



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

TEMA DE TESIS

**DISEÑO, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE DERIVADOS DE QUINAZOLINA COMO AGENTES CON
POTENCIAL CITOTÓXICO EN LÍNEAS CELULARES DE INTERES FARMACÉUTICO**

T E S I S

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

QFB. ULISES MARTÍNEZ ORTEGA

**T U T O R DR. FRANCISCO HERNÁNDEZ LUIS
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

Ciudad de México, agosto, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

MIEMBROS DEL JURADO

Dr. Roberto Martínez	Presidente	Instituto de Química, UNAM
Dra. Adela Rodríguez Romero	Vocal	Instituto de Química, UNAM
Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez	Vocal	UAE Morelos
Dr. José Luis Medina Franco	Vocal	Facultad de Química, UNAM
Dr. Fernando León Cedeño	Secretario	Facultad de Química, UNAM

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

Laboratorio 121, Departamento de Farmacia, Edificio E, Facultad de Química, UNAM

SUSTENTANTE

QFB. Ulises Martínez Ortega

ASESOR

Dr. Francisco Hernández Luis

Agradecimientos institucionales

Expreso mi agradecimiento a las siguientes instituciones por el apoyo recibido:

A la Universidad Nacional Autónoma de México. Agradezco a todos los profesores que me formaron a lo largo de mi bachillerato, licenciatura y maestría. Por ser, además, parte de la institución de la que obtuve una parte importantísima de mi educación, mi segundo hogar.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada durante la maestría con el número de becario 1002367 y por el apoyo en la compra de los materiales a través del proyecto CONACyT-SEP CB-220664.

A la Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de Información y Comunicación (DGTIC) por el uso de la supercomputadora Miztli bajo el proyecto semilla LANCAD-UNAM-DGTIC-207.

A los miembros del jurado por las valiosas aportaciones al presente trabajo. Gracias por su tiempo y dedicación al mejoramiento de mi tesis.

A la Facultad de Química de la UNAM por el apoyo para la realización de los estudios de espectroscopía, espectrometría de masas y ensayos de citotoxicidad a través del programa PAIP 5000-9136.

ÍNDICE GENERAL

Índice de abreviaturas	6
Resumen/Abstract	7
Antecedentes	8
Cáncer en México.....	9
Aspectos moleculares del cáncer: Orígenes y Desarrollo.....	10
Tratamientos: El reto del pasado heredado al futuro.....	10
Terapia dirigida.....	11
Moléculas pequeñas: Los inhibidores de cinasas se llevan el juego.....	11
Juego casi perfecto, los inhibidores de cinasas: Problemas en las alturas....	13
Alternativas en otros puntos críticos: Lactato deshidrogenasa.....	15
Propuestas atoradas en un embudo infinito: Inhibidores de LDH.....	16
Planteamiento del problema	19
Hipótesis	21
Objetivos	21
Generales.....	21
Particulares.....	21
Metodología	23
Diseño de series CU-A y CU-B.....	24
Acoplamiento molecular.....	24
Síntesis.....	25
Análisis retrosintético.....	25
Evaluación biológica.....	27
Inhibición enzimática.....	27
Evaluación de citotoxicidad celular.....	28
Resultados y análisis	29
Diseño de la serie CU-A/B.....	30
Síntesis y caracterización estructural.....	32

Síntesis de intermediarios CU-11A/B.....	32
Síntesis de productos finales.....	36
Caracterización instrumental.....	37
Evaluación biológica.....	40
Inhibición enzimática.....	40
Inhibición sobre EGFR.....	40
Inhibición sobre LDH.....	43
Competencia con piruvato.....	43
Competencia con NADH.....	46
Evaluación citotóxica en líneas celulares.....	49
Serie CU-A.....	49
Serie CU-B.....	52
Conclusiones.....	56
Perspectivas.....	56
Bibliografía.....	58
Anexos.....	65
Diseño de moléculas.....	66
Síntesis química.....	68
Evaluación biológica.....	95

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Tris	2-amino-2-hidroximetil-propan-1,3-diol
BCN	2-amino-5-nitro-benzonitrilo
HEPES	ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]etan-1-sulfónico
DNA	Ácido desoxiribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
ABC	ATP binding cassette
CMTN	Cáncer de mama triple negativo
CAPA	Cáncer pancreático
CPCNP	Cáncer pulmonar de células no pequeñas
DMF-DMA	Dimetilacetal de la dimetilformamida
NOESY	Espectroscopía de efecto nuclear Overhauser
FIMI	Formamidina
LDH	Lactato deshidrogenasa
LLA	Leucemia linfocítica aguda
LMC	Leucemia mieloide crónica
MC	Melanoma cutáneo
NMP	Neoplasma mieloproliferativo
NAD+	Nicotinamida adenina dinucleótido (oxidada)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido (reducido)
OMS	Organización Mundial de la Salud
Mcl-1	Proteína célula-mieloide de leucemia 1
Bcl-XL	Proteína extra grande de linfoma de célula B
RMSD	Raíz de la desviación cuadrada media
RE	Receptor de estrógenos
RP	Receptor de progesterona
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
HER2	Receptor del factor de crecimiento humano 2
VEGF	Receptor del factor de crecimiento vascular
SMP	Síndrome mielodiplásico
TEGI	Tumores del estroma gastrointestinal

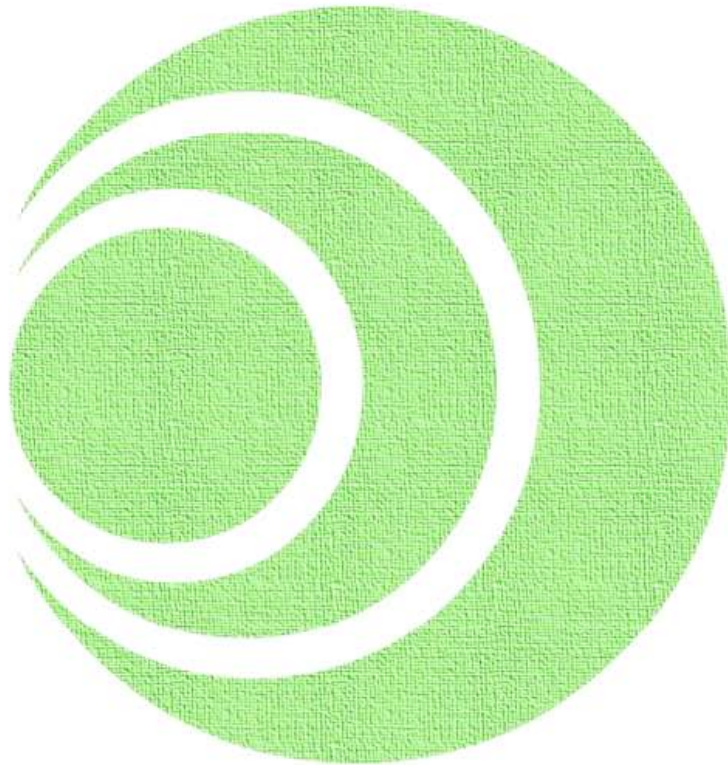
Resumen

En este trabajo se diseñaron, sintetizaron y evaluaron biológicamente dos nuevas series de moléculas derivadas de 4-anilinoquinazolininas (**CU-A** y **CU-B**). El diseño se llevó a cabo mediante acoplamiento molecular para inhibir a la lactato deshidrogenasa A (LDH) de músculo de conejo y al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) de humano. Los compuestos fueron sintetizados mediante técnicas convencionales de calentamiento así como el uso de microondas. Las estructuras de los productos finales se confirmaron mediante resonancia magnética nuclear ^1H , ^{13}C y NOESY. Dichos productos se evaluaron a nivel enzimático sobre las enzimas mencionadas realizando ensayos de competencia contra piruvato y contra NADH para LDH. Las dos series de compuestos mostraron actividad inhibitoria potente sobre EGFR y actividad competitiva contra NADH siendo la molécula más activa **CU-8A**. La serie de moléculas también fue evaluada a nivel celular sobre líneas cancerosas para determinar su actividad citotóxica. Los resultados fueron mixtos; sin embargo, **CU-8A** fue el más potente de la serie A presentando actividad sobre todas las líneas celulares en tanto que de la serie B, **CU-7B** fue el más activo de todos. Dada las características que presenta **CU-8A**, esta molécula se consideró líder la cual deberá mejorar su selectividad contra líneas cancerosas.

Abstract

In this work, two new series of 4-aminoquinazolines (**CU-A** and **CU-B**) were design, synthesized and biologically evaluated. The design was carried out using molecular docking on rabbit muscle lactate dehydrogenase A and human epidermal growth factor receptor. The compounds were synthesized via conventional and microwave type heating. The final compound's structures were determined by nuclear magnetic resonance ^1H , ^{13}C y NOESY. Such compounds were assayed at enzymatic level on EGFR and LDH in experiments of piruvate and NADH competence for LDH. Both series of compound showed potent inhibitory activity on EGFR and competitive activity against NADH for LDH, being **CU-8A** the most active molecule. Furthermore, the compounds were assayed as cytotoxic agents on several cancer cell lines. Results were mixed, however, **CU-8A** was the most active compound from series A, and **CU-7B** was the most active from series B. Due to **CU-8A** characteristics, it was considered a lead that should enhance its selectivity against cancer cell lines.

ANTECEDENTES



Antecedentes

Cáncer en México

El cáncer es un grupo de enfermedades que más ha estado presente como causa de muertes en los últimos años. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha proyectado que para finales del 2021 ocurrirán, al menos, 16 millones de casos nuevos y 10 millones de muertes por año¹. Estas estadísticas fuerzan a los gobiernos a desarrollar y reforzar programas de control de cáncer que puedan incluir prevención, detección temprana y tratamientos mejorados en países que no pertenecen al primer mundo. En México, de acuerdo con datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía, tumores en próstata, tráquea, bronquios, pulmón y estómago son los que más afectan al género masculino con 36% de fallecimientos en tanto que el cáncer de mama y cérvico-uterino representa el 26% de las defunciones en mujeres de manera general. El cáncer de mama es el que mayor aumento de la tasa de morbilidad hospitalaria ha presentado en los últimos años. Ha pasado de 7 mujeres por cada 100 mil a 218 siendo el tumor maligno con mayor impacto en mujeres mayores de 20 años ².

A pesar del notable aumento en la mortalidad por tumores malignos, los programas nacionales son limitados y las políticas públicas no se han podido desarrollar e implementar, aunado a la ausencia de un registro nacional de cáncer. Esto último genera problemas importantes para conocer los datos reales de las neoplasias malignas. Algunos estudios han proyectado la situación para México en años futuros revelando que las diez principales causas de muerte por cáncer serán por cáncer de próstata, hígado y mama y se piensa que en el 2020 se muestre un descenso en las muertes por cáncer de pulmón, estómago y cérvico-uterino. Sin embargo, el cáncer de mama es el que mayor aumento de la tasa de morbilidad hospitalaria ha presentado en los últimos años. Ha pasado de 7.43 mujeres por cada 100 mil a 218.24 siendo el tumor maligno con mayor impacto en mujeres mayores de 20 años y se estima que superará la tasa de 11 por cada 100 000 ³.

Aspectos moleculares del cáncer: Orígenes y Desarrollo

Históricamente, se ha demostrado una gran variabilidad en el cáncer, desde sus orígenes hasta en cómo se desarrolla. Aspectos como mutágenos químicos y físicos son las causas más comunes de iniciación y progresión del cáncer, de manera técnica, los mutágenos que causan cáncer se les denomina carcinógenos ⁴⁻⁶. Los mecanismos de acción de estos mutágenos son diversos, los físicos generalmente se presentan como radiaciones de rayos X, gamma y ultravioleta que afectan a los enlaces químicos dentro de las macromoléculas de las células causando daños. En tanto que los mutágenos químicos presentan mecanismos más amplios, desde ataques nucleofílicos al DNA, estrés oxidante que desencadenan promoción de oncogenes ⁷.

Los proto-oncogenes son secuencias de DNA que codifican para ciertas macromoléculas que se involucran en el crecimiento y desarrollo celular. Cuando un agente mutágeno ataca a estas secuencias y provoca que la expresión y regulación de sus productos sea incorrecta este promueve que el proto-oncogen se transforme en oncogen. Desde los inicios de la investigación sobre el cáncer se han logrado identificar los productos de estos oncogenes, los más comunes son K-Ras, CDK, ciclinas, erb, c-raf, c-kit, c-myc entre muchos otros. Todos estos oncogenes tienen funciones que involucran la regulación de fases del ciclo celular, transducción de señales, son factores de transcripción o transcriben receptores de membrana de factores de crecimiento ⁷.

Tratamientos: El reto del pasado heredado al futuro

La medicina en cáncer y la quimioterapia se aceleró durante los años 80 y 90 gracias a todo el desarrollo bioquímico que permitió la identificación de los oncogenes ya mencionados. Muchas rutas reveladas en el crecimiento de células permitieron que los fármacos se desarrollarán de manera más racional y los quimioterapéuticos históricos como lo son los agentes modificantes del DNA, antimetabolitos, intercaladores y agentes citotóxicos se vieron relegados a una era que parecía prometer: La terapia dirigida.

Terapia dirigida

Como su nombre lo indica, es un tipo de terapia en donde se focalizan los esfuerzos para inhibir a una cierta macromolécula o proceso específico. Este tipo de terapia hace uso de un concepto conocido como *druggability* que, en español, se puede traducir como la posibilidad de que macromolécula endógena sea considerada una diana biológica importante en una enfermedad y que permita el diseño de moléculas bioactivas que interfieran con su función⁸. De esta manera surgieron distintos tipos de agentes terapéuticos dirigidos, y se clasificaron de acuerdo con su naturaleza como moléculas pequeñas, anticuerpos monoclonales y, en épocas más recientes, se comienza a considerar inmunoterapias más desarrolladas con inmunomoduladores^{9,10}.

Moléculas pequeñas: Los inhibidores de cinasas se llevan el juego

La química farmacéutica se basa principalmente en el diseño de moléculas pequeñas, este tipo de moléculas se consideran así cuando su masa molecular se encuentra debajo de 900 Da. Estas moléculas tienen usos muy variados, desde sondas de investigación para caracterizar funciones biológicas o desarrollar nuevas moléculas, hasta el desarrollo mismo de un fármaco¹¹.

La gran mayoría de las moléculas pequeñas aprobadas como quimioterapéuticos son inhibidoras de cinasas, aunque también existen moduladores del receptor de estrógeno, inhibidores de la aromatasas, desacetilasas, proteasoma y otras enzimas involucradas en el desarrollo del cáncer⁹.

El grupo de dianas biológicas más estudiadas para el cáncer ha sido sin duda, las cinasas. Éstas son enzimas que tienen la función de transferir el fosfato gamma del adenosín trifosfato (ATP) a un sustrato en una reacción conocida como fosforilación. Hasta hace 6 años, se habían caracterizado 518 cinasas distintas y se dividieron en 10 grupos¹².

Ya que la función es la misma para todas las cinasas, su sitio activo es altamente conservado. Las cinasas presentan 12 subdominios plegados alrededor de una estructura catalítica bilobulada que es característicamente que se extiende dentro de la proteína; de manera natural la molécula de ATP se inserta en uno de los lóbulos. La porción de tipo adenina se localiza en una zona denominada “bisagra” en donde se establecen algunos puentes de

ANTECEDENTES

hidrógeno en tanto que los fosfatos se encuentran formando un complejo con un átomo de magnesio el cual funge como puente de interacción entre un ácido aspártico o glutámico y estabiliza a los fosfatos para que ocurra la reacción de fosforilación. Además, la zona en la cuál se une la purina, muestra dos zonas hidrofóbicas denominadas zona I y II las cuales son aprovechadas por los inhibidores de cinasas (figura 1A y 1B)¹³.

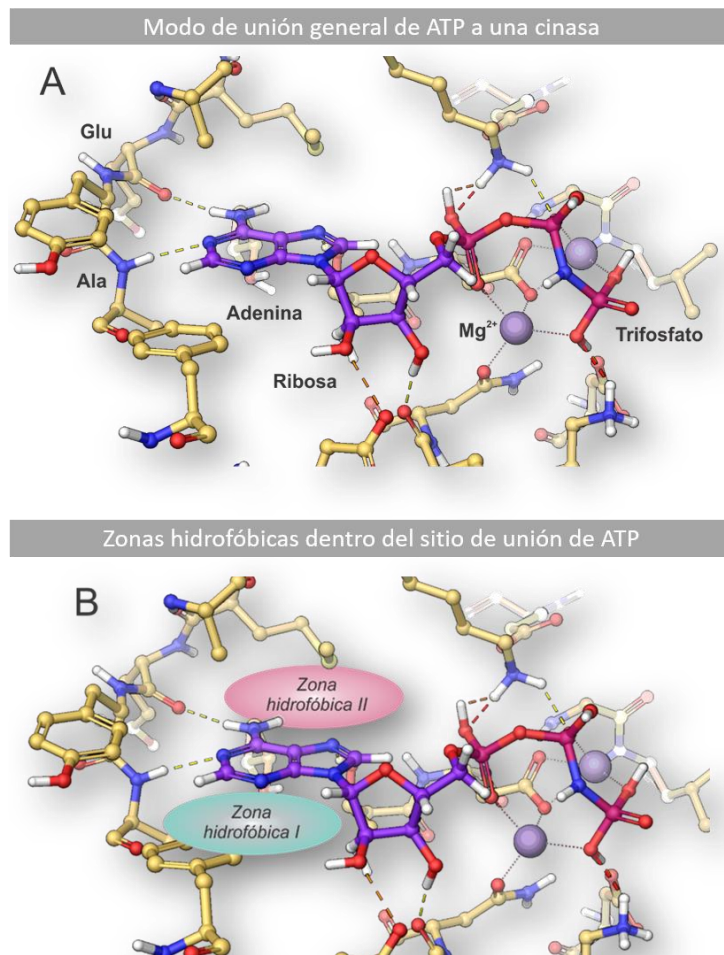


Figura 1. Sitio de unión de ATP. **(A)** Modo de unión característico del ATP en los sitios de tipo cinasa. **(B)** Ubicación de las zonas hidrofóbicas que aprovechan los inhibidores de cinasa

Juego casi perfecto, los inhibidores de cinasas: Problemas en las alturas

La gran mayoría de los inhibidores se dirigen contra la zona de bisagra pues presentan núcleos base similares a la adenina; además algunos otros aprovechan estructuras que pueden reaccionar e inhibir de manera covalente a la proteína. Los inhibidores más comunes son los denominados de tipo I y II. Los inhibidores de tipo I reconocen la conformación activa de la cinasa y aprovechan las zonas hidrofóbicas, ya mencionadas con anterioridad, donde establecen puentes de hidrógeno similares a los que la adenina establece de manera natural¹⁴.

La lista de estos inhibidores es amplia y muchos de ellos se encuentran comercialmente. **Imatinib** fue el primer inhibidor de cinasas aprobado para su uso quimioterapéutico en el tratamiento de leucemia mieloide crónica¹⁵. Este fármaco resultó tan importante a nivel clínico que permitió el desarrollo de muchos más inhibidores de cinasas que tuvieron como dianas algunas cinasas oncogénicas muy reconocibles. Este tipo de inhibidores se aprovechan de un fenómeno conocido como adicción oncogénica. Este fenómeno se caracteriza por aumentar la actividad de ciertas rutas metabólicas que favorecen la proliferación de las células cancerosas, al atacar estas vías, la célula entra en estrés que la lleva a la muerte¹⁶. En la **tabla 1** se enlistan algunos ejemplos de estos inhibidores, sus dianas biológicas validadas y a qué enfermedad se ha indicado de manera clínica¹⁷.

Sin duda, los inhibidores de cinasas dieron un giro importante a la aproximación terapéutica del cáncer pues gracias a que se desarrolló y promovió la idea de diseñar estas moléculas de manera más racional, en cierta manera se ha disminuido la cantidad de efectos tóxicos. Sin embargo, no escapan de los problemas convencionales de la quimioterapia pues existe la resistencia a estos fármacos y eventualmente efectos adversos. Para el caso de las mutaciones, es posible que las mismas no se encuentren involucradas en la adicción oncogénica por lo que inhibir a las enzimas mutadas, además de no ser tan efectivo a nivel molecular, a nivel metabólico no es notable la acción¹⁸.

Este tipo de resistencia resulta retadora en el sentido del uso racional y diseño de combinaciones de quimioterapéuticos. Un ejemplo claro, es la importancia de la mutación T790M en la resistencia de inhibidores de EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico, por sus siglas en inglés) en el cancer de pulmón de células no pequeñas

ANTECEDENTES

(CPCNP). Las investigaciones llevaron a diseñar la molécula conocida como **osimertinib** (figura 2) la cual puede inhibir a la EGFR mutada pues sortea la mutación T790M que se encuentra en la zona conocida como tipo bisagra ^{19,20}.

Tabla 1. Agentes quimioterapéuticos con más de una diana biológica

Fármaco	Diana	Cl ₅₀ (nM)	Indicación terapéutica
Imatinib	ABL1	61	LMC, LLA
	KIT	100	TEGI
	PDGFRA	50	SMP
	PDGFRB	50	
Crizotinib	ALK	183	
	ROS1	4.1	CPCNP
	MET	2.25	
Afatinib	EGFR	0.22	CPCNP
	HER2	5	
Erlotinib	EGFR	19.3	CPCNP
	JAK2	N/A	NMP
	HER2	360	CAPA
	HER3	1100	
Nilotinib	ABL1	18	LMC
	KIT	98	MC

Abreviaturas. CAPA: Cáncer pancreático; CPCNP: Cáncer pulmonar de células no pequeñas; LLA: Leucemia linfocítica aguda; LMC: Leucemia mieloide crónica; MC: Melanoma cutáneo; NMP: Neoplasma mieloproliferativo; TEGI: Tumores del estroma gastrointestinal; SMP: Síndrome mielodisplásico.

Otro tipo de resistencia notable es la reactivación de una vía metabólica que conecta con otra ruta de señalización como es el caso de MEK en la reactivación de la ruta de MAPK, la cual

es la responsable de la resistencia a los inhibidores de BRAF, así pues se ha optado por utilizar dos fármacos distintos que puedan inhibir a BRAF y a MEK, en donde se han observado resultados favorables a nivel clínico ²¹⁻²³.

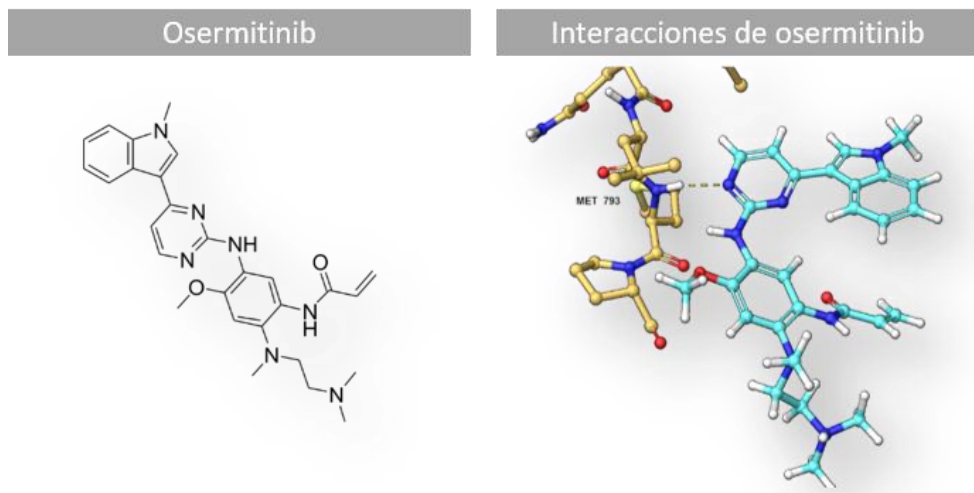


Figura 2. Osemirtinib. Osemirtinib se une a EGFR estableciendo un puente de hidrógeno con la porción de tipo pirimidina del fármaco y el nitrógeno de MET793 de la cadena principal.

Alternativas en otros puntos críticos: Lactato deshidrogenasa

Dada las ciertas problemáticas que podrían presentar los inhibidores de cinasas, otras alternativas han sido exploradas, dando pie a proponer desde terapias combinatorias hasta la implementación de otras dianas biológicas que se han encontrado en hasta el momento durante algunos años. Este es el caso de la lactato deshidrogenasa (LDH).

Dentro de la compleja diversidad que puede presentar la bioquímica del cáncer existen puntos clave que la mayoría de los distintos tipos de cáncer han mostrado, estos puntos son comúnmente conocidos como los “sellos del cáncer” (*Hallmarks of cancer*)²⁴⁻²⁷. Uno de estos sellos se encuentra en la *reprogramación-desregulación del metabolismo energético*. Muchos tipos de células cancerosas muestran una preferencia metabólica por la glicolisis más que la fosforilación oxidativa, a este fenómeno se le conoce como el efecto de Warburg. Si bien, las células no cancerosas utilizan la glicolisis y la fermentación láctica para la producción de ATP en condiciones de concentración menor de oxígeno, las células cancerosas utilizan estas rutas inclusive cuando el nivel de oxígeno es óptimo. En tumores, aunque estos presenten

ANTECEDENTES

angiogénesis, el nivel de oxígeno no es suficiente por lo que el factor inducible de hipoxia 1 α (HIF-1 α) y las vías de c-myc activan la expresión de otros oncogenes como el EGFR, la vía de AKT y aumentan la expresión de la lactato deshidrogenasa A (LDHA). Ya que la LDH es la enzima encargada de realizar la fermentación láctica, ésta es una diana importante en el fenómeno de Warburg.

La LDH realiza la conversión de piruvato a lactato y viceversa utilizando NADH o NAD⁺ (**figura 3**). Esta enzima es un tetrámero compuesta por subunidades conocidas como M y H que están codificadas en los genes *LDHA* y *LDHB* respectivamente. Las dos subunidades se pueden combinar hasta cinco combinaciones de hetero y homo tetrámeros. LDH-1 (4H), LDH-2 (3H1M), LDH-3 (2H2M), LDH-4 (1H3M) y LDH-5 (4M), en donde LDH-5 también se conoce como LDHA.

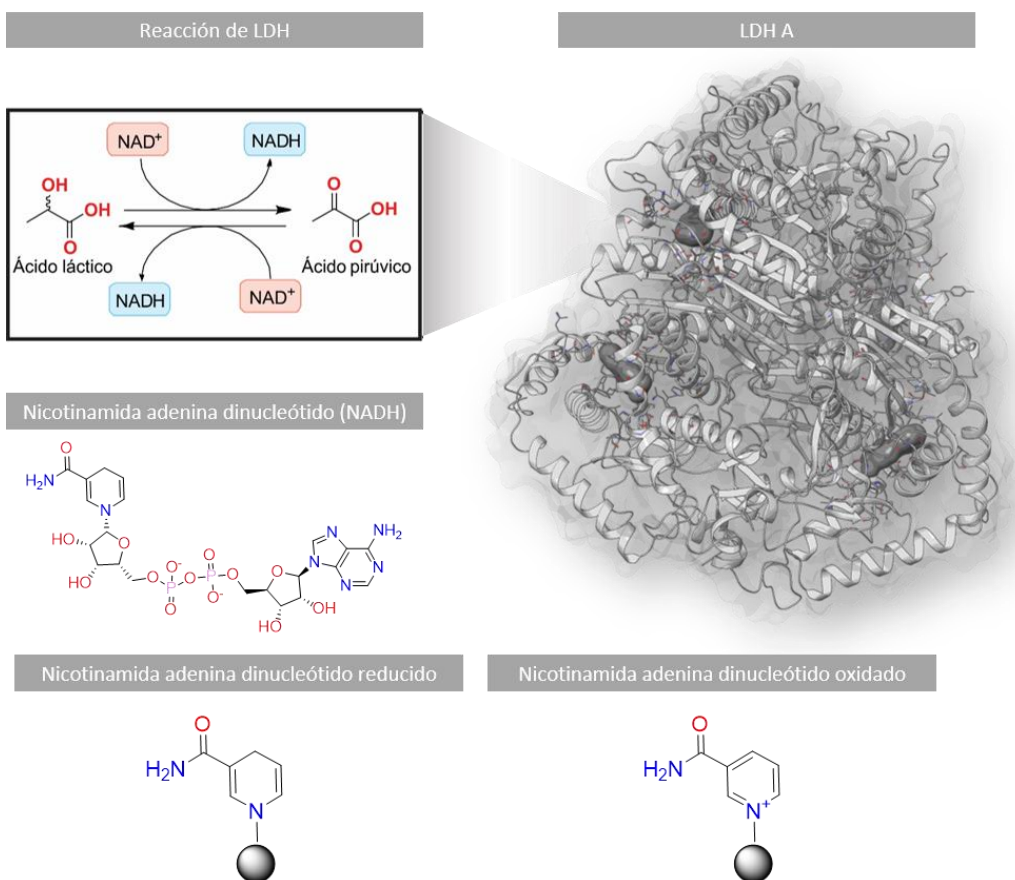


Figura 3. Lactato deshidrogenasa. La lactato deshidrogenasa es un tetrámero que realiza la conversión de ácido láctico a ácido pirúvico y viceversa mediante la molécula de nicotinamida adenindinucleótido (NADH y NAD⁺).

Un rol importante de la LDHA, es la protección de los tumores hacia las ROS. Cuando la LDHA es inhibida, la célula se ve forzada a producir ATP mediante la fosforilación oxidativa. Estudios han permitido proponer que la inhibición de LDHA lleva a apoptosis de la célula cancerosa ya que la inducción de ROS y la liberación de Ca²⁺, el cual disminuye el potencial de membrana interno de la mitocondria, activa la caspasa-9 y caspasa-3 que, eventualmente, induce la apoptosis. Además, otros estudios han encontrado relación de LDHA con la expresión de ciertas proteínas antiapoptóticas, como la proteína célula-mieloide de leucemia 1 (Mcl-1) y la proteína extra grande de linfoma de célula B (Bcl-XL), así como el aumento de proteólisis de enzimas como la poli (ADP ribosa) polimerasa (PARP, encargada de reparar el DNA roto) y aumento en la concentración del anión superóxido (O₂⁻) en cáncer de mama. Finalmente, la sobreexpresión de LDHA puede promover el crecimiento de tumores previniendo necrosis en ambientes hipóxicos, ya que fue demostrado que en tumores que sobreexpresan el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) no se observó necrosis.

Propuestas atoradas en un embudo infinito: Inhibidores de LDH

Dada la naturaleza de la LDH, en donde el sustrato y la coenzima deben unirse en cada reacción, existen dos sitios clave para la inhibición de esta enzima. Para el caso del sitio de piruvato, uno de los inhibidores mejor conocidos es el oxamato el cual ha mostrado buena actividad en algunas líneas celulares de cáncer gástrico; sin embargo, dada que su permeabilidad celular es muy baja, su dosis efectiva es muy alta para poder ser administrada *in vivo*. Otras opciones como derivados de *N*-hidroxiindoles (NHI) se han probado y, dado que son moléculas con diseño racional, han mostrado mejores resultados *in vitro*.

Por otro lado, la inhibición sobre el sitio de NADH se ha logrado con un número mayor de moléculas tales como gosipol, un polifenol, FX11 un derivado de naftaleno y también los derivados NHI. A pesar de las opciones que se han proporcionado, no se ha logrado continuar en ensayos clínicos, por lo que es clara la necesidad continuar con el desarrollo de moléculas (fig.4)

ANTECEDENTES

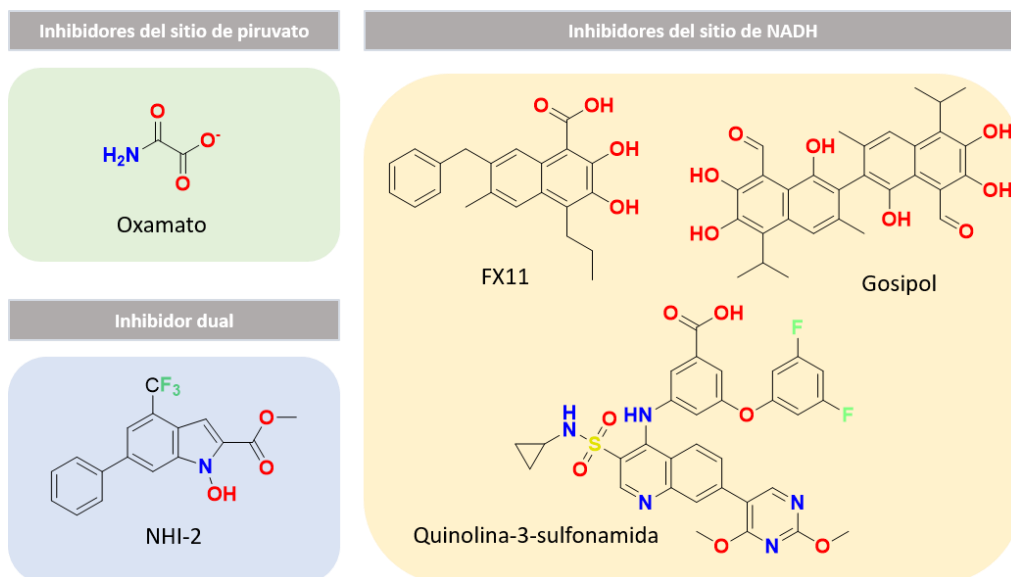
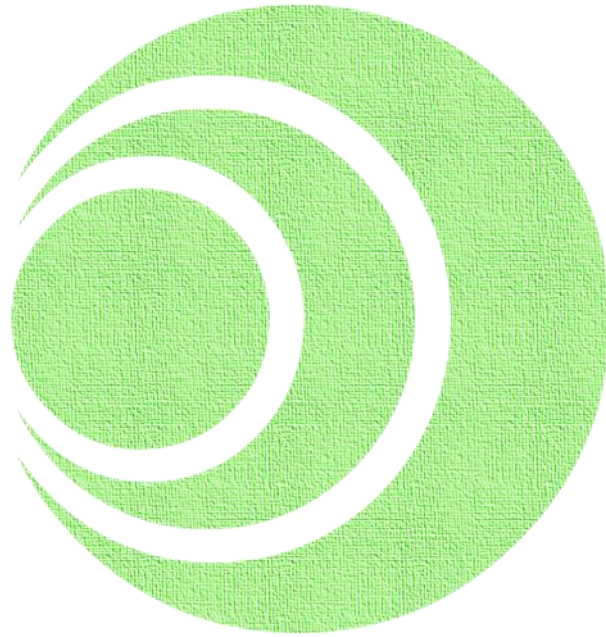


Figura 4. Inhibidores de LDHA y sus mecanismos de acción

PLANTEAMIENTO
DEL PROBLEMA



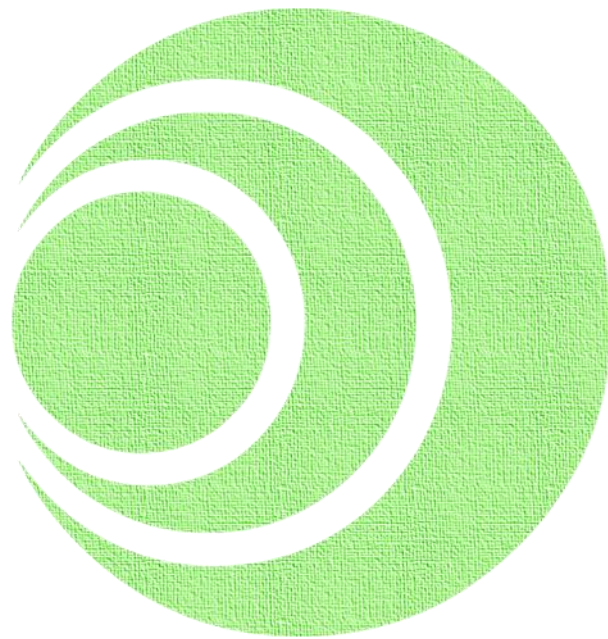
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Planteamiento del problema

El cáncer es una enfermedad para la cual no existe una cura universal y, en algunos casos, está sujeta a la detección temprana de la enfermedad para poder esperar resultados favorables de los métodos que existen para tratarla.

Además, dado que los inhibidores de cinasas pueden presentar más de una actividad. la cual está correlacionada comúnmente con efectos adversos ¿se podrá aprovechar este fenómeno para conjuntar a las dianas EGFR y LDH para encontrar compuestos citotóxicos sobre líneas celulares cancerosas con potencias similares a los controles positivos?

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



Hipótesis

Los compuestos que presenten el núcleo de la quinazolina en su estructura pueden actuar como inhibidores de EGFR y LDH y, por lo tanto, presentar acción citotóxica sobre líneas celulares cancerosas.

Objetivo General

Diseñar, sintetizar y evaluar derivados de quinazolina frente a Lactato deshidrogenasa (LDH) y al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) así como frente a líneas celulares cancerosas.

Objetivos Particulares

- Diseñar moléculas derivadas de quinazolininas (serie **CU**)
- Proponer una ruta sintética para la serie de moléculas **CU**
- Caracterizar espectroscópicamente la serie **CU**
- Evaluar sobre LDH la serie **CU**
- Evaluar sobre EGFR la serie **CU**
- Evaluar la serie **CU** sobre líneas celulares cancerosas

METODOLOGÍA



Metodología

Diseño de la serie CU

Con el fin de generar productos factibles se decidió utilizar derivados de cloruro de benzoilo tales como 3 y 4-nitrobenzoilo así como el 3,4-diclorobenzoilo. En dichos derivados se consideraron variantes como grupos donadores de electrones y grupos atractores de electrones. Los diseños se basaron en los inhibidores conocidos de EGFR y los inhibidores conocidos de LDH. Se utilizó el acoplamiento molecular para evaluar y validar las modificaciones propuestas.

Acoplamiento molecular

Se utilizaron tres programas distintos para realizar el acoplamiento molecular: *Autodock vina*²⁸, *Autodck 4.0*²⁹ y *LeDock*³⁰. Los ligandos fueron preparados utilizando Gaussian 16³¹, con el método de DFT-B3LYP/6-31G*³²⁻³⁴. Se utilizaron los isómeros más estables de la porción amida de las moléculas. Las estructuras elegidas para el acoplamiento molecular se descargaron de la base de datos *PDB*³⁵ cuyos códigos son 6Q13 y 2GS7 para LDH (y EGFR (*Homo sapiens*) respectivamente. Ambas estructuras se prepararon a pH 7.2 con el módulo *Protein Preparation Wizard*³⁶.

Autodock vina y Autodock

Mediante el uso de la interfaz gráfica *Pyrx*³⁷ se realizó el protocolo de acoplamiento molecular siguiendo las instrucciones proporcionadas por el programa. Se localizó la zona de acoplamiento molecular basándose en las coordenadas de los ligandos cocrystalizados presentes en las estructuras de las enzimas y se generó la rejilla. Para Vina se mantuvo el *exhaustivness* en 9 y en Autodock se utilizó el Algoritmo Genético Lamarckiano³⁸.

LeDock

Se utilizó la interfaz gráfica del programa, se cargaron las proteínas con sus ligandos cocrystalizados para detectar y generar la rejilla que el programa utiliza. Se realizaron 100

evaluaciones con una tolerancia de 2 Å para generar las agrupaciones (*clusters*) al momento de ejecutar el protocolo de acoplamiento molecular.

Visualización y validación

Las poses generadas provenientes del acoplamiento molecular se cargaron en la interfaz gráfica de *Maestro* para el análisis de las mismas. Se calculó la desviación estándar cuadrada media (RMSD por sus siglas en inglés) para determinar que las poses generadas fueran similares, las poses de referencia fueron las generadas por *LeDock*. Se consideró el valor de RMSD menor a 2 Å para establecer que no existen diferencias significativas en las poses de los acoplamientos moleculares. Las poses generadas por los programas se puntuaron bajo los criterios de *Autodock Vina* para homogeneizar los datos promedio.

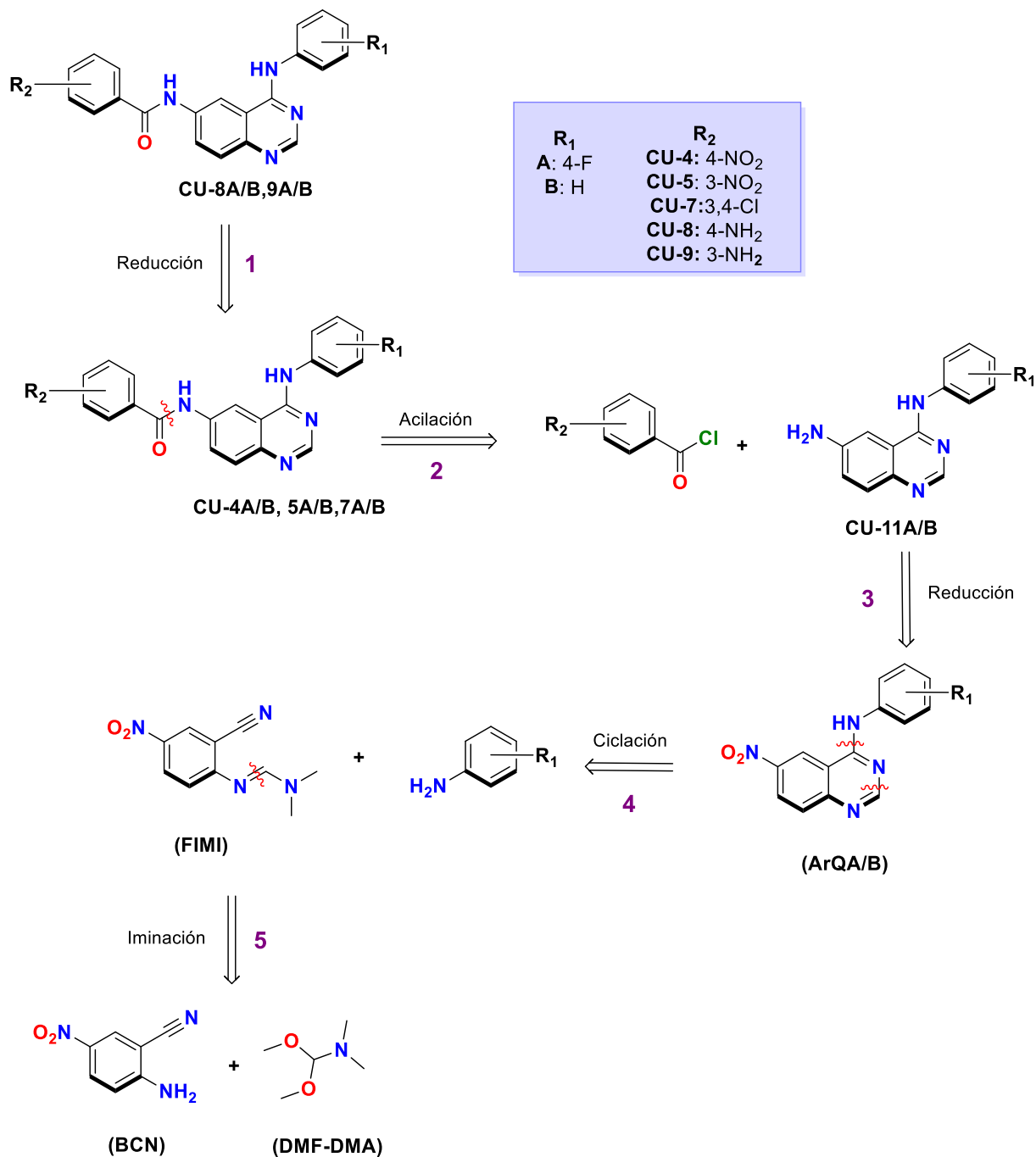
Síntesis química

Con base en los resultados de acoplamiento molecular, se identificó la serie **CU-A/B** y se llevó a cabo el análisis retrosintético para proponer rutas de síntesis química. Considerando que el núcleo base de las moléculas es un derivado de las 4-arilquinazolininas, se propuso una sola ruta sintética para las mismas.

*Análisis retrosintético para la obtención de la serie **CU-A/B***

La estrategia sintética para la producción de la serie **CUA/B** se encuentra distribuida en 5 pasos (esquema 1) partiendo de la materia prima **CU-11A/B** y los derivados de cloruro de benzoilo mediante una reacción de acilación (proceso 2) Para el caso de **CU-8A/B** y **9A/B** se lleva a cabo una reacción de reducción (proceso 1). La materia prima **CU-11** se genera a partir del compuesto nitrado **CU-11** mediante una reducción (proceso 3).

Para la síntesis del intermediario **ArQ** se utilizó la anilina correspondiente y el intermediario de tipo formamidina (**FIMI**) mediante una reacción de ciclación (proceso 4). Dicha **FIMI** fue generada mediante una reacción de iminación (proceso 5) con las respectivas materias primas 2-amino-5-nitrobenzocitrilo (**BCN**) y el dimetilacetal de la dimetilformamida (**DMF-DMA**).



Esquema 1. Retrosíntesis de las series **CU-A** y **CU-B**

Evaluación biológica

Ensayos enzimáticos

Inhibición enzimática sobre Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)

Todos los componentes del ensayo se disolvieron en la disolución amortiguadora de pH para la reacción. La disolución de de pH fue preparado a partir del 2-amino-2-hidroximetil-propan-1,3-diol (Tris base) y llevado a una concentración 40 mmol L⁻¹, pH 7.5 Adicionalmente, se adicionó MgCl₂ y albúmina sérica bovina (BSA) a concentración de 20 mmol L⁻¹ y 0.1 mg mL⁻¹. Se prepararon disoluciones madre de los compuestos a evaluar en dimetilsulfóxido (DMSO)

Los ensayos de inhibición se llevaron a cabo en 25 µL en una placa de 96 pozos blanca. Se adicionaron 100 ng de enzima en cada pozo, los sustratos, poly(glu,tyr) 4:1 y el ATP tuvieron una concentración final de 1 µmol L⁻¹ en tanto que la de los inhibidores fue de 10 nmol L⁻¹. Los ensayos se realizaron a 5 horas de incubación, después de las cuales, se utilizó el sistema de detección de ADP para cinasas *ADP-Glo™ Kinase Assay* (#catV6930).

Ensayos de inhibición enzimática sobre Lactato deshidrogenasa (LDH)

Todos los componentes del ensayo se disolvieron en el amortiguador de pH de trabajo. El amortiguador de pH fue preparado a partir del ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]etan-1-sulfónico (HEPES) y del 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]etan-1-sulfonato de potasio (HEPES-K) cuya concentración final fue 2 mmol L⁻¹ y pH de 7.2. Se prepararon disoluciones madre de los compuestos a evaluar en dimetilsulfóxido (DMSO)

Para el ensayo de competencia con el 2-oxopropanoato de sodio (piruvato) los sustratos de la enzima, la nicotina adenina dinucleótido reducida (β-NADH) y el piruvato, tuvieron una concentración final de 447 µmol L⁻¹ respectivamente. La cantidad de enzima depositada fueron 0.011 U.³⁹

Para el ensayo de competencia con β-NADH, el piruvato tuvo una concentración final de 447 µmol L⁻¹ y el NADH tuvo una concentración final de 40 µmol L⁻¹. La cantidad de enzima depositada fue 0.011 U⁴⁰.

Las moléculas ensayadas y el inhibidor NHI-2 fueron evaluados por triplicado a una concentración de 10 µmol L⁻¹, la concentración de DMSO máxima al final fue de 0.01% v/v. La actividad de la enzima se siguió en el sentido de la generación de lactato, se midió la fluorescencia generada por NADH a una

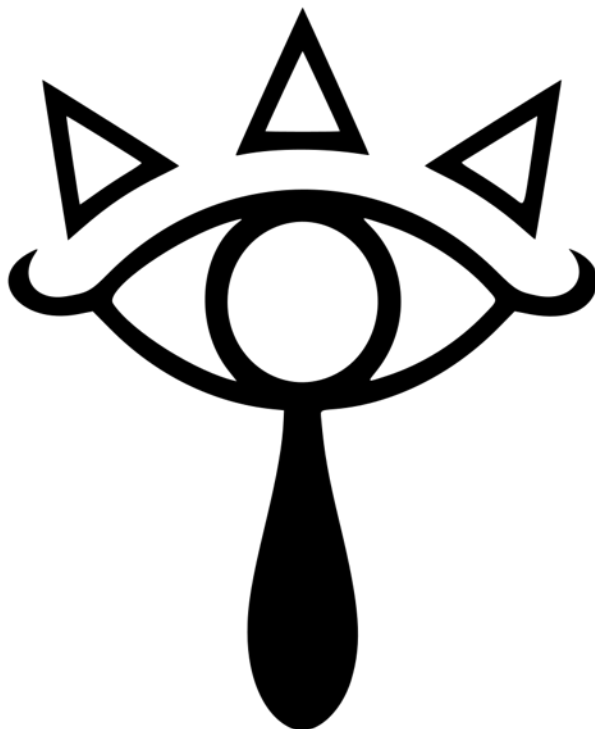
longitud de excitación/emisión de 340/460 nm. La actividad enzimática se calculó con la ecuación 1 (**anexo**).

Evaluación de citotoxicidad celular

Las líneas celulares que se utilizan en el laboratorio de pruebas biológicas del Instituto de Química pertenecen al NCI (PC3,MCF7), ATTC (MDA-MB23) y el Centro Médico (SKLU-1, COS7) y son cultivadas en el medio de cultivo RPMI-1640 adicionado con suero fetal bovino (10%) y una mezcla de antibióticos-antimicótico. Cada placa se inoculó con dos líneas celulares por triplicado y fueron incubadas por 24 hrs a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂. Para un **cribado primario** los compuestos fueron solubilizados en DMSO y se colocaron de tal manera que su concentración final fuese 0.025 µmol L⁻¹. Las placas fueron incubadas por 48 h.

Posterior al periodo de incubación, las células se fijaron *in situ* añadiendo una disolución de ácido tricloroacético frío al 50% e incubadas a 4°C por 60 minutos. Se desechó el sobrenadante, las placas se lavaron 5 veces con agua y dejaron secar al ambiente. El teñido de las células fijadas al sustrato del pozo, se efectuó añadiendo una solución al 0.4% de sulforrodamina B (SRB) e incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente. A las placas teñidas se les añadió disolución amortiguadora de tris-hidroximetil-aminometano (tris) y se midió la densidad óptica (DO) en un lector de microplacas a una longitud de onda de 515 nm.

RESULTADOS Y ANÁLISIS



RESULTADOS Y ANÁLISIS

RESULTADOS y ANÁLISIS

Diseño de la serie CUA/B

El diseño de la serie **CUA/B** tomó en cuenta la similitud de los inhibidores de EGFR modificando la posición 6 de la quinazolina así como en la similitud que presentan los derivados de quinolina inhibidores de LDH. Las modificaciones fueron realizadas con el fin de generar derivados asequibles generados en un solo paso de tal manera que se optimice la síntesis de las moléculas. Estas modificaciones se evaluaron utilizando el acoplamiento molecular tanto en EGFR y LDH.

La estructura de la LDHA utilizada para realizar el acoplamiento molecular fue de conejo; esto no representa un inconveniente debido a que la secuencia de la proteína de conejo presenta 93.66% de identidad con la secuencia de humano. Los aminoácidos que no son similares a la secuencia de humano no se encuentran en el sitio activo de la enzima, por lo que el acoplamiento molecular ni los ensayos de inhibición enzimática se ven comprometidos. El uso de la enzima proveniente de conejo corresponde a su abundancia e inmediatez al momento de adquirirla comercialmente.

De esta manera, el acoplamiento molecular se llevó a cabo y fue validado utilizando tres programas distintos. La pose generada por *LeDock* fue la pose de referencia, ya que se ha observado que este programa es el que mejor desempeño tiene para encontrar poses dentro de programas de acoplamiento molecular libres y comerciales ⁴¹. Se consideró válida la pose si esta no supera los 2Å de RMSD, los acoplamientos moleculares mostraron un valor promedio de este parámetro menor al límite anteriormente mencionado (**véase anexo**).

Los resultados para LDH, después de realizar el consenso de las energías de unión (CEU), se muestran en la figura 5. Se puede observar claramente que las moléculas diseñadas no se unen favorablemente al sitio de unión de piruvato a diferencia del sitio de NADH donde observa que la energía de unión es más negativa (kcal/mol) que inclusive el compuesto de referencia NHI-2.

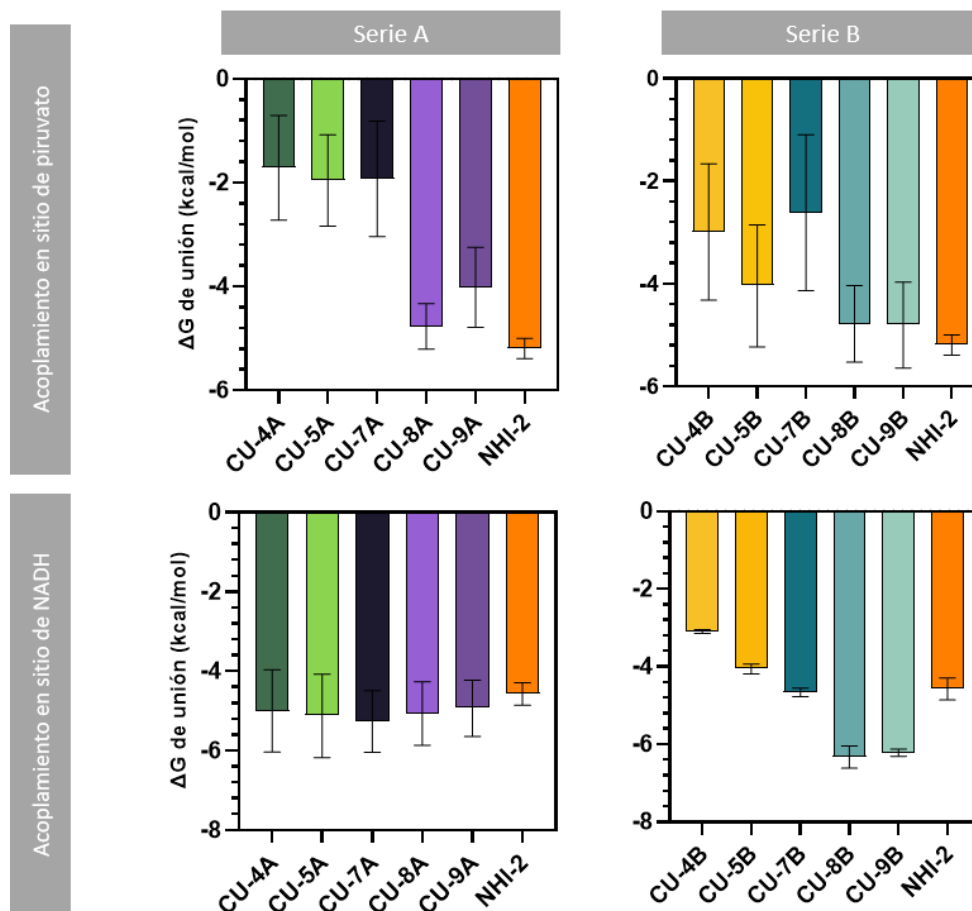


Figura 5. Consenso de energías de unión de la serie **CU** y **NHI-2** en los sitios de unión de piruvato y NADH

Esto es claro, ya que la similitud que presentan las moléculas con el NADH y su disposición espacial es muy similar. Es importante mencionar que los modos de unión de los compuestos fueron en isómero *trans* de la porción de tipo amida, de esta manera la molécula no “es forzada” a adquirir disposiciones tridimensionales no favorables.

Otro detalle claro a resaltar es que, las moléculas **CU-8/9/A/B**, son las que mejor perfil energético mostraron, ya que cuentan con un grupo amino en la porción de tipo benzilo.

RESULTADOS Y ANÁLISIS

Para el caso de EGFR, el CEU se muestra en la figura 6. Dado que la porción de tipo 4-anilinoquinazolina es similar a gefitinib es claro que las energías de unión son muy similares entre ellas. Así pues, se procedió a realizar la síntesis de las moléculas.

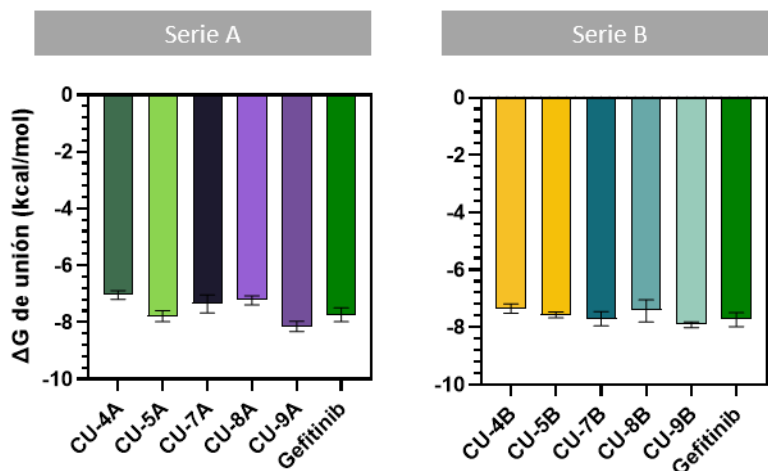
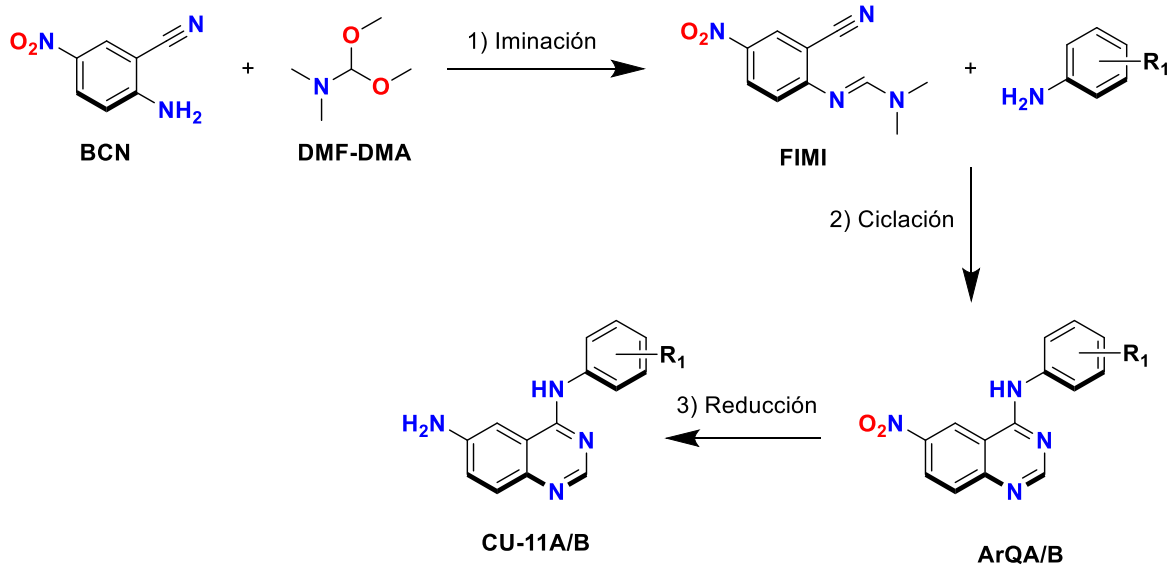


Figura 6. Consenso de energías de unión de la serie CU en EGFR

Síntesis química y caracterización instrumental

Síntesis de los intermediarios CU-11A/B



Esquema 1. Ruta sintética de la serie CU-11A/B

Tabla 2. Condiciones de reacción y rendimiento de la síntesis de la serie CU-11A/B

Reacción	Condiciones					R (%)
	Reactivos	Disolventes	T (°C)	t ₁ [*] (h)	t ₂ ^{**} (h)	
1 ^a	DMF-DMA	DMF	120	1.0	0.25	89
2 ^b	4-fluoroanilina, Anilina	AcOH/MeCN (3:7)	120	3.5	0.5	81
3 ^c	HCO ₂ NH ₄ , Pd/C	MeOH	70	1.5	N/A	90

*Tiempo de método convencional. **Tiempo de método en microondas. ^a 1.1 eq de DMF-DMA, 10 mL de disolvente. ^b 1.1 eq de la anilina correspondiente, 15/10 mL de mezcla de disolvente. ^c 6 eq de formiato de amonio, 10% en masa con respecto a la ArQ de Pd/C al 10% m/m..

Reacción (1) Iminación

En esta reacción es importante notar que la temperatura de reacción debe ser superior a los 90 °C pues es necesario que la transformación de la DMF-DMA ocurra. Dicha transformación promueve la formación de una especie altamente reactiva de tipo iminio la cual reacciona rápidamente con la amina proveniente del BCN en un proceso de adición-eliminación. En el trabajo final de la reacción resulta conveniente que se agregue DMF ya que el producto formado es poco soluble en dicho disolvente a temperatura ambiente lo que beneficia al rendimiento de la reacción. Como parte de la reacción, el subproducto formado es metanol por lo que al dejar enfriar el matraz o bien el vial de microondas el producto precipita en forma de cristales los cuales son aislados con facilidad, a través de una filtración al vacío. Cabe mencionar que esta reacción permite obtener el producto en escala de gramos.

Reacción (2) ciclación y (3) reducción

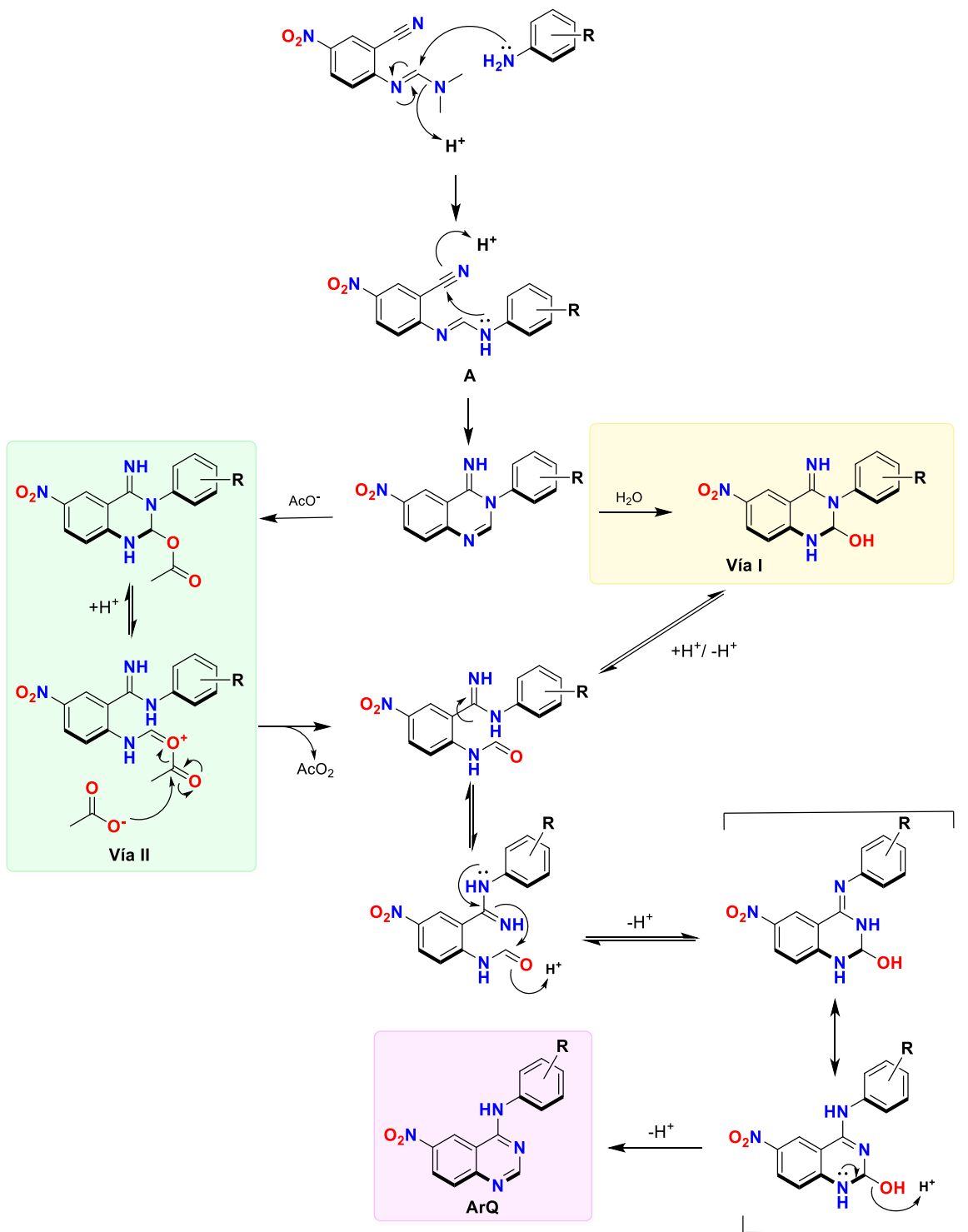
La reacción de ciclación procede favorablemente gracias al medio ácido que se utiliza a manera de disolvente. La formación de las moléculas **ArQA/B** se puede explicar mediante el rearrreglo de Dimroth (esquema 2) ^{42,43}. La formación de la imina **A** se ha logrado evidenciar indicando que dicha especie es clave para los pasos consecuentes ⁴⁴. En este punto de la reacción, puede resultar clara la necesidad de contar con la presencia de agua (vía I) dentro de la reacción para que esta reaccione con el carbonilo del enlace C-N₃ y la posterior apertura del anillo posterior al cual ocurre una rotación de 180° del enlace C₁₀-C₄. Sin embargo, las condiciones en las que se llevó a cabo la reacción eran anhidras, si bien el ácido acético glacial puede contener una mínima parte de agua, el 99% de la mezcla es ácido acético. Lo anterior puede promover que el acetato reaccione con el carbonilo del enlace C-N₃ (vía II) y, gracias a

RESULTADOS Y ANÁLISIS

la temperatura, la apertura del anillo se lleva a cabo formando en consecuencia anhídrido acético. Si bien, el anhídrido acético podría resultar inconveniente para la reacción pues la anilina puede acilarse, el último paso de la formación de la quinazolina inhibe cualquier reacción de acilación secundaria pues se produce agua y esta reaccionará rápidamente con el anhídrido acético. En lo que respecta al trabajo final de la reacción, similar a la iminación anterior, los productos son insolubles en el medio de reacción por lo que se pueden filtrar directamente y posteriormente realizar limpieza del mismo utilizando acetonitrilo caliente.

Para la reacción de reducción, el método de hidrogenación catalítica resulta un método muy eficiente para la obtención de la **ArQA/B**. Es importante mencionar que el agente reductor, el disolvente y la temperatura son importantes para que la reacción pueda llevarse a cabo pues, tanto el sustrato como el producto, son muy solubles a temperaturas altas. De esta manera, la hidrogenación catalítica es el método más eficiente para la reducción; además, el trabajo final de la reacción resulta muy conveniente pues posterior a la eliminación del Pd/C la disolución se lleva a punto de saturación posterior, en el cual puede añadirse agua y promover la cristalización del producto así como mantener en disolución el formiato de amonio que pudiese encontrarse en exceso.

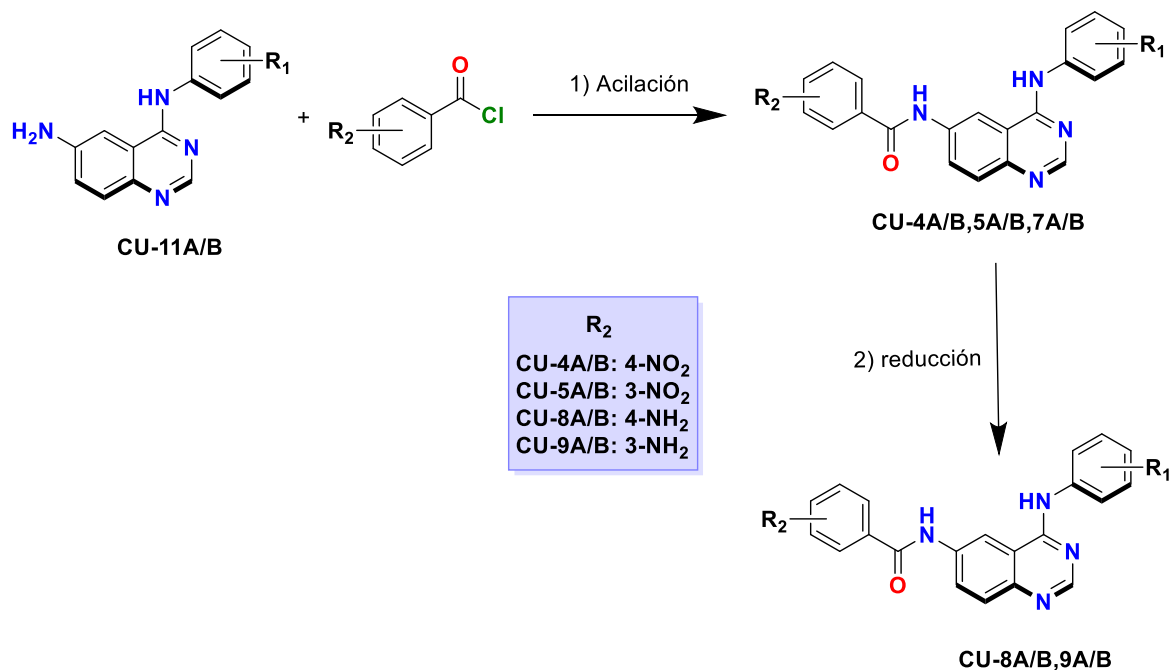
RESULTADOS Y ANÁLISIS



Esquema 2. Mecanismo de reacción para la formación de la serie ArQ

RESULTADOS Y ANÁLISIS

Síntesis de los productos finales CUA/B



Esquema 3. Ruta sintética de los productos finales CUA/B. En el proceso 2, los compuestos utilizados son CU-4A/B y CU-5A/B

Tabla 3. Condiciones de reacción y rendimiento de la síntesis de la serie AQ-A-C

Reacción	Condiciones					R (%)
	Reactivos	Disolventes	T (°C)	t ₁ [*] (h)	t ₂ ^{**} (h)	
1 ^a	Cloruro de benzoilo, Et ₃ N	MeCN (Anhídrido)	T.a	1.0	N/A	14-70
2 ^b	HCO ₂ NH ₄ , Pd/C	MeOH	70	1.0	N/A	85-90

*Tiempo de método convencional. **Tiempo de método en microondas. ^a 2.5 eq de cloruro del cloruro de benzoilo correspondiente, 3 eq de trietilamina. ^b 6 eq de formiato de amonio, 10% en masa con respecto a la ArQ de Pd/C al 10% m/m..

Reacción (1) acilación

La reacción de acilación en presencia de trietilamina cuantitativamente al analizarse mediante cromatografía de capa fina (CCF) después de una hora, se descartan subproductos de

acilación de manera empírica pues en CCF sólo se observa una mancha No hubo necesidad de realizar purificaciones posteriores.

La presencia de trietilamina permite que la **ArQA/B** se disuelva por completo en el medio de reacción por lo que la reacción procede fácilmente al estar los reactivos en disolución. En el medio de reacción, la sal generada por la neutralización con la trietilamina y el HCl liberado comienza a precipitar lo que permite eliminar de manera sencilla las materias primas que no reaccionaron. Además, la reacción es detenida al agregar NaOH a la mezcla, esto permite que el cloruro de benzoilo en exceso se convierta en su respectivo benzoato el cual es soluble en agua, mientras que el producto comienza a precipitar permitiendo obtenerlo mediante filtración a vacío. Este trabajo final de la reacción permite obtener rendimientos pobres a moderados pues estos rondan entre 14% a 70%.

Reacción (2) reducción

Muy similar a lo ocurrido en la reacción anterior, la reducción del grupo nitro presente en **CU-4A/B** y **CU-5A/B** es muy directa. Con las condiciones optimizadas y el tratamiento final de la reacción, en donde se descomponen los posibles intermediarios reactivos, se permite aislar los productos **CU-8A/B** y **CU-9A/B** de manera sencilla obteniendo rendimientos buenos entre 85% a 90%.

Análisis instrumental

Los productos finales fueron caracterizados mediante espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear en una dimensión (1D-RMN) de protón (^1H) y carbono (^{13}C) así como RMN de dos dimensiones (2D-RMN) y por espectroscopía de efecto nuclear Overhauser (NOESY) para determinar la isomería de la amida que presentan las moléculas.

Al realizar el análisis de todas las moléculas se logró identificar el patrón de señales características de la quinazolina en ^1H y en ^{13}C , dichos patrones de señales se muestran en la figura 7. Este patrón y desplazamiento químico de señales permitió identificar rápidamente al anillo de quinazolina y poder asignar el resto de señales correspondientes a los respectivos sustituyentes.

RESULTADOS Y ANÁLISIS

En cuanto a RMN de protón, las señales observadas fueron consistentes, para el hidrógeno número 2, la señal observada fue un singulete. Para la señal del hidrógeno 6, esta se observó como doblete en todas las iteraciones y, finalmente, la señal de los hidrógenos 8 y 9 se observaron como dobles de dobles que, en algunos casos, se encontraron mezclados con otras señales generando una señal de tipo multiplete.

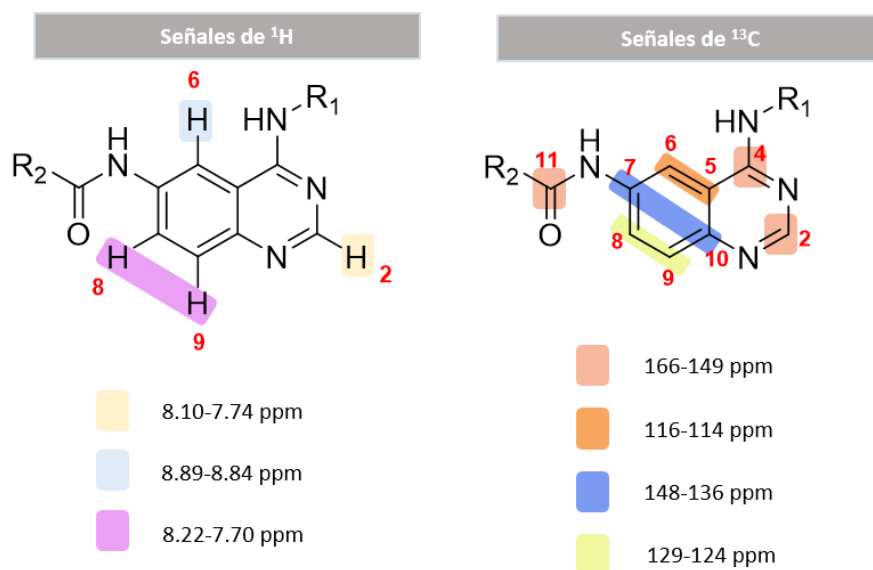


Figura 7. Rango de señales características de ¹H y ¹³C de las quinazolininas sintetizadas

Con respecto a la RMN de ¹³C, algunas de las señales se encontraban en desplazamientos químicos muy cercanos por lo que algunas señales no eran fácilmente distinguibles. Comenzando con la señal de carbono de amida (carbono 11) que se encuentra a campo alto seguidos de los carbonos 2 y 4 que también se encuentran a campo alto pues se encuentran considerablemente desprotegidos. Los carbonos 5 y 6, y 8 y 9 se encontraron en zonas muy características correspondientes a carbonos de tipo sp². Finalmente, la señal de los carbonos 7 y 10 se encontraron siempre en un intervalo de desplazamiento químico correspondiente a la unión de N y C.

Una vez identificadas las señales de las quinazolininas, se procedió a identificar las señales de los sustituyentes en posición 4 de la misma quinazolinina; de esta manera se logró identificar los patrones característicos de la 4-fluoroanilina y de la anilina tal y como se muestra en la figura 8.

RESULTADOS Y ANÁLISIS

Para la serie CUB, es decir, el sustituyente de tipo anilina, se observaron las señales características de un benceno monosustituido tanto para ^1H -RMN como en ^{13}C -RMN, 4 grupos de señales en total. En tanto para el espectro de ^1H -RMN, se observaron 3 señales, siendo la señal del hidrógeno numerado 15 como un triplete, y las señales para los hidrógenos 13 y 14 se mostraron como dobletes, ya siendo doble de dobles o doble de triples.

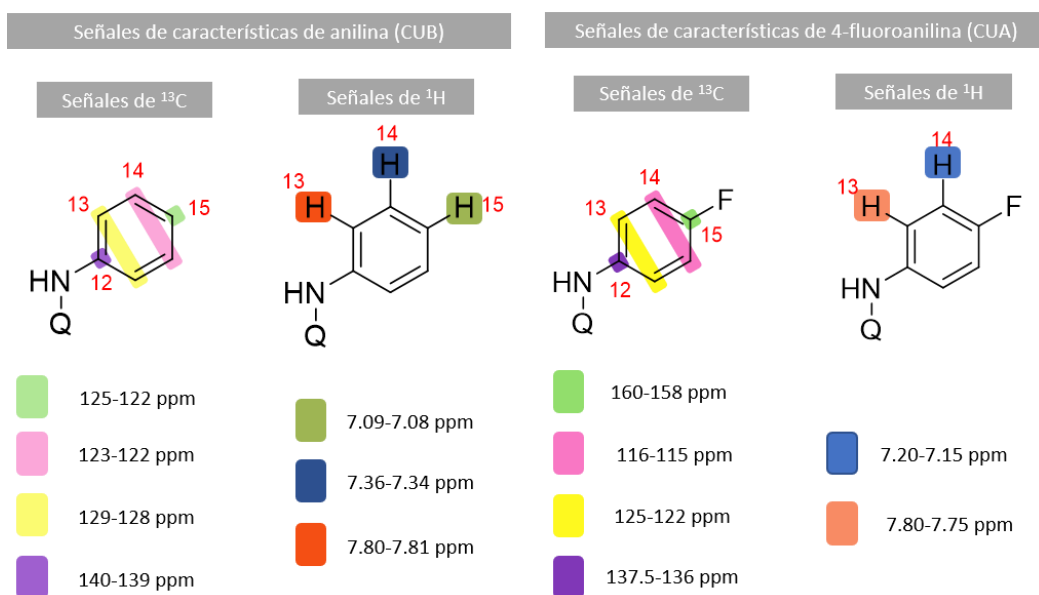


Figura 8. Intervalo de señales características de ^1H y ^{13}C de 4-fluoroanilina (serie CUA) y anilina (serie CUB).

Para las señales de la 4-fluoroanilina, es decir, la serie CUA, en el espectro de RMN- ^{13}C también, se observaron 4 señales de carbono, características de un benceno disustituido. En el espectro de ^1H -RMN, se observaron dos señales de los hidrógenos 13 y 14 que, de igual manera, se observaron como dobletes ya siendo doble de dobles o doble de triples. Es importante notar la diferencia de los intervalos encontrados en las anilinas, los intervalos de los desplazamientos químicos encontrados en la 4-fluoro anilina, tanto para los carbonos 13 y 14 y sus respectivos hidrógenos, se encuentran a menor desplazamiento químico mostrando que el átomo de flúor funge como un sustituyente donador de densidad electrónica. Por supuesto, la señal del carbono 15 unido a flúor se encuentra en mayores desplazamientos químicos dada la naturaleza del enlace que se genera, pues es un enlace covalente polar.

RESULTADOS Y ANÁLISIS

También es importante mencionar, que esta misma señal se divide en 2 señales, es decir, un doblete, ya que existe acoplamiento de los núcleos entre flúor y carbono y la secuencia de pulsos utilizada en el experimento realizado no permite desacoplar esta interacción⁴⁵. Finalmente, gracias a los experimentos NOESY fue posible determinar los isómeros generados por las amidas respectivas. Si bien, para la serie **CU-A**, los hidrógenos de los nitrógenos no fueron detectados por el experimento, sus análogos de la serie **CU-B** si fueron observados lo que permitió determinar su isomería. De esta manera, se observaron las siguientes conformaciones: **CU-5A/B** y **CU-9A/B** *trans*. **CU-7A/B** tanto *cis* como *trans*. Es importante comentar que todos los compuestos sintetizados son completamente nuevos y todos ellos fueron sólidos. (Véase anexo para datos espectroscópicos y espectrométricos)

Evaluación biológica

Inhibición enzimática de EGFR

Los ensayos de inhibición sobre EGFR se realizaron con el fin de competir con ATP. La concentración elegida para evaluar las moléculas se decidió basándose en la CI_{50} reportada para gefitinib (9.3 nmol L^{-1}) dentro del mismo tipo de ensayo realizado (medición de luminiscencia)⁴⁶.

Los resultados de este ensayo se observan en la figura 9.

RESULTADOS Y ANÁLISIS

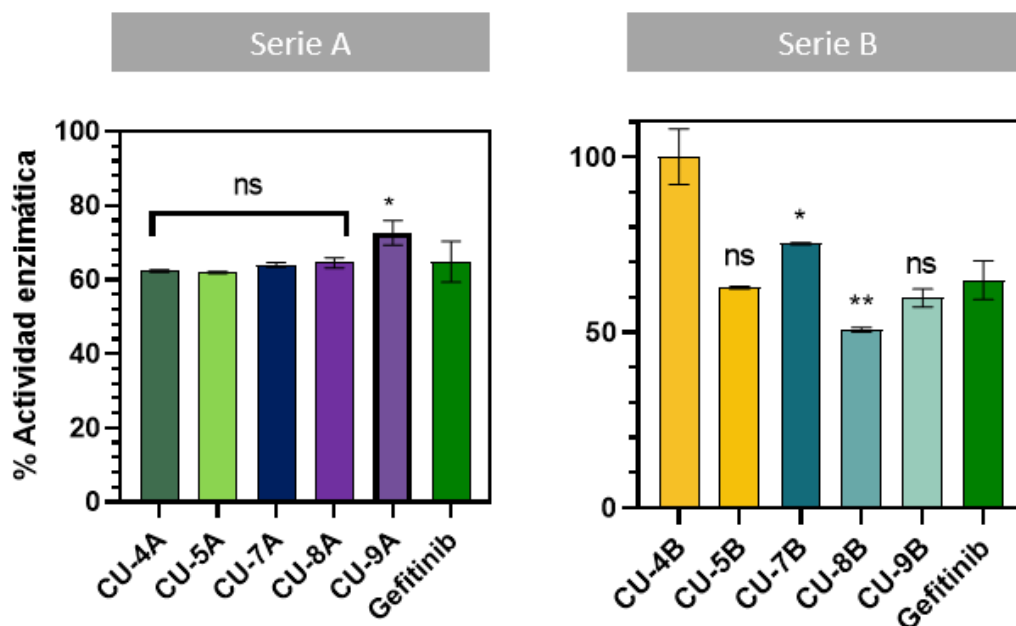


Figura 9. Resultados de inhibición enzimática de EGFR. Se utilizó EGFR recombinante de humano para evaluar a las moléculas (10 nmol/L) y a gefitinib (10 nmol/L) como control positivo. Los resultados se presentan como %promedio de actividad enzimática \pm DE (n=2). Los datos se compararon estadísticamente mediante ANOVA de una vía ($p < 0.0001$) tomando como control a NHI-2; posteriormente, se realizó una prueba de Dunnet. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$).

Como puede notarse, los compuestos evaluados, presentan actividad similar a gefitinib. Esto tiene correlación con las energías de unión predichas por acoplamiento molecular. Es importante notar que la serie **CU-B** es ligeramente más potente que la serie **CU-A**; esto puede deberse a la que la anilina en posición 4 de la quinazolina no tiene sustituyentes por lo que es probable que esta se encuentre más estable dentro de la zona hidrofóbica que presenta la cinasa generando interacciones de tipo van der Waals. La figura 10 muestra los modos de unión de **CU-9A**, **CU-9B** y gefitinib. Como puede observarse, el modo de unión es muy similar entre ellos, esto es claro dada la estructura que comparten ambas moléculas. Se sugiere que las moléculas orientan su N1 hacia el carbonilo de la M795, la cual es la interacción clave para presentar actividad inhibitoria, además mantener dentro del receptor la porción de tipo anilina ya mencionada la cual, en todos los casos, presenta una interacción de tipo π -catión.

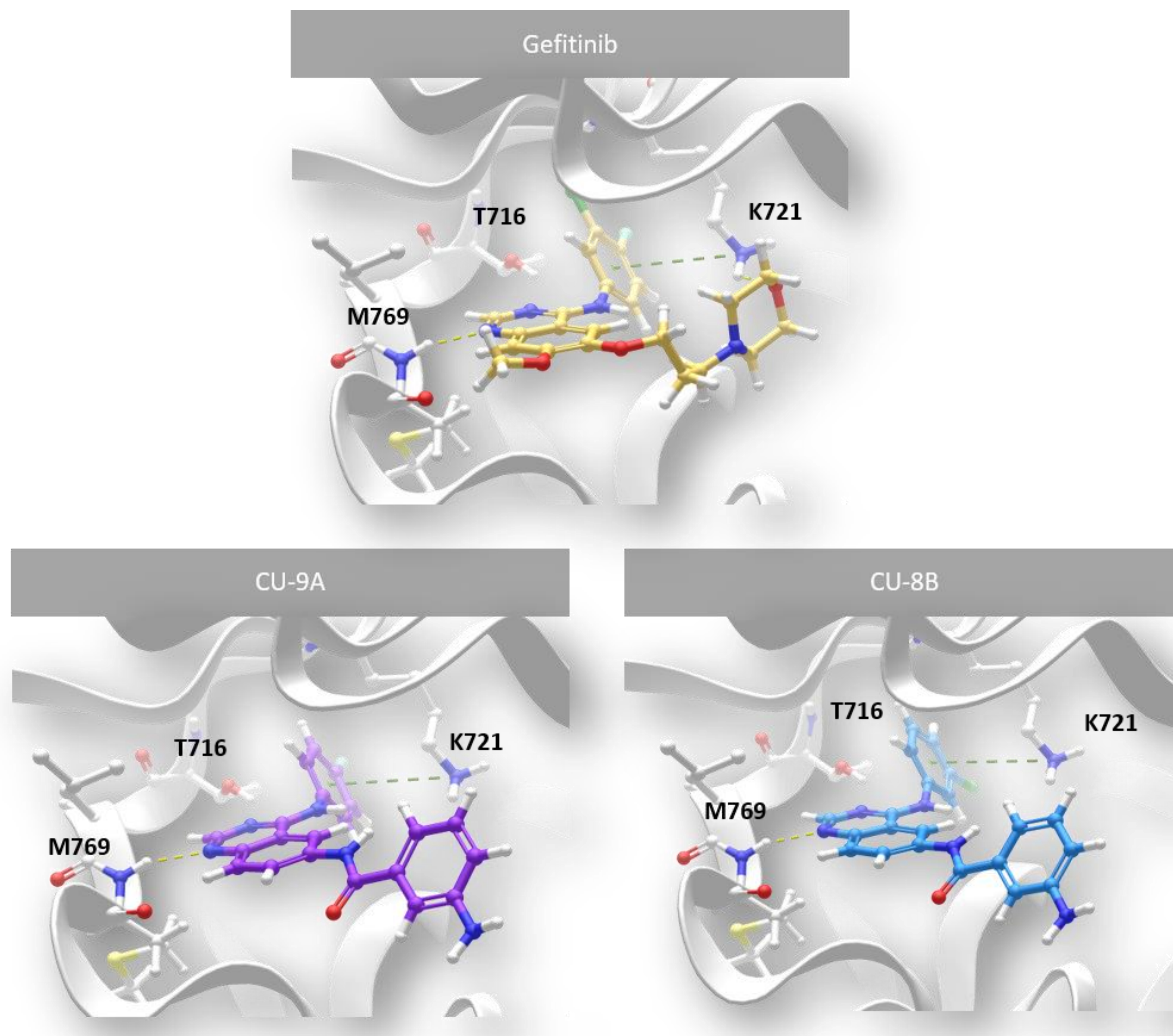


Figura 10. Modo de unión 3D predicho de gefitinib, CU-9A y CU-9B mediante los programas de acoplamiento molecular (Ledock) (PDB:2GS7). (Véase anexo para la representación del modo de unión en 2D)

Un detalle a destacar, es la nula actividad de **CU-4B**; la predicción del modo de unión de esta molécula es muy similar, si se compara con el resto de las moléculas. Es posible que la poca actividad de esta molécula se deba a que no es tan soluble en el amortiguador empleado en estos ensayos enzimáticos. A pesar de ello, ambas series presentaron actividad potente sobre esta enzima, por lo que estos resultados son muy favorables.

Inhibición enzimática de LDH

El ensayo de inhibición enzimática, se realizó bajo dos condiciones, la competencia contra piruvato y la competencia contra NADH. La condición de competencia contra piruvato se planteó de tal manera que la concentración de NADH fuese al menos 1000 veces más que la concentración de las moléculas evaluadas para asegurar que el sitio de unión de NADH se encontrase saturado. Por otro lado, la condición de competencia contra NADH se realizó a 4 veces más concentrado el NADH que las moléculas a ensayar, así se podría observar la competencia de las moléculas ensayadas, además, la concentración a evaluar se eligió debido a la CI_{50} del control positivo..

Competencia con piruvato

Los resultados de los ensayos de competencia se muestran en la figura 11.

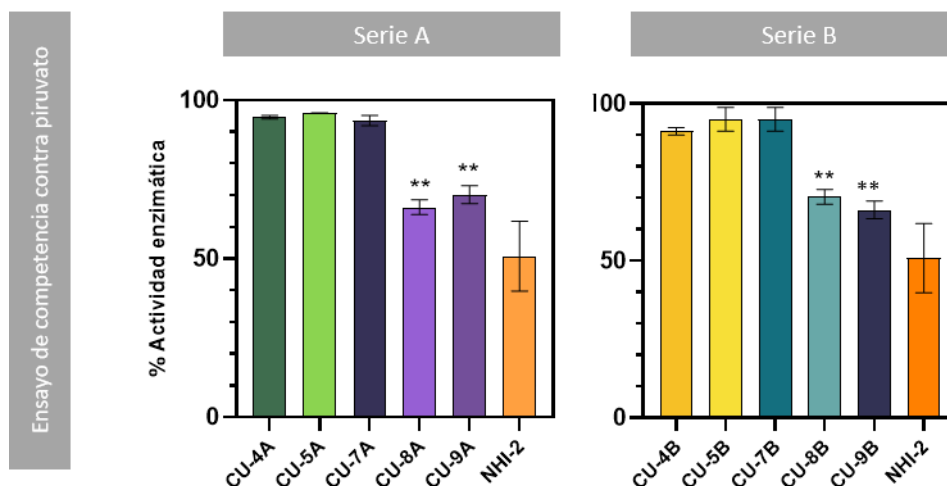


Figura 11. Resultados de inhibición enzimática de LDH en competencia con piruvato. Se utilizó LDH de músculo de conejo para evaluar a las moléculas (10 $\mu\text{mol/L}$) y a NHI-2 (10 $\mu\text{mol/L}$) como control positivo. Los resultados se presentan como %promedio de actividad enzimática \pm DE (n=3). Los datos se compararon estadísticamente mediante ANOVA de una vía ($p < 0.0001$) tomando como control a NHI-2, posteriormente, se realizó una prueba de Dunnet. (** $p < 0.01$).

Como puede observarse, a diferencia del compuesto control, **NHI-2**, las moléculas ensayadas tuvieron nula o poca actividad biológica en el sitio de unión de piruvato. Este resultado era esperable, debido a que los resultados de acoplamiento molecular indicaban que estos

RESULTADOS Y ANÁLISIS

compuestos no presentasen actividad biológica considerable. Interesantemente, los compuestos que sí presentaron actividad biológica fueron los respectivos pares **CU-8/9-A/B**. Al realizar el análisis de las poses predichas por acoplamiento molecular se observan algunos detalles que podrían explicar la actividad biológica de estas moléculas (figura 12).

En primer lugar **NHI-2** orienta la porción de tipo éster hacia la R168, la cual es la porción responsable de reconocer al piruvato y anclarlo para que este sea reducido por el NADH. Si bien, **NHI-2**, se encuentra en su forma de éster, es posible que durante su aproximación hacia el sitio activo de la enzima pudiera hidrolizarse, sin embargo, los datos reportados de su actividad biológica se atribuyen a su forma de éster; cabe mencionar que la actividad encontrada en estos experimentos realizados, coincide con su valor reportado de CI_{50}^{40} .

Ahora bien, la posible razón por la cual las moléculas ensayadas hayan presentado actividad sobre la enzima, puede deberse a que la orientación de la porción tipo 3-aminobenzoilo y la porción tipo 4-aminobenzoilo, ambas se orientan hacia la R168 e incluso establece apilamientos de tipo π (desplazado) con Y238 y/o H192. Dado el modo de unión de **CU-8/9-A**, la propia quinazolina podría establecer una interacción de tipo π -catión con R105 y, aunque **CU-8/9-B** no parece interactuar con R105 por parte de la quinazolina, sí puede establecer una interacción similar con la porción de anilina ya que la ausencia del átomo de flúor le permite presentar esta pose, haciendo equivalente el número de interacciones con respecto su par análogo.

RESULTADOS Y ANÁLISIS

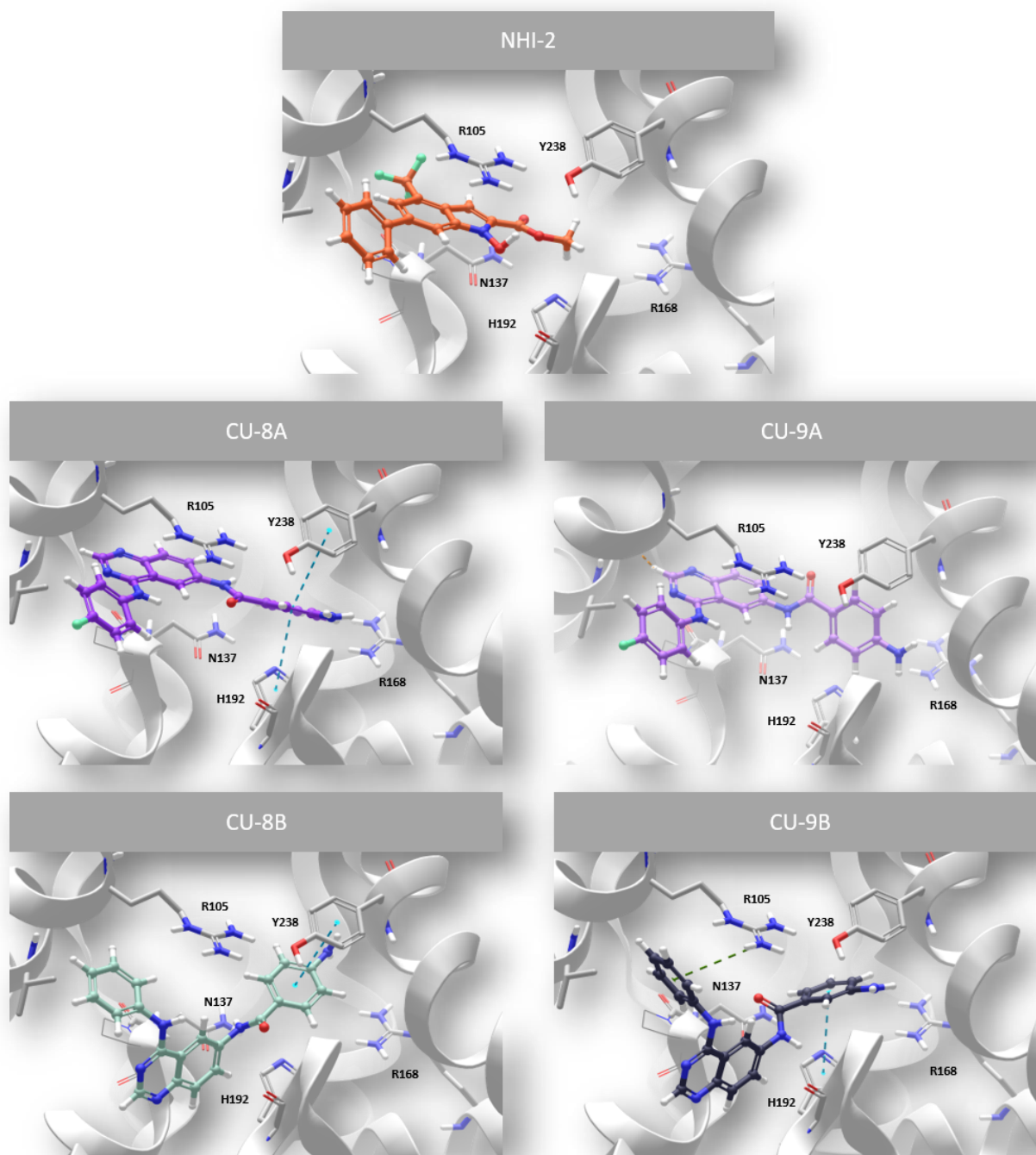


Figura 12. Modo de unión 3D de **NHI-2**, **CU-8A**, **CU-9A**, **CU-8B** y **CU-9B** predicho por acoplamiento molecular (ledock). Las interacciones se muestran con líneas punteadas. (PDB:6Q13).(Véase anexo para la representación del modo de unión en 2D)

Competencia con NADH

Los datos de competencia con NADH se muestran en la figura 13.

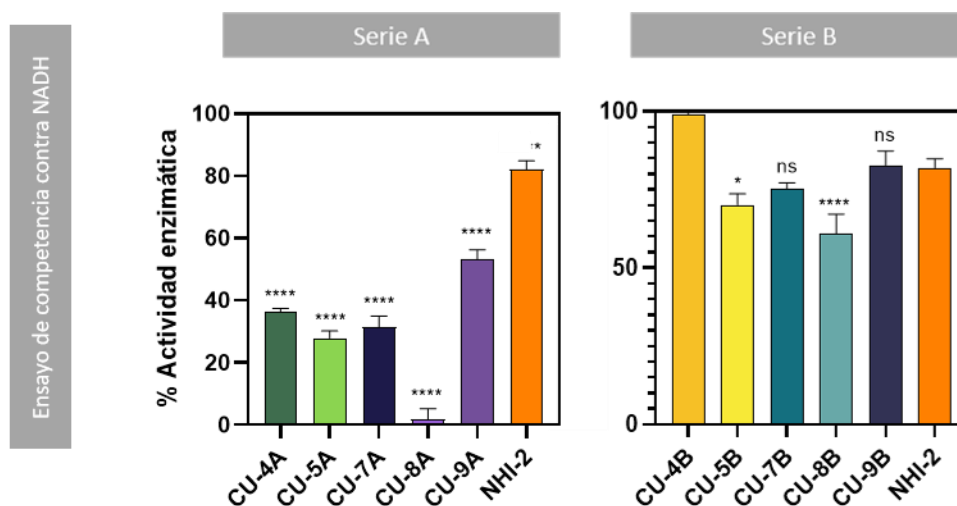


Figura 13. Resultados de inhibición enzimática de LDH en competencia con NADH. Se utilizó LDH de músculo de conejo para evaluar a las moléculas (10 $\mu\text{mol/L}$) y a NHI-2 (10 $\mu\text{mol/L}$) como control positivo. Los resultados se presentan como %promedio de actividad enzimática \pm DE ($n=3$). Los datos se compararon estadísticamente mediante ANOVA de una vía ($p < 0.0001$) tomando como control a NHI-2, posteriormente, se realizó una prueba de Dunnet. (**** $p < 0.0001$; * $p < 0.05$).

Para estos ensayos, los resultados obtenidos muestran mayor actividad inhibitoria sobre la enzima. Una tendencia clara se puede observar con respecto una serie de moléculas con respecto a la otra serie de éstas es que muestra mayor actividad biológica que la serie **CU-B** y que incluso el compuesto **NHI-2**. Esta tendencia parece coincidir de cierta manera con los resultados presentados de acoplamiento molecular. Para poder entender la razón por la cual la serie **CU-A** presenta más actividad, se analizaron los modos de unión de **CU-8A**, **CU-4B** y **NHI-2** (figura 14). Comenzando con **NHI-2**, se observa que el modo de unión orienta el *N*-hidroxiindol hacia la interfaz de la proteína generando un puente de hidrógeno con el oxígeno de la cadena principal de T94. El resto de las interacciones son únicamente contactos hidrofóbicos lo cual explica la energía de unión (-4.2 kcal/mol). En lo que respecta a **CU-8A**, el modo de unión permite establecer dos puentes de hidrógeno provenientes del NH de la anilina y del NH de la amida con los oxígenos de la cadena principal de T94 y G96. Además,

RESULTADOS Y ANÁLISIS

la 4-fluoroanilina se orienta hacia la cadena lateral de N137 en donde el propio flúor tiene la posibilidad de generar un puente de hidrógeno de dicha cadena lateral; de esta manera es posible explicar la mayor afinidad de esta molécula al sitio activo. Finalmente, al comparar el modo de unión de **CU-8A** con NADH, se puede observar las similitudes en las poses de estas moléculas. La porción de tipo 4-aminobenzoilo se localiza en la misma zona de la adenina de NADH, inclusive orientando a la amina hacia la misma dirección. Además, la amida de **CU-8A** mimetiza el puente de hidrógeno que establece NADH con G96. Finalmente, la zona relativamente polar de **CU-8A** de 4-fluoroanilina, se localiza en la misma zona en donde se une la pentosa de NADH.

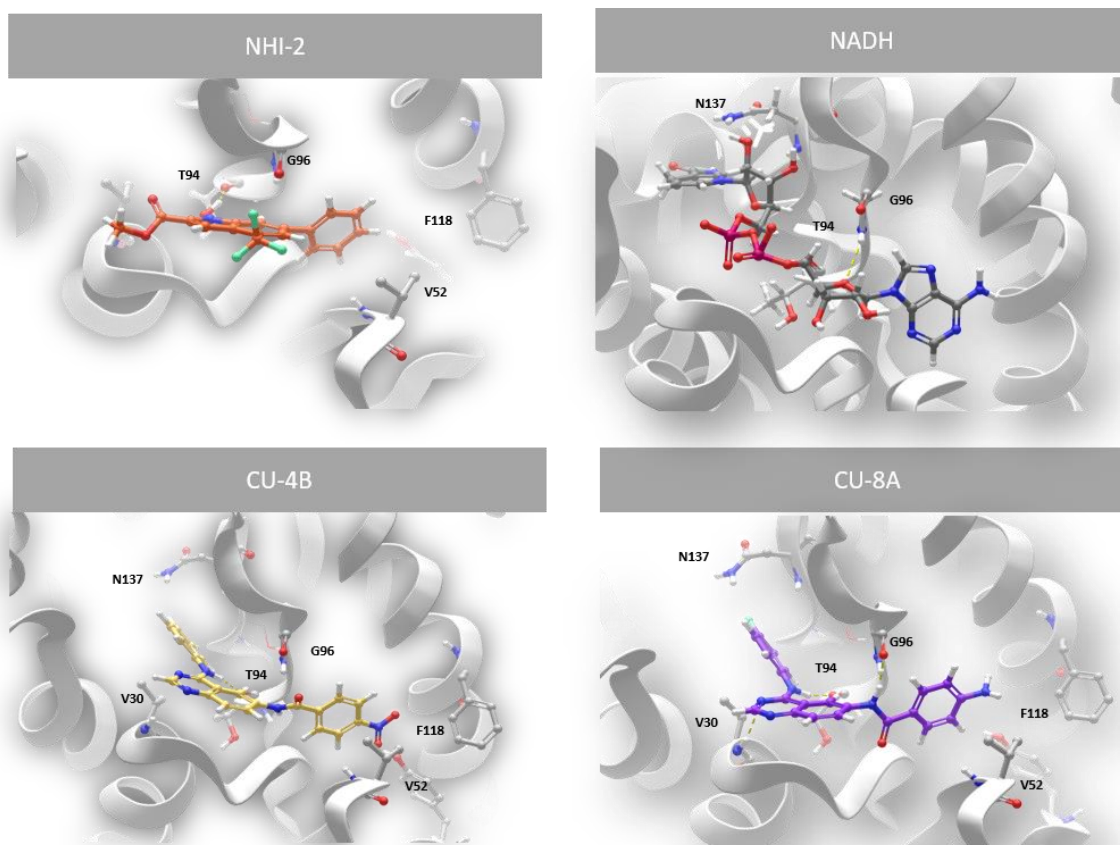


Figura 14. Modo de unión 3D de **NHI-2**, **CU-8A** y **CU-4B** predicho por acoplamiento molecular (Ledock) así como la pose co-cristalizada de NADH. Las interacciones se muestran con líneas punteadas. Se observan puentes de hidrógeno con G96 y T94. (PDB:6Q13). (Véase anexo para la representación del modo de unión en 2D)

RESULTADOS Y ANÁLISIS

Otra manera de explicar la actividad biológica, es la polaridad del sitio de unión de NADH. La figura 15, muestra la polaridad de esta zona, la cual es notablemente polar, lo cual tiene sentido pues debe recibir a NADH que es una molécula con una polaridad alta. Además, el sitio de unión de NADH cambia su conformación, pues la R98 cambia su posición, al recibir la molécula de NADH esta R98 “encierra” a la molécula asegurando su posición ⁴⁷. Este hecho puede suceder para las moléculas evaluadas, por lo que la serie **CU-B**, al momento de unirse al sitio de NADH puede presentar impedimento estérico importante, lo que desestabiliza al complejo proteína-ligando promoviendo la salida de las moléculas de este sitio.

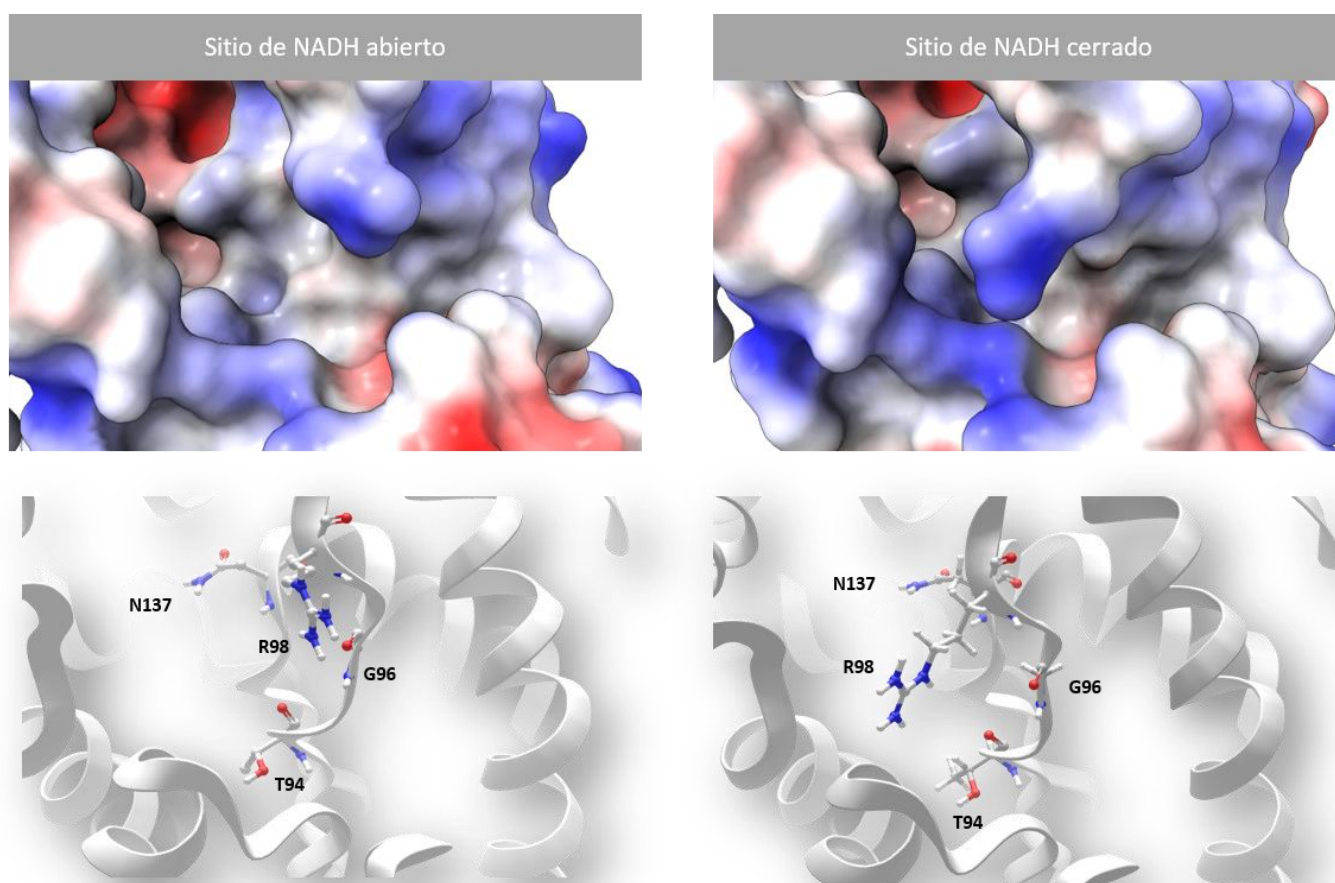


Figura 15. Superficies de potencial electrostático del sitio de unión de NADH en LDH y aminoácidos clave en el reconocimiento y apertura del sitio de NADH. Estructura abierta *PDB: 4I4s*; estructura cerrada *PDB: 4I4r*.

Evaluación citotóxica en líneas celulares

Los ensayos de viabilidad celular se llevaron a cabo utilizando sulforodamina B (SRB, figura 13) como se mencionó en la metodología. Este tipo de ensayo tiene la ventaja sobre otros ensayos de viabilidad celular como MTT o azul de tripano ya que no depende del metabolismo celular y por lo tanto no existen posibles reacciones entre el colorante y las moléculas evaluadas⁴⁸. La función de la SRB se basa en la unión de proteínas que fueron fijadas a las células una vez que se trataron con ácido trifluoroacético. Si bien, este método no podría distinguir entre células muertas o viables, los resultados no se ven comprometidos y diversas comparaciones se han llevado a cabo comprobando que el uso de este colorante es muy confiable⁴⁹⁻⁵². En lo que respecta a la evaluación biológica, los análisis involucraron distintas líneas celulares y una línea sana con el fin de evaluar la seguridad y selectividad de las moléculas.

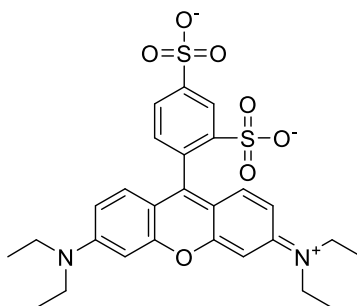


Figura 16. Estructura de la sulforodamina

Ensayos citotóxicos: Serie CU-A

Los resultados de ensayos citotóxicos de la serie **CU-A** se muestran en la figura 17. Lo primero que es posible notar, es que las moléculas **CU-4A**, **CU-5A** y **CU-7A** presentaron una actividad baja sobre todas líneas celulares salvo en la línea MDA-MB231, que es una línea de cáncer de mama triple negativo (CMTN). Esta línea, como su origen lo indica, no presenta receptor de estrógenos (RE), receptor de progesterona (RP) y el receptor del factor de crecimiento humano 2 (HER2). De esta manera, dado que las moléculas presentaron actividad citotóxica, podemos saber que la diana biológica no se encuentra dentro de estos receptores.

RESULTADOS Y ANÁLISIS

Para el caso de la serie PC3, MCF-7 y SKLU-1 que son líneas celulares de carcinoma de próstata, adenocarcinoma de mama y adenocarcinoma de pulmón respectivamente, se observa que **CU-4A**, **CU-5A** y **CU-7A** no presentan actividad en estas células y en la línea HCT-15, una línea de cáncer colorectal, presentaron una actividad baja. En lo que respecta a las moléculas **CU-8A** y **CU-9A**, se observa que son las moléculas que presentaron actividad variable, que ca de alta a muy baja, en todas las líneas celulares salvo en SKLU-1 para **CU-9A**.

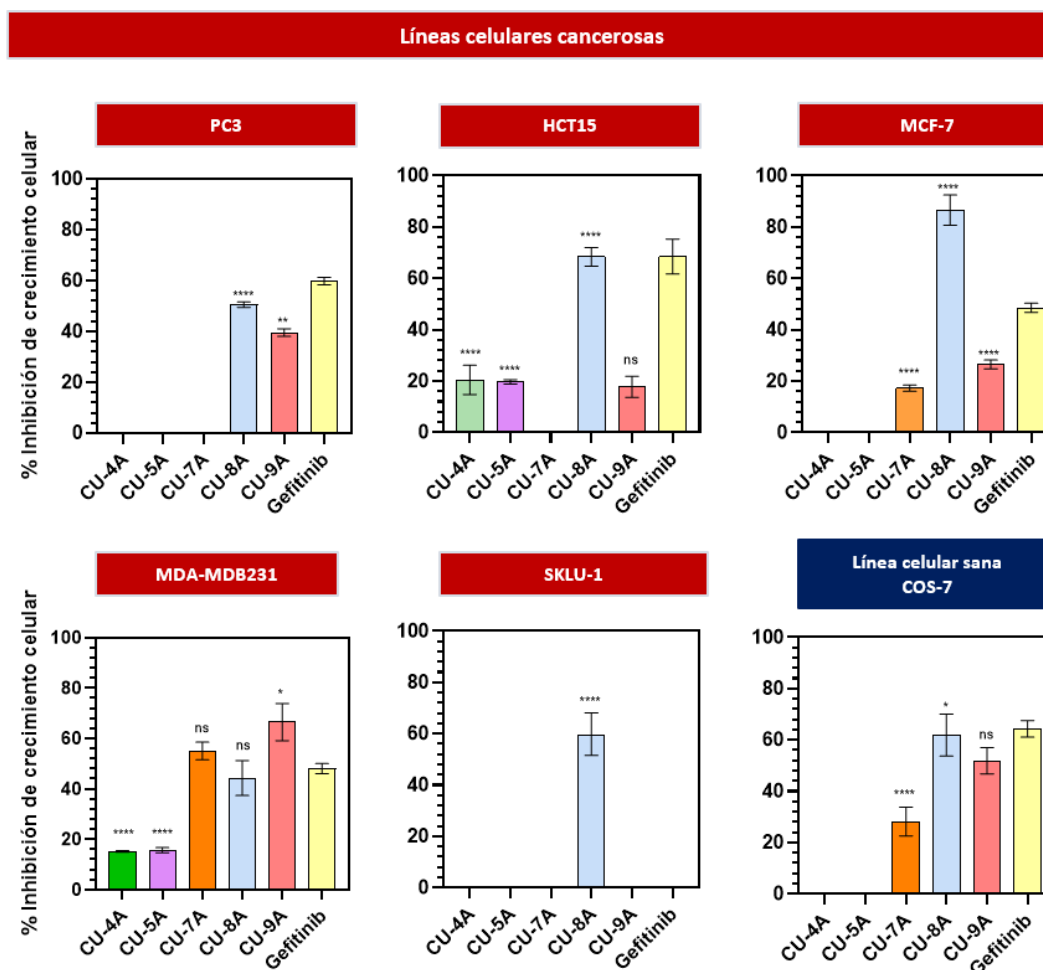


Figura 17. Resultados de ensayos de citotoxicidad de la serie **CU-A** sobre líneas celulares cancerosas y una sana. Las moléculas se evaluaron a 25 $\mu\text{mol/L}$ junto con el control positivo gefitinib. Los resultados se presentan como %Inhibición de crecimiento celular \pm DE ($n=3$). Los datos se compararon estadísticamente mediante ANOVA de una vía ($p < 0.0001$) tomando como control a Gefitinib,

RESULTADOS Y ANÁLISIS

posteriormente, se realizó una prueba de *Dunnet*. (**** $p < 0.0001$; * $p < 0.05$; ns, sin diferencia estadísticamente significativa).

De acuerdo con los datos disponibles de *The Protein Human Atlas (PHA)*⁵³, PC3 presenta 103 unidades normalizadas de expresión (NX) de RNA y MCF-7 34.9 NX de RNA para LDHA; en lo que respecta al resto de líneas celulares, no existe información normalizada o cuantificada sobre la expresión de esta enzima.

A pesar de ello, gracias a los datos disponibles, se puede explicar por qué **CU-8A** tiene buena actividad en PC3 y MCF-7 dado que esta molécula resultó la más potente a nivel enzimático; además, revela que la posición de la amina en la porción de tipo benzoilo influye de manera importante en la actividad celular similar a lo observado a nivel enzimático. De manera interesante, esta molécula tiene mayor actividad sobre MCF-7 que sobre PC3, se esperaría que fuese al revés la actividad dada la expresión de la enzima. Este fenómeno puede deberse a la composición de la membrana celular, pues esta puede tener mayor o menor expresión de transportadores de moléculas orgánicas y las bombas de expulsión como la ABC (*ATP binding cassette*).

Otra evidencia que podría soportar esta hipótesis, es la expresión de EGFR en las líneas celulares; es importante recordar que el diseño de las moléculas se basó en la similitud con los inhibidores de EGFR que, a propósito, uno de ellos es gefitinib, el control positivo de los ensayos celulares. El PHA, muestra que la expresión de EGFR en la línea PC3 (2.2 NX) es mayor que en la línea MCF-7 (0.2 NX). Dado que las moléculas resultaron tener actividad muy potente sobre EGFR, se esperaría que estas fueran más activas sobre PC3, cosa que no sucede por lo que, de nuevo, se puede atribuir este fenómeno a la composición de la membrana de las células.

Es importante notar, que las moléculas que no resultaron potentes para LDH, siguieron presentando actividad citotóxica, esto puede deberse a la importante actividad inhibitoria sobre EGFR. Ejemplo de lo anterior son moléculas como **CU-4A**, **CU-5A** y **CU-7A** que no tienen buena actividad sobre LDH pero sí sobre EGFR y por ello logran presentar ligera actividad citotóxica. Por otro lado, la molécula **CU-8A**, que resultó ser la más activa de la serie, tiene

correlación directa entre su actividad citotóxica y como inhibidor enzimático pues como se analizó anteriormente, su CI_{50} sobre LDH se encuentra claramente por debajo de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Si bien, los resultados fueron de moderados a buenos, la actividad sobre la línea celular sana, COS-7 (riñón de chimpancé) es notable por lo que aún es necesario realizar modificaciones a las moléculas para poder disminuir esta toxicidad sobre la línea sana. Afortunadamente, la molécula más potente, **CU-8A**, además de superar o igualar a las moléculas de referencia en los ensayos enzimáticos y celulares, tiene la posibilidad de ser modificada con el fin de mejorar la selectividad por lo que esta molécula puede considerarse una molécula *líder*^{8,24}, por supuesto, será necesario caracterizar las respectivas CI_{50} a nivel enzimático y a nivel celular.

Ensayos citotóxicos: Serie CU-B

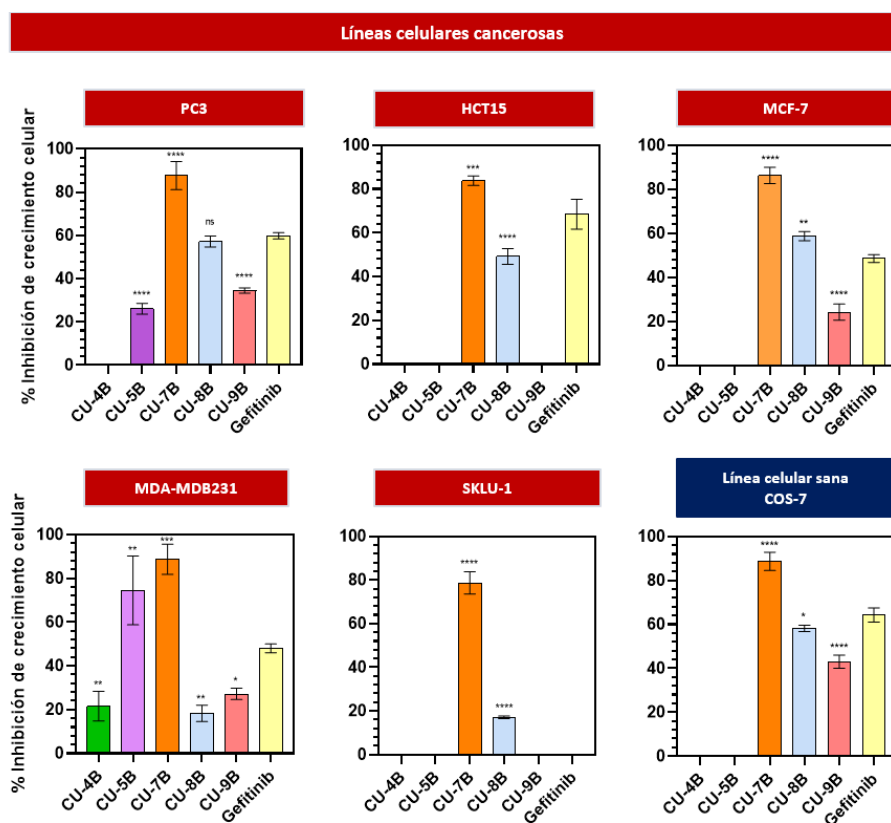


Figura 18. Resultados de ensayos de citotoxicidad de la serie **CU-A** sobre líneas celulares cancerosas y una sana. Las moléculas se evaluaron a $25 \mu\text{mol/L}$ junto con el control positivo gefitinib. Los resultados se presentan como %Inhibición de crecimiento celular \pm DE ($n=3$). Los datos se compararon

RESULTADOS Y ANÁLISIS

estadísticamente mediante ANOVA de una vía ($p < 0.0001$) tomando como control a Gefitinib, posteriormente, se realizó una prueba de Dunnet. (***) $p < 0.0001$; (*) $p < 0.05$; ns, sin diferencia estadísticamente significativa).

En lo que respecta a la serie **CU-B**, los resultados de citotoxicidad se muestran en la figura 18. Es muy notable que esta serie resultó ser ligeramente más activa que su serie análoga siendo el compuesto con la mejor actividad el **CU-7B**. Es importante resaltar que, esta serie resultó ser menos activa para LDH, por lo que su actividad podría encontrarse justificada, su potencia no podría estar asociada por esta diana biológica, ya que para la línea PC3 y MCF-7, los resultados son muy similares. De esta manera, la razón por la cual los compuestos, de manera general resultaron ser más potentes debe relacionarse con la estructura de las moléculas.

Uno de los aspectos que pueden tener impacto en la actividad o toxicidad de xenobióticos, es el metabolismo de los mismos. El metabolismo de fase I es el responsable de generar metabolitos que en ocasiones pueden ser más activos o menos activos, ya que se basa en la modificación de las estructuras químicas, siendo las reacciones óxido-reducción las más abundantes de esta fase⁵⁴. Al observar las moléculas de la serie **CU-B** es evidente que una porción que se encuentra disponible para biotransformarse es la anilina.

Se encuentra bien documentado que, los fármacos que presentan anilinas en su estructura, son susceptibles a hidroxilaciones, generalmente en la posición número 4 con respecto al nitrógeno (figura 16A)⁵⁴⁻⁵⁶. Estas hidroxilaciones son necesarias para que, posteriormente, en fase II de metabolismo, los xenobióticos sean conjugados con otras biomoléculas como glutatión o ácido glucurónico para su posterior excreción. Sin embargo, si estas moléculas previamente biotransformadas se encuentran en gran concentración, es posible que vuelvan a ser oxidadas. Tal es el caso de las 4-hidroxianilinas, al ser oxidadas de nuevo, estas son convertidas a quinoneiminas (figura 19B).

Estas especies, quinoneiminas, son aceptores de tipo Michael dada su estructura de tipo carbonilo alfa,beta-insaturado. Por supuesto, estas especies pueden reaccionar con bases blandas como lo es el glutatión; sin embargo, si estas especies se encuentran continuamente dentro de las células, estas especies pueden comenzar a reaccionar con otras bases blandas

RESULTADOS Y ANÁLISIS

presentes dentro de las macromoléculas de las células, como pueden ser proteínas. Al reaccionar los tioles de las proteínas estas dejan de funcionar y se genera estrés dentro de la célula lo que la conduce a la muerte⁵⁷⁻⁵⁹. De esta manera, es posible que las moléculas de la serie **CU-B** pasen por estas biotransformaciones por lo que la aparente actividad anticancerosa se potencia por toxicidad de los metabolitos (figura 19C). Por supuesto, esto puede evitarse bloqueando la posición 4 de la anilina con algún átomo distinto a hidrógeno, y el resultado puede observarse en la serie **CU-A**.

Finalmente, es importante mencionar que son necesarios experimentos para demostrar que las moléculas evaluadas disminuyen los niveles de ácido láctico producido, de esta manera se podrá validar que uno de los mecanismos de acción para inducir la muerte celular, es la inhibición de LDH que, por supuesto, será necesario determinar qué proteínas son expresadas para promover dicha muerte celular.

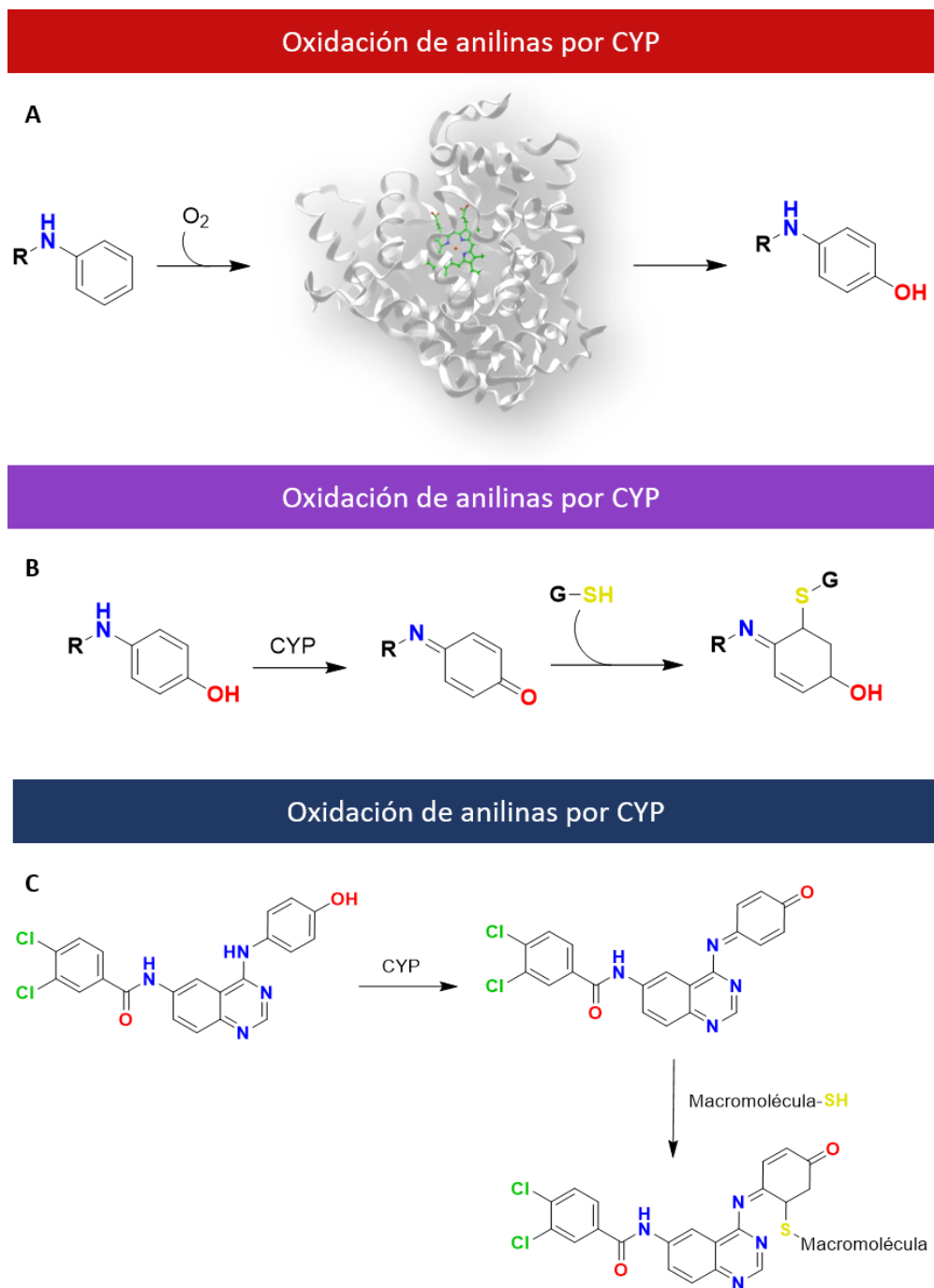
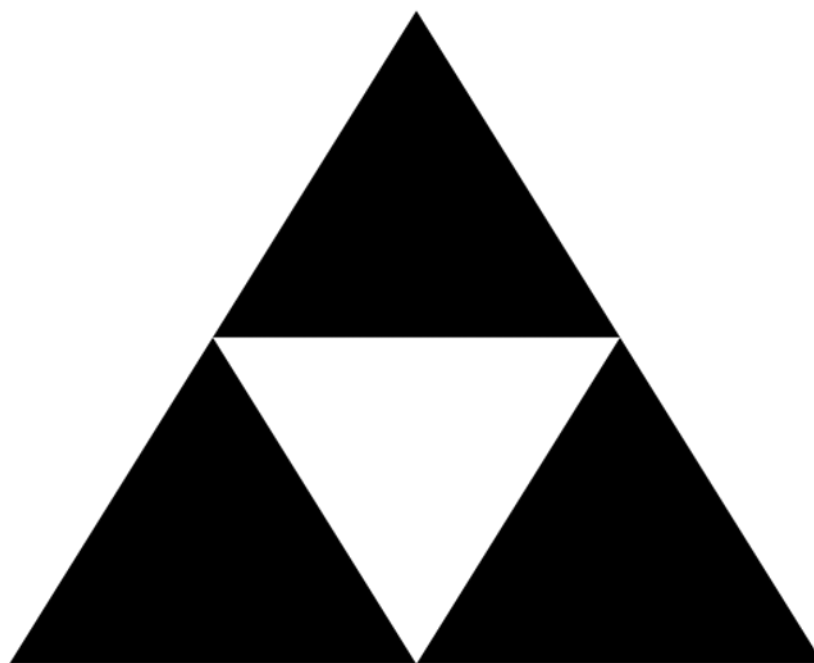


Figura 19. Metabolismo y toxicidad de anilinas y compuestos de la serie **CU-B**. **(A)** Las anilinas son biotransformadas mediante los CYP450 mediante hidroxilación. **(B)** Un exceso de anilina hidroxilada es nuevamente biotransformada a quinoneimina, una estructura que reacciona con nucleófilos. **(C)** Las moléculas de la serie **CU-B** pueden presentar una biotransformación hacia quinoneiminas las cuales se unen a macromoléculas generando toxicidad celular.

CONCLUSIONES Y PRERSPECTIVAS



Conclusiones

Se lograron diseñar y sintetizar 10 moléculas divididas en 2 series distintas, **CU-A** y **CU-B** con núcleo de quinazolina las cuales se evaluaron a nivel enzimático sobre EGFR y LDH. Los resultados de estos ensayos indican que las moléculas son potentes inhibidoras de EGFR e inhibidoras moderadas en LDH sobre el sitio de NADH.

A nivel celular, la serie **CU-A** presentó resultados mixtos, destacando de manera importante la potencia de **CU-8A** en la mayoría de las líneas celulares evaluadas y por ser la única que presentó actividad sobre la línea SKLU-1 (adenocarcinoma de cáncer). En lo que respecta a la serie **CU-B**, los resultados de actividad citotóxica son ligeramente más potentes, sin embargo, esta actividad puede deberse a la toxicidad por metabolismo de las moléculas.

Además, la actividad biológica de las moléculas, presentan correlación directa entre los datos de inhibición enzimática y citotoxicidad: las moléculas que no son buenas inhibidoras de LDH pero sí de EGFR presentan actividad citotóxica, en tanto que, una de las moléculas, **CU-8A**, que es excelente inhibidora de ambas enzimas presenta una buena actividad citotóxica sobre las líneas celulares cancerosas

Finalmente, dados los resultados de actividad enzimática, celular y la disponibilidad de modificar la estructura, **CU-8A**, se consideró una molécula *líder* de la cual se podrán realizar optimizaciones de selectividad.

Perspectivas

- Determinar CI_{50} de las moléculas más activas sobre EGFR, LDH y las líneas celulares.
- Demostrar el modo de unión propuesto EGFR y LDH mediante experimentos de cristalografía de la molécula **CU-8A**.
- Proponer modificaciones de **CU-8A** para mejorar selectividad y promover su acción dual.
- Realizar experimentos para determinar qué tipo de muerte celular llevan a cabo las moléculas y qué implicaciones fisiológico celulares se presentan.

Bibliografía

- (1) OMS. *Cancer Tomorrow*, 2020.
- (2) INEGI. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. Datos nacionales https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018_nal.pdf (accessed Jul 4, 2020).
- (3) Reynoso-Noverón, N.; Torres-Domínguez, J. A. Epidemiología Del Cáncer En México : Carga Global y Proyecciones 2000-2020 Epidemiology of Cancer in México : Global Burden and Projections 2000-2020. *Rev. Latinoam. Med. Conduct.* **2017**.
- (4) Barnes, J. L.; Zubair, M.; John, K.; Poirier, M. C.; Martin, F. L. Carcinogens and DNA Damage. *Biochemical Society Transactions.* 2018. <https://doi.org/10.1042/BST20180519>.
- (5) NTP (National Toxicology Program). Report on Carcinogens, Fourteenth Edition. *Rep. Carcinog.* **2016**. <https://doi.org/10.1542/pir.32-9-375>.
- (6) Bouvard, V.; Baan, R.; Straif, K.; Grosse, Y.; Secretan, B.; El Ghissassi, F.; Benbrahim-Tallaa, L.; Guha, N.; Freeman, C.; Galichet, L.; Coglianò, V. A Review of Human Carcinogens--Part B: Biological Agents. *The lancet oncology.* 2009. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(09\)70096-8](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(09)70096-8).
- (7) Varios. *Tumor Metabolome Targeting and Drug Development*, Primera Ed.; Kanner, S., Ed.; Springer, 2014.
- (8) Owens, J. Determining Druggability. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**. <https://doi.org/10.1038/nrd2275>.
- (9) Gotwals, P.; Cameron, S.; Cipolletta, D.; Cremasco, V.; Crystal, A.; Hewes, B.; Mueller, B.; Quaratino, S.; Sabatos-Peyton, C.; Petruzzelli, L.; Engelman, J. A.; Dranoff, G. Prospects for Combining Targeted and Conventional Cancer Therapy with Immunotherapy. *Nature Reviews Cancer.* 2017. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.17>.

- (10) Thundimadathil, J. Cancer Treatment Using Peptides: Current Therapies and Future Prospects. *J. Amino Acids* **2012**. <https://doi.org/10.1155/2012/967347>.
- (11) Medina-Franco, J. L.; Fernán-Dezde Gortari, E.; Jesús Naveja, J. Avances En El Diseño de Fármacos Asistido Por Computadora. *Educ. Quim.* **2015**, *26* (3), 180–186. <https://doi.org/10.1016/j.eq.2015.05.002>.
- (12) Liu, Y.; Gray, N. S. Rational Design of Inhibitors That Bind to Inactive Kinase Conformations. *Nature Chemical Biology*. 2006. <https://doi.org/10.1038/nchembio799>.
- (13) Traxler, P.; Furet, P. Strategies toward the Design of Novel and Selective Protein Tyrosine Kinase Inhibitors. In *Pharmacology and Therapeutics*; 1999. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(98\)00044-8](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(98)00044-8).
- (14) Tong, M.; Seeliger, M. A. Targeting Conformational Plasticity of Protein Kinases. *ACS Chemical Biology*. 2015. <https://doi.org/10.1021/cb500870a>.
- (15) Hunter, T.; Hunter, T. Treatment for Chronic Myelogenous Leukemia: The Long Road to Imatinib. *Mol. Cell* **2007**, *117* (8), 2036. <https://doi.org/10.1172/JCI31691.2036>.
- (16) Pagliarini, R.; Shao, W.; Sellers, W. R. Oncogene Addiction: Pathways of Therapeutic Response, Resistance, and Road Maps toward a Cure. *EMBO Rep.* **2015**, *16* (3), 280–296. <https://doi.org/10.15252/embr.201439949>.
- (17) Kannaiyan, R.; Mahadevan, D. A Comprehensive Review of Protein Kinase Inhibitors for Cancer Therapy. *Expert Review of Anticancer Therapy*. 2018. <https://doi.org/10.1080/14737140.2018.1527688>.
- (18) Ferguson, F. M.; Gray, N. S. Kinase Inhibitors: The Road Ahead. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2018. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.21>.
- (19) Mok, T. S.; Wu, Y. L.; Ahn, M. J.; Garassino, M. C.; Kim, H. R.; Ramalingam, S. S.; Shepherd, F. A.; He, Y.; Akamatsu, H.; Theelen, W. S. M. E.; Lee, C. K.; Sebastian, M.; Templeton, A.; Mann, H.; Marotti, M.; Ghorghiu, S.; Papadimitrakopoulou, V. A. Osimertinib or Platinum-Pemetrexed in EGFR T790M-Positive Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2017**. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1612674>.

- (20) Wu, Y. L.; Ahn, M. J.; Garassino, M. C.; Han, J. Y.; Katakami, N.; Kim, H. R.; Hodge, R.; Kaur, P.; Brown, A. P.; Ghiorghiu, D.; Papadimitrakopoulou, V. A.; Mok, T. S. K. CNS Efficacy of Osimertinib in Patients with T790M-Positive Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer: Data from a Randomized Phase III Trial (Aura3). In *Journal of Clinical Oncology*, 2018. <https://doi.org/10.1200/JCO.2018.77.9363>.
- (21) Flaherty, K. T.; Robert, C.; Hersey, P.; Nathan, P.; Garbe, C.; Milhem, M.; Demidov, L. V.; Hassel, J. C.; Rutkowski, P.; Mohr, P.; Dummer, R.; Trefzer, U.; Larkin, J. M. G.; Utikal, J.; Dreno, B.; Nyakas, M.; Middleton, M. R.; Becker, J. C.; Casey, M.; Sherman, L. J.; Wu, F. S.; Ouellet, D.; Martin, A. M.; Patel, K.; Schadendorf, D. Improved Survival with MEK Inhibition in BRAF-Mutated Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **2012**. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1203421>.
- (22) Long, G. V.; Stroyakovskiy, D.; Gogas, H.; Levchenko, E.; De Braud, F.; Larkin, J.; Garbe, C.; Jouary, T.; Hauschild, A.; Grob, J. J.; Chiarion Sileni, V.; Lebbe, C.; Mandalà, M.; Millward, M.; Arance, A.; Bondarenko, I.; Haanen, J. B. A. G.; Hansson, J.; Utikal, J.; Ferraresi, V.; Kovalenko, N.; Mohr, P.; Probachai, V.; Schadendorf, D.; Nathan, P.; Robert, C.; Ribas, A.; DeMarini, D. J.; Irani, J. G.; Casey, M.; Ouellet, D.; Martin, A. M.; Le, N.; Patel, K.; Flaherty, K. Combined BRAF and MEK Inhibition versus BRAF Inhibition Alone in Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **2014**. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1406037>.
- (23) Solit, D. B.; Rosen, N. Resistance to BRAF Inhibition in Melanomas. *N. Engl. J. Med.* **2011**. <https://doi.org/10.1056/NEJMcibr1013704>.
- (24) Sneader, W. *Drug Discovery: A History*; 2006. <https://doi.org/10.1002/0470015535>.
- (25) Kroemer, G.; Pouyssegur, J. Tumor Cell Metabolism: Cancer's Achilles' Heel. *Cancer Cell*. 2008, pp 472–482. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.05.005>.
- (26) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The next Generation. *Cell*. 2011, pp 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- (27) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **2000**, 100 (1), 57–70.

<https://doi.org/10.1007/s00262-010-0968-0>.

- (28) Trott, O., Olson, A. J. Autodock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking. *J. Comput. Chem.* **2010**.
- (29) Huey, R.; Morris, G. M.; Forli, S. Using AutoDock 4 and AutoDock Vina with AutoDockTools: A Tutorial. *Scripps Res. Inst. Mol.* **2012**.
- (30) Liu, N.; Xu, Z. Using LeDock as a Docking Tool for Computational Drug Design. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*; 2019.
<https://doi.org/10.1088/1755-1315/218/1/012143>.
- (31) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. E.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G. A.; O., F.; Foresman, J. B.; Fox, J. D. Gaussian 16. *Gaussian, Inc., Wallingford CT*,. 2016.
- (32) Burke, K.; Wagner, L. O. DFT in a Nutshell. *International Journal of Quantum Chemistry*. 2013. <https://doi.org/10.1002/qua.24259>.
- (33) Becke, A. B3LYP. *J. Chem. Phys.* **1993**.
- (34) Rassolov, V. A.; Ratner, M. A.; Pople, J. A.; Redfern, P. C.; Curtiss, L. A. 6-31G* Basis Set for Third-Row Atoms. *J. Comput. Chem.* **2001**. <https://doi.org/10.1002/jcc.1058>.
- (35) Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*. 2000.
<https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>.
- (36) Schrödinger. Protein Preparation Wizard | Schrödinger. *Schrödinger Release 2018-1*. 2018.
- (37) Dallakyan, S.; Olson, A. J. Small-Molecule Library Screening by Docking with PyRx. *Methods Mol. Biol.* **2015**. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2269-7_19.
- (38) Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J. Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function. *J. Comput. Chem.* **1998**, *19* (14), 1639–1662.

[https://doi.org/https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(19981115\)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(19981115)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B).

- (39) Powers, J. L.; Kiesman, N. E.; Tran, C. M.; Brown, J. H.; Bevilacqua, V. L. H. Lactate Dehydrogenase Kinetics and Inhibition Using a Microplate Reader. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **2007**, *35* (4), 287–292. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bmb.74>.
- (40) Granchi, C.; Calvaresi, E. C.; Tuccinardi, T.; Paterni, I.; Macchia, M.; Martinelli, A.; Hergenrother, P. J.; Minutolo, F. Assessing the Differential Action on Cancer Cells of LDH-A Inhibitors Based on the N-Hydroxyindole-2-Carboxylate (NHI) and Malonic (Mal) Scaffolds. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11* (38), 6588–6596. <https://doi.org/10.1039/C3OB40870A>.
- (41) Wang, Z.; Sun, H.; Yao, X.; Li, D.; Xu, L.; Li, Y.; Tian, S.; Hou, T. Comprehensive Evaluation of Ten Docking Programs on a Diverse Set of Protein–Ligand Complexes: The Prediction Accuracy of Sampling Power and Scoring Power. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18* (18), 12964–12975. <https://doi.org/10.1039/C6CP01555G>.
- (42) Fischer, R. W.; Misun, M. Large-Scale Synthesis of a Pyrrolo[2,3-d]Pyrimidine via Dakin-West Reaction and Dimroth Rearrangement. *Org. Process Res. Dev.* **2001**. <https://doi.org/10.1021/op010041v>.
- (43) Katritzky, A. R. Recent Advances in the Dimroth Rearrangement: A Valuable Tool for the Synthesis of Heterocycles. *Advances in Heterocyclic Chemistry*. 2010. [https://doi.org/10.1016/S0065-2725\(10\)01011-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2725(10)01011-1).
- (44) Gilday, John, P.; Welham, Malthew, J. Process for the Manufacture of Gefitinib. *WO2005023783* **2005**.
- (45) Labmert, J.; Mazzola, E.; Ridge, C. *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: An Introduction to Principles, Applications, and Experimental Methods*, 2nd ed.; Wiley, 2019.
- (46) Ding, C.; Chen, S.; Zhang, C.; Hu, G.; Zhang, W.; Li, L.; Chen, Y. Z.; Tan, C.; Jiang, Y. Synthesis and Investigation of Novel 6-(1,2,3-Triazol-4-Yl)-4-Aminoquinazolin

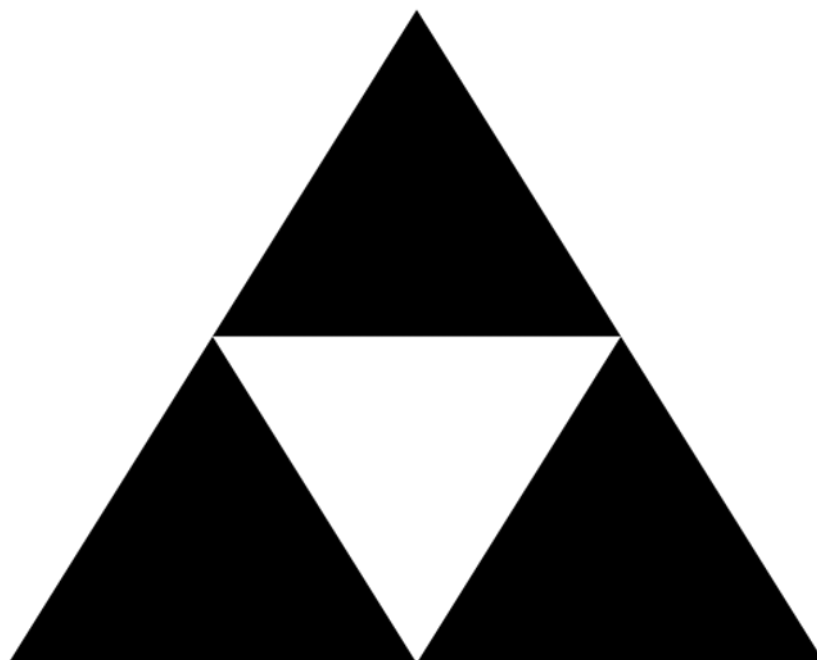
Derivatives Possessing Hydroxamic Acid Moiety for Cancer Therapy. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25* (1), 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.10.006>.

- (47) Dempster, S.; Harper, S.; Moses, J. E.; Dreveny, I. Structural Characterization of the Apo Form and NADH Binary Complex of Human Lactate Dehydrogenase. *Acta Crystallogr. Sect. D* **2014**, *70* (5), 1484–1490. <https://doi.org/10.1107/S1399004714005422>.
- (48) Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, *82* (13), 1107–1112. <https://doi.org/10.1093/jnci/82.13.1107>.
- (49) Rubinstein, L. V.; Shoemaker, R. H.; Paull, K. D.; Simon, R. M.; Tosini, S.; Skehan, P.; Scudiero, D. A.; Monks, A.; Boyd, M. R. Comparison of in Vitro Anticancer-Drug-Screening Data Generated with a Tetrazolium Assay versus a Protein Assay against a Diverse Panel of Human Tumor Cell Lines. *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, *82* (13), 1113–1118. <https://doi.org/10.1093/jnci/82.13.1113>.
- (50) Haselsberger, K.; Peterson, D. C.; Thomas, D. G.; Darling, J. L. Assay of Anticancer Drugs in Tissue Culture: Comparison of a Tetrazolium-Based Assay and a Protein Binding Dye Assay in Short-Term Cultures Derived from Human Malignant Glioma. *Anticancer. Drugs* **1996**, *7* (3), 331–338.
- (51) Perez, R. P.; Godwin, A. K.; Handel, L. M.; Hamilton, T. C. A Comparison of Clonogenic, Microtetrazolium and Sulforhodamine B Assays for Determination of Cisplatin Cytotoxicity in Human Ovarian Carcinoma Cell Lines. *Eur. J. Cancer* **1993**, *29A* (3), 395–399. [https://doi.org/10.1016/0959-8049\(93\)90394-u](https://doi.org/10.1016/0959-8049(93)90394-u).
- (52) Keepers, Y. P.; Pizao, P. E.; Peters, G. J.; van Ark-Otte, J.; Winograd, B.; Pinedo, H. M. Comparison of the Sulforhodamine B Protein and Tetrazolium (MTT) Assays for in Vitro Chemosensitivity Testing. *Eur. J. Cancer* **1991**, *27* (7), 897–900. [https://doi.org/10.1016/0277-5379\(91\)90142-z](https://doi.org/10.1016/0277-5379(91)90142-z).

- (53) Uhlen, M.; Oksvold, P.; Fagerberg, L.; Lundberg, E.; Jonasson, K.; Forsberg, M.; Zwahlen, M.; Kampf, C.; Wester, K.; Hober, S.; Wernerus, H.; Björling, L.; Ponten, F. Towards a Knowledge-Based Human Protein Atlas. *Nat. Biotechnol.* **2010**, *28* (12), 1248–1250. <https://doi.org/10.1038/nbt1210-1248>.
- (54) Authors, V. *Drug Metabolism*, 1st ed.; Caira, M. R., Ionescu, C., Eds.; Springer, 2005. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/1-4020-4142-X>.
- (55) Shimizu, S.; Atsumi, R.; Itokawa, K.; Iwasaki, M.; Aoki, T.; Ono, C.; Izumi, T.; Sudo, K.; Okazaki, O. Metabolism-Dependent Hepatotoxicity of Amodiaquine in Glutathione-Depleted Mice. *Arch. Toxicol.* **2009**, *83* (7), 701. <https://doi.org/10.1007/s00204-009-0436-9>.
- (56) Daily, E. B.; Aquilante, C. L. Cytochrome P450 2C8 Pharmacogenetics: A Review of Clinical Studies. *Pharmacogenomics* **2009**, *10* (9), 1489–1510. <https://doi.org/10.2217/pgs.09.82>.
- (57) Ye, W.; Seneviratne, U. I.; Chao, M.-W.; Ravindra, K. C.; Wogan, G. N.; Tannenbaum, S. R.; Skipper, P. L. Transimination of Quinone Imines: A Mechanism for Embedding Exogenous Redox Activity into the Nucleosome. *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25* (12), 2627–2629. <https://doi.org/10.1021/tx3004517>.
- (58) Hughes, T. B.; Swamidass, S. J. Deep Learning to Predict the Formation of Quinone Species in Drug Metabolism. *Chem. Res. Toxicol.* **2017**, *30* (2), 642–656. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.6b00385>.
- (59) Bharatam, M. R. and P. V. Formation of a Toxic Quinoneimine Metabolite from Diclofenac: A Quantum Chemical Study. *Drug Metabolism Letters*. 2019, pp 64–76. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2174/1872312812666180913120736>.



ANEXOS



ANEXOS

Diseño de moléculas

Tabla 1A. Energías de unión concenso (kcal/mol) de las poses generadas por los programas de acoplamiento molecular en LDH

Acoplamiento en sitio de NADH						
	CU-4A	CU-5A	CU-7A	CU-8A	CU-9A	NHI-2
Vina	-3.145	-4.200	-4.789	-6.012	-6.321	-4.897
Autodock	-3.047	-4.014	-4.601	-6.420	-6.137	-4.356
Ledock	-3.088	-3.953	-4.591	-6.563	-6.201	-4.477
Prom	-3.093	-4.056	-4.660	-6.332	-6.220	-4.577
	CU-4B	CU-5B	CU-7B	CU-8B	CU-9B	NHI-2
Vina	-5.024	-5.000	-4.558	-4.164	-4.115	-4.897
Autodock	-6.023	-6.242	-6.099	-5.700	-5.420	-4.356
Ledock	-3.953	-4.134	-5.147	-5.324	-5.265	-4.477
Prom	-5.000	-5.125	-5.268	-5.063	-4.933	-4.577
Acoplamiento en sitio de piruvato						
	CU-4A	CU-5A	CU-7A	CU-8A	CU-9A	NHI-2
Vina	-1.400	-1.365	-0.647	-4.320	-3.250	-5.171
Autodock	-2.845	-1.560	-2.478	-5.201	-4.017	-5.404
Ledock	-0.900	-2.980	-2.655	-4.778	-4.789	-5.014
Prom	-1.715	-1.968	-1.927	-4.766	-4.019	-5.196
	CU-4B	CU-5B	CU-7B	CU-8B	CU-9B	NHI-2
Vina	-2.671	-3.355	-0.870	-4.000	-3.892	-5.171
Autodock	-4.456	-5.413	-3.636	-5.482	-5.534	-5.404
Ledock	-1.860	-3.355	-3.339	-4.880	-4.990	-5.014
Prom	-2.996	-4.041	-2.615	-4.787	-4.805	-5.196

Tabla 1.1A Energías de unión concenso (kcal/mol) de las poses generadas por los programas de acoplamiento molecular en EGFR

	CU-4A	CU-5A	CU-7A	CU-8A	CU-9A	Gefitinib
Vina	-6.870	-7.871	-7.140	-7.156	-7.950	-7.800
Autodock	-7.157	-7.926	-7.720	-7.126	-8.300	-7.474
Ledock	-7.100	-7.562	-7.210	-7.410	-8.200	-7.940
Prom	-7.042	-7.786	-7.357	-7.231	-8.150	-7.738
	CU-4B	CU-5B	CU-7B	CU-8B	CU-9B	Gefitinib
Vina	-7.202	-7.489	-7.710	-7.500	-7.814	-7.800
Autodock	-7.323	-7.539	-7.453	-7.020	-7.900	-7.474
Ledock	-7.520	-7.680	-7.950	-7.780	-7.910	-7.940
Prom	-7.348	-7.569	-7.704	-7.433	-7.875	-7.738

Tabla 2A. RMSD de las poses generadas por los programas de acoplamiento molecular tomando como referencia a la pose de *LeDock en LDH*

Molécula	RMSD (Å) LDH (Sitio de piruvato)			RMSD (Å) LDH (NADH)		
	<i>Vina</i>	<i>Autodock 4</i>	Promedio	<i>Vina</i>	<i>Autodock 4</i>	Promedio
CU-4A	1.93	1.44	1.685	0.95	1.13	1.04
CU-5A	0.47	1.56	1.015	1.74	1.23	1.485
CU-7A	1.32	1.78	1.55	0.22	1.87	1.045
CU-8A	0.56	1.01	0.785	1.24	1.16	1.2
CU-9A	0.14	0.97	0.555	1.36	1.42	1.39
CU-4B	1.83	9.33	5.58	0.67	1.16	0.915
CU-5B	0.5	4.19	2.345	1.11	1.49	1.3
CU-7B	0.78	1.33	1.055	1.27	1.34	1.305
CU-8B	3.01	4.70	3.855	1.14	1.07	1.105
CU-9B	1.74	4.70	3.22	1.24	1.36	1.3

Tabla 2.1A. RMSD de las poses generadas por los programas de acoplamiento molecular tomando como referencia a la pose de *LeDock EGFR*

RMSD (Å) EGFR			
Molécula	<i>Vina</i>	<i>Autodock 4</i>	Promedio
CU-4A	0.14	1.67	0.905
CU-5A	0.67	1.12	0.895
CU-7A	1.10	1.54	1.54
CU-8A	0.98	1.01	0.995
CU-9A	0.45	1.36	0.905
CU-4B	0.89	1.87	1.38
CU-5B	1.50	1.23	1.365
CU-7B	1.01	1.33	1.17
CU-8B	1.78	0.12	0.95
CU-9B	1.45	1.25	1.35

Síntesis química

Para la obtención de los productos finales, se emplearon como materias primas productos intermediarios comercialmente disponibles de la marca Sigma Aldrich®, al igual que todos los disolventes de carácter anhidro. El resto de los disolventes fueron adquiridos de las marcas J.T.Baker® (grado analítico).

Las mediciones en peso se llevaron a cabo en una balanza analítica marca Sartorius™ modelo CP124 S.

El proceso de agitación y calentamiento convencionales de las reacciones químicas, se llevaron a cabo en parrillas de la marca IKA® modelos RET control-visc C, RCT basic y C-MAG HS 4. El calentamiento en microondas se llevó a cabo en un microondas de la marca Anton Parr® Monowave 300 EXTRA, adaptado a un automuestreado modelo MAS 24 y viales de vidrio para microondas tipo G30.

La concentración de mezclas de reacción y productos finales se llevó a cabo en un rotaevaporador de la marca IKA® modelo RV 10 digital, acoplado a una bomba de vacío marca Vacuubrand® modelo CVC 3000 y un refrigerante de espiral marca Brinkmann™.

Los puntos de fusión de productos finales e intermediarios fueron determinados, mediante el uso de un aparato térmico digital de punto de fusión de la marca Electrothermal® modelo 9300.

La hidrogenación catalítica de compuestos nitrados en ciertos experimentos se hizo mediante el uso un equipo de hidrogenación marca Paar® modelo 3916 EG, conectado como fuente de alimentación a un tanque de hidrógeno del Grupo INFRA®.

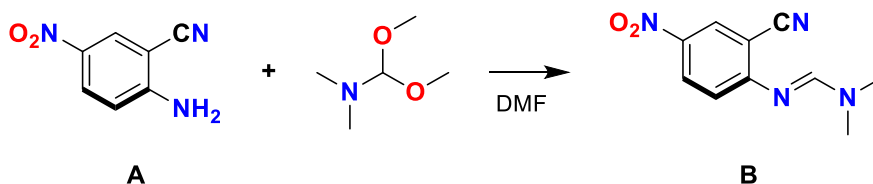
El avance de reacción en todos los experimentos se hizo mediante cromatografía en capa fina, utilizando para ello, cromatoplasmas de sílica gel de la marca SORTECH®, con indicador fluorescente a 240 nm. Las técnicas de revelado empleadas fueron tres: exposición a la luz UV (lámpara Spectroline®, modelo ENF-240C), ninhidrina como revelador de aminas y yodación.

Para la caracterización analítico-instrumental se hizo uso del servicio otorgado por la USAII, en la cual se llevaron los análisis de RMN, Espectrometría de Masas (MS) e Infrarrojo (IR).

Los experimentos de RMN se efectuaron a temperatura ambiente, en los espectrómetros marca Varian modelos VNMRS de 600 MHz y MR de 300 MHz, en disolución de dimetil sulfóxido deuterado con tetrametilsilano como estándar interno.

Los análisis por espectrometría de masas se efectuaron en los espectrómetros de masas marca LECO®, modelo Pegasus 4D, con analizador másico TOF (Tiempo de Vuelo) y ionización electrónica, acoplado a un cromatógrafo de gases de la marca Agilent®, modelo 6890N con columna capilar DB5; así como en el espectrómetro de masas con analizador másico de tiempo de vuelo, marca Perkin Elmer®, modelo AxION 2 TOF.

Síntesis de (E)-N'-(2-ciano-4-nitrofenil)-N,N-dimetilformimidamida



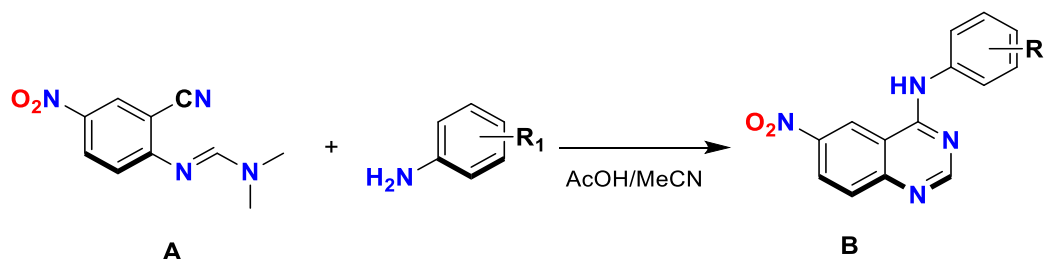
Método convencional

En un matraz de fondo redondo se colocó 1 eq. de **A** y 1.1 eq de DMF-DMA en 10 mL de DMF. La mezcla se colocó bajo agitación y calentamiento de 120° C durante 1h. Posterior de haber confirmado la completa conversión de **A** mediante CCF y ninhidrina, la mezcla se dejó enfriar. El tratamiento final de la reacción consistió en filtrar los cristales obtenidos mediante un sistema a vacío. Los cristales se lavaron con una mezcla de MeCN y DMF. R = 89%, T. fus. = 138-140 °C Rf = 0.77 (CHCl₃/MeOH, 7:3).

Método por microondas

En un vial para microondas de tipo G30 se colocó 1 eq. de **A** y 1.1 eq de DMF-DMA en 5 mL de DMF. El vial se colocó en el microondas el cual se programo con una rampa de calentamiento de 2 min hasta 120 °C, el tiempo de reacción fue de 15 min. El tratamiento final de la reacción consistió en filtrar los cristales obtenidos mediante un sistema a vacío. Los cristales se lavaron con hexano. Sólido cristalino amarillo, R = 92%, P. fus. = 138-140 °C Rf = 0.77 (CHCl₃/MeOH, 7:3).

Síntesis general de las *N*-(halofenil)-6-nitro-quinazolin-4-aminas



Método convencional

En un matraz de fondo redondo se colocó 1 eq. de **A** y 1.1 eq de la anilina correspondiente en 15 mL de una mezcla AcOH/MeCN 7:3. La mezcla se coló bajo agitación y calentamiento a 120 °C por 12 horas. La reacción se monitoreó mediante CCF hasta observar que la materia prima **A** se consumió por completo. La mezcla se filtró en un sistema a vacío y se lavó con MeCN frío, el producto **B** se puede utilizar en la reacción consecuyente sin necesidad de ser recristalizado. Si se desean obtener cristales, el producto filtrado se coloca en un vaso de precipitados de 50 mL y se colocan 10 mL de una mezcla de MeOH/MeCN 5:5 y se calienta hasta encontrarse completamente disuelto, posterior a ello se retira del calentamiento y se agrega agua suficiente hasta que la mezcla comience a tornarse opaca, en ese momento se deja enfriar hasta observar la formación de cristales amorfos amarillos los cuales se filtran a vacío.

***N*-(4-fluorofenil)-6-nitro-quinazolin-4-amina**

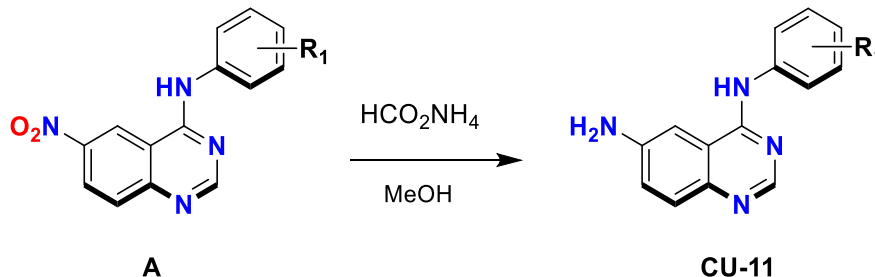
Sólido naranja R= 78%, P. fus. = 278-280 °C, Rf = 0.88 (CHCl₃/MeOH, 7:3).

6-nitro- *N*-(fenil)-quinazolin-4-amina

Sólido amarillo R= 78%, T. fus. = 278-280 °C, Rf = 0.88 (CHCl₃/MeOH, 7:3).

Método por microondas

En un vial para microondas tipo G30 se colocó 1 eq. de **A** y 1.1 eq de la anilina correspondiente en 15 mL de una mezcla AcOH/MeCN 7:3. El vial se colocó en el microondas el cual se programó con una rampa de calentamiento de 2 min hasta 120 °C, el tiempo de reacción fue de 30 min, el tratamiento final de la reacción es el mismo utilizado para el método convencional. Sólido amarillo R= 78%, P. fus. = 278-280 °C, Rf = 0.88 (CHCl₃/MeOH, 7:3).

Síntesis general de las *N*⁴-fenil-quinazolin-4,6-diaminas

En un matraz de fondo redondo se colocó 1 eq de **A** 10% con respecto a la masa de **A** de Pd/C al 10% m/m. Los dos sólidos se mezclan perfectamente hasta obtener una mezcla con coloración verdosa. Posterior a esto, se colocan 6 eq de formiato de amonio con respecto a **A** y se mezclan perfectamente dentro del matraz (**respetar los pasos y mezclas descritas para evitar accidentes**). Al matraz con la mezcla sólida, se agregan lentamente y en pequeñas porciones 20 mL de metanol. La mezcla se coloca bajo agitación y calentamiento a 70 °C. La reacción se monitorea mediante CCF y se revela con ninhidrina para evidenciar la formación de la amina. Una vez completada la reacción, la mezcla se deja enfriar y se filtra utilizando un embudo con vidrio poroso al cual se agrega una cantidad de celita y se acopla a un sistema de vacío con el fin de eliminar el Pd/C suspendido. La disolución filtrada se

concentra en un rotaevaporador hasta observar la formación de un sólido amarillo, sin llevar a sequedad, el matraz se retira del rotaevaporador y posteriormente se agrega poco a poco agua hasta observar la formación de cristales. La mezcla se deja cristalizar y los cristales se filtran al vacío para obtener los productos.

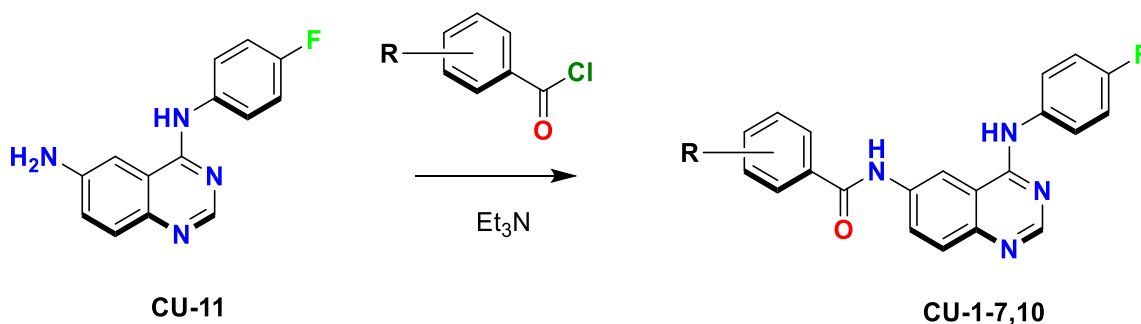
***N*⁴-(4-fluorofenil)quinazolin-4,6-diamina**

Sólido cristalino amarillo/verde pálido. R = 90% P. fus. = 179-180 °C, R_f = 74 (CHCl₃/MeOH, 7:3)

***N*⁴-fenilquinazolin-4,6-diamina**

Sólido cristalino verde pálido. R = 90% P. fus. = 179-180 °C, R_f = 74 (CHCl₃/MeOH, 7:3)

Síntesis general de las *N*-(4-((halofenil)amino)quinazolin-6-il)benzamidias



En un matraz de fondo redondo, se coloca 1 eq (200 mg) de **CU-11A/B**, 10 mL de acetonitrilo anhidro y 3 eq de trietilamina. La mezcla se agita hasta que **CU-11A/B** se disuelva por completo. Posteriormente, se adicionan 2.5 equivalentes del cloruro de benzoilo correspondiente y se deja en agitación bajo atmosfera de nitrógeno durante una hora. Una vez transcurrida la hora, si dentro del matraz se observa precipitado se filtra y se verifica mediante CCF su identidad. En este momento pueden ocurrir dos variantes en el trabajo final de la reacción:

- El sólido filtrado es el compuesto final
- El sólido filtrado sólo es una sal

Ambas situaciones convergen en la purificación final. En caso de que el sólido filtrado sea una sal, las aguas madres son concentradas hasta observar la formación de un sólido. En este momento ambas situaciones convergen, el sólido que se ha obtenido mediante filtración o concentración se redisuelve en etanol caliente, en caso de que éste no se disuelva, se agregan 0.5 mL de DMF. Una vez disueltos, en caliente, se agrega poco a poco una disolución de NaOH 1 mol/L hasta que la disolución comience

a observarse opaca. En este momento, la mezcla se retira de calentamiento y se permite que llegue a temperatura ambiente. El compuesto comenzará a precipitar, el cual se filtra al vacío.

N-(4-((4-fluorofenil)amino)quinazolin-6-il)-3-nitrobenzamida

EM, APCI (m/z): 386.1200 [M+H]⁺ **RMN-¹H (600 MHz, TMS, DMSO-*d*₆)** δ (ppm): 10.93 (s, 1H, CONH-22); 9.84 (s, 1H, NH-23); 8.88-8.83 (m, 2H, H-6, H-21); 8.52 (s, 1H, H-2); 8.47-8.41 (m, 2H, H-19, H-17); 8.02 (dd, *J* = 9.1, 2.2 Hz, 1H, H-9); 7.84 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-18); 7.80 (t, *J* = 7.9 Hz, 3H, H-13, H-8); 7.35 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, H-14); 7.08 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, H-15). **RMN-¹³C (151 MHz, TMS, DMSO-*d*₆)** δ (ppm): 163.94 (C-11); 158.16 (C-4); 154.27 (C-2); 147.67 (C-20), 147.37 (C-10); 139.87 (C-12); 136.63 (C-16); 136.29 (C-7); 134.74 (C-21); 130.91 (C-18), 128.95 (C-14); 128.84 (C-19); 126.99 (C-9); 124.13 (C-17); 122.94 (C-13, C-15); 122.94 (C-8); 115.84 (C-5); 114.85 (C-6). **NOESY (400 MHz, TMS, DMSO-*d*₆) Interacción H-H:** (CONH-22, H-6); (CONH-22, H-17); (CONH-22, H-9); (NH-23, H-6); (NH-23, H-13); (H-19, H-18); (H-18, H-17); (H-9, H-8); (H-13, H-14); (H-14, H-15) Sólido, amarillo. R = 90% P. fus. = 314-316 °C, R_f = 90 (CHCl₃/MeOH, 7:3)

N-(4-((4-fluorofenil)amino)quinazolin-6-il)-4-nitrobenzamida

EM, APCI (m/z): 404.1198 [M+H]⁺ **RMN-¹H (600 MHz, TMS, DMSO-*d*₆)** δ (ppm): 10.84 (s, 1H, CONH-20); 9.90 (s, 1H, NH-21); 8.85 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H-6); 8.49 (s, 1H, H-2); 8.40-35 (m, 2H, H-18); 8.26-8.21 (m, 2H, H-17); 7.96 (dd, *J* = 9.0, 2.2 Hz, 1H, H-9); 7.81-7.76 (m, 3H, H-8, H-13); 7.22-7.15 (m, 2H, H-14). **RMN-¹³C (151 MHz, TMS, DMSO-*d*₆)** δ (ppm): 164.50 (C-11); 159.77-158.18 (d, *J* = 1.59 Hz, C-15); 154.23 (C-4); 149.86 (C-2); 147.58 (C-10, C-19); 140.62 (C-16); 136.68 (C-12); 136.14 (C-7); 129.77 (C-17); 128.87 (C-9); 125.04 (C-8); 124.99 (C-13); 124.26 (C-18); 115.62 (C-14); 115.47 (C-5); 114.60 (C-6). Sólido, amarillo. cristalino R = % P. fus. = 264-265 °C, R_f = 90 (CHCl₃/MeOH, 7:3)

3,4-dicloro-N-(4-((4-fluorofenil)amino)quinazolin-6-il)benzamida

EM, APCI (m/z): 427.0555 [M+H]⁺ **RMN-¹H (600 MHz, TMS, DMSO-*d*₆)** δ (ppm): 10.80 (s, 1H, CONH-22); 9.92 (s, 1H, NH-23); 8.85 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H-6); 8.48 (s, 1H, H-2); 8.30 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H-21); 8.01 (dt, *J* = 8.7, 2.3 Hz, 2H, H-9, H-17); 7.80 (dd, *J* = 10.0, 6.1 Hz, 3H, H-18, H-13); 7.76 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H-8); 7.22-7.13 (m, 2H, H-14). **RMN-¹³C (151 MHz, TMS,**

DMSO-*d*₆ δ (ppm): 163.76 (C-11); 159.72-158.13 (d, $J = 1.59$ Hz, C-15); 154.14 (C-4); 147.49 (C-2); 136.80 (C-10), 136.19 (C-12); 135.20 (C-7); 131.96 (C-19); 131.44 (C-16); 130.21 (C-20); 128.79 (C-18), 128.72 (C-21); 128.67 (C-17); 124.97 (C-9); 124.92 (C-8); 122.93 (C-13) 115.59 (C-14); 115.44 (C-5); 114.63 (C-6). **NOESY (400 MHz, TMS, DMSO-*d*₆) Interacción H-H:** (H-18, H-17) (H-8, H-9); (H-13, H-14) Sólido, blanco. R = 48.6% P. fus. = 284-285 °C, R_f = 90 (CHCl₃/MeOH, 7:3)

3-amino-N-(4-((4-fluorofenil)amino)quinazolin-6-il)benzamida

EM, APCI (m/z): 374.1399 [M+H]⁺ **RMN-¹H (600 MHz, TMS, DMSO-*d*₆)** δ (ppm): 10.87 (s, 1H, CONH-22); 10.69 (s, 1H, NH-23); 8.96 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-6); 8.62 (s, 1H, H-2); 8.16-8.10 (m, 1H, H-9); 7.94-7.83 (m, 2H, H-8); 7.83-7.76 (m, 2H, H-13); 7.76-7.769 (m, 1H, H-18); 7.46 (td, $J = 7.8, 2.6$ Hz, H-21, H-17); 7.26-7.18 (m, 2H, H-14); 6.81 (dt, $J = 7.19, 1.7$ Hz, 1H, H-19); no observado (2H, NH₂-24). **RMN-¹³C (151 MHz, TMS, DMSO-*d*₆)** δ (ppm): 166.20 (C-11); 163.60-162.96 (d, $J = 0.64$ Hz, C-15); 160.52 (C-4); 159.01 (C-2); 151.11 (C-20); 139.03 (C-10); 138.27 (C-12); 135.54 (C-7); 134.93 (C-16); 129.57 (C-18); 126.26 (C-9); 123.27 (C-8), 123.03 (C-13); 119.29 (C-17); 117.16 (C-19); 115.84 (C-14); 115.69 (C-5); 115.03 (C-6); 114.74 (C-21). Sólido, blanco. R = 55.1% P. fus. = 255-257 °C, R_f = 90 (CHCl₃/MeOH, 7:3)

4-amino-N-(4-((4-fluorofenil)amino)quinazolin-6-il)benzamida

EM, APCI (m/z): 374.1363 [M+H]⁺ **RMN-¹H (600 MHz, TMS, DMSO-*d*₆)** δ (ppm): 10.09 (s, 1H, CONH-20); 9.81 (s, 1H, NH-21); 8.80 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-6); 8.46 (s, 1H, H-2); 7.95 (dd, $J = 8.8, 2.2$ Hz, 2H, H-17); 7.81-7.71 (m, 3H, H-13, H-8); 7.22-7.14 (m, 2H, H-14); 6.63-6.57 (m, 2H, H-18); 7.22-7.15 (m, 2H, H-14); 5.80 (s, 2H, NH₂-22). **RMN-¹³C (151 MHz, TMS, DMSO-*d*₆)** δ (ppm): 165.88 (C-11); 163.65 (C-4); 159.69-158.10 (d, $J = 1.59$ Hz, C-15); 153.65 (C-2); 152-96 (C-19); 146.84 (C-10); 137.91 (C-12); 136.25 (C-7); 130.00 (C-17); 128.77 (C-9); 128.44 (C-8); 121.00 (C-16); 115.59 (C-14); 115.44 (C-5); 113.81 (C-6); 113.19 (C-18). Sólido, amarillo. R = 71.28% P. fus. = 237-238 °C, R_f = 90 (CHCl₃/MeOH, 7:3)

N-(4-((fenil)amino)quinazolin-6-il)-3-nitrobenzamida

EM, APCI (m/z): 386.1200 [M+H]⁺ **RMN-¹H (600 MHz, TMS, DMSO-*d*₆)** δ (ppm): 10.93 (s, 1H, CONH-22); 9.84 (s, 1H, NH-23); 8.88-8.83 (m, 2H, H-6, H-21); 8.52 (s, 1H, H-2); 8.47-8.41 (m,

2H, H-19, H-17); 8.02 (dd, $J = 9.1, 2.2$ Hz, 1H, H-9); 7.84 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-18); 7.80 (t, $J = 7.9$ Hz, 3H, H-13, H-8); 7.35 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H, H-14); 7.08 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H, H-15). **RMN-¹³C (151 MHz, TMS, DMSO-*d*₆)** δ (ppm): 163.94 (C-11); 158.16 (C-4); 154.27 (C-2); 147.67 (C-20), 147.37 (C-10); 139.87 (C-12); 136.63 (C-16); 136.29 (C-7); 134.74 (C-21); 130.91 (C-18), 128.95 (C-14); 128.84 (C-19); 126.99 (C-9); 124.13 (C-17); 122.94 (C-13, C-15); 122.94 (C-8); 115.84 (C-5); 114.85 (C-6). **NOESY (400 MHz, TMS, DMSO-*d*₆) Interacción H-H:** (CONH-22, H-6); (CONH-22, H-17); (CONH-22, H-9); (NH-23, H-6); (NH-23, H-13); (H-19, H-18); (H-18, H-17); (H-9, H-8); (H-13, H-14); (H-14, H-15); Sólido, amarillo. R = 90% P. fus. = 293-294 °C, R_f = 90 (CHCl₃/MeOH, 7:3)

N-(4-((fenilamino)quinazolin-6-il)-4-nitrobenzamida

EM, APCI (m/z): 386.1319 [M+H]⁺ **RMN-¹H (600 MHz, TMS, DMSO-*d*₆)** δ (ppm): 10.94 (s, 1H, CONH-20); 9.86 (s, 1H, NH-21); 8.89 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-6); 8.52 (s, 1H, H-2); 8.40-36 (m, 2H, H-18); 8.27-8.22 (m, 2H, H-17); 8.00 (dd, $J = 9.1, 2.2$ Hz, 1H, H-9); 7.80 (dd, $J = 9.9, 8.1$ Hz, 3H, H-8, H-13); 7.35 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H, H-14); 7.08 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H). **RMN-¹³C (151 MHz, TMS, DMSO-*d*₆)** δ (ppm): 164.49 (C-11); 158.17 (C-4); 154.28 (C-2); 149.87 (C-19); 147.66 (C-10); 140.59 (C-16); 139.87 (C-12); 136.65 (C-7); 129.79 (C-17); 128.95 (C-14); 125.128.86 (C-9); 128.74 (C-8); 124.26 (C-18); 124.14 (C-15); 122.97 (C-13). Sólido, amarillo. cristalino R = % P. fus. = 280-282 °C, R_f = 90 (CHCl₃/MeOH, 7:3)

3,4-dicloro-N-(4-((fenilamino)quinazolin-6-il)benzamida

EM, APCI (m/z): 409.0588 [M+H]⁺ **RMN-¹H (600 MHz, TMS, DMSO-*d*₆)** δ (ppm): 10.74 (s, 1H, CONH-22); 9.84 (s, 1H, NH-23); 8.84 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-6); 8.52 (s, 1H, H-2); 8.27 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-21); 8.07-7.93 (m, 2H, H-17, H-9); 7.84-7.69 (m, 4H, H-18, H-13, H-8); 7.35 (dd, $J = 8.5, 7.4$ Hz, 2H, H-14); 7.08 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H, H-15).

RMN-¹³C (151 MHz, TMS, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 163.76 (C-11); 158.15 (C-4); 154.18 (C-2); 147.52 (C-10); 139.87 (C-12); 136.70 (C-7); 131.25 (C-16); 131.21 (C-19); 131.99 (C-20); 131.49 (C-18), 130.13 (C-21); 128.86 (C-9); 124.95 (C-14); 128.75 (C-8); 128.61 (C-17) 124.13 (C-15); 122.96 (C-13). **NOESY (400 MHz, TMS, DMSO-*d*₆) Interacción H-H:** (CONH-22, H-

6); (CONH-22, H-22); (CONH-22, H-17);(H-9, H-9); (H-14, H-15); (H-14, H-13) Sólido, blanco.
R = 48.6% P. fus. = 276-277 °C, Rf = 90 (CHCl₃/MeOH, 7:3)

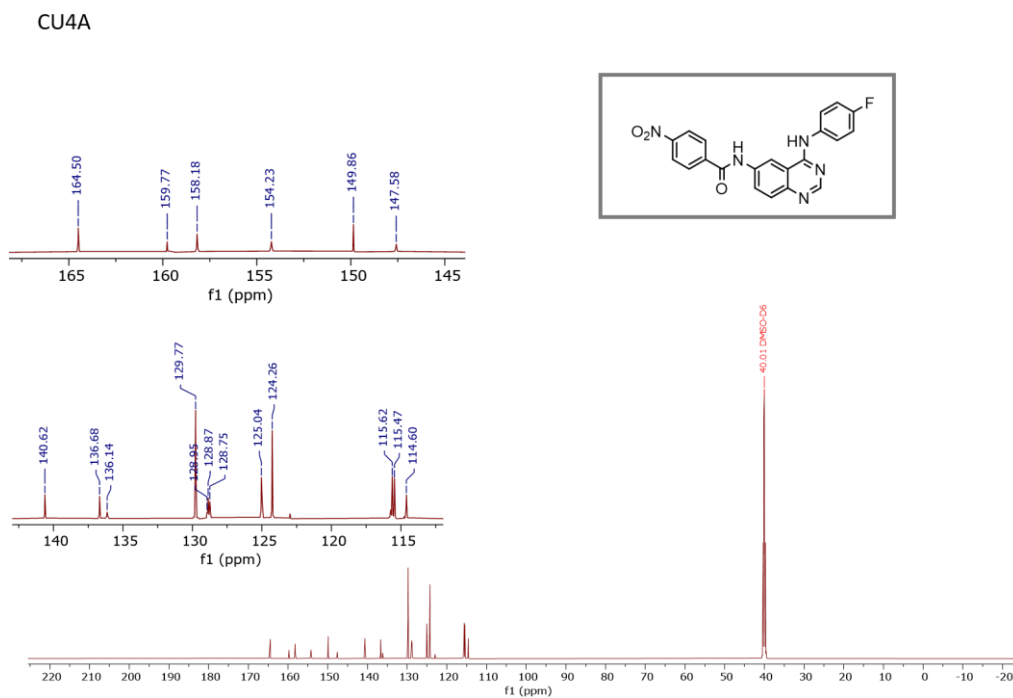
3-amino-N-(4-((fenilamino)quinazolin-6-il)benzamida

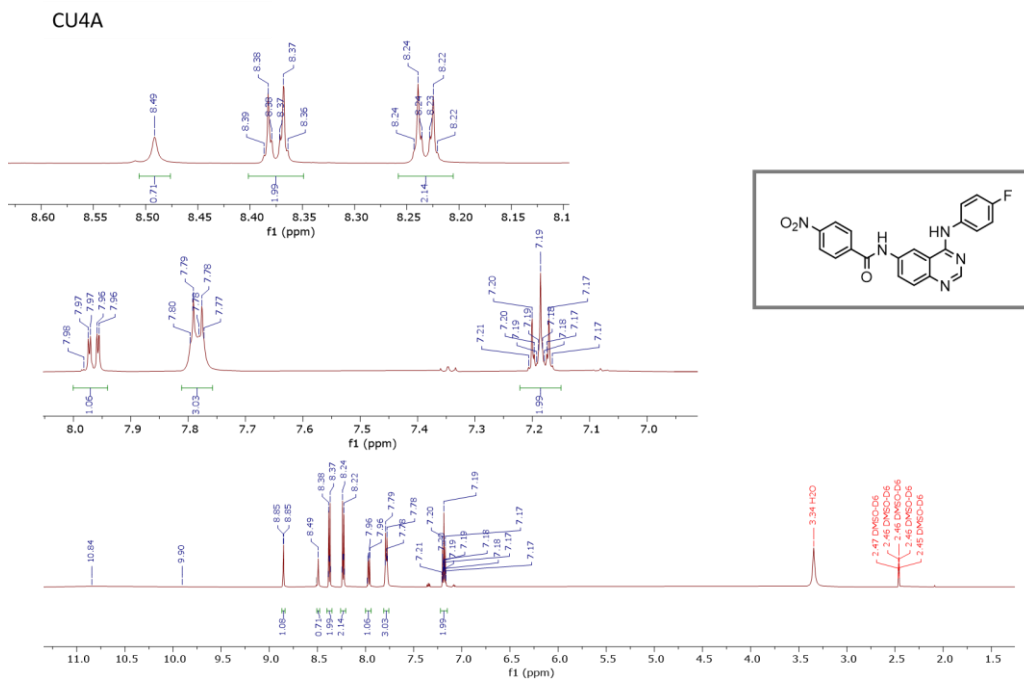
EM, APCI (m/z): 356.1505 [M+H]⁺ **RMN-¹H (600 MHz, TMS, DMSO-*d*₆)** δ (ppm): 10.39 (s, 1H, CONH-22); 9.80 (s, 1H, NH-23); 8.85 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H-6); 8.50 (s, 1H, H-2); 7.96 (dd, *J* = 8.9, 2.2 Hz, 1H, H-9); 7.82-7.78 (m, 2H, H-13); 7.75 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H-8); 7.38-7.32 (m, 2H, H-14); 7.18-7.11 (m, 3H, H-21, H-18, H-17); 7.08 (t, *J* = 7.4, 1.7 Hz 1H, H-15); 6.75 (dt, *J* = 7.19, 1.7 Hz, 1H, H-19); 5.34 (s, 2H, NH₂-24). **RMN-¹³C (151 MHz, TMS, DMSO-*d*₆)** δ (ppm): 166.98 (C-11); 158.12 (C-4); 153.95 (C-2); 149.45 (C-20); 147.28 (C-10); 139.27 (C-12); 137.39 (C-7); 135.99 (C-16); 129.46 (C-18); 128.95 (C-14); 128.73 (C-9); 128.64 (C-8); 124.05 (C-15); 122.92 (C-13); 117.60 (C-19); 115.89 (C-17); 115.25 (C-5); 114.16 (C-6); 113.51 (C-21). **NOESY (600 MHz, TMS, DMSO-*d*₆) Interacción H-H:** (CONH-22, H-6); (CONH-22, H-9); (CONH-22, (CONH-22, H-18) (NH-23, H-6); (NH-23, H-13); (NH-23, H-14); (H-19, H-18); (H-14, H-13); (H-9, H-8); (NH₂-24, H-18); (NH₂-24, H-19) Sólido, blanco. R = 55.1% P. fus. = 322-324 °C, Rf = 90 (CHCl₃/MeOH, 7:3)

4-amino-N-(4-((fenilamino)quinazolin-6-il)benzamida

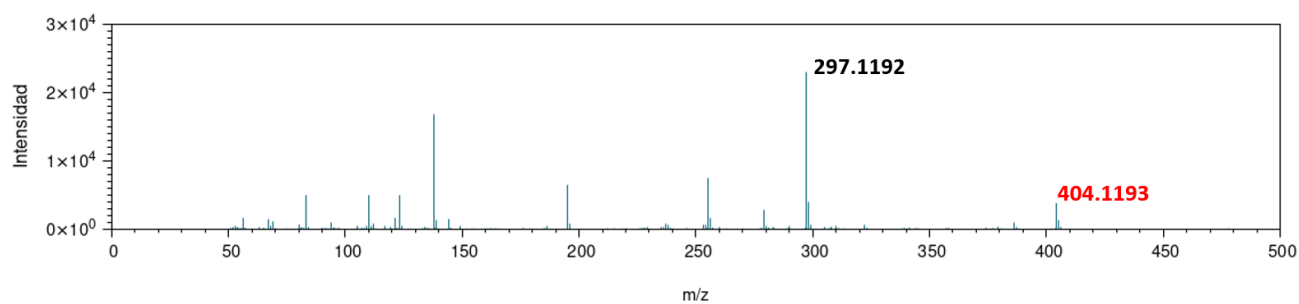
EM, APCI (m/z): 356.1513 [M+H]⁺ **RMN-¹H (600 MHz, TMS, DMSO-*d*₆)** δ (ppm): 10.09 (s, 1H, CONH-20); 9.76 (s, 1H, NH-21); 8.81 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H-6); 8.49 (s, 1H, H-2); 7.97 (dd, *J* = 9.1, 2.2 Hz, 1H, H-9); 7.82-7.76 (m, 4H, H-13, H-17); 7.74 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H-8); 7.34 (t, *J* = 7.95 Hz, 2H, H-14); 7.07 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H, H-15); 6.62-6.58 (m, 2H, H-18); 5.80 (s, 2H, NH₂-22). **RMN-¹³C (151 MHz, TMS, DMSO-*d*₆)** δ (ppm): 165.86 (C-11); 158.04 (C-4); 153.71 (C-2); 152.96 (C-19), 147.00 (C-10); 140.01 (C-12); 137.87 (C-7); 130.00 (C-17); 128.93 (C-14); 128.78 (C-9), 128.49 (C-8); 123.97 (C-15); 122.84 (C-13); 121.01 (C-16); 115.92 (C-5); 113.83 (C-6); 113.18 (C-18) Sólido, amarillo. R = 71.28% P. fus. = 240-242 °C, Rf = 90 (CHCl₃/MeOH, 7:3)

Espectros

Espectro 1. Espectro de RMN de ^{13}C de la molécula CU-4A

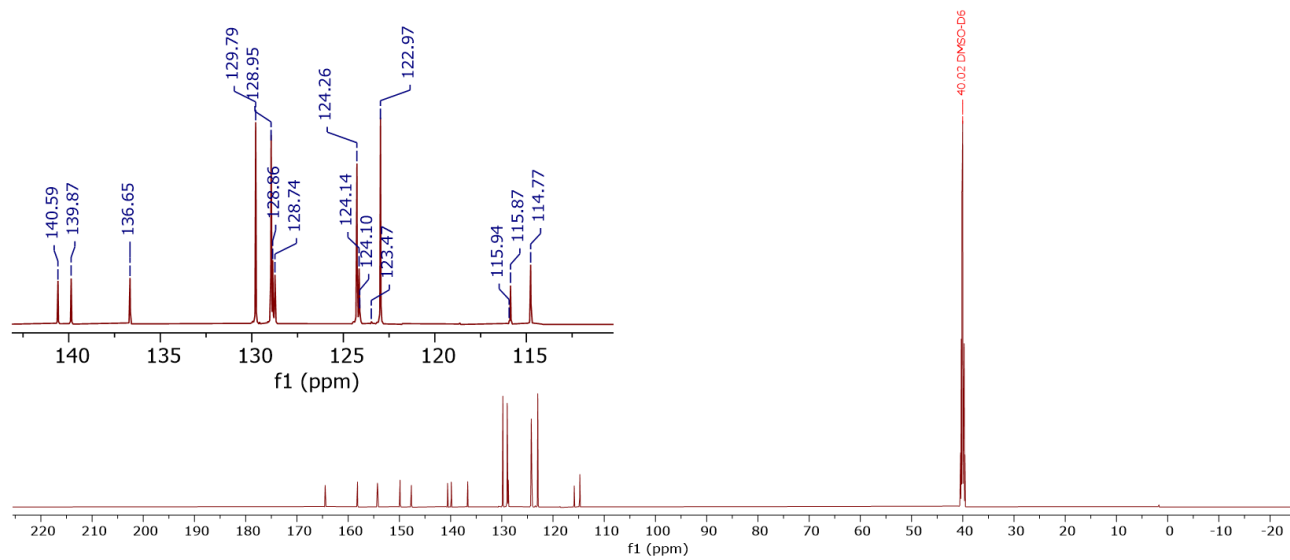
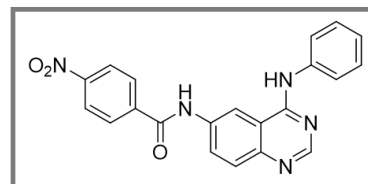


Espectro 1.1. Espectro de RMN de ^1H de la molécula CU-4A



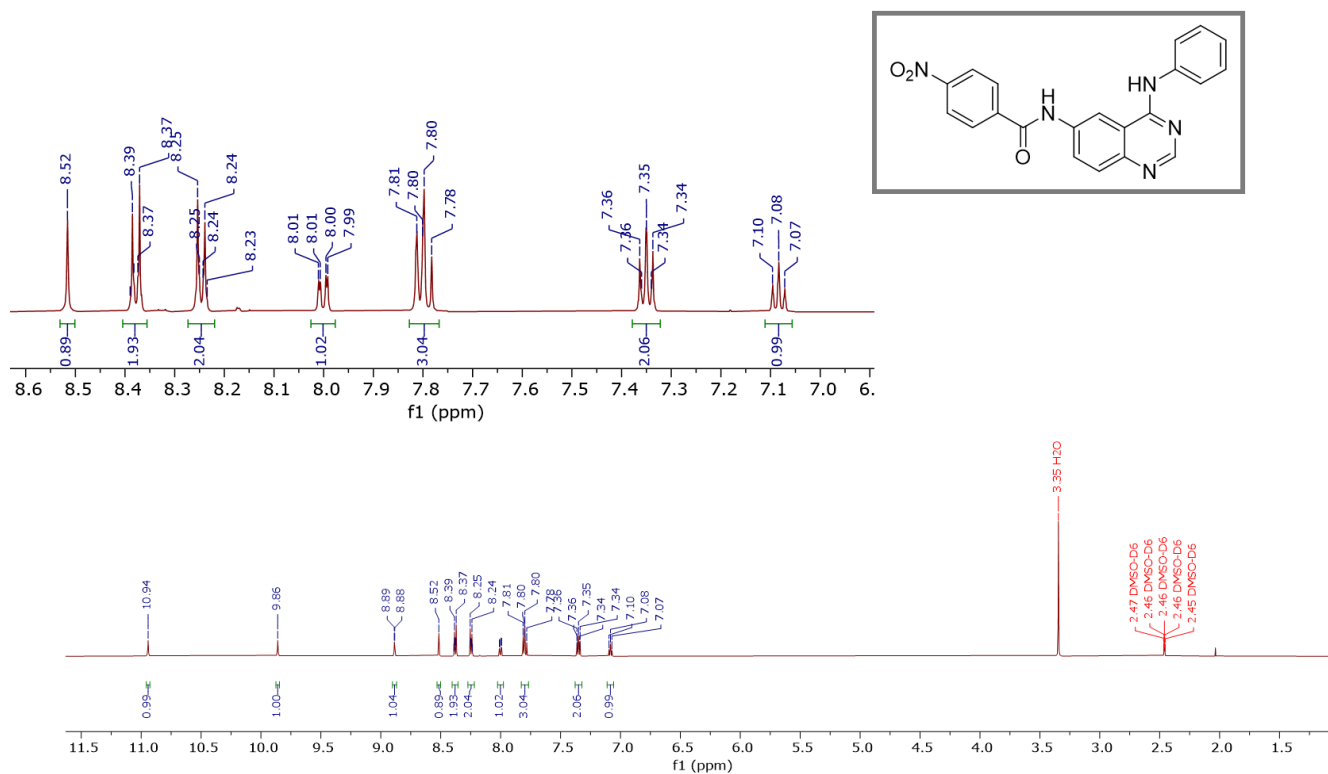
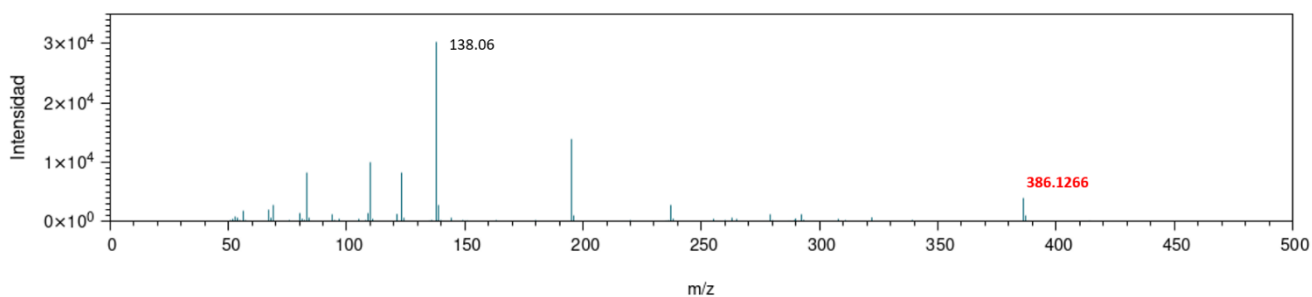
Espectro 1.2. Espectro de masas por APCI de la molécula CU-4A

CU4B



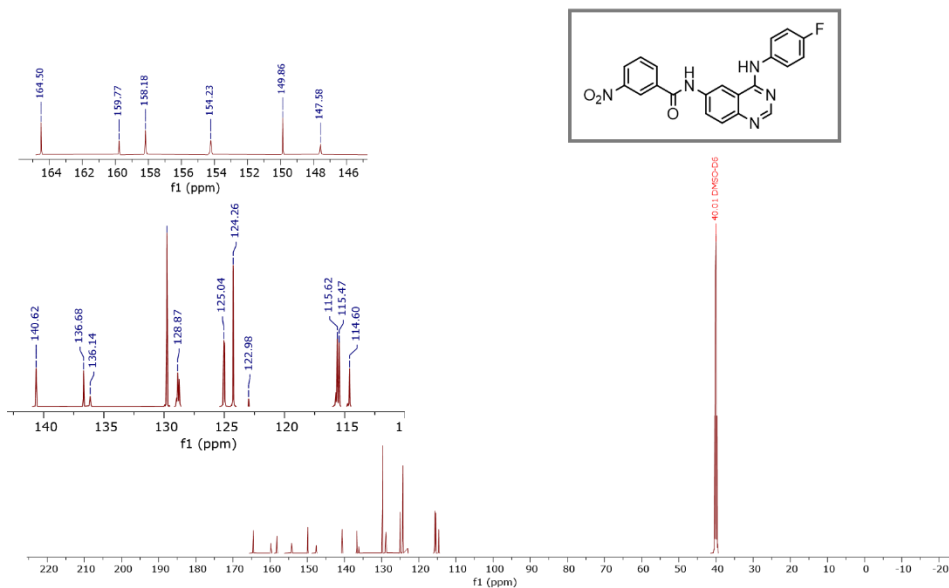
Espectro 2. Espectro de RMN de ^{13}C de la molécula CU-4B

CU4B

Espectro 2.1. Espectro de RMN de ¹H de la molécula CU-4B

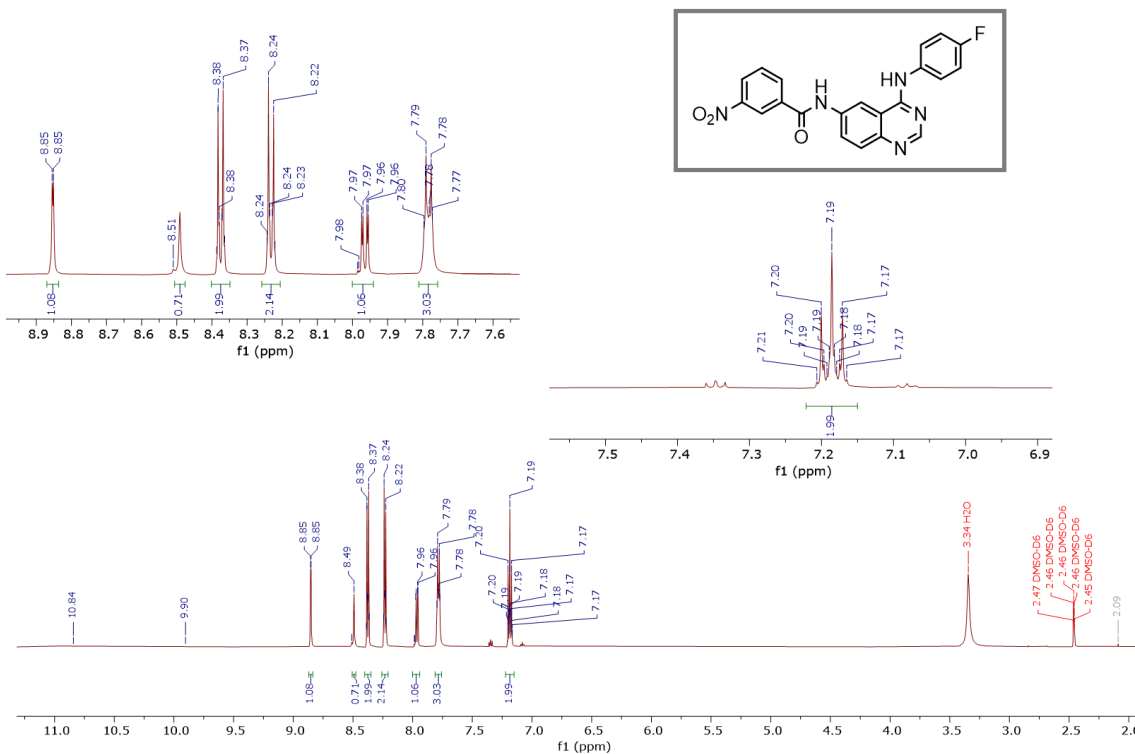
Espectro 2.2. Espectro de masas por APC de la molécula CU-4B

CU5A

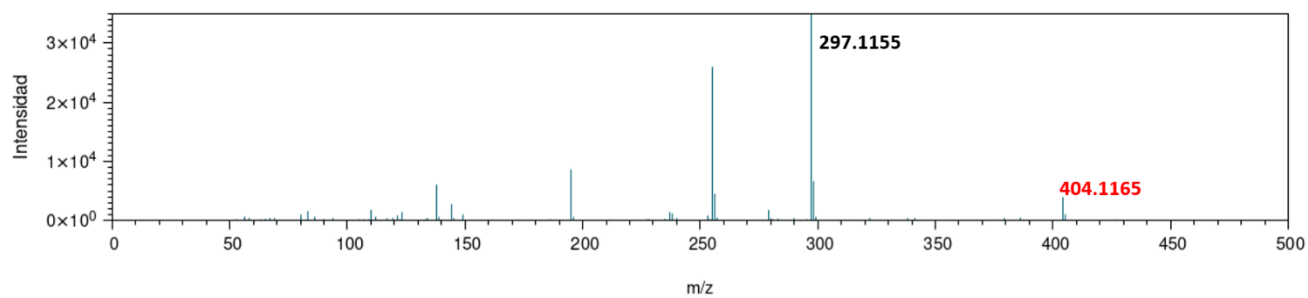


Espectro 3. Espectro de RMN de ^{13}C de la molécula CU-5A

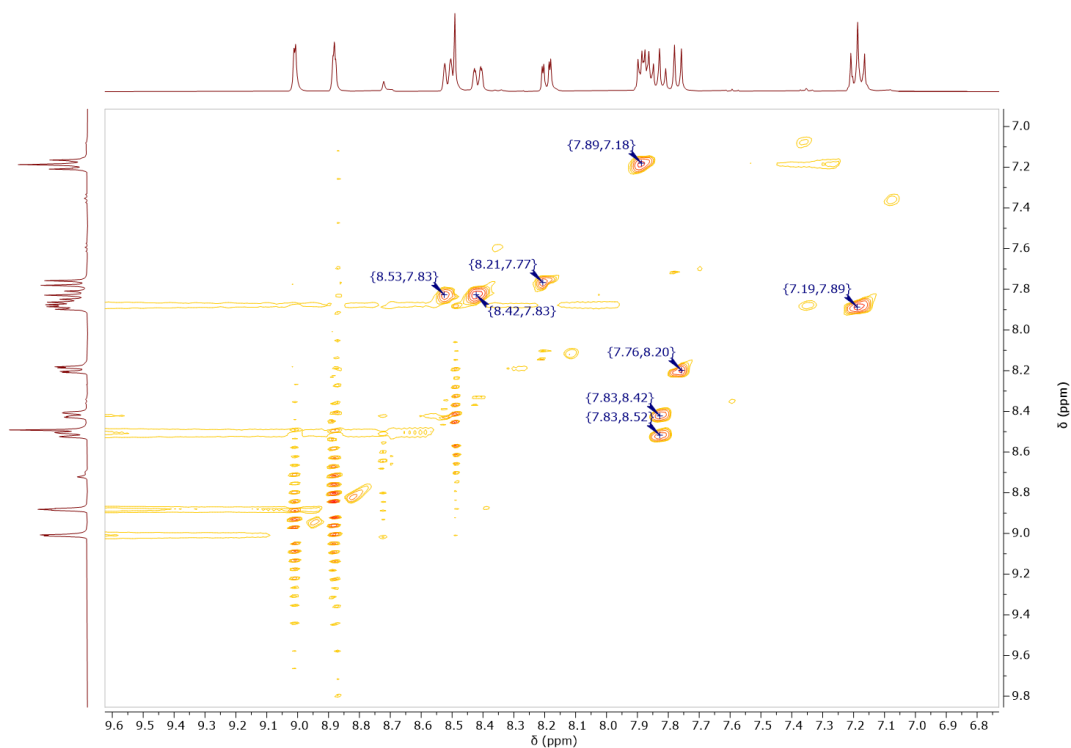
CU5A



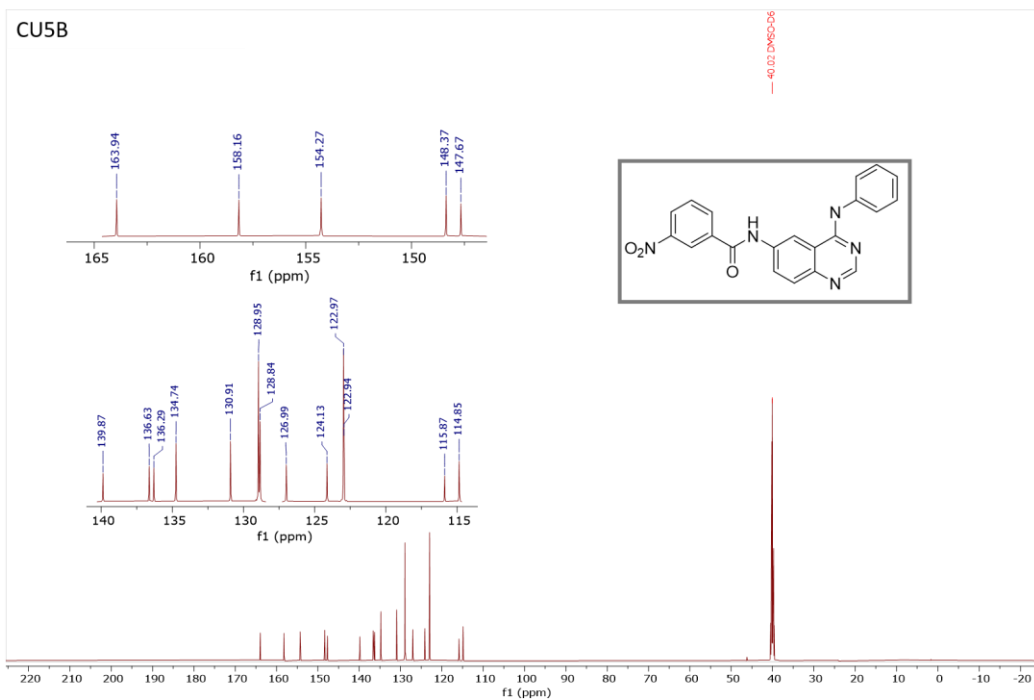
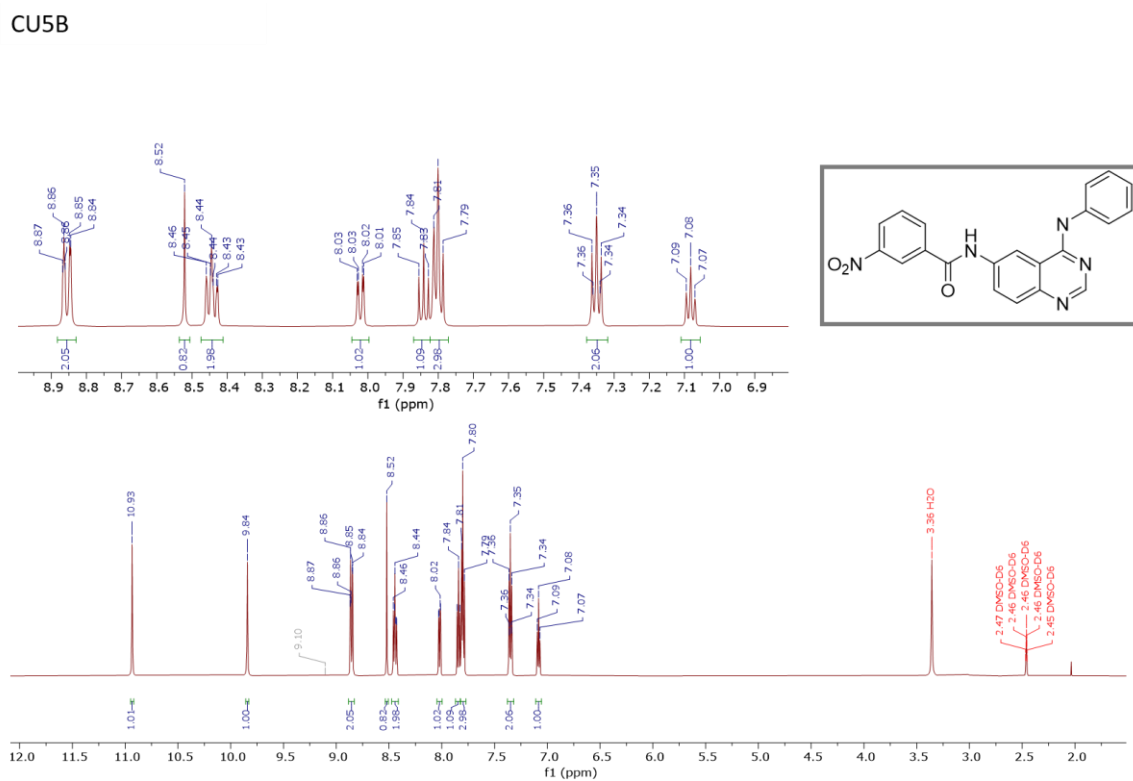
Espectro 3.1. Espectro de RMN de ^1H de la molécula CU-5A

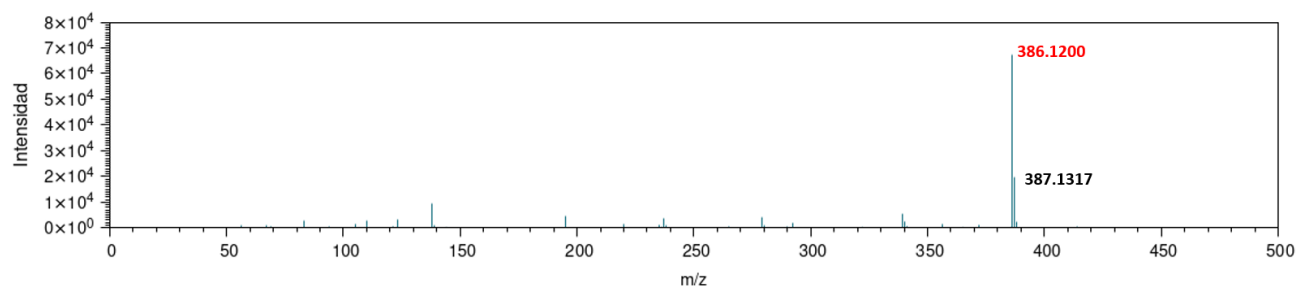
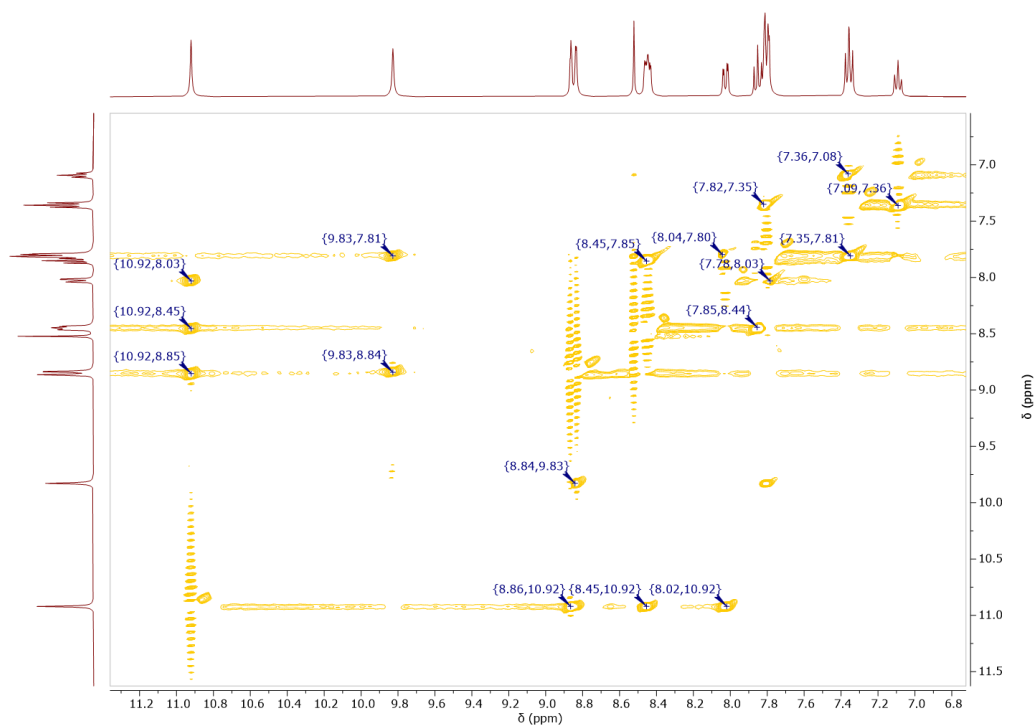


Espectro 3.2. Espectro de masas por APC de la molécula CU-5A

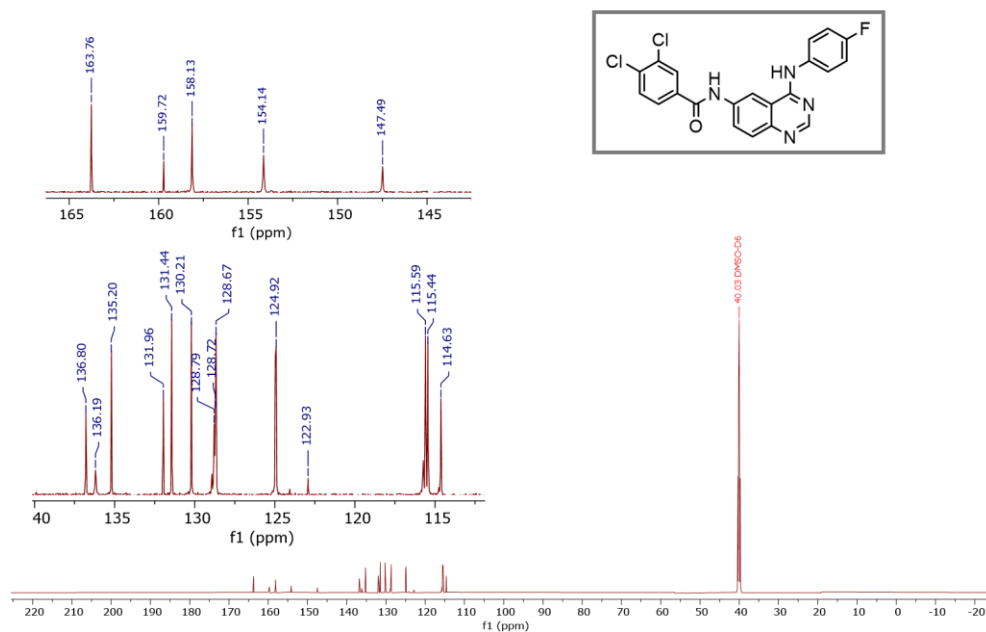


Espectro 3.3. Espectro NOESY de la molécula CU-5A

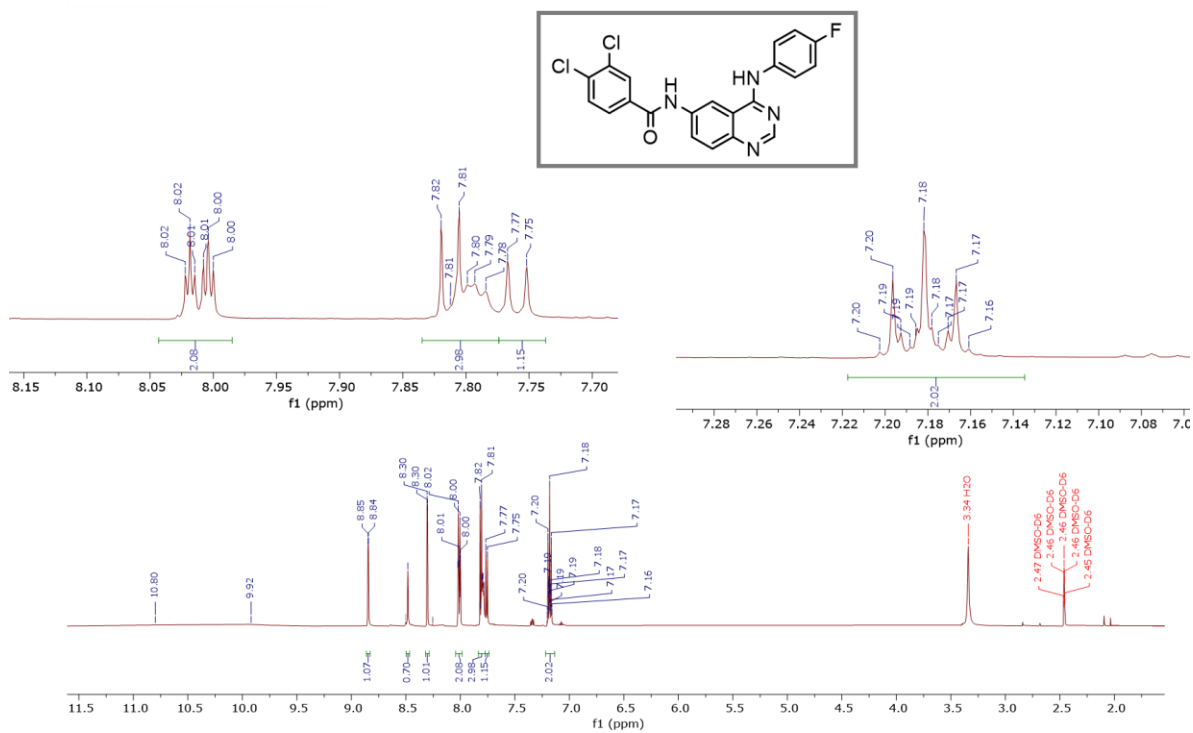
Espectro 4. Espectro de RMN de ^{13}C de la molécula CU-5B

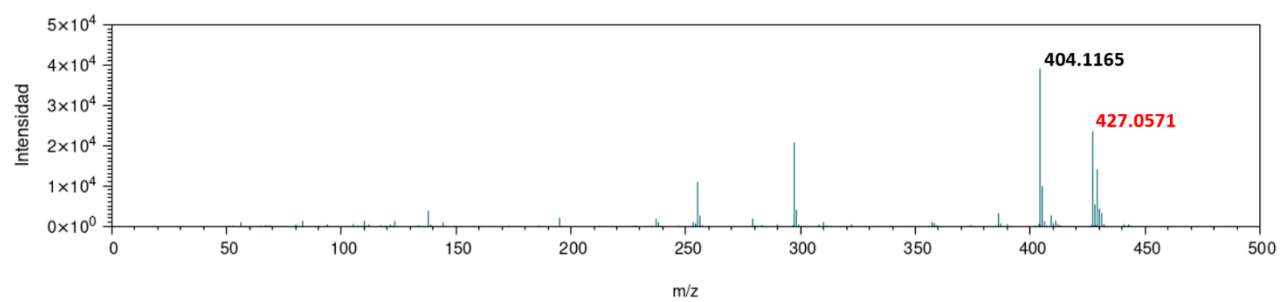
Espectro 4.1. Espectro de RMN de ^1H de la molécula CU-5B**Espectro 4.2.** Espectro de masas por APC de la molécula CU-5B**Espectro 4.3.** Espectro NOESY de la molécula CU-5B

CU7A

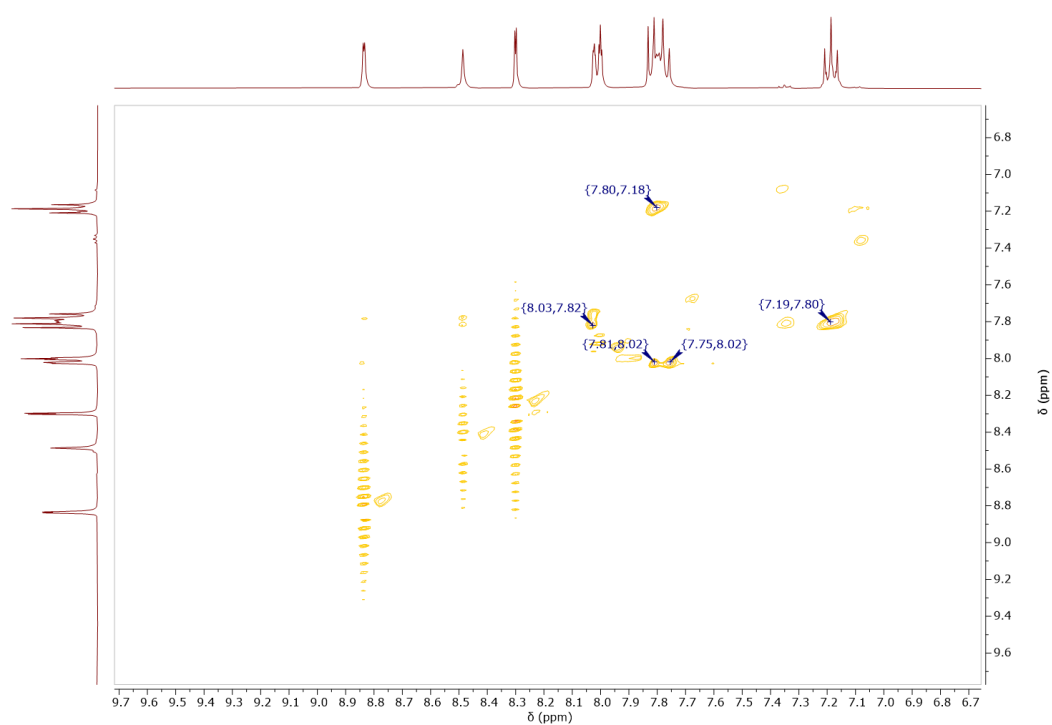
Espectro 5. Espectro de RMN de ^{13}C de la molécula CU-7A

CU7A

Espectro 5.1. Espectro de RMN de ^1H de la molécula CU-7A

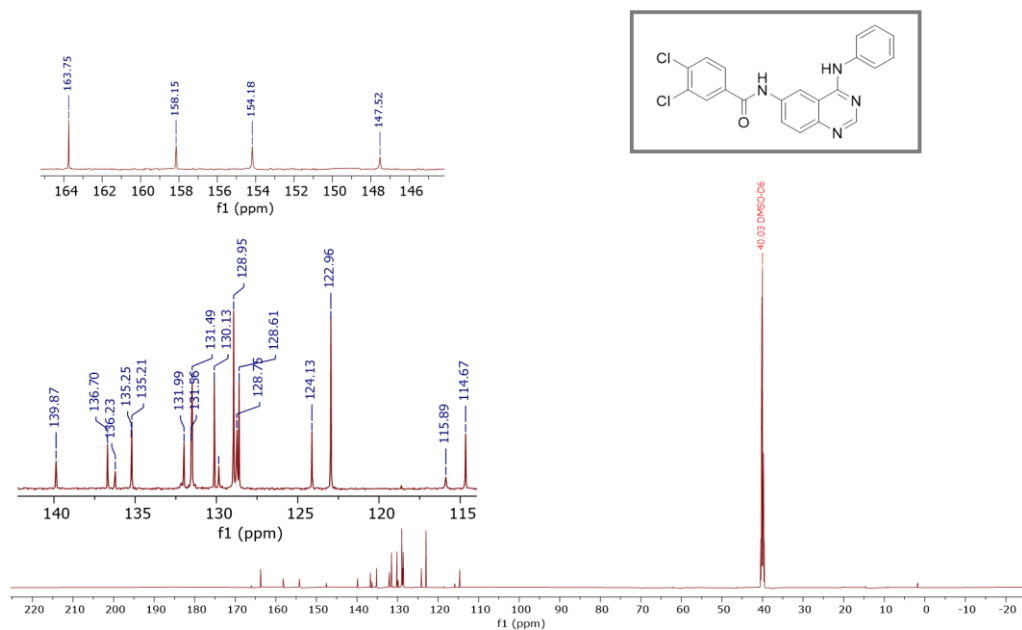


Espectro 5.2. Espectro de masas por APC de la molécula CU-7^a

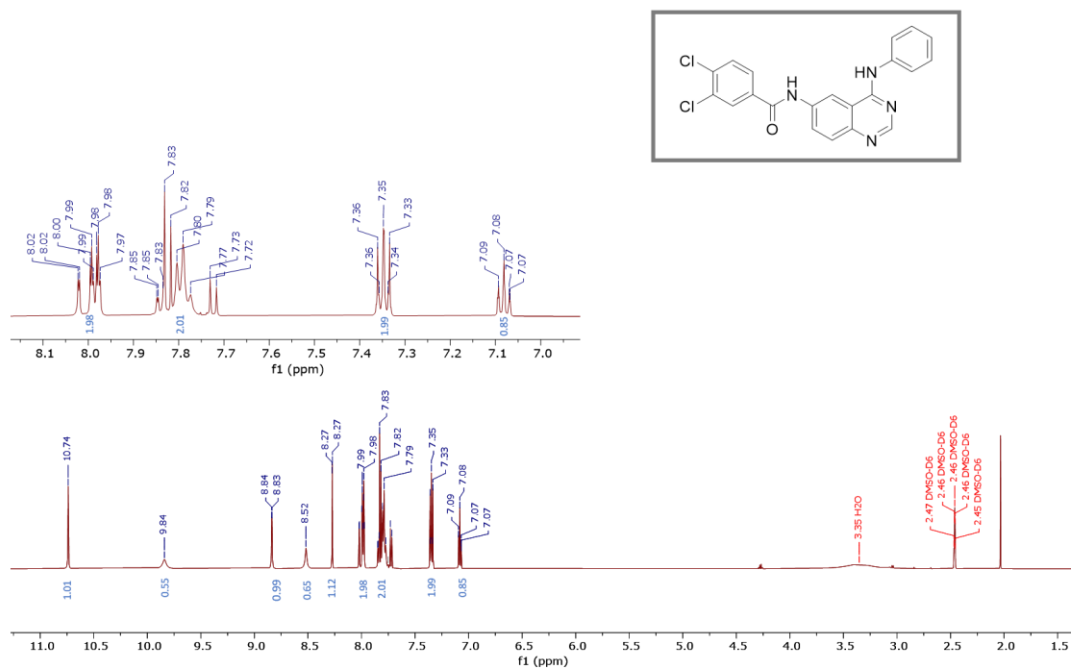


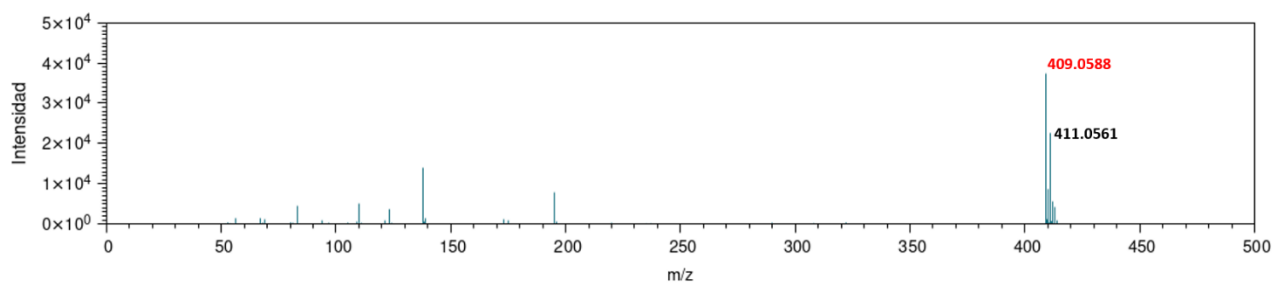
Espectro 5.3. Espectro NOESY de la molécula CU-7A

CU7B

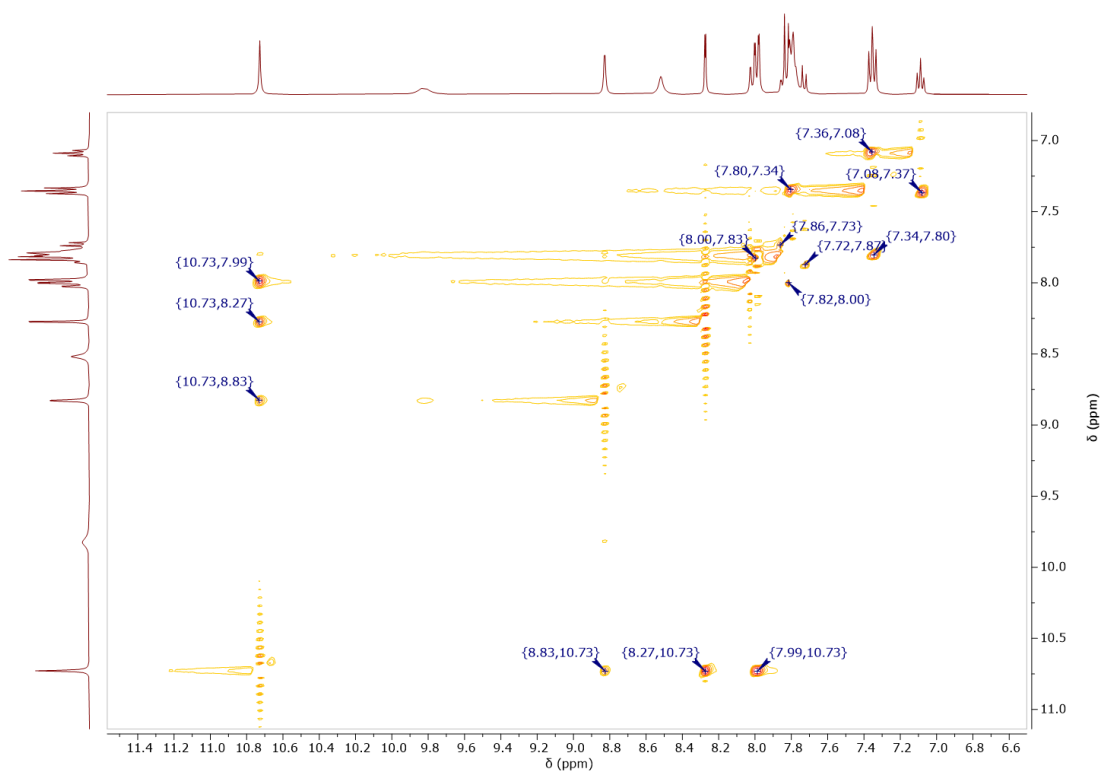
Espectro 6. Espectro de RMN de ^{13}C de la molécula CU-7B

CU7B

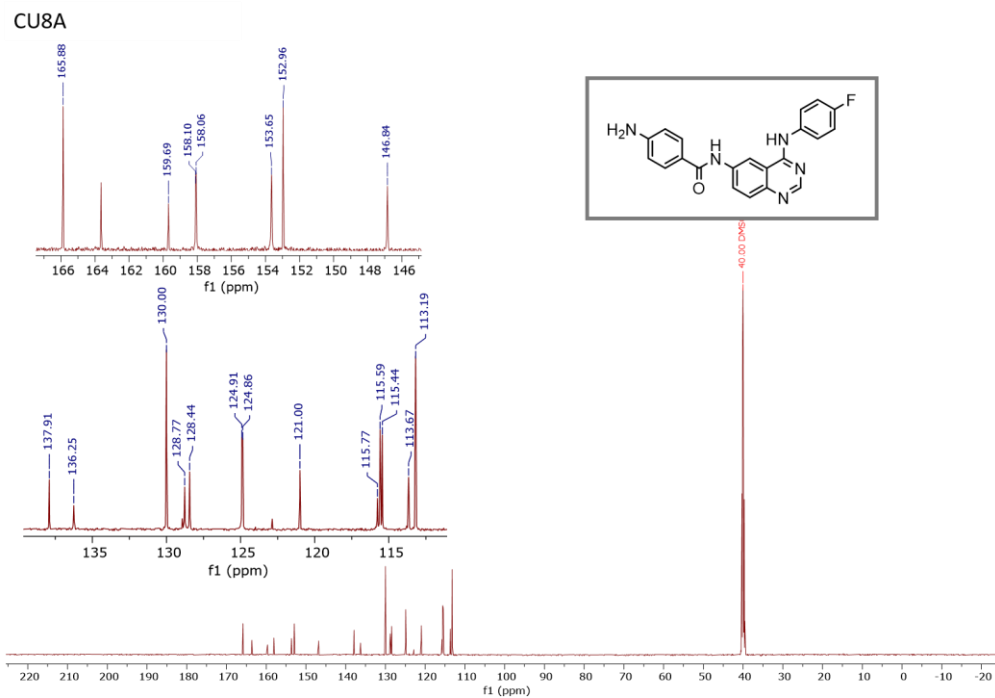
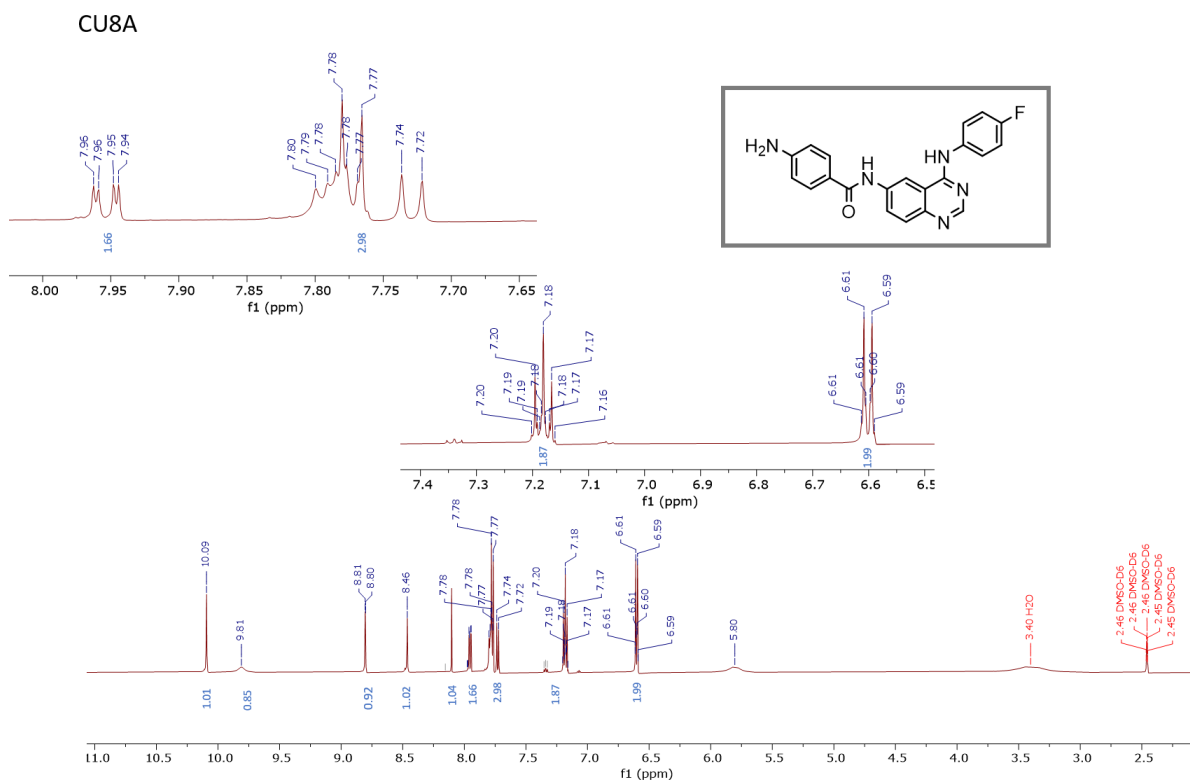
Espectro 6.1. Espectro de RMN de ^1H de la molécula CU-7B

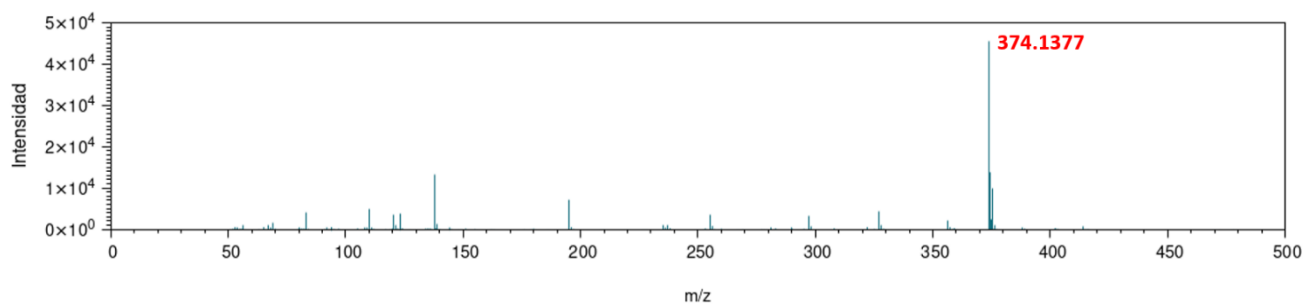
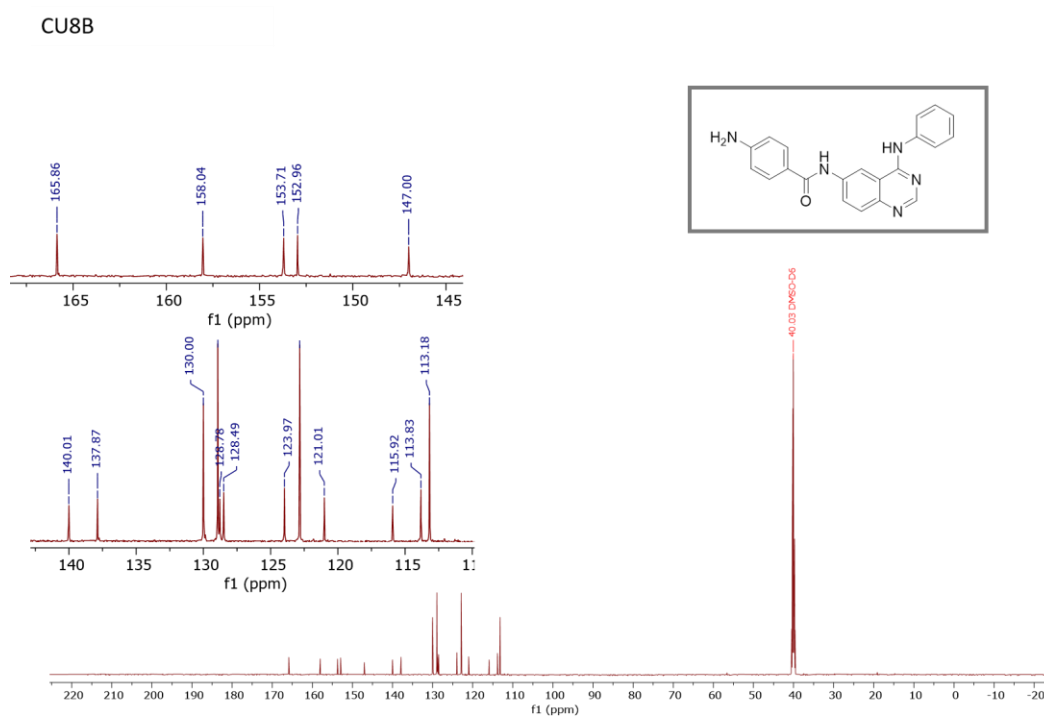


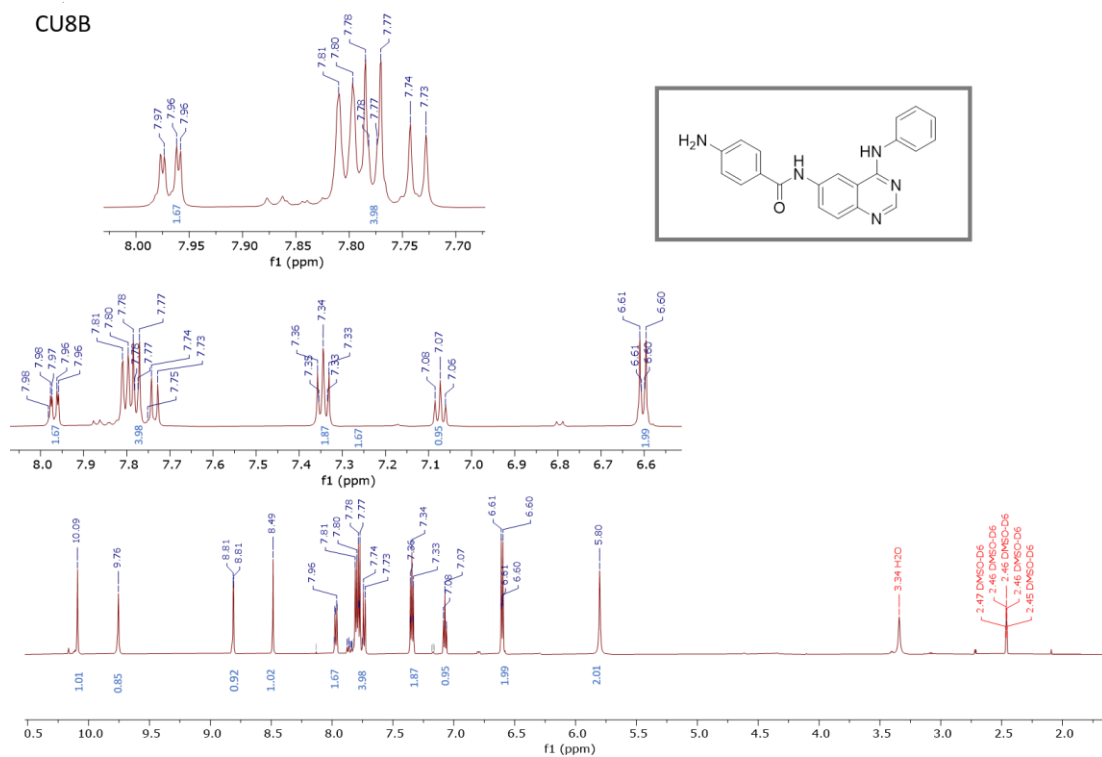
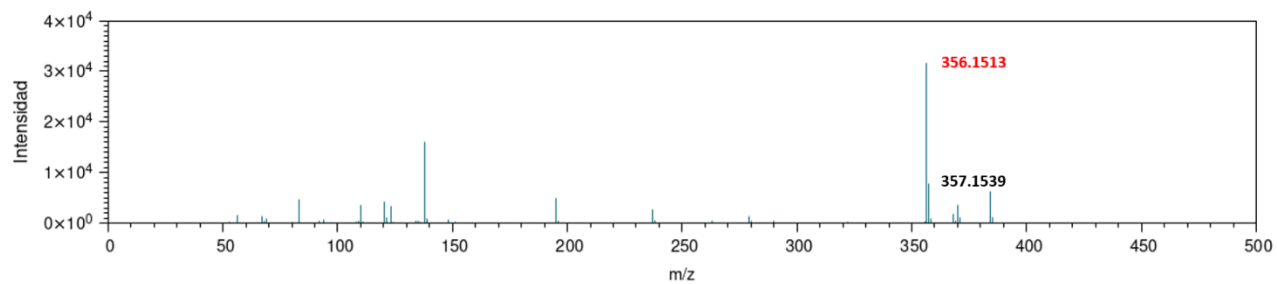
Espectro 6.2. Espectro de masas por APCI de la molécula CU-7B



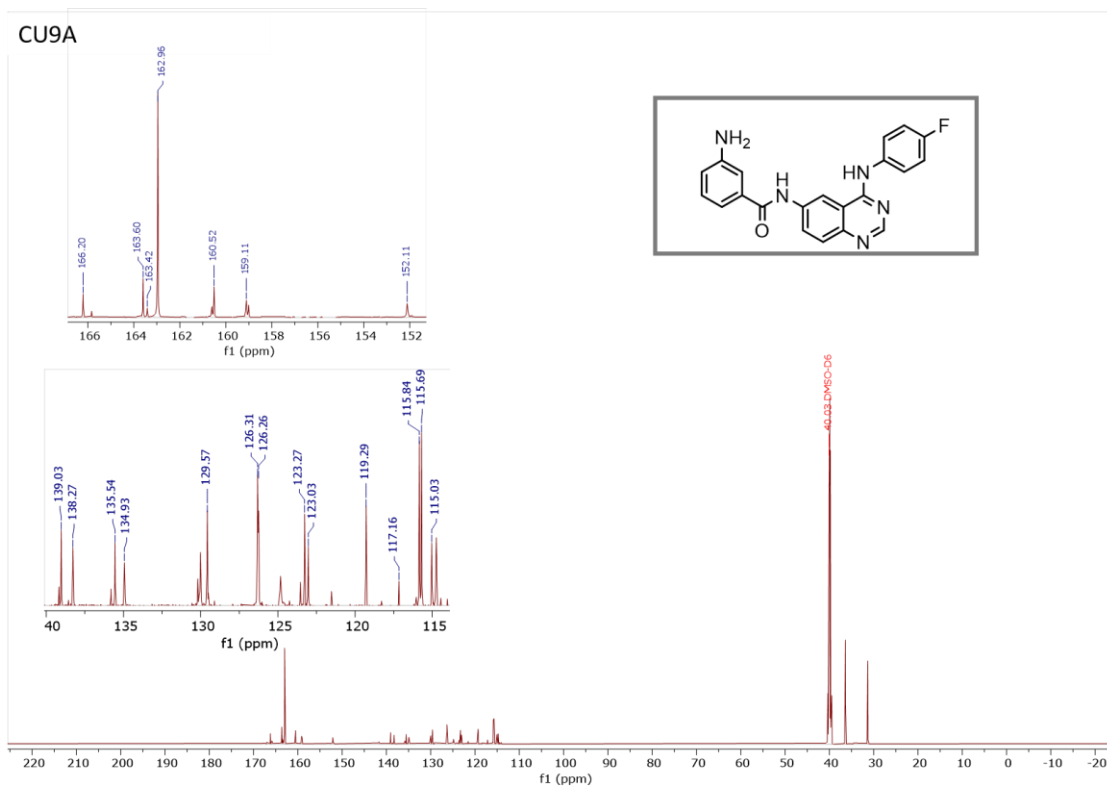
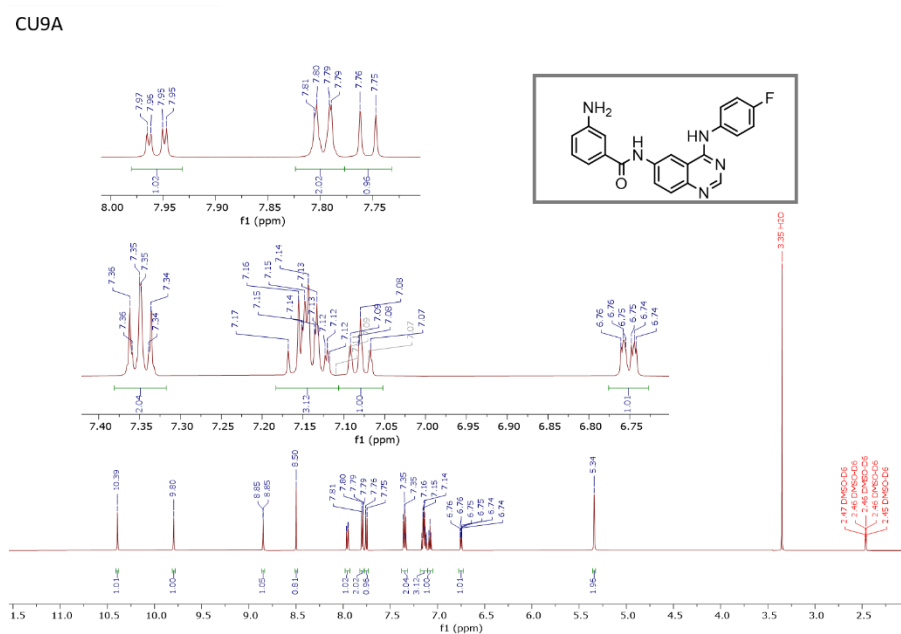
Espectro 6.3. Espectro NOESY de la molécula CU-7B

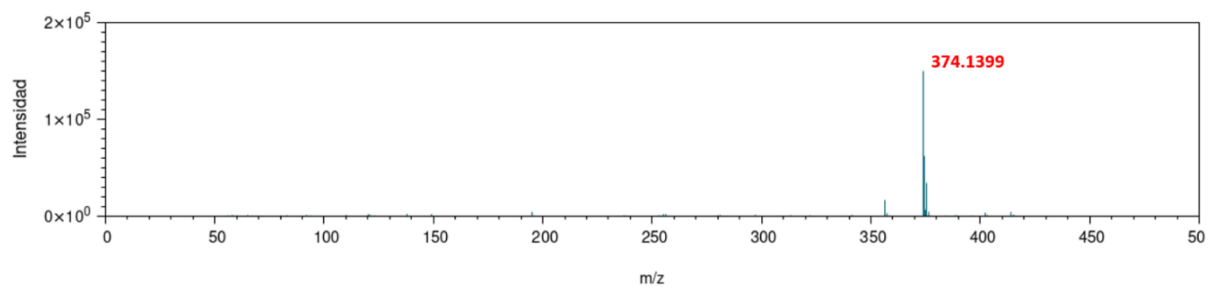
Espectro 7. Espectro de RMN de ^{13}C de la molécula CU-8A

Espectro 7.1. Espectro de RMN de ^1H de la molécula CU-8A**Espectro 7.2.** Espectro de masas por APCI de la molécula CU-8A**Espectro 8.1.** Espectro de RMN de ^{13}C de la molécula CU-8B

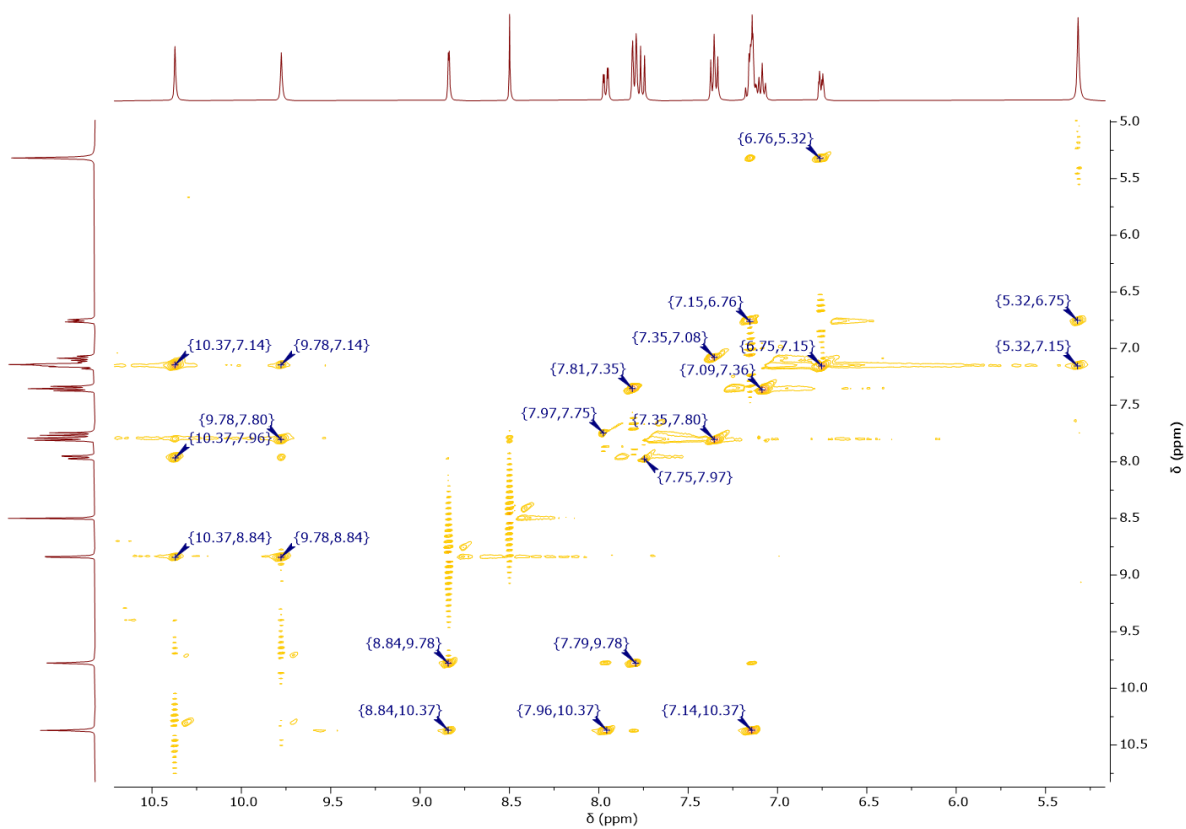
Espectro 8.2. Espectro de RMN de ^1H de la molécula CU-8B

Espectro 8.3. Espectro de masas por APCI de la molécula CU-8B

Espectro 9. Espectro de RMN de ^{13}C de la molécula CU-9AEspectro 9.1. Espectro de RMN de ^1H de la molécula CU-9A

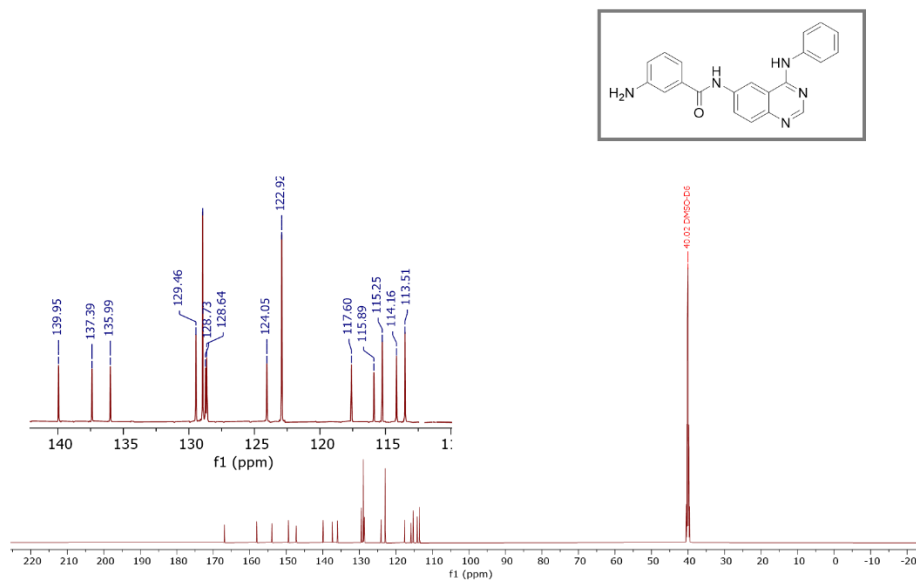


Espectro 9.2. Espectro de masas por APCI de la molécula CU-9A

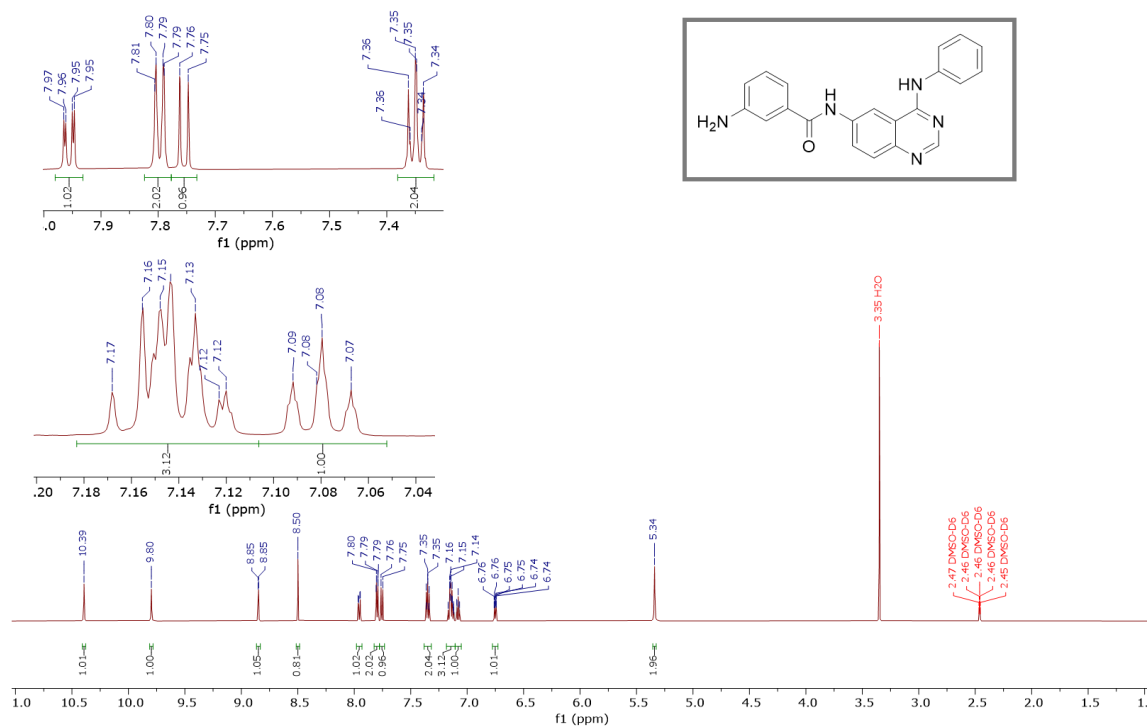


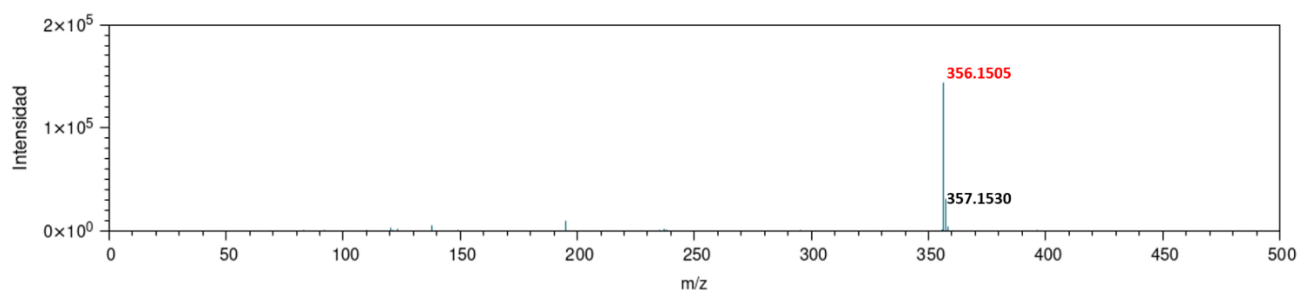
Espectro 9.3. Espectro NOESY de la molécula CU-9A

CU9B

Espectro 10. Espectro de RMN de ^{13}C de la molécula CU-9B

CU9B

Espectro 10.1. Espectro de RMN de ^1H de la molécula CU-9B



Espectro 10.2. Espectro de masas por APCI de la molécula CU-9B

Evaluación biológica

$$\%Actividad\ enzimática = \left(1 - \frac{Fluorescencia - Blanco}{Fluorescencia\ inicial - Blanco}\right) \times 100$$

Ecuación 1. Cálculo de actividad enzimática de LDH

$$\%Actividad\ enzimática = \left(\frac{Luminiscencia}{Luminiscencia\ máxima}\right) \times 100$$

Ecuación 2. Cálculo de actividad enzimática de LDH

Tabla 3A. Porcentajes de actividad enzimática de LDH. Los compuestos y el control fueron evaluados a concentración de 10µmol/L.

Moléculas	%Actividad enzimática	
	Competencia con piruvato	Competencia con NADH
CU-4A	94.65±0.58	36.10±1.16
CU-5A	96.03±0.05	27.91±2.27
CU-7A	93.59±1.62	31.55±3.47
CU-8A	94.45±2.33	1.90±3.30
CU-9A	96.12±2.80	53.36±2.92
CU-4B	90.42±0.42	99.09±1.56

CU-5B	91.23±1.18	70.20±3.50
CU-7B	95.05±3.76	75.26±1.91
CU-8B	70.38±2.36	60.89±6.35
CU-9B	66.23±2.82	82.84±4.55
NHI-2	52.331±10.99	82.04±2.84

Tabla 3.1A. Porcentajes de actividad enzimática de EGFR. Los compuestos y el control fueron evaluados a concentración de 10nmol/L.

Moléculas	%Actividad enzimática
	Competencia con piruvato
CU-4A	62.39±0.31
CU-5A	61.99±0.30
CU-7A	64.59±0.65
CU-8A	64.59±1.40
CU-9A	72.68±3.29
CU-4B	100±7.94
CU-5B	62.73±0.34
CU-7B	75.25±0.34
CU-8B	50.71±0.66
CU-9B	50.71±2.53
Gefitinib	64.87±5.53

Tabla 4A. Porcentaje de crecimiento celular en diferentes líneas celulares cancerosas y sana. Los compuestos fueron evaluados a concentración de 25µmol/L

Moléculas	%Inhibición de crecimiento celular					
	PC-3	HCT15	MCF-7	MDA-MB231	SK-LU-1	COS-7
CU-4A	NA	20.43±5.7	0	15.2±0.3	NA	NA
CU-5A	NA	19.73±0.9	0	15.7±1	NA	NA
CU-7A	NA	NA	17.3±1.2	55±3.5	NA	28.2±5.6
CU-8A	50.6±1.1	68.4±3.6	86.6±5.9	44.3±6.9	59.8±8.3	61.9±8.2
CU-9A	39.6±1.5	17.8±4.1	26.6±1.7	66.5±7.4	NA	64.3±3.2
CU-4B	NA	NA	NA	21.6±6.8	NA	NA
CU-5B	26.1±2.5	NA	NA	74.5±15.7	NA	NA
CU-7B	8.7±6.5	83.8±2.2	86.3±3.7	88.8±6.9	78.7±5.1	88.7±4.2
CU-8B	34.6±1.2	NA	24.2±3.7	27.2±2.6	NA	43±3
CU-9B	57.2±2.5	49.2±3.6	58.8±2.1	18.3±3.7	17.1±0.6	58.2±1.4
Gefitinib	59.9±1.5	68.5±6.8	48.6±1.8	48±2	NA	64.3±3.2

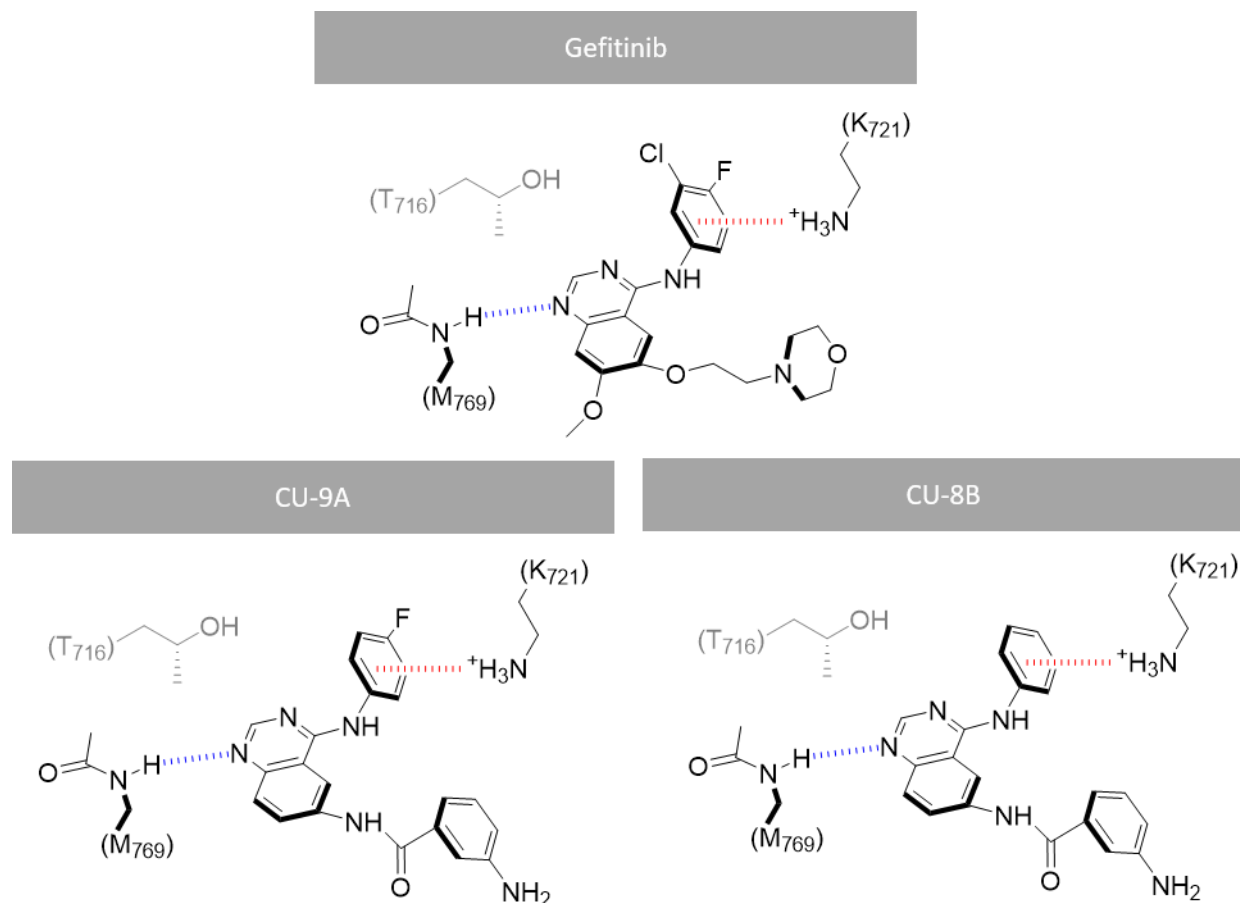


Figura A1. Modo de unión 2D de las moléculas **gefitinib**, **CU-9A** y **CU-8B** predichas por los acoplamientos moleculares en el sitio de unión de ATP de EGFR. Los puentes de hidrógeno se muestran con líneas intermitentes azules, las interacciones de tipo π se muestran con líneas intermitentes rojas.

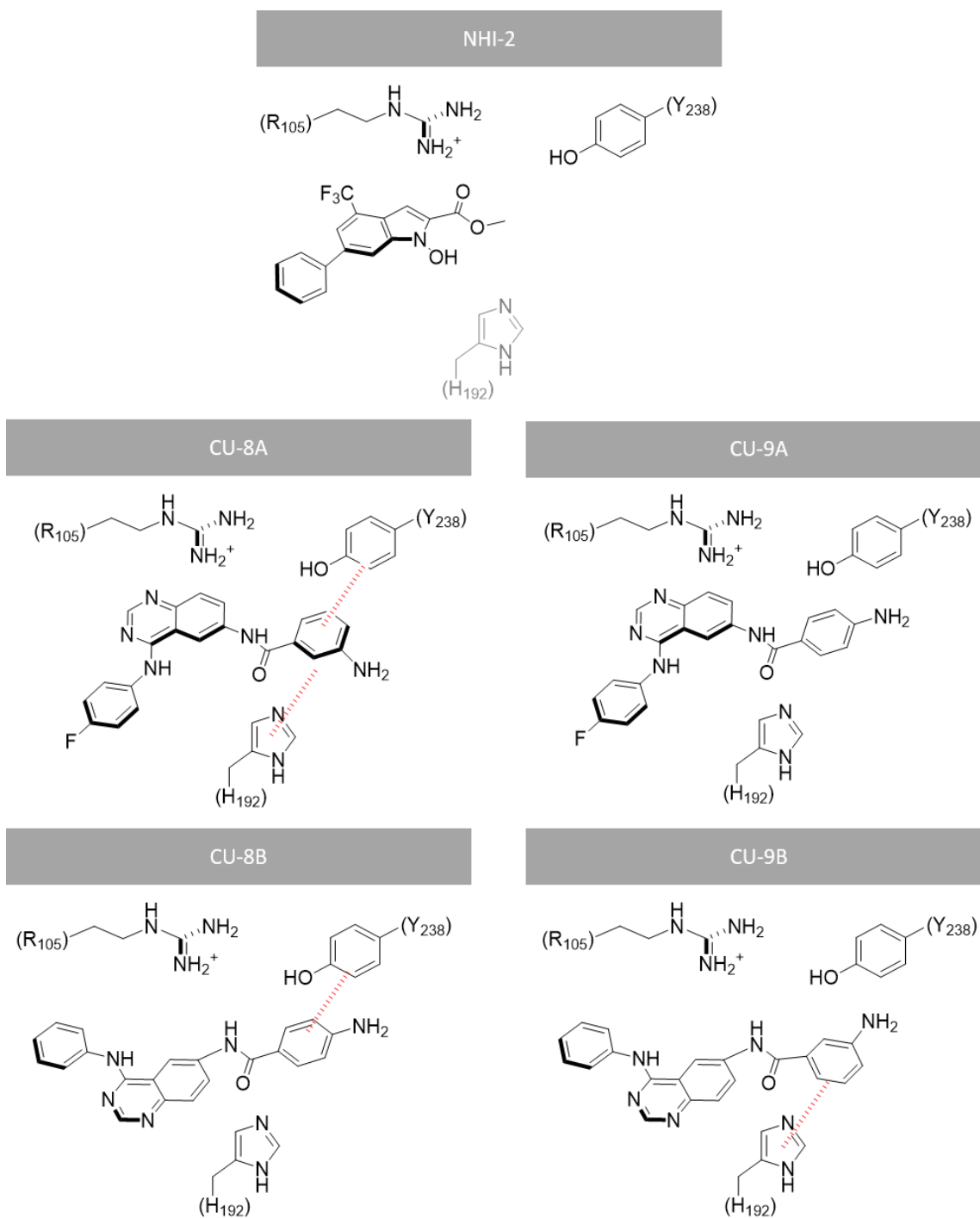


Figura A2. Modo de unión 2D de las moléculas **NHI-2**, **CU-8A**, **CU-9A**, **CU-8B** y **CU-9B** predichas por los acoplamiento molecular en el sitio de unión de piruvato en LDH. Los puentes de hidrógeno se muestran con líneas intermitentes azules, las interacciones de tipo π se muestran con líneas intermitentes rojas.

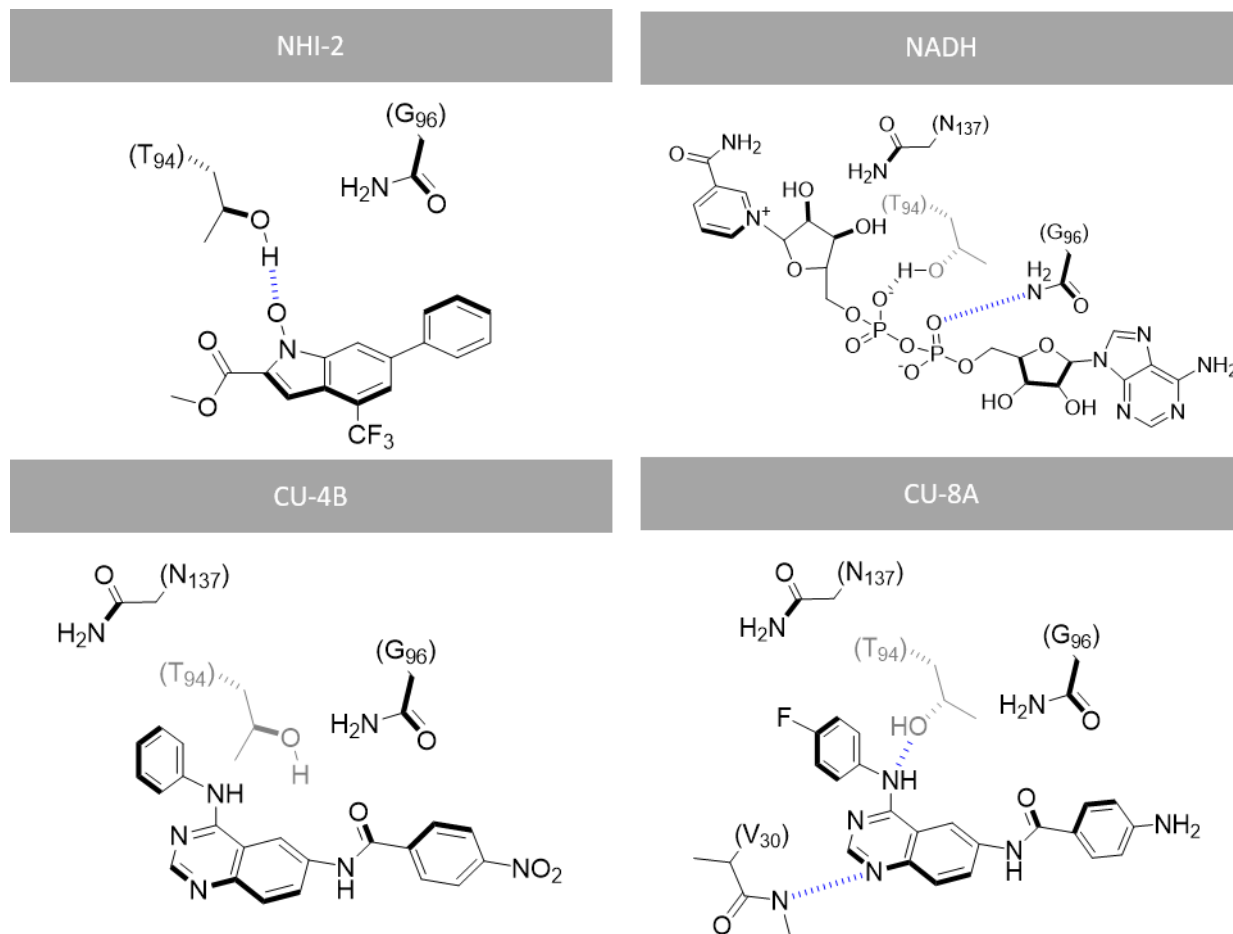


Figura A3. Modo de unión 2D de **NHI-2**, **NADH**, **CU-4B** y **CU-8A** predichos por acoplamiento molecular dentro del sitio de unión de NADH en LDH.