



**CEU**  
*Universidad  
San Pablo*



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE  
MADRID

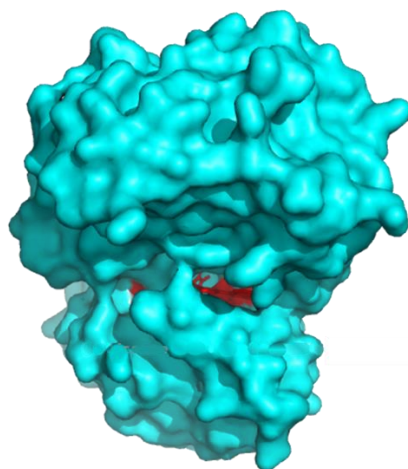


Universidad  
de Alcalá

**TRABAJO DE FIN DE MÁSTER**  
**Máster Interuniversitario en Descubrimiento de**  
**Fármacos**  
**Curso 2019-2020**

**Evolución en el diseño y desarrollo de inhibidores de la  
proteína NIK**

**Evolution in the design and development of NIK protein  
Inhibitors**



**Elaborado por David Rodríguez López**

**Dirigido por Patricia García García y Juan José Vaquero López**

**Universidad de Alcalá**



**Autorización de la presentación del TFM en Descubrimiento de Fármacos  
Curso 2019-2020**

**Nombre y apellidos Directores/as del TFM:** Patricia García García/ Juan J. Vaquero López

**Categoría Profesional:** Prof. Titular de Universidad/ Catedrático de Universidad

**Departamento/Unidad:** Química Orgánica y Química Inorgánica

**Centro:** Universidad de Alcalá

**CERTIFICA/N:**

Que el trabajo titulado:

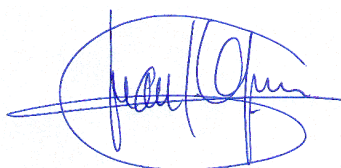
**“Evolución en el diseño y desarrollo de inhibidores de la proteína NIK”**

Que ha realizado **D. David Rodríguez López** como Trabajo Fin de Máster, para el Máster Interuniversitario en Descubrimiento de Fármacos, ha sido realizado en este Departamento bajo su dirección y autorizan su presentación.

En Madrid, a 25 de junio de 2020



Patricia García García



Juan J. Vaquero López

Firmas



# INDICE

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Objetivos.....	3
NF- $\kappa$ B: función e importancia.....	4
NIK: función e importancia.....	8
Inhibidores de NIK.....	13
Conclusiones.....	33
Bibliografía.....	34



## 1. Resumen.

En 1997 se descubre la proteína NIK y su papel fundamental en la ruta no canónica de activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Dada la implicación de esta ruta en diversas patologías, se comienza a investigar la estructura de NIK con mayor profundidad, al mismo tiempo que se trata de buscar inhibidores para la misma. Hubo varios intentos de inhibidores de NIK fallidos hasta que en 2009, aun sin conocer la estructura 3D de NIK, se descubren los primeros compuestos que verdaderamente eran inhibidores de NIK.

En 2012 al fin se consigue obtener la estructura cristalográfica de NIK y acotar su dominio catalítico, lo cual supuso un gran avance en la síntesis de inhibidores. Ese mismo año también se descubrió un bolsillo trasero con respecto al sitio de unión de ATP de NIK que revolucionó el descubrimiento de inhibidores dado que supuso una expansión del epítipo de la proteína.

A partir de este momento se desarrollaron diversos inhibidores de NIK que al principio no eran muy potentes ni selectivos pero con el paso de los años se fueron desarrollando otros nuevos que superaron estos problemas. Los enfoques para descubrir este tipo de inhibidores han ido desde los productos naturales hasta los compuestos desarrollados mediante el proceso "*hit to lead*" aprovechando técnicas computacionales.

## 2. Introducción.

Actualmente las enfermedades relacionadas con la mala regulación de la respuesta inmune, como aterosclerosis y osteoporosis, las relacionadas con la proliferación celular, como varios tipos de cáncer, aquellas relacionadas con una respuesta inflamatoria inapropiada, como la esclerosis múltiple, el asma, la artritis reumatoide,<sup>1</sup> e incluso las enfermedades causadas por virus, incluyendo al COVID-19,<sup>2</sup> tristemente gozan de una gran prevalencia en todo el mundo.

Todas ellas, que las sufran millones de personas o sólo unas pocas en todo el mundo, tienen la característica común de que tienen a un factor de transcripción conocido como NF- $\kappa$ B formando parte de su mecanismo de activación, ya sea induciendo o inhibiendo la transcripción de determinados genes que dan lugar a su aparición.

Siendo así, es lógico que se quiera regular el correcto funcionamiento de NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción de una elevadísima complejidad debido a diversos factores, como el hecho de que puede llegar a activarse en muchas formas diversas, siendo cada una de ellas responsable de la activación o inhibición de unos genes específicos. Sin embargo, aún no está claro que genes activa cada forma de NF- $\kappa$ B. Tampoco está del todo claro la forma en la que NF- $\kappa$ B se regula debido a que para su activación existen muchas rutas diversas e incluso podrían existir otras que aún no se han descrito.

No obstante, entre las rutas que se conocen hay una que se activa normalmente cuando se producen determinadas patologías, la llamada vía no canónica, y su componente central es una proteína llamada NIK. Es lógico pensar que ésta es una de las dianas más interesantes para inhibir, convirtiéndose NIK en un claro objetivo. Esto se ha tratado de conseguir prácticamente desde el descubrimiento de NIK en 1997, pero desgraciadamente el hecho de que no se obtuviera la estructura cristalográfica de NIK hasta 2012 y la intrincada forma tridimensional de su sitio de inhibición preferente han desembocado en que exista un número muy limitado de inhibidores selectivos de ésta y los que existen tienen una notable similitud estructural.



Sin embargo, en los últimos años, los nuevos avances en las tecnologías computacionales enfocadas al descubrimiento de fármacos, así como la mayor comprensión en el funcionamiento de NIK, auguran un futuro prometedor a esta diana en el descubrimiento de fármacos.

### **3. Objetivos.**

El objetivo principal de este trabajo es revisar los inhibidores de NIK que han ido surgiendo hasta la fecha. Para ello, se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- Hacer una descripción de la proteína NIK centrada en su región catalítica.
- Plasmar el proceso que ha llevado al descubrimiento de los diferentes inhibidores.
- Describir cuales son las características que hacen que una molécula sea capaz de inhibir a NIK, así como describir los motivos que hacen que unas sean mejores que otras.

#### 4. NF- $\kappa$ B: función e importancia.

Para poder contextualizar el papel de NIK en el organismo, así como las rutas biológicas en las que interviene, es indispensable que antes se describa a NF- $\kappa$ B y el papel que este cumple en el organismo.

NF- $\kappa$ B fue descubierto por Ranjan Sen en el grupo de David Baltimore en 1986.<sup>3,4</sup> Su nombre proviene del inglés “*Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B cells*” que significa factor de transcripción nuclear de las cadenas ligeras kappa de los linfocitos beta. Los factores de transcripción son proteínas muy especializadas que se encargan de promover o inhibir la transcripción de determinados genes. Para llevar a cabo tal proceso son capaces de reconocer secuencias muy específicas de ADN que se encuentran en la región reguladora de los genes llamadas regiones promotoras.<sup>5</sup>

A nivel de composición NF- $\kappa$ B puede encontrarse en diversas formas homodiméricas o heterodiméricas compuestas por proteínas miembros de la familia Rel. Esta familia la componen cinco miembros: Rel A (p65), C-Rel, RelB, p100 (precursor de p52) y p105 (precursor de p50) y que se caracterizan porque poseen una secuencia conservada común de trescientos aminoácidos en el extremo N-terminal, llamada dominio Rel, que se encarga de la unión al ADN, la dimerización y la unión a las proteínas inhibidoras I $\kappa$ B de las que hablaremos más adelante.<sup>6</sup>

De todos los posibles homodímeros y heterodímeros que puede formar NF- $\kappa$ B no todos tienen la misma actividad, lo que explica que cada tipo de dímero se genere frente a un determinado estímulo y por lo tanto genere un efecto transcripcional diferente, hecho que se traduce en la expresión de distintos genes.<sup>7</sup>

Respecto a su localización, NF- $\kappa$ B se encuentra presente en una forma inactiva, unido a las proteínas inhibidoras I $\kappa$ B, en el citoplasma.

Son varias las funciones de NF- $\kappa$ B que se conocen, pero aún a día de hoy se siguen investigando fenómenos que podrían estar relacionados con él. Las funciones en las que se sabe a ciencia cierta que NF- $\kappa$ B tiene un papel

fundamental y que han sido más estudiadas son tres: la respuesta inflamatoria, la respuesta inmune y la regulación en la proliferación celular.

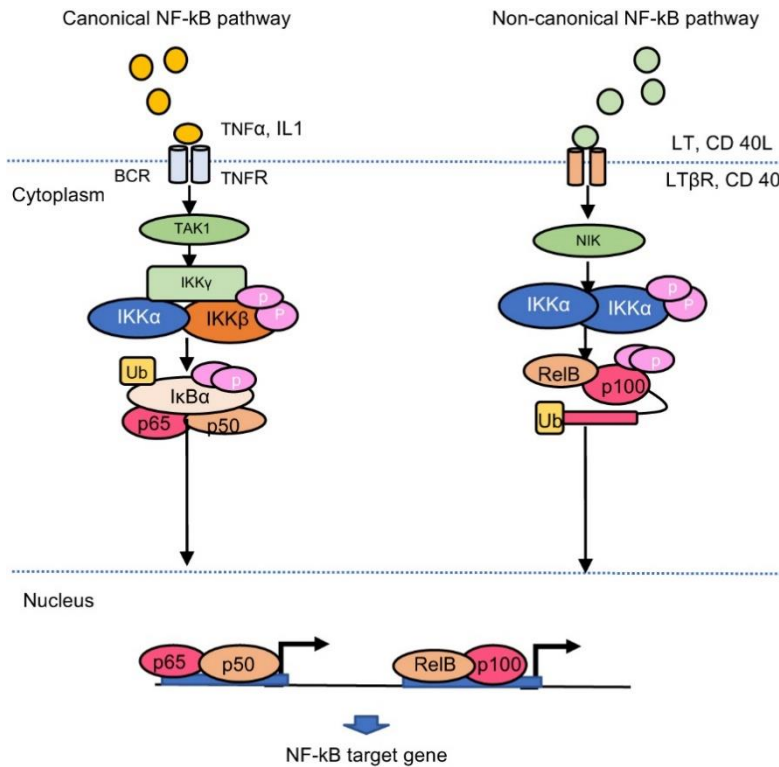
NF- $\kappa$ B interviene en la respuesta inflamatoria induciendo la transcripción de genes que codifican diversas citoquinas, proteínas pro- o anti-inflamatorias, como IL-6 o TNF- $\alpha$ , entre otras muchas.

NF- $\kappa$ B está relacionado con la proliferación celular dado que regula genes que codifican proteínas que inducen la apoptosis como Bim u otros como Bcl-3 que codifican proteínas que son anti-apoptóticas.

Por otra parte NF- $\kappa$ B interviene en la respuesta inmune, entre otras tareas, en la codificación de genes que acabaran dando lugar a los linfocitos T.

Son varias las rutas de activación que han sido descubiertas para NF- $\kappa$ B y todas ellas desembocan en que alguna combinación de homodímeros o heterodímeros de la familia **Rel** sea translocada al interior del núcleo, pero hay grandes diferencias entre ellas.<sup>8</sup> Estas diferencias se hallan principalmente en el tipo de estímulos que se deben recibir para activar cada una, en los componentes de la cascada de señalización a nivel celular y en la combinación de dímeros que se transloca finalmente hasta el núcleo (Figura 1).

A continuación se describen las principales rutas de activación de NF- $\kappa$ B, incidiendo en los aspectos mencionados anteriormente.



**Figura 1. Vías de activación de NF-κB (figura tomada de la referencia 9).**

**a) Vía canónica.**

Esta vía, también conocida como la vía clásica, es principalmente responsable de la respuesta inmune innata y adaptativa. Los estímulos que la activan son diversos, encontrándose entre ellos diversas citoquinas pro-inflamatorias como IL-6 o TNF $\alpha$ , que es reconocida por el receptor TNFR-1, aquellos estímulos que puede recibir el TLR o “*Toll like Receptor*” y los estímulos recibidos por los receptores de antígenos TCR y BCR. Es importante mencionar que todos los receptores anteriores se hallan en la membrana celular y son, por lo tanto, la puerta de entrada del estímulo que va a desembocar en la activación de NF-κB.

Tras la recepción del estímulo, una serie de intermediarios de la cascada de señalización celular tienen como objetivo la fosforilación de la proteína IKK $\beta$ . Dicha proteína a su vez se va a encargar de fosforilar a la proteína inhibidora IκB $\alpha$ , la cual posee una secuencia de aminoácidos llamada repeticiones de ankirina que es la que se une a la secuencia de señalización nuclear (NLS por sus siglas en inglés) de las proteínas de la familia Rel y de esta forma las inhibe ya que el enmascaramiento de esta secuencia imposibilita la translocación al interior del núcleo. Las proteínas IκB se encuentran formando un complejo con

NF- $\kappa$ B que constituye su forma inhibida, que en la ruta que nos ocupa está compuesto por la proteína inhibidora I $\kappa$ B $\alpha$  unida a los miembros de la familia Rel, p65 y p50. Tras ser fosforilada I $\kappa$ B $\alpha$  se une la E3-ligasa que hace que I $\kappa$ B $\alpha$  pueda ser reconocida por la ubiquitina haciendo que esta se dirija al proteosoma para su degradación. De esta manera el complejo NF- $\kappa$ B queda libre y con la ayuda de NLS, que ahora ha quedado expuesto, se hará posible su translocación al núcleo. Una vez en el núcleo NF- $\kappa$ B inducirá la expresión de diversos genes.

#### **b) Vía no canónica.**

También se la conoce como ruta alternativa y en este trabajo es a la que más atención se le va a dedicar debido a que es la ruta en la que interviene NIK fundamentalmente.

Entre los estímulos que pueden activar esta ruta destacan los que activan el receptor de BAFF (factor activador de células B), el ligando CD40 a través de su receptor, y virus de diversa índole entre los que destacan virus ARN como el VIH.

Cuando esta ruta no se encuentra activa tenemos en el citoplasma a NIK unida a TRAF3 ("*TNF-Receptor Associated Factor 3*"), formando un complejo proteico que a su vez está unido a TRAF2 y éste a su vez a cIAP1/2 ("*Cellular Inhibitor of Apoptosis 1/2*"). En estas condiciones cIAP1/2 se encarga de inducir la ubiquitinación de NIK lo que hace que NIK viaje al proteosoma donde será degradada bajando así los niveles de NIK en la célula.

Pero si alguno de los estímulos anteriormente mencionados activa la ruta, TRAF2 y TRAF3 se separan de NIK y viajan a la membrana celular para unirse al receptor que haya sido activado por el estímulo en cuestión. A continuación cIAP1/2 los sigue y se une a ellos, dejando sola y libre a NIK, para acto seguido ubiquitinar, en esta ocasión, a TRAF3 que viajara al proteosoma para ser degradado. Todo esto conlleva que los niveles de NIK en la célula se incrementen. Una vez que tenemos libre a NIK esta va a fosforilar a IKK $\alpha$  y esta a su vez fosforila a uno de los dímeros inactivos de NF- $\kappa$ B. Concretamente fosforila a la proteína p100 del heterodímero p100-RelB, la cual cabe mencionar que junto con p105 se encuentra auto inhibida ya que posee en sí misma una

secuencia de ankirina que enmascara su dominio NLS. Sin embargo, cuando IKK $\alpha$  fosforila a p100 hace que esta se ubiquitine y separe de RelB viajando al proteosoma donde se degradará para convertirse en p52. Justo después p52 se une con RelB para formar un nuevo heterodímero que sí será activo. Finalmente este heterodímero activo se translocará al interior del núcleo ya que posee una NLS libre, y una vez allí inducirá la transcripción de determinados genes entre los que destacan genes que codifican para proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 y Bcl-xl, e inhibirá la expresión de otros genes que codifican para proteínas pro-apoptóticas como Bim, promoviendo de este modo la proliferación celular, lo cual si se descontrola puede llegar a provocar patologías como el cáncer.

Las vías canónica y no canónica se relacionan principalmente a través de NIK. Aunque NIK no sea requerido para la vía de activación canónica sí que puede intervenir en la amplificación de dicha ruta. En ciertos casos especiales, como es la activación por parte de ciertos ligandos, NIK puede estar funcionando mientras que la ruta canónica esta activada. Aunque aún no se ha aclarado por qué ocurre esto, se cree que NIK se encuentra en una encrucijada entre ambas vías de activación de NF- $\kappa$ B ejerciendo de regulador positivo o negativo entre sendas vías. Estos hechos demuestran la clara relación que guardan dichas vías y como NIK es el componente que las interrelaciona debido a la regulación que ejerce sobre ambas.<sup>10</sup>

## **5. NIK: función e importancia.**

NIK, también conocida también como MAP3K14, fue descubierta por Malinin en 1997,<sup>11</sup> once años más tarde que NF- $\kappa$ B. A nivel estructural NIK es una proteína de 947 aminoácidos que consta de al menos cuatro dominios descritos hasta la fecha (Figura 2). El primer dominio es la zona TRAF3 N-terminal que comprende entre los aminoácidos 30-120. Esta región se encarga de la unión entre TRAF3 y NIK. El segundo dominio es la zona de regulación negativa, zona comprendida más o menos entre los aminoácidos 121-318 que a su vez está compuesta por dos regiones, una región básica con motivos de cremallera de leucinas que comprende los aminoácidos 127-146 y una región que comprende los aminoácidos 250-317 rica en prolina. Este dominio se encarga de ejercer una regulación negativa en la actividad catalítica de NIK, lo cual se ha comprobado

mediante experimentos en los que se medía la actividad catalítica de NIK de longitud normal comparada con un mutante de NIK al que se le había cortado la sección de aminoácidos que correspondían al dominio de regulación negativa, siendo mucho más activa catalíticamente la NIK modificada. El tercer dominio lo forman los aminoácidos 390-660 aproximadamente y es la región Serina-Treonina quinasa. Esta región se ocupa de la actividad catalítica propiamente dicha, encargándose de la fosforilación de los aminoácidos serina y treonina correspondientes. Por último se ha identificado un cuarto dominio llamado región C-terminal no catalítica que es el encargado de interactuar con miembros de la cascada de señalización como los sustratos IKK $\alpha$  y p100 y reguladores como TRAF1, TRAF2, TRAF5 y TRAF6. Además se han descubierto recientemente algunos sitios de fosforilación mediados por IKK $\alpha$  en este último dominio (Ser-809, Ser-812 y Ser-815) que corroboran y corresponden con uno de los varios ejemplos del llamado “*feedback negativo*” que constituye una de las estrategias que utiliza NF- $\kappa$ B para regularse y que en este caso es NIK quien lo manifiesta. Este hecho es muy importante ya que como vimos en el apartado de las vías de activación de NF- $\kappa$ B, NIK es el componente central de la vía de activación no canónica.

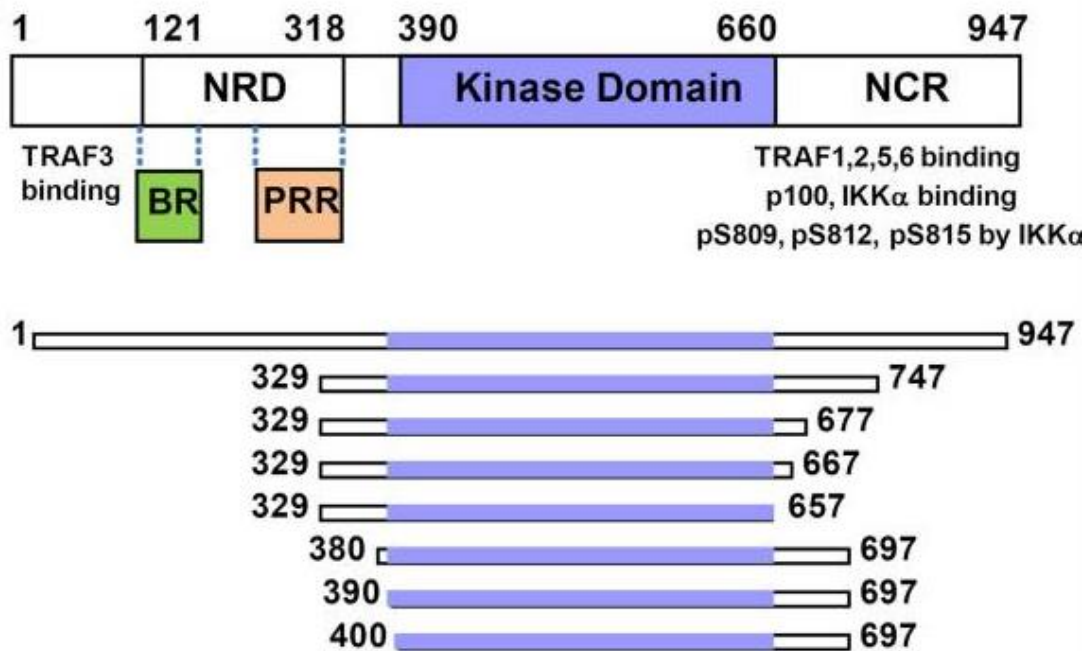
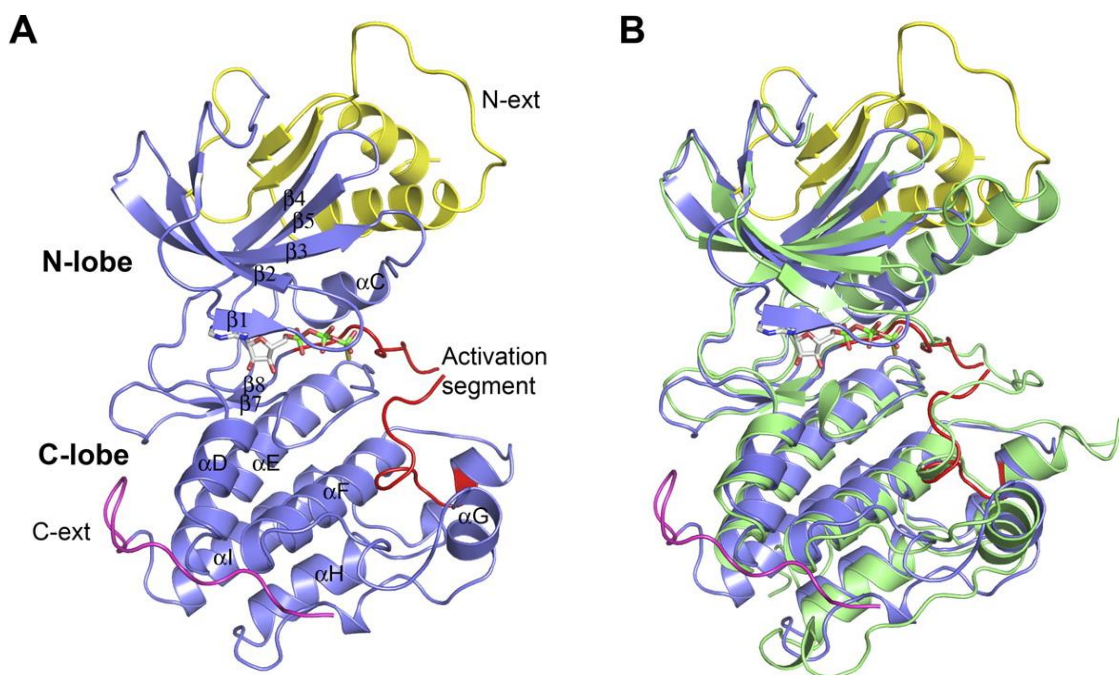


Figura 2. Diferentes dominios de NIK (figura tomada de la referencia 6).

Para describir la estructura de la región catalítica de NIK (Figura 3) se empezará por el dominio quinasa que adopta un pliegue de proteína quinasa canónico de dos lóbulos, el lóbulo *N*-terminal en el cual se comprenden principalmente una lámina beta antiparalela de 5 hebras además de una hélice alfa, y el lóbulo *C*-terminal, que está formado exclusivamente por hélices alfa. Es importante decir que aunque la figura 3 corresponde a los residuos 333-675 de NIK, hay una región para la que no se obtuvo densidad electrónica interpretable y que corresponde a los residuos 543-555, que forman parte del bucle de activación (Figura 3A).

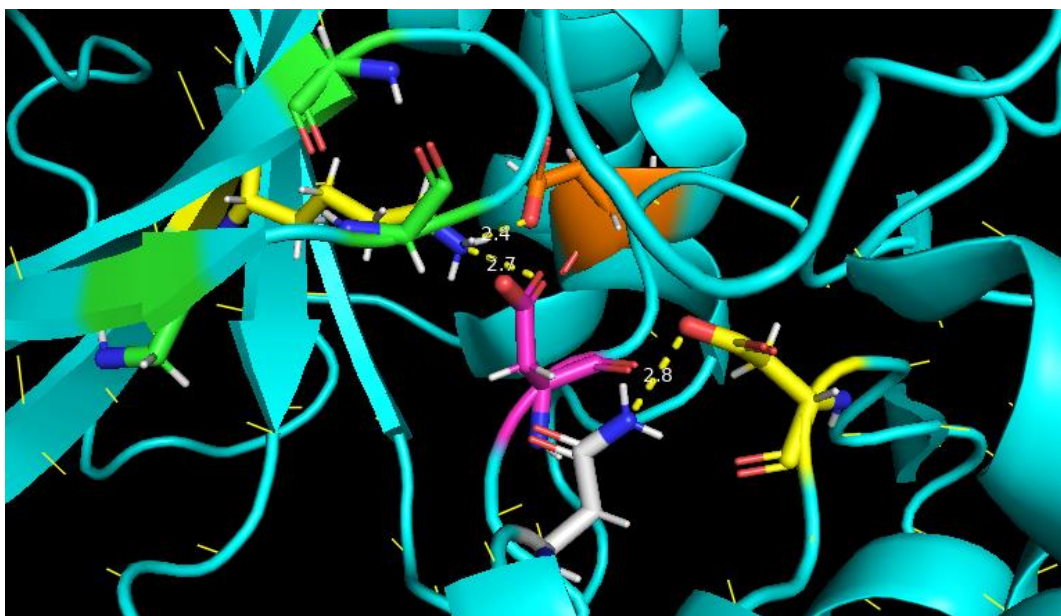
La zona donde se unen los dos lóbulos es la conocida como región bisagra y además es el sitio de unión ATP. Se puede considerar que el dominio catalítico de NIK está adoptando una conformación tan cerrada como otras proteínas quinastas activadas. Sin embargo, aunque la mayoría de las quinastas adoptan esa conformación activa (cerrada) gracias a la fosforilación de alguno de sus residuos, NIK la adopta gracias a la estabilización de dicha conformación fruto de la interacción de los residuos que forman su región catalítica. Atendiendo a lo anteriormente mencionado, podríamos considerar que NIK está activada intrínsecamente mediante la estabilización de su forma activa (Figura 3B).



**Figura 3. A) Región catalítica de NIK; B) Comparación de NIK (mantiene los colores de la figura A) con otra quinasa (verde) que se activa mediante fosforilación (figuras tomadas de la referencia 6).**



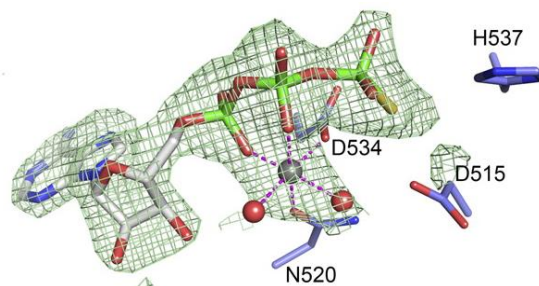
En esta conformación, plasmada en la figura 4, los residuos más importantes para la actividad catalítica de NIK son: Lys-429 (amarillo), que se encuentra bajo el bucle rico en glicina (verde), y es la encargada de estabilizar en una posición determinada los fosfatos alfa y beta del ATP; Glu-440 (naranja), que se encarga de estabilizar a la Lys-429 mediante un puente salino (enlace iónico) en la posición adecuada para que realice su función; Asp-534 (morado), que se encuentra en el motivo DFG, que se encarga de la unión al catión metálico y está cerca del bucle de activación cuya composición proteica determina que NIK sea una serina-treonina quinasa. También está el motivo HGD (dado que NIK posee glicina en lugar de arginina) en el cual se encuentra el Asp-515 (rosa), que es el encargado de posibilitar la transferencia del fosfato gamma y por último esta Asn-520 (blanco) que es el encargado de orientar a Asp-515 en la posición adecuada para que pueda facilitar la transferencia del grupo fosfato y hacer que NIK permanezca siempre activa (Figura 4).



**Figura 4. Residuos importantes para la actividad catalítica de NIK (PDB 4IDT. Figura tomada de la referencia 12).**

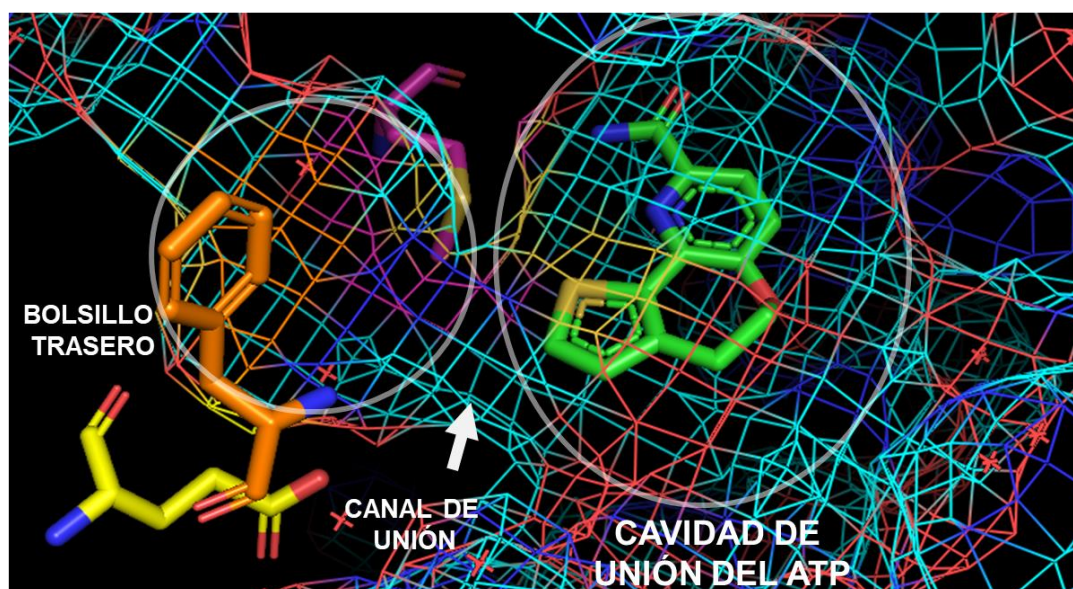
También es importante señalar que NIK, como todas las quinazas, posee un catión metálico divalente, que en su caso es  $Mg^{2+}$ , el cual podría considerarse que tiene una función híbrida. Por una parte se coordina a dos oxígenos de los grupos fosfato alfa y beta del ATP para favorecer la donación del grupo fosfato

gamma. Por otra parte también se está coordinando a aminoácidos Asn-520 y Asp-534. Además se está coordinando a dos moléculas de agua (Figura 5).



**Figura 5. Cation  $Mg^{2+}$  y su entorno (figura tomada de la referencia 6).**

El modo de unión de ATP al sitio activo de NIK es similar a como ocurre en otras quinasas. El anillo de adenina se une a la región bisagra mediante dos enlaces de hidrogeno y el  $Mg^{2+}$  que hay en el dominio DFG del sitio de unión se une a los oxígenos de los grupos fosfatos alfa y beta del ATP. Sin embargo, una particularidad del sitio de unión de ATP en NIK es que tras él hay una cavidad de carácter hidrofílico que está unida al sitio de unión de ATP mediante un estrecho conducto. A esta cavidad se la llamó bolsillo trasero y no interviene en la unión del ATP (figura 6).<sup>13</sup>



**Figura 6. Sitio activo de NIK destacando su bolsillo trasero que esta flanqueado por los aminoácidos Phe-537 (naranja) y Glu-442 (amarillo). En el lugar de unión del ATP tenemos un inhibidor (17) (verde). En el canal que conecta el bolsillo y el sitio de unión de ATP está la Met-471 (morado) (PDB-5T8P. Figura tomada de la referencia 14)**

Cabe destacar que se encontró una mutación de origen natural en NIK que interfiere en la señalización de NF- $\kappa$ B. Concretamente el residuo que muta es Thr-559 que es un residuo conservado en el área de unión al sustrato y que se cree que contribuye a la especificidad de NIK para fosforilar serina y treonina.

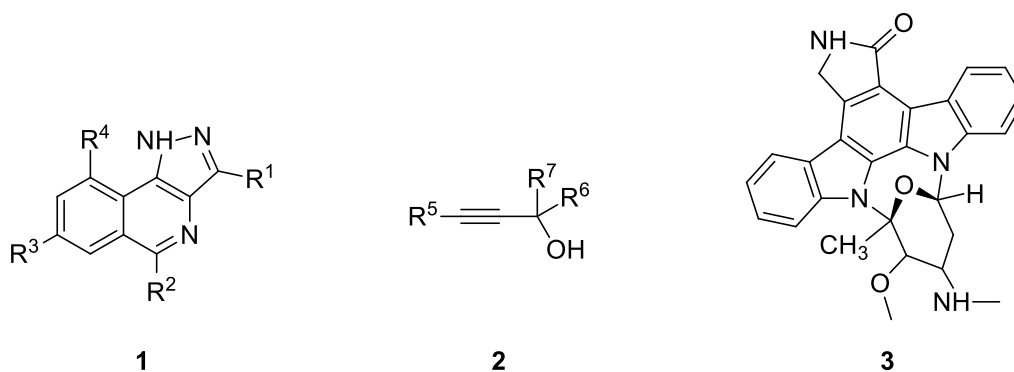
También es importante mencionar que se demostró que el constructo más corto de la proteína que conservaba la actividad catalítica 330-680 tenía capacidad de autofosforilación mucho menor que la del constructo más largo 330-747, demostrándose que los sitios de autofosforilación estaban en la región 680-747.

Finalmente es necesario un último apunte sobre la estructura general de NIK. Concretamente se debe mencionar que se han observado formas monoméricas y diméricas de NIK siendo muy predominante la forma monomérica, lo cual concuerda con su actividad y su estructura, ya que se ha visto que una estructura dimérica podría interferir con la unión de su proteína sustrato.

Hay que destacar que la importancia de NIK radica en que una mala regulación en los niveles de esta proteína puede originar enfermedades tanto por exceso (enfermedad renal, lupus eritromatoso, osteopetrosis y algunos tipos de cáncer) como por defecto (leucemia mieloide aguda y osteoporosis).<sup>15</sup>

## **6. Inhibidores de NIK.**

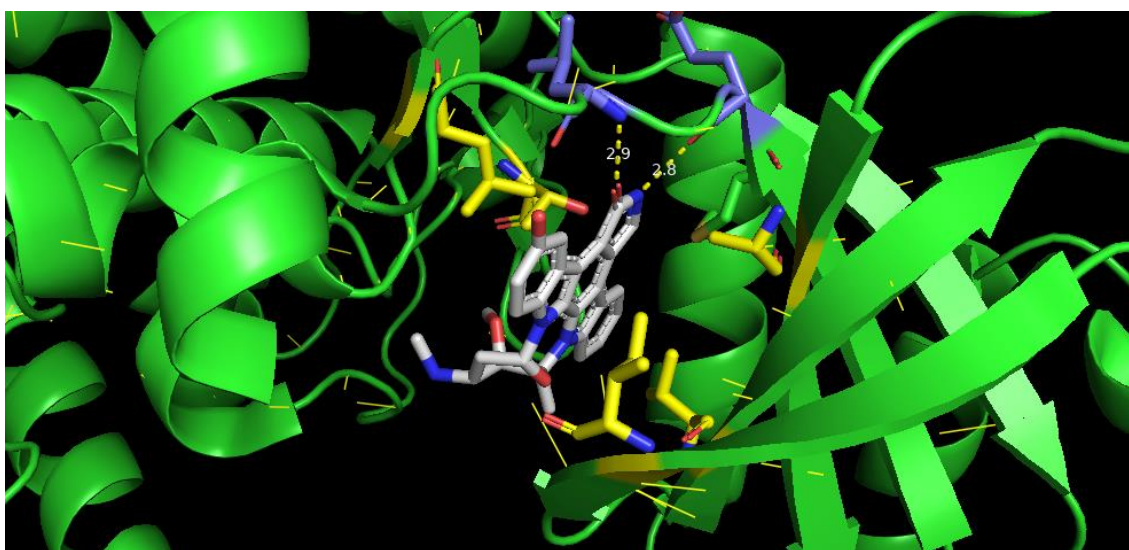
Para abordar el descubrimiento y desarrollo de los diferentes inhibidores de NIK que han surgido a lo largo de los años se seguirá un orden cronológico. Según este orden la primera familia de moléculas descritas como inhibidores de NIK fueron las pirazolo [4,3-c] isoquinolinas (**1**).<sup>16</sup> Sin embargo, Mortier descubrió en 2010 que estas moléculas no eran inhibidores de NIK, sino de otra enzima que estaba presente en la vía de activación canónica de NF- $\kappa$ B.<sup>17</sup> De este modo los primeros inhibidores reales de NIK fueron los alquinil alcoholes **2**, descritos en 2009 en una patente de la empresa Amgen.<sup>18</sup> En 2010 Mortier, en el mismo estudio que desbancó a los compuestos **1** como inhibidores de NIK, descubrió que el producto natural estaurosporina (**3**), era un verdadero inhibidor de NIK (Figura 7).



**Figura 7**

Al mismo tiempo validó un modelo en 3D especialmente diseñado para simular el lugar de unión de los compuestos candidatos a inhibidores en NIK. Para realizar dicho modelo se basó en la técnica del modelado por homología utilizando a PAK1 (“*p21 activated kinase 1*”) como plantilla.

Una vez que se realizó el modelo 3D del sitio de unión NIK se procedió a probar el modo de unión de una molécula que se sabía que era un inhibidor de otras quinasas, la estaurosporina.<sup>19</sup> Dicho estudio demostró que la estaurosporina (blanco) se unía a dos residuos principales en la estabilización del anillo de adenina en el ATP.<sup>20</sup> Esos residuos eran Glu-470 y Leu-472 en NIK que en PAK1 correspondían a Glu-345 y Leu-347 (azules) respectivamente. Además la región aromática de la estaurosporina quedaba estabilizada por interacciones hidrofóbicas con los residuos Ile-406, Val-414, Ala-427, Leu-522 y Thr-533 en NIK que en PAK1 correspondían a los residuos Ile-276, Val-289, Ala-297, Leu-396 y Thr-406 (amarillos), respectivamente (figura 8).



**Figura 8. Estaurosporina en el modelo 3D Del sitio de unión de NIK usando como plantilla a PAK1 (PDB-2HY8. Figura tomada de la referencia 21).**

En su investigación Mortier también realizó estudios sobre la actividad biológica de la estaurosporina que demostraron no sólo que era un verdadero inhibidor de NIK, si no que, mediante un ensayo radiométrico de proteína quinasa, demostró que era capaz de inhibir su actividad hasta en un 72% a una concentración de 10  $\mu\text{M}$ .

De este estudio se puede destacar que fue pionero en elaborar el primer modelo 3D del sitio de unión de NIK. Este acontecimiento fue muy relevante no solo porque dicho modelo sirviera para posteriores estudios, sino porque en esta época no se disponía de la estructura cristalográfica de NIK.

Ese mismo año Mortier publicó un nuevo estudio donde utilizaba el modelo 3D del sitio de unión de NIK que había validado anteriormente.<sup>22</sup> En esta ocasión el estudio se centró en utilizar la técnica del “*virtual screening*” (VS) combinada con varios filtros como “*high-throughput docking*” (docking de alto rendimiento).

Concretamente, para llevar a cabo este estudio se seleccionó una librería inicial de compuestos. Esta librería fue ZINC, dado que es de acceso libre y dispone de los compuestos listos para usarlos en “docking”. El VS que se realizó en este estudio se centró solamente en las moléculas pequeñas por tres motivos: el espacio químico se exploraría más eficazmente, las moléculas pequeñas presentan un mayor eficacia como ligandos (LE) y la atractiva posibilidad de poder diseñar leads a partir de un hit mediante la modificación de alguna parte de la molécula.

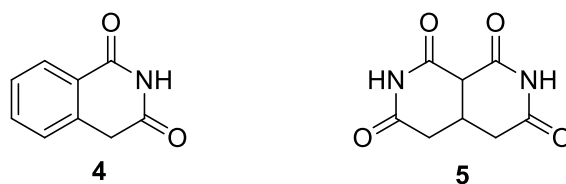
El primer paso del VS fue aplicar unas reglas similares a las de Lipinsky ( $150 < \text{PM} < 250$ ;  $\log P \leq 2,5$ ;  $\text{HD} \leq 2$ ;  $\text{HA} \leq 4$ ) a los compuestos de la librería ZINC que se componía de unos ocho millones de compuestos. 67.500 compuestos pasaron este filtro inicial. Tras este procedimiento se procedió a hacer el docking de las moléculas seleccionadas en el sitio de unión del ATP en NIK, usando para ello el programa de docking automático GOLD con los parámetros apropiados para VS. El sitio de unión de ATP se delimitó a 10 Å alrededor de la estaurosporina que se tomó como referencia. Para cada compuesto se probaron tres posiciones de docking y su afinidad con NIK se midió usando tres funciones

de puntuación (“score functions”), que sirvieron para medir la eficiencia como ligando de cada molécula. De las tres funciones de puntuación se obtuvo un índice de eficiencia como ligando consensuado ( $LE_{total}$ ). A partir de estos datos se tomaron los dos mil compuestos con mejor  $LE_{total}$ , así como los cien mejores compuestos de cada función de puntuación individual y se formó una muestra de 2250 compuestos. Estos compuestos fueron los elegidos para pasar a la siguiente fase del cribado.

El siguiente paso fue un análisis visual de la interacción de las moléculas seleccionadas con la región bisagra de NIK, descartándose aquellas que no interaccionaron. De los 1019 compuestos que cumplieron el requisito anterior, solamente 324 mostraban el enlace de hidrógeno con Leu-472, que es clave para poder ser considerados inhibidores de quinasas. Finalmente solo 224 de estos compuestos estaban comercialmente disponibles.

El cuarto y último paso del proceso fue seleccionar 49 de las 224 moléculas candidatas, atendiendo principalmente al criterio de conseguir la mayor variabilidad estructural posible.

La actividad biológica de estos 49 compuestos se midió a través de un ensayo de radiometría de proteína quinasa. Aunque ninguno resultó ser tan buen inhibidor como la estaurosporina, la cual dio un valor de  $IC_{50} = 2,3 \mu M$ , hubo dos moléculas **4** y **5** que arrojaron valores del  $IC_{50}$  de  $51 \mu M$  y  $90 \mu M$ , respectivamente (figura 9).

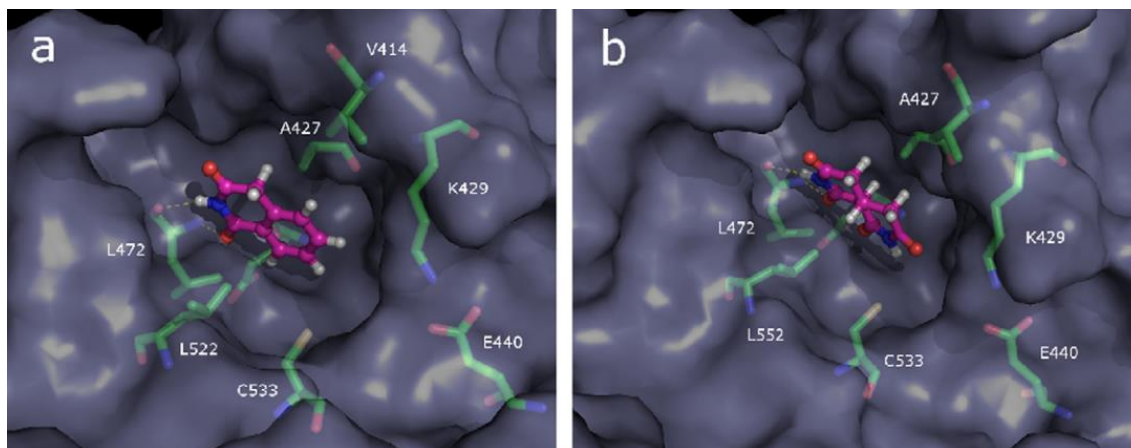


**Figura 9**

Cuando se analizaron, los residuos con los que las moléculas **4** y **5** tenían las mayores interacciones, se observó que se originaba un enlace de hidrógeno entre el NH del residuo L472, situado en la región bisagra de la zona de unión del ATP de NIK, y los carbonilos en posición 1 de los compuestos **4** y **5**, en el que los carbonilos actuaban como aceptores de hidrógeno. Además, se daba un segundo enlace de hidrógeno entre el nitrógeno en posición 2 de los compuestos

**4** y **5** y el carbonilo de la L472, donde el carbonilo actuaba como aceptor de hidrógeno. A parte de estos enlaces, también ocurría una estabilización adicional debida a interacciones de Van der Waals (Figura 10).

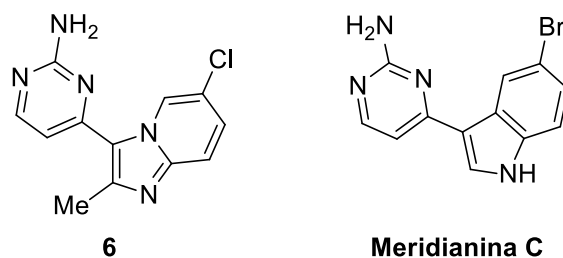
De este estudio cabría destacar que fue la primera vez que se usó la metodología del VS en el sitio de unión de ATP de NIK.



**Figura 10. Modo de unión e interacciones principales de las moléculas 4 (a) y 5 (b) (figura tomada de la referencia 22)**

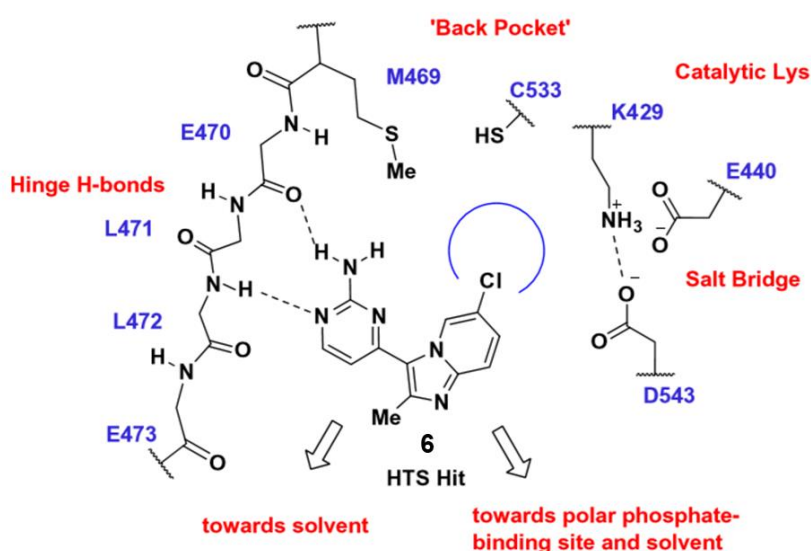
En 2012 ocurre un gran avance, Liu y Sudom obtienen la primera estructura cristalográfica de NIK que revela un sitio de unión prometedor para inhibir a la proteína.<sup>6</sup> Este gran avance se vería reflejado posteriormente en los estudios de búsqueda de inhibidores de NIK.

En 2013 Li, quien también había participado en el descubrimiento de los primeros inhibidores de NIK por la empresa Amgen en 2009, publicó un estudio realizado con objeto de descubrir nuevos inhibidores utilizando la metodología del diseño basado en la estructura.<sup>23</sup> Dicho estudio comenzó con un HTS (“*high-throughput screening*”) de una librería propia, utilizando como estructura en la que basar dicho cribado una estructura truncada de NIK que sólo contenía su dominio catalítico. Gracias a este proceso se obtuvo un primer hit (**6**) con un valor del  $IC_{50} = 0,6 \mu M$  para NIK y un valor del  $IC_{50} = 16 \mu M$  para la inhibición de la degradación proteosomal de p100 a p52. Dicho compuesto **6** es un derivado del alcaloide de origen natural meridianina C (Figura 11).



**Figura 11**

A continuación se elaboró un modelo 3D por homología de NIK y se procedió a hacer el docking del hit original, con objeto de ver cuál era el modo de unión a la proteína y sacar conclusiones para aplicar a un siguiente estudio SAR a partir de la estructura del compuesto **6** que estaban desarrollando (Figura 12).



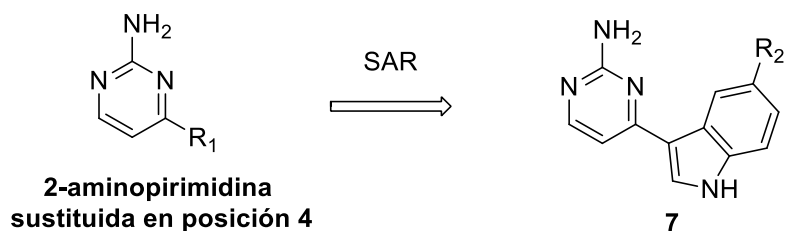
**Figura 12. Modelo de homología del sitio activo de NIK (figura tomada de la referencia 23)**

Con esta información se emprendió el proceso para pasar del *hit* al *lead* el cual comenzaría sometiendo a estudios de relación estructura-actividad (SAR) derivados del hit **6**.

Primero se estudió la influencia de diversos sustituyentes heterocíclicos en posición 4 de la 2-aminopirimidina. Como sustituyentes se probaron índoles, bencimidazoles e indolinas, siendo los índoles los más activos y dentro de estos los unidos por el nitrógeno más activos que los unidos por carbono. No obstante, se siguió a partir del indol unido por carbono dado que su estructura se parecía más a la de los alcaloides tipo meridianina y pensaron que su modo de unión



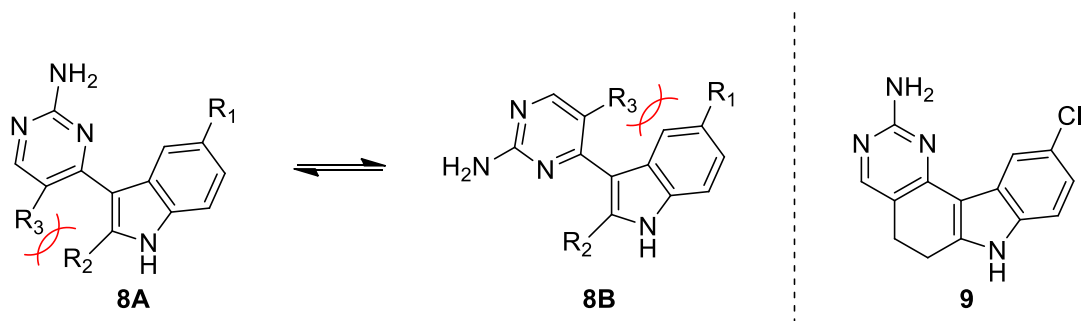
sería similar a estos. Gracias a este primer estudio SAR se obtuvo la estructura del lead **7** (Figura 13).



**Figura 13**

Después se estudió como los sustituyentes del anillo de fenilo del indol afectaban a la actividad. Se vio que la mayor actividad se obtuvo con el sustituyente ciano y que, de manera general, los sustituyentes electroattractores funcionaban mejor.

También se observó que el anillo de aminopirimidina podía rotar sobre el enlace biarilo dando lugar a dos conformaciones diferentes A o B. La preferencia sobre una u otra venía dada por la energía relativa de dicha conformación, la cual venía dada a su vez por los sustituyentes que tuvieran en orto con respecto al enlace biarilo (Figura 14).

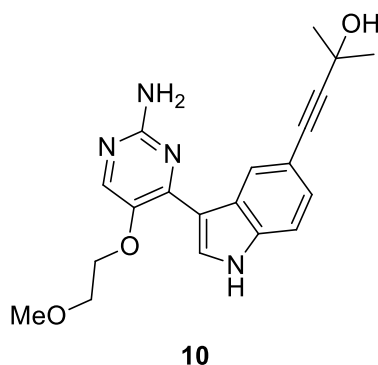


**Figura 14**

Mediante un nuevo estudio SAR a partir de derivados de la estructura de la figura 14 se observó que aquellos que tenían una estructura que fijaba la conformación A eran mucho más activos, por lo que se determinó que ese era el modo de unión preferente. A partir de esta información obtuvieron un lead muy prometedor **9** con un  $IC_{50} = 0,070 \mu M$  para NIK (figura 14).

Aunque el compuesto anterior resultaba muy prometedor no fue el único ni el mejor inhibidor de NIK que se descubrió en este estudio. Toda la información recogida en los diferentes estudios SAR previos y el conocimiento de que existía

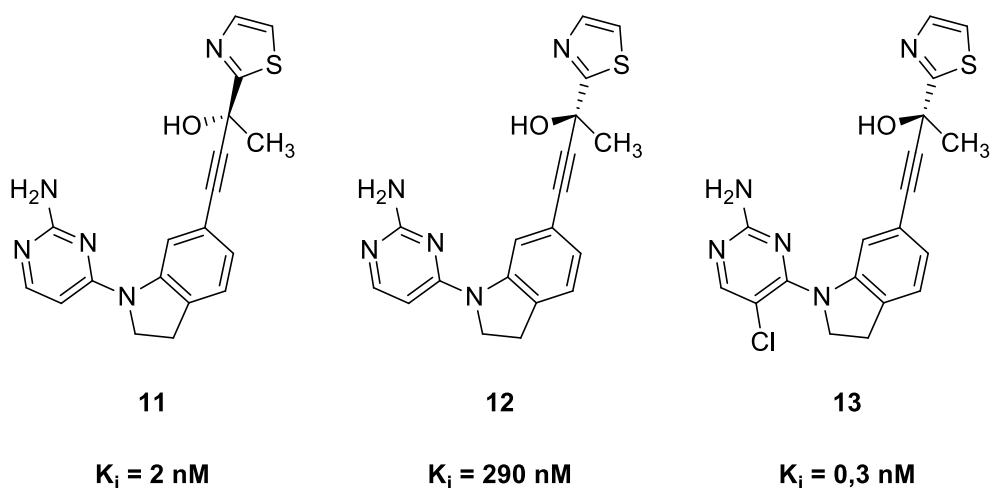
un bolsillo trasero en el sitio de unión de ATP de NIK unido al hecho de que conocían el carácter hidrofílico de éste, ya que la estructura cristalina del dominio catalítico de NIK reveló que en el interior del mismo había moléculas de agua, acabó llevándoles al compuesto **10**, que fue el que mejores valores de inhibición obtuvo, con un  $IC_{50}$  – CLA-NIK de  $0,040 \mu\text{M}$  y un  $IC_{50}$  de  $0,020 \mu\text{M}$  en células humanas HT29 (Figura 15).



**Figura 15**

La mayor inhibición del compuesto **10** se achacó a que había conseguido cruzar la barrera de los dos aminoácidos citados anteriormente y había entrado en el bolsillo trasero de NIK. Esto último se confirmó mediante la estructura obtenida por difracción de rayos X del co-cristal de NIK truncada con el compuesto **10** unido. Dicha estructura constituye la primera del dominio catalítico de NIK junto a un inhibidor. Los logros alcanzados en este estudio fueron trascendentales para estudios posteriores, dado que se reveló el modo de unión de los inhibidores de NIK a su dominio catalítico y se consiguió acceder a su bolsillo trasero, ampliando así el epítipo inhibitorio de esta proteína. Además, se sentaron las bases sobre la estructura de futuros inhibidores que quisieran acceder al bolsillo trasero de NIK. Concretamente se demostró que la función alcohol terminal y el espaciador alquinilo eran esenciales para conseguir cruzar el conducto que da paso al bolsillo trasero y unirse a este.

Al año siguiente, Li junto con otros desarrolladores de los primeros inhibidores, esclarecieron algunas de las cualidades que hacían inhibidores reales de NIK a los compuestos que habían desarrollado en su patente de 2009, realizando una serie de estudios sobre la actividad de algunas de las moléculas descritas en ella.<sup>24</sup> Las moléculas **11**, **12** y **13** fueron las elegidas para tal estudio (figura 16).

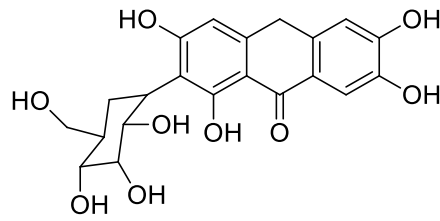


**Figura 16**

La actividad de estas moléculas se midió utilizando diversos estudios entre los que destacamos el ensayo HTRF (“*Homogeneous Time Resolved Fluorescence*”) donde se obtuvieron los valores de  $K_i$  que se muestran en la figura anterior. También se ensayaron con varios tipos de células de mieloma múltiple (MM) donde se encontró que estas moléculas podían llegar a inhibir hasta en un 95% a NF- $\kappa$ B. Por otro lado, se demostró que las moléculas estudiadas tenían la capacidad de disminuir los niveles de p52 en células que tenían NIK activado debido a mutaciones ocasionadas por el MM. Sin embargo la propia Amgen realizó un estudio que demostró que no eran selectivos solo de NIK si no que podían inhibir otras quinasas.

En este estudio hemos podido ver que estos inhibidores de elevada actividad poseen una estructura muy similar a la de los inhibidores que vimos anteriormente que eran capaces de pasar al bolsillo trasero de NIK. Se puede pensar entonces que la elevada potencia de estos inhibidores viene dada por el hecho de que ellos también son capaces de entrar al bolsillo trasero de NIK.

Tras un pequeño parón en el descubrimiento de inhibidores, en 2016 Takeda descubre que la mangiferina C (**14**), una molécula de origen natural, es un inhibidor de NIK (Figura 17).<sup>25</sup>

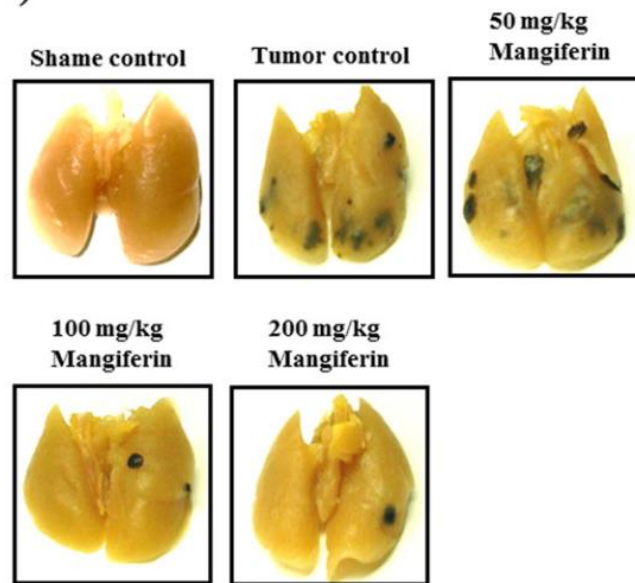


14

**Figura 17. Mangiferina C**

En anteriores estudios se había demostrado que la mangiferina tenía actividad anticancerosa contra la leucemia mieloide aguda<sup>26</sup> y se sabía que la mangiferina inducía la apoptosis en células de MM inhibiendo la translocación de NF- $\kappa$ B.<sup>27</sup> Con esta información en mente se trató de dilucidar el mecanismo de acción molecular por el cual actuaba la mangiferina. Para ello se realizó un estudio donde se medía el nivel de fosforilación de IKK $\alpha$ , al cual tenía que fosforilar NIK para ver si era efectivamente un inhibidor de la ruta de activación no canónica de NF- $\kappa$ B. Los ensayos mostraron que, efectivamente, según subía la dosis de mangiferina, el grado de fosforilación de IKK $\alpha$  disminuía, demostrándose así que efectivamente era un inhibidor de la ruta de activación no canónica de NF- $\kappa$ B mediante la inhibición de NIK. No obstante en este estudio también se demostró que no era muy selectivo ya que era capaz de fosforilar otras proteínas.

Más tarde, aquel mismo año se publica de mano de Takeda un estudio donde se continúan investigando las propiedades de la mangiferina como inhibidor de NIK.<sup>28</sup> En esta ocasión se trató de demostrar la eficacia de la mangiferina en melanoma metastásico pero no en líneas celulares, sino en ratones, los cuales mostraron una significativa mejoría como puede apreciarse en sus tejidos (Figura 18).

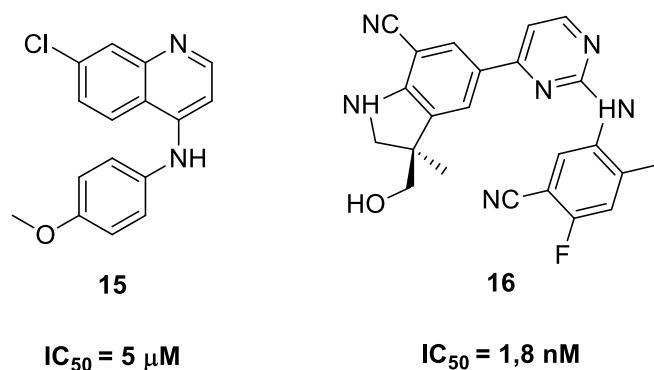


**Figura 18. Tejidos de rata con melanoma tratados con mangiferina (figura tomada de la referencia 28).**

De este estudio podemos destacar que, aunque aún no está claro como la mangiferina inhibe a NIK para que no fosforile a  $IKK\alpha$ , el hecho de que haya resultado tan eficaz contra la supervivencia de líneas celulares de dos de los cánceres más peligrosos que hay, especialmente el mieloma múltiple, para el que a día de hoy no existe cura, y los tratamientos paliativos actuales resultan ineficaces en muchos pacientes, convierten a la mangiferina en un candidato a fármaco prometedor en este campo.

En 2017 se descubre una nueva familia de inhibidores por Passeron y col., las 4-anilinoquinolinas.<sup>29</sup> El máximo exponente de la familia, dado que obtuvo la mayor capacidad inhibitoria, fue el compuesto **15** (Figura 19). Además se comprobó la efectividad de estos compuestos en el tratamiento del linfoma angioinmunoblastico de células T.

También en 2017, Janssen realizó un estudio que acabaría culminando con el descubrimiento de la familia de los derivados de cianoindolina con diversos sustituyentes como nuevos inhibidores de NIK<sup>30</sup>. El compuesto **16** se consagró como uno de los mejores lead de esta familia dada su gran capacidad de inhibición (Figura 19).

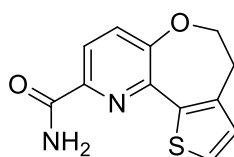


**Figura 19**

El mismo año Castanedo centró sus esfuerzos en la síntesis de inhibidores selectivos de NIK, especialmente frente a la fosfoinositol-3-quinasa (PI3K), una quinasa muy común asociada al sistema inmune.<sup>31, 32</sup>

Su trabajo se basó en la optimización guiada por la estructura de un hit con el objetivo de conseguir un inhibidor tipo 1 ½ de NIK. Estos compuestos no son otra cosa que aquellos que se unen a un bolsillo trasero unido a la región de unión de ATP a parte de a la propia zona de unión de ATP, en el contexto de las quinasas. Para conseguir tal cosa el paso crucial era burlar al residuo guardián del túnel que da acceso al bolsillo trasero de NIK, la Met-471.

Se comenzó con un HTS de una librería de compuestos propia. La actividad de estos compuestos se evaluó mediante un ensayo de hidrólisis de ATP y se tomó como hit al compuesto **17** que obtuvo un valor de 1,3 μM. Su elección no solo vino dada por el resultado del ensayo, sino que su estructura difería significativamente de los inhibidores de NIK descritos hasta la fecha. Además sus propiedades fisicoquímicas eran bastante buenas (Figura 20).



**17**

**NIK ADP-FP K<sub>i</sub> = 1,3 μM**

**Figura 20**

La estructura cristalina del compuesto anterior unida a NIK murina mostro que eran varias las interacciones principales que estabilizaban su unión. Por un lado la proximidad de la amida primaria a la región bisagra de NIK hacia que pudiera aceptar un enlace de hidrogeno de Leu-474 y ser donante de enlace de hidrógeno hacia Glu-472. Por otra parte en el llamado bolsillo trasero, cuyo acceso quedaba restringido por Met-471, ocurría la segunda interacción clave. En este bolsillo había una molécula de agua que donaba enlace de hidrógeno a Glu-442 de la hélice  $\alpha$ C y aceptaba enlace de hidrógeno de Phe-537 del motivo DFG (Figura 21).

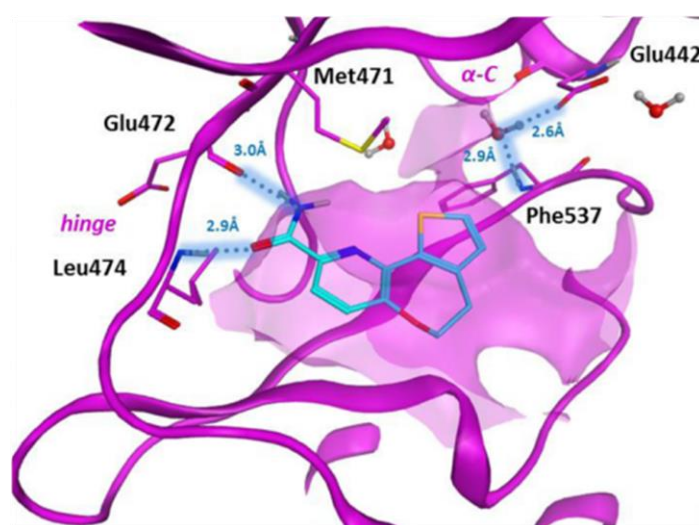


Figura 21 (figura tomada de la referencia 31).

Sin embargo, sabían que los inhibidores tipo 1  $\frac{1}{2}$  anteriores eran capaces de entrar en ese bolsillo mediante un alquino unido a un alcohol terciario. Dicho alcohol puede reemplazar la red de enlaces de hidrógeno que se da con la molécula de agua lo cual expande el epítipo de NIK.

Así pues realizaron un estudio SAR con compuestos que mantenían el esqueleto del hit original pero a los que se les había añadido diversos alcoholes terciarios unidos por alquino. Sin embargo, una sustitución en el anillo de tiofeno originaba una conformación no apropiada para que el alcohol entrara al bolsillo trasero, así que modificaron el armazón del hit original. Tras probar distintas opciones el armazón basado en imidazobenzoxepina fue el elegido porque permitía una disposición adecuada del alcohol terciario y tenía una lipofilia inicial adecuada. La estructura cristalográfica de este compuesto unido a NIK (pdb-5T8O), revelaba que el alcohol había entrado al bolsillo trasero. Dicha estructura

mostraba que el nuevo lead se situaba aún más cerca de la región bisagra y que la Met-471 se había desplazado con respecto a la estructura del hit inicial. Además el alcohol estaba a la distancia adecuada, dentro del bolsillo, como para interactuar con los residuos Glu-442 y Phe-537, desbancando a la molécula de agua (Figura 22).

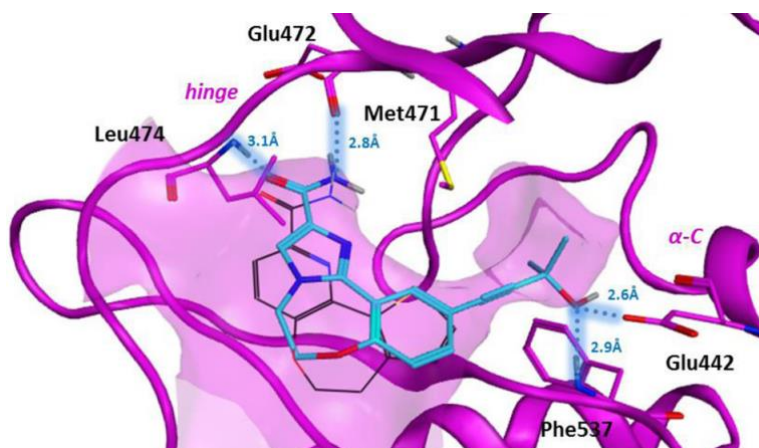
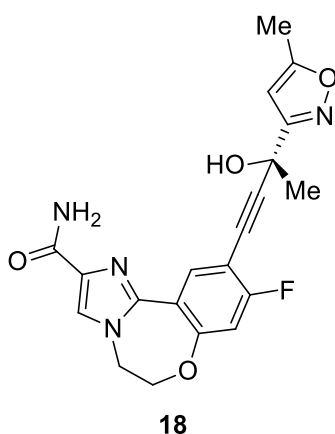


Figura 22 (figura tomada de la referencia 31).

Seguidamente se realizaron nuevos estudios SAR con el objetivo de encontrar sustituyentes capaces de ocupar de forma más eficaz el bolsillo trasero. Con esto en mente probaron diferentes alcoholes terciarios hasta llegar al compuesto **18**. Este compuesto era el que poseía una  $K_i$  y un  $IC_{50}$  más favorables (Figura 23).



NIK ADP-FP  $K_i = 0,3 \text{ nM}$

NF-kB  $IC_{50} = 156 \text{ nM}$

Figura 23



No obstante este compuesto no cumplía con una de las premisas iniciales del estudio, la selectividad por NIK frente a PI3K, ya que también la inhibía.

Con objeto de solucionar este problema se realizaron nuevos estudios SAR, donde probaron varios enfoques. Bien sustituir el oxígeno del anillo de oxepina, dado que sabían que el modo de unión a PI3K de estos compuestos era en parte mediante ese oxígeno, o bien colocar sustituyentes en el anillo de oxepina o en el de imidazol que generasen un impedimento en el modo de unión a PI3K al compuesto. Se probaron diversas opciones hasta llegar a los cambios que ocasionaban un mayor detrimento en la inhibición de PI3K al tiempo que aumentaban la inhibición de NIK. Así llegaron finalmente a los compuestos **19** y **20** con excelentes resultados de potencia y selectividad (Figura 24).

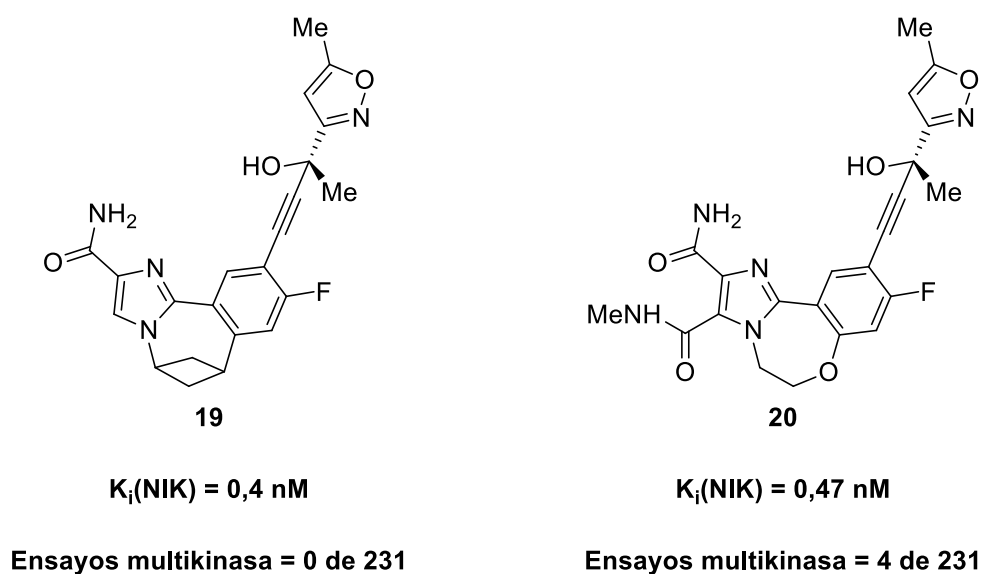
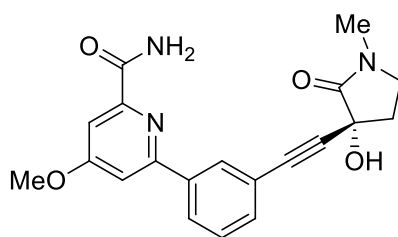


Figura 24

En un estudio posterior el mismo grupo realizó un “*scaffold-hopping*” para acabar determinando que el anillo de oxazepina podía eliminarse de los compuestos y llegar a moléculas más accesibles sintéticamente y que seguían siendo buenos inhibidores de NIK en cuanto a potencia y selectividad como el compuesto **21** (Figura 25).<sup>33</sup>



**21**

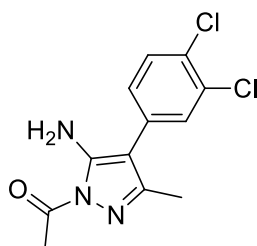
**NIK ADP-FP  $K_i$  = 0,23 nM**

**NF-kB  $IC_{50}$  = 34 nM**

**Ensayos multikinasa = 1 de 228**

**Figura 25**

Antes de terminar 2018 sería Pippione quien descubriera un nuevo tipo de inhibidores.<sup>34</sup> En su estudio se partió de 2320 moléculas pequeñas obtenidas de diversas librerías. Los compuestos se sometieron a una serie de ensayos biológicos donde un compuesto de tipo aminopirazol se alzó como un hit prometedor debido a su selectividad y potencia. Este compuesto se convirtió en el punto de partida del proceso “*hit to lead*”. Tras sucesivos estudios SAR el proceso desembocó en el compuesto **22**, que destacó como lead debido a su selectividad hacia NIK sobre 44 quinasas, aunque su potencia era inferior a la de los inhibidores anteriores. No obstante su estructura difería significativamente de las anteriormente descritas (Figura 26).



**22**

**$IC_{50}$  = 8,4  $\mu$ M**

**Figura 26**

Al año siguiente un nuevo inhibidor fue descubierto por Cheng.<sup>35</sup> Para lograrlo se llevó a cabo un análisis discriminatorio del docking de varios compuestos. El que obtuvo los mejores resultados fue el compuesto **23**, al que se sometió a ensayos biológicos que determinaron que su  $IC_{50}$  en NIK era del rango micromolar y que poseía cierta actividad anti proliferativa contra células

cancerosas. De este estudio se puede destacar que aunque el compuesto que obtienen no mejora a lo anterior en cuanto a capacidad inhibitoria, sí que posee una estructura que difiere significativamente de los inhibidores anteriores, lo que afecta a su modo de unión y lo convierte en un lead muy prometedor (figura 27).

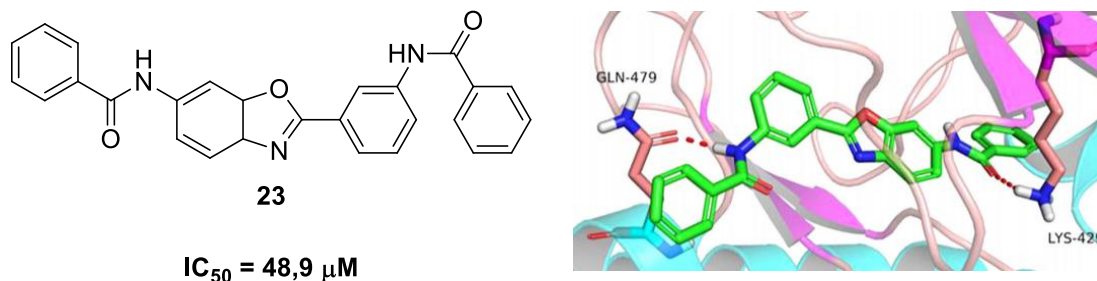
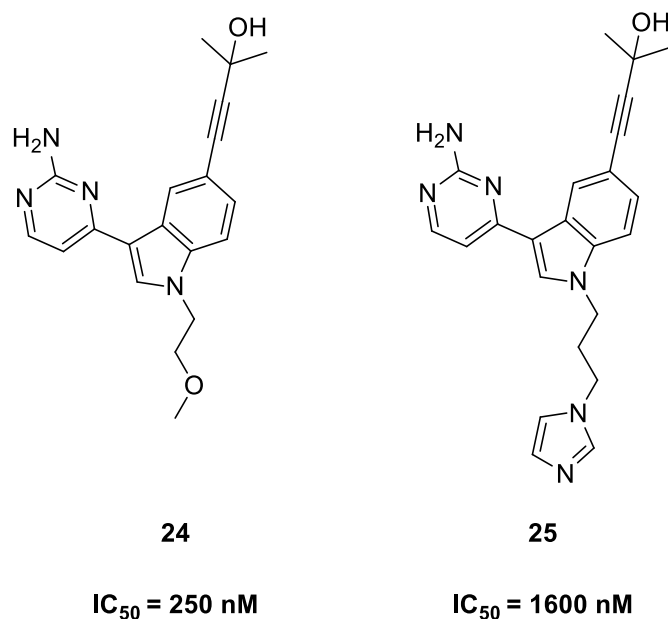


Figura 27. Compuesto 23 y su modo de unión (figura tomada de la referencia 35).

La evolución de la tecnología y la mejora del “*machine learning*” hacen que la búsqueda de NIK vaya racionalizándose cada vez más y, en 2019, Ye valida un modelo apoyado en vectores de regresión (SVR) para utilizarlo en el descubrimiento de nuevos inhibidores.<sup>36</sup>

En este trabajo se partió con el objetivo de establecer un MD-SVR (docking molecular basado en regresión SVR). Primero se validó un modelo QSAR (SAR cuantitativo) basado en docking molecular integrando, “*docking scores*” (funciones que miden la calidad del docking) y perfiles de interacciones clave para así mejorar la calidad del docking inicial. El modelo MD-SVR, que había sido elaborado a partir de inhibidores conocidos de NIK, se utilizó para buscar nuevos inhibidores. Dicho modelo predijo que los compuestos **24** y **25** serían buenos leads, lo cual se confirmó tras sintetizarlos y evaluar su actividad inhibitoria de NIK (Figura 28).



**Figura 28**

Además se demostró que los resultados obtenidos por el modelo MD-SVR mejoraban a los obtenidos por “*docking score*” clásico. Para esto se realizó un estudio donde se medía la actividad de los compuestos que habían obtenido una buena puntuación de *docking score*. Sin embargo, la actividad no era muy buena mientras que el *docking score* predecía lo contrario.

Uno de los trabajos más recientes es el desarrollado por Li en 2020, que basándose en información obtenida de los anteriores inhibidores ha llegado a obtener uno nuevo más potente.<sup>37</sup>

En su estudio, se parte de la estructura cristalográfica del co-cristal de NIK con el compuesto **13**. Viendo el modo de unión de **13** en esta estructura se pensó que un resto de 7H-pirrolo-[2,3-d]-pirimidina podría imitar la función del resto de pirimidina de **13**. Tras varias optimizaciones llegaron al compuesto **26**, que tenía un anillo de benceno reemplazando al 2,3-dihidroindol del núcleo de **13**. El compuesto **26** dio un  $IC_{50}$  de 303 nM en un ensayo de consumo de ATP. El paso siguiente en el camino del “hit to lead” fue hacer un *docking molecular* del compuesto **26** en la estructura NIK/**13** para elucidar el modo de unión de **26** a la proteína y compararlo con el de **13**. Tras comprobar el modo de unión, realizaron una serie de modificaciones estructurales sobre el compuesto **26** y sometieron a un estudio SAR a los compuestos resultantes. Este último estudio SAR les llevo

al compuesto **27** que resultó ser un inhibidor muy potente y selectivo de NIK frente a 98 quinasas en un estudio KinomeSCAN (figura 29).

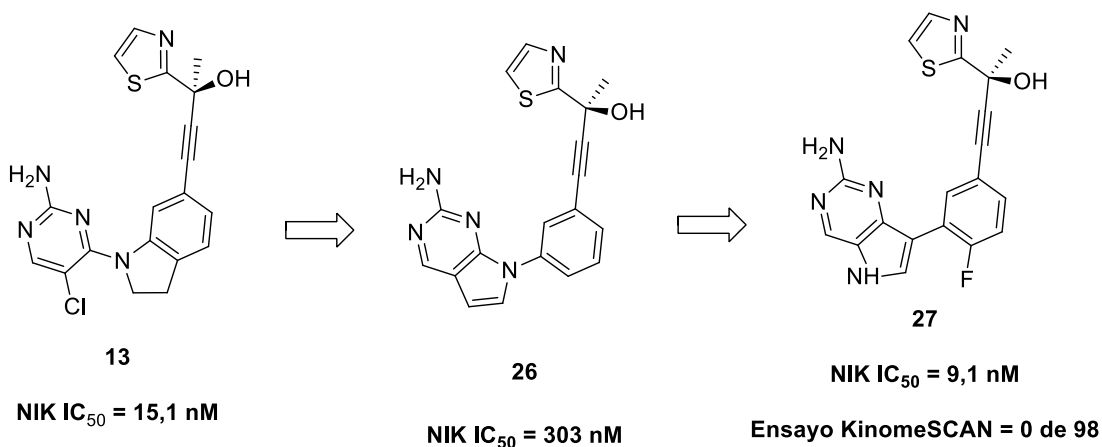
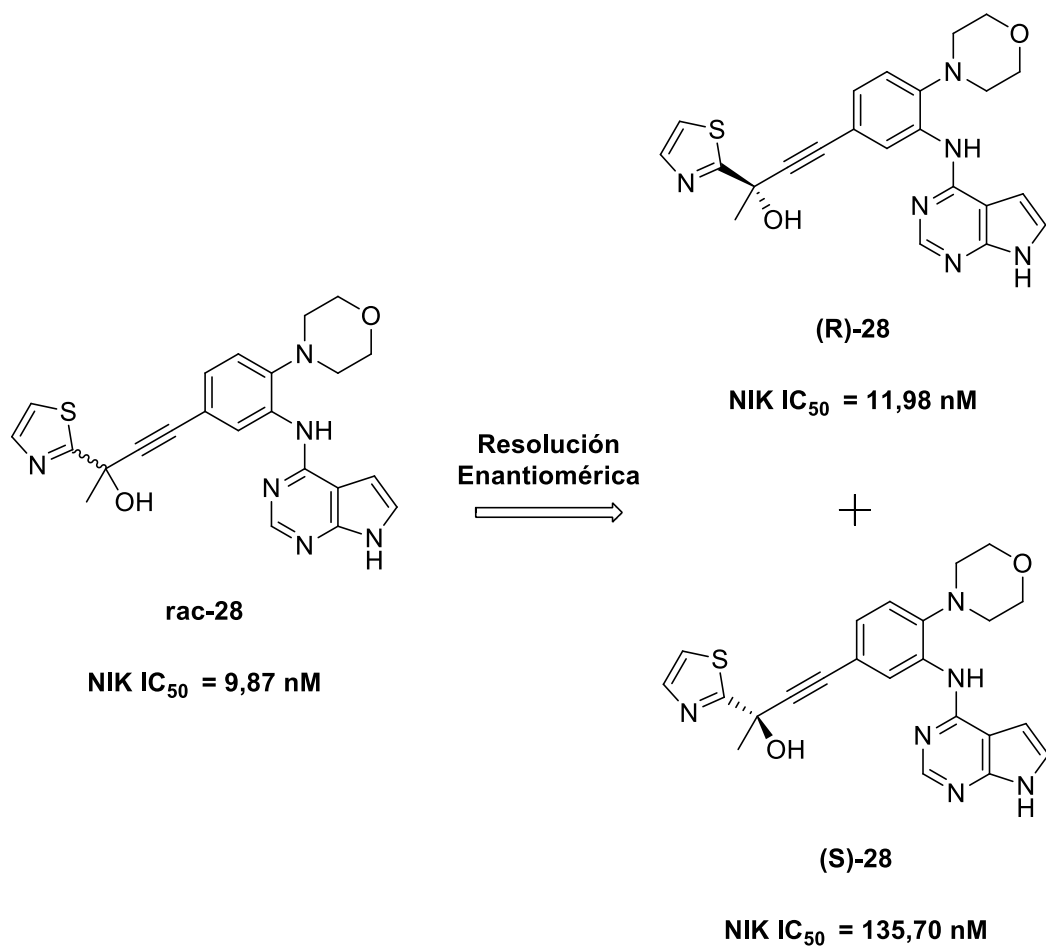


Figura 29

Además **27** mostró una gran actividad anti-inflamatoria, tanto *in vivo* como *in vitro*, dado que disminuía en gran medida el nivel de ARNm que codificaba para citoquinas pro-inflamatorias como TNF $\alpha$ .

El trabajo más reciente corresponde a Zhu, publicado en junio de 2020.<sup>38</sup> Este estudio se basa también en el modo de unión del compuesto **13**, descubierto por Amgen. A partir de dicha estructura y gracias al uso de docking molecular y posteriores estudios SAR se llegó a la conclusión de que los compuestos del tipo N-fenil-7H-pirrolo [2,3-d]-pirimidin-4-amina son inhibidores de NIK. El principal exponente de esta familia fue el compuesto **28**, que resultó ser un lead muy prometedor debido a su notable IC<sub>50</sub> y su selectividad sobre 298 quinasas (figura 30).



**Figura 30**

Como podemos ver en la figura anterior el compuesto racémico posee una mayor capacidad de inhibición que sus enantiómeros por separado. Este hecho, infrecuente, sigue en estudio, pero se cree que es debido a que los dos enantiómeros actúan por mecanismo diferentes.

## 7. Conclusiones.

Son varias las conclusiones importantes que se pueden extraer de este trabajo.

- La primera es que desde 2009 hasta la fecha se han hecho grandes esfuerzos en el desarrollo de inhibidores de NIK, siendo variados los enfoques que se han seguido para lograrlo.
- La segunda es que el desarrollo de este campo ha ido ligado a los avances en el conocimiento de NIK, siendo varios los acontecimientos que han contribuido a ello. Se puede destacar la obtención de la estructura cristalina del dominio catalítico de NIK, la cual reveló el bolsillo trasero y con él la posibilidad de expandir el epítopo de la proteína. Esto desembocó en el desarrollo de una serie de inhibidores significativamente más potentes que los que no entraban en ese bolsillo.
- También se puede concluir que aunque haya habido variedad de enfoques en el descubrimiento de inhibidores, todos ellos han acabado desembocando en una diana común. Esto ha acabado originando no solo que los inhibidores de NIK tenga una notable similitud estructural, sino que la mayoría sean conceptualmente idénticos.
- Para el descubrimiento de inhibidores novedosos debe producirse un nuevo enfoque estratégico como, por ejemplo, el que supuso el descubrimiento del bolsillo trasero. Una posibilidad podría ser este cambio el descubrimiento de un sitio de inhibición alostérico en NIK que permitiera el desarrollo inhibidores estructuralmente diferentes.

## 8. Bibliografía.

- (1) Escárcega, R. O. El factor de transcripción nuclear kappa en las enfermedades humanas [The transcription factor NF-kappaB in human diseases]. *Rev. Méd. IMSS*. **2010**, *48*, 55–60. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=36871>
- (2) McGarty, Terrence. IL-6, COVID-19, Cytokine Storms and Galen. **2020**, doi:10.13140/RG.2.2.18445.90087.
- (3) Sen, R.; Baltimore, D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*. **1986**, *46*, 705-716. doi:10.1016/0092-8674(86)90346-6
- (4) Baltimore, D. Discovering NF- B. *CSH Perspect. Biol*. **2009**, *1*, a000026–a000026. doi:10.1101/cshperspect.a000026
- (5) Wikipedia la enciclopedia libre. [https://es.wikipedia.org/wiki/Factor\\_de\\_transcripci%C3%B3n](https://es.wikipedia.org/wiki/Factor_de_transcripci%C3%B3n) (accedió Jun 1, **2020**)
- (6) Liu, J.; Sudom, A.; Min, X.; Cao, Z.; Gao, X.; Ayres, M.; Lee, F.; Cao, P.; Johnstone, S.; Plotnikova, O.; Walker, N.; Chen, G.; & Wang, Z. Structure of the nuclear factor κB-inducing kinase (NIK) kinase domain reveals a constitutively active conformation. *J. Biol. Chem*. **2012**, *287*, 27326–27334. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.366658>
- (7) Herrington, F. D.; Carmody, R. J.; & Goodyear, C. S. Modulation of NF-κB Signaling as a Therapeutic Target in Autoimmunity. *J. Biomol. Screen*. **2016**, *21*, 223–242. doi:10.1177/1087057115617456
- (8) Shih, V. F.; Tsui, R.; Caldwell, A.; & Hoffmann, A. A single NFκB system for both canonical and non-canonical signaling. *Cell Res*. **2011**, *21*, 86–102. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.161>
- (9) Khongthong, P.; Roseweir, A.; & Edwards, J. The NF-KB pathway and endocrine therapy resistance in breast cancer, *Endocr-Relat. Cancer*. **2019**, *26*, R369-R380. Retrieved Jun 23, 2020, from <https://erc.bioscientifica.com/view/journals/erc/26/6/ERC-19-0087.xml>
- (10) Thu, Y. M.; & Richmond, A. NF-κB inducing kinase: a key regulator in the immune system and in cancer. *Cytokine Growth F. R*. **2010**, *21*, 213–226. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2010.06.002>
- (11) Malinin, N.L.; Boldin, M.P.; Kovalenko, A.V.; Wallach, D. MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature*. **1997**; *385*, 540-544. doi:10.1038/385540a0
- (12) Image of PDB ID: 4IDT (Liu, J.; Sudom, A.; Wang, Z. (2012) Crystal Structure of NIK with 11-bromo-5,6,7,8-tetrahydropyrimido[4',5':3,4]cyclohepta[1,2-b]indol-



2-amine (T28) at 2.4Å resolution *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23: 1238-1244) created with Pymol

(13) de Leon-Boenig, G.; Bowman, K. K.; Feng, J. A.; Crawford, T.; Everett, C.; Franke, Y.; Oh, A.; Stanley, M.; Staben, S. T.; Starovasnik, M. A.; Wallweber, H. J.; Wu, J.; Wu, L. C.; Johnson, A. R.; & Hymowitz, S. G. The crystal structure of the catalytic domain of the NF-κB inducing kinase reveals a narrow but flexible active site. *Structure*. **2012**, 20, 1704–1714.

<https://doi.org/10.1016/j.str.2012.07.013>

(14) Image of PDB ID: 5T8P (Smith, M.A.; McEwan, P.A. (**2017**) Crystal structure of murine NF-kappaB inducing kinase (NIK) bound to benzoxepin compound 2 at 2.32Å resolution *J. Med. Chem.* 60: 627-640) created with Pymol

(15) Valiño-Rivas, L.; Vaquero, J. J.; Sucunza, D.; Gutierrez, S.; Sanz, A. B.; Fresno, M.; Ortiz, A.; & Sanchez-Niño, M. D. NIK as a Druggable Mediator of Tissue Injury. *Trends. Mol. Med.* **2019**, 25 4, 341–360.

<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2019.02.005>

(16) Flohr, S.; Naumann, T.; Pyrazoloisoquinoline Derivatives For Inhibiting Nfkb-Inducing Kinase. U.S. Patent 6,841,556, Jan 11, **2005**.

<https://patents.google.com/patent/US6841556>

(17) Mortier, J.; Frederick, R.; Ganef, C.; Remouchamps, C.; Talaga, P.; Pochet, L.; Wouters, J.; Piette, J.; Dejardin, E.; & Masereel, B. Pyrazolo[4,3-c]isoquinolines as potential inhibitors of NF-kappaB activation. *Biochem. pharmacol.* **2010**, 79 10, 1462–1472. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.01.007>

(18) Chen, G.; Cushing, T.D.; Fisher, B.; He, X.; Li, K.; Li, Z.; Mcgee, L.R.; Pattaropong, V.; Faulder, P.; Seganish, J.L.; Shin, Y. Alkynyl Alcohols as kinase Inhibitors. W.O. Patent 2009158011A1, Dec 30, **2009**.

<https://patents.google.com/patent/WO2009158011A1/en>

(19) Ruegg, U.T.; Burgess, G.M.; Staurosporine, K-252 and UCN-01: potent but nonspecific inhibitors of protein kinases. *Trends. Pharmacol. Sci.* **1989**, 10 6,218– 220. doi: 10.1016/0165-6147(89)90263-0

(20) Ghose, A.K.; Herbertz, T.; Pippin, D.A.; Salvino, J.M.; Mallamo, J.P.; Knowledge based prediction of ligand binding modes and rational inhibitor design for kinase drug discovery. *J. Med. Chem.* **2008**; 51 17, 5149–5171.

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm800475y>

(21) Image of PDB ID: 2HY8 (Schulze-Gahmen, U.; Lu, H. (**2017**) PAK1 complex with ST2001 at 2.0Å resolution) created with Pymol

(22) Mortier, J.; Masereel, B.; Remouchamps, C.; Ganef, C.; Piette, J.; & frederick, R. NF-κB inducing kinase (NIK) inhibitors: Identification of new scaffolds using virtual screening. *Bioor. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20 15, 4515–4520. doi:10.1016/j.bmcl.2010.06.027

(23) Li, K.; McGee, L. R.; Fisher, B.; Sudom, A.; Liu, J.; Rubenstein, S. M.; ... Wang, Z. Inhibiting NF- $\kappa$ B-inducing kinase (NIK): Discovery, structure-based design, synthesis, structure–activity relationship, and co-crystal structures. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23* 5, 1238–1244. doi:10.1016/j.bmcl.2013.01.012

(24) Demchenko, Y. N.; Brents, L. A.; Li, Z.; Bergsagel, L. P.; McGee, L. R.; & Kuehl, M. W. Novel inhibitors are cytotoxic for myeloma cells with NF $\kappa$ B inducing kinase-dependent activation of NF $\kappa$ B. *Oncotarget.* **2014**, *5* 12, 4554–4566. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2128>

(25) Takeda, T.; Tsubaki, M.; Kino, T.; Yamagishi, M.; Iida, M.; Itoh, T.; Imano, M.; Tanabe, G.; Muraoka, O.; Satou, T.; & Nishida, S. Mangiferin induces apoptosis in multiple myeloma cell lines by suppressing the activation of nuclear factor kappa B-inducing kinase. *Chem-biol. Interact.* **2016**, *251*, 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.03.018>

(26) Shoji, K.; Tsubaki, M.; Yamazoe, Y.; Satou, T.; Itoh, T.; Kidera, Y.; Tanimori, Y.; Yanae, M.; Matsuda, H.; Taga, A.; Nakamura, H.; & Nishida, S. Mangiferin induces apoptosis by suppressing Bcl-xL and XIAP expressions and nuclear entry of NF- $\kappa$ B in HL-60 cells. *Arch Pharm Res.* **2011**, *34* 3, 469–475. <https://doi.org/10.1007/s12272-011-0316-8>

(27) Ghosh, S.; & Karin, M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell.* **2002**, *109* Suppl, S81–S96. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00703-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00703-1)

(28) Takeda, T.; Tsubaki, M.; Sakamoto, K.; Ichimura, E.; Enomoto, A.; Suzuki, Y.; ... Nishida, S. Mangiferin, a novel nuclear factor kappa B-inducing kinase inhibitor, suppresses metastasis and tumor growth in a mouse metastatic melanoma model. *Toxicol. Appl. Pharm.* **2016**, *306*, 105–112. doi:10.1016/j.taap.2016.07.005

(29) Passeron, T.; Benhida, R.; Dao, P.; De Donatis, G.M.; Martin, A. 4-Anilino-Quinoline Compounds as Anti-Cancer Agents. W.O. Patent WO 2018/007648A1, Jan 11, **2018**.

<https://patents.google.com/patent/WO2018007648A1/en?q=WO+2018%2f007648A1>

(30) Stansfield, I.; Querolle, O. A. G.; Poncelet, V.S.; Gross, G. M.; Jacoby, E.; Meerpoel, L.; Green, S. R.; Kulagowski, J. J.; Macleod, C.; Mann, S. E.; Hynd, G. New Substituted Cyanindoline Derivatives as NIK Inhibitors. W.O. Patent WO 2017/125530A1, Jul 27, **2017**.

<https://patents.google.com/patent/WO2017125530A1/en11>

(31) Castanedo, G. M.; Blaquiere, N.; Beresini, M.; Bravo, B.; Brightbill, H.; Chen, J.; ... Staben, S. T. Structure-Based Design of Tricyclic NF- $\kappa$ B Inducing Kinase (NIK) Inhibitors That Have High Selectivity over Phosphoinositide-3-kinase (PI3K). *J. Med. Chem.* **2017**, *60* 2, 627–640. doi:10.1021/acs.jmedchem.6b01363

(32) Blaquiere, N.; Burch, J.; Castanedo, G.; Feng, J. A.; Hu, B.; Staben, S.; Wu, G.; Yuen, P. Alkynyl Alcohols and Methods of Use. W.O. Patent WO 2015/025025A1, Feb 26, **2015**.

<https://patents.google.com/patent/WO2015025025A1/en?q=WO+2015025025A1>

(33) Blaquiere, N.; Castanedo, G. M.; Burch, J. D.; Berezhkovskiy, L. M.; Brightbill, H.; Brown, S.; Chan, C.; Chiang, P. C.; Crawford, J. J.; Dong, T.; Fan, P.; Feng, J.; Ghilardi, N.; Godemann, R.; Gogol, E.; Grabbe, A.; Hole, A. J.; Hu, B.; Hymowitz, S. G.; Alaoui Ismaili, M. H.; ... Staben, S. T. Scaffold-Hopping Approach To Discover Potent, Selective, and Efficacious Inhibitors of NF- $\kappa$ B Inducing Kinase. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* 15, 6801–6813.

<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00678>

(34) Pippione, A. C.; Sainas, S.; Federico, A.; Lupino, E.; Piccinini, M.; Kubbutat, M.; ... Lolli, M. L. N-Acetyl-3-aminopyrazoles block the non-canonical NF- $\kappa$ B cascade by selectively inhibiting NIK. *MedChemComm.* **2018**, *9* 6, 963–968. doi:10.1039/c8md00068a

(35) Cheng, G.; Mei, X.; Yan, Y.; Chen, J.; Zhang, B.; Li, J.; ... Zhou, Y. Identification of new NIK inhibitors by discriminatory analysis-based molecular docking and biological evaluation. *Arch. Pharm.* **2019**, *352* 7 e1800374. doi:10.1002/ardp.201800374

(36) Ye, Q.; Li, Q.; Gao, A.; Ying, H.; Cheng, G.; Chen, J.; ... Zhou, Y. Discovery of Novel Indoleaminopyrimidine NIK Inhibitors based on Molecular Docking-based Support Vector Regression (SVR) Model. *Chem. Phys. Lett.* **2019**, *718*, 38-45. doi:10.1016/j.cplett.2019.01.031

(37) Li, Z.; Li, X.; Su, M. B.; Gao, L. X.; Zhou, Y. B.; Yuan, B.; Lyu, X.; Yan, Z.; Hu, C.; Zhang, H.; Luo, C.; Chen, Z.; Li, J.; & Zhao, Y. Discovery of a Potent and Selective NF- $\kappa$ B-Inducing Kinase (NIK) Inhibitor That Has Anti-inflammatory Effects in Vitro and in Vivo. *J. Med. Chem.* **2020**, *63* 8, 4388–4407.

<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00396>

(38) Zhu, Y.; Ma, Y.; Zu, W.; Song, J.; Wang, H.; Zhong, Y.; Li, H.; Zhang, Y.; Gao, Q.; Kong, B.; Xu, J.; Jiang, F.; Wang, X.; Li, S.; Liu, C.; Liu, H.; Lu, T.; & Chen, Y. Identification of N-Phenyl-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-amine Derivatives as Novel, Potent, and Selective NF- $\kappa$ B Inducing Kinase (NIK) Inhibitors for the Treatment of Psoriasis. *J. Med. Chem.* **2020**, 10.1021/acs.jmedchem.0c00055. Advance online publication.

<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00055>