

ARTÍCULO ORIGINAL**Síntesis y evaluación de nuevos inhibidores de las HDAC****Synthesis and evaluation of new HDAC inhibitors****Tabraue-Chávez M, Panadero-Fajardo S, Arévalo-Ruiz M, Domínguez-Seglar JF, Gómez-Vidal JA.***

Departamento de Química Farmacéutica y Orgánica, Facultad de Farmacia, Campus de Cartuja, s/n 18071 Granada (Spain).
jagvidal@ugr.es

RESUMEN

La acetilación de residuos de lisina en las histonas está mediada por las enzimas denominadas histona acetiltransferasas (HAT). Los grupos acetilo son eliminados de las ϵ -N-acetil-lisinas por la actividad de las histonas desacetilasas (HDAC). El balance entre las actividades opuestas de las HAT y las HDAC regula el estado de acetilación de las histonas. Este tipo de modificaciones regulan en la célula procesos fundamentales clave en respuesta a señales extracelulares. En general, altos niveles de acetilación (hiperacetilación) se asocian a un incremento de la actividad transcripcional, mientras que bajos niveles de acetilación (hipoacetilación) se asocian a la represión de la expresión genética. Actualmente se conocen diversos tipos de inhibidores de las HDAC que pueden reactivar la expresión genética e inhibir el crecimiento de las células tumorales, por lo que se investiga su uso en el tratamiento frente al cáncer. Sería deseable identificar nuevos inhibidores de las enzimas HDAC para su utilización en el tratamiento o profilaxis de enfermedades en las que la inhibición de dichas enzimas HDAC está implicada. Se han obtenido 10 nuevos inhibidores de las HDAC y se ha evaluado su actividad frente a HDAC aislada. Se discute la importancia de las modificaciones realizadas en el espaciador.

PALABRAS CLAVE: Histonas desacetilasas, inhibidores, antitumorales, síntesis, evaluación.

ABSTRACT

Lysine residues acetylation on histones is mediated by histone acetyltransferase (HAT). The acetyl groups are removed from ϵ -N-acetyl-lysine by the histone deacetylase (HDAC) activity. The balance between the HATs and HDACs activities regulates the histone acetylation status. Such changes regulate key processes in the cell in response to extracellular signals. Mostly, high levels of acetylation (hyperacetylation) are associated with increased transcriptional activity. Low levels of acetylation (hypoacetylation) are associated with repression of gene expression. Currently, different types of HDAC inhibitors are known to reactivate gene expression and inhibit tumor cell growth. We aim at identifying novel HDAC inhibitors for the treatment or prophylaxis of cancer diseases. Ten new HDAC inhibitors have been obtained and their potency as HDAC inhibitors has been evaluated. A structure-activity relationship discussion has been focused on the structural changes made in the spacer.

KEYWORDS: Histone deacetylase, anticancer, inhibitor, synthesis, evaluation.

Fecha de recepción (Date received): 15-04-2010

Fecha de aceptación (Date accepted): 10-06-2010

Ars Pharm 2010; 51.Suplemento 3: 541-548.

INTRODUCCIÓN

Según datos de la Organización Mundial de la Salud, el cáncer es una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial. Se le atribuyen 7,9 millones de defunciones (aproximadamente el 13% de las defunciones mundiales) ocurridas en el 2007 y se prevé que el número de defunciones anuales mundiales por cáncer seguirá aumentando y llegará a unos 12 millones en el 2030.

A nivel europeo, y centrándonos en los tres países que compone la Sociedad Farmacéutica del Mediterráneo Latino, la mortalidad global por cáncer en hombres en España, Francia e Italia ocupó una situación intermedia entre los países europeos en el año 2006. Por el contrario, en las mujeres durante el mismo período, España tiene la tasa de mortalidad más baja de Europa, mientras que Francia e Italia ocupa puestos más altos aunque por debajo de la media.

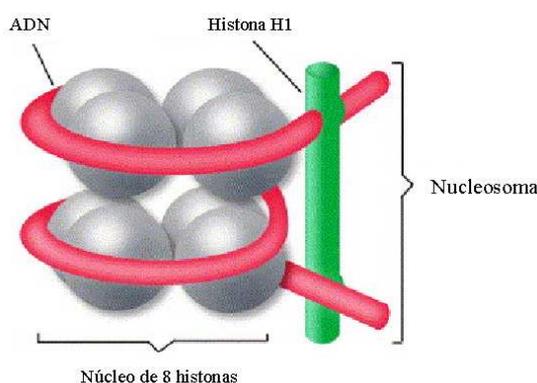
Desde el punto de vista del tratamiento de pacientes con cáncer, el conocimiento de las bases moleculares implicadas ha permitido el desarrollo de fármacos con capacidad de interferir en el crecimiento de las células transformadas frente a otras no tumorales. Así, en los últimos años se ha puesto de manifiesto la importancia de la epigenética en la búsqueda de nuevas dianas a modular, útiles en un tratamiento antitumoral¹. La diferencia más importante entre el mecanismo epigenético y el mecanismo genético es que los cambios epigenéticos pueden ser reversibles mediante el uso de agentes químicos.

El control epigenético puede tener lugar de dos formas:

- a) Por modificación química del ADN: metilación de la citosina del ADN.
- b) Por modificación de las proteínas que organizan al ADN en la cromatina.

El genoma humano se localiza dentro del núcleo celular en la cromatina, que es un complejo macromolecular dinámico formado por nucleosomas. Un único nucleosoma se compone de un fragmento de ADN (146 pares de bases) enrollado alrededor de un octámero de histona formado por 2 copias de cada una de las 4 histonas H3, H4, H2A y H2B (Figura 1).

Figura 1. Representación del nucleosoma



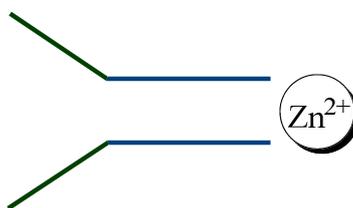
Las proteínas denominadas histonas² determinan el grado de empaquetamiento de la cromatina. Para ello, el ADN cromosómico se dispone alrededor de las histonas, de forma que si el grado de empaquetamiento es alto, al disminuir el espacio entre el nucleosoma y el ADN enrollado a su alrededor, se dificulta el acceso de los factores de transcripción y no se permite la expresión génica; si es bajo, la expresión génica es activa³.

Uno de los marcadores químicos que se encuentran en las histonas son los grupos acetilo presentes en los grupos amino de las cadenas laterales del aminoácido lisina. La acetilación de residuos de lisina en las histonas está mediada por las enzimas denominadas histona acetiltransferasas (HAT). Por el contrario, los grupos acetilo son eliminados de las ε-N-acetil-lisinas por la actividad de las histonas desacetilasas (HDAC). La introducción del grupo acetilo evita la protonación de dichos grupos amino y, por tanto, el establecimiento de enlaces de tipo iónico con el ADN. Como consecuencia, el grado de empaquetamiento del mismo es menor, se produce la expresión génica, y se evita la división celular. La pérdida de estos grupos acetilo conduce al establecimiento de enlaces de tipo iónico con el ADN, a un mayor grado de empaquetamiento, y a la división celular. El balance entre las actividades opuestas de las HAT y las HDAC regula el estado de acetilación de las histonas.

En general, altos niveles de acetilación (hiperacetilación) se asocian a un incremento de la actividad transcripcional, mientras que bajos niveles de acetilación (hipoacetilación) se asocian a la represión de la expresión genética. Se ha demostrado que los fármacos con capacidad para inhibir HDAC poseen actividad antitumoral⁴.

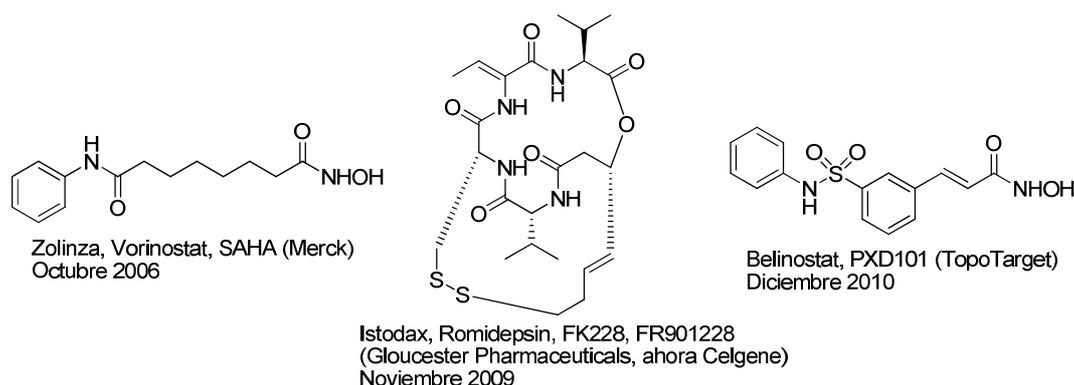
El sitio activo de las HDAC consiste en un “bolsillo” tubular hidrofóbico en cuyo extremo se encuentra un átomo de zinc (Zn^{2+}), crucial para su actividad (Figura 2). En base a dicha estructura y al mecanismo de acción se han diseñado inhibidores de las HDAC con un grupo capaz de coordinarse al Zn^{2+} , un grupo voluminoso lipófilo y un linker o espaciador que los una. La longitud del espaciador debe permitir la inserción en el bolsillo activo y la coordinación al Zn^{2+} catalítico⁵.

Figura 2. Modelo simplificado del sitio activo de las HDAC



En el 2006 se aprobó el uso del fármaco Vorinostat para el tratamiento de pacientes con linfoma de células T cutáneas. Es el primero de esta serie de antitumorales y con un mecanismo de acción relacionado con la epigenética (Figura 3).

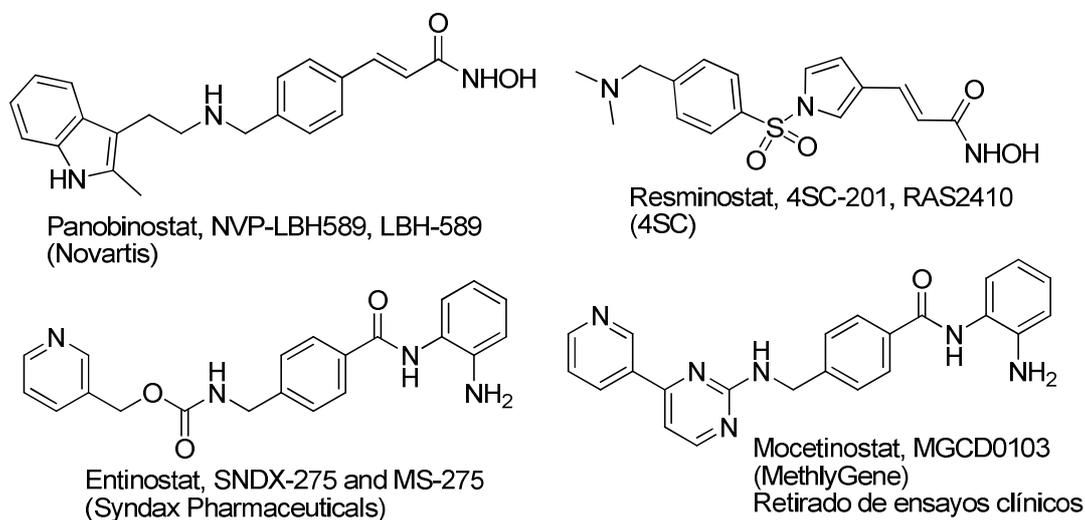
Figura 3. Inhibidores HDAC en el mercado



Actualmente se ha comercializado un segundo fármaco de esta familia de inhibidores que pueden reactivar la expresión genética e inhibir el crecimiento de las células tumorales denominado Istodax. En pocos meses saldrá al mercado un tercer fármaco de esta serie denominado Belinostat (Figura 3).

Se pone de manifiesto el evidente interés de la industria farmacéutica hacia este tipo de inhibidores cuando se analiza la situación de nuevos fármacos inhibidores de las HDAC en ensayos clínicos. En la Figura 4 se muestran algunos ejemplos procedentes de diferentes empresas del sector en ensayos clínicos en fase I y II.

Figura 4. Inhibidores HDAC en ensayos clínicos



Debido a la importancia de dichos fármacos como antitumorales y fruto de la investigación realizada por la Doctora Mavys Tabraue Chávez para el desarrollo de nuevos inhibidores de HDAC, la Universidad de Granada tiene solicitada dos patentes internacionales⁶.

OBJETIVOS

Uno de las líneas de investigación de nuestro Grupo tiene como objetivo la síntesis y evaluación de nuevos inhibidores de HDAC. Dentro del presente estudio se han establecido dos zonas estructurales susceptibles de mejora:

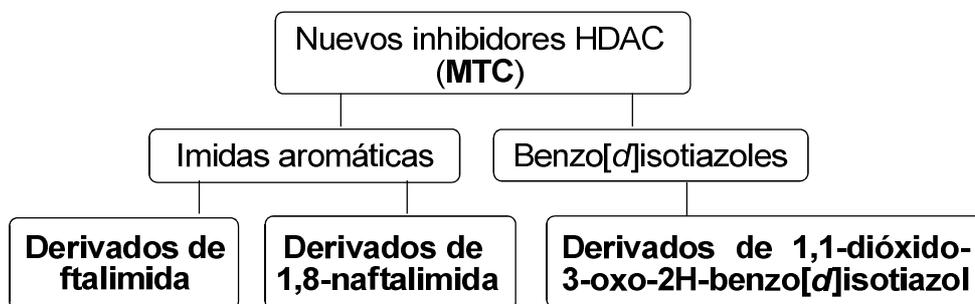
- a) El grupo voluminoso lipófilo, con afinidad hacia la zona previa al canal hidrofóbico.
- b) El espaciador, que ha de presentar la longitud adecuada.

Como consecuencia se ha de conocer cómo influye la estructura del espaciador en la actividad biológica, debido a la introducción de un grupo amida, un bencilo, y aumentando o disminuyendo la longitud de la cadena metilénica. También se modificó la cabeza lipófila de estos productos mediante la introducción de diversos sustituyentes.

METODOLOGÍA Y RESULTADOS

Los compuestos finales se agruparon en familias de acuerdo con sus características estructurales aunque todos los compuestos sintetizados presentan el ácido hidroxámico como grupo quelante del Zn^{2+} catalítico de las HDAC (Figura 5).

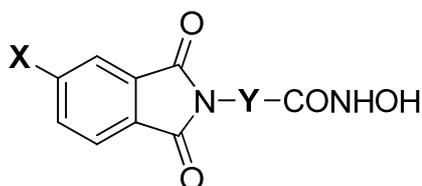
Figura 5



Se han sintetizado tres familias de compuestos dependiendo de la cabeza lipófila elegida:

1. Derivados de imidas aromáticas tipo ftalimidias (Tabla 1).

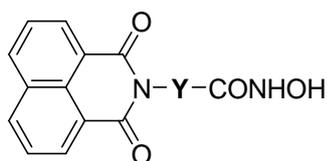
Tabla 1. Familia de ácidos hidroxámicos con cabeza lipófila tipo ftalimida



Compuesto	X	Y	Compuesto	X	Y
69(a)	H	-(CH ₂) ₅ -	MTC-141	CH ₃	-(CH ₂) ₅ -
MTC-26	H	-CH ₂ CONHCH ₂ CH ₂ -	MTC-86	CH ₃	-CH ₂ CONHCH ₂ CH ₂ -
MTC-30	H	-CH ₂ CH ₂ CONHCH ₂ -	MTC-106	CH ₃	-CH ₂ CH ₂ CONHCH ₂ -
MTC-33	H	-CH ₂ CH ₂ CONHCH- ↓	MTC-107	CH ₃	-CH ₂ CH ₂ CONHCH- ↓
MTC-34	H	-CH ₂ CH ₂ CONHCH- ⋮	MTC-108	CH ₃	-CH ₂ CH ₂ CONHCH- ⋮
MTC-32	H	-CH ₂ CH ₂ CONHCH ₂ CH ₂ -	MTC-85	CH ₃	-CH ₂ CH ₂ CONHCH ₂ CH ₂ -
MTC-126	H	-H ₂ C--	MTC-127	NO ₂	-(CH ₂) ₅ -

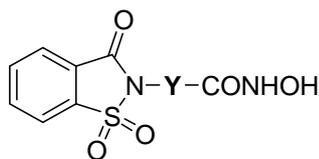
2. Derivados de imidas aromáticas tipo 1,8-naftalimidias (Tabla 2).

Tabla 2. Familia de ácidos hidroxámicos con cabeza lipófila tipo naftalimida.



Compuesto	Y
19(a)	-(CH ₂) ₅ -
MTC-40	-CH ₂ CONHCH ₂ CH ₂ -
MTC-38	-CH ₂ CH ₂ CONHCH ₂ -
MTC-45	-CH ₂ CH ₂ CONHCH- ↓
MTC-46	-CH ₂ CH ₂ CONHCH- ⋮
MTC-39	-CH ₂ CH ₂ CONHCH ₂ CH ₂ -

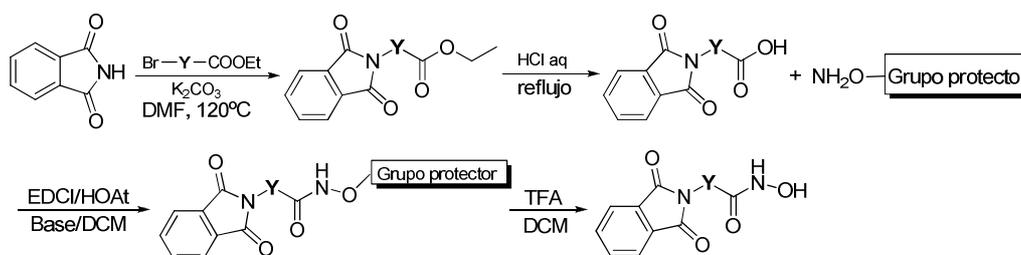
3. Derivados de 1,1-dióxido-3-oxo-2H-benzo[d]isotiazoles (Tabla 3)

Tabla 3. Familia de ácidos hidroxámicos con cabeza lipófila tipo benzo[*d*]isotiazol

Compuesto	Y	Compuesto	Y
MTC-123	-(CH ₂) ₄ -	MTC-105	-CH ₂ CH ₂ CONHCH-
MTC-97	-(CH ₂) ₅ -	MTC-66	-CH ₂ CH ₂ CONHCH ₂ CH ₂ -
MTC-124	-(CH ₂) ₆ -	MTC-128	-H ₂ C--
MTC-79	-CH ₂ CONHCH ₂ CH ₂ -	MTC-94	-CH ₂ CH ₂ CONH-
MTC-103	-CH ₂ CH ₂ CONHCH ₂ -	MTC-95	-CH ₂ CH ₂ CONHCH-
MTC-104	-CH ₂ CH ₂ CONHCH-	MTC-96	-CH ₂ CH ₂ CONHCH-

Los compuestos obtenidos se han sintetizado mediante dos estrategias diferentes: a) síntesis en solución (Esquema 1), b) síntesis en fase sólida (Esquema 2).

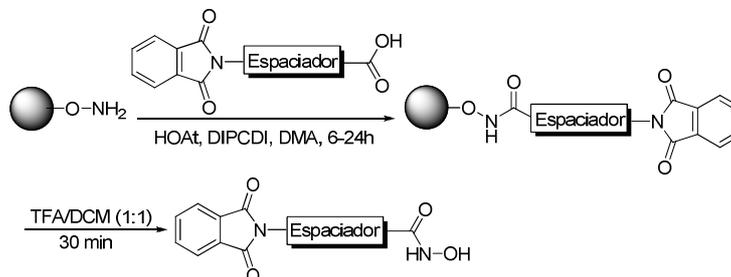
La síntesis en solución de este tipo de ácidos hidroxámicos requiere el uso de hidroxilamina convenientemente protegida (Esquema 1).

Esquema 1. Síntesis en solución de ácidos hidroxámicos

La síntesis en fase sólida permite la obtención de los ácidos hidroxámicos deseados a partir de los correspondientes grupos carboxilo (Esquema 2). Los intermedios soportados

sobre la fase sólida han permitido su modificación química siguiendo metodologías previamente descritas.

Esquema 2. Síntesis de ácidos hidroxámicos en fase sólida

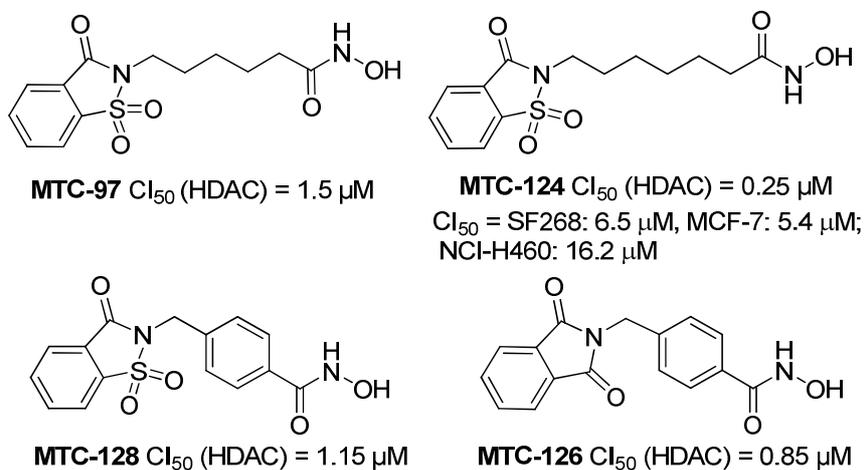


La evaluación de la capacidad inhibitoria de los compuestos se ha llevado a cabo a dos niveles:

- Capacidad inhibitoria sobre enzima aislada: mediante valoración colorimétrica de la inhibición de un extracto nuclear de HDAC.
- Capacidad inhibitoria del crecimiento de diversas líneas tumorales.

Como resultado se han obtenido potentes inhibidores de las HDAC que actúan como antitumorales (Figura 6). Las CI_{50} encontradas se sitúan en el rango submicromolar.

Figura 6. Ejemplos representativos de los nuevos inhibidores de las HDAC obtenidos



CONCLUSIONES

- Se han sintetizado nuevos potentes inhibidores de las HDAC con CI_{50} inferiores a 1 μ M.
- La potencia antitumoral de los inhibidores sintetizados se correlaciona con la actividad antitumoral.

-
3. La naturaleza del espaciador influye en la potencia.
 4. La introducción de enlace tipo amida da lugar a la pérdida de actividad.
 5. Los inhibidores más potentes son aquellos que presentan una cadena lineal de 5 ó 6 átomos de carbono o un espaciador tipo bencilo.

BIBLIOGRAFIA

1. Yoo, C. B.; Jones, P. A. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2006, 5, 37-50.
 2. Monneret, Claude. Histone deacetylase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.*, 2005, 40, 1-13.
 3. Biel, M.; Wascholowski, V.; Giannis, A. Epigenetics-An epicenter of gene regulation: Histones and histone-modifying enzymes. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005, 44, 3186-3216.
 4. Acharya, M. R.; Sparreboom, A.; Venitz, J.; Figg, W. D. Rational development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents: A review. *Mol. Pharmacol.* 2005, 68, 917-932.
 5. Lu, Q.; Yang, Y.-T.; Chen, C.-S.; Davis, M.; Byrd, J. C.; Etherton, M. R.; Umar, A.; Chen, C.-S. Zn²⁺-chelating motif-tethered short-chain fatty acids as a novel class of histone deacetylase inhibitors. *J. Med. Chem.* 2004, 47, 467-474.
 6. a) Gómez Vidal, José A.; Domínguez Seglar, José F.; Tabraue Chávez, Mavys. Derivados de benzo[d]isotiazoles como inhibidores de las HDAC. Patente solicitud nº P200601945 (Julio 2006). PCT Int. Appl. (2008) WO 2008003800 A1 20080110. CAN 148:144755. b) Gómez Vidal, José A.; Domínguez Seglar, José F.; Tabraue Chávez, Mavys. Nuevos derivados de ftalimida como inhibidores de las HDAC. Patente solicitud nº P200601946 (Julio 2006). PCT Int. Appl. (2008) WO 2008003801 A1 20080110. CAN 148:144647.
-