

## Capítulo 3. ANTECEDENTES

### 3.1 MAPk p38

Tres diferentes familias de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPk) han sido identificadas en las células de mamíferos; éstas son: las cinasas reguladas extracelularmente (ERK), las p38 y las cinasas aminoterminal c-Jun/cinasas activadas por estrés (JNK/SAPK) [*Ciliberto & Savino; 2001*]

La proteína p38 es una enzima importante en la señalización celular para la síntesis de citocinas proinflamatorias como la Interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) y el Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) [*Abbas, et. al., 2004*]

Hay cuatro isoformas de la MAPk p38: alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), gamma ( $\gamma$ ) y delta ( $\delta$ ) [*Chang, et al.; 2001*] Entre sí, los miembros p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  y p38 $\delta$  tienen 75%, 62%, y 64% de similitud en su secuencias de aminoácidos respectivamente, con la p38 $\alpha$  [*Ciliberto & Savino; 2001*] p38 $\alpha$  y p38 $\beta$  se encuentran en todos los tejidos, p38 $\gamma$  en tejido óseo y p38 $\delta$  en pulmón, riñón, páncreas e intestino delgado. Durante las enfermedades inflamatorias hay un incremento en la producción de la isoforma p38 $\alpha$  [*Chakravarty & Dugar; 2002*] Es por esto que la inhibición de la proteína MAPk p38 $\alpha$  y la consecuente interrupción de su actividad en la transducción de la señal es una ruta potencial para la intervención terapéutica.

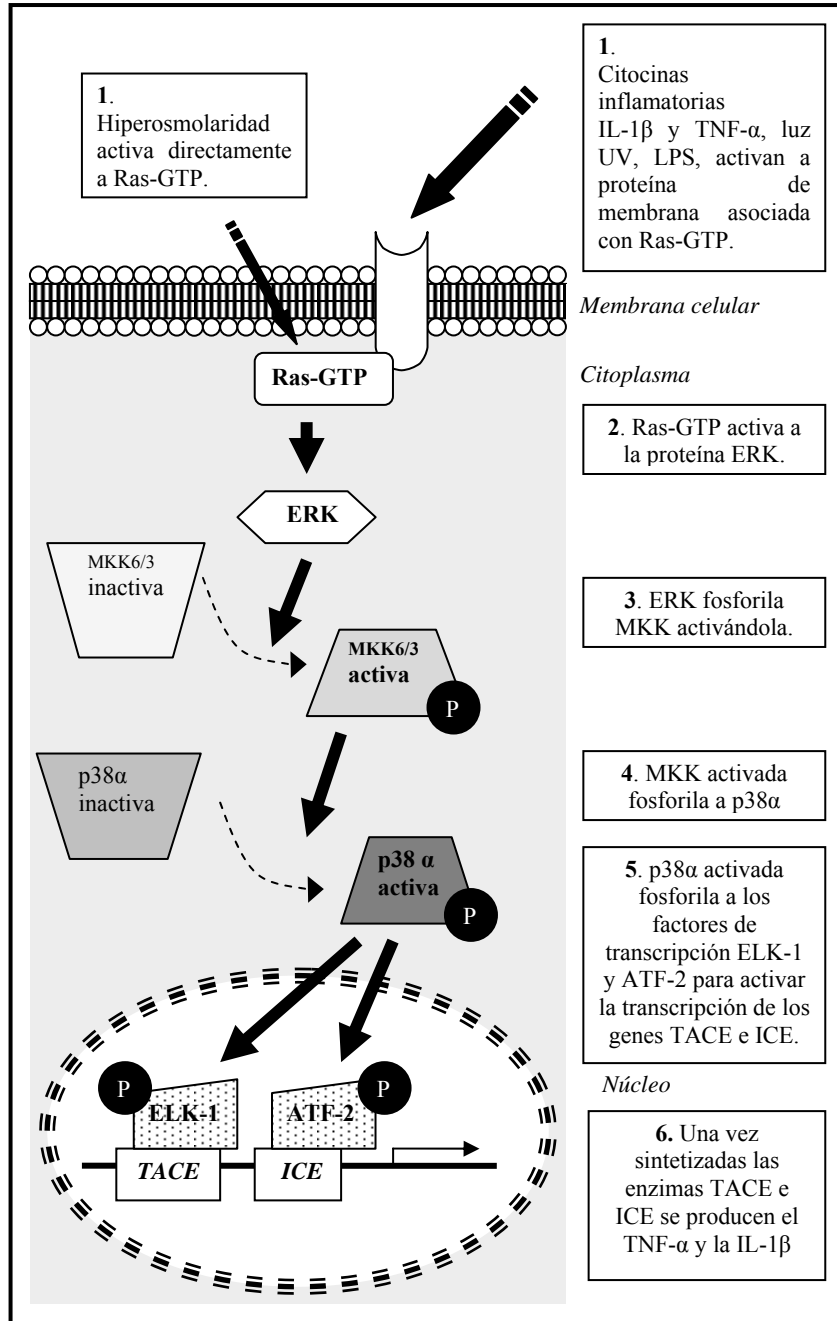
La p38 $\alpha$  ha sido identificada como la molécula blanco de los compuestos piridinilimidazol, los cuales son conocidos por su actividad para inhibir la liberación de

citocinas en monocitos estimulados por lipopolisacárido (LPS) [*Ciliberto & Savino; 2001*]  
 Sin embargo, debido a su similitud, también se ha reportado la inhibición de la isoforma  $\beta$  por parte de los compuestos piridinilimidazol, mientras que los miembros  $\gamma$  y  $\delta$  son insensibles a esos compuestos [*Wang, et al.; 1997*]. La p38 se descubrió como una proteína cinasa activada en macrófagos de ratones en respuesta a LPS, y se sabe que su activación también es respuesta de estímulos de estrés (calor, luz UV, y alta osmolaridad), u otras cinasas específicas como las proteínas cinasa cinasa activadas por mitógeno 3 y 6 (MKK3 Y MMK6) [*Ciliberto & Savino; 2001*]

Las proteínas son activadas por las cinasas MKK6 y MKK3 que a su vez fueron activadas por ERK; recientemente se demostró que las MAPk interactúan específicamente debido a su estructura del sitio de unión y las interacciones que genera con sus ligandos, esto puede conferirle especificidad en la vía de señalización [*Chang, et.al; 2002*]. Las proteínas involucradas en el proceso inflamatorio son activadas por fosforilación por la proteína antecedente para finalmente activar a factores de transcripción.

Las MAPk están involucradas en diversas vías de comunicación celular incluyendo la de enfermedades inflamatorias crónicas y se ha demostrado que hay un exceso de producción de TNF- $\alpha$  y de IL-1 $\beta$  en artritis reumatoide, enfermedad de Crohn y psoriasis [*Regan, et.al.; 2002*]

Inicialmente se activa el proceso Ras-GTP por fosforilación al tener contacto una proteína o receptor de membrana asociada con algún estímulo mencionado, **ver Figura 3.1.**



**Figura 3.1.** Papel de la MAPk p38α en la cascada de activación de transcripción de enzimas TACE e ICE, en fagocitos mononucleares y linfocitos . Modificado de Chakravarty & Dugar; 2002 y Abbas, 2004.

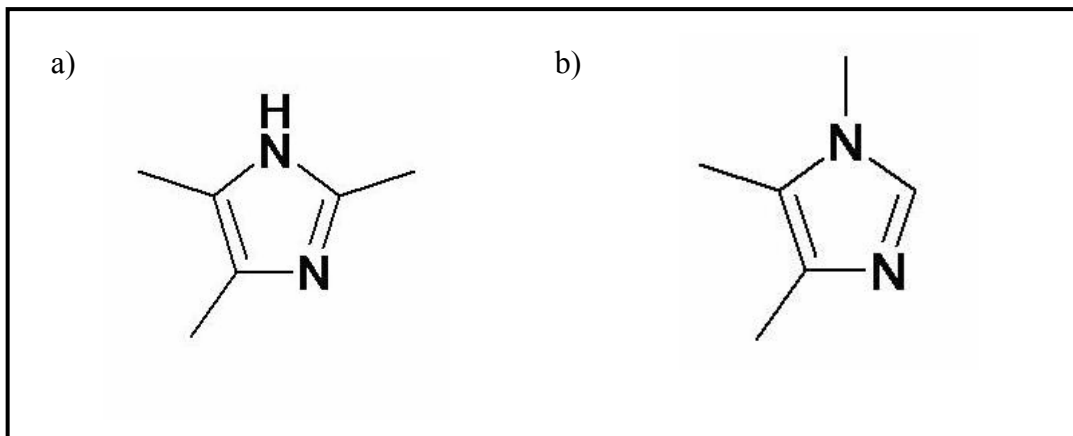
Se genera un cambio estructural en la proteína colocándola en su conformación activa que continua la señalización a través de la proteína ERK, ésta a su vez activa a la proteína MKK3 y MKK6; estas proteínas cinasas son fosforiladas en el residuo Ser189 (serina en posición 189). Al adquirir esta nueva conformación activada, las MKK6 y MKK3 fosforilan en los residuos de Thr181 y Tyr182 (treonina181 y tirosina182) a MAPkp38 $\alpha$ . Una vez activada, la MAPk p38 $\alpha$  tiene una amplia gama de sustratos que van desde otras cinasas hasta factores de transcripción [*Ciliberto & Savino; 2001*] Entre los factores que activa, dentro del núcleo celular, se encuentran el Factor 2 Activador de Transcripción (ATF2) y el factor Proteína Ets-like 1 (ELK1). Éstos promueven la transcripción de genes involucrados en la síntesis de citocinas que son los de la enzima convertidora de TNF- $\alpha$  (TACE), y la enzima convertidora de IL-1 $\beta$  (ICE), éstas son requeridas para el procesamiento de proTNF-  $\alpha$  y pro IL-1 $\beta$  a su forma activa [*Wagner & Laufer, 2005*]

### 3.2 AGENTES ANTICITOCINAS

Recientemente se han utilizado productos que impiden la acción biológica de citocinas, como antagonistas competitivos de receptores, que han permitido una alternativa original para el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas como por ejemplo la artritis reumatoide, la enfermedad de Crohn o la psoriasis [*Wagner & Laufer; 2005*] Los tratamientos antes mencionados han resultado exitosos en las pruebas clínicas debido a su intervención en la señalización de citocinas inhibiendo proteínas específicas como la MAPk p38 $\alpha$ , las cuales juegan un papel clave en el proceso de inflamación [*Chen, et al.; 2002*]

Sin embargo la mayoría de los fármacos inhibidores de citocinas son proteínas y poseen varias desventajas propias de su tipo como baja estabilidad, poca penetración celular, poca actividad celular, baja absorción oral, vida media corta, metabolismo acelerado y sobre todo un alto costo de manufactura. Es por esto que se desea el desarrollo de moléculas que posean la misma actividad biológica pero que al mismo tiempo satisfagan los aspectos farmacocinéticos ya que serían una alternativa muy favorable en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunes [*Wagner & Laufer; 2005*]

Gran número de reportes han descrito varias clases de inhibidores para la MAPk p38 $\alpha$ , y recientemente una serie de artículos han descrito una clase de piridinil-imidazoles que son inhibidores selectivos para dicha proteína, éstos fueron la primer clase de inhibidores de la p38 $\alpha$  que probaron ser una excelente herramienta para la elucidación de las bases estructurales y funcionales de la proteína. Se ha demostrado que los piridinil – imidazoles son inhibidores competitivos con ATP y típicamente son imidazoles 2,4,5 trisustituidos o imidazoles 1,4,5 trisustituidos, ver **Figura 3.1** [*Chakravarty & Dugar; 2002*] Este tipo de ligandos inhibidores tienen alta especificidad y eficacia con la p38 $\alpha$  y tienen poco efecto en otras proteína cinasas por lo que resultan de especial interés para el desarrollo de nuevos antiinflamatorios, [*Tong, et.al. ; 1997*]



**Figura 3.2.** Estructura de a) imidazoles 2,4,5-trisustituidos y b) imidazoles 1,4,5-trisustituidos. Modificado de Chakravarty & Dugar; 2002.

Estudios cristalográficos han revelado la estructura de los complejos p38-inhibidor, los cuales arrojan tres características importantes en la estructura de los inhibidores:

- 1 La ocupación de un sitio accesorio, ocupado usualmente en los piridinilimidazoles por el fluorfenil.
2. Un puente de hidrógeno entre el nitrógeno del piridinil y el N-H de la Met 109 (metionina en posición 109).
3. Una interacción entre la lisina 53 y el N-H del imidazol no alquilado.

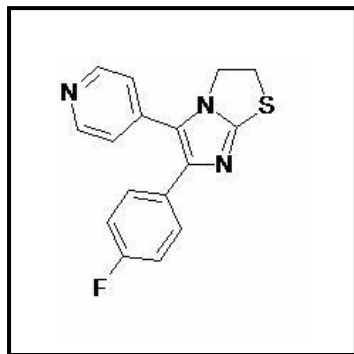
De estas tres la más importante es el puente de hidrógeno entre la piridina y la Met 109, puesto que esa misma interacción también se forma entre el N-1 de la adenina del ATP y la proteína. [Adams, *et al.*; 2001]

Los compuestos piridinilimidazol son representantes de una nueva clase de agentes antiinflamatorios que se encargan de inhibir la síntesis de una gran variedad de proteínas proinflamatorias. [Laufer, *et al.*; 2005] Subsecuentemente se ha publicado información adicional demostrando que la inhibición selectiva de las cinasas se correlaciona con la

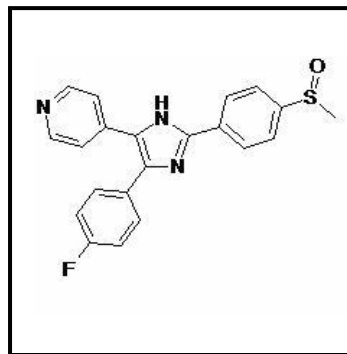
habilidad del piridinilimidazol para bloquear la síntesis de citocinas inflamatorias. Experimentos bioquímicos han demostrado que esa actividad se debe a la capacidad de los piridinilimidazoles para competir con la molécula de ATP por la unión a la p38.

En 1984, Lantos y colaboradores en SmithKline & French (SK&F) sintetizaron una serie de piridinil-imidazoles teniendo como molécula cabeza de serie la SK&F 86002 **ver Figura 3.3a**, sin conocer el mecanismo exacto de acción. Se comenzaron a realizar estudios que relacionaban la estructura con la actividad (SAR) y el trabajo indicó que una piridina en la posición 4 era requerida para que se tuviera actividad; en 1995 Gallagher y sus colaboradores diseñaron una nueva clase de compuestos siguiendo la misma línea, su compuesto base el SB203580, **ver figura 3.3b**, satisfacía las necesidades para funcionar como inhibidor de la p38 $\alpha$  con alta especificidad y un valor de pIC<sub>50</sub> de 8 $\mu$ M. A partir de 1996 se sintetizaron imidazoles sustituidos que permitían mejorar los valores de pIC<sub>50</sub>. [*Jackson & Bullington, 2002*] Estudios cristalográficos, de mutaciones y bioquímicos demostraron que la molécula SB203580 se une al sitio de unión de la ATP de la p38 y así mismo se han desarrollado una amplia gama de inhibidores [*Adams, et al.; 2001*]

Una característica en común de estas moléculas es la presencia de un grupo fenilo en la posición 4 el cual cumple con las necesidades lipofílicas aparentes hasta el momento de la proteína.



**Figura 3.3a.** Estructura de SK&F86002. Jackson & Bullington, 2002.

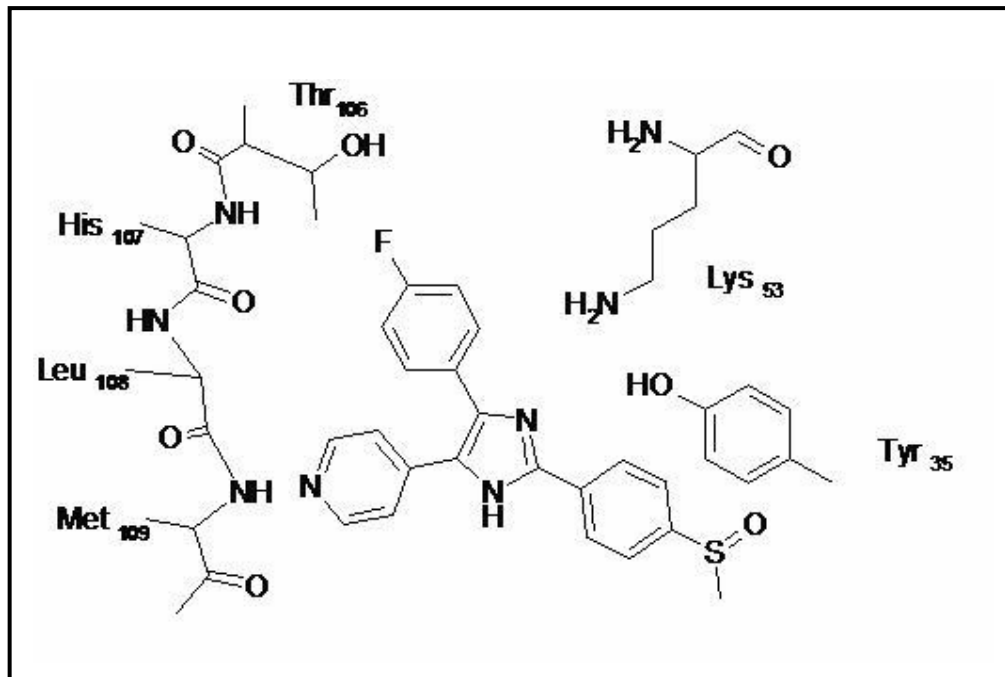


**Figura 3.3b.** Estructura de SB203580. Jackson & Bullington, 2002.

Así mismo, se observa la presencia de un anillo de piridina o pirimidina en la posición 5 con un nitrógeno en la posición 4 esencial para que se presente la actividad; se demostró en varios estudios cristalográficos que el nitrógeno tiene interacciones con Met109 en el sitio de unión de la MAPk p38 $\alpha$ , estos estudios comprobaron las interacciones comunes presentes en todos los inhibidores de la proteína provistos por el análisis estructura actividad (SAR) que habían mostrado que la presencia y posición del átomo de nitrógeno era esencial y que el anillo de imidazol está en la misma región espacial que el anillo de adenina del ATP. Finalmente se observó que el grupo sulfóxido ocupa una región en el espacio similar a la del grupo fosfato en el ATP, esto conforma el farmacóforo imprescindible, ver **Figura 3.4** [Chakravarty & Dugar; 2002]

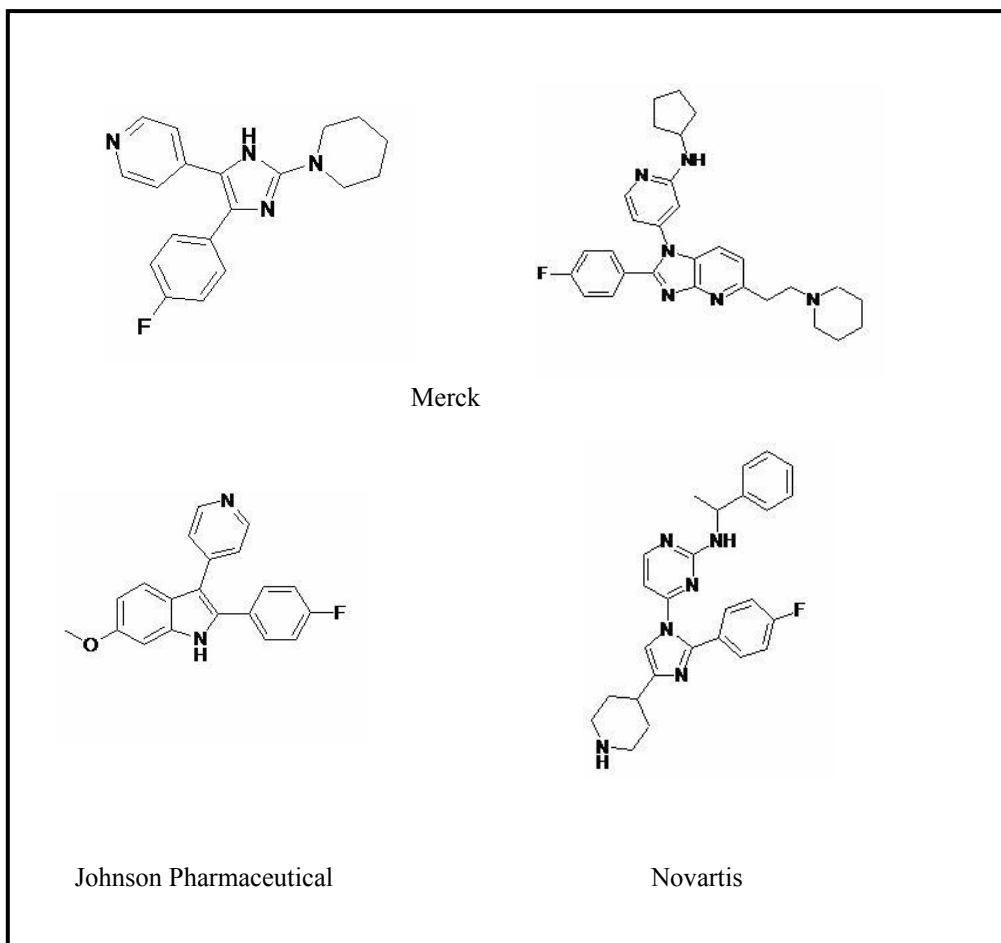
La importancia de encontrar nuevos sustituyentes para el farmacóforo surge por la necesidad de mejorar las interacciones fisicoquímicas, lo cual aumentaría la afinidad y la especificidad; pero también reduciría la toxicidad ya que se encontró que una primera generación de moléculas basadas en SK&F86002 ocasionaban una severa toxicidad en el hígado ya que interactuaban con el citocromo hepático CYP450 [Wagner & Laufer, 2005]





**Figura 3.4.** Sitio de unión de la proteína p38 $\alpha$  con el ligando SB203580 e interacciones fundamentales. Modificado de Wagner & Laufer, 2005.

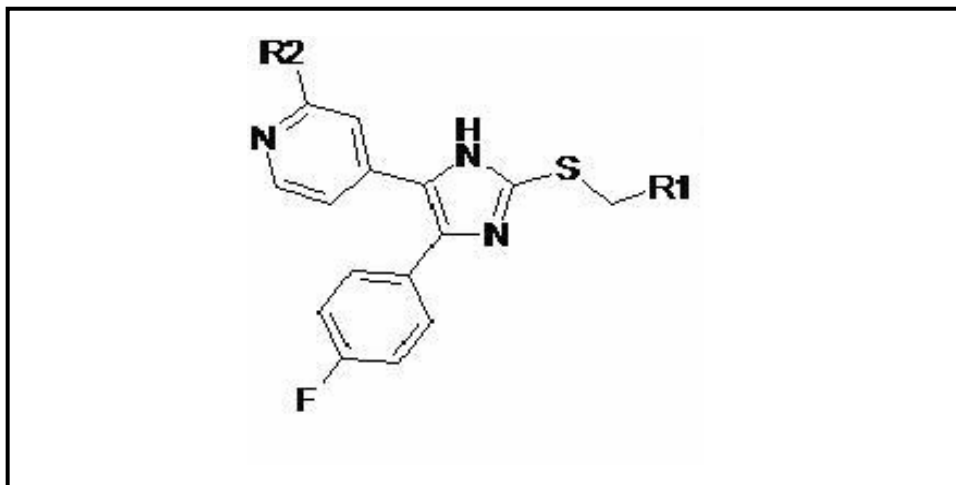
Las soluciones para evitar esta interacción fue la introducción de sustituyentes estéricamente demandantes en la posición 2 del anillo de la piridina, la introducción de sustituyentes en el anillo del imidazol adyacente a la piridina e incluso el reemplazo del imidazol con otros 5- o 6- heterociclos. Distintas compañías farmacéuticas como GlaxoSmithKline, Merck, Bayer, Boehringer-Ingelheim, Vertex, Astra Zeneca, Novartis, Aventis, han sintetizado nuevos inhibidores con base en los estudios SAR y cristalográficos realizados manejando diversas variaciones en las moléculas, tales como imidazoles no sustituidos, imidazoles N-sustituidos, piridinil pirroles, piridinil piridazinas, sustitución de anillos, entre otros, **ver Figura 3.5, [Wagner & Laufer, 2005]**



**Figura 3.5.** Distintas modificaciones hechas al farmacóforo para mejorar la especificidad y la afinidad y disminuir la toxicidad, sintetizadas por varios laboratorios farmacéuticos. Cirillo Pier *et. al.* 2002.

Las moléculas analizadas en este proyecto comprenden un grupo de ligandos 2-  
 alquil sulfanil imidazoles sintetizados y probados experimentalmente por investigadores de  
 la Facultad de Farmacia de la Universidad de Tübingen, **ver Figura 3.6**; estos compuestos  
 son análogos de SK&F86002 y los investigadores mediante estudios SAR de  
 requerimientos estructurales mínimos identificaron similitudes entre los sustituyentes 4-

fluorofenil y piridin-4-yl, semejantes a los de SB203580.



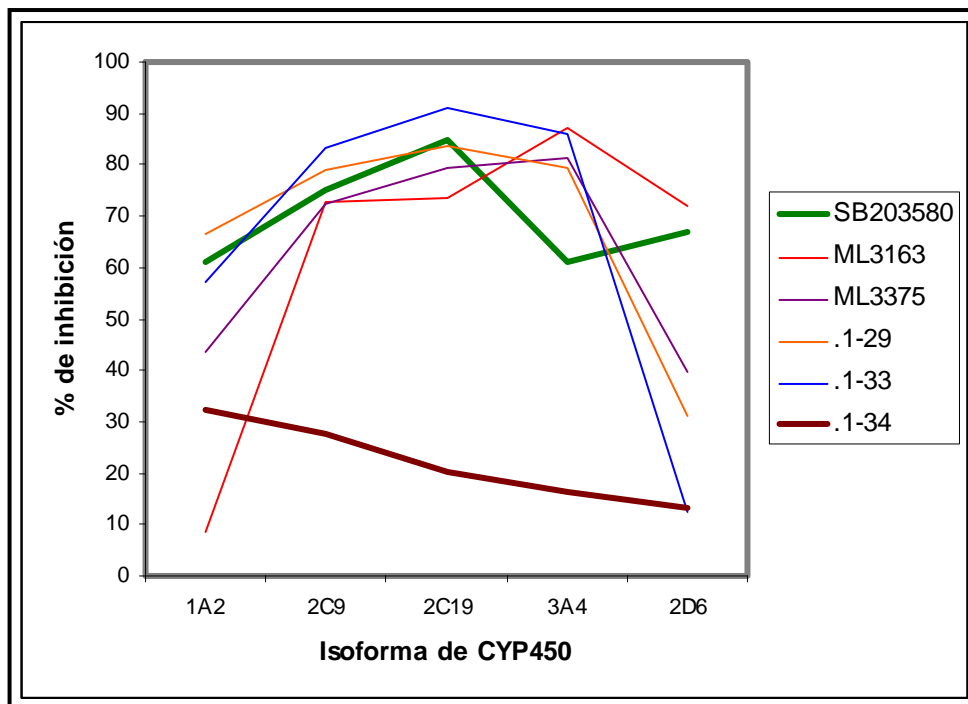
**Figura 3.6.** 2-Alquil sulfanil imidazoles sintetizados en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Tübingen. Wagner & Laufer, 2005.

Se observó que con los distintos cambios había un decremento en la toxicidad  
 [Wagner & Laufer, 2005]

Algunos de los compuestos diseñados se enlistan en la **Tabla 3.1** y sus valores respecto a la inhibición de las isoformas de CYP450 pueden ser observados en el **Gráfico 3.1.**

| Código | R <sup>1</sup>  | R <sup>2</sup>                        |
|--------|-----------------|---------------------------------------|
| ML3163 | 4-MeS(O)-ph     | H                                     |
| ML3375 | H               | H                                     |
| 1-29   | H               | <i>rac</i> -PhCH(CH <sub>3</sub> )NH  |
| 1-33   | CH <sub>3</sub> | <i>rac</i> -PhCH(CH <sub>3</sub> )NH- |
| 1-34   | CH <sub>3</sub> | H <sub>3</sub> CC(O)NH-               |

**Tabla 4.1.** Modificaciones en los distintos residuos según los compuestos sintetizados y probados experimentalmente en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Tübingen. Wagner & Laufer, 2005.



**Gráfico 4.1.** Valores de % de inhibición de las distintas isoformas del CYP450 para evaluar la toxicidad; a menor % de inhibición menor toxicidad tendrá el compuesto. Realizado a partir de los valores de porcentaje de inhibición de isoformas del CYP450 de Wagner & Laufer, 2005.

En el gráfico podemos observar una clara disminución de la toxicidad con ligandos sustituidos como el 1-34, respecto al SB203580. Sin embargo, también se aprecia que no hay una disminución tan significativa lo que obliga a diseñar nuevas estructuras que reduzcan más el porcentaje de inhibición del citocromo P450. La disminución en la toxicidad de ligandos como el 1-34, está debida a su estructura y propiedades fisicoquímicas que lo hacen más específico a la MAPk p38 $\alpha$  al mejorar las interacciones con su sitio de unión. Es por lo tanto importante conocer las características estructurales y fisicoquímicas que deben poseer los ligandos para que actúen específicamente y de manera eficaz.

Teniendo la información proporcionada por el farmacóforo y los valores de pIC<sub>50</sub>, así como el conocimiento del decremento en la toxicidad con distintas sustituciones, es importante hacer un estudio QSAR que brinde de manera cuantitativa información sobre la importancia de los grupos del farmacóforo y las interacciones con la MAPk p38 $\alpha$ . Esto incluye un típico análisis computacional para distintos compuestos usados como agentes terapéuticos [*Ragno, et. al.; 2000*]

### 3.3 HERRAMIENTAS *IN SILICO*

La importancia de contar con la estructura del receptor, la MAPk p38 $\alpha$ , es vital para realizar el estudio; su estructura sólo está disponible en su forma no fosforilada bajo el código 1A9U que puede obtenerse del *Brookhaven Protein Data Bank* (PDB).

Un estudio realizado anteriormente compara mediante un estudio SAR la estructura de 1A9U y la compara con otras cinasas como ERK2 encontrándose casi un 50% de homología y una topología casi idéntica lo cual indica que el modelo puede ser utilizado para el estudio que nosotros llevamos a cabo [*Scior; 2001*]

El PDB proporciona la estructura de MAPk p38 $\alpha$  y del ligando SB203580, este modelo tiene el código 1A9U. Es importante destacar que las estructuras del PDB son elucidadas por métodos cristalográficos en un determinado momento de la proteína por lo cual estas estructuras deben llevar un tratamiento que asegure su confiabilidad.

### 3.3.1 QSAR

El estudio QSAR (*Quantitative Structure Activity Relationship*), estudio cuantitativo de relación estructura actividad, es una herramienta estadística y computacional que mediante el uso de variables dependientes y variables independientes puede utilizar la regresión lineal simple o múltiple para el desarrollo de un modelo predictivo.

Las variables dependientes son datos conocidos de concentración de algunos compuestos para que se presente determinada actividad obtenidos mediante algún ensayo *in vitro* o *in vivo*. Las variables independientes son descriptores de ligandos y sitio de unión, que detallan las características fisicoquímicas, estructurales y electrónicas de los compuestos utilizados como ligandos, del sitio de unión de los receptores y de las interacciones posibles entre ambos, ofreciendo valores numéricos para cada descriptor.

La ecuación o modelo predictivo obtenido será capaz de calcular teóricamente la concentración necesaria de un compuesto no incluido en el estudio para que presente determinada actividad, sin necesidad de realizar las pruebas *in vitro* o *in vivo*.

Los análisis QSAR necesitan de dos datos: la actividad biológica, y los valores numéricos de los descriptores o parámetros [Martin, et al.; 1981] La actividad biológica es un dato que se debe obtener de experimentos, como medir en líneas celulares el porcentaje de inhibición de crecimiento celular o medir la síntesis de determinado compuesto de interés, dependiendo de las características necesarias para el experimento. En muchas

ocasiones la actividad suele medirse en términos de concentración, ya sea inhibitoria o de estimulación; entendiendo que el valor que representa a la molécula más activa sería el de aquella que necesita de menor concentración para presentar el efecto o la actividad esperada [*Martin, Y.C, et al.; 1981*]

Los descriptores son valores cuantitativos que reflejan la característica, ya sea fisicoquímica o estructural de una molécula. En el laboratorio, los descriptores más utilizados son los que miden las propiedades hidrofóbicas, de disociación o de tamaño de los ligandos y sitios de unión de los receptores. De manera teórica, es posible calcular algunos otros parámetros como es el caso de descriptores cuánticos o de conectividad. No obstante las herramientas computacionales han puesto a disposición los cálculos de descriptores de una forma más rápida y eficiente [*Xu, et al.; 2002*] Algunos programas están desarrollados para calcular aspectos tales como la superficie polar o no polar, así como su energía, cálculos que serían tediosos y largos debido al número de algoritmos matemáticos necesarios para su cuantificación [*Katritzky, et al.; 2002*]

Existe una gran cantidad de descriptores que utilizan complicados algoritmos matemáticos para su cálculo. Es importante realizar una adecuada selección de los descriptores a utilizar en la ecuación final para lo cual se debe analizar su importancia respecto a la actividad biológica.

Al tener los datos de la actividad biológica y los descriptores que se desean utilizar, se puede evaluar su relación graficando los valores. Es importante mencionar que el valor de la actividad biológica debe ir en el valor de las Y ya que son las variables que son

dependientes del descriptor que se utiliza, mientras que los descriptores toman los valores de X [*Scior; 2001*]

Al proporcionar una ecuación por regresión, se busca la linealidad de los datos, por lo que los descriptores que aproximen más a la ecuación a un valor de R<sup>2</sup> de 1 son considerados importantes. Esta selección debe hacerse con base a los resultados encontrados en el estudio SAR. Es importante mencionar que el número de descriptores no debe exceder de 1/3 del número de ligandos a analizar, de otra manera al ir incrementando el número de descriptores aumenta el valor de R<sup>2</sup> pero no da una verdadera evaluación fisicoquímica ni estructural, ya que se busca encontrar un consenso que funcione para otras moléculas también [*Scior; 2001*] La evaluación del modelo es muy importante, existen diferentes métodos para hacerlo mismos que serán explicados en el capítulo de metodología.

Interpretar la ecuación o modelo predictivo, al encontrar una línea recta no quiere decir automáticamente que los valores de Y se deben a la existencia de las variables X, puede ser que tanta libertad en la descripción genera casualmente la curva de Y. Es por eso que un análisis QSAR requiere de estudios avanzados y conocimientos multidisciplinarios científicos [*Scior; 2001*]

El modelo QSAR linear genera una ecuación que tiene la siguiente forma:

$$\text{Actividad Biológica} = C_0 + (C_1 \bullet P_1) + (C_2 \bullet P_2) + (C_3 \bullet P_3) + \dots$$



Donde los parámetros  $P_1, P_2, \dots, P_n$ , representan los diferentes descriptores calculados para cada molécula en la serie, y los coeficientes  $C_0, C_1, \dots, C_n$ , son obtenidos para tomar en cuenta las variaciones de dichos descriptores y de la actividad biológica [*Martin, et al.; 1981*]

Para llevar a cabo el estudio QSAR seguimos las recomendaciones de experimentados autores, aquellas indicaciones mencionadas son:

1. Seleccionar las geometrías iniciales especialmente en el caso de moléculas flexibles. Los autores del proyecto deben describir el método utilizado.
2. Detallar los métodos de optimización de geometría de las estructuras tridimensionales (3D) incluyendo los criterios para minimizar la energía.
3. Establecer procedimientos para determinar cargas en las moléculas.
4. Describir los criterios de alineamiento, ubicación y tamaño del sitio de unión.
5. Determinar la importancia de las variables utilizadas.
6. Diseñar modelos para la validación.

Estas recomendaciones cumplen con los requerimientos para la realización de un estudio QSAR [*Thibaut, et. al.; 2000*]

Contando con la información antecedente de los ligandos, la estructura del receptor, las recomendaciones, podemos desarrollar el análisis QSAR que complementará a todos los estudios hechos que permitirán desarrollar nuevos antiinflamatorios de una manera ventajosa para la industria farmacéutica.