6 a 8 semanas de edad y con un peso de entre 100 y 125g. Se les permitió el acceso a alimentos (bolitas de comida) y agua a demanda.¹⁸

Los protocolos de tratamiento consistieron en dietas que fueron suplementadas con 0,5% de colesterol durante 7 días. Durante este periodo de tiempo, a los animales se les administró, una vez al día y mediante una sonda nasogástrica, los compuestos desarrollados en el ensayo disueltos en 0,2 ml de aceite de maíz. El último día, se sacrificaron los animales y se tomaron muestras del hígado para el análisis de los lípidos. La composición de lípidos hepáticos se determinó posteriormente utilizando el método de HPLC.

Los datos se obtienen como porcentaje de cambio en ésteres de colesterol hepático frente a los animales control que recibieron una dieta alta en colesterol (sonda oral en 0,2 ml de aceite de maíz/día) pero sin fármaco.¹⁵