

# Síntese e modelagem molecular do novo derivado indolinônico como candidato a antiinflamatório COX-2 seletivo.

Santos, J.L.<sup>1\*</sup>; Blau, L.<sup>1</sup>; Menegon, R.F.<sup>1</sup>; Oliveira, H.P.<sup>1</sup>; Bueloni, R.H.<sup>1</sup>; Boffo, E.<sup>2</sup>; Machado, R.G.P.<sup>3</sup>; Longo, M.C.<sup>3</sup>; Chung, M.C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Araraquara, SP, Brasil.

<sup>2</sup>Instituto de Química, Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, São Carlos, SP, Brasil

<sup>3</sup>Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Araraquara, SP, Brasil.

Recebido 06/07/07 / Aceito 05/11/07

## RESUMO

**Os fármacos antiinflamatórios são sabidamente os mais comercializados em todo o mundo, e apesar disto apresentam sérios efeitos colaterais, sobretudo no que se refere ao trato gastrointestinal. A descoberta de novos protótipos com atividade e segurança terapêutica melhoradas continua sendo uma busca constante. Com o advento da química computacional torna-se mais fácil o estudo teórico do comportamento fisiológico de uma nova substância bem como a compreensão do possível mecanismo de ação destas novas moléculas. Assim, através de modelos matemáticos de moléculas e receptores estudou-se neste trabalho o composto I (1-(2,6-diclorofenil)indolin-2-ona) quanto à sua possibilidade de inibir seletivamente a isoforma COX-2 da enzima prostaglandina endoperóxido sintase (PGHS), e também as melhores posições para a introdução de grupamentos químicos e modificações moleculares.**

*Palavras-chave:* indolinônico; COX-2; antiinflamatório.

Entre as diversas estratégias utilizadas para a introdução de novos fármacos na terapêutica, as modificações moleculares mostram-se promissoras. Estas consistem na transformação química de moléculas conhecidas, com o objetivo de aumentar potência e segurança, garantindo assim um melhor perfil farmacocinético e farmacodinâmico (Wermuth, 2004).

Os antiinflamatórios não-esteróides são uma importante classe terapêutica de fármacos que exercem seus efeitos devido ao bloqueio do sítio ciclooxigenase (COX) da enzima prostaglandina endoperóxido sintase (PGHS) (Lolli et al., 2001). Três isoformas da COX são conhecidas: COX-1, COX-2 e COX-3. A COX-1 é constitutivamente

expressa no estômago, rins e plaquetas, e considerada importante na proteção da mucosa estomacal. A COX-2, inicialmente tida como induzida pelo processo inflamatório, foi constatada como sendo constitutiva no endotélio vascular, rins, pulmão e cérebro. A COX-3 é uma isoforma encontrada principalmente no sistema nervoso central e seu papel é ainda desconhecido (Botting, 2006).

A descoberta de inibidores da isoforma COX-2 levou a obtenção da segunda geração de antiinflamatórios não-esteróides, como celecoxibe, rofecoxibe, lumiracoxibe entre outros. Entretanto, o rofecoxibe (AINE COX-2) foi retirado do mercado em 2004 devido à constatação de efeitos cardiovasculares decorrentes, em parte, da inibição da isoforma COX-2 presente no endotélio vascular, levando a um desequilíbrio do processo homeostático entre a produção de prostaciclina no endotélio vascular e tromboxano A2 nas plaquetas (Cairns, 2007).

O diclofenaco é um dos mais populares AINEs utilizados na terapêutica, aprovado em cerca de 120 países desde sua introdução há 25 anos atrás, e é o 30º fármaco no ranking dos 200 mais vendidos nos Estados Unidos (Bandarage et al., 2000). Apesar da sua larga utilização, o diclofenaco não é um fármaco seletivo COX-2, e seu uso crônico está relacionado com alterações na integridade e função gastrointestinal (Velázquez et al., 2005).

Estruturalmente relacionado ao diclofenaco, o lumiracoxibe é um derivado aril-alcanóico COX-2 seletivo, aprovado em 2006 para comercialização pela união européia. Embora desenvolvido como um COX-2 seletivo, ainda se observa com a utilização desse fármaco os efeitos gastrointestinais, ainda que menos pronunciados que o diclofenaco (Arellano et al., 2006)

Recentemente, desenvolvemos em nosso laboratório, análogos do diclofenaco e lumiracoxibe, com atividade antiinflamatória aguda em edema de pata de rato

\*Autor Correspondente: Jean Leandro Santos - Lapdesf - Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos - Departamento de Fármacos e Medicamentos - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Universidade Estadual Paulista - Rodovia Araraquara-Jaú, km 01 - Caixa Postal 502 - CEP: 14801-902 - Araraquara - SP, Brasil - Telefone: (16) 3301-6962 - e-mail: jeanleandrosantos@yahoo.com.br

induzido por carragenina por vezes superior, e com reduzida gastrotoxicidade.

A modelagem molecular (MM), segundo a IUPAC, é a investigação das estruturas e das propriedades moleculares pelo uso de química computacional e técnicas de visualização gráfica, visando fornecer uma representação tridimensional, sob um dado conjunto de circunstâncias (Carvalho et al., 2003). Ela compreende um número de ferramentas e métodos computacionais e teóricos que tem como objetivo entender e prever o comportamento de sistemas reais, sendo usada para descrever e prever estruturas moleculares, propriedades do estado de transição e equilíbrio de reações, propriedades termodinâmicas, entre outras. Esses métodos abrangem estudos de minimização de energia de moléculas, análise conformacional, simulações de dinâmica molecular, entre outros, sendo aplicáveis desde átomos isolados a biomacromoléculas (Kitchen et al., 2004; Verli & Barreiro, 2005). A MM fornece informações importantes para o processo de planeamento de fármacos, pois permite a obtenção de propriedades específicas de um composto que podem influenciar na interação com seu receptor, como por exemplo, o logP, a refratividade molar, o mapa de potencial eletrostático, o contorno da densidade eletrônica e as energias dos orbitais de fronteira HOMO e LUMO. Assim, ela tem se tornado uma ferramenta indispensável não somente no processo de planeamento, mas também na otimização de protótipos já existentes (Barreiro et al., 1997).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar através da química computacional se o composto I (1-(2,6-diclorofenil)indolin-2-ona) (Figura 1), derivado do diclofenaco, encaixa-se ao modelo farmacofórico proposto para os fármacos COX-2 (Garg et al., 2003; Rodrigues et al., 2002), apresentando similaridade conformacional à fármacos como celecoxibe e lumiracoxibe. Assim pretendeu-se estudar se a menor irritação gástrica observada para este composto, quando comparado a AINES não seletivos (ex. diclofenaco), estaria relacionada a uma possível inibição preferencial da isoforma COX-2.

Os cálculos moleculares dos compostos foram rea-

lizados utilizando o programa PC Spartan Pro 1,0,5 (Wavefunction, inc), empregando o método semi-empírico PM 3 (parametric method 3). O cálculo teórico do coeficiente de partição (ClogP) e da refratividade molar (CMR) dos compostos foi realizado utilizando o programa ChemDraw ultra 8.0.

Dentre as principais mudanças de aminoácidos entre as isoformas COX-1 e COX-2, têm-se a substituição da isoleucina nas posições 434 e 523 por valina na COX-2. Esta mudança permite acesso à região hidrofóbica próxima à entrada e adjacente ao canal central hidrofóbico do sítio ligante, aumentando muitas vezes o volume do sítio ativo ligante da COX-2, o que resulta numa influência do volume molecular do inibidor sobre a seletividade à isoforma da enzima (Garg et al., 2003).

Com base em mais de 40 equações de QSAR, Garg et al. (2003) propuseram como algoritmos importantes nestas equações a hidrofobicidade (medida pelo ClogP) e os fatores estéricos (medido pelo CMR - calculated molar refractivity). Assim, é sugerido que os compostos com melhores seletividades à COX-2 apresentam ClogP = 3,3 (3,2 - 5,7) e CMR  $\geq$  9.

Os valores calculados para o celecoxibe, lumiracoxibe, e o composto I são mostrados na Figura 1.

Pode-se notar que entre estas estruturas a única que satisfaz as condições estéricas e de hidrofobicidade é a do celecoxibe, apesar do lumiracoxibe possuir uma elevada seletividade à COX-2, superior mesmo ao celecoxib.

Baseando-se nos 100 mais seletivos compostos (seletividade > 1000 para COX-2), foram propostas as melhores distâncias entre as quatro principais regiões de interação dos inibidores com o sítio ativo da enzima COX-2: P1, P2, P3 e P4. Sendo que P1 e P2 são grupos doadores e receptores de ligações de H, e P3 e P4 são grupos que fazem interações hidrofóbicas (Figura 2) (Rodrigues et al., 2002).

Com base nestas distâncias foi possível medir as dimensões das estruturas e assim compará-las dentro do modelo farmacofórico proposto (Figura 3).

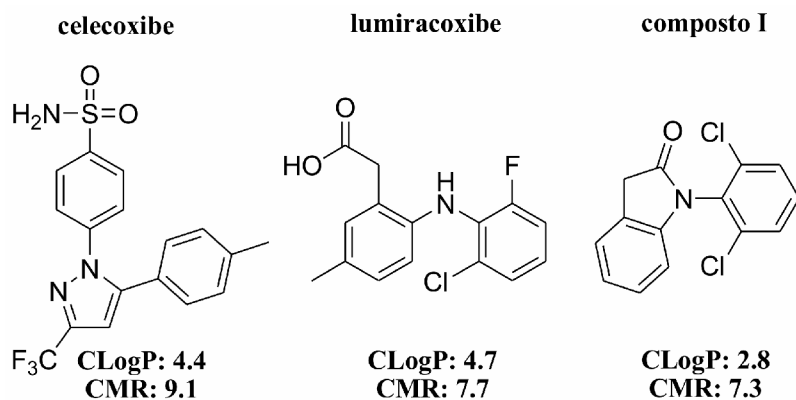


Figura 1. Estrutura química dos AINES celecoxibe, lumiracoxibe e do composto I, e valores calculados de LogP e refratividade molar.

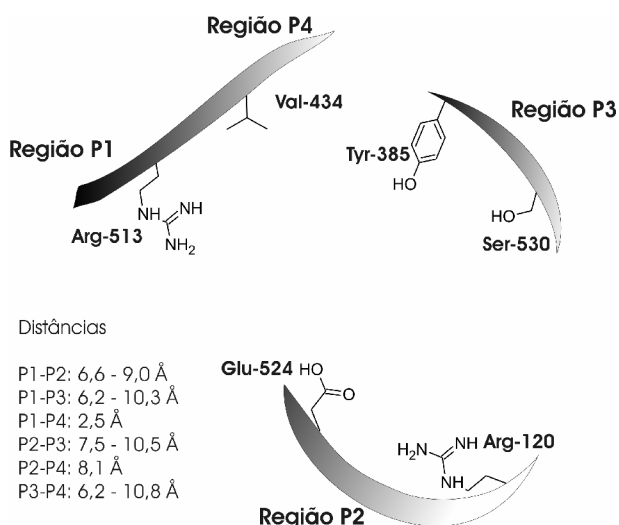


Figura 2. Modelo farmacofórico proposto para COX-2 e distâncias entre regiões ligantes.

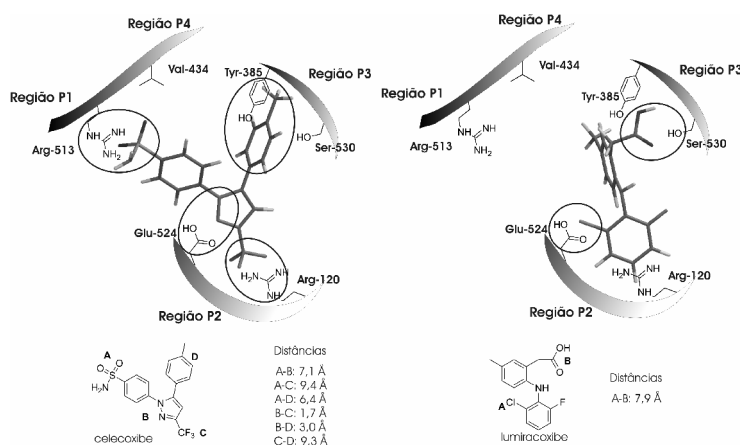


Figura 3. Interação dos AINES celecoxibe e lumiracoxibe no modelo farmacofórico proposto.

É possível observar que o celecoxib (seletividade COX-2 = 375 vezes) (Rodrigues et al., 2002) interage com três dentre as quatro regiões de interação propostas (P1, P2 e P3), enquanto que o lumiracoxib (seletividade COX-2 = 1428 vezes) (Blobsaum & Marnett, 2007) liga-se apenas a duas (P2 e P3). As posições em que as moléculas foram adicionadas ao modelo são baseadas em estruturas cristalinas de COX-2 com os respectivos fármacos (Garg et al., 2003). Através da comparação das seletividades destes dois fármacos fica clara a evidência de que não é necessária a interação das moléculas com as quatro regiões propostas, assim como a satisfação dos valores ótimos sugeridos de hidrofobicidade e volume molecular. Em vista disso, é possível que mesmo uma molécula com dimensões menores, como a do composto I, seja capaz de interagir de maneira seletiva à COX-2.

Ao se comparar as distâncias entre os grupos ligantes

do composto I com os grupos do celecoxibe e lumiracoxibe (Figuras 3 e 4), observa-se que o primeiro é significativamente menor e mais rígido que os outros dois, o que dificulta seu encaixe neste modelo. Porém, este fato não é o que se observa nos resultados biológicos, onde o composto I apresenta atividade antiinflamatória em edema de pata de rato induzida por carragenina, e ao mesmo tempo uma mínima irritação gástrica quando se avalia a área de lesão dos estômagos dos ratos tratados com esse composto.

Ao fazer a sobreposição da estrutura do composto I com a do celecoxibe e lumiracoxibe, respeitando as possíveis interações no modelo farmacofórico nas regiões P2 e P3, observa-se que em ambas as imagens há sempre dois anéis bem sobrepostos (Figura 5), o amino heterocíclico e um fenílico, e ainda acima do grupamento carbonílico do composto I está sempre presente um grupo bastante polar, como trifluormetil ou carboxílico. Esta observação pode ser

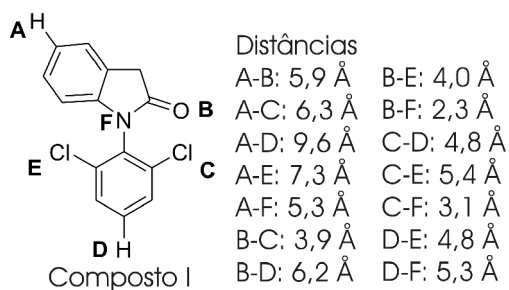


Figura 4. Distâncias calculadas para o composto I.

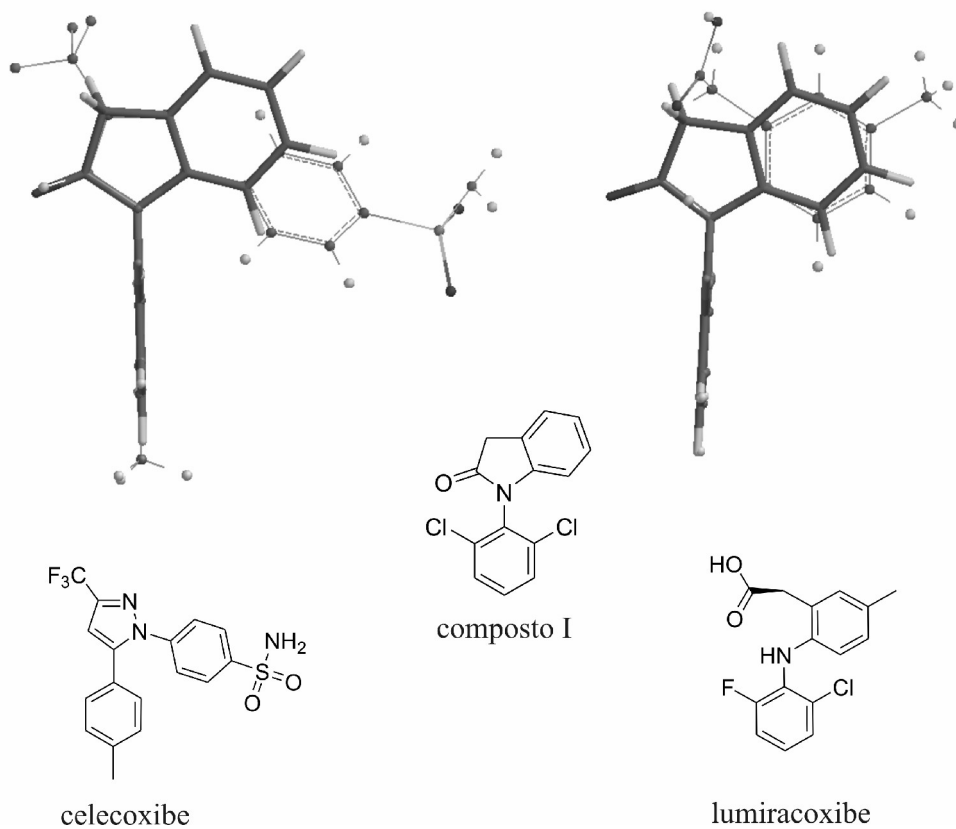


Figura 5. Sobreposição do composto I (modelo em tubo) aos compostos celecoxibe e lumiracoxibe (modelos em linhas)

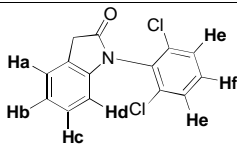
uma forte sugestão de que, independentemente da posição de encaixe do composto I na isoforma COX-2 da enzima, um grupo polar nesta região pode ser muito importante para um aumento na atividade antiinflamatória deste novo composto.

A partir deste entendimento em nível molecular de ação, estratégias de modificação molecular serão utilizadas a fim de se otimizar a atividade antiinflamatória do composto protótipo estudado. Assim, como pudemos observar pelo modelo farmacofórico que a substituição dos hidrogênios benzílicos  $\alpha$ -carbonílico por grupos polares pôde dar origem a uma promissora série de compostos mais seguros e com maior potência antiinflamatória.

#### Obtenção do composto I (1-(2,6-diclorofenil)indolin-2-ona)

Em 20mL de diclorometano, adicionou-se 315mg (1,1 mmol) de diclofenaco e 226mg (1,2 mmol) de EDC (cloridrato de etil dimetilaminopropil carbodiimida). A mistura permaneceu sob agitação por 30 minutos a temperatura ambiente e então diluída com mais 50mL de diclorometano e lavada com água destilada (3x20mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio e o solvente removido por evaporação obtendo-se 278mg (94% rendimento) de 1-(2,6-diclorofenil)indolin-2-ona de coloração avermelhada (faixa de fusão: 121 - 123 °C; Infravermelho (KBr): 1732 (C=O lactama), 1612 (C-N), 783 e 750 (C-Cl)  $\text{cm}^{-1}$ ; MS-IE: 278 (m/z); RMN  $^1\text{H}$  (Tabela 1).

Tabela 1 - Deslocamentos químicos de RMN 1H a partir do TMS (400 MHz, DMSO-d6)



Hidrogênio	<sup>1</sup> H
CH <sub>2</sub>	2H 3,87 s
Ha	1H 6,38 d J=7,67
Hb	1H 7,08 dt J=7,67 e 1,05
Hc	1H 7,20 dt J=7,67 e 1,05
Hd	1H 7,38 d J=7,67
He	2H 7,74 d J=8,13
Hf	1H 7,60 dd J=8,13 e 8,13

## ABSTRACT

*Synthesis and molecular modeling of a novel indolinone derivative as a candidate anti-inflammatory selectively inhibiting COX-2.*

**Anti-inflammatory drugs are known to be the most widely-marketed drugs in the world, despite their serious side effects, mainly on the gastrointestinal tract. Thus, there are constant efforts to discover new prototypes with improved therapeutic activity and safety for the patient. Since the advent of the computational chemistry, the theoretical study of the physiological behavior of a new compound and hence an understanding of its supposed mechanism of action have been made a lot more accessible. Thus, molecule-receptor mathematical modeling was applied to compound I (1-(2,6-dichlorophenyl)indolin-2-one), to predict theoretically its ability to inhibit, selectively, the COX-2 isoform of prostaglandin endoperoxide synthase (PGHS-2), and the best positions to introduce chemical groups and to make molecular modifications.**

*Keywords:* indolinone; COX-2; anti-inflammatory.

## REFERÊNCIAS

Arellano FM, Yood MU, Wentworth CE, Oliveria SA, Rivero E, Verma A, Rothman KJ. Use of cyclo-oxygenase 2 inhibitors (COX - 2) and prescription non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in UK and USA populations. Implications for COX - 2 cardiovascular profile. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 2006; 15(12):861-72.

Bandarage UK, et al. Nitrosothiol Esters of Diclofenac: synthesis and pharmacological characterization as gastrointestinal-sparing prodrugs. *J Med Chem* 2000; 43:4005-16.

Barreiro EJ, Rodrigues CR, Albuquerque MG, Sant'anna CMR, Alencastro, RB. Modelagem molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em química medicinal. *Quim Nova* 1997; 20:300-10.

Blobaum AL, Marnett LJ. Structural and functional basis of cyclooxygenase inhibition. *J Med Chem* 2007; 50(7):1425-38.

Botting RM. Cyclooxygenase: past, present and future. A tribute to John R. Vane (1927-2004). *J Therm Biol* 2006; 31(1-2):208-19.

Cairns JA. The coxibs and traditional nonsteroidal anti-inflammatory drugs: a current perspective on cardiovascular risks. *Can J Cardiol* 2007; 23(2):125-31.

Carvalho I, Pupo MT, Borges ADL, Bernardes LSC. Introdução à modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. *Quim Nova* 2003; 26(3):428-38.

Garg R, Kurup A, Mekapati SB, Hansch C. Cyclooxygenase (COX) inhibitors: a comparative QSAR study. *Chem Rev* 2003; 103:703-31.

Kitchen DB, Decornez H, Furr JR, Bajorath J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3:935-49.

Lolli ML, Cena C, Medana C, Lazzarato L, Morini G, Coruzzi G, Manarini S, Fruttero R, Gasco A. A new class of ibuprofen derivatives with reduced gastrotoxicity. *J Med Chem* 2001; 44:3463-8.

Rodrigues CR, Veloso MP, Verli H, Fraga CAM, Miranda ALP, Barreiro EJ. Selective pghs-2 inhibitors: a rational approach for treatment of the inflammation. *Curr Med Chem* 2002; 9:1867-85.

Velázquez C, Rao PNP, Knaus EE. Novel nonsteroidal antiinflammatory drugs possessing a nitric oxide donor

*Síntese e Modelagem Molecular de um novo AINE*

diazon-1-ium-1,2-diolate moiety: design, synthesis, biological evaluation, and nitric oxide release studies. *J Med Chem* 2005; 48:4061-7.

Verli H, Barreiro EJ. A medicinal chemistry paradigm: ligands and receptor flexibility. *Quím Nova* 2005; 28(1):95-102.

Wermuth C. Selective optimization of side activities: another way for drug discovery. *J Med Chem* 2004; 47 (6):1303-14.