

Derivados del ácido antranílico como potenciales inhibidores de la MEK: Estudios de acoplamiento molecular y propuestas para su síntesis

OSVALDO JAVIER QUINTANA ROMERO, MARCO A. LOZA-MEJÍA

Resumen—Debido a los problemas asociados a la resistencia de las células tumorales a los quimioterápicos actuales, el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento del cáncer, sigue siendo una necesidad urgente en el área de salud. La vía de la MAPK es una vía que está desregulada en las células tumorales y que induce a la proliferación celular descontrolada, por el ello el diseño de inhibidores de esta vía constituye una estrategia para el desarrollo de nuevos antitumorales. La MEK cinasa es una enzima clave en la vía de la MAPK y varios inhibidores de la MEK han llegado a fase clínica. Sin embargo, problemas de selectividad y perfil farmacocinético han impedido que se empleen en la clínica. En este trabajo se evalúa la potencial afinidad de derivados del ácido antranílico hacia la MEK mediante estudios de acoplamiento molecular y se propone una ruta sintética para la obtención de dichos derivados. Los estudios de acoplamiento molecular sugieren que los compuestos diseñados podrían ser potentes inhibidores de la MEK.

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer es un problema de salud con impacto mundial, debido a que es la principal causa de muerte a nivel mundial. En el 2012 según datos de la OMS, a causa del cáncer hubieron 8.2 millones de muertes y se pronostica que en las próximas dos décadas aumentarían los casos anuales de cáncer, de 14 millones que hubo en el 2012 a 22 millones.[1] El cáncer se caracteriza por ser una masa anómala de tejidos donde las células pierden la capacidad de controlar sus funciones normales, por lo cual tienen una replicación acelerada y la pierde la capacidad de inducirse apoptosis (muerte celular programada). Esto da como resultado tumores y un cuadro clínico inespecífico, donde el paciente va debilitándose y como consecuencia puede ser una enfermedad mortal.[2]

Una forma de controlar y/o combatir esta enfermedad es mediante el uso de fármacos, esta terapia recibe el nombre de quimioterapia. El objetivo de la quimioterapia es controlar o matar a las células cancerígenas con el fin de dar una mejor calidad de vida al paciente.

Para su tratamiento, existen tres estrategias: la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. Esta última es el uso de los medicamentos para interrumpir el crecimiento de las células cancerosas, ya sea mediante su destrucción o impidiendo su

multiplicación. Algunos tratamientos buscan el control del padecimiento debido a que la curación se vuelve complicada, con el control se intenta reducir el tamaño de cualquier tumor canceroso y/o evitar el crecimiento y la propagación del cáncer (antimetastásicos), esto con la finalidad de que el paciente se sienta mejor y alargar su tiempo de vida.

Las enzimas constituyen una de las dianas importantes de acción farmacológica, incluyendo los quimioterápicos. Los inhibidores enzimáticos intervienen en la transformación de productos endógenos del propio organismo o de agentes patógenos que lo invaden, ayudan a transportar sustancias químicas vitales, regulan la velocidad de reacciones químicas o realizan funciones estructurales, reguladoras o de transporte. La inhibición enzimática tiene como fin provocar el incremento, acumulación o reducción de un sustrato, estimular o inhibir la actividad propia de la enzima mediante diferentes mecanismos.

La MEK cinasa (mitogen-activated protein kinase kinase), es una enzima que es parte de una de las cascadas de señalización llamada MAPK (mitogen-activated protein kinase) que la constituye una familia de serín/treonín cinasas activadas. Esta cascada de fosforilación incluye diversos miembros que generalmente describen una única vía la cual es iniciada por receptores de tirosina en la membrana celular y termina con la regulación de transcripción de genes en el núcleo dando como resultado la proliferación celular. Es por eso que esta vía ha sido clave para la investigación terapéutica en contra del cáncer pues al detener o inhibir esta vía la proliferación celular no se lleva a cabo y consecuentemente el cáncer no se propaga ni sigue creciendo. [3]

Los inhibidores de la MEK cinasa, son de los primeros inhibidores selectivos que se han desarrollado para inhibir la activación de la cadena de la MAPK y han entrado a ensayos clínicos. Como anteriormente se mencionó, la MEK cinasa es un interesante blanco farmacológico, por la capacidad de regulación de la vía de la MAPK, además de mostrar efectos menos tóxicos comparados a los otros inhibidores de la vía de la MAPK. Los inhibidores de la MEK cinasa que se han desarrollado (Figura 1), tienen una selectividad de inhibir de forma no competitiva en el sitio del ATP. A nivel clínico, los inhibidores de la MEK cinasa han probado ser antiangiogénicos y antimetastásicos. [4]

Muchos fármacos que se han desarrollado con este mecanismo de acción y que se han probado en ensayos clínicos, han superado la fase I y la fase II, dando resultados esperados para el control del cáncer. Sin embargo, en los estudios de fase III se han detectado la presencia de efectos

Quintana-Romero pertenece a la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo de la Facultad de Ciencias Químicas y realizó el proyecto como parte de su servicio social y trabajo de tesis. Loza-Mejía fungió como asesor del proyecto.

Los autores agradecen a la Universidad La Salle por el apoyo otorgado a través del proyecto Q-089.

adversos debido a una baja selectividad y problemas a nivel de su perfil farmacocinético.[4], [5] Es por ello, que es importante continuar con el desarrollo de nuevos inhibidores de la MEK que pueden utilizarse posteriormente en la clínica.

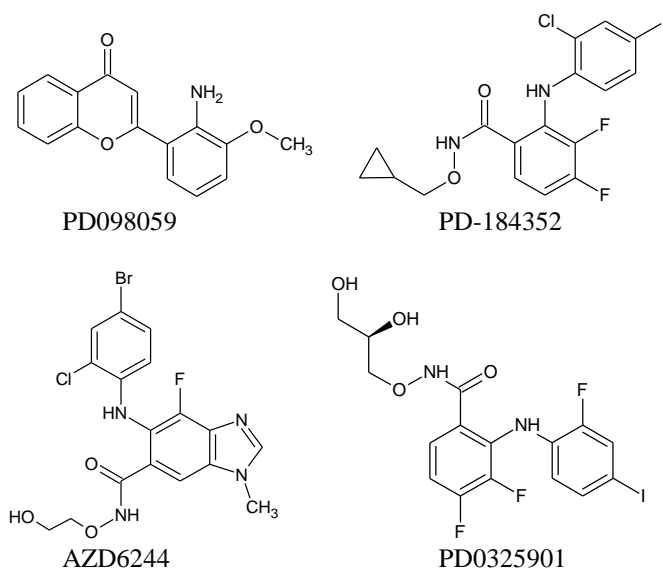


Figura 1. Inhibidores de la MEK cinasa probados en fase clínica

En trabajos recientes se ha descrito el desarrollo de inhibidores de la MEK basados en la estructura del ácido antranílico, similares al compuesto PD0325901. Estos derivados tuvieron una afinidad hacia la MEK en el rango nanomolar.[6] Este y otros estudios similares han buscado optimizar la afinidad hacia la MEK modificando los grupos funcionales en los dos anillos de benceno. Sin embargo, pocos estudios se han realizado sobre la cadena lateral alifática, y aún en estos estudios se mantiene el carácter alifático, por lo que el análisis del efecto de la incorporación de sistemas aromáticos en esta parte permanece inexplorado.

El presente trabajo aborda el diseño de nuevas moléculas como potenciales inhibidores de la MEK cinasa a través de las variaciones estructurales que se muestran en la **Figura 2**. Estos nuevos derivados se analizarán por acoplamiento molecular (*docking*) y se procederá a plantear una ruta sintética adecuada que permita la obtención de compuestos con esta estructura base en pocos pasos y buenos rendimientos.

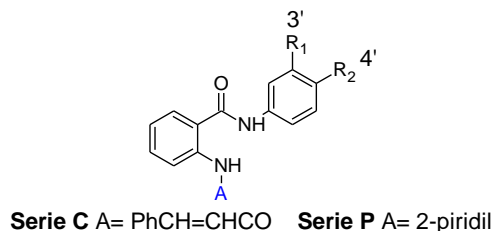


Figura 2. Estructura base de los compuestos propuestos como inhibidores de la MEK cinasa y variaciones estructurales propuestas.

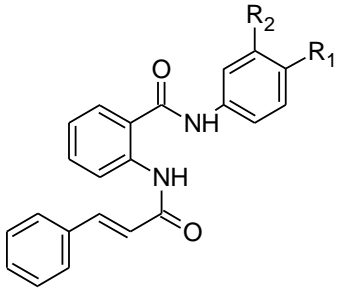
II. METODOLOGÍA

1. Estudios de acoplamiento molecular

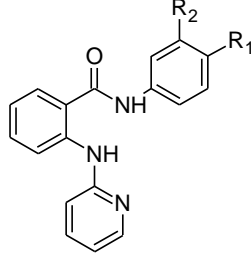
El estudio de acoplamiento molecular (*Docking*) se realizó de la siguiente forma:

a. Construcción de la base de datos: Mediante el uso del programa ChemSketch (ACDLabs, Toronto, Canadá) se realizó la base de datos. En esta base de datos se colocó cada molécula que se usaría para el *docking*. En el programa se empezó a construir la molécula en su forma bidimensional a lo que después se convirtió en su estructura tridimensional usando la opción de 3D Optimization la cual se encuentra en el programa, cada molécula que ya convertida en su conformación molecular se guardó en .mol para poder extraerlo al programa de acoplamiento molecular. Las moléculas que propuestas se encuentran en las tablas 1 y 2. La selección de las moléculas se basó en las características que confieren los grupos funcionales a las moléculas, procurando cubrir los grupos electroattractores (-CF₃, -CN), electrodonadores (-NMe₂, -OMe), hidrofóbicos (-Cl) y formadores de puentes de hidrógeno (-SO₂NH₂).

b. Preparación de la diana biológica: La estructura tridimensional del receptor farmacológico, la proteína MEK, se descargó en formato .pdb de la página del Protein Data Bank (www.pdb.org)[7] con el código 4AN3, que corresponde a la estructura cristalina de MEK1 unida al ligando sintético 5Y0 (N-[(2S)-2,3-bis(oxidanil)propoxi]-3,4-bis(fluoranil)-2-[(2-fluoranil-4-iodanil-fenil)amino]benzamida). La elección del archivo con el cual se trabajaría se basó en la resolución de la estructura cristalina, buscando que fuera la máxima disponible y la presencia de un ligando que sugiriera el sitio de unión más probable. La preparación de la proteína se realizó en el programa Molegro Virtual Docker versión 6.0.1 (Molegro, Aarhus, Dinamarca) incorporando los átomos de hidrógeno faltantes y eliminando las moléculas de agua y co-cristalizadores

Tabla 1. Derivados de la serie C analizados por acoplamiento molecular.


	R ₁	R ₂
C1	-H	-H
C2	-Cl	-H
C3	-OMe	-H
C4	-CN	-H
C5	-NMe ₂	-H
C6	-NO ₂	-H
C7	-CF ₃	-H
C8	-SO ₂ NH ₂	-H
C9	-H	-Cl
C10	-H	-OMe
C11	-H	-CN
C12	-H	-NMe ₂
C13	-H	-NO ₂
C14	-H	-CF ₃
C15	-H	-SO ₂ NH ₂

Tabla 2. Derivados de la serie P analizados por acoplamiento molecular.


	R ₁	R ₂
P1	-H	-H
P2	-Cl	-H
P3	-OMe	-H
P4	-CN	-H
P5	-NMe ₂	-H
P6	-NO ₂	-H
P7	-CF ₃	-H
P8	-SO ₂ NH ₂	-H
P9	-H	-Cl
P10	-H	-OMe
P11	-H	-CN
P12	-H	-NMe ₂
P13	-H	-NO ₂
P14	-H	-CF ₃
P15	-H	-SO ₂ NH ₂

c. Estudios de acoplamiento molecular (docking): Los estudios de acoplamiento molecular se realizaron empleando el programa Molegro Virtual Docker versión 6.0.1. En este programa se puede determinar un potencial sitio de unión y las moléculas candidatas más prometedoras son identificadas por un algoritmo de acoplamiento molecular llamado MolDock Optimizer, el cual está basado en un nuevo sistema de búsqueda que combina la evolución diferencial con un algoritmo de predicción de cavidades. El esquema de evaluación de cada complejo molécula-proteína es a través de un parámetro denominado Moldock score, el cual se refiere a las energías aproximadas de unión ligando-receptor (incluyendo las cargas electrostáticas y los puentes de hidrógeno formados) y las interacciones intraligando.

2. Parte química

El análisis retrosintético mostró que se podía partir de dos materias primas iniciales fácilmente asequibles, el ácido antranílico y el anhídrido isatoico. Ambas rutas, mostradas en la Figura 3, se evaluaron en términos de rendimiento y de dificultad del trabajo de reacción. Los compuestos sintetizados se caracterizaron mediante las técnicas analíticas habituales (IR, RMN, EM). Los datos espectroscópicos y espectrométricos pueden ser solicitados a los autores

III. RESULTADOS

1. Parte de acoplamiento molecular

La **Tabla 3** muestra los resultados generados en el estudio de acoplamiento molecular. De estos resultados se desprende que la serie C es la que muestra mejor afinidad teórica por la MEK (denotado por el menor valor de Rerank score), por lo que los estudios de síntesis se enfocaron únicamente a esta serie.

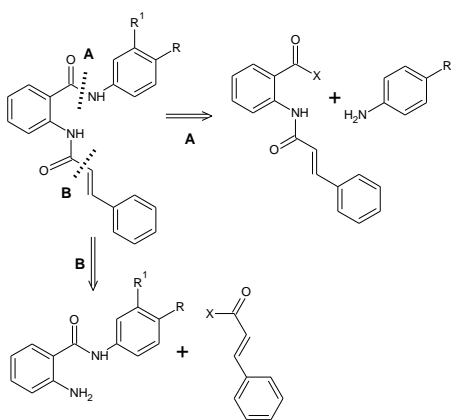
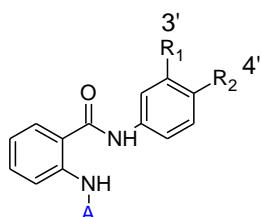


Figura 3. Análisis retrosintético de los compuestos proyectados.

Tabla 3. Resultados del estudio de acoplamiento molecular.



Serie C A= PhCH=CHCO

Serie P A= 2-piridil

Ligando	Rerank Score	/	Ligando	Rerank Score
C1	-99.4577		P1	-84.0271
C2	-105.435		P2	-86.3089
C3	-116.28		P3	-89.5242
C4	-119.066		P4	-91.8798
C5	-122.849		P5	-96.1774
C6	-113.883		P6	-87.847
C7	-125.7		P7	-101.88
C8	-128.83		P8	-103.938
C9	-105.303		P9	-91.9929
C10	-113.684		P10	-100.506
C11	-110.528		P11	-107.998
C12	-98.7833		P12	-96.6513
C13	-110.19		P13	-93.7638
C14	-119.87		P14	-103.297
C15	-119.169		P15	-108.505

Al comparar los valores de Rerank Score de los compuestos evaluados con el del ligando de referencia 5Y0 (Rerank score= -101.3), es notable que los compuestos de la serie C tuvieron en general valores menores de score, de hecho sólo los compuestos C1 y C12 tuvieron valores de score mayores. Esto es importante destacarlo pues el compuesto 5Y0 tiene una afinidad de 0.6 nM por MEK[8] por lo que es posible que

los compuestos de la serie C exhiban mayor afinidad en estudios in vitro.

Al analizar de forma detallada los modos de unión de los compuestos de las series C (Figura 4), destaca que la mayoría tiene una interacción tipo puente de hidrógeno con la Phe 209 a través del hidrógeno del enlace amida con el anillo de anilina, mientras que la cadena de cinamoilo tiene pocas interacciones, por lo que es probable que la incorporación de esta cadena permita un acomodo favorable de este tipo de compuestos en el sitio receptor. En cambio los compuestos de la serie P tienen interacciones tipo puente de hidrógeno con Val 127 y Lys 97.

La comparación de los modos de unión de los compuestos C15, P15 y 5Y0 con los aminoácidos del sitio de unión evaluado se muestra en la Figura 4. El modo de unión del compuesto P15 es muy similar al del compuesto 5Y0, adoptando conformaciones similares, mientras que en el caso del compuesto C15, la cadena de cinamoilo ocupa un sitio que no se ha explorado en estudios previos. Esto abre la puerta a que en estudios futuros se contemple la sustitución en el sistema de cinamoilo, además de que podría brindar mayor selectividad hacia MEK por sobre otras cinasas.

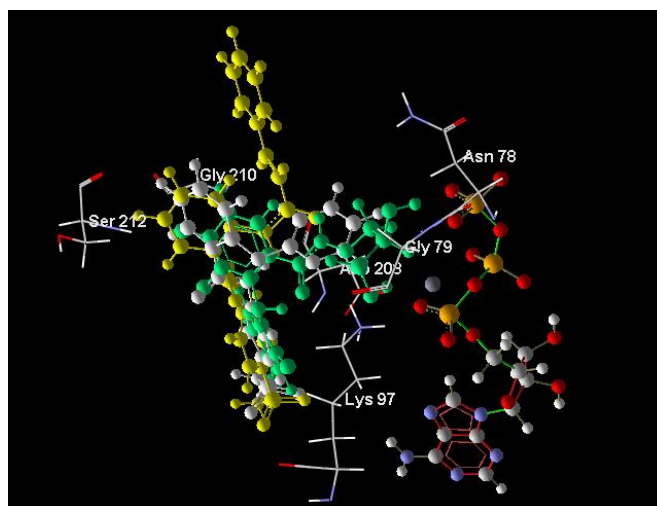


Figura 4. Comparación del modo de unión del ligando 5Y0 (en blanco), P15 (en verde) y C15 (en amarillo).

2. Parte química

Es esencial una buena gramática del español. Los autores deben verificar su escritura. Si el autor tiene deficiencias en su ortografía se le recomienda tener a la mano y utilizar un buen diccionario del idioma, gramatical y de dudas del idioma; o bien usar el corrector de la computadora siempre que sea posible. Se deben evitar por completo los coloquismos.

La propuesta sintética “A” de la **Figura 3** partió del tratamiento del ácido antranílico con cloruro de cinamoilo en piridina como medio de reacción. Durante esta transformación se observaron dos productos, uno el producto de sustitución deseado y un segundo producto menos polar, los productos se hallaban en proporción 1:1 con una importante cantidad de materia prima sin reaccionar. El producto menos polar se identificó posteriormente como un derivado de

benzoxazinona, cuya formación se explica en la **Figura 4**. Este producto mostró ser un nuevo punto de partida pues era muy fácil de aislar y purificar en un rendimiento del 90% y podía ser aprovechado para la obtención de los productos finales mediante el tratamiento de dicho compuesto con las aminas aromáticas con el patrón de sustitución deseado.

El tratamiento de la benzoxazinona con anilina mostró que dos factores eran importantes: catálisis ácida suave, ya que sin ésta no procedía la reacción y la temperatura, ya que cuando se incrementaba la temperatura del medio de reacción se obtenían productos de ciclación no deseados (3-fenil-2-[(E)-2-feniletetil]quinazolin-4(3H)-ona,). Una revisión de la literatura mostró que productos con este tipo de estructura ciclada han mostrado actividad antiviral,[9] lo que amplía el potencial de la ruta de síntesis desarrollada para la obtención de moléculas bioactivas.

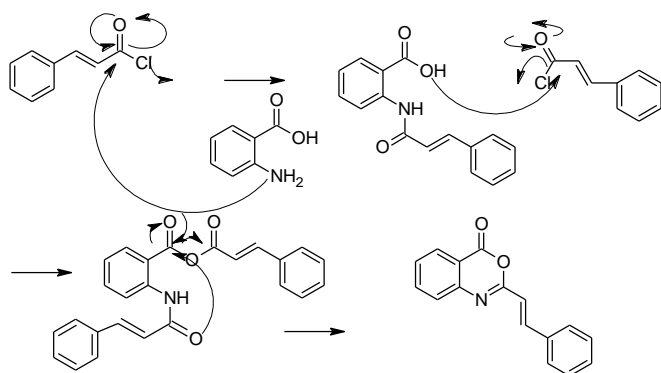


Figura 5. Mecanismo de obtención de la benzoxazinona

La **Figura 5** resume la secuencia de síntesis desarrollada. Este procedimiento se probó para la obtención de los compuestos C1, C2 y C3, obteniendo rendimientos del 40 al 80% dependiendo de la naturaleza de los grupos funcionales en el anillo de anilina.

Cabe señalar que el trabajo de reacción en todos los pasos de la secuencia es muy sencillo y no se requiere el uso de disolventes orgánicos en cantidades importantes para la purificación, por lo que es una ventaja importante de este procedimiento.

Finalmente, las perspectivas de este trabajo incluyen la obtención de los derivados con menores valores de Rerank score y la realización de los estudios de afinidad e inhibición de la MEK a fin de validar los estudios del estudio teórico de acoplamiento molecular.

IV. CONCLUSIONES

Se realizaron los estudios de acoplamiento molecular sobre las moléculas propuestas y se escogió a los compuestos de la "serie C" como las moléculas con mayor probabilidad de unirse con alta afinidad a la MEK cinasa. El sistema del grupo cinamoilo ocupa una región previamente no explorada, lo que podría contribuir a aumentar la selectividad hacia MEK sobre otros tipos de cinasas. Los valores de Rerank score sugieren que tendrán una afinidad muy alta con la MEK, en el rango de nanomolar.

Se desarrolló una ruta de síntesis sencilla que permite la obtención de los derivados del N-fenil-2-[(2E)-3-fenilprop-2-

enoil]amino}benzamida (serie C) en dos pasos a partir del ácido antranílico, la cual se probó con la obtención de tres compuestos C1, C2, y C3. Esta ruta puede ser explotada para la obtención de otros derivados y realizar estudios profundos de relación estructura-actividad.

También se obtuvieron otros compuestos con interés biológico al cambiar la fuerza del ácido, en este caso se obtuvieron los derivados de 3-fenil-2-[(E)-2-feniletetil]quinazolin-4(3H)-ona, los cuales pueden ser estudiados como posibles antivirales.

Queda pendiente la determinación de la actividad antitumoral de estos compuestos así como los estudios de afinidad hacia la MEK y otras cinasas para determinar su selectividad.

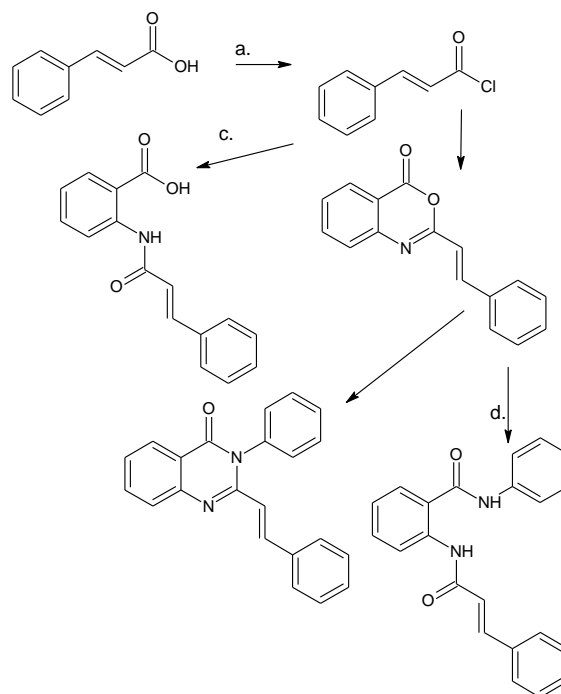


Figura 6. Ruta de síntesis desarrollada en este trabajo. a. SOCl₂, reflujo, 90 min; b. ácido antranílico en proporción 1:1; c. ácido antranílico en proporción 1:2 con el cloruro de cinamoilo; d. anilina, acetonitrilo, AcOH (cat.), reflujo 4 h; e. anilina, DMF, TFA (cat.) reflujo, 4h.

REFERENCIAS

- [1] R. Siegel, J. Ma, Z. Zou, and A. Jemal, "Cancer statistics, 2014.," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 64, no. 1, pp. 9–29, Jan. .
- [2] O. Afzal, S. Kumar, M. R. Haider, M. R. Ali, R. Kumar, M. Jaggi, and S. Bawa, "A review on anticancer potential of bioactive heterocycle quinoline," *Eur. J. Med. Chem.*, (en prensa)
- [3] M. Kiga, F. Tanzawa, S. Iwasaki, F. Inaba, K. Fujiwara, H. Iwadare, T. Echigo, Y. Nakamura, T. Shibata, K. Suzuki, I. Yasumatsu, A. Nakayama, Y. Sasazawa, E. Tashiro, M. Imoto, and S. Kurakata, "Antitumor effects of novel highly hydrophilic and non-ATP-competitive MEK1/2 inhibitor, SMK-17.," *Anticancer. Drugs*, vol. 23, no. 1, pp. 119–30, Jan. 2012.
- [4] Y. Zhao and A. A. Adjei, "The clinical development of MEK inhibitors.," *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, vol. 11, no. 7, pp. 385–400, Jul. 2014.

- [5] C. Frémin and S. Meloche, "From basic research to clinical development of MEK1/2 inhibitors for cancer therapy," *J. Hematol. Oncol.*, vol. 3, p. 8, Jan. 2010.
- [6] I. V Hartung, M. Hitchcock, F. Pühler, R. Neuhaus, A. Scholz, S. Hammer, K. Petersen, G. Siemeister, D. Brittain, and R. C. Hillig, "Optimization of allosteric MEK inhibitors. Part 1: Venturing into underexplored SAR territories," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 23, no. 8, pp. 2384–2390, Apr. 2013.
- [7] H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, and P. E. Bourne, "The Protein Data Bank," *Nucleic Acids Res.*, vol. 28, no. 1, pp. 235–242, Jan. 2000.
- [8] P. Rice, "Novel Carboxamide-Based Allosteric Mek Inhibitors: Discovery and Optimization Efforts Toward X1518 (Gdc-0973)," *Acs Med.Chem.Lett.*, vol. 3, p. 416, 2012.
- [9] M. T. Rudd, J. W. Butcher, K. T. Nguyen, C. J. McIntyre, J. J. Romano, K. F. Gilbert, K. J. Bush, N. J. Liverton, M. K. Holloway, S. Harper, M. Ferrara, M. DiFilippo, V. Summa, J. Swestock, J. Fritzen, S. S. Carroll, C. Burlein, J. M. DiMuzio, A. Gates, D. J. Graham, Q. Huang, S. McClain, C. McHale, M. W. Stahlhut, S. Black, R. Chase, A. Soriano, C. M. Fandozzi, A. Taylor, N. Trainor, D. B. Olsen, P. J. Coleman, S. W. Ludmerer, and J. A. McCauley, "P2-quinazolinones and bis-macrocycles as new templates for next-generation hepatitis C virus NS3/4a protease inhibitors: discovery of MK-2748 and MK-6325," *ChemMedChem*, vol. 10, no. 4, pp. 727–35, Apr. 2015.