



Síntese e caracterização de derivados indólicos com potencial atividade inibitória da Mcl-1 para o tratamento de câncer

Ingrid Vieira Machado^{1*}(PG), Hérika Danielle Almeida Vidal¹(PG), Erick de Oliveira Lemes¹(PG), Jaqueline Evangelista Queiroz¹(PG), Renata Awad¹(PG), Arthur de Carvalho Silva²(PQ), Cleber Camilo de Melo-Filho²(PQ), José Teófilo Moreira-Filho²(PQ), Marcelo do Nascimento Gomes^{2,3}(PQ), Gilberto Lúcio Benedito de Aquino¹(PQ).

¹ Laboratório de Pesquisa em Bioprodutos e Síntese (LPBioS), Universidade Estadual de Goiás - UEG, CEP 75132-400.

² InSiChem Drug Discovery, PROIN.UEG, UEG, CEP 75132-400.

³ Faculdade Metropolitana de Anápolis FAMA, CEP 75064-780.

*ingrid__vieira@hotmail.com

Resumo: O câncer está entre as dez principais causas de morte no mundo, causando 1,7 milhões de mortes em 2016. Estudos têm mostrado que a proteína Mcl-1 é um importante alvo para o câncer, assim como câncer de mama, próstata e leucemia, consequentemente, potenciais inibidores da Mcl-1 podem ser agentes contra o câncer dependente da Mcl-1 para sobreviver. Assim, o objetivo dessa pesquisa foi a utilização do modelo QSAR desenvolvido pela *startup* InSiChem Drug Discovery para o planejamento de novos derivados β -cetoindóis como potenciais inibidores da Mcl-1. Derivados indólicos é um grupo de compostos com relevância medicinal, e apresenta uma série de atividades biológicas atribuídas a subclasse dos alcaloides, assim como, antitumoral, antiviral, antibacterial, anticonvulsivante, entre outras. Após selecionados os hits virtuais, foi realizado a síntese orgânica e identificação estrutural dos compostos (RMN e IV). Foram obtidos sete derivados indólicos com pureza e rendimentos satisfatórios.

Palavras-chave: Câncer. Design Molecular. Inibidores da Mcl-1.

Introdução

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) o câncer está entre as dez principais causas de morte, causando 1,7 milhões de mortes no ano de 2016 ("World Health Organization", 2018). Dentre os principais tipos de câncer podem ser citados os de mama, próstata e leucemia, em que alguns estudos



descritos na literatura têm mostrado a proteína Mcl-1 como um importante alvo para a doença (BELMAR; FESIK, 2015).

Myeloid cell leukemia (Mcl-1) é um membro antiapoptótico da família de proteínas Bcl-2, conhecidas como reguladores primários da via apoptótica (BELMAR; FESIK, 2015). A Mcl-1 confere resistência a quimioterapia ou até mesmo a terapia direcionada, além disso, a Mcl-1 pode promover metástase (MERINO et al., 2017).

Partindo desse pressuposto, se faz necessária a busca por novos compostos que possam auxiliar no tratamento do câncer. É importante salientar ainda que alguns estudos presentes na literatura têm demonstrado que a inibição de Mcl-1 apresenta eficácia contra inúmeras linhagens de células tumorais (KOTSCHY et al., 2016), consequentemente, tais evidências provam que a Mcl-1 é um alvo interessante para o planejamento racional de novos fármacos.

Atualmente, com o intuito de reduzir tempo e custos no desenvolvimento de novos fármacos, estudos da relação estrutura-atividade (do inglês “*Quantitative Studies Activity Relationship*” – QSAR) e estratégias para o design de drogas assistido por computador (do inglês “*Computer-aided Drug Design*” CADD) são utilizados para otimizar esse processo árduo (MELO-FILHO et al., 2016). Um dos principais objetivos do QSAR é facilitar a busca por hits com específicas variáveis estruturais de acordo com o alvo em questão, por meio da intuição e da experiência química expressa em um formato computadorizado e matematicamente quantificado. Uma vez determinada a relação entre a atividade biológica e a estrutura química é possível selecionar quais são os hits mais promissores para serem submetidos a pesquisa e testes em laboratório. Portanto, tais estudos são fundamentais para acelerar e aumentar as taxas de sucesso no desenvolvimento de novos compostos a serem utilizados como novos fármacos (BARREIRO; FRAGA, 2001).

Nessa busca por compostos com atividades biológicas, os derivados indólicos vêm se destacando por apresentarem uma série de atividades das quais podem ser citadas a atividade antitumoral, antiviral, anticonvulsivante, etc. (SHARMA; KUMAR; PATHAK, 2010). Tais derivados indólicos podem ser obtidos a partir de chalconas. As chalconas são consideradas precursoras para a síntese de derivados indólicos por apresentarem em sua estrutura a presença de cetonas α,β -



insaturadas (BARAKAT et al., 2013) que podem ser condensadas com o núcleo indólico.

Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi utilizar um modelo QSAR desenvolvido pela *startup* InSiChem Drug Discovery para o design de novos derivados β -cetoindois como potencial inibidores da Mcl-1.

Material e Métodos

• Modelo QSAR

O modelo QSAR utilizado foi desenvolvido pela *startup* InSiChem Drug Discovery projeto incubado no Programa de Incubadoras da Universidade Estadual de Goiás (PROIN.UEG), o modelo usa metodologia de aprendizado de máquina (do inglês *machine learning*), combinando algoritmos de classificação e descritores moleculares para planejar novos inibidores do alvo Mcl-1. Os detalhes do procedimento seguem sob sigilo definido pelo contrato de pré-incubação para evitar a descaracterização do pedido de propriedade intelectual e transferência de tecnologia.

A validação do modelo foi realizada por um teste cego utilizando o composto S63845, em que o mesmo não foi utilizado para a construção do filtro, porém, foi submetido ao modelo sabendo que é um composto ativo já reportado na literatura (KOTSCHY et al., 2016). De acordo com os resultados obtidos, o composto apresentou probabilidade de atividade igual a 0,998 e de inatividade igual a 0,002, sendo assim um hit virtual.

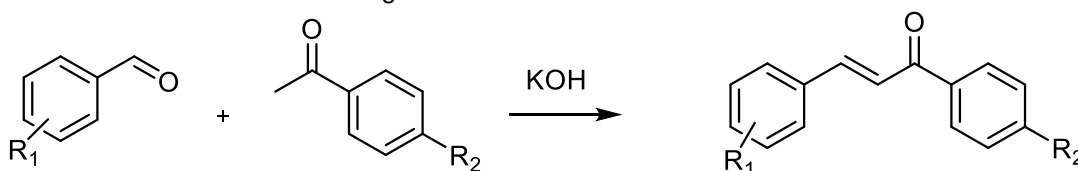
Uma série de compostos foi testada no modelo e então foram selecionados os *hits* virtuais que apresentavam considerável probabilidade de atividade frente à inibição da Mcl-1 para serem sintetizados.

• Síntese

A síntese das chalconas se deu pela reação equimolar (1mmol) entre acetofenonas e benzaldeídos substituídos (Figura 1) em uma pequena quantidade de etanol absoluto e utilizando KOH pulverizado como catalisador. A mistura foi

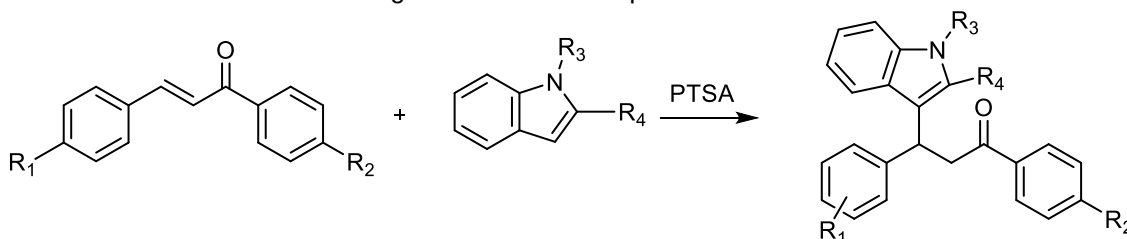
agitada em temperatura ambiente até a formação de precipitado, a mistura reacional foi arrefecida e então filtrada a vácuo, o sólido foi recrystalizado em etanol absoluto, quando necessário.

Figura 1: Síntese de Chalconas



As chalconas obtidas foram utilizadas como material de partida para a síntese dos derivados indólicos. Foram utilizadas quantidades equimolares (1mmol) de chalconas e metil indol ou 2-metil indol (Figura 2) no qual foram adicionados em um balão de fundo redondo (50mL) em 15mL de acetonitrila e ácido *p*-toluenossulfônico (PTSA) (0,1mmol). A solução foi agitada mecanicamente e deixada sob refluxo por cinco horas. Após o término da reação a solução foi vertida em uma mistura de água e gelo picado e deixada na geladeira *overnight* para formação do precipitado. A solução foi filtrada a vácuo e o sólido foi recrystalizado em álcool isopropílico.

Figura 2: Síntese dos β -cetoindóis



As reações foram acompanhadas por cromatografia em coluna delgada (CCD) utilizando um sistema de solventes hexano/acetato de etila (8:2) e cromatografia gasosa (CG) com detector FID. Foram injetados 1uL no modo Split, com Hélio (pureza de 99,999%) como gás de arraste, fluxo de 1mL/min, temperatura

do injetor a 250 °C. A temperatura inicial da coluna foi de 100°C (isoterma por 3 min) seguida por uma rampa de aquecimento a 10°C/min até 280°C (isoterma por 9 min), totalizando 30 min de corrida.

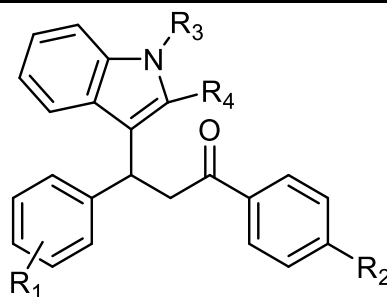
• Caracterização

Os produtos obtidos foram confirmados através da análise de infravermelho (IV) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H RMN) e carbono (^{13}C RMN).

Resultados e Discussão

O modelo QSAR utilizado trabalha com dados disponíveis na literatura e em alguns bancos de dados públicos como PubChem, Bioassay e ChEMBL. De acordo com a predição é possível observar a probabilidade de atividade dos compostos selecionados para síntese descritos na tabela 1. É importante salientar ainda que de acordo com o *guideline* QSAR é considerada um hit virtual aquela estrutura que apresente probabilidade de atividade igual ou superior a 70% (TROPSHA, 2010), contudo, foram selecionadas para síntese algumas moléculas preditas como inativas para que o modelo possa ser validado experimentalmente com um futuro teste de atividade biológica.

Tabela 1: Relação dos compostos sintetizados, rendimento e probabilidade de atividade.



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Rendimento (%)	Predição de Atividade QSAR (%)
1	4-CH ₃	Br	CH ₃	H	86,22	79,8
2	4-CH ₃	Br	H	CH ₃	75,03	68,0
3	3-NO ₂	F	CH ₃	H	65,25	76,0
4	H	F	CH ₃	H	85,39	79,4



5	H	F	H	CH ₃	74,25	68,0
6	4-CH ₃	F	CH ₃	H	61,25	79,8
7	4-CH ₃	F	H	CH ₃	60,08	68,0

Com base na predição da atividade das estruturas propostas é possível observar que a metilação no nitrogênio do anel indólico aumenta consideravelmente a atividade, diferença essa que pode ser observada entre os compostos **1** e **2**, **4** e **5** e **6** e **7**.

Uma outra observação que pode ser realizada em respeito aos substituintes dos compostos é que os compostos **1** e **6** apresentam a mesma predição de atividade, porém, se diferenciam pela presença de *p*-bromo e *p*-flúor respectivamente, e sabe-se que tais átomos possuem volumes relativamente diferentes, consequentemente, pode-se dizer que o volume não influencia diretamente na atividade biológica dos compostos.

Após a síntese dos derivados foi possível confirmar pureza satisfatória através da análise de cromatografia em camada delgada e cromatografia gasosa. Através da análise de infravermelho foi possível confirmar os principais grupos funcionais de cada composto. Confirmou-se a formação estrutural dos compostos através das análises de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono.

Considerações Finais

A síntese dirigida é uma forma de diminuir tempo e gastos no planejamento de novos fármacos, pois, utiliza-se de inteligência artificial para otimizar o processo direcionando a síntese de estruturas previamente testadas teoricamente frente a um alvo específico.

Por fim, para concluir a pesquisa, futuramente objetiva-se a realização dos testes de atividade biológica para validação experimental do modelo preditivo desenvolvido pela InSiChem Drug Discovery.



Agradecimentos

LPBioS, InSiChem Drug Discovery, PrP-UEG, FAPEG, CNPq, CAPES.

Referências

BARAKAT, A.; ISLAM, M. S.; KARAM, M. A.; AL-OTHAM, Z. A. Highly enantioselective Friedel Crafts alkylation of indoles with α,β -unsaturated ketones with simple Cu(II)eoxazolineeimidazoline catalysts. **Tetrahedron**, v. 69, p. 5185–5192, 2013.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal – As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos**. São Paulo - SP: ArtMed, 2001.

BELMAR, J.; FESIK, S. W. Small molecule Mcl-1 inhibitors for the treatment of cancer. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 145, p. 76–84, 2015.

KOTSCHY, A.; SZLAVIK, Z.; MURRAY, J.; DAVIDSON, J.; MARAGNO, A. L.; LE TOUMELIN-BRAIZAT, G.; CHANRION, M.; KELLY, G. L.; GONG, J. N.; MOUJALLED, D. M.; BRUNO, A.; CSEKEI, M.; PACZAL, A.; SZABO, Z. B.; SIPOS, S.; RADICS, G.; PROSZENYAK, A.; BALINT, B.; ONDI, L.; BLASKO, G.; GENESTE, O.; et al. The MCL1 inhibitor S63845 is tolerable and effective in diverse cancer models. **Nature**, v. 538, n. 7626, p. 477–482, 2016.

MELO-FILHO, C. C.; DANTAS, R. F.; BRAGA, R. C.; NEVES, B. J.; SENGER, M. R.; VALENTE, W. C. G.; REZENDE-NETO, J. M.; CHAVES, W. T.; MURATOV, E. N.; PAVELEY, R. A.; FURNHAM, N.; KAMENTSKY, L.; CARPENTER, A. E.; SILVA-JUNIOR, F. P.; ANDRADE, C. H. QSAR-Driven Discovery of Novel Chemical Scaffolds Active against Schistosoma mansoni. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 56, n. 7, p. 1357–1372, 2016.



MERINO, D.; WHITTLE, J. R.; VAILLANT, F.; SERRANO, A.; GONG, J. N.; GINER, G.; MARAGNO, A. L.; CHANRION, M.; SCHNEIDER, E.; PAL, B.; LI, X.; DEWSON, G.; GRÄSEL, J.; LIU, K.; LALAOU, N.; SEGAL, D.; HEROLD, M. J.; HUANG, D. C. S.; SMYTH, G. K.; GENESTE, O.; LESSENE, G.; VISVADER, J. E.; LINDEMAN, G. J. Synergistic action of the MCL-1 inhibitor S63845 with current therapies in preclinical models of triple-negative and HER2-amplified breast cancer. **Science Translational Medicine**, v. 9, n. 401, 2017.

SHARMA, V.; KUMAR, P.; PATHAK, D. Biological importance of the indole nucleus in recent years: A comprehensive review. **Journal of heterocyclic chemistry**, v. 47, n. Scheme 1, p. 1458–1461, 2010.

TROPSHA, A. Best practices for QSAR model development, validation, and exploitation. **Molecular Informatics**, v. 29, n. 6–7, p. 476–488, 2010.

World Health Organization. Disponível em: <<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>>. Acesso em: 4 jun. 2018.