

RESÚMENES DE TESIS DOCTORALES

NUEVOS INDAZOLES COMO INHIBIDORES SELETIVOS DE LA SINTASA DEL ÓXIDO NÍTRICO (NOS)

Carlos Pérez Medina. Autor

Concepción López García y Rosa María Claramunt
Vallespi. Directoras

Departamento de Química Orgánica y Bio-Orgánica

Fecha de lectura: 13 de marzo de 2008

Calificación: Sobresaliente cum laude por unanimidad

La inhibición de la sintasa del óxido nítrico (NOS) se ha convertido en uno de los principales objetivos de la química médica en los últimos años. La cantidad de procesos vitales en los que se ve involucrada esta pequeña molécula, el óxido nítrico (NO), ha propiciado que a dicha inhibición se le otorguen posibles efectos terapéuticos. Sin embargo, la existencia de tres isoformas (neuronal, inducible y endotelial) de la citada enzima dificulta el descubrimiento de inhibidores útiles debido a que generalmente presentan baja selectividad. De entre el gran número de familias de compuestos que mejores resultados han ofrecido, se encuentra la de los indazoles. Derivados como el 7-nitroindazol (1) y el 3-bromo-7-nitroindazol (2) (Figura 1) se han descrito como inhibidores potentes de las tres isoformas *in vitro*, pero selectivos de la NOS neuronal *in vivo*. Otra característica de estos compuestos es que son inhibidores competitivos tanto del sustrato (*L*-Arginina) como del cofactor (tetrahidrobiopterina), ya que son capaces de ocupar ambos sitios tal y como se observa en la Figura 2.

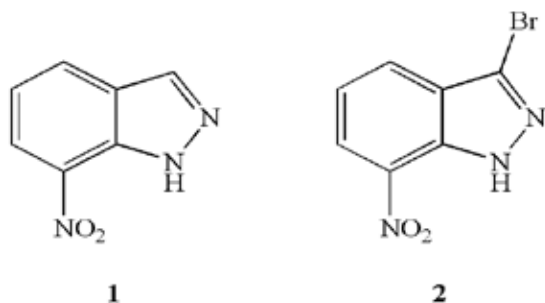


Figura 1. Derivados de indazol con capacidad inhibitoria sobre la NOS.

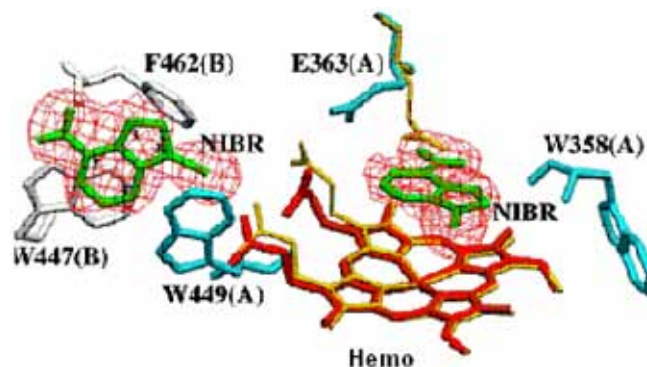


Figura 2. Reconocimiento molecular del 3-bromo-7-nitroindazol (2) en el dominio del cofactor (izquierda) y del sustrato (derecha)

En esta tesis se ha estudiado un conjunto de derivados de indazol en su mayoría no descritos hasta el momento, que se han dividido en dos grandes grupos (no fluorados, Figura 3, y fluorados, Figura 4) y en cinco familias (3-7; 8-11; 12-17; 18-29; y 30-36), y que han permitido profundizar en el conocimiento de sus propiedades inhibitoras sobre la NOS. Los principales objetivos han sido: a) sintetizar las citadas familias de indazoles, racionalizando los resultados e interpretando los mecanismos, b) caracterizar todos los compuestos mediante RMN en disolución y estado sólido, con especial atención a la posible existencia de diferentes formas tautómeras y a la formación de agregados supramoleculares, c) determinar la estructura cristalina por medio de difracción de rayos-X, d) llevar a cabo cálculos computacionales que permitan la interpretación de los resultados experimentales, y e) evaluación biológica de los derivados preparados a través de ensayos *in vitro* y resolución de estructuras centro activo-inhibidor.

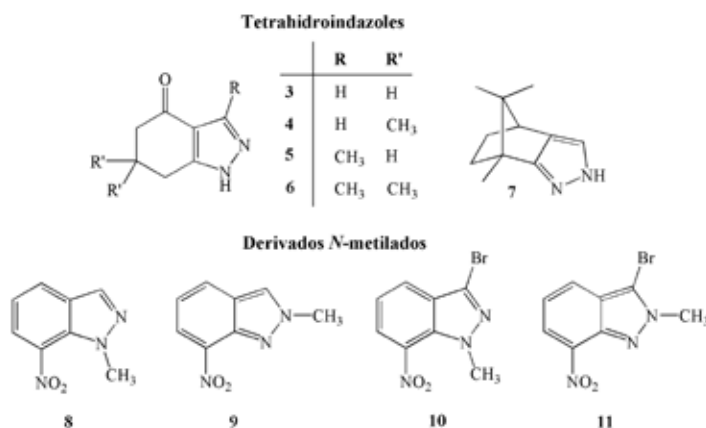


Figura 3. Derivados no fluorados de indazol preparados y estudiados.

Con cada familia de compuestos se han perseguido objetivos concretos, siendo los más relevantes: la ponderación de la importancia de la aromaticidad del anillo bencénico y el impedimento estérico (tetrahidroindazoles, **3-7**); el estudio de la incapacidad para establecer enlace de hidrógeno por parte de uno de los nitrógenos pirazólicos (derivados *N*-metilados, **8-11**); o el efecto del diferente grado de fluoración del anillo bencénico sobre las interacciones aromáticas, así como de la posibilidad de los átomos de flúor de participar en enlaces de hidrógeno (derivados fluorados, **12-36**).

Los ensayos de actividad anti-NOS *in vitro* realizados con una selección de estos derivados han proporcionado unos resultados sumamente interesantes (ver Tabla 1) y es de destacar la potencia inhibitoria que presentan los compuestos **13** y **16**, especialmente este último, ya que es selectivo de la isoforma inducible.

La cocrystalización de un grupo de los compuestos preparados con el dominio catalítico de la isoforma endotelial ha permitido la formación y resolución de la estructura cristalina de cuatro complejos centro activo-inhibidor. También en este caso las conclusiones son muy relevantes. En el caso de los derivados fluorados, se observan modos de unión semejantes a los de los inhibidores **1** y **2**, y la formación de enlaces de hidrógeno por parte del átomo de flúor en la posición 7 (Figura 5).

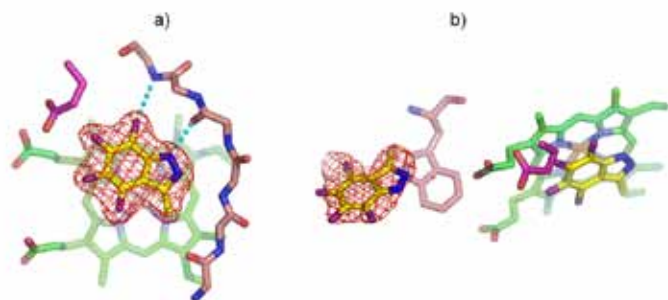
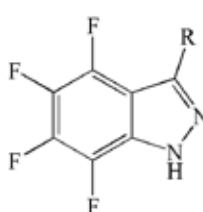


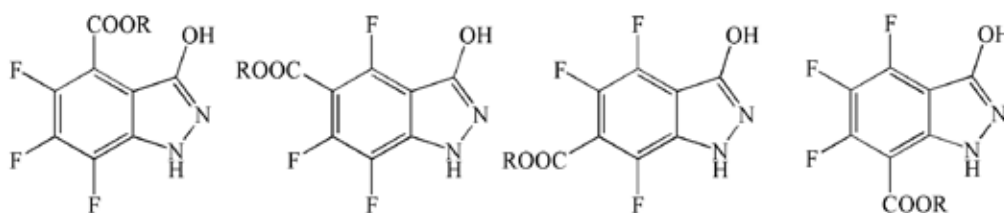
Figura 5. Estructura del complejo formado en el centro activo de la eNOS y el compuesto **13**. a) Sitio del sustrato (grupo hemo). b) Sitio del cofactor BH_4 (izquierda) y del sustrato (derecha).

Tetrafluoroindazoles



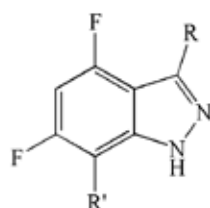
	R		R
12	H	15	C_6H_5
13	CH_3	16	C_6F_5
14	CF_3	17	OH

Ácidos trifluoro-3-hidroxiindazol carboxílicos y sus ésteres



	R		R		R		R
18	H	21	H	24	H	27	H
19	CH_3	22	CH_3	25	CH_3	28	CH_3
20	CH_2CH_3	23	CH_2CH_3	26	CH_2CH_3	29	CH_2CH_3

Difluoroindazoles



	R	R'		R	R'	
30	CH_3	H		34	CH_3	H
31	OH	H		35	OH	H
32	CH_3	NO_2		36	CH_3	NO_2
33	OH	NO_2				

Figura 4. Derivados fluorados de indazol preparados y estudiados.

CONCLUSIONES

- Se han sintetizado un total de 36 derivados de indazol, habiendo establecido el mecanismo de su formación.
- Se ha llevado a cabo un amplio estudio estructural de estos compuestos por medio de RMN en disolución (1H , ^{13}C , ^{15}N y ^{19}F), y en estado sólido, determinando en cada caso la especie tautomérica presente y observando el equilibrio tautomérico de las tetrahidroindazolonas **3-6**.
- La difracción de rayos X ha proporcionado la estructura cristalina de 5 compuestos: **4**, **6**, **14**, **15**, **31**. En todas, salvo en la del **6**, se han detectado asociaciones intermoleculares por enlace de hidrógeno, habiéndose observado dímeros en **15** y **31**, trímeros en **4** y catémeros en **16**.

4. Los cálculos teóricos a diferentes niveles acerca de la estabilidad relativa de las diferentes formas tautómeras de las moléculas en fase gaseosa permiten racionalizar los resultados experimentales obtenidos, tanto en disolución como en estado sólido.
5. Se han realizado ensayos *in vitro* para la determinación de la actividad anti-NOS de un total de 16 compuestos: **1**, **2**, **3-11** y **13-17**. Los resultados de estos ensayos apuntan hacia la obligatoriedad de la aromaticidad en el anillo de seis miembros, y presentan a los derivados fluorados como una alternativa atractiva en el diseño de inhibidores, debido a la optimización de las interacciones aromáticas con el grupo hemo.
6. Se han resuelto las estructuras cristalinas de varios complejos centro activo-inhibidor mediante difracción de rayos X (radiación sincrotrón), observándose en el caso de los derivados fluorados **13** y **17** la adopción de modos de unión semejantes a los de los inhibidores **1** y **2**.

Tabla 1

Valores de actividad de la NOS en presencia de los derivados sintetizados 3-11 y 13-17, y de los inhibidores 1 y 2 (en % respecto a la muestra control)

Comp.	% Actividad NOS	% Actividad iNOS
1	12 ± 4	16 ± 4
2	5 ± 1	3 ± 1
3	81 ± 1	77 ± 1
4	94 ± 3	102 ± 1
5	102 ± 2	96 ± 1
6	98 ± 2	78 ± 7
7	91 ± 1	80 ± 2
8	72,7 ± 0,3	75 ± 3
9	71 ± 5	64 ± 1
10	78 ± 1	90 ± 2
11	7•10 ² ± 1•10 ²	93 ± 1
13	37 ± 7	17 ± 1
14	59 ± 2	79 ± 1
15	89 ± 2	63 ± 2
16	92 ± 3	20 ± 1
17	77 ± 3	94 ± 7

BIBLIOGRAFÍA

- López, C. y Pérez Medina, C.: "El óxido nítrico, una molécula indispensable para la vida", *100cias@uned*, **1** (2008).
- Salerno, L., Sorrenti, V., Di Giacomo, C., Romeo, G. and Siracusa, M.A.: *Current Pharmacological Design*, **8**, 177-200 (2002).
- Raman, C.S., Li, H., Martásek, P., Southan, G., Masters, B.S.S. and Poulos, T.L.: *Biochemistry*, **40**, 13448-55 (2001).
- Claramunt, R.M., López, C., Pérez Medina, C., Pinilla, E., Torres, M.R. and Elguero, J.: *Tetrahedron*, **62**, 11704-13 (2006).
- Teichert, J., Oulié, P., Jacob, K., Vendier, L., Etienne, M., Claramunt, R.M., López, C., Pérez Medina, C., Alkorta, I. and Elguero, J.: *New Journal of Chemistry*, **31**, 936-46 (2007).
- Pérez Medina, C., López, C. and Claramunt, R.M.: *Molecules*, **11**, 415-420 (2006).



El nuevo Doctor con los miembros del Tribunal de la Tesis Doctoral: (de izquierda a derecha) Dra. M.^a Pilar Cabildo Miranda (UNED), Dr. Marcos Antonio Pinto Martins (UFSM, Brasil), Dra. Carmen Carreño García (UAM), Dr. Carlos Pérez Medina, Dra. Elena Pinilla Aguilar (UCM) y Dra. M.^a Luisa Jimeno Herranz (CSIC).

Agradecimientos

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la concesión de una beca FPU del Ministerio de Educación y Ciencia y a la financiación económica de los proyectos BQU2006-02568 y CTQ2007-62113.