



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

“SÍNTESIS MEJORADA DEL MELFALÁN”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO

PRESENTA :

DIEGO ALEMÁN PONCE DE LEÓN





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor José Manuel Méndez Stivalet

VOCAL: Profesor: Ana Adela Sánchez Mendonza

SECRETARIO: Profesor: Marcos Martínez García

1er. SUPLENTE: Profesor: José Federico del Rio Portilla

2° SUPLENTE: Profesor: Claudia Inés Rivera Cardenas

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 6-C Departamento de Química Orgánica, Instituto de Química, UNAM

ASESOR

Dr. Marcos Martínez García

SUSTENTANTE

Diego Alemán Ponce de León

Contenido

LISTA DE ABREVIATURAS.....	I
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1. Mostazas Nitrogenadas.....	5
2.2. Ácido (2S)-2-amino-3-{4-[bis(2-cloroetil)amino]fenil}propanoico (Melfalán)..	7
2.3. Síntesis del melfalán.....	10
2.4. Derivados del melfalán.....	14
2.5. Aplicaciones farmacéuticas del melfalán.....	20
2.5.1. Mieloma múltiple.....	20
2.5.2. Cáncer de ovarios.....	21
3. OBJETIVOS.....	24
3.1. Objetivo general.....	25
3.2. Objetivos particulares.....	25
4. EQUIPOS Y REACTIVOS.....	26
4.1. Equipos.....	27
4.2. Reactivos y disolventes.....	28
5. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	29
5.1. Síntesis del (2S)-2-amino-3-(4-nitrofenil)propanoato de <i>p</i> -toluensulfonilo...30	
5.2. Síntesis del (2S)-2-diacetamido-3-(4-nitrofenil)propanoato de <i>p</i> -toluensulfonilo.....	31
5.3. Síntesis del (2S)-2-diacetamido-3-(4-aminofenil)propanoato de <i>p</i> -toluensulfonilo.....	32
5.4. Síntesis del (2S)-2-acetamido-3-{4-[bis(2-cloroetil)amino]fenil}propanoato de <i>p</i> -toluensulfonilo.....	33
5.5. Síntesis del Ácido (2S)-2-amino-3-{4-[bis(2-cloroetil)amino]fenil}propanoico.....	34
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	35
6.1. (1) (2S)-2-amino-3-(4-nitrofenil)propanoato de <i>p</i> -toluensulfonilo.....	36
6.2. (2) (2S)-2-diacetamido-3-(4-nitrofenil)propanoato de <i>p</i> -toluensulfonilo	39
6.3. (3) (2S)-2-diacetamido-3-(4-aminofenil)propanoato de <i>p</i> -toluensulfonilo...42	

6.4.	(4) (2 <i>S</i>)-2-acetamido-3-{4-[bis(2-cloroetil)amino]fenil}propanoato de <i>p</i> -toluensulfonilo.....	46
6.5.	(5) Ácido (2 <i>S</i>)-2-amino-3-{4-[bis(2-cloroetil)amino]fenil}propanoico.....	51
7.	CONCLUSIONES.....	56
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	58
9.	ANEXO.....	62

Lista de abreviaturas

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ARN: Ácido Ribonucleico

Ar: Aromático

CD₃OD: Metanol deuterado

CH₂Cl₂: Diclorometano

cm⁻¹: Centímetros a la menos 1

d: Señal doble

dd: Señal doble de dobles

ddd: Señal doble de dobles de dobles

DMSO-d₆: Dimetil sulfóxido deuterado

EM: Espectrometría de masas

ESI-*Ms*: Espectrometría de masas por Ionización por Electrospray

EtOH: Etanol

H₂O: Agua

HCl: Ácido clorhídrico

IE: Impacto electrónico

IR: Espectroscopía de infrarrojo

***J*:** Constante de acoplamiento

K₂CO₃: Carbonato de potasio

KBr: Bromuro de potasio

MeOH: Metanol

MHz: Megahertz

Hz: Hertz

***m/z*:** Relación masa/carga

mL: Mililitro

Na: Sodio

Na₂CO₃: Carbonato de sodio

nm: Nanómetro

ppm: Partes por millón

RMN ¹H: Resonancia magnética nuclear de protón

RMN ¹³C: Resonancia magnética nuclear de carbono 13

t: Señal triple

s: Señal simple

UV-Vis: Ultravioleta-visible

°C: Grado Celsius

λ: Longitud de onda

δ_H: Desplazamiento químico de protón en partes por millón

δ_C: Desplazamiento químico de carbón en partes por millón

1. Introducción

1. Introducción

En la actualidad existe una enorme cantidad de enfermedades incurables, de las cuales todas pueden originarse debido a múltiples factores. Entre ellos se pueden mencionar los hereditarios, patógenos, fisiológicos, de transmisión, ambientales, la edad o por la degeneración del ADN. Estos son algunos de los motivos por los que se pueden desarrollar dos tipos de cáncer y que serán fundamentales en este trabajo: El Mieloma Múltiple y el Cáncer de Ovario.

El Mieloma Múltiple (MM) es la segunda neoplasia hematológica en orden de frecuencia, definida por la presencia de células plasmáticas monoclonales con capacidad para producir una paraproteína monoclonal y causar alteraciones clínicas en forma de anemia, insuficiencia renal, hipercalcemia o lesiones óseas, ya que la presencia de anomalías cromosómicas o moleculares es una constante que ha mejorado el conocimiento de su patogenia y del método de diagnóstico. Aun así, el MM sigue siendo una enfermedad incurable en la mayoría de los casos, aunque su pronóstico ha mejorado, cada vez con más series que superan la supervivencia media de 5 años. Esto es debido al cambio terapéutico que muestra indicios sobre la posibilidad de superar al trasplante autólogo, permitiendo un aumento en la supervivencia de los pacientes, debido a una mayor quimiosensibilidad.

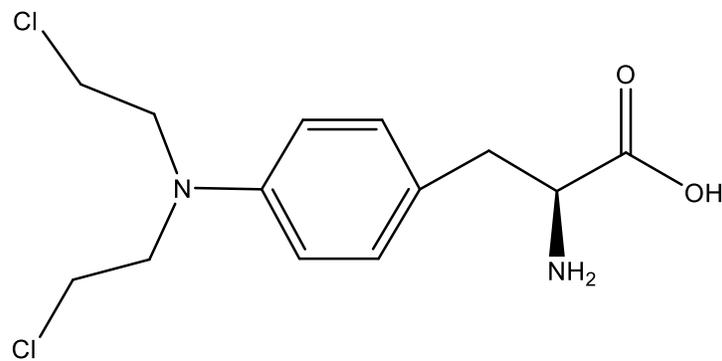
Por otro lado el cáncer de ovario es el séptimo cáncer más común en las mujeres de todo el mundo, representando el 4 % de todos los cánceres que afectan a la mujer y el 20 % de los cánceres genitales. Pero debido a su difícil diagnóstico precoz, el 70 % de los casos se diagnostican en estado avanzado, y es por esta razón que se ha vuelto la quinta causa de muerte de la mujer, por debajo del cáncer de mama.

Uno de los tratamientos más empleados a nivel nacional e internacional para combatir los cánceres de MM y de ovario es la quimioterapia, en la actualidad existen una gran variedad de fármacos quimioterapéuticos

1. Introducción

Entre las familias de estos agentes quimioterapéuticos se encuentran las mostazas nitrogenadas, que son de los fármacos antitumorales más efectivos y eficaces utilizados en la quimioterapia contra el cáncer.

De ellos se destacan dos agentes anticancerígenos empleados actualmente: la mecloretamina también conocida como mostaza nitrogenada y el melfalán (figura 1), ya que se ha demostrado experimentalmente que estos fármacos son citotóxicos al presentar 2 grupos alquilo, que pueden ejercer su actividad farmacológica al formar enlaces cruzados en el surco principal de ADN.



Melfalán.

2. Antecedentes

2. Antecedentes

Los compuestos etil clorados son de gran importancia en la industria, debido a que han encontrado un amplio uso como fármacos quimioterapéuticos, los cuales son derivados de la mostaza nitrogenada, por lo que se les han denominado compuestos mostaza.

2.1. Mostazas Nitrogenadas

El primer compuesto mostaza fue la mostaza sulfurada o también conocida como gas mostaza (Figura 1), sintetizada por el químico Belga, Cesar Mansuète Despretz en 1882. En 1886 el químico Alemán Victor Meyer describió completamente su estructura y más tarde, en la Primera Guerra Mundial, el gas mostaza fue utilizado como un arma química debido a sus efectos tóxicos en plantas, animales y humanos¹.

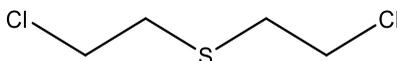


Figura 1. Gas Mostaza.

De igual manera la mostaza nitrogenada (Figura 2) inicialmente fue sintetizada como un arma química pero nunca se empleó de esta manera. Y fue hasta 1942 que se autorizó su estudio bioquímico, descubriendo sus efectos farmacológicos y citotóxicos².

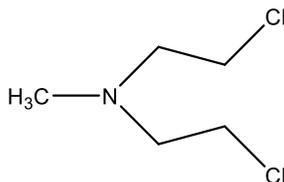


Figura 2. Mostaza Nitrogenada (MN).

Diferentes estudios han demostrado que la mostaza nitrogenada, forma aductos y entrecruzamientos con el ADN, el ARN y las proteínas. Pero también se ha

2. Antecedentes

demostrado que puede dañar el ADN, por lo que en un principio se utilizó para el tratamiento de algunas enfermedades como el cáncer de mama o la leucemia. Además también se han realizado estudios del mecanismo de acción que presentan los grupos alquilos en el ADN³.

De esta manera, el estudio de la mostaza nitrogenada ha sido de gran importancia para el tratamiento de enfermedades como el cáncer de diferentes tipos, por lo que tiempo después, a partir del descubrimiento del mecanismo de acción de la mostaza nitrogenada, se comenzaron a buscar derivados que puedan ser utilizados como quimioterapéuticos contra los diferentes tipos de cáncer que existen y otras enfermedades incurables.

Algunos de los derivados de la mostaza nitrogenada de mayor importancia se presentan en la figura 3, de los cuales en todos ellos se sustituye el metilo de la mostaza nitrogenada por un grupo que le brindará las propiedades específicas para el tipo de cáncer o padecimiento en el que se podría emplear.

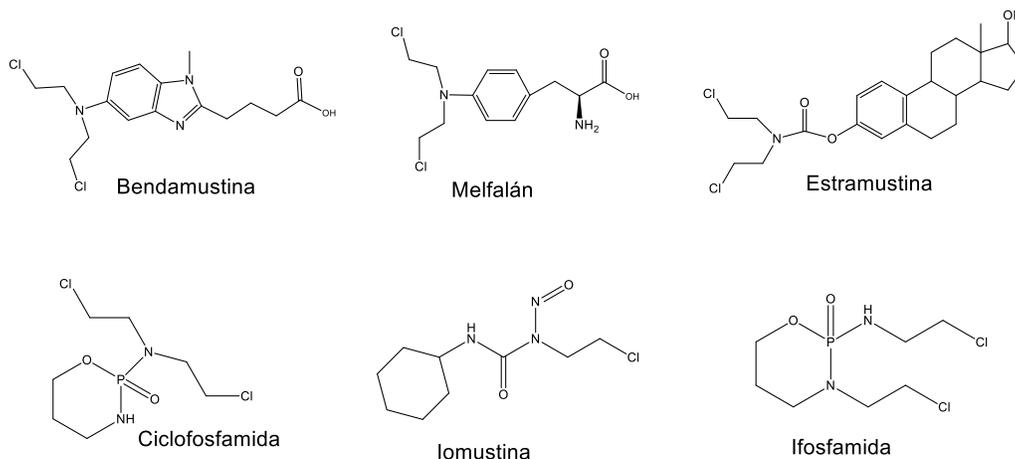


Figura 3. Derivados de la mostaza nitrogenada.

A continuación se muestran algunas de las aplicaciones así como los nombres comerciales de los fármacos previamente presentados:

- Bendamustina: Es utilizado para el tratamiento del cáncer de mama, de leucemia linfocítica crónica, linfomas y otras neoplasias hematológicas linfoides. Sus nombres comerciales son Treanda®, Ribomustin® y Cytostasan.

2. Antecedentes

- Estramustina: Es empleado principalmente para el tratamiento del cáncer de próstata que ha evolucionado o se ha diseminado, además de poder inhibir la producción de hormonas masculinas. Su nombre comercial es Emcyt®.
- Ciclofosfamida: Es utilizado con frecuencia en el tratamiento de linfomas de Burkitt, la enfermedad de Hodgkin, leucemias agudas y crónicas linfoblásticas, leucemia no linfoblásticas, mieloma múltiple, cáncer de mama, ovario, pulmón y sarcoma. Sus nombres comerciales son Citoxa®, Neosar®, Genuxal®, Citofosfana® o Endoxan®.
- Iomustina: Se utiliza en el tratamiento de tumores cerebrales primarios, metastásicos, en la enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, del melanoma, cáncer de pulmón y de colon. Sus nombres comerciales son CeeNU® y CCNU®
- Ifosfamida: Se emplea en el tratamiento de algunas neoplasias malignas como: cáncer de pulmón, testículo, sarcoma óseo, de tejidos blandos, mama, ovario, endometrio, cuello uterino, páncreas, en la enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin e hipernefroma. Su nombre comercial es Ifex®⁴⁻¹⁸.

2.2. Ácido (2S)-2-amino-3-{4-[bis(2-cloroetil)amino]fenil}propanoico (Melfalán)

El melfalán o por su nombre IUPAC Ácido (2S) 2-amino-3-{4-[bis(2-cloroetil)amino]fenil}propanoico fue sintetizado por primera vez en 1952 por Bergel y Stock, a través de la sustitución de L-fenilalanina (Figura 4) por el grupo metilo de la mostaza nitrogenada o conocido comercialmente como Mustargen®. Algunas de las propiedades del melfalán son que prácticamente es insoluble en agua y tiene un pK_{a1} de 2.5, su fórmula molecular es $C_{13}H_{18}N_2O_2Cl_2$ con una masa molecular de 305.20 g/mol, también fue conocida al inicio como sarcolicina o mostaza L-fenilalanina, su isómero D conocido como medfalán, es menos activo contra los tumores de animales y la dosis necesaria para producir el mismo efecto que su isómero L es mucho mayor. A su vez, la mezcla racémica (DL-) es conocida como merfalán o sarcalosina, pero el Dr. Bergsagel D.E. en 1962 descubrió que el isómero L, podía emplearse como un nuevo agente

2. Antecedentes

quimioterapéutico para el tratamiento del mieloma múltiple⁹. Desde entonces ha sido empleado para el tratamiento de muchas otras enfermedades como el cáncer de ovario, cáncer de mama, neuroblastoma, linfoma y leucemia aguda.

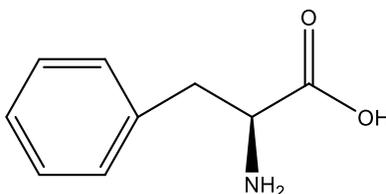
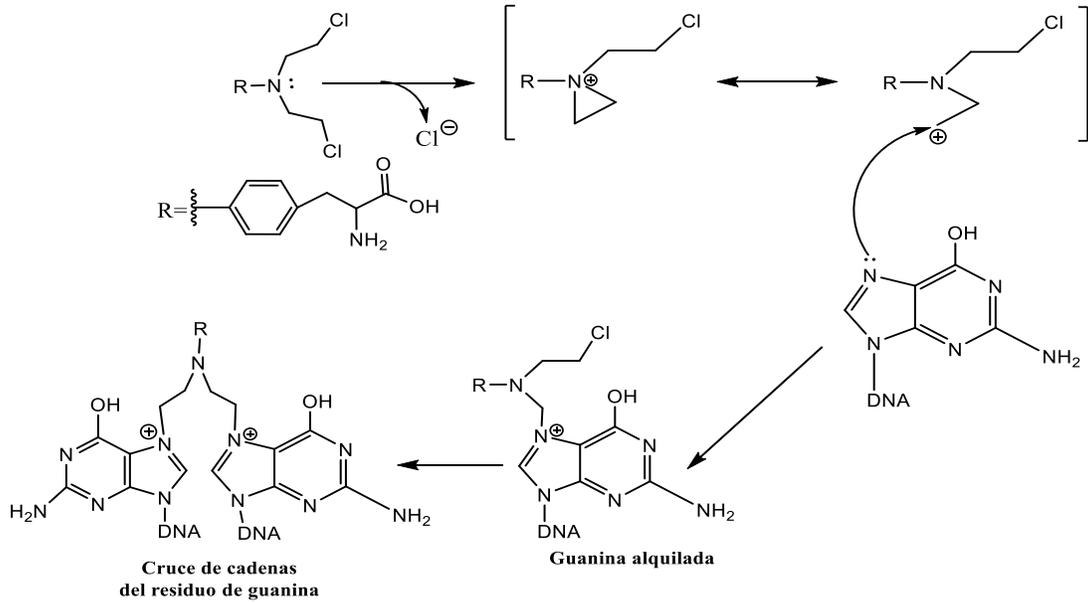


Figura 4. L-fenilalanina.

El melfalán o conocido comercialmente como AKERAN®, es altamente empleado para el tratamiento de las enfermedades previamente mencionadas, así como su estudio químico, debido que éste compuesto presenta una extensa actividad antitumoral, una gran habilidad por erosionar la médula ósea, además de tener una mínima toxicidad extramedular, con fuertes efectos inmunosupresivos y un ciclo celular no específico.

Parte de su mecanismo de acción se debe a que el melfalán es un agente alquilante bifuncional derivado del nitrógeno mostaza, el cual inhibe el ADN y la síntesis del ARN por la formación del entrecruzamiento de las cadenas con el ADN, específicamente el nitrógeno 7 y el oxígeno 6 de la guanina, al ser las posiciones más importantes para la alquilación del ADN (Esquema 1), además de presentar actividad antitumoral y la inhibición de la síntesis de algunas proteínas¹⁰.

2. Antecedentes



Esquema 1. Mecanismo de alquilación de la guanina del ADN¹⁰.

Para que esto se lleve a cabo, el melfalán es introducido a las células por los sistemas de transporte de aminoácidos. Y una vez que se encuentra en el plasma, más del 90% del melfalán es enlazado a las proteínas, para así tener una alta penetración al fluido cerebroespinal y finalmente es eliminado por una hidrólisis química espontánea, en la excreción renal, lo cual puede involucrar la activación de la secreción tubular renal además de la filtración glomerular¹¹.

Por otra parte el tiempo de vida media biológico del melfalán es de aproximadamente 60 min, permitiendo la infusión en las células madre dentro de las 8 horas de haberse administrado vía intravenosa. Su biodisponibilidad disminuye con la repetición de las dosis, así como con la presencia de alimentos, que retrasa el tiempo para alcanzar la concentración plasmática máxima y reducir el área bajo la curva de concentraciones plasmáticas (ABC) en un 39 al 45%¹².

2. Antecedentes

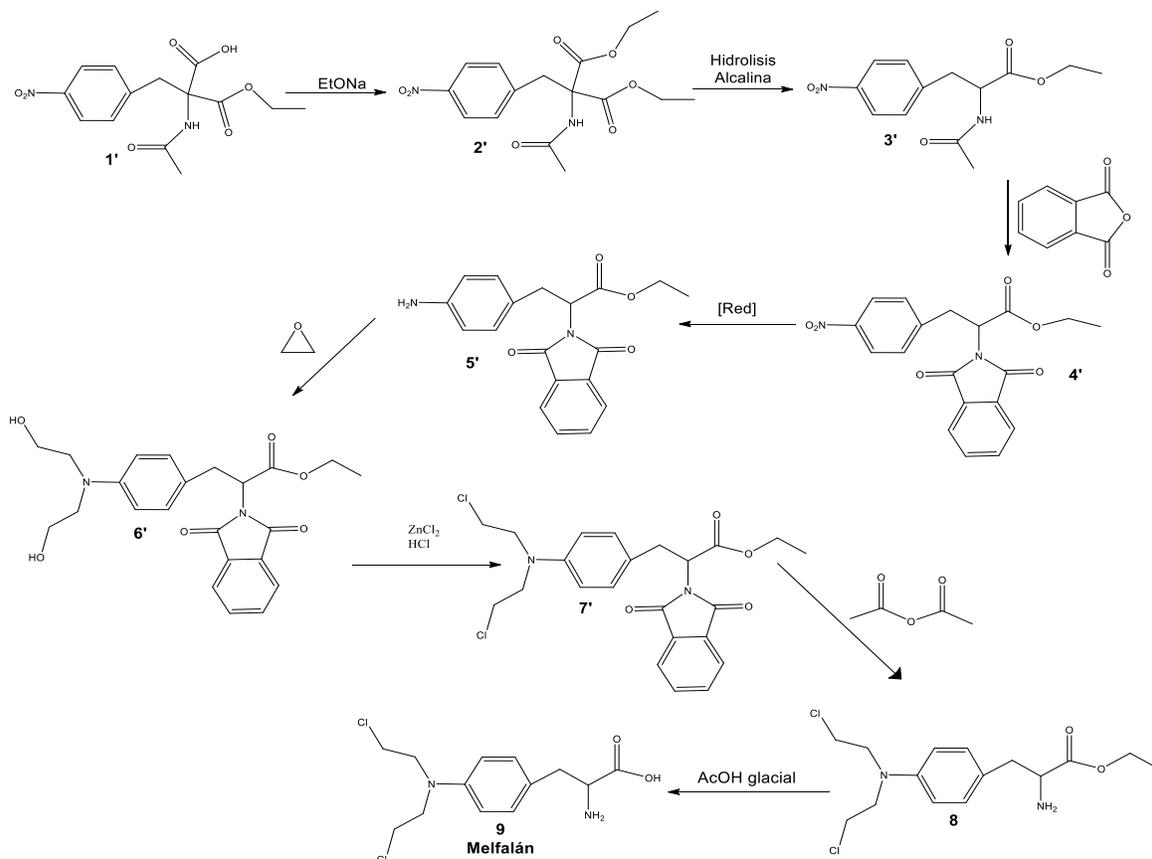
2.3. Síntesis del melfalán

Desde el momento de su descubrimiento se han buscado distintas rutas sintéticas para obtener el melfalán, utilizando como materia prima la L-fenilalanina o el 4-nitro-L-fenilalanina.

Algunas de las rutas sintéticas se muestran a continuación:

- La primera ruta sintética fue reportada por F. Bergel y J. A. Stock en 1952¹³, esquema 2. En esta síntesis se utiliza como materia prima el ácido 2-acetamido-2-carboxietil-2-(4-nitrobencil)propanoico (compuesto **1'**) que se hace reaccionar con etóxido de sodio para la obtener al malonato de L-fenilalanina (compuesto **2'**), el cual mediante una hidrólisis alcalina se descarboxiló, obteniendo el compuesto **3'**. Después de proteger el grupo amina con anhídrido ftálico (compuesto **4'**), se llevó a cabo la reducción del grupo nitro, obteniendo el compuesto **5'**, el cual se hizo reaccionar con óxido de etileno para formar el compuesto **6'** y después con cloruro de zinc y ácido clorhídrico se halogenó (compuesto **7'**), para finalmente hidrolizarlo en dos pasos, usando anhídrido acético (compuesto **8'**) y ácido acético glacial para obtener el melfalán **9'**¹⁴.

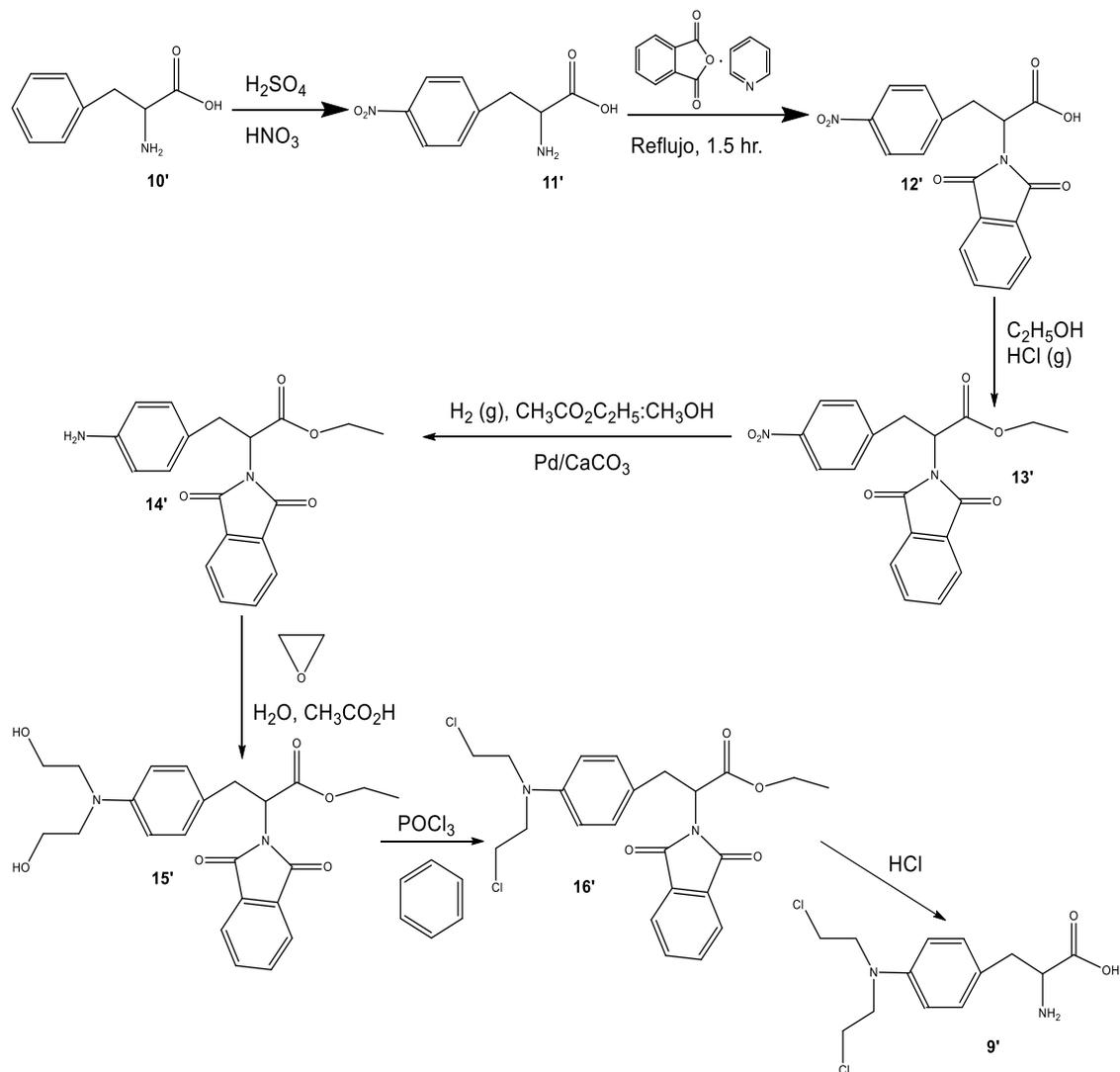
2. Antecedentes



Esquema 2. Primera síntesis reportada del melfalán¹⁴.

- En el año 2007, utilizando como materia prima la L-fenilalanina se describió la síntesis del melfalán en 7 pasos sintéticos esquema 3¹². La L-fenilalanina **10'** se hace reaccionar con ácido sulfúrico y ácido nítrico, obteniendo el compuesto nitrado en la posición 4 (compuesto **11'**). Posteriormente utilizando anhídrido ftálico en piridina, se protegió el grupo amino (compuesto **12'**) y luego mediante una esterificación con etanol y ácido clorhídrico gaseoso se protegió el grupo carboxilo, (compuesto **13'**), cuyo producto se redujo, bajo una atmósfera de hidrógeno en acetato de etilo/metanol y carbonato de calcio sobre paladio, obteniendo al compuesto **14'**. Éste se trató con ácido acético glacial y óxido de etileno para obtener el compuesto **15'** y después halogenarlo con cloruro de fosforilo en benceno (compuesto **16'**), para finalmente obtener el melfalán **9'** al hidrolizarlo con ácido clorhídrico concentrado¹⁰.

2. Antecedentes

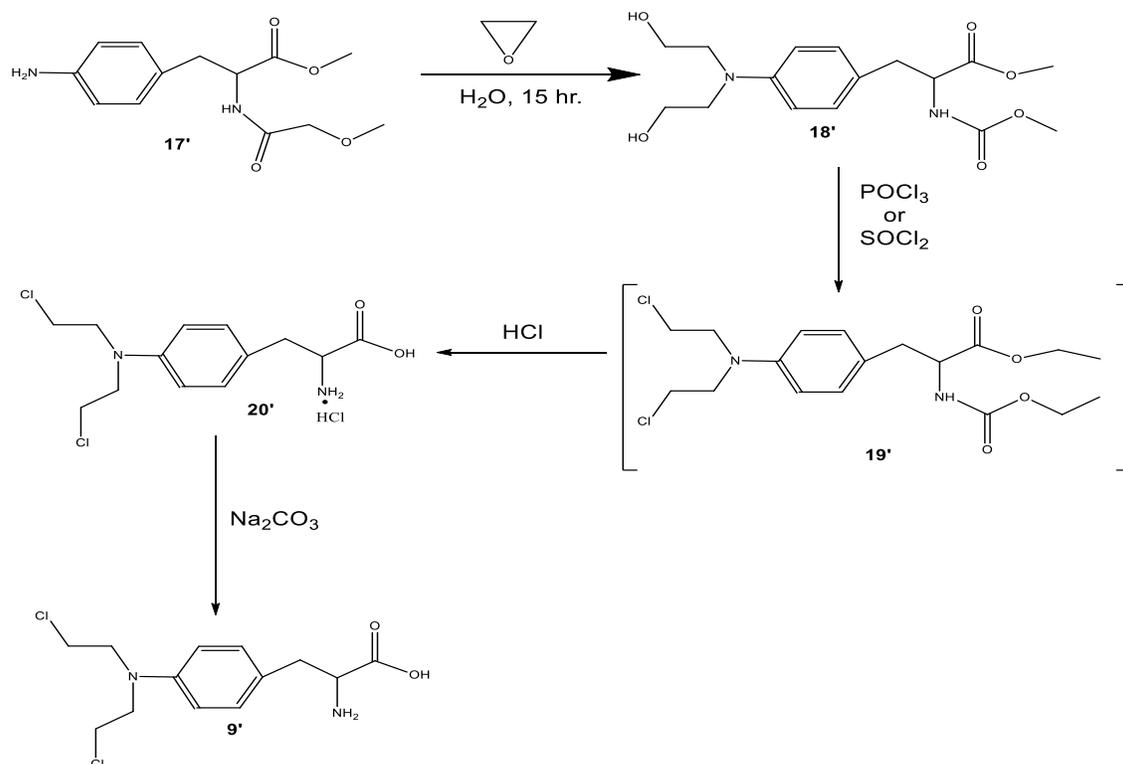


Esquema 3. Síntesis del Mefalán con L-fenilalanina¹⁰.

- Una de las síntesis para **9'**, patentada por Estados Unidos el 21 de enero de 2016, con No. de Publicación: US 2016/0016889 A1, partió del (S) 3-(4-aminofenil)-2-(etoxi-carbonilamino)propanoato de metilo (compuesto **17'**) en 4 pasos sintéticos, esquema 4.

Inicialmente se hace reaccionar el compuesto **17'** con óxido de etileno en agua para obtener el compuesto **18'**, para después halogenarlo con cloruro de fosforilo (compuesto **19'**) y sin aislarlo se llevó a cabo la hidrólisis en ácido clorhídrico, obteniendo el compuesto **20'**, que al tratarse con bicarbonato de sodio se obtuvo el mefalán **9'**¹⁵.

2. Antecedentes



Esquema 4. Patente para la síntesis del Melfalán¹⁵.

Con base en lo anterior, debido a los distintos factores que existen para la síntesis del melfalán entre otros, los precios tienen algunas variaciones, las que se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Precio comercial del melfalán

Producto	Droga	Presentación	Laboratorio	Precio
Akerana	melfalán	2mg Comp. x 25	Techsphere	\$ 1646.12
Eriolan	melfalán	Liof. 50mg Ir	Eriochem	\$ 6137.68
Melfalán Varifarma	melfalán	Liof. 50mg Iny. F. Amp.	Varifarma	\$ 2475.00
Melfoma 2	melfalán	2mg Comp. x 25	Dosa	\$ 1098.89
Melfoma 2	melfalán	2mg Comp. x 50	Dosa	\$ 2049.70
Melfoma 5	melfalán	5mg Comp. x 25	Dosa	\$ 1225.70
Melfoma 5	melfalán	5mg Comp. x 50	Dosa	\$ 2451.40
Melfoma 50	melfalán	50mg Iny. F. Amp. x 1	Dosa	\$ 7175.80

2. Antecedentes

2.4. Derivados del melfalán

A partir de los estudios citotóxicos que le han hecho al melfalán, se han hecho modificaciones del fármaco obteniendo una gran cantidad de derivados, con el objetivo de aumentar la actividad antitumoral, disminuir su toxicidad, su costo, y de esta manera poder aplicarlo en el tratamiento de otras enfermedades neoplásicas.

Algunos de estos compuestos derivados del melfalán:

- Como se puede observar en la Figura 5 las principales modificaciones se han realizado en el grupo ácido del melfalán.

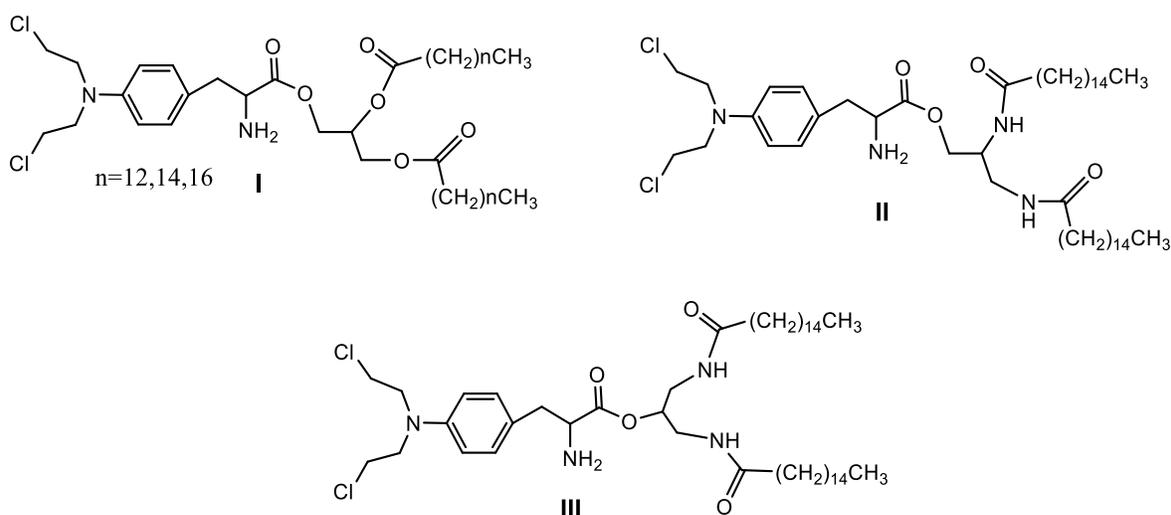
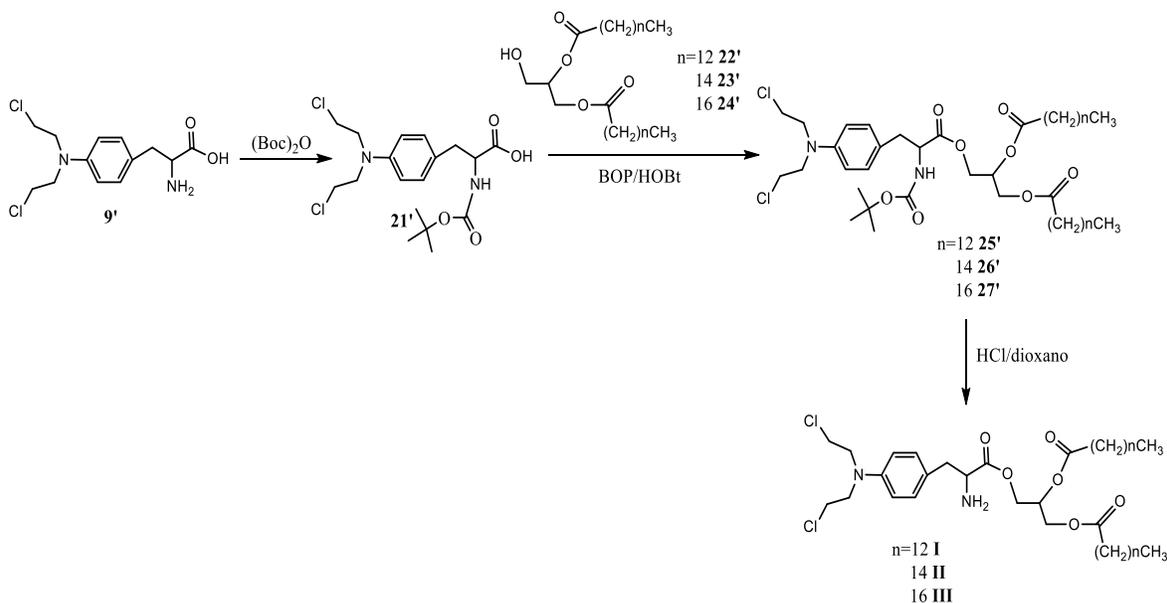


Figura 5. Posibles agentes neoplásicos¹⁶.

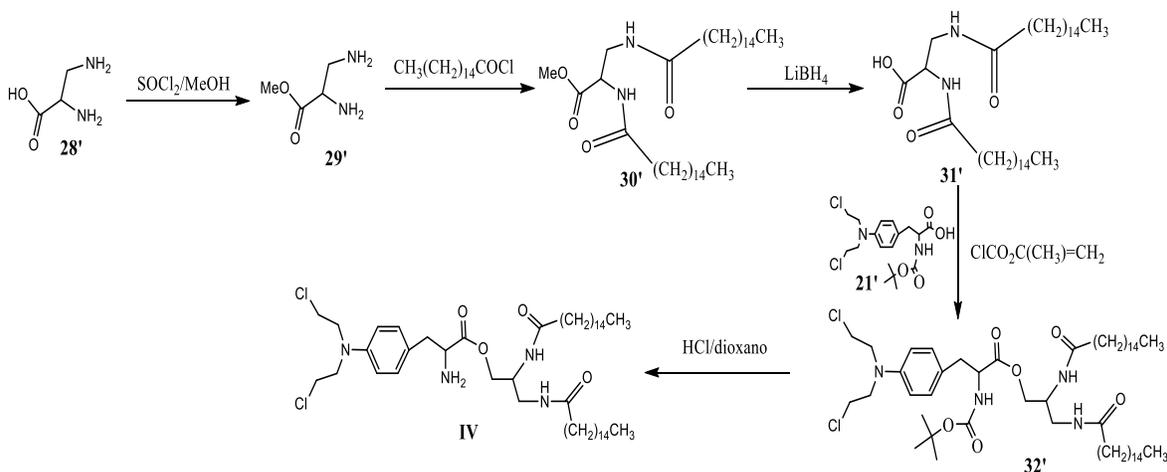
Los derivados I-III fueron sintetizados a partir del melfalán 9' con Diterbutildicarbonato ((Boc)₂O), con la obtención del producto 21' N-terbutoxicarbonilo, posteriormente se hizo reaccionar con hexafluoruro de (benzotriazol-1-iloxi)-tris(dimetilamino)fosfonio (BOP) y los respectivos alcoholes racémicos primarios 22'-24' con la obtención de los productos 25'-27', para finalmente realizar la desprotección del grupo amino de cada uno, al tratarlo con ácido clorhídrico en dioxano, proporcionando los respectivos diastereoisómeros I-III, esquema 5.

2. Antecedentes



Esquema 5. Síntesis de los derivados I-III¹⁶.

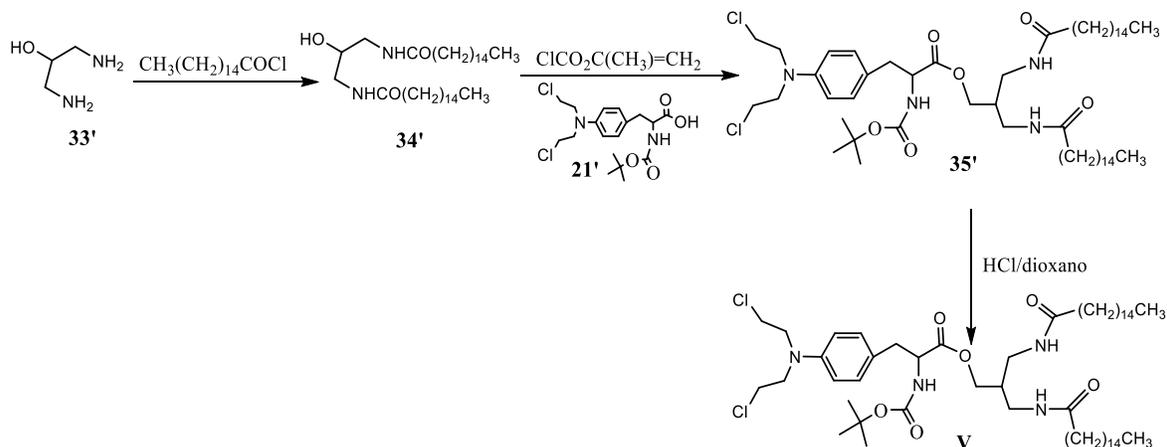
Para el caso del derivado **IV** (Esquema 6) se partió de la mezcla racémica del ácido 2,3-diaminopropanoico **28'**, que bajo condiciones de cloruro de tionilo/metanol se obtuvo el producto **29'**, el cual se reaccionó con cloruro de palmítico en presencia de trietilamina (producto **30'**), reduciéndolo con borohidruro de litio, cuyo producto **31'** se hace reaccionar con el producto **21'** y cloroformiato de isopropilo en presencia 4-dimetilaminopiridina (DMAP) para llevar a cabo la protección del grupo aminoácido (producto **32'**), para finalmente usar ácido clorhídrico en dioxano para obtener el derivado **IV**.



Esquema 6. Síntesis del derivado IV¹⁶.

2. Antecedentes

Mientras que para el caso del derivado **V**, se sintetizó desde el 1,3-diamino-2-ol **33'**, con cloruro de palmitoilo en presencia de trietilamina para obtener el producto **34'** y posteriormente se llevan a cabo las mismas reacciones que se describieron anteriormente para los productos **21'** y **31'** con la formación del producto **35'**, para la obtención del derivado **V** (Esquema 7).



Esquema 7. Síntesis del derivado **V**¹⁶.

Estos compuestos presentan algunas ventajas sobre la actividad biológica que tiene el melfalán, debido a la presencia de diacilgliceroles de cadena larga. Estos les brindarán el potencial para utilizarse como agentes antineoplásicos, con las modificaciones y estudios pertinentes¹⁶.

- Otros compuestos reportados en la bibliografía son mostrados en la figura 6. En donde se puede observar que ahora las modificaciones se realizan en la amina α al carbonilo del melfalán.

2. Antecedentes

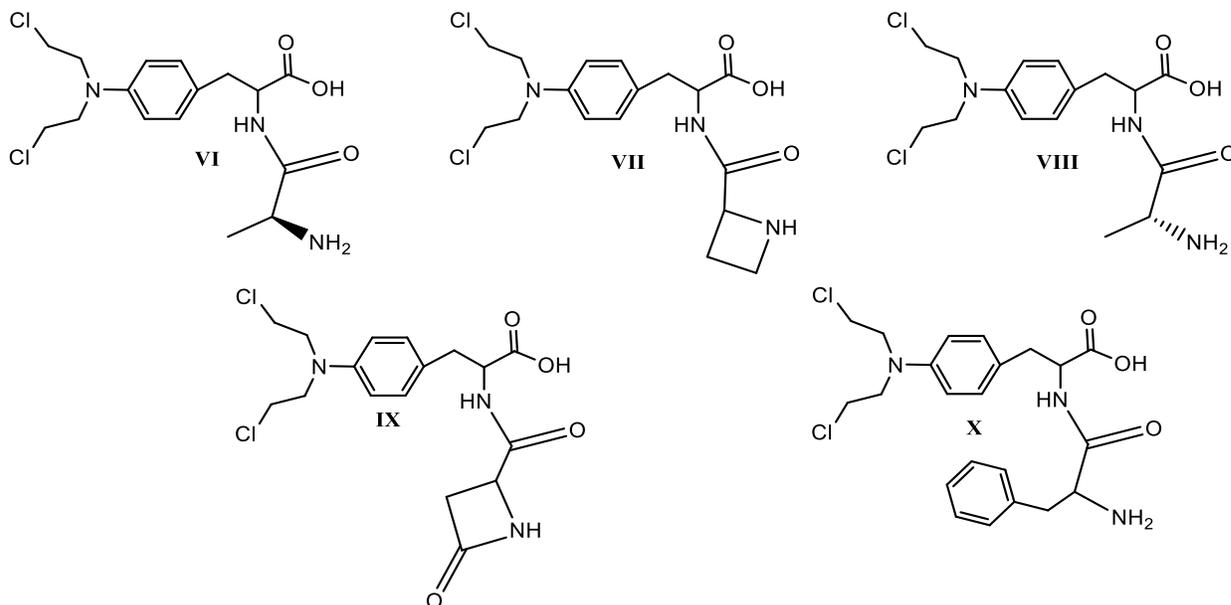
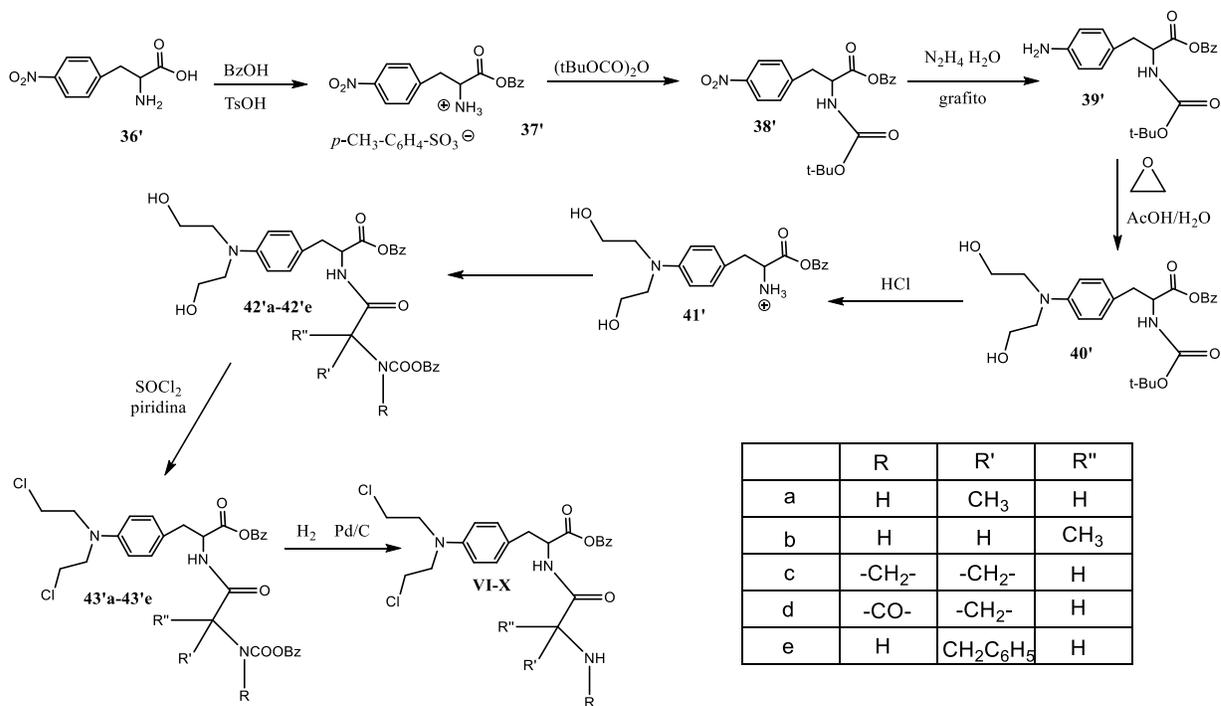


Figura 6. Posibles pro-fármacos para su uso en la terapia farmacológica dirigida a anticuerpos¹⁸.

Estos derivados fueron sintetizados (Esquema 8) a partir de la 4-nitro-L-fenilalanina **36'**, a la cual se protegieron sus grupos carboxílico y amino, por la formación del bencil éster (producto **37'**), utilizando alcohol bencílico y ácido *p*-toluensulfónico y posteriormente se forma derivado N-t-butiloxycarbonilo (producto **38'**), seguido de la reducción del grupo nitro con hidrazina y grafito (producto **39'**), para después introducir las dos cadenas de 2-hidroxietilos, utilizando óxido de etileno en 50 % de ácido acético acuoso (producto **40'**), así mismo se removió el grupo N-t-butiloxycarbonilo, usando HCl 4 M en dioxano, obteniendo el producto **41'**, el cual se hace reaccionar con N-benciloxycarbonil-L-alanina, N-benciloxycarbonil-L-prolina, N-benciloxycarbonil-D-alanina, N-benciloxycarbonil-L-alanina, ácido N-benciloxycarbonil-L-piroglutámico o N-benciloxycarbonil-L-alanina, N-benciloxycarbonil-L-fenilalanina, en dioxano anhidro y el éster N-hidroxi-succinimida, para obtener los productos respectivos (**42'a-42'e**), a los cuales individualmente se les trató con cloruro de tionilo y piridina en etanol anhidro, formando los productos **43'a-43'e** los que finalmente fueron hidrogenados con paladio sobre carbono para obtener los derivados **VI-X**.

2. Antecedentes



Esquema 8. Síntesis de los derivados **VI-X**¹⁷.

Estos derivados se proponen para su uso en la terapia farmacológica con enzima dirigida a anticuerpos, la cual es un enfoque diferente para la quimioterapia contra el cáncer. Esta consiste en dos etapas; en la primera etapa una molécula citotóxica se genera selectivamente en el sitio del tumor, ya que al inicio se administra un conjugado formado entre un anticuerpo y una enzima, mientras que en la segunda etapa, se localiza en el tumor a través de la unión al antígeno asociado al tumor. Se deja transcurrir suficiente tiempo para que cualquier conjugado no unido presente se elimine de la circulación y a continuación se administra una forma latente de un agente citotóxico (un pro-fármaco), en cuyo caso el resto enzimático del conjugado unido convierte el pro-fármaco no citotóxico en la especie citotóxica activa. De esta manera, la terapia supera muchos de los problemas asociados con la conjugación directa de agentes citotóxicos con anticuerpos monoclonales^{17,18}.

- En 2006 se reportó un nuevo análogo del melfalán **XI** (Figura 7), el cual es un inhibidor más activo del ADN y de la biosíntesis del colágeno en células de cáncer

2. Antecedentes

de mama humano MDA-MB y MCF-7, además de ser un agente citotóxico mejor que el fármaco precursor.

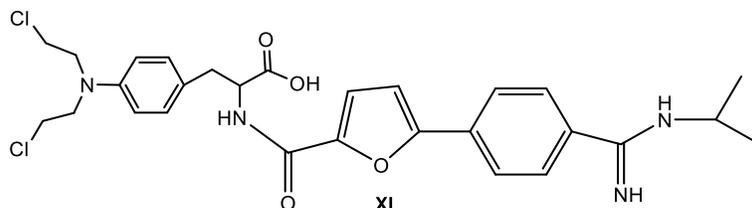
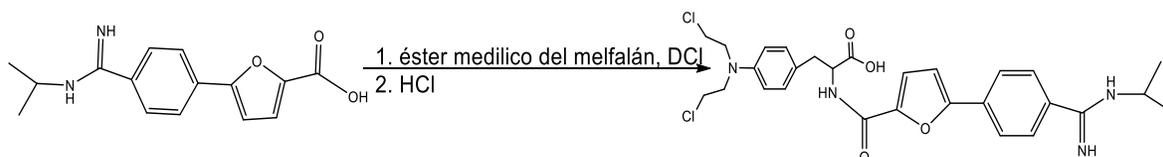


Figura 7. Compuesto análogo al melfalán **XI**¹⁹.

La síntesis para el análogo de amidina del melfalán, se realizó mediante dos disoluciones, una con el hidrocloreto del ácido 5-(4-N-isopropil)fenil)2-furan carboxílico, en dimetilformamida (DMF) anhidra con N,N'-carbonildiimidazol, para hacerla reaccionar posteriormente con la otra disolución de hidrocloreto del éster metílico del melfalán y trietilendiamina en DMF anhidra, para después ser tratado con ácido clorhídrico 2M y de ésta forma obtener el derivado del melfalán (Esquema 9)¹⁹.



Esquema 9. Síntesis del derivado de amidina del melfalán¹⁹.

2. Antecedentes

2.5. Aplicaciones farmacéuticas del melfalán

El melfalán actualmente es utilizado en el área farmacéutica para el tratamiento de múltiples enfermedades, principalmente en el tratamiento del mieloma múltiple o el cáncer de ovario o también, en el tratamiento del cáncer de mama, neuroblastoma, rhabdomyosarcoma, macroglobulinemia de Waldenström, linfoma, leucemia aguda y en el régimen de acondicionamiento pre-autólogo y alogénico en el trasplante de la médula ósea.

2.5.1. Mieloma Múltiple

El mieloma múltiple se puede definir como una enfermedad clonal adquirida que afecta a los plasmocitos linfocitos B normales al inhibirlos.

En 1873 se utilizó por primera vez el término de mieloma múltiple (MM) por Rustizky, para representar las variadas lesiones óseas que presentó un paciente²⁰, pero en 1889 Otto Kahler publicó una revisión sobre la enfermedad, dándola a conocer como “Enfermedad de Kahler”²¹, sin embargo la enfermedad recibió distintos nombres hasta que James Homer Wright en 1900 publicó en 2 artículos sucesivos sus descubrimientos relacionados con los plasmocitos, demostrando que eran las células malignas del mieloma^{22,23} y en 1927 Arinkin destacó la importancia del aspirado de médula ósea en el diagnóstico del mieloma múltiple²⁴ lo cual se confirmó por Rosenthal y Vogel en 1938²⁵. Con estudios consecuentes, se encontró en 1939 por Longsworth *et al.* al emplear electroforesis la existencia de un pico monoclonal²⁶. Pero fue hasta 1962 que Bergsagel *et al.* informaron que el melfalán, podía inducir remisiones en aproximadamente un tercio de los pacientes con MM¹¹, hasta 1999 no se había encontrado alguna combinación de medicamentos que fuera superior a la del melfalán/prednisona²⁷.

Algunos de los síntomas más frecuentes en el momento del diagnóstico son los dolores óseos, presentes en alrededor de dos tercios de los paciente, la astenia y las infecciones de repetición, así como, por un diagnóstico de rutina de una anemia, una velocidad de sedimentación globular elevada o una insuficiencia renal. Mientras que las lesiones óseas son causa principal de morbilidad en la

2. Antecedentes

evolución del mieloma (Figura 8), lo cual genera dolor crónico, fracturas patológicas, compresión medular e hipercalcemia²⁸.

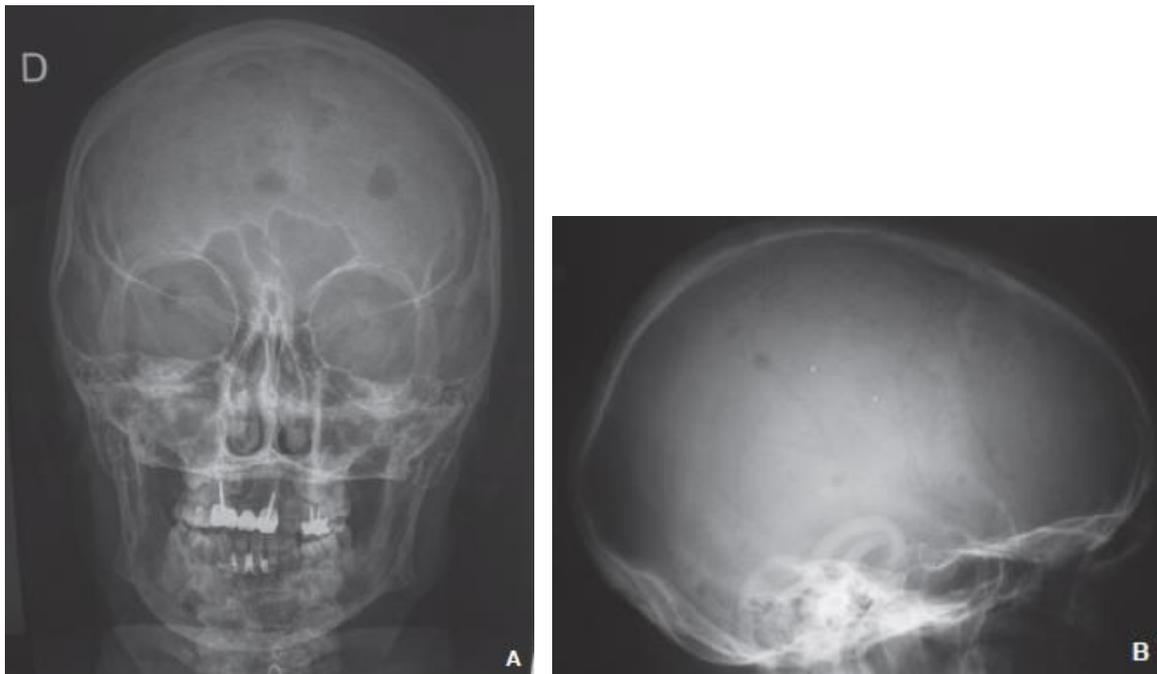


Figura 8. Radiografía de cráneo anteroposterior (A) y lateral (B) en relación con lesiones mielomatosas múltiples²⁸.

El melfalán al ser administrado vía intravenosa, metabolizado por el hígado y excretado mediante las heces u orina, su degradación tóxica dependerá del funcionamiento renal, del índice de masa corporal, el género y del perfil del paciente²⁹, con lo cual se podrá continuar estudiando, para mejorar su uso en el mieloma múltiple.

2.5.2. Cáncer de Ovarios

El cáncer de ovario se conoce científicamente por más de 150 años, pero durante éste tiempo no se ha logrado cambiar la mortalidad que genera, lo cual lo coloca como el sexto tumor más común en las mujeres, reportándose 200,000 nuevos casos en todo el mundo cada año, constituyendo el 4% de todos los cánceres diagnosticados en las mujeres, con 6.6 nuevos casos por cada 100,000 mujeres al año. Pero a pesar de lo anterior los tratamientos siguen siendo muy caros y sofisticados, ya que en las últimas dos décadas solo se han tenido ligeros

2. Antecedentes

avances en la tasa de supervivencia de los 5 años, con un incremento del 30-50% utilizando cisplatino. Por ejemplo en Europa solo más de un tercio de las mujeres con cáncer de ovario sobrevive a los 5 años luego de hacerse el diagnóstico. Colocándola en la cuarta causa de muerte, ocasionada por tumores ginecológicos en países desarrollados y en México.

Esta baja tasa de supervivencia está relacionada al avance de la enfermedad, en cuanto se hizo el diagnóstico. Por lo que el pronóstico depende fundamentalmente del tipo histológico, originándose el 90 % de los casos en el epitelio que cubre la superficie del ovario o que delimita los quistes de inclusión y el 10 % que se desarrolla a partir del estroma, las cuerdas sexuales y en las células germinales. Siendo que los cánceres epiteliales responden a la cirugía y quimioterapia en principio, pero recidivan y tan sólo sobreviven el 33 % a largo plazo, mientras que los cánceres derivados de estroma y de las células germinales se pueden curar en la mayor parte de los casos, conservando a menudo su función reproductora.

Ya que aproximadamente del 75-80% de los casos de cáncer de ovario epitelial son de tipos histológicos serios (Figura 9), mientras que los cánceres mucinoso, endometroide, de células claras, de Brenner y de linaje indiferenciado son los menos comunes³⁰.

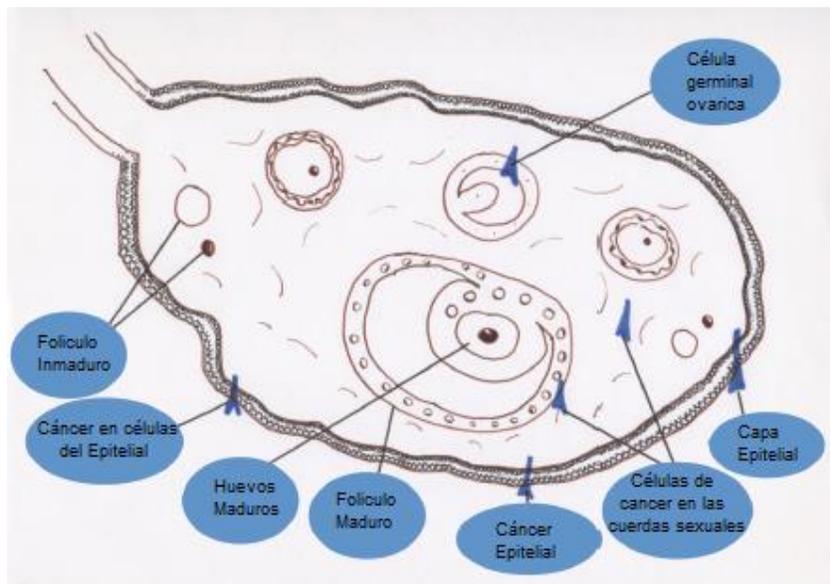


Figura 9. Tipos de cáncer de ovario de acuerdo a su origen³⁰.

2. Antecedentes

Los agentes alquilantes fueron los primeros fármacos utilizados que a pesar de sus peligros, siguen siendo el pilar de la terapia anticancerígena, ya que muy pronto los pacientes mostraban eficacia al ser tratados con melfalán, incluso cuando apareció el cisplatino en los años 80, estos fármacos como la bendamustina, la ciclofosfamida, la nimustina y en especial el melfalán, funcionaron de mejor manera³¹.

Por lo que el melfalán es el agente alquilante que más se ha utilizado en el tratamiento contra el cáncer de ovario, debido a su tasa del 40 a 50 % de respuesta en pacientes sin tratamiento previo, sin embargo se llega a desarrollar una resistencia, con lo cual tendrá un tiempo medio de respuesta de solamente 17 meses y de todos los pacientes solo del 5 al 15 % continuaran respondiendo después de los 2 años de iniciar la terapia. Pero se encontró que si se combinaban las quimioterapias en donde al menos se emplee un agente alquilante, se lograba disminuir la remisión de la enfermedad (20 al 30 %), prolongando el desarrollo a la resistencia de los fármacos utilizados³².

Por otra parte estudios preclínicos sugirieron que la infusión prolongada de melfalán podría ser más activa que la infusión corta, además, basándose en consideraciones farmacocinéticas (corta semivida, pequeño volumen de distribución y baja capacidad de unión a proteínas), el melfalán es un buen candidato para la infusión continua. Sin embargo, debido a su baja estabilidad en 5.0 % de dextrosa o cloruro sódico al 0.9 %, el melfalán se administra generalmente por infusión a corto plazo, demostrando que la estabilidad del melfalán puede aumentar un 3.0 % en cloruro de sodio³³.

Así que el melfalán podrá seguir siendo un agente quimioterapéutico principal para poder aumentar la efectividad de nuevos fármacos o de nuevas combinaciones quimioterapéuticas con mejor eficiencia para el tratamiento del cáncer de ovario.

3. Objetivos

3. Objetivos

3.1. Objetivo general.

Realizar la síntesis del melfalán, con un número menor de etapas a las que ya se encuentran reportadas, a partir de *p*-nitro-L-fenilalanina.

3.2. Objetivos particulares.

- Realizar la síntesis y caracterización de todos los intermediarios obtenidos para la síntesis del melfalán.
- Proponer una nueva ruta sintética con menos etapas para la síntesis del melfalán

4. Reactivos y Equipos

4. Equipos y Reactivos

4.1. Equipos

- **Resonancia Magnética Nuclear**

JEOL, ECLIPSE	300 MHz ¹ H y 75 MHz ¹³ C.
BRUCKER, ADVANCE III	400 MHz ¹ H y 100 MHz ¹³ C.
Referencia	¹ H Tetrametilsilano (Me ₄ Si, 0.00 ppm).
Disolventes	Dimetilsulfóxido deuterado Metanol deuterado

- **Espectrofotometría de UV-Vis**

Espectrofotómetro SHIMADZU UV 160 U.

- **Espectrofotometría de FT-IR**

Espectrofotómetro FT-IR MAGNA.700

- **Espectrometría de Masas**

Espectrómetro de masas Bruker Esquire.

Espectrómetro de masas Jeol, SX 102 A

- **Análisis Elemental**

Analizador elemental, marca Thermo Scientific, modelo Flash 2000.

4. Reactivos y Equipos

4.2. Reactivos y Disolventes.

- **Reactivos.**

4-Nitro-L-fenilalanina monohidratado 98% (Aldrich)

Ácido cloroacético $\geq 99\%$

Ácido clorhídrico 36.5-38% (J. T. Baker)

Ácido *p*-toluensulfónico 98% (Aldrich)

Alcohol bencílico $\geq 99\%$ (Aldrich)

Carbonato de potasio $\geq 99\%$ (Aldrich)

Cloruro de acetilo 99% (Merck)

Complejo $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ 1 M en THF (Aldrich)

Hidrato de Hidrazina 98% (Aldrich)

$\text{Fe}(\text{acac})_3$

- **Disolventes**

Acetato de Etilo

Acetona

Etanol

Metanol

Tetrahidrofurano (Aldrich)

Tolueno (Aldrich)

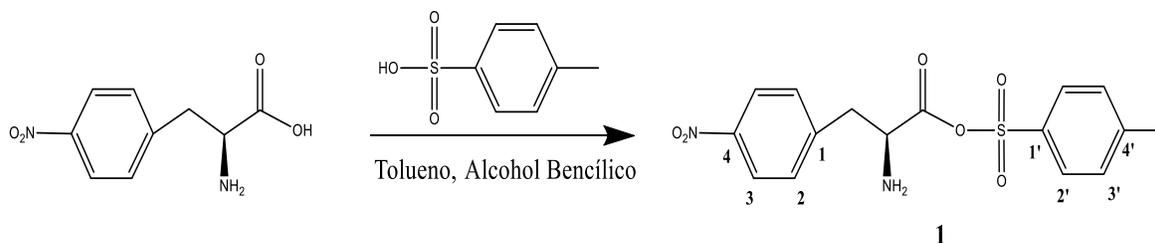
El acetato de etilo, acetona, etanol y metanol, fueron purificados por medio de destilación simple empleando como agente desecante hidróxido de potasio (acetato de etilo), cloruro de calcio (acetona) u óxido de calcio (metanol y etanol).

5. Desarrollo
Experimental

5. Desarrollo Experimental

5.1. Síntesis del (2S)-2-amino-3-(4-nitrofenil)propanoato de *p*-toluensulfonilo (1).

Se disolvió 1 g (4.38 mmol) de 4-nitro-L-fenilalanina en tolueno; se colocaron 0.5 mL (4.80 mmol) de alcohol bencílico y 0.9 g (5.23 mmol) de ácido *p*-toluensulfónico. Posteriormente la mezcla de reacción se colocó a reflujo a 130 °C con agitación constante por 18 horas, formándose un precipitado el cual se filtró y posteriormente se lavó con diclorometano, obteniéndose 1.57 g (4.09 mmol), el (2S)-2-amino-3-(4-nitrofenil)propanoato de *p*-toluensulfonilo **1**, como un sólido de color blanco, con un rendimiento del 93.44%, esquema 10.



Esquema 10. Protección del grupo carboxílico.

Datos espectroscópicos

UV-vis (MeOH) λ (nm); 235, 264.

FTIR (KBr) cm^{-1} ; 3032, 2950, 2673, 2595, 2529, 1701.97, 1520, 1346, 1289, 1116.

RMN de ^1H (MeOD, 300 MHz) δ (ppm); 2.36 (s, 3H, Ar-CH₃), 3.35 (ddd, 2H, $J = 6.3, 14.7$ Hz, CH₂), 4.35 (dd, 1H, $J = 6.7, 1.5$ Hz, CH), 7.23 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, Ar³), 7.55 (d, 2H, $J = 9.0$ Hz, Ar²), 7.70 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, Ar^{2'}), 8.21 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, Ar³).

RMH de ^{13}C (MeOD, 75 MHz) δ (ppm); 19.9 (CH₃), 35.6 (CH₂), 53.2 (CH), 123.6 (Ar³), 125.6 (Ar^{2'}), 128.5 (Ar^{3'}), 130.4 (Ar²), 140.4 (Ar^{1'}), 142.2 (Ar¹, Ar^{4'}), 147.7 (Ar⁴), 169.5 (CO).

ESI-Ms (m/z); 383.0; M+1+H₂O

Punto fusión (°C); 209.7 (se descompone).

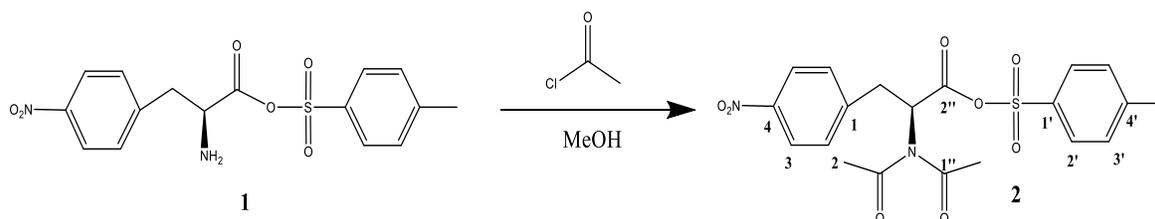
Análisis elemental calc. C 47.91 %; H 4.56 %; N 7.00 %; S 8.49 %.

Análisis elemental exp. C 50.20 %; H 4.74 %; N 7.33 %; S 8.38 %.

5. Desarrollo Experimental

5.2. Síntesis del (2S)-2-diacetamido-3-(4-nitrofenil)propanoato de *p*-toluensulfonilo (2).

Se agregaron 1.5 mL (21.02 mmol) de cloruro de acetilo en MeOH anhidro sobre un baño de hielo con agitación por 15 min. Posteriormente se agregó 1 g (2.61 mmol) del compuesto **1** a la mezcla de reacción, elevando la temperatura a 70 °C por 72 horas a reflujo. Finalmente se evaporó el disolvente a presión reducida y el sólido obtenido se lavó 3 veces con tolueno, recuperando las aguas madre para luego evaporar nuevamente el disolvente, obteniéndose 0.99 g (2.20 mmol) del (2S)-2-diacetamido-3-(4-nitrofenil)propanoato de *p*-toluensulfonilo **2**, como un sólido de color blanco, con un rendimiento del 84.45%, esquema 11.



Esquema 11. Amidificación del compuesto **1**.

Datos espectroscópicos

UV-vis (MeOH) λ (nm); 264, 235.

FTIR (KBr) cm^{-1} ; 2958-2897, 1751, 1637, 1514, 1341, 1215, 1122.

RMN de ^1H (MeOD, 300 MHz) δ (ppm); 2.38 (s, 3H, Ar-CH₃), 3.38 (ddd, 2H, $J=2.1, 5.1$ Hz, CH₂), 3.79 (s, CO-CH₃), 4.44 (t, 1H, $J=5.2$ Hz, CH), 7.25 (d, 2H, $J=6.0$ Hz, Ar^{3'}), 7.53 (d, 2H, $J=6.6$ Hz, Ar^{2'}), 7.72 (d, 2H, $J=6.3$ Hz, Ar^{2'}), 8.20 (d, 2H, $J=6.6$ Hz, Ar^{3'}).

RMH de ^{13}C (MeOD, 75 MHz) δ (ppm); 19.9 (CH₃), 35.5 (CH₂), 52.3 (CH₃), 53.2 (CH), 123.5 (Ar^{3'}), 125.5 (Ar^{2'}), 128.5 (Ar^{3'}), 130.4 (Ar^{2'}), 140.5 (Ar^{1'}), 141.9 (Ar^{1'}, Ar^{4'}), 147.5 (Ar^{4'}), 168.6 (CO^{1''}, CO^{2''}).

ESI-Ms (m/z); 449.1; M+1

Punto fusión (°C); 183.

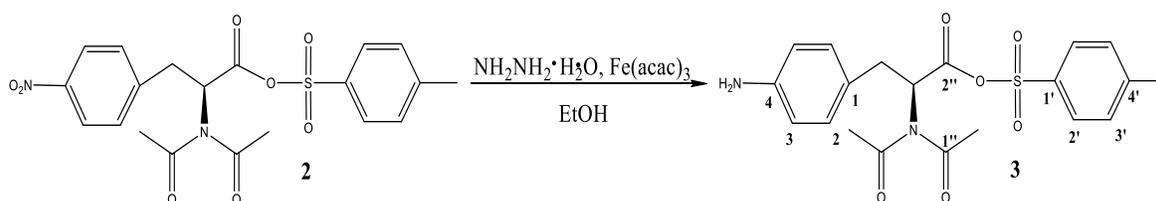
Análisis elemental calc. C 49.44 %; H 4.91 %; N 6.91 %; S 8.49 %.

Análisis elemental exp. C 53.57 %; H 4.50 %; N 6.25 %; S 7.15 %.

5. Desarrollo Experimental

5.3. Síntesis del (2S)-2-diacetamido-3-(4-aminofenil)propanoato de *p*-toluensulfonilo (3).

Se disolvió 1 g (2.22 mmol) del compuesto **2** en EtOH anhidro con 0.3 mL (6.19 mmol) de Hidrato de Hidrazina y 0.02 g (5.66×10^{-2} mmol) de $\text{Fe}(\text{acac})_3$, colocando la mezcla de reacción en reflujo con agitación constante a 90 °C por 24 horas y el precipitado formado se filtró. A las aguas madre se les evaporó el disolvente a presión reducida para obtener 0.83 g (1.84 mmol) del (2S)-2-diacetamido-3-(4-aminofenil)propanoato de *p*-toluensulfonilo **3** como un sólido color café claro, con un rendimiento del 82.79%, esquema 12.



Esquema 12. Reducción del grupo nitro del compuesto **2**.

Datos espectroscópicos

UV-vis (MeOH,) λ (nm); 230, 269.

FTIR (KBr) cm^{-1} ; 3328, 3040, 2924, 2855, 1685, 1602, 1344, 1120.

RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ (ppm); 2.29 (s, 3H Ar- CH_3), 3.17 (s, 8H, CH_2 , CO- CH_3), 3.96 (t, $J = 6.6$ Hz, CH), 7.13 (d, 2H, $J = 7.8$ Hz, Ar 3), 7.50 (d, 4H, $J = 8.1$ Hz, Ar 2 , Ar 2), 8.17 (d, 4H, $J = 8.4$ Hz, Ar 3), 9.10 (a, 2H, NH_2).

RMH de ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz) δ (ppm); 21.3 (CH_3), 37.1 (CH_2), 52.6 (CH_3), 53.3 (CH), 124.1 (Ar 3), 126.1 (Ar 2), 128.7 (Ar 3), 131.5 (Ar 2), 138.4 (Ar 1), 143.6 (Ar 1), 145.9 (Ar 4), 147.5 (Ar 4), 166.8 (CO $^{1''}$), 167.5 (CO $^{2''}$).

ESI- Ms (m/z); 449.2; $\text{M}+1+\text{N}_2\text{H}_2$.

Punto fusión (°C); 207.

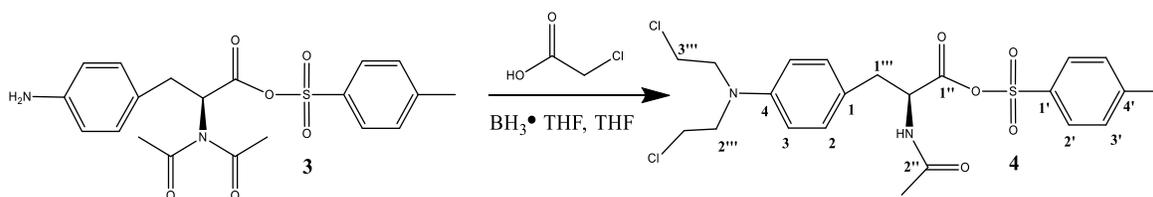
Análisis elemental calc. C 43.84 %; H 5.15 %; N 11.35 %; S 8.69 %.

Análisis elemental exp. C 53.56 %; H 5.39 %; N 12.49 %; S 7.15 %.

5. Desarrollo Experimental

5.4. Síntesis del (2S)-2-acetamido-3-{4-[bis(2-cloroetil)amino]fenil}propanoato de *p*-toluensulfonilo (4).

Se disolvió 1 g (2.22 mmol) del compuesto **3** en THF con 5 g (52.91 mmol) de ácido cloroacético, calentando ligeramente a 30 °C. Posteriormente se adicionó 1 mL (10.4 mmol) del complejo borano-tetrahidrofurano (BH₃·THF), elevando la temperatura a 50 °C con agitación constante por 3 horas e inmediatamente se subió la temperatura a 70 °C por 20 minutos más. Después se adicionaron 5 mL de MeOH, dejando en agitación otros 20 minutos más. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida, y después se añadieron ~20 mL de agua destilada y ajustando el pH entre 5-6 con K₂CO₃. Se evaporó el disolvente obteniéndose un sólido café, el cual se lavó con acetona, extrayendo 0.97 g, (1.55 mmol) del (2S)-2-acetamido-3-{4-[bis(2-cloroetil)amino]fenil}propanoato de *p*-toluensulfonilo **4**, como un líquido café muy viscoso, con un rendimiento del 69.93 %, esquema 13.



Esquema 13. Cloroetilación del compuesto **3**.

Datos espectroscópicos

UV-vis (MeOH) λ (nm); 234, 267.

FTIR (KBr) cm⁻¹; 3015, 2953, 1719, 1643, 1391, 1346, 1164.

RMN de ¹H (MeOD, 400 MHz) δ (ppm); 1.41 (s, CO-CH₃), 2.38 (s, 3H Ar-CH₃), 3.28 (s, 2H, CH₂^{1''''}), 4.10 (s, 8H, CH₂^{2''''}, CH₂^{3''''}), 3.78 (t, 1H, *J* = 6.7 Hz, CH), 7.25 (d, 2H, *J* = 6.0 Hz, Ar^{3'}), 7.60 (dd, 2H, *J* = 5.6 Hz, Ar^{2'}), 7.72 (d, 2H, *J* = 6.0 Hz, Ar^{2'}), 8.20 (dd, 2H, *J* = 5.4 Hz, Ar^{3'}).

RMH de ¹³C (MeOD, 100 MHz) δ (ppm); 19.9 (CH₃), 24.6 (CH₃), 36.6 (CH₂^{1''''}), 41.6 (CH₂^{2''''}), 52.3 (CH), 59.4 (CH₂^{3''''}), 123.5 (Ar^{3'}), 125.5 (Ar^{2'}), 128.4 (Ar^{3'}), 130.5 (Ar^{2'}), 140.4 (Ar^{1'}), 141.9 (Ar^{1'}, Ar^{4'}), 147.4 (Ar^{4'}), 170.8 (CO^{1''}), 175.1 (CO^{2''}).

ESI-MS (m/z); 523.0; +Na

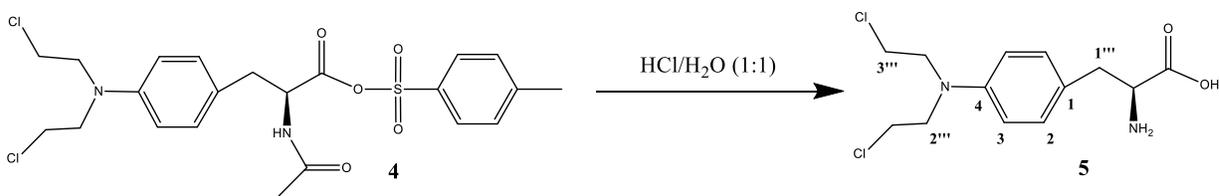
Análisis elemental calc. C 29.34 %; H 3.34 %; N 4.97 %; S 1.04 %.

Análisis elemental exp. C 50.39 %; H 5.00 %; N 5.34 %; S 6.11 %.

5. Desarrollo Experimental

5.5. Síntesis del Ácido (2S)-2-amino-3-{4-[bis(2-cloroetil)amino]fenil}propanoico (5).

Se disolvió 1 g (1.59 mmol) del compuesto **4** en 10 mL de una mezcla de HCl/H₂O 1:1 con agitación constante y reflujo a 30 °C por 20 horas. Posteriormente se hicieron 5 extracciones de 15 mL con acetato de etilo a la fase acuosa (color roja), la cual se trató con carbón activado, hasta la obtención de una coloración amarilla, se filtró y a las aguas madre se les ajustó el pH a 3-5 con Na₂CO₃, luego se evaporó el disolvente a presión reducida. Finalmente el producto obtenido se suspendió en 40 mL de acetona y se mantuvo en agitación constante por 18 horas. Transcurrido el tiempo se obtuvo 0.33 g (1.09 mmol) del ácido (2S)-2-amino-3-{4-[bis(2-cloroetil)amino]fenil}propanoico **5**, como un sólido de color café, con un rendimiento del 54.69 %, esquema 14.



Esquema 14. Obtención del Melfalán.

Datos espectroscópicos

UV-vis (MeOH) λ (nm); 210, 261.

FTIR (KBr) cm⁻¹; 3367, 2926, 1607, 1515, 1347, 1076,

RMN de ¹H (DMSO-d₆, 300 MHz) δ (ppm); 3.15 (s, 8H, CH₂^{2'''}, CH₂^{3'''}), 3.27 (ddd, 2H, *J*= 6.3, 18 Hz CH₂^{1'''}), 3.38 (t, 1H, *J*= 3.0 Hz, CH), 7.50 (d, 1H, *J*= 8.7 Hz, Ar²), 7.65 (d, 1H, *J*= 8.7 Hz, Ar²), 8.16 (d, 2H, *J*= 8.7 Hz, Ar³), 8.65 (a, 2H, NH₂), 10.71 (s, 1H, CO₂H).

RMH de ¹³C (DMSO-d₆, 75 MHz) δ (ppm); 37.1 (CH₂^{1'''}), 40.0 (CH₂^{2'''}), 49.4 (CH₂^{3'''}), 52.3 (CH), 123.9 (Ar³), 131.7 (Ar²), 143.9 (Ar¹), 147.2 (Ar⁴), 176.8 (CO₂H).

IE-Ms (m/z); 305

Punto fusión (°C); 180.

Análisis elemental calc. C 11.33 %; H 2.40 %; N 3.70 %.

Análisis elemental exp. C 51.16 %; H 5.94 %; N 9.18 %.

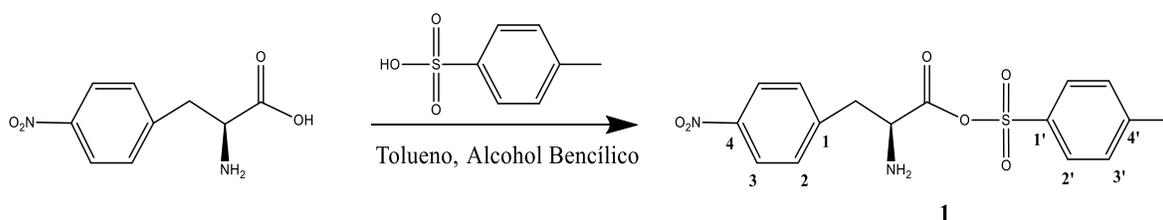
6. Discusión de *Resultados*

6. Discusión de resultados

La síntesis del melfalán se inició con la obtención de los intermediarios **1-4**.

6.1. (1) (2S)-2-amino-3-(4-nitrofenil)propanoato de *p*-toluensulfonilo.

Para obtener el compuesto **1**, inicialmente se disolvió la 4-nitro-L-fenilalanina en tolueno, alcohol bencílico y el grupo protector el ácido *p*-toluensulfónico, formándose el (2S)-2-amino-3-(4-nitrofenil)propanoato de *p*-toluensulfonilo **1** como un sólido blanco, con un rendimiento del 93 % (Esquema 15).



Esquema 15. Síntesis del compuesto **1**.

La elucidación estructural del compuesto **1**, se inicia con el estudio de RMN de ^1H . En el espectro se pueden observar, una señal simple a δ_{H} 2.36 asignada al grupo CH_3 del grupo protector, a δ_{H} 3.35 se observa una señal doble de dobles de dobles correspondiente al grupo CH_2 de la L-fenilalanina con constantes de acoplamiento de $J = 6.3, 14.7$ Hz. Por otra parte también se observa una señal doble de dobles a δ_{H} 4.3 debido al grupo CH unido a la amina con constantes de acoplamiento de $J = 1.5, 6.7$ Hz. Finalmente se observan 4 señales dobles a δ_{H} 7.23, 7.55, 7.70, 8.21, correspondientes a los protones de los anillos aromáticos 3', 2, 2' y 3 con constantes de acoplamiento de $J = 8.7$ Hz, $J = 9.0$ Hz, $J = 8.1$ Hz, y $J = 8.7$ Hz, respectivamente (Figura 10).

6. Discusión de Resultados

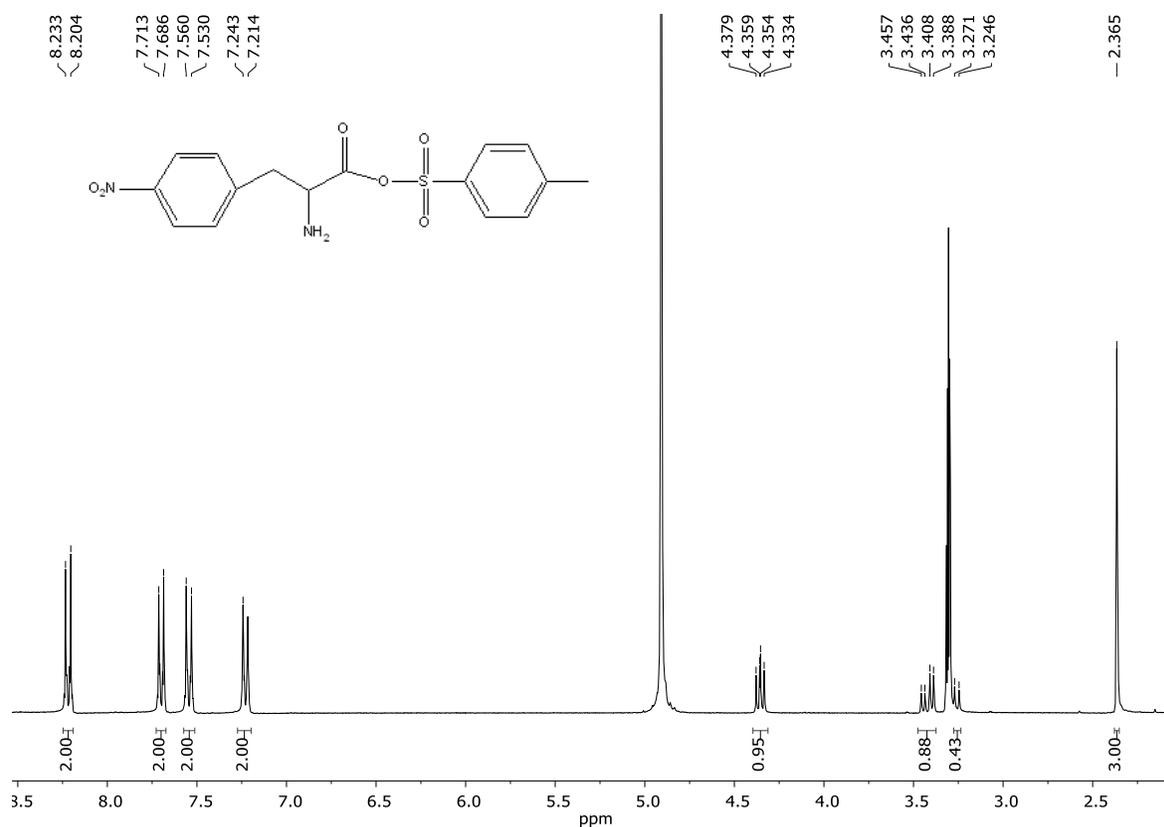


Figura 10. Espectro de RMN de ¹H del compuesto **1** en MeOD a 300 MHz.

El espectro de RMN de ¹³C, muestra una señal a δ_c 19.9 debido al carbono del metilo del grupo *p*-toluensulfonilo (*p*-TsO), seguido de la señal a δ_c 35.6 asignada al carbono del grupo metileno. Así mismo a δ_c 53.2 se encuentra la señal correspondiente al carbono del grupo metino. Por otra parte las señales a δ_c 123.6, 125.6, 128.5, 130.4, asignadas a los carbonos 3, 2', 3' y 2 de los anillos aromáticos respectivamente, mientras que la señal para los carbonos *ipso* 1' y 4, a δ_c 140.4, 147.7 respectivamente, a δ_c 142.2 se observa una señal para los carbonos *ipso* 1 y 4' y finalmente a δ_c 169.5 corresponde la señal del carbono del grupo carbonilo (Figura 11).

6. Discusión de Resultados

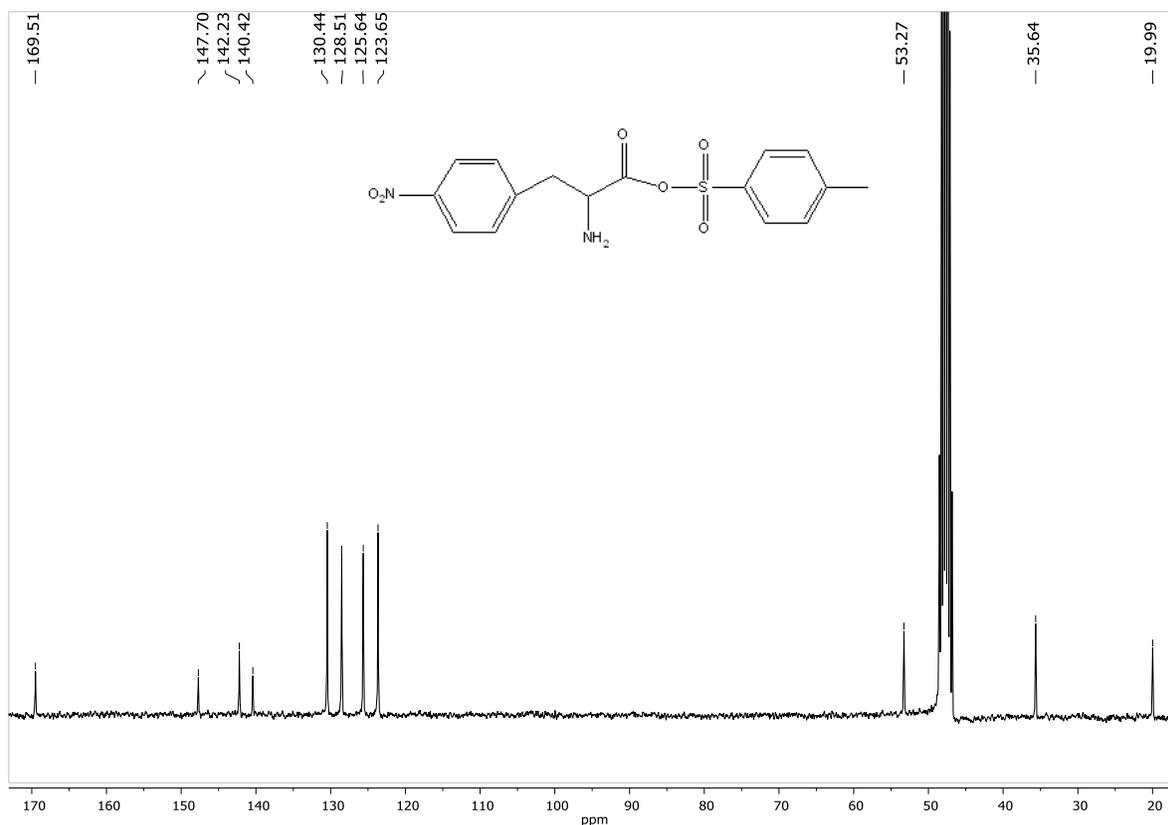


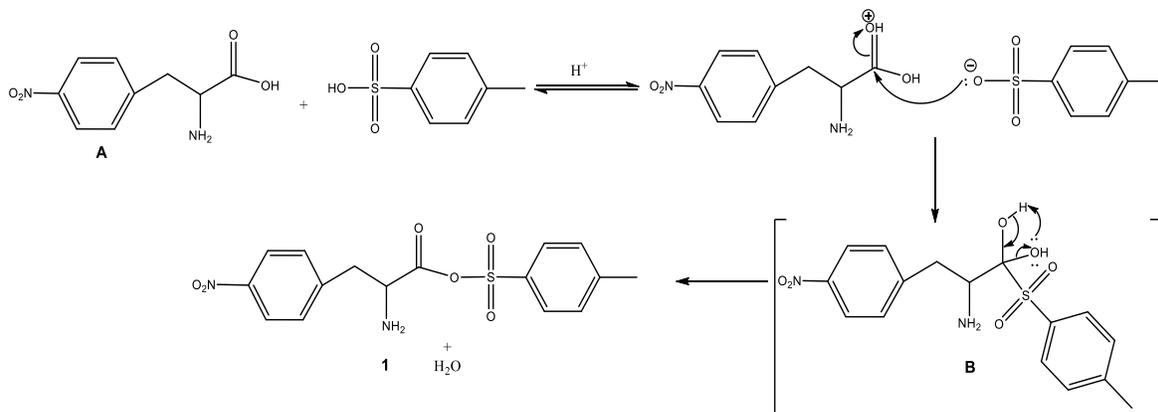
Figura 11. Espectro de RMH de ^{13}C del compuesto **1** en MeOD a 75 MHz.

La estructura del compuesto **1** se confirmó mediante espectrometría de masas de ionización por Electropray (I.E.S.), en cuyo espectro se observó un pico a 383 m/z, que corresponde al ión molecular M^{+1} (365 g/mol), más una molécula de H_2O .

El mecanismo de reacción para la protección del grupo ácido del carboxílico del *p*-nitro-L-fenilalanina **A** se muestra en el esquema 16, donde se puede observar, que primero se activa el carbonilo de **A** por medio de un equilibrio ácido-base con el *p*-toluensulfonilo (*p*-TsOH) y pueda ser atacado nucleofílicamente por parte del *p*-toluensulfonato formándose el intermediario **B**.

Posteriormente en el intermediario **B** ocurre una protonación y desprotonación en el gen diol, generándose H_2O como buen grupo saliente y en consecuencia, se obtiene el compuesto **1**.

6. Discusión de Resultados

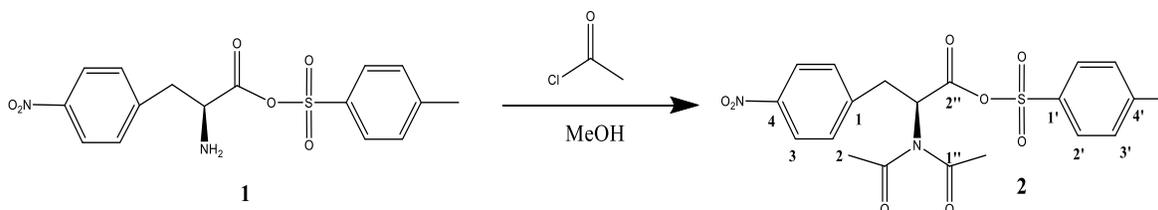


Esquema 16. Mecanismo de reacción para la protección del grupo ácido del carboxílico.

Una vez obtenido y caracterizado por todas las técnicas espectroscópicas el compuesto **1** se procedió a realizar la protección de la amina.

6.2. (2) (2S)-2-diacetamido-3-(4-nitrofenil)propanoato de *p*-toluensulfonylo.

Para la obtención del compuesto **2**, se utilizó un exceso de cloruro de acetilo en MeOH anhidro y el compuesto **1**. Posteriormente se aisló el producto, con la obtención del (2S)-2-diacetamido-3-(4-nitrofenil)propanoato de *p*-toluensulfonylo **2**, como un sólido de color blanco, con un rendimiento del 84% (Esquema 17).



Esquema 17. Síntesis del compuesto **2**.

Una vez purificado el compuesto **2**, presenta el espectro de RMN de ¹H (Figura 12) para su caracterización. En éste se observa, a δ_H 2.38 una señal simple perteneciente al grupo CH₃ del grupo *p*-TsO, seguido de una señal doble de dobles de dobles a δ_H 3.38 con constantes de acoplamiento de $J = 2.1, 5.1$ Hz, asignado al grupo CH₂ del compuesto obtenido. A δ_H 3.79 se encuentra la señal simple para los dos grupos CH₃ de las amidas, a δ_H 4.44 se encuentra una señal triple con constante de acoplamiento de $J = 5.2$ Hz, correspondiente al grupo CH unido a la diamida. Finalmente a δ_H 7.25, 7.53, 7.72 y 8.20 se encuentran cuatro

6. Discusión de Resultados

señales dobles para los protones de los anillos aromáticos 3', 2, 2' y 3, con constantes de acoplamiento de $J = 6.0$ Hz, $J = 6.6$ Hz, $J = 6.3$ Hz, $J = 6.6$ Hz respectivamente.

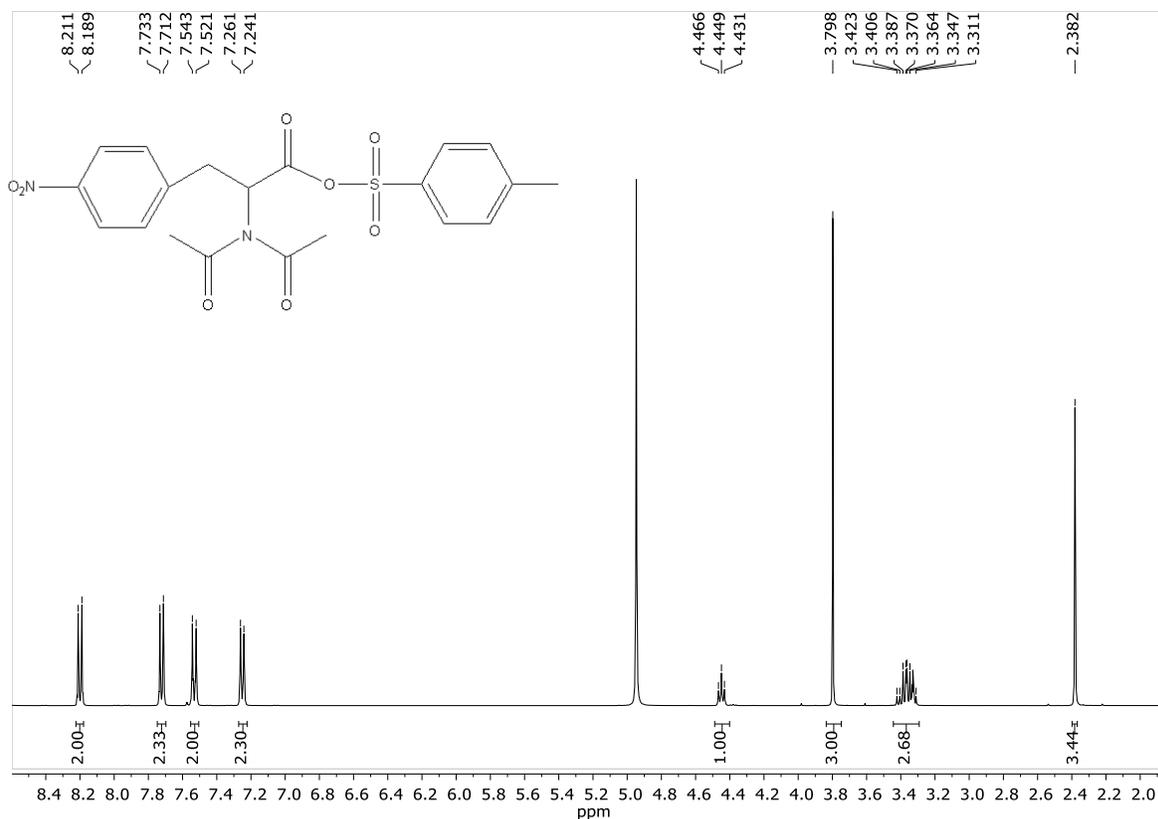


Figura 12. Espectro de RMN de ¹H del compuesto **2** en MeOD a 300 MHz.

En el espectro de RMN de ¹³C (Figura 13) para el compuesto **2**, donde se observa a δ_c 19.9 la señal correspondiente al grupo CH₃ del *p*-TsO. Así mismo a δ_c 35.5 se encuentra la señal del grupo CH₂ de la L-fenilalanina, seguida de la señal a δ_c 52.3 para el carbono de los dos grupos metilos de las amidas, mientras que la señal a δ_c 53.2, pertenece al grupo metino unido a la diamida, a δ_c 123.5, 125.5, 128.5, 130.4, se encuentran la señales para los carbonos de los anillos aromáticos 3, 2', 3', 2 respectivamente, por tanto las señales a δ_c 140.5 y 147.5 corresponden a los carbonos *ipso* 1' y 4, la señal a δ_c 141.9 es asignada a los carbonos *ipso* 1 y 4', y finalmente una señal a δ_c 168.6 es asignada a los carbonos de los grupos carbonilos 1'' y 2''.

6. Discusión de Resultados

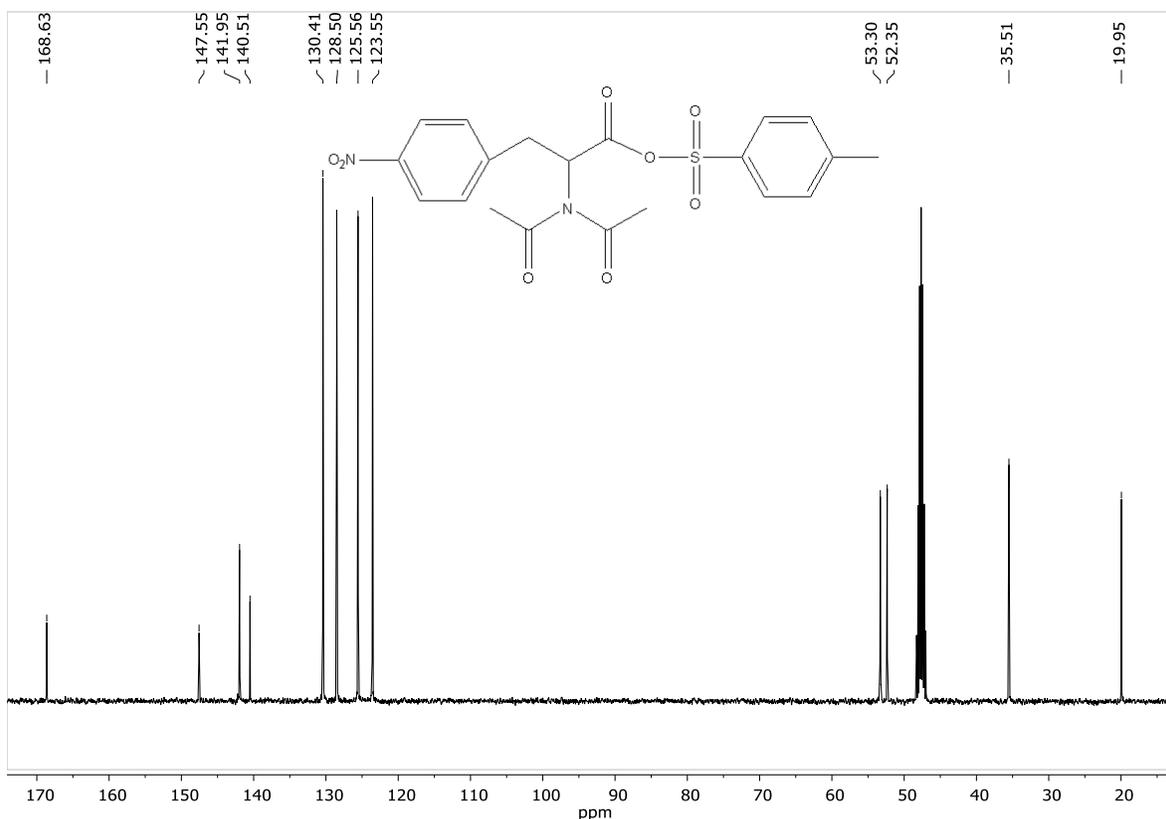
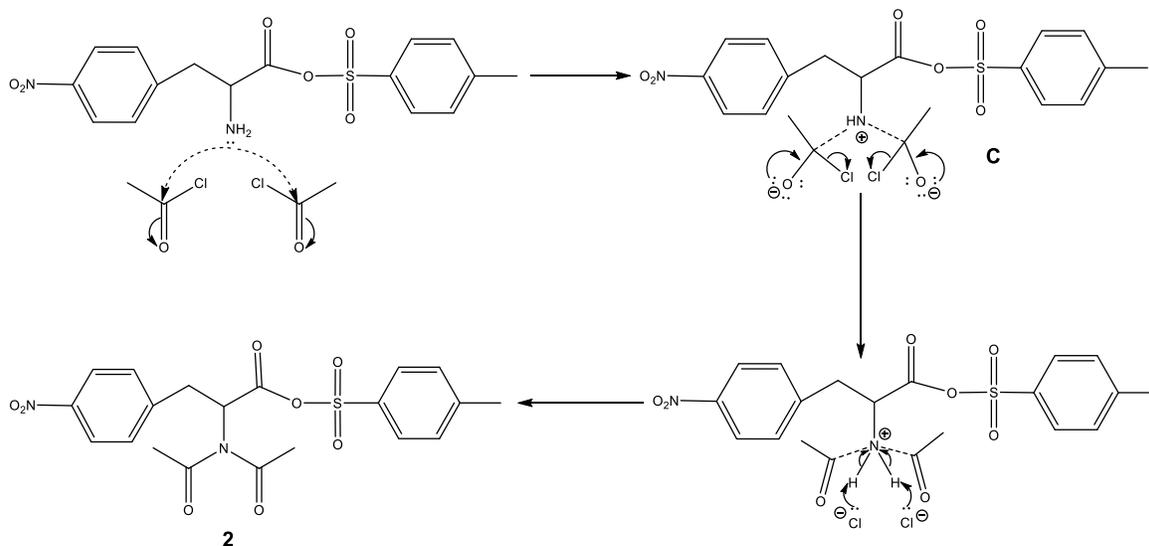


Figura 13. Espectro de RMH de ¹³C del compuesto **2** en MeOD a 75 MHz.

Se confirmó la estructura por espectrometría de masas por I.E.S., cuyo espectro se puede observar un pico a 449.1 m/z, correspondiente al ión molecular M⁺¹ del compuesto **2**.

Al caracterizarse por Uv-Vis, FTIR y análisis elemental, para comprobar la formación de esta estructura, es que se propone que el mecanismo de reacción para la formación del compuesto **2** se según el esquema 18, consiste en un ataque nucleofílico simultáneo por parte de la amina a los carbonos de los grupos carbonilos de dos moléculas de cloruro de acetilo, con la formación de los grupos alcóxidos **C**, cuyos oxígenos al introducir nuevamente su par de electrones se libera dos iones cloruros al medio, para formar la diamida **2**, a pesar de que esto implique una total desactivación del nitrógeno con respecto a su nucleoficidad.

6. Discusión de Resultados

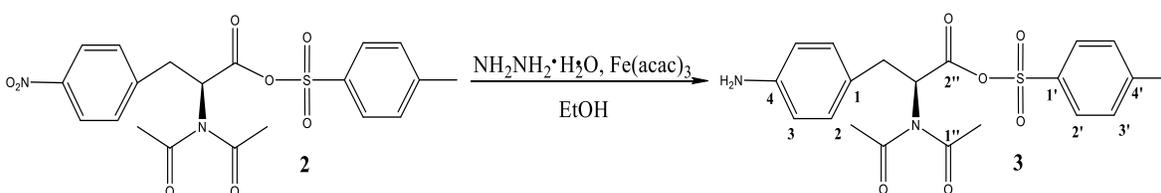


Esquema 18. Mecanismo de reacción para la amidificación del compuesto **1**.

Una vez obtenido y caracterizado por todas las técnicas espectroscópicas el compuesto **2** se procedió a realizar la reducción del grupo nitro.

6.3. (3) (2S)-2-diacetamido-3-(4-aminofenil)propanoato de *p*-toluensulfonilo.

La reducción del grupo nitro del compuesto **2** se llevó a cabo en EtOH anhidro con Hidrato de Hidrazina y $\text{Fe}(\text{acac})_3$, para obtener el (2S)-2-diacetamido-3-(4-aminofenil)propanoato de *p*-toluensulfonilo **3** como un sólido color café claro, con un rendimiento del 83 % (Esquema 19).



Esquema 19. Síntesis del compuesto **3**.

De igual manera el compuesto **3** se caracterizó por RMN de ^1H (Figura 14), en el espectro se observa a δ_{H} 2.29 la señal simple del grupo CH_3 del *p*-TsO, seguido de la señal simple a δ_{H} 3.17, correspondiente a los grupos metilos de amidas y el grupo metileno, mientras que la señal triple del grupo metino unido a la diamida se encuentra a δ_{H} 3.96 con constante de acoplamiento de $J = 6.6$ Hz. Las señales dobles a δ_{H} 7.13 y 8.17 con constantes de acoplamiento de $J = 7.8$ Hz, $J = 8.4$ Hz,

6. Discusión de Resultados

que corresponden a los protones de los anillos aromáticos 3' y 3 respectivamente, a δ_H 7.50 una señal doble con constante de acoplamiento de $J= 8.1$ Hz se asignó a los protones de los anillos aromáticos 2 y 2'. Finalmente se observa una señal a δ_H 9.10 para los protones de la amina.

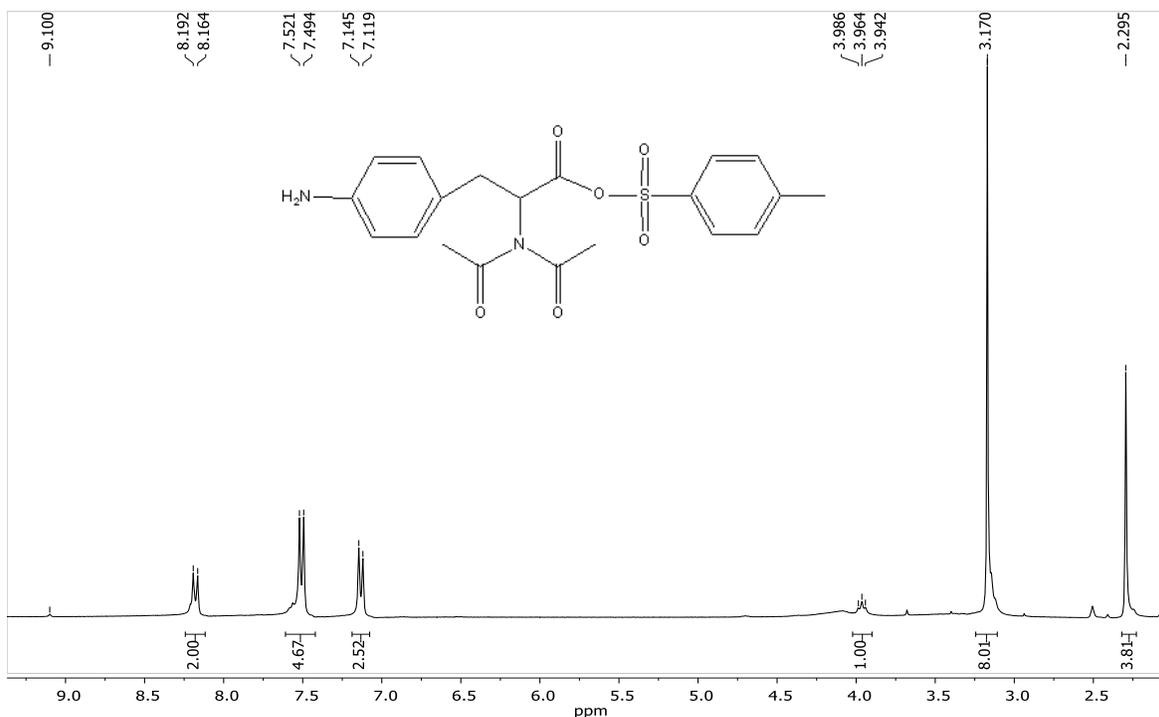


Figura 14. Espectro de RMN de 1H del compuesto **3** en DMSO- d_6 a 300 MHz.

De igual manera se obtuvo el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 15), a δ_c 21.3 se observa la señal asignada al grupo CH_3 del *p*-TsO, seguida de la señal para el grupo CH_2 unido a la anilina, a δ_c 37.1. A δ_c 52.6 se observa la señal de los grupos CH_3 de la diamida, mientras que a δ_c 53.3 se encuentra la señal correspondiente al grupo CH , a δ_c 124.1, 126.1, 128.7, 131.5, se encuentran las señales de los carbonos de los anillos aromáticos 3, 2', 3', 2 respectivamente. A δ_c 138.4, 143.6, 145.9, 147.5 se encuentran las señales de los carbonos *ipso* 1', 1', 4', 4 respectivamente y finalmente a δ_c 166.8 y 167.5 se observan las señales de los carbonos de los grupos carbonilos 1'', 2'' respectivamente.

6. Discusión de Resultados

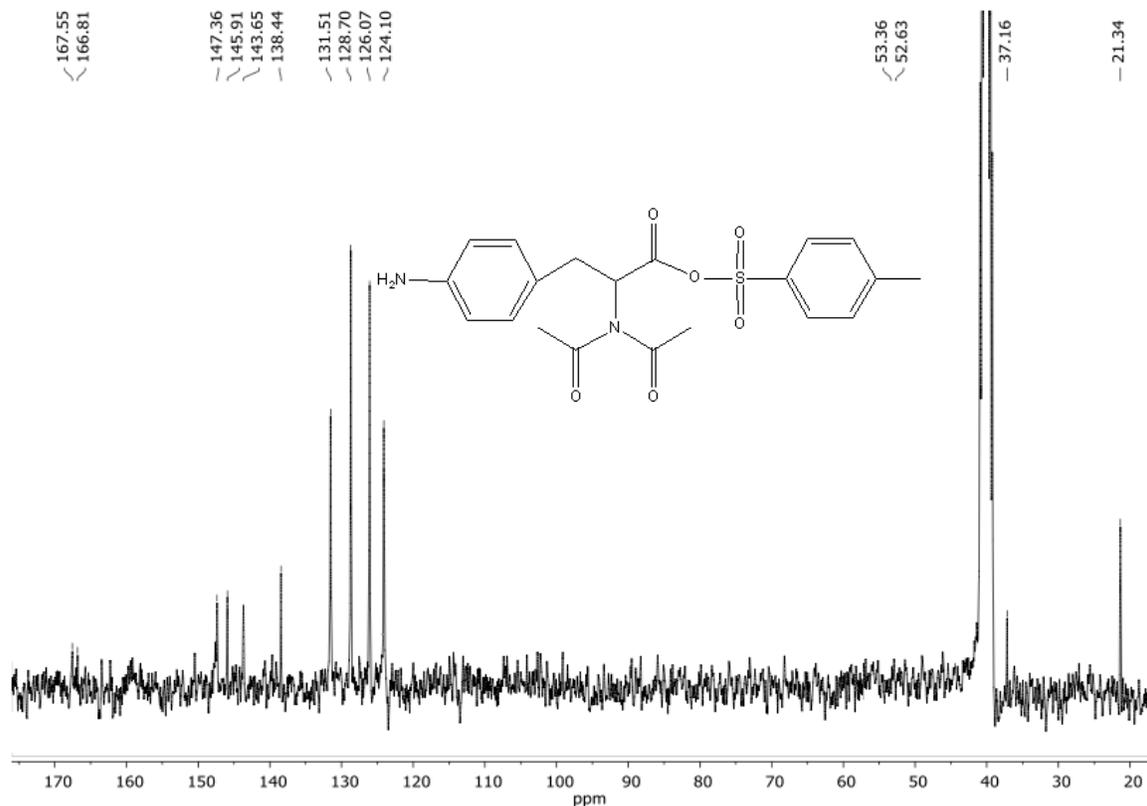
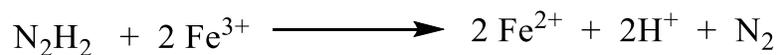
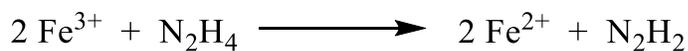


Figura 15. Espectro de RMN de ¹³C del compuesto **3** en DMSO-d₆ a 75 MHz.

En espectrometría de masas, éste compuesto presentó un pico a 449.2 m/z, el cual corresponde al ión molecular M⁺ del compuesto **3**, más una molécula de N₂H₂, debido al exceso de hidracina agregada sobre la cantidad de Fe(acac)₃.

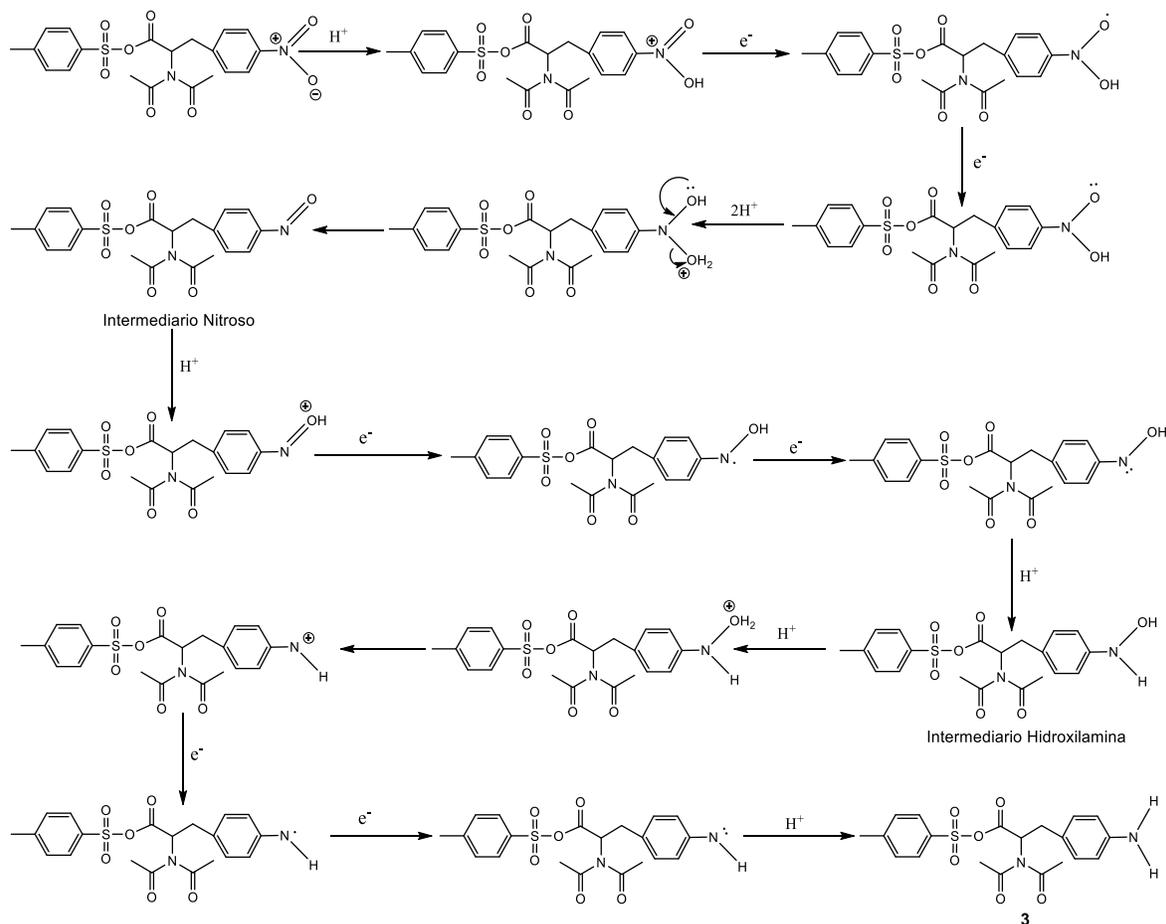
El mecanismo de reacción que ocurre para la reducción del grupo nitro del compuesto **2**, es por medio de 2 pasos, el primero donde se oxida la hidracina a nitrógeno molecular, cuya reacción (Esquema 20) es la fuente de protones y electrones necesarios para la reducción del grupo nitro.



Esquema 20. Reacción de oxidación de la hidracina.

6. Discusión de Resultados

Mientras que en el segundo paso utiliza éste medio para formar el intermediario nitroso y posteriormente el intermediario hidroxilamina, para finalmente obtenerse el compuesto **3**, como se muestra en el esquema 21³⁴.



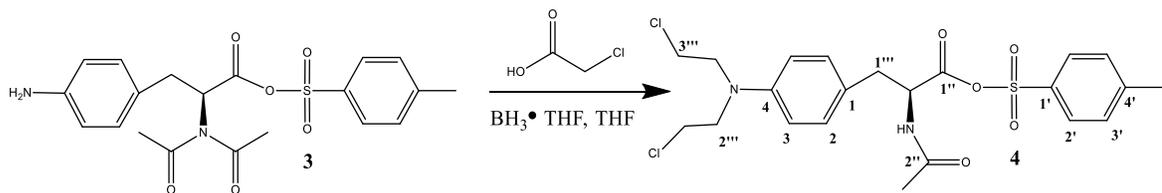
Esquema 21. Mecanismo de reacción de la aminación reductiva³⁴.

Una vez obtenido y caracterizado por todas las técnicas espectroscópicas el compuesto **3** se procedió a realizar la obtención del compuesto dicloroetilado.

6. Discusión de Resultados

6.4 (4) (2S)-2-acetamido-3-{4-[bis(2-cloroetil)amino]fenil}propanoato de *p*-toluensulfonilo.

Para realizar la dietilcloración, se disolvió el compuesto **3** en THF, añadiendo el ácido cloroacético y el complejo $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$, finalizando la reacción con MeOH y ajustando el pH con K_2CO_3 , se obtuvo el (2S)-2-acetamido-3-{4-[bis(2-cloroetil)amino]fenil}propanoato de *p*-toluensulfonilo **4**, como un líquido café muy viscoso, con un rendimiento del 69 % (Esquema 22).



Esquema 22. Síntesis del compuesto **4**.

En el espectro de RMN de ^1H del compuesto **4**, se observa a δ_{H} 1.41 una señal simple perteneciente al grupo CH_3 de la amida, seguido de la señal simple a δ_{H} 2.38 asignada al grupo CH_3 del *p*-TsO, así mismo a δ_{H} 3.28 se observa la señal simple correspondiente al $\text{CH}_2^{1''}$, mientras que a δ_{H} 4.10 se encuentra otra señal simple asignada a los grupos metilenos $2'''$ y $3'''$, a δ_{H} 3.78, se encuentra una señal triple con constante de acoplamiento $J = 6.7$ Hz que corresponde al grupo CH unido a la amida. Posteriormente se encuentra a δ_{H} 7.25 y 7.72 las señales dobles con constantes de acoplamiento de $J = 6.0$ Hz para ambos, los cuales se asignaron a los protones $3'$ y $2'$ del anillo aromático respectivamente, mientras que las señales dobles de dobles a δ_{H} 7.60 y 8.20 con constantes de acoplamiento de $J = 5.6$ Hz y $J = 5.4$ Hz, pertenecen a los protones 2 y 3 del anillo aromático respectivamente (Figura 16).

6. Discusión de Resultados

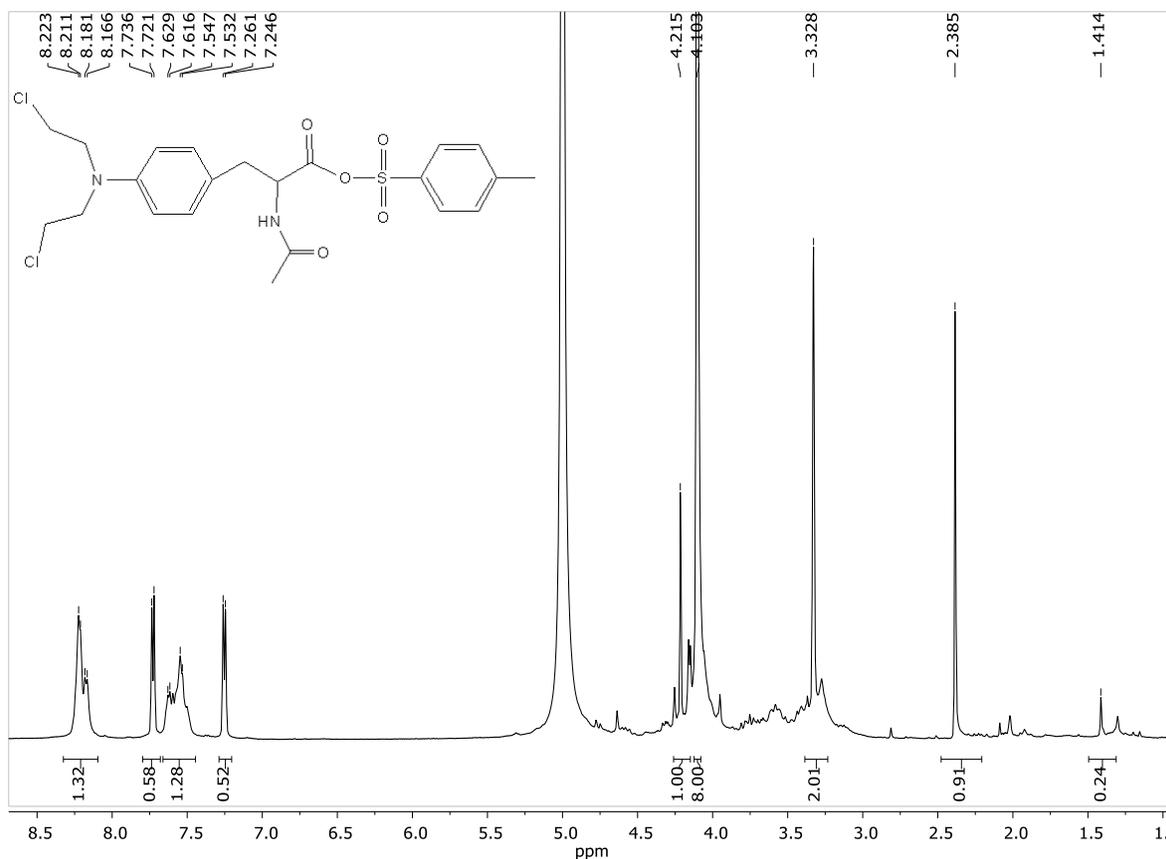


Figura 16. Espectro de RMN de ¹H del compuesto **4** en MeOD a 400 MHz.

A su vez el espectro de RMN de ¹³C (Figura 17) del compuesto **4**, presenta una señal a δ_c 19.9 asignada al grupo CH₃ del *p*-TsO, seguida de la señal a δ_c 24.6 para el grupo CH₃ de la amida, mientras que a δ_c 36.6, 41.6, 59.4, se encuentran las señales correspondientes a los metilenos 1''', 2''' y 3''' respectivamente. Así la señal a δ_c 52.3 se asigna al grupo CH unida a la amida, por lo que a δ_c 123.5, 125.5, 128.4 y 130.5, se observan las señales de los carbonos 3, 2', 3' y 2 respectivamente. Además de que las señales de los carbonos *ipso* 1' y 4 se muestran a δ_c 140.4 y 147.4 respectivamente. A δ_c 141.9 se observa la señal de los carbonos *ipso* 1 y 4'. Finalmente a δ_c 170.8 y 175.1 se observan las señales de los carbonos de los grupos carbonilos 1'' y 2'' respectivamente.

6. Discusión de Resultados

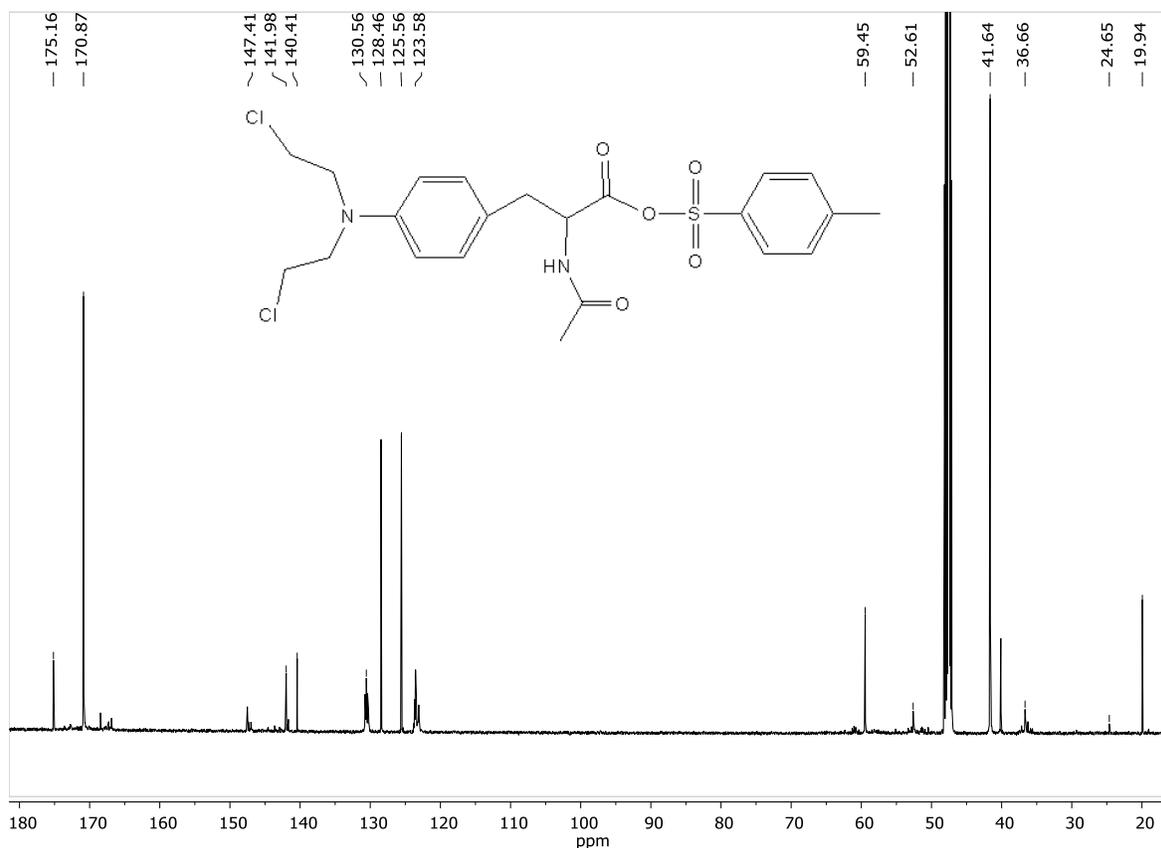
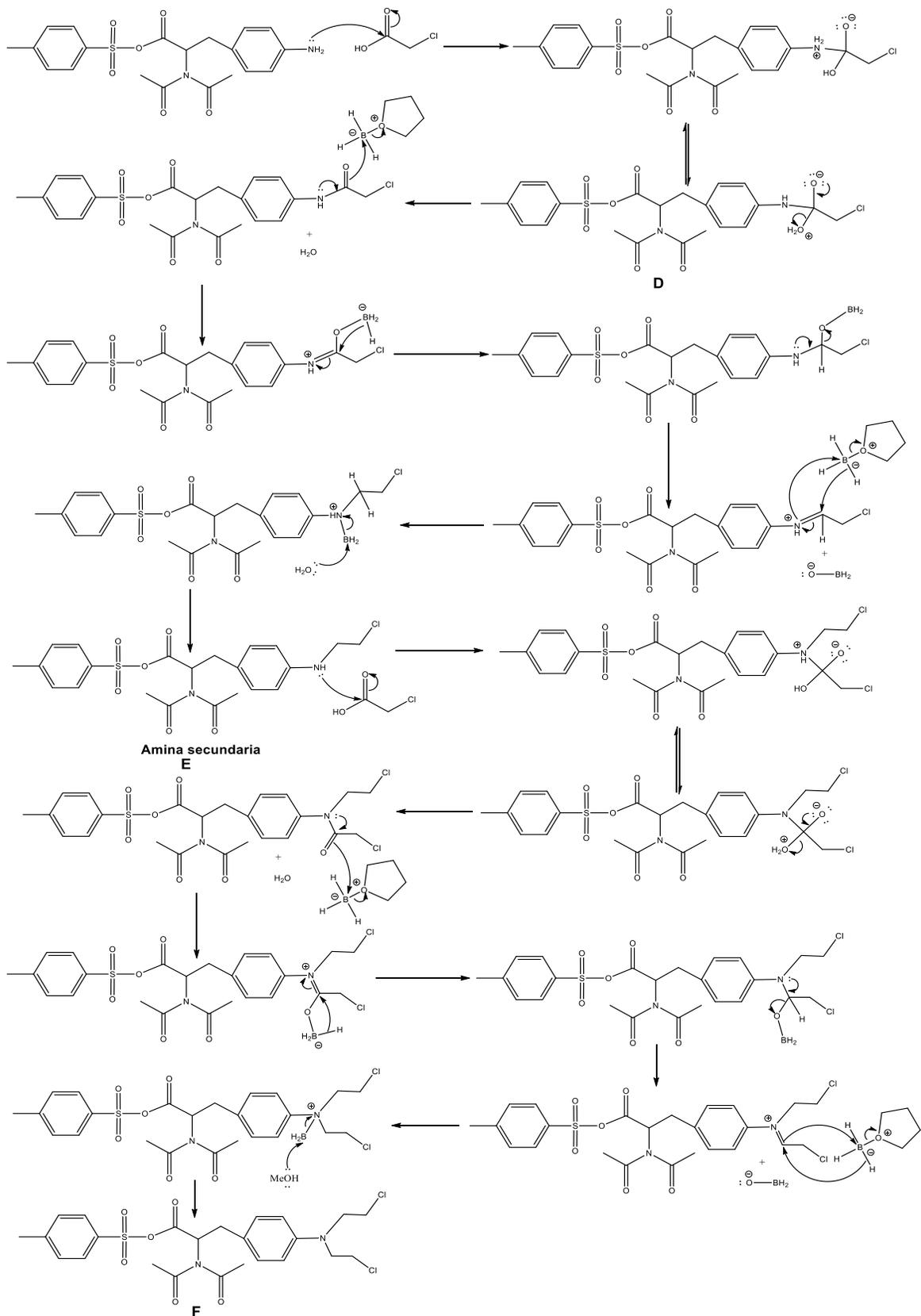


Figura 17. Espectro de RMN de ¹³C del compuesto **4** en MeOD a 100 MHz.

Para el compuesto **4** su estructura fue confirmada por espectrometría de masas, por impacto electrónico, en el que se presenta un pico a 523.0 m/z, el cual corresponde al ión molecular del compuesto **4** y Na.

El mecanismo de reacción para la formación del compuesto **4** (Esquema 23), se presenta el ataque nucleofílico por parte de la amina del anillo aromático al carbono del grupo carboxílico del ácido cloroacético (ACA), formándose el intermediario alcóxidos **D** y mediante un equilibrio ácido-base se genera una molécula de agua como buen grupo saliente, dando como resultado la primera amida **E**, la cual es reducida por el complejo BH₃·THF, obteniéndose la amina secundaria, la cual será más nucleofílica debido al efecto inductivo del cloroetilo, por lo que sucederá el mismo proceso con otra molécula del ácido cloroacético, para formarse la mostaza nitrogenada **F**.

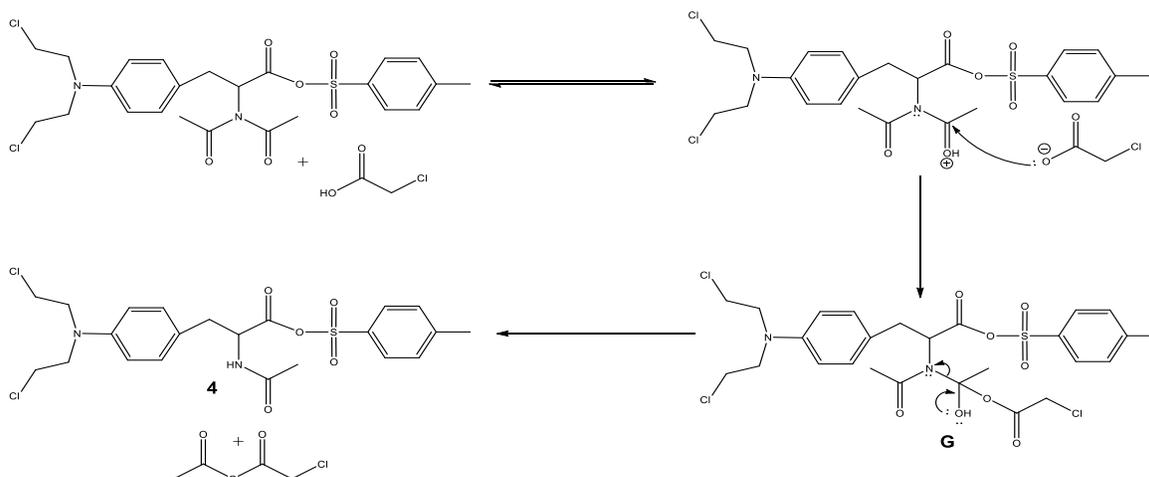
6. Discusión de Resultados



Esquema 23. Mecanismo de reacción para la dicloroetilación del compuesto 3.

6. Discusión de Resultados

Al término de la reacción se observó que, debido al exceso del ácido cloroacético, es que se lleva a cabo la hidrólisis de una de las amidas del compuesto **3**, lo cual explica el desplazamiento químico de los protones del CH₃, en RMN de ¹H (Figura 16), cuya señal se asignó mediante HMBC y HSQC. Por lo que en el esquema 24 se propone el mecanismo de reacción que realiza el ácido cloroacético, en el cual por un equilibrio ácido-base, se activa uno de los carbonilos de las amidas y por un ataque nucleofílico se forma el intermediario **G**, el cual por la protonación del nitrógeno se rompe el enlace C-N, formándose el compuesto **4**.



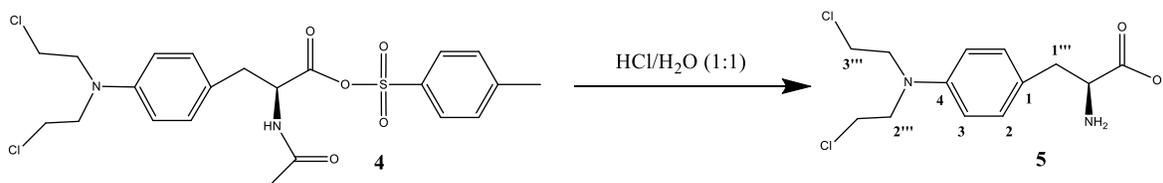
Esquema 24. Mecanismo de reacción para la hidrólisis de amida.

Una vez obtenido y caracterizado por todas las técnicas espectroscópicas el compuesto **4** se procedió a realizar la hidrólisis de los grupos protectores para la obtención del melfalán.

6. Discusión de Resultados

6.5 (5) Ácido (2S)-2-amino-3-{4-[bis(2-cloroetil)amino]fenil}propanoico.

Para la obtención del melfalán se hidrolizaron los grupos protectores del compuesto **4**, utilizando una mezcla de HCl/H₂O 1:1. Posteriormente se trató con carbón activado, ajustando su pH con Na₂CO₃ y suspendiendo en acetona se obtuvo el Ácido (2S)-2-amino-3-{4-[bis(2-cloroetil)amino]fenil}propanoico **5**, como un sólido de color café, con un rendimiento del 55 %, esquema 25.



Esquema 25. Obtención del Melfalán.

El compuesto **5** se caracterizó inicialmente por RMN de ¹H, cuyo espectro (Figura 18) muestra a δ_H 3.15 una señal simple para los protones de los grupos CH₂ en las cadenas cloroetílicas, una señal doble de dobles de dobles a δ_H 3.29 con constantes de acoplamiento *J*= 6.3, 18.0 Hz, para el metileno 1''', seguido de una señal triple a δ_H 3.39 con constante de acoplamiento *J*= 3.0 Hz correspondiente al grupo metino unido a la amina. Posteriormente se encuentran los protones en la posición 2 del anillo aromático, a δ_H 7.65 con constante de acoplamiento de *J*= 8.7 Hz, una señal doble a δ_H 7.50 el cual no se pudo asignar y lo consideramos una impureza (probablemente del cloruro de tosilo u otra impureza). Seguido de un doble a δ_H 8.16 con constante de acoplamiento *J*= 8.7 Hz, pertenece a los protones del anillo aromático, mientras que a δ_H 8.65 se observa una señal ancha probablemente otra impureza. Finalmente a δ_H 10.71 se encuentra la señal simple del protón ácido del grupo carboxílico.

6. Discusión de Resultados

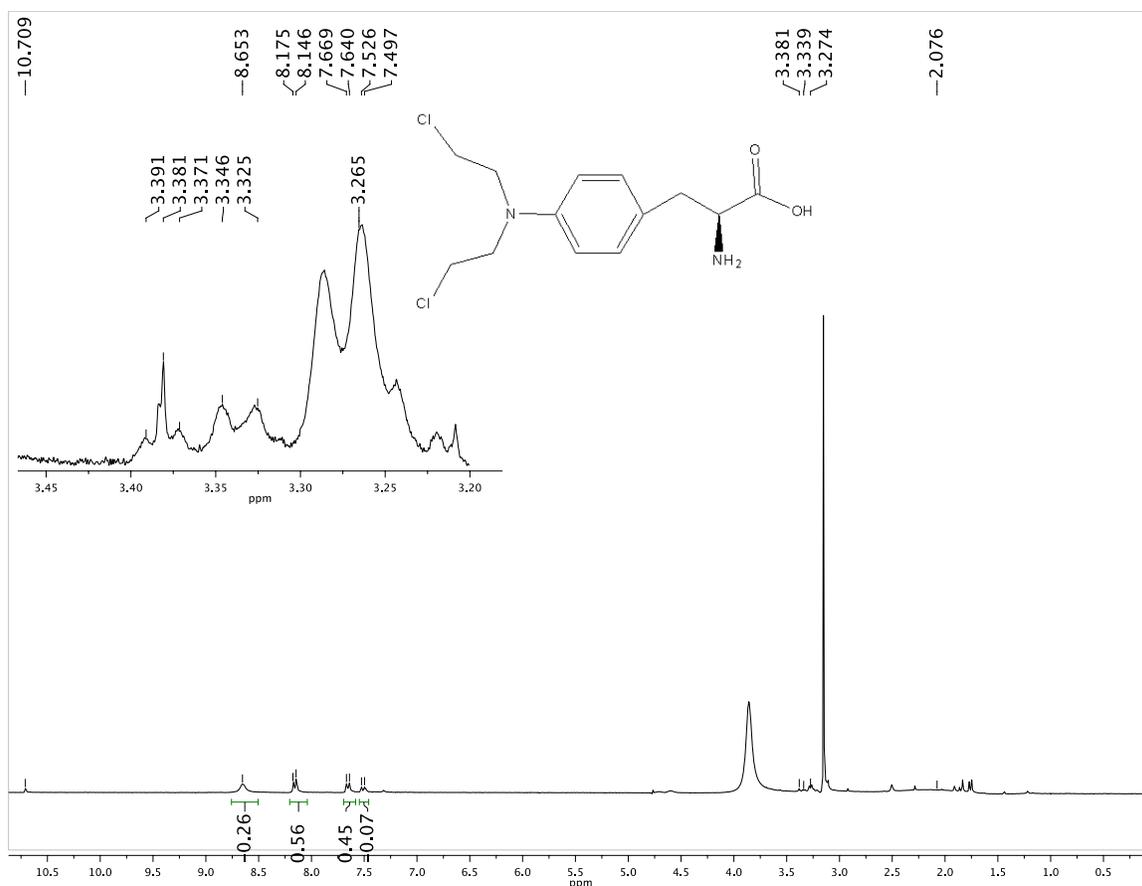


Figura 18. Espectro de RMN de ^1H del compuesto **5** en DMSO-d_6 a 300 MHz.

El espectro de RMN de ^{13}C (Figura 19) del compuesto **5**, muestra a δ_c 37.1 la señal perteneciente al grupo $\text{CH}_2^{1''}$, mientras para las señales de los grupos metileno $2''$ y $3''$ de las cadenas alifáticas se encuentran a δ_c 40.0 y 49.4, seguidos de la señal a δ_c 52.3 para el grupo CH unido a amina. Además las señales para los carbonos 3 y 2 del anillo aromático a δ_c 123.9 y 131.7 respectivamente y las señales de los carbonos *ipso* 1 y 4 se observan a δ_c 143.9 y 147.2 respectivamente. Finalmente a δ_c 176.8 se encuentra la señal asignada al carbono del carbonilo del grupo carboxílico.

6. Discusión de Resultados

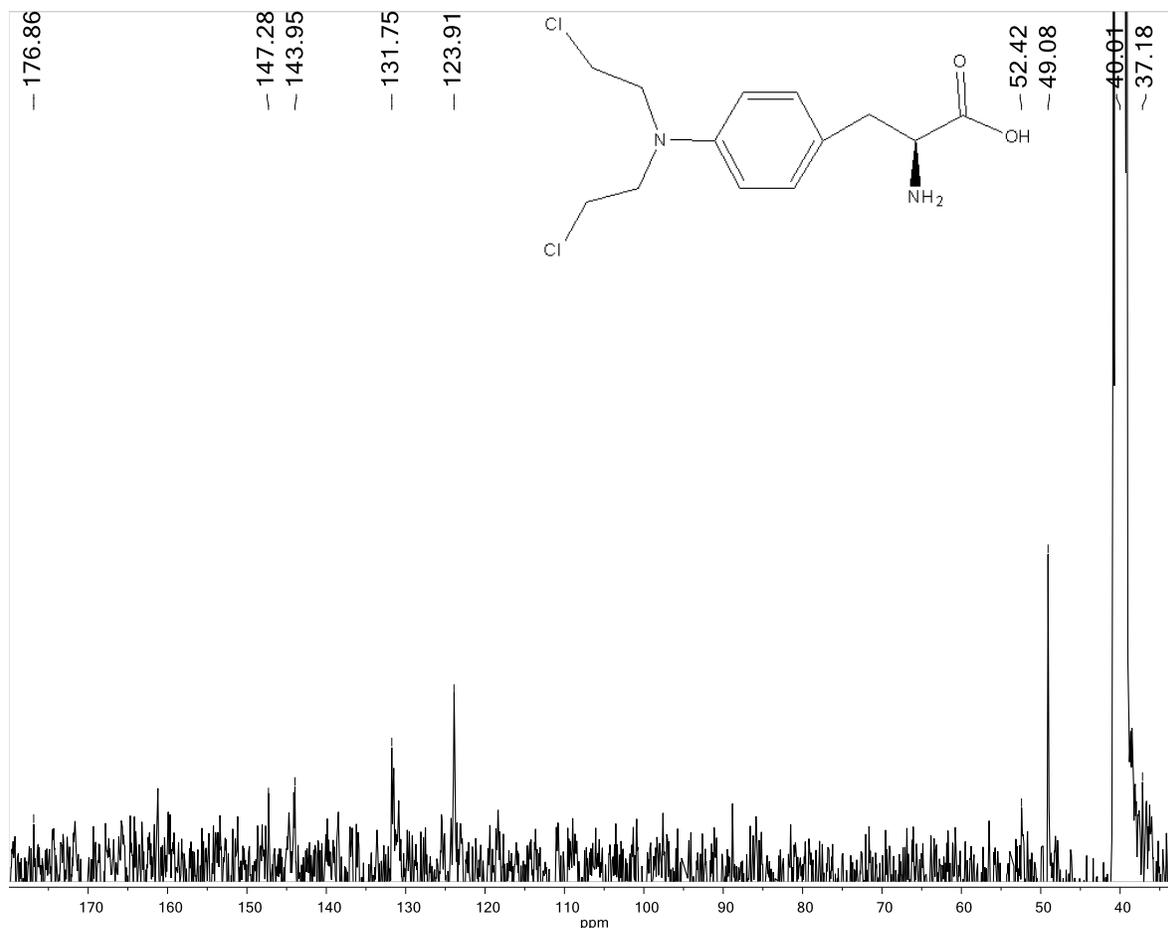
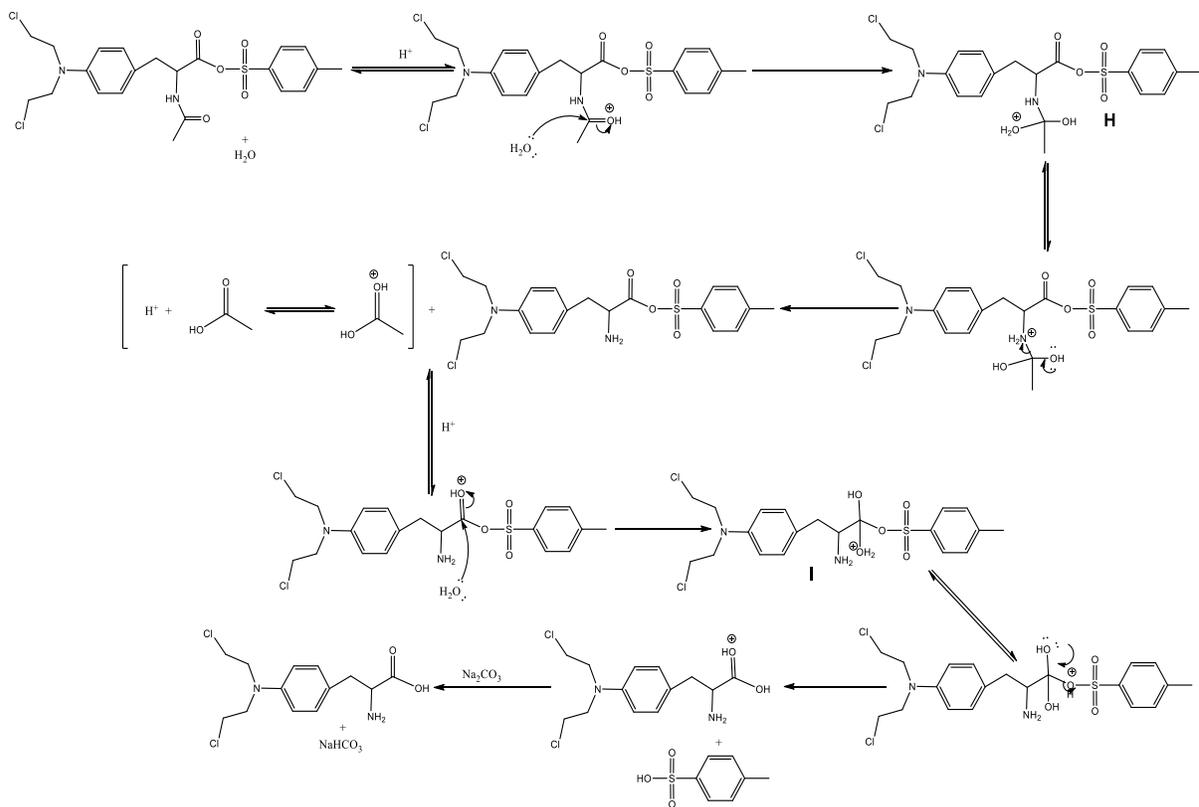


Figura 19. Espectro de RMN de ¹³C del compuesto **5** en DMSO-d₆ a 75 MHz.

Finalmente se confirmó su estructura por espectrometría de masas por impacto electrónico en el que se observó un pico a 305 m/z, el cual corresponde al ión molecular del compuesto **5**.

El mecanismo de reacción para la hidrólisis de los grupos protectores correspondientes de la amina y el carboxilo se muestra en el esquema 26, el cual consiste en la activación de los grupos carbonilos por medio de equilibrios ácido-base, para ser atacados nucleofílicamente por moléculas de agua, formando los intermediarios dioles **H** y **I**. Posteriormente se rompen las uniones C-N, C-O, liberándose ácido acético y ácido *p*-toluensulfónico, por lo que al ajustar el pH con Na₂CO₃ se forma el compuesto **5**, correspondiente al melfalán.

6. Discusión de Resultados



Esquema 26. Mecanismo de reacción para la hidrólisis de los grupos protectores.

Finalmente al obtener el compuesto **5** se procedió a caracterizarlo por todas las técnicas espectroscópicas, concluyendo de esta manera la ruta sintética del melfalán.

A éste compuesto se le realizaron una serie de lavados con 40 mL acetona en tres ocasiones, obteniéndose un polvo blanco, el cual se volvió a caracterizar y el espectro de resonancia magnética nuclear de ^1H se muestra en la figura 20.

6. Discusión de Resultados

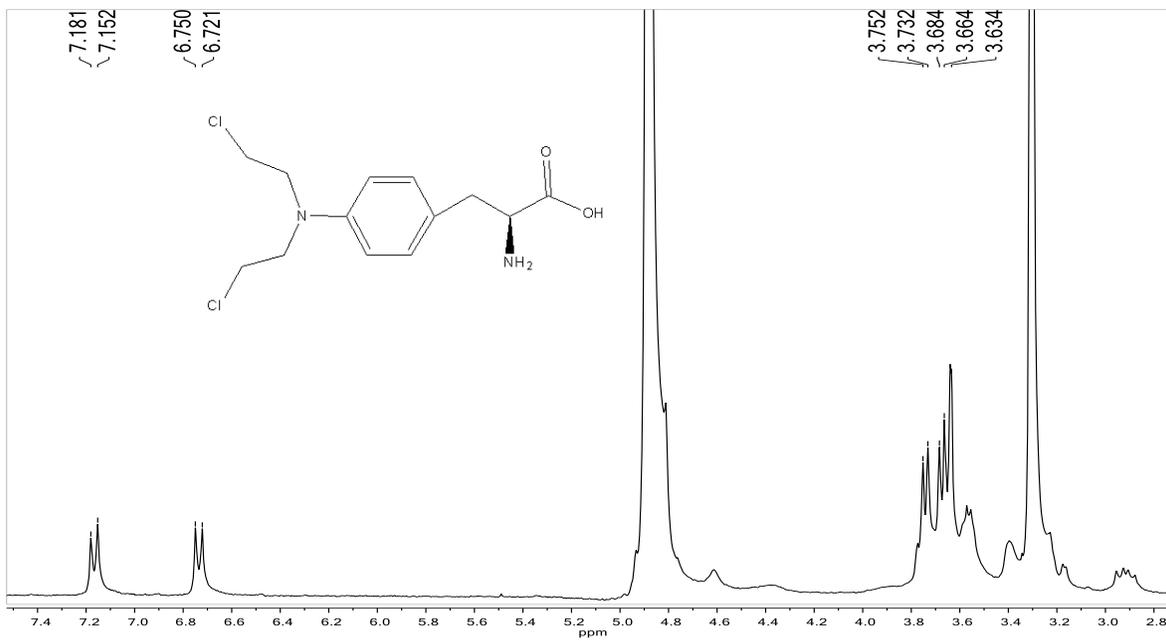


Figura 20. Espectro de RMN de ¹H del melfalán **5** en MeOD a 300 MHz después.

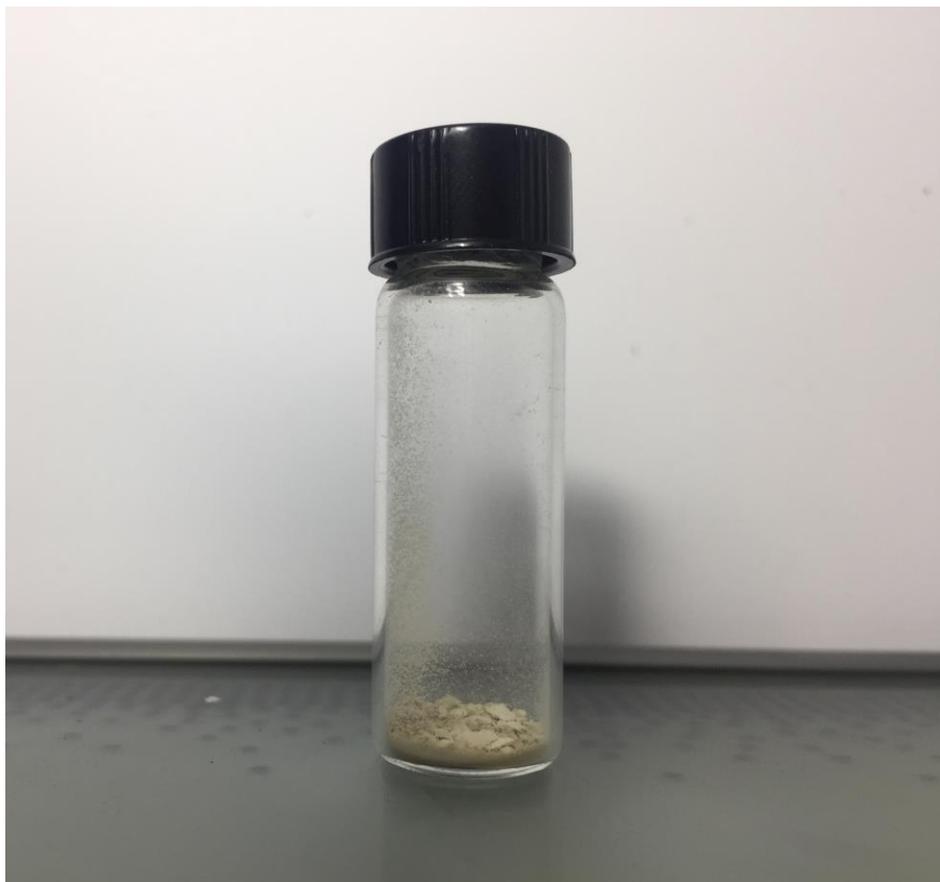


Figura 21. Melfalán.

7. Conclusiones

7. Conclusiones

- Se realizó la síntesis del (2S)-2-amino-3-(4-nitrofenil)propanoato de *p*-toluensulfonilo mediante la protección del grupo carboxilo de la 4-Nitro-L-fenilalanina con ácido *p*-toluensulfónico en tolueno y alcohol bencílico con buenos rendimientos.
- Se realizó la protección de la amina del (2S)-2-amino-3-(4-nitrofenil)propanoato de *p*-toluensulfonilo con exceso del cloruro de acetilo en etanol, y se obtuvo la diamida. Probablemente la formación de esta diamida ocurrió por un ataque simultáneo a dos moléculas del cloruro de acetilo. El producto ((2S)-2-diacetamido-3-(4-nitrofenil)propanoato de *p*-toluensulfonilo) de la reacción se obtuvo con buenos rendimientos.
- El grupo nitro del (2S)-2-diacetamido-3-(4-nitrofenil)propanoato de *p*-toluensulfonilo se redujo con hidrazina y Fe(acac)₃. El producto ((2S)-2-diacetamido-3-(4-aminofenil)propanoato de *p*-toluensulfonilo) de la reacción se obtuvo con buenos rendimientos, y no se observó un cambio en la isomería.
- Se realizó la síntesis de la mostaza nitrogenada ((2S)-2-acetamido-3-{4-[bis(2-cloroetil)amino]fenil}propanoato de *p*-toluensulfonilo) y se observó que el uso del ácido cloroacético genera la pérdida de un grupo acetilo.
- La desprotección de los dos grupos protectores se realizó en una sola etapa de síntesis para obtener el melfalán. El producto de la reacción se obtuvo con buenos rendimientos.
- Todos y cada uno de los compuestos obtenidos se caracterizaron por RMN de ¹H, ¹³C, espectroscopía de IR, Uv-Vis, espectrometría de masas y análisis elemental.

Se demostró que es posible obtener al melfalán empleando una nueva ruta sintética, en solo cinco etapas de síntesis (menores a las reportadas en la literatura) y con un mayor rendimiento total de 22.84 %.

8. Bibliografía

8. Bibliografía

1. Etemad L., Moshiri, M., & Balali-Mood, M. (2015). History of Use and Epidemiology of Mustard Compounds. En Basic and Clinical Toxicology of Mustard Compounds (pp. 27-47). Iran: Springer International Publishing.
2. Gilman, A. (1963). The initial clinical trial of nitrogen mustard. *The American Journal of Surgery*, 105, pp. 574-578.
3. Inturi, S., Tewari-Singha, N., Agarwala, C., Whiteb, C. & Agarwal, R. (2014). Activation of DNA damage repair pathways in response to nitrogen mustard-induced DNA damage and toxicity in skin keratinocytes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 163-164, pp. 53-63.
4. *Bendamustina*. abril 23,2017, de Chemocare Sitio web: <http://chemocare.com/es/chemotherapy/drug-info/bendamustina.aspx>
5. *Estramustina*. abril 23,2017, de Chemocare Sitio web: <http://chemocare.com/es/chemotherapy/drug-info/estramustina.aspx>
6. *Ciclofosfamida*. abril 23,2017, de Facultad de Medicina UNAM Sitio web: http://www.facmed.unam.mx/bmnd/gi_2k8/prods/PRODS/Ciclofosfamida.htm
7. *Ifosfamida*. abril 23,2017, de Facultad de Medicina UNAM Sitio web: http://www.facmed.unam.mx/bmnd/gi_2k8/prods/PRODS/Ifosfamida.htm
8. *Iomustina*. abril 23,2017, de Facultad de Medicina UNAM Sitio web: <http://chemocare.com/es/chemotherapy/drug-info/lomustine.aspx>
9. Bergsagel D.E., Sprague, C.C., Austin, C. & Griffith, K. M. (1962). Evaluation of new chemotherapeutic agents in the treatment of multiple myeloma. IV. L-Phenylalanine mustard. *Cancer Chemother Rep.*, 21, pp. 87-99.
10. Ashnagar, A., Gharib, N. & Darakhshanmehr, M. (2007). Synthesis and Elucidation of 4-bis(Chloroethyl)-amino-L-phenylalanine. *Asian Journal of Chemistry*, 19, pp. 5399-5406.
11. Bayraktar, U.D., Bashir, Q., Qazilbash, M., Champlin, R.E., & Ciurea, S.O. (2013). Fifty Years of Melphalan Use in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 19, pp. 344-356.
12. (2015). Melphalan. BC Cancer Agency Drug Manual, 1, pp. 1-9.

8. Bibliografía

13. Bergel, F. & Stock, J. A. (1954). Cyto-active amino-acid and peptide derivatives. Part I. Substituted phenylalanines. *Journal of Chemical Sciences*, pp.2409-2417.
14. Bergel, F., Burnop, V. C. E. & Stock, J. A. (1955). Cyto-active amino-acids and peptides. Part II. Resolution of para-substituted phenylalanines and synthesis of p-di-(2-chloroethyl)amino-DL-phenyl[14 C]alanine. *Journal of Chemical Sciences*, pp.1223-1230.
15. Biophore India Pharmaceuticals PVT. LTD. (2016). *An Improved Process for the Synthesis of Melphalan and the Hydrochloride Salt U.S. Patent No. US 2016/0016889 A1*. Balanagar, Hyderabad (IN): Google Patents.
16. Morris, A.D., Atassi, G., Guilbaud, N. & Cordi, A. A. (1996). The synthesis of novel melphalan derivatives as potential antineoplastic agents. *Eur. J. Med. Chem.*, 32, pp. 343-349.
17. Larden, A. W. & Cheung, H. T. A. (1996). Synthesis of N- α -Aminoacyl Derivatives of Melphalan for Potential Use in Drug Targeting. *Tetrahedron Letters*, 37, pp. 7581,7582.
18. Larden, A. W. & Cheung, H. T. A. (1998). Synthesis of α -Aminoacyl Derivatives of Melphalan for Use in Antibody Directed Enzyme Pro-drug Therapy. *Tetrahedron Letters*, 55, pp. 3265-3276.
19. Bielawski, K., Bielawska a, A., Sosnowska, K., Miltyk, W., Winnicka, K. & Jerzy Pałka, J. (2006). Novel amidine analogue of melphalan as a specific multifunctional inhibitor of growth and metabolism of human breast cancer cells. *Biochemical Pharmacology*, 72, pp. 320-331.
20. Rustizky J. (1873). Multiple myeloma. *Deutsch Z Chir.* 3, pp. 162-172.
21. Kahler O. (1889). Zur Symptomatologie des multiplen myeloms: Beobachtung von albuminurie. *Prog Med Wochnschr.* 14, pp. 33-45.
22. Wright J. H. (1900). A case of multiple myeloma. *Transactions of the Association of American Physicians.* 15, pp.137–147.
23. Wright J. H. (1900). A case of multiple myeloma. *Johns Hopkins Hospital Report.* 9, pp. 359–366.
24. Arinkin M. I. (1929). *Die intravitale Untersuchungsmethodik des Knochenmarks.* *Folia Haematologie.* 38, pp. 233–240.

8. Bibliografía

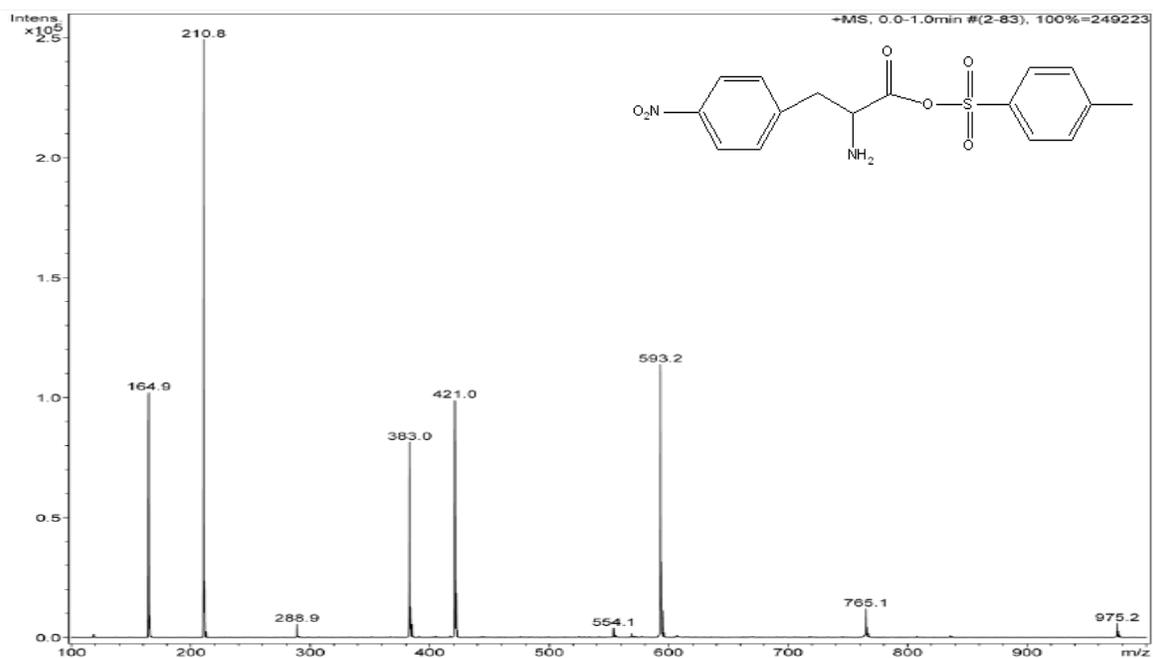
25. Rosenthal N. & Vogel P. (1938). Value of the sternal puncture in the diagnosis of multiple myeloma. *Journal of Mount Sinai Hospital*. 4, pp.1001-1019.
26. Longsworth L. G., Shedlovshy T. & Macinnes D. A. (1939). Electrophoretic patterns of normal and pathological human blood serum and plasma. *Journal of Experimental Medicine*. 70, pp. 399–413.
27. Diaz, J. C. (2016). Historia del mieloma múltiple. *Red. Biomed.*, 17, pp. 225-229.
28. Charlot, I., Salmon, J. H., Gagneux, L., Brochot, P. & Eschard, J. P. (2012). Mieloma múltiple. *Elsevier*, 45, pp. 1-13.
29. Marcussen, M., Bødker, J. S., Christensen, H. S., Johansen, P., Nielsen, S., Christiansen, I., & Johnsen, H. E. (2017). Molecular Characteristics of High-Dose Melphalan Associated Oral Mucositis in Patients with Multiple Myeloma: A Gene Expression Study on Human Mucosa. *PLoS One*, 12, pp. 1-18.
30. Novoa, A. (2014). Natural history of ovarian cancer. *ecancer*, 8, pp. 1-10.
31. De Picciotto, N., Cacheux, W., Roth, A., Chappuis, P. O. & Labidi-Galy, S. I. (2016). Ovarian cancer: Status of homologous recombination pathway as a predictor of drug response. *Critical reviews in oncology/hematology*, 101, pp. 50-59.
32. Green, J. A., Vistica, D. T., Young, R. C., Hamilton, T. C., Rogan, A. M., & Ozols, R. F. (1984). Potentiation of melphalan cytotoxicity in human ovarian cancer cell lines by glutathione depletion. *Cancer research*, 44, pp. 5427-5431.
33. Mougenot, P., Fabbro, M., Bressolle, F., Pouessel, D., Culine, S. & Pinguet, F. (2006). Phase II study of melphalan as a single-agent infused over a 24-hour period with individual adapted dosing in patients with recurrent epithelial ovarian cancer. *Oncology reports*, 15, pp. 237-241.
34. Widdowson, D. A. The Chemistry of Nitrogen Compunds. junio 11, 2017, Sitio web: http://www.ch.ic.ac.uk/widdowson/teach_files/nitrogen/dw1.html#4.6

9. Anexo

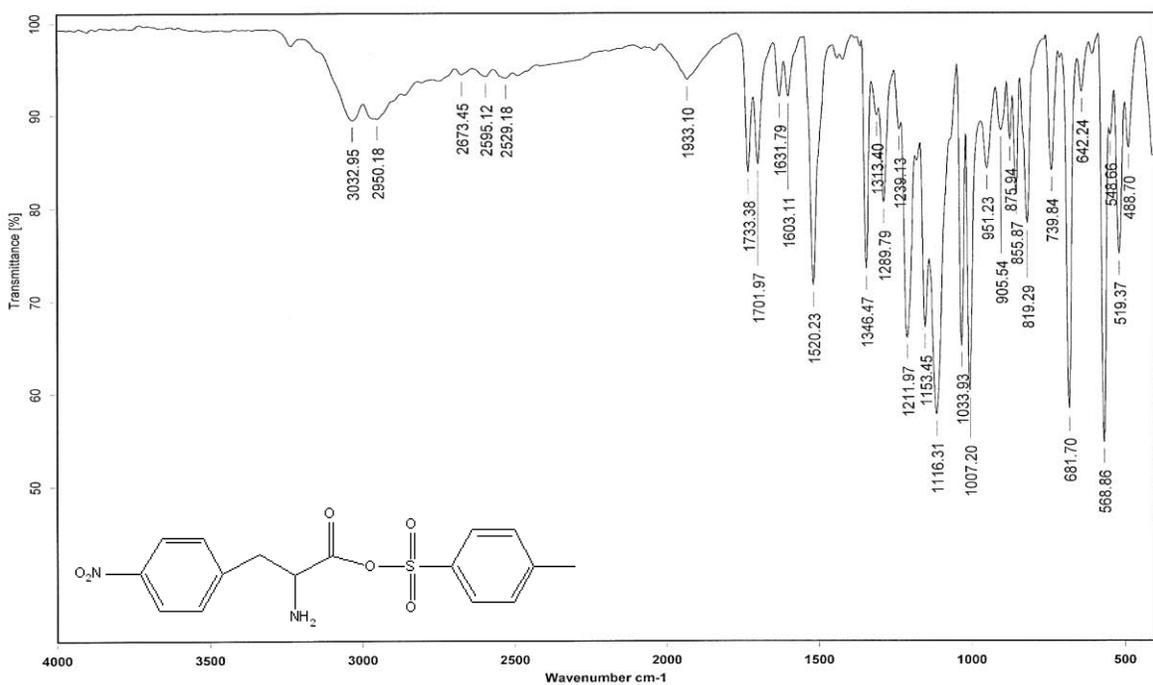
9. Anexo

9.1. (2S)-2-amino-3-(4-nitrofenil)propanoato de *p*-toluensulfonilo (1)

9.1.1. Espectrometría de masas



9.1.2. Espectro de FTIR

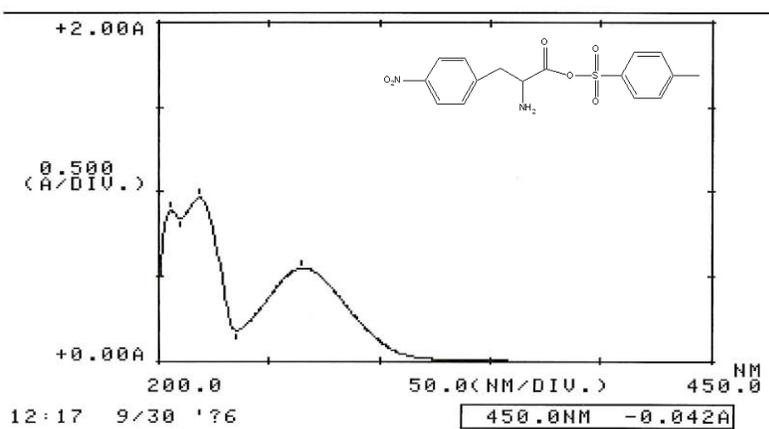


9. Anexo

9.2.3. Espectro de UV-Vis

*** PEAK-PICK ***

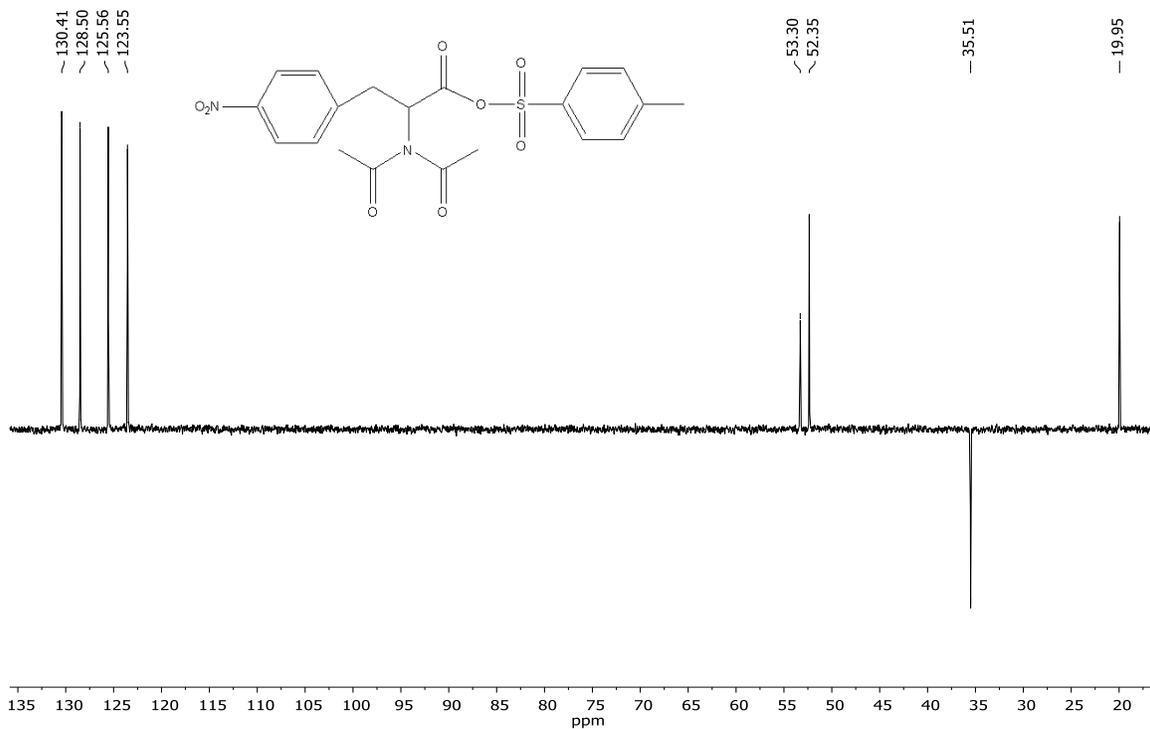
λ	ABS	λ	ABS
264.5	0.551	235.0	0.185
218.5	0.972	209.5	0.844
205.0	0.892		



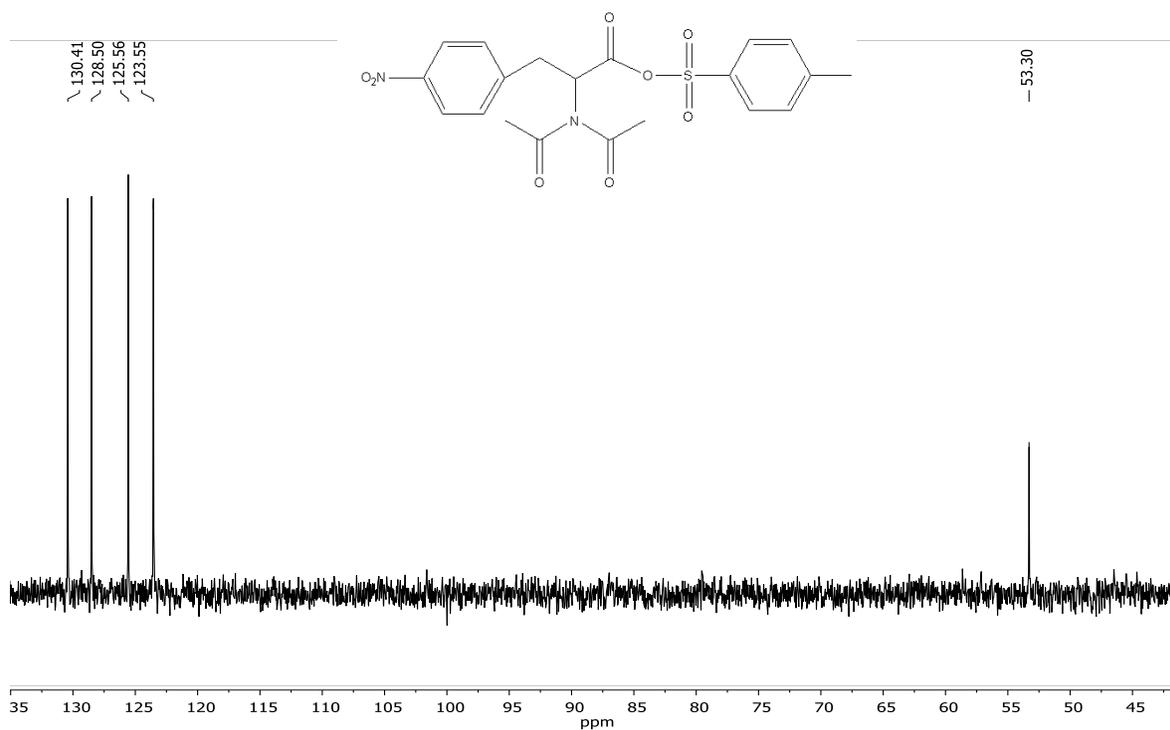
9. Anexo

9.2. (2S)-2-diacetamido-3-(4-nitrofenil)propanoato de *p*-toluensulfonilo (2)

9.2.1. Espectro de RMN DEPT 90

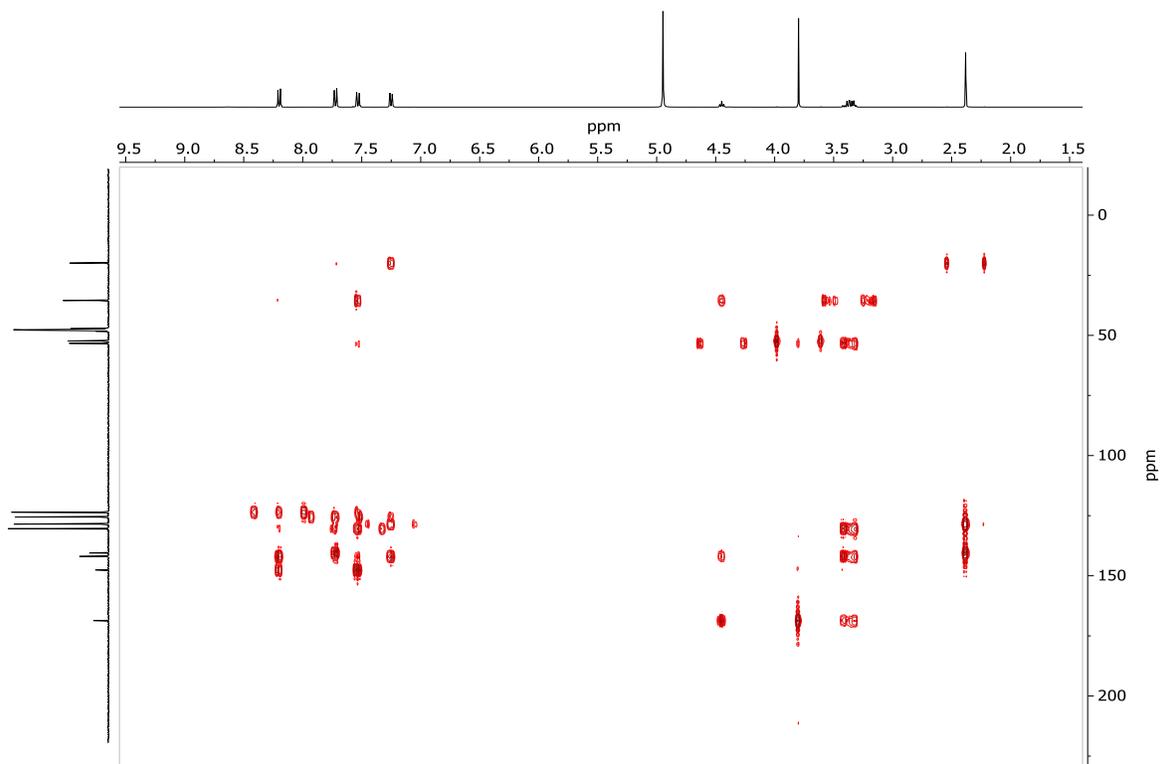


9.2.2. Espectro de RMN DEPT 135

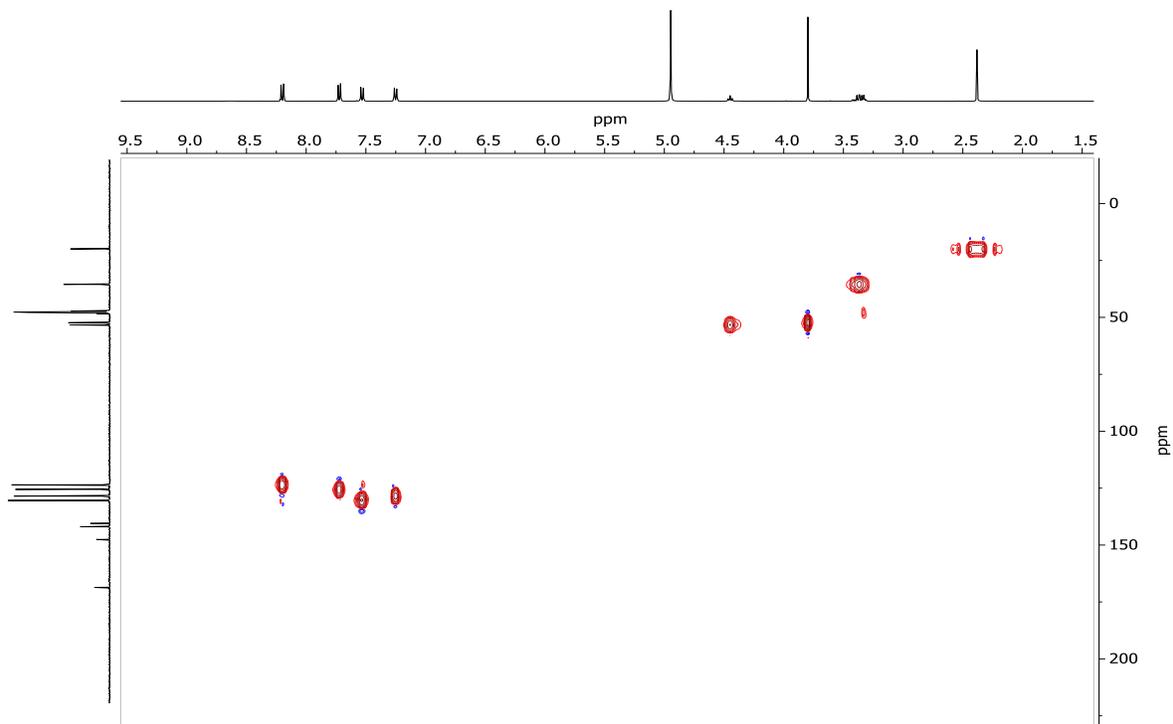


9. Anexo

9.2.3. Espectro de RMN HMBC

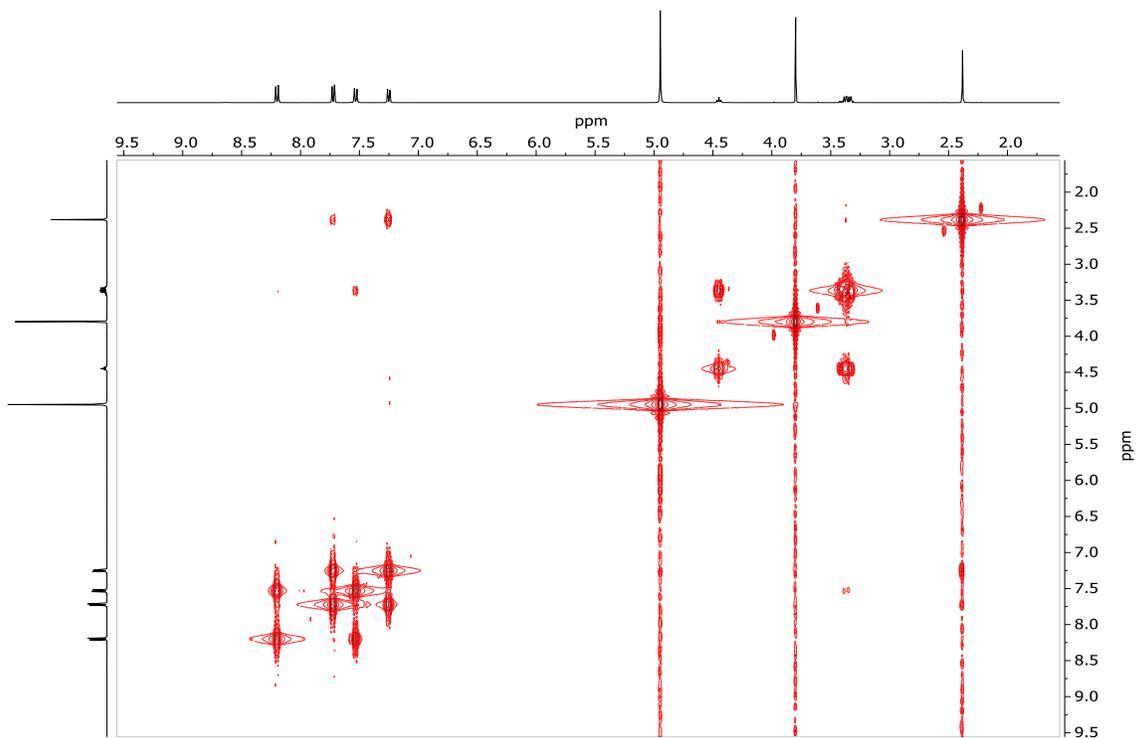


9.2.4. Espectro de RMN HSQC

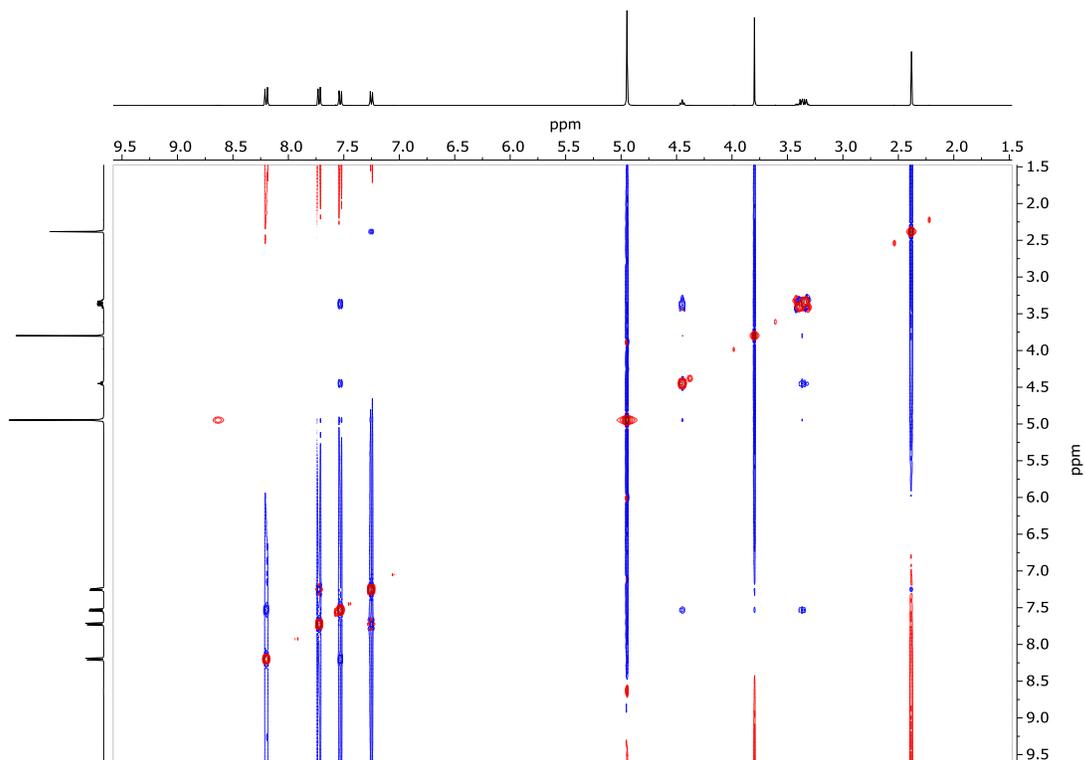


9. Anexo

9.2.5. Espectro de RMN COSY

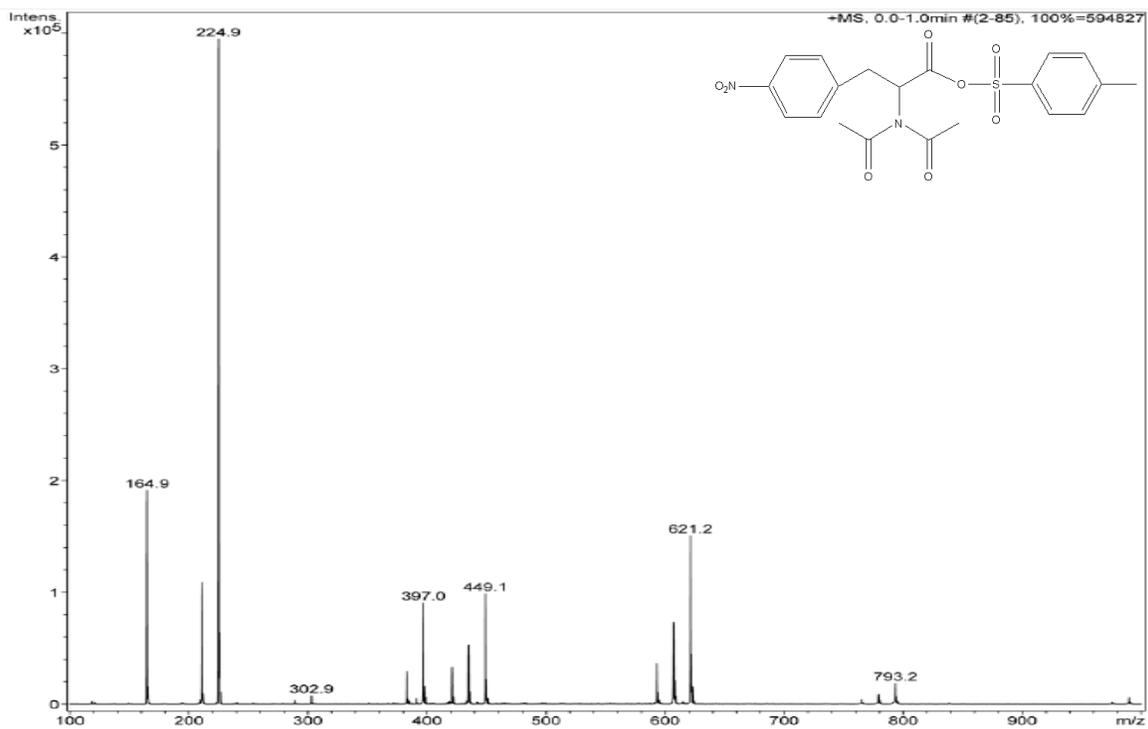


9.2.6. Espectro de RMN NOESY

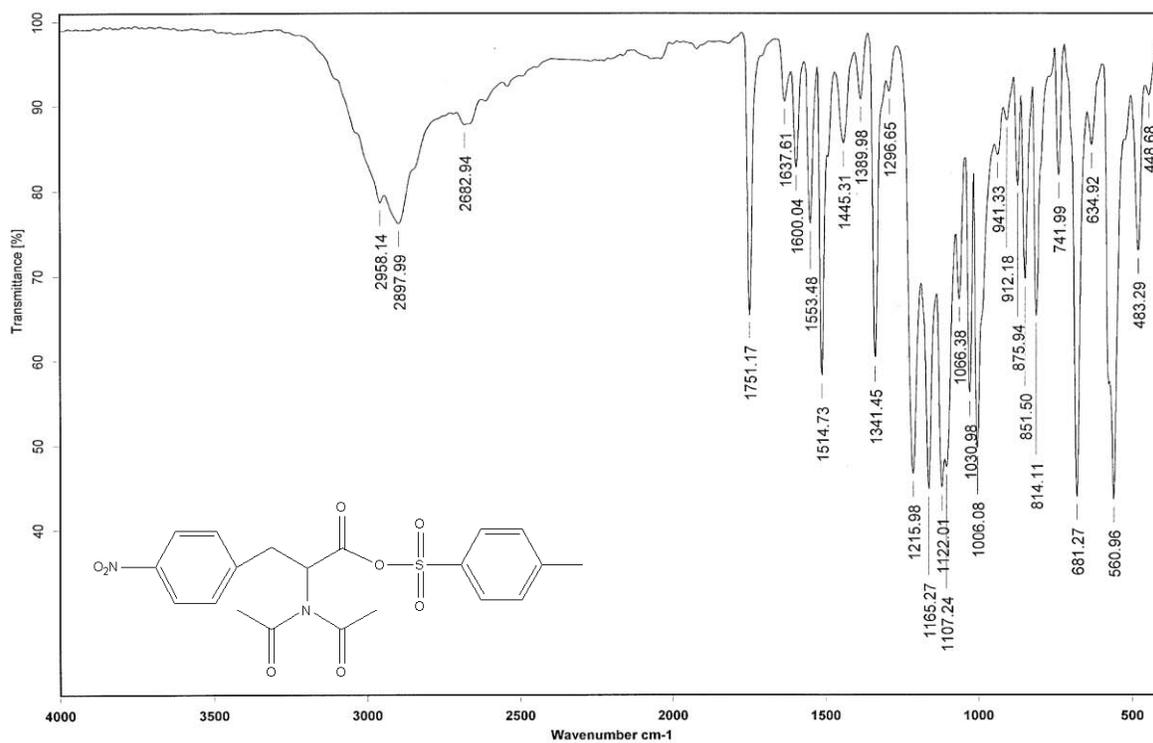


9. Anexo

9.2.7. Espectrometría de masas

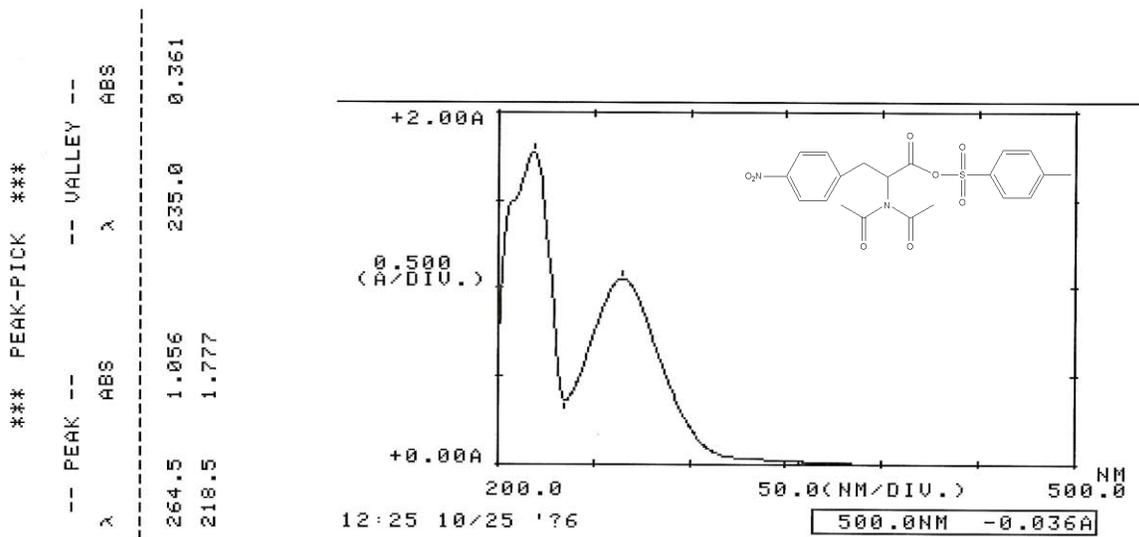


9.2.8. Espectro de FTIR



9. Anexo

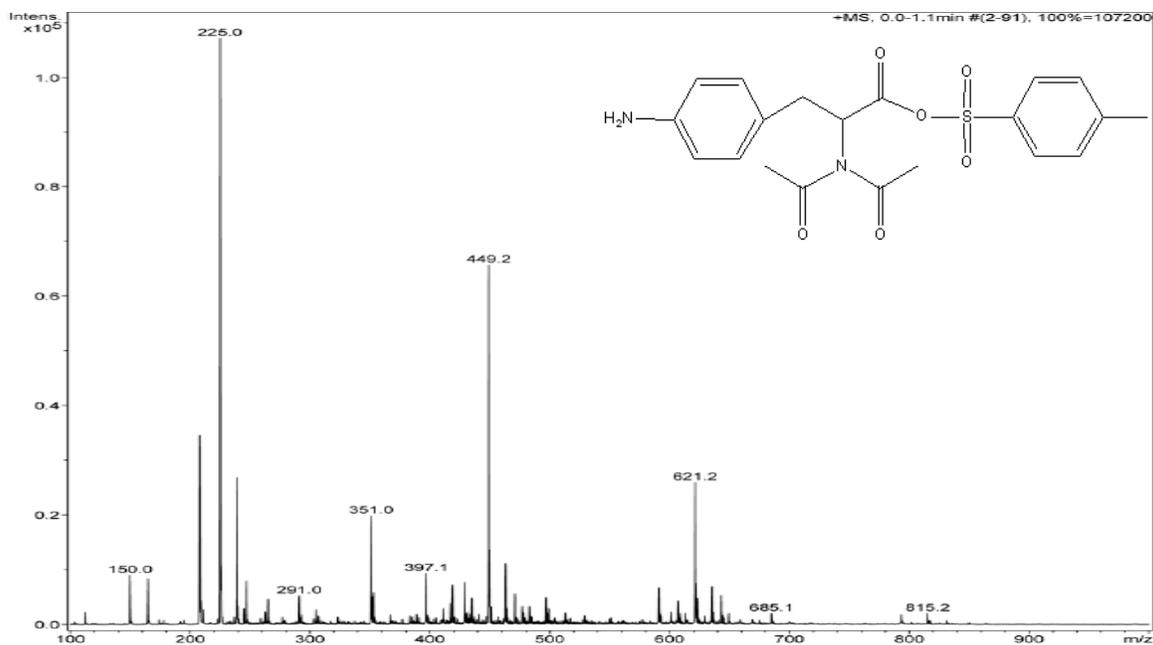
9.2.9. Espectro de UV-Vis



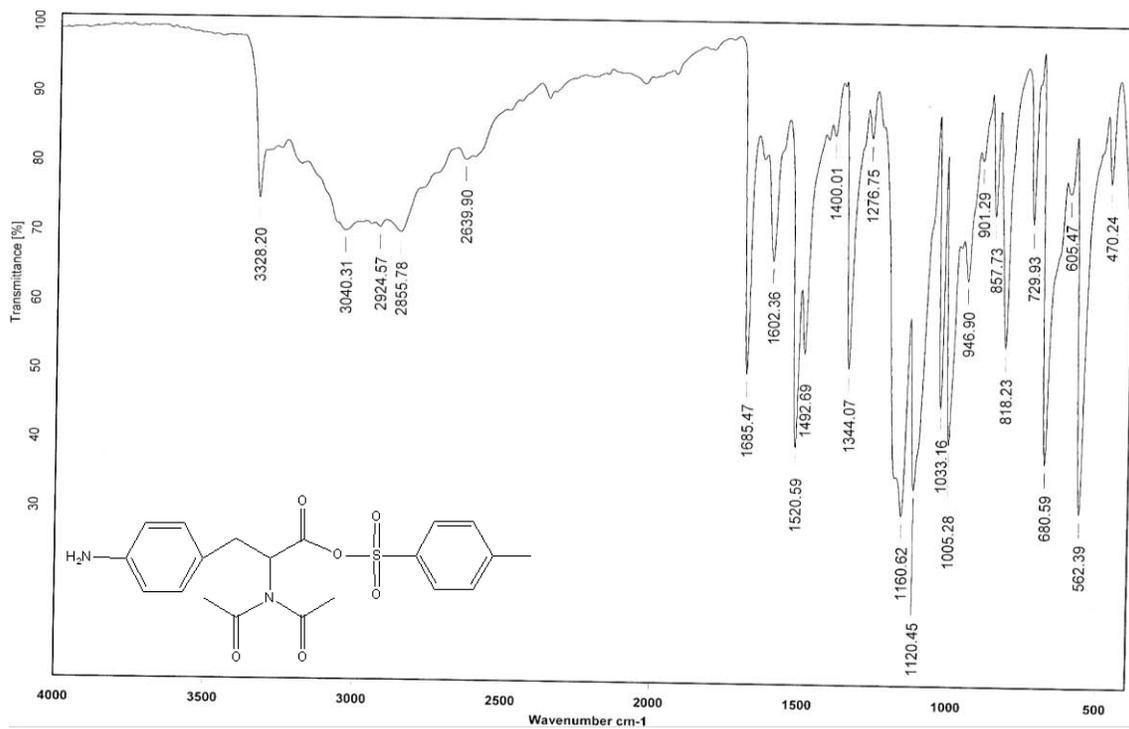
9. Anexo

9.3. (2S)-2-diacetamido-3-(4-aminofenil)propanoato de *p*-toluensulfonilo (3)

9.3.1. Espectrometría de masas



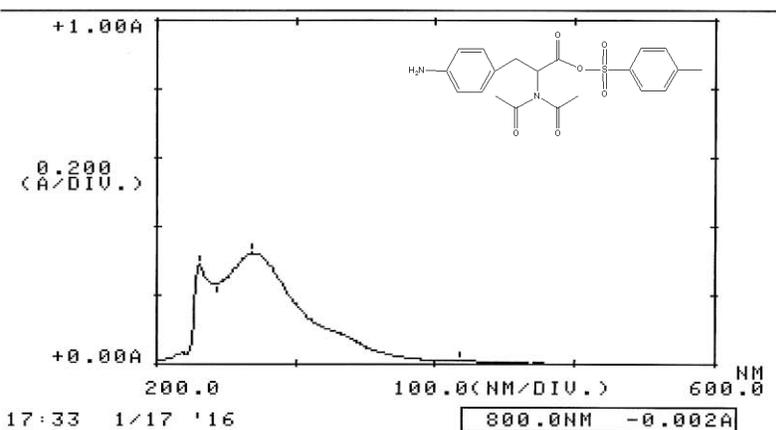
9.3.2. Espectro de FTIR



9. Anexo

9.3.3. Espectro de UV-Vis

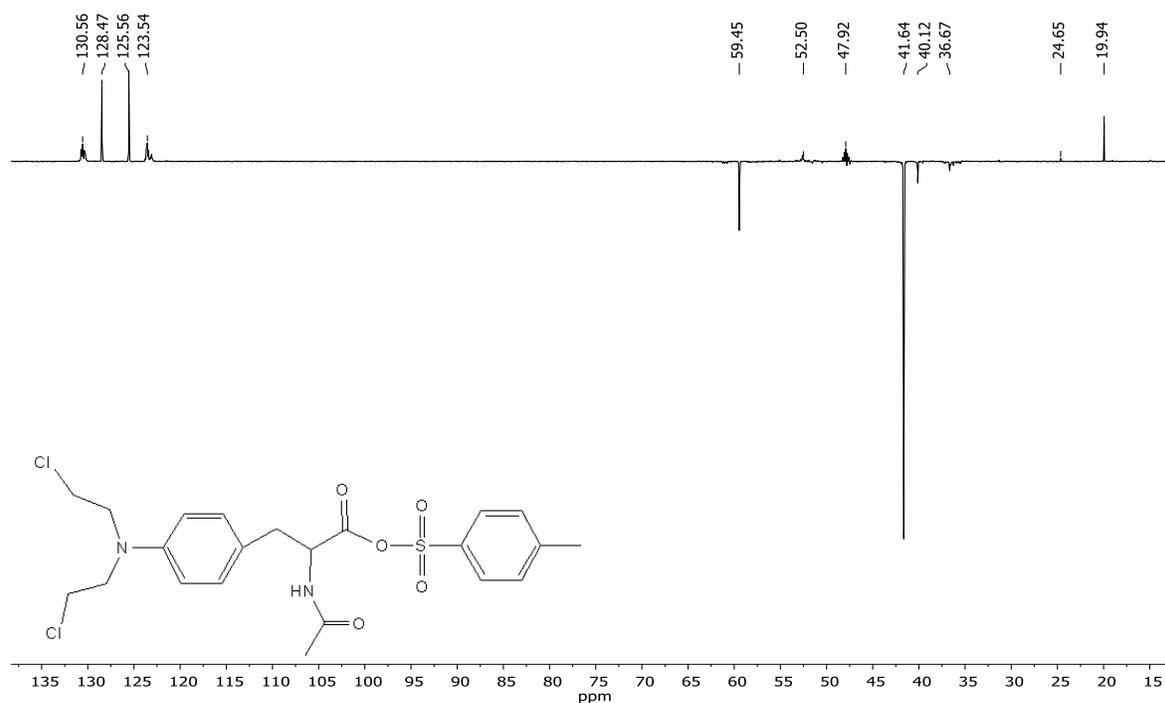
```
*** PEAK-PICK ***  
-- PEAK -- -- VALLEY --  
λ ABS λ ABS  
-----  
417.0 0.011 572.0 -0.002  
269.0 0.323 409.0 0.010  
230.0 0.294 243.0 0.233
```



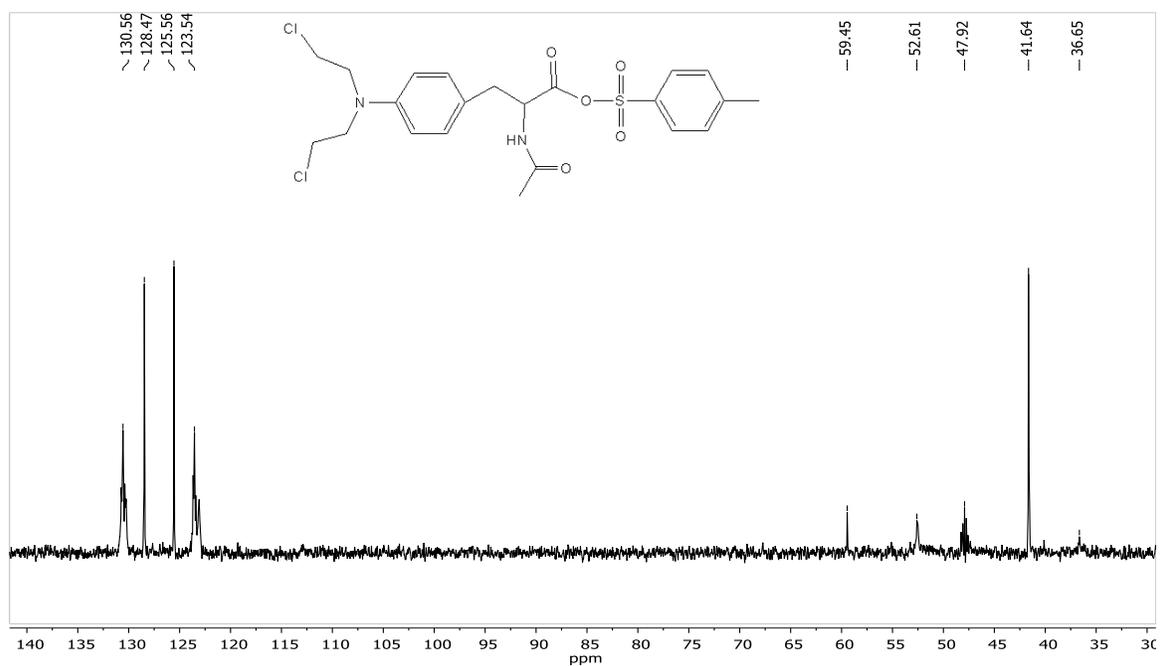
9. Anexo

9.4. (2S)-2-acetamido-3-[4-[bis(2-cloroetil)amino]fenil]propanoato de *p*-toluensulfonilo (4)

9.4.1. Espectro de RMN DEPT 90

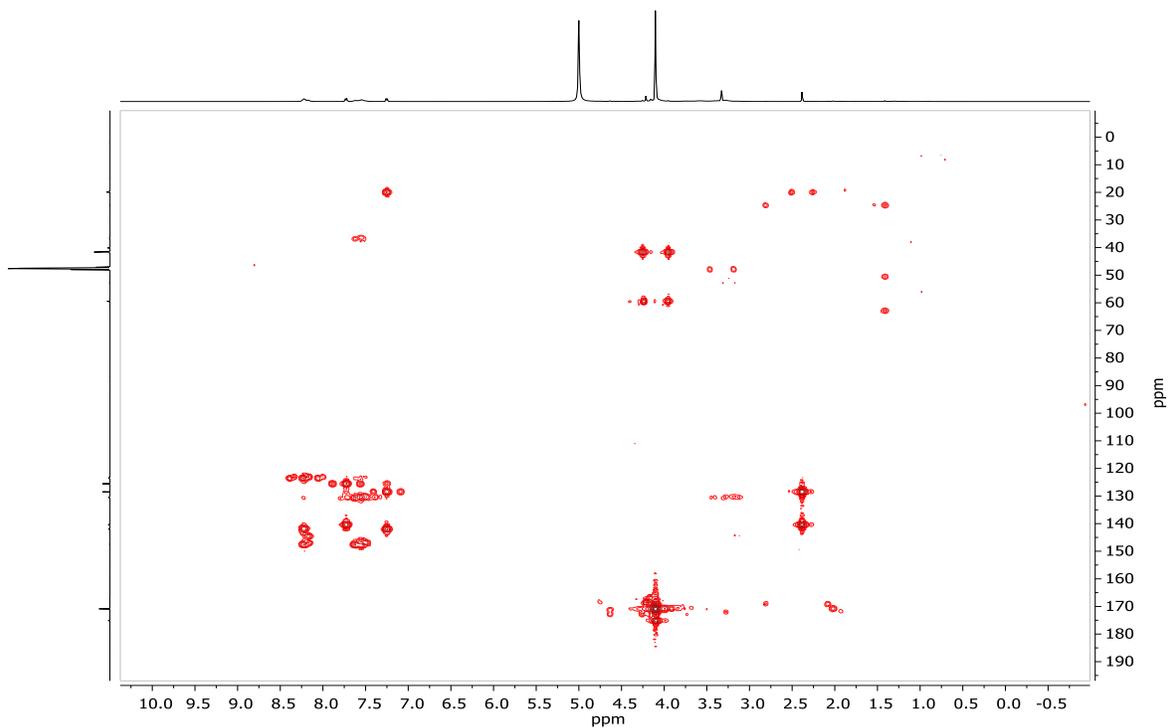


9.4.2. Espectro de RMN DEPT 135

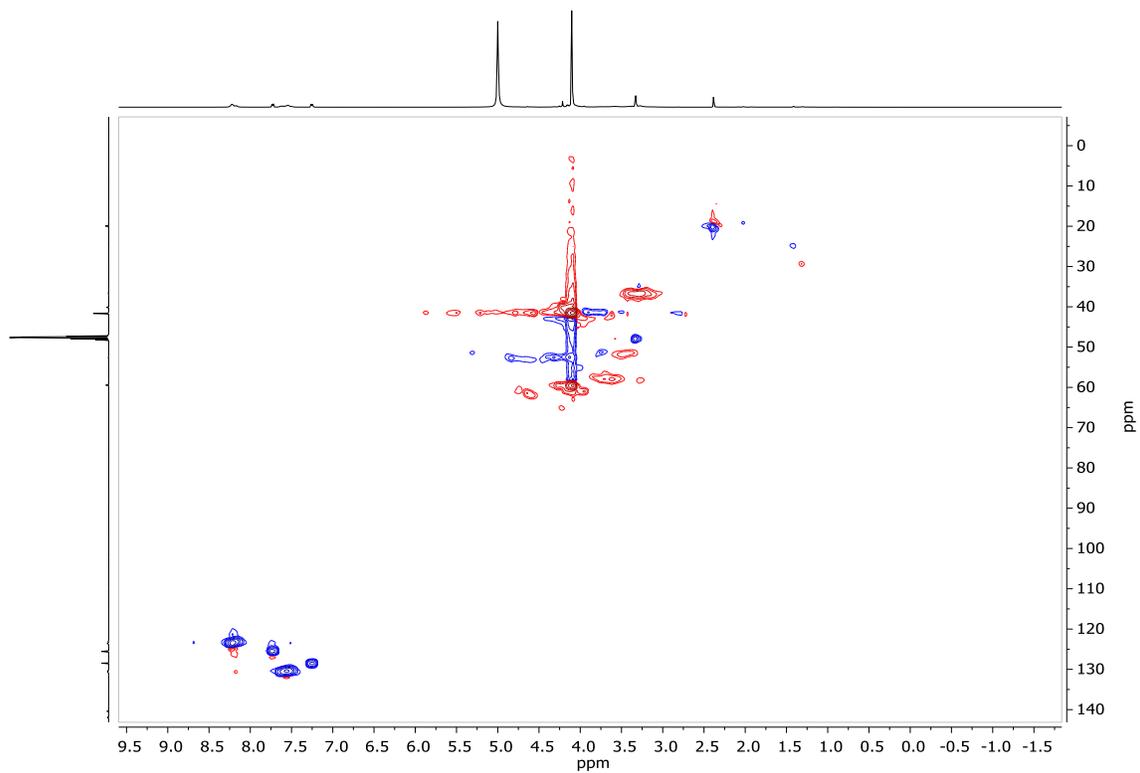


9. Anexo

9.4.3. Espectro de RMN HMBC

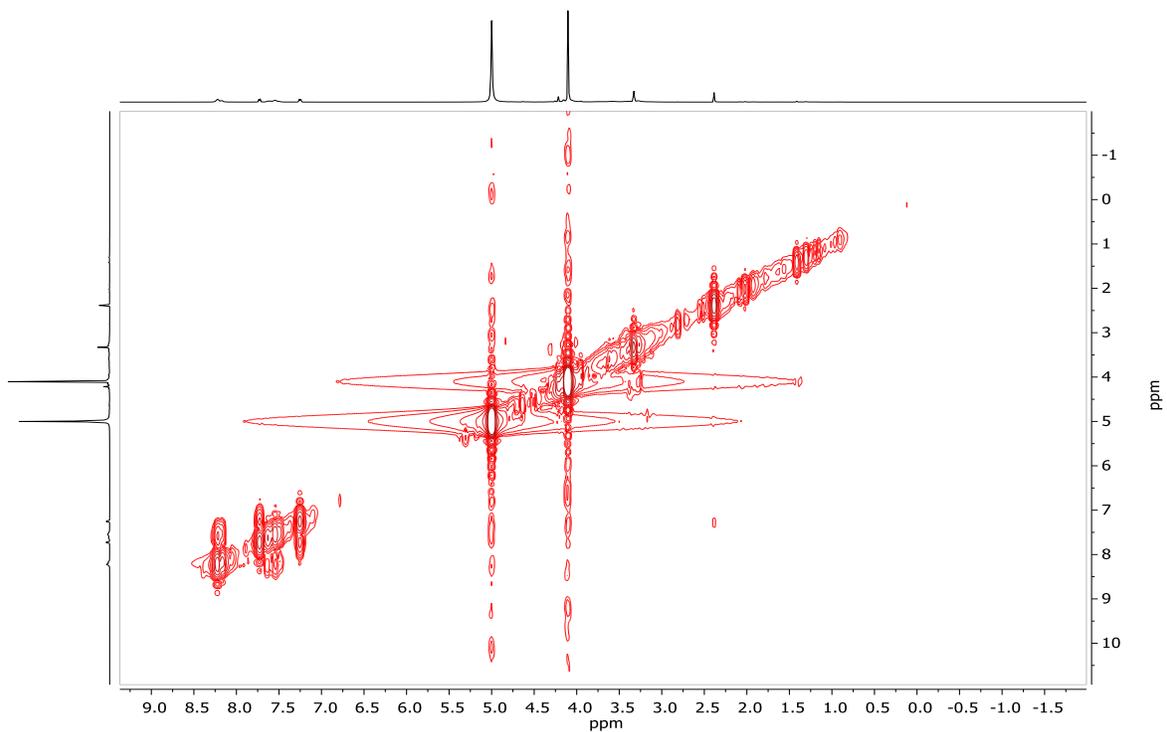


9.4.4. Espectro de RMN HSQC

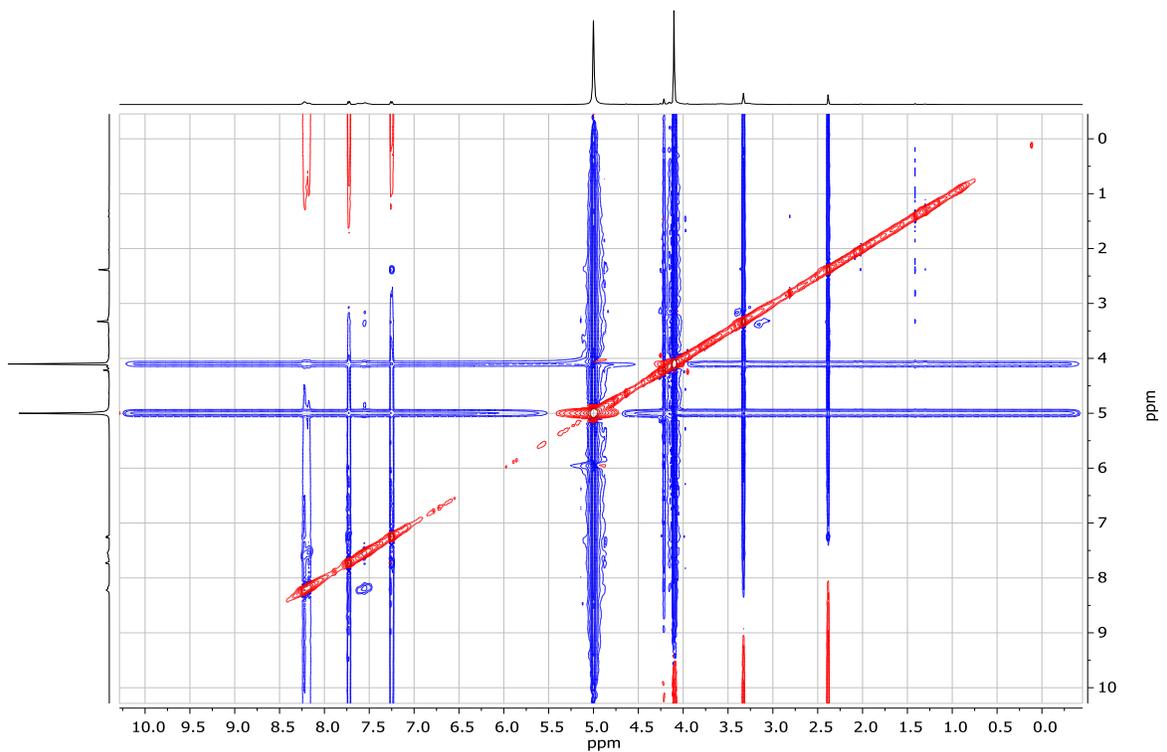


9. Anexo

9.4.5. Espectro de RMN COSY

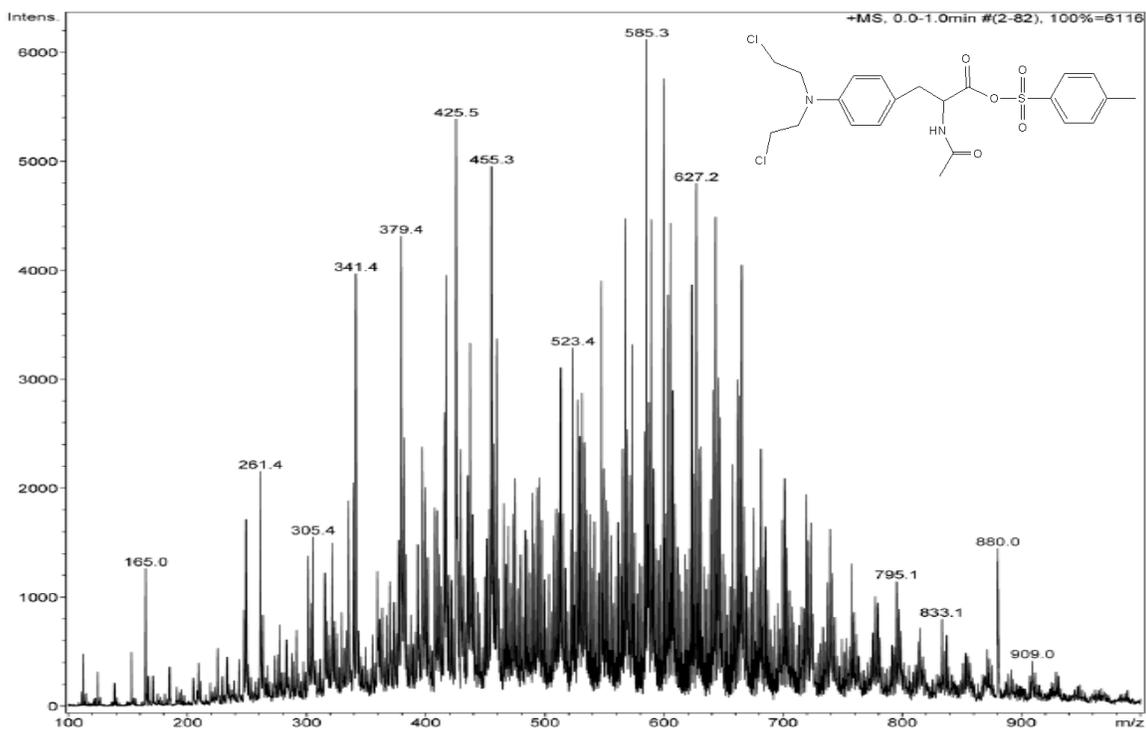


9.4.6. Espectro de RMN NOESY

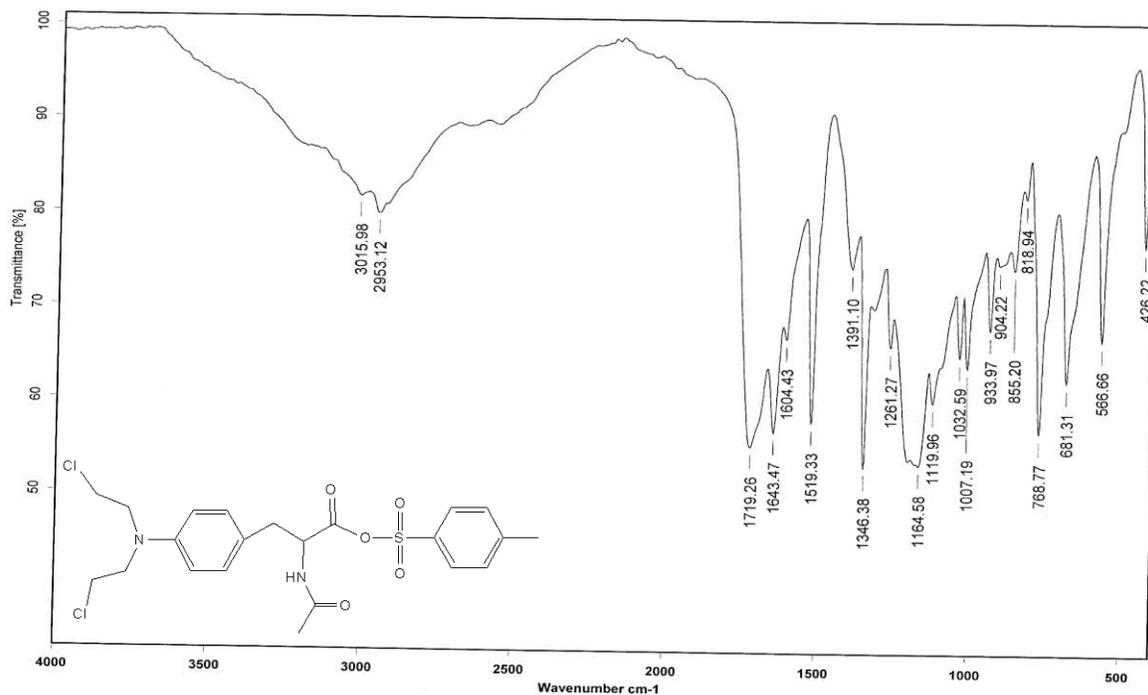


9. Anexo

9.4.7. Espectrometría de masas

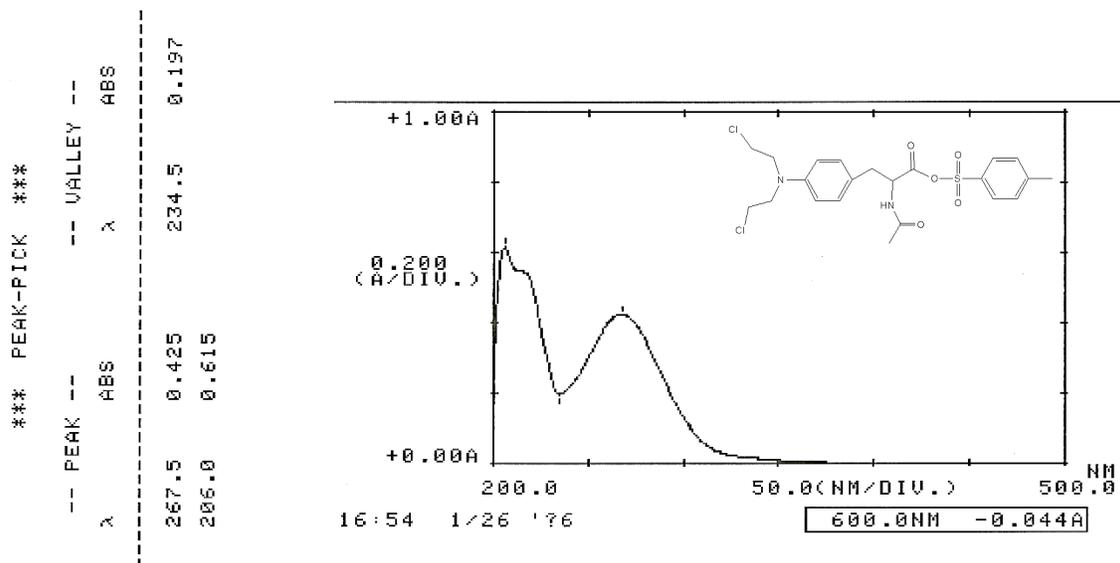


9.4.8. Espectro de FTIR



9. Anexo

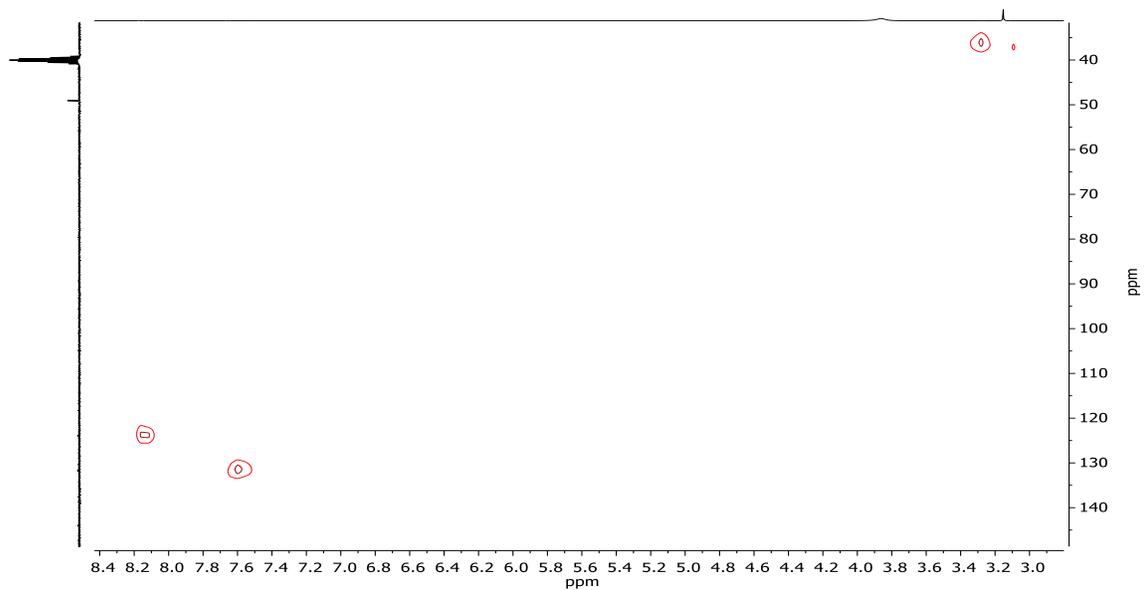
9.4.9. Espectro de UV-Vis



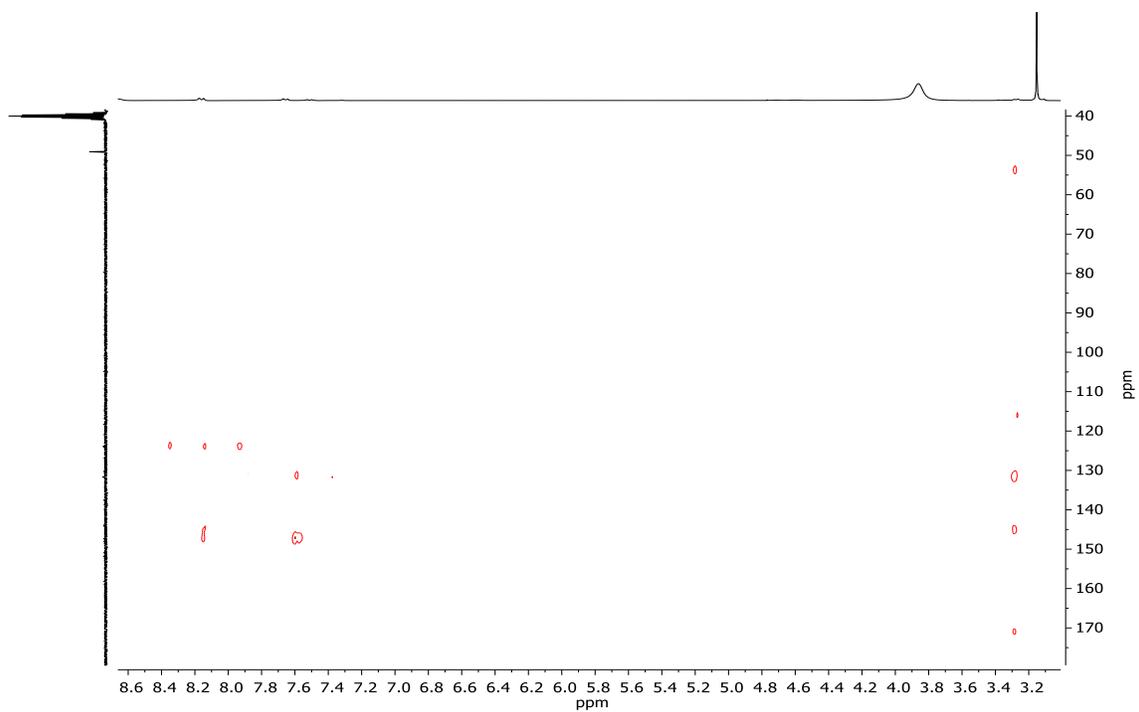
9. Anexo

9.5. Ácido (2S)-2-amino-3-{4-[bis(2-cloroetil)amino]fenil}propanoico (5) melfalán

9.5.1. Espectro de RMN HSBC



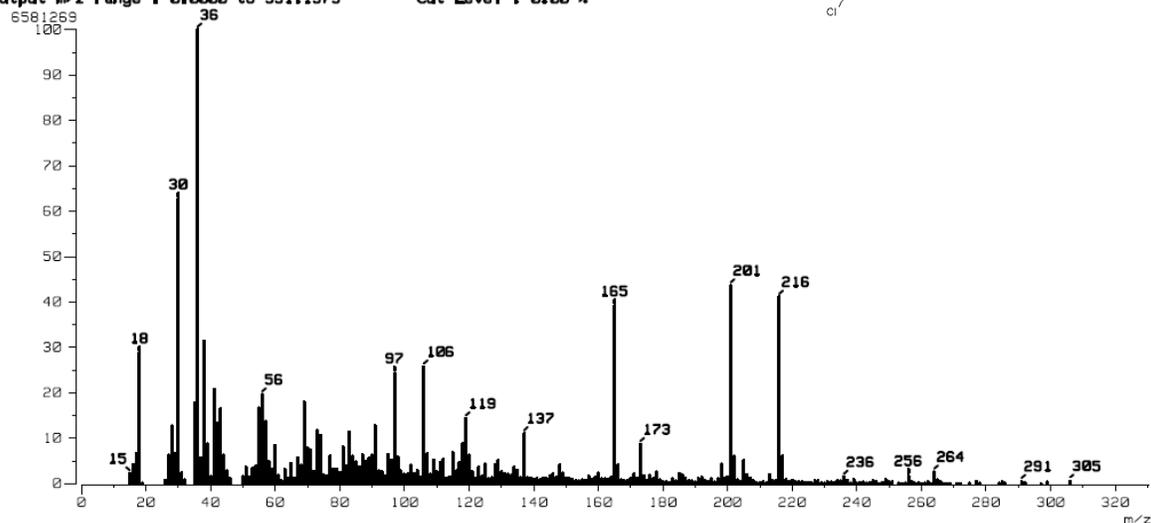
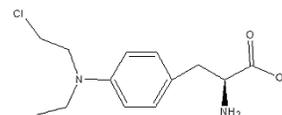
9.5.2. Espectro de RMN HMBC



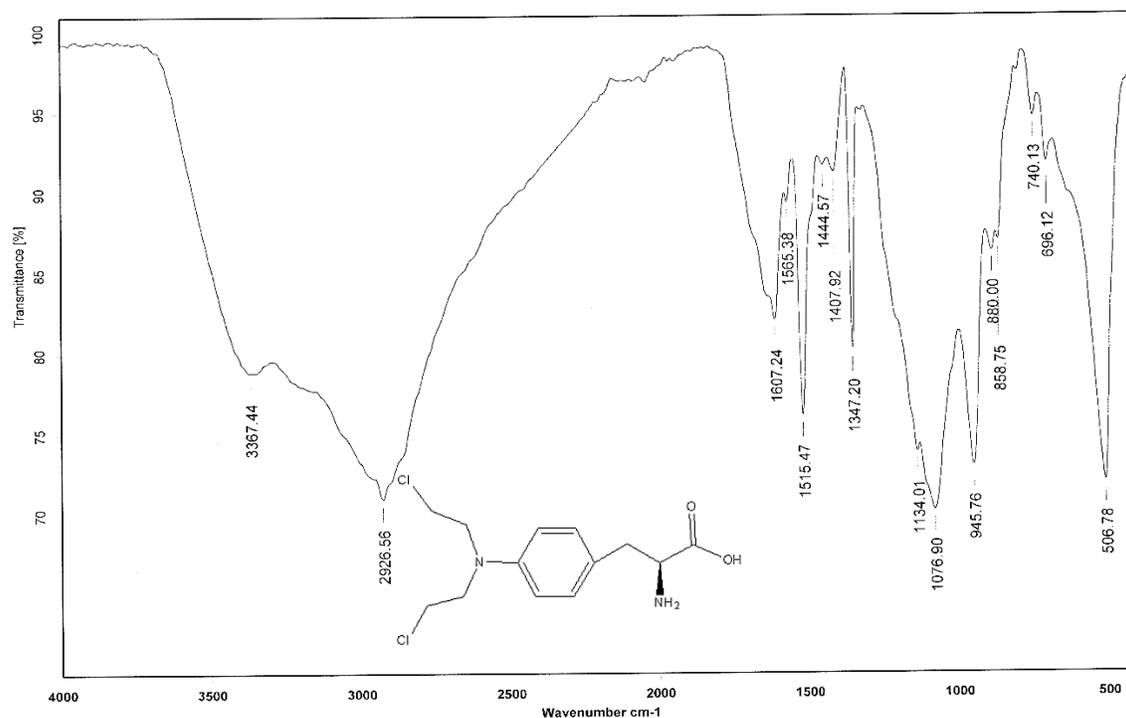
9. Anexo

9.5.3. Espectrometría de masas

[Mass Spectrum]
Data : Dr-Martinez-Marcos-006 Date : 23-May-2017 16:12
Sample: 1161 Met-08 Jeol SX102A
Note : Operadores Carmen Garcia Javier Perez
Inlet : Direct Ion Mode : EI+
Spectrum Type : Normal Ion [M-Linear]
RT : 0.89 min Scan# : (15,23)
BP : m/z 36.0000 Int. : 627.64
Output m/z range : 0.0000 to 331.1573 Cut Level : 0.00 %



9.5.4. Espectro de FTIR



9. Anexo

9.5.5. Espectro de UV-Vis

