



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

SÍNTESIS, EVALUACIÓN BIOLÓGICA Y ACOPLAMIENTO MOLECULAR DE
COMPUESTOS HÍBRIDOS ENTRE DERIVADOS DE QUINAZOLINA Y
ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS.

T E S I S

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B LUIS ROBERTO GARDUÑO VILLAVICENCIO

TUTOR PRINCIPAL

DR. FRANCISCO HERNÁNDEZ LUIS
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, MX

JULIO, 2019



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. José Guillermo Penieres Carrillo	Presidente
Dr. Héctor García Ortega	Vocal
Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez	Vocal
Dr. Alejandro Cordero Vargas	Vocal
Dr. Alfonso Sebastián Lira Rocha	Secretario

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

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

SUSTENTANTE

Q.F.B. Luis Roberto Garduño Villavicencio

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 de la que me siento orgulloso de pertenecer. Gracias a todos los profesores que me formaron a lo largo de mi bachillerato, licenciatura y maestría. Por ser, además, de la institución de la que obtuve la mejor educación, mi segundo hogar.

Al CONACyT por la beca otorgada durante toda la maestría con el número de becario 628804 y por el apoyo en la compra de los materiales a través del proyecto CONACyT-SEP CB-220664.

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 Dirección General de Profesiones (DGAPA) por el apoyo otorgado dentro del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con el número de proyecto IN218117.

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



ÍNDICE GENERAL

Resumen	4
Introducción	5
Marco teórico	6
Definición y patología.....	6
Epidemiología.....	8
Tratamiento.....	10
Diseño de moléculas.....	15
Planteamiento del problema	18
Hipótesis	18
Objetivos	19
Metodología	20
Síntesis.....	20
Serie A.....	20
Serie B.....	25
Serie C.....	28
Evaluación biológica.....	33
Primera etapa.....	33
Segunda etapa.....	33
Tercera etapa.....	34



Acoplamiento molecular.....	34
Validación.....	34
Ligando.....	34
Proteína.....	35
Molecular docking.....	35
Visualización en 2D.....	35
Resultados y análisis.....	36
Síntesis.....	36
Caracterización.....	36
Parte química.....	44
Evaluación biológica.....	49
Primera etapa.....	49
Segunda etapa.....	51
Tercera etapa.....	52
Acoplamiento molecular.....	53
Validación.....	53
EGFR.....	54
COX-2.....	57
Conclusiones.....	61
Referencias bibliográficas.....	62
ANEXO I: Metodología.....	66
ANEXO II: Caracterización.....	69
ANEXO III: Acoplamiento molecular.....	90



Resumen

Se sintetizaron tres nuevas series de compuestos híbridos derivados de quinazolininas y antiinflamatorios no esteroideos (AINE) (**01-12**). Los productos se evaluaron biológicamente como agentes citotóxicos contra líneas celulares de carcinoma de mama humano (MCF-7), carcinoma de próstata humano (PC-3), riñón de mono (COS-7) y fibroblasto gingival humano (FGH); utilizando tamoxifeno y gefitinib como fármacos de referencia. La mayoría de los compuestos evaluados mostraron una actividad citotóxica significativa, especialmente el derivado **02**. Se realizó el acoplamiento molecular de los compuestos con el receptor EGFR y al sitio de unión de la enzima COX-2 para predecir los modos de unión ligando/diana y se calculó la energía de unión ΔG . Las reglas de Lipinski y Veber sugirieron que los compuestos **02** y **04** son agentes que pueden tener actividad biológica, con un enfoque similar al fármaco que tiene actividad citotóxica inhibiendo EGFR. El modo de unión más favorable sugiere que el átomo de N1 o N3 en el núcleo de quinazolina está unido por enlace de hidrógeno con Met 769, mientras que el modo de unión más favorable con COX-2, sugiere que el átomo de H en el grupo funcional amida de los derivados híbridos está unido por enlaces de hidrógeno con Ser 530. Las estructuras de todos los compuestos sintetizados se confirmaron mediante IR, RMN-¹H, NOESY y EM.

Abstract

Three novel series of quinazolines and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID's) derived hybrids compounds (**01-12**) were synthesized and biologically evaluated as cytotoxic agents against human breast carcinoma cell lines (MCF-7), human prostate carcinoma cell lines (PC-3), monkey kidney cell lines (COS-7) and human gingival fibroblast (FGH) using tamoxiphen and gefitinib as a reference drugs. Most of the evaluated compounds displayed meaningful cytotoxic activity, especially analog **02**. The compounds were docked into the EGFR receptor and COX-2 enzyme binding site to predict the ligand/target binding modes and ΔG binding energy was calculated. Lipinski and Veber rules suggested that compounds **02** and **04** are agents that can have biological activity, with drug likeness approach that have cytotoxic activity inhibiting EGFR. The most favorable binding mode suggests that, the N1 or N3 atom in quinazoline nucleus is hydrogen-bonded interacts with Met 769, while, the most favorable binding mode with COX-2 suggests that the H atom in the amide of hybrid derivatives is hydrogen-bonded interacts with Ser 530. The structures of all synthesized compounds were confirmed by IR, NMR-¹H, NOESY and MS data.



Introducción

El cáncer es una de las enfermedades con mayor recurrencia a nivel mundial y es causante de un gran número de muertes cada año, por lo que el descubrimiento de nuevas formas de combatirlo se ha vuelto una necesidad imperativa en la investigación. De acuerdo con Hanahan y Weinberg, el cáncer se define como “un conjunto de enfermedades caracterizadas por un desequilibrio entre la división y muerte celular”,^[1] con lo cual queda evidenciada la dificultad en su tratamiento. Entre los tipos de tratamientos con los que se cuenta actualmente se tiene a la quimioterapia, que es el uso de sustancias con actividad antitumoral y normalmente, es la primera elección cuando se habla de cáncer; sin embargo, la terapia con los fármacos actuales, tiene diversos inconvenientes como la presencia de severas reacciones adversas, poca selectividad de acción, baja solubilidad acuosa, problemas de biodisponibilidad, entre otros. Dentro de la quimioterapia contra el cáncer existe un grupo de moléculas, como el erlotinib y el gefitinib, que tienen en su estructura al núcleo de quinazolina, los cuales, se sabe interactúan con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Este receptor está directamente relacionado con la proliferación de células tumorales. En este estudio se tomó al núcleo de la quinazolina como uno de los andamios (*scaffold*) del diseño de los derivados. Lo anterior porque se le considera una estructura privilegiada en el ámbito de la química farmacéutica, debido a su presencia en diversos compuestos con variadas actividades biológicas, incluyendo anticancerígena. Se sabe además, que en todo proceso cancerígeno un componente importante es la generación de inflamación en la zona afectada antes de que se presente la diseminación a diversos órganos, por lo cual algunos grupos de investigación han estudiado a los antiinflamatorios no esteroideos (AINE's) como agentes quimiopreventivos en el tratamiento en etapas tempranas del cáncer, pues se sabe que este tipo de fármacos actúan inhibiendo a la enzima COX-2, que está encargada de la síntesis de prostaglandinas, y que por lo tanto, está asociada a los procesos inflamatorios.

De acuerdo a lo anterior, el presente trabajo se enfoca en el diseño, síntesis, evaluación biológica y acoplamiento molecular de derivados que puedan presentar una acción antitumoral dada por la porción de quinazolina y otra antiinflamatoria presuntiva en los estudios de acoplamiento molecular, proporcionada por algún AINE y, de esta manera, contar con compuestos con acción dual para el tratamiento del cáncer.

Roberto Garduño-Villavicencio



Marco teórico

Definición y patología

El cáncer es una enfermedad compleja, la cual se presenta de manera muy variable de un paciente a otro. La misma variabilidad también se exhibe a niveles tanto celulares como moleculares. Este padecimiento es un proceso de diversos pasos en el que las células se someten a cambios metabólicos drásticos, encabezados por la proliferación celular en un rango de tiempo muy corto, la evasión a los mecanismos de respuesta inmune y, finalmente, la invasión de tejidos distantes, produciendo metástasis. [2]

El proceso cancerígeno tiene como resultado la formación de una masa de células no reguladas genéticamente, que pueden ser clasificadas como “rebeldes”, ya que no obedecen las reglas de crecimiento y muerte celular. Esta masa celular puede llegar a ser asintomática por un largo periodo de tiempo; sin embargo, seguirá creciendo hasta perturbar las funciones fisiológicas normales, causando diversos síntomas dependiendo de la localización y el tamaño de la masa, así como de la manera en cómo se dé la propagación de las células cancerígenas. [3]

Muchos tipos de cáncer son originados a partir de una célula (o de un número pequeño de células). [4] Para que la célula pueda volverse cancerosa, debe presentar diversos cambios en los oncogenes y en los genes supresores que harán que la célula comience a proliferar más allá de su límite normal. Este proceso dará como resultado la formación de una clona de células “rebeldes”, si esta clona es tolerada por el organismo y permite que no sea perturbado, la clona continuará proliferando y, durante el proceso, las células tumorales acumularán cada vez más modificaciones en el ciclo celular. Siguiendo este contexto, solo las células que sean más aptas y agresivas prosperarán, tomando así el lugar de las células sanas; es así como los tumores se desarrollan para volverse malignos. De esta manera surge uno de los problemas en el tratamiento del cáncer cuando un paciente recibe un fármaco que mata células cancerígenas; si el tratamiento no es totalmente efectivo y permite la sobrevivencia de una pequeña cantidad de células malignas, éstas generarán cambios que las hace resistentes al fármaco. El número de células residuales pueden hacer que el cáncer recaiga en una forma que sea peor a la inicial.

Para oncólogos y patólogos, el cáncer está mejor descrito como una enfermedad progresiva, que comienza como una pequeña lesión que generalmente se encuentra localizada sobre un tejido y es considerada clínicamente de origen benigno.



Cuando se detecta en una etapa temprana, la lesión puede ser completamente extraída y posiblemente no cause la muerte del paciente. En ocasiones, las pequeñas lesiones aparecen en un área de tejido que es afectado por una enfermedad inflamatoria crónica, como la cirrosis hepática, gastritis o esófago de Barrett. Las enfermedades antes mencionadas son llamadas “enfermedades precursoras”, debido a que representan un terreno favorable para que el cáncer pueda desarrollarse. Cuando no es detectado en alguna etapa temprana, el cáncer tiene la posibilidad de desarrollarse no solo por el tamaño de los tumores, sino también por su capacidad de interferir y perturbar ciertas funciones del organismo. Cuando el tumor es más grande, no puede estar confinado en un solo lugar, con lo cual se extenderá en el órgano inicial y se diseminará a otros órganos vecinos. [5]

La caja del cáncer

A pesar de la diversidad en la generación, desarrollo y progresión del proceso cancerígeno, existe un esquema común a seguir en la proliferación y muerte celular; como resultado, un número de oncogenes y supresores de tumores se ven frecuentemente alterados, independientemente del tipo de cáncer o la causa de la enfermedad. La **Figura 1**, representa lo que se ha definido como la “caja del cáncer”, que es la red de genes y procesos que tienen que ser alterados para inducir la formación de células cancerígenas.

La caja del cáncer involucra tres procesos principales de señalización: dos que promueven el crecimiento y uno que lo suprime. Una de las principales señales de crecimiento involucrada en la caja del cáncer, incluye receptores externos de membrana como el receptor del factor del crecimiento epidérmico (EGFR), una proteína que se extiende en ambos lados de la membrana celular. En el dominio externo, interacciona con factores de crecimiento presentes en la sangre o en espacios intercelulares. En cuanto al dominio interno, el proceso tiene la actividad enzimática de una tirosina cinasa, que se activa cuando el receptor se une al factor de crecimiento. La tirosina cinasa inicia una cascada intracelular de señalización parecida a una reacción en cadena que se propaga amplificando moléculas como productos de los genes KRAS. El último efecto de estas señales es activar la proliferación celular por la estimulación de la progresión del ciclo celular.

Para contrarrestar estas señales, el principal proceso antiproliferativo es controlado por el gen TP53 y su producto p53. Cuando el ADN de la célula se daña y no es reparado, p53 detecta la anomalía activando un gran número de mecanismos antiproliferativos que ocurren al mismo tiempo. Estos mecanismos antiproliferativos pueden bloquear la progresión del ciclo celular, obligando a la diferenciación celular o induciendo a una muerte celular programada, conocido como apoptosis. La caja del cáncer muestra cómo los tres procesos mencionados anteriormente están interconectados. [6]

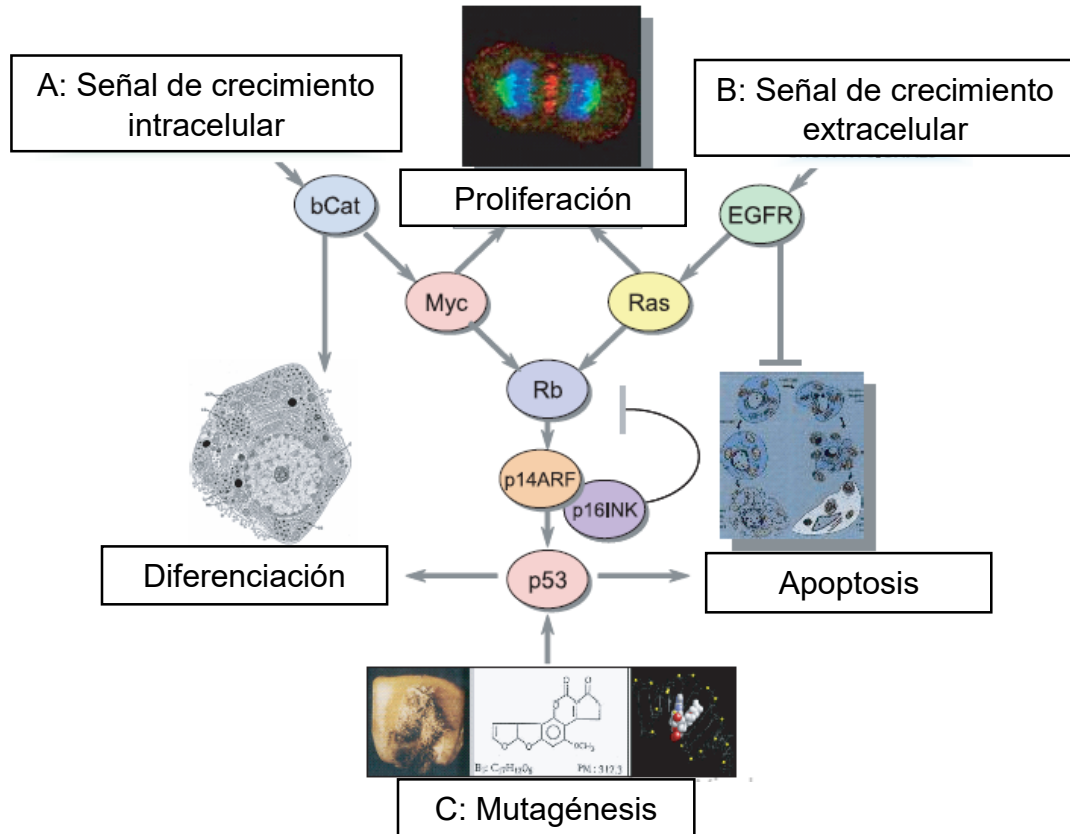


Figura 1. Caja del cáncer.

La figura muestra como diversos genes pueden cooperar en el desarrollo del cáncer. Se ilustran las 3 fases de la vida de una célula: división (arriba), diferenciación (izquierda) y muerte celular programada (derecha). Genes importantes y sus ayudantes son representados con flechas. [6]

Epidemiología

En el mundo, el número de casos presentados cada año aumenta de manera significativa, por ello la necesidad de encontrar diversos métodos que disminuyan la mortalidad y morbilidad asociadas a este padecimiento. De acuerdo a la OMS, el cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo, simplemente en 2015 ocasionó 8.8 millones de defunciones, lo cual se traduce a que una de cada seis muertes en el mundo es debido a esta enfermedad.

Los cinco tipos de cáncer [7] que causan un mayor número de fallecimientos son los siguientes:

- Pulmonar (1.69 millones de defunciones)
- Hepático (788 000 defunciones)
- Colorrectal (774 000 defunciones)
- Gástrico (754 000 defunciones)
- Mamario (571 000 defunciones)



Alrededor de un tercio de las muertes por cáncer se debe a siete factores principales de riesgo conductuales y dietéticos. La modificación o la prevención de los principales factores de riesgo pueden reducir de forma significativa la incidencia de cáncer. Estos factores de riesgo incluyen:

- consumo de tabaco
- sobrepeso u obesidad
- mala alimentación en la que se ingieren cantidades insuficientes de frutas y hortalizas
- inactividad física
- consumo de bebidas alcohólicas
- radiaciones ionizantes y ultravioleta
- contaminación del aire en las ciudades

El tabaquismo es el principal factor de riesgo y ocasiona aproximadamente el 22% de las muertes por cáncer. La acumulación general de factores de riesgo se combina con la pérdida de eficacia de los mecanismos de reparación celular que suele ocurrir con la edad. ^[8] Cuando alguno de estos factores de riesgo incide sobre una o un grupo de células, inicia el proceso que se ejemplifica en la **Figura 2**, ^[9] en donde se muestra la promoción de todo proceso cancerígeno, así como los mecanismos de muerte celular que intervienen en la disminución del número de células afectadas. Por otra parte, las infecciones oncogénicas, ocasionan el 25% de los casos de cáncer en los países de ingresos medios y bajos y cerca del 15% de los casos de cáncer diagnosticados en 2012 se atribuyeron a infecciones, especialmente las causadas por *Helicobacter pylori*, los virus de la hepatitis B y C, y el virus de Epstein-Barr.

Los virus de la hepatitis B y de la hepatitis C y algunos tipos de papiloma aumentan el riesgo de contraer cáncer de hígado y cáncer de cuello uterino, respectivamente. Asimismo, la infección por el VIH aumenta considerablemente el riesgo de contraer el cáncer cervicouterino. ^[10]

Uno de los problemas más graves, aunque muy común, es la detección del cáncer en una fase avanzada. En 2017, solo el 26% de los países de ingresos bajos informaron que el departamento de sanidad pública contaba con servicios de patología para atender a la población en general. Más del 90% de los países de ingresos altos ofrecen tratamiento a los enfermos oncológicos, mientras que en los países de ingresos bajos este porcentaje es inferior al 30%. El impacto económico del cáncer es sustancial y va en aumento. De acuerdo a las estimaciones, el costo total atribuible a la enfermedad en 2010 ascendió a US\$ 116 billones. Con esto, queda reflejado que solo uno de cada cinco países de ingresos medianos o bajos dispone de los recursos necesarios para impulsar políticas de lucha contra la enfermedad.

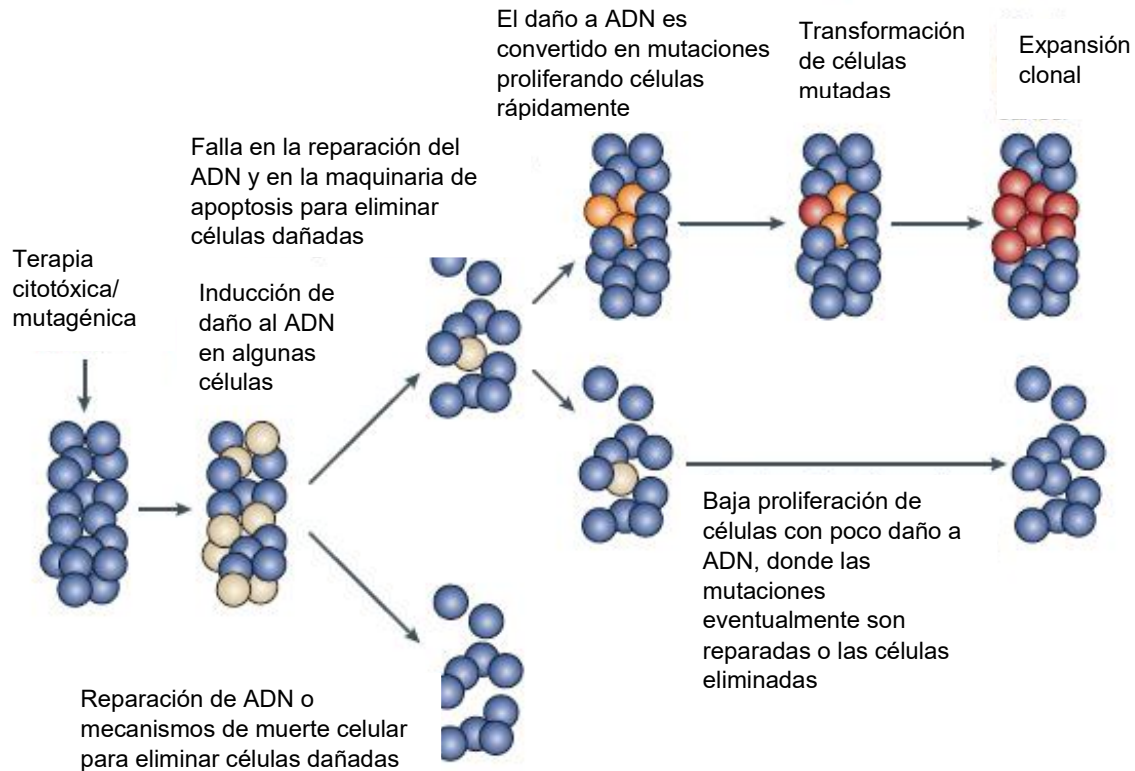


Figura 2. La figura ilustra el rol de las células en la muerte y proliferación celular relacionada a la carcinogénesis. Las exposiciones de agentes externos en un tejido pueden inducir mutaciones y citotoxicidad provocada por el daño al ADN. La reparación del ADN y la muerte celular ayudan a subsanar o eliminar células dañadas, respectivamente. El fallo en la reparación o eliminación de células dañadas pueden resultar en la permanencia del ADN dañado y así formar una mutación. [9]

Entre el 30 y el 50% de los tipos de cáncer se pueden evitar. Para ello, es necesario reducir los factores de riesgo y aplicar estrategias preventivas. La prevención abarca también la detección precoz de la enfermedad y el tratamiento de los pacientes. Si se detectan a tiempo y se tratan adecuadamente, las posibilidades de recuperación para muchos tipos de cáncer son excelentes. [11]

Tratamiento

El diagnóstico correcto del cáncer es esencial para poder prescribir un tratamiento adecuado y eficaz, porque cada tipo de cáncer requiere de un protocolo específico que puede abarcar una o más modalidades, tales como la cirugía, la radioterapia o la quimioterapia. Como primer paso es importante determinar los objetivos del tratamiento o los cuidados paliativos. Los servicios médicos ofrecidos deben ser integrados y centrados en las personas. [12]



Dentro de los tratamientos con los que se cuenta actualmente para combatir el cáncer, existe la quimioterapia, que es el uso de sustancias que puedan interactuar con ciertas dianas farmacológicas asociadas a la enfermedad. En este rubro existe un grupo de fármacos que cuentan en su estructura con el núcleo de quinazolina, un biciclo aromático fusionado con un anillo de benceno y uno de pirimidina, la estructura química se muestra en la **Figura 3**.

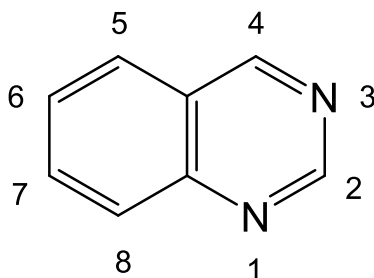


Figura 3. Estructura del núcleo de quinazolina.

Los fármacos derivados de quinazolina son agentes terapéuticos de considerable importancia química y farmacológica. Este núcleo ha sido extensamente utilizado como *scaffold* (núcleo base para el desarrollo de moléculas bioactivas) en el área de la química farmacéutica, especialmente como agente anticancerígeno. Algunos derivados de quinazolina, como el nolatrexedato (**I**), son considerados como inhibidores de la antifolato timidilato sintasa, ^[13] mientras que los derivados de 2,4-dihidroquinazolinas están normalmente asociados con la inhibición de la polimerización sobre tubulina, como ejemplo el compuesto GMC-5-193 (**II**). ^[14] Además, algunas 4-anilinoquinazolinas representan una clase de fármacos antitumorales que han demostrado selectividad sobre EGFR, inhibiendo la autofosforilación, detectando que la interacción por parte de este tipo de compuestos es reversible, demostrando, además, mayor especificidad que en otros tipos de cinasas; ejemplo de este tipo de fármacos son el gefitinib (**III**) o el erlotinib (**IV**). ^[15] Por último, derivados de la 2-triclorometilaminoquinazolinas (**V**) exhiben un importante efecto inhibitorio sobre cinasas dependientes de ciclina. Los derivados antes mencionados se muestran en la **Figura 4**. ^[16]

El diseño estructural de las moléculas derivadas de quinazolina ha atraído la atención de gran manera, debido a su accesibilidad sintética (facilidad en la compra o síntesis de las materias primas), diversidad en la reactividad química, y por asociárseles a otro tipo de actividades biológicas además de la anticancerígena como antiinflamatoria, ^[17] antimalárica, ^[18] antihelmítica, ^[19] relajante muscular, ^[20] antihiperlipidémica, ^[21] antituberculosa, ^[22] antimicrobiana ^[23] o antihipertensiva. ^[24]

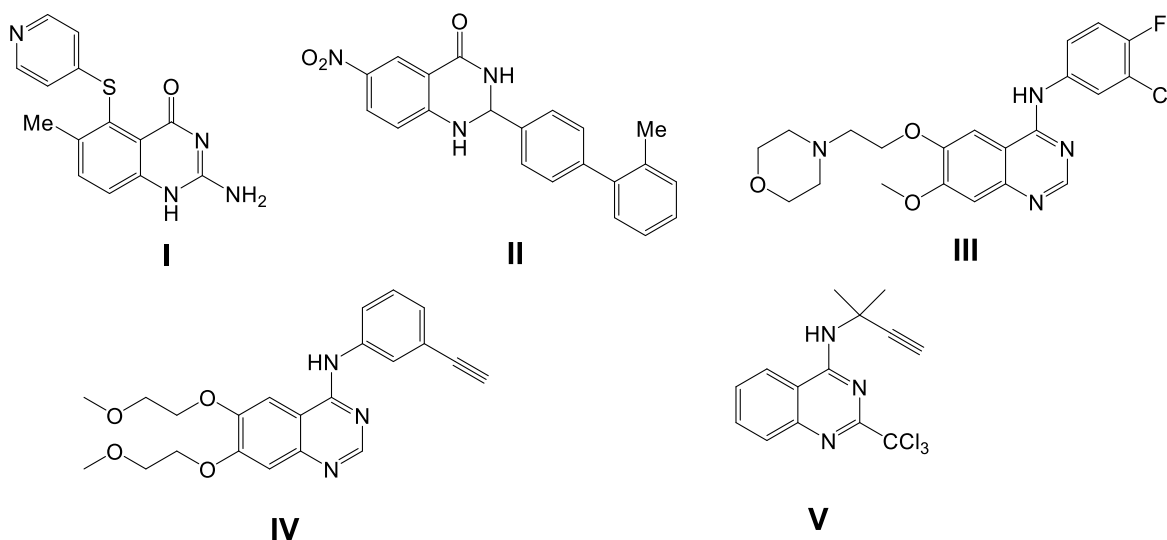


Figura 4. Fármacos que contienen el núcleo de quinazolina que han sido utilizados para el tratamiento del cáncer. **I:** nolatrexedato, **II:** 4-quinazolinonas-2-sustituidas, **III:** erlotinib y **IV:** gefitinib **V:** 2-triclorometil-aminoquinazolinas. ^[16]

Como ya se había mencionado anteriormente, algunos fármacos que contienen la estructura de quinazolina, como el erlotinib o el gefitinib, interaccionan con el EGFR, que es una proteína de tipo tirosina cinasa. Estas proteínas son enzimas que están envueltas en muchos procesos celulares como la proliferación celular, el metabolismo, supervivencia o apoptosis. ^[25] Diversas proteínas tipo tirosina cinasa son activadas en células cancerosas, dando como resultado el crecimiento y la progresión de tumores, por lo que el bloquear la actividad de estas proteínas representan un enfoque racional en la terapia del cáncer. Las proteínas tirosina cinasas (PTKs, por sus siglas en inglés), catalizan la fosforilación de residuos de tirosina y serina/treonina en varias proteínas involucradas en la regulación de todas las funciones del organismo. La activación inapropiada y no controlada de muchas de estas cinasas, por sobreexpresión, activación constitutiva o mutación, da como resultado el crecimiento celular acelerado y no regulado. ^[26] La sobreexpresión de estos receptores fue encontrada en diversos tipos de cáncer (mama, ovario, colon y próstata) y sus niveles de expresión están correlacionados con la vascularidad que está asociada a su vez con una pobre prognosis en pacientes. ^[27] La **Figura 5** ^[28] presenta muchas de las funciones que están controladas por el EGFR, además de los sitios de acción en los que interaccionan fármacos como el gefitinib, el cual actúa en el dominio intermembranal del receptor, realizando una competencia con el ligando endógeno, el ATP.

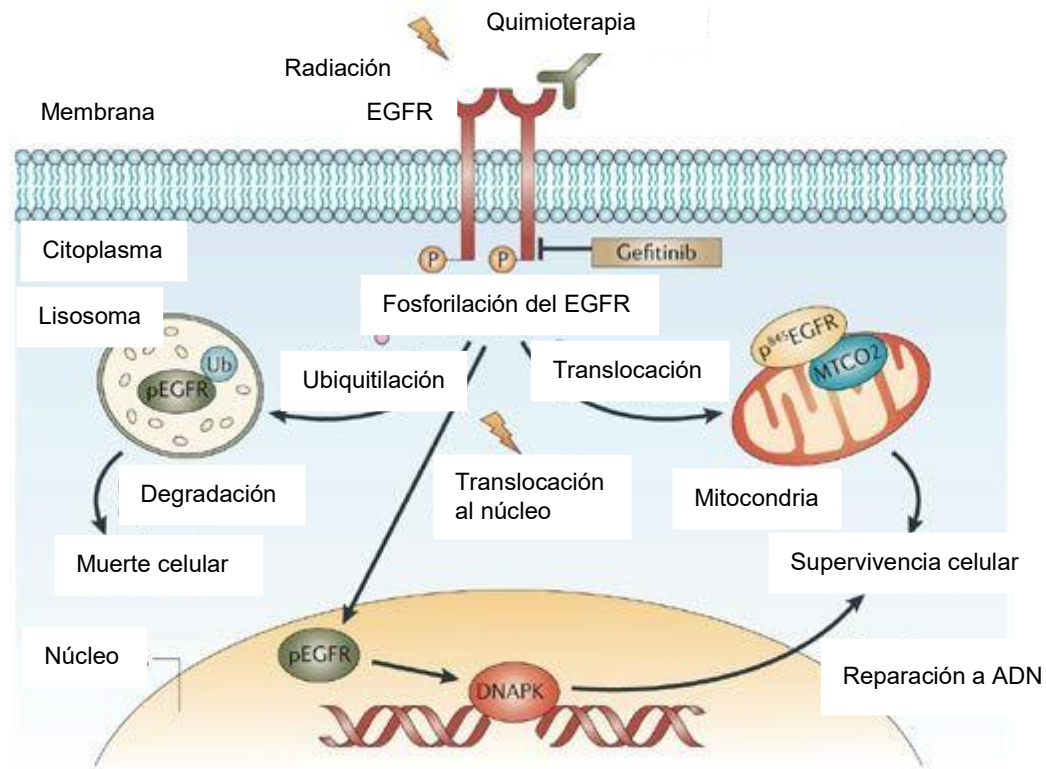


Figura 5. Efecto de la radiación y la quimioterapia sobre la señalización de EGFR. Se observa como el gefitinib interactúa con el dominio interno del receptor inhibiendo su fosforilación induciendo la muerte celular. [28]

Por otra parte, aunque siguiendo con el mismo rubro en el tratamiento del cáncer, en 1863, Rudolf Virchow notó la presencia de leucocitos en tejidos con neoplasia, con lo que comenzó a hacer una conexión entre inflamación y cáncer. Él sugirió que el “infiltrado linforetico” (como llamó a la aparición de leucocitos en tejidos en donde no deberían de observarse) reflejaba el origen del cáncer en sitios de inflamación crónica. Después de 10 años de estudio del microambiente inflamatorio en tejidos malignos, dio origen a la hipótesis de Virchow, y la unión entre cáncer e inflamación comenzó a tener implicaciones en la prevención y tratamiento. [29] En la **Tabla 1** se muestran algunos tipos de cáncer que se originan cuando el proceso inflamatorio es cofactor de la carcinogénesis. Cerca del 15% del cáncer es atribuible a agentes infecciosos, [30] y la inflamación es un componente importante. Además, un mayor riesgo de recurrencia, es asociado con la inflamación crónica causada por agentes químicos y físicos, [31] y reacciones inflamatorias autoinmunes. [32] De acuerdo con lo propuesto con Virchow, fue que se comenzaron a utilizar a los antiinflamatorios no esteroideos (AINE’s) como agentes preventivos en el tratamiento del cáncer, ya que se observó que la inflamación es un componente vital en la progresión de tumores, respaldado por diversos estudios que muestran que en el inicio y progresión del tumor hay una irritación crónica, infección e inflamación.



Tabla 1. Algunas asociaciones entre riesgo de cáncer e inflamación.

Cáncer	Estímulo/condición inflamatoria
Vesícula	Esquistosomiasis
Cervicouterino	Virus del papiloma
Ovario	Inflamación pélvica
Gástrico	<i>H. pylori</i> inductor de gastritis
Linfoma de MALT	<i>H. pylori</i>
Esofágico	Metaplasia de Barret
Colon	Enfermedad gastrointestinal inflamatoria
Hepático	Virus de la hepatitis (B y C)
Bronquial	Sílice, asbestos, humo de cigarro
Sarcoma de Kaposi	Virus del herpes tipo 8

Los AINE's son una clase de compuestos que proveen efecto analgésico, antipirético y en altas dosis pueden mostrar efecto antiinflamatorio. La importancia de este tipo de compuestos en la reducción del riesgo, ha surgido en años recientes de acuerdo a lo mostrado en estudios clínicos y preclínicos. Uno de las primeras observaciones clínicas en las que los AINE's pudieron inhibir la progresión del cáncer, deriva de estudios de pacientes con poliposis adenomatosa familiar (FAP) y síndrome de Gardner. Los pacientes con FAP desarrollan numerosos pólipos intestinales durante el inicio de la edad adulta debido a una mutación en el gen *APC*, un importante modulador de la señalización de Wnt. En esta población de pacientes, la ingestión por un año de sulindaco disminuyó la multiplicación de pólipos e indujo su regresión a células sanas. Estos estudios fueron consistentes con los encontrados en modelos animales inducidos con cáncer, pues mostraron la regresión de pólipos intestinales siguiendo un tratamiento con AINE's. En 1991, una gran población mostró en un estudio que dosis bajas de AINE's reducían el riesgo relativo de cáncer de colon, seguidamente otros estudios revelaron que la ingesta crónica de AINE's redujo significativamente la formación y recurrencia de pólipos en el colon, resultando en un 40-50% en la reducción del riesgo relativo de cáncer colorrectal. [33] Después la pregunta fue, ¿qué mecanismos eran responsables de estos efectos benéficos? En 1994, se reportó que la COX-2, fue selectivamente regulada en cáncer colorrectal por este tipo grupo de compuestos. [34] Desde entonces, los niveles de COX-2, se han mostrado más elevados en otros tumores de tipo epitelial incluyendo el de mama, estómago, páncreas, vejiga, pulmón y próstata. [35] El principal efecto de los AINE's es la inhibición de la actividad enzimática sobre COX-1 y COX-2, con lo que se llegó a demostrar que al disminuir la expresión o la actividad en COX-2, se disminuyó la formación de tumores en animales y humanos, con lo que se demostró que ésta enzima es un blanco en la inhibición de la progresión del cáncer. [36]



Se sabe que la COX-2 produce PG's (prostaglandinas) que regulan la angiogénesis, modulan el sistema inmune, regulan la migración/invasión celular e inhiben la apoptosis, todos estos fenómenos son promotores en la progresión del cáncer. Otros subproductos de la COX-2, como el malondialdehído, forma aductos con el ADN resultando en mutaciones que pueden iniciar carcinogénesis. Todos estos efectos estimulan la progresión tumoral y ayudan a explicar el papel pro-neoplásico de la COX-2.^[37] Uno de los principales productos en cuanto a PG's de la COX-2 en el microambiente gastrointestinal es la PGE₂. En un comportamiento fisiológico normal, las PG's derivadas de COX juegan un papel muy importante en la protección de la mucosa gastroduodenal.^[38] La PGE₂ que se deriva de la COX-2, ha mostrado ser proinflamatoria mediante la progresión de enfermedades como la artritis y cáncer. En la **Figura 6**^[39] se muestra la cascada de señalización que sigue la PGE₂ en el cáncer de colorrectal. Como se observa hay un punto en el que la señalización converge con la ruta de la β-catetina, la cual interacciona con el factor de crecimiento epidérmico vascular (VEGF, cofactor que regula la angiogénesis), desencadenando efectos biológicos como la supervivencia celular, angiogénesis, proliferación celular y anti-apoptosis.

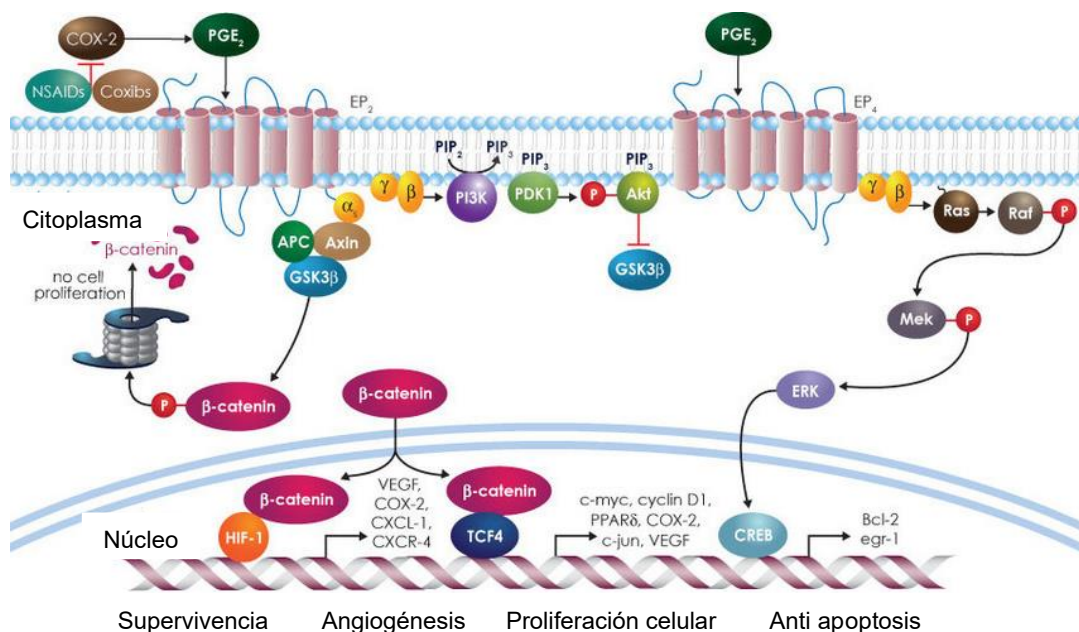


Figura 6. Señalización producida por PEG₂.^[39]

Diseño de moléculas

Actualmente, diversos reportes muestran que las 4-anilinoquinazolininas son potentes y altamente selectivos inhibidores de EGFR, formando un enlace reversible que compite con el ATP en el sitio de unión. Diversos grupos químicos en las quinazolininas han sido descritos como esenciales para que interactúen con el EGFR.



De acuerdo con Xu y colaboradores, el anillo de pirimidina es obligatorio para que haya actividad y un enlace NH libre junto con el de la anilina de la posición 4, son óptimos para potenciarla, un sustituyente electroattractor en la posición 3 del anillo de anilina puede resultar favorable, siendo cloro o bromo los más óptimos y teniendo de preferencia grupos donadores o atractores en posiciones 6 o 7 de la quinazolina; por último, pero no menos importante un enlace NH en la posición dos será importante ya, que este grupo o en N en la posición 3 pueden interactuar con el residuo de metionina 769. [40]

Teniendo en cuenta los parámetros anteriores, el grupo de Xu hizo la propuesta de una molécula base; además, el grupo de Patel [41] aportó que la naturaleza del grupo NH de la posición 4 de la quinazolina no necesariamente debe ser una anilina, estas dos estructuras se muestran en la **figura 7**.

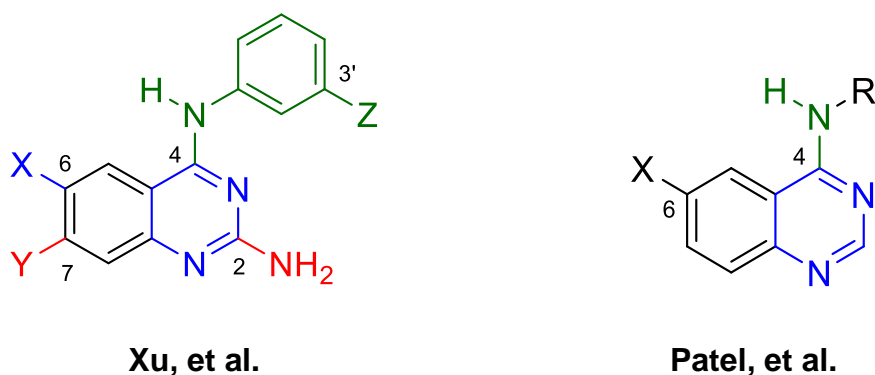
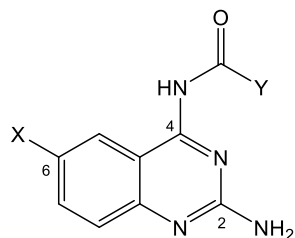


Figura 7. Moléculas con el núcleo de quinazolina propuestas por los grupos de investigación de Xu [40] y Patel [41], con colores se representan los elementos farmacofóricos esenciales para que haya interacción con EGFR. X, Y: GED o GEA, Z: Cl o Br, R: alquilo, alilo.

Con base en los requerimientos estructurales señalados, y tomando en cuenta las reglas de Lipinsky y Veber (los valores de los descriptores de las moléculas pueden consultarse en la **Tabla 9** en el **Anexo I**), fue que se propuso en el presente trabajo la síntesis de tres series de compuestos que tuvieran actividad biológica potencial en líneas celulares tumorales y actividad antiinflamatoria de manera predictiva, realizada con estudios de acoplamiento molecular, formadas por una porción de quinazolina y de un AINE.

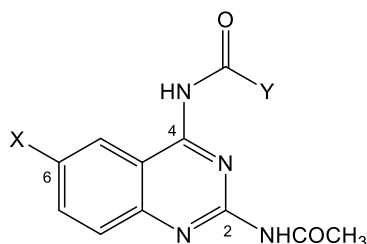
En este trabajo, los AINE's utilizados fueron el **(S)-ibuprofeno** y el **(S)-naproxeno**, debido a su fácil adquisición comercial, ya que los medicamentos en el mercado cuentan con estos enantiómeros en un porcentaje de EE>99%.

De acuerdo a lo anterior, las series propuestas se muestran en la **Figura 8**.



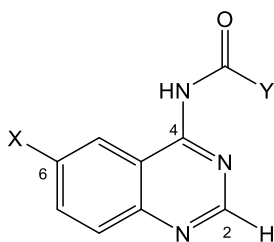
Serie A

- 01:** X: NO₂, Y: (S)-ibuprofenilo
- 02:** X: NH₂, Y: (S)-ibuprofenilo
- 03:** X: NO₂, Y: (S)-naproxenilo
- 04:** X: NH₂, Y: (S)-naproxenilo



Serie B

- 05:** X: NO₂, Y: (S)-ibuprofenilo
- 06:** X: NH₂, Y: (S)-ibuprofenilo
- 07:** X: NO₂, Y: (S)-naproxenilo
- 08:** X: NH₂, Y: (S)-naproxenilo



Serie C

- 09:** X: NO₂, Y: (S)-ibuprofenilo
- 10:** X: NH₂, Y: (S)-ibuprofenilo
- 11:** X: NO₂, Y: (S)-naproxenilo
- 12:** X: NH₂, Y: (S)-naproxenilo

Figura 8. Compuestos híbridos propuestos conformados por una porción de quinazolina y un AINE.

En cuanto al diseño de la serie A, se tomó como base las observaciones del grupo de Patel, la amina libre de la posición 2 y en lugar de colocar un enlace N-C formando una anilina en la posición 4, se sustituyó por un grupo amida para poder formar así un enlace entre la quinazolina y el AINE correspondiente, por último, del grupo de Xu se decidió colocar un grupo donador (NH₂) o un grupo atractor (NO₂) en posición 6 para observar el efecto electrónico en reflejado en la actividad biológica. Siguiendo con la serie B, se decidió colocar un grupo acetilo, formando una amida en la posición 2 respetando el enlace NH, con la finalidad de disminuir la polaridad los compuestos y que estos puedan ingresar más fácilmente a la célula y aumentar la actividad biológica, además de que posiblemente dentro de la célula las moléculas pudieran sufrir una reacción metabólica de desacetilación. En cuanto a la serie C, se tomó como estructura la base de quinazolina propuesta por el grupo de Xu, que coincide con la estructura del erlotibib y el gefitinib en cuanto al sustituyente H en la posición 2, en este caso se continuó considerando la formación del enlace amida en la posición 4, respetando ese enlace NH y de igual manera se propuso colocar un grupo electrodonador y uno electroattractor en posición 6.



Planteamiento del problema

El tratamiento contra el cáncer con el que se cuenta en la actualidad tiene diversas desventajas, como la toxicidad asociada, resistencia generada por las células afectadas, poca selectividad y baja biodisponibilidad, por lo que existe una constante búsqueda de nuevas moléculas que disminuyan estos efectos adversos y combatan la enfermedad.

De acuerdo a lo anterior, se plantea la siguiente interrogante, al sintetizar moléculas híbridas con una porción de quinazolina y otra de un antiinflamatorio, ¿se obtendrá un efecto citotóxico en líneas celulares y se observará una relación entre los estudios de acoplamiento molecular con el posible efecto antiinflamatorio de los compuestos?

Hipótesis

Si se evalúan *in vitro* los compuestos híbridos, éstos presentarán un efecto citotóxico en algunos tipos de líneas celulares, además del efecto antiinflamatorio presuntivo mostrado en el acoplamiento molecular. Asimismo, el estudio computacional mostrará las interacciones presentes entre las moléculas y las dianas farmacológicas que expliquen la actividad biológica mostrada.



Objetivos

General

Sintetizar tres series de moléculas híbridas entre derivados de quinazolina y antiinflamatorios no esteroideos, evaluarlos *in vitro* sobre líneas celulares cancerígenas y con fenotipo no tumoral, así como realizar el estudio de acoplamiento molecular con dos dianas farmacológicas que están involucradas en la actividad biológica estudiada.

Particulares

- a) Sintetizar 12 compuestos híbridos entre derivados de quinazolina y antiinflamatorios no esteroideos (S)-ibuprofeno y (S)-naproxeno.
- b) Evaluar *in vitro* los híbridos sobre 2 líneas celulares cancerígenas (MCF-7, PC-3) y sobre dos líneas celulares con fenotipo no tumoral (FGH, COS-7).
- c) Realizar el acoplamiento molecular entre los compuestos híbridos y las dianas farmacológicas EGFR y COX-2.

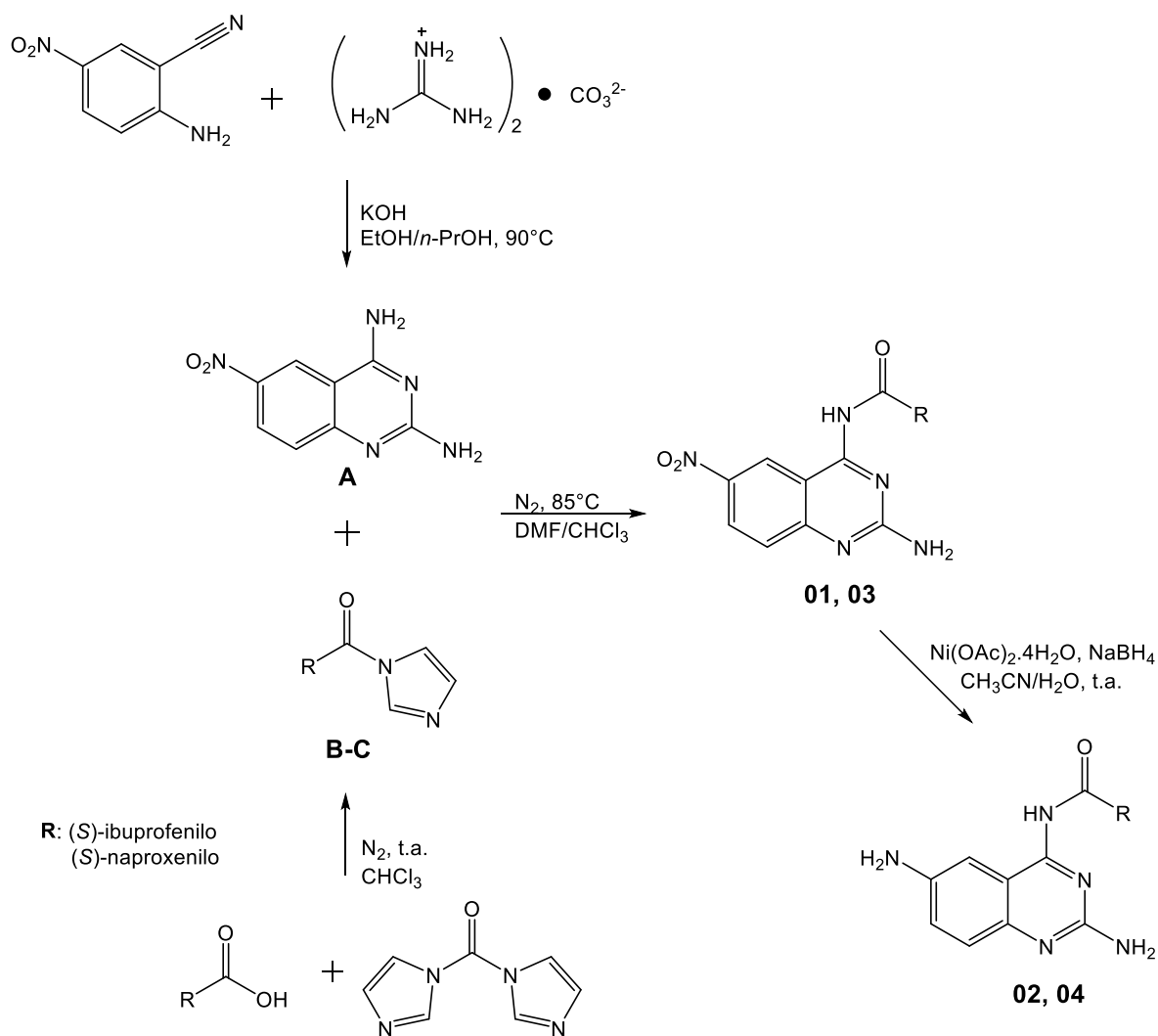


Metodología

Síntesis

Síntesis de la serie A

A continuación, se muestra en el **Esquema 1** el método seguido para sintetizar los compuestos **01–04**. Cada una de las reacciones será descrita de manera independiente. La caracterización estructural de los compuestos se presenta en el apartado de **Resultados y discusión**.



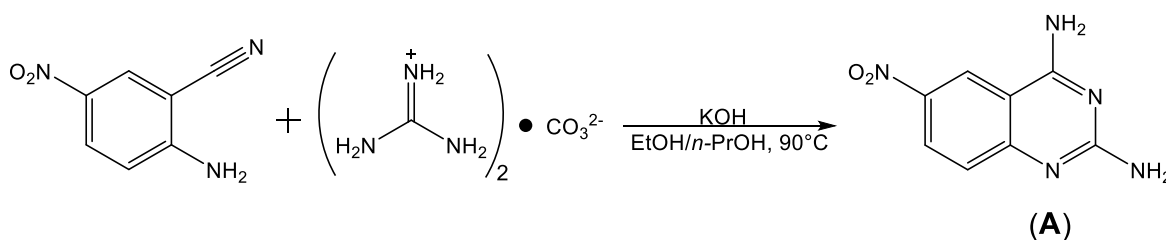
Esquema 1. Ruta sintética para la obtención de los compuestos de la serie A.



Síntesis del intermediario 2,4-diamino-6-nitroquinazolina (A)

En un matraz bola de 100 mL de una boca se colocaron 9.19 mmol de 2-amino-5-nitrobenzonitrilo y 6.89 mmol de carbonato de guanidina en 45 mL de una mezcla (1:2) EtOH/*n*-PrOH, la reacción se mantuvo en agitación constante durante 30 min. Posteriormente, se adicionaron 11.03 mmol de KOH al matraz y el sistema se colocó a reflujo, en agitación constante, a una temperatura de 90°C. Pasadas 10 h de reacción en calentamiento continuo, la suspensión se separó por filtración al vacío en caliente y se realizó una extracción sólido-líquido con una mezcla MeOH/H₂O (1:3) (5 x 20 mL c/u) hasta llegar a un pH=7 en el filtrado. El producto se secó al vacío durante 16 h.

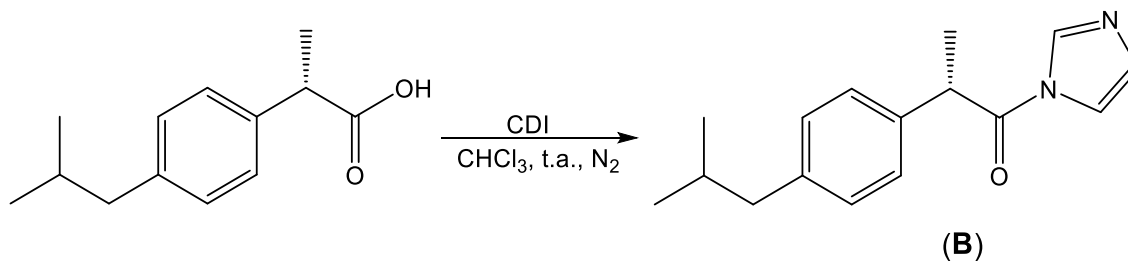
Se realizó una ccf y se eluyó en un sistema CHCl₃/MeOH (9:1) (1x, 254 nm), no se detectó la presencia de impurezas.



Esquema 2. Formación del intermediario **A**.

Síntesis de intermediario (S)-1-(1*H*-imidazol-1-il)-2-(4-isobutilfenil)propan-1-ona (B)

En un matraz bola de 100 mL de una boca secado previamente 2 h en la estufa, se adicionaron 2.42 mmol de (S)-ibuprofeno, 2.89 mmol de CDI y 5 mL de CHCl₃. El sistema se purgó y se colocó bajo atmósfera de N₂. La reacción se colocó en agitación constante a temperatura ambiente. Después de 1 h se realizó la ccf de la reacción en disolución y se eluyó en un sistema Hex/AcOEt (6:4) (1x, 254 nm). Al no observarse presencia de materia prima, se dio por terminada la reacción. El producto no fue aislado debido a su inestabilidad.



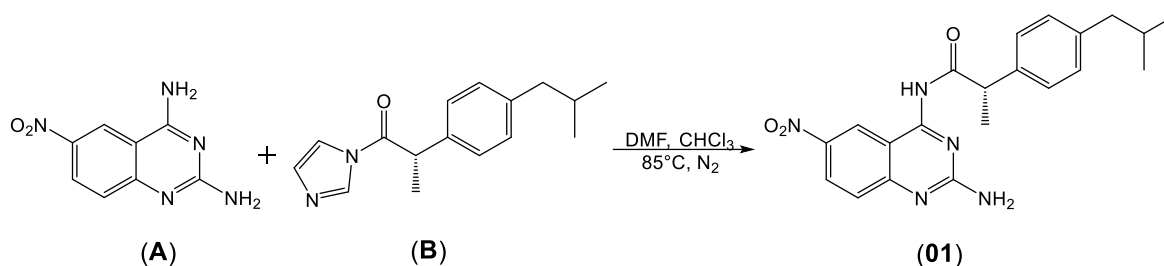
Esquema 3. Formación del intermediario **B**.



Síntesis del compuesto (S)-N-(2-amino-6-nitroquinazolin-4-il)-2-(4-isobutilfenil)propanamida (**01**)

En un matraz bola de 100 mL de una boca, donde ya se tenían disueltos 2.42 mmol del intermediario **B**, se añadieron 1.21 mmol del intermediario **A** disuelto en 20 mL de DMF, a continuación, se añadieron 20 mL más de DMF al matraz. Se adaptó un serpentín para reflujo, el sistema se purgó, la reacción se colocó en agitación constante, a temperatura de 85°C, bajo atmósfera de N₂. Pasadas 18 h en calentamiento continuo, el producto fue extraído con 50 mL de una disolución al 20% de HCl y CH₂Cl₂ sucesivamente como fase orgánica (4 x 20 mL c/u). La fase orgánica se trató con Na₂SO₄ anhidro y se concentró a presión reducida. El producto se precipitó con éter etílico anhidro y se filtró al vacío.

Se realizó la ccf del sólido y se eluyó en un sistema CHCl₃/MeOH (9:1) (1x, 254 nm). No se observó presencia de impurezas.

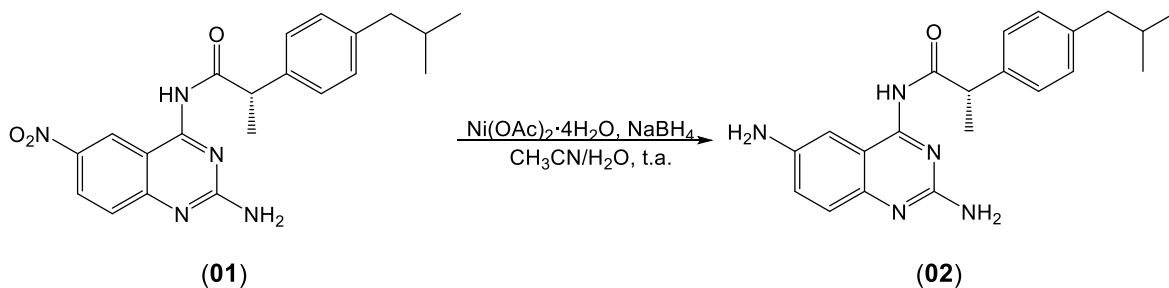


Esquema 4. Formación del compuesto **01**.

Síntesis del compuesto (S)-N-(2,6-diaminoquinazolin-4-il)-2-(4-isobutilfenil)propanamida (**02**)

Se añadieron 0.64 mmol del compuesto **01**, 0.12 mmol de Ni(OAc)₂·4H₂O y 3.3 mL de una mezcla (10:1) CH₃CN/H₂O en un matraz bola de 50 mL de una boca, la reacción se mantuvo en agitación constante durante 30 min. Al término de este tiempo, se añadieron 2.50 mmol de NaBH₄ y la reacción continuó por 30 min más, el color de la disolución se tornó negro. Al término de la reacción, el compuesto se extrajo con 20 mL de H₂O y AcOEt (5 x 6 mL c/u), posteriormente se realizó una filtración rápida sobre algodón para retirar los restos de sales de níquel.

La fase orgánica se trató con Na₂SO₄ anhidro y se concentró a presión reducida. Se realizó la ccf del sólido obtenido y se eluyó en un sistema CHCl₃/MeOH (7:3) (1x, 365 nm). No se observó presencia de subproductos con el compuesto de interés.

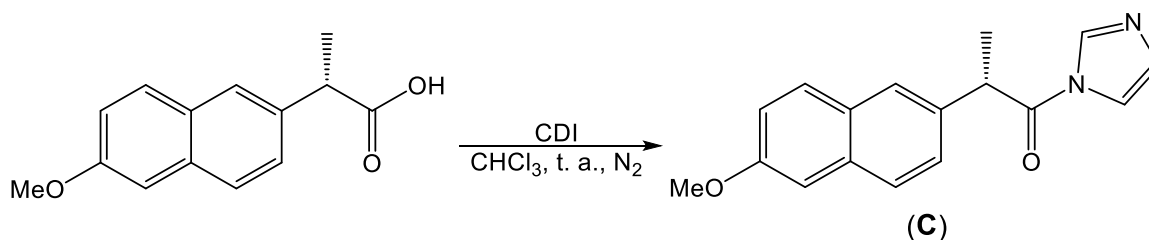


Esquema 5. Formación del compuesto **02**.

Síntesis del intermediario (*S*)-1-(1*H*-imidazol-1-il)-2-(6-metoxinaftalen-2-il)propan-1-ona (**C**)

Se colocaron 2.18 mmol de (*S*)-naproxeno y 2.83 mmol de CDI en un matraz bola de una boca previamente secado en la estufa durante 2 h. Se añadieron 5 mL de CHCl_3 y una barra de agitación magnética. El sistema se purgó y se colocó en agitación constante, a temperatura ambiente, bajo una atmósfera de N_2 .

Pasada 1.5 h se realizó la ccf comparando contra la materia prima, el sistema de elución utilizado fue Hex/AcOEt (6:4) (1x, 254 nm), al no observarse presencia de ésta se dio por finalizada la reacción. El producto no fue aislado debido a su inestabilidad.



Esquema 6. Formación del intermediario **C**.

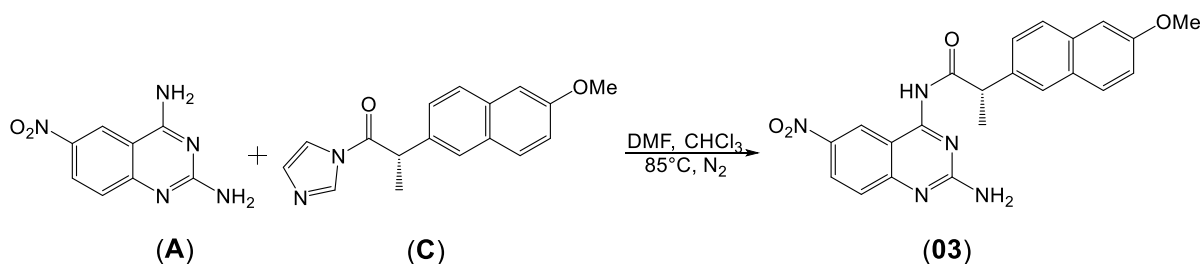
Síntesis del compuesto (*S*)-*N*-(2-amino-6-nitroquinazolin-4-il)-2-(6-metoxinaftalen-2-il)propanamida (**03**)

En un matraz bola de 100 mL de una boca, se disolvieron previamente 2.10 mmol del intermediario **C** en 5 mL de CHCl_3 , se añadieron 1.09 mmol del intermediario **A** disueltos en 20 mL de DMF, después se añadieron 20 mL más de DMF.

Se colocó un serpentín para reflujo en el sistema y fue purgado, la reacción se colocó bajo atmósfera de N_2 . El sistema se colocó a 85°C en agitación constante.



Después de 15 h de reacción, se realizó una extracción líquido-líquido con 50 mL de una disolución de HCl al 20% y CH₂Cl₂ (4 x 20 mL c/u). La fase orgánica se trató con Na₂SO₄ anhidro y se concentró a presión reducida. La precipitación del compuesto se realizó con éter etílico anhidro y se filtró al vacío para posteriormente realizar ccf del sólido comparándolo contra el intermediario **A**, el sistema de elución utilizado fue CHCl₃/MeOH (9:1) (1x, 254 nm). No se observó presencia de impurezas junto con el producto.



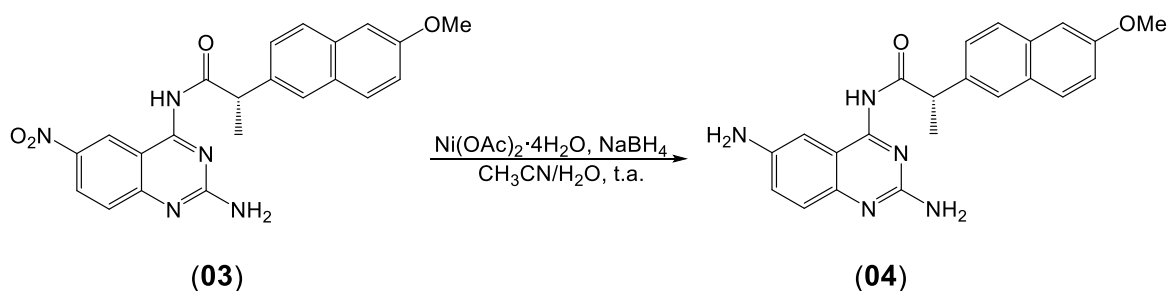
Esquema 7. Formación del compuesto **03**.

Síntesis de (*S*)-*N*-(2,6-diaminoquinazolin-4-il)-2-(6-metoxinaftalen-2-il)propanamida (**04**)

En un matraz bola de 50 mL de una boca se añadieron 0.60 mmol del compuesto **03**, 0.12 mmol de Ni(OAc)₂·4H₂O y 3.3 mL de una mezcla (10:1) CH₃CN/H₂O, la reacción permaneció en agitación constante durante 30 min. Pasado este tiempo, se adicionaron 2.40 mmol de NaBH₄ y la reacción continuó por 30 min más, el color en la disolución viró a negro.

El compuesto se extrajo con 20 mL H₂O y AcOEt (5 x 5 mL c/u). Se realizó una filtración rápida con algodón de la fase orgánica para retirar restos de sales de níquel, se trató con Na₂SO₄ anhidro y se concentró a presión reducida.

Se ejecutó la ccf del sólido obtenido, comparándolo contra el compuesto **03**. La cromatoplaça se eluyó en un sistema CHCl₃/MeOH (7:3) (1x, 365 nm). No se observó la presencia de impurezas con el producto.

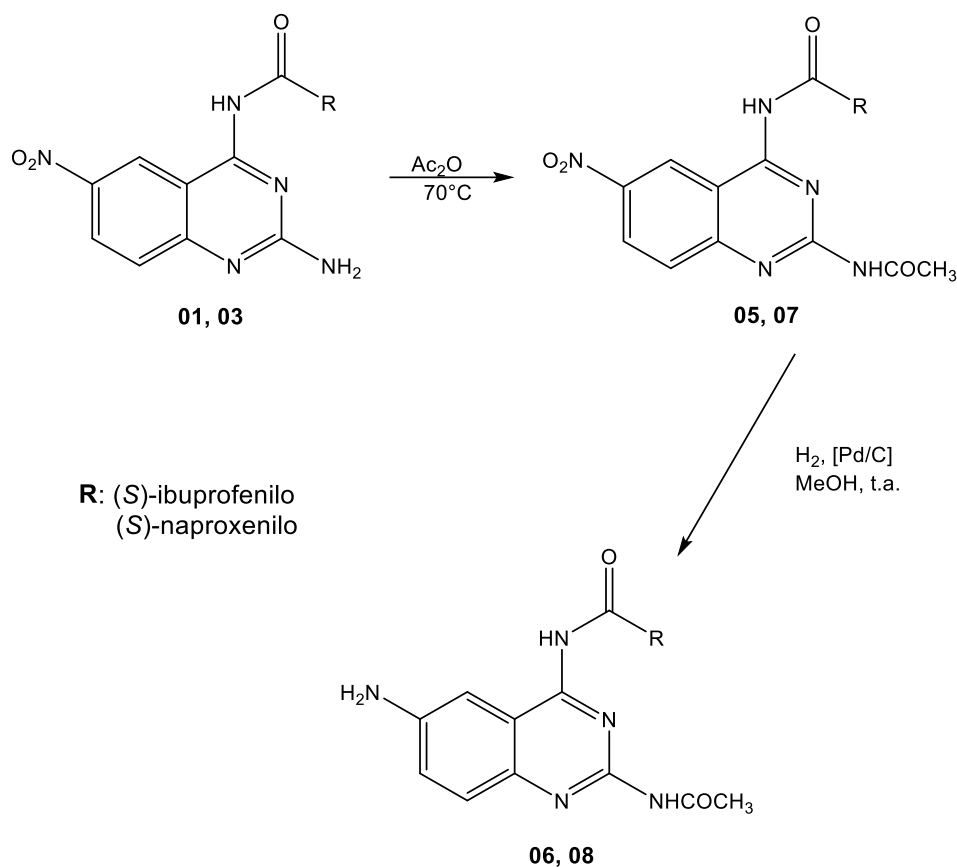


Esquema 8. Formación del compuesto **04**.



Síntesis de la serie B

En el **Esquema 9** se representa la síntesis seguida para la elaboración de los compuestos **05–08**. La metodología para cada reacción será descrita de manera independiente, la caracterización espectroscópica y espectrométrica está descrita en el apartado de **Resultados y discusión**.



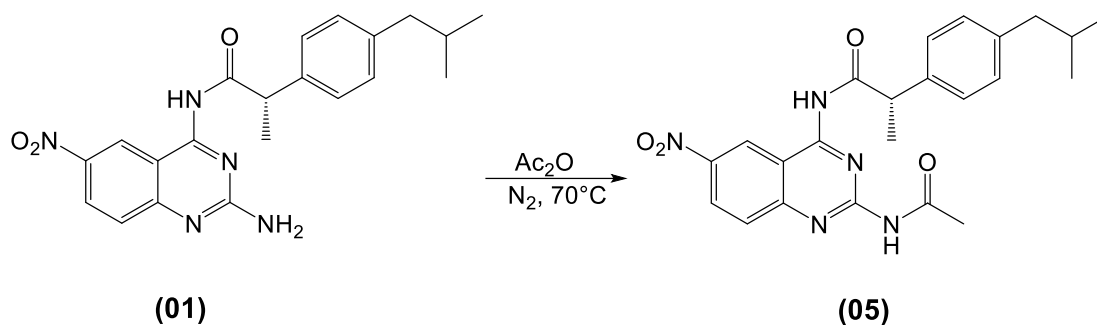
Esquema 9. Ruta sintética para la obtención de los compuestos de la serie B.

Síntesis de (S)-N-(2-acetamido-6-nitroquinazolin-4-il)-2-(4-isobutilfenil)propanamida (**05**)

Se colocaron 0.76 mmol del compuesto **01** y 3 mL de anhídrido acético en un matraz bola de 50 mL de una boca. El sistema fue purgado, se colocó bajo atmósfera de N_2 en agitación constante a temperatura de 70°C . Pasadas 36 h en calentamiento constante, se añadieron 5 mL de hexano y se mantuvo en agitación durante 20 min, se separó por decantación el ácido acético de la emulsión formada y esta última se vertió en éter etílico anhidro para obtener un sólido.



Al sólido formado se le hicieron extracciones sólido-líquido con éter etílico anhidro (4 x 5 mL c/u) y posteriormente se realizó ccf usando como sistema de elución $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1) (1x, 254 nm). No se observó que hubiera impurezas presentes con el producto.

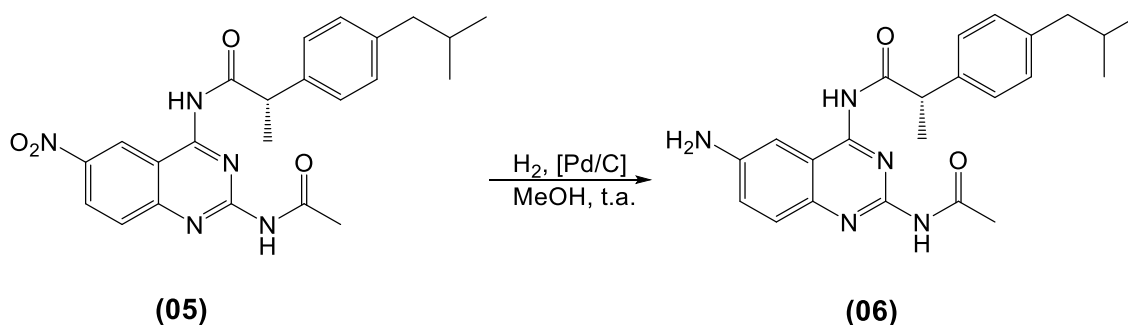


Esquema 10. Formación del compuesto **05**.

Síntesis del (S)-*N*-(2-acetamido-6-aminoquinazolin-4-il)-2-(4-isobutilfenil)propanamida (**06**)

Se colocaron 0.76 mmol del compuesto **05** y 0.030 g de Pd/C al 10% en un vaso de precipitados de 50 mL y se realizó una mezcla en sólido. La mezcla se trasvasó con ayuda de 10 mL de MeOH en un vaso Paar de 500 mL y se añadieron 30 mL más de MeOH para completar un volumen total de 40 mL. El frasco se colocó en un equipo de hidrogenación Paar a 60 lb/inch² de presión y 30 rpm en el reóstato. Pasados 15 minutos de reacción, la disolución se filtró al vacío sobre celita y la fase alcohólica se concentró a presión reducida.

Se indujo la precipitación del producto con éter etílico anhidro y se filtró al vacío. Se realizó ccf del sólido obtenido, el sistema de elución utilizado fue $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (7:3) (1x, 365 nm). No se observó presencia de impurezas en la reacción.



Esquema 11. Formación del compuesto **06**.

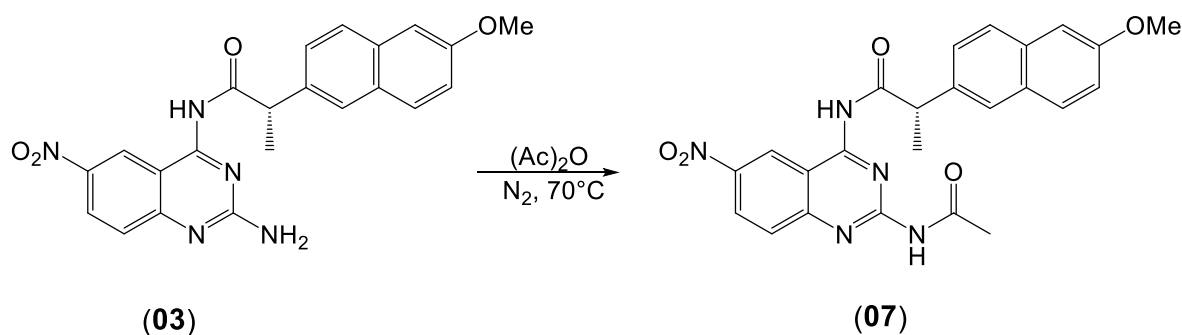


Síntesis de (S)-N-(2-acetamido-6-nitroquinazolin-4-il)-2-(6-metoxinaftalen-2-il)propanamida (**07**)

En un matraz bola de una boca se colocaron 0.72 mmol **03** y 3 mL de anhídrido acético. El sistema se purgó y se colocó bajo atmósfera de N₂. La reacción se colocó a 70°C en agitación constante.

Después de 48 h de calentamiento y agitación constantes, se dejó reposar la reacción hasta alcanzar la temperatura ambiente y se adicionaron 5 mL de hexano para seguir con la agitación por 15 min más. Se decantó el producto separando el ácido acético de la emulsión formada; esta última se vertió en éter etílico anhidro para inducir la precipitación del producto.

Se hicieron extracciones sucesivas sólido-líquido (4 x 5 mL c/u) con éter etílico al sólido formado y se le realizó ccf fina en un sistema de elución (CHCl₃/MeOH (9:1) (1x, 254 nm). No se observó presencia de impurezas en el producto.

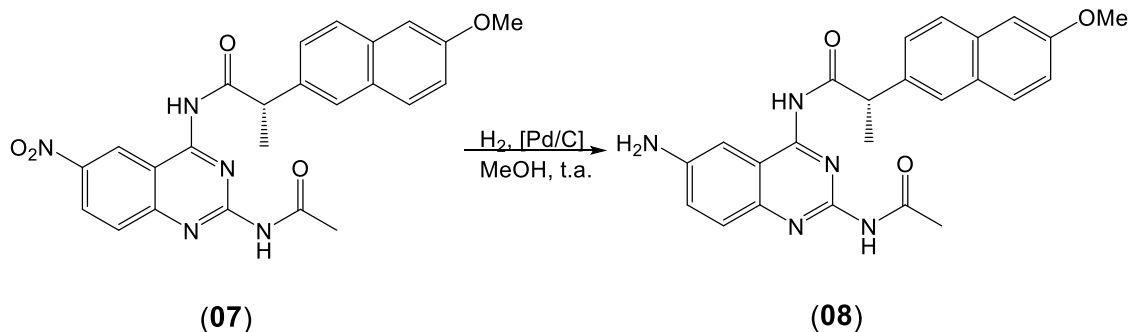


Esquema 12. Formación del compuesto **07**.

Síntesis de (S)-N-(2-acetamido-6-aminoquinazolin-4-il)-2-(6-metoxinaftalen-2-il)propanamida (**08**)

Se realizó la mezcla en sólido, de 0.44 mmol del compuesto **07** con 0.021 g de Pd/C al 10% en un vaso de precipitados de 50 mL. Se añadieron 10 mL de MeOH a la mezcla y se trasvasó a un frasco Paar de 500 mL, se colocaron 30 mL adicionales de MeOH y la reacción se instaló en el equipo de hidrogenación a una presión de 60 lb/inch² y 30 rpm en el reóstato. Después de 15 min de reacción, la disolución se filtró al vacío en celita y la fase alcohólica se concentró a presión reducida.

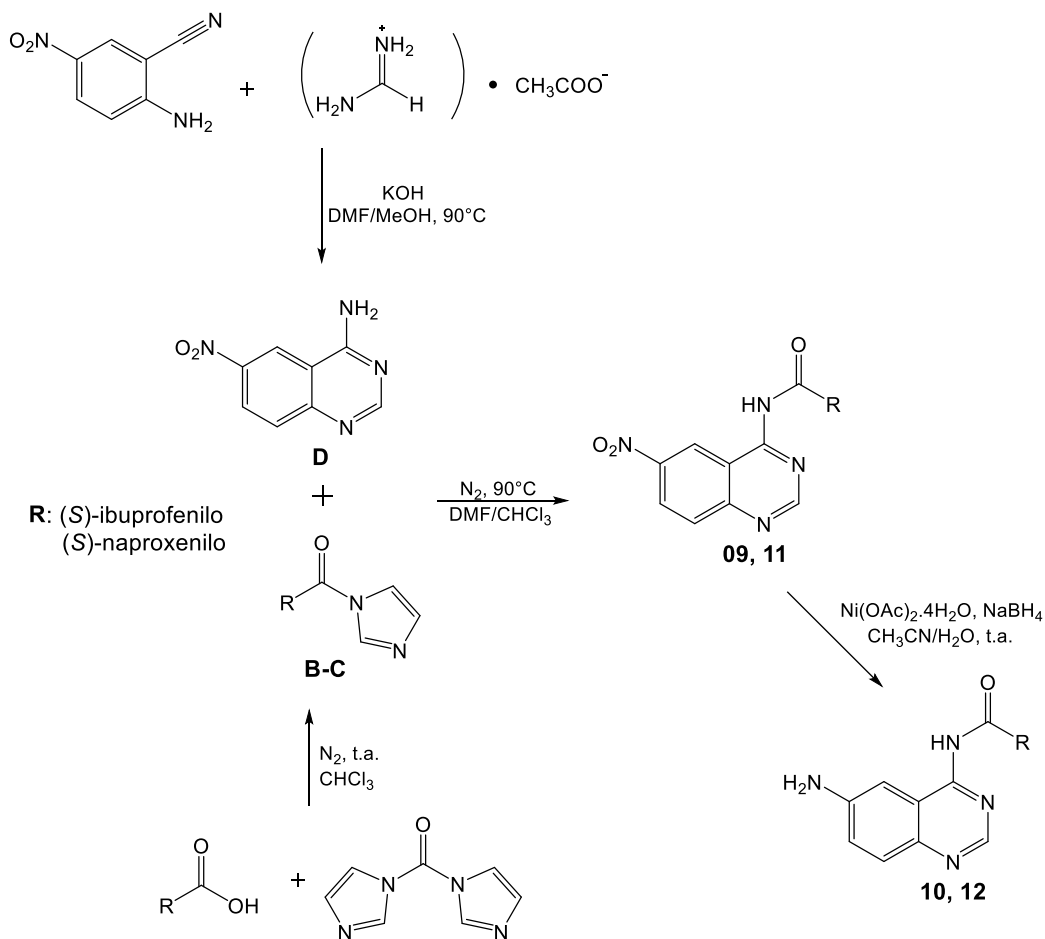
Para la obtención del sólido se indujo la precipitación del compuesto con éter etílico anhidro y se filtró al vacío. Posteriormente se realizó ccf en un sistema de elución CHCl₃/MeOH (7:3) (1x, 365 nm). No se observaron impurezas además del producto.



Esquema 13. Formación del compuesto 08.

Síntesis de la serie C

La ruta sintética seguida para la formación de los compuestos **09–12** se muestra en la **Esquema 14**, en donde la caracterización de cada uno de los compuestos se muestra en el apartado de **Resultados y análisis**.



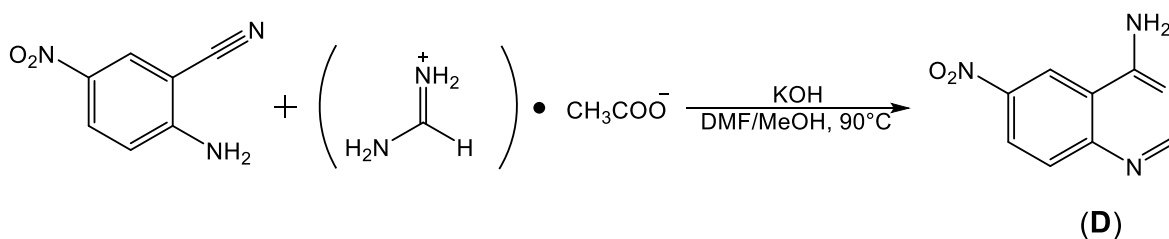
Esquema 14. Ruta sintética para la obtención de los compuestos de la serie C.



Síntesis del intermediario 4-amino-6-nitroquinazolina (**D**)

Se mezclaron 6.13 mmol de 2-amino-5-nitrobenzonitrilo, 7.36 mmol de acetato de formamidina y 7.36 mmol de KOH en 50 mL de una mezcla (4:1) DMF/MeOH. Al sistema se le adaptó una columna Vigreux y se colocó en agitación constante a una temperatura de 90°C. Después de 24 h de calentamiento continuó, la mezcla de reacción se vertió en una disolución saturada y fría de NaCl. El sólido se mantuvo precipitando durante 12 h y posteriormente se filtró al vacío.

La purificación del compuesto consistió en una extracción sólido-líquido con 30 mL de MeOH frío. Posteriormente se realizó ccf, eluyendo la cromatoplaaca en un sistema CHCl₃/MeOH (9:1) (1x, 254 nm). No se observó presencia de impurezas.

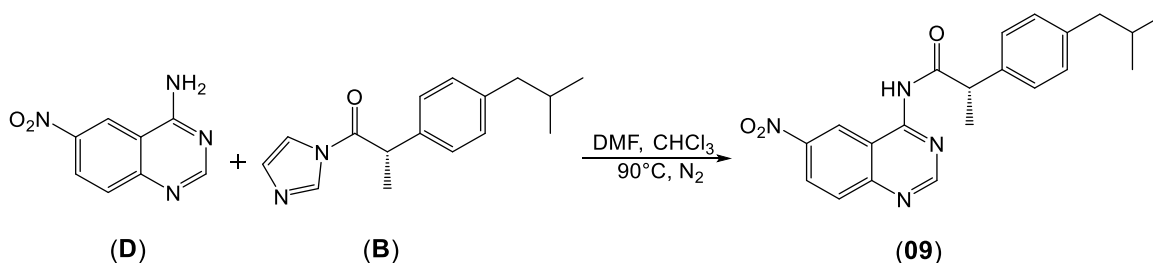


Esquema 15. Formación del intermediario **D**.

Síntesis de (S)-2-(4-isobutilfenil)-N-(6-nitroquinazolin-4-il)propanamida (**09**)

Se mezclaron 2.42 mmol del intermediario **B** previamente disueltos en 5 mL de CHCl₃ (la preparación ya fue descrita anteriormente) y 1.45 mmol del intermediario **D** disueltos en 10 mL de DMF, posteriormente se añadieron 15 mL más de DMF. Al matraz se le adecuó un serpentín para reflujo, se purgó, colocó bajo atmósfera de N₂, en agitación constante a una temperatura de 90°C. Pasadas 24 h de reacción, el compuesto se extrajo con 40 mL de una disolución al 10% de HCl y con éter etílico (3 x 10 mL c/u). La fase orgánica se trató con Na₂SO₄ anhidro y se concentró al vacío. Para inducir la precipitación del compuesto se utilizaron 10 mL de hexano.

Se realizó la ccf del sólido usando como fase móvil (CHCl₃/MeOH (9:1) (1x, 254 nm).



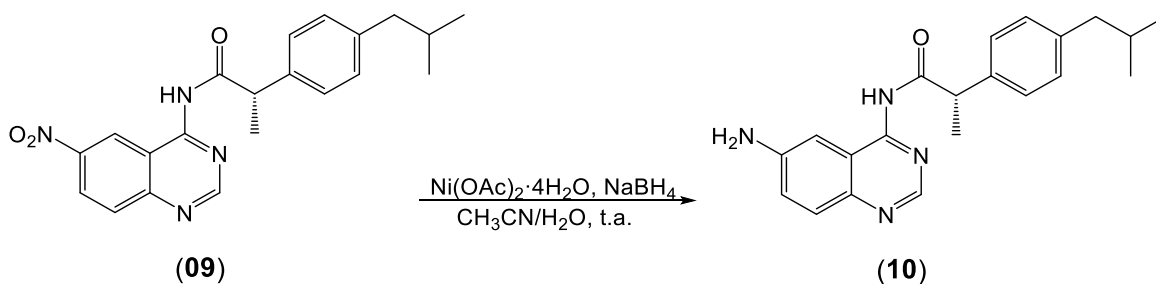
Esquema 16. Formación del compuesto **09**.



Síntesis de (S)-N-(6-aminoquinazolin-4-il)-2-(4-isobutilfenil) propanamida (**10**)

Se añadieron 0.53 mmol del compuesto **09**, 0.11 mmol de $\text{Ni}(\text{OAc})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y 4.4 mL de una mezcla (10:1) $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ a un matraz bola de 50 mL de una boca. La reacción se mantuvo en agitación constante durante 30 min. Al término de este tiempo, se añadieron 2.12 mmol de NaBH_4 y la reacción continuó por 30 min más, el color de la disolución se tornó negro.

Cuando terminó la reacción, el compuesto se extrajo con 25 mL de H_2O y AcOEt (4 x 5 mL c/u). Se ejecutó una filtración rápida sobre algodón. La fase orgánica se trató con Na_2SO_4 anhidro y se concentró a presión reducida. Se realizó ccf del sólido obtenido y se eluyó en un sistema $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (7:3) (1x, 365 nm). No se observó presencia de impurezas además del compuesto de interés.



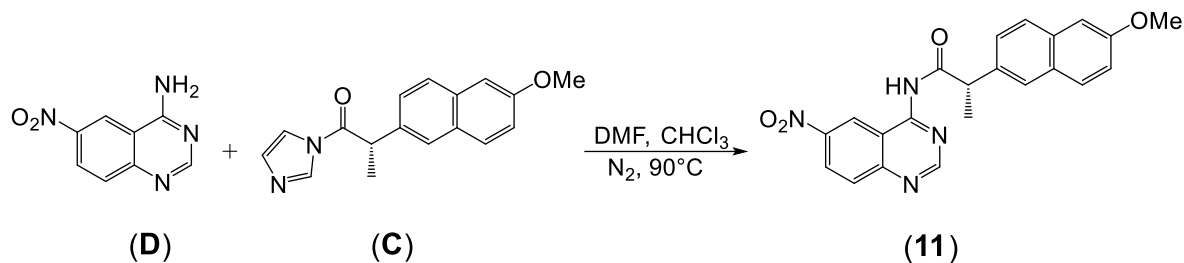
Esquema 17. Formación del compuesto **10**.

Síntesis de (S)-2-(6-metoxinaftalen-2-il)-N-(6-nitroquinazolin-4-il)propanamida (**11**)

En un matraz bola de 100 mL de una boca, se disolvieron previamente 2.18 mmol del intermediario **C** (la preparación ya fue descrita anteriormente) en 5 mL de CHCl_3 , se añadieron 1.31 mmol del intermediario **D** disueltos en 10 mL de DMF, después se añadieron 15 mL más de DMF y se colocó una barra de agitación magnética. Se adaptó un serpentín para reflujo en el sistema y fue purgado. La reacción se instaló bajo atmósfera de N_2 , a una temperatura de 90°C , en agitación constante.

Después de 28 h, se realizó una extracción líquido-líquido con 30 mL de una disolución de HCl al 10% y éter etílico (3 x 10 mL c/u). La fase orgánica se trató con Na_2SO_4 anhidro y se concentró a presión reducida.

La precipitación del compuesto se realizó con hexano y se filtró al vacío para posteriormente realizar ccf del sólido, comparándolo contra el intermediario **D**, el sistema de elución utilizado fue $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1) (1x, 254 nm). No se observó presencia de impurezas junto con el producto.

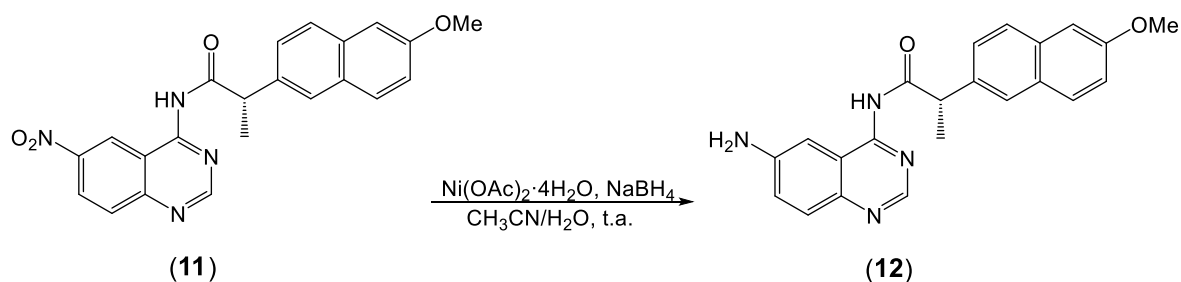


Esquema 18. Formación del compuesto **11**.

Síntesis de (S)-N-(6-aminoquinazolin-4-il)-2-(6-metoxinaftalen-2-il)propanamida (**12**)

En un matraz bola de 50 mL de una boca se añadieron 0.67 mmol del compuesto **11**, 0.13 mmol de $\text{Ni}(\text{OAc})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y 4.4 mL de una mezcla (10:1) $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, la reacción permaneció en agitación constante durante 30 min. Pasado este tiempo, se adicionaron 2.69 mmol de NaBH_4 y la reacción continuó por 35 min más. El compuesto se extrajo con 20 mL de H_2O y AcOEt (4 x 5 mL c/u). Se realizó una filtración rápida con algodón de la fase orgánica para retirar restos de sales de níquel, se trató con Na_2SO_4 anhidro y se concentró a presión reducida.

Se preparó ccf del sólido obtenido comparándolo contra el compuesto **11**. La cromatoplaqa se eluyó en un sistema $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (7:3) (1x, 365 nm). No se observó presencia de impurezas con el producto.



Esquema 19. Formación del compuesto **12**.



La lista de los compuestos finales que fueron evaluados biológicamente y estudiados con acoplamiento molecular se presentan en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Estructuras de los compuestos finales.

Serie A	Serie B	Serie C
01	05	09
02	06	10
03	07	11
04	08	12



Evaluación biológica

Los compuestos finales fueron evaluados en el laboratorio de pruebas biológicas LSA del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, a cargo de la M. en C. Teresa Ramírez Apan.

Los ensayos se realizaron de manera *in vitro* sobre 4 líneas celulares, dos líneas tumorales (PC-3, MCF-7) y dos líneas con fenotipo no tumoral (COS-7 y FGH), en tres etapas diferentes que se describen a continuación.

Primera etapa

La evaluación de los compuestos fue mediante el método de sulforrodamina B (SRB) sobre dos líneas cancerosas PC-3 (adenocarcinoma de próstata) y MCF-7 (adenocarcinoma de mama con receptor de estrógeno) a 25 μ M. Las sustancias fueron solubilizadas en DMSO para obtener una disolución stock con la que a partir de ésta se alcanzaría la concentración deseada con diluciones seriadas, llevando al aforo con agua.

Se utilizaron como controles positivos el tamoxifeno y el gefitinib. Cada ensayo se realizó por triplicado a una sola concentración. Las células se incubaron durante 48 h a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Al término de la incubación, se midió la densidad óptica en un lector de microplacas a una longitud de onda de 515 nm y se obtuvo el porcentaje de inhibición del crecimiento \pm EEM.

De este primer ensayo, se seleccionaron los compuestos que presentaron actividad biológica, aunque fuera moderada, para posteriormente evaluarlas en un segundo ensayo. Las 12 moléculas presentaron actividad biológica.

Segunda etapa

Todas las moléculas fueron evaluadas nuevamente de manera *in vitro* por el método de SRB, pero esta vez sobre una línea celular con fenotipo no tumoral COS-7 (riñón de mono) para así determinar qué tan tóxicas pueden ser en líneas sanas. La metodología utilizada es la misma descrita en la primera etapa, usando al tamoxifeno y el gefitinib como control positivo.

En este ensayo se seleccionaron las moléculas que resultaron con el mejor perfil citotóxico de la primera etapa y con un porcentaje menor al del gefitinib de la segunda etapa, por lo que las moléculas estudiadas en la tercera etapa fueron los derivados de la serie A.



Tercera etapa

Para la última etapa los 4 compuestos seleccionados fueron evaluados por el método de SRB (descrito en la primera etapa) de manera *in vitro* en otra línea celular con fenotipo no tumoral, FGH (fibroblastos gingivales humanos) y así determinar de nueva cuenta si las moléculas podrían no ser tóxicas en una línea celular de humano sana. El control positivo fue el tamoxifeno.

Acoplamiento molecular

Se realizó el estudio de acoplamiento molecular de los compuestos de las series A, B y C sobre dos dianas farmacológicas, COX-2 (PDB ID: 5F1A) y EGFR (PDB ID: 2GS7), con el fin de determinar una tendencia entre actividad biológica reportada y la magnitud de la afinidad calculada por el software; asimismo, observar las interacciones presentes entre las dianas y los derivados. Cabe señalar que, para comparar los resultados con fármacos en el mercado de actividad comprobada, se utilizó el gefitinib en el acoplamiento con EGFR y el (S)-ibuprofeno y (S)-naproxeno en el acoplamiento con la COX-2.

Validación

Con el fin de validar que el método utilizado es confiable y puede ser reproducible, se utilizó el software Maestro v.11 para calcular el valor de RMSD. Éste método solo se realizó para el EGFR, debido a que la COX-2 no contaba con ningún ligando en el Protein Data Bank. La proteína usada fue EGRF (PDB: 3UG2), puesto que el EGFR (PDB ID: 2GS7) se encuentra cocrystalizado con AMP, no con el gefitinib, que es el fármaco usado para comparar el valor de ΔG . Otra razón de no utilizar el EGFR (PDB ID: 2GS7) para la validación, es que el software, no admite ligandos con un número de enlaces rotables mayor a 10, en el caso del AMP se tienen 15.

Se utilizó la pose en formato PDB generada de AutoDockTools-1.5.6 y la proteína en formato PDB del Protein Data Bank sin ser tratada.

Ligando

La optimización de la geometría de los compuestos de las series A, B y C se realizó en Spartan Graphical User Interface v.10, utilizando un modelo semiempírico tipo PM6 y fueron guardados en formato MOL2, asignando cargas electrostáticas. Usando AutoDockTools-1.5.6, se detectó la raíz de la estructura y se identificaron y visualizaron los enlaces rotables; la estructura del ligando se guardó en formato PDBQT.



Proteína

Las proteínas fueron obtenidas de Protein Data Bank y guardadas en archivo PDB. Mediante Maestro v.11, se retiraron hidrógenos polares, iones, las moléculas cocrystalizadas, se colocó en un medio fisiológico de pH=7.4 y se asignaron cargas Gasteiger; los archivos se guardaron en formato PDBQT.

Molecular docking

Con el software AutoDockTools-1.5.6 se realizó el acoplamiento molecular y el establecimiento del grid entre las moléculas y las dianas. Se consideraron los enlaces rotables para de los ligandos y rígidos en las dianas. El tamaño del grid fue de 60x60x60 con un espacio de 0,375 Å. Se empleó la función de energía empírica libre y un Algoritmo Genético Lamarckiano con un tamaño de población de 150, un número máximo de evaluaciones de 2 500 000, número de corridas de 10 y con número de generaciones de 27 000.

Se eligió la energía libre de unión (ΔG) con el valor más bajo del clúster de mayor número de conformaciones y el archivo se guardó en formato PDBQT. Los resultados del acoplamiento se analizaron en PyMOL v.099 para observar las interacciones entre los ligandos y las dianas farmacológicas.

Todos los estudios del acoplamiento molecular se procesaron en una PC con sistema operativo Windows 8 y 4 Gb de memoria RAM.

Visualización en 2D

Para la visualización en 2D del acoplamiento molecular con cada proteína y ligando se utilizó la plataforma Protein Plus del NCSB: Protein Data Bank.

Se utilizó el archivo PDB generado en AutoDockTools-1.5.6 de la pose seleccionada para cada ligando, el cual fue convertido en formato SDF con ayuda del software OpenBabelGUI v.2.1.6. Para la proteína se utilizó el archivo PDB previamente preparado en Maestro v.11.



Resultados y análisis

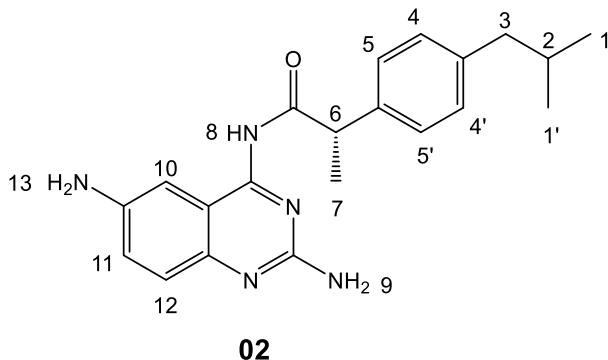
Síntesis

Caracterización

La caracterización física, y los datos obtenidos de IR, EM y RMN-¹H de los compuestos finales se presenta a continuación. Los espectros de NOESY para la serie A se muestra de manera independiente.

Tabla 3. Caracterización de los compuestos finales. Fase móvil en la determinación del R_f CHCl₃/MeOH (7:3) 1x.

Compuesto	Caracterización
<p style="text-align: center;">01</p>	<p>Sólido amarillo paja Rendimiento=72% P.f.=178-180 °C R_f=0.73 IR-ATR (cm⁻¹): 3424, 3268, 3133 y 1502 (N-H), 1678 (C=O), 1619 y 1463 (C=C_{arom}), 1571 (C=N), 1414 (CH₃), 1330 y 1282 (C-NO₂), 730 (CH₂). EM-DART (m/z): M [H⁺] = 394 RMN-¹H (400 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 0.83 [(H_{1-1'}) (d, J = 8.8Hz, 6H)], 1.37 [(H₇) (d, J = 9.28Hz, 3H)], 1.75 [(H₂) (m, J = 9.0Hz, 1H)], 2.39 [(H₃) (d, J = 9.48Hz, 2H)], 4.24 [(H₆) (dd, J = 8.92Hz, 9.36Hz, 1H)], 7.10 [(H_{4-4'}) (d, J = 10.68Hz, 2H)], 7.30 [(H_{5-5'}) (d, J = 10.72Hz, 2H)], 7.58 [(H₁₂) (d, J = 12.32Hz, 1H)], 8.09 [(H₉) (sa, 2H)], 8.38 [(H₁₁) (dd, J = 3.1Hz, 3.24Hz, 1H)], 9.24 [(H₁₀) (d, J = 3.32Hz, 1H)], 10.29 [(H₈) (s, 1H)]. RMN-¹³C (400 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 129.19 [(C-N_{amida})]</p>



Sólido amarillo intenso

Rendimiento=90%

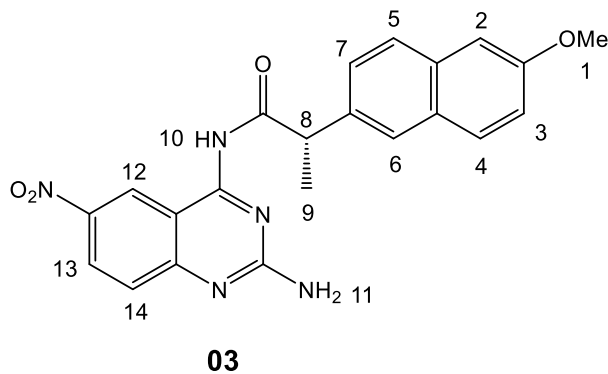
P.f.= 143-146 °C

R_f=0.58

IR-ATR (cm⁻¹): 3431, 3210, 2953 y 1519 (N-H), 1633 (C=O), 1519 y 830 (C=C_{arom}), 1585 (C=N), 1421 (CH₃), 725 (CH₂).

EM-DART (m/z): M [H⁺] = 364

RMN-¹H (400 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 0.84 [(H_{1-1'}) (d, J = 6.64Hz, 6H)], 1.35 [(H₇) (d, J = 7.0Hz, 3H)], 1.79 [(H₂) (m, J = 6.72, 1H)], 2.39 [(H₃) (d, J = 7.12Hz, 2H)], 4.11 [(H₆) (sa, 1H)], 5.21 [(H₁₃) (s, 2H)], 7.29 [(H_{5-5'}) (d, J = 7.92Hz, 2H)], 7.08 [(H_{4-4'}) (d, J = 8.16Hz, 2H)], 7.09 [(H₁₁) (d, J = 2.42Hz, 1H)], 7.26 [(H₁) (dd, J = 7.88Hz, 1H)], 7.27 [(H₁₀) (d, J = 7.56Hz, 1H)], 9.77 [(H₈) (s, 1H)].
RMN-¹³C (400 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 125.15 [(C-N_{amida})]



Sólido amarillo paja

Rendimiento=67%

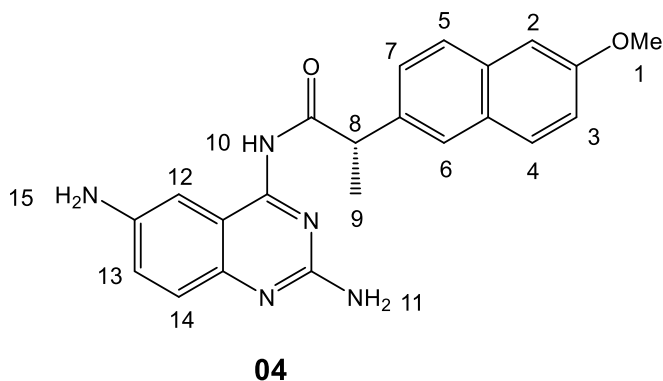
P.f.=187-188 °C

R_f=0.78

IR-ATR (cm⁻¹): 3467, 3251, 3133 y 1503 (N-H), 1671 (C=O), 1617 y 1466 (C=C_{arom}), 1571 (C=N), 1430 (CH₃), 1325 y 1289 (C-NO₂), 1289 (C-O).

EM-DART (m/z): M [H⁺] = 418

RMN-¹H (400 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 1.46 [(H₉) (d, J = 7.0Hz, 3H)], 3.34 [(H₁) (s, 3H)], 4.43 [(H₈) (d, J = 6.56Hz, 1H)], 7.13 [(H₃) (dd, J = 2.56Hz, 2.56Hz, 1H)], 7.26 [(H₂) (d, J = 2.44, 1H)], 7.52 [(H₇) (dd, J = 1.72Hz, 1.68Hz, 1H)], 7.58 [(H₁₄) (d, J = 9.28Hz, 1H)], 7.74 [(H₄) (d, J = 8.84Hz, 1H)], 7.77 [(H₅) (d, J = 3.88Hz, 1H)], 7.80 [(H₆) (d, J = 4.4Hz, 1H)], 8.07 [(H₁₁) (s, 2H)], 8.38 [(H₁₃) (dd, J = 2.52Hz, 5.00Hz 1H)], 9.25 [(H₁₂) (d, J = 2.52Hz, 1H)], 10.36 [(H₁₀) (s, 1H)].
RMN-¹³C (400 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 127.31 [(C-N_{amida})]



Sólido amarillo intenso

Rendimiento=92%

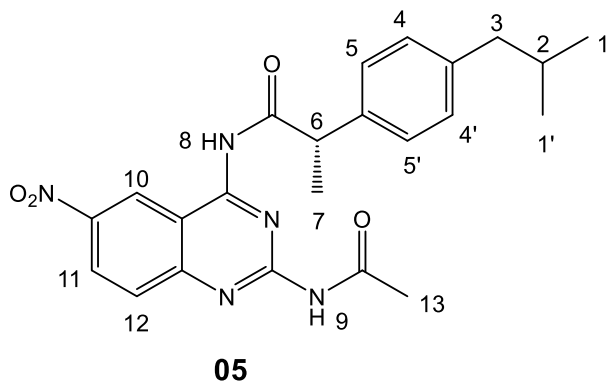
P.f.=155-157 °C

R_f=0.48

IR- ATR (cm⁻¹): 3332, 3210, 2970 y 1502 (N-H), 1631 (C=O), 1603 y 1447 (C=C_{arom}), 1583 (C=N), 1385 (CH₃), 1295 (C-O).

EM-DART (m/z): M [H⁺] = 388

RMN-¹H (400 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 1.45 [(H₉) (d, J = 7.0Hz, 3H)], 3.36 [(H₁) (s, 3H)], 4.28 [(H₈) (sa, 1H)], 5.21 [(H₁₅) (s, 1H)], 7.03 [(H₂) (d, J = 2.36Hz, 1H)], 7.04 [(H₁₃) (dd, J = 2.4Hz, 2.56Hz, 1H)], 7.11 [(H₃) (dd, J = 2.48Hz, 2.64Hz, 1H)], 7.14 [(H₁₂) (d, J = 2.56Hz, 1H)], 7.52 [(H₇) (d, J = 1.64Hz, 1H)], 7.58 [(H₁₄) (d, J = 1.56Hz, 1H)], 7.24 [(H₄) (d, J = 8.88Hz, 1H)], 7.77 [(H₅) (d, J = 9.0Hz, 1H)], 7.80 [(H₆) (d, J = 10.84Hz, 1H)], 9.81 [(H₁₀) (s, 1H)].
RMN-¹³C (400 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 126.97 [(C-N_{amida})]



Sólido crema

Rendimiento=76%

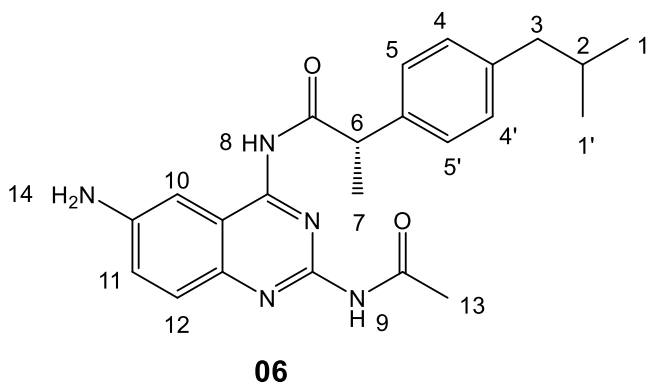
P.f.=134-137 °C

R_f=0.67

IR-ATR (cm⁻¹): 3422, 3266, 3104 y 1512 (N-H), 1679 (C=O), 1619 y 1463 (C=C_{arom}), 1575 (C=N), 1417 (CH₃), 1338 y 1290 (C-NO₂), 746 (CH₂).

EM-APCI (m/z): M [H⁺] = 416

RMN-¹H (400 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 01.55 [(H_{1-1'}) (d, J = 7.12 6H)], 2.12 [(H₇) (d, J = 8.2Hz, 3H)], 1.75 [(H₂) (m, J = 3.43Hz, 1H)], 2.39 [(H₃) (d, J = 7.56Hz, 2H)], 4.24 [(H₆) (dd, J = 2.54Hz, 2.57Hz, 1H)], 7.30 [(H_{5-5'}) (d, J = 8.3Hz, 2H)], 7.10 [(H_{4-4'}) (d, J = 8.8Hz, 2H)], 7.58 [(H₁₂) (d, J = 8.5Hz, 1H)], 8.09 [(H₉) (sa, 2H)], 8.38 [(H₁₁) (dd, J = 10.53Hz, 3.4Hz, 1H)], 9.24 [(H₁₀) (d, J = 4.1Hz, 1H)], 10.29 [(H₈) (s, 1H)].



Sólido amarillo verdoso

Rendimiento=85%

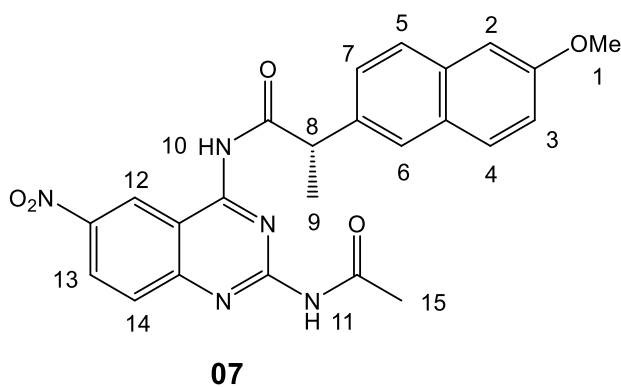
P.f.=122-125 °C

R_f=0.45

IR-ATR (cm⁻¹): 3424, 3268, 3133 y 1502 (N-H), 1678 (C=O), 1619 y 1463 (C=C_{arom}), 1571 (C=N), 1414 (CH₃), 1330 y 1282 (C-NO₂), 730 (CH₂).

EM-APCI (m/z): M [H⁺] = 406

RMN-¹H (400 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 0.83 [(H_{1-1'}) (d, J = 7.9Hz 6H)], 1.37 [(H₇) (d, J = 6.5Hz 3H)], 1.75 [(H₂) (m, J = 7.9Hz, 1H)], 2.39 [(H₃) (d, J = 5.4Hz, 2H)], 4.24 [(H₆) (dd, J = 2.45Hz, 2.70Hz, 1H)], 7.30 [(H_{5-5'}) (d, J = 8.3Hz, 2H)], 7.10 [(H_{4-4'}) (d, J = 8.8Hz, 2H)], 7.58 [(H₁₂) (d, J = 8.5Hz, 1H)], 8.09 [(H₉) (sa, 2H)], 8.38 [(H₁₁) (dd, J = 1.43Hz, 1.55Hz, 1H)], 9.24 [(H₁₀) (d, J = 4.1Hz, 1H)], 10.29 [(H₈) (s, 1H)].



Sólido crema

Rendimiento=50%

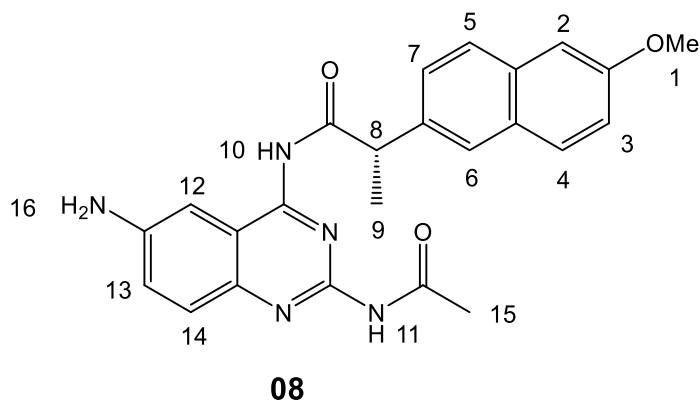
P.f.=124-126 °C

R_f=0.70

IR-ATR (cm⁻¹): 3467, 3251, 3133 y 1503 (N-H), 1671 (C=O), 1617 y 1466 (C=C_{arom}), 1571 (C=N), 1430 (CH₃), 1325 y 1289 (C-NO₂), 1289 (C-O).

EM-APCI (m/z): M [H⁺] = 460

RMN-¹H (400 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 1.46 [(H₉) (d, J = 7.23Hz, 3H)], 3.34 [(H₁) (s, 3H)], 4.43 [(H₈) (dd, J = 6.5Hz, 6.80Hz, 1H)], 7.13 [(H₃) (dd, J = 8.2Hz, 7.9Hz, 1H)], 7.26 [(H₂) (d, J = 3.9Hz, 1H)], 7.52 [(H₇) (dd, J = 6.3Hz, 5.95Hz, 1H)], 7.58 [(H₁₄) (d, J = 8.5Hz, 1H)], 7.74 [(H₄) (d, J = 8.7Hz, 1H)], 7.77 [(H₅) (d, J = 8.4Hz, 1H)], 7.80 [(H₆) (d, J = 4.4Hz, 1H)], 8.07 [(H₁₁) (s, 2H)], 8.38 [(H₁₃) (dd, J = 8.7Hz, 8.67Hz, 1H)], 9.25 [(H₁₂) (d, J = 4.2Hz, 1H)], 10.36 [(H₁₀) (s, 1H)].



Sólido amarillo verdoso

Rendimiento=85%

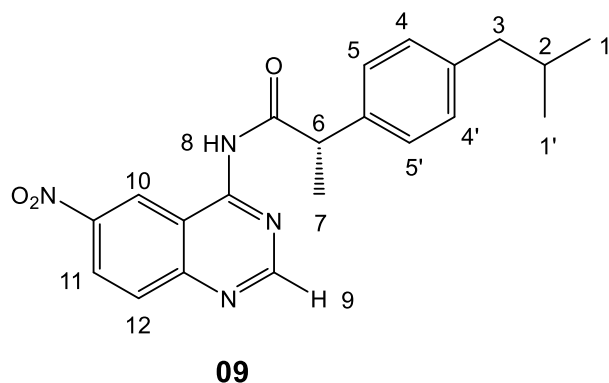
P.f.=115-119 °C

R_f=0.59

IR- ATR (cm⁻¹): 3332, 3210, 2970 y 1502 (N-H), 1631 (C=O), 1603 y 1447 (C=C_{arom}), 1583 (C=N), 1385 (CH₃), 1295 (C-O).

EM-APCI (m/z): M [H⁺] = 430

RMN-¹H (400 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 1.45 [(H₉) (d, J = 7.23Hz, 3H)], 3.36 [(H₁) (s, 3H)], 4.28 [(H₈) (dd, J = 7.23Hz, 7.15Hz, 1H)], 5.21 [(H₁₅) (s, 1H)], 7.03 [(H₂) (d, J = 3.9Hz, 1H)], 7.04 [(H₁₃) (dd, J = 2.19Hz, 2.23Hz, 1H)], 7.11 [(H₃) (dd, J = 8.2Hz, 8.33Hz, 1H)], 7.14 [(H₁₂) (d, J = 4.2Hz, 1H)], 7.52 [(H₇) (dd, J = 6.3Hz, 6.50Hz, 1H)], 7.58 [(H₁₄) (d, J = 8.5Hz, 1H)], 7.24 [(H₄) (d, J = 8.7Hz, 1H)], 7.77 [(H₅) (d, J = 8.4Hz, 1H)], 7.80 [(H₆) (d, J = 4.4Hz, 1H)], 8.07 [(H₁₁) (s, 2H)], 9.81 [(H₁₀) (s, 1H)].



Sólido naranja pálido

Rendimiento=85%

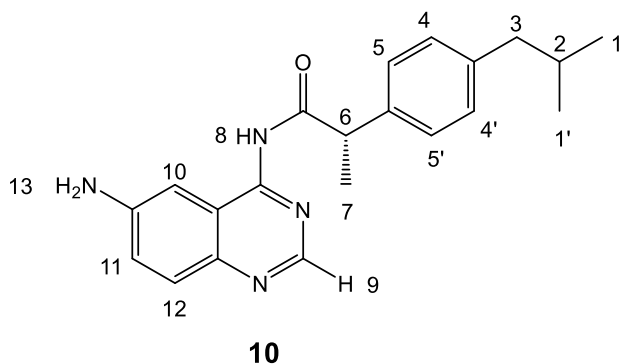
P.f.=145-148 °C

R_f=0.72

IR-ATR (cm⁻¹): 3424, 3268, 3133 y 1502 (N-H), 1678 (C=O), 1619 y 1463 (C=C_{arom}), 1571 (C=N), 1414 (CH₃), 1330 y 1282 (C-NO₂), 730 (CH₂).

EM-APCI (m/z): M [H⁺] = 379

RMN-¹H (400 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 0.83 [(H_{1-1'}) (d, J = 6.9Hz, 6H)], 1.37 [(H₇) (d, J = 7.23Hz, 3H)], 1.75 [(H₂) (m, 1H)], 2.39 [(H₃) (d, J = 2.24Hz, 2H)], 4.24 [(H₆) (dd, J = 2.67Hz, 2.80Hz, 1H)], 7.30 [(H_{5-5'}) (d, J = 8.3Hz, 2H)], 7.10 [(H_{4-4'}) (d, J = 8.8Hz, 2H)], 7.58 [(H₁₂) (d, J = 8.5Hz, 1H)], 8.09 [(H₉) (sa, 2H)], 8.38 [(H₁₁) (dd, J = 10.72Hz, 10.81Hz, 1H)], 9.24 [(H₁₀) (d, J = 4.1Hz, 1H)], 10.29 [(H₈) (s, 1H)].



Sólido verde oscuro

Rendimiento=92%

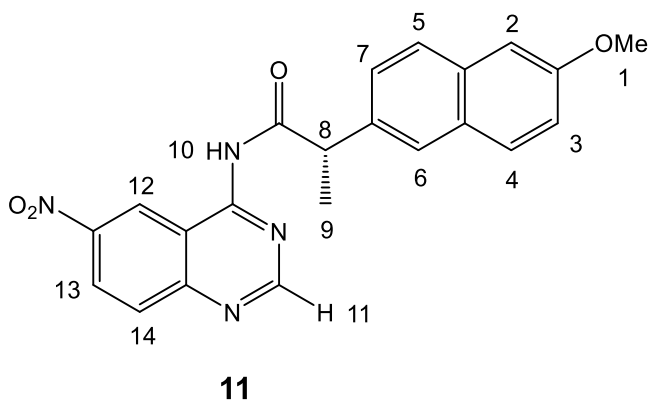
P.f.= 123-125 °C

R_f=0.43

IR-ATR (cm⁻¹): 3431, 3210, 2953 y 1519 (N-H), 1633 (C=O), 1519 y 830 (C=Carom), 1585 (C=N), 1421 (CH₃), 725 (CH₂).

EM-APCI (m/z): M [H⁺] = 349

RMN-¹H (400 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 0.84 [(H_{1-1'}) (d, J = 6.78Hz, 6H)], 1.35 [(H₇) (d, J = 8.2Hz, 3H)], 1.79 [(H₂) (m, J = 1.78Hz, 1H)], 2.39 [(H₃) (d, J = 7.78Hz, 2H)], 4.11 [(H₆) (dd, J = 2.14Hz, 2.20Hz, 1H)], 5.21 [(H₁₃) (s, 2H)], 7.29 [(H_{5-5'}) (d, J = 8.7Hz, 2H)], 7.08 [(H_{4-4'}) (d, J = 8.5Hz, 2H)], 7.09 [(H₁₁) (d, J = 8.1Hz, 1H)], 7.26 [(H₁) (dd, J = 8.50Hz, 8.51Hz, 1H)], 7.27 [(H₁₀) (d, J = 4.1Hz, 1H)], 9.77 [(H₈) (s, 1H)].



Sólido naranja

Rendimiento=85%

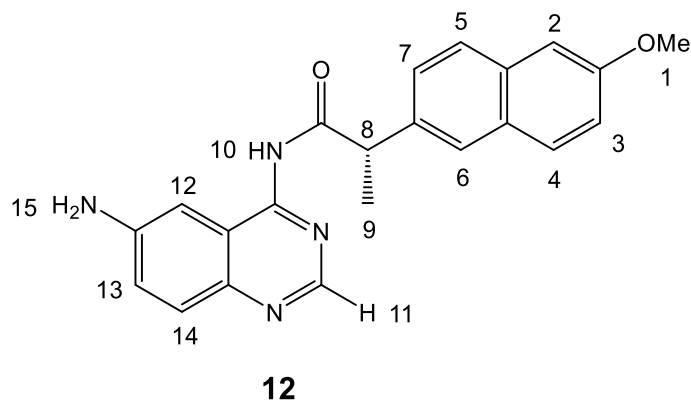
P.f.=117-119 °C

R_f=0.73

IR-ATR (cm⁻¹): 3467, 3251, 3133 y 1503 (N-H), 1671 (C=O), 1617 y 1466 (C=Carom), 1571 (C=N), 1430 (CH₃), 1325 y 1289 (C-NO₂), 1289 (C-O).

EM-APCI (m/z): M [H⁺] = 403

RMN-¹H (400 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 1.46 [(H₉) (d, J = 7.59Hz, 3H)], 3.34 [(H₁) (s, 3H)], 4.43 [(H₈) (dd, J = 2.45Hz, 2.47Hz, 1H)], 7.13 [(H₃) (dd, J = 1.89Hz, 1.92Hz, 1H)], 7.26 [(H₂) (d, J = 3.9Hz, 1H)], 7.52 [(H₇) (dd, J = 6.3Hz, 6.27Hz, 1H)], 7.58 [(H₁₄) (d, J = 8.5Hz, 1H)], 7.74 [(H₄) (d, J = 8.7Hz, 1H)], 7.77 [(H₅) (d, J = 8.4Hz, 1H)], 7.80 [(H₆) (d, J = 4.4Hz, 1H)], 8.07 [(H₁₁) (s, 2H)], 8.38 [(H₁₃) (dd, J = 8.7Hz, 8.57Hz, 1H)], 9.25 [(H₁₂) (d, J = 4.2Hz, 1H)], 10.36 [(H₁₀) (s, 1H)].



Sólido verdoso

Rendimiento=95%

P.f.=100-101 °C

R_f=0.52

IR- ATR (cm⁻¹): 3332, 3210, 2970 y 1502 (N-H), 1631 (C=O), 1603 y 1447 (C=C_{arom}), 1583 (C=N), 1385 (CH₃), 1295 (C-O).

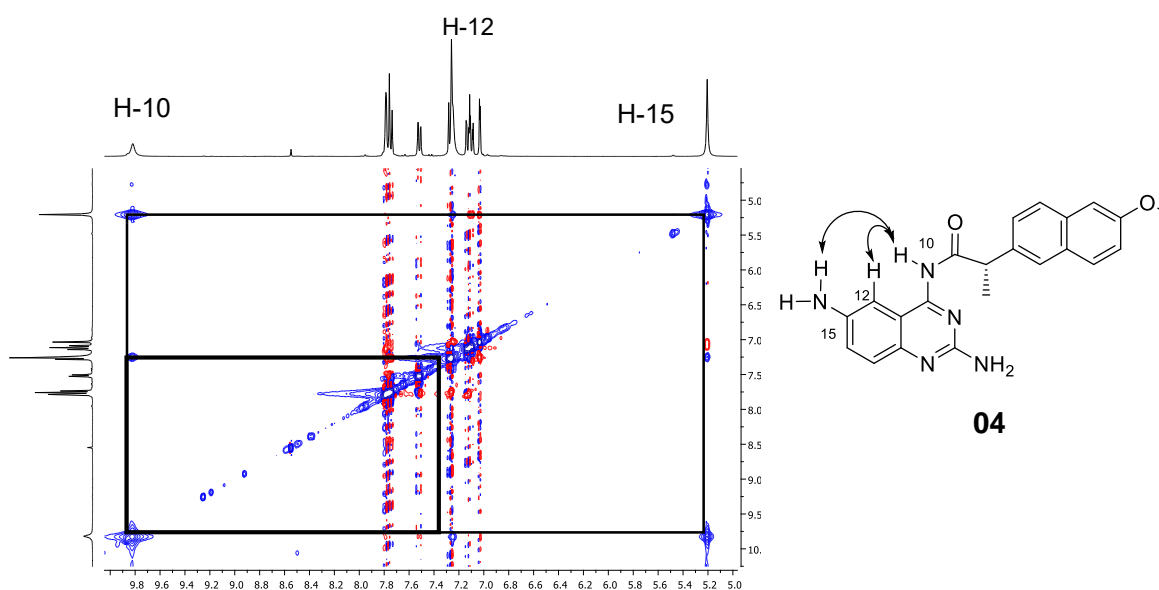
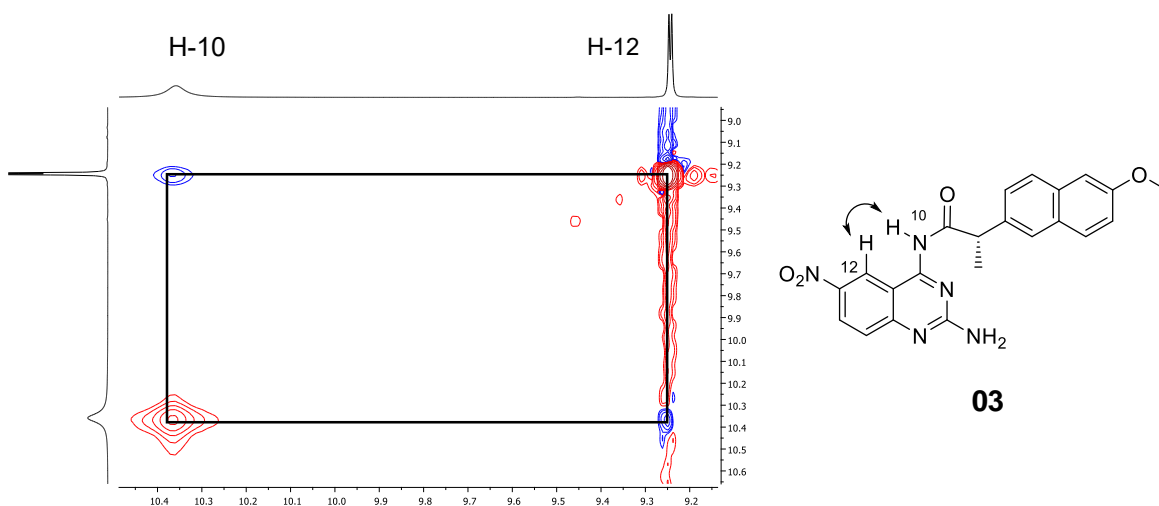
EM-APCI (m/z): M [H⁺] = 377

RMN-¹H (400 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 1.45 [(H₉) (d, J = 6.89Hz, 3H)], 3.36 [(H₁) (s, 3H)], 4.28 [(H₈) (dd, J = 7.54Hz, 7.44Hz, 1H)], 5.21 [(H₁₅) (s, 1H)], 7.03 [(H₂) (d, J = 3.9Hz, 1H)], 7.04 [(H₁₃) (dd, J = 8.7Hz, 8.56Hz, 1H)], 7.11 [(H₃) (dd, J = 2.87Hz, 2.77Hz, 1H)], 7.14 [(H₁₂) (d, J = 4.2Hz, 1H)], 7.52 [(H₇) (dd, J = 6.3Hz, 6.38Hz, 1H)], 7.58 [(H₁₄) (d, J = 8.5Hz, 1H)], 7.24 [(H₄) (d, J = 8.7Hz, 1H)], 7.77 [(H₅) (d, J = 8.4Hz, 1H)], 7.80 [(H₆) (d, J = 4.4Hz, 1H)], 8.07 [(H₁₁) (s, 2H)], 9.81 [(H₁₀) (s, 1H)].



Los espectros NOESY fueron obtenidos para determinar la posición en la que se formó el enlace la amida de la serie A, entre el intermediario **A** con los AINE's, ya que como se observa en la estructura del intermediario podría formarse en la posición 2 y/o 4 de la quinazolina.

En los compuestos nitrados, se observa la interacción del protón en el anillo de quinazolina 10 y 12 en los compuestos **01** y **03**, respectivamente, con el protón de la amida en posición 4 de la quinazolina. Otra señal confirmatoria es la interacción que se presenta entre los hidrógenos de la amina en posición 6 de la quinazolina con el protón de la amida de los compuestos **02** y **04**, aunque también se observa la interacción descrita para los compuestos nitrados. A manera de ejemplo se colocaron los espectros de NOESY de **03** y **04**, donde se observan las interacciones descritas.





Parte química

Para la formación de los intermediarios **A** y **D** se utilizó una variación de la reacción de Niementowski, usando guanidina para la síntesis de la quinazolina correspondiente a la serie A y B; mientras que para la síntesis de la serie C, se usó como equivalente sintético la formamidina. El análisis retrosintético se muestra en la **Figura 9**.

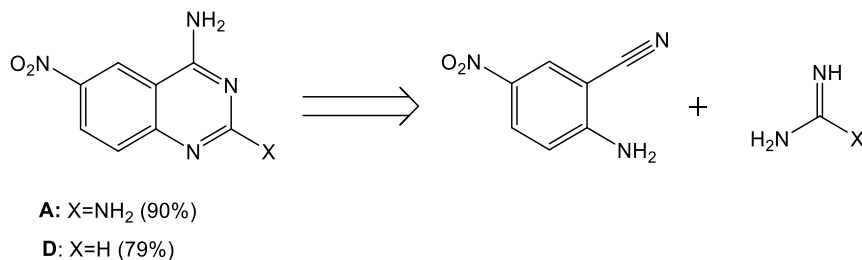
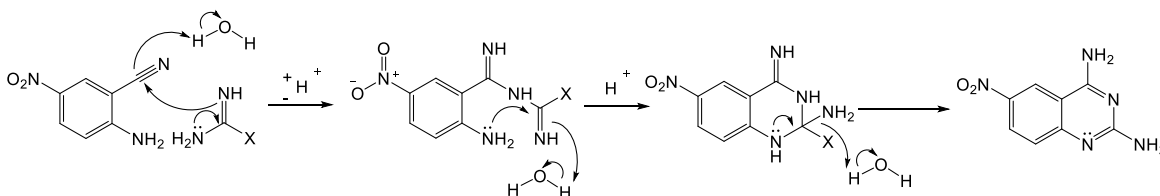


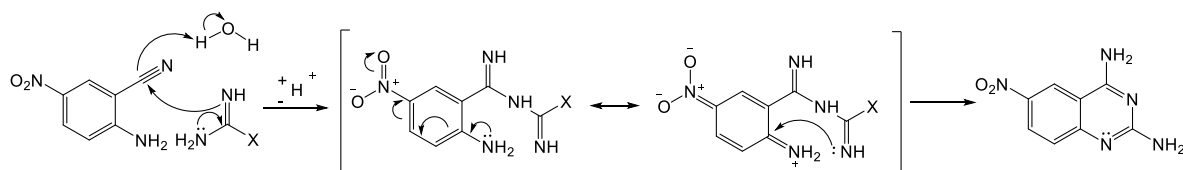
Figura 9. Análisis retrosintético de la formación de las quinazolinas utilizadas.

En cuanto a la formación de ambos núcleos de quinazolina, se proponen dos transformaciones químicas que pueden ocurrir simultáneamente. Por una parte, el mecanismo de reacción ácido-base, representado en la **Figura 10**, el cual está mediado por la adición en la reacción de una base fuerte como el KOH, que desplaza el equilibrio de la reacción hacia la formación del producto. Por otro lado, se muestra un mecanismo de S_NAr, que ocurre mediante la formación de un intermediario tipo Meisenheimer, que está promovido por el efecto del grupo electro-atrayente fuerte como es el NO₂, que está en posición *para* al grupo saliente, el NH₂, en la materia prima del 2-amino-5-nitrobenzonitrilo.

Mecanismo de reacción ácido-base



Mecanismo de reacción S_NAr



X: NH₂, H

Figura 10. Mecanismos de reacción propuestos en la formación del núcleo de quinazolina.



Aunque no se determinó cuál es el mecanismo de reacción predominante en esta transformación, se considera que, de acuerdo a que el NO₂ es un grupo electro-atrayente y el amino un electro-donador muy fuertes, el mecanismo en el que se involucra la formación del intermediario de Meisenheimer podría ser el que aporte más en la formación de los respectivos productos, debido a la estabilidad dada por el efecto mesomérico entre estos dos grupos funcionales.

Este efecto también podría explicarse con los rendimientos obtenidos para cada quinazolina. En el caso del intermediario **A**, se obtuvo un rendimiento del 90%, en donde se utiliza a la guanidina para la reacción de ciclación; la guanidina tiene un grupo NH₂ más en su estructura en comparación de la formamidina, que para la obtención del intermediario **D**, se consiguió con un rendimiento menor (79%). El grupo NH₂ dona densidad electrónica, haciendo favorable la reacción de adición nucleofílica del nitrógeno de la imina sobre el carbono del nitrilo en la materia prima, con lo que al tener un grupo NH₂ extra, la adición se llevará a cabo con mayor facilidad. El rendimiento podría reflejar la elección de un mecanismo de reacción predominante; si el mecanismo de S_NAr es el que aporta más a la formación del producto, al tener ese NH₂ adicional en la guanidina, dona mayor densidad electrónica haciendo más factible, en comparación con el H de la formamidina, la sustitución del grupo amino en la materia prima por la amina en la guanidina. El resultado de una reacción más favorecida sobre otra, sería un mayor rendimiento, indicando mecanismo de reacción principal. Por otro lado, si la reacción procediera mayormente por el mecanismo ácido-base, un paso determinante en la reacción es la eliminación de una molécula de amoniaco de la parte de la guanidina o formamidina, y como ambas pueden expulsar esa molécula, no debería verse reflejado en el rendimiento de las reacciones.

Para la formación de los compuestos híbridos, se requirió previamente una reacción de activación del ácido carboxílico de los AINE's. Debido a la baja reactividad del carbono sp² del carboxilo frente a reacciones de adición-eliminación, se favorece primero la reacción ácido-base frente a nucleófilos, como en este caso, las aminas en posiciones 2 y 4 de la quinazolina **A** y la amina en posición 4 del intermediario **D**. Además, el efecto mesomérico entre los dos oxígenos y el carbono que constituyen un ácido carboxílico, disminuye la electrofilia del carbono. Es por ello que se debe minimizar el efecto mesomérico para aumentar la reactividad del centro electrofílico con la sustitución de un mejor grupo.

Se decidió utilizar al CDI como agente activante para favorecer la reacción de formación del enlace amida en los compuestos híbridos, destacando sobre otros activantes, por la facilidad en el manejo del compuesto, el tiempo para la formación de los respectivos derivados imidazólicos (1 h) y que la reacción se realiza a temperatura ambiente en un disolvente que no necesitó destilarse previamente.



Una de las condiciones de reacción que más se cuidó fue que la atmósfera dentro del sistema estuviera libre de la mayor humedad posible, por lo que fue muy importante purgar la mezcla y colocarla bajo atmósfera de nitrógeno, para que así la humedad del medio ambiente no hiciera reversible a la reacción, efecto que si fue observado al no tener los cuidados antes mencionados. También, si la reacción permanecía en agitación por más de dos horas, se observaba la formación de nueva cuenta de las materias primas.

Los intermediarios imidazólicos no fueron aislados debido a su baja estabilidad frente a su exposición con el medio ambiente. En ninguna de las activaciones, después del tiempo reacción, se observó la presencia de materia prima, por lo que fue una reacción cuantitativa y se tomó en cuenta en los cálculos estequiométricos para la adición de la quinazolina correspondiente. Esta adición se realizó en el mismo matraz donde se activó el AINE. La solubilidad de la quinazolina es un factor muy importante a considerar para su reactividad pues, al ser poco solubles en disolventes orgánicos, el rendimiento de las reacciones disminuye a menos del 10%. Por ello se optó por utilizar DMF para solubilizarlas previamente y no adicionar el compuesto en estado sólido. Los rendimientos de los compuestos nitrados obtenidos para la serie A son del 67 al 72%, mientras que para los derivados nitrados de la serie C, los rendimientos aumentan del 75 al 82%.

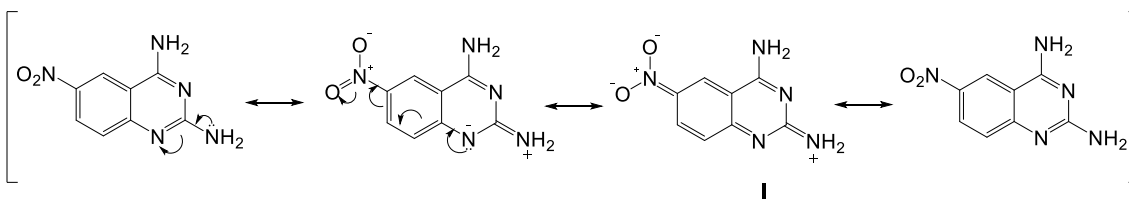
En el caso de la serie A, los rendimientos obtenidos pueden ser discutidos iniciando desde la 2,4-diamino-6-nitroquinazolina (**A**), pues al tener dos aminas en su estructura, hay competencia en la formación de más de un enlace tipo amida, por lo que se optó en colocar 0.5 equivalentes de quinazolina por cada equivalente de ácido carboxílico activado. Con esto se redujo el número y proporción de subproductos, además de aumentar la proporción del compuesto de interés. Este efecto puede ser explicado de acuerdo a los híbridos de resonancia mostrados en la **Figura 11**, donde la estructura I de la resonancia del grupo NH_2 , en la posición 2 de la quinazolina, muestra la pérdida de aromaticidad en dos anillos, lo cual no es favorable. Además de un efecto electro-atrayente por parte del grupo NO_2 en posición 6, haciendo que la imina formada en posición 2 tenga menos disponibles los electrones para realizar adiciones nucleofílicas.

Por otro lado, las estructuras de resonancia con la amina en posición 4 de la quinazolina, muestran en la estructura II un híbrido similar a la estructura I, llegando así al mismo inconveniente antes mencionado. Por lo tanto, hay dos estructuras donde se observa la disminución de la nucleofilia de la amina en posición 2, haciendo favorable la formación del enlace amida en la posición 4.

En el caso de la formación de los compuestos nitrados de la serie C, aunque no hay competencia de reactividad, se decidió colocar en menor proporción a la quinazolina debido también a su baja solubilidad, utilizando condiciones de reacción similares.



Amina en posición 2



Amina en posición 4

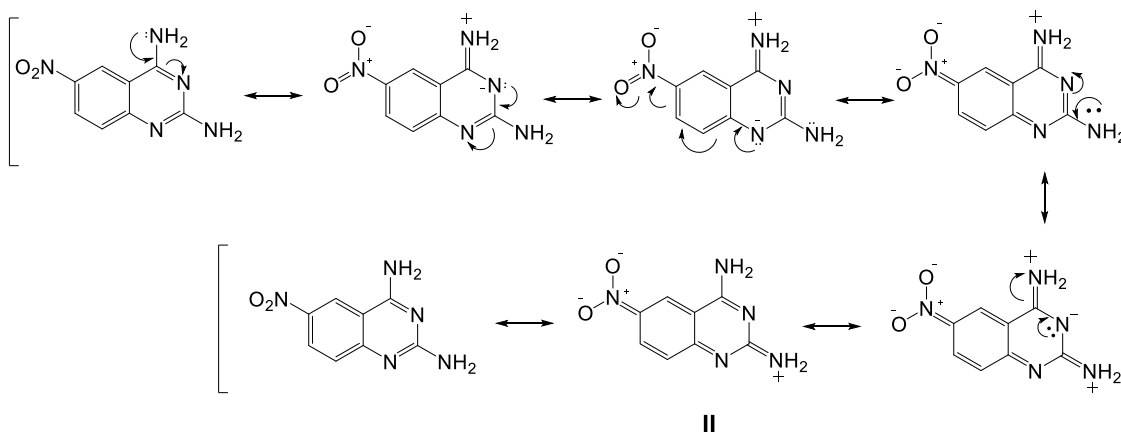


Figura 11. Estructuras canónicas del híbrido de resonancia de mayor importancia en la formación de las moléculas híbridas.

Para la reacción de acetilación utilizada en la síntesis de la serie B, se observó que cuando se realiza a una temperatura mayor a 80°C, el enlace amida en la posición 4 se hidroliza, por lo que se decidió realizarla a 70°C durante un mayor tiempo, desde 36 a 48 h, de acuerdo al correspondiente derivado nitrado. A pesar de modificar las condiciones iniciales, en todo momento se observó la presencia de materia prima en el análisis por ccf. Este comportamiento dio como resultado un rendimiento moderado, entre 56 al 70%, de acuerdo al compuesto sintetizado.

Se pudo observar también que un método de purificación idóneo para el compuesto **05** fue vertiendo la reacción en una disolución saturada fría de NaCl para inducir la precipitación del producto, y posteriormente hacer extracciones sólido-líquido con éter etílico anhidro para retirar las trazas de materia prima. Sin embargo, al querer extrapolar este método para purificar al compuesto **07**, el producto se hidrolizó regenerando el intermediario **A** y el (**S**)-naproxeno. Se piensa que el ácido acético generado, *in situ* en la reacción por la degradación del anhídrido acético, protona al oxígeno del enlace amida, y a continuación, el agua de la disolución de NaCl realiza una reacción de adición-eliminación, obteniendo así las materias primas. Este fenómeno se ve favorecido por el grupo OMe que se encuentra en el (**S**)-naproxeno, a comparación con el isobutilo del (**S**)-ibuprofeno.



Por último, se utilizaron dos métodos de catálisis diferentes para reducir el grupo NO_2 a NH_2 . La primera, una catálisis homogénea mediada por $\text{Ni}(\text{OAc})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y NaBH_4 en $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, usada en los derivados nitrados de las series A y C, obteniéndose rendimientos buenos del 80 al 87% en la serie A, y del 85 al 92% para los correspondientes compuestos de la serie C.

Para la reducción de los compuestos de la serie B, al utilizar el método mencionado anteriormente, se observó que, aunque el grupo NO_2 se reducía, el grupo acetilo de la posición 2 se eliminaba, generando los compuestos con NH_2 de la serie A. Los productos de interés si fueron aislados, pero con rendimiento $<10\%$, por lo que no se consideró un método viable y se procedió a emplear otras condiciones de reacción y se optó por un método de reacción más suave, utilizando una catálisis heterogénea intervenida por H_2 y $[\text{Pd}/\text{C}]$ en MeOH .

El rendimiento de reacción aumentó considerablemente a 92-96%, de acuerdo al compuesto. El inconveniente de este método de reacción son las cantidades de compuesto y disolvente usadas, ya que, por ejemplo, para la reducción con $\text{Ni}(\text{OAc})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ seguido de NaBH_4 ,^[42] se podían manejar cantidades menores a 150 mg, la reacción procedía con 3 mL de CH_3CN y para la purificación se usaban 30 mL de AcOEt en series de extracciones líquido-líquido. Por otro lado, en la reducción en donde se utiliza $[\text{Pd}/\text{C}]$, las cantidades mínimas requeridas son de 400 mg de acuerdo al recipiente utilizado en el equipo de hidrogenación, mientras que la cantidad de disolvente que se emplea en este método es alrededor de 150 mL de MeOH .

En general, en la parte sintética se obtuvieron rendimientos de moderados a buenos, cada una de las reacciones fue optimizada, reportándose los rendimientos y las condiciones de reacción que resultaron mejores.



Evaluación biológica

Se realizó la evaluación biológica *in vitro* de los compuestos finales sobre líneas celulares por el método de SRB y se determinó el porcentaje de inhibición celular. La evaluación de las moléculas se efectuó en tres etapas las cuales se describen a continuación.

Primera etapa

Los compuestos se evaluaron en dos líneas celulares tumorales, PC-3 (adenocarcinoma de próstata) y MCF-7 (adenocarcinoma de mama dependiente de estrógeno). La concentración utilizada fue de 25 μ M y el resultado se determinó a las 48 h de exposición, mientras que el control positivo fueron el tamoxifeno y el gefitinib. Los resultados obtenidos en este ensayo se muestran en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Porcentaje de inhibición celular de los compuestos híbridos en las líneas celulares PC-3 y MCF-7. NC=no citotóxico. n=3

Serie	Compuesto	Línea Celular (% inhibición)	
		PC-3	MCF-7
A	01	62.1 \pm 3.8	71.5 \pm 6.1
	02	89.1 \pm 3.3	100
	03	61.5 \pm 6.2	57.9 \pm 5.7
	04	72.9 \pm 5.8	75.4 \pm 5.9
B	05	32.1 \pm 4.8	29.5 \pm 3.1
	06	21.1 \pm 5.3	23.5 \pm 5.1
	07	31.5 \pm 4.2	37.9 \pm 3.7
	08	25.9 \pm 4.7	25.4 \pm 6.9
C	09	12.1 \pm 5.8	11.6 \pm 3.1
	10	19.1 \pm 4.3	12.5 \pm 2.3
	11	11.5 \pm 4.2	17.6 \pm 3.6
	12	NC	40.8 \pm 2.3
	Tamoxifeno	58.99 \pm 7.1	29.6 \pm 2.9
	Gefitinib	98.3 \pm 1.7	96.8 \pm 2.2



Como se puede observar en la tabla anterior, el compuesto que resultó con mayor actividad frente a ambas líneas fue el **02**, que tiene grupos NH_2 libres en posiciones 2 y 6, y al **(S)-ibuprofeno** como el AINE que forma el enlace amida. Inclusive mostró un mejor perfil que el tamoxifeno y que el gefitinib, en donde se sabe que este último actúa sobre EGFR produciendo un efecto antiproliferativo. En el caso particular de este compuesto se observa que en la línea celular MCF-7 muestra un mayor porcentaje de inhibición, esto podría deberse por el hecho de que esta línea celular tiene mayormente expresado el EGFR en comparación con la línea PC-3.

De manera general los compuestos de la serie A presentaron mejores valores a comparación de las series B y C en estas dos líneas celulares, esto podría deberse al NH_2 libre de la posición 2. Sin embargo, los compuestos **02** y **04**, que tienen además el NH_2 de la posición 6, resultaron más activos que sus análogos nitrados.

La serie B, en donde se tiene un grupo acetilo formando una amida en posición 2, se observa la tendencia contraria mostrada en la serie A, los compuestos nitrados ahora fueron más activos que los compuestos con el grupo amino. Posiblemente, el grupo NO_2 de la posición 6 “retire” densidad electrónica haciendo que el H de la amida en posición 2 al estar más “libre” pueda formar más fácilmente una interacción tipo puente de hidrógeno con la diana farmacológica, a comparación del grupo NH_2 que, al donar densidad electrónica, la interacción se ve desfavorecida. Esta serie puede evidenciar lo esencial de tener un enlace NH libre en la posición 2 para la actividad de la quinazolina, aunque no sea de la misma naturaleza que la amina en la misma posición que compuestos de la serie A, también forma puentes de hidrógeno, aunque no con tanta fuerza y por eso disminuyen su actividad.

En cuanto a los compuestos de la serie C, se observa que fueron las moléculas que tuvieron una menor actividad frente a éstas dos líneas celulares. Aquí también se observa la tendencia mostrada en la serie A, los compuestos con grupos NH_2 mostraron mejor actividad que los que tienen NO_2 en posición 6, con lo que de nueva cuenta se observa la importancia de tener un grupo con NH_2 libre en la posición 6 de la quinazolina para aumentar la actividad citotóxica. Además, algo de suma importancia es que en esta serie no hay ningún enlace NH libre en la posición 2 de la quinazolina, concluyéndose así la importancia de este enlace para que pueda haber actividad citotóxica en estas dos líneas celulares. Aunque en esta serie hay que tomar muy en cuenta que el compuesto **12** en la línea PC-3 no presentó citotoxicidad, con lo que fue específico ante MCF-7.

De acuerdo a los datos obtenidos en la primera etapa fue que se decidieron evaluar los compuestos que tuvieron actividad en una línea celular con fenotipo no tumoral.



Segunda etapa

Los compuestos que presentaron actividad, por más moderada que ésta fue, se decidieron evaluar en una línea celular con fenotipo no tumoral, se utilizó COS-7 (riñón de mono) debido a que es una línea que se utiliza como primer ensayo de toxicidad en diversos protocolos. La concentración de los compuestos fue de 25 μ M y el resultado se determinó a las 48 h de exposición, mientras que el control positivo fueron el tamoxifeno y el gefitinib. Los resultados se muestran en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Porcentaje de inhibición del crecimiento celular de los compuestos híbridos en la línea celular COS-7. NC: no citotóxico. n=3.

Serie	Compuesto	% inhibición de crecimiento
		COS-7
A	01	30.6 \pm 3.9
	02	60.8 \pm 3.4
	03	19.0 \pm 2.1
	04	58.0 \pm 2.0
B	05	32.3 \pm 2.7
	06	27.0 \pm 1.8
	07	27.0 \pm 1.8
	08	26.8 \pm 2.8
C	09	35.3 \pm 1.5
	10	15.3 \pm 3.5
	11	5.2 \pm 0.7
	12	NC
	Tamoxifeno	34.0 \pm 4.3
	Gefitinib	95.6 \pm 4.3

En este ensayo se determinó qué tan dañino es un compuesto en una línea celular sana. En el caso de los valores obtenidos se observó primeramente que el compuesto que presentó mayor inhibición del crecimiento fue de nueva cuenta **02**, en ese aspecto fue el más citotóxico de todos los compuestos. Exceptuando a los compuestos **02** y **04** de la serie A, desde el compuesto **01** hasta el **10**, todos se encuentran entre valores de 15 y 35% de inhibición de crecimiento.



Los compuestos **11** y **12** fueron los que mostraron mejores resultados. Por un lado, la molécula **11** fue la que mostró el valor más bajo de inhibición, lo que significa que fue la segunda menos tóxica, solo por detrás de la molécula **12**, en donde no presentó valor de inhibición alguno. Este es un resultado muy positivo, ya que indica que en esta línea celular el compuesto no es dañino, debido a que no hay receptores en una línea celular sana con el que interaccione. Cabe recalcar que mientras el tamoxifeno tuvo un valor de crecimiento dentro de la media de la mayoría de los compuestos, el gefitinib presentó un valor de toxicidad mucho mayor a todos los compuestos, inclusive que el compuesto **02**, por lo que resultó que los todos compuestos sintetizados son menos dañinos en esta línea celular que, un compuesto que se usa en la quimioterapia contra el tratamiento del cáncer. Con base en los resultados de la primera y segunda etapas, se determinó realizar una tercera con los compuestos que resultaron más activos en ambas etapas previas

Tercera etapa

Se evaluaron los compuestos de la serie A, en otra línea celular con fenotipo no tumoral, FGH (fibroblasto gingival humano), ya que fueron los que tuvieron mayor actividad en los ensayos anteriores. La concentración de los compuestos fue de 25 μ M y el resultado se determinó a las 48 h de exposición, el control positivo fue el tamoxifeno. Los valores obtenidos en el ensayo se listan en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Porcentaje de inhibición del crecimiento celular de los compuestos híbridos en la línea celular FGH. NC: no citotóxico. n=3.

Serie	Compuesto	% inhibición de crecimiento
		FGH
A	01	NC
	02	NC
	03	NC
	04	NC
	Tamoxifeno	9.9 \pm 04

En la tabla anterior se observa que ninguno de los compuestos que resultaron más activos contra las líneas celulares tumorales, presentaron citotoxicidad frente a una línea celular de humano. Este resultado puede ser muy prometedor, puesto que, aunque no era el propósito del trabajo se encontró una serie de compuestos que no son citotóxicos por lo menos en una línea celular y que es uno de los problemas con los que cuenta la quimioterapia actual.



Acoplamiento molecular

Se realizó el estudio *in silico* de los compuestos sintetizados frente a las dianas farmacológicas EGFR y COX-2, con la finalidad observar las interacciones presentes entre ambos elementos y obtener la energía de unión, y así asociarlo con la actividad biológica mostrada en la evaluación *in vitro* en el caso del EGFR y predecir la posible acción que podrían mostrar en un ensayo donde esté involucrado el efecto antiinflamatorio de la COX-2. Las imágenes del acoplamiento molecular pueden ser consultadas en el **Anexo III**.

Validación

Se realizó la validación del acoplamiento molecular, con el fin de determinar, si el método utilizado es confiable. De acuerdo a la literatura, un valor de RMSD < 2.0 Å es indicativo de que la técnica utilizada es válida; el resultado del cálculo, obtenido en el software fue de RMSD = 1.8122 Å. Las estructuras del gefitinib cocrystalizado y del que proviene del acoplamiento molecular se muestran en la **Figura 12**. La porción de quinazolina, que es la que interactúa con el receptor, se encuentra sobrepuesta casi en su totalidad en ambas estructuras, aunque en el caso de la porción de la morfolina, seguramente se encuentra más desviada debido a que al no interactuar con el EGFR no tiene puntos de unión que hagan que se mantenga fija, esto puede estar reflejado en el valor de RMSD, pues, aunque es un valor aceptado, podría ser aún menor, si la porción de la morfolina estuviera limitada en su rotación.

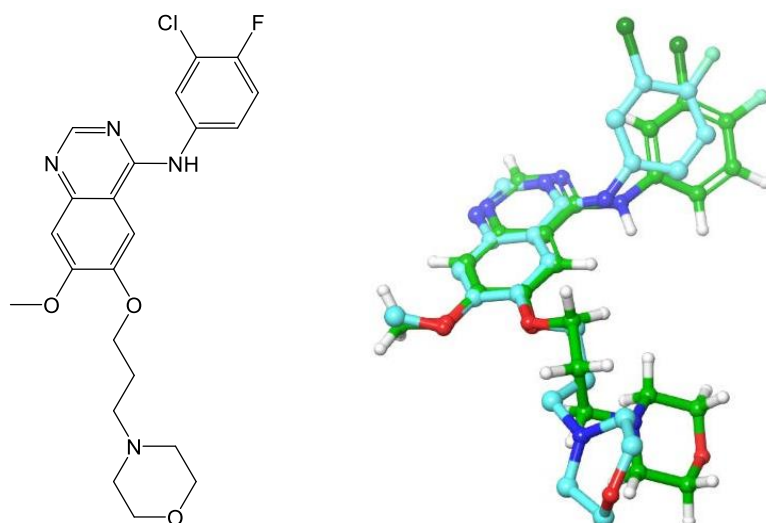


Figura 12. Estructura en 2D del **gefitinib** (izquierda). Imágenes sobrepuestas del **gefitinib** en el software Maestro v.11. En verde se muestra la estructura cocrystalizada y en azul el producto del acoplamiento molecular.



Los datos obtenidos que se muestran en la **Tabla 7** son para el receptor EGFR. Éstos fueron calculados con el software AutoDockTools-1.5.6. y visualizados con PyMOL v0.99.

Tabla 7. Datos obtenidos del acoplamiento de los compuestos y el EGFR.

Serie	Compuesto	EGFR (PDB: 2GS7)		
		ΔG (kJ/mol)	Clúster	Interacciones
A	01	-7.2	7	Met 769
	02	-8.5	7	Asp 776, Met 769
	03	-7.3	6	Lys 704, Met 769
	04	-7.8	7	Met 769
B	05	-6.3	6	Lys 704, Pro 770
	06	-6.4	6	Lys 704, Pro 770
	07	-6.2	5	Lys 704, Met 769, Asp 776
	08	-6.4	5	Lys 704, Val 986
C	09	-5.6	5	Pro 770
	10	-6.0	6	Pro 770
	11	-6.1	4	Thr 766
	12	-5.8	4	Asp 831
	Gefitinib	-6.3	8	Met 769

Como se observa en la tabla anterior, el compuesto que presentó el menor ΔG fue el **02** que refleja una mejor interacción en comparación con los otros compuestos; esto concuerda con los datos de la evaluación citotóxica, además tiene asociado uno de los números de clúster mayor y se observa la interacción con el residuo de Met 769, formando un puente de hidrógeno entre el N en la posición 3 de la quinazolina y el H de la amida en posición 4, ambos con el OH del ácido carboxílico en la metionina.



Se sabe que dicha interacción es muy importante para que haya actividad antiproliferativa por parte de la quinazolina, también el compuesto presenta una interacción con el Asp 776 entre el H de la NH₂ en posición 6 con el O del ácido aspártico; éstas interacciones pueden ser visualizadas en la **Figura 13**.

La interacción con el residuo de metionina se observa en la mayoría de los compuestos de la serie A, que fueron los que obtuvieron mejores resultados de evaluación biológica. Adicionalmente a esta interacción, otras que se observan con los derivados de la serie A son Asp 776 y Lys 704.

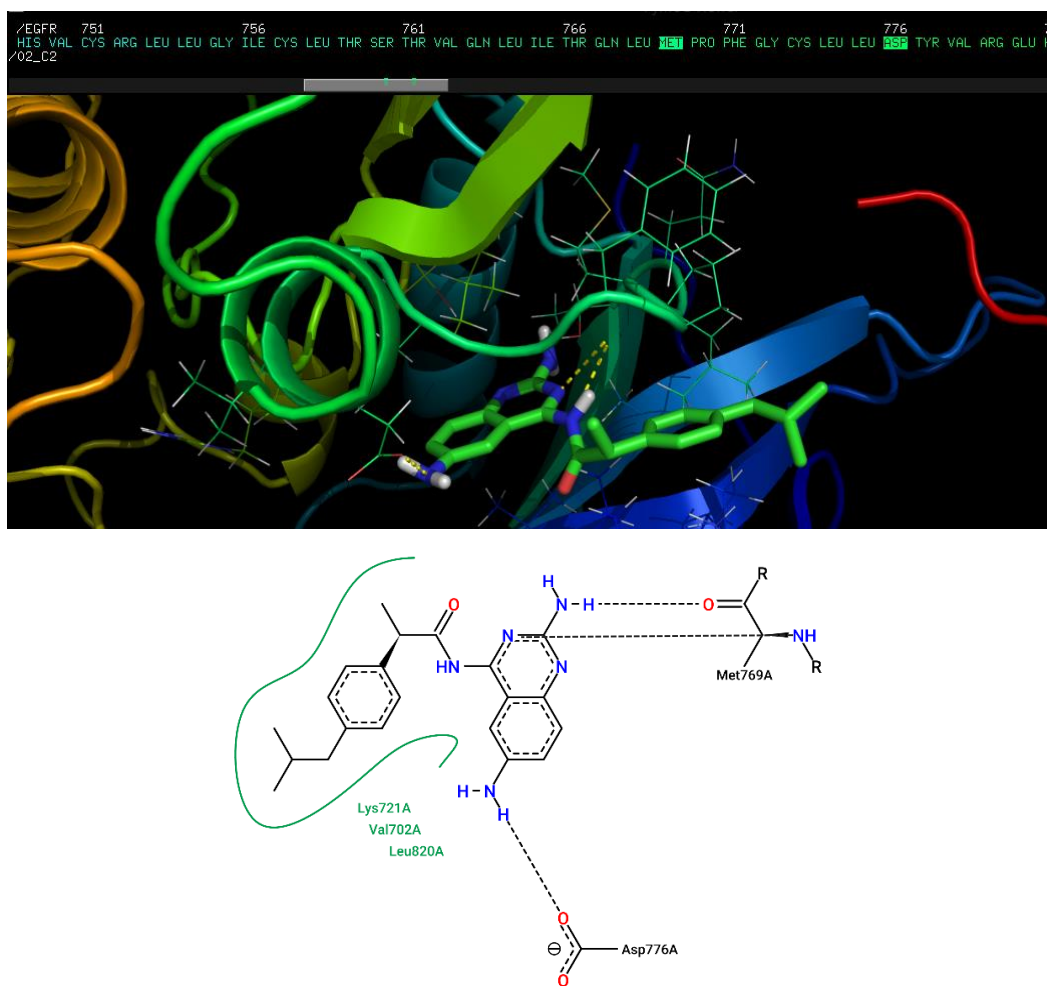


Figura 13. Acoplamiento entre **02** y EGFR.

Siguiendo con los compuestos de la serie B, que fueron los que presentaron una actividad biológica moderada, también tuvieron los valores de ΔG intermedios de las tres series. Para esta serie, las principales interacciones formadas con el receptor son con los residuos Lys 704, Met 769, Pro 770, Asp 776 y Val 986, en esta serie solo el compuesto **07** fue el que presentó la interacción con la metionina.



Para la serie C en donde se tuvo al compuesto con menor actividad biológica, **12**, se observa que presentó la mayor energía de unión (ΔG), lo que hace menos favorable la interacción con el receptor. Ésta serie tuvo la actividad *in vitro* más baja, al igual que lo mostrado en el estudio computacional. Las interacciones presentes entre las moléculas de la serie y el receptor son Thr 766, Pro 770 y Asp 831, este último solo presentado con el derivado **12**. Recordando los resultados de evaluación biológica, éste compuesto mostró actividad específica sobre MCF-7 y no resultó ser citotóxico en COS-7, quizá debido a que no presenta la interacción con Met 769 como se observa en la **Figura 14**.

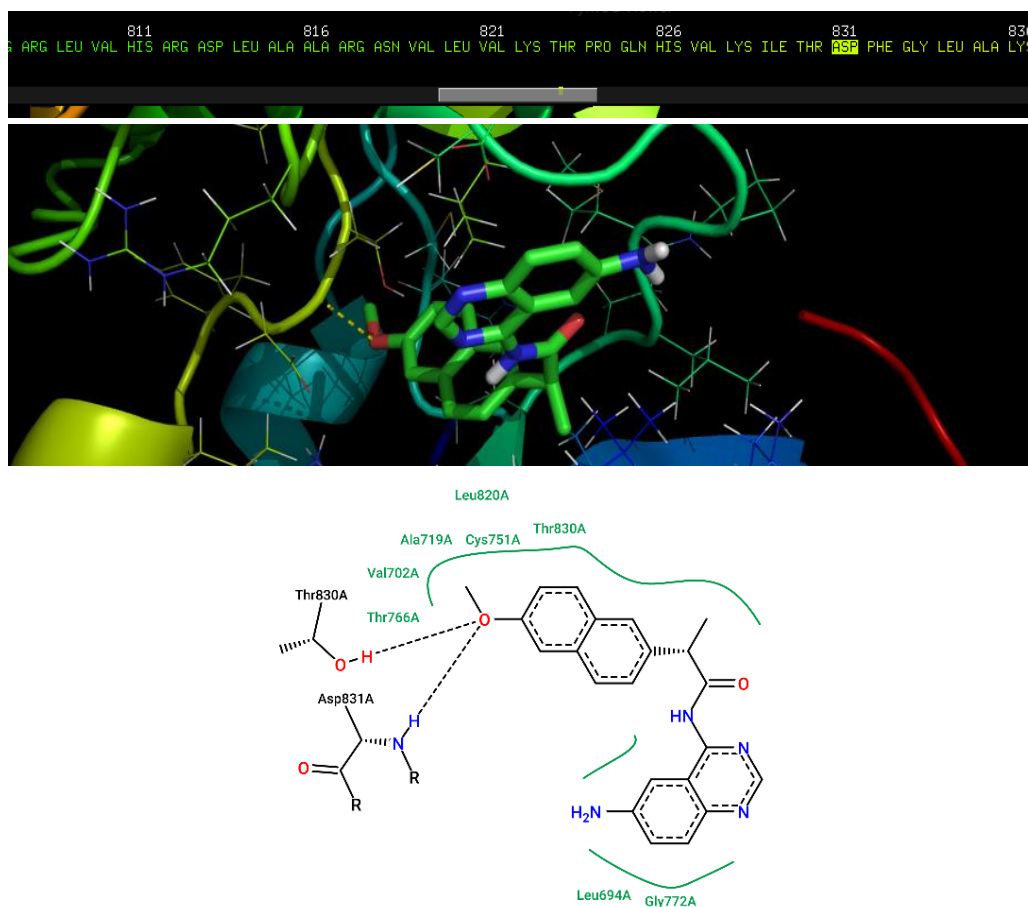


Figura 14. Acoplamiento entre **12** y EGFR.

Por último, para comparar qué tan activos son los compuestos frente a un fármaco que se utiliza en la clínica, se realizó el acoplamiento con la molécula de gefitinib. El gefitinib tuvo asociada una ΔG de -6.3 kJ/mol, un número de clúster de 8 y la interacción presentada con la Met 769, que, si lo comparamos, por ejemplo, con los -8.2 kJ/mol del compuesto **02** y que presenta la misma interacción con el receptor, indicaría que este último debería ser más potente para combatir un proceso tumoral en el organismo.



Por otro lado, los valores obtenidos del acoplamiento de los compuestos con la COX-2, se muestran en la **Tabla 8**. Estos fueron calculados con el software AutoDockTools-1.5.6. y visualizados con PyMOL v0.99.

Tabla 8. Datos obtenidos del acoplamiento de los compuestos y la COX-2.

Serie	Compuesto	COX-2 (PDB: 5F1A)		
		ΔG (kJ/mol)	Clúster	Interacciones
A	01	-7.5	7	Tyr 385, Ser 530
	02	-8.6	10	Tyr 385, Phe 205, Ser 530
	03	-7.2	6	Tyr 355
	04	-7.4	6	Tyr 385, Ser 530
B	05	-7.7	6	Tyr 385, Trp 387
	06	-8.0	7	Tyr 385
	07	-6.8	7	Tyr 385
	08	-7.1	7	Tyr 385
C	09	-7.7	6	Tyr 385
	10	-8.2	7	Tyr 385, Ser 530, Ala 527
	11	-7.62	8	Tyr 385, Gly 526
	12	-7.78	8	Ser 530
	(S)-ibuprofeno	-8.0	10	Tyr 385, Ser 530
	(S)-naproxeno	-7.5	10	Tyr 385, Ser 530

Como se muestra en la **Tabla 8**, los derivados **02** y **10** de la serie A y C, fueron los que presentaron los mejores valores de $\Delta G = -8.01$ kJ/mol y un número de clúster de 7.

Como se sabe, una interacción importante con la COX-2 es formando un puente de hidrógeno entre el OH de la Ser 530 y el OH del ácido carboxílico en los AINE's. Este hecho fue comprobado con el acoplamiento molecular realizado con el **(S)-ibuprofeno** y el **(S)-naproxeno**, con lo que se observa la interacción mencionada, además de otra con la Tyr 355.



Estas interacciones se observan en los compuestos que presentaron la menor ΔG , por ejemplo, en el caso del compuesto **06**, se observan dos interacciones principalmente, un puente de hidrógeno formado entre el OH de la Ser 530 con el O de la amida en posición 4 y entre el OH de la Tyr 385 con el O de la amida antes mencionada. En el caso del enlace formado con el H de la amida, se puede explicar por el hecho de que los grupos funcionales de ácido carboxílico y la amida son isómeros, con los que la amida estaría mimetizando el tipo de enlace formado, la visualización del acoplamiento se puede observar en la **Figura 15**.

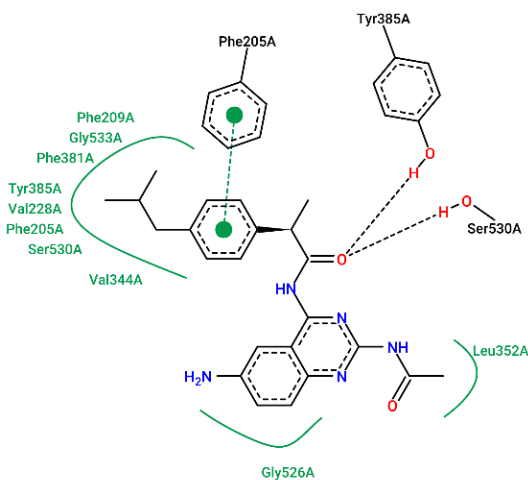
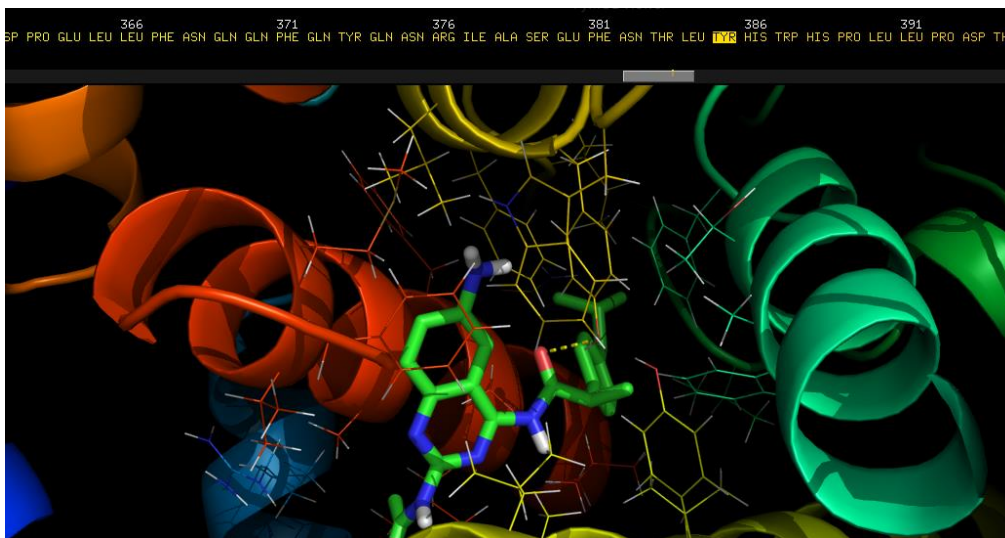


Figura 15. Acoplamiento entre el compuesto **06** y la COX-2.

En cuanto al acoplamiento del compuesto **02** mostrado en la **Figura 16**, también se observa un enlace tipo puente de hidrógeno entre el OH de la Ser 530 con el H del enlace NH del carboxilo de la amida en posición 4; también podría estarse mimetizando el tipo de enlace formado normalmente, ya que el grupo funcional amida presenta efecto mesomérico de resonancia.

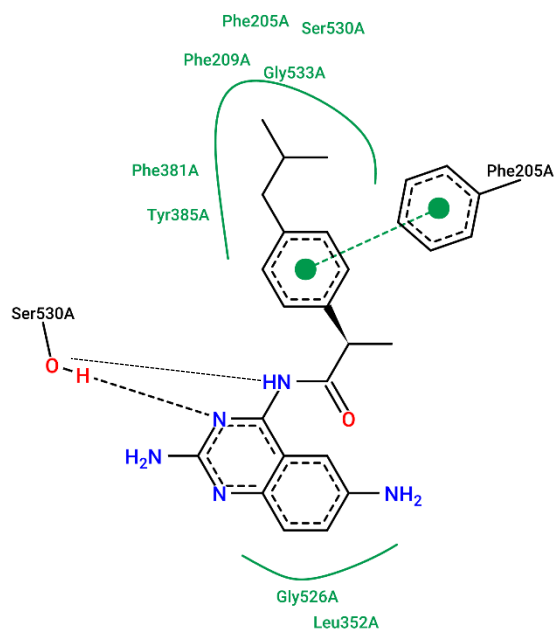
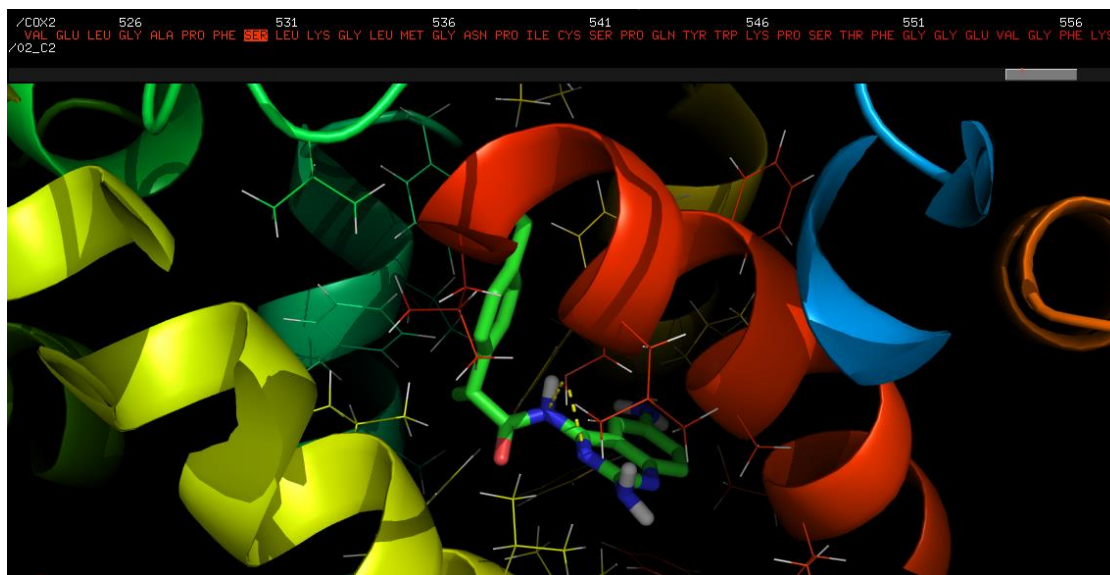


Figura 16. Acoplamiento entre el compuesto **02** y la COX-2.

Aunque la mayoría de los compuestos sintetizados mostraron la interacción con el residuo de Tyr 355, en contraparte el compuesto que mostró la mayor ΔG con un valor de -6.83 kJ/mol fue el compuesto **07**, que, aunque también presentó la interacción con Tyr 355, no se observa interacción con Ser 530, este hecho puede ser observado en la **Figura 17**.

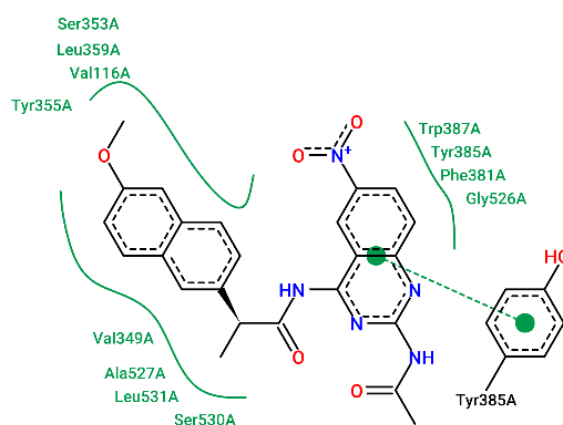
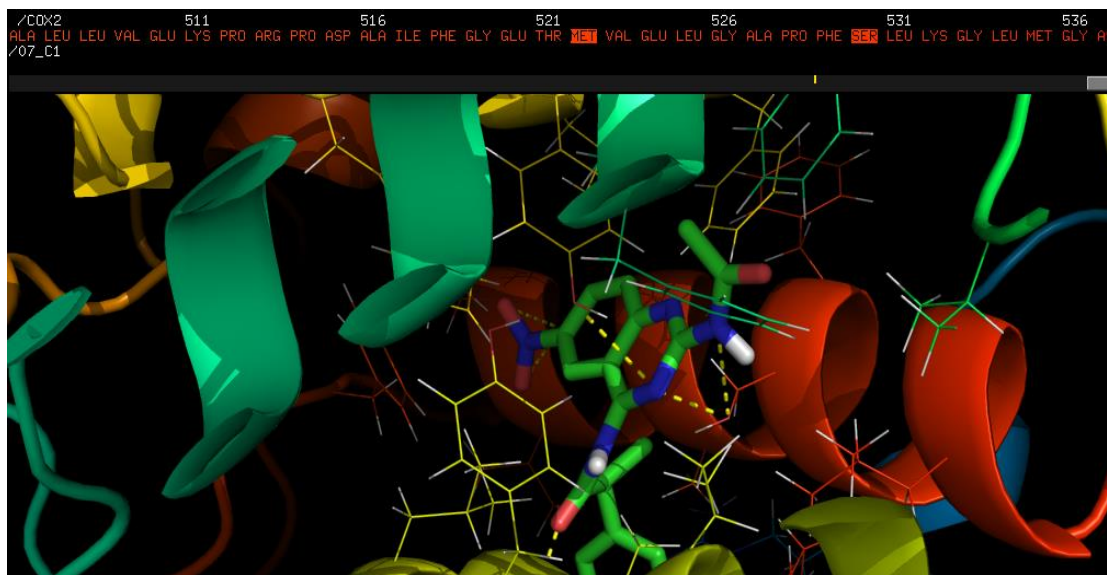


Figura 17. Acoplamiento entre el compuesto **07** y la COX-2.

Con los datos obtenidos, se realizó la comparación entre de los fármacos usados como agentes antiinflamatorios con cada uno de los híbridos que tuvieron el mejor resultado de acuerdo con el AINE utilizado. El compuesto **12** fue el que mostró un mejor perfil con el **(S)-naproxeno** en su estructura y que, al compararlo con el **(S)-naproxeno** libre, tuvo un menor valor de ΔG . En cuanto a la comparación con el **(S)-ibuprofeno**, los compuestos que mostraron mejores resultados son el **02** y el **10**. Por lo tanto, estos compuestos son candidatos a ser evaluados *in vitro* en un ensayo para determinar su posible efecto antiinflamatorio, ya que presentan resultados teóricos mejores que los fármacos usados en este trabajo.

De acuerdo con los datos de evaluación biológica y acoplamiento molecular, el compuesto **02**, es una molécula *lead* que puede ser evaluada en otros ensayos biológicos, incluso determinar su actividad biológica *in vivo*.



Conclusiones

Se sintetizaron 12 compuestos híbridos formadas por dos derivados distintos de quinazolina (intermediarios **A** y **D**) y dos AINE's (**(S)-ibuprofeno** y **(S)-naproxeno**), los cuales fueron caracterizados mediante las técnicas de IR, EM, RMN-¹H y NOESY.

Los compuestos finales se evaluaron *in vitro*, de donde que se obtuvieron 12 moléculas *hit*, mostrando que los derivados con el grupo amino en posición 6 fueron más activos que sus análogos nitrados. Los resultados observados fueron bastante prometedores en las líneas celulares MCF-7 y PC-3, ya que algunos de los derivados finales son más activos que fármacos que se emplean en la clínica para el tratamiento contra el cáncer. De esta determinación, se obtuvo un compuesto *lead*, la molécula **02**, además de la especificidad que presentó el compuesto **12** sobre la línea celular MCF-7. Los resultados obtenidos de la línea celular COS-7 indicaron toxicidad por parte de los derivados, exceptuando a análogo **12**, aunque el gefitinib presentó un valor mayor a los híbridos sintetizados, siendo este más dañino. Además, el estudio sobre una línea celular de humano (FGH) arrojó un resultado muy bueno, puesto que las moléculas de la serie A, no son tóxicas en dicho ensayo.

El estudio de acoplamiento molecular arrojó resultados favorables para el receptor EGFR, puesto que algunos de los compuestos forman un puente de hidrógeno entre el átomo de N de la posición 1 o 3 de la quinazolina y la Met 769, esta interacción es esencial en los compuestos derivados de quinazolina para que presenten actividad citotóxica. En este caso, el compuesto **02** también mostró el mejor perfil de actividad asociado con el menor valor de ΔG , haciendo favorable la interacción ligando/receptor. En contraparte, el compuesto **12**, que fue el menos activo en la evaluación biológica, careció de la interacción con Met 769, arrojando un valor mayor de ΔG a comparación de los demás compuestos. Esto evidencia la importancia de tener un enlace NH en posición 2 para la actividad biológica de la quinazolina. En cuanto al acoplamiento con la enzima COX-2, se observó que diversos compuestos interaccionan con el residuo de Ser 530, esencial para el efecto antiinflamatorio, mimetizando el puente de hidrógeno formado entre el átomo de H del ácido carboxílico en los antiinflamatorios, por el H de la amida en los híbridos sintetizados. Los compuestos con el mejor perfil en este estudio presentaron valores menores de ΔG comparado con algunos AINE's usados en la clínica, con lo que podrían mostrar un mejor efecto antiinflamatorio de manera *in vitro*. Aunque este estudio es predictivo, aporta un argumento a la potencial actividad antiinflamatoria de estos derivados.



Referencias bibliográficas

- [1] Hanahan, D., Weinberg, A. R.; Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 2011, **144** (5), 646-674.
- [2] Merlo, L. M., Pepper, J. W., Reid, B.J., Maley, C. C.; Cancer as an Evolutionary and Ecological Process. *Nat. Rev. Cancer*, 2006, **6**, 924-935.
- [3] Olivier, M., Petitjean, A., Marcel, V., Pétré, A., Mounawar, M., Plymoth, A., de Fromental, C. C., Hainaut, P.; Recent Advances in p53 Research: an Interdisciplinary Perspective. *Cancer Gene Ther.*, 2009, **16**, 1-12.
- [4] Nowell, P. C.; The Clonal Evolution of Tumor Cell Populations. *Science*, 1976, **194**, 23-28.
- [5] Baselga, J.; Targeting Tyrosine Kinases in Cancer: The Second Wave. *Science*, 2006, **312**, 1175-1178.
- [6] Herceg, Z., Hainaut, P.; Genetic and Epigenetic Alterations as Biomarkers for Cancer Detection, Diagnosis and Prognosis. *Mol. Oncol.*, 2007, **1**, 26-41.
- [7] Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., et al. (2013). Cancer Incidence and Mortality Worldwide. IARC CancerBase. Lyon, France. Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer. Consultado 22 de mayo de 2019.
- [8] Risk Factors Collaborators. Global, Regional, and National Comparative Risk Assessment of 79 Behavioural, Environmental and Occupational, and Metabolic Risks or Clusters of Risks, 1990-2015: a Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet Glob Health*, 2016, **388**, 1659-1724.
- [9] James, M. A., Lois B. T.; Mechanism of Therapy-Related Carcinogenesis. *Nat Rev. Cancer*. 2005, **5**, 943-955.
- [10] Plummer, M., de Martel, C., Vignat, J., Ferlay, J., Bray. F., Franceschi, S.; Global Burden of Cancers Attributable to Infections in 2012: a Synthetic Analysis. *Lancet Glob. Health*, 2016, **4**, 30143-30147.
- [11] Stewart, B.W., Wild, C.P. World Cancer Report 2014 Lyon: International Agency for Research on Cancer. Consultado: 22 de mayo de 2019.
- [12] Organización Mundial de la Salud. Cáncer: www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer. Consultado: 22 de mayo de 2019.



- [13] Mhaske S.B., Argade, N.P.; The Chemistry of Recently Isolated Naturally Occurring Quinazolinone Alkaloids. *Tetrahedron*, 2006, **62**, 9787-9826.
- [14] Nigel, J., Liverton, D. J., Armstrong, D. A., Claremon, D. C., Remy, D. C., Baldwin, J. J., Lynch, R. J., Zhang, G., Gould, R. J.; Nonpeptide Glycoprotein IIb/IIIa Inhibitors: Substituted Quinazolinones and Quinazolinones as Potent Fibrinogen Receptor Antagonist. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, **8**, 483-486.
- [15] Bridges, A. J.; Chemical Inhibitors of Protein Kinases. *Chem. Rev.*, 2001, **101**, 2541-2571.
- [16] Sielecki T.M., Johnson T.L., Liu J., Muckelbauer J.K., Grafstrom R.H., Cox S., Boylan J., Burton, C. R., Chen, H., Smallwood, A., Chang, C., Boisclair, M., Benfield, P. A., Trainor, G. L., Seitz, S. P.; Quinazolines as Cyclin Dependent Kinase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2001, **11**, 1157-1160.
- [17] Ashok, K., Chatrasal, S. R.; Synthesis and Anti-inflammatory Activity of Newer Quinazolin-4-one Derivatives. *Eur. J. Med. Chem.*, 2009, **44**, 83-90.
- [18] Shuren, Z., Joe, W., Gudise, C., Erika, S., Xianjun, L., Yongshen, Z.; Synthesis and Evaluation of 4-quinazolinone Compounds as Potential Antimalarial Agents. *Eur J. Med. Chem.*, 2010, **45**, 3864-3869.
- [19] Rajiv, D., Anil, K.; Synthesis and Biological Activity of Peptide Derivatives of Iodoquinazolinones. *Molecules*, 2008, **13**, 958-976.
- [20] Buyuktimkin, S., Ekinici, A. C.; Pharmacological Studies on Quarternized-4-(3H) quinazolinones. *J. Pharm. Sci.*, 1992, **81**, 1092-1094.
- [21] Fawzia, M. R., Amry, E.; The Antihyperlipidemic Activities of 4-(3H)-Quinazolinone and Two Halogenated Derivatives in Rats. *Lipid Health Dis.*, 2005, **4**, 22-24.
- [22] Kunes, J., Bazant, J., Pour, M., Waisser, K., Slosa'rek, M., Janota, J.; Quinazoline Derivatives with Antitubercular Activity. *Farmaco*, 2000, **55**, 725-729.
- [23] Wasfy, A. A. F.; Synthesis and Antimicrobial Evaluation of Some 2, 2-disubstituted-3,3-biquinazolin-4-(3H)-ones. *Indian J. Chem. B.*, 2003, **42B**, 3102-3107.
- [24] Ashok, K., Chatrasal, S. R.; Synthesis and Anti-inflammatory Activity of Newer Quinazolin-4-one Derivatives. *Eur. J. Med. Chem.*, 2009, **44**, 83-90.
- [25] Jordan, J. D., Landau, E. M., Iyengar, R.; Signaling of Networks: The Origin of the Multicellular Multi-tasking. *Cell*, 2000, **103**, 193-215.



- [26] Blume-Jensen, P., Hunter, T.; Oncogenic Kinase Signaling. *Nature*, 2001, **411**, 355–378.
- [27] Slichenmeyer, W. J., Elliott, W. L., Fry, D. W.; A Pan ErbBtyrosine Kinase Inhibitors. *Semin. Oncol.*, 2001, **28**, 67–89.
- [28] Mukesh, K. N., Meredith, A. M., Felix Y. F., Theodore, S. L.; Integration of EGFR Inhibitors with Radiochemotherapy. *Nat. Rev. Cancer*, 2006, **6**, 876–885.
- [29] Balkwill, F., Mantovani, A; Inflammation and Cancer: Back to Virchow? *The Lancet*, 2001, **357**, 539–545.
- [30] Parkin, D. M., Pisani, P., Muñoz, N., Ferlay, J.; Infections and Human Cancer. *Cold Spring Harbor*, 1999.
- [31] Gulumian, M.; The Role of Oxidative Stress in Diseases Caused by Mineral Dusts and Fibres: Current Status and Future of Prophylaxis and Treatment. *Mol. Cell Biochem.*, 1999, **196**, 69–77.
- [32] Ekobom, A., Helmick, C., Zack, M., Adami, H. O.; Ulcerative Colitis and Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.*, 1990, **323**, 1228–33.
- [33] Cha, Y. I., DuBois, R. N.; NSAIDs and Cancer Prevention: Targets Downstream of COX-2. *Annu. Rev. Med.*, 2007, **58**, 239–252.
- [34] Eberhart, C. E., Coffey, R. J., Radhika, A., Giardiello, F. M., Ferrenbach, S., N.Dubois, R.; Up-regulation of Cyclooxygenase-2 Gene Expression in Human Colorectal Adenomas and Adenocarcinomas. *Gastroenterology*, 1994, **107**, 1183–1188.
- [35] Tjandrawinata, R. R., Dahiya, R., Hughes-Fulford, M.; Induction of Cyclooxygenase-2 mRNA by Prostaglandin E2 in Human Prostatic Carcinoma Cells. *Br. J. Cancer*, 1997, **75**, 1111–1118.
- [36] Arber, N., Eagle, C. J., Spicak, J., Rácz, M. D., Dite, M. D., Hajer, M. D., Zavoral, M. D., Lechuga, M. D., Gerletti, B. D., Tang, M. S., Rosenstein, R. B., Macdonald, K.; Celecoxib for the Prevention of Colorectal Adenomatous Polyps. *N. Engl. J. Med.*, 2006, **355**, 885–895.
- [37] Wang, D., DuBois, R. N.; Prostaglandins and Cancer. *Gut*, 2006, **55**, 115–122.
- [38] Robert, A., Nezamis, J. E., Lancaster, C., Hanchar, A. J.; Cytoprotection by Prostaglandins in rats. Prevention of Gastric Necrosis Produced by Alcohol, HCl, NaOH, Hypertonic NaCl and Thermal Injury. *Gastroenterology*, 1979, **77**, 433–443.



[39] May, O.; COX-2/PGE2 Signaling: A Target for Colorectal Cancer Prevention. Caiman Chemical: www.caymanchem.com/news/cox-2-pge2-signaling Consultado: 22 de mayo de 2019.

[40] Hou, T., Zhu, L., Chen, L., Xu, X.; Mapping the Binding Site of a Large Set of Quinazoline Type EGF-R Inhibitors Using Molecular Field Analyses and Molecular Docking Studies. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 2003, **43**, 273–287.

[41] Noolvi, M. N., Patel, H. M.; Synthesis, Method Optimization, Anticancer Activity of 2,3,7-trisubstituted Quinazoline Derivatives and Targeting EGFR-tyrosine Kinase by Rational Approach. *Arab. J. Chem.*, 2013, **6**, 35–48.

[42] Setamdideh, D., Khezri, B., Mollapour, M.; Convenient Reduction of Nitro Compounds to Their Corresponding Amines with Promotion of NaBH₄/Ni(AcO)₂·4H₂O System in Wet CH₃CN. *Orient. J. Chem.*, 2011, **27**(3), 991-996.



ANEXO I: Metodología



Materiales y equipos

- Los disolventes utilizados fueron de la marca J. T. Baker (grado analítico) sin ser destilados previamente.
- Las materias primer fueron utilizadas sin tratamiento previo de la marca Sigma-Aldrich.
- El (S)-ibuprofeno (marca: Maver, nombre: Dolver, lote: 183077, caducidad: mayo 2020) , y (S)-naproxeno (marca: Novag, nombre: Inflanox, lote: SJ1872, caducidad: octubre 2020) fueron obtenidos por extracción sólido-líquido con CHCl_3 de tabletas comerciales, en donde se reporta un $\text{EE} > 99\%$, las condiciones de reacción utilizadas no afectan la estereoquímica de los compuestos, por lo que no se determinó la configuración absoluta de los compuestos finales.
- Para la evaporación de disolventes a presión reducida se utilizó un rotaevaporador marca BÜCHI modelo R-114, bomba de vacío marca GAST modelo 0523-v47-6528DX y enfriador marca VWR Scientific modelo 1107.
- El punto de fusión de los compuestos sintetizados se determinó en un aparato Fischer marca BÜCHI modelo B-540 con capilares e vidrio marca Vacubrand propios del equipo. Los puntos de fusión no están corregidos.
- La reducción catalítica se realizó en un equipo para hidrogenación marca Parr modelo 3916-EG adaptado a un tanque de hidrógeno de la compañía INFRA.
- Los espectros de IR-ATR, RMN- ^1H , EM-DART y EM-APCI, fueron realizados en la Unidad de Servicios de Apoyo a la investigación (USAII) de la Facultad de Química, UNAM.
- Para la nomenclatura de los compuestos el utilizó el software ChemDraw Professional 16.0.
- La visualización y preparación de los espectros de RMN- ^1H y NOESY se realizó con el software MestReNova. Mientras que, para visualizar y preparar los espectros de espectrometría de masas por APCI se realizó con el software TOF MS Driver.
- La preparación de los ligandos **01-12** se realizó con el software Spartan'10.
- La preparación de las macromoléculas y el acoplamiento molecular se realizó con AutoDockTools-1.5.6. La visualización de los acoplamientos moleculares fue con el software PyMOL 1.1.
- Para la visualización en 2D se utilizó el servidores de RCSB: Protein Data Bank. La conversión del archivo PDB de las poses del acoplamiento a formato SDF se realizó en el software OpenBabelGUI v2.1.6



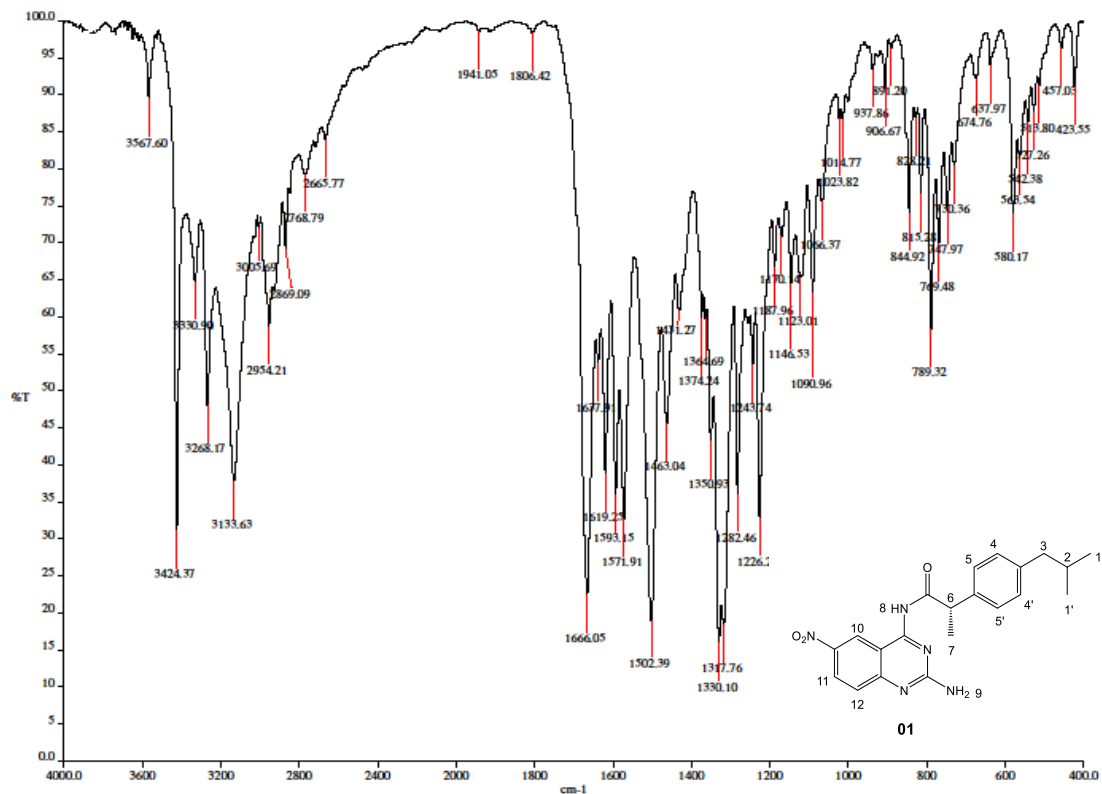
A continuación, se muestran los valores de cada uno de los parámetros de las reglas empíricas de Lipinsky y Veber que fueron considerados en el diseño de los compuestos finales.

Tabla 9. Parámetros teóricos calculados con el software MolPrime+ v.1.2.7 considerados en el diseño de los compuestos híbridos.

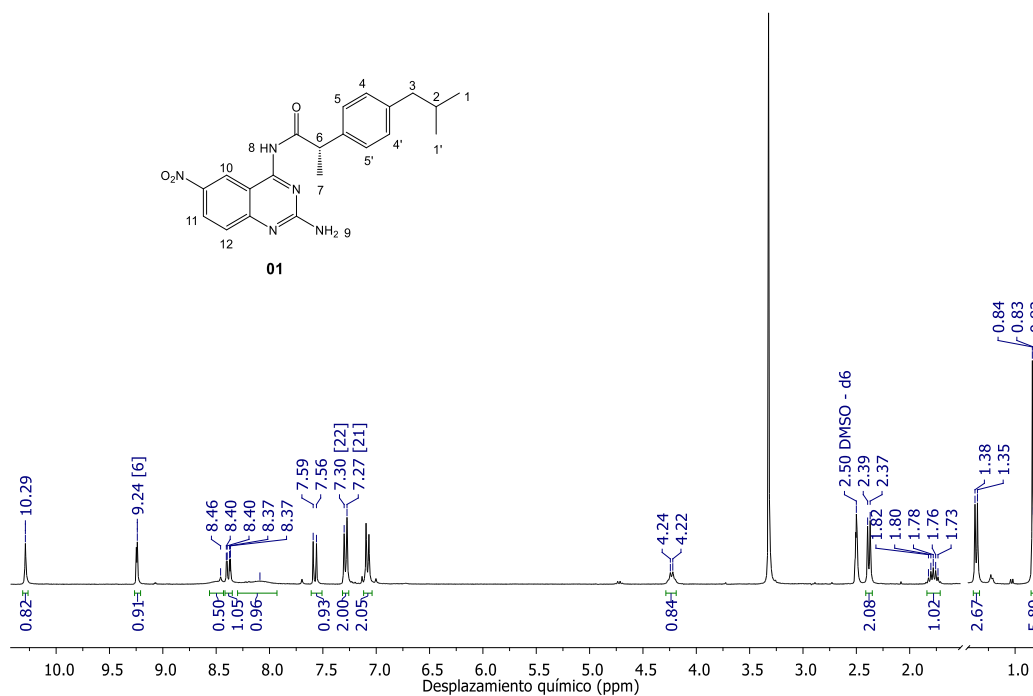
Compuesto	Peso molecular (g/mol)	Enlaces rotables	Átomos donadores de H	Átomos aceptores de H	Log P	PSA (Å ²)
01	393.43	7	2	7	4.06	87.53
02	363.45	6	3	6	3.73	78.15
03	417.41	6	2	8	4.02	109.13
04	387.43	5	3	7	3.70	98.23
05	435.48	9	2	8	4.43	95.85
06	405.49	8	3	7	4.11	88.34
07	459.45	8	2	9	4.40	118.39
08	429.47	7	3	8	4.07	107.30
09	378.42	7	1	6	4.48	81.9
10	348.44	6	2	5	4.15	75.23
11	402.40	6	1	7	4.44	102.65
12	372.42	5	2	6	4.12	93.51



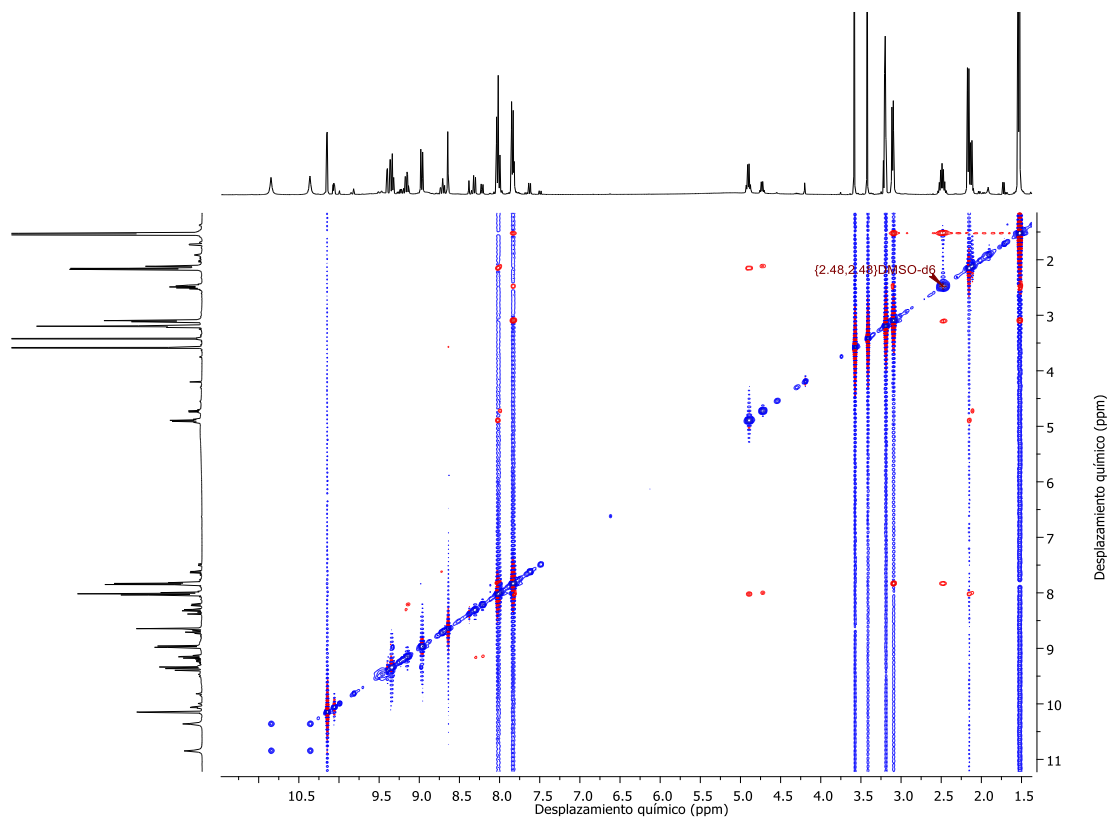
ANEXO II: Caracterización



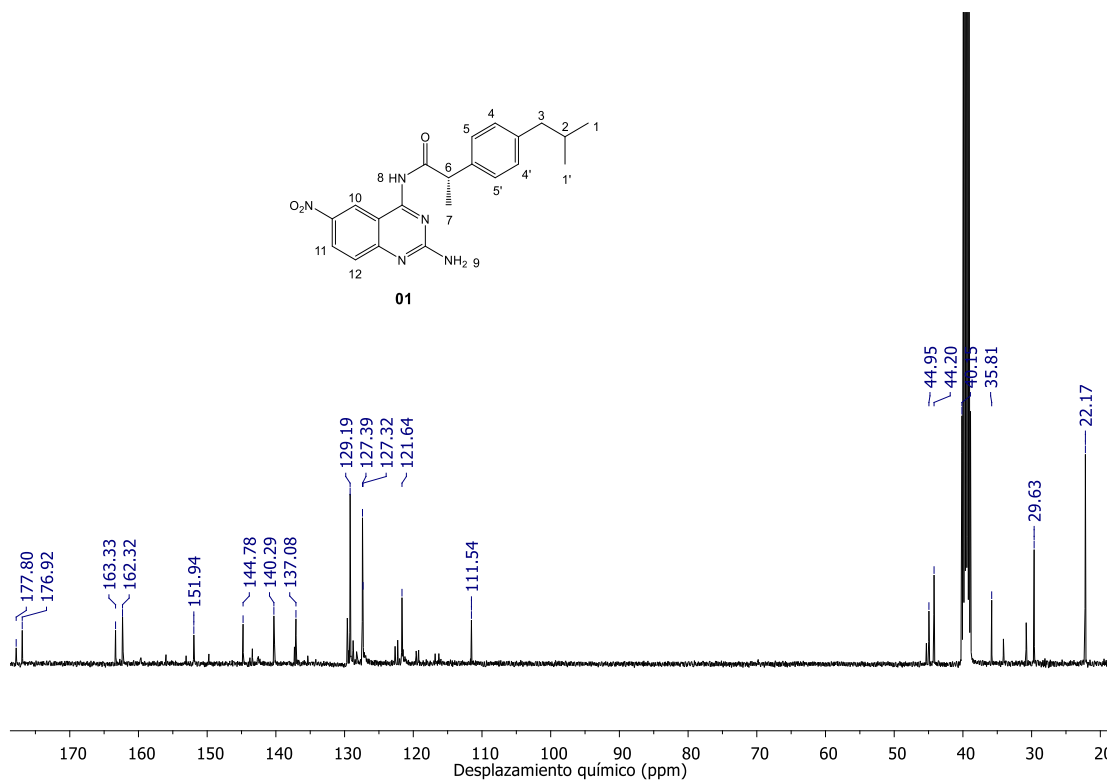
Espectro 1. IR-ATR del compuesto **01**.



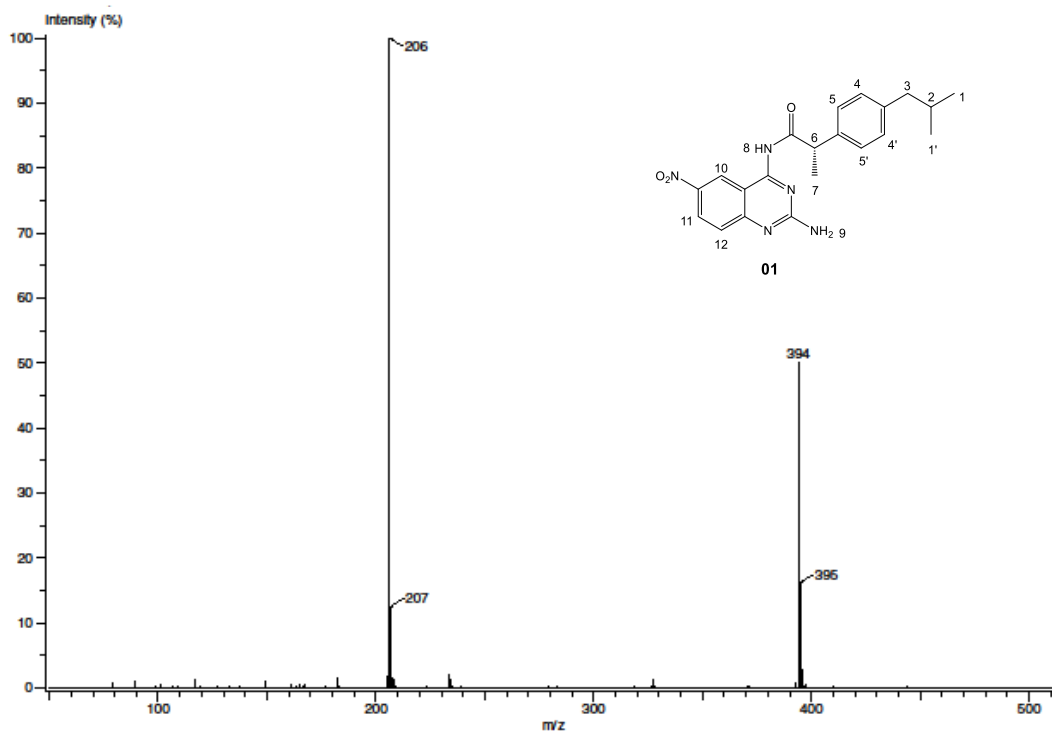
Espectro 2. RMN-¹H del compuesto **01** (DMSO-d₆, 400 MHz).



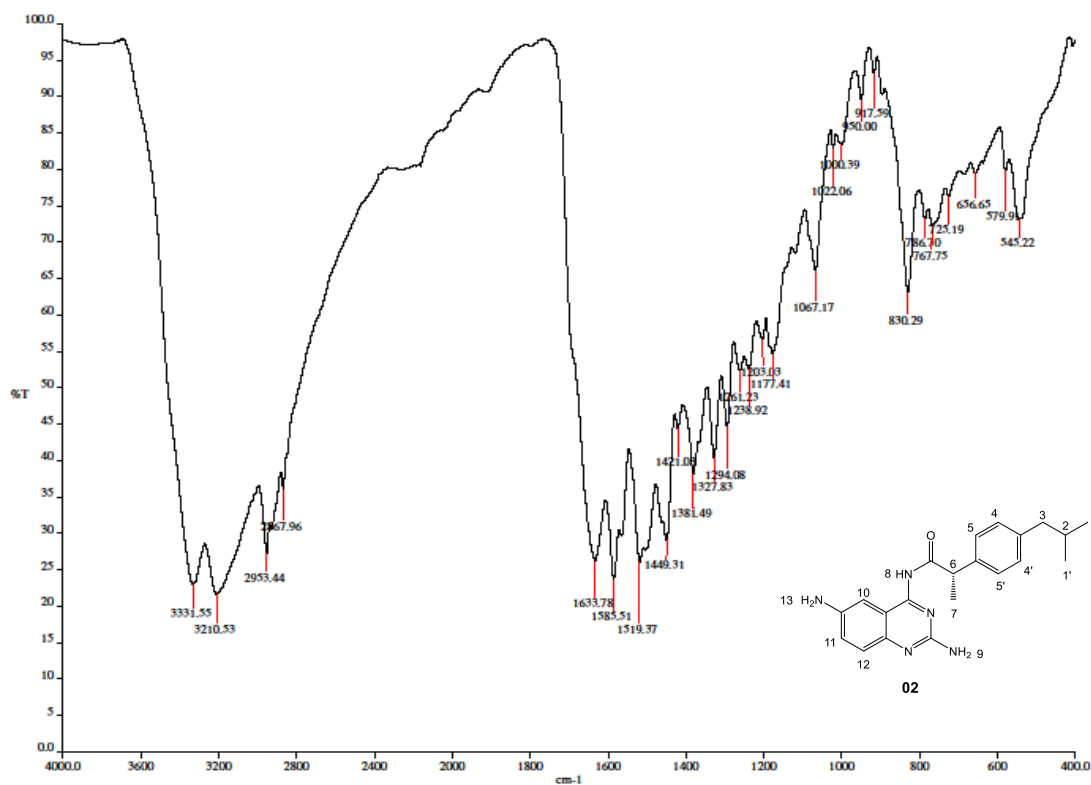
Espectro 3. NOESY del compuesto **01** (DMSO-d₆, 400 MHz).



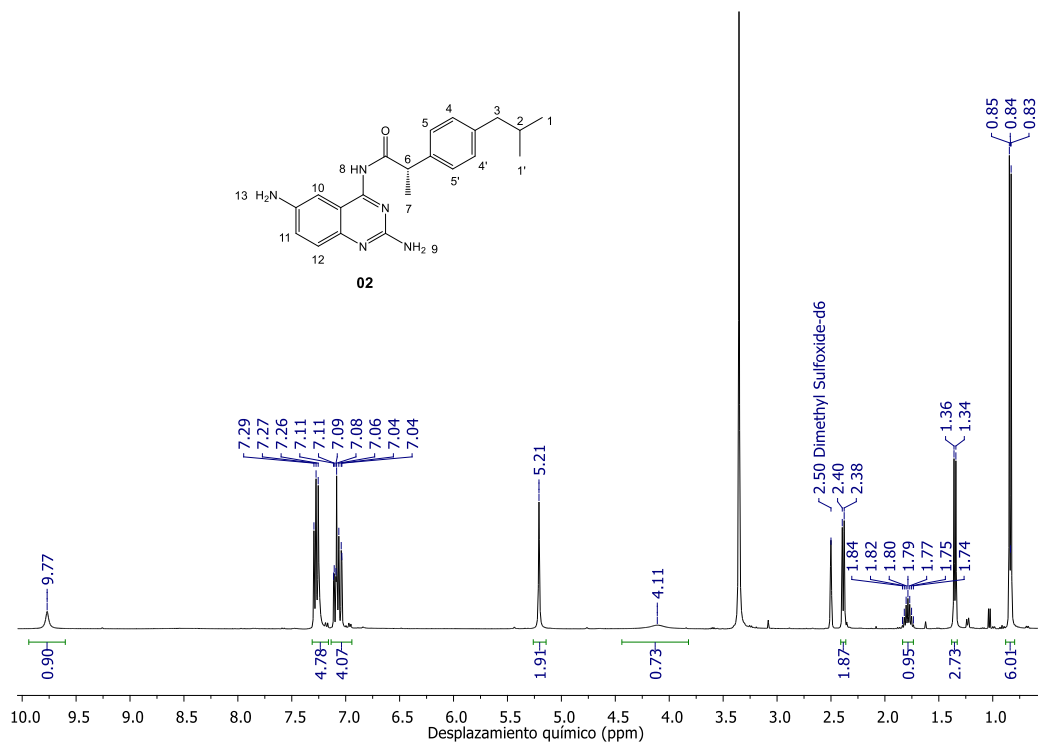
Espectro 4. RMN-¹³C del compuesto **01** (DMSO-d₆, 400 MHz).



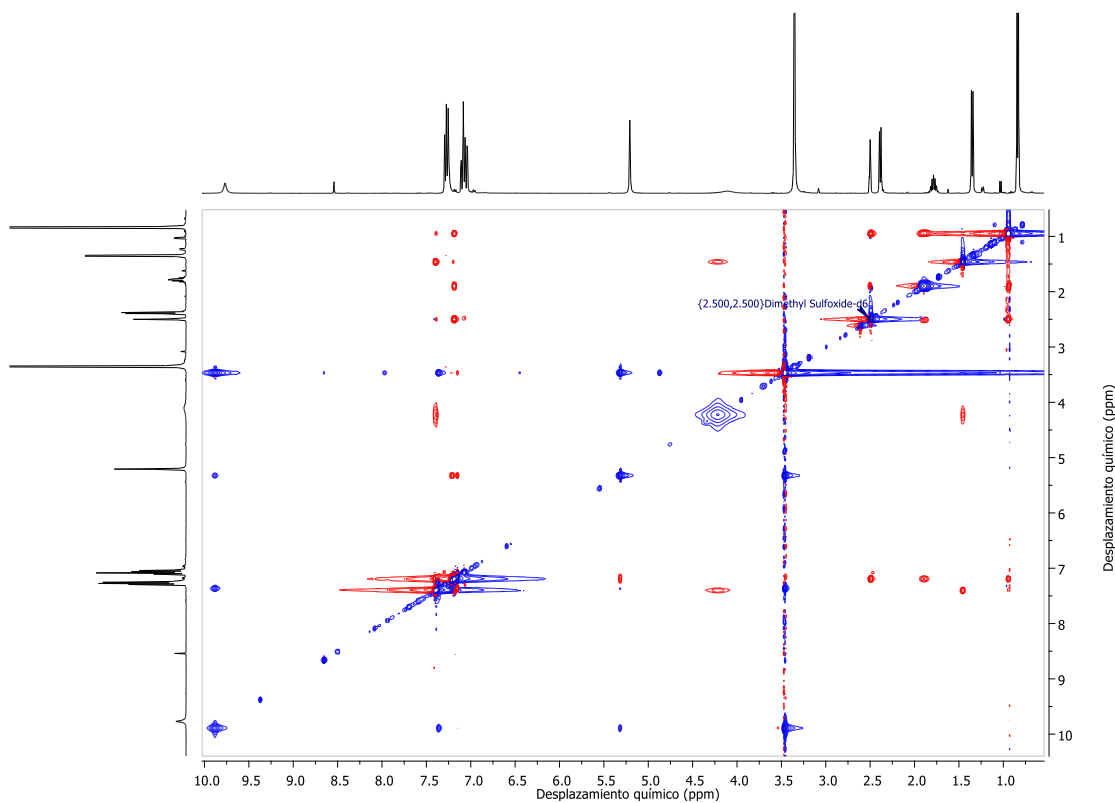
Espectro 5. EM-DART del compuesto 01.



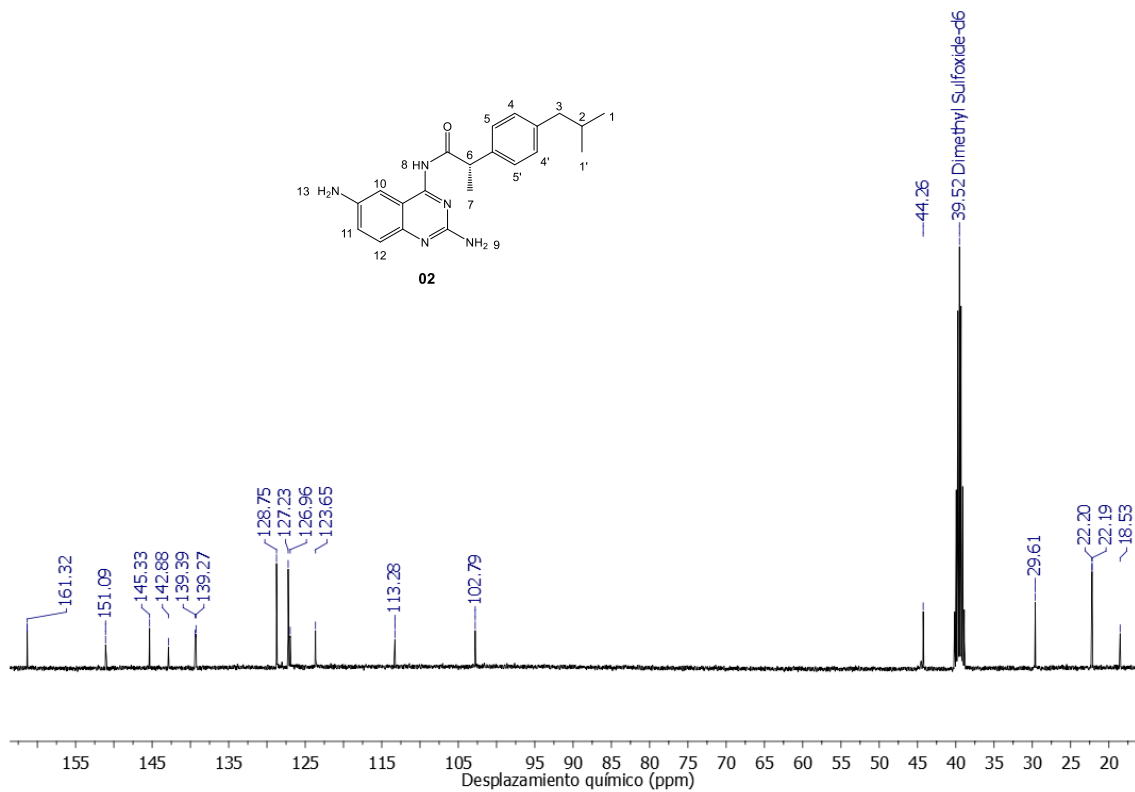
Espectro 6. IR-ATR del compuesto 02.



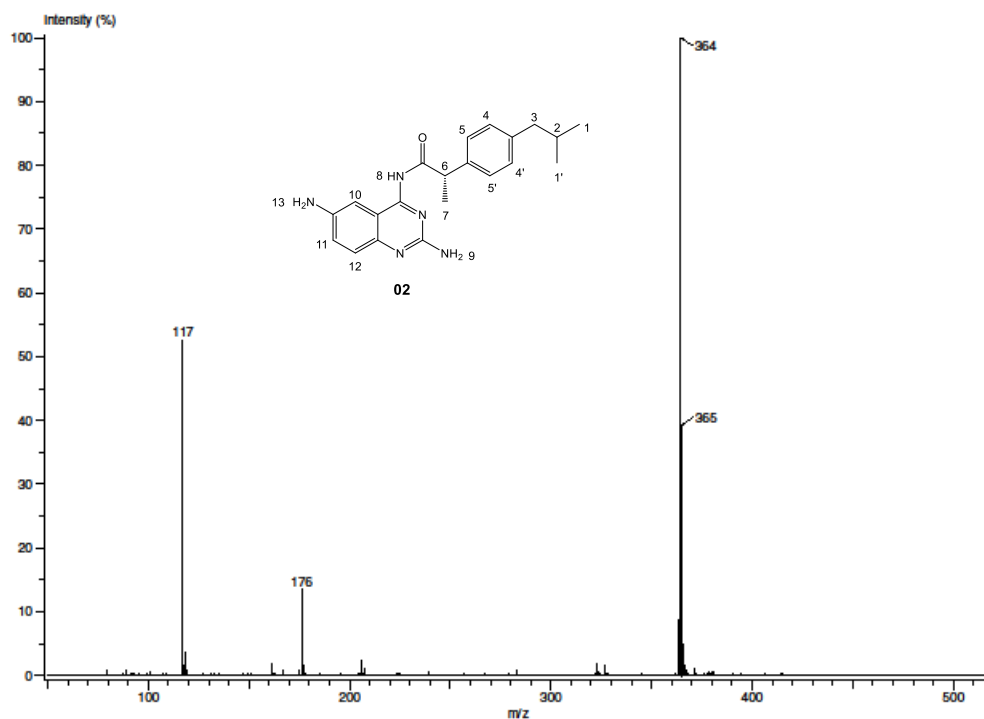
Espectro 7. RMN-¹H del compuesto **02** (DMSO-d₆, 400 MHz).



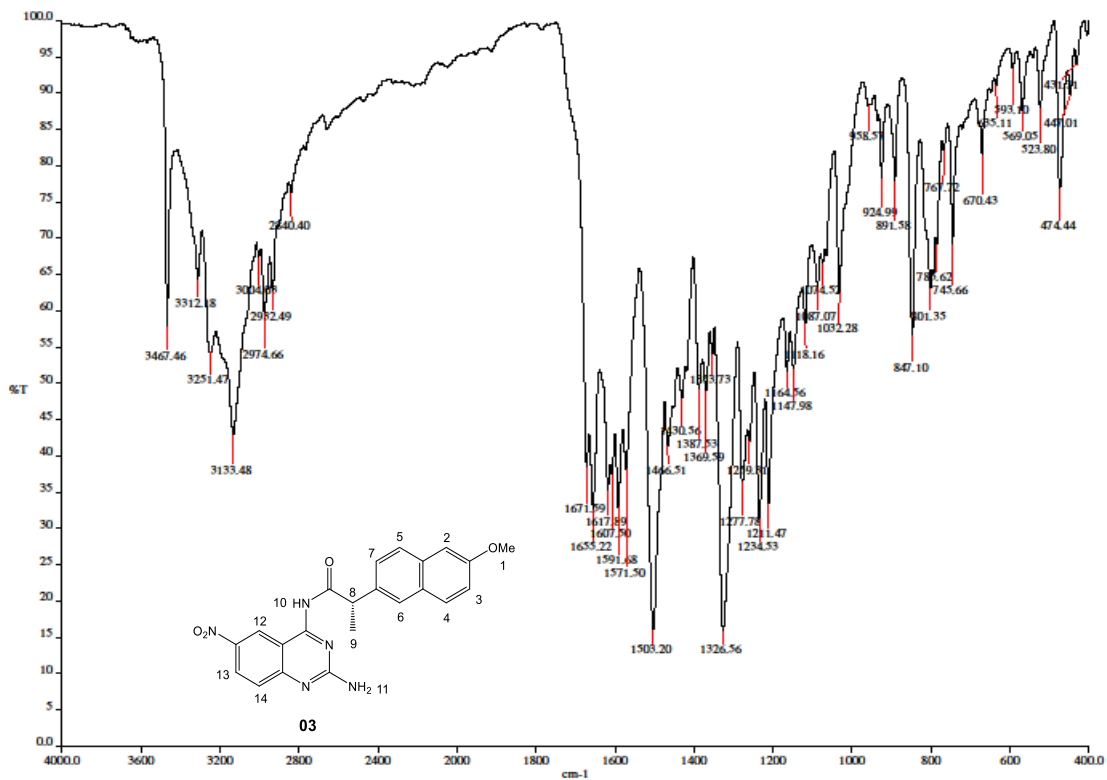
Espectro 8. NOESY del compuesto **02** (DMSO-d₆, 400 MHz).



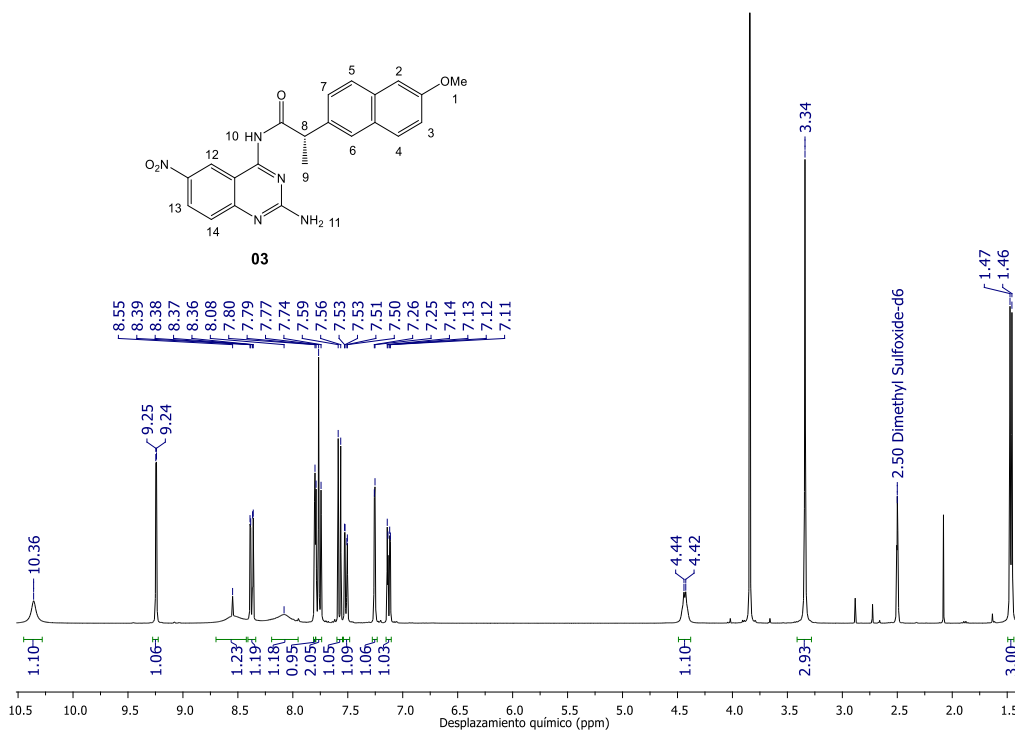
Espectro 9. RMN-¹³C del compuesto **02** (DMSO-d₆, 400 MHz).



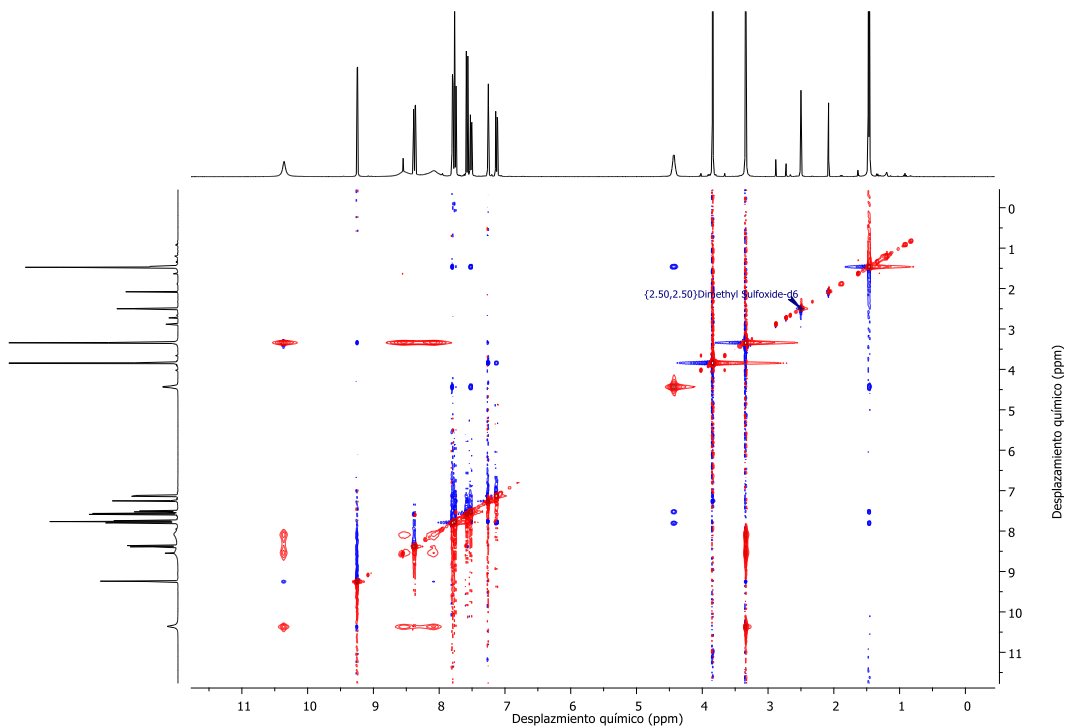
Espectro 10. EM-DART del compuesto **02**.



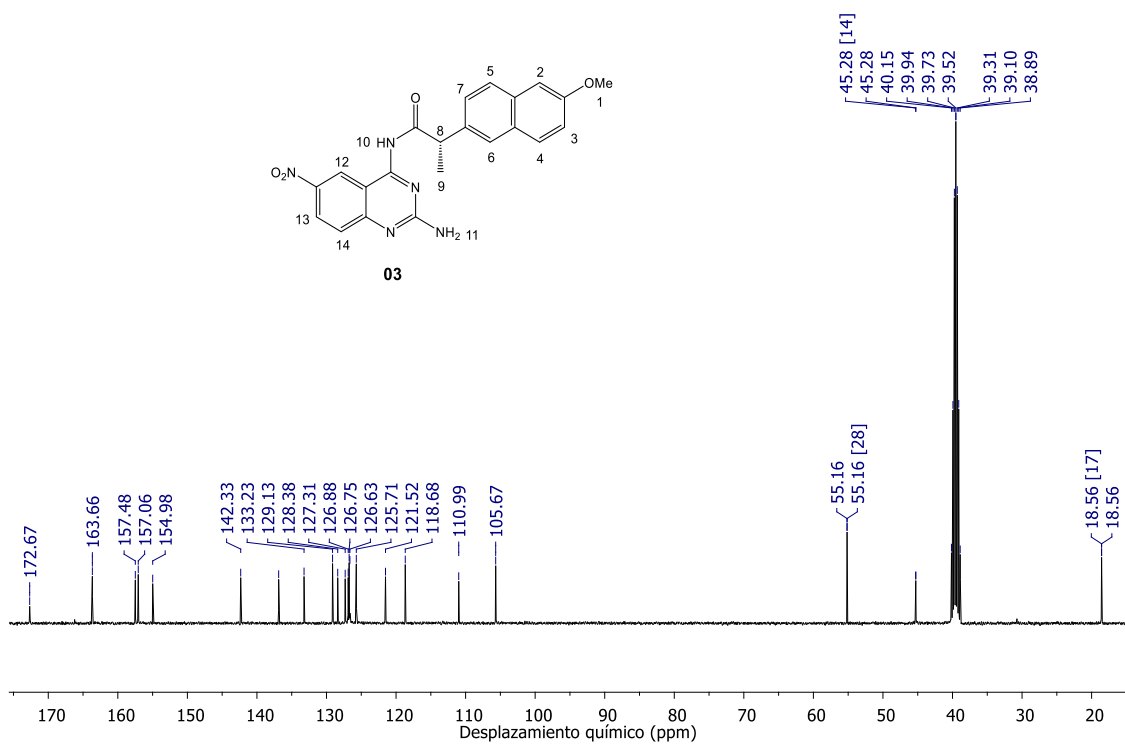
Espectro 11. IR-ATR del compuesto **03**.



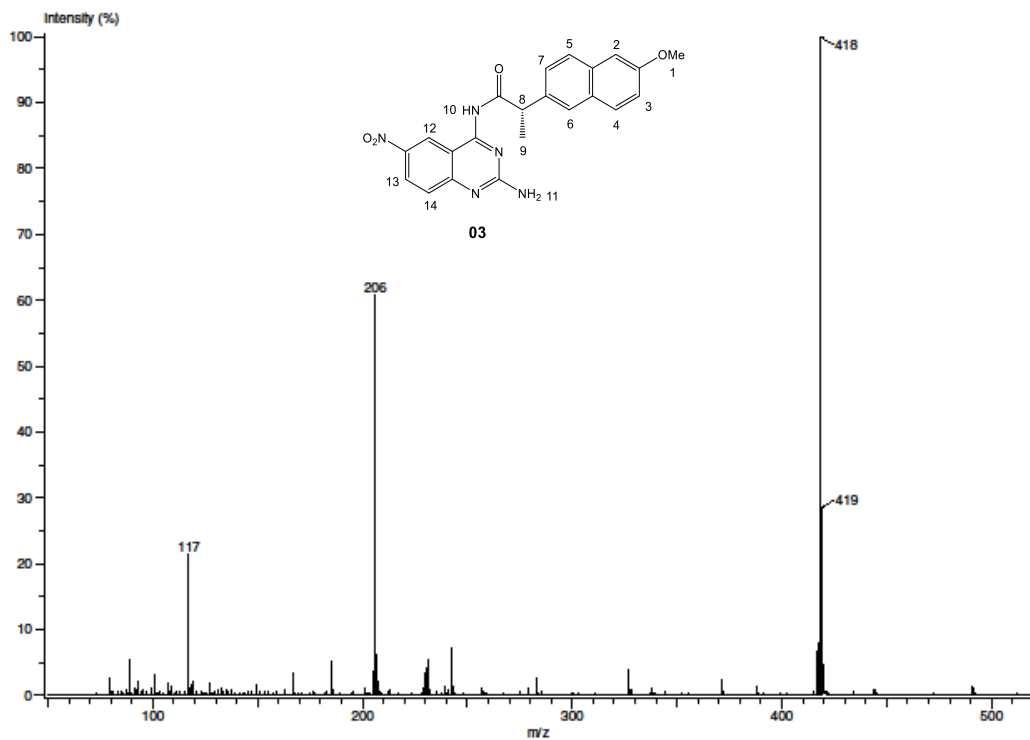
Espectro 12. RMN-¹H del compuesto **03** (DMSO-d₆, 400 MHz).



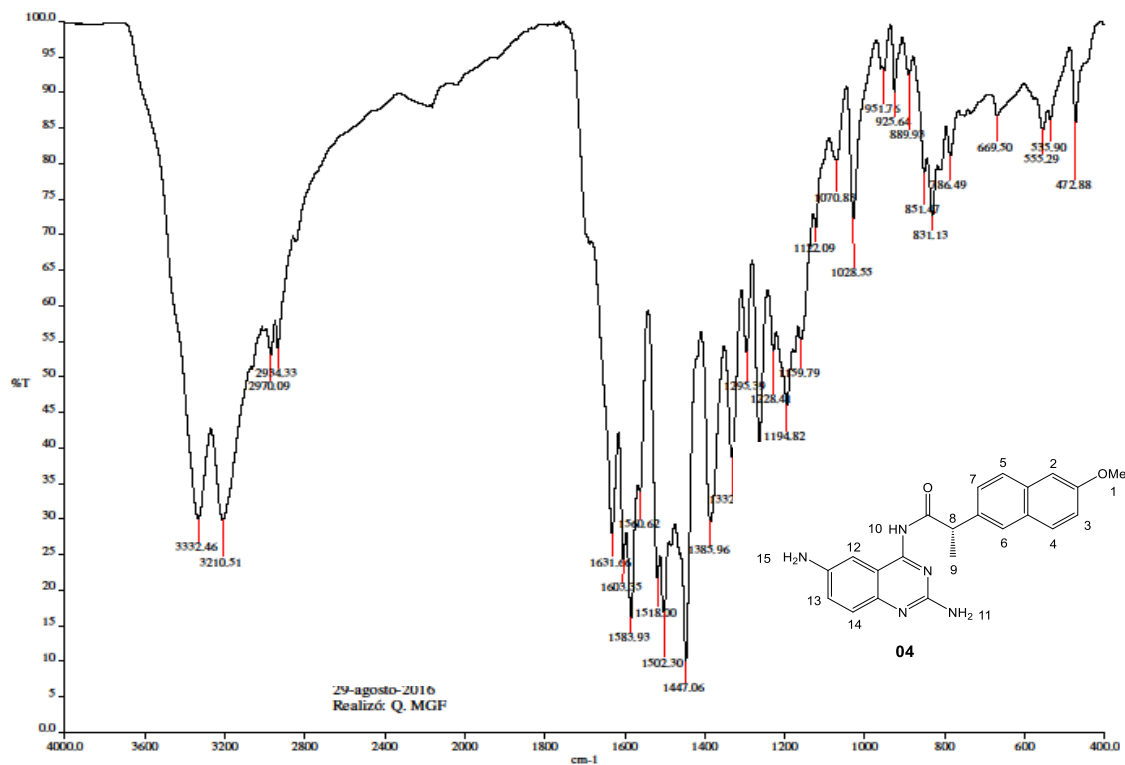
Espectro 13. NOESY del compuesto **03** (DMSO-d₆, 400 MHz).



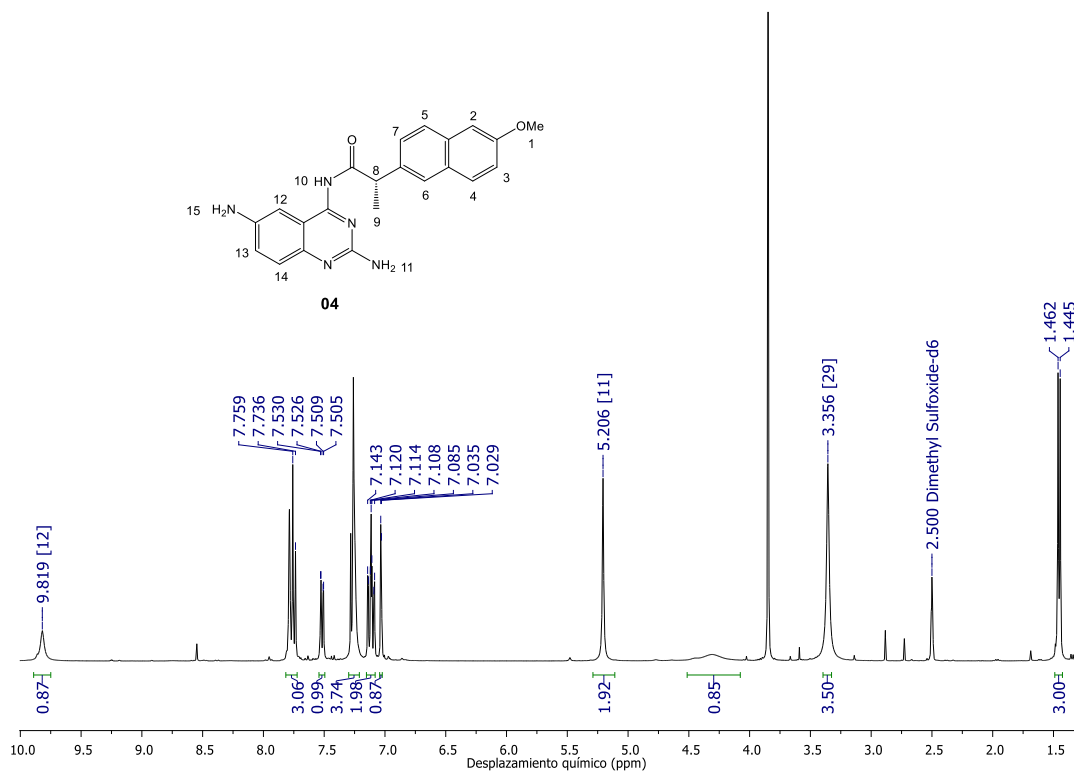
Espectro 14. RMN-¹³C del compuesto **03** (DMSO-d₆, 400 MHz).



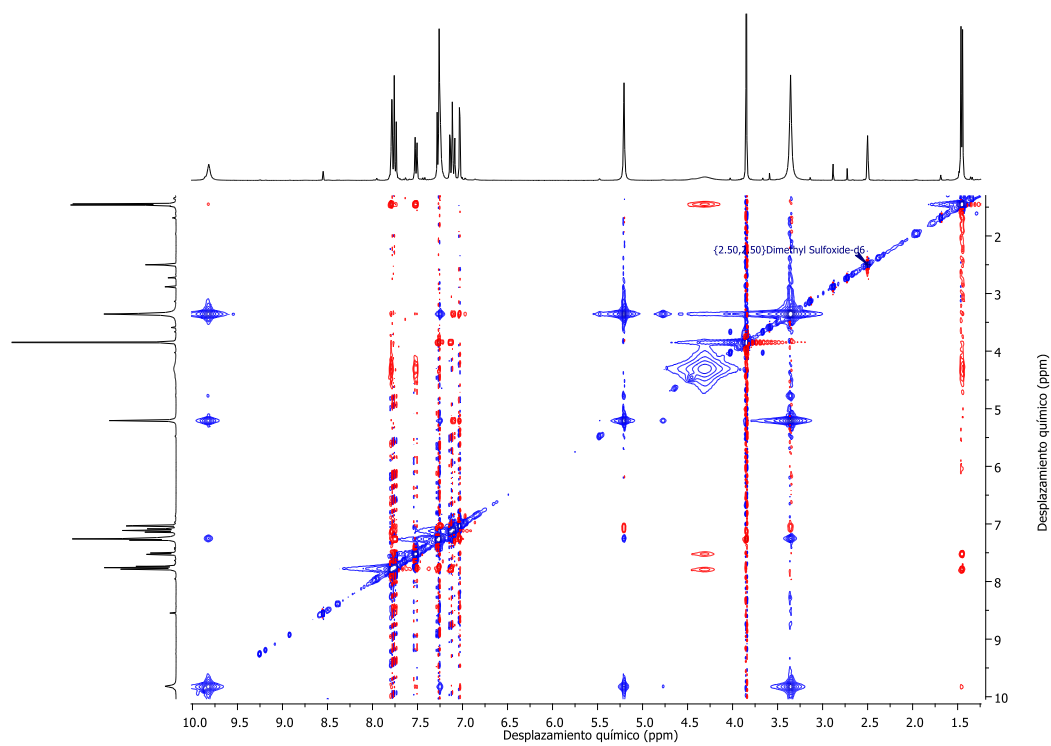
Espectro 15. EM-DART del compuesto 03.



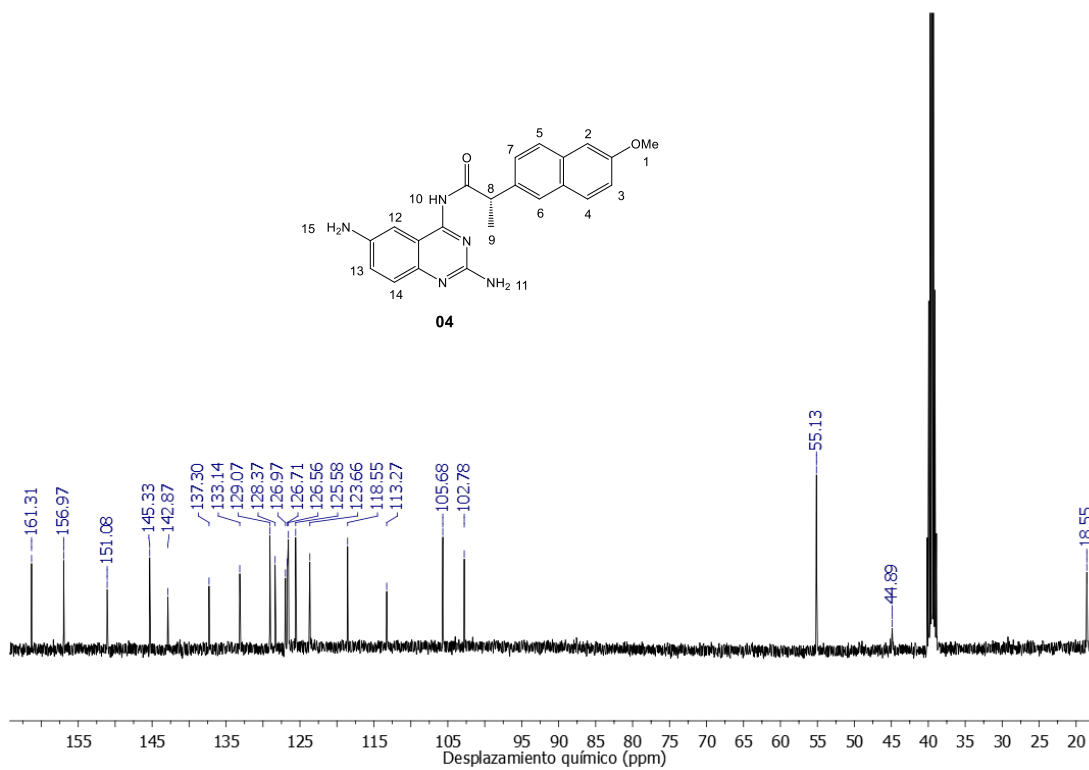
Espectro 16. IR-ATR del compuesto 04.



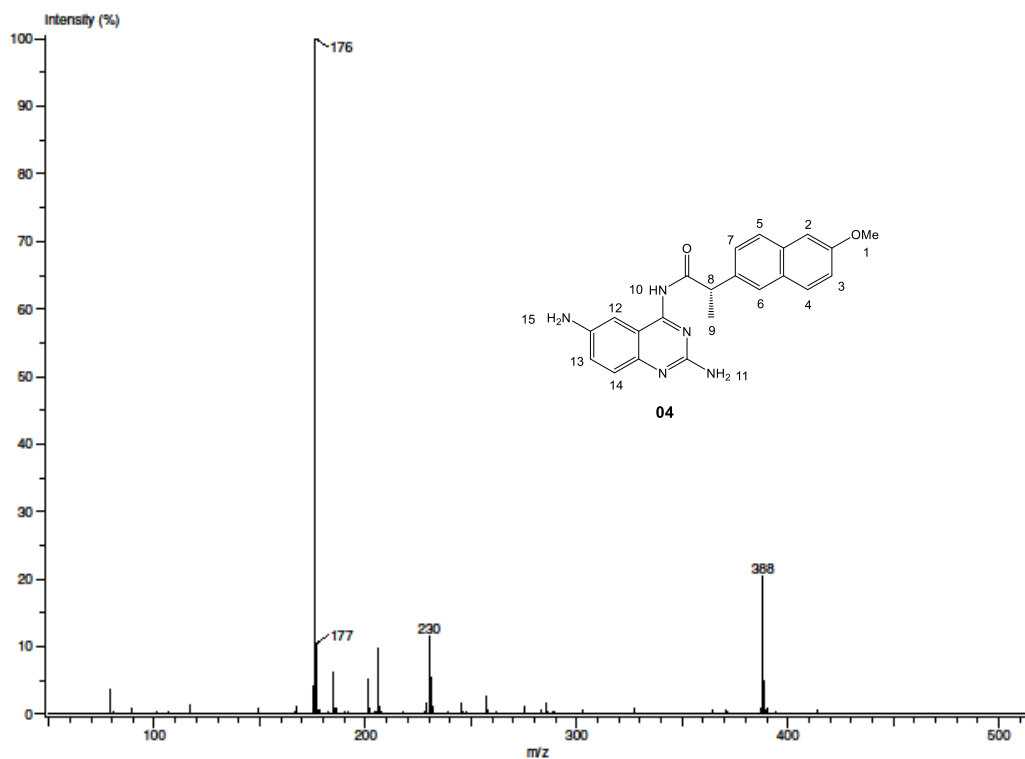
Espectro 17. RMN-¹H del compuesto **04** (DMSO-d₆, 400 MHz).



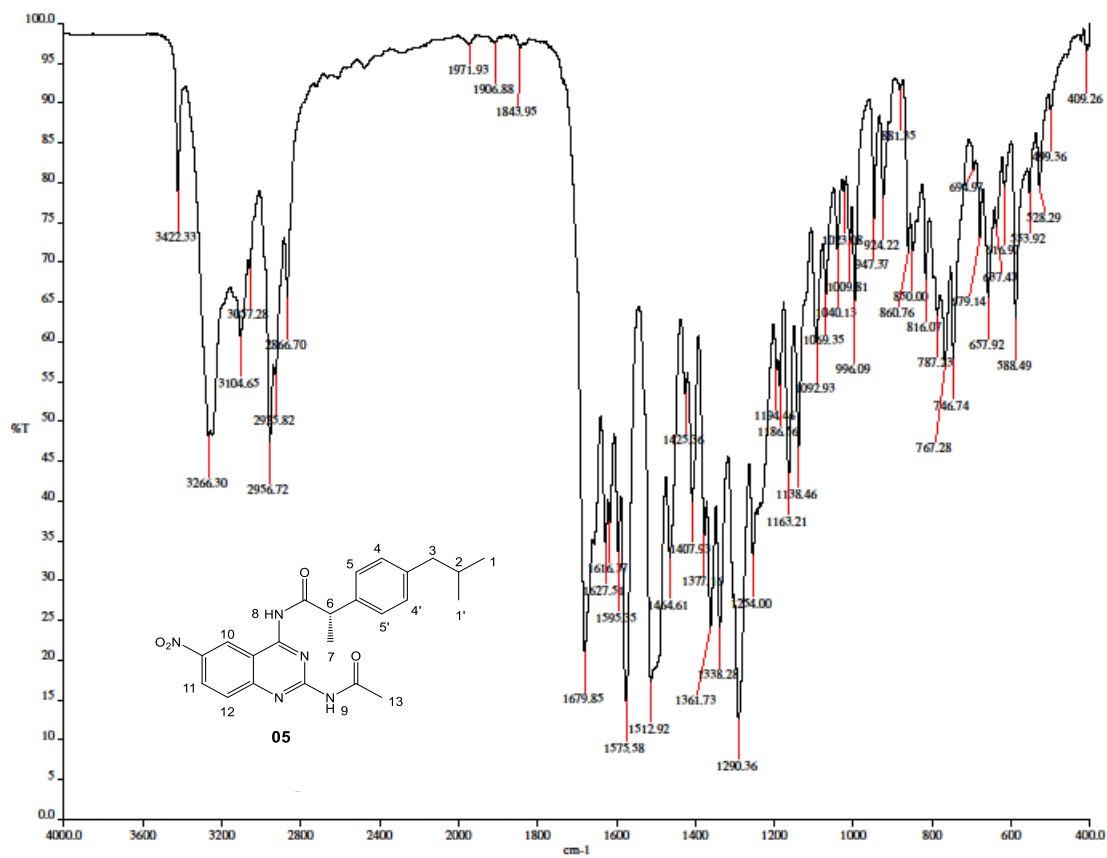
Espectro 18. NOESY del compuesto **04** (DMSO-d₆, 400 MHz).



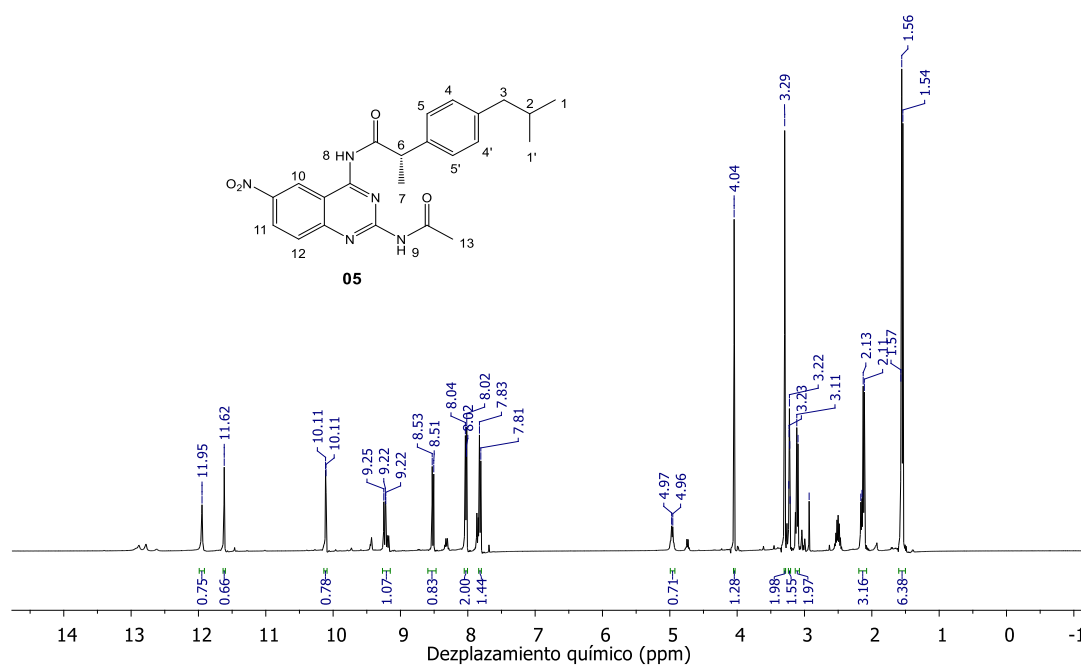
Espectro 19. RMN-¹³C del compuesto **04** (DMSO-d₆, 400 MHz).



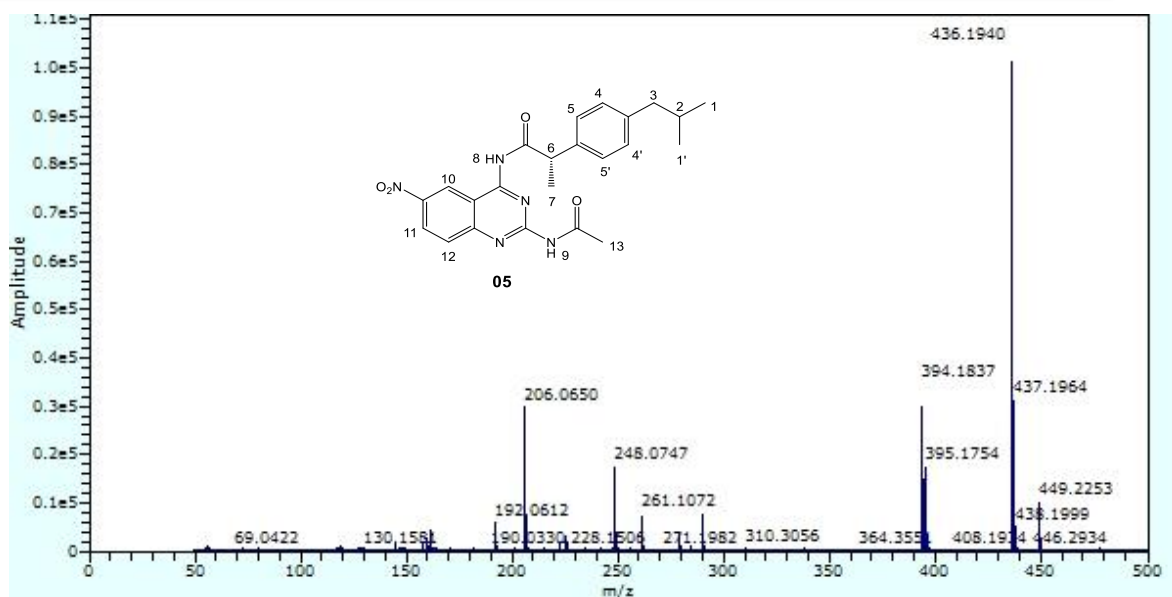
Espectro 20. EM-DART del compuesto **04**.



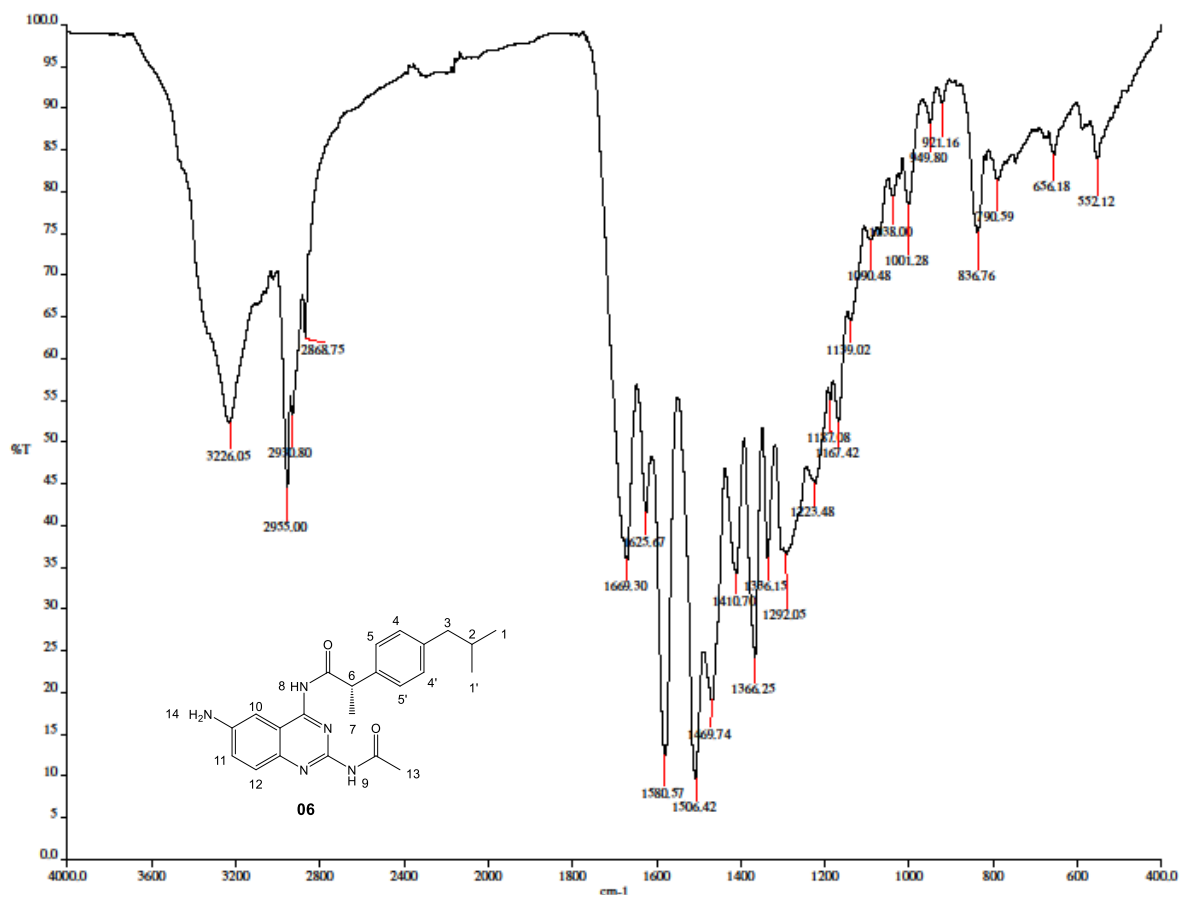
Espectro 21. IR-ATR del compuesto **05**.



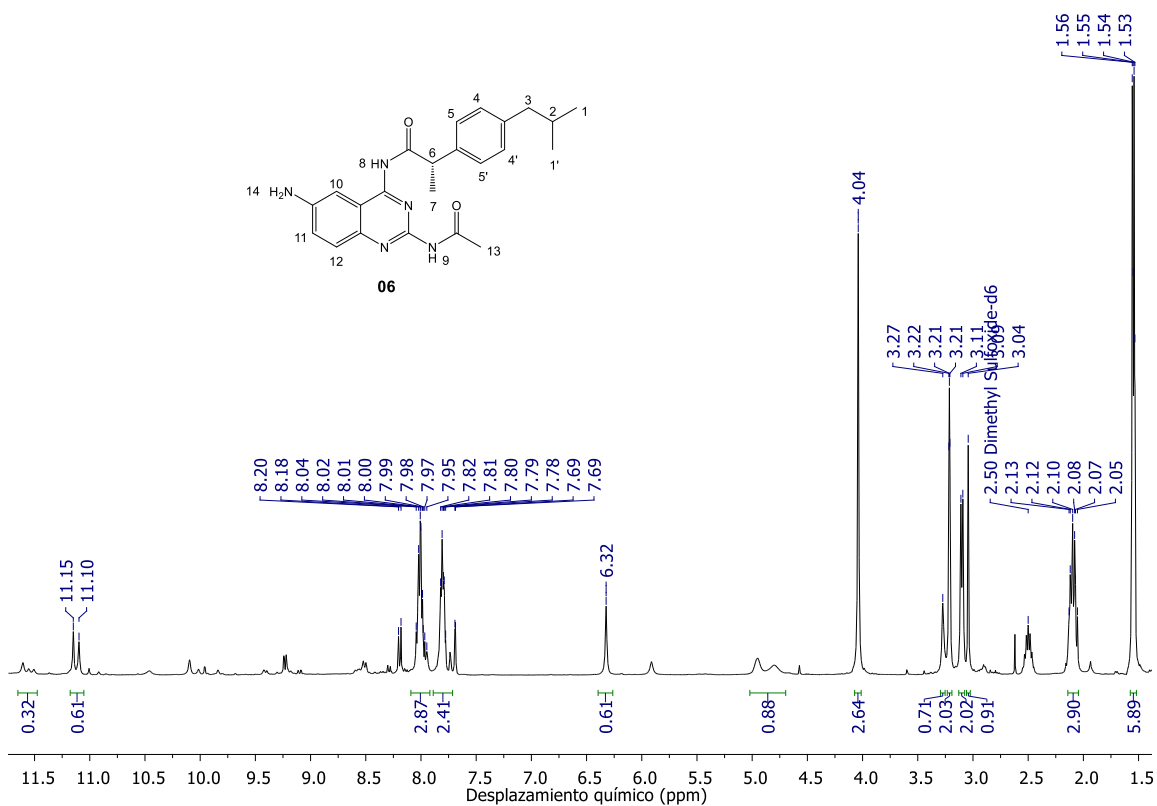
Espectro 22. RMN-¹H del compuesto **05** (DMSO-d₆, 400 MHz).



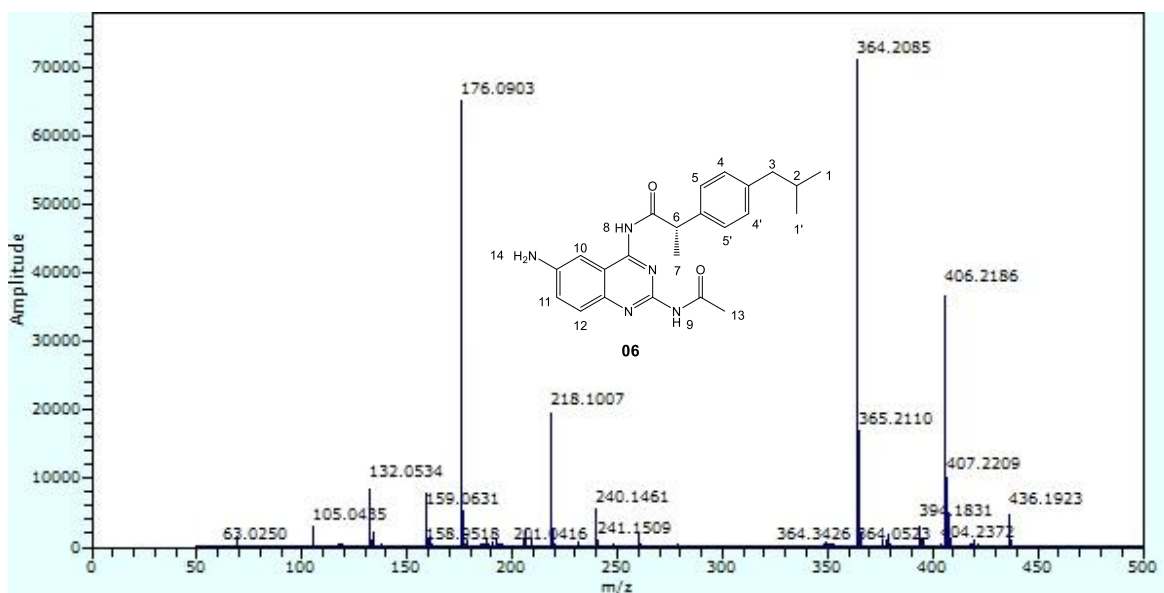
Espectro 23. EM-APCI del compuesto **05**.



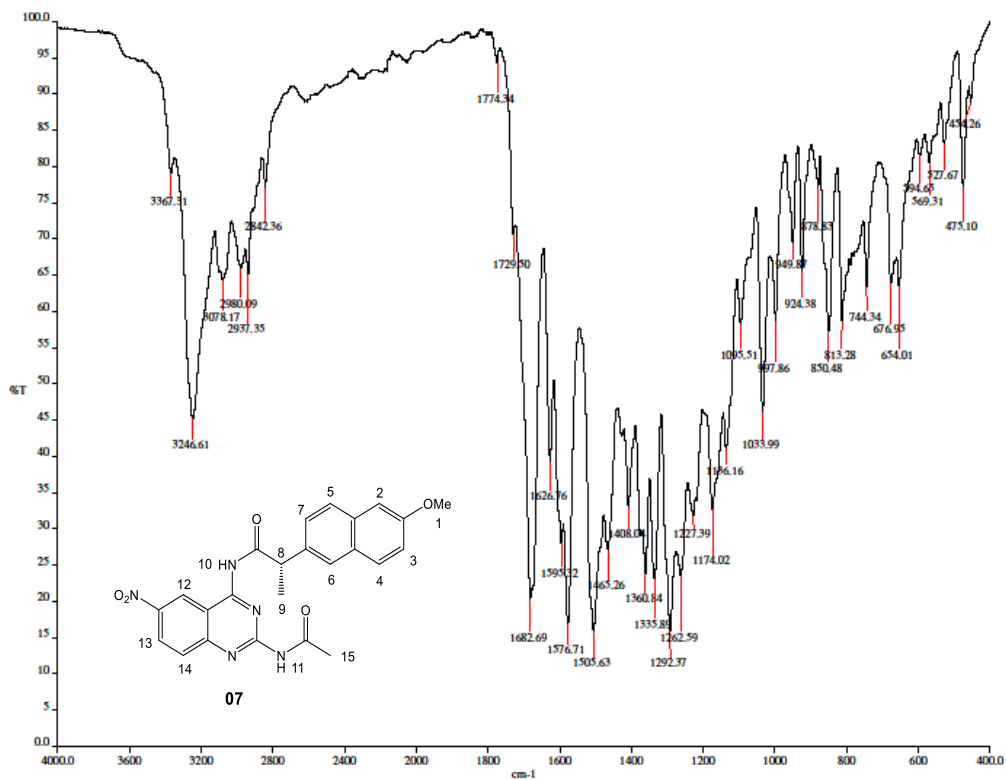
Espectro 24. IR-ATR del compuesto **06**.



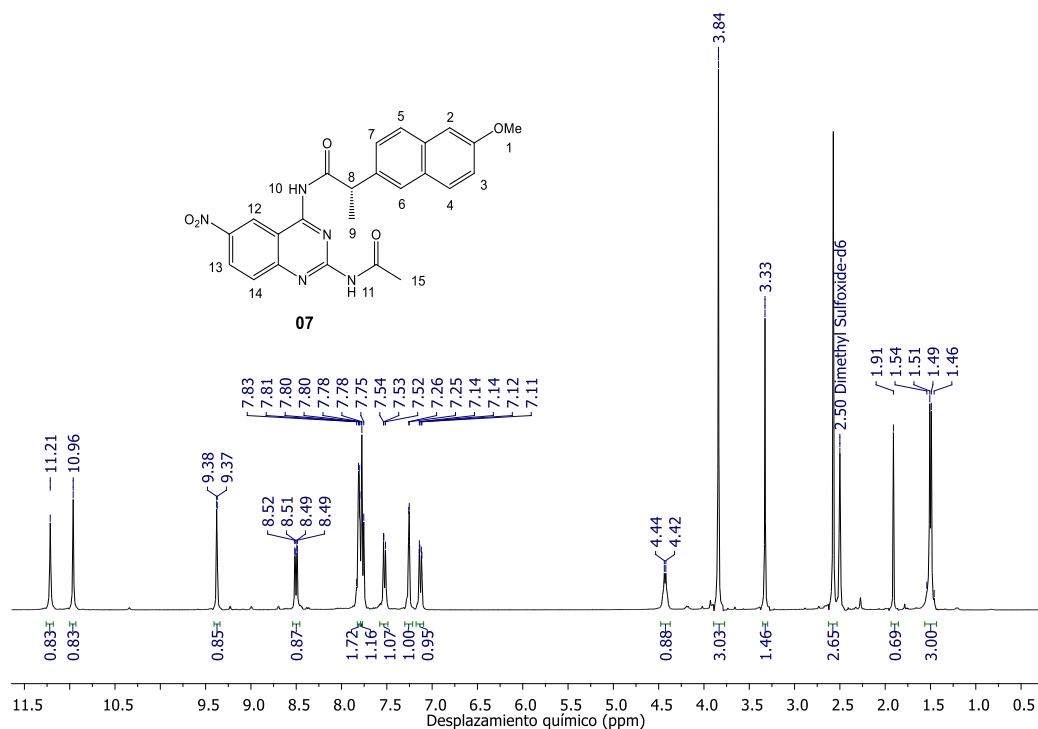
Espectro 25. RMN-¹H del compuesto **06** (DMSO-d₆, 400 MHz).



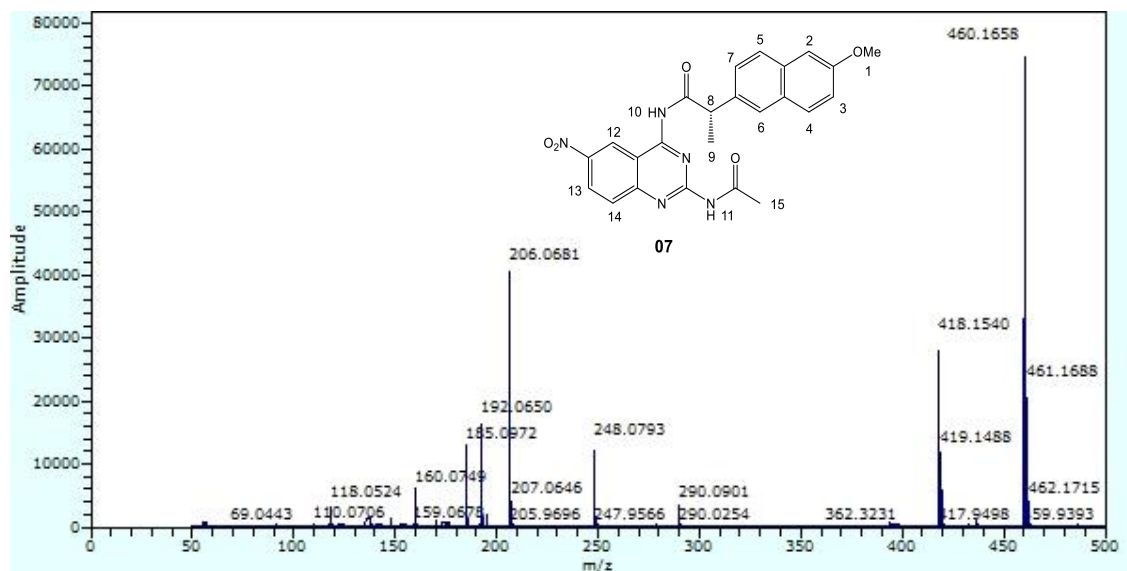
Espectro 26. EM-APCI del compuesto **06**.



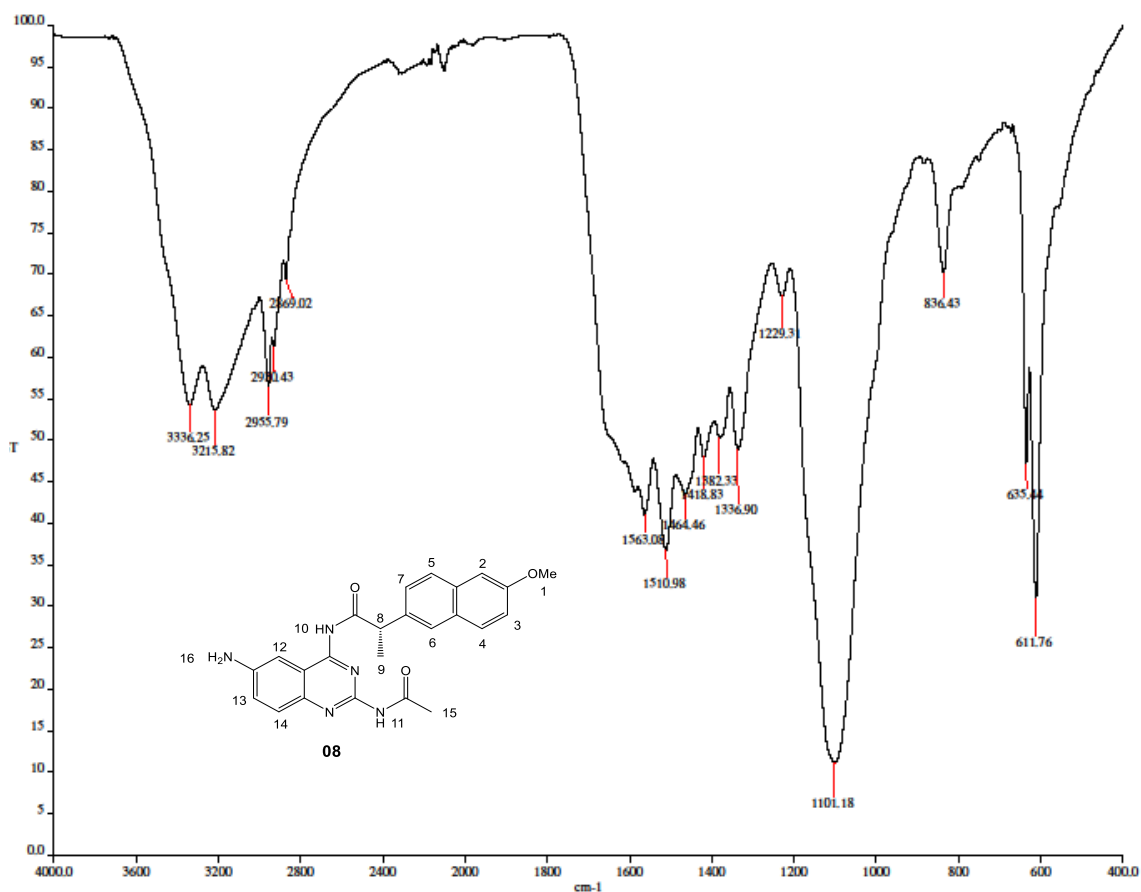
Espectro 27. IR-ATR del compuesto **07**.



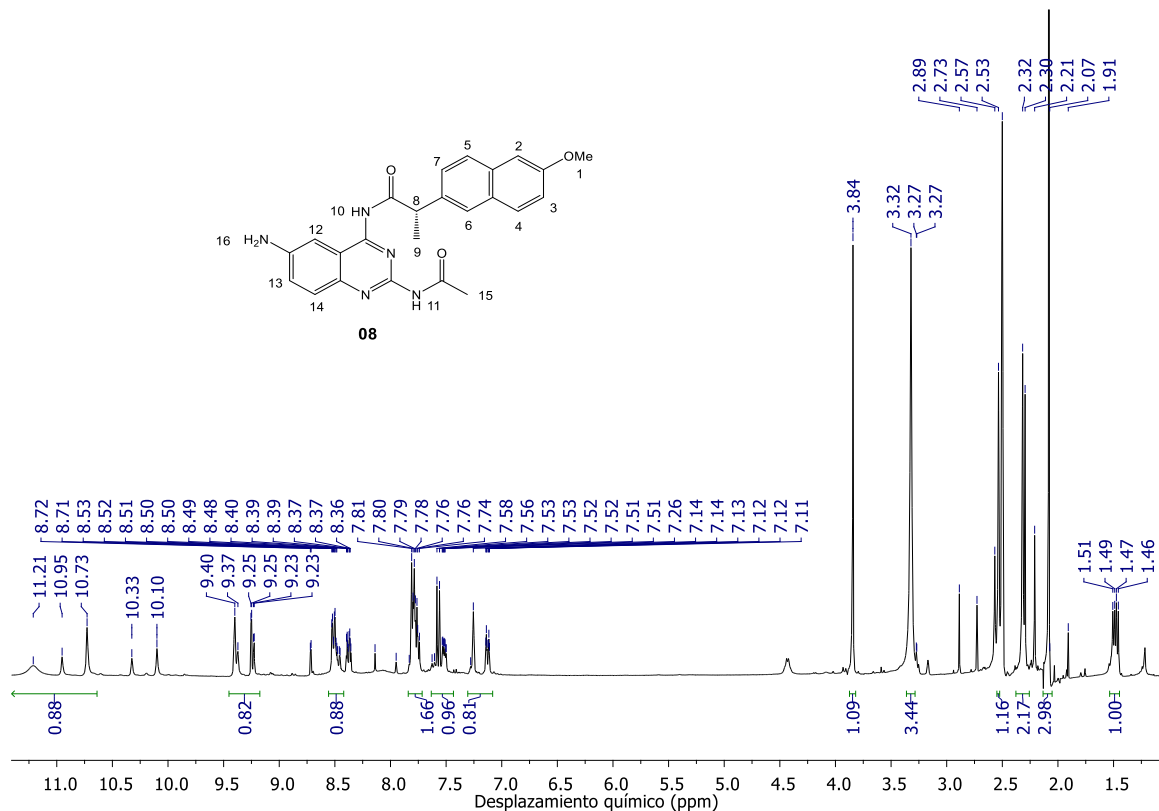
Espectro 28. RMN-¹H del compuesto **07** (DMSO-d₆, 400 MHz).



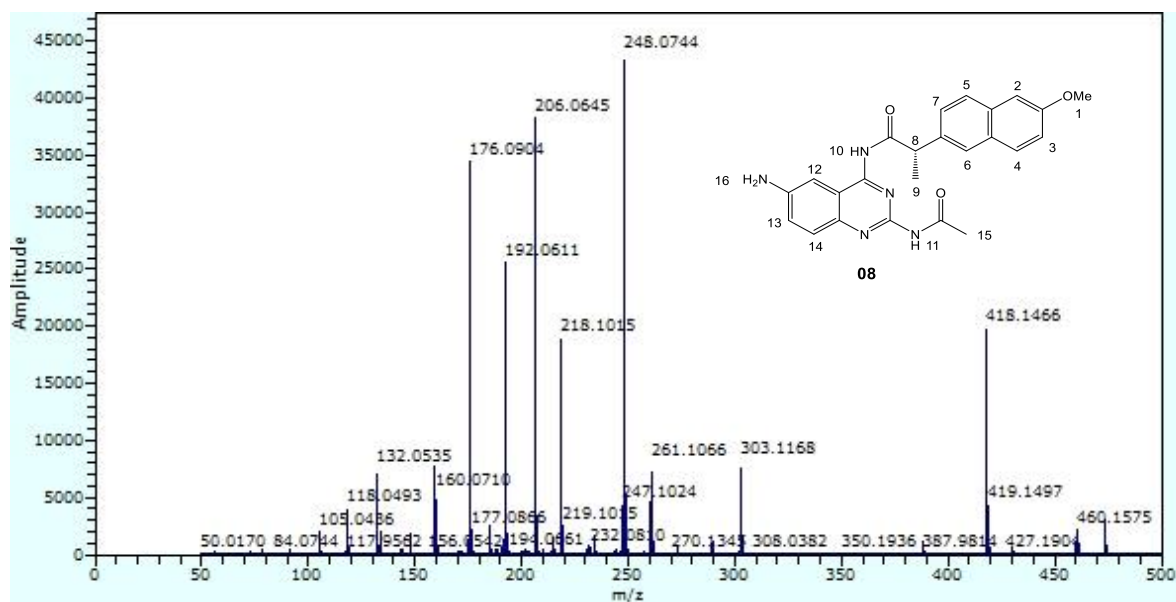
Espectro 29. EM-APCI del compuesto **07**.



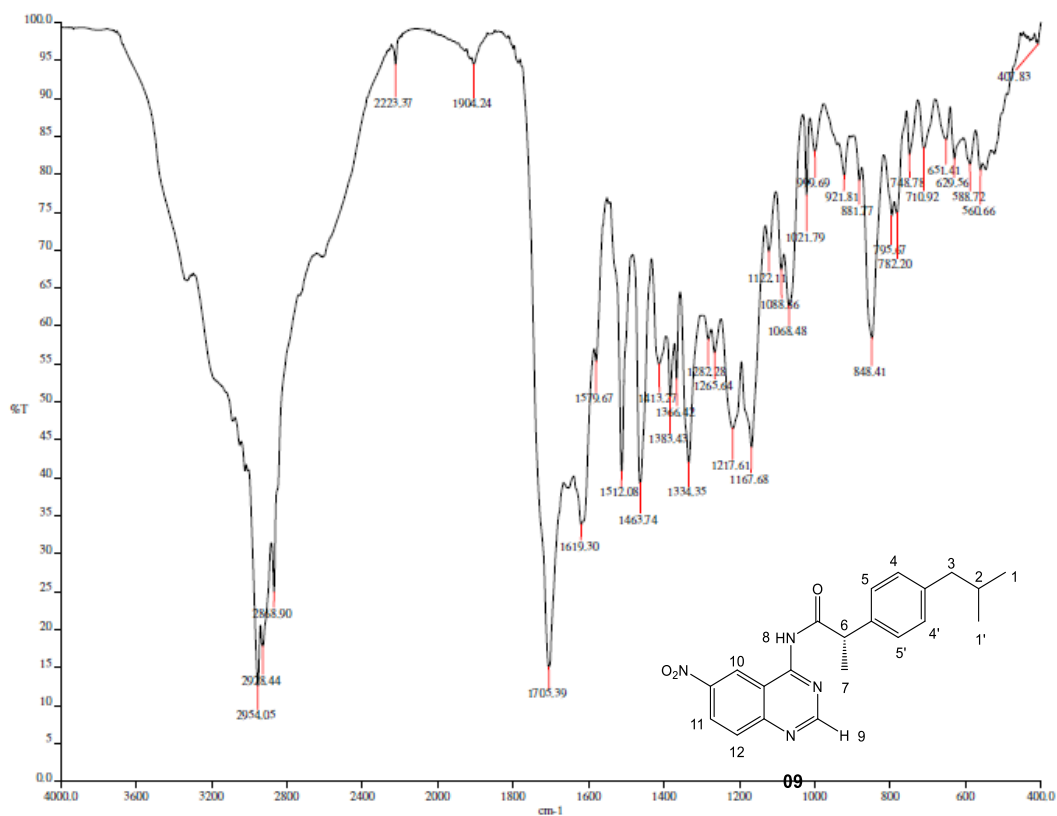
Espectro 30. IR-ATR del compuesto **08**.



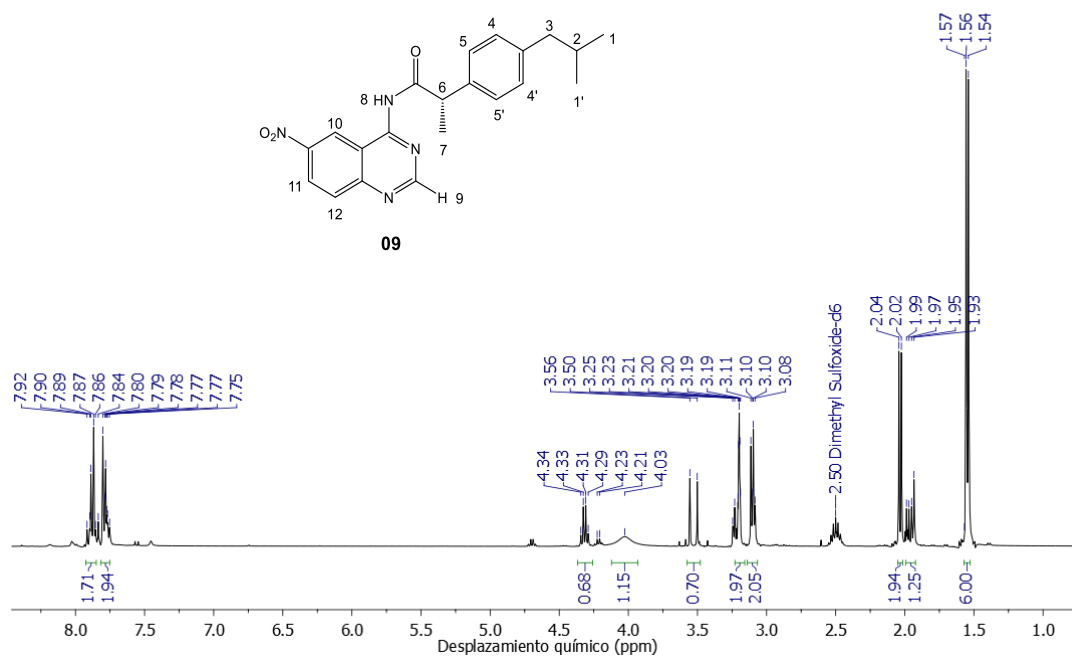
Espectro 31. RMN-¹H del compuesto **08** (DMSO-d₆, 400 MHz).



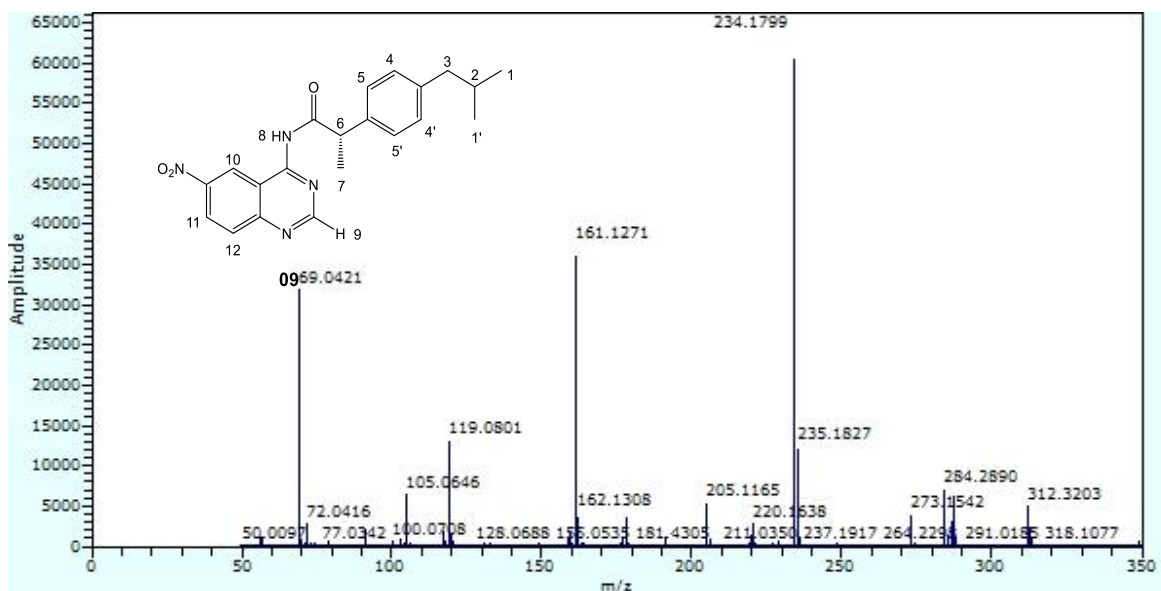
Espectro 32. EM-APCI del compuesto **08**.



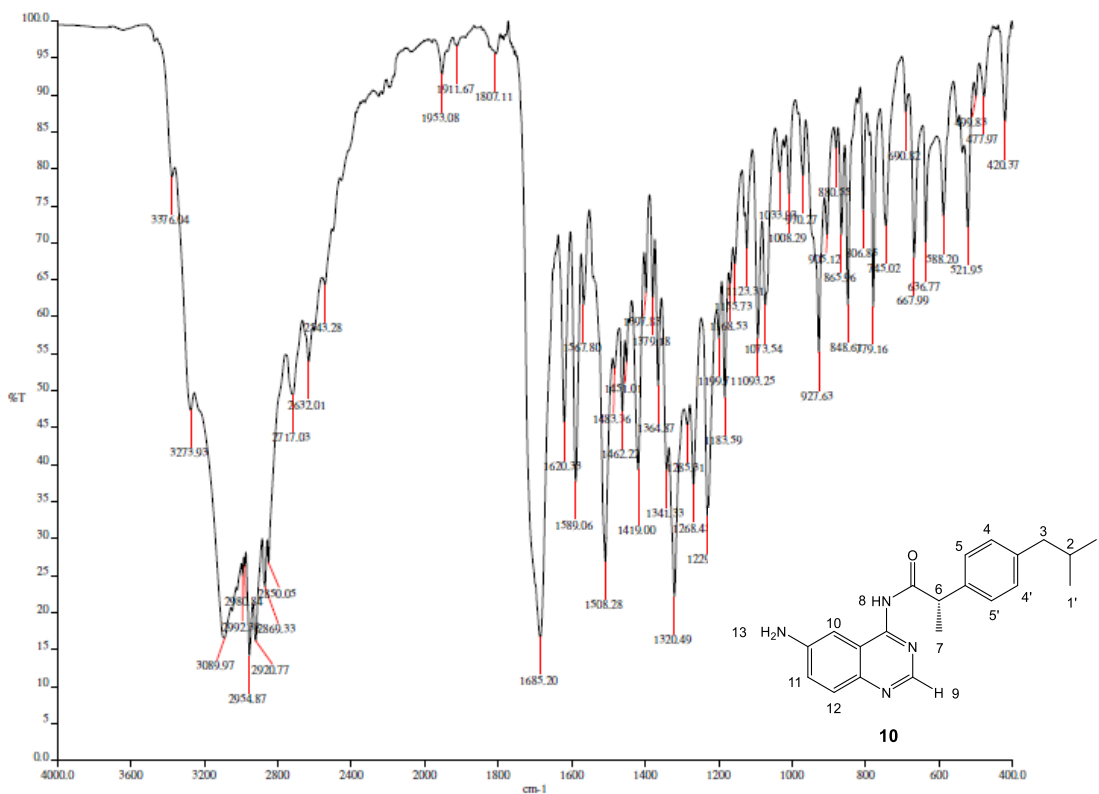
Espectro 33. IR-ATR del compuesto **09**.



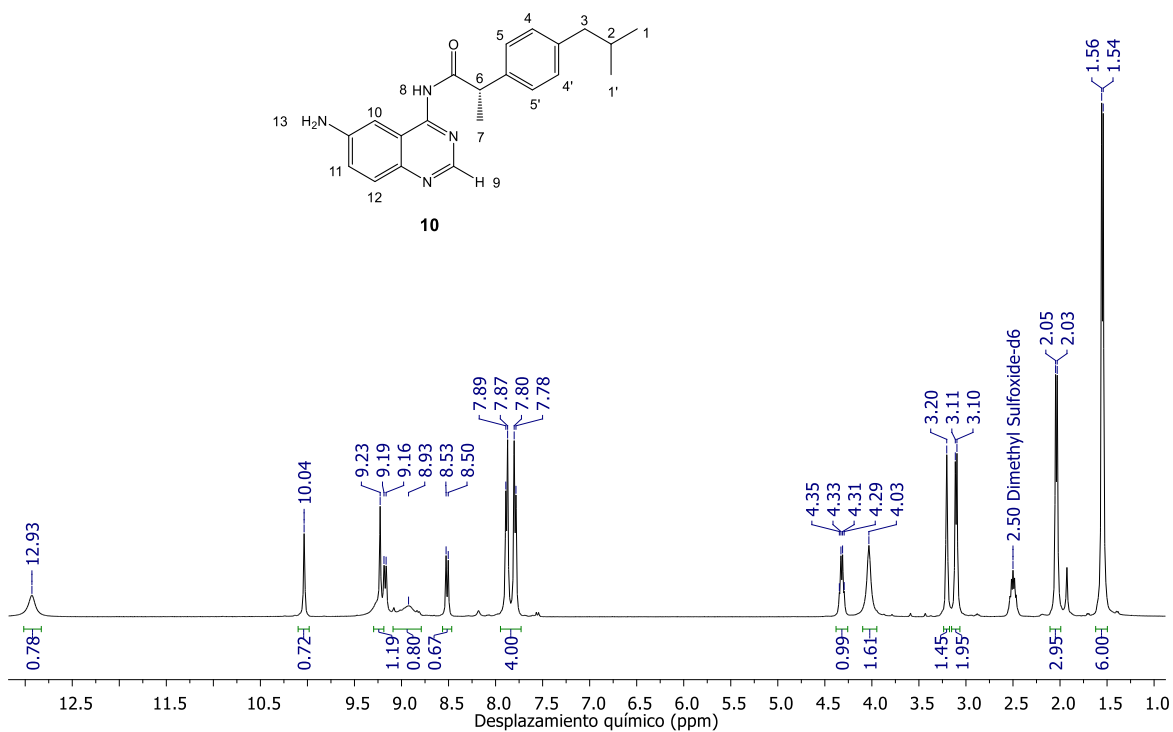
Espectro 34. RMN-¹H del compuesto **09** (DMSO-d₆, 400 MHz).



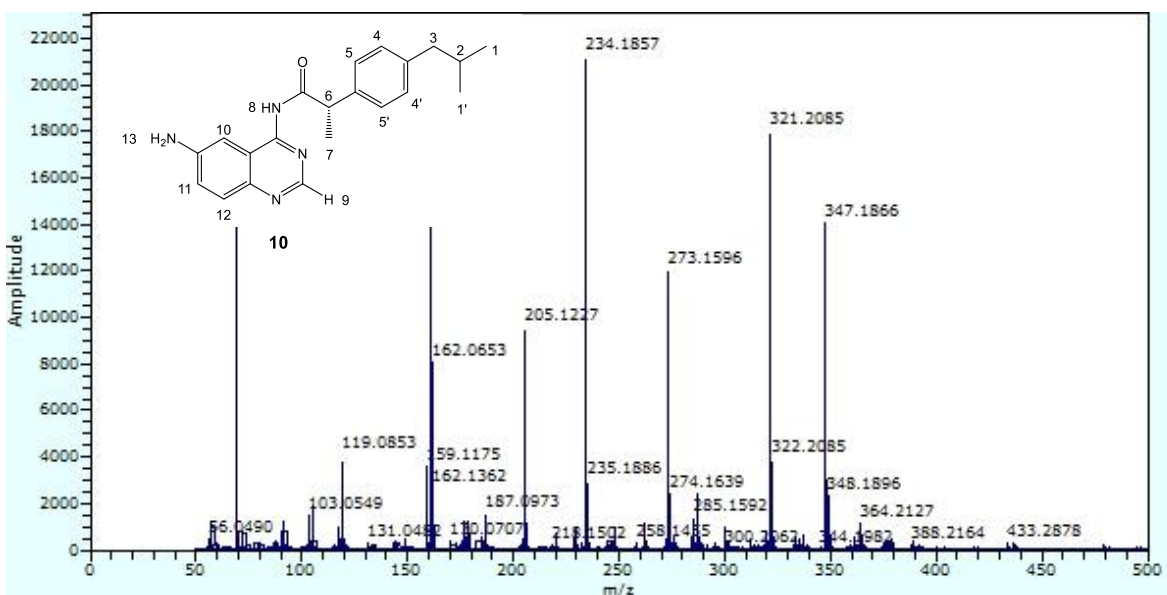
Espectro 35. EM-APCI del compuesto **09**.



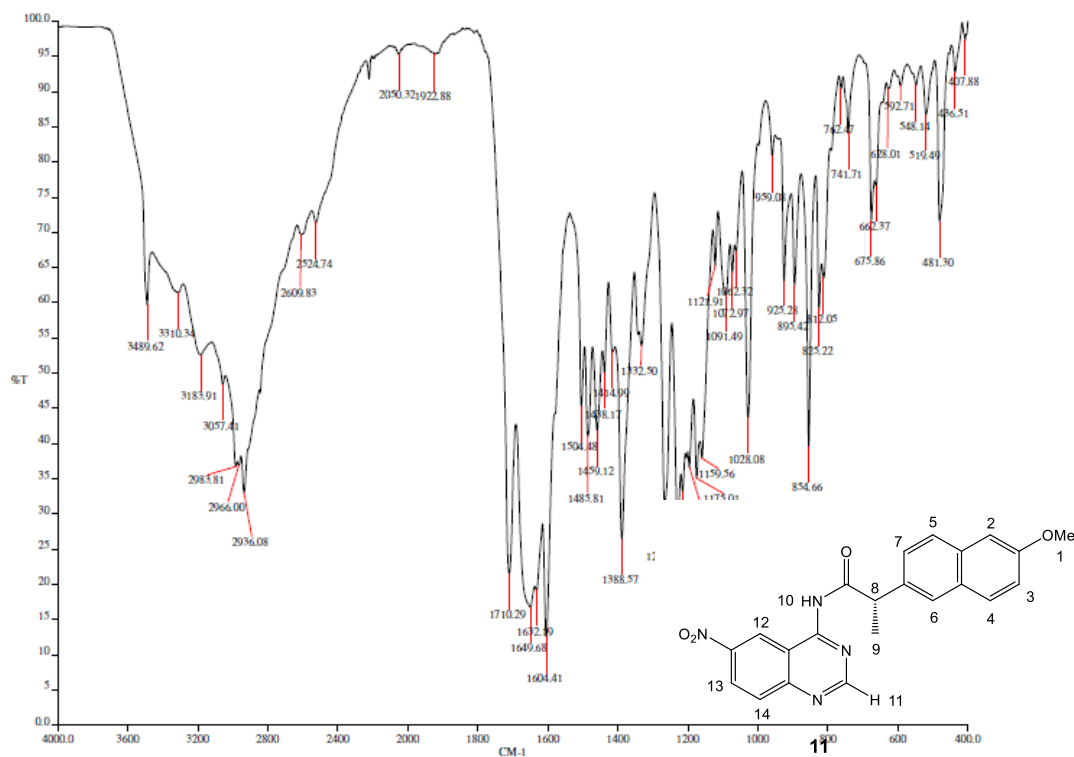
Espectro 36. IR-ATR del compuesto **10**.



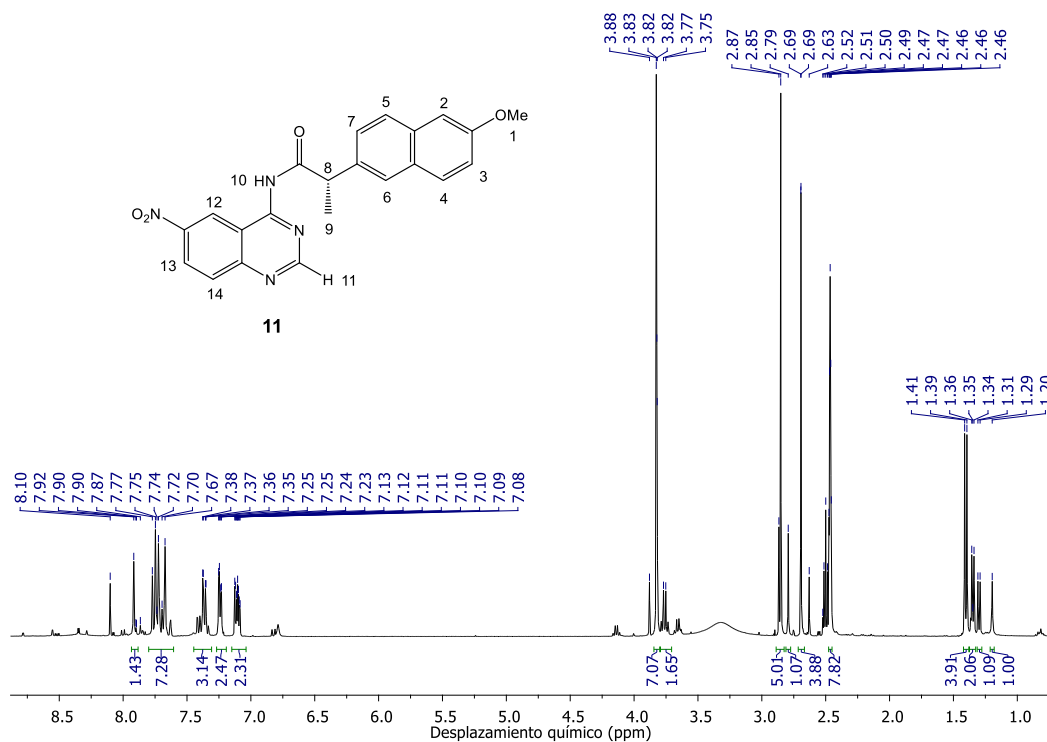
Espectro 37. RMN-¹H del compuesto **10** (DMSO-d₆, 400 MHz).



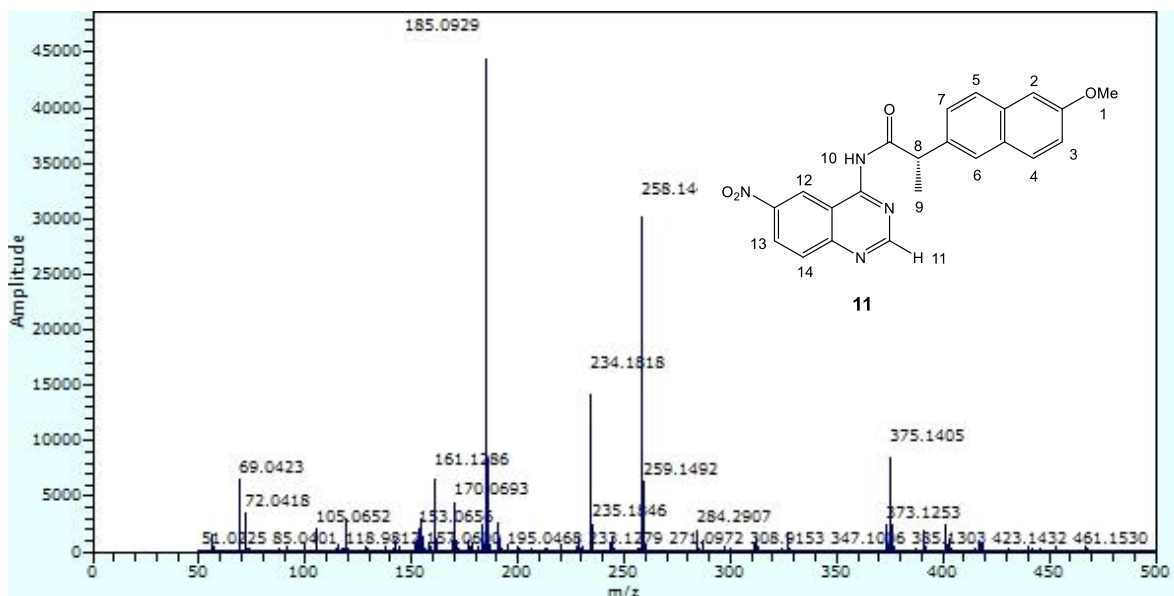
Espectro 38. EM-APCI del compuesto **10**.



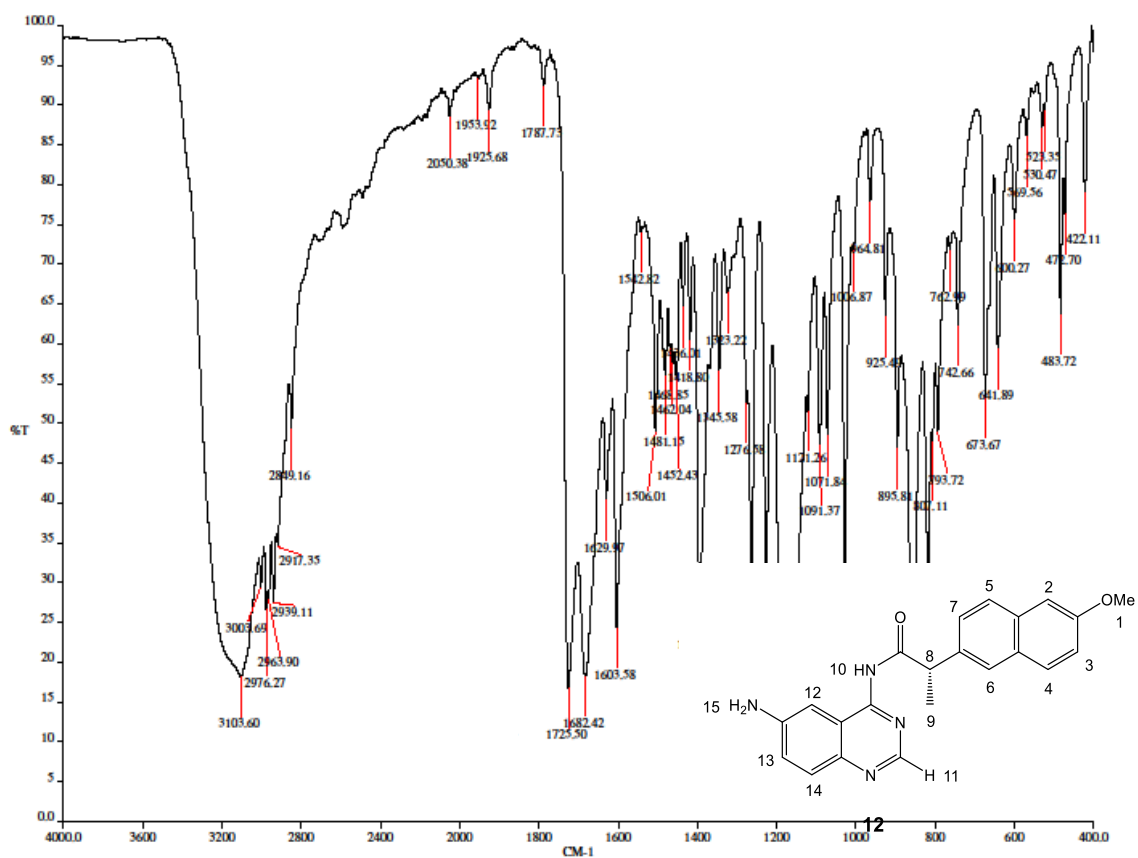
Espectro 39. IR-ATR del compuesto 11.



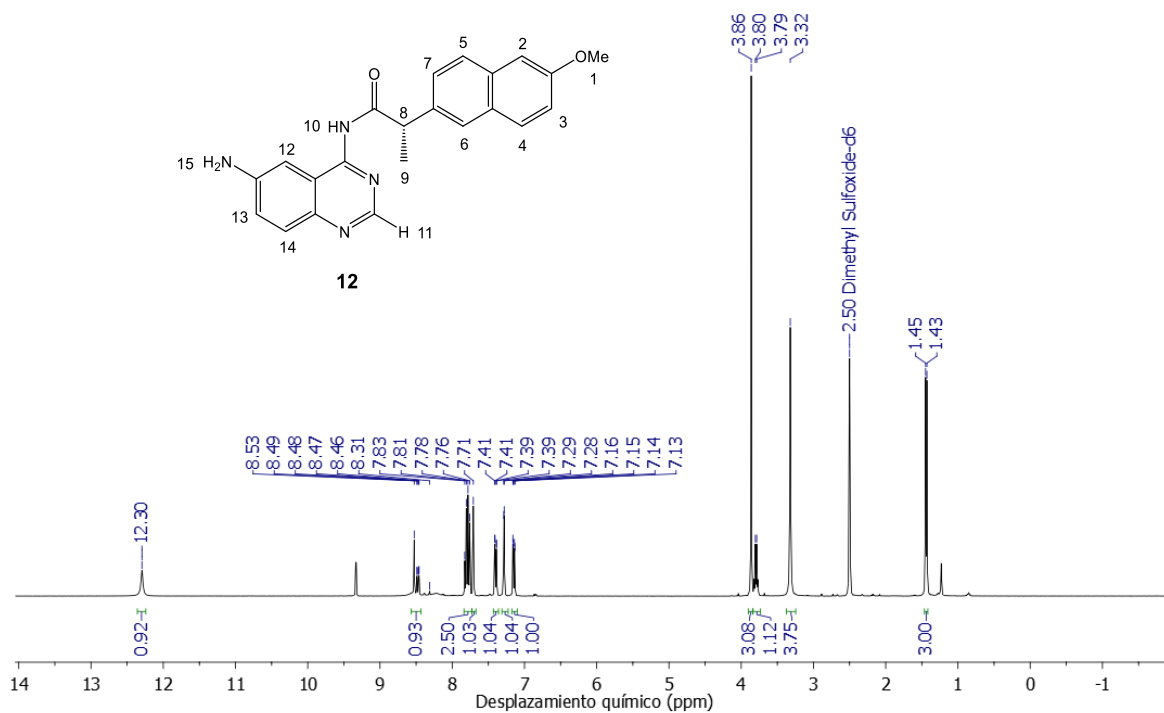
Espectro 40. RMN-¹H del compuesto 11 (DMSO-d₆, 400 MHz).



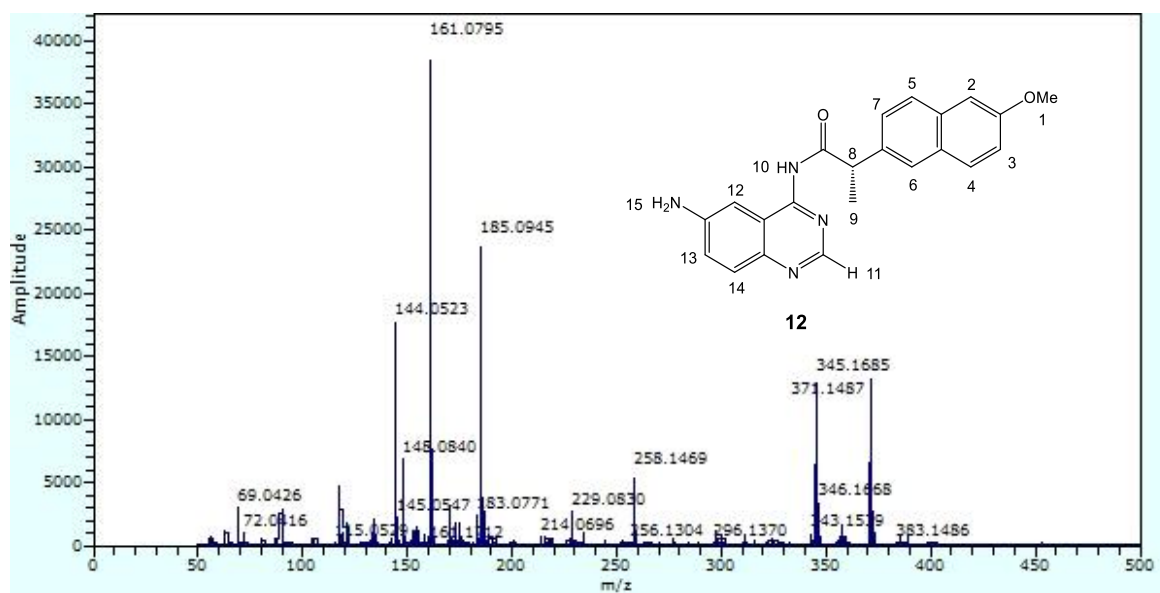
Espectro 41. EM-APCI del compuesto 11.



Espectro 42. IR-ATR del compuesto 12.



Espectro 43. RMN-¹H del compuesto **12** (DMSO-d₆, 400 MHz).



Espectro 44. RMN-¹H del compuesto **12** (DMSO-d₆, 400 MHz).



ANEXO III: Acoplamiento molecular

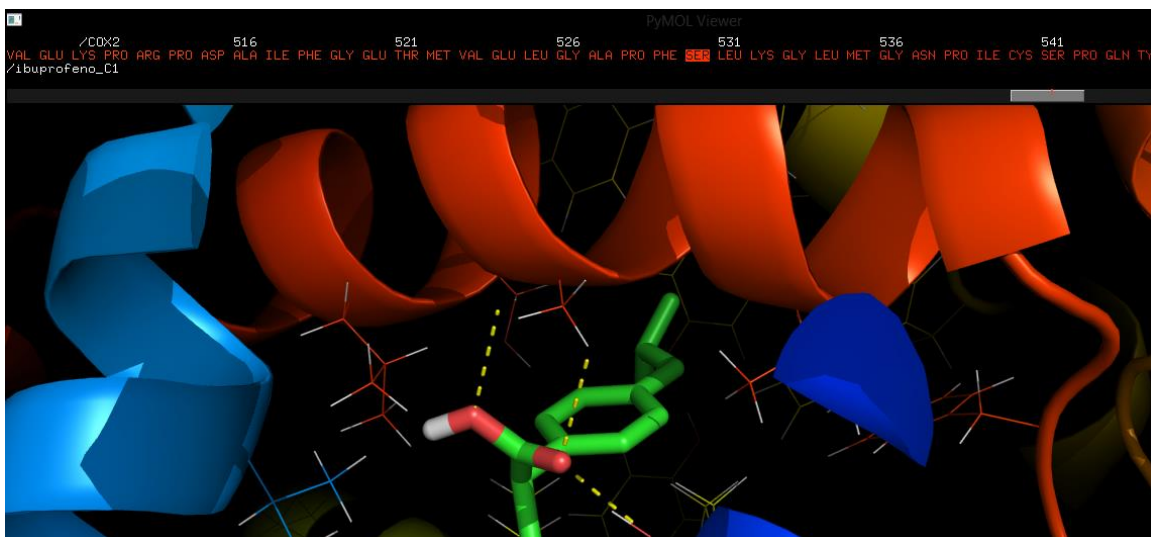


Figura 18. Acoplamiento molecular entre (S)-ibuprofeno y COX-2.

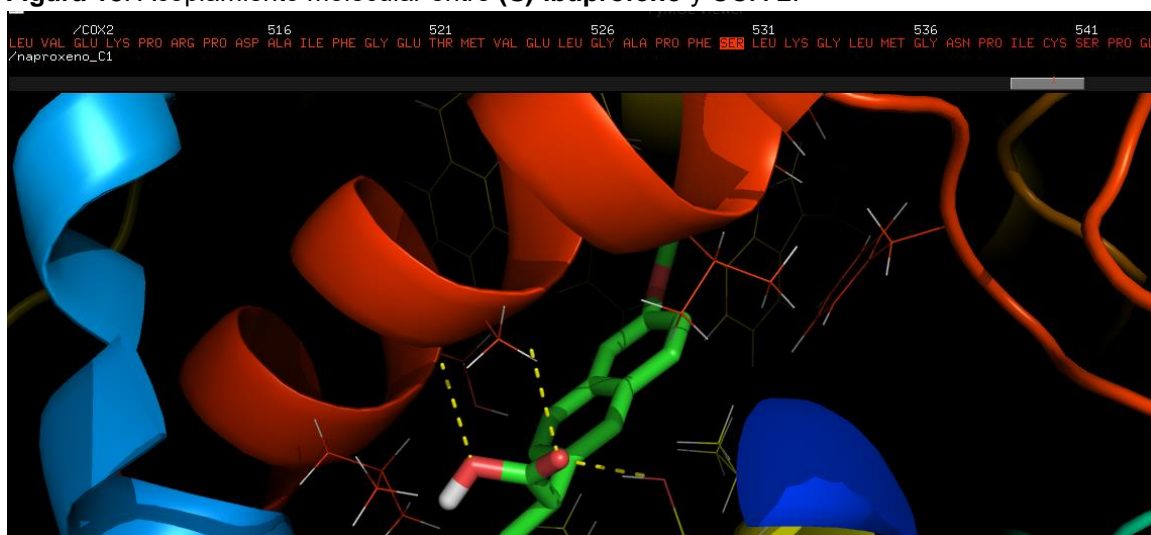


Figura 19. Acoplamiento molecular entre (S)-naproxeno y COX-2.

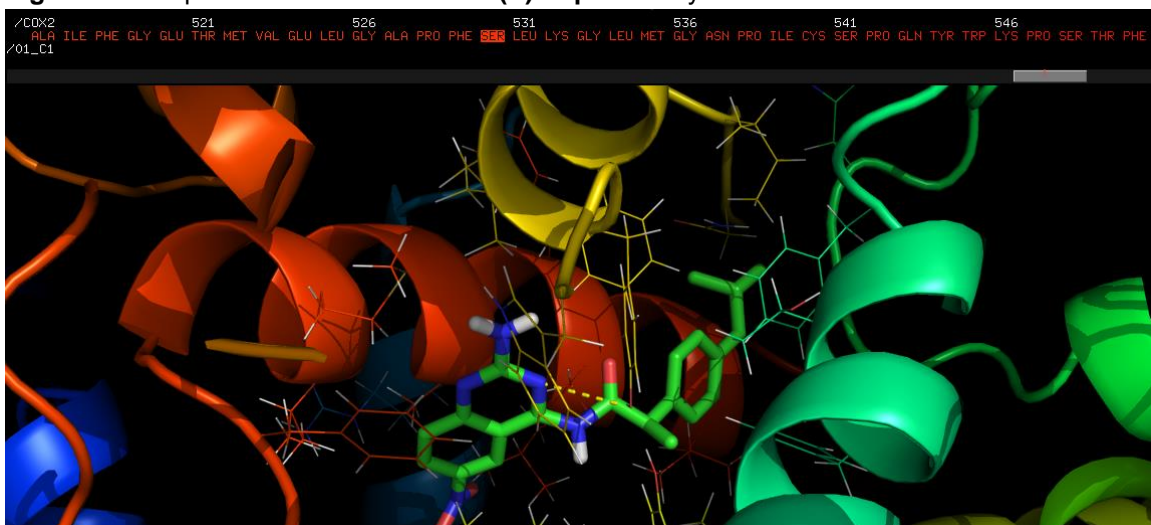


Figura 20. Acoplamiento molecular entre 01 y COX-2.

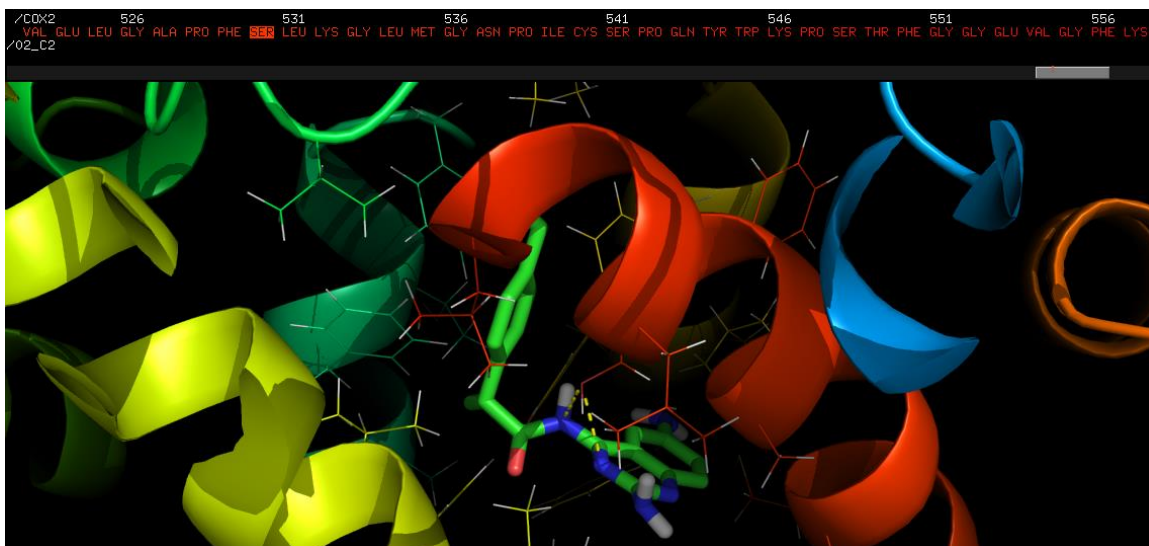


Figura 21. Acoplamiento molecular entre 02 y COX-2.

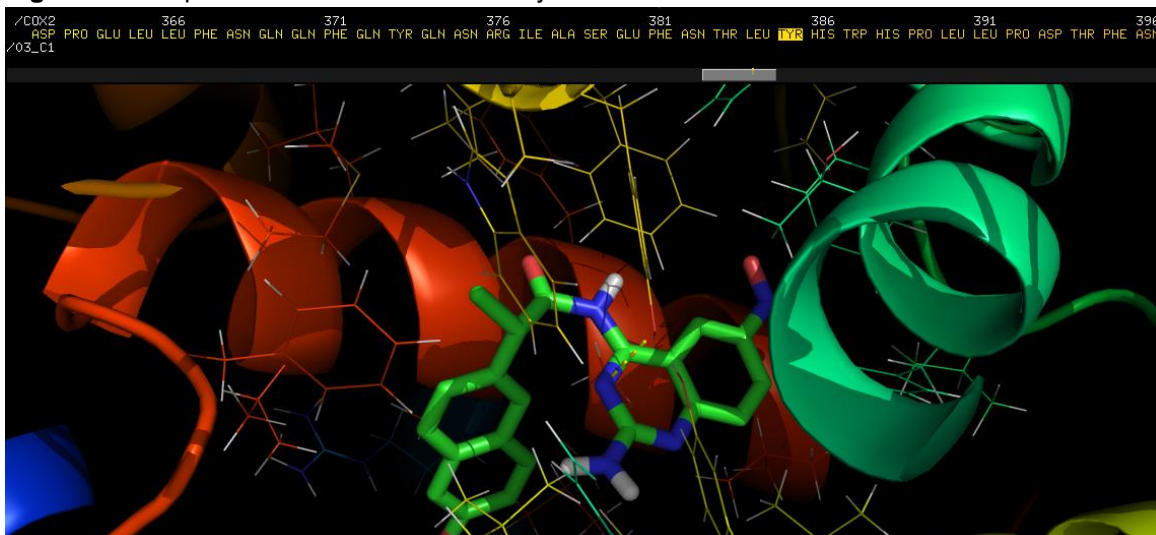


Figura 22. Acoplamiento molecular entre 03 y COX-2.

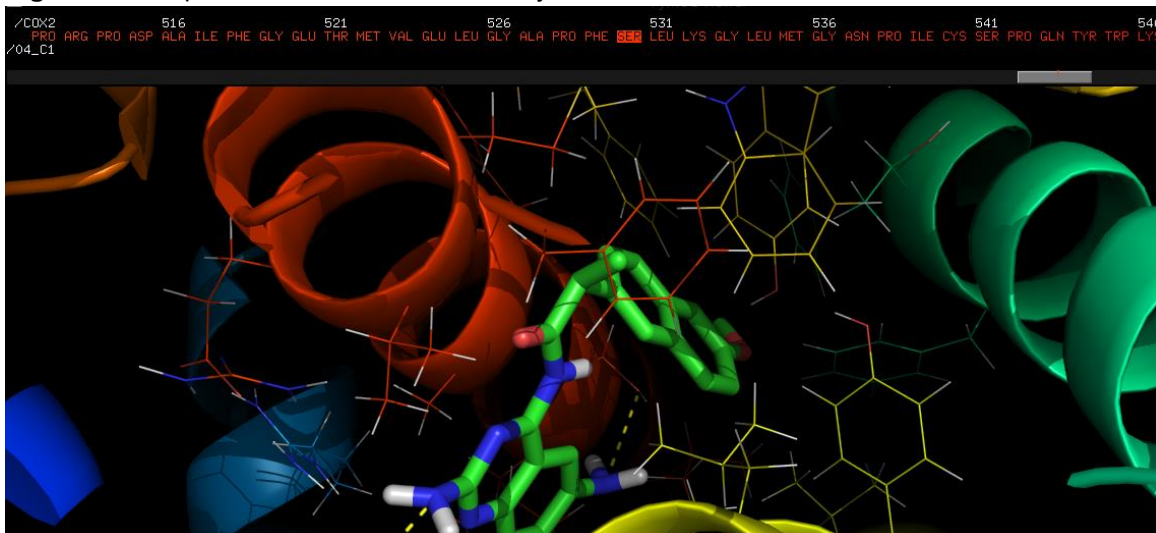


Figura 23. Acoplamiento molecular entre 04 y COX-2.

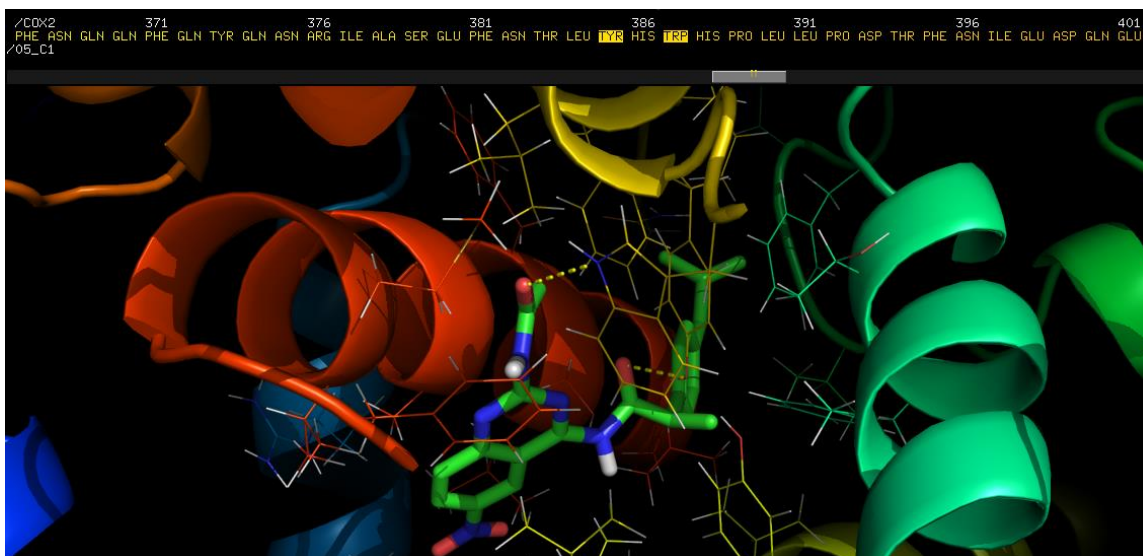


Figura 24. Acoplamiento molecular entre 05 y COX-2.

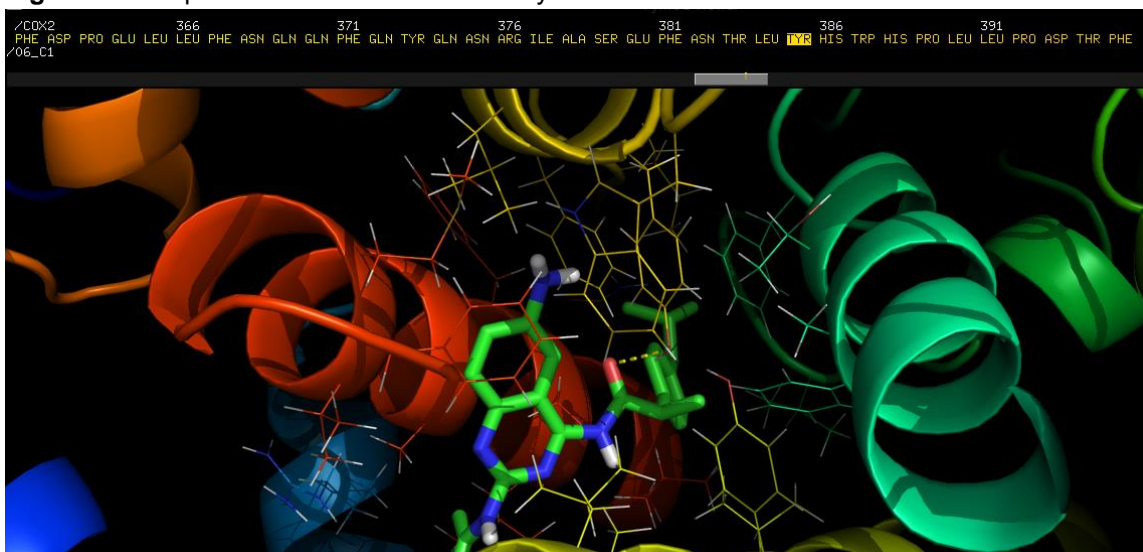


Figura 25. Acoplamiento molecular entre 06 y COX-2.

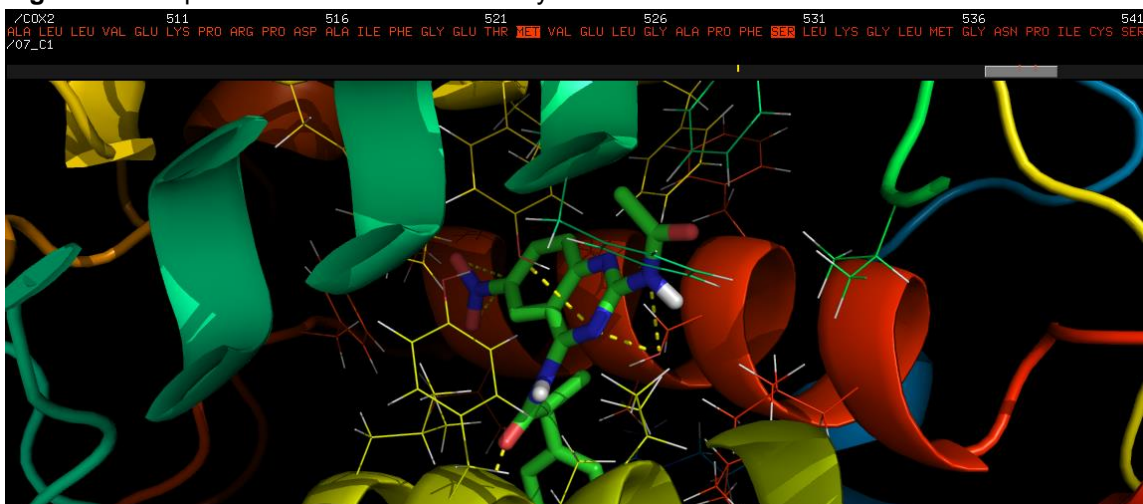


Figura 26. Acoplamiento molecular entre 07 y COX-2.

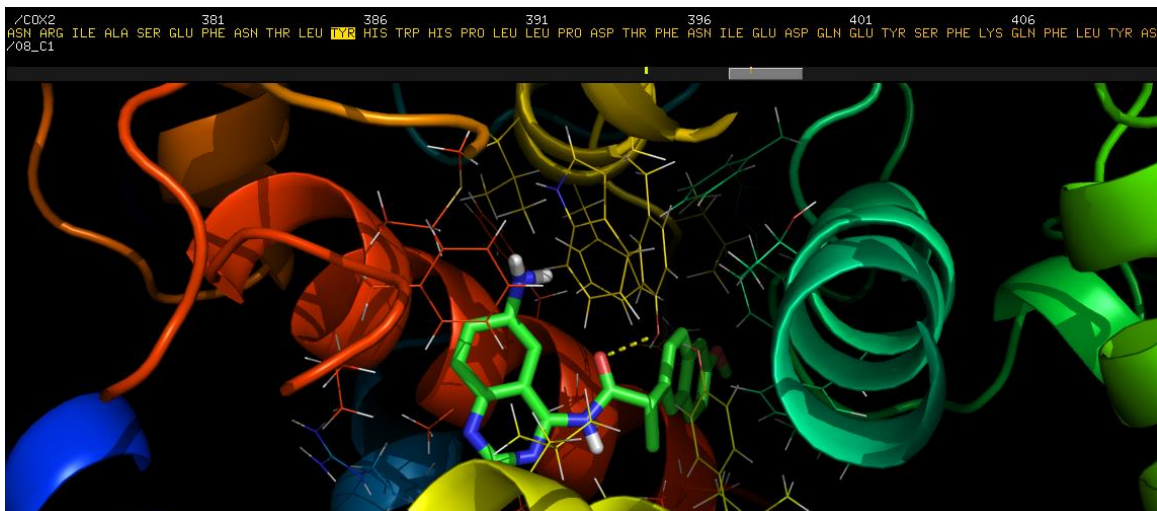


Figura 27. Acoplamiento molecular entre 08 y COX-2.

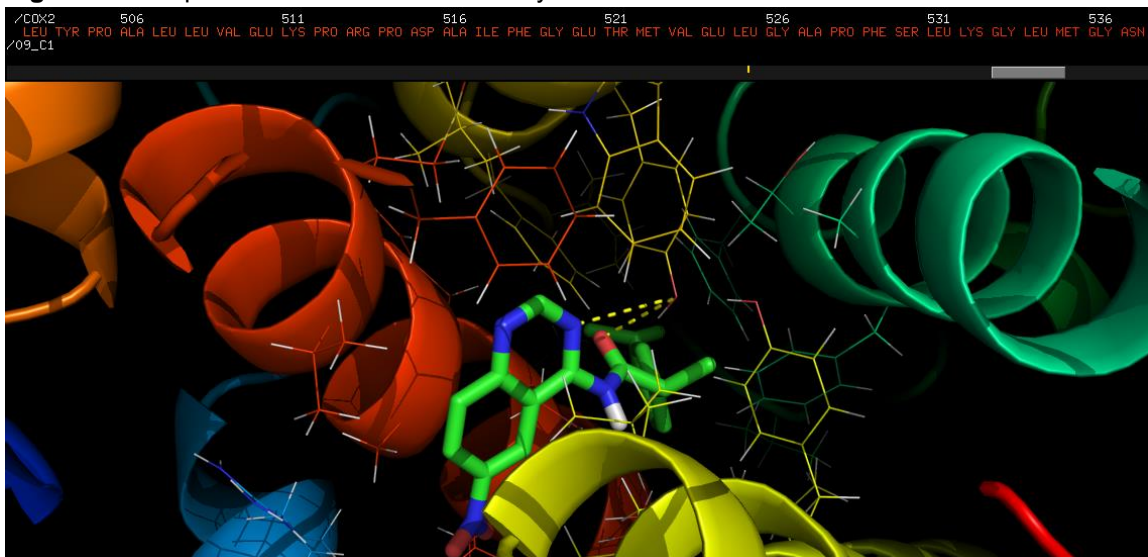


Figura 28. Acoplamiento molecular entre 09 y COX-2.

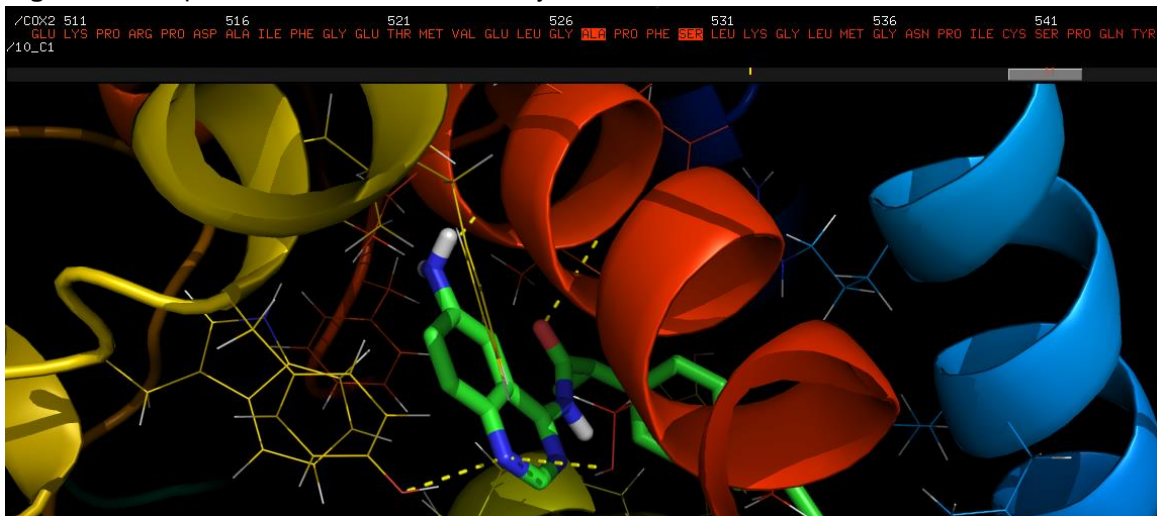


Figura 29. Acoplamiento molecular entre 10 y COX-2.

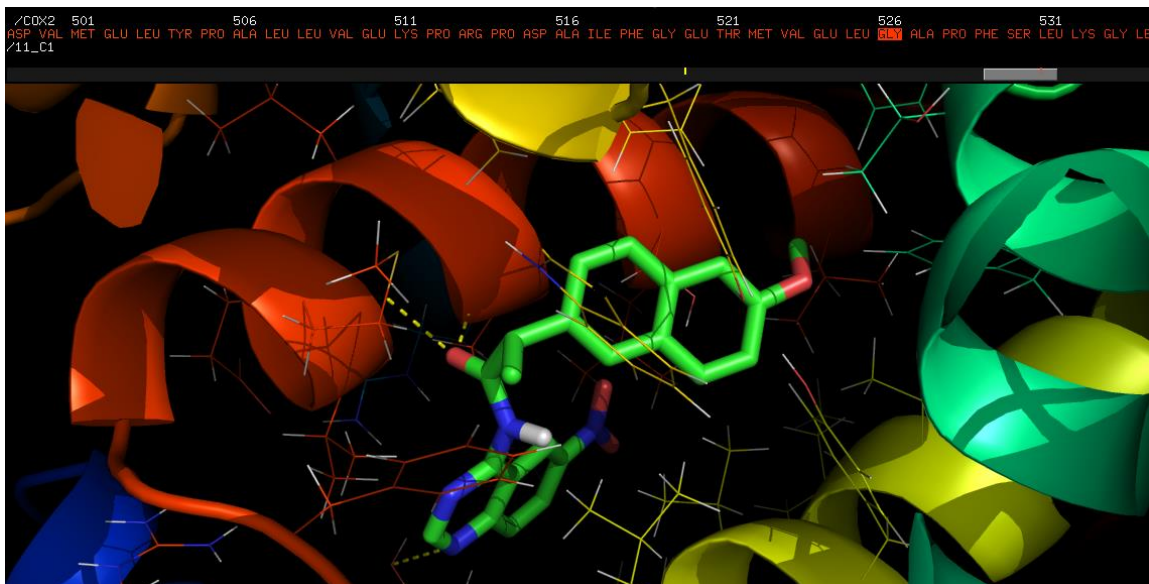


Figura 30. Acoplamiento molecular entre 11 y COX-2.

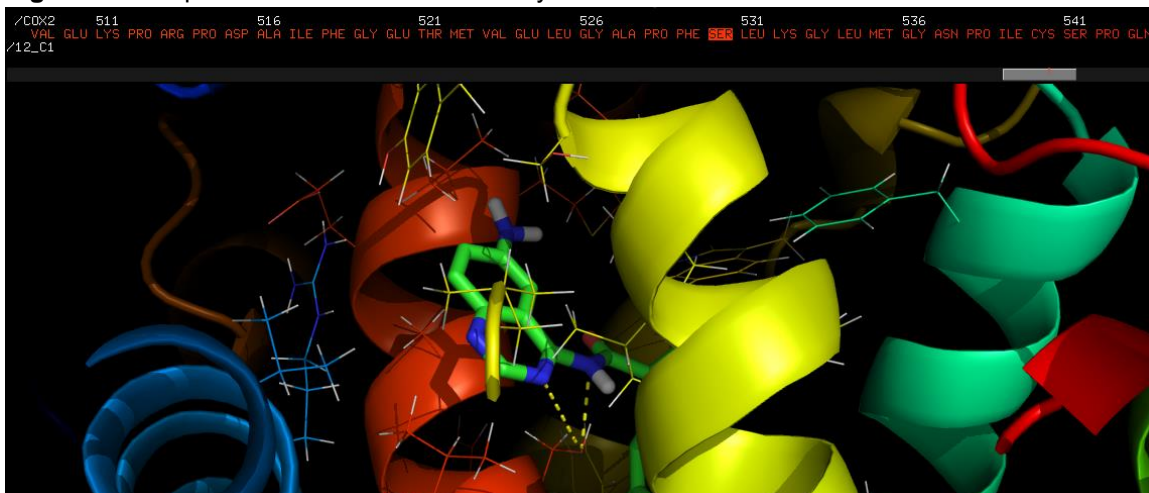


Figura 31. Acoplamiento molecular entre 12 y COX-2.

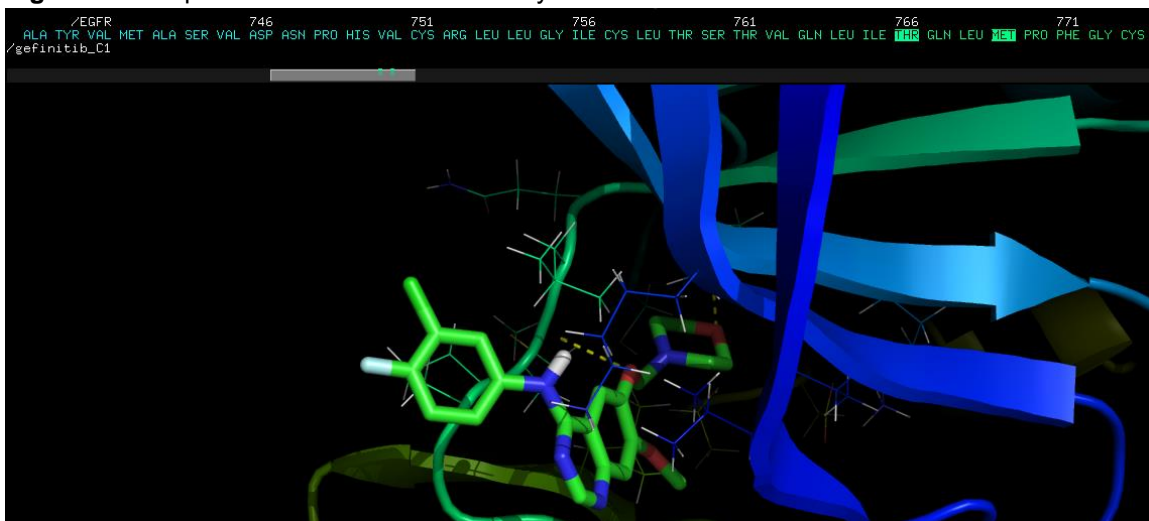


Figura 32. Acoplamiento molecular entre gefitinib y EGFR.

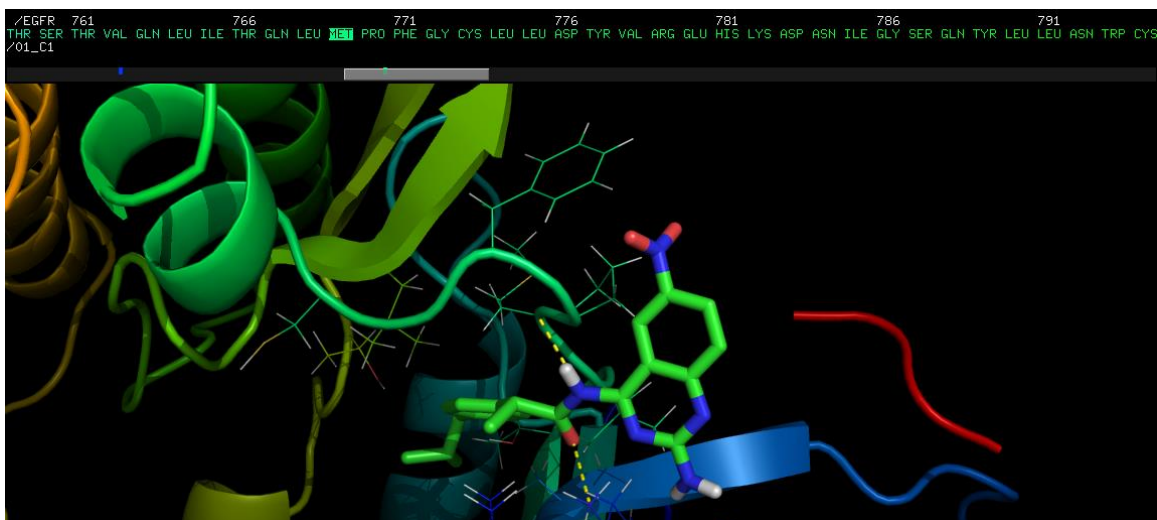


Figura 33. Acoplamiento molecular entre 01 y EGFR.

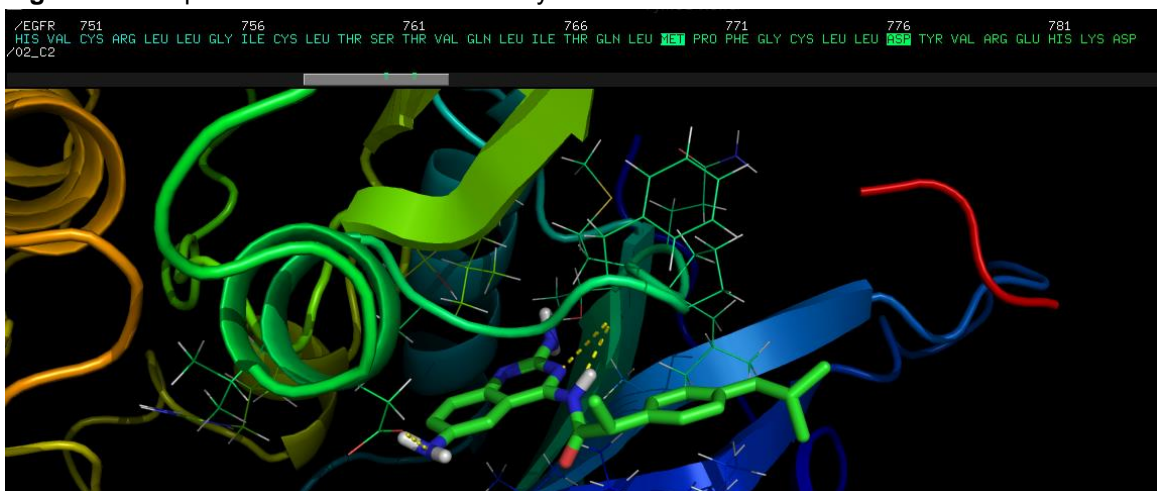


Figura 34. Acoplamiento molecular entre 02 y EGFR.

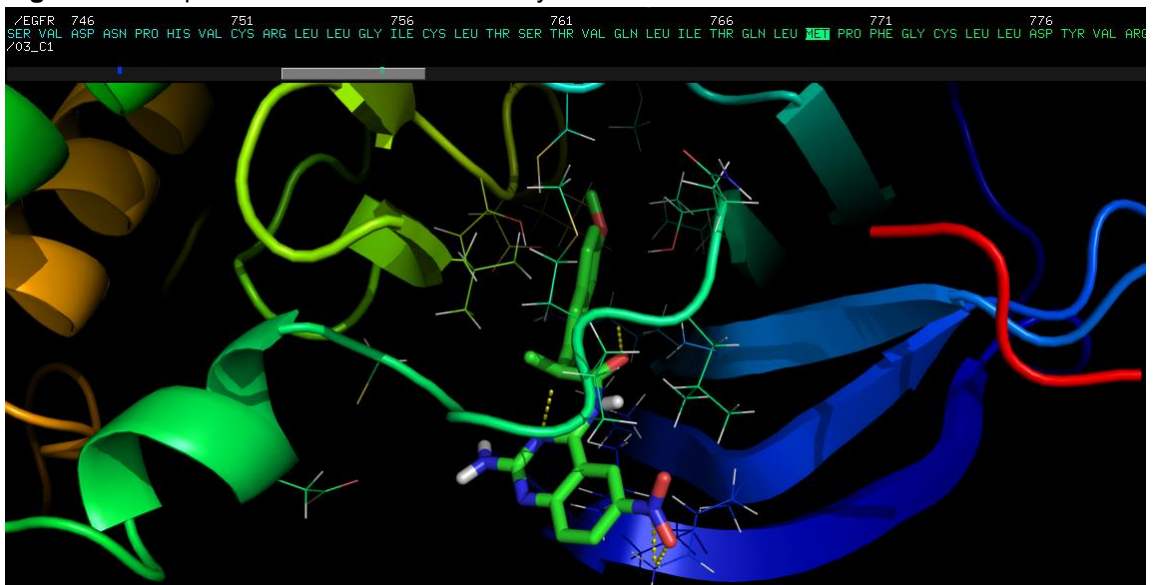


Figura 35. Acoplamiento molecular entre 03 y EGFR.

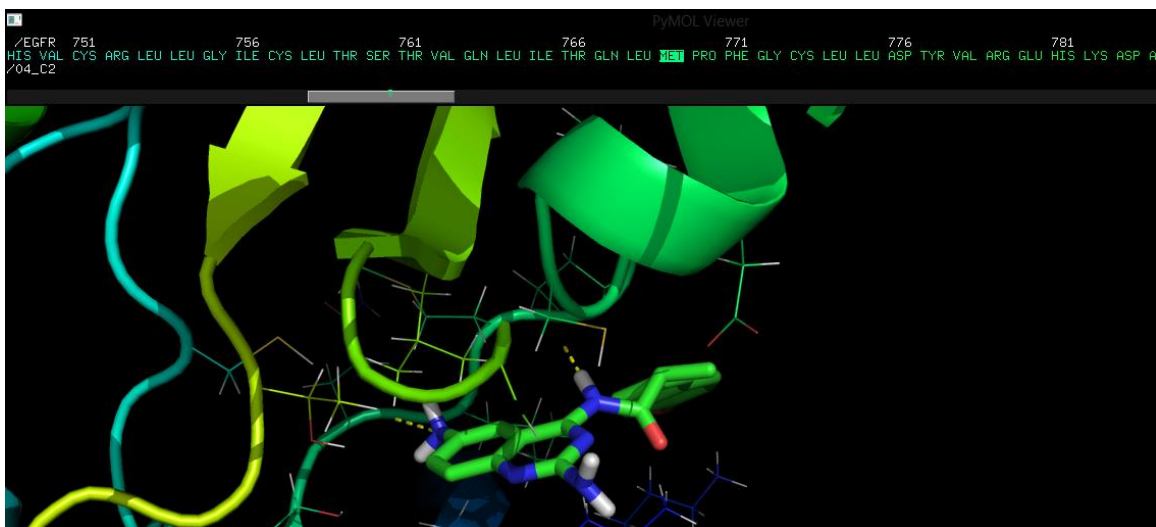


Figura 36. Acoplamiento molecular entre 04 y EGFR.

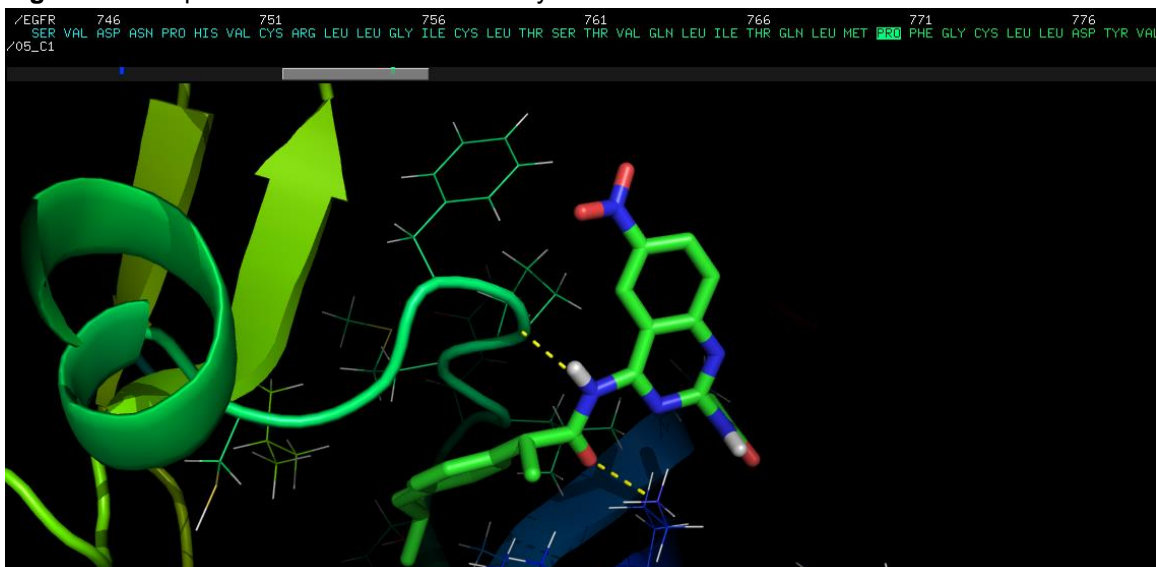


Figura 37. Acoplamiento molecular entre 05 y EGFR.

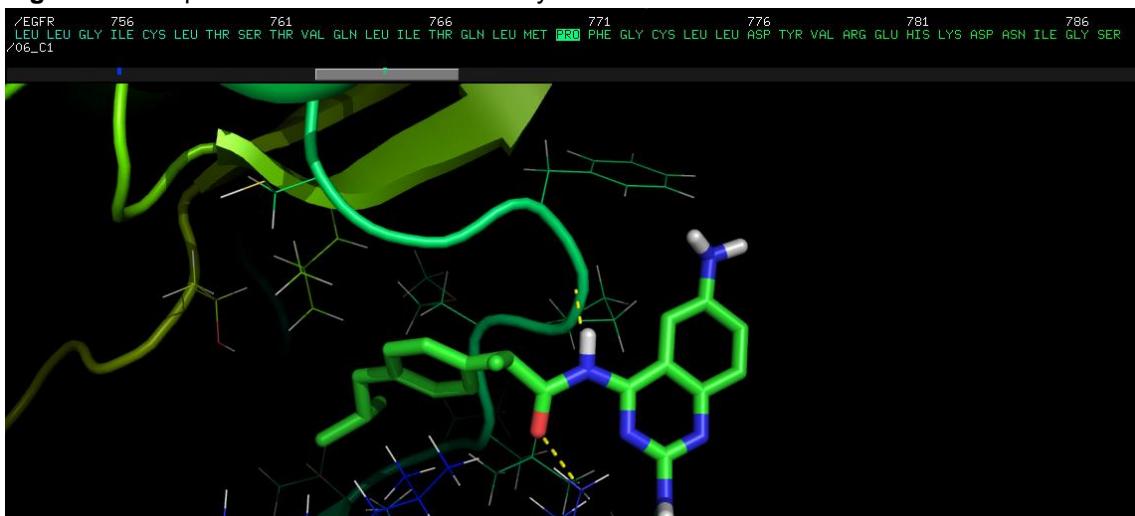


Figura 38. Acoplamiento molecular entre 06 y EGFR.

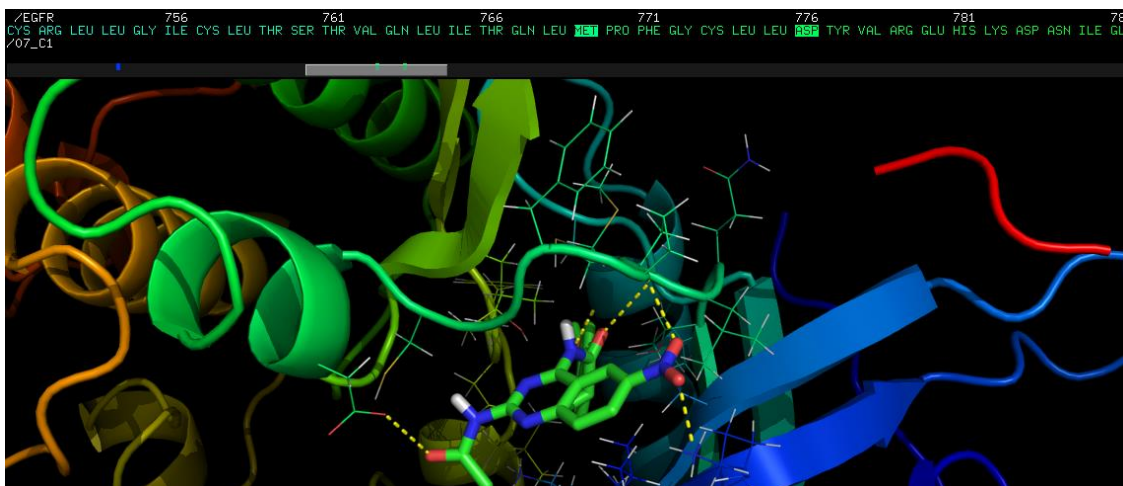


Figura 39. Acoplamiento molecular entre 07 y EGFR.



Figura 40. Acoplamiento molecular entre 08 y EGFR.

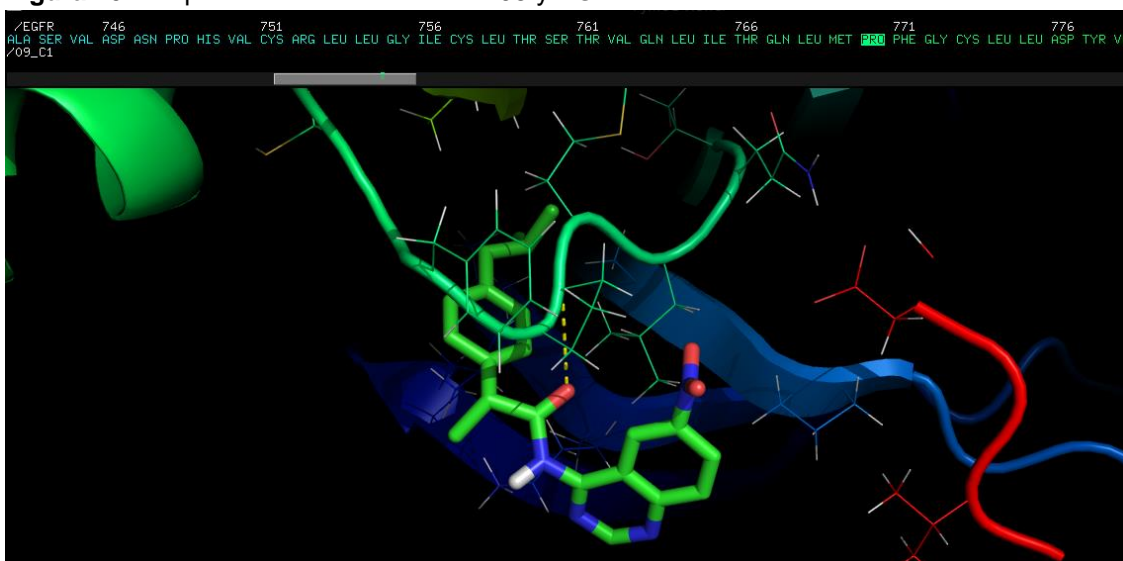


Figura 41. Acoplamiento molecular entre 09 y EGFR.

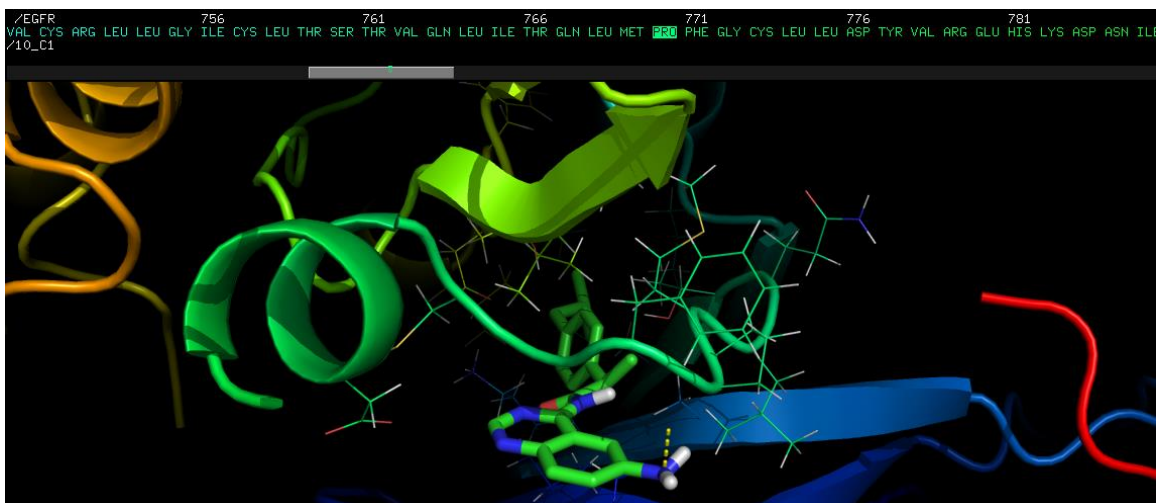


Figura 42. Acoplamiento molecular entre 10 y EGFR.

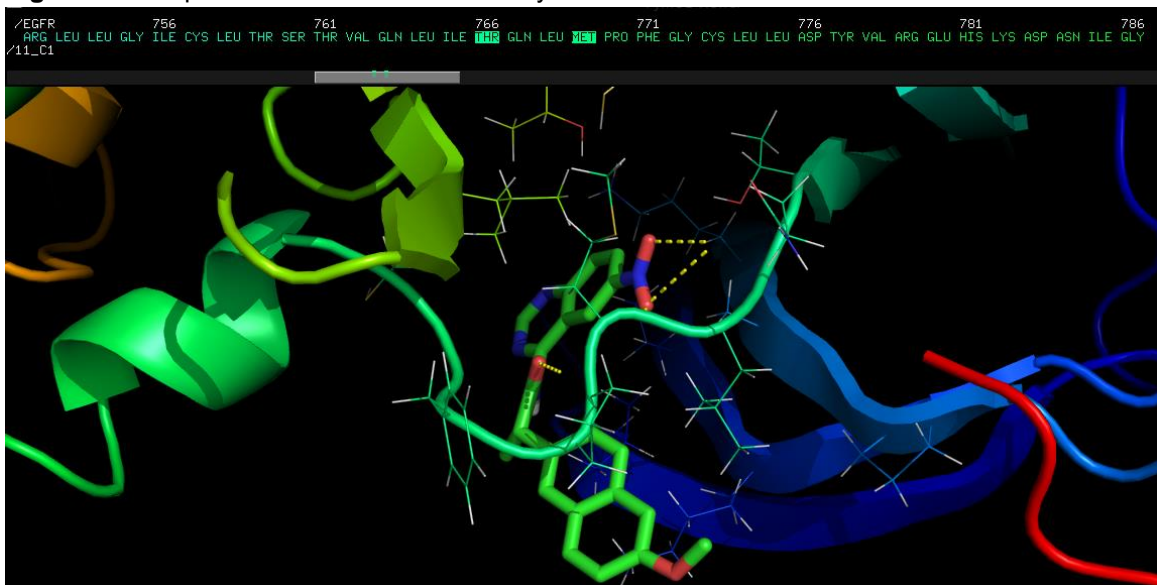


Figura 43. Acoplamiento molecular entre 11 y EGFR.

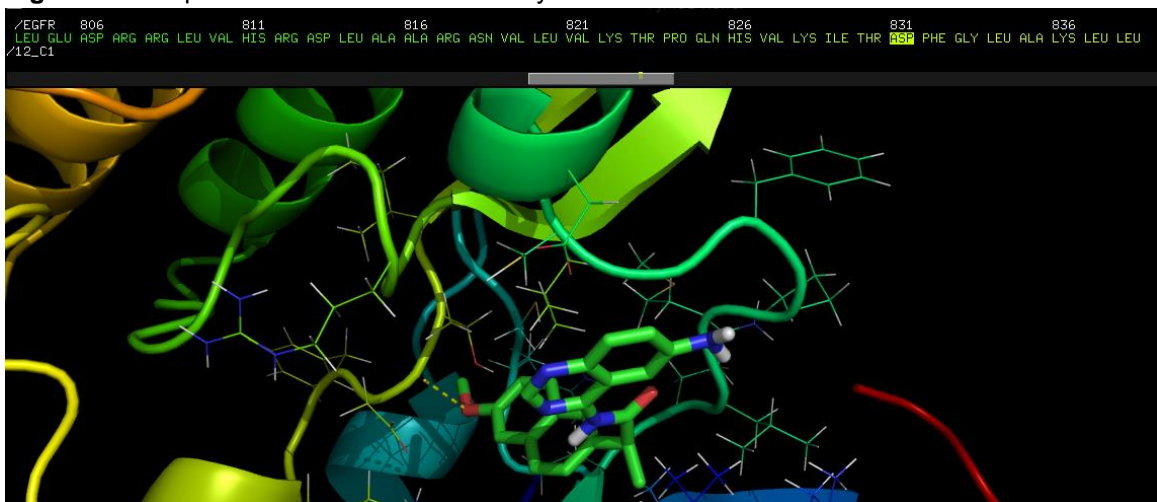


Figura 44. Acoplamiento molecular entre 12 y EGFR.

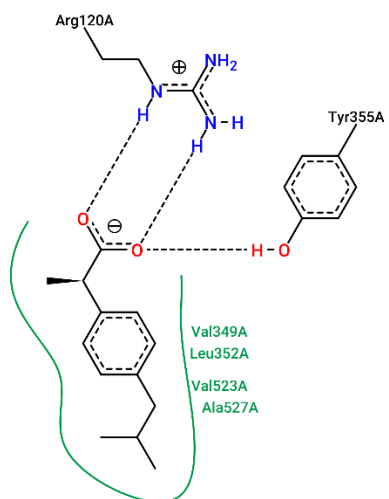


Figura 45. Acoplamiento 2D entre (S)-ibuprofeno y COX-2.

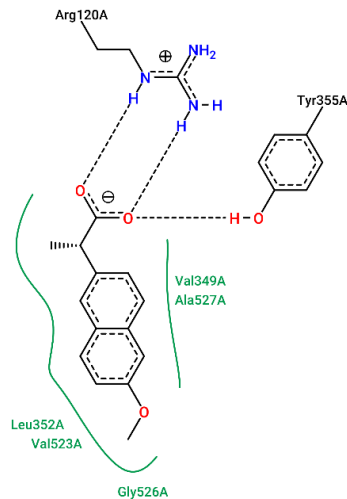


Figura 46. Acoplamiento 2D entre (S)-naproxeno y COX-2.

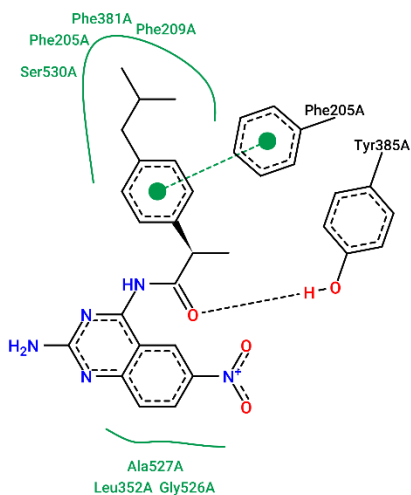


Figura 47. Acoplamiento 2D entre 01 y COX-2.

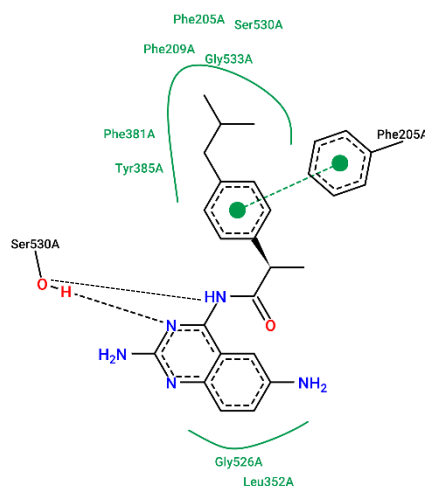


Figura 48. Acoplamiento 2D entre 02 y COX-2.

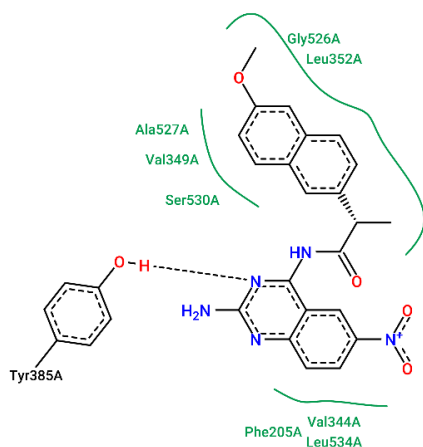


Figura 49. Acoplamiento 2D entre 03 y COX-2.

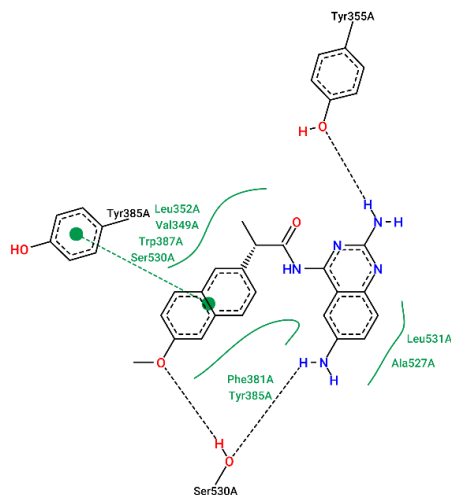


Figura 50. Acoplamiento 2D entre 04 y COX-2.

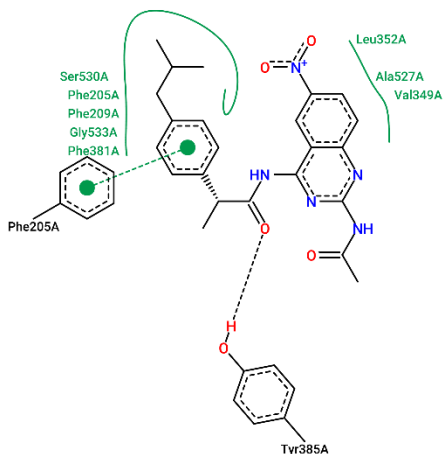


Figura 51. Acoplamiento 2D entre 05 y COX-2.

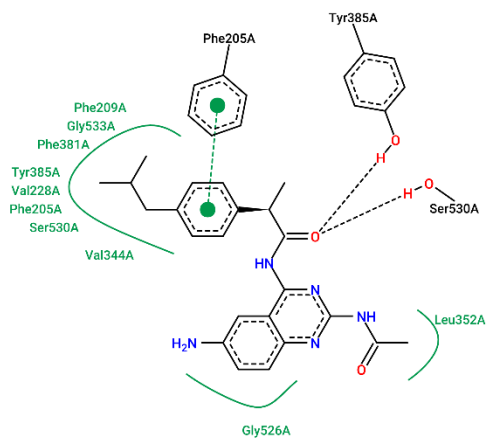


Figura 52. Acoplamiento 2D entre 06 y COX-2.

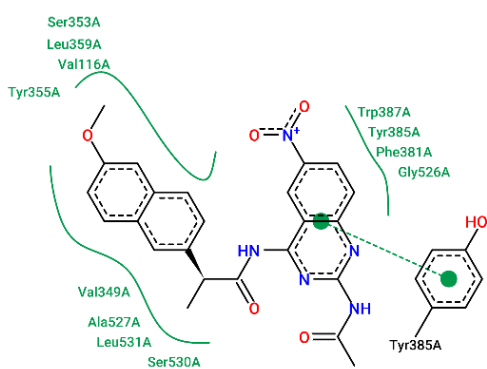


Figura 53. Acoplamiento 2D entre 07 y COX-2.

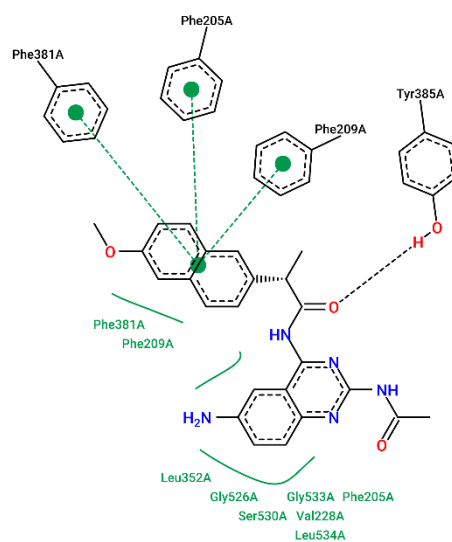


Figura 54. Acoplamiento 2D entre 08 y COX-2.

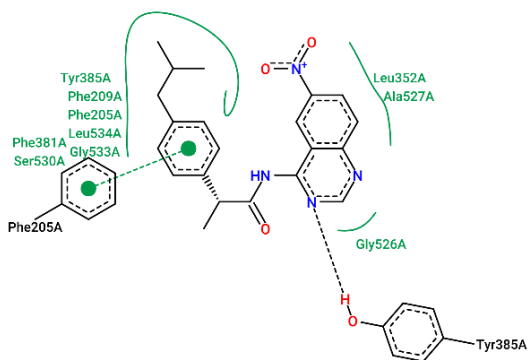


Figura 55. Acoplamiento 2D entre 09 y COX-2.

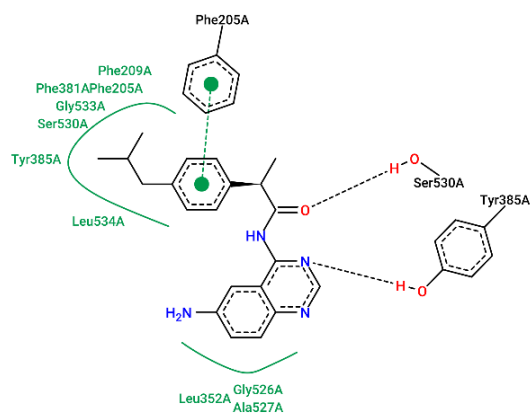


Figura 56. Acoplamiento 2D entre 10 y COX-2.

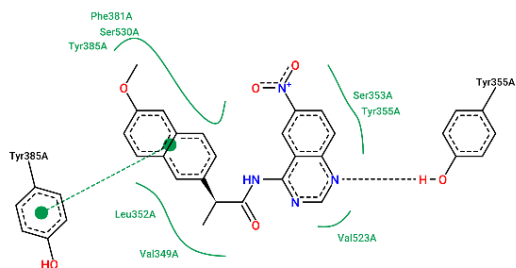


Figura 57. Acoplamiento 2D entre 11 y COX-2.

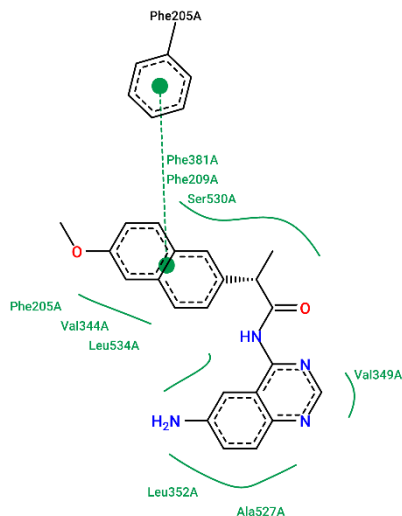


Figura 58. Acoplamiento 2D entre 12 y COX-2.

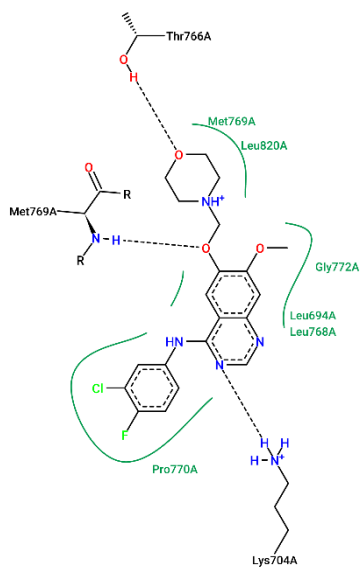


Figura 59. Acoplamiento 2D entre gef y EGFR.

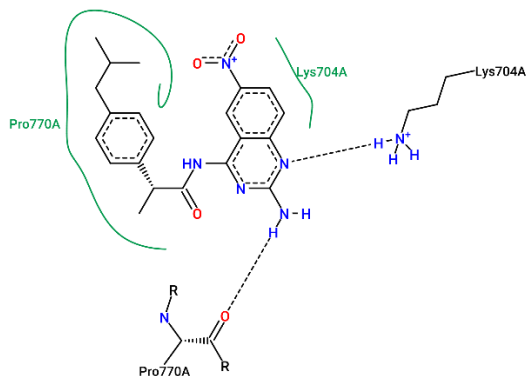


Figura 60. Acoplamiento 2D entre 01 y EGFR.

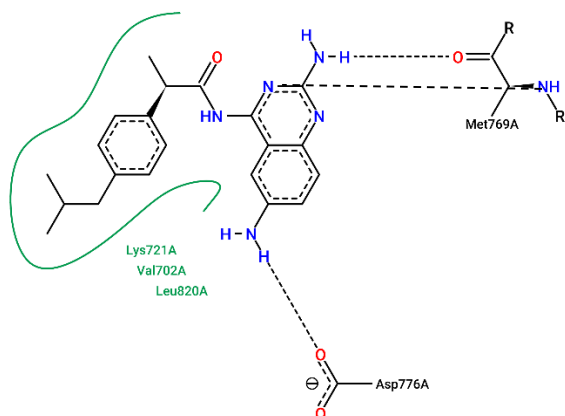


Figura 61. Acoplamiento 2D entre 02 y EGFR.

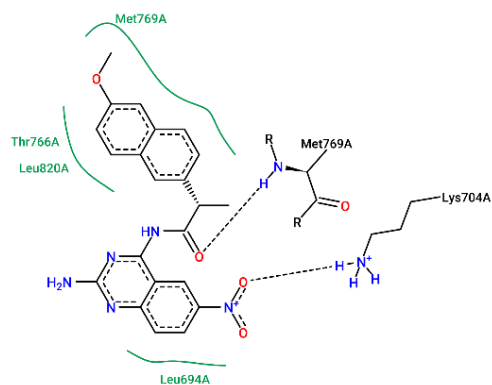


Figura 62. Acoplamiento 2D entre 03 y EGFR.

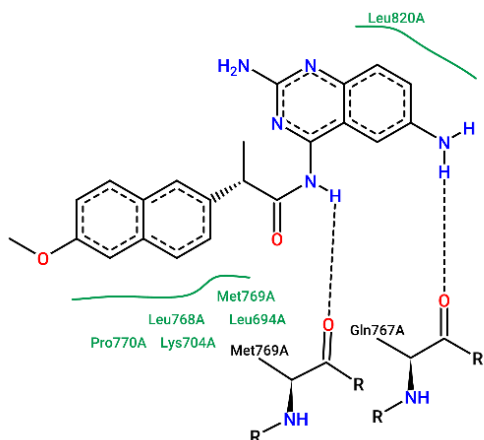


Figura 63. Acoplamiento 2D entre **04** y EGFR.

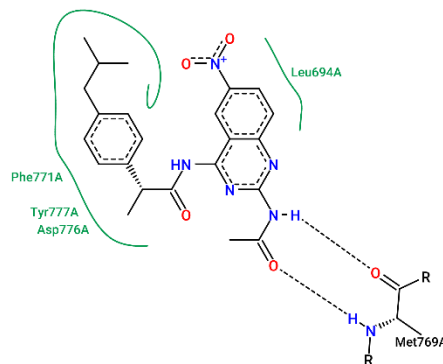


Figura 64. Acoplamiento 2D entre **05** y EGFR.

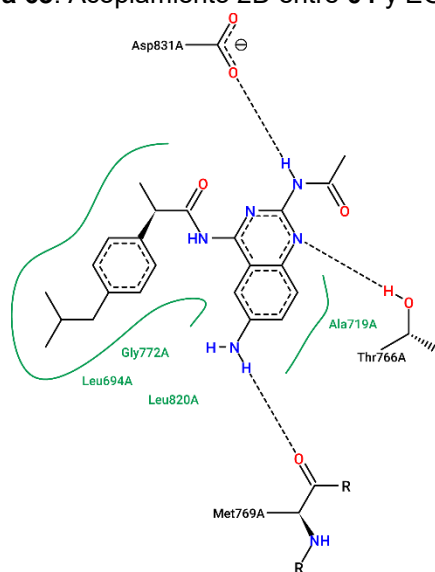


Figura 65. Acoplamiento 2D entre **06** y EGFR.

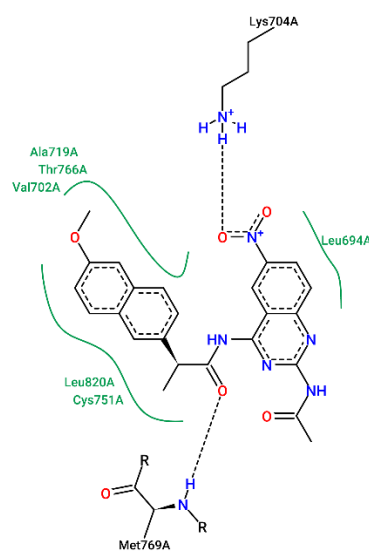


Figura 66. Acoplamiento 2D entre **07** y EGFR.

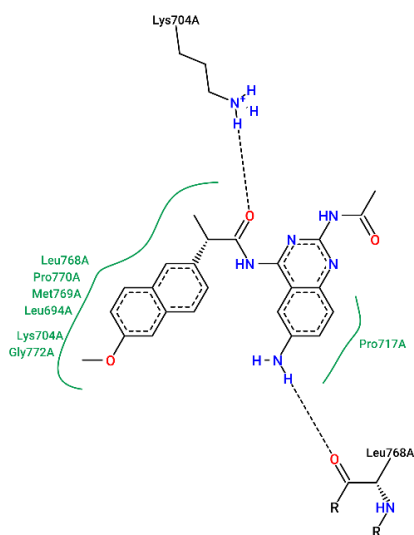


Figura 67. Acoplamiento 2D entre **08** y EGFR.

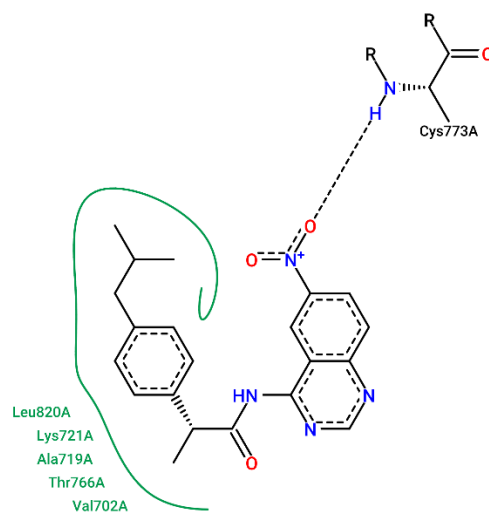


Figura 68. Acoplamiento 2D entre **09** y EGFR.

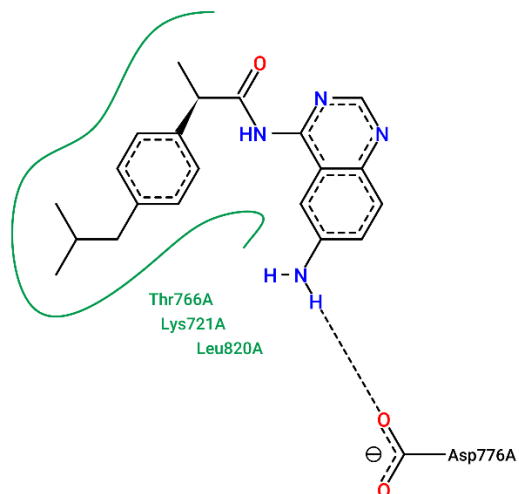


Figura 69. Acoplamiento 2D entre 10 y EGFR.

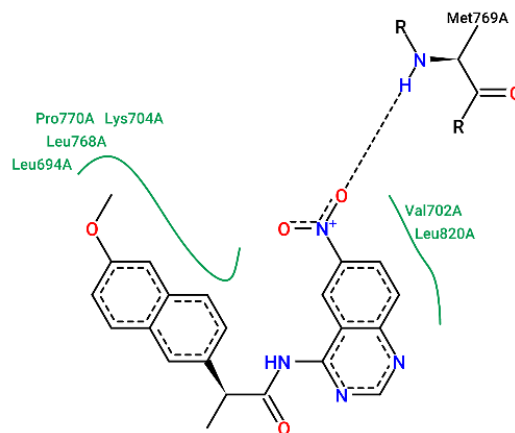


Figura 70. Acoplamiento 2D entre 11 y EGFR.

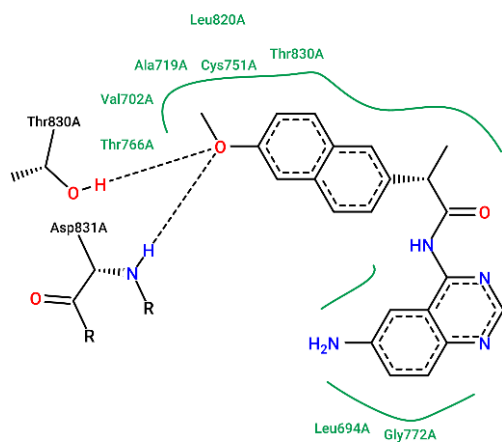


Figura 71. Acoplamiento 2D entre 12 y EGFR.