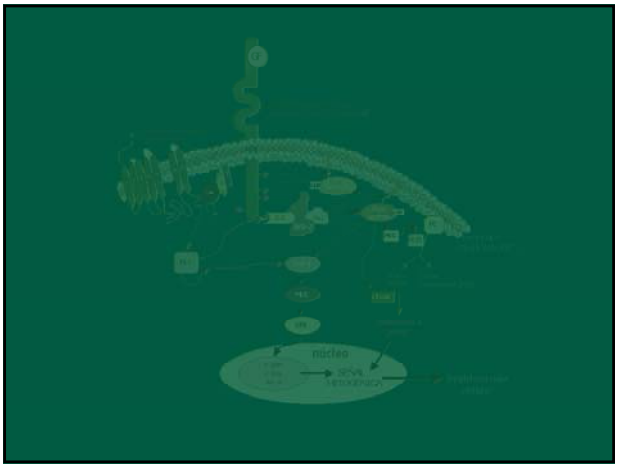
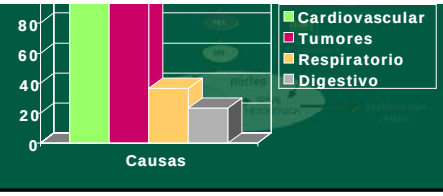


Causas de muerte por enfermedad

Tasa ajustada por 100.000 habitantes (países desarrollados)

Según OMS,
15 millones de nuevos casos de cáncer antes del 2020



Inhibidores enzimáticos antitumorales

⇩

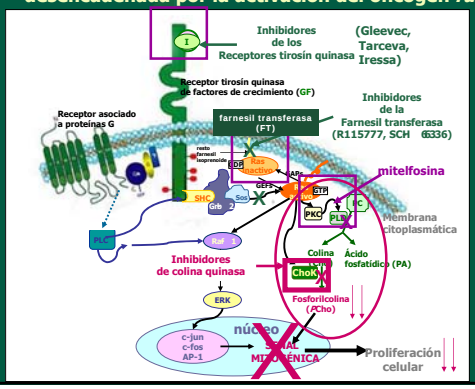
Inhibidores de las vías de transducción de la señal mitogénica activadas por oncogenes

⇩

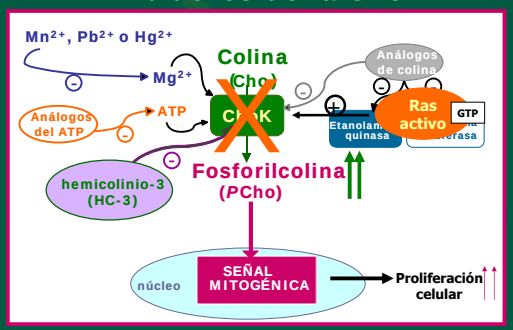
oncogén *ras*

- Pulmón (30%)
- Colon (50%)
- **Páncreas (90%)**

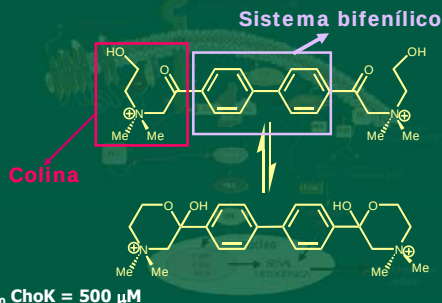
Puntos de ataque en la ruta de señalización celular desencadenada por la activación del oncogén *ras*



Inhibidores de la ChoK



HEMICOLINIO-3

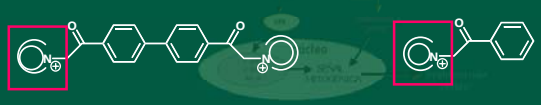


CI_{50} ChoK = 500 µM
CI_{50} HT-29 = 2500 µM

Nuevos inbidores de ChoK por farmacodulación del HEMICOLINIO-3

Primera fase del estudio

Mejora de la actividad sobre ChoK y capacidad antiproliferativa

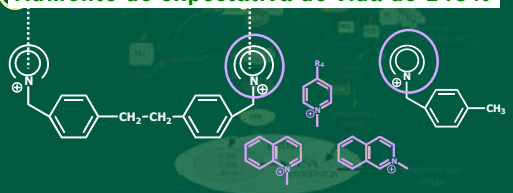


Khaless, F. Diseño y síntesis de compuestos antitumorales que interfieren con señales químicas inducidas por oncogenes. *Tesis Doctoral*. Universidad de Granada.1998.

Nuevos inbidores de ChoK por farmacomodulación del HEMICOLINIO-3

Segunda fase del estudio

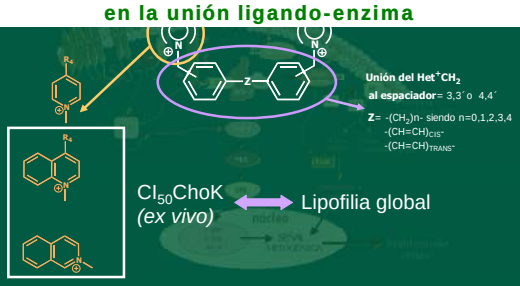
Elevada actividad antiproliferativa *in vivo*
Aumento de expectativa de vida de 143 %



Núñez Carretero, M.C. Variaciones moleculares del hemicolinio-3: estudios QSAR / QSPR de nuevos Inhibidores de colina quinasa y su relación con la actividad antiproliferativa en células transformadas por oncogenes *ras*. *Tesis Doctoral*. Universidad de Granada. 1999.

Nuevos inbidores de ChoK por farmacomodulación del HEMICOLINIO-3

Importancia de las interacciones hidrofóbicas en la unión ligando-enzima



CI_{50}ChoK *(ex vivo)* ⟺ Lipofilia global

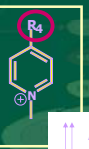
Díaz Mochón, J.J. Nuevas moléculas que interaccionan con la ruta colina quinasa como posibles agentes antitumorales. *Tesis Doctoral*. Universidad de Granada. 2001.

Nuevos inbidores de ChoK por farmacodulación del HEMICOLINIO-3

Estudios QSAR

Actividad antiproliferativa ⟺ Parámetros electrónicos lipofílicos

Sustituyentes fuertemente electrón donantes en posición 4 del heterociclo ($-\sigma_{R4}$)

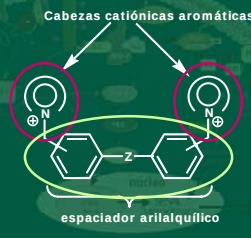


Elevada lipofilia global de la molécula (log*P*)

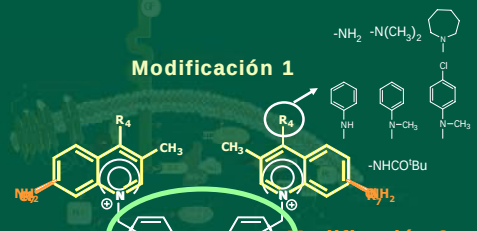
↑↑ Actividad antiproliferativa

Campos, J.M.; Núñez, M.C.; Sánchez, R.M.; Gómez-Vidal, J.A.; Rodríguez-González, A.; Báñez, M.; Gallo, M.A.; Lacal, J.C.; Espinosa, A. Quantitative Structure-Activity Relationships for a Series of Symmetrical Bisquaternary Anticancer Compounds. *Bioorg. Med. Chem.*, 2002, *10*, 2215-2231.

Estructura general de los compuestos biscuaternizados simétricos análogos del HC-3

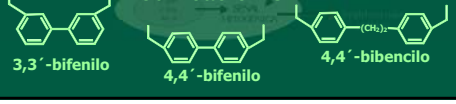


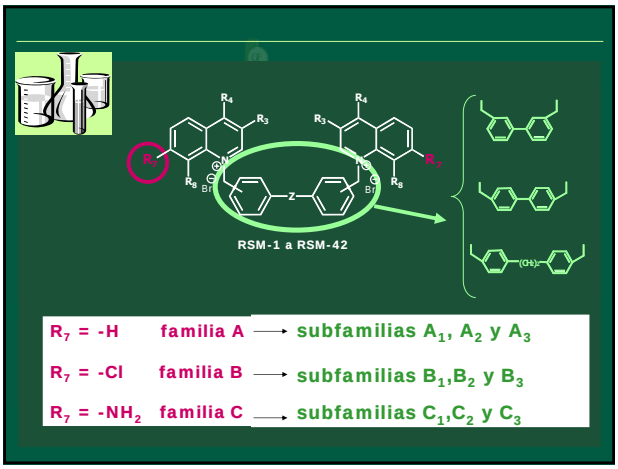
Modificación 1

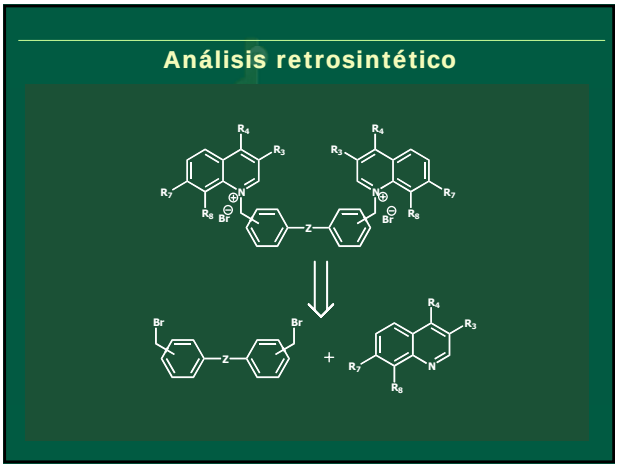


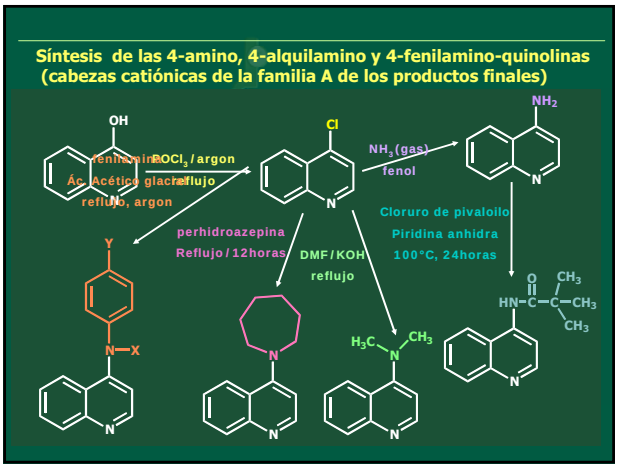
Modificación 2

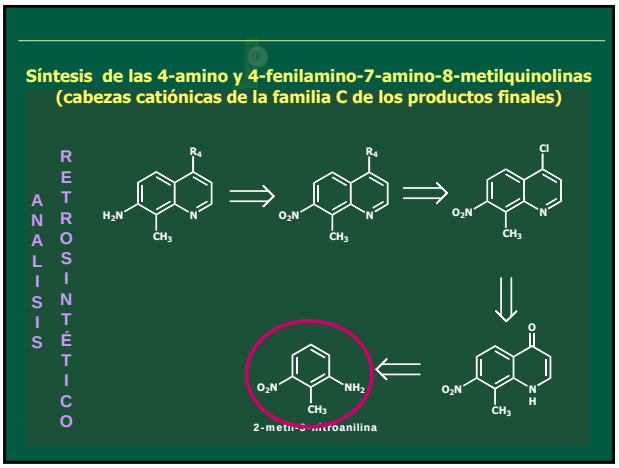
Modificación 3




RSM-1 a RSM-42
R_7 = -H familia A → subfamilias A_1, A_2 y A_3
R_7 = -Cl familia B → subfamilias B_1,B_2 y B_3
R_7 = -NH_2 familia C → subfamilias C_1,C_2 y C_3

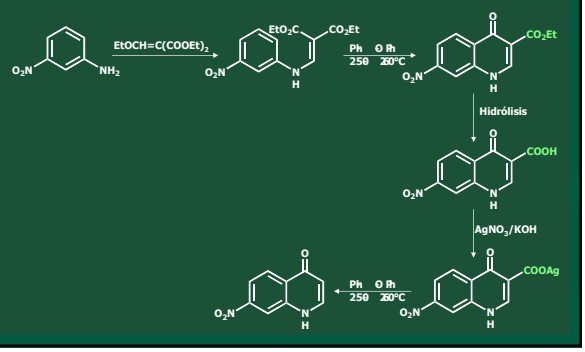

Análisis retrosintético


Síntesis de las 4-amino, 4-alquilamino y 4-fenilamino-quinolinas
(cabezas catiónicas de la familia A de los productos finales)
Fenilamina
Ác. Acético glacial
reflujo, argon
$POCl_3$ / argon
reflujo
NH_3 (gas)
fenol
perhidroazepina
Reflujo / 12horas
DMF / KOH
reflujo
Cloruro de pivaloilo
Piridina anhidra
100°C, 24horas

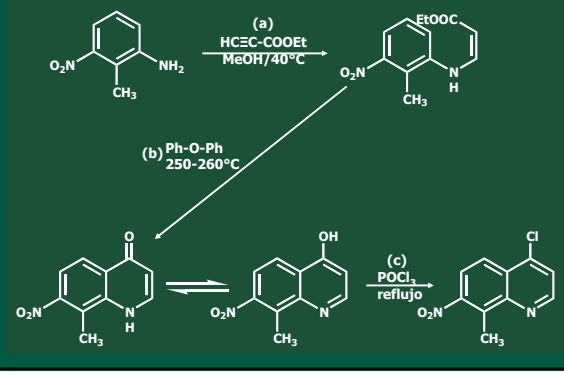

Síntesis de las 4-amino y 4-fenilamino-7-amino-8-metilquinolinas
(cabezas catiónicas de la familia C de los productos finales)
ANALISIS RETROSINTÉTICO
2-metil-3-nitroanilina

Síntesis de las 4-amino y 4-fenilamino-7-amino-8-metilquinolinas (cabezas catiónicas de la familia C de los productos finales)

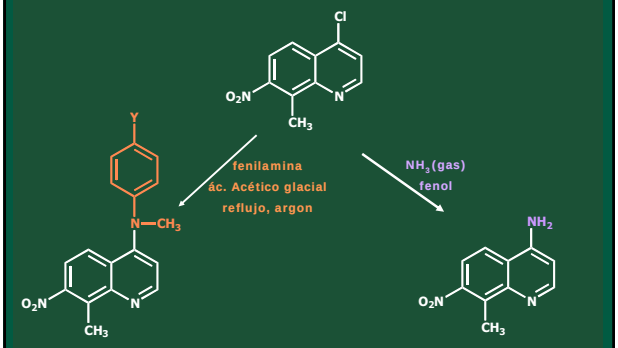
Método de Gould-Jacobs



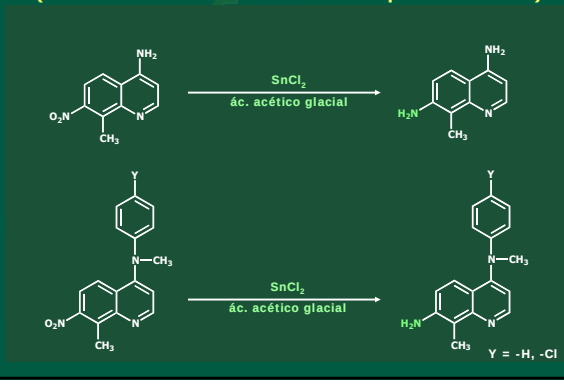
Síntesis de la 4-cloro-7-nitro-8-metilquinolina



Síntesis de las 4-amino y 4-fenilamino-7-nitro-8-metilquinolinas

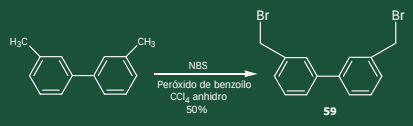


Síntesis de las 4-amino y 4-fenilamino-7-amino-8-metilquinolinas (cabezas catiónicas de la familia C de los productos finales)



Síntesis de los espaciadores

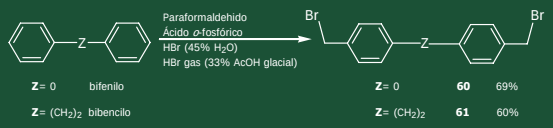
Síntesis del 3,3´-bis(bromometil)bifenilo



59

Síntesis de los espaciadores

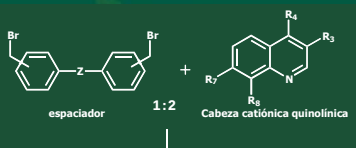
Síntesis del 4,4´-bis(bromometil)bifenilo y 4,4´-bis(bromometil)bibencilo



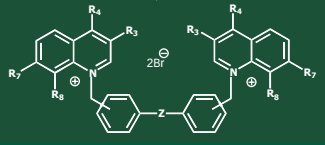
Z= 0	bifenilo	**Z**= 0	**60**	69%
Z= $(CH_2)_2$	bibencilo	**Z**= $(CH_2)_2$	**61**	60%

Método de Cram y Steinberg

Síntesis de los compuestos finales



SN2 **Butanona**
100°C



ENSAYOS BIOLÓGICOS

- Dr. Lacal y colaboradores-
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Efecto de los compuestos finales sobre la actividad ChoK

- ensayos *ex vivo* ChoK humana aislada

Actividad antiproliferativa de los compuestos

- ensayos *in vitro* HT-29

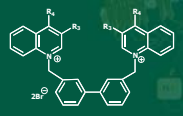
Toxicidad de los compuestos

- *ensayos* en ratones Swiss

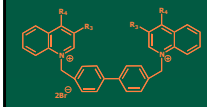
Estudio cualitativo estructura actividad (SAR)

Familia A

Subfamilia A_1



Subfamilia A_2

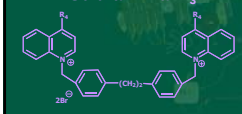


Compuesto	R_3	R_4	CI_{50} *ex vivo* ChoK (μM)		CI_{50} *in vitro* HT-29 (μM)	
RSM-1	-H	$-NH_2$	1.2	81.1	1.9	2.2
RSM-9						
RSM-2	$-CH_3$	$-NH_2$	11.9	No inhibe	4.4	3.3
RSM-10						
RSM-3	-H	$-N(CH_3)_2$	4.4	39.7	1.6	1.7
RSM-11						
RSM-4	-H	$-NHCO^tBu$	No inhibe	14.4	1.7	2.6
RSM-12						
RSM-5	-H		0.5	2.2	0.5	0.5
RSM-13						
RSM-6	-H		1.3	17.8	1.6	0.7
RSM-14						
RSM-7	-H		0.4	3.0	0.8	0.6
RSM-15						
RSM-8	-H		2.1	2.0	1.5	1.2
RSM-16						

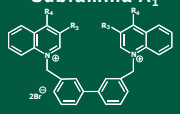
Estudio cualitativo estructura actividad (SAR)

Familia A

Subfamilia A_3



Subfamilia A_1



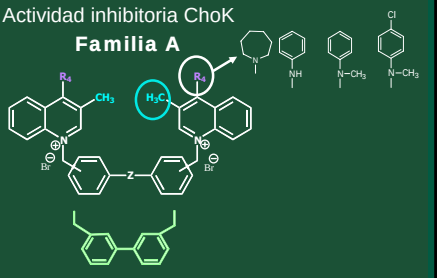
Compuesto	R_4	CI_{50} *ex vivo* ChoK (μM)		CI_{50} *in vitro* HT-29 (μM)	
RSM-17	$-N(CH_3)_2$	10.2	4.4	0.5	1.6
RSM-18		0.6	0.5	0.3	0.5
RSM-19		2.3	1.3	0.3	1.6
RSM-20		1.4	0.4	0.7	0.8
RSM-21		4.8	2.1	0.7	1.5

Estudio cualitativo estructura actividad (SAR)

Influencia del anillo de quinolinio sin sustitución en posición 7

Actividad inhibitoria ChoK

Familia A

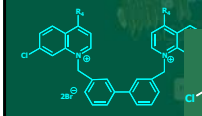


- La capacidad antiproliferativa frente a HT-29 está menos influida por el tipo de espaciador y de sustituyente en R_4

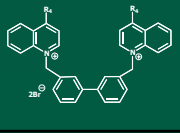
Estudio cualitativo estructura actividad (SAR)

Familia B

Subfamilia B_1



Subfamilia A_1

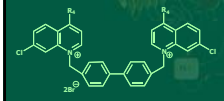


Compuesto	R_4	CI_{50} *ex vivo* ChoK (μM)		CI_{50} *in vitro* HT-29 (μM)	
RSM-22	$-NH_2$	20.6	1.2	1.9	1.9
				0.7	1.6
				0.4	0.5
				1.0	0.8
RSM-26		5.7	2.1	1.9	1.5

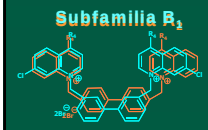
Estudio cualitativo estructura actividad (SAR)

Familia B

Subfamilia B_2



Subfamilia B_1

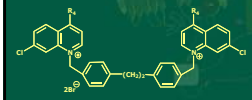


Compuesto	R_4	CI_{50} *ex vivo* ChoK (μM)		CI_{50} *in vitro* HT-29 (μM)	
RSM-27	$-NH_2$	63.30	80.6	3.20	2.9
RSM-28	$-N(CH_3)_2$	20.60	3.7	0.80	0.7
RSM-29		19.80	2.2	2.40	0.5
RSM-30		11.40	3.0	1.00	0.6
RSM-31		11.40	5.0	1.20	1.2

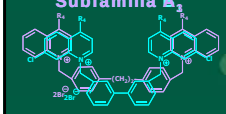
Estudio cualitativo estructura actividad (SAR)

Familia B

Subfamilia B_3



Subfamilia B_1



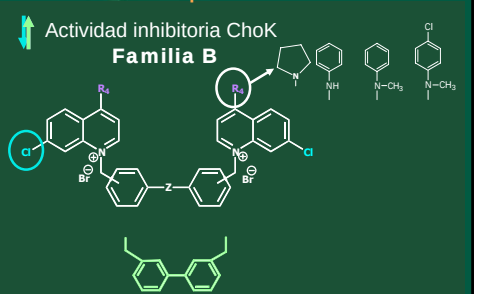
Compuesto	R_4	CI_{50} *ex vivo* ChoK (μM)		CI_{50} *in vitro* HT-29 (μM)	
RSM-32	$-NH_2$	No inhibe	80.0	1.9	2.0
RSM-33	$-N(CH_3)_2$	9.0	10.2	0.3	0.5
RSM-34		1.0	1.6	0.2	0.4
RSM-35		3.5	3.4	0.5	0.7
RSM-36		5.7	5.8	0.8	0.9

Estudio cualitativo estructura actividad (SAR)

Influencia de la introducción de un cloro en posición 7 del anillo de quinolinio

Actividad inhibitoria ChoK

Familia B



- **La actividad antiproliferativa apenas se ve afectada por la introducción del grupo cloro**

Estudio cualitativo estructura actividad (SAR)

Familia C

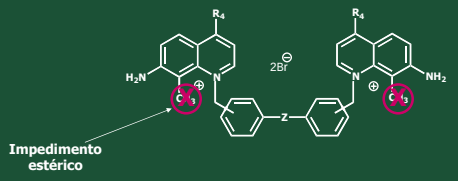
Compuesto	R_4	CI_{50} *ex vivo* ChoK (μM)		CI_{50} *in vitro* HT-29 (μM)	
RSM-37		56.8	0.4	3.8	0.8
RSM-38		146.9	2.1	33.0	1.5
			3.0	25.2	0.6
			2.0	19.4	1.2
RSM-41		132.6	1.4	7.0	0.7
RSM-42		57.5	4.8	19.5	0.7

Subfamilia C_3

Estudio cualitativo estructura actividad (SAR)

Influencia de la introducción de un amino en posición 7 del anillo de quinolinio

Familia C



- la potencia inhibitoria sobre la ChoK se ve drásticamente disminuida

Estudio cuantitativo estructura-actividad (QSAR)

pCI_{50} HT-29 ⟺ parámetros electrónicos, lipofílicos, de volumen

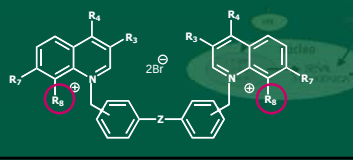
↑ $pCI_{50} = -\log (CI_{50})$ ↑ Actividad antiproliferativa

Estudio cuantitativo estructura-actividad (QSAR)

$$p(CI_{50})_{HT\text{-}29} = -1.70 - 3.69\ (\pm 0.35)\ RM^2_{R8} + 0.10\ (\pm 0.02)\ \text{clog}\ P + 0.85\ (\pm 0.19)\ \pi_{espaciador} - 3.79\ (\pm 0.68)\ \sigma_{R4}$$

$$n = 42,\ r = 0.928,\ s = 0.206,\ F_{4,37} = 57.04,\ \alpha < 0.001$$

↓ actividad antiproliferativa ⟺ ↑ RM_{R8} → negativo, cuadrático



RM_{R8} (-H) = 1.03

RM_{R8} (-CH_3) = 5.65

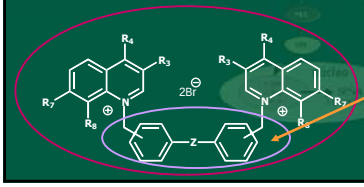
Estudio cuantitativo estructura-actividad (QSAR)

$$p(CI_{50})_{HT\text{-}29} = -1.70 - 3.69\ (\pm 0.35)\ RM^2_{R8} + 0.10\ (\pm 0.02)\ \text{clog}\ P + 0.85\ (\pm 0.19)\ \pi_{espaciador} - 3.79\ (\pm 0.68)\ \sigma_{R4}$$

$$n = 42,\ r = 0.928,\ s = 0.206,\ F_{4,37} = 57.04,\ \alpha < 0.001$$

actividad antiproliferativa ⟺ lipofilia global (clog *P*)

contribución del espaciador a la lipofilia ($\pi_{espaciador}$)

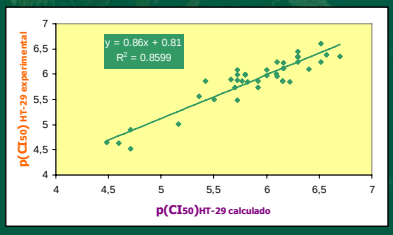


interacciones hidrofóbicas inhibidor-ChoK

Estudio cuantitativo estructura-actividad (QSAR)

p(CI50)HT-29 experim = 0.81 + 0.86 (± 0.06) p(CI50)HT-29 calcul.

***n* = 42, *r* = 0.927, *s* = 0.186, *F*1,40 = 243.81, α < 0.001**



Estudios de toxicidad

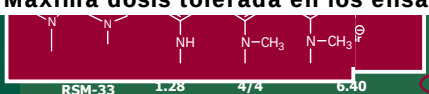
- Selección de los compuestos con mayor actividad antiproliferativa *in vitro*
- Administración intraperitoneal a ratones Swiss
- Dosis diaria durante cinco días y nueve de descanso

Estudios de toxicidad

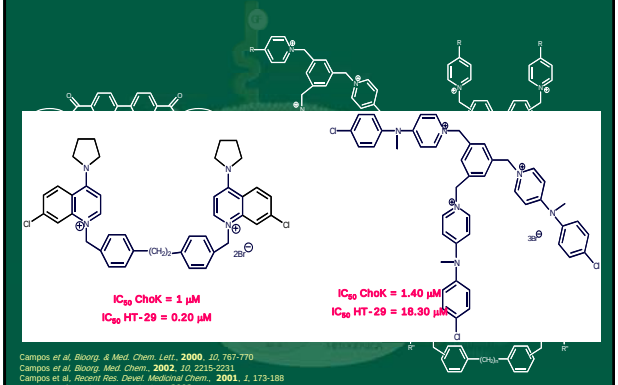
	1mg/kg	Supervivencia /total	5 mg/kg	Supervivencia/ total
				4/4
				4/4
				4/4
RSM-33	1.28	4/4	6.40	0/4
RSM-34	1.20	3/4	6.00	4/4
RSM-35	1.10	4/4	5.52	3/4

Límite del ensayo de toxicidad

Máxima dosis tolerada en los ensayos *in vivo*



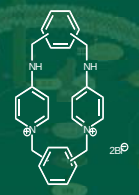
Background



Campos *et al*, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, **2000**, *10*, 767-770
Campos *et al*, *Bioorg. Med. Chem.*, **2002**, *10*, 2215-2231
Campos et al, *Recent Res. Devel. Medicinal Chem.*, **2001**, *1*, 173-188
Conejo-García et al, *Eur. J. Med. Chem.* **2003,** *38*, 109-116
Conejo-García *et al*, *J. Med. Chem.*, **2004**, *47*, 5433-5440
Sánchez-Martín et al, *J. Med. Chem.* **2005,** *48*, 3354-3363

Aims

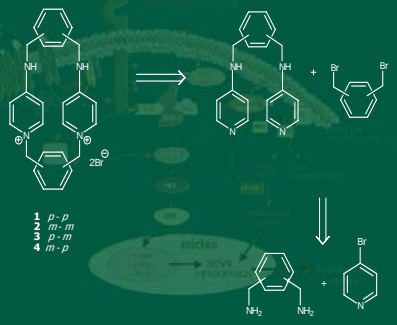
How the rigidity increase affects to the activity: bispyridinium cyclophanes



Isomers: *p-p* , *m–m* , *p–m*, *m-p*

Synthesis

Bispyridinium Cyclophanes

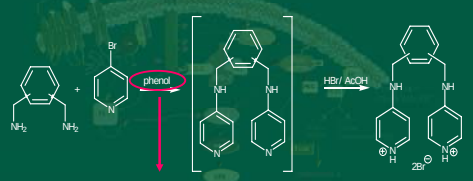


1 *p-p*
2 *m-m*
3 *p-m*
4 *m-p*

Synthesis

Synthesis of bispyridinium cyclophanes

Intermediates



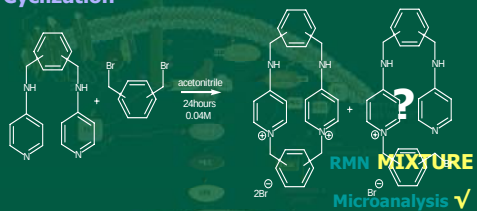
Donor of protons
Solvatant agent
Phenoxide ion source

Conejo-García et al, *J. Med. Chem.* **2003,** *46,* 3754-3757

Synthesis

Synthesis of bispyridinium cyclophanes

Cyclization



RMN MIXTURE
Microanalysis √
HMRS √

Synthesis

Synthesis of bispyridinium cyclophanes

Dilution

Reaction time

Polarity of the solvent

Disolution of the intermediates

Compound	Solvent	Dilution (M)	Time	Purification	Yield
1	acetonitrile	0.04	24 hours	Impossible	Mixture 50%
2	acetonitrile	0.02	24 hours	Recrystallization	60.4%
3	acetonitrile	0.02	24 hours	Recrystallization	51.3%
4	acetonitrile	0.01	24 hours	Recrystallization	54.8%
1	acetonitrile	0.004	3 days	Not neccesary	90.3%
1	ethanol	0.004	12 days	Not neccesary	N. D.

Biological results and discussion

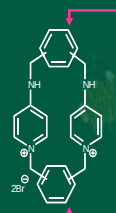
Biological assays

Prof. Lacal, Institute of Biomedical Investigations

- *ex vivo* IC_{50} ChoK (human)
- *in vitro* IC_{50} HT-29

Biological results and discussion

Bispyridinium cyclophanes (SAR)



Lower linker

Compound	Isomer	IC_{50} ChoK (μM)	IC_{50} HT-29 (μM)
4	*m m*	0.3	28.82
1	*p p*	2.1	36.9
2	*m p*	13.2	>100
3	*p m*	24.8	58.6

Upper linker

An Increase of the rigidity leads to an increase of the activity

SUBSTITUTION MODEL OF THE LINKERS

Lower ring: 1,4-benzene

Upper ring: 1,3-benzene

} ChoK inhibitory activity

Conejo-García et al, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 3754-3757

Molecular modelling

Bispyridinium cyclophanes (SAR)

Compound	Isomer	IC_{50} ChoK (μM)	Distance N^+-N^+ (Å)
4	*m m*	0.3	6.21
1	*p p*	2.1	6.41
2	*m p*	13.2	5.14
3	*p m*	24.8	5.25

Bispyridinium cyclophanes are useful pharmacological tools for the further investigation of ChoK inhibitors as antiproliferatives agents

Study the conformational behaviour to establish SAR

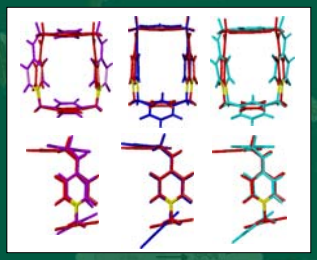
Order of activity following distance

Distance between the positively charged nitrogens is crucial for the inhibition

4 (6.21 Å) > 1 (6.41 Å) > 3 (5.25 Å) > 2 (5.14 Å)

Molecular modelling

Superposition of the most stable conformations

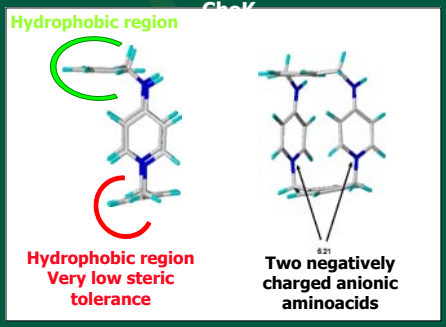


ChoK activity: 4 > 1 > 2 > 3

Conejo-García et al, *Eur. J. Med. Chem.* **2005,** *40,* 315-319

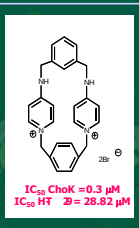
Molecular modelling

Binding model for the interaction of 4 with ChoK

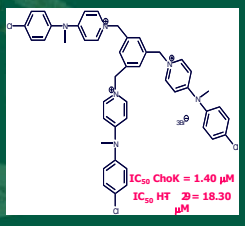


Conejo-García et al, *Eur. J. Med. Chem.* **2005,** *40,* 315-319

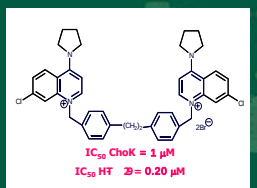
Aims



IC_{50} ChoK =0.3 μM
IC_{50} HT 29 = 28.82 μM



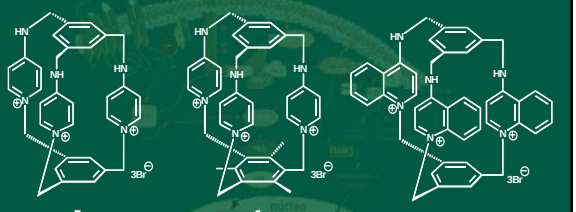
IC_{50} ChoK = 1.40 μM
IC_{50} HT 29 = 18.30 μM



IC_{50} ChoK = 1 μM
IC_{50} HT 29 = 0.20 μM

Aims

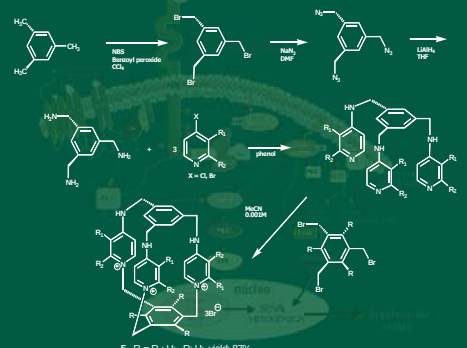
Combination of both the rigidity and the third cationic head: bicyclophanes



5 6 7

Conejo-García et al, *J. Org. Chem.*, **2005**, *70*, 5748-5751

Synthesis of trispyridinium bicyclophanes



5 $R_1 = R_2$: H; R: H; yield: 87%
6 $R_1 = R_2$: H; R: H; yield: 56%
7 $R_1 + R_2$: $(CH{=}CH)_2$; R: H; yield:8%

onejo-García et al, *J. Org. Chem.*, **2005**, *70*, 5748-5751

Biological assays

Compounds 5-7 proved to be inactive as ChoK Inhibitors