



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Síntesis de un profármaco de derivado de quinazolina con potencial actividad
frente a células cancerosas

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. LOURDES CECILIA ARENAS CORONA

TUTOR: DR. FRANCISCO HERNÁNDEZ LUIS
DEPARTAMENTO DE FARMACIA, FACULTAD DE QUÍMICA

CIUDAD DE MÉXICO, AGOSTO 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**Síntesis de un profármaco de derivado de quinazolina con
potencial actividad frente a células cancerosas**

**T E S I S
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

Q.F.B. LOURDES CECILIA ARENAS CORONA



Ciudad de México, agosto 2020

JURADO ASIGNADO

Presidente	Dr. Roberto Martínez	Instituto de Química, UNAM
Vocal	Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez	UAE Morelos
Vocal	Dr. Marco Antonio Velasco Velázquez	Facultad de Medicina, UNAM
Vocal	Dr. Jaime Pérez Villanueva	UAM-Xochimilco
Secretario	Dr. Marcos Hernández Rodríguez	Instituto de Química, UNAM

LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

Este trabajo se realizó en los laboratorios 121 y 122 del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química (Conjunto E), bajo la dirección del Dr. Francisco Hernández Luis.

ASESOR

Dr. Francisco Hernández Luis

SUSTENTANTE

Q.F.B. Lourdes Cecilia Arenas Corona

Parte de este trabajo se presentó en el Spring 2019 ACS National Meeting celebrado del 31 de marzo al 4 de abril del 2019 en Orlando, Florida, bajo la modalidad de cartel con el título de "Synthesis of prodrugs from a quinazoline derivative to optimize its behavior against cancer cells".

Así mismo, también se presentó en el 54° Congreso Mexicano de Química celebrado del 30 de septiembre al 3 de octubre del 2019 en el Complejo Cultural Universitario, BUAP Pue., Puebla, México, bajo la modalidad de cartel con el título de " Síntesis alternativa de un derivado de quinazolina para su posterior optimización en su comportamiento frente a células cancerosas".

AGRADECIMIENTOS

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

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** de la que me siento orgullosa de pertenecer, especialmente a la Facultad de Química, por brindarme las herramientas necesarias para mi formación académica y personal.

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

Expreso mi agradecimiento a la Dirección General del Personal Académico UNAM por el apoyo proporcionado en la compra de materiales de vidriería y sustancias químicas dentro del proyecto **UNAM-DGAPA-PAPIIT IN223120**.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo proporcionado en la compra de reactivos de importación para la realización de los experimentos realizados en este trabajo con el proyecto **SEP-CONACyT CB-220664** y por la beca otorgada para la realización de estudios de maestría (CVU No. 888107).

A la Facultad de Química por el apoyo otorgado para el registro de espectros de RMN, masas e IR, dentro del programa **PAIP 5000 9136**.

A la Unidad de Servicios Analíticos (USAI) de la Facultad de Química UNAM y a su personal que realizó el registro de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (Rosa Isela del Villar Morales, Nayeli López Balbiaux); Espectroscopia de Infrarrojo (Marisela Patricia Gutiérrez Franco) y Espectrometría de masas (Georgina Duarte).

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) y al posgrado en Ciencias Químicas por el apoyo económico brindado para la asistencia a congresos.

ÍNDICE

Abreviaturas	III
Resumen	V
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	
2.1. Generalidades del cáncer	2
2.2. Los signos distintivos del cáncer	3
2.3. Epidemiología	4
2.4. Carcinogénesis	6
2.5. Metástasis	7
2.6. Causas del cáncer	8
2.7. Tipos de cáncer	9
2.8. Tratamientos contra el cáncer	10
2.9. Búsqueda de nuevos agentes quimioterapéuticos	11
2.10. Aplicación de las quinazolininas como agentes terapéuticos contra el cáncer	13
2.10.1. Derivados de quinazolina-2,4,6-triamina y su actividad quimioterapéutica	14
2.11. Profármacos	15
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
4. HIPÓTESIS	21
5. OBJETIVOS	
5.1. Objetivo general	21
5.2. Objetivos particulares	21
6. METODOLOGÍA	22
6.1. Parte química	23
6.1.1. Consideraciones para el diseño del profármaco	23
6.1.2. Síntesis de los compuestos	24
6.1.2.1. Síntesis de <i>N</i> -(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-hidroxi-3,5- dimetoxibenzamida (MLB13)	24
6.1.2.1.1. Ruta de síntesis A para obtener el derivado MLB13	25
6.1.2.1.2. Ruta de síntesis B y C para obtener el derivado MLB13	26
6.1.2.2. Síntesis de 4-[(2,4-diaminoquinazolin-6-il)carbamoil]-2,6- dimetoxifenil 3-(dietilamino)propanoato (LCAC137)	27
6.1.3. Caracterización espectroscópica y espectrométrica	27

6.2. Parte biológica	28
6.2.1. Ensayo de reducción del MTT	29
6.2.2. Ensayo de captación del rojo neutro	29
6.2.3. Ensayo con cristal violeta	29
6.2.4. Ensayo de reducción de resazurina	29
6.3. Parte computacional	30
6.3.1. Elección de la estructura cristalizada de la enzima	30
6.3.2. Estudio de acoplamiento molecular	30
6.3.2.1. Preparación del ligando	30
6.3.2.2. Preparación de la proteína	30
6.3.2.3. Acoplamiento molecular	30
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	
7.1. Parte química	32
7.1.1. Síntesis de los compuestos	32
7.1.1.1. Síntesis de <i>N</i> -(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzamida (MLB13)	32
7.1.1.2. Síntesis de 4-[(2,4-diaminoquinazolin-6-il)carbamoil]-2,6-dimetoxifenil 3-(dietilamino)propanoato (LCAC137)	46
7.1.2. Caracterización espectroscópica del derivado de la 2,4,6-triaminoquinazolina (MLB13) y su profármaco	50
7.1.2.1. Caracterización espectroscópica y espectrométrica de la <i>N</i> -(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzamida (MLB13)	52
7.1.2.2. Caracterización espectroscópica y espectrométrica de 4-[(2,4-diaminoquinazolin-6-il)carbamoil]-2,6-dimetoxifenil 3-(dietilamino)propanoato (LCAC137)	57
7.2. Parte biológica	63
7.3. Parte computacional	65
7.3.1. Hidrólisis de los profármacos	66
8. CONCLUSIONES	70
9. PERSPECTIVAS	71
10. REFERENCIAS	72
APÉNDICE I. Metodología de síntesis de los compuestos	79
APÉNDICE II. Espectros de IR, RMN de ¹ H y ¹³ C, y de masas de los compuestos sintetizados	88

Abreviaturas

δ	Desplazamiento químico en resonancia magnética nuclear
λ	Longitud de onda
°C	Grado Celsius
μM	Micromolar
ADN	Ácido desoxirribonucleico
APCI	Ionización química a presión atmosférica
ATR	Reflectancia totalmente atenuada
ccf	Cromatografía de capa fina
CDI	<i>N,N'</i> -Carbonildiimidazol
CES	Carboxilesterasas
CI ₅₀	Concentración inhibitoria 50
COSY	Espectroscopia de resonancia magnética de correlación de acoplamiento spin-spin (H1-H1) en 2 dimensiones. (<i>Correlated Spectroscopy</i>)
DCC	<i>N,N'</i> -Diciclohexilcarbodiimida
DHFR	Dihidrofolato reductasa
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropiletilamina
DMAP	<i>N,N</i> -Dimetil-4-aminopiridina
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
DMSO	Sulfóxido de dimetilo
EDAC	N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
Fmoc	Grupo protector Fluorenil-9-metoxicarbonilo
FT-IR	Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>)
g	Gramos
Glu	Ácido glutámico
h	Hora
hCE1	Carboxilesterasa humana 1
His	Histidina
HMBC	Espectroscopia de correlación de dos o tres enlaces heteronucleares de distancia (<i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i>)
HSQC	Espectroscopia de correlación de 1 enlace heteronuclear de distancia (<i>Heteronuclear Simple Quantum Coherence</i>)
<i>J</i>	Constante de acoplamiento

lb/in ²	Libras por pulgada cuadrada
mL	Mililitros
MM	Masa molar
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
MTX	Metotrexato
NOESY	Espectroscopía de correlación de núcleos a través del espacio (<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>)
OMS	Organización mundial de la salud
PBS	Solución amortiguadora salina de fosfatos (<i>Phosphate buffered saline</i>)
Pd/C	Paladio soportado sobre carbono
p.f.	Punto de fusión
P.M.	Peso molecular
PyBOP	Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il- <i>N</i> -oxi-tris(pirrolidin) fosfonio
Rf	Coeficiente de retención en ccf (Distancia recorrida/Distancia eluida)
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear de protón
RMN ¹³ C	Resonancia magnética nuclear del isotopo de carbono 13
rpm	Revoluciones por minuto
Ser	Serina
SFB	Suero fetal bovino
TEA	Trietilamina
TMS	Tetrametilsilano
XO	Xantina Oxidasa

Resumen

El **MLB13**, derivado de quinazolina-2,4,6-triamina, ha destacado por su actividad antioxidante y potencial actividad citoprotectora (disminución de daño genotóxico), pero debido a su baja solubilidad acuosa su estudio en líneas celulares malignas es limitado. El presente trabajo describe la búsqueda de una posible solución al problema, mediante la síntesis de un profármaco de **MLB13**, utilizando el aminoácido *N,N*-dietil-beta-alanina como modificador. La intención fue que al agregar un grupo ionizable a **MLB13** éste incrementaría su solubilidad acuosa. Su diseño consideró que el profármaco liberaría el compuesto activo por hidrólisis enzimática del grupo funcional éster. Para poder llevar a cabo la síntesis del profármaco fue necesario contar con una ruta de síntesis que permitiera obtener **MLB13**, con mayor rendimiento y pureza a lo previamente informado. Los estudios llevados a cabo permitieron encontrar una ruta sintética que proporcionó la cantidad suficiente de **MLB13** para después obtener el profármaco **LCAC137**, que se caracterizó mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos. Posteriormente, se exploró su comportamiento frente a células cancerosas y, mediante un estudio de acoplamiento molecular, se estimó la susceptibilidad de hidrólisis de este compuesto frente a la enzima carboxilesterasa humana 1 (hCE1).

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer tiene grandes repercusiones como problema de salud pública en nuestro país y en todo el mundo. En el orbe, 1 de cada 6 muertes es debida a este padecimiento y, alrededor del 70% de las muertes que ocasiona, ocurren en países de bajos y medianos ingresos. En México, el cáncer es la tercera causa de muerte, después de las enfermedades cardiovasculares y la diabetes.

El cáncer involucra un proceso de crecimiento y diseminación incontrolada de células. Aparece prácticamente en cualquier lugar del cuerpo y puede llegar a invadir el tejido circundante provocando metástasis en puntos distantes del organismo, lo cual generalmente conlleva a la muerte. Actualmente, la quimioterapia es uno de los tratamientos más utilizados. Sin embargo, los agentes quimioterapéuticos presentan ciertas desventajas en su uso clínico al afectar a células sanas del cuerpo, lo cual desencadena efectos secundarios graves; encontrar resistencia, innata y/o adquirida, de las células cancerosas para evadir sus efectos. Estas limitantes, junto con la incidencia cada vez mayor del cáncer, ocasionan la necesidad continua de descubrir y desarrollar nuevos agentes quimioterapéuticos para su tratamiento.

En este contexto, nuestro grupo de investigación ha estudiado diversos derivados de quinazolin-2,4,6-triamina, con la intención de contar con compuestos que alteren el proceso carcinogénico implicando aspectos del estatus redox celular. Uno de ellos, denominado **MLB13**, destacó por su potencial antioxidante y comportamiento favorable frente al daño genotóxico ocasionado por otra sustancia; sin embargo, presentó problemas de baja solubilidad acuosa. Con la intención de ampliar su perfil de bioactividad se pretende estudiar su comportamiento frente a células cancerosas para estimar si podría trastornar su crecimiento, o influir en la actividad de otros citotóxicos. Sin embargo, su insolubilidad acuosa limita el alcance de estos cometidos.

Para tratar de resolver este inconveniente, el presente trabajo tuvo como objetivo el diseño, síntesis y evaluación de un profármaco de **MLB13** con el propósito de contar con un compuesto de mayor solubilidad acuosa y de potencial citotóxico frente a células cancerosas. Para lograr esto se adicionó de forma covalente un aminoácido a la estructura pobremente soluble en agua a través del grupo funcional éster, el cual fuera fácilmente hidrolizado por enzimas de la Fase I de biotransformación de xenobióticos. Con la idea de conocer más acerca de la susceptibilidad de hidrólisis del profármaco se propuso también un estudio de acoplamiento molecular con una enzima carboxilesterasa.

2. ANTECEDENTES

En este capítulo se presenta la información previa que da lugar al problema planteado e hipótesis del presente trabajo de tesis. Primero se menciona algunos conceptos del cáncer, después se abordan las quinazolininas como agentes quimioterapéuticos, y al final se comenta la importancia de los profármacos en la química farmacéutica.

2.1. Generalidades del cáncer

Según la Sociedad Americana contra el Cáncer, el cáncer es un grupo de enfermedades caracterizadas por un crecimiento celular incontrolado y la propagación de células anormales. Se han emitido teorías para explicar el mecanismo por el cual ocurre la pérdida del control de la proliferación. La teoría genética propone que las alteraciones adquiridas en el genoma celular, es decir las mutaciones somáticas, son las que dan origen al cáncer, mientras que la teoría epigenética sugiere que las alteraciones metabólicas pueden inducir la expresión de genes que originan cáncer^{1,2}.

Aunque el cáncer a menudo se conoce como una condición única, en realidad consiste en más de 100 enfermedades diferentes. Puede surgir en casi cualquier sitio del cuerpo humano y según el órgano afectado y otras consideraciones, cada cáncer tiene diferentes formas de evolución, pronóstico, posibilidades de prevención, diagnóstico y tratamiento. El cáncer que se origina en un órgano del cuerpo lleva consigo sus características, incluso si se propaga a otra parte del organismo^{3,4}.

Normalmente, las células humanas crecen y se dividen para formar nuevas células conforme el cuerpo las necesita. Cuando las células normales envejecen o se dañan, mueren, y células nuevas las reemplazan. Sin embargo, en el cáncer, este proceso ordenado se descontrola. A medida que las células se vuelven anormales, las células viejas o dañadas sobreviven en lugar de morir, y células nuevas se forman cuando no son necesarias. Estas células adicionales pueden dividirse sin interrupción, ya que contienen mutaciones en genes implicados en el ciclo celular y pueden llegar a formar masas, mejor conocidas como tumores^{3,5}.

Todo este proceso lleva muchos años, de manera que desde que se genera la primera célula dañada hasta que el cáncer se desarrolla lo bastante como para ser detectable o producir los primeros síntomas pueden pasar entre 10 y 20 años. Además, para que el proceso siga adelante, esa célula y sus primeros descendientes tienen que superar numerosas barreras que tratan de impedir su acción⁴.

En las células normales, los procesos de división celular y replicación de ADN son rigurosamente regidos por controles del ciclo celular, ya que poseen mecanismos para corregir irregularidades pequeñas o efectos más nocivos que resultan en la muerte celular por apoptosis o en una detención irreversible del ciclo celular, conocida como senescencia celular. Las células cancerosas adoptan capacidades que les permiten superar los mecanismos descritos anteriormente⁶.

El cáncer se considera un proceso multiescalonado que requiere la acumulación de mutaciones en proto-oncogenes y/o en genes supresores de tumores (los más comunes son los que codifican Kras y p53) y que puede acelerarse si se afectan los genes de reparación del ADN. Cada una de las anomalías genéticas presentes en las células cancerosas contribuye a la pérdida del control de la proliferación y diferenciación celulares, y a la adquisición de capacidades, como la invasión hística, el potencial de metástasis y la angiogénesis².

El cáncer comienza como un tumor primario, pero existe el peligro de que, al crecer algunas células cancerosas puedan desprenderse y moverse a lugares distantes del cuerpo por medio del sistema circulatorio o del sistema linfático y formar nuevos tumores, lejos del tumor original estableciendo metástasis. Son estas metástasis las que suelen acabar con la vida de los pacientes^{3,7}.

Debido a que pueden ocurrir una amplia variedad de cambios genéticos y epigenéticos en diferentes células dentro de los tumores malignos a lo largo del tiempo, la mayoría de los cánceres se caracterizan por la heterogeneidad notable en la población de células. Esta heterogeneidad complica significativamente el tratamiento de la mayoría de los cánceres porque es probable que existan subgrupos de células que serán resistentes al tratamiento y por tanto sobrevivirán y proliferarán incluso si la mayoría de las células se eliminan⁸.

2.2. Los signos distintivos del cáncer

Se ha observado que el desarrollo del cáncer se realiza a través de un proceso formalmente análogo a la evolución darwiniana, en el que una sucesión de cambios genéticos, cada uno de los cuales confiere uno u otro tipo de ventaja de crecimiento, conduce a la conversión progresiva de las células normales del ser humano en células cancerosas.

Hanahan, D. y Weinberg, R. sugieren que la manifestación de seis alteraciones esenciales en la fisiología celular, hace que las células normales se transformen en células cancerosas. (Figura 2.1). Cada uno de estos cambios fisiológicos permite evadir los mecanismos de defensa contra el cáncer de las células y tejidos sanos. Los autores proponen que estas seis capacidades están presentes en la mayoría y quizás en todos los tipos de tumores humanos⁹.

1. Autosuficiencia en señales de crecimiento. Las células tumorales no necesitan señalización para saber cuándo tienen que crecer y proliferar, a diferencia de las células normales que si necesitan esas señales para iniciar el proceso.
2. Insensibilidad a las señales inhibitoras del crecimiento. Las células cancerosas pueden interrumpir o ignorar estos mensajes inhibitorios. Por lo general, esto es el resultado de mutaciones o alteraciones en genes conocidos como genes supresores de tumores, que normalmente controlan la respuesta de una célula a señales externas e internas para salir del ciclo de división celular.
3. Invasión de tejidos y metástasis. Las células cancerosas, a diferencia de las células normales, pueden romper las barreras de los tejidos y propagarse de un órgano a

otro. A veces lo hacen al ingresar a los vasos sanguíneos recién formados creados por el tumor.

4. Potencial replicativo ilimitado. Las células normales tienen un número finito de divisiones que pueden realizar durante su ciclo de vida antes de morir; sin embargo, las células tumorales son mucho más "promiscuas", pues la mayoría de ellas pueden dividirse todas las veces que quieran sin problema alguno.
5. Angiogénesis mantenida. Para que un tumor crezca, necesita un suministro de sangre cada vez mayor para proporcionar oxígeno y nutrientes al creciente número de células. Un tumor puede estimular la formación de nuevos vasos sanguíneos, un proceso conocido como angiogénesis, para suministrarle nutrientes adecuados y promover su crecimiento.
6. Evasión de la apoptosis. Cuando las células envejecen o se dañan, están programadas para morir en un proceso llamado apoptosis. Las células cancerosas son peligrosas porque evitan el ciclo normal de muerte celular y continúan acumulándose en el cuerpo. Las señales de apoptosis pueden interrumpirse cuando los genes supresores de tumores sufren mutaciones u otros daños^{9,10}.

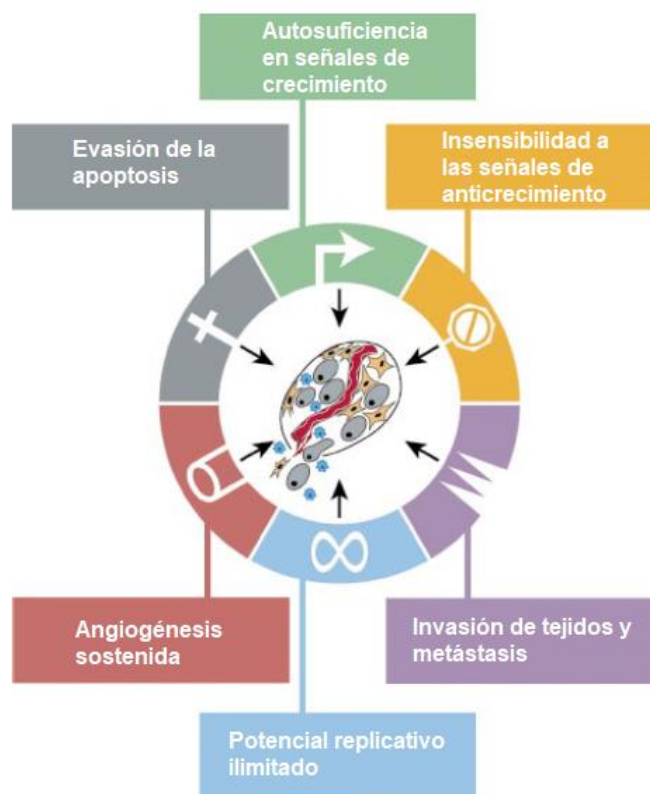


Figura 2.1. Capacidades adquiridas por las células cancerosas⁹.

2.3. Epidemiología

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial, en el año 2018 fue responsable de un estimado de 9.6 millones de muertes.

Aproximadamente 1 de cada 6 muertes en el mundo es debida al cáncer. Estudios han revelado que alrededor del 70% de las muertes por cáncer ocurren en países de bajos y medianos ingresos¹¹.

En el 2018 se presentaron 18.1 millones de nuevos casos en el mundo, debido a los cambios en el crecimiento poblacional y el envejecimiento, se estima que para el 2040 la cifra incrementará a 29.5 millones de casos de incidencia. El último reporte de la OMS muestra que más del 70% de todos los nuevos casos de cáncer se registran en Asia y Europa (Figura 2.2)¹².

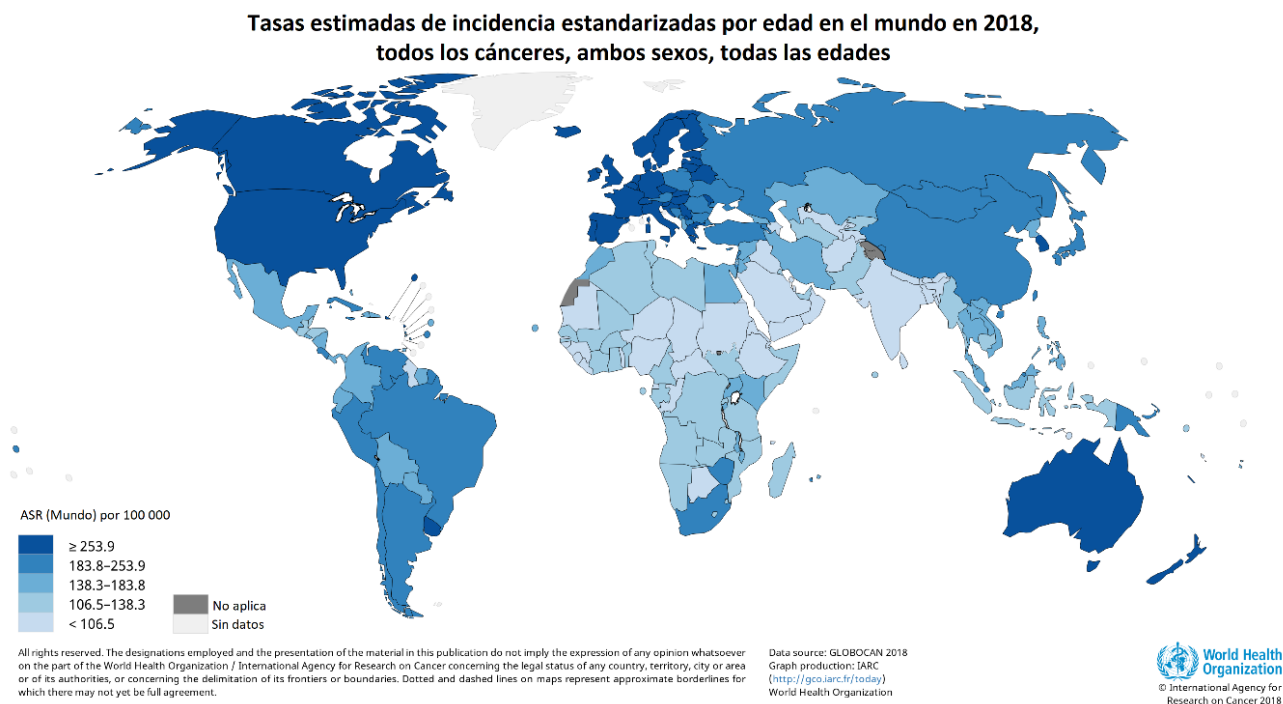


Figura 2.2. Incidencia del cáncer en el mundo en 2018¹².

Los cánceres más comunes a nivel mundial son el de pulmón, mama, colorrectal, próstata, cáncer de piel y estómago. Mientras que las causas más comunes de muerte por cáncer son debido a los cánceres de pulmón, colorrectal, estómago, hígado y mama¹¹.

El panorama en nuestro país no es muy diferente de lo que ocurre a nivel mundial, en México el cáncer es la tercera causa de muerte, después de las enfermedades cardiovasculares y la diabetes. En 2018, se presentaron 190,667 casos nuevos y hubo 83,476 muertes debidas al cáncer (Figura 2.3). Los cánceres más recurrentes en la población mexicana en general en ambos sexos, son los de mama, próstata, cervicouterino, colorrectal y de pulmón¹³. Se estima que para el 2025 en México aumente la incidencia a más de 220 mil nuevos casos¹⁴.

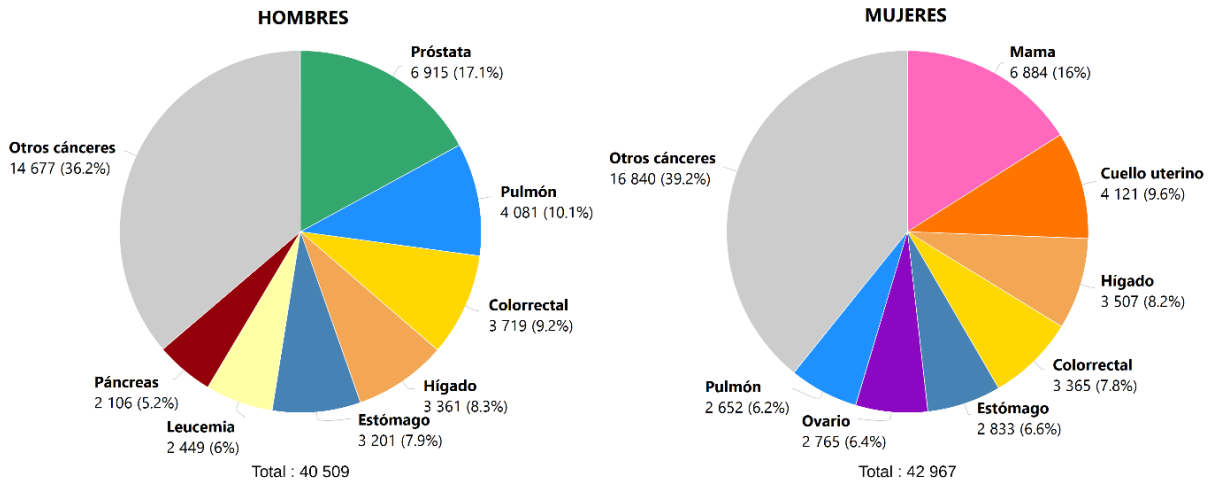


Figura 2.3. Número estimado de muertes en México en 2018¹².

2.4. Carcinogénesis

El desarrollo del cáncer involucra la mutación y la selección de células con capacidad progresivamente creciente de proliferación, supervivencia, invasión y metástasis (Figura 2.4). El primer paso es la *iniciación*, ocurre por una alteración genética que conduce a la proliferación anormal de una sola célula. El segundo paso es la *promoción*, un proceso reversible en el cual se acumulan otras alteraciones genéticas. En esta etapa, agentes específicos conocidos como promotores, mejoran el desarrollo de neoplasias al proporcionar a las células iniciadas una ventaja de crecimiento selectivo sobre las células normales circundantes. La proliferación celular provoca entonces el crecimiento de una población de células tumorales derivadas clonalmente. La *progresión*, es la última etapa y es irreversible, continúa a medida que ocurren mutaciones adicionales dentro de las células de la población tumoral y perpetúan su crecimiento y proliferación. Algunas de estas mutaciones confieren una ventaja selectiva a la célula, por ejemplo, crecimiento más rápido. Entonces ocurre la selección clonal, la cual consiste en que un nuevo clon de células tumorales evolucionado con propiedades (como supervivencia, invasión o metástasis) que confieren una ventaja selectiva, se vuelvan dominantes en la población tumoral. La selección clonal continúa durante el desarrollo del tumor, por lo que los tumores se vuelven continuamente de crecimiento más rápido y cada vez más malignos. Las células cancerosas continúan proliferando y diseminándose a través de los tejidos cercanos. Finalmente, las células cancerosas invaden otros órganos e incluso los vasos sanguíneos y linfáticos, lo que les permite hacer metástasis en todo el cuerpo¹⁵⁻¹⁸.

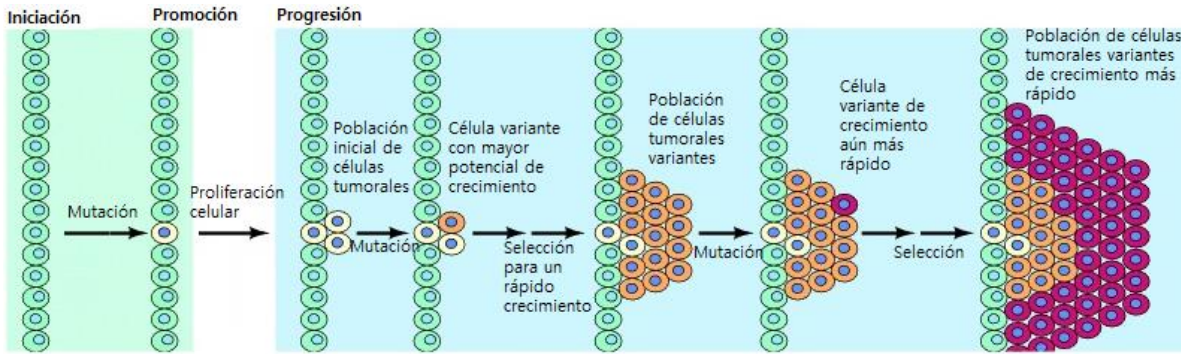


Figura 2.4. Etapas del desarrollo tumoral. El desarrollo del cáncer se inicia cuando una sola célula mutada comienza a proliferar de manera anormal. Mutaciones adicionales seguidas de la selección de células de crecimiento más rápido dentro de la población, resultan en la progresión del tumor a un crecimiento cada vez más rápido¹⁵.

2.5. Metástasis

La metástasis es el término general utilizado para describir la propagación de las células cancerosas desde el tumor primario a los tejidos circundantes e incluso a los órganos distantes y es la principal causa de morbilidad y mortalidad por cáncer (Figura 2.5). Se estima que la metástasis es responsable de aproximadamente el 90% de muertes por cáncer¹⁹. La metástasis implica una serie de pasos secuenciales e interrelacionados.

Para completar la cascada metastásica, las células cancerosas deben desprenderse del tumor primario, intravasarse en los sistemas circulatorio y linfático, evadir el ataque inmune, extravasarse en lechos capilares distantes e invadir y proliferar en órganos distantes. Las células metastásicas también establecen un microambiente que facilita la angiogénesis y la proliferación, lo que resulta en tumores secundarios malignos macroscópicos^{20,21}.

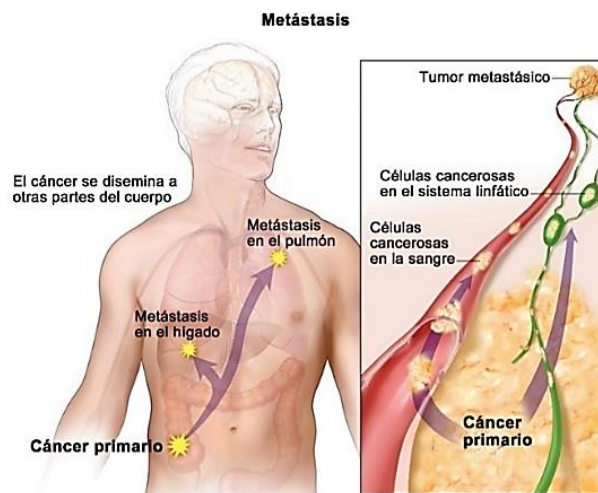


Figura 2.5. Metástasis. En la metástasis, las células cancerosas se separan del sitio donde se formaron originalmente (cáncer primario), viajan a través de la sangre y el sistema linfático, y forman nuevos tumores (tumores metastásicos) en otras partes del cuerpo. El tumor metastásico es el mismo tipo de cáncer que el tumor primario²⁰.

La presencia de metástasis tiene implicaciones en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento del cáncer. En cuanto al tratamiento, tanto la cirugía como la quimioterapia sistémica pueden desempeñar un papel importante en la mejora de pacientes seleccionados, todo dependerá del tipo de cáncer original, dónde comenzó, cuánto se ha diseminado y dónde se encuentra, edad del paciente, etc. Sin embargo, es importante reconocer que los desenlaces de pacientes con metástasis son, con raras excepciones, eventualmente fatales y que la quimioterapia se administra con el objetivo paliativo de prolongar la vida y mejorar la calidad de vida, ya que estudios han demostrado que la mediana de supervivencia después del desarrollo de metástasis a distancia es de 26 meses²²⁻²⁴.

Pocos fármacos se han desarrollado para intentar actuar directamente en el proceso de metástasis, en parte debido a que las características de los pasos críticos en los procesos metastásicos aún se están identificando. Sin embargo, ya se tiene conocimiento de un número de blancos potenciales. Por ejemplo, los genes que controlan la transición epitelio-mesénquima (EMT) y la motilidad celular, así como sus vías de señalización, son candidatos racionales para el desarrollo de fármacos. Las células tumorales a menudo son atraídas por varios tipos de quimiocinas a los sitios de órganos distantes, estas quimiocinas también pueden servir como objetivos moleculares para la terapia antimetastásica. La reactivación de genes supresores de metástasis y sus vías de señalización, así como la inhibición de la actividad transcripcional del promotor de metástasis también son estrategias racionales^{8,25}.

2.6. Causas del cáncer

A pesar de que todavía no existe un acuerdo absoluto entre la comunidad de investigación del cáncer en términos de lo que realmente causa el cáncer, los científicos están seguros de que muchos factores pueden estar relacionados con el cáncer. A estos factores se les conoce como "factores de riesgo de cáncer", los cuales incluyen hábitos alimenticios, estilo de vida, entornos de vida o trabajo, genética y muchos otros (Figura 2.6). Los siguientes son algunos de los principales factores de riesgo de cáncer que han sido identificados³:

- a) Tabaquismo; fumar cigarrillos está directamente relacionado con al menos un tercio de todas las muertes por cáncer anualmente en los Estados Unidos. Fumar cigarrillos es la causa más importante de cáncer de pulmón y la principal causa de muerte por cáncer de pulmón tanto en hombres como en mujeres. Fumar también es responsable de la mayoría de los cánceres de laringe, cavidad oral y esófago^{3,26}.
- b) Dieta; la evidencia sugiere que aproximadamente un tercio de las muertes por cáncer que ocurren cada año en los Estados Unidos están relacionadas con factores dietéticos. Estos incluyen tipos de alimentos, métodos de preparación, tamaño de porción, variedad y balance calórico general. Una dieta alta en grasas se ha asociado con un mayor riesgo de cáncer de próstata, endometrio, colon y recto^{3,27}.
- c) Genética; un mayor riesgo de desarrollar ciertos tipos de cáncer puede heredarse en el material genético transmitido de generación en generación, lo que representa hasta el 4 por ciento de todos los cánceres en todo el mundo. Los cambios genéticos

que contribuyen al cáncer tienden a afectar tres tipos principales de genes — proto-oncogenes, genes supresores de tumores y genes reparadores del ADN^{3,28}.

- d) Ocupación y medio ambiente; las personas que tienen contacto directo con agentes cancerígenos en el lugar de trabajo tienen mayor riesgo de desarrollar cáncer, por ejemplo, el refinamiento de níquel, y el trabajo con cuero y madera han sido asociados con un aumento de riesgo de cánceres específicos. La contaminación del aire (interior y exterior), el agua y el suelo causa aproximadamente del 1 al 4 por ciento de todos los cánceres en todo el mundo^{3,28}.
- e) Agentes infecciosos; los principales son el virus de la hepatitis B (VHB) y el virus de la hepatitis C, el virus del papiloma humano (VPH) y *Helicobacter pylori*, estos siguen al tabaco en importancia como factores de riesgo para la incidencia de cáncer en los países en desarrollo²⁸.
- f) Inactividad física; ha sido reconocida como una pandemia global que causa aproximadamente el 10% de los cánceres de mama y colon, y el 9% de la mortalidad prematura en general. En consecuencia, la carga de salud de la inactividad física se ha comparado con la del tabaquismo o la obesidad²⁶.
- g) Uso de alcohol; los cánceres de la cavidad oral, la faringe, la laringe, el esófago, el hígado y los senos pueden ser causados por el consumo excesivo de alcohol, con un riesgo que varía según el sitio del cáncer, pero aumenta para todos los sitios con mayor consumo. Según los datos de 2009, se estima que el 3.5% de las muertes por cáncer en los Estados Unidos (alrededor de 19,500 muertes) estaban relacionadas con el alcohol^{28,29}.

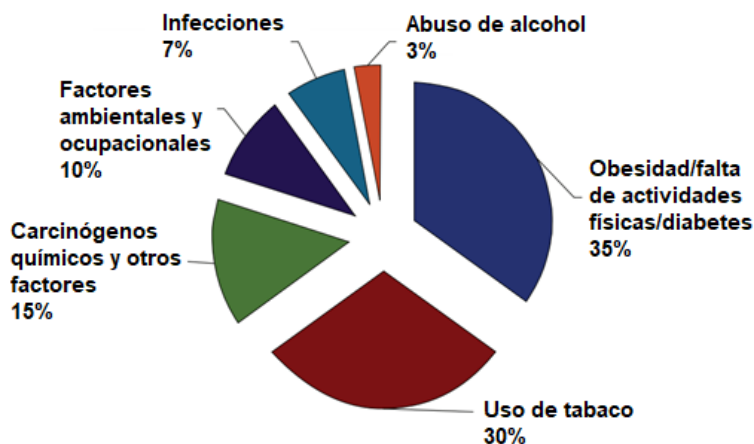


Figura 2.6. Factores de riesgo para el desarrollo del cáncer³⁰.

2.7. Tipos de cáncer

Los cánceres se clasifican de dos maneras: por el tipo de tejido en el que se origina el cáncer (tipo histológico) y por el sitio primario, o la ubicación en el cuerpo donde se desarrolló el cáncer por primera vez. A continuación, se muestra la clasificación del cáncer según el tipo histológico³¹.

- **Carcinoma:** Cáncer que comienza en la piel o en los tejidos que recubren o cubren los órganos internos. Los carcinomas, tumores malignos del tejido epitelial, representan del 80 al 90 por ciento de todos los casos de cáncer. Los carcinomas se dividen en dos subtipos principales: adenocarcinoma, que se desarrolla en un órgano o glándula, y carcinoma de células escamosas, que se origina en el epitelio escamoso.
- **Sarcoma:** Los sarcomas, que son raros en los humanos, son tumores sólidos de tejidos de soporte y conectivos, como músculos, huesos, cartílagos y tejido fibroso. Generalmente ocurre en adultos jóvenes, el sarcoma más común a menudo se desarrolla como una masa dolorosa en el hueso.
- **Leucemia:** Cáncer que comienza en el tejido formador de sangre, como la médula ósea, y hace que se produzcan células sanguíneas anormales que ingresan a la sangre. La enfermedad a menudo se asocia con la sobreproducción de glóbulos blancos inmaduros. Estos glóbulos blancos inmaduros no funcionan bien, por lo tanto, el paciente a menudo es propenso a la infección. La leucemia también afecta a los glóbulos rojos y puede causar mala coagulación de la sangre y fatiga debido a la anemia.
- **Mieloma:** Es un cáncer que se origina en las células plasmáticas de la médula ósea. Las células plasmáticas pueden volverse anormales, multiplicarse incontrolablemente y solo producen un tipo de anticuerpo que no funciona correctamente para combatir las infecciones.
- **Linfoma:** Se desarrolla en las glándulas o ganglios del sistema linfático, una red de vasos, ganglios y órganos (específicamente el bazo, las amígdalas y el timo) que purifican los fluidos corporales y producen glóbulos blancos o linfocitos que combaten las infecciones. Se reconocen más de 30 tipos de linfoma, con un comportamiento clínico que abarca desde notablemente indolente hasta profundamente agresivo.
- **Cánceres del sistema nervioso central:** Son cánceres en cerebro y médula espinal. Los tumores cerebrales primarios van desde los astrocitomas pilocíticos, que son muy poco frecuentes, no invasivos y curables quirúrgicamente, hasta el glioblastoma multiforme, el tumor cerebral intraparenquimatoso más común en adultos, que es altamente invasivo y prácticamente incurable^{15,31-34}.

2.8. Tratamientos contra el cáncer

En los últimos años, se ha logrado un progreso notable hacia una mejor comprensión del desarrollo del cáncer, lo que ha llevado a importantes avances en su tratamiento. El tipo de tratamiento en cada paciente dependerá de dónde está su cáncer, qué tan grande es, si se ha diseminado y su salud general. Algunas personas con cáncer tendrán un solo tratamiento, pero la mayoría necesitan una combinación de tratamientos^{35,36}.

- ❖ **Cirugía.** La cirugía se usa para tratar muchos tipos de cáncer. Es un procedimiento en el cual un cirujano extirpa el cáncer del cuerpo. Funciona mejor para tumores sólidos que están contenidos en un área, si el cáncer se ha diseminado, la cirugía no es opción

de tratamiento. Algunas veces la cirugía no es posible debido a la posición del tumor, por ejemplo, si el tumor está cerca de un vaso sanguíneo u otro tejido delicado³⁶.

- ❖ Radioterapia. La radiación puede describirse como una entidad física utilizada para matar a las células cancerosas. El tipo de radiación utilizada es la radiación ionizante. La radiación hace que las partículas en los cuerpos biológicos se carguen eléctricamente, de tal manera que puede matar directamente a las células cancerosas o alterarlas genéticamente para que accedan a la apoptosis y la muerte celular. El efecto adverso de la radioterapia es que también daña a las células normales que se encuentran en la periferia de la masa tumoral principal³⁷.
- ❖ Quimioterapia. Usa medicamentos para destruir las células cancerosas. La quimioterapia provoca cambios en las células tumorales para que dejen de crecer o mueran; por lo tanto, las dos ramas de los fármacos quimioterapéuticos son citostáticos y citotóxicos³⁷.
- ❖ Inmunoterapia. La premisa de la inmunoterapia es que el cuerpo se cure a sí mismo. La inmunoterapia tiene una amplia gama de modalidades terapéuticas bajo investigación, que incluyen trasplantes alogénicos de células madre, vacunas antineoplásicas, citocinas proinflamatorias, receptores de antígeno quimérico y transferencia adoptiva de células T, entre otros³⁸.
- ❖ Terapia dirigida. Es un tipo de tratamiento contra el cáncer que se enfoca en los cambios en las células cancerosas que las ayudan a crecer, dividirse y propagarse. Los fármacos dirigidos pueden: evitar que las células cancerosas se dividan y crezcan, buscar células cancerosas y matarlas, alentar al sistema inmunitario a atacar las células cancerosas, detener el cáncer de los vasos sanguíneos en crecimiento o ayudar a llevar otros tratamientos, como la quimioterapia, directamente a las células cancerosas³⁶.
- ❖ Terapia hormonal. Se sabe que casi el 25% de los tumores en hombres y el 40% en mujeres tienen una base hormonal. La terapia hormonal es un tratamiento contra el cáncer que ralentiza o detiene el crecimiento del cáncer que utiliza hormonas para crecer. Suele utilizarse para tratar los cánceres de próstata y de mama^{37,39}.

2.9. Búsqueda de nuevos agentes quimioterapéuticos

El cáncer es una enfermedad agresiva que es difícil de tratar debido a varias razones, una de ellas es porque el cáncer se trata de una enfermedad no estática, sino que evoluciona y progresa con el tiempo acumulando nuevas mutaciones³⁵.

La quimioterapia es uno de los tratamientos más comúnmente recetados para el cáncer, la ventaja más importante que ofrece es su capacidad de viajar por todo el cuerpo y atacar los cánceres generalizados. La quimioterapia puede ser dirigida o no dirigida, se habla de quimioterapia dirigida cuando genes, proteínas o receptores que se encuentran en células cancerosas son el objetivo exacto del fármaco⁴⁰.

Los fármacos de la quimioterapia no dirigida se pueden agrupar por su funcionamiento, su estructura química y sus relaciones con otros fármacos. Algunos funcionan de más de una

manera y pueden pertenecer a más de un grupo. La siguiente tabla enlista los tipos de fármacos quimioterapéuticos de acuerdo a su mecanismo de acción:

Tabla 2.9. Clasificación de fármacos de la quimioterapia según su mecanismo de acción⁴¹⁻⁴³.

Clase de fármaco	Mecanismo de acción	Ejemplos
Agentes alquilantes	Deterioro de la función celular mediante la formación de enlaces covalentes en moléculas importantes como proteínas, ADN y ARN.	<ul style="list-style-type: none"> • Platinos (cisplatino, carboplatino, oxaliplatino) • Mostazas nitrogenadas (clorambucilo, melfalán) • Oxazafosforinas (ciclofosfamida, ifosfamida)
Antimetabolitos	Funcionan como análogos estructurales sustituyendo metabolitos naturales involucrados en la síntesis de ADN y ARN, o compiten por el sitio catalítico de una enzima clave.	<ul style="list-style-type: none"> • Análogos de pirimidina (gemcitabina, 5-fluorouracilo, capecitabina) • Anti-folatos (metotrexato, raltitrexed)
Antibióticos antitumorales	Intercalan ADN en secuencias específicas, creando radicales libres que causan la rotura de la cadena.	<ul style="list-style-type: none"> • Antraciclinas (doxorrubicina, epirubicina) • Bleomicina, mitoxantrona
Inhibidores de la topoisomerasa	Actúan interfiriendo con las topoisomerasas que son enzimas que controlan la estructura 3D del ADN. Las topoisomerasas I y II son las responsables del desenrollamiento del ADN durante la replicación.	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibidores de la topoisomerasa I (irinotecán, topotecán) • Inhibidores de la topoisomerasa II (etopósido)
Fármacos de unión a tubulina	Se unen a la tubulina y previenen la formación del microtúbulo, que es importante durante la mitosis, pero también para la forma celular, el transporte intracelular y la función axonal.	<ul style="list-style-type: none"> • Alcaloides de la vinca (vincristina, vinorelbina) • Taxanos (paclitaxel, docetaxel)
Agentes quimioterapéuticos misceláneos	Algunos fármacos quimioterapéuticos ejercen su acción de manera ligeramente diferente y no se pueden clasificar bien en ninguna de las otras categorías.	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibidor de ribonucleótido reductasa (hidroxiurea) • Inhibidor de esteroides adrenocorticales (mitotano) • Retinoides (bexaroteno, isotretinoína)

Actualmente existe una gran variedad de agentes quimioterapéuticos, sin embargo, estos mantienen la desventaja de también afectar a las células sanas del cuerpo, como las células de la médula ósea, el revestimiento epitelial del sistema digestivo, los folículos pilosos y las uñas. Como consecuencia este tipo de fármacos suelen provocar algunos efectos secundarios graves (náuseas, vómitos, pérdida de cabello, fatiga, estreñimiento, fiebre, diarrea) y, en ocasiones, causar la muerte de los pacientes⁴⁴⁻⁴⁶.

Otro problema que enfrentan los fármacos quimioterapéuticos es que las células cancerosas generan gradualmente resistencia a casi todos estos compuestos a través de una variedad de mecanismos y vías distintas. La resistencia quimioterapéutica se presenta de las siguientes maneras: intrínseca, cuando existe desde el principio del tratamiento; y adquirida, si aparece durante el transcurso del tratamiento^{47,48}.

La quimiorresistencia puede ser causada por la disminución de la activación intracelular de profármacos o el aumento de la inactivación de fármacos por las enzimas de fase I y/o II. Por ejemplo, la resistencia a citarabina, utilizada para el tratamiento de la leucemia mielógena aguda, se debe a la disminución de la activación del fármaco a través de la mutación de la desoxicitidina quinasa, enzima encargada de su biotransformación. También se genera resistencia por el incremento de la exportación de fármacos o la disminución de la acumulación intracelular de fármacos. Ejemplo de ello es la resistencia a doxorubicina ocasionada por la sobreexpresión de la glucoproteína P en células tumorales, lo cual provoca la expulsión del fármaco hacia el exterior de las células. La evasión de la apoptosis es otro mecanismo por el cual se desarrolla resistencia, se sabe por ejemplo que células cancerosas comúnmente sobreexpresan proteínas antiapoptóticas, como Bcl-2, lo que resulta en una falta de respuesta a la quimioterapia⁴⁸⁻⁵⁰.

Estas desventajas mencionadas junto con la incidencia cada vez mayor del cáncer, ocasionan la necesidad continua de descubrir y desarrollar nuevos agentes quimioterapéuticos para el tratamiento del cáncer.

2.10. Aplicación de las quinazolininas como agentes terapéuticos contra el cáncer

En los últimos años ha habido un considerable interés en el desarrollo y farmacología de compuestos orgánicos heteroaromáticos. En la búsqueda de nuevos fármacos contra el cáncer, los derivados heterocíclicos, debido a sus usos terapéuticos generalizados, han atraído una gran atención entre la comunidad científica⁵¹.

Entre estas estructuras, la quinazolina constituye una clase importante de farmacóforos en química medicinal debido a su potencial para formar interacciones intermoleculares tipo $\pi - \pi$ y de puente de hidrógeno con residuos de aminoácidos aromáticos de los receptores⁵². La quinazolina es un heterociclo que pertenece a la familia de las benzodiazinas con su nitrógeno heteroatómico ubicado en las posiciones 1 y 3. Es el núcleo heterocíclico más comúnmente experimentado en la investigación médica, debido a su amplio espectro de potencial farmacológico y que una gran cantidad de sus derivados son de relevancia fisiológica y farmacéutica⁵³. Las quinazolininas han mostrado tener actividad antiviral, anticancerígena, antimicrobiana, antifúngica, antituberculosa, analgésica, antiinflamatoria, antihipertensiva, antipalúdica y anticonvulsiva entre otras⁵⁴⁻⁵⁷.

Algunos fármacos con el núcleo de quinazolina incluyen al erlotinib, gefitinib y lapatinib (Figura 2.7). Todos ellos comparten el *scaffold* de quinazolin-4-amina y se desarrollaron como terapias para el tratamiento del cáncer al inhibir la tirosina quinasa del receptor del

factor de crecimiento epidérmico (EGFR, por sus siglas en inglés), que está involucrado en la regulación del crecimiento celular, la diferenciación y supervivencia⁵³.

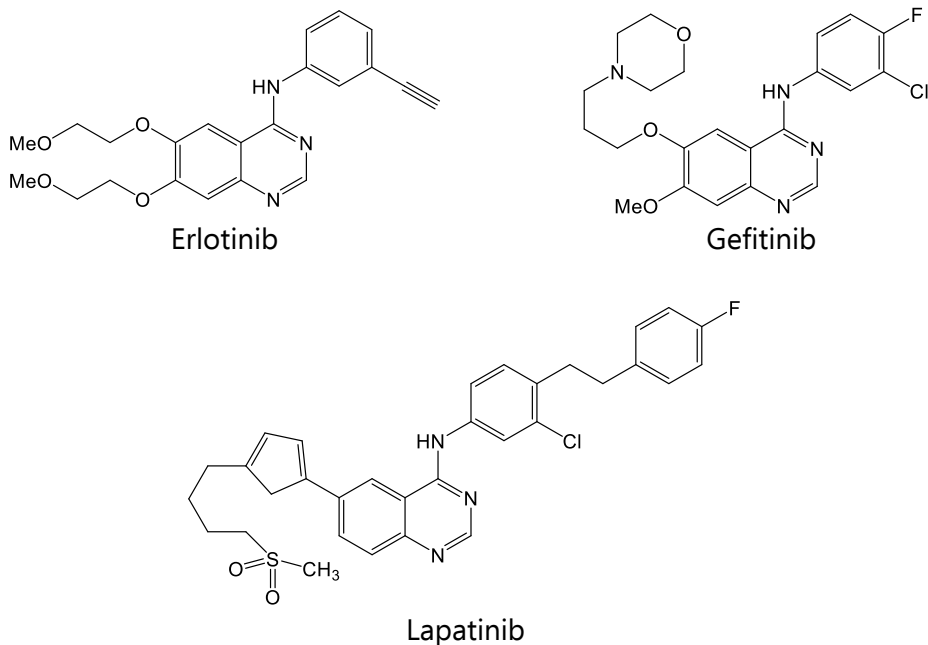


Figura 2.7. Fármacos con núcleo de quinazolina disponibles comercialmente.

Con base al buen desempeño de los derivados de quinazolina contra el cáncer, el desarrollo de nuevos derivados de quinazolina como medicamentos contra el cáncer es un campo prometedor.

2.10.1. Derivados de quinazolina-2,4,6-triamina y su actividad quimioterapéutica

En 1970, el grupo de investigación de John Davoll reportó la síntesis de derivados de la quinazolina-2,4,6-triamina, con el fin de explorar su uso como antagonistas del ácido fólico para el tratamiento de leucemia⁵⁸.

Posteriormente, en 1972 el mismo grupo reportó dos nuevos conjuntos de derivados con actividad antiparasitaria contra *Plasmodium berghei*, *Plasmodium Cynomolgy* y *Trypanosoma cruzi*, con lo cual comenzó a explorarse más la actividad antiparasitaria de estos derivados^{59,60}.

En 1989, en un estudio de actividad antiparasitaria con *Leishmania major* y *L. mexicana* de algunos de los derivados sintetizados anteriormente por el grupo de Davoll, se encontró que la actividad inhibidora de la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR) no estaba directamente relacionada con la actividad antiparasitaria *in vitro* como se creía, sin embargo, se concluyó que de alguna manera estas moléculas interferían con el metabolismo de folatos, esenciales para la supervivencia de dichos parásitos⁶¹.

Posteriormente, el grupo de Aleem Gangjee también sintetizó derivados de quinazolina-2,4,6-triamina. Sus compuestos los evaluaron contra la enzima DHFR humana y al observarse

concentraciones inhibitorias nanomolares, comenzaron a explorar las propiedades antitumorales de estos derivados⁶².

Recientemente, en el grupo de investigación del Dr. Francisco Hernández Luis, se ha desarrollado la síntesis de derivados de quinazolina-2,4,6-triamina con actividad antiparasitaria en *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania mexicana* y *Plasmodium berghei* mediante la potencial inhibición de la DHFR y la PTR^{63,64}. También se ha explorado la potencial actividad citotóxica en diferentes líneas celulares de cáncer (PC-3, HCT-15, MCF-7, MDA-MB231, SK-LU-1) de derivados de quinazolina-2,4,6-triamina y 2,6-diaminoquinazolin-4(3H)-ona^{65,66}.

Uno de estos derivados, el denominado **MLB13** se diseñó y sintetizó como agente antioxidante debido a la porción fenólica en su estructura (Figura 2.8). Este presentó actividad atrapadora de radicales libres y destacó por su acción inhibitoria frente a Xantina oxidasa (XO), una enzima en la que su inhibición está relacionada con la modificación del equilibrio redox en células malignas, lo que les puede ocasionar la muerte. Por otro lado, en un estudio de genotoxicidad *in vivo* se observó que **MLB13** no produce daño genotóxico, sino por el contrario lo disminuye y que la posible vía es mediante la inducción de muerte celular de las células dañadas. De esta manera surge el interés de evaluar el comportamiento de este nuevo compuesto frente a células cancerosas, sin embargo, presenta problemas de baja solubilidad acuosa lo que limita su evaluación en cultivos de líneas celulares malignas⁶⁷⁻⁶⁹.

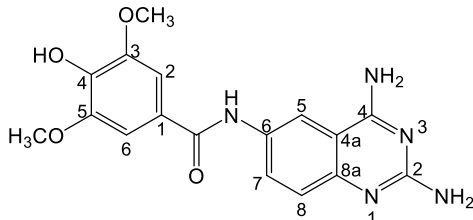


Figura 2.8. *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzamida (**MLB13**) enumerada con base a la nomenclatura química.

2.11. Profármacos

La solubilidad, es uno de los parámetros importantes para lograr la concentración deseada del fármaco en la circulación sistémica para la respuesta farmacológica deseada. Cualquier fármaco a absorber debe estar presente en forma de solución acuosa en el sitio de absorción. La baja solubilidad es uno de los principales problemas que enfrentan los investigadores durante el desarrollo de fármacos, sobre todo porque cada vez las moléculas son más complejas y de mayor peso molecular. Más del 40% de las nuevas entidades químicas desarrolladas en la industria farmacéutica son prácticamente insolubles en agua. Para resolver este problema suelen emplearse diversas técnicas que mejoran la solubilidad de los fármacos poco solubles, las cuales incluyen modificaciones físicas o químicas del fármaco⁷⁰⁻⁷².

El diseño de profármacos es una alternativa para mejorar la solubilidad acuosa. Esta estrategia es un método versátil y potente que se puede aplicar a una amplia gama de moléculas. Actualmente, entre el 5 y el 7% de los medicamentos aprobados en todo el mundo se pueden clasificar como profármacos, y aproximadamente el 20% de todos los medicamentos nuevos de molécula pequeña aprobados durante el período 2000–2008 pueden clasificarse como profármacos^{73–75}.

La estrategia de profármacos no debe considerarse un último recurso o limitarse a solo cuando el prototipo presenta problemas inesperados, ya que con esta estrategia además se pueden modular la farmacocinética, farmacodinámica y toxicología de los medicamentos⁷⁶.

Un profármaco es una molécula que no tiene ninguna actividad biológica intrínseca pero que es capaz durante las diferentes fases de su metabolismo de generar un fármaco biológicamente activo (Figura 2.9). Hay dos clases principales de profármacos, uno se llama profármaco bioprecursor, este resulta de una modificación molecular del principio activo. La modificación genera un nuevo compuesto que es capaz de ser un sustrato de las enzimas metabólicas, siendo el metabolito el compuesto activo esperado. Otro tipo es el derivado biorreversible, el cual consiste en una molécula activa unida covalentemente a una entidad denominada modificador, que al hidrolizarse libera al principio activo^{76,77}. Estos últimos son el tipo de profármaco de interés en este trabajo.

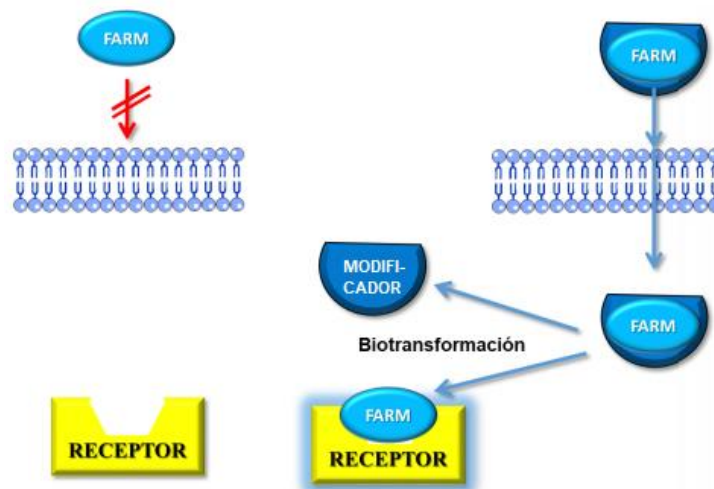


Figura 2.9. Esquema de funcionamiento de un profármaco.

El modificador ideal de los derivados biorreversibles debe tener las siguientes características⁷⁸:

- Debe guardar el compuesto activo hasta que llegue al sitio de acción terapéutica
- Permitir la liberación del compuesto activo por acción química o enzimática
- Ser fácil de preparar y de bajo costo
- Debe ser inerte y estable

Si el modificador posee actividad biológica *per se*, se dice que se trata de un profármaco mutuo o co-fármaco y cuando al liberarse el modificador genera un segundo profármaco (es decir, se requieren dos etapas metabólicas para generar el principio activo), se denomina pre-profármaco (Figura 2.10)⁷⁹.

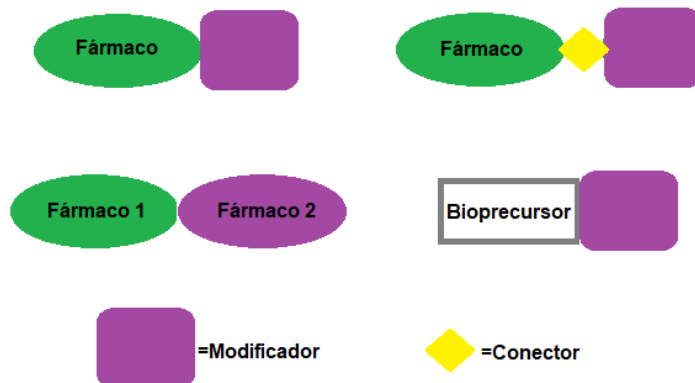


Figura 2.10. Tipos de derivados biorreversibles.

El incremento en la solubilidad del compuesto problema se logra mediante la adición, de algunos grupos ionizables al compuesto pobremente soluble en agua, como fosfato, hemisuccinato o ésteres de aminoácidos, o incluso un enlace a macromoléculas neutras como el polietilenglicol⁷⁶.

Se ha visto que los profármacos de aminoácidos mejoran la administración oral de los medicamentos que tienen poca solubilidad y permeabilidad. La introducción de un aminoácido, ya sea natural o derivado, en un fármaco original generalmente aumenta la solubilidad en agua en varios órdenes de magnitud a través de un anión de carboxilato ionizado o un catión de amonio. Actualmente existen profármacos de aminoácidos comerciales y también se han descrito varios ejemplos preclínicos del uso de aminoácidos como modificadores.

El valaciclovir es un ejemplo de este tipo de profármacos, se trata del éster de L-valina del aciclovir que es empleado actualmente en el tratamiento del herpes, varicela zóster y citomegalovirus. Valaciclovir fue desarrollado para aumentar la absorción oral y los niveles plasmáticos de aciclovir. El profármaco ha demostrado tener una biodisponibilidad oral tres a cinco veces mayor que el fármaco original debido a la participación de múltiples transportadores en la captación de valaciclovir en el intestino delgado^{80,81}.

De forma similar la valbenazina es un éster de L-valina del (+)- α -dihidotetabenazina (DHTBZ) que se emplea para tratar la discinesia tardía, este profármaco fue diseñado para prolongar la vida media de los metabolitos activos y minimizar la variabilidad en la exposición al fármaco para limitar los efectos secundarios. Otro ejemplo es el profármaco midodrina, donde el aminoácido glicina se encuentra unido a la desglímidodrina, un agonista selectivo del receptor α_1 utilizado en el tratamiento de la hipotensión ortostática. La midodrina tiene una biodisponibilidad oral del 93%, que es significativamente más que el valor

correspondiente para la desglímidodrina (50%). Algunos ejemplos más son los profármacos valganciclovir, talaglumetad, valtorcitabina, etc⁸²⁻⁸⁴.

Debido a la amplia especificidad del sustrato, el direccionamiento de profármacos a transportadores del tracto gastrointestinal como PEPT1, PEPT2, hPT1, etc. se considera uno de los métodos prometedores para mejorar la absorción oral de las formas activas de escasa permeabilidad. Una vía exitosa para ser un sustrato de PEPT1 es la conjugación de un aminoácido natural con el fármaco original. En la mayoría de los casos, el profármaco de éster de L-valina ha demostrado tener mejor afinidad con PEPT1 que otros ésteres de aminoácidos^{85,86}.

La mayoría de los profármacos de aminoácidos son ésteres o amidas, en los que el grupo α -amina o α -carboxílico de los aminoácidos está unido a grupos funcionales del fármaco o compuesto activo (hidroxilo, amina y carboxilo). El grupo α -amina o α -carboxílico de los aminoácidos también se puede unir al fármaco original a través de enlaces de carbonato y carbamato. El uso de las cadenas laterales de los aminoácidos, que ofrecen una gran cantidad de grupos funcionales (por ejemplo, amina, ácido carboxílico, alcohol, tiol), incrementa las oportunidades en el diseño de profármacos (Figura 2.11)⁷⁵.

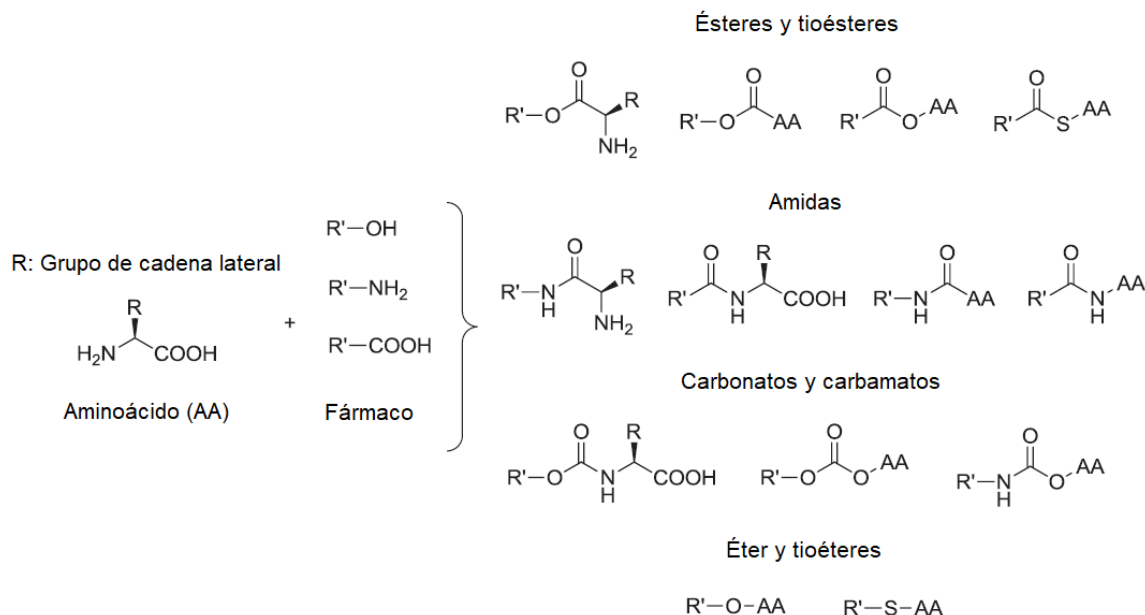


Figura 2.11. Enlaces típicos entre los grupos funcionales de aminoácidos y los fármacos originales⁷⁵.

Los ésteres son los profármacos más comúnmente utilizados, y se estima que aproximadamente el 49% de todos los profármacos comercializados se activan por hidrólisis enzimática⁷⁴. Las enzimas principalmente involucradas en la bioconversión de profármacos a base de éster son la paraoxonasa, carboxilesterasa, acetilcolinesterasa, colinesterasa, butirilcolinesterasa y arilesterasa. La mayoría de estas enzimas entran en la categoría de

enzimas hidrolíticas, sin embargo, las enzimas no hidrolíticas como citocromo P450, también pueden catalizar la bioconversión de profármacos de éster⁸⁷.

Las esterasas son responsables de la activación de profármacos y la desintoxicación de fármacos, estas enzimas contribuyen al metabolismo del 10% de los fármacos clínicos y terapéuticos que contienen enlaces éster, amida y tioéster. Las esterasas se dividen en 3 categorías A-, B- y C-esterasas, según la especificidad del sustrato y la sensibilidad a varios inhibidores. En general, las A-esterasas no son inhibidas por organofosforados, sin embargo, hidrolizan estos compuestos; las B-esterasas son inhibidas por organofosforados, carbamatos y compuestos organosulfurados y las C-esterasas no hidrolizan los ésteres organofosforados ni son inhibidas por ellos^{87,88}.

Entre estas esterasas, las enzimas carboxilesterasas (CES), pertenecientes a las B-esterasas, son bien conocidas por su participación en el metabolismo de los fármacos. Las enzimas CES son miembros de la superfamilia de serina esterasa que posee el residuo de serina del dominio conservado -Gly-X-Ser-X-Gly- en el sitio activo⁸⁸. Las CES hidrolizan sustratos utilizando un mecanismo de dos pasos que se conserva en todas las hidrolasas serinas. Este proceso depende de una triada catalítica esencial que generalmente está compuesta por tres residuos (serina, histidina y ácido glutámico). Primero, el ataque nucleofílico por el átomo de oxígeno de serina activado por base (como Ser221 en CES1 de humano) en el carbono carbonílico del sustrato, conduce a la formación de un acil-enzima intermediario y la liberación de un alcohol, tiol, o amina. En segundo lugar, el acil-enzima intermediario es atacado de manera idéntica por el agua que actúa como nucleófilo, lo que lleva a liberar el metabolito ácido carboxílico y regenerar la carboxilesterasa a su estado original (Figura 2.12)⁸⁹.

Las enzimas CES humanas se clasifican en 5 subfamilias: CES1, CES2, CES3, CES4A y CES5A. Se sabe que CES1 y CES2 son responsables de la biotransformación de varios fármacos y profármacos utilizados clínicamente. La homología de aminoácidos de CES1 y CES2 alrededor del sitio activo es alta, sin embargo, se han observado diferencias significativas en su especificidad de sustrato. Hasta la fecha se han reportado bastantes fármacos que actúan como sustratos de carboxilesterasa humana 1 (hCE1): capecitabina, lovastatina, imidapril, metilfenidato, oseltamivir, clopidogrel, etc^{88,90}.

En particular la hCE1 se expresa principalmente en el hígado, con cantidades menores en el intestino, riñón, pulmón, testículos, corazón, monocitos y macrófagos. Es una enzima capaz de hidrolizar ésteres, tioésteres, amidas, carbamatos e incluso puede llevar a cabo reacciones de transesterificación. LA hCE1 se localiza en el retículo endoplásmico de las células, existe en un equilibrio trímero-hexámero y cada trímero posee tres sitios catalíticos. El dominio catalítico de hCES1 está compuesto por la triada Ser-221, Glu-354 e His-468. El sitio catalítico tiene una cavidad grande (aproximadamente 1300 Å) con regiones específicas para la unión de porciones estructurales metilo o etilo y una región más grande y más flexible que puede interaccionar con grupos funcionales más voluminosos. El sitio activo de hCE1 contiene bolsas rígidas y flexibles, lo que explica la capacidad de la enzima para actuar de manera

específica y promiscua. Así mismo, la enzima presenta el sitio Z, que funge como regulador alostérico y la compuerta o "side door", que permite la entrada y salida de sustratos y productos⁹⁰⁻⁹³.

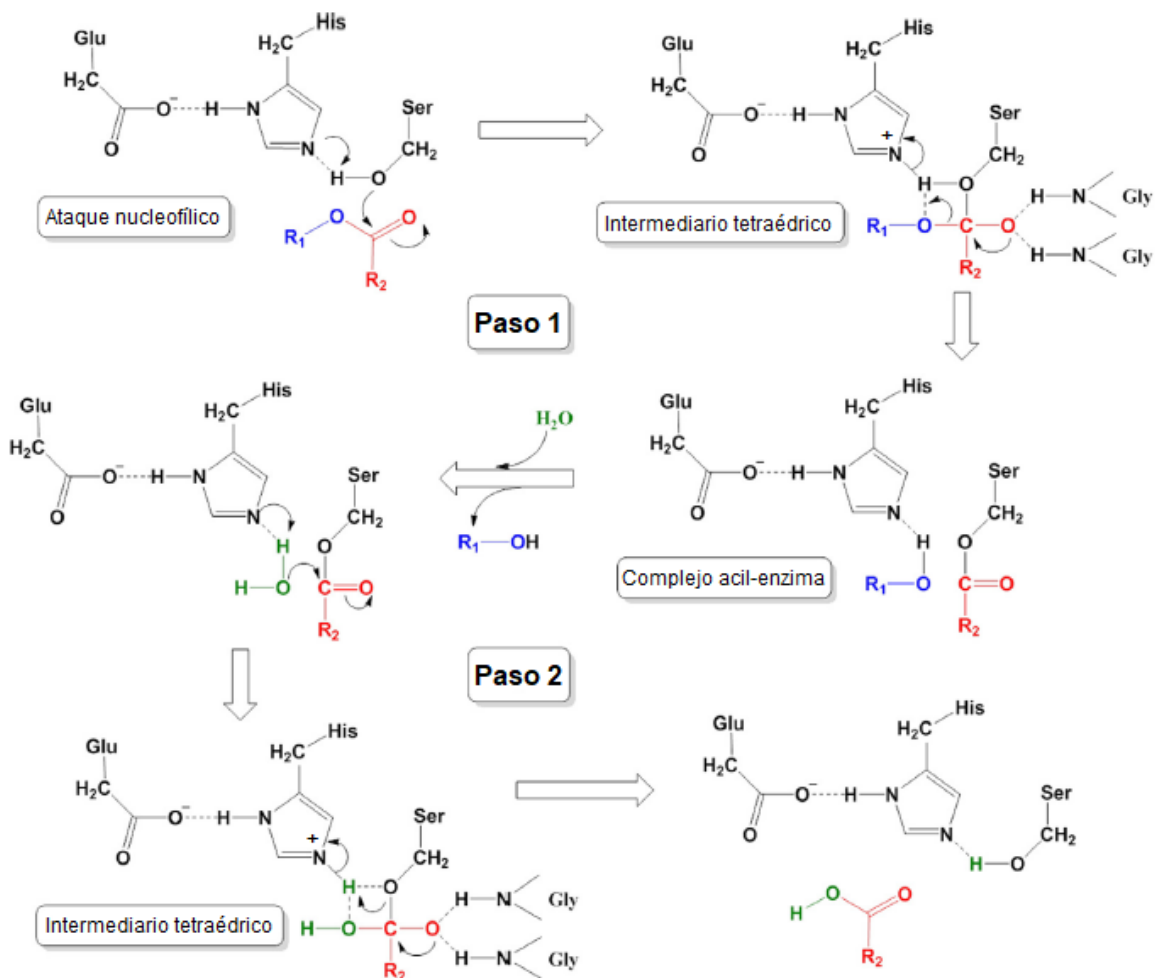


Figura 2.12. Mecanismo catalítico de dos pasos de carboxilesterasas de mamíferos⁸⁹.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer es un grupo de padecimientos que afecta a millones de personas en el mundo cada año, principalmente de países en vías de desarrollo. Los actuales agentes quimioterapéuticos de uso clínico no son suficientes para combatir este problema ya que tienen ciertas limitaciones lo cual mantiene la necesidad de seguir buscando nuevas moléculas que puedan llegar a actuar en el tratamiento del cáncer. El **MLB13** ha destacado por su actividad antioxidante y su comportamiento favorable frente al daño genotóxico, sin embargo, su baja solubilidad acuosa ha limitado su evaluación frente a líneas celulares malignas. ¿Será posible que, mediante la incorporación de un aminoácido a la estructura del **MLB13**, se logre mejorar su comportamiento frente a células cancerosas?

4. HIPÓTESIS

La síntesis del profármaco **LCAC137**, mediante la esterificación del grupo hidroxilo de **MLB13** con un aminoácido, dará origen a un compuesto con actividad inhibitoria de la viabilidad celular en células cancerosas.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

- Sintetizar, caracterizar y evaluar frente a células cancerosas, el profármaco **LCAC137**.

5.2. Objetivos particulares

- Sintetizar el derivado **MLB13** mediante diferentes rutas con la finalidad de mejorar su método de obtención.
- Elegir el método de síntesis más conveniente para obtener **MLB13** en mayor cantidad y con mayor pureza.
- Sintetizar un profármaco éster de aminoácido utilizando diferentes agentes acoplantes.
- Caracterizar mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos el intermediario **MLB13** y su profármaco.
- Enviar a evaluación biológica contra células cancerosas a **MLB13** y su profármaco.
- Realizar estudios de acoplamiento molecular (docking) con la enzima carboxilesterasa humana 1.

6. METODOLOGÍA

Los pasos de la metodología que se siguieron para desarrollar el presente trabajo pueden observarse en el siguiente diagrama (Figura 6.1). Posteriormente se describirá de forma general las actividades estipuladas y detalladamente en los apéndices correspondientes.

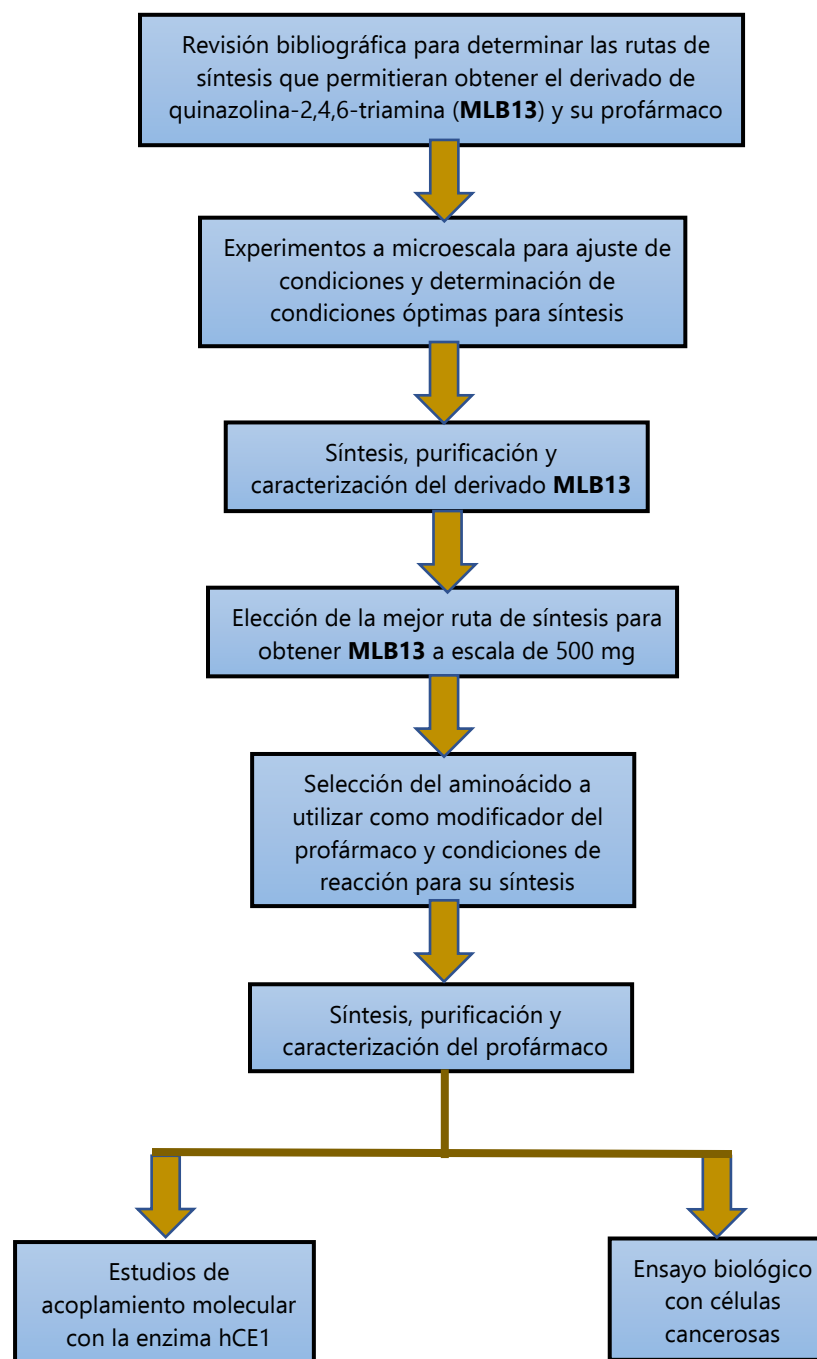


Figura 6.1. Metodología llevada a cabo para el desarrollo del proyecto de esta tesis.

6.1. Parte química

6.1.1. Consideraciones para el diseño del profármaco

El profármaco diseñado es del tipo bipartita, es decir un fármaco unido a un modificador, el cual se estructuró de acuerdo a la Figura 6.2.

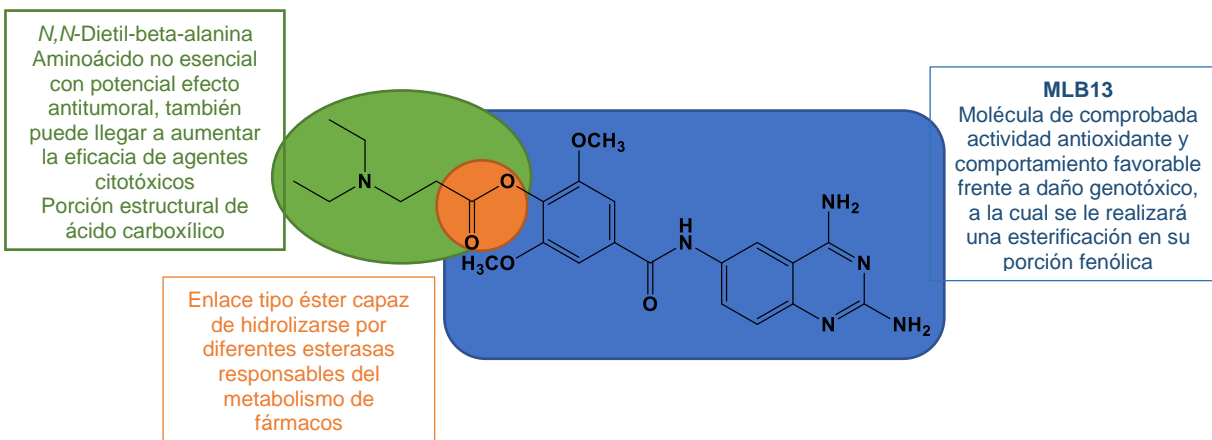


Figura 6.2. Profármaco éster de aminoácido (**LCAC137**) a sintetizar a partir de *N,N*-diethyl-beta-alanina y un derivado de quinazolina-2,4,6-triamina (**MLB13**).

MLB13 es un derivado de quinazolina-2,4,6-triamina que inicialmente fue diseñado con similitud estructural al pirogalol, con la finalidad de que este presentara actividad antioxidante y así lograr una molécula con posibilidades de aplicación contra la carcinogénesis por estrés oxidante. Al evaluar el compuesto resultó tener la actividad esperada. Explorando más esta molécula, en un ensayo de genotoxicidad *in vivo*, mediante el ensayo de micronúcleos, se observó que **MLB13** no solo no causaba daño genotóxico, sino que disminuía el daño causado por un agente tóxico como el CrO_3 , probablemente tras ocasionar la muerte de células dañadas. La limitante de esta molécula es su baja solubilidad acuosa lo cual ha imposibilitado su evaluación en líneas celulares malignas. De acuerdo a lo anterior, fue considerado como un candidato idóneo para llevar a cabo su síntesis y la de su profármaco y de esta manera poder indagar acerca de su actividad en células cancerosas.

La estrategia de profármacos suele emplearse para mejorar la solubilidad acuosa, la permeabilidad o para reducir el rápido metabolismo de un compuesto de interés. En este trabajo lo que se desea es mejorar la solubilidad acuosa del compuesto original tras introducir un aminoácido a su estructura.

La unión de aminoácidos a compuestos insolubles en agua por medio de un enlace éster es un método bastante utilizado. A pH fisiológico, el aminoácido presente en el profármaco se encuentra ionizado, de esta manera se logra el incremento de la solubilidad acuosa de la molécula original. Este tipo de profármacos suelen ser muy convenientes porque una vez

activado el fármaco *in vivo*, el modificador liberado, es decir el aminoácido, no presenta toxicidad en el organismo, requisito indispensable en un profármaco⁹⁴.

Se decidió incorporar el aminoácido mediante una esterificación en el grupo hidroxilo de **MLB13** debido a que los enlaces tipo éster son fácilmente hidrolizados por un gran número de enzimas metabolizadoras, además son enlaces más fáciles de escindir si los comparamos con las amidas que son de mayor estabilidad. Las velocidades de hidrólisis de los profármacos estructurados mediante un enlace amida suelen ser bajas y por lo tanto no se alcanza la liberación *in vivo* de cantidades suficientes del fármaco, disminuyendo así el efecto terapéutico esperado.

El aminoácido que se decidió utilizar para la síntesis del profármaco fue *N,N*-dietil-beta-alanina debido a su potencial efecto antitumoral debido a que se biotransforma a beta-alanina, un aminoácido no esencial que ha demostrado reducir el metabolismo canceroso de las células epiteliales de mama cuando se utiliza como tratamiento. Además, este aminoácido puede aumentar la eficacia de agentes citotóxicos como Doxorubicina. La beta-alanina al combinarse con histidina forma carnosina cuya acumulación ha demostrado reducir la proliferación de células tumorales cultivadas y el crecimiento tumoral *in vivo*. Otros investigadores han sugerido que la beta-alanina puede ser un agente antitumoral potencial que exhibe varios efectos anticancerígenos en células tumorales renales y cervicales^{95,96}.

N,N-Dietil-beta-alanina proporciona ventaja al momento de la síntesis del profármaco, ya que mediante sus dos etilos mantiene protegido el grupo amino del aminoácido, evitando reacciones colaterales que pudieran disminuir el rendimiento de la reacción y dificultar la purificación. Mantener la protección del grupo amino en la estructura final del profármaco no causa mayor dificultad, debido a que se espera que, al biotransformarse estas cadenas alquílicas, den paso a la formación de dos moléculas de acetaldehído y la beta-alanina. Actualmente existen fármacos que en su estructura contienen aminoácidos *N*-alquilados los cuales suelen ayudar al incremento de la liposolubilidad de la molécula mejorando su traslado por las membranas celulares^{97,98}.

6.1.2. Síntesis de los compuestos

6.1.2.1. Síntesis de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzamida (MLB13)

De forma general, para la obtención del derivado **MLB13** se siguieron tres rutas de síntesis diferentes:

6.1.2.1.1. Ruta de síntesis A para obtener el derivado **MLB13**

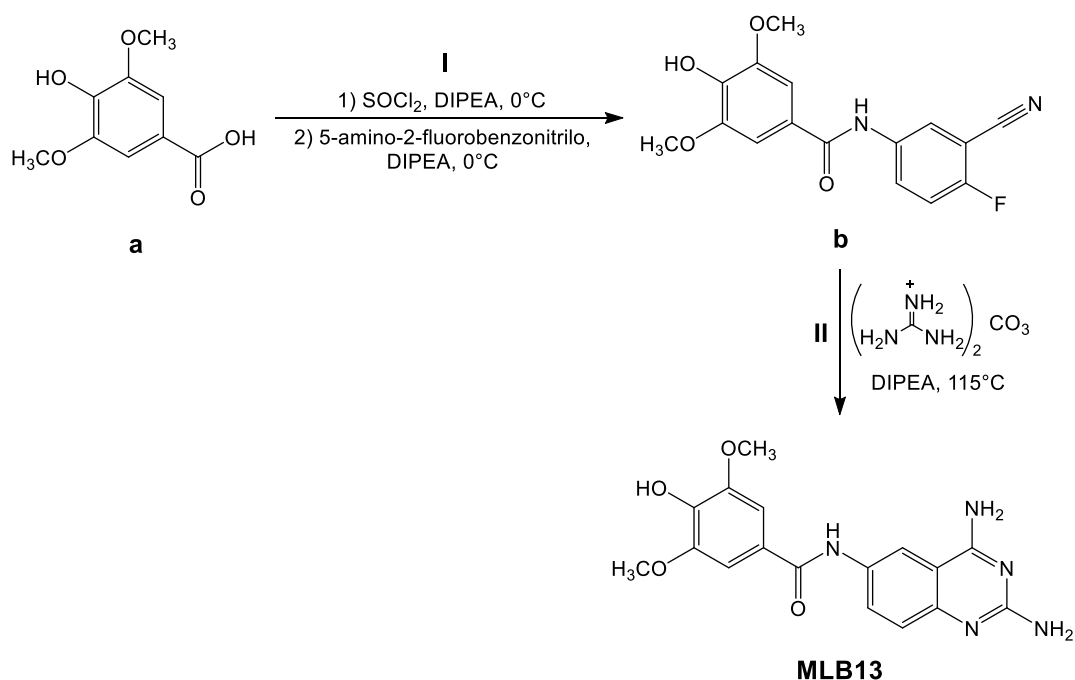


Figura 6.3. Ruta sintética A para la obtención de **MLB13**.

Esta metodología ya había sido propuesta y estudiada, según lo reportado en la tesis de López Sánchez, M. A. en el año 2015⁶⁷. La obtención del primer producto (**b**) se realizó en dos etapas. En la primera, se formó el cloruro de acilo, mediante la reacción con cloruro de tionilo del carboxilato, producto de la neutralización previa del ácido síringico (**a**) con DIPEA. Una vez que se realizó la destilación azeotrópica del exceso de cloruro de tionilo con tolueno anhidro, se procedió con la siguiente etapa que consistió en la reacción del cloruro de acilo con el 5-amino-2-fluorobenzonitrilo en medio básico para dar lugar a la formación de la carboxamida (**b**). La última reacción para obtener **MLB13** se trató de una ciclocondensación con guanidina formada *in situ* de la neutralización con DIPEA del carbonato de guanidina; esta reacción implica una sustitución nucleofílica aromática y el ataque de la guanidina al carbono sp del nitrilo (Figura 6.3).

El avance de cada una de estas reacciones se monitoreó mediante cromatografía de capa fina (ccf). La purificación con cromatografía en columna con polaridad creciente de cloroformo a metanol, permitió eliminar residuos de materias primas y otras impurezas del producto obtenido mediante esta ruta de síntesis.

6.1.2.1.2. Ruta de síntesis B y C para obtener el derivado MLB13

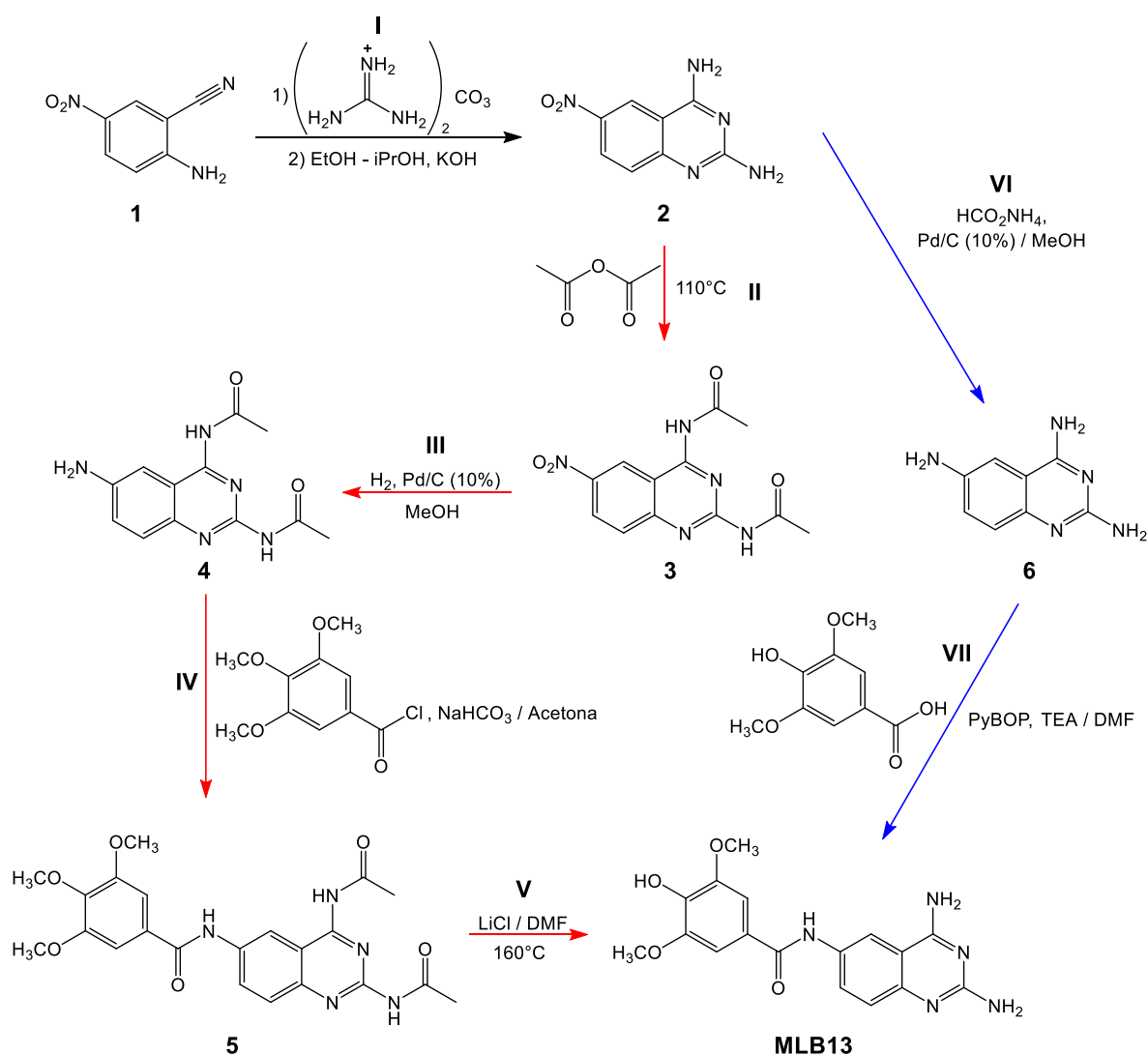


Figura 6.4. Ruta sintética B (flechas rojas) y ruta sintética C (flechas azules) para la obtención de MLB13.

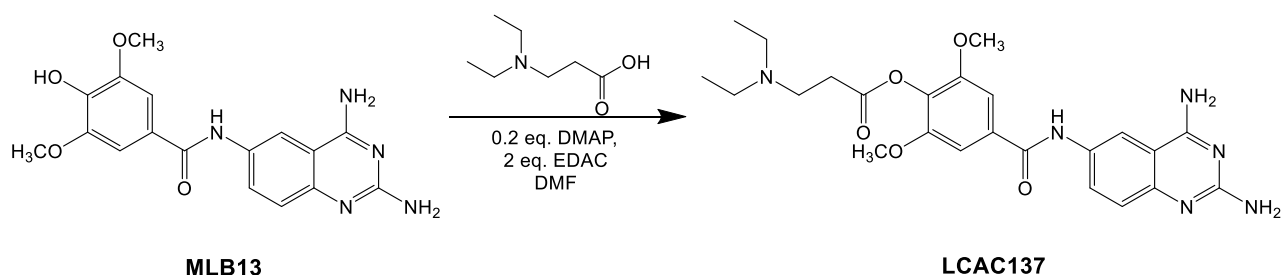
La primera reacción de la ruta de síntesis B consistió en ciclar 2-amino-5-nitrobenzonitrilo (**1**) con carbonato de guanidina formada *in situ* de la neutralización con KOH del carbonato de guanidina, para obtener 6-nitroquinazolina-2,4-diamina (**2**). Posteriormente, al compuesto obtenido se le protegieron los grupos amino acetilando con anhídrido acético a una temperatura de 110 °C. La siguiente reacción fue una reducción del grupo nitro a amino, mediante una hidrogenación catalítica con Pd/C para la formación de N,N'-(6-aminoquinazolina-2,4-diil)diacetamida (**4**). Después se hizo reaccionar (**4**) con cloruro de 3,4,5-trimetoxibenzoilo a temperatura ambiente, para obtener la carboxamida (**5**) en la posición 6 de la quinazolina mediante una reacción de Schotten-Baumann. El siguiente paso se trató de una desmetilación selectiva de (**5**) en la posición 4 del anillo de benceno,

catalizada con LiCl anhidro en DMF a una temperatura de 160 °C, de esta reacción se logró el compuesto **MLB13** deseado (Figura 6.4).

Los métodos B y C tienen en común la primera reacción para la formación de 6-nitroquinazolina-2,4-diamina (**2**). El método C, a diferencia del B, inicia con una reducción del grupo nitro a amino en la posición 6 de (**2**), sin proteger previamente los aminos en posiciones 2 y 4 de la quinazolina, mediante una reacción con formiato de amonio catalizada con Pd/C en metanol a 80 °C. Una vez que se tiene la quinazolina-2,4,6-triamina (**6**) se lleva a cabo una reacción de acoplamiento con ácido síringico en presencia de una base y benzotriazol-1-iloxi)-tris-(pirrolidino)fosfato (PyBOP), como agente activante de grupos carboxilos en DMF y a temperatura ambiente, para finalmente obtener **MLB13**.

El avance de cada una de estas reacciones se monitoreó mediante cromatografía de capa fina (ccf). La purificación con cromatografía en columna con polaridad creciente de cloroformo a metanol, permitió eliminar residuos de materias primas y otras impurezas del producto **MLB13** finalmente obtenido a través de las rutas sintéticas B y C.

6.1.2.2. Síntesis de 4-[(2,4-diaminoquinazolin-6-il)carbamoil]-2,6-dimetoxifenil 3-(dietilamino)propanoato (LCAC137)



Para realizar esta reacción primero se tuvo que obtener **MLB13** a escala de 500 mg mediante la ruta de síntesis C. Posteriormente, a través de una variante de la esterificación de Steglich, se hizo reaccionar **MLB13** con clorhidrato de *N,N*-dietil-beta-alanina en presencia de DMAP como catalizador (crucial para la formación eficiente del éster), EDAC como agente acoplante (el cual da paso a la formación del intermediario de *O*-acilurea) y DMF como disolvente. Esta reacción se llevó a cabo a 60 °C durante 6 días y se fue monitoreando mediante cromatografía de capa fina (ccf). La purificación con cromatografía en columna con polaridad creciente de diclorometano a metanol, permitió eliminar residuos de materias primas y otras impurezas del producto **LCAC137**.

6.1.3. Caracterización espectroscópica y espectrométrica

La caracterización espectroscópica de los intermediarios *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzamida (**MLB13**) obtenidos mediante las diferentes metodologías y del profármaco (**LCAC137**), se llevó a cabo mediante espectros elaborados por el personal de la Unidad de Servicio de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI), FQ UNAM

mediante RMN de ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC, NOESY y experimentos de intercambio con agua deuterada en el espectrómetro de RMN de 9.4 T marca Varian modelo VNMRS y/o en el espectrómetro de RMN de 9.4 T marca Varian modelo MR.

Los espectros de IR fueron elaborados por la Q. Maricela Gutierrez Franco en el equipo FTIR/FIR 400 de Perkin-Elmer. (Reflectancia atenuada ATR). Los espectros de masas se realizaron mediante APCI de alta resolución en el espectrómetro de masas con analizador másico de tiempo de vuelo, marca Perkin Elmer, modelo AxION 2 TOF por la Q. Georgina Artemisa Duarte Lisci.

En particular, la asignación de los protones de las moléculas en el espectro de RMN de ^1H se realizó mediante los valores de desplazamiento químico (δ) y la correlación de las constantes de acoplamiento observadas en el mismo espectro, así como la correlación observada en el espectro bidimensional COSY.

La asignación de los protones de las carboxamidas y los aminos se llevó a cabo mediante los experimentos de intercambio con agua deuterada, y NOESY; mientras que la asignación de los carbonos de las moléculas en el espectro de RMN de ^{13}C se llevó a cabo mediante los valores de desplazamiento químico (δ) y las correlaciones existentes en los espectros de correlación heteronuclear HSQC y HMBC.

6.2. Parte biológica

Se emplearon dos líneas celulares de cáncer de mama, MCF-7 y MDA-MB-231; una línea celular de cáncer cervicouterino, HeLa; y una línea celular no cancerosa, J774. Los ensayos *in vitro* de éstas cuatro líneas celulares fueron realizados en el laboratorio de investigación en diseños experimentales, epidemiológicos y clínicos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca (UABJO) por el grupo de la Dra. Adriana Moreno Rodríguez; donde se evaluó la actividad (inhibición de la viabilidad celular) del compuesto **MLB13** y su profármaco **LCAC137** frente a la del cisplatino, que se utilizó como fármaco de referencia.

Las líneas celulares fueron adquiridas de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). MCF-7, MDA-MB-231 y J774 fueron cultivadas con medio RPMI 1640, mientras que la línea celular HeLa fue cultivada en medio DMEM. Ambos medios fueron suplementados previamente con 1% de aminoácidos no esenciales, 1% de antibióticos y 10% de suero fetal bovino (SFB). Los cultivos celulares se mantuvieron a 37° C con 95% de humedad y 5% de CO_2 .

Para MCF-7, MDA-MB-231 y HeLa se sembraron 10,000 células por pozo en placas de 96 pozos, mientras que para la línea celular J774 se colocaron 50,000 células por pozo. Las cuatro líneas celulares se mantuvieron en un volumen constante de 100 μL /pozo y se dejaron incubar durante 24 horas. Posteriormente las células fueron tratadas con los compuestos de interés a diferentes concentraciones por 24 horas.

Para la preparación de las disoluciones a diferentes concentraciones de los compuestos de interés se partió de una disolución stock de 10 mg/mL de **MLB13** y de **LCAC137** en DMSO, para después obtener 7 microplacas de 96 pozos con concentraciones de 0.78125 μM , 1.5625 μM , 3.125 μM , 6.25 μM , 12.5 μM , 25 μM , 50 μM y 100 μM , montadas por triplicado y para cada uno de los compuestos. Las diluciones de trabajo se prepararon en el medio de crecimiento correspondiente el día de la prueba.

6.2.1. Ensayo de reducción del MTT

Después de tratar las diferentes líneas celulares con los compuestos durante 24 horas, se retiró el medio de cultivo y se lavó con solución buffer de fosfatos (PBS) cada uno de los pozos. El reactivo revelador de la viabilidad celular que se utilizó fue el MTT (una sal amarilla de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol o simplemente metil-tiazol-tetrazolio) a una concentración de 0.25 mg/mL en PBS. Transcurridas 4 horas de incubación a 37 °C con el reactivo revelador, se descartaron los sobrenadantes de las placas de 96 pozos y los cristales de formazán se disolvieron en alcohol isopropílico. Posteriormente se realizó la lectura de absorbancia en un lector de placas BIORAD 550 a 570 nm.

6.2.2. Ensayo de captación del rojo neutro

Después de tratar las diferentes líneas celulares con los compuestos durante 24 horas, se retiró el medio de cultivo de las placas y se lavó con solución PBS cada uno de los pozos. Posteriormente se añadió el colorante rojo neutro a una concentración de 0.33%. Transcurridas 1.5 horas de incubación a 37 °C con el colorante, se descartaron los sobrenadantes de las placas de 96 pozos y se lavaron con solución PBS. Luego se añadió la solución de revelado, se agitó unos segundos la placa y se realizó la lectura de absorbancia en un lector de placas BIORAD 550 a 540 nm.

6.2.3. Ensayo con cristal violeta

Después de tratar las diferentes líneas celulares con los compuestos durante 24 horas, se retiró el medio de cultivo de las placas y se agregó una solución de formaldehído al 10% a cada uno de los pozos. Luego las placas se lavaron con agua destilada para posteriormente agregar el colorante cristal violeta a una concentración de 0.5%. Transcurridos 20 min de incubación a 37 °C con el colorante, se descartaron los sobrenadantes de las placas de 96 pozos y se lavaron con agua destilada. Finalmente se añadió una solución de ácido acético al 10% y se realizó la lectura de absorbancia en un lector de placas BIORAD 550 a 595 nm.

6.2.4. Ensayo de reducción de resazurina

Después de tratar las diferentes líneas celulares con los compuestos durante 24 horas, se retiró el medio de cultivo y se lavó con solución buffer de fosfatos (PBS) cada uno de los pozos. El reactivo revelador de la viabilidad celular que se utilizó fue la resazurina (compuesto no fluorescente, azul) a una concentración de 10% v/v. Posteriormente

transcurridas 4 horas de incubación a 37 °C con el reactivo revelador, se realizó la lectura de absorbancia en un lector de placas BIORAD 550 a 570 nm.

Los resultados de las mediciones fueron procesados en los programas de análisis estadístico BioStat® y GraphPad Prism, para obtener la CI_{50} de cada compuesto mediante un análisis Probit.

6.3. Parte computacional

Esta parte del proyecto se realizó con el apoyo del Dr. Antonio Romo Mancillas de la Universidad Autónoma de Querétaro.

6.3.1. Elección de la estructura cristalizada de la enzima

La enzima carboxilesterasa humana 1 (hCE1) se localizó en la base de datos de UniProt, primero se buscó la proteína cristalizada de la especie *Homo sapiens* con mejor resolución (debajo de 2.5 Å) y que no estuviera en su forma inhibida. En este sentido, se empleó la enzima hCE1 obtenida por el método de difracción de rayos X, con resolución de 2.4 Å (ID PDB: 1MX1).

La enzima se descargó por medio del programa Maestro 12.2, donde se removieron las moléculas de agua, los ligandos y las cadenas B, C, D, E, F, ya que se trataba del homohexámero y solo se dejó la cadena A. También se realizó la alineación de los puentes de hidrógeno utilizando PROPKA pH 7.0. Después se guardó la proteína en formato mol2 para su posterior empleo en el estudio de acoplamiento molecular.

6.3.2. Estudio de acoplamiento molecular^{99,100}

6.3.2.1. Preparación del ligando

Los ligandos se modelaron en el programa Maestro 12.2 y se guardaron en formato mol2. Posteriormente, se prepararon en el programa Autodock tools 1.5.6, en donde se detectó automáticamente la raíz de la estructura y los enlaces rotables.

6.3.2.2. Preparación de la proteína

La proteína se preparó empleando la herramienta Autodock tools 1.5.6, donde se fusionaron los hidrógenos no polares, se mantuvieron los hidrógenos polares capaces de formar puentes de hidrógeno y se agregaron las cargas parciales.

6.3.2.3. Acoplamiento molecular

Se empleó la herramienta Receptor Grid Generation de Glide en Maestro 12.2 para localizar las coordenadas del sitio activo con ayuda de la posición del ligando (tacrina) que originalmente traía la enzima. Para el acoplamiento molecular se empleó el programa

Autodock 4.2.6 y la visualización y análisis de los resultados generados se realizó empleando nuevamente Autodock tools 1.5.6 y MOE 2014.0901.

La generación de la rejilla se realizó en el sitio activo reportado para la hCE1, la cual se centró en el sitio catalítico del monómero A (coordenadas $x=21.2$ $y=-29.95$ $z=28.41$), con un tamaño de rejilla de $18.75 \times 18.75 \times 18.75$ Å.

Para la búsqueda de las conformaciones se empleó un algoritmo aleatorio del tipo Lamarckiano, el número de corridas fue igual a 20, tamaño de población de 150, 10^7 evaluaciones y número máximo de generaciones 27000, fijando un valor de operador de recombinación de 0.8 y de mutación de 0.02. Se escogió la conformación energéticamente más favorable del conjunto más abundante.

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El análisis de resultados se divide en tres apartados; la primera sección contempla la síntesis y caracterización espectroscópica del derivado **MLB13** y su profármaco, en la segunda se realiza el análisis de los resultados obtenidos de la evaluación biológica y por último, en la tercera sección se discuten los resultados del estudio de acoplamiento molecular con la enzima hCE1.

7.1. Parte química

7.1.1. Síntesis de los compuestos

Los resultados generados al realizar la síntesis de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzamida (**MLB13**) y su profármaco, así como los intentos para la realización de los mismos, se reportan en esta sección.

7.1.1.1. Síntesis de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzamida (**MLB13**)

Existen diferentes rutas de síntesis para obtener las *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il) carboxamidas. Una de ellas se planteó anteriormente en la tesis de López Sánchez, M. A. en 2015⁶⁷ para sintetizar **MLB13** y otras dos se diseñaron en este trabajo para optimizar la obtención de este mismo compuesto. En la Figura 7.1 se muestran el análisis retrosintético que conllevó al diseño de rutas alternativas de síntesis.

Un punto a considerar es que, para la síntesis de amidas a partir de aminas y ácidos carboxílicos, se debe utilizar un agente activador del grupo carboxilo con el fin de volver al carbono sp^2 de este grupo, un electrófilo susceptible de ser atacado por la amina. Con ello en mente cualquier ruta de síntesis que se eligiera conllevaba el uso de algún agente activante o el uso de materias primas de mayor reactividad como los cloruros de acilo.

La ruta de síntesis A como ya se mencionó en la metodología, fue previamente diseñada y llevada a cabo por López Sánchez, M. A. en el grupo de investigación⁶⁷. Ésta surgió a partir de la búsqueda de una ruta que permitiera la formación inequívoca de la carboxamida en la posición 6 de la quinazolina-2,4,6-triamina, ya que, si se empleaba una estrategia semejante a la ruta B o C se corría el riesgo de llevar a cabo el acoplamiento sobre otras posiciones susceptibles de reaccionar, lo que causaría la obtención de múltiples subproductos.

A pesar de tratarse de una ruta de síntesis corta, esta mantenía ciertos inconvenientes. El primero de ellos era el uso de $SOCl_2$, el cual es un reactivo altamente corrosivo, tóxico y que produce ácido clorhídrico, el segundo fue la formación de diferentes subproductos que complicaban la purificación y el tercer inconveniente era que la última reacción de esta ruta no era cuantitativa, ya que gran cantidad de materia prima quedaba sin reaccionar, lo cual ocasionaba rendimientos bajos.

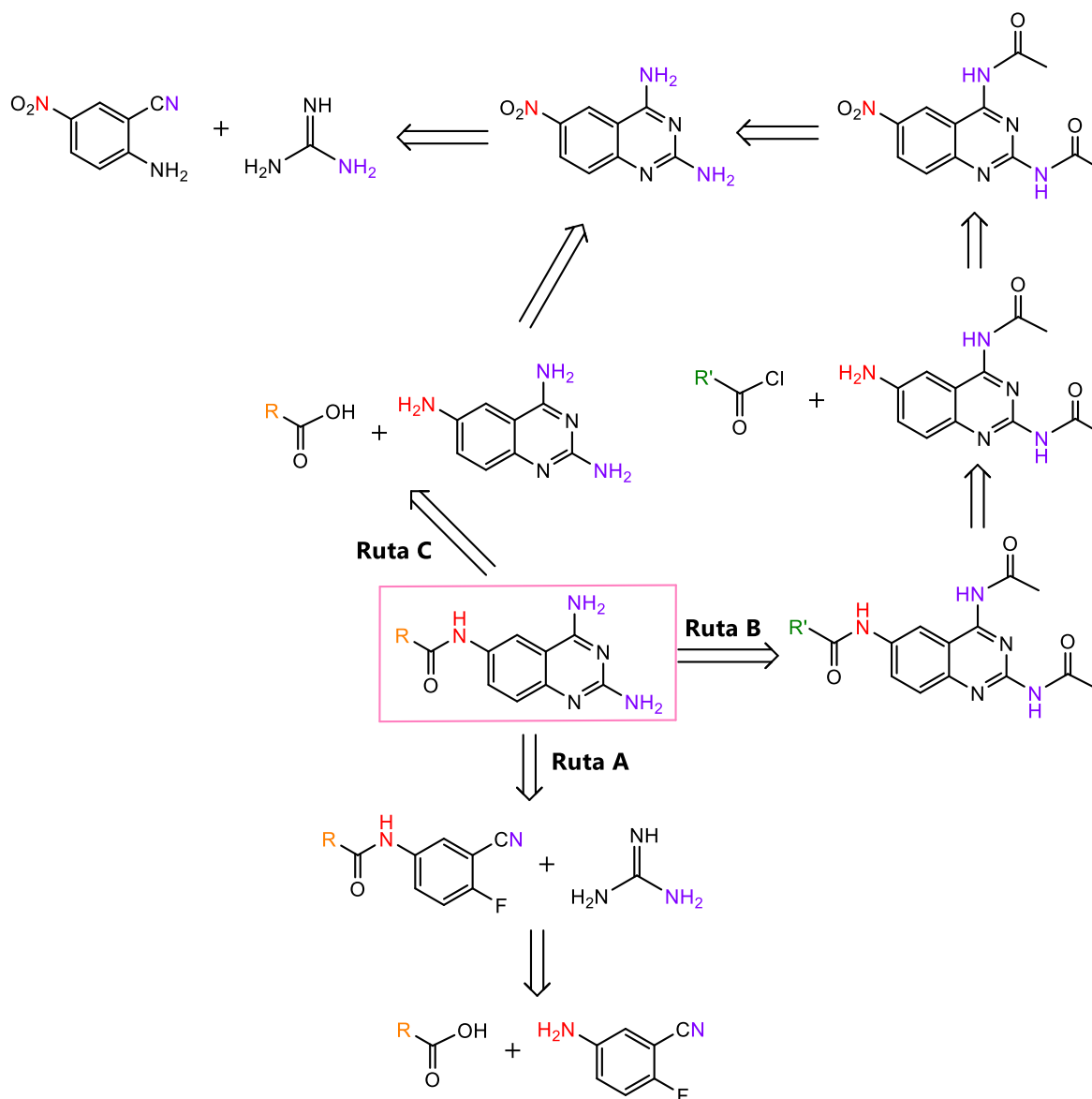


Figura 7.1. Rutas retrosintéticas propuestas para sintetizar **MLB13**.

Con todas estas limitantes en mente, se propusieron rutas de síntesis alternativas a la ya reportada. La ruta de síntesis B se pensó con base en la existencia de una metodología estandarizada por Mendoza Martínez, C. y Matus Meza, S. A^{63,101} para la obtención del núcleo de la *N,N'*-(6-aminoquinazolin-2,4-diil)diacetamida, pues permite tener la certeza de que sólo el grupo amino en la posición 6 reaccionaría. Con la quinazolina protegida en posiciones 2 y 4, fácilmente se podría llevar a cabo la formación de la carboxamida en posición 6 frente al cloruro de 3,4,5-trimetoxibenzoilo, el cual, a diferencia del ácido carboxílico, tiene el carbono sp^2 activado lo que lo hace muy susceptible de ser atacado por un nucleófilo como la amina de la quinazolina. Una vez obtenida la carboxamida faltaría el último paso de desprotección del metoxilo de la posición 4 del anillo de 3,4,5-trimetoxibencilo para llegar al compuesto deseado. La desprotección selectiva implica el uso de ácidos (incluidos los ácidos de Lewis, por ejemplo, $AlCl_3$ y BBr_3) o bases; sin embargo, estas condiciones no son

compatibles con compuestos que tienen grupos funcionales sensibles a ácidos o bases como lo podría ser nuestra amida de interés, por ello se decidió emplear LiCl como catalizador ya que es un reactivo económico y ofrece compatibilidad con otros grupos funcionales. El mecanismo de reacción por el cual ocurre la desprotección selectiva de aril metil éteres con LiCl se muestra en la Figura 7.2.

Se cree que el proceso de reacción de desmetilación probablemente ocurre por un ataque nucleofílico por parte del LiCl en el grupo metilo seguido de la liberación de CH₃Cl. Esta ruptura regioselectiva se debe a la diferencia en la estabilización electrónica del fenóxido resultante. El efecto de los sustituyentes en el anillo permite que la reacción de escisión sea más rápida y fácil cuando se tratan de grupos electroattractores en posición para u orto. Debido a estos efectos, la selectividad y la reactividad están muy influenciadas por los grupos presentes que ayudan específicamente al ion cloruro a extraer el grupo saliente.

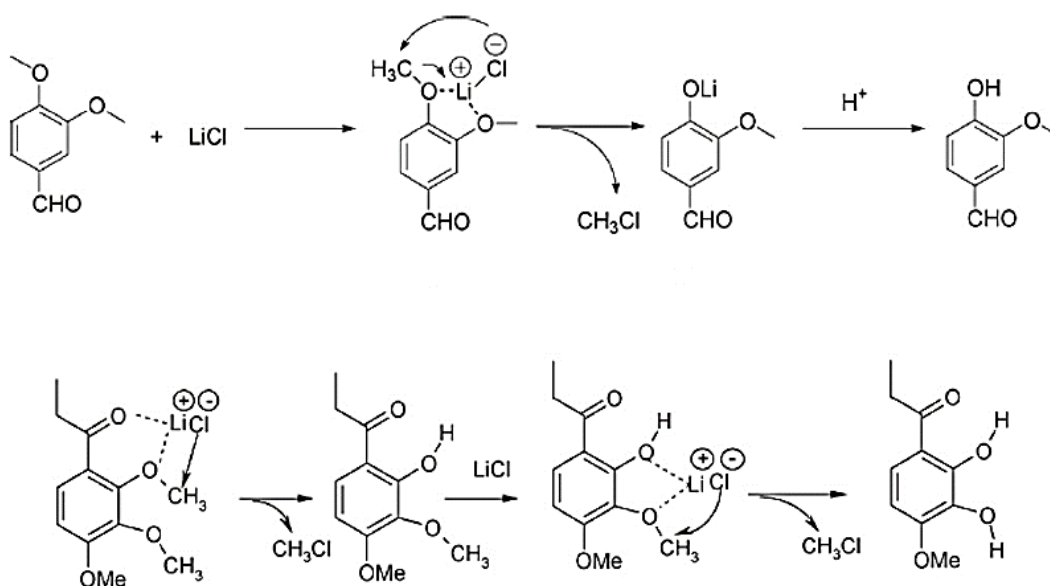


Figura 7.2. Mecanismo propuesto de desalquilación catalítica de aril éter por LiCl¹⁰².

Retomando las rutas de síntesis propuestas, la ruta C surgió de la necesidad de tener un método de obtención de **MLB13** que implicara un menor número de pasos a realizar, lo cual aumentaría el rendimiento global. Además, con esta estrategia no se tendría el problema de la probable aparición de subproductos provenientes de las desacetilaciones del núcleo de quinazolina, las cuales son difíciles de evitar a lo largo del proceso de síntesis. Se sabe que esto ocurre porque el grupo acetilo de la posición 4 es muy lábil, y susceptible de sufrir hidrólisis, debido a que es el sitio con una menor densidad electrónica⁶³. Esta ruta sintética comparte la primera reacción con la ruta B, la cual ya estaba previamente estandarizada por el grupo de investigación. El verdadero desafío en esta metodología era activar al grupo carboxilo del ácido siríngico y que una vez activado se acoplara con la quinazolina-2,4,6-triamina, por lo que se planteó el uso de agentes acoplantes como el *N,N*-carbonildiimidazol (CDI) y el Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-*N*-oxi-tris(pirrolidin) fosfonio (PyBOP).

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La siguiente tabla muestra algunas condiciones experimentales bajo las cuales se llevaron a cabo las reacciones de las tres diferentes rutas de síntesis y algunas observaciones experimentales de los productos obtenidos en cada una.

Tabla 7.1. Condiciones de reacción y resultados.

Reacción	Tiempo de reacción (h)	Temperatura (°C)	Rendimiento (%)	Rf	Punto de fusión (°C)	Apariencia
Ruta A						
I	19	Ambiente	44	0.59*	233.0-234.1	Sólido beige
II	3.5	115	13	0.28**	210.2-211.8	Sólido gris
Ruta B						
I	8.0	95	86	0.31*	360.2-363.1	Sólido naranja
II	6.0	110	63	0.71*	277.2-279.5	Sólido amarillo
III	0.5	Ambiente	90	0.36*	225.6-227.0	Sólido amarillo
IV	25	Ambiente	91	0.58*	256.0-259.0	Sólido gris
V	24	160	90	0.28**	224.0-227.4	Sólido amarillo
Ruta C						
VI	0.5	80	83	0.26**	231.7-233.0	Sólido amarillo
VII	50	Ambiente	55	0.28**	223.0-224.2	Sólido amarillo

* Sistema I = CHCl₃/MeOH 8:2

** Sistema II = CHCl₃/MeOH/NH₃ 70:25:5

La ruta de síntesis A se realizó bajo las mismas condiciones previamente reportadas como las mejores para llegar a obtener **MLB13**⁶⁷; las observaciones experimentales llevadas a cabo a lo largo de esta ruta parecían indicar que se había llegado al compuesto final deseado, ya que algunas propiedades fisicoquímicas como el factor de retención coincidían con las de su referencia. Incluso el espectro de masas indicó que se había obtenido un compuesto con el peso molecular esperado al observarse la presencia del ion molecular (M+1) en 356.1299 m/z (Figura 7.3).

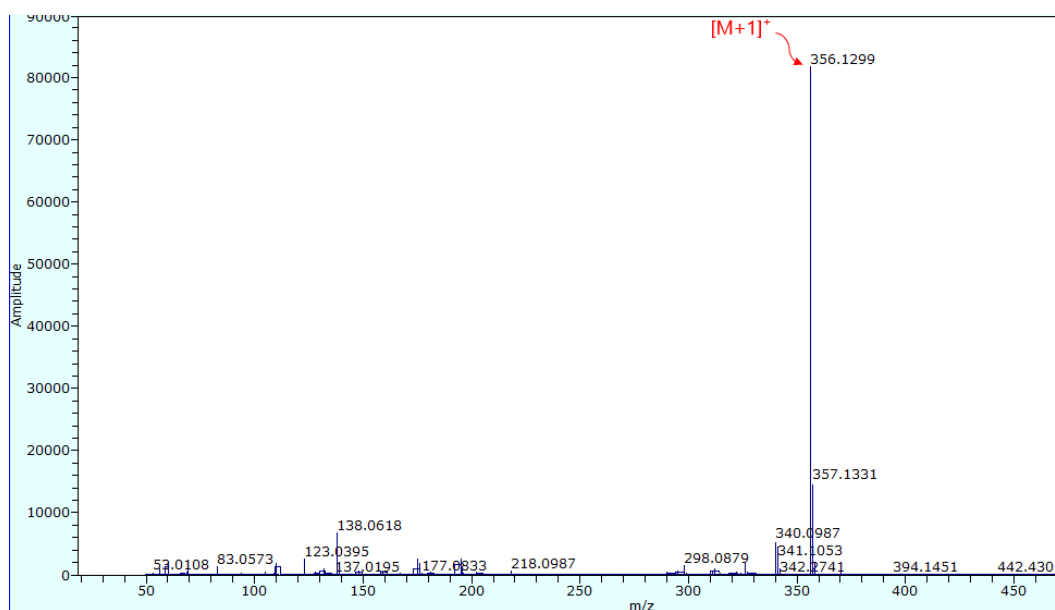


Figura 7.3. Espectro de masas del compuesto final obtenido mediante la ruta de síntesis A.

Pero no fue sino hasta la caracterización mediante RMN de ^1H y de ^{13}C de este producto, donde se corroboró que el compuesto no se trataba de **MLB13** sino de un isómero estructural de este.

Al analizar el espectro de ^1H lo que más resaltó fue que las señales que se esperaba correspondieran a los grupos amino de las posiciones 2 y 4 de la quinazolina, estaban desplazadas hacia campo más alto respecto de las señales de estos grupos en el espectro de referencia. La diferencia entre estas señales al comparar ambos espectros osciló entre 0.5-0.6 ppm, por lo que se sospechó que no se trataba de la molécula esperada, sino de otra muy similar. En el espectro de ^{13}C también se observaron señales que no se ajustaban a las esperadas (Figura 7.4).

Probablemente lo que ocurrió fue que únicamente se llevó a cabo la sustitución nucleofílica aromática sobre el átomo de flúor por parte de la guanidina y no se llevó a cabo el ataque nucleofílico hacia el nitrilo, lo cual impidió el cierre del anillo para formar la correspondiente quinazolina. Esta suposición concuerda con que las señales se hayan recorrido hacia campo alto, ya que los protones de las aminas unidas a anillos aromáticos muestran mayor desplazamiento químico que las aminas que no lo están.

Otra forma de corroborar que el compuesto sintetizado a través de esta ruta no se trataba de **MLB13**, fue mediante su hidrólisis. Para ello se puso a reaccionar una pequeña muestra de este compuesto disuelto en MeOH, con unas gotas de disolución acuosa de NaOH y se calentó. Los productos de hidrólisis se observaron mediante cromatografía en capa fina. Uno de ellos tuvo un R_f similar al del ácido síringico y el otro tuvo un R_f distinto al de la quinazolina-2,4,6-triamina que se tenía de referencia y del que se esperaba que coincidiera.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

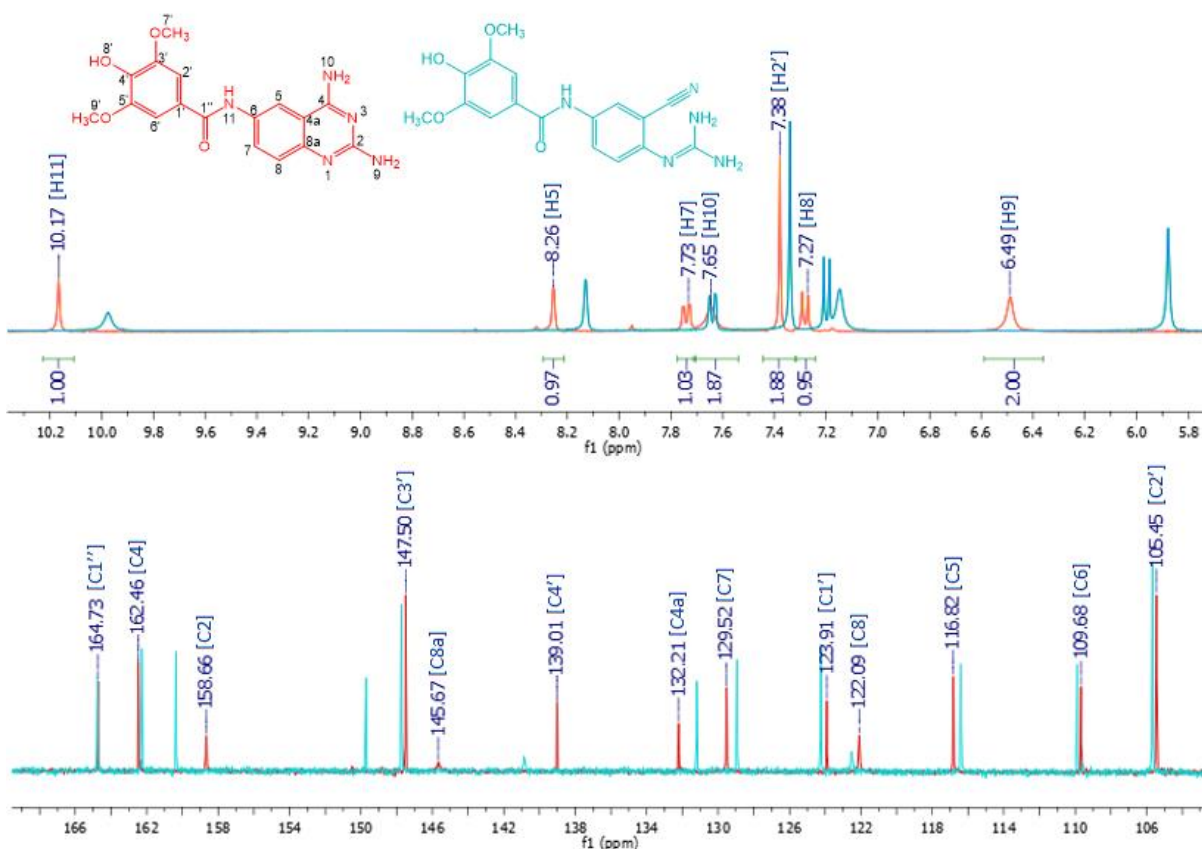


Figura 7.4. Fragmentos de los espectros de ^1H y ^{13}C del producto obtenido mediante la ruta de síntesis A (señales en azul) y de **MLB13** obtenido mediante la ruta de síntesis B (señales en rojo).

Con esto último se concluye que las condiciones de reacción manejadas en esta ruta de síntesis no son adecuadas en el último paso para propiciar el cierre del anillo. Se sugiere que posteriormente se prueben otras condiciones de reacción empleando síntesis asistida por microondas, para lograr disminuir variantes que tal vez afecten el cierre del anillo. Otra opción también sería probar algún agente catalizador que favorezca la formación del núcleo de quinazolina.

Con esta ruta de síntesis lo que sí se logró fue la formación de la *N*-(3-ciano-4-fluorofenil)-4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzamida a partir del ácido síngico previamente activado con cloruro de tionilo y su posterior ataque nucleofílico por parte del 5-amino-2-fluorobenzonitrilo. El rendimiento de esta reacción fue de 44%, el cual se considera pobre de acuerdo al Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry¹⁰³. Dicho rendimiento probablemente se debe a que el grupo amino no es lo suficientemente nucleofílico para llevar a cabo la reacción de forma eficiente a pesar de que el ácido carboxílico se encuentre activado. Los grupos flúor y ciano son sustituyentes electroattractores que le restan nucleofilia a la materia prima.

En cuanto a la ruta de síntesis B, las primeras cuatro reacciones ya habían sido desarrolladas y estandarizadas por diferentes miembros del grupo de investigación en distintos trabajos^{63,69}, por lo que no hubo mayor problema en la reproducción de las mismas.

El mecanismo propuesto para la reacción de ciclocondensación de esta ruta de síntesis es el que se muestra en la Figura 7.5. Consiste en que la guanidina pasa de un estado catiónico a uno neutro, a partir de la cual se realiza un ataque nucleofílico sobre el carbono sp del nitrilo generándose así el intermediario reactivo. De ahí que el grupo amino proveniente del 2-amino-5-nitrobenzonitrilo ataca al grupo imina del intermediario proveniente de la guanidina liberándose así amoníaco. En principio, el favorecimiento se debe a la aromatización de este ciclo para dar paso a la formación de una especie estable y de menor energía.

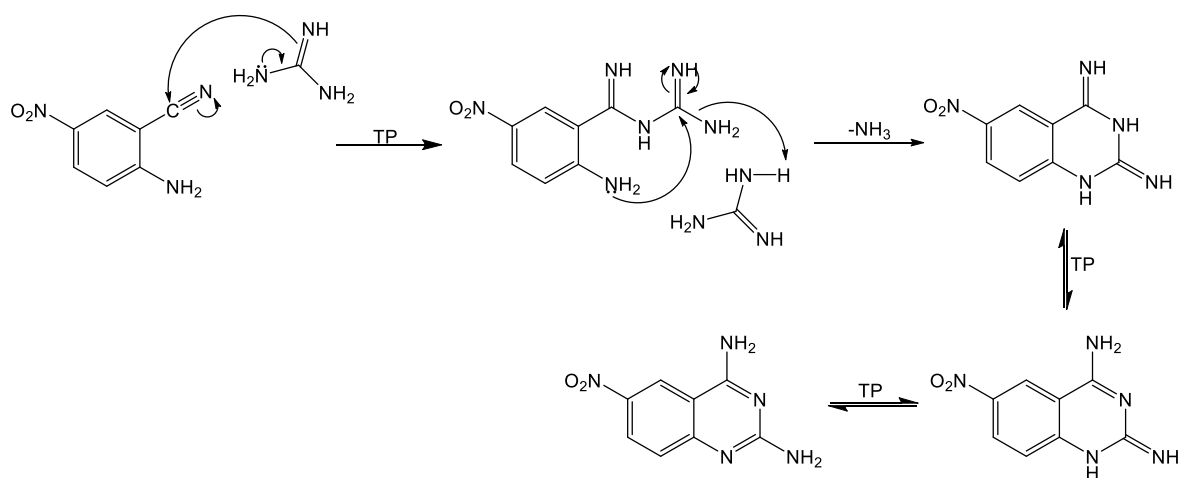


Figura 7.5. Propuesta de mecanismo de ciclocondensación para formar la 6-nitroquinazolina-2,4-diamina (**2**).

Los rendimientos de las primeras reacciones de esta ruta de síntesis estuvieron entre 60% y 90%, fueron muy similares a los ya reportados e incluso se mejoró el rendimiento de la reacción número IV pasando del 55% al 91% (Figura 7.6). Hasta la reacción número III la cantidad de impurezas que se observaban fue mínima y con ayuda de las referencias de los productos previamente sintetizados, no se complicó el seguimiento de estas primeras reacciones.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

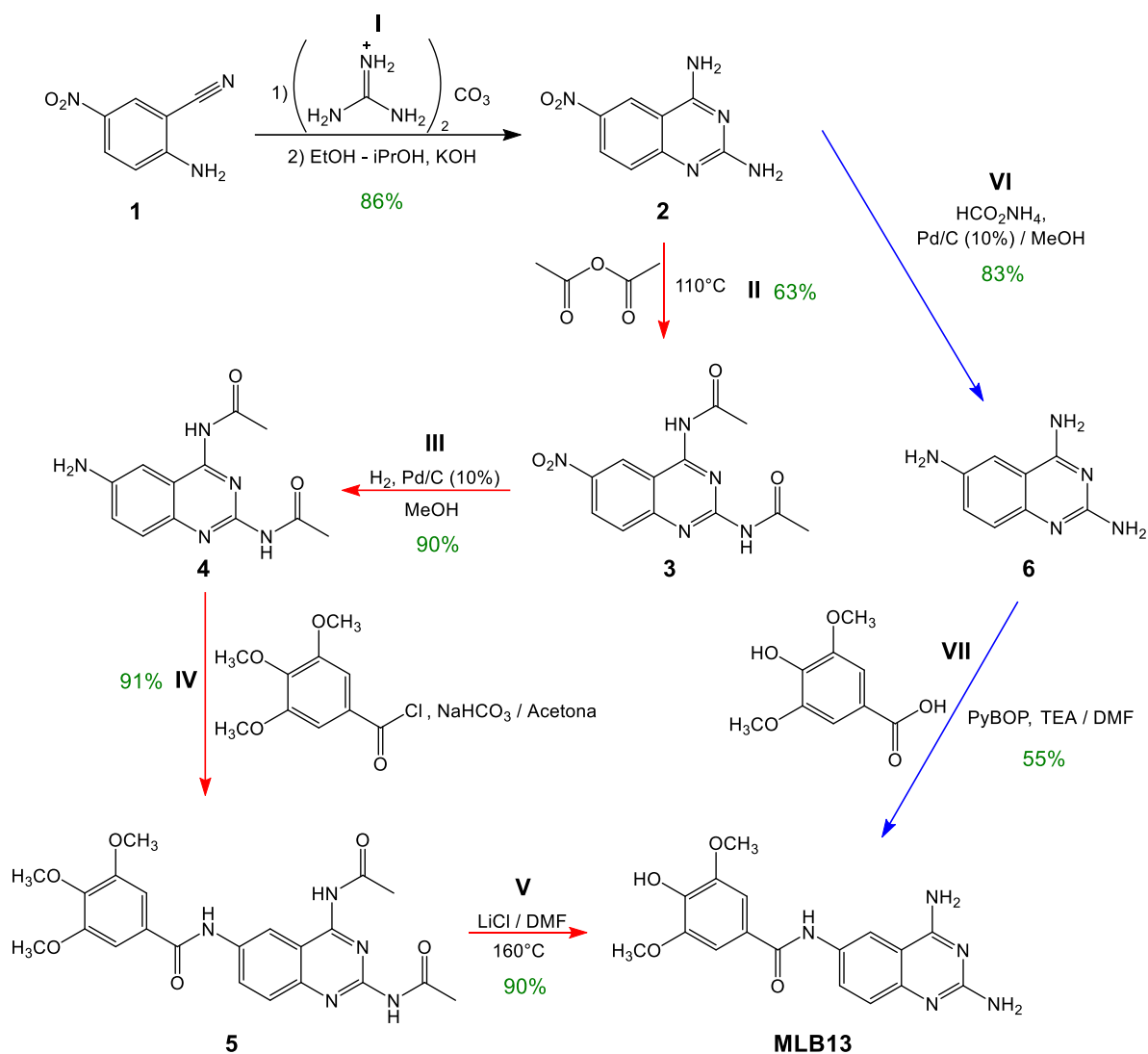


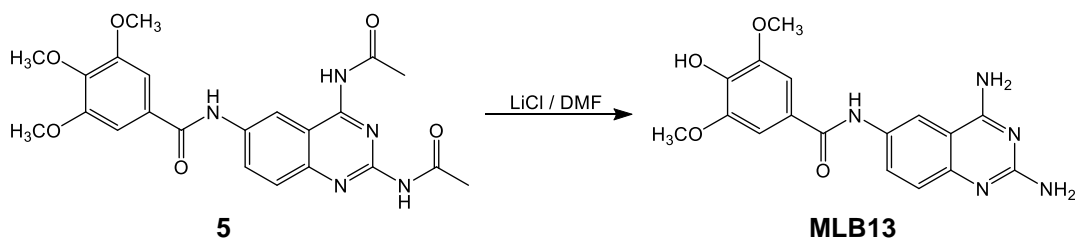
Figura 7.6. Esquema de las rutas de síntesis B (flechas rojas) y C (flechas azules) para la obtención de **MLB13** señalándose el rendimiento de cada reacción en color verde.

En la reacción IV se utilizó cloruro de 3,4,5-trimetoxibenzoilo para dar paso a la formación de la carboxamida en posición 6, la ventaja de esta reacción es que no se requiere del uso previo de un agente activante y que la quinazolin-2,4,6-triamina viene protegida en las otras dos posiciones susceptibles de reaccionar, por lo que el rendimiento de la reacción resultó ser del 91%. Cabe resaltar que en este paso de la ruta de síntesis se comenzaron a observar impurezas en mayor proporción. Al intentar purificar el producto principal obtenido, se observó que conforme se iban aplicando diferentes técnicas de purificación, no se lograba retirar del todo las impurezas y conforme más se trataba el producto, las impurezas volvían a aparecer; esto se atribuyó a las reacciones de desacetilación que ocurren simplemente por tener el producto en disolución y un poco de temperatura, sobre todo la desacetilación de la posición 4 que ya se ha reportado como la más susceptible de hidrólisis, debido a la falta de densidad electrónica en esta zona.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La reacción V tuvo que realizarse bajo diferentes condiciones de acuerdo a la bibliografía, después se eligieron las más óptimas para llevar a cabo el último paso de esta ruta de síntesis B. La siguiente tabla muestra algunas variables que se modificaron a lo largo de esta experimentación.

Tabla 7.2. Condiciones de reacción probadas durante la optimización de la reacción V de la ruta de síntesis B.



Método con microondas					
Experimento	Tiempo de reacción (min)	Equivalentes de LiCl	Temperatura (°C)	Rendimiento (%)	Observaciones
1	10	3	160	-	No hubo reacción
2	20	3	160	-	No hubo reacción
3	40	3	160	-	No hubo reacción
4	60	3	180	-	Pirolisis de la materia prima
5	20	10	160	-	Poco producto formado
6	30	10	160	-	Poco producto formado
7	50	10	160	-	Poco producto formado
8	30	16	160	44	Sólido color café
Método convencional					
Experimento	Tiempo de reacción (h)	Equivalentes de LiCl	Temperatura (°C)	Rendimiento (%)	Observaciones
1	14	10	165	51	Sólido café
2	19	10	165	57	Sólido color café oscuro
3	10	16	170	64	Sólido color gris

Las variables que se modificaron en esta reacción fueron el tiempo, el número de equivalentes de LiCl, la temperatura y el método, ya sea convencional o por microondas. Los mejores rendimientos se lograron a través del método convencional con 16 equivalentes de LiCl, durante 10 h de reacción y a 170 °C. Se esperaba que esta reacción diera buenos resultados mediante el método por microondas, ya que en la bibliografía se mencionan altos rendimientos con poco tiempo de reacción para reacciones similares¹⁰². En este caso ocurrió lo contrario, mediante el método convencional se alcanzaron rendimientos más altos. Probablemente la potencia utilizada en el microondas no fue la más adecuada; sin embargo, no fue posible modificarla porque el equipo utilizado no lo permite. Incluso, tal vez

incrementando todavía más el tiempo de reacción en el microondas se hubieran mejorado los rendimientos.

Inicialmente cuando se planteó esta ruta de síntesis se pensó que el producto que se obtendría al final sería **MLB13** protegido en posiciones 2 y 4 y que se iba a tener que llevar a cabo una reacción adicional, ya sea antes o después de la síntesis del profármaco, para la desprotección de los aminos en posiciones 2 y 4. Al realizar la síntesis y aislar el producto principalmente obtenido de la reacción V, se observó que coincidía en propiedades fisicoquímicas con el compuesto **MLB13**, después mediante su caracterización espectroscópica se confirmó que efectivamente se trataba del derivado **MLB13** ya sin los grupos protectores, por lo tanto no era necesario realizar la reacción de desprotección inicialmente pensada. Con esto, se vuelve a corroborar que los acetilos en posiciones 2 y 4 son grupos lábiles que se hidrolizan fácilmente, sobre todo bajo condiciones fuertes de temperatura como la empleada durante la última reacción y condiciones ácidas como la que se empleó durante el tratamiento del producto con HCl una vez terminada la reacción.

La ruta de síntesis B implicó mayor número de reacciones, lo cual provocó una pérdida significativa de materia a lo largo del camino, ya que en cada paso fue necesario el correspondiente tratamiento del producto sintetizado previo a la realización de la siguiente reacción. El producto obtenido de la última reacción de esta ruta se observó acompañado de varias impurezas, estas solo se lograron separar mediante cromatografía en columna, lo cual también produjo pérdidas del compuesto final.

La ruta de síntesis C implicó únicamente tres reacciones. La primera coincide con la ruta B y pertenece a las reacciones previamente estandarizadas, por lo cual no hubo problema en llevarse a cabo. La segunda reacción surgió de utilizar otro método diferente al de la hidrogenación catalítica con Pd/C previamente reportada para la síntesis de quinazolina-2,4,6-triamina, ya que esta mantiene dos desventajas, una es que, debido a la infraestructura con la que se cuenta, máximo se puede poner a reaccionar un gramo de materia prima por reacción en el hidrogenador y dura 1 hora. La otra es que con esta reacción las impurezas que se generan no se pueden separar fácilmente del producto. Con ello en mente se probó la reacción de reducción utilizando formiato de amonio como agente de transferencia de hidrógeno en presencia de 10% de Pd/C como catalizador en metanol a reflujo (Figura 7.7). Esta reacción se caracteriza por ser suave, simple, rápida y selectiva para reducir el grupo nitro aromático de compuestos a los derivados amino correspondientes. Con estas otras condiciones se logró disminuir el tiempo de reacción a 15 min para un gramo de materia prima. El rendimiento fue bueno, pero disminuyó un poco respecto del que se logra con las condiciones en el hidrogenador, el cual va del 91% al 95%. También se observó que el producto fácilmente precipitaba al retirar un poco de disolvente a presión reducida y que al filtrar el sólido las impurezas se mantenían en disolución, logrando así un producto más limpio y de mejor apariencia.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

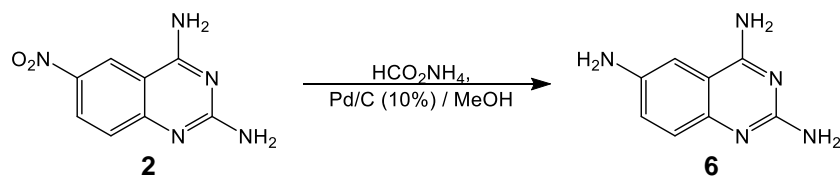
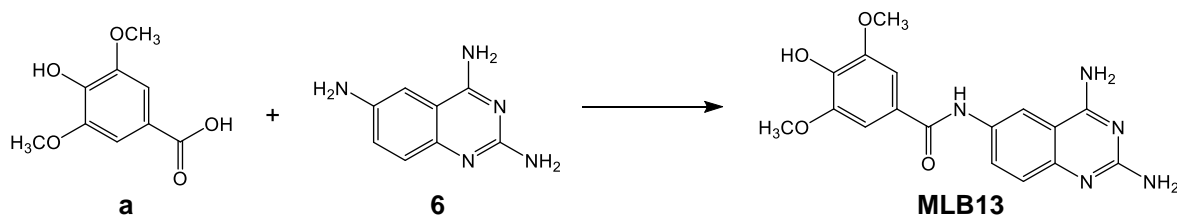


Figura 7.7. Reacción de reducción para la obtención de quinazolina-2,4,6-triamina en la ruta de síntesis C.

Al realizar ambos métodos de reducción se observó que cuando se almacena el compuesto obtenido en el hidrogenador, este se descompone más rápido que cuando se almacena el compuesto proveniente de la reacción con formiato de amonio. Probablemente las impurezas que se generan y se mantienen en el primer producto aceleran la oxidación de la quinazolina-2,4,6-triamina a sus derivados nitrosos y nitro, lo que ocasiona que el sólido amarillo se vuelva café oscuro en poco tiempo.

Hallar las condiciones de reacción más adecuadas para llevar a cabo el último paso de esta ruta de síntesis fue una tarea complicada. Esta metodología implicaba el uso de ácido siríngico como materia prima, por lo que era necesario activarla previamente, es decir, convertir el grupo hidroxilo en un mejor grupo saliente y así favorecer la formación de la amida en posición 6. Lo anterior es imprescindible, ya que el acoplamiento directo entre un ácido carboxílico y una amina difícilmente ocurre debido a las reacciones ácido base que compiten. Existe un gran número de agentes acoplantes, así como condiciones de reacción que permiten la activación de ácidos carboxílicos para la posterior formación de amidas. Los reactivos más comúnmente utilizados son carbodiimidas y sales de fosfonio o uronio/aminio de benzotriazol. Algunos de estos reactivos fueron probados para llegar a las mejores condiciones de reacción y finalmente obtener **MLB13**. La siguiente tabla desglosa las condiciones experimentales probadas.

Tabla 7.3. Diferentes condiciones para la reacción de activación y acoplamiento del ácido siríngico a quinazolina-2,4,6-triamina.



Experi- mento	Reactivo	Disolvente	Temperatura (°C)	Tiempo de reacción (h)	Rendimiento (%)	Observaciones
1	C ₂ Cl ₂ O ₂ (2 eq. y 1.6 eq. de DIPEA)	CH ₂ Cl ₂ /DMF anhidro para la activación y CH ₂ Cl ₂ anhidro para el acoplamiento	Ambiente para la activación y acoplamiento	2.5 (activación) 48 (acoplamiento)	-	La reacción de activación ocurrió, pero en el acoplamiento no se observó avance

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Continuación de la Tabla 7.3						
2	CDI (1.2 eq.)	CHCl ₃ para la activación y CHCl ₃ /DMF anhidro para el acoplamiento	Activación a T ambiente y el acoplamiento a 80 °C	1.5 (activación) 48 (acoplamiento)	-	La reacción de activación ocurrió, pero en el acoplamiento no se observó avance
3	SOCl ₂ (5 eq. y 1.4 eq. de DIPEA)	Tolueno para la activación y DMF anhidro para el acoplamiento	Activación a 0 °C y el acoplamiento a T ambiente	1.5 (activación) 48 (acoplamiento)	-	La reacción de activación ocurrió, pero en el acoplamiento no se observó avance.
4	PyBOP (1.6 eq y 1.5 de TEA)	DMF anhidro	Ambiente	50	55	Se realizó la activación y el acoplamiento en un solo paso.

Como se puede observar, en la tabla anterior los primeros tres reactivos fueron útiles para activar al ácido síngico, sin embargo, una vez formado el intermediario reactivo la reacción de acoplamiento no ocurría. En ninguna de estas tres reacciones se observó la formación de un compuesto similar al de referencia, ni el consumo de las materias primas. El único cambio que se observaba conforme transcurría el tiempo de reacción, era que el ácido volvía a su forma desactivada. Una vez que se tenía el ácido activado por medio de cualquier reactivo, la reacción de acoplamiento se empezaba a temperatura ambiente y luego se iba incrementando paulatinamente la temperatura hasta 80 °C para ver si mejoraba el avance de la reacción, lo cual no ocurrió en ninguno de los casos.

Probablemente la baja nucleofilia de los grupos amino de la quinazolina-2,4,6-triamina sea la razón por la que no se llevó a cabo la formación de la carboxamida bajo estas condiciones. Aunque el amino en la posición 6 sea el más reactivo de los tres disponibles, sigue siendo poco nucleofílico debido a que su par de electrones está comprometido con la resonancia que se lleva a cabo en el heterociclo. Además, los tres intermediarios resultantes de la activación del ácido síngico también tuvieron que ser lo suficientemente estables como para no ser susceptibles al ataque nucleofílico por parte de la quinazolina-2,4,6-triamina.

La Figura 7.8 muestra un ejemplo del mecanismo de reacción para la activación de ácidos carboxílicos con uno de los agentes acoplantes utilizados y en color verde se marca el intermediario que probablemente no fue susceptible de reaccionar frente a la baja nucleofilia de la quinazolina.

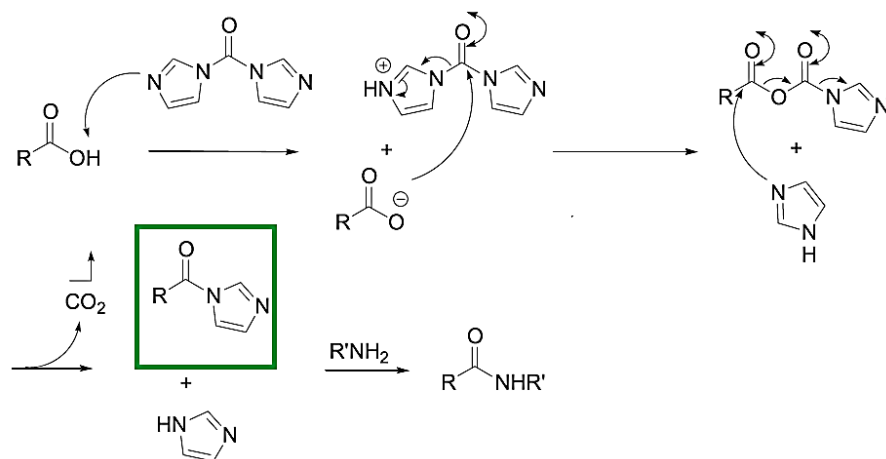


Figura 7.8. Mecanismo de reacción del CDI para la síntesis de amidas¹⁰⁴.

Con los otros dos reactivos utilizados, es decir, cloruro de tionilo y cloruro de oxalilo se observó la formación del correspondiente cloruro de acilo, que tampoco fue susceptible de reaccionar como se esperaba, ya que de entre todos los derivados de ácidos carboxílicos, estos se consideran los más reactivos.

Solo las condiciones del experimento 4 permitieron tener avance en la reacción para la obtención de **MLB13** y no fue necesario realizar primero la activación y después el acoplamiento, sino que ambas reacciones sucedían en el mismo matraz.

Esta reacción consistió en mezclar el ácido siríngico con la quinazolina-2,4,6-triamina en presencia de PyBOP y trietilamina en DMF. El ácido desprotonado por la base, reacciona primero con PyBOP para generar tanto una especie de acilfosfonio activado como hidroxibenzotriazol en su forma desprotonada. La especie aniónica de hidroxibenzotriazol reacciona fácilmente con el ácido activado para producir un éster reactivo, el cual finalmente es atacado por la quinazolina-2,4,6-triamina dando paso a la formación de la correspondiente amida. La fuerza que impulsa esta reacción basada en fosfonio es generar el óxido correspondiente (Figura 7.9).

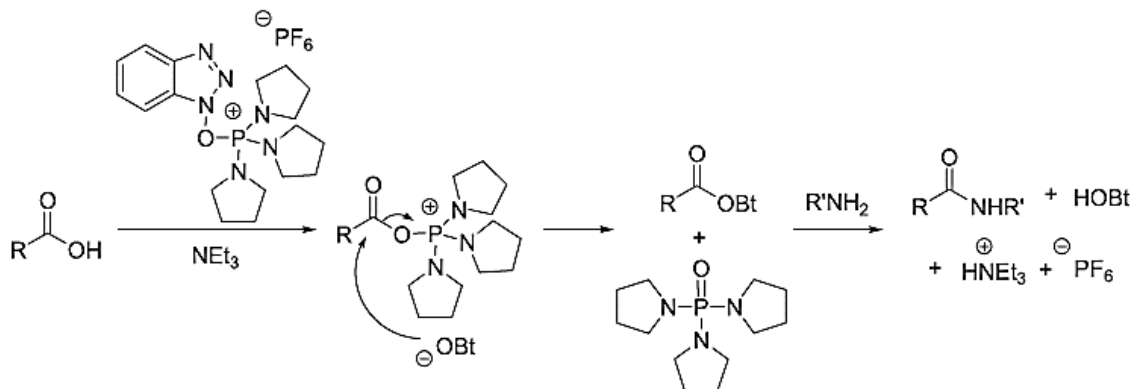


Figura 7.9. Mecanismo de reacción con PyBOP para la síntesis de amidas¹⁰⁴.

En este caso el intermediario formado fue más susceptible de reaccionar con la quinazolina probablemente porque las especies que se generan al final de esta reacción sean todavía más estables que las que se generarían con otros agentes activantes, lo que impulsa a que bajo estas condiciones si se lleve a cabo la formación de la carboxamida.

El rendimiento de esta reacción fue bajo, lo cual era de esperarse ya que durante su monitoreo se observaba bastante materia prima sin reaccionar y que ya no avanzaba por más tiempo que se dejaba. La naturaleza del nucleófilo empleado es la principal desventaja para que se lleve a cabo la reacción de acoplamiento.

La formación de la carboxamida en posiciones 2 y 4 del heterociclo era posible mediante esta ruta de síntesis, sin embargo, si se llevó a cabo fue en mínimas cantidades ya que al monitorear la reacción se observaba principalmente la formación de un solo producto, el cual correspondía a la carboxamida en posición 6 que posteriormente se confirmó mediante RMN. Esto concuerda con lo esperado ya que los aminos en posiciones 2 y 4 del núcleo de quinazolina son todavía menos nucleofílicos que el de la posición 6, como se pudo observar en un estudio de modelado molecular dónde es posible obtener el potencial electrostático mapeado en la densidad electrónica. Aquí se puede visualizar qué átomos de la molécula poseen alta densidad electrónica y cuáles una deficiencia de ella. Los aminos en 2 y 4 al tener menor densidad electrónica, son poco nucleofílicos y esto los hace menos susceptibles de reaccionar frente al electrófilo (Figura 7.10). De igual manera el menor carácter nucleofílico de los aminos en 2 y 4 respecto del amino en posición 6 se puede explicar a través de la deslocalización de sus pares de electrones solitarios, ya que los aminos en 2 y 4 generan mayor número de estructuras resonantes que el amino en posición 6, lo cual provoca que este último tenga mayor capacidad de ataque hacia el electrófilo.

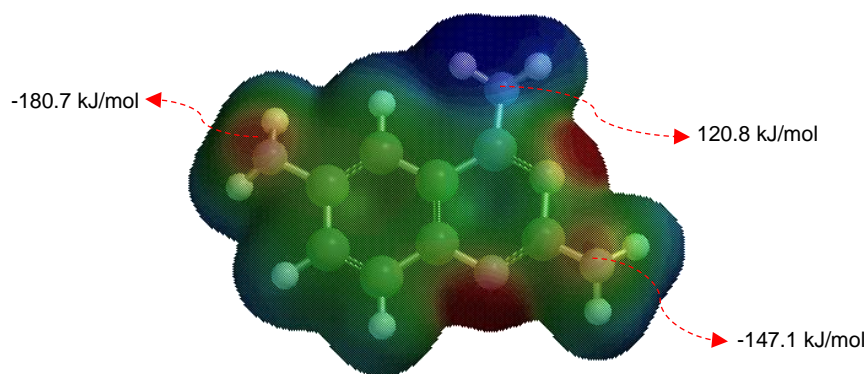


Figura 7.10. Mapa del potencial electrostático de la quinazolina-2,4,6-triamina. Las zonas azules indican deficiencia de densidad electrónica mientras que las rojas indican alta densidad electrónica. La molécula se minimizó con el método semiempírico PM3, en el programa Spartan '14 V1.1.4 y el mapa de potencial electrostático se obtuvo con un isovalor de 0.006.

Las impurezas que se formaron de esta reacción no fueron mayor problema, ya que eran mínimas y fueron fáciles de retirar mediante algunas extracciones sólido-líquido con disolventes orgánicos como acetato de etilo y éter etílico. Al no requerir un mayor

procedimiento de purificación, se lograron obtener cantidades suficientes de **MLB13** con un buen grado de pureza.

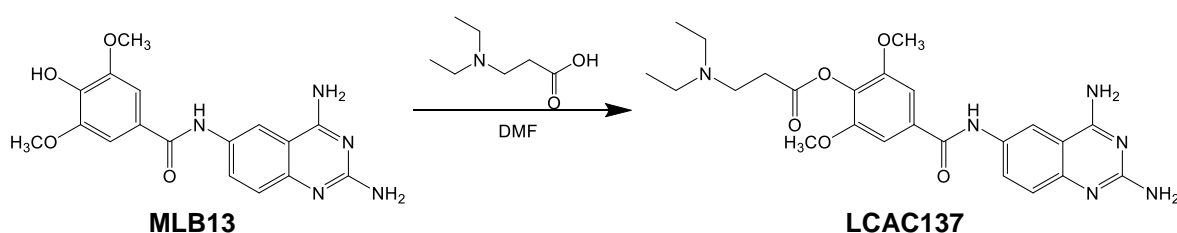
Finalmente, los rendimientos globales de las rutas de síntesis B y C resultaron ser muy similares (40% y 39% respectivamente). La ruta C tuvo la ventaja de llevarse a cabo en menos pasos ya que conlleva tres reacciones donde solo la última es de bajo rendimiento; sin embargo, se logra un producto con pocas impurezas las cuales no son tan complicadas de separar si lo comparamos con el producto obtenido mediante la ruta B. Gracias a las ventajas que ofrece esta ruta, se eligió como la opción más conveniente para sintetizar **MLB13** en mayores cantidades y así poder realizar el siguiente paso que era la obtención del profármaco.

7.1.1.2. Síntesis de 4-[(2,4-diaminoquinazolin-6-il)carbamoil]-2,6-dimetoxifenil 3-(dietilamino)propanoato (LCAC137)

La reacción que se utilizó para llevar a cabo la síntesis del profármaco se trató de una variante de la esterificación de Steglich, la cual tiene la ventaja de ser una reacción en condiciones suaves que permite que sustratos lábiles a los ácidos y/o estéricamente demandantes puedan reaccionar, como es el caso de **MLB13**. Esta reacción se lleva a cabo por la presencia de una carbodiimida como reactivo de acoplamiento.

Antes de saber cuáles eran las condiciones adecuadas para obtener **LCAC137** se probaron otras donde se variaron ya sea el aminoácido empleado, el tiempo de reacción, la temperatura, el agente acoplante o el método de síntesis utilizado. Algunos intentos realizados en el laboratorio se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 7.4. Condiciones de reacción probadas durante la optimización de la reacción para la obtención del profármaco **LCAC137**.



Reacción	Método	Agente acoplante empleado	Tiempo de reacción (h)	Temperatura (°C)	Presencia de producto
I	Convencional	DCC (1.2 eq.)	43	Ambiente	No
II	Convencional	DCC (1.2 eq.)	5	50	No
III	Convencional	PyBOP (1.2 eq.)	72	Ambiente	No
IV	Convencional	EDAC (1.5 eq.)	92	Ambiente	Sí, en cantidades mínimas

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Continuación de la Tabla 7.4					
V	Convencional	EDAC (1.5 eq.)	96	60	Sí, en cantidades mínimas
VI	Convencional	EDAC (2 eq.)	96	60	Sí, en cantidades mínimas
VII	Convencional	EDAC (2 eq.)	144	60	Sí, con rendimiento crudo de 65%
VIII	Microondas	DCC (1.2 eq.)	2	70	Sí, en cantidades mínimas
IX	Microondas	DCC (1.2 eq.)	1	80	Sí, en cantidades mínimas
X	Microondas	DCC (1.2 eq.)	1	90	Sí, en cantidades mínimas
XI	Microondas	EDAC (1.5 eq.)	2	70	Sí, en cantidades mínimas
XII	Microondas	PyBOP (1.2 eq.)	2	80	No
XIII	Microondas	PyBOP (1.2 eq.)	1	100	No

Como se puede observar, las mejores condiciones que permitieron la obtención del profármaco fueron utilizando a la *N,N*-dietil-beta-alanina, mediante el método convencional, con EDAC como agente acoplante, durante 6 días de reacción, a 60 °C y con 0.2 equivalentes de DMAP. De esta reacción se recuperó un sólido color amarillo, con un rendimiento del 5%, $R_f = 0.60$ (sistema II) y punto de descomposición = 245.0-246.8 °C.

Cabe mencionar que también se intentó la síntesis de un profármaco de **MLB13** usando el aminoácido Fmoc-Prolina con EDAC como agente acoplante, sin embargo, la reacción no procedió bajo las condiciones de tiempo y temperatura probadas.

En la práctica, la reacción con ácidos carboxílicos, EDAC y aminas conduce a amidas sin problemas, pero los alcoholes, por su carácter poco nucleofílico suelen necesitar de agentes catalizadores para que se lleve a cabo la reacción de esterificación de forma cuantitativa. En este caso se decidió utilizar la DMAP para que actuara como un reactivo de transferencia de acilo y así poder obtener el éster deseado sin problema.

En la reacción la EDAC y el ácido carboxílico forman un intermediario de *O*-acilurea, que ofrece una reactividad similar al anhídrido del ácido carboxílico correspondiente. Después DMAP, como un nucleófilo más fuerte que el alcohol, reacciona con la *O*-acilurea que conduce a la formación de una amida reactiva y a la urea correspondiente que es estable. Luego el alcohol lleva a cabo el ataque nucleofílico sobre el carbonilo de la amida reactiva, dando paso a la formación del éster y la regeneración de la DMAP (Figura 7.11).

Está reportado que el uso de las carbodiimidas para la síntesis de ésteres y amidas tiene como inconveniente que cuando el grupo nucleofílico no ataca lo suficientemente rápido al

intermediario *O*-acilurea, dicha molécula sufre un rearrreglo y produce una *N*-acilurea que no es reactiva. Esta reacción colateral logró disminuirse con la presencia de la DMAP.

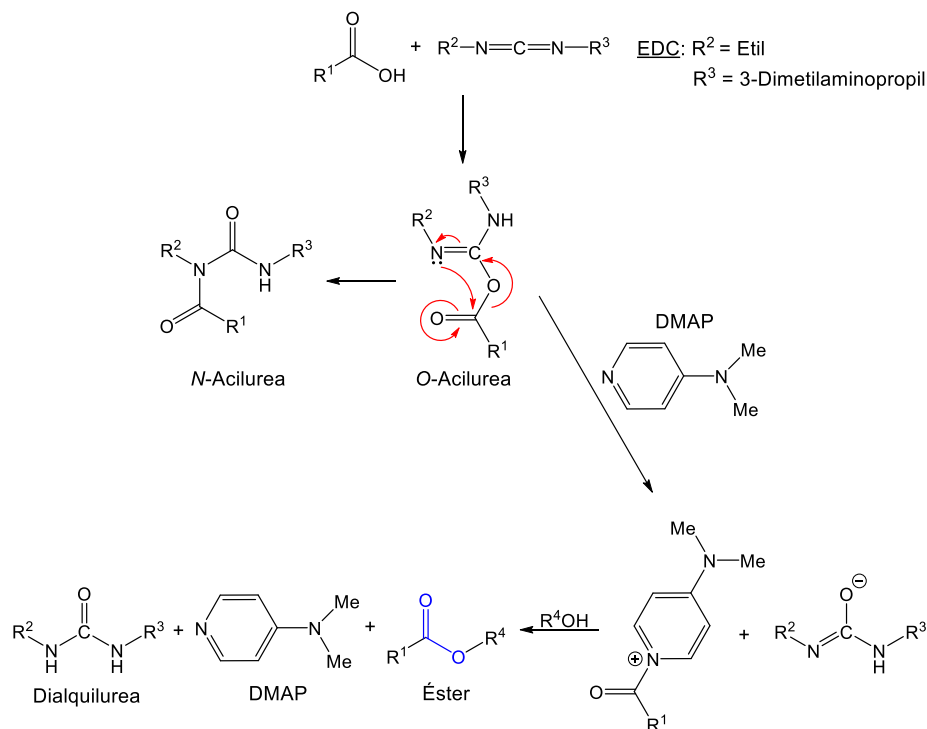


Figura 7.11. Mecanismo de acoplamiento de éster mediado por EDC/DMAP¹⁰⁵.

El rendimiento de reacción resultó ser muy bajo, lo cual era de esperarse ya que al dar por terminada la reacción se observaba que quedaba bastante materia prima, la cual ya no reaccionaba por más tiempo que se dejaba. El rendimiento se calculó respecto de la cantidad obtenida del profármaco después de ser purificado mediante cromatografía en columna, esto también contribuyó a las pérdidas que ocasionaron un bajo rendimiento.

Esta reacción fue de pobre rendimiento debido a que el hidroxilo de **MLB13**, que da paso a la formación del éster, es muy poco nucleofílico por la resonancia que se lleva a cabo en el anillo de benceno y además se encuentra impedido estéricamente por la presencia de los metoxilos. Por esta razón fue complicado hallar condiciones que permitieran obtener el profármaco con mayor rendimiento.

También se observó en algunos experimentos que bastante de la especie acil piridinio, formado a partir del intermediario *O*-acilurea y DMAP, quedaba sin reaccionar, a tal grado que fue posible purificarlo y aislarlo. Mediante RMN de 1H y ^{13}C se confirmó su presencia y se concluyó que la causa de que dicho intermediario no estuviera reaccionando de la forma esperada era debido a la baja nucleofilia de **MLB13** (Figura 7.12). Este problema se logró mejorar disminuyendo la cantidad de equivalentes de DMAP utilizados durante la reacción.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

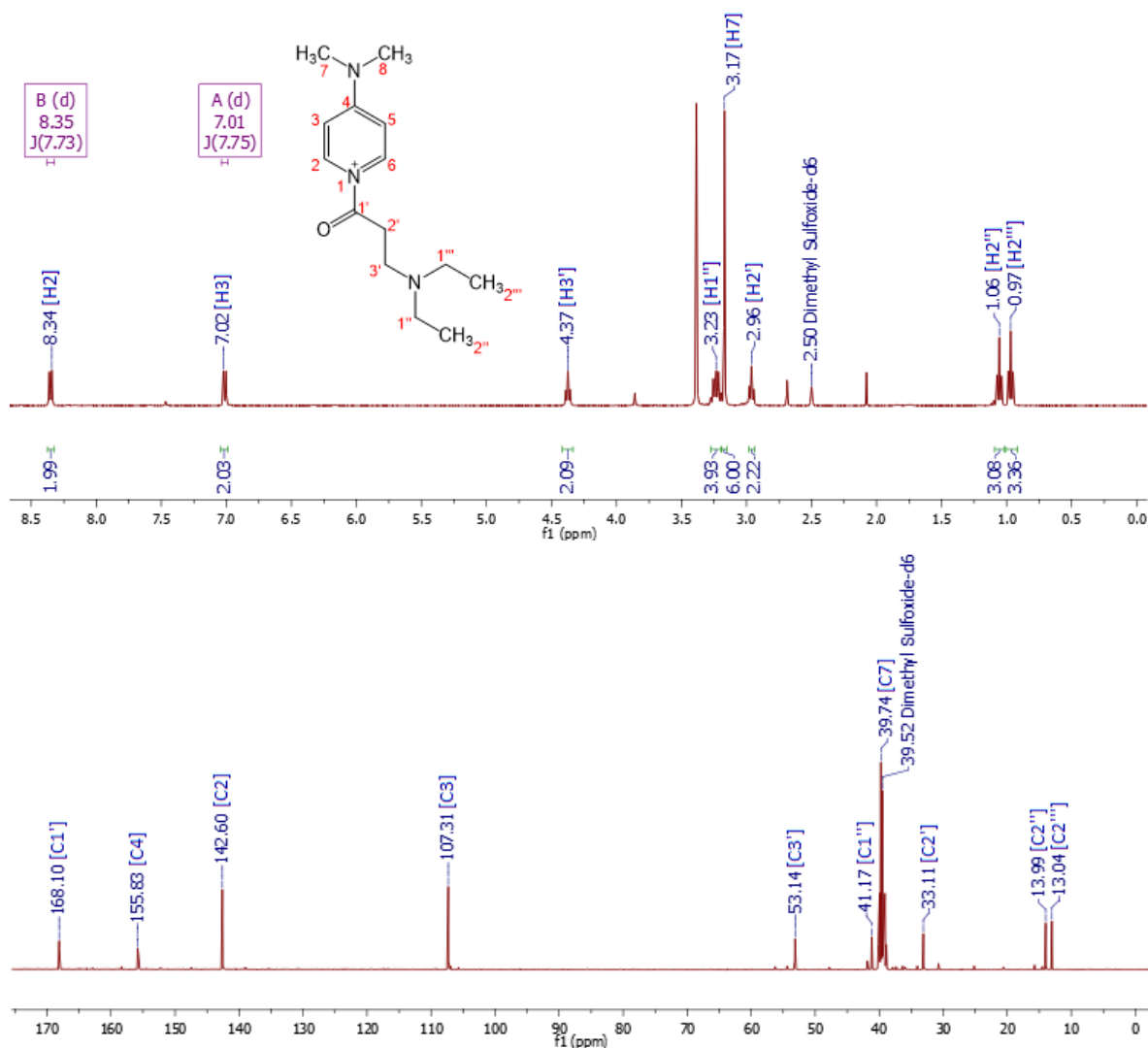


Figura 7.12. Espectros de ¹H y ¹³C de la especie acil piridinio formada entre DMAP y *N,N*-dietil-beta-alanina proveniente de la reacción de acoplamiento con EDAC.

De esta reacción también era probable la incorporación del aminoácido en las posiciones 2 y 4 del núcleo de quinazolina a través de la formación de un enlace amida. Un estudio del potencial electrostático de **MLB13** permitió visualizar qué átomos de la molécula poseen alta densidad electrónica y cuáles una deficiencia de ella. En la Figura 7.13 se observa que los aminos en 2 y 4 tienen una menor densidad electrónica respecto del hidroxilo y, por lo tanto, son menos nucleofílicos. Dicha observación es a causa de la deslocalización de los pares de electrones solitarios de estos nitrógenos lo cual permite la formación de un mayor número de estructuras resonantes al estar unidos estos átomos directamente al anillo de quinazolina y lo cual provoca la disminución de la capacidad de ataque del nucleófilo. De esta manera se pudo predecir que el aminoácido se incorporaría en los aminos 2 y 4 del heterociclo con menor probabilidad.

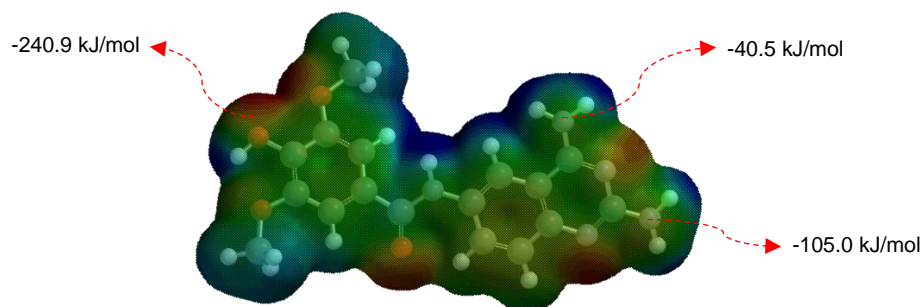


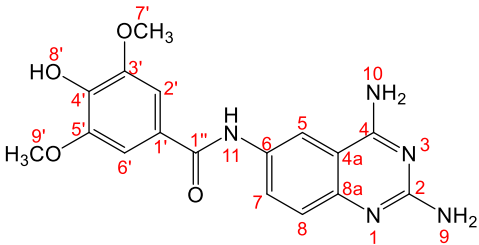
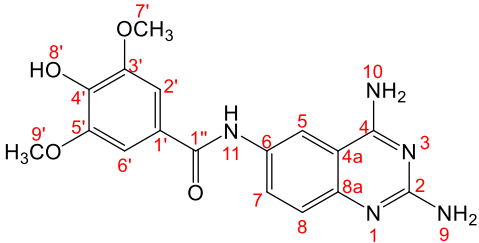
Figura 7.13. Mapa del potencial electrostático de **MLB13**. Las zonas azules indican deficiencia de densidad electrónica mientras que las rojas indican alta densidad electrónica. La molécula se minimizó con el método Hartree-Fock, con base 3-21G, en el programa Spartan '14 V1.1.4 y el mapa de potencial electrostático se obtuvo con un isovalor de 0.002.

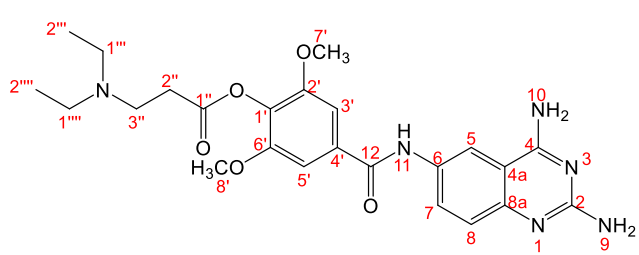
7.1.2. Caracterización espectroscópica del derivado de la 2,4,6-triaminoquinazolina (MLB13) y su profármaco

Para realizar la caracterización espectroscópica de los compuestos sintetizados, fundamentalmente se utilizó RMN de ^1H y de ^{13}C y para la caracterización espectrométrica se utilizó espectrometría de masas por APCI, en el que un indicio de que se sintetizó la molécula indicada es el peso molecular, que puede confirmarse con el ion molecular y el patrón de fragmentación realizado. Los espectros de infrarrojo sirvieron de apoyo para confirmar que los grupos funcionales producían las bandas de absorción por las vibraciones de tensión y/o flexión característicos.

La Tabla 7.5 incluye la estructura del intermediario, el rendimiento obtenido y algunas constantes determinadas, como el R_f y el punto de fusión, así como las señales de los espectros de IR, masas, RMN de ^1H y ^{13}C asignadas. Los espectros completos adquiridos se encuentran en el apéndice II.

Tabla 7.5. Características e información espectroscópica del derivado **MLB13** y su profármaco **LCAC137**.

Derivado	Información espectroscópica
 <p>MLB13 (obtenido mediante la ruta de síntesis B) <i>N</i>-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzamida P.M.: 355.35 g/mol Aspecto: Polvo amarillo Rendimiento: 90% Punto de fusión: 224.0-227.4 °C Rf: 0.28 en sistema II</p>	<p>IR - FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): (-O=C-NH) 3195 y 1601, (-NH₂) 3336, 1557 y 824, (C=O) 1646, (-OCH₃) 2851, (C-O-CH₃) 1218</p> <p>EM (APCI)⁺: 356.1260 (M+1⁺)</p> <p>RMN ¹H (DMSO-d₆, 400MHz): δ 10.17 [(H₁₁)(s,1H, Protón intercambiado en experimento con D₂O)], 8.26 [(H₅)(d, J = 1.78₅₋₇ Hz, 1H)], 7.73 [(H₇)(dd, J = 1.98₇₋₅, 8.91₇₋₈ Hz, 1H)], 7.65 [(H₁₀)(s, 2H, Protones intercambiados en experimento con D₂O)], 7.38 [(H_{2',6'})(s, 2H)], 7.27 [(H₈)(d, J = 8.88₈₋₇ Hz, 1H)], 6.49 [(H₉)(s, 2H, Protones intercambiados en experimento con D₂O)], 3.85 [(H_{7',9'})(s, 6H)], 3.74 [(H₈)(s, 1H, Protones intercambiados en experimento con D₂O)]</p> <p>RMN ¹³C (DMSO-d₆, 100MHz): δ 164.73 (C_{1''}), 162.46 (C₄), 158.66 (C₂), 147.50 (C_{3',5'}), 145.67 (C_{8a}), 139.01 (C_{4'}), 132.21 (C_{4a}), 129.52 (C₇), 123.91 (C₁), 122.09 (C₈), 116.82 (C₅), 109.68 (C₆), 105.45 (C_{2',6'}), 56.18 (C_{7',9'})</p>
 <p>MLB13 (obtenido mediante la ruta de síntesis C) <i>N</i>-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzamida P.M.: 355.35 g/mol Aspecto: Polvo amarillo claro Rendimiento: 55% Punto de fusión: 223.0-224.2 °C Rf: 0.28 en sistema II</p>	<p>IR - FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): (-O=C-NH) 3195 y 1603, (-NH₂) 3343, 1544 y 829, (C=O) 1644, (-OCH₃) 2843, (C-O-CH₃) 1214 y 1038</p> <p>EM (APCI)⁺: 356.1485 (M+1⁺)</p> <p>RMN ¹H (DMSO-d₆, 400MHz): δ 10.11 [(H₁₁)(s,1H, Protón intercambiado en experimento con D₂O)], 8.20 [(H₅)(d, J = 2.08₅₋₇ Hz, 1H)], 7.68 [(H₇)(dd, J = 2.15₇₋₅, 8.93₇₋₈ Hz, 1H)], 7.54 [(H₁₀)(s,2H, Protones intercambiados en experimento con D₂O)], 7.36 [(H_{2',6'})(s, 2H)], 7.25 [(H₈)(d, J = 8.89₈₋₇ Hz, 1H)], 6.36 [(H₉)(s,2H, Protones intercambiados en experimento con D₂O)], 3.85 [(H_{7',9'})(s, 6H)], 3.80 [(H₈)(s, 1H, Protones intercambiados en experimento con D₂O)]</p>

	<p>RMN ¹³C (DMSO-d₆, 400MHz): δ 164.73 (C_{1''}), 162.44 (C₄), 159.23 (C₂), 147.52 (C_{3',5'}), 147.03 (C_{8a}), 139.01 (C_{4'}), 131.81 (C_{4a}), 129.38 (C₇), 123.98 (C_{1'}), 122.85 (C₈), 116.77 (C₅), 109.77 (C₆), 105.40 (C_{2',6'}), 56.17 (C_{7',9'})</p>
<div style="text-align: center;">  <p>LCAC137 4-[(2,4-diaminoquinazolin-6-il)carbamoil]-2,6-dimetoxifenil 3-(dietilamino)propanoato</p> <p>P.M.: 482.54 g/mol Aspecto: Polvo amarillo Rendimiento: 5% Punto de descomposición: 245.0-246.8 °C Rf: 0.60 en sistema II</p> </div>	<p>IR - FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): (-O=C-NH) 3165 y 1599, (-NH₂) 3328, 1537 y 839, (C=O amida) 1644, (-OCH₃) 2849, (C-O-CH₃) 1238, (O=C éster)1730</p> <p>EM (APCI)⁺: 483.2638 (M+1⁺)</p> <p>RMN ¹H (DMSO-d₆, 400MHz): δ 10.66 [(H₁₁)(s,1H)], 8.70 [(H₁₀)(s,2H)], 8.50 [(H₅)(d, J = 1.96₅₋₇ Hz, 1H)], 7.94 [(H₇)(dd, J = 1.96₇₋₅, 8.91₇₋₈ Hz, 1H)], 7.60 [(H₉)(s,2H)], 7.44 [(H_{3',5'})(s, 2H)], 7.39 [(H₈)(d, J = 8.76₈₋₇ Hz, 1H)], 4.56 [(H_{3''})(t, 2H)], 3.87 [(H_{7',8'})(s, 6H)], 3.74 [(H_{1''',1'''})(c, 4H)], 2.88 [(H_{2''})(t, 2H)], 1.22 [(H_{2'''})(t, 3H)], 0.83 [(H_{2''''})(t, 3H)]</p> <p>RMN ¹³C (DMSO-d₆, 400MHz): δ 168.51 (C_{1''}), 164.64 (C₁₂), 162.84 (C₄), 162.56 (C₂), 151.71 (C_{1'}), 147.55 (C_{2',6'}), 137.67 (C_{8a}), 134.29 (C_{4a}), 132.46 (C_{4'}), 130.30 (C₇), 118.03 (C₈), 117.24 (C₅), 109.36 (C₆), 104.70 (C_{3',5'}), 56.36 (C_{7',8'}), 56.19 (C_{1''',1'''}), 41.25 (C_{3''}), 29.10 (C_{2''}), 28.91 (C_{2''',2''''})</p>

7.1.2.1. Caracterización espectroscópica y espectrométrica de la N-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzamida (MLB13)

Los espectros de RMN, IR y masas que se van a discutir a continuación son los generados a partir de **MLB13** sintetizado mediante la ruta C propuesta en este trabajo. Los espectros obtenidos para la caracterización de **MLB13** sintetizado a través de la ruta B se encuentran detallados en el apéndice II.

La espectrometría de masas de alta resolución arrojó el ion molecular M+1 356.1485 m/z correspondiente al peso molecular esperado. La espectroscopia de infrarrojo mostró la banda para la vibración de tensión del enlace N-H de amidas secundarias a 3195 cm⁻¹; la banda para la vibración de flexión del enlace N-H de amidas apareció a 1603 cm⁻¹; en 3343 cm⁻¹ se mostró la banda para la vibración de tensión N-H de aminas primarias; las bandas para la vibración de flexión del enlace N-H de aminas aparecieron a 1544 y 829 cm⁻¹; en 1644 cm⁻¹ se registró

la banda de tensión del enlace C=O de la amida; en 2843 cm^{-1} apareció la banda de tensión del enlace CH₃-O de los éteres metílicos y las bandas para la tensión C-O del aril alquil éter aparecieron en 1214 y 1038 cm^{-1} .

La asignación de los protones de las moléculas se realizó mediante el valor de desplazamiento químico (δ), la multiplicidad, la integración de cada una de las señales, así como la medición de las constantes de acoplamiento, y mediante esto último se hizo la correlación de las señales que pertenecían al mismo núcleo aromático. Dicha correlación fue confirmada mediante los espectros bidimensionales COSY.

La espectroscopia de RMN ¹H mostró para el anillo de quinazolina la señal que corresponde al protón de la posición 5, un doblete (8.20 ppm, J=2.08 Hz acoplamiento meta); para el protón en 7, mostró un doble de dobles (7.68 ppm, J=8.93 Hz acoplamiento orto y 2.15 Hz acoplamiento meta) y para el protón en 8 presentó un doblete (7.25 ppm, J=8.89 Hz acoplamiento orto). Los protones aromáticos del 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenceno marcados en 2' y 6', por ser equivalentes estuvieron representados por una sola señal en el espectro a 7.36 ppm. Los protones de la amina marcados en 10 propiciaron una señal ancha que integraba para dos protones a 7.54 ppm y los protones de la amina marcados en 9 presentaron una señal ancha que integraba para dos protones a 6.36 ppm. Estos últimos cuatro, se corroboraron con su desaparición en el experimento de intercambio con agua deuterada (Figura 7.14).

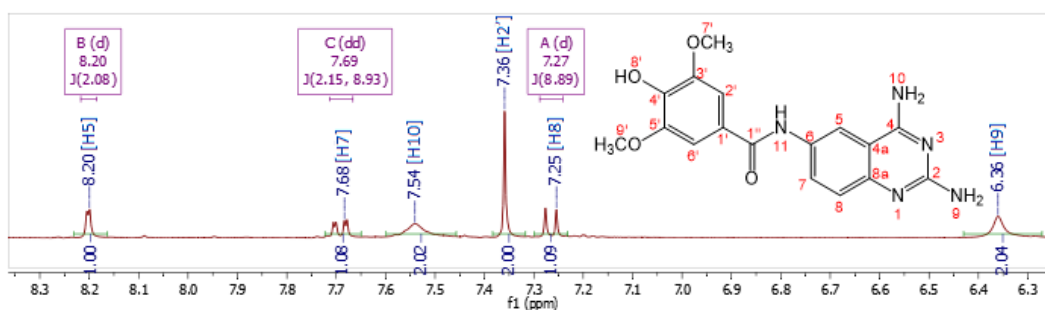


Figura 7.14. Ampliación del fragmento de la zona aromática del espectro de RMN ¹H de **MLB13**.

Se sabe que el grupo amino de la posición 4 del núcleo de quinazolina está más desprotegido debido a la resonancia que está llevando a cabo dicho núcleo. Según el estudio *in silico* realizado por Matus Meza, A. S. en 2013⁶³, el grupo amino de la posición 2 del núcleo de quinazolina está más favorecido al mantener una mayor distribución electrónica por parte de los nitrógenos de las posiciones 1 y 3. Entonces de acuerdo a lo anterior, se esperaba encontrar el grupo amino de la posición 4 en un valor de desplazamiento químico hacia campo más bajo en comparación del correspondiente con el grupo amino en la posición 2. Con ayuda del espectro NOESY de **MLB13** se confirma lo predicho ya que se puede observar la correlación a distancia del protón en la posición 5 de la quinazolina, con los dos protones del amino de la posición 4. Este mismo espectro nos permite corroborar que la amida se formó con el amino de la posición 6 del núcleo de quinazolina, al observar las correlaciones

entre el protón de la amida y los protones de las posiciones 5 y 7 del heterociclo (Figura 7.15).

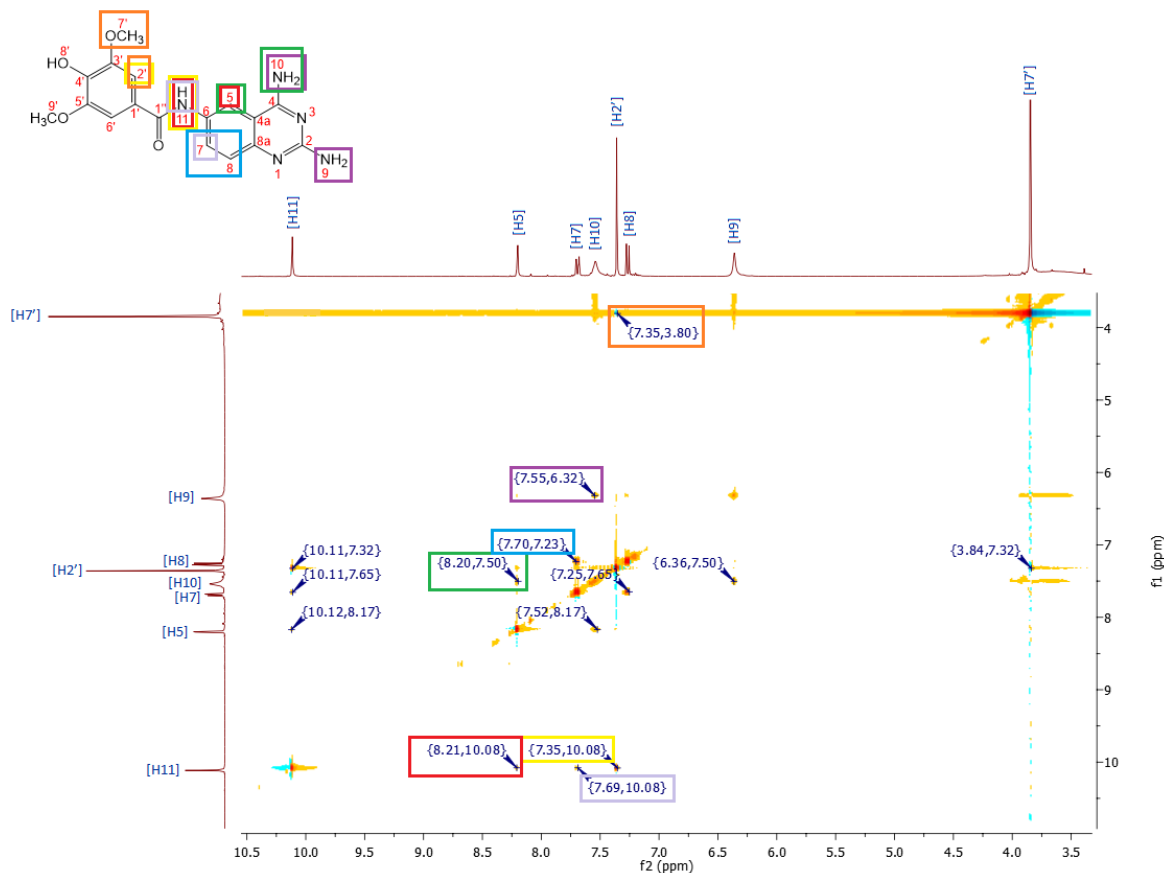


Figura 7.15. Fragmento del espectro NOESY de **MLB13**, y correlaciones observadas.

El protón del grupo carboxamida fue asignado a la señal que aparece a 10.11 ppm, que integra para un protón y que adicionalmente desaparece en el experimento de intercambio con agua deuterada (Figura 7.16). Los protones de los metoxilos marcados en 7' y 9' son equivalentes y corresponden con la señal encontrada a 3.85 ppm que integra para 6 protones. La señal del protón del hidroxilo es muy pequeña y difícil de observar, este fenómeno se debe a que este hidrógeno presenta carácter ácido, lo que causa que el intercambio del protón por los del medio sea muy rápido y por lo tanto se complica detectarlo mediante RMN en disolución; sin embargo, se logró asignar en 3.80 ppm.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

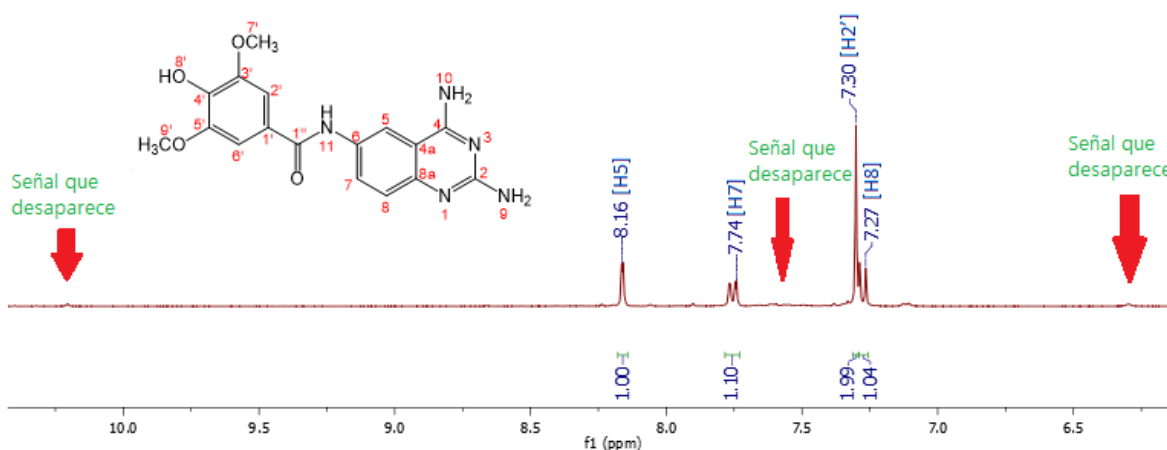


Figura 7.16. Fragmento del espectro de ^1H del experimento de intercambio con D_2O de **MLB13**. Se indican las señales que desaparecen.

El espectro bidimensional COSY sirvió para confirmar las asignaciones de las señales de los protones en posiciones 5, 7 y 8 pertenecientes al núcleo de quinazolina (Figura 7.17).

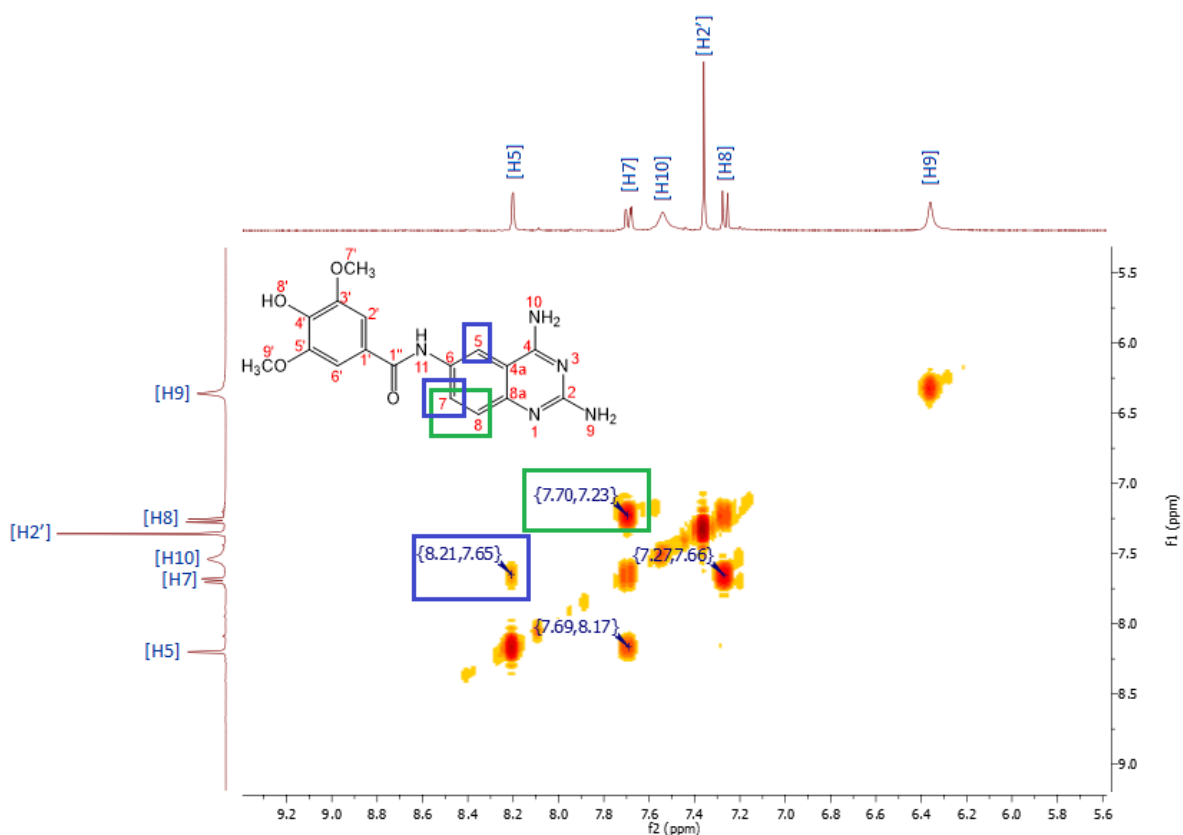


Figura 7.17. Fragmento del espectro COSY de **MLB13** y sus correlaciones encontradas y asignadas a la molécula.

Para corroborar la asignación correcta de las señales de ^1H y ^{13}C fue necesario registrar espectros de correlación heteronuclear, HSQC y HMBC, que correlacionan a un enlace y a larga distancia, respectivamente.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Con las correlaciones encontradas en el experimento HSQC, se pudieron asignar los carbonos de las posiciones 5, 7, 8, 2', 6', 7' y 9' en el espectro de ^{13}C (Figura 7.18).

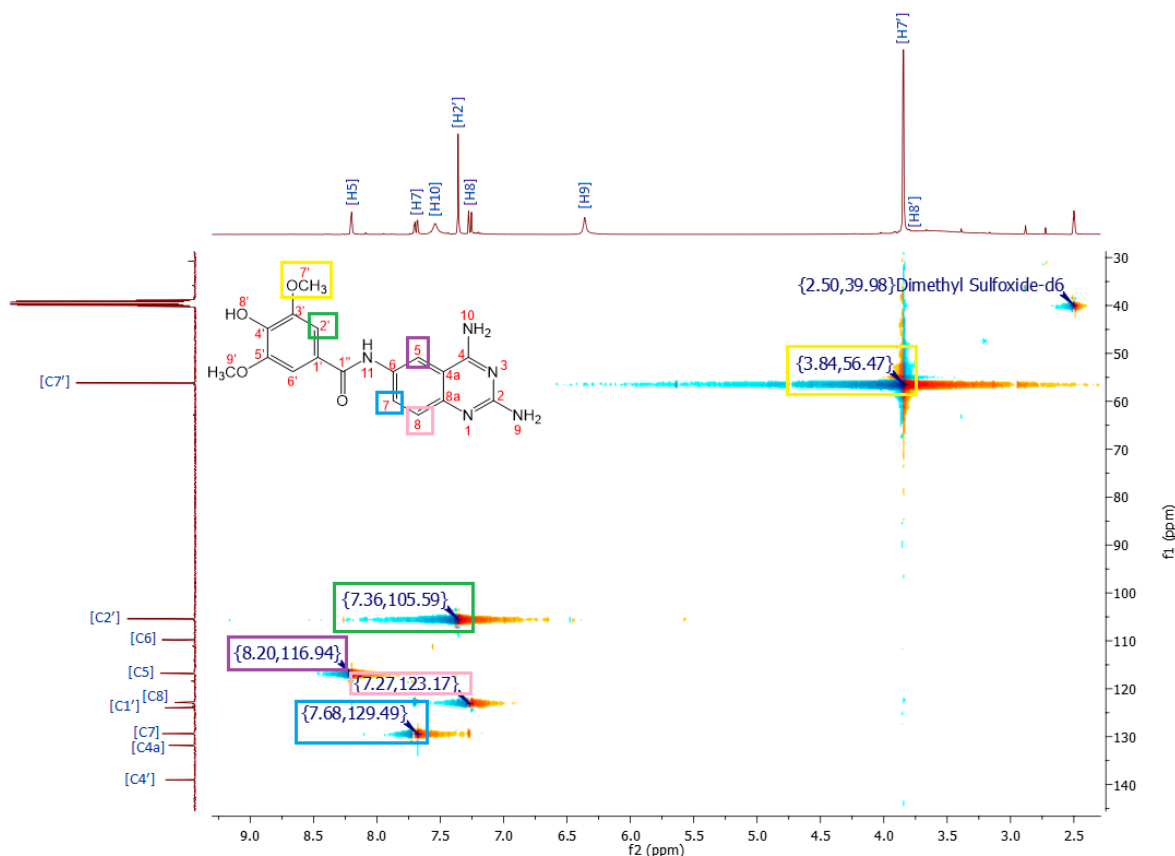


Figura 7.18. Fragmento del espectro HSQC de **MLB13** y correlaciones observadas.

El resto de los carbonos lograron asignarse con ayuda de las correlaciones del espectro bidimensional HMBC. El carbono 1'' correlaciona con los protones 11 y 2', el carbono 4 con el protón 5, el carbono 3' con los protones 7' y 6', el carbono 8a con los protones 5 y 7, el carbono 4' con el protón 2', el carbono 4a con los protones 5 y 8, el carbono 1' con el protón 2' y el carbono 6 con el protón 8 (Figura 7.19).

La asignación del carbono 2 se llevó a cabo de forma indirecta, pues no se observaba correlación con ningún protón, a diferencia del carbono 4, que correlaciona con el protón 5.

El carbono 6, es decir el que está unido directamente al nitrógeno de la carboxamida, estuvo localizado en la zona de campo alto, dado que la densidad electrónica en esta zona es mayor, en comparación con los otros carbonos del núcleo de quinazolina-2,4,6-triamina.

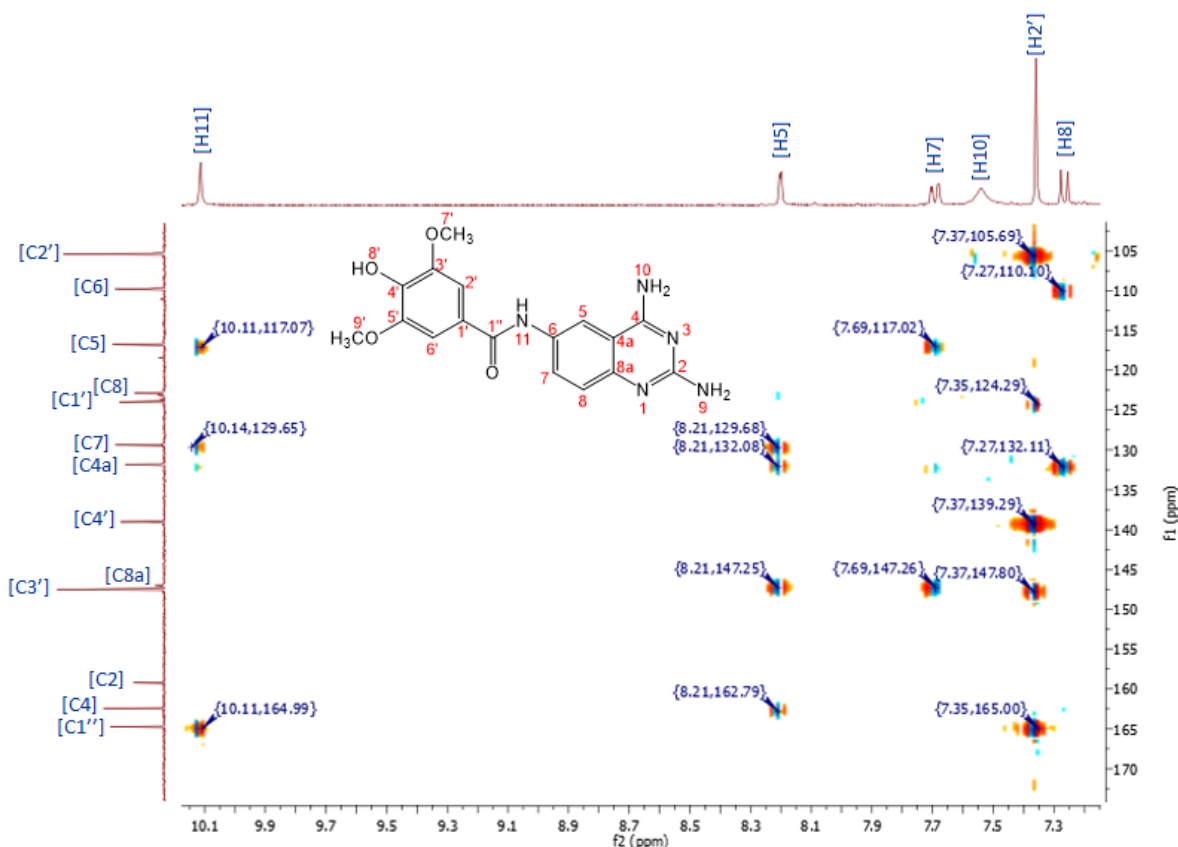


Figura 7.19. Fragmento aumentado del espectro HMBC de **MLB13** y sus correlaciones observadas.

7.1.2.2. Caracterización espectroscópica y espectrométrica de 4-[(2,4-diaminoquinazolin-6-il)carbamoil]-2,6-dimetoxifenil 3-(dietilamino)propanoato (LCAC137)

La espectrometría de masas de alta resolución arrojó el ion molecular $M+1$ 483.2638 m/z correspondiente al peso molecular esperado. La espectroscopia de infrarrojo mostró la banda para la vibración de tensión del enlace N-H de amidas secundarias a 3165 cm^{-1} ; la banda para la vibración de flexión del enlace N-H de amidas apareció a 1599 cm^{-1} ; en 3328 cm^{-1} se mostró la banda para la vibración de tensión N-H de aminas primarias; las bandas para la vibración de flexión del enlace N-H de aminas aparecieron a 1537 y 839 cm^{-1} ; en 1644 cm^{-1} se registró la banda de tensión del enlace C=O de la amida; en 2849 cm^{-1} apareció la banda de tensión del enlace $\text{CH}_3\text{-O}$ de los éteres metílicos; las bandas para la tensión C-O del aril alquil éter aparecieron en 1238 y por último la banda para la tensión C=O del éster se encontró en 1730 cm^{-1} .

La asignación de los protones de las moléculas se realizó mediante el valor de desplazamiento químico (δ), la multiplicidad, la integración de cada una de las señales, así como la medición de las constantes de acoplamiento, y mediante esto último se hizo la correlación de las señales que pertenecían al mismo núcleo aromático. Dicha correlación fue confirmada mediante los espectros bidimensionales COSY.

La espectroscopia de RMN ^1H mostró para el anillo de quinazolina la señal que corresponde al protón marcado en posición 5, un doblete (8.50 ppm, $J=1.96$ Hz acoplamiento meta); para el protón marcado en 7, mostró un doble de dobles (7.94 ppm, $J=8.91$ Hz acoplamiento orto y 1.96 Hz acoplamiento meta) y para el protón en 8 presentó un doblete (7.39 ppm, $J=8.76$ Hz acoplamiento orto). Los protones aromáticos del anillo de benceno marcados en 3' y 5', por ser equivalentes estuvieron representados por una sola señal en el espectro a 7.44 ppm. Los protones de la amina marcados en 10 propiciaron una señal ancha que integraba para dos protones a 8.70 ppm y los protones de la amina marcados en 9 presentaron una señal ancha que integraba para dos protones a 7.60 ppm (Figura 7.20).

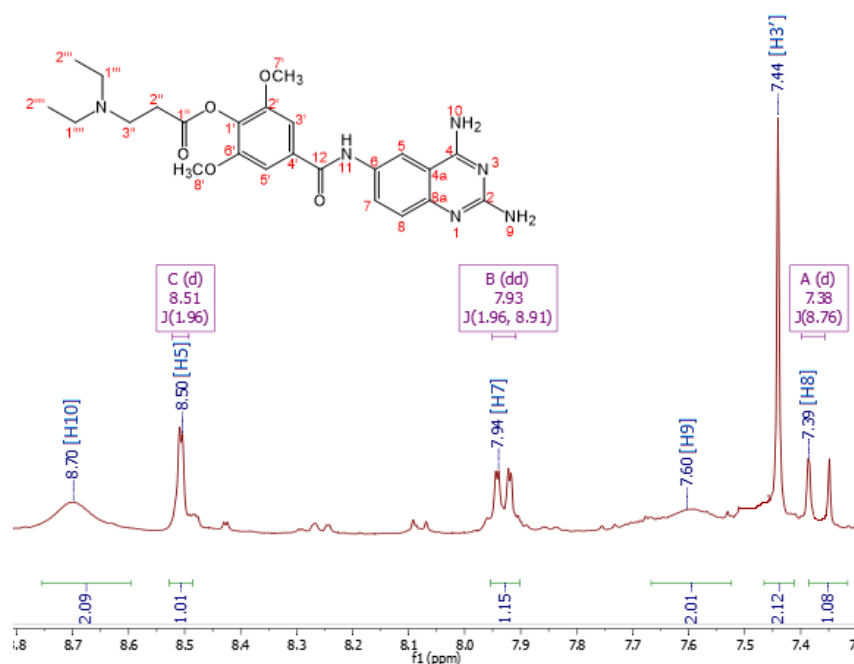


Figura 7.20. Ampliación del fragmento de la zona aromática del espectro de RMN ^1H de **LCAC137**.

El protón del grupo carboxamida fue asignado a la señal que integra para uno y que aparece a 10.66 ppm, este tipo de protones suelen aparecer en la zona de campo bajo del espectro por la poca densidad electrónica que conservan como consecuencia del efecto electroatractor del carbonilo próximo. Los protones de los metoxilos marcados en 7' y 8' son equivalentes y corresponden con la señal que integra para 6 protones encontrada a 3.87 ppm, la cual coincide con la zona donde suelen hallarse los protones de carbonos unidos a oxígeno.

Los protones que forman parte del modificador, es decir del aminoácido del profármaco, correspondieron con las señales encontradas en la zona que va desde 0.8 a 4.5 ppm la cual coincide con la zona de protones alifáticos y protones de carbonos unidos a nitrógeno. En 4.35 y 4.56 ppm se encuentra dos tripletes que integran para un protón cada uno y los cuales corresponden con los protones marcados en 3''. Estos protones son los más desplazados hacia campo bajo del espectro debido a que el carbono que les corresponde está unido directamente a nitrógeno y son vecinos próximos al carbonilo que forma parte del éster, por

lo cual se encuentran más desprotegidos. Los protones del multiplete en 3.74 ppm que integran para 4 aproximadamente, se asignaron a los de la posición 1''' y 1'''' ya que son equivalentes y los siguientes más desprotegidos por estar sobre un carbono unido directamente a nitrógeno. Los tripletes encontrados en 2.88 y 2.98 ppm que integran para un protón cada uno fueron asignados a los protones en 2'' ya que se encontraban próximos al carbonilo. Por último, las señales multipletes entre 0.83 y 1.22 ppm que integran para 6 protones, fueron asignadas a los de las posiciones 2''' y 2'''' por ser de carácter alifático (Figura 7.21)

Los protones químicamente equivalentes son protones que se encuentran en el mismo entorno y, por lo tanto, experimentan la misma fuerza magnética en RMN. Como consecuencia suelen crear señales superpuestas en el espectro. Esto no ocurre cuando los protones llegan a percibir ambientes químicos diferentes. En este caso varios protones que se esperaba fueran equivalentes, desdoblaron en dos señales, probablemente porque esta parte de la molécula cuenta con varios enlaces sencillos que tienen libre giro y lo cual origina que protones equivalentes perciban diferentes entornos químicos.

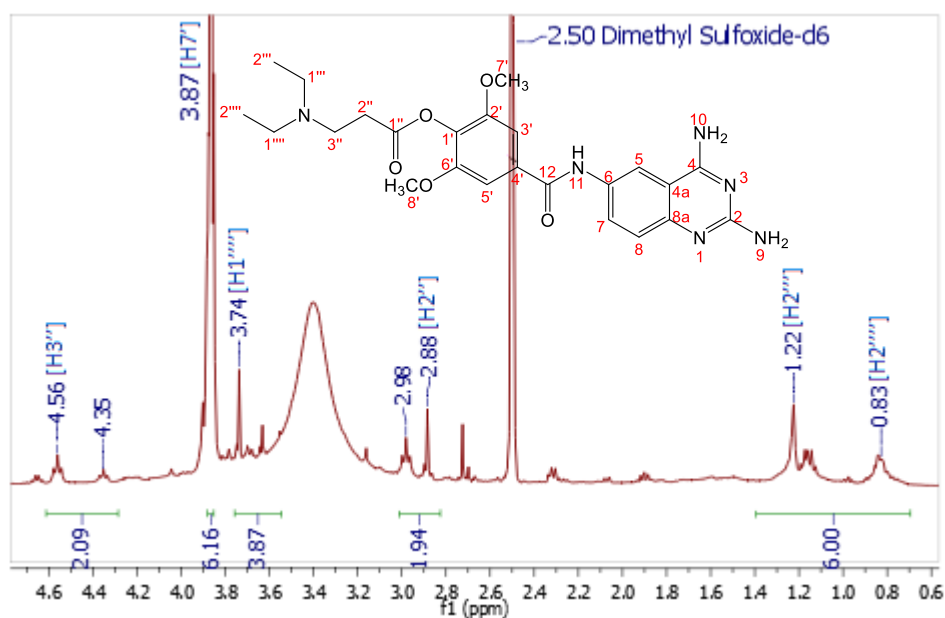


Figura 7.21. Ampliación del fragmento de la zona alifática del espectro de RMN ¹H de LCAC137.

El espectro bidimensional COSY sirvió para confirmar las asignaciones de las señales de los protones de las posiciones 5, 7 y 8 pertenecientes al núcleo de quinazolina y los protones marcados en 2'', 3'', 1'''' y 2'''' pertenecientes a la parte del modificador del profármaco (Figura 7.22).

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

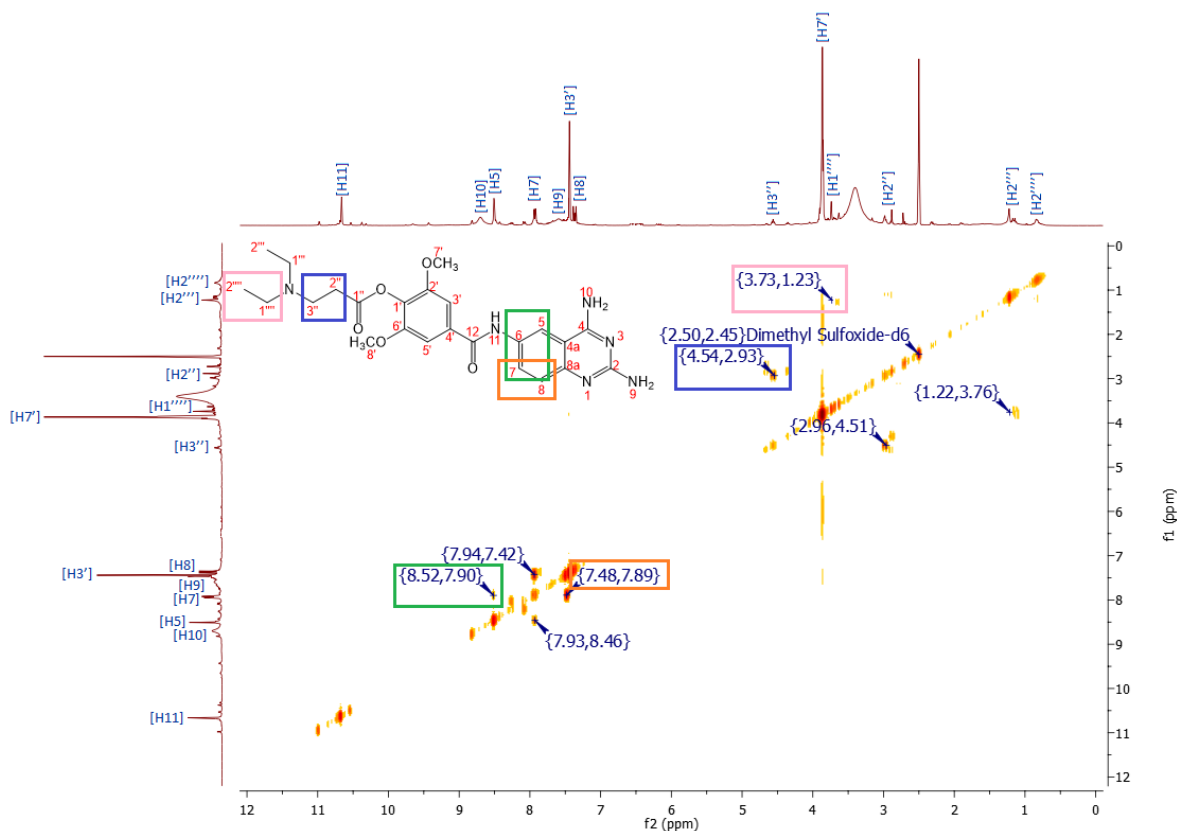


Figura 7.22. Experimento COSY de **LCAC137** y sus correlaciones encontradas y asignadas a la molécula.

Para corroborar la asignación correcta de las señales de ^1H y ^{13}C fue necesario registrar espectros de correlación heteronuclear, HSQC y HMBC, que correlacionan a un enlace y a larga distancia, respectivamente.

Con las correlaciones encontradas en el experimento HSQC, se pudieron asignar los carbonos 5, 7, 8, 3', 5', 2'', 3'', 1''', 2''', 1''''', 2''''', 7' y 8' en el espectro de ^{13}C (Figura 7.23).

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

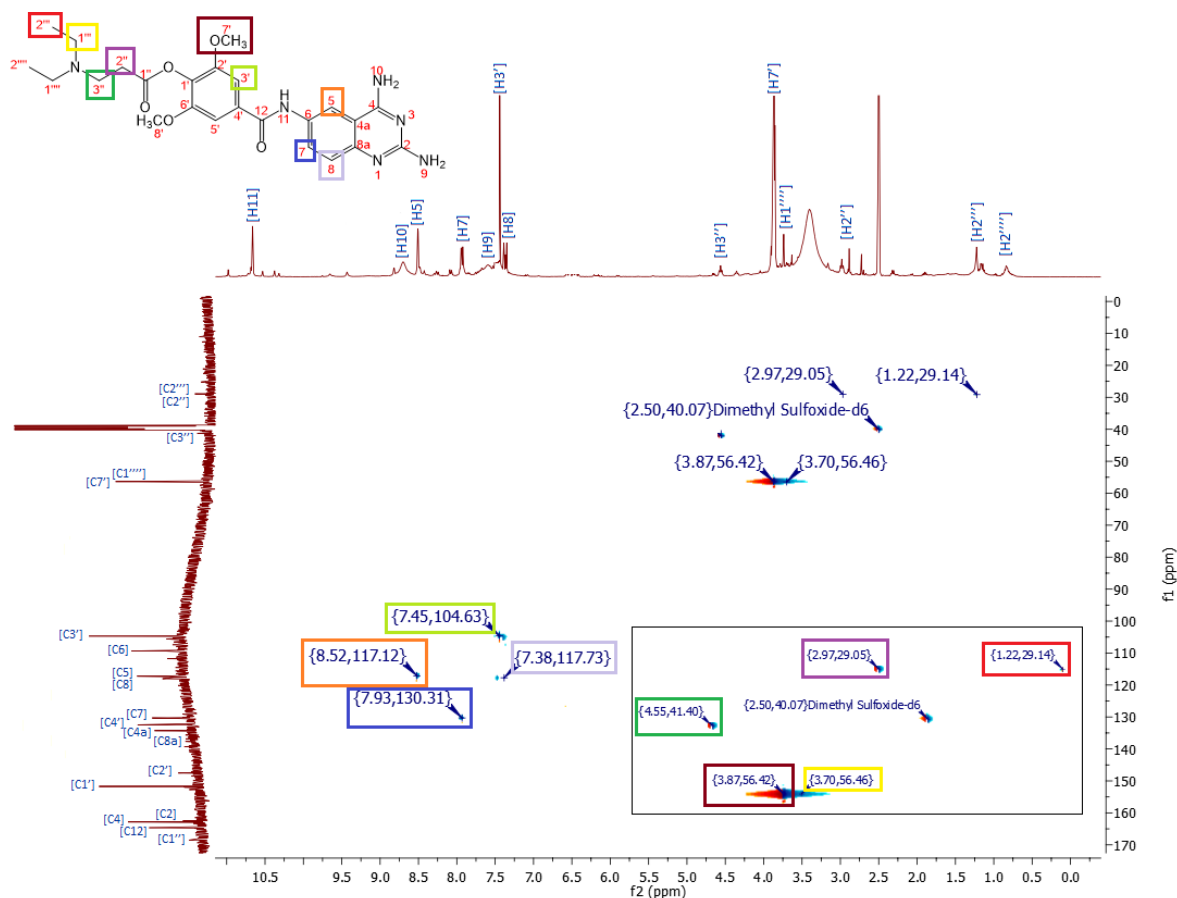


Figura 7.23. Experimento HSQC de **LCAC137** y correlaciones observadas.

El resto de los carbonos lograron asignarse con ayuda de las correlaciones del espectro bidimensional HMBC. El carbono 12 correlaciona con los protones 11 y 3', el carbono 4 con el protón 5, el carbono 2' con los protones 7' y 5', el carbono 8a con los protones 5 y 7, el carbono 1' con los protones 5', 7' y 3'', el carbono 4a con los protones 5 y 8, el carbono 4' con el protón 5', el carbono 6 con el protón 8, el carbono 1'' con los protones 2'', 3'' y 1''', el carbono 2'' con los protones en 3'', el carbono 3'' con los protones en 2'', el carbono 2''' con los protones en 1''', el carbono 1''' con los protones en 1'''' y el carbono 1'''' con los protones en 2'''. De entre estas correlaciones, la más importante para saber si el éster se había formado en el hidroxilo de **MLB13**, fue la del carbono 1' con los protones en 3'' (Figura 7.24).

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

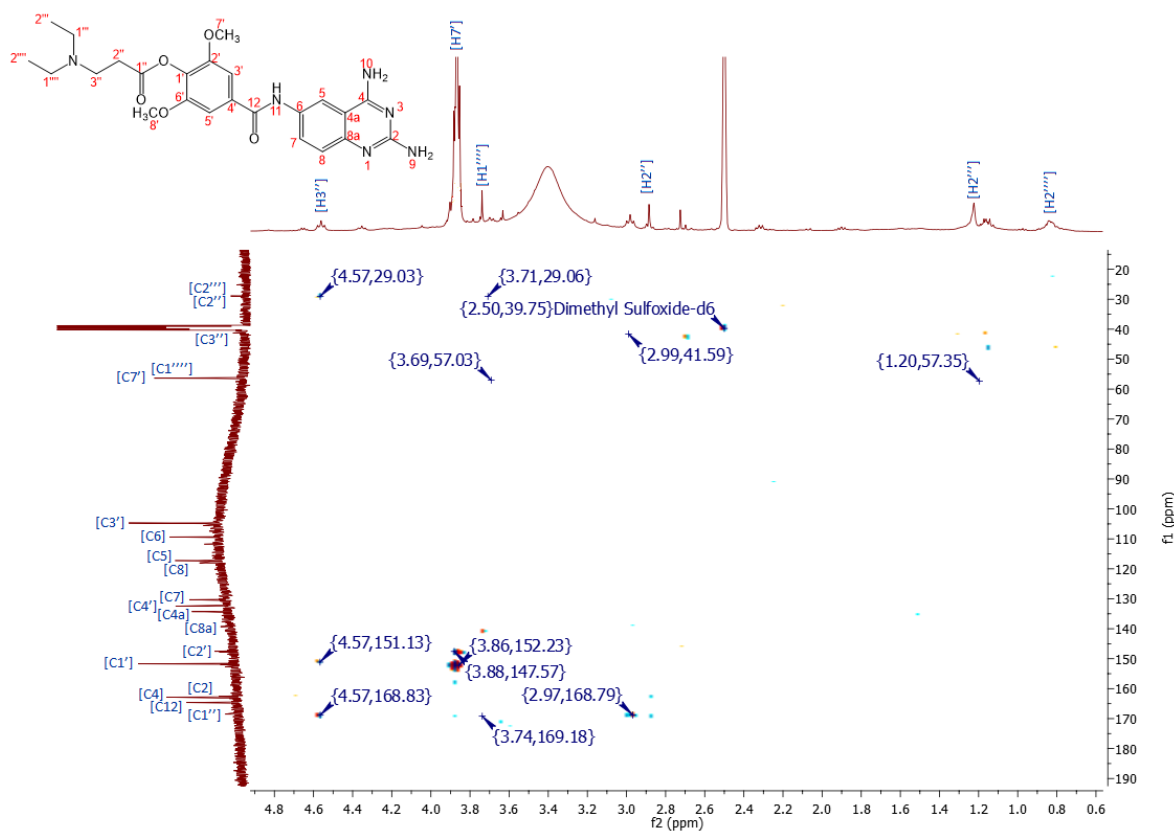


Figura 7.24. Fragmento aumentado de la zona alifática del espectro HMBC de **LCAC137** y sus correlaciones observadas.

La asignación del carbono 2 se llevó a cabo de forma indirecta, pues no se observaba correlación con ningún protón, a diferencia del carbono 4, que correlaciona con el protón en 5.

Otro espectro de utilidad para saber si la *N,N*-dietil-beta-alanina se había acoplado en el hidroxilo de **MLB13** y no en los aminos de 2 y 4 fue el de NOESY, el cual correlaciona protones que están cerca de otros en el espacio. La correlación entre el protón 3' y el 8' confirma la formación del éster (Figura 7.25).

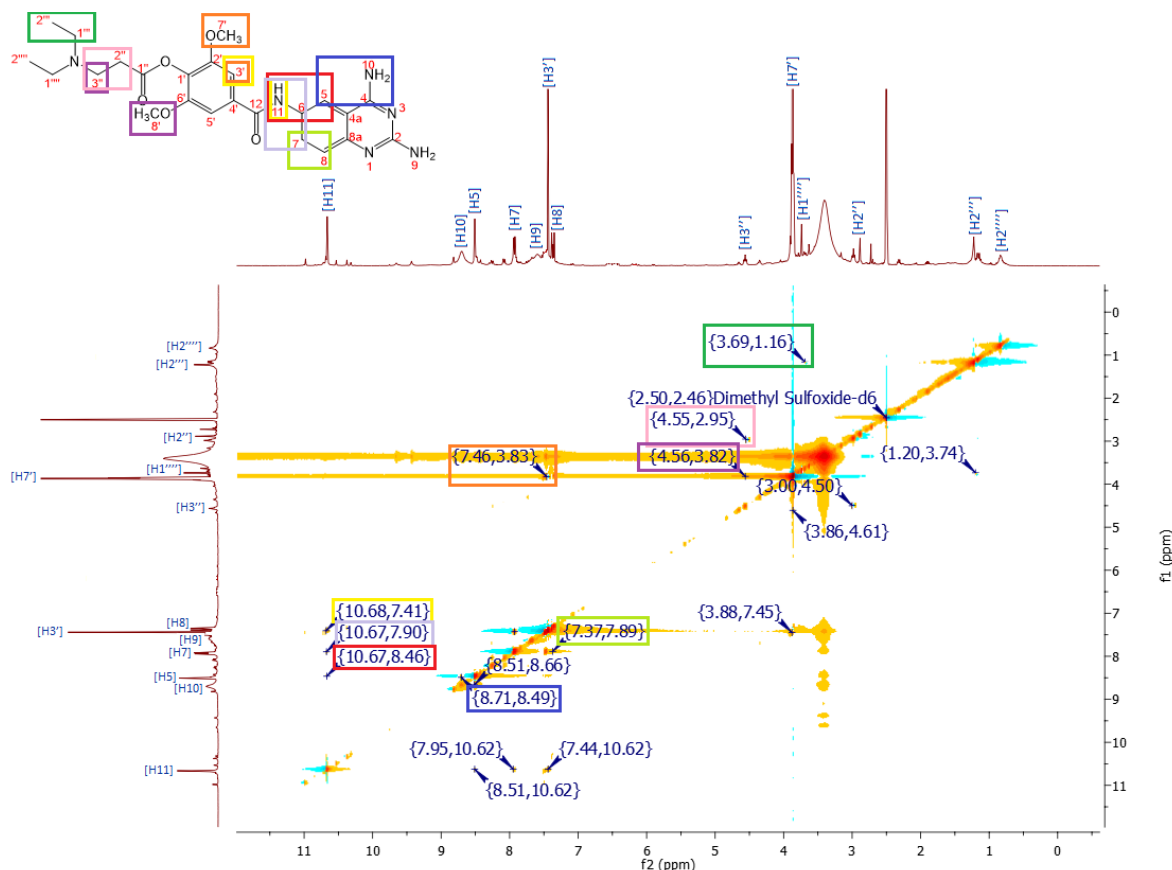


Figura 7.25. Experimento NOESY de LCAC137 y sus correlaciones observadas.

7.2. Parte biológica

A continuación, se muestran los resultados de los ensayos de viabilidad celular, obtenidos mediante el método MTT, para las líneas celulares MCF-7, MDA-MB-231, HeLa y J774 después de haber sido expuestas durante 24 horas a diferentes concentraciones de **MLB13**, **LCAC137** y del fármaco de referencia cisplatino.

Tabla 7.6. Efecto de **MLB13** y su profármaco **LCAC137** sobre la inhibición de la viabilidad celular *in vitro* en células tumorales a 24 horas mediante el ensayo de reducción del MTT.

Compuesto	CI ₅₀ (μM)			
	MCF-7	MDA-MB-231	HeLa	J774
MLB13	109.78	>100	12.8557	0.8311
LCAC137	5.7	>100	129.6746	0.9163
Cisplatino	80.41	87.90	11.9	7.4

Se empleó cisplatino como fármaco de referencia porque es un compuesto que tiene un amplio espectro terapéutico contra el cáncer y su costo es bajo en comparación con otros tratamientos antineoplásicos. Actualmente se usa solo o en combinación con otros fármacos para el tratamiento del cáncer de testículo, ovario, mama, cervical, esófago, pulmón de células pequeñas y no pequeñas, próstata, entre otros¹⁰⁶.

Los resultados del ensayo en la línea celular MCF-7 de cáncer de mama ER positivo, muestran que el profármaco **LCAC137** presentó mayor actividad inhibitoria de la viabilidad celular en comparación con **MLB13** y Cisplatino. En cambio, **MLB13** mantuvo una actividad inhibitoria menor a la del fármaco de referencia. De acuerdo a lo anterior, se puede decir que la adición del aminoácido *N,N*-dietil-beta-alanina a la estructura de **MLB13** mediante un enlace tipo éster, resultó favorable ya que, para esta línea celular la actividad inhibitoria del profármaco mejoró respecto a la de la estructura original como se esperaba.

El ensayo en la línea celular MDA-MB-231 de cáncer de mama reflejó que tanto el derivado **MLB13** como su profármaco no muestran actividad inhibitoria frente a este tipo de células cancerosas, las cuales provienen de un cáncer de mama triple negativo caracterizado por su rápida propagación y opciones de tratamiento limitadas.

Por otro lado, en el ensayo con la línea celular HeLa de cáncer cérvico-uterino, el compuesto **MLB13** presentó una actividad inhibitoria similar a la del Cisplatino, en cambio el profármaco **LCAC137** mostró menor actividad. Dicho comportamiento fue contrario al observado en la línea celular MCF-7, por lo que en este caso la adición del aminoácido al compuesto pobremente soluble en agua no ayudó a mejorar la actividad del compuesto, sino que la disminuyó. Probablemente el aminoácido esté modificando la estructura original del derivado de quinazolina-2,4,6-triamina de tal manera que logre interferir en el mecanismo de acción por el cual se ve afectada la viabilidad de este tipo de células cancerosas.

El ensayo también se realizó en la línea celular J774, es decir en células de macrófago normales. Los compuestos evaluados resultaron tener actividades inhibitorias similares entre ellos, pero mayores a la del Cisplatino, por lo que ambos compuestos mantienen un nivel de citotoxicidad mayor al esperado en células normales. Este comportamiento es una desventaja ya que la baja selectividad de acción de los agentes quimioterapéuticos puede provocar los indeseados efectos adversos.

Simultáneamente se evaluó la actividad inhibitoria de la viabilidad celular de los compuestos en células MCF-7 mediante el uso de cristal violeta y rojo neutro.

Tabla 7.7. Valores de CI_{50} de los compuestos **MLB13** y **LCAC137** evaluados en la línea celular MCF-7 a 24 horas mediante diferentes ensayos de viabilidad celular.

Compuesto	CI_{50} (μM)		
	MTT	Cristal violeta	Rojo neutro
MLB13	109.78	253.5219	137.8511
LCAC137	5.7	59.62	0.0003
Cisplatino	80.41	21.3	38.9

Existen diferentes ensayos para poder observar el efecto que tienen los compuestos sobre la viabilidad de las células. En el ensayo de MTT se determina el número de células vivas mediante la formación de un compuesto coloreado (formazán), el cual es producto de la reacción de reducción del MTT que tiene lugar en las mitocondrias de las células. La

determinación de la viabilidad celular en el ensayo con rojo neutro consiste en la captación del colorante por los lisosomas y endosomas de las células vivas, mientras que el ensayo con cristal violeta se fundamenta en la interacción que ocurre entre el colorante con las proteínas y el ADN presente en las células vivas que mantienen su adherencia^{107,108}.

Como se observa en la Tabla 7.7 los resultados mantienen la misma tendencia a pesar de haber empleado diferentes técnicas para determinar la actividad de interés. **MLB13** es el compuesto con menor actividad inhibitoria, mientras que el profármaco **LCAC137** muestra mayor eficacia que **MLB13** e incluso que Cisplatino en los ensayos con MTT y rojo neutro. Los tres ensayos evidencian que en esta línea celular el profármaco es más activo que el compuesto original **MLB13**.

El ensayo para evaluar la citotoxicidad de los compuestos en células no cancerosas se realizó mediante los ensayos de reducción de MTT y Resazurina. Los resultados obtenidos mediante ambas técnicas se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 7.8. Valores de CI_{50} de los compuestos **MLB13** y **LCAC137** evaluados en la línea celular J774 a 24 horas mediante los ensayos de MTT y Resazurina.

Compuesto	CI_{50} (μM)	
	MTT	Resazurina
MLB13	0.8311	0.0235
LCAC137	0.9163	0.9006
Cisplatino	7.4	8.2

El estudio de la reducción de resazurina permite monitorear la citotoxicidad de los compuestos mediante la transformación de la resazurina (azul, no fluorescente) a resofurina (rosado, fluorescente), la cual es llevada a cabo por oxidoreductasas que se encuentran principalmente en la mitocondria de células viables.

Los resultados de los dos ensayos en la línea celular J774, reflejaron una tendencia similar. Ambos compuestos mostraron ser más citotóxicos que el fármaco de referencia Cisplatino, sin embargo, **MLB13** resultó ligeramente más citotóxico que el profármaco **LCAC137** en ambos ensayos.

Finalmente, con los ensayos llevados a cabo hasta el momento, se ha observado que tanto **MLB13** como **LCAC137** pueden afectar la viabilidad de células cancerosas, un compuesto más que el otro dependiendo del tipo de célula. Estos datos colocan a los compuestos como estructuras prototipos para posteriores estudios de optimización.

7.3. Parte computacional

Con esta herramienta de la química farmacéutica se buscó explorar un poco acerca del comportamiento metabólico que tendrá el profármaco **LCAC137** frente a una enzima hidrolítica, específicamente la enzima hCE1.

7.3.1. Hidrólisis de los profármacos

El requisito principal para que el compuesto sintetizado **LCAC137** pueda considerarse como profármaco, es que debe hidrolizarse *in vivo*. Este proceso puede ocurrir por medios químicos o enzimáticos. El estudio de acoplamiento molecular realizado permite tener una estimación de la factibilidad de hidrólisis vía enzimática con base a la estabilidad del complejo ligando-receptor formado, así como la orientación y conformación que se calcule en el sitio catalítico.

Para realizar el estudio se seleccionó la enzima hCE1 debido a que es una de las principales enzimas encargadas de hidrolizar fármacos y xenobióticos en general, a la fecha se encuentran reportados varios profármacos que son activados principalmente por hCE1. Los resultados que se generaron después del acoplamiento molecular se muestran en la Tabla 7.9.

Tabla 7.9. Resultados del acoplamiento molecular con la carboxilesterasa humana 1.

Compuesto	Docking Score (Kcal/mol)	kI (μM)
LCAC137	-7.99	1.39
Tacrina	-6.55	15.85
Oseltamivir	-7.87	1.71

Los resultados anteriores sugieren que **LCAC137** genera un complejo enzima-sustrato energéticamente favorable con el sitio catalítico de hCE1 al tener un valor negativo de energía de unión, por lo que presuntamente se puede pensar que se metaboliza por dicha enzima.

Se decidió realizar el acoplamiento molecular de oseltamivir, ya que es un profármaco antiviral del cual se ha demostrado experimentalmente que es activado en su mayor parte por la enzima hCE1, y entonces puede servir de referencia¹⁰⁹. **LCAC137** tuvo un valor de energía de unión similar e incluso un poco más negativo que el de oseltamivir y ambos tuvieron valores de kI similares y bajos, con lo que se puede proponer que ambas moléculas tienen alta afinidad por el sitio catalítico de la enzima y que al tener entre ambos profármacos estos parámetros tan similares, muy probablemente **LCAC137** sea hidrolizado tan eficazmente por hCE1 como sucede con oseltamivir.

El acoplamiento con tacrina se realizó para validar el estudio y también para tener otro ligando de hCE1 como referencia. Esta molécula no actúa como sustrato, sin embargo, es un ligando que ya venía en el sitio activo de la enzima cristalizada. Tacrina tuvo un valor de energía de unión menos negativa y un valor de kI más alto que la de los profármacos, por lo que se puede argumentar que **LCAC137** y Oseltamivir pudieran presentar todavía mayor

afinidad por la enzima, que la que presenta este ligando ya reportado en la estructura cristalográfica.

Igualmente es importante analizar la orientación que adquiere el profármaco en el sitio catalítico, puesto que debe encontrarse en la distancia y orientación adecuada para sufrir el ataque por parte de la Ser221. En la Figura 7.26 se muestra la orientación y conformación que **LCAC137** adquiere en el sitio catalítico. Se puede observar la estabilización por la formación de siete interacciones intermoleculares, cuatro entre los hidrógenos de los metilos y metilenos provenientes de la parte del aminoácido del profármaco y el azufre de los aminoácidos Met425 y Met364, uno entre el oxígeno de la amida y el hidrógeno de la Gly143, uno entre el amino de la posición 2 de la quinazolina y Ala093 y otro entre el amino de la posición 4 de la quinazolina y Leu363. Para establecer la hidrólisis hipotética del éster, es importante la cercanía y factibilidad de ataque por parte de Ser221 para desencadenar el mecanismo catalítico de dos pasos que se mencionó en los antecedentes. En varios trabajos acerca de la hidrólisis de ésteres por hCE1 y en estructuras cristalográficas, la distancia entre el carbonilo y el hidroxilo de la Ser221 oscila entre 2.8 y 7.1 Å¹¹⁰. Con base en ello es muy probable que **LCAC137** sea hidrolizado por la enzima dando paso a la liberación del compuesto activo, ya que la distancia entre estos átomos es de 5.61 Å según el estudio realizado. Al observar la distancia de 7.98 Å que hay entre los átomos de interés para que se lleve a cabo la hidrólisis del profármaco Oseltamivir y comparándola con la de **LCAC137**, se sugiere que el profármaco sintetizado tiene muy altas probabilidades de ser hidrolizado por hCE1 como sucede realmente con Oseltamivir (Figura 7.27).

Para validar el estudio de acoplamiento molecular realizado, se utilizó el ligando tacrina que ya venía en la estructura cristalizada de la proteína y el modo de unión de tacrina calculado en AutoDock 4.2.6. Ambos se colocaron en el sitio activo de hCE1 para su visualización y se calculó el RMSD en la plataforma de DockRMSD en línea (Figura 7.28)¹¹¹. El valor de RMSD es un parámetro utilizado para estudiar el grado de divergencia de estructuras alineadas y en este caso se esperaba que fuera menor a 2.0 Å para la correcta validación del estudio, lo cual no sucedió. Esto se puede justificar a partir de que se ha visto que hCE1 mantiene cierta promiscuidad de unión al ligando debido a que su sitio activo es muy grande y flexible, entonces es capaz de permitir que los compuestos se acoplen en varias orientaciones diferentes a la vez¹¹². Al ser tacrina una molécula pequeña, pseudo-simétrica y el sitio de unión grande, hay gran oportunidad de que la predicción de este ligando en el acoplamiento molecular no concuerde al nivel de precisión esperado, ya que realmente la molécula puede acomodarse en diferentes orientaciones y seguir siendo reconocida. A pesar de que el estudio realizado no cumple con el criterio de aceptación para un modelo de buena precisión, ha permitido darnos idea de lo que puede llegar a suceder con **LCAC137**.

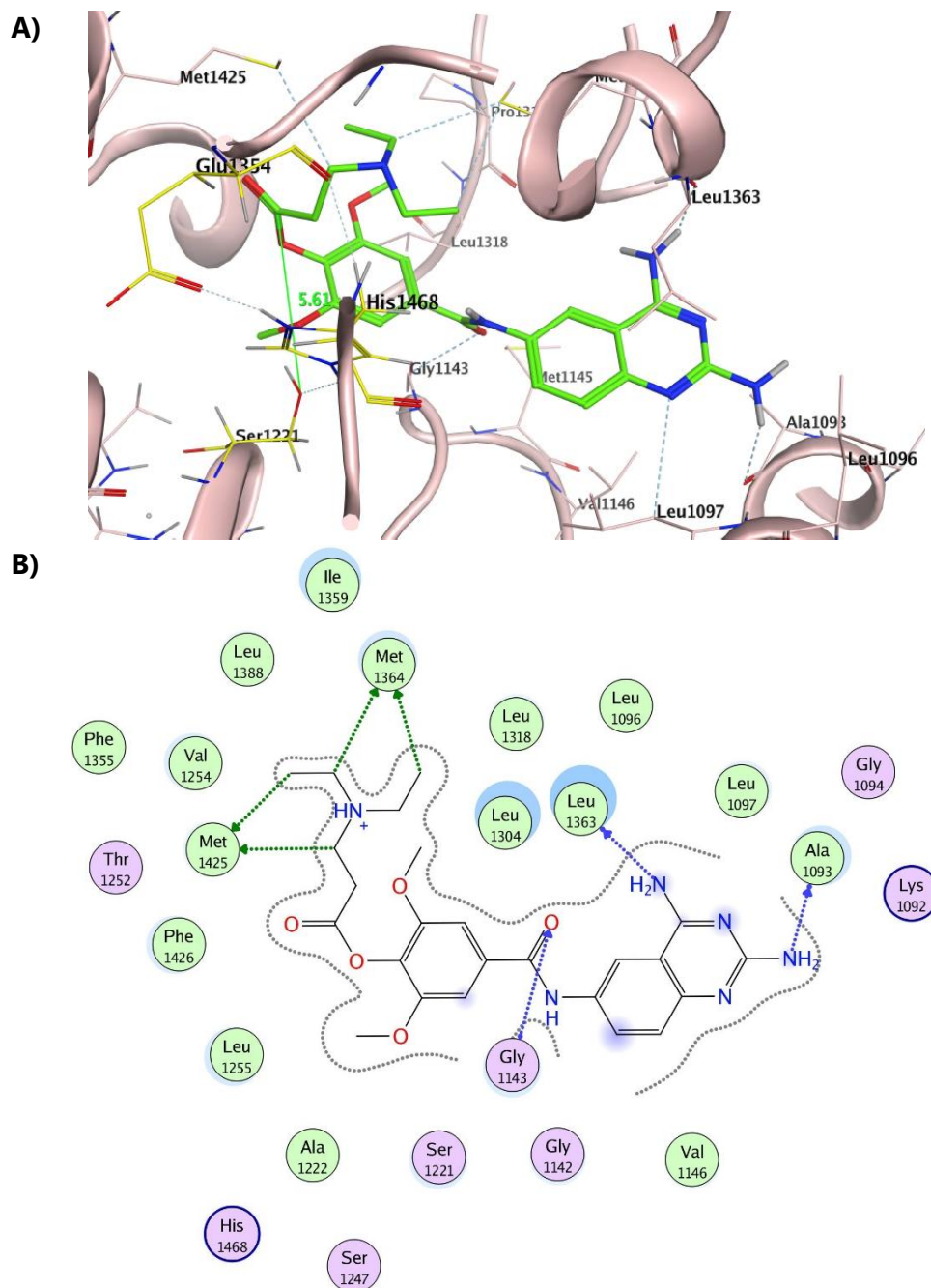


Figura 7.26. A) Visualización 3D de las interacciones principales de **LCAC137** con el sitio catalítico de hCE1. Los aminoácidos en amarillo pertenecen a la triada catalítica. Los aminoácidos en rosa son parte de la cavidad grande del sitio catalítico. Las líneas punteadas indican los puentes de hidrógeno que estabilizan a la molécula y la línea verde indica la distancia entre el hidroxilo de la Ser221 y el carbonilo del éster. B) Visualización 2D de las interacciones principales de **LCAC137** con el sitio catalítico de hCE1.

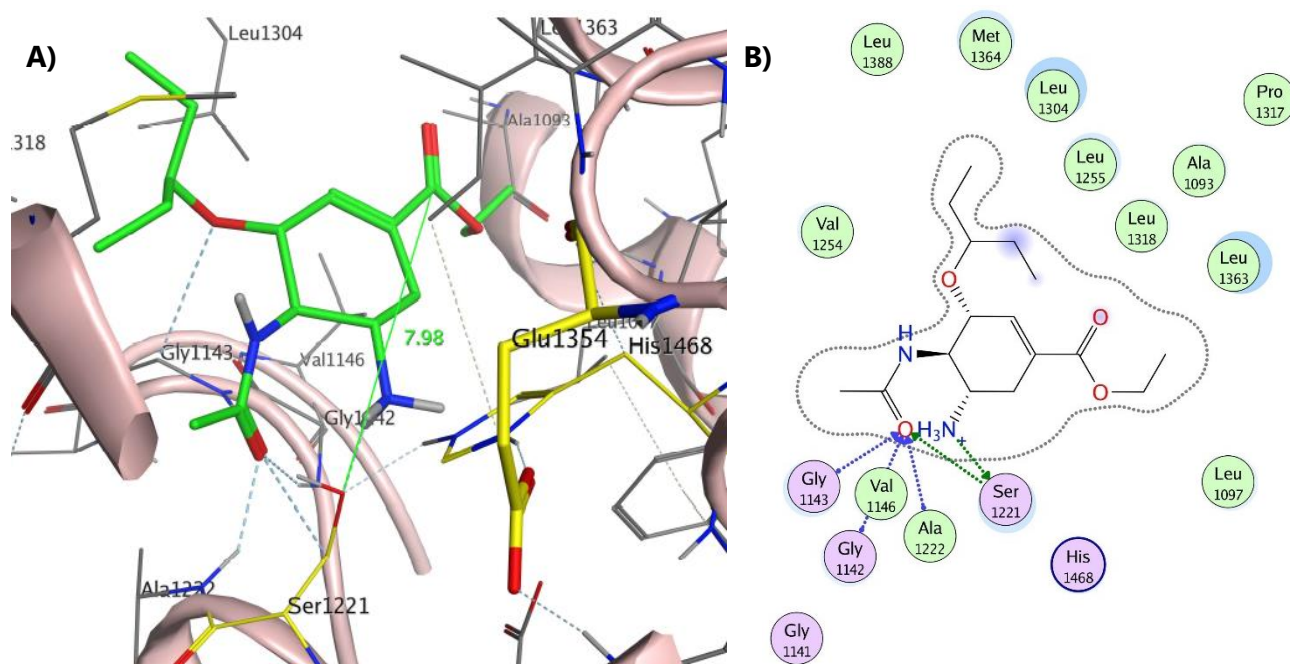


Figura 7.27. A) Visualización 3D de las interacciones principales de oseltamivir con el sitio catalítico de hCE1. Los aminoácidos en amarillo pertenecen a la triada catalítica. Los aminoácidos en rosa son parte de la cavidad grande del sitio catalítico. Las líneas punteadas indican los puentes de hidrógeno que estabilizan a la molécula y la línea verde indica la distancia entre el hidroxilo de la Ser221 y el carbonilo del éster. B) Visualización 2D de las interacciones principales de oseltamivir con el sitio catalítico de hCE1.

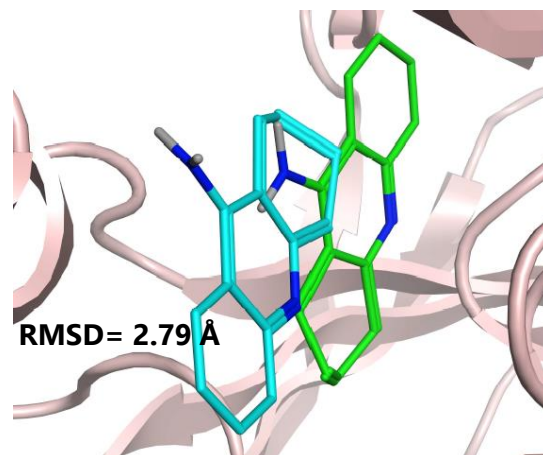


Figura 7.28. Superposición de dos moléculas del ligando tacrina en el sitio activo de hCE1. En color verde se muestra la estructura cristalográfica y en azul la conformación calculada en el estudio de acoplamiento molecular.

8. CONCLUSIONES

Se logró sintetizar el derivado de quinazolina-2,4,6-triamina **MLB13** mediante las rutas de síntesis B y C propuestas con rendimientos globales de 40% y 39% respectivamente, de las cuales la ruta C permitió sintetizar el compuesto mediante un menor número de reacciones y con menor número de impurezas las cuales no eran difíciles de separar del compuesto de interés.

Con la ruta de síntesis C, se obtuvieron más de 500 mg del compuesto **MLB13** con un buen grado de pureza determinado mediante cromatografía en capa fina, el cual posteriormente fue utilizado como materia prima para la síntesis de su profármaco.

Mediante diferentes condiciones de reacción probadas, se lograron las más adecuadas para obtener el profármaco **LCAC137** a través de la esterificación de un aminoácido con el grupo hidroxilo del derivado **MLB13**, aunque este se sintetizó con un bajo rendimiento debido a la poca reactividad que ofrece el derivado de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il) carboxamida en su porción fenólica.

Por medio de la caracterización espectroscópica y espectrométrica de los compuestos sintetizados, se confirmó la obtención de **MLB13** y su profármaco **LCAC137**.

En el estudio para determinar la actividad inhibitoria de la viabilidad celular de **MLB13** y **LCAC137** en células cancerosas, se observó que ambos compuestos afectaron el crecimiento de la línea celular MCF-7 de cáncer de mama y HeLa de cáncer cervicouterino, lo cual sugiere que estos compuestos podrían ser útiles en el tratamiento del cáncer.

La adición del aminoácido *N,N*-dietil-beta-alanina a la estructura de **MLB13** mediante un enlace tipo éster, resultó favorable en el caso de la línea celular MCF-7 ya que la actividad inhibitoria del profármaco **LCAC137** mejoró respecto a la de la estructura original e incluso resultó ser un compuesto más potente que el fármaco de referencia Cisplatino.

MLB13 y **LCAC137** mostraron la desventaja de ser más citotóxicos que el fármaco Cisplatino en el ensayo con células no cancerosas J774.

Se anticipa que la molécula **LCAC137** sintetizada pueda actuar como profármaco al ser sustrato de la enzima carboxilesterasa humana 1 (hCE1), de acuerdo a los resultados obtenidos en el estudio de acoplamiento molecular, aunque no se rechaza la posible hidrólisis por otras enzimas como la acetilcolinesterasa o la carboxilesterasa intestinal, enzimas que también se encargan de metabolizar una gran cantidad de xenobióticos sin aparente especificidad.

9. PERSPECTIVAS

El trabajo desarrollado es solamente una parte de la investigación emprendida por nuestro grupo en la búsqueda de nuevos derivados de quinazolina-2,4,6-triamina con potencial actividad citotóxica. En cuanto a este proyecto faltaría llevar a cabo la síntesis de otros profármacos con otro tipo de aminoácidos actuando como modificadores, para tener conocimiento de si estos afectan de forma variable la solubilidad del compuesto y la actividad que presenten en líneas de células cancerosas.

Debido al bajo rendimiento con el que se obtuvo el profármaco **LCAC137** es necesario encontrar nuevas condiciones de reacción que permitan mejorar su obtención y así contar con más del compuesto para futuras evaluaciones.

Es necesario evaluar el efecto citotóxico de los compuestos en otras líneas celulares de cáncer.

Queda pendiente evaluar los compuestos en combinación con el fármaco cisplatino para observar si ocasionan algún efecto aditivo o sinérgico en la viabilidad celular.

Determinar mediante técnicas de microscopía confocal si la actividad inhibitoria de la viabilidad celular del profármaco está relacionada con la interrupción en la red del citoesqueleto, disminución de la función mitocondrial o daño al ADN.

El estudio de acoplamiento molecular no pudo validarse eficientemente debido a que el valor de RMSD obtenido no fue menor a 2.0 Å. Se puede llevar a cabo el mismo estudio utilizando una estructura cristalográfica de la misma enzima en complejo con un ligando diferente al de tacrina. También se puede utilizar un software distinto para realizar el mismo estudio o incluso cambiar la enzima por alguna otra esterasa reportada para la hidrólisis de fármacos.

También queda pendiente realizar estudios de estabilidad química y enzimática a **LCAC137** para saber si actúa de acuerdo a lo que se espera de un profármaco y si coincide con lo predicho teóricamente.

10. REFERENCIAS

- (1) What Is Cancer? <https://www.cancer.org/cancer/cancer-basics/what-is-cancer.html> (consultado Feb 23, 2020).
- (2) Boticario Boticario, C.; Cascales Angosto, M. *Innovaciones En Cáncer*; Universidad Nacional de Educación a Distancia: Madrid, 2012.
- (3) What Is Cancer? | SEER Training <https://training.seer.cancer.gov/disease/cancer/> (consultado Feb 23, 2020).
- (4) Fernandez Bayo, I.; Timón, A.; Méndez, T. *Breve Manual de Oncología Para Informadores de La Salud*; Centro de Investigación del Cáncer: Toledo, 2006.
- (5) ¿Qué es el cáncer y cómo se desarrolla? - SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica © 2019 <https://seom.org/informacion-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer-y-como-se-desarrolla> (consultado Feb 23, 2020).
- (6) Schmitt, C. A. Senescence, Apoptosis and Therapy - Cutting the Lifelines of Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3* (4), 286–295. <https://doi.org/10.1038/nrc1044>.
- (7) Cancer Overview | The University of Kansas Cancer Center <https://www.kucancercenter.org/patients-caregivers/cancer-education/cancer-overview> (consultado Feb 23, 2020).
- (8) Kasper, D.; Fauci, A.; Hauser, S.; Longo, D.; Jameson, J. L.; Loscalzo, J. Capítulo 102e: Biología de La Célula Cancerosa. In *Harrison. Principios de Medicina Interna*; McGraw-Hill: Madrid, 2016; pp 1–45.
- (9) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **2000**, *100* (1), 57–70. <https://doi.org/10.1007/s00262-010-0968-0>.
- (10) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The next Generation. *Cell* **2011**, *144* (5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- (11) Cancer <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (consultado Feb 23, 2020).
- (12) Cancer Today <http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie> (consultado Feb 23, 2020).
- (13) PREVENCIÓN Y DIAGNÓSTICO OPORTUNO EN CÁNCER https://www.smeo.org.mx/descargables/COPREDOC_GUIA.pdf (consultado Feb 23, 2020).
- (14) Juntos Contra el Cáncer – PANORAMA DEL CÁNCER EN MÉXICO <https://juntoscontraelcancer.mx/panorama-del-cancer-en-mexico/> (consultado Feb 23, 2020).
- (15) Cooper, G. M.; Hausman, R. E. Cancer. In *The cell A Molecular Approach*; Associates, S., Ed.; Sinauer Associates: Washington, 2007; pp 719–760.
- (16) Granados García, M.; Herrera Gómez, Á. *Manual de Oncología. Procedimientos Médico Quirúrgicos*; McGraw Hill: México, 2010.
- (17) Maru, G. B.; Kumar, G.; Ghantasala, S.; Tajpara, P. Polyphenol-Mediated In Vivo Cellular Responses during Carcinogenesis. In *Polyphenols in Human Health and Disease*; Watson, R. R., Preedy, V. R., Zibadi, S., Eds.; Elsevier Inc: San Diego, 2014; Vol. 2, pp 1141–1179. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398456-2.00088-8>.
- (18) Malarkey, D. E.; Maronpot, R. R. Carcinogenesis. In *Encyclopedia of Toxicology*; Elsevier Inc.: New York, 2005; pp 445–466.
- (19) Chaffer, C. L.; Weinberg, R. A. A Perspective on Cancer Cell Metastasis. *Science* **2011**, *331* (6024), 1559–1564. <https://doi.org/10.1126/science.1203543>.
- (20) Definición de metástasis - Diccionario de cáncer - National Cancer Institute <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/metastasis> (consultado Feb 23, 2020).

- (21) Seyfried, T. N.; Huysentruyt, L. C. On the Origin of Cancer Metastasis. *Crit Rev Oncog* **2013**, *18* (1–2), 43–73. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>.
- (22) Bast, R. C.; Kufe, D. W.; Pollock, R. E.; R. Weichselbaum, R.; Holland, J. F.; Frei, E. Treatment of Metastatic Disease. In *Holland-Frei Cancer Medicine*, B.C. Decker: Hamilton, 2003; pp 1917–1918.
- (23) What is Metastasis? | Cancer.Net <https://www.cancer.net/navigating-cancer-care/cancer-basics/what-metastasis> (consultado Aug 2, 2020).
- (24) Wang, R.; Zhu, Y.; Liu, X.; Liao, X.; He, J.; Niu, L. The Clinicopathological Features and Survival Outcomes of Patients with Different Metastatic Sites in Stage IV Breast Cancer. *BMC Cancer* **2019**, *19* (1091), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6311-z>.
- (25) Iizumi, M.; Liu, W.; Pai, S. K.; Furuta, E.; Watabe, K. Drug Development against Metastasis-Related Genes and Their Pathways: A Rationale for Cancer Therapy. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1786* (2), 87–104. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2008.07.002>.
- (26) Arem, H.; Loftfield, E. Cancer Epidemiology: A Survey of Modifiable Risk Factors for Prevention and Survivorship. *Am. J. Lifestyle Med.* **2018**, *12* (3), 200–210. <https://doi.org/10.1177/1559827617700600>.
- (27) Baena Ruiz, R.; Salinas Hernández, P. Diet and Cancer: Risk Factors and Epidemiological Evidence. *Maturitas* **2014**, *77* (3), 202–208. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2013.11.010>.
- (28) Frank A. Sloan and Hellen Gelband, E. *Cancer Control Opportunities in Low- and Middle-Income Countries*, Sloan, F. A., Gelband, H., Eds.; The National Academies Press: Washington, DC, 2005.
- (29) Nelson, D. E.; Jarman, D. W.; Rehm, J.; Greenfield, T. K.; Rey, G.; Kerr, W. C.; Miller, P.; Shield, K. D.; Ye, Y.; Naimi, T. S. Alcohol-Attributable Cancer Deaths and Years of Potential Life Lost in the United States. *Am. J. Public Health* **2013**, *103* (4), 641–648. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2012.301199>.
- (30) Othman, N. H. Honey and Cancer: Sustainable Inverse Relationship Particularly for Developing Nations-a Review. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2012**, *2012* (1), 1–10. <https://doi.org/10.1155/2012/410406>.
- (31) Cancer Classification | SEER Training <https://training.seer.cancer.gov/disease/categories/classification.html> (consultado Feb 23, 2020).
- (32) Types of cancer | Cancer Research UK <https://www.cancerresearchuk.org/what-is-cancer/how-cancer-starts/types-of-cancer> (consultado Feb 23, 2020).
- (33) Matasar, M. J.; Zelenetz, A. D. Overview of Lymphoma Diagnosis and Management. *Radiol. Clin. North Am.* **2008**, *46* (2), 175–198. <https://doi.org/10.1016/j.rcl.2008.03.005>.
- (34) Nabors, L. B.; Ammirati, M.; Bierman, P. J.; Brem, H.; Butowski, N.; Chamberlain, M. C.; Deangelis, L. M.; Robert, A.; Friedman, A.; Gilbert, M. R.; et al. Central Nervous System Cancers: Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw.* **2013**, *11* (9), 1114–1151.
- (35) Bidram, E.; Esmaeili, Y.; Ranji-Burachaloo, H.; Al-Zaubai, N.; Zarrabi, A.; Stewart, A.; Dunstan, D. E. A Concise Review on Cancer Treatment Methods and Delivery Systems. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2019**, *54* (1), 1–28. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101350>.
- (36) Treatment for cancer | Cancer in general | Cancer Research UK <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/cancer-in-general/treatment> (consultado Feb 23, 2020).
- (37) Abbas, Z.; Rehman, S. An Overview of Cancer Treatment Modalities. In *Neoplasms*, Shahzad, H. N., Ed.; London, 2018; pp 139–157. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76558>.

- (38) Bellmunt, J.; Powles, T.; Vogelzang, N. J. A Review on the Evolution of PD-1/PD-L1 Immunotherapy for Bladder Cancer: The Future Is Now. *Cancer Treat. Rev.* **2017**, *54* (1), 58–67. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2017.01.007>.
- (39) Hormone Therapy for Cancer - National Cancer Institute <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/hormone-therapy> (consultado Feb 23, 2020).
- (40) Qué es la terapia dirigida | Cancer.Net <https://www.cancer.net/es/desplazarse-por-atención-del-cáncer/cómo-se-trata-el-cáncer/qué-es-la-terapia-dirigida> (consultado Aug 3, 2020).
- (41) Bhosle, J.; Hall, G. Principles of Cancer Treatment by Chemotherapy. *Surgery* **2009**, *27* (4), 173–177. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2017.12.002>.
- (42) Dickens, E.; Ahmed, S. Principles of Cancer Treatment by Chemotherapy. *Surgery* **2017**, *36* (3), 134–138. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2017.12.002>.
- (43) DeVita, V. T.; Hellman, S.; Rosenberg, S. A. *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, 2001.
- (44) Sekar, T. V.; Paulmurugan, R. Bioluminescence Imaging of Cancer Therapy. In *Molecular Imaging*, California, 2014; pp 69–93.
- (45) Chakraborty, S.; Rahman, T. The Difficulties in Cancer Treatment. *e cancer* **2012**, *6* (16), 1–5. <https://doi.org/10.3332/ecancer.2012.ed16>.
- (46) Mandal, R.; Bhurtel, R. Knowledge on Management of Chemotherapy Related Side - Effects Among Cancer Patients. *Int. J. Nurs. Res. Pract.* **2017**, *4* (2), 10–15.
- (47) Medina Villaseñor, E. A.; Martínez Macías, R. *Fundamentos de Oncología*, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM: Ciudad de México, 2009.
- (48) Pan, S. T.; Li, Z. L.; He, Z. X.; Qiu, J. X.; Zhou, S. F. Molecular Mechanisms for Tumour Resistance to Chemotherapy. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2016**, *43* (8), 723–737. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12581>.
- (49) Alfaroouk, K. O.; Stock, C. M.; Taylor, S.; Walsh, M.; Muddathir, A. K.; Verduzco, D.; Bashir, A. H. H.; Mohammed, O. Y.; Elhassan, G. O.; Harguindey, S.; et al. Resistance to Cancer Chemotherapy : Failure in Drug Response from ADME to P - Gp. *Cancer Cell Int* **2015**, *15* (71), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12935-015-0221-1>.
- (50) Bertino, J. R.; Göker, E.; Gorlick, R.; Li, W. W.; Banerjee, D. Resistance Mechanisms to Methotrexate in Tumors. *Oncologist* **1996**, *1* (4), 223–226. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.1-4-223>.
- (51) Nikaljea, A. P.; Bahetia, K. Computer Based Drug Design of Various Heterocyclic Compounds Having Anticancer Activity: A Brief Review. *J Bioinform Genomics Proteomics* **2017**, *2* (1), 1–13.
- (52) Matus-Meza, A. S.; Velasco-Velázquez, M. A.; Hernández-Luis, F. Design , Synthesis and Cytotoxic Evaluation of Quinazoline-2,4,6-Triamine and 2,6-Diaminoquinazolin-4(3H)-One Derivatives. *Med. Chem. Res.* **2018**, *27* (1), 1748–1756.
- (53) Ajani, O. O.; Aderohunmu, D. V.; Umeokoro, E. N.; Olomieja, A. O. Quinazoline Pharmacophore in Therapeutic Medicine. *Bangladesh J Pharmacol* **2016**, *11* (3), 716–733. <https://doi.org/10.3329/bjp.v11i3.25731>.
- (54) Venkata, B.; Kumar, S.; Dashrath, S.; Vinod, R. Synthesis and Anti-Bacterial Activity of Some Novel 2,3-Disubstituted Quinazolin-4(3h)-Ones. *Int. J. Chem. Sci.* **2008**, *6* (3), 1196–1201. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2006.01.006>.
- (55) Patel, N. B.; Patel, J. C. Synthesis and Antimicrobial Activity of Schiff Bases and 2-Azetidinones Derived from Quinazolin-4(3H)-One. *Arab. J. Chem.* **2011**, *4* (4), 403–411. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2010.07.005>.
- (56) Kumar, A.; Rajput, C. S.; Bhati, S. K. Synthesis of 3-[4'-(p-Chlorophenyl)-Thiazol-2'-Yl]-2-

- [(Substituted Azetidinone/Thiazolidinone)-Aminomethyl]-6-Bromoquinazolin-4-Ones as Anti-Inflammatory Agent. *Bioorganic Med. Chem.* **2007**, *15* (8), 3089–3096. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.01.042>.
- (57) Aly, M. M.; Mohamed, Y. A.; El-Bayouki, K. A. M.; Basyouni, W. M.; Abbas, S. Y. Synthesis of Some New 4(3H)-Quinazolinone-2-Carboxaldehyde Thiosemicarbazones and Their Metal Complexes and a Study on Their Anticonvulsant, Analgesic, Cytotoxic and Antimicrobial Activities - Part-1. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45* (8), 3365–3373. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.04.020>.
- (58) Davoll, J.; Johnson, A. M. Quinazoline Analogues of Folic Acid. *J. Chem. Soc.* **1970**, *8*, 997–1002. <https://doi.org/10.1039/j39700000997>.
- (59) Davoll, J.; Clarke, J.; Elslager, E. F. Folate Antagonists. 4. Antimalarial and Antimetabolite Effects of 2,4-Diamino-6- [(Benzyl)Amino] Pyrido [2,3-d] - Pyrimidines. *J. Med. Chem.* **1972**, *15* (8), 837–839. <https://doi.org/10.1021/jm00278a009>.
- (60) Davoll, J.; Johnson, A. M.; Davies, H. J.; Bird, O. D.; Clarke, J.; Elslager, E. F. Folate Antagonists. 2. 2,4-Diamino-6- ([Aralkyl and (Heterocyclic)Methyl] Amino)Quinazolines, a Novel Class of Antimetabolites of Interest in Drug-Resistant Malaria and Chagas' Disease. *J. Med. Chem.* **1972**, *15* (8), 812–826. <https://doi.org/10.1021/jm00278a007>.
- (61) Berman, J. D.; King, M.; Edwards, N. Antileishmanial Activities of 2,4-Diaminoquinazoline Putative Dihydrofolate Reductase Inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1989**, *33* (11), 1860–1863. https://doi.org/10.1007/978-3-642-69254-3_5.
- (62) Gangjee, A.; Vidwans, A. P.; Vasudevan, A.; Queener, S. F.; Kisliuk, R. L.; Cody, V.; Li, R.; Galitsky, N.; Luft, J. R.; Pangborn, W. Structure-Based Design and Synthesis of Lipophilic 2,4-Diamino-6- Substituted Quinazolines and Their Evaluation as Inhibitors of Dihydrofolate Reductases and Potential Antitumor Agents. *J. Med. Chem.* **1998**, *41* (18), 3426–3434. <https://doi.org/10.1021/jm980081y>.
- (63) Matus Meza, A. S. (2013). Síntesis de derivados de la 2,3,6-triaminoquinazolina como posibles agentes antiparasitarios (Tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. de México.
- (64) Mendoza Martínez, C.; Correa Basurto, J.; Nieto Meneses, R.; Márquez Navarro, A.; Suárez, R. A.; Montero Cortes, M. D.; Noguera Torres, B.; Suárez Contreras, E.; Galindo Sevilla, N.; Rojas Rojas, Á.; et al. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Quinazoline Derivatives as Anti-Trypanosomatid and Anti-Plasmodial Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *96*, 296–307. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.09.072>.
- (65) Herrera Vázquez, F. S. (2019). Diseño, síntesis y evaluación biológica de un set de quinazolinas como potenciales inhibidores de tubulina (Tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. de México.
- (66) Rosales Zariñana, V. A. (2015). Síntesis de derivados de quinazolina con potencial actividad citotóxica (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. de México.
- (67) Lopez Sánchez, M. A. (2015). Síntesis de derivados de quinazolin-2,4,6-triamina para evaluar su potencial actividad antioxidante (Tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. de México.
- (68) Hernández Cruz, E. Y. (2016). Efecto genotóxico y citotóxico de nuevos compuestos quinolínicos (quinazolinas MLB01, MLB02 y MLB13) en sangre periférica de ratones: micronúcleos, apoptosis y viabilidad celular (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. de México.
- (69) Olguin Galindo, J. C. (2017). Efecto de nuevos compuestos quinolínicos (quinazolinas MLB02 y MLB13) sobre el daño genotóxico y citotóxico inducido por compuestos metálicos de

- cromo hexavalente en ratones Hsd:ICR (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. de México.
- (70) Savjani, K. T.; Gajjar, A. K.; Savjani, J. K. Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques. *ISRN Pharm.* **2012**, *2012*, 1–10. <https://doi.org/10.5402/2012/195727>.
- (71) Lipinski, C. Poor Aqueous Solubility - An Industry Wide Problem in Drug Discovery. *Am. Pharm. Rev.* **2002**, *5* (3), 82–85.
- (72) Stella, V. J.; Nti-Addae, K. W. Prodrug Strategies to Overcome Poor Water Solubility. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, *59* (7), 677–694. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.05.013>.
- (73) Jana, S.; Mandlekar, S.; Marathe, P. Prodrug Design to Improve Pharmacokinetic and Drug Delivery Properties: Challenges to the Discovery Scientists. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17* (32), 3874–3908. <https://doi.org/10.2174/092986710793205426>.
- (74) Rautio, J.; Kumpulainen, H.; Heimbach, T.; Oliyai, R.; Oh, D.; Järvinen, T.; Savolainen, J. Prodrugs: Design and Clinical Applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7* (3), 255–270. <https://doi.org/10.1038/nrd2468>.
- (75) Vig, B. S.; Huttunen, K. M.; Laine, K.; Rautio, J. Amino Acids as Promoieties in Prodrug Design and Development. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65* (10), 1370–1385. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.10.001>.
- (76) Abet, V.; Filace, F.; Recio, J.; Alvarez-Builla, J.; Burgos, C. Prodrug Approach: An Overview of Recent Cases. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *127*, 810–827. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.10.061>.
- (77) Burgos, C.; Cuadro, A. M.; Alvarez-Builla, J. Profármacos, Ejemplos Seleccionados Del Mercado Español I. Profármacos Unidos a Transportador. *An. Quim.* **2019**, *115* (3), 209–217.
- (78) Rathore, M. ; Kumar, S. Prodrug Design and Development for Improved Bioavailability across Biological Barriers. *Ijppr.Human* **2016**, *7* (2), 187–220.
- (79) Leppänen, J.; Huuskonen, J.; Nevalainen, T.; Gynther, J.; Taipale, H.; Ja, T. Design and Synthesis of a Novel L-Dopa-Entacapone Codrug. *J. Med. Chem.* **2002**, *45* (6), 1379–1382.
- (80) Vale, N.; Ferreira, A.; Matos, J.; Fresco, P.; Gouveia, M. J. Amino Acids in the Development of Prodrugs. *Molecules* **2018**, *23* (9), 1–61. <https://doi.org/10.3390/molecules23092318>.
- (81) Sinko, P. J.; Balimane, P. V. Carrier-Mediated Intestinal Absorption of Valacyclovir, the L-Valyl Ester Prodrug of Acyclovir: 1. Interactions with Peptides, Organic Anions and Organic Cations in Rats. *Biopharm. Drug Dispos.* **1998**, *19* (4), 209–217. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-081X\(199805\)19:4<209::AID-BDD93>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-081X(199805)19:4<209::AID-BDD93>3.0.CO;2-O).
- (82) Scorr, L. M.; Factor, S. A. VMAT2 Inhibitors for the Treatment of Tardive Dyskinesia. *J. Neurol. Sci.* **2018**, *389* (1), 43–47. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2018.02.006>.
- (83) Müller, T. Valbenazine Granted Breakthrough Drug Status for Treating Tardive Dyskinesia. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2015**, *24* (6), 737–742. <https://doi.org/10.1517/13543784.2015.1029573>.
- (84) Vig, B.; Rautio, J. Amino Acid Prodrugs for Oral Delivery: Challenges and Opportunities. *Ther. Deliv.* **2011**, *2* (8), 959–962. <https://doi.org/10.4155/tde.11.75>.
- (85) Han, X.; Sun, J.; Wang, Y.; He, Z. PepT1, ASBT-Linked Prodrug Strategy to Improve Oral Bioavailability and Tissue Targeting Distribution. *Curr. Drug Metab.* **2015**, *16* (1), 71–83. <https://doi.org/10.2174/1389200216666150401110754>.
- (86) Anand, B. S.; Dey, S.; Mitra, A. K. Current Prodrug Strategies via Membrane Transporters/Receptors. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2002**, *2* (6), 607–620. <https://doi.org/10.1517/14712598.2.6.607>.
- (87) Psimadas, D.; Georgoulas, P.; Valotassiou, V.; Loudos, G. Enzymes Involved in the Bioconversion of Ester-Based Prodrugs. *J. Pharm. Sci.* **2012**, *101* (7), 2271–2280.

- <https://doi.org/10.1002/jps>.
- (88) Tatsuki F, T. Review The Emerging Role of Human Esterases. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **2012**, *27*(5), 466–477. <https://doi.org/10.2133/dmpk.DMPK-12-RV-042>.
- (89) Wang, D.; Zou, L.; Jin, Q.; Hou, J.; Ge, G.; Yang, L. Human Carboxylesterases : A Comprehensive Review. *Acta Pharm. Sin. B* **2018**, *8*(5), 699–712. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.05.005>.
- (90) Redinbo, M. R.; Bencharit, S.; Potter, P. M. Human Carboxylesterase 1 : From Drug Metabolism to Drug Discovery. *Biochem. Soc. Trans.* **2003**, *31* (Pt 3), 620–624.
- (91) Redinbo, M. R.; Potter, P. M. Mammalian Carboxylesterases : From Drug Targets to Protein Therapeutics. *Drug Discov Today.* **2005**, *10*(5), 313–325.
- (92) Mai, T. I. Review Human Carboxylesterase Isozymes : Catalytic Properties and Rational Drug Design. *Drug Metab. Pharmacokinet* **2006**, *21* (3), 173–185.
- (93) CES1 - Liver carboxylesterase 1 precursor - Homo sapiens (Human) - CES1 gene & protein <https://www.uniprot.org/uniprot/P23141> (consultado Feb 26, 2020).
- (94) Cabrera, S.; Díez-Torrubia, A. Profarmacos: Pasado, Presente Y Futuro. *An. Quím.* **2010**, *106* (3), 207–214.
- (95) Vaughan, R. A.; Gannon, N. P.; Garcia-Smith, R.; Licon-Munoz, Y.; Barberena, M. A.; Bisoffi, M.; Trujillo, K. A. B-Alanine Suppresses Malignant Breast Epithelial Cell Aggressiveness Through Alterations in Metabolism and Cellular Acidity in Vitro. *Mol. Cancer* **2014**, *13* (1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-13-14>.
- (96) Pandurangan, M.; Enkhtaivan, G.; Mistry, B.; Patel, R. V.; Moon, S.; Kim, D. H. β -Alanine Intercede Metabolic Recovery for Amelioration of Human Cervical and Renal Tumors. *Cross Mark* **2017**, *49* (8), 1373–1380. <https://doi.org/10.1007/s00726-017-2437-y>.
- (97) Rückle, T.; Dubray, B.; Hubler, F.; Mutter, M. Efficient One-Pot Synthesis of N-Ethyl Amino Acids. *J. Pept. Sci.* **1999**, *5* (1), 56–58.
- (98) Monteiro, L. S.; Kołomańska, J.; Suarez, A. C. Synthesis of Novel Nonproteinogenic Amino Acids: N-Ethyl- α,β - Dehydroamino Acid Methyl Esters. *European J. Org. Chem.* **2010**, *2010* (35), 6731–6735. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201001302>.
- (99) Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30* (16), 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc>.
- (100) Cosconati, S.; Forli, S.; Perryman, A. L.; Harris, R.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. Virtual Screening with AutoDock: Theory and Practice. *Expert Opin. Drug Discov.* **2010**, *5* (6), 597–607. <https://doi.org/10.1517/17460441.2010.484460>.
- (101) Mendoza Martínez, C. (2009). Síntesis, evaluación biológica y estudios in silico de moléculas diseñadas como híbridos contra Trypanosoma cruzi (Tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. de México.
- (102) Fang, Z.; Zhou, G. C.; Zheng, S. L.; He, G. L.; Li, J. L.; He, L.; Bei, D. Lithium Chloride-Catalyzed Selective Demethylation of Aryl Methyl Ethers under Microwave Irradiation. *J. Mol. Catal. A Chem.* **2007**, *274* (1–2), 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.molcata.2007.04.013>.
- (103) Furniss, B. S.; Hannaford, A. J.; Smith, P. W. G.; Tatchell, A. R. *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*, Longman Scientific & Technical: New York, 1989.
- (104) Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V.; Park, M.; Ox, A. Amide Bond Formation and Peptide Coupling. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827–10852. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2005.08.031>.
- (105) Tsakos, M.; Schaffert, E. S.; Clement, L. L.; Villadsen, N. L.; Poulsen, T. B. Ester Coupling Reactions-an Enduring Challenge in the Chemical Synthesis of Bioactive Natural Products. *Nat. Prod. Rep.* **2015**, *32* (4), 605–632. <https://doi.org/10.1039/c4np00106k>.

- (106) Medina Reyes, E. I.; Mancera Rodríguez, M. A.; Delgado Buenrostro, N. L.; Moreno Rodríguez, A.; Bautista Martínez, J. L.; Díaz Velásquez, C. E.; Martínez Alarcón, S. A.; Torrens, H.; Godínez Rodríguez, M. de los Á.; Terrazas Valdés, L. I.; et al. Novel Thiosemicarbazones Induce High Toxicity in Estrogen-Receptor-Positive Breast Cancer Cells (MCF7) and Exacerbate Cisplatin Effectiveness in Triple-Negative Breast (MDA-MB231) and Lung Adenocarcinoma (A549) Cells. *Invest. New Drugs* **2020**, *38* (3), 558–573. <https://doi.org/10.1007/s10637-019-00789-1>.
- (107) Arencibia Arrebola, D. F.; Rosario Fernández, L. A.; Curveco Sánchez, D. L. Principales Ensayos Para Determinar La Citotoxicidad de Una Sustancia, Algunas Consideraciones y Su Utilidad. *Rev Toxi* **2003**, 40–52.
- (108) Feoktistova, M.; Geserick, P.; Leverkus, M. Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2016**, *2016* (4), 343–346. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087379>.
- (109) Shi, D.; Yang, J.; Yang, D.; LeCluyse, E. L.; Black, C.; You, L.; Akhlaghi, F.; Yang, B. Response to Comments on “Anti-Influenza Prodrug Oseltamivir Is Activated by Carboxylesterase Human Carboxylesterase 1, and the Activation Is Inhibited by Antiplatelet Agent Clopidogrel” [3]. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2007**, *322* (1), 424–425. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.120030>.
- (110) Hatfield, M. J.; Tsurkan, L.; Hyatt, J. L.; Yu, X.; Edwards, C. C.; Hicks, L. D.; Wadkins, R. M.; Potter, P. M. Biochemical and Molecular Analysis of Carboxylesterase-Mediated Hydrolysis of Cocaine and Heroin. *Br. J. Pharmacol.* **2010**, *160* (8), 1916–1928. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00700.x>.
- (111) Bell, E. W.; Zhang, Y. DockRMSD: An Open-Source Tool for Atom Mapping and RMSD Calculation of Symmetric Molecules through Graph Isomorphism. *J. Cheminform.* **2019**, *11* (1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13321-019-0362-7>.
- (112) Bencharit, S.; Morton, C. L.; Hyatt, J. L.; Kuhn, P.; Danks, M. K.; Potter, P. M.; Redinbo, M. R. Crystal Structure of Human Carboxylesterase 1 Complexed with the Alzheimer’s Drug Tacrine: From Binding Promiscuity to Selective Inhibition. *Chem Biol* **2003**, *10* (4), 341–349. [https://doi.org/10.1016/s1074-5521\(03\)00071-1](https://doi.org/10.1016/s1074-5521(03)00071-1).

Información general de la síntesis y caracterización de los compuestos

La síntesis de los compuestos se realizó con disolventes y reactivos de las compañías Sigma Aldrich®, Meyer® y J.T.Baker® empleándose sin previo tratamiento.

Para pesar la cantidad requerida de reactivos, se usó la balanza analítica marca Sartorius™ modelo CP124 S y una balanza granataria Scout Pro Ohaus™.

Las reacciones se llevaron a cabo en las parrillas de agitación y calentamiento controlado de la marca IKA® modelos RET control-visc C, RCT basic, C-MAG HS 7 y RCT digital; y en un reactor de microondas marca Anton Paar® modelo Monowave 300 EXTRA, adaptado a un automuestreador modelo MAS 24. Las reacciones de hidrogenación catalítica se llevaron a cabo en el hidrogenador Paar™ 3916 EG, conectado a un tanque de hidrógeno del Grupo INFRA®.

El seguimiento de las reacciones se hizo mediante cromatografía en capa fina, mediante placas de aluminio recubiertas con gel de sílice de la marca Sorbtech™, usando los sistemas de elución de la Tabla 1 y fueron reveladas con una lámpara de luz ultravioleta Spectroline® modelo ENF-240C de onda corta (254nm) y larga (365nm), vapor de yodo o con una disolución de ninhidrina al 0.3% en BuOH.

Tabla 1. Sistemas de elución empleados

Sistema	Disolventes	Proporción
I	CHCl ₃ /MeOH	8:2
II	CHCl ₃ /MeOH/NH ₃	70:25:5

Para la cromatografía en columna se usó gel de sílice de tamaño de partícula 60 Å, gránulos de 150-250 µm, malla 60-100, de Sigma Aldrich®.

La destilación a presión reducida de los disolventes se llevó a cabo en el rotaevaporador de la marca IKA® modelo RV 10 digital, acoplado a una bomba de vacío marca Vacuubrand® modelo CVC 3000 y un refrigerante de espiral marca Brinkmann™.

La determinación de los puntos de fusión se hizo con capilares en un aparato térmico digital de punto de fusión de la marca Electrothermal® modelo 9300.

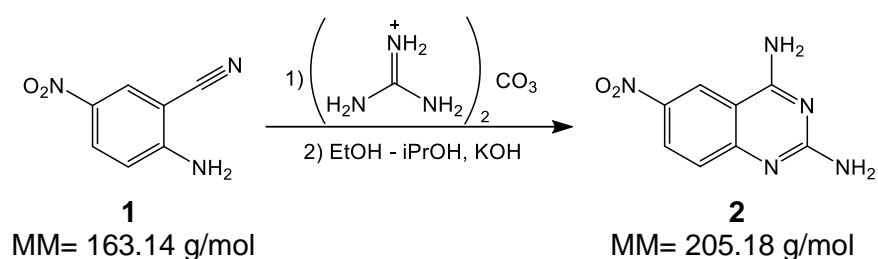
Los espectros de infrarrojo fueron elaborados en la USAII de la Facultad de Química de la UNAM por la Q. Maricela Gutiérrez Franco en un espectrofotómetro de FTIR / FIR Spectrum 400 de Perkin-Elmer. (Reflectancia totalmente atenuada ATR).

Los espectros de masas mediante APCI de alta resolución fueron realizados a su vez en el espectrómetro de masas con analizador másico de tiempo de vuelo, marca Perkin Elmer, modelo AxION 2 TOF por la Q. Georgina Artemisa Duarte Lisci.

Se utilizó DMSO-d₆ Sigma Aldrich® para las muestras de RMN. Los espectros de los productos fueron adquiridos en el espectrómetro de RMN de 9.4 T marca Varian modelo VNMRS y en el espectrómetro de RMN de 9.4 T marca Varian modelo MR de la USAII, FQ, UNAM por la M. en C. Nayeli López Balbiaux y la M. en C. Rosa Isela del Villar Morales.

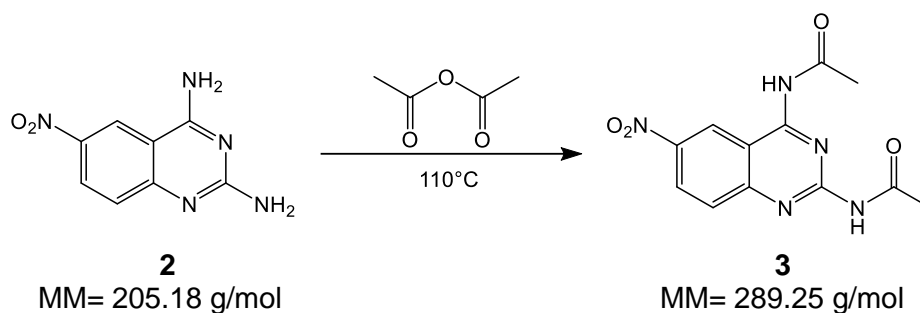
Los desplazamientos químicos (δ) se encuentran especificados en ppm con relación al TMS.

Síntesis de la 6-nitroquinazolina-2,4-diamina (2)



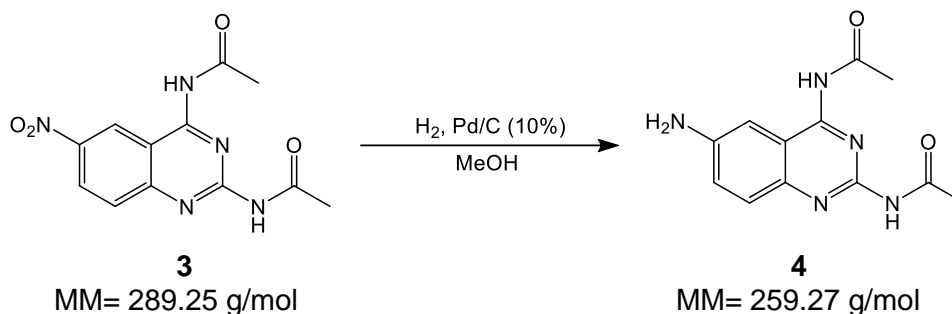
En un matraz bola de 100 mL, con boca de 14x20, se colocaron 3.0094 g (18.45 mmol) de 2-amino-5-nitrobenzonitrilo y 2.3726 g (13.17 mmol) de carbonato de guanidina con 20 mL de mezcla de disolventes EtOH/iPrOH (1:2). Dicha mezcla se colocó bajo agitación por un lapso de 20 minutos. Por otro lado, en un vaso de precipitados de 50 mL se disolvieron 1.1869 g (21.15 mmol) de KOH en 15 mL de la mezcla de disolventes EtOH/iPrOH (1:2) con agitación vigorosa durante aproximadamente 30 minutos, luego de ese tiempo la disolución se adicionó al matraz bola y la mezcla de reacción se colocó bajo agitación y a reflujo en un baño de aceite a una temperatura de 95 °C por 8 horas. Transcurrido el tiempo se filtró a vacío la mezcla de reacción en caliente, el sólido naranja obtenido se lavó repetidamente con agua tibia hasta pH neutro, luego se lavó con 100 mL de MeOH tibio y por último se le hizo un lavado con 50 mL de acetona. Se obtuvieron 3.2482 g (15.83 mmol) de 6-nitroquinazolina-2,4-diamina con un rendimiento del 86%, R_f = 0.31 (sistema I), p.f. = 360.2-363.1 °C.

Síntesis de la *N,N'*-(6-nitroquinazolina-2,4-diil)diacetamida (3)



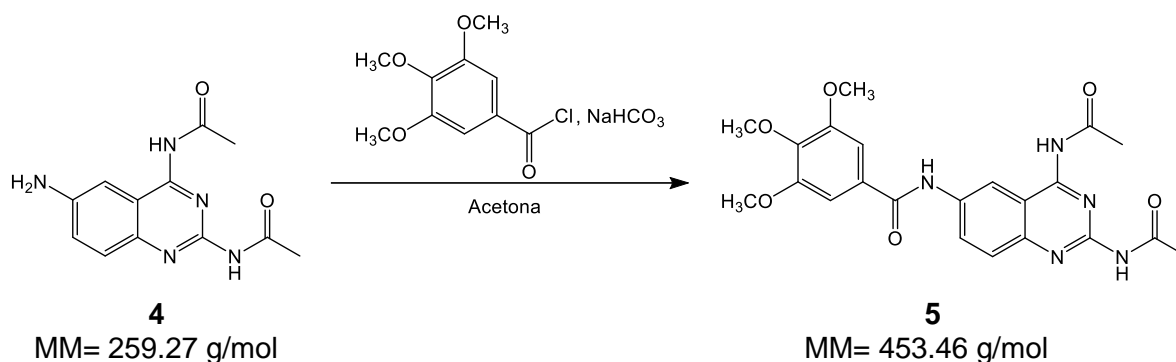
En un matraz bola de 100 mL, con boca de 14x20, se colocaron 1.0090 g (4.92 mmol) de 6-nitroquinazolina-2,4-diamina junto con 30 mL de anhídrido acético. La mezcla de reacción de color naranja se colocó bajo agitación, a una temperatura de 110 °C en un baño de aceite y al matraz bola se le adaptó una columna vigreux. Se dejó reaccionar durante 6 horas y pasado este tiempo se dejó enfriar la mezcla de reacción para posteriormente filtrarla a vacío. El sólido amarillo obtenido se lavó repetidamente con agua hasta pH neutro. Se obtuvieron 0.9027 g (3.12 mmol) de *N,N'*-(6-nitroquinazolina-2,4-diil)diacetamida con un rendimiento del 63%, Rf = 0.71 (sistema I), p.f. = 277.2-279.5 °C.

Síntesis de la *N,N'*-(6-aminoquinazolina-2,4-diil)diacetamida (4)



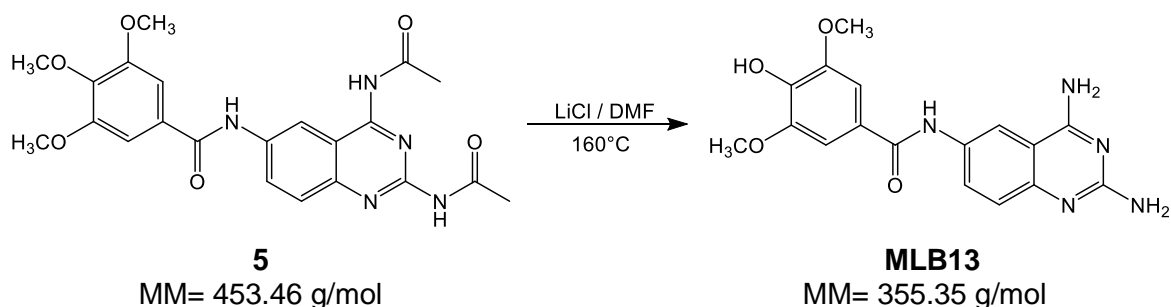
En un frasco de hidrogenación Paar de 500 mL se colocaron 1.0032 g (3.47 mmol) de *N,N'*-(6-nitroquinazolina-2,4-diil)diacetamida junto con 0.1040 g de Pd/C (10%), ambos sólidos se mezclaron en seco y posteriormente se adicionaron 200 mL de MeOH. La presión inicial de hidrógeno se estableció en 60 lb/in² y se dejó reaccionar por un lapso de 30 minutos consumiéndose 18 lb/in². Posteriormente la mezcla de reacción verde brillante se filtró a vacío en un embudo poroso para separar el Pd/C de la disolución amarilla, el filtrado se concentró en el rotavapor hasta obtener un sólido amarillo. Se obtuvieron 0.8095 g (3.12 mmol) del intermediario (4) con un rendimiento del 90%, Rf = 0.36 (sistema I), p.f. = 225.6-227.0 °C.

Síntesis de *N*-(2,4-diacetamidoquinazolin-6-il)-3,4,5-trimetoxibenzamida (5)



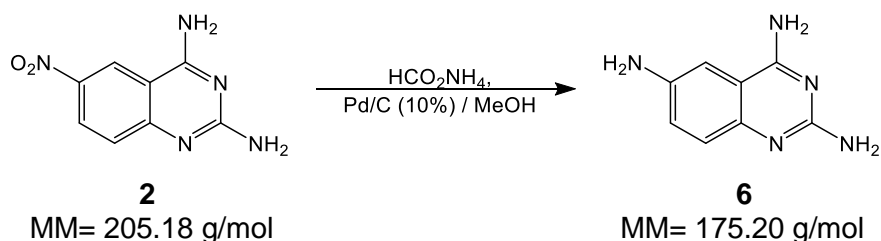
En un matraz bola de 25 mL, con boca de 14x20, se colocaron 0.3002 g (1.16 mmol) de (**4**), 0.1460 g (1.74 mmol) de NaHCO₃ y 10 mL de acetona. La mezcla se colocó bajo agitación, se adaptó una columna vigreux al matraz bola y se sumergió en un baño de hielo por 15 minutos. Por otro lado, se disolvieron 0.3423 g (1.48 mmol) del cloruro de 3,4,5-trimetoxibenzoilo en 5 mL de acetona, posteriormente esta disolución se colocó en un embudo de adición. Transcurridos los 15 minutos de la mezcla de reacción en baño de hielo, se prosiguió a cambiar la columna vigreux por el embudo de adición y se comenzó a gotear la disolución al matraz bola bajo atmósfera de N₂. Una vez que se terminó la adición del cloruro de ácido se cambió el embudo de adición por la columna vigreux y se dejó reaccionar en el baño de hielo por 30 minutos más. Después, la mezcla de reacción se dejó a temperatura ambiente y bajo agitación por 25 horas. Transcurrido el tiempo, la reacción se vertió sobre una mezcla de hielo y agua, esta nueva mezcla se filtró a vacío y el sólido gris obtenido se lavó con 15 mL de MeOH. Se obtuvieron 0.4786 g (1.06 mmol) de (**5**) con un rendimiento del 91%, R_f = 0.58 (sistema I), p.f. = 256.0-259.0 °C.

Síntesis de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzamida (MLB13)



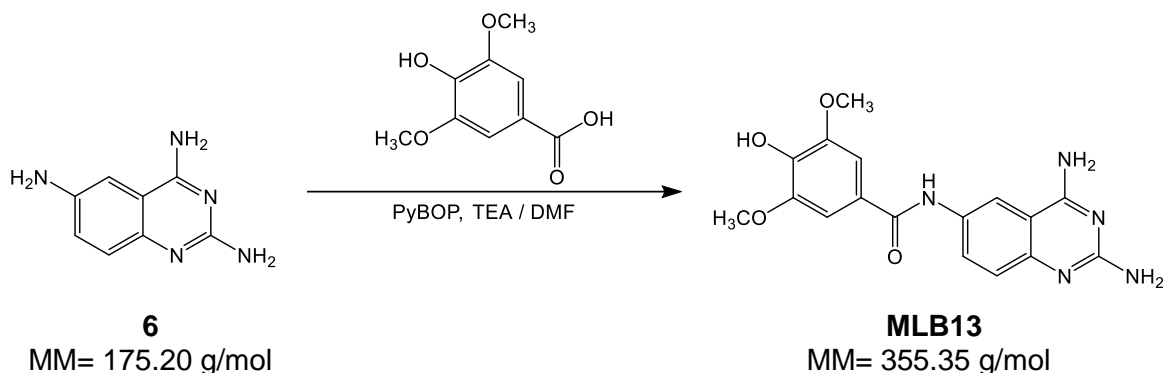
En un matraz bola de 100 mL seco, con boca de 14x20, se colocaron 0.8547 g (1.88 mmol) de **(5)** y 1.3218 g (31.18 mmol) de LiCl anhidro en 30 mL de DMF anhidra. Al matraz se le adaptó un sistema de reflujo, se colocó bajo atmósfera de N₂ y se dejó reaccionar a 160 °C, bajo agitación constante por 41 horas. Pasado este tiempo se dejó enfriar la mezcla de reacción y se le adicionaron 30 mL de una disolución de HCl 0.1 M, luego esta nueva mezcla se colocó bajo refrigeración durante 24 horas. Se formó un precipitado de color café que se filtró a vacío. Se obtuvieron 0.6031 g (1.70 mmol) de **MLB13** con un rendimiento del 90%, R_f = 0.28 (sistema II), p.f. = 224.0-227.4 °C.

Síntesis de quinazolina-2,4,6-triamina (**6**)



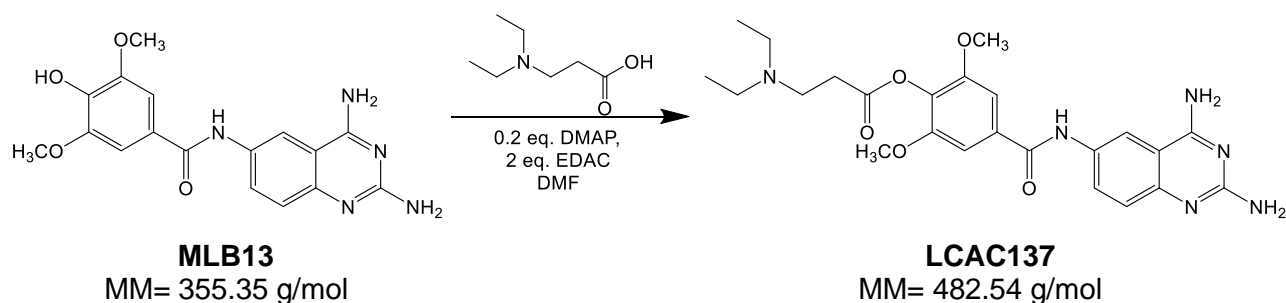
En un matraz bola de 250 mL, con boca de 24x40, se colocaron 2.0105 g (9.80 mmol) de **(2)** junto con 0.2125 g de Pd/C (10%), ambos sólidos se mezclaron en seco y después se les adicionaron 130 mL de MeOH. La mezcla de reacción se colocó bajo agitación y en seguida se agregaron 7.3759 g (116.97 mmol) de HCO₂NH₄. Luego se adaptó un sistema de reflujo a 80 °C, se dejó reaccionar durante 30 minutos y con agitación constante. Transcurrido el tiempo, la suspensión oscura obtenida se pasó a través de una cámara de celita para separar el Pd/C de la disolución café. La disolución se concentró en rotavapor hasta obtener una suspensión de color café claro, la cual se filtró a vacío. Se recuperó un sólido amarillo que finalmente se lavó con 25 mL de acetona. Se obtuvieron 1.4315 g (8.17 mmol) de **(6)** con un rendimiento del 83%, R_f = 0.26 (sistema II), p.f. = 231.7-233.0 °C.

Síntesis de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzamida (MLB13)



En un matraz bola de 100 mL, con boca de 14x20, se disolvieron 1.1072 g (5.59 mmol) de ácido siríngico en 10 mL de DMF anhidra, luego se agregó 1 mL (7.17 mmol) de TEA y 0.8140 g (4.65 mmol) de **(6)** previamente disueltos en 10 mL de DMF anhidra. Al mezclar los reactivos se obtuvo una disolución color ámbar a la cual se le adicionaron 3.8500 g (7.40 mmol) de PyBOP. Se dejó reaccionar durante 50 horas bajo agitación constante, atmósfera de N₂ y a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, a la mezcla de reacción se le retiró la mayor cantidad de DMF en el rotavapor hasta quedar una mezcla aceitosa color café, después se agregaron aproximadamente 10 mL de acetona y luego 30 mL de éter etílico hasta observar la formación de un precipitado color amarillo el cual se filtró a vacío. Se recuperó un sólido color café oscuro de apariencia pegajosa que pesó 0.9050 g (2.55 mmol), con un rendimiento del 55%, R_f = 0.28 (sistema II), p.f. = 223.0-224.2 °C.

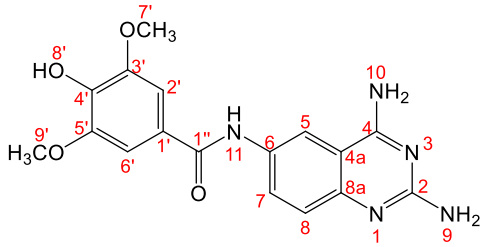
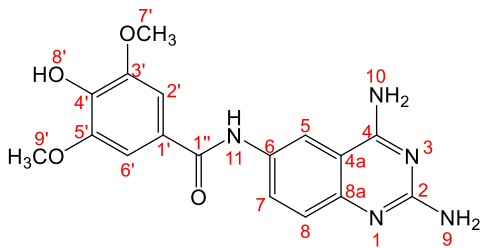
Síntesis de 4-[(2,4-diaminoquinazolin-6-il)carbamoil]-2,6-dimetoxifenil 3-(dietilamino)propanoato (LCAC137)



En un matraz bola de 100 mL, con boca de 14x20, se colocaron 0.4094 g (1.15 mmol) de **MLB13** junto con 0.3156 g (1.74 mmol) de clorhidrato de *N,N*-dietil-beta-alanina y 15 mL de DMF anhidra, luego se agregaron 0.0288 g (0.24 mmol) de DMAP y 0.4421 g (2.31 mmol)

de EDAC. La mezcla de reacción se colocó bajo agitación constante y se dejó reaccionar a una temperatura de 60 °C, bajo atmosfera de N₂ durante 6 días. Transcurrido este tiempo a la mezcla de reacción se le retiró lo más que se pudo del disolvente en el rotavapor hasta quedar una miel color café. A esta miel se le agregaron algunos mililitros de CHCl₃ y éter etílico hasta observar la formación de un precipitado el cual se filtró a vacío. Posteriormente, se purificó mediante columna de cromatografía de sílica gel de tamaño de poro 60 Å, malla 60-100, con polaridad creciente de diclorometano a metanol. Se recuperó un sólido color amarillo que pesó 0.0290 g (0.06 mmol), con un rendimiento del 5%, R_f = 0.60 (sistema II), punto de descomposición = 245.0-246.8 °C.

Tabla 2. Información espectroscópica de los derivados sintetizados.

Derivado	Información espectroscópica
<div style="text-align: center;">  </div> <p>MLB13 (obtenido mediante la ruta de síntesis B) <i>N</i>-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzamida P.M.: 355.35 g/mol Aspecto: Polvo amarillo Rendimiento: 90% Punto de fusión: 224.0-227.4 °C Rf: 0.28 en sistema II</p>	<p>IR - FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): (-O=C-NH) 3195 y 1601, (-NH₂) 3336, 1557 y 824, (C=O) 1646, (-OCH₃) 2851, (C-O-CH₃) 1218</p> <p>EM (APCI)⁺: 356.1260 (M+1⁺)</p> <p>RMN ¹H (DMSO-d₆, 400MHz): δ 10.17 [(H₁₁)(s,1H, Protón intercambiado en experimento con D₂O)], 8.26 [(H₅)(d, <i>J</i> = 1.78₅₋₇ Hz, 1H)], 7.73 [(H₇)(dd, <i>J</i> = 1.98₇₋₅, 8.91₇₋₈ Hz, 1H)], 7.65 [(H₁₀)(s, 2H, Protones intercambiados en experimento con D₂O)], 7.38 [(H_{2',6'})(s, 2H)], 7.27 [(H₈)(d, <i>J</i> = 8.88₈₋₇ Hz, 1H)], 6.49 [(H₉)(s, 2H, Protones intercambiados en experimento con D₂O)], 3.85 [(H_{7,9})(s, 6H)], 3.74 [(H₈)(s, 1H, Protones intercambiados en experimento con D₂O)]</p> <p>RMN ¹³C (DMSO-d₆, 100MHz): δ 164.73 (C_{11''}), 162.46 (C₄), 158.66 (C₂), 147.50 (C_{3',5'}), 145.67 (C_{8a}), 139.01 (C₄), 132.21 (C_{4a}), 129.52 (C₇), 123.91 (C₁), 122.09 (C₈), 116.82 (C₅), 109.68 (C₆), 105.45 (C_{2',6'}), 56.18 (C_{7,9})</p>
<div style="text-align: center;">  </div> <p>MLB13 (obtenido mediante la ruta de síntesis C) <i>N</i>-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzamida P.M.: 355.35 g/mol Aspecto: Polvo amarillo claro Rendimiento: 55% Punto de fusión: 223.0-224.2 °C Rf: 0.28 en sistema II</p>	<p>IR - FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): (-O=C-NH) 3195 y 1603, (-NH₂) 3343, 1544 y 829, (C=O) 1644, (-OCH₃) 2843, (C-O-CH₃) 1214 y 1038</p> <p>EM (APCI)⁺: 356.1485 (M+1⁺)</p> <p>RMN ¹H (DMSO-d₆, 400MHz): δ 10.11 [(H₁₁)(s,1H, Protón intercambiado en experimento con D₂O)], 8.20 [(H₅)(d, <i>J</i> = 2.08₅₋₇ Hz, 1H)], 7.68 [(H₇)(dd, <i>J</i> = 2.15₇₋₅, 8.93₇₋₈ Hz, 1H)], 7.54 [(H₁₀)(s,2H, Protones intercambiados en experimento con D₂O)], 7.36 [(H_{2',6'})(s, 2H)], 7.25 [(H₈)(d, <i>J</i> = 8.89₈₋₇ Hz, 1H)], 6.36 [(H₉)(s,2H, Protones intercambiados en experimento con D₂O)], 3.85 [(H_{7,9})(s, 6H)], 3.80 [(H₈)(s, 1H, Protones intercambiados en experimento con D₂O)]</p>

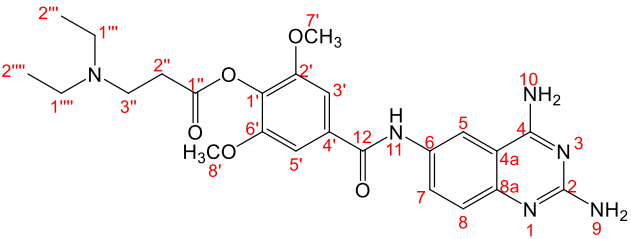
	<p>RMN ¹³C (DMSO-d₆, 400MHz): δ 164.73 (C_{1'}), 162.44 (C₄), 159.23 (C₂), 147.52 (C_{3',5'}), 147.03 (C_{8a}), 139.01 (C₄), 131.81 (C_{4a}), 129.38 (C₇), 123.98 (C₁), 122.85 (C₈), 116.77 (C₅), 109.77 (C₆), 105.40 (C_{2',6'}), 56.17 (C_{7,9'})</p>
<div style="text-align: center;">  <p>LCAC137 4-[(2,4-diaminoquinazolin-6-il)carbamoil]-2,6-dimetoxifenil 3-(dietilamino)propanoato P.M.: 482.54 g/mol Aspecto: Polvo amarillo Rendimiento: 5% Punto de descomposición: 245.0-246.8 °C Rf: 0.60 en sistema II</p> </div>	<p>IR - FTIR por reflectancia ATR (cm⁻¹): (-O=C-NH) 3165 y 1599, (-NH₂) 3328, 1537 y 839, (C=O amida) 1644, (-OCH₃) 2849, (C-O-CH₃) 1238, (O=C éster)1730</p> <p>EM (APCI)⁺: 483.2638 (M+1⁺)</p> <p>RMN ¹H (DMSO-d₆, 400MHz): δ 10.66 [(H₁₁)(s,1H)], 8.70 [(H₁₀)(s,2H)], 8.50 [(H₅)(d, J = 1.96₅₋₇ Hz, 1H), 7.94 [(H₇)(dd, J = 1.96₇₋₅, 8.91₇₋₈ Hz, 1H)], 7.60 [(H₉)(s,2H)], 7.44 [(H_{3',5'})(s, 2H)], 7.39 [(H₈)(d, J = 8.76₈₋₇ Hz, 1H), 4.56 [(H_{3''})(t, 2H), 3.87 [(H_{7',8'})(s, 6H)], 3.74 [(H_{1''',1'''})(c, 4H)], 2.88 [(H_{2''})(t, 2H)], 1.22 [(H_{2'''})(t, 3H)], 0.83 [(H_{2'''})(t, 3H)]</p> <p>RMN ¹³C (DMSO-d₆, 400MHz): δ 168.51 (C_{1'}), 164.64 (C₁₂), 162.84 (C₄), 162.56 (C₂), 151.71 (C₁), 147.55 (C_{2',6'}), 137.67 (C_{8a}), 134.29 (C_{4a}), 132.46 (C₄), 130.30 (C₇), 118.03 (C₈), 117.24 (C₅), 109.36 (C₆), 104.70 (C_{3',5'}), 56.36 (C_{7,8'}), 56.19 (C_{1''',1'''}), 41.25 (C_{3''}), 29.10 (C_{2''}), 28.91 (C_{2''',2'''})</p>

Figura 1. Espectro de FT-IR de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-hidroxi-3,5-dimetoxybenzamida (MLB13) obtenido mediante ruta B

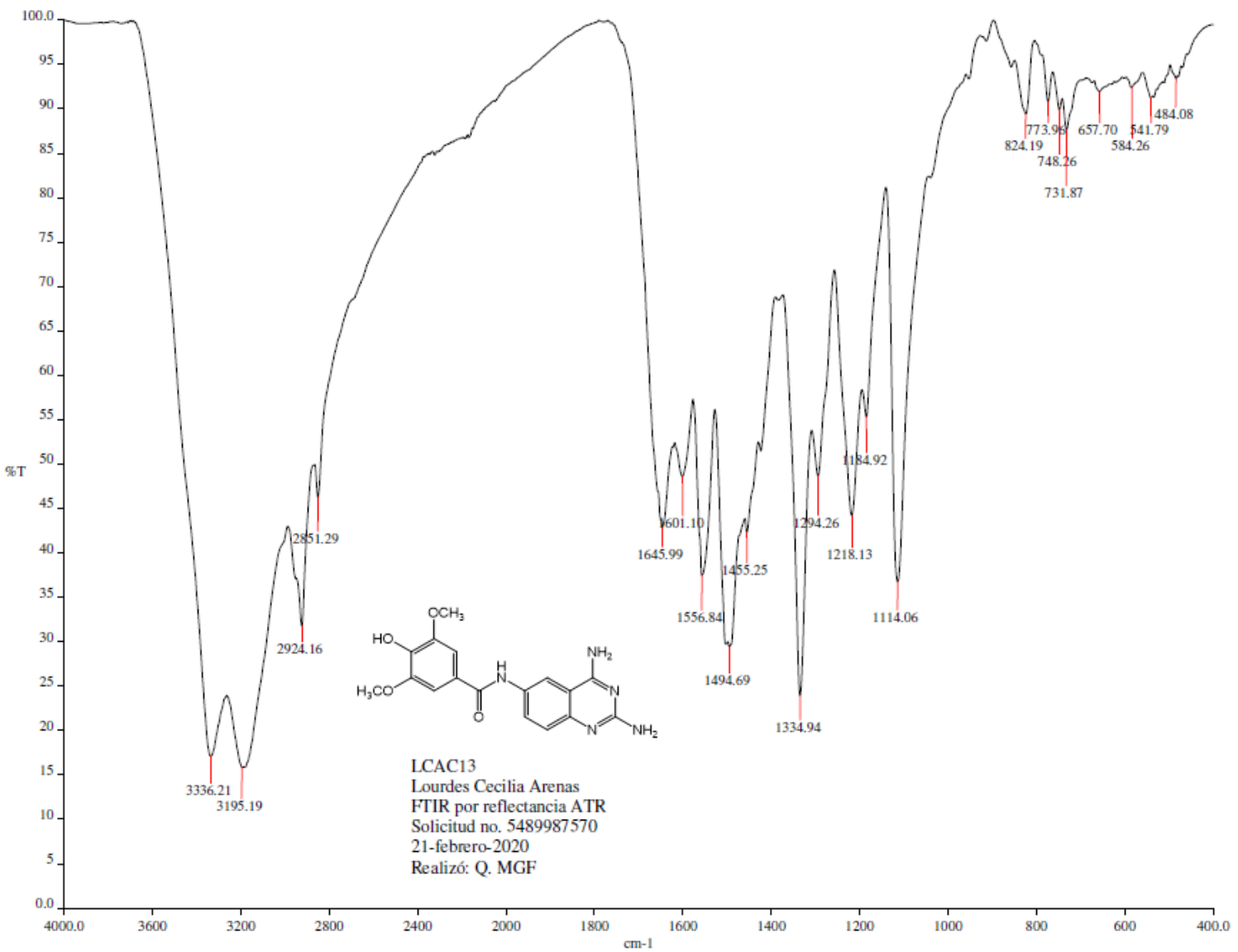


Figura 2. Espectro de masas por APCI de alta resolución de N-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzamida (MLB13) obtenido mediante ruta B

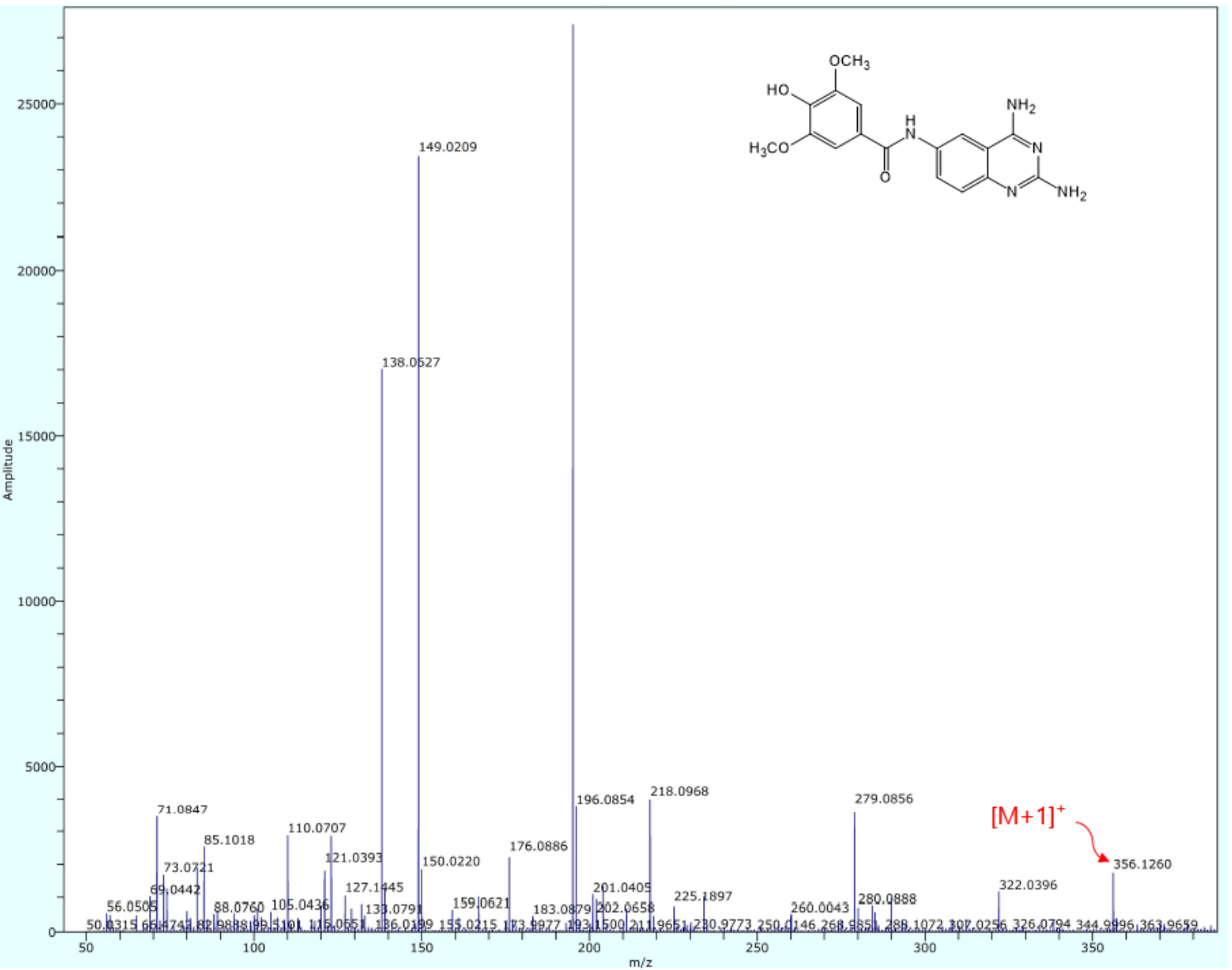


Figura 3. Espectro de RMN ^1H de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-*il*)-4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzamida (MLB13) obtenido mediante ruta B

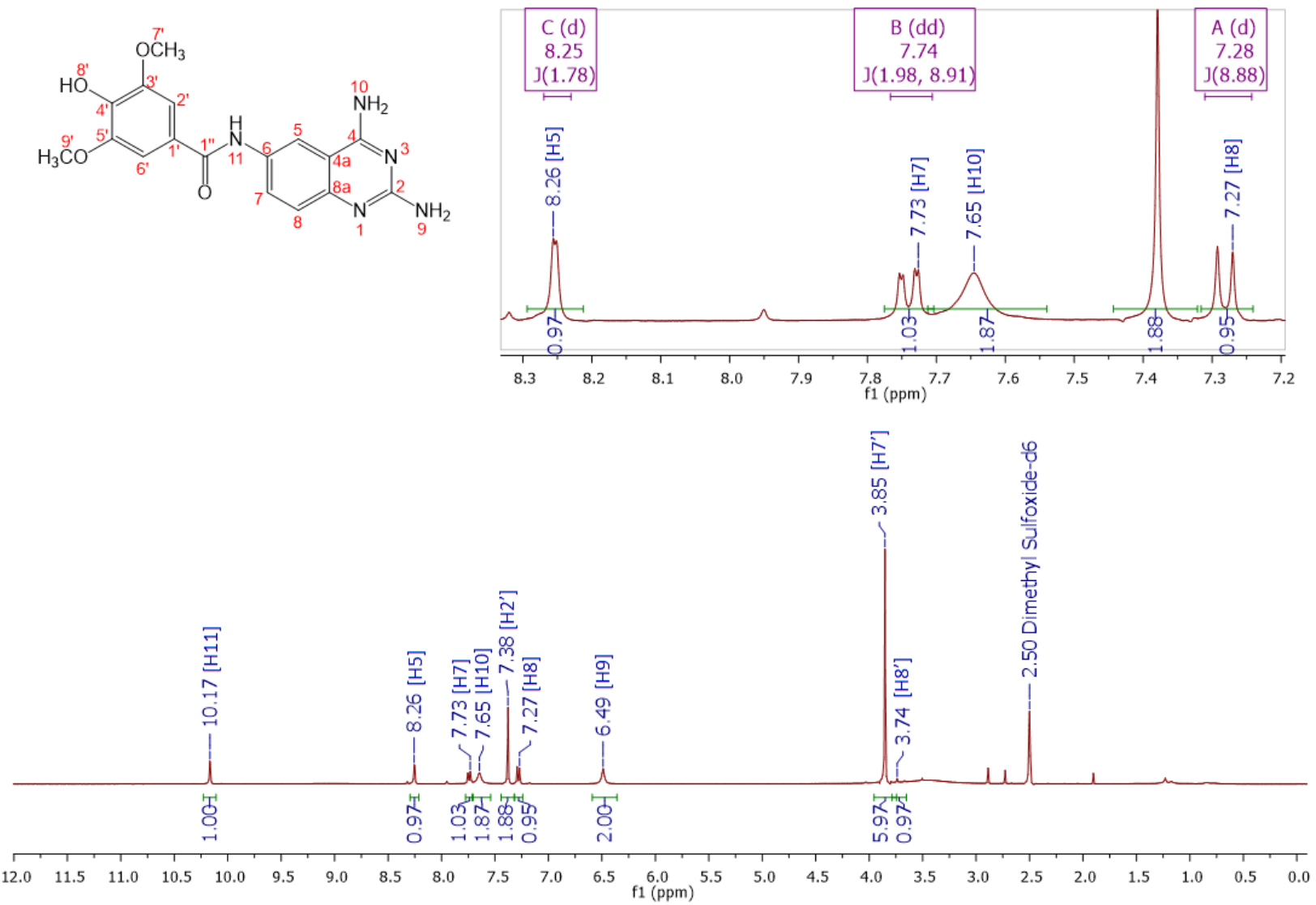


Figura 4. Espectro de experimento de intercambio de D_2O en RMN ^1H de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-hidroxifenil-3,5-dimetoxibenzamida (MLB13) obtenido mediante ruta B

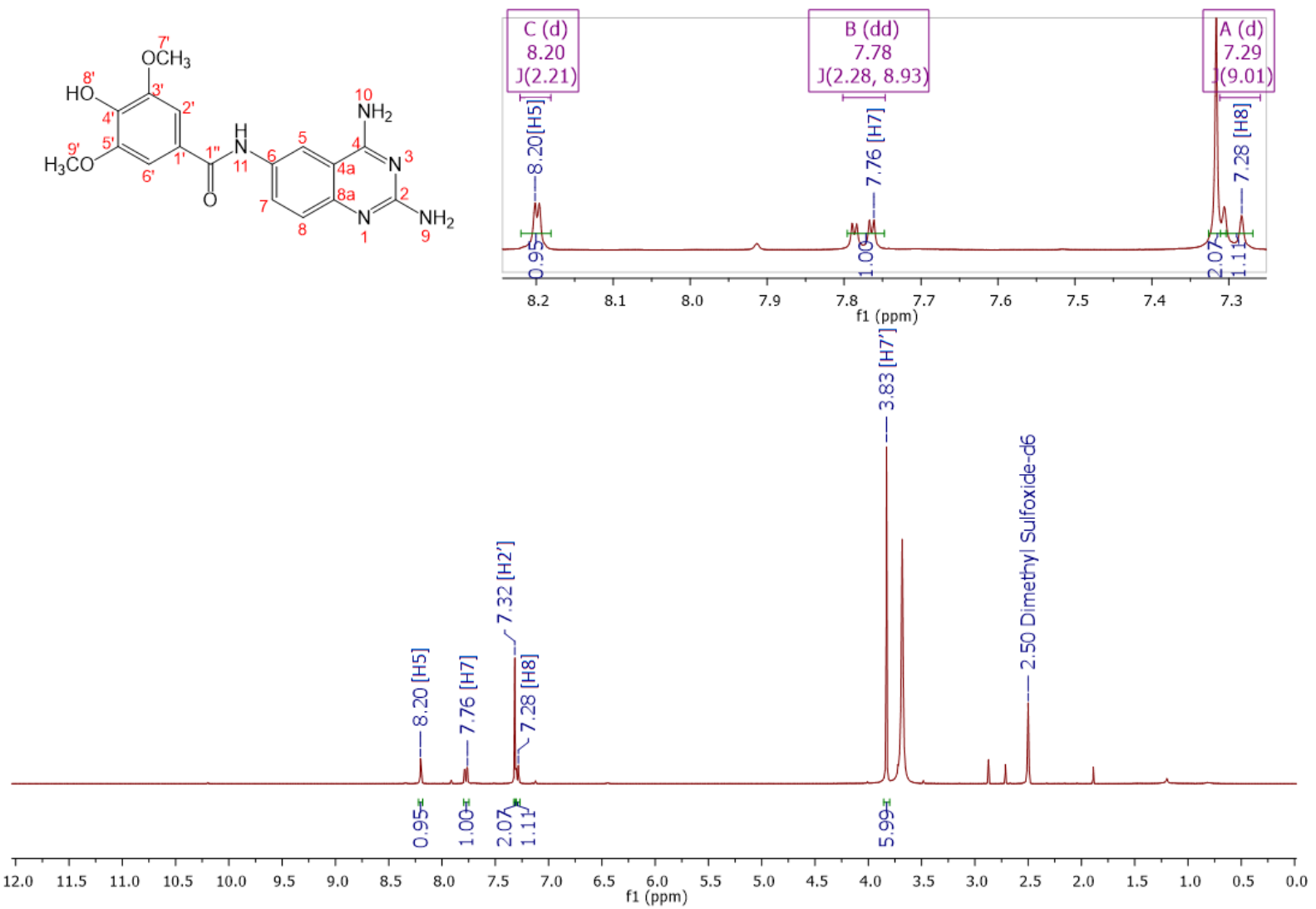


Figura 5. Espectro de RMN ^{13}C de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzamida (MLB13) obtenido mediante ruta B

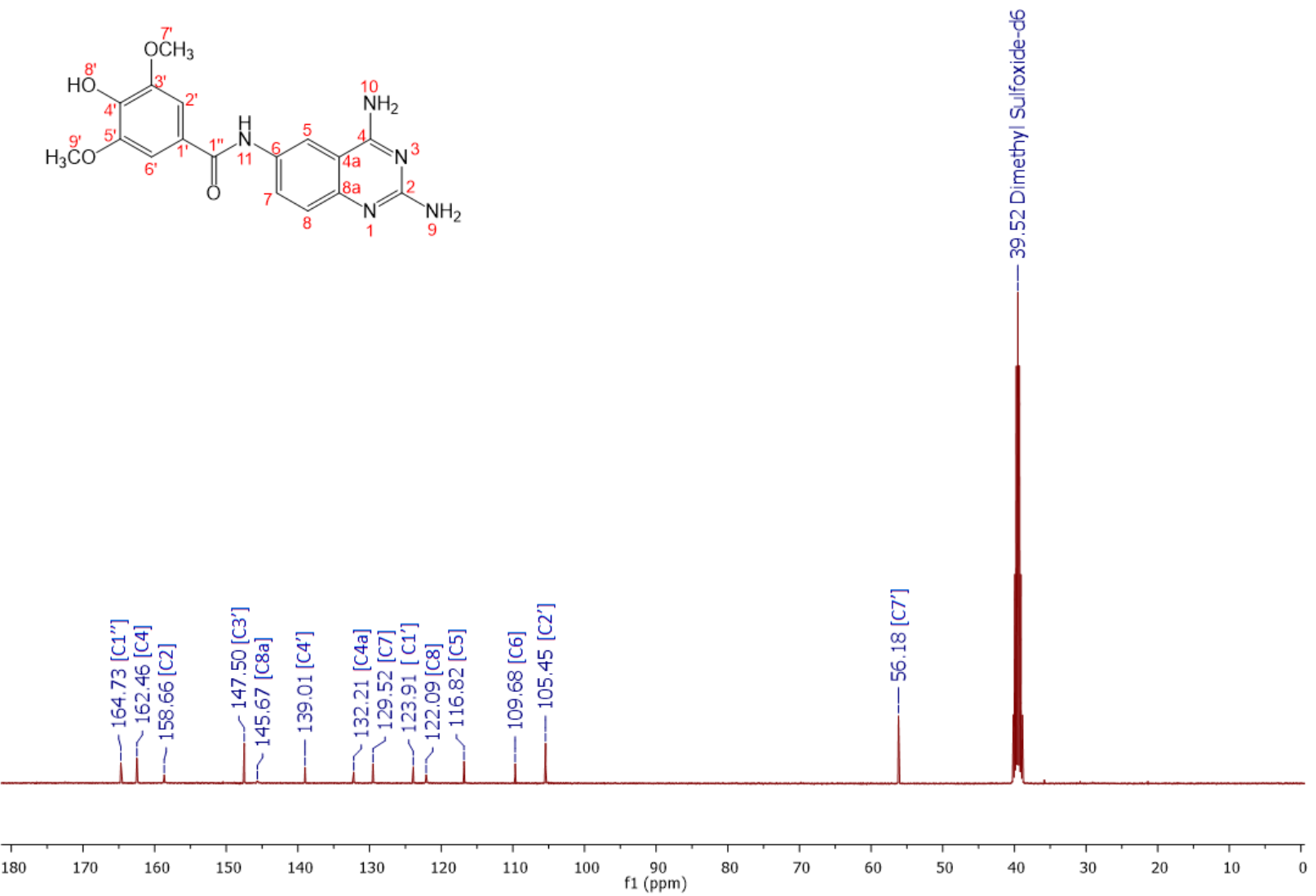


Figura 6. Espectro de FT-IR de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-hidroxi-3,5-dimetoixibenzamida (MLB13) obtenido mediante ruta C

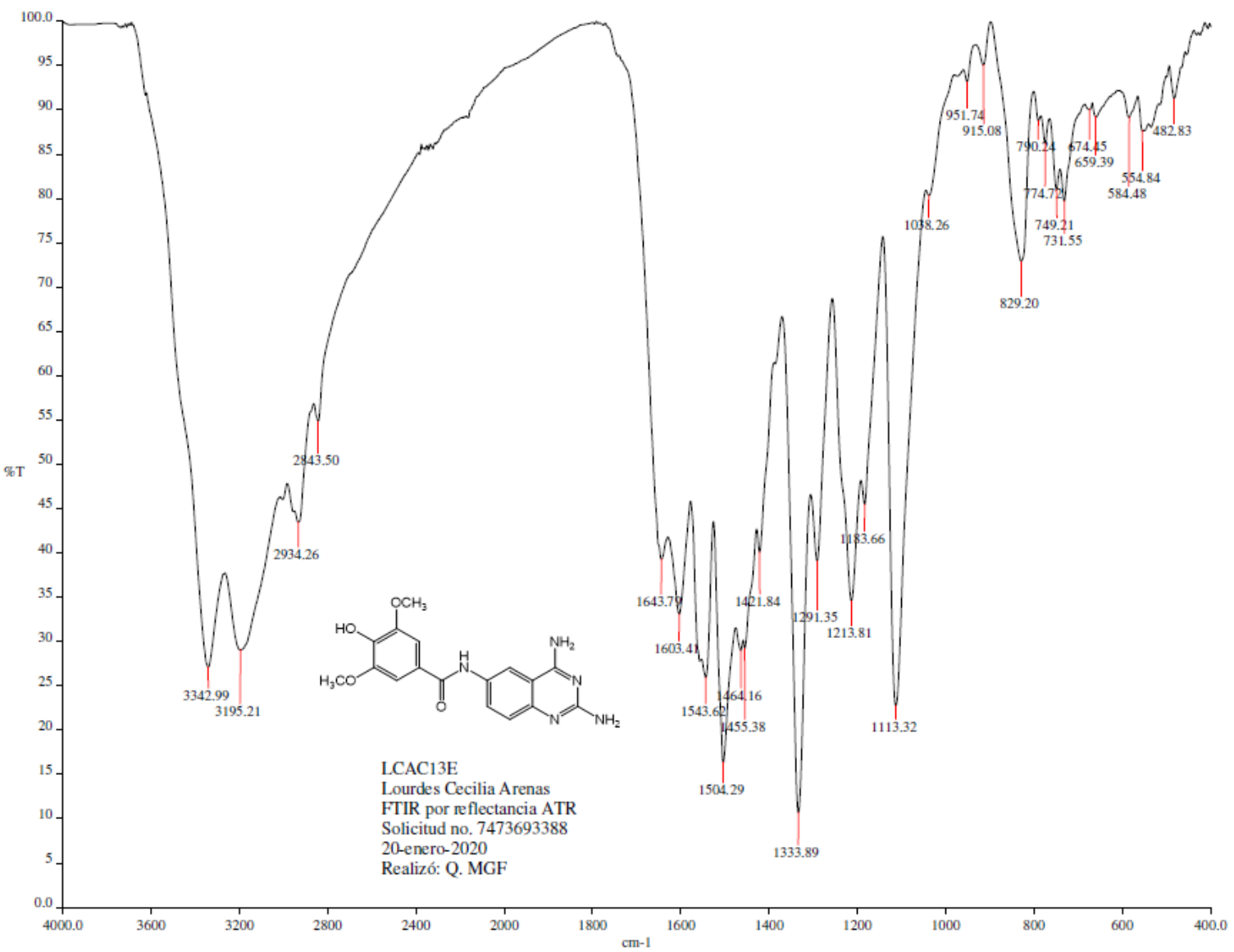


Figura 7. Espectro de masas por APCI de alta resolución de N-(2,4-diaminoquinazolin-6-yl)-4-hidroxibenzamida (MLB13) obtenido mediante ruta C

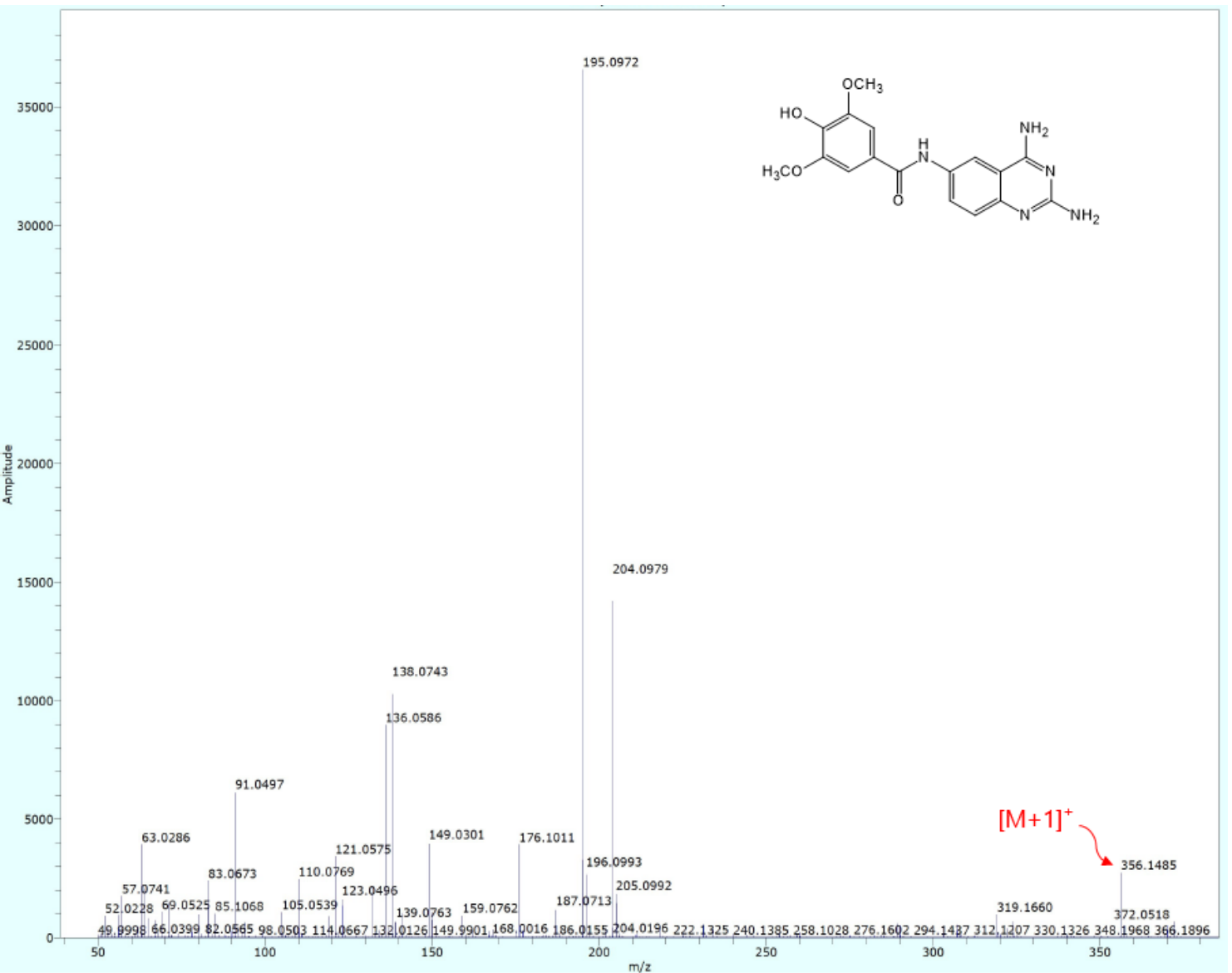


Figura 8. Espectro de RMN ^1H de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-*il*)-4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzamida (MLB13) obtenido mediante ruta C

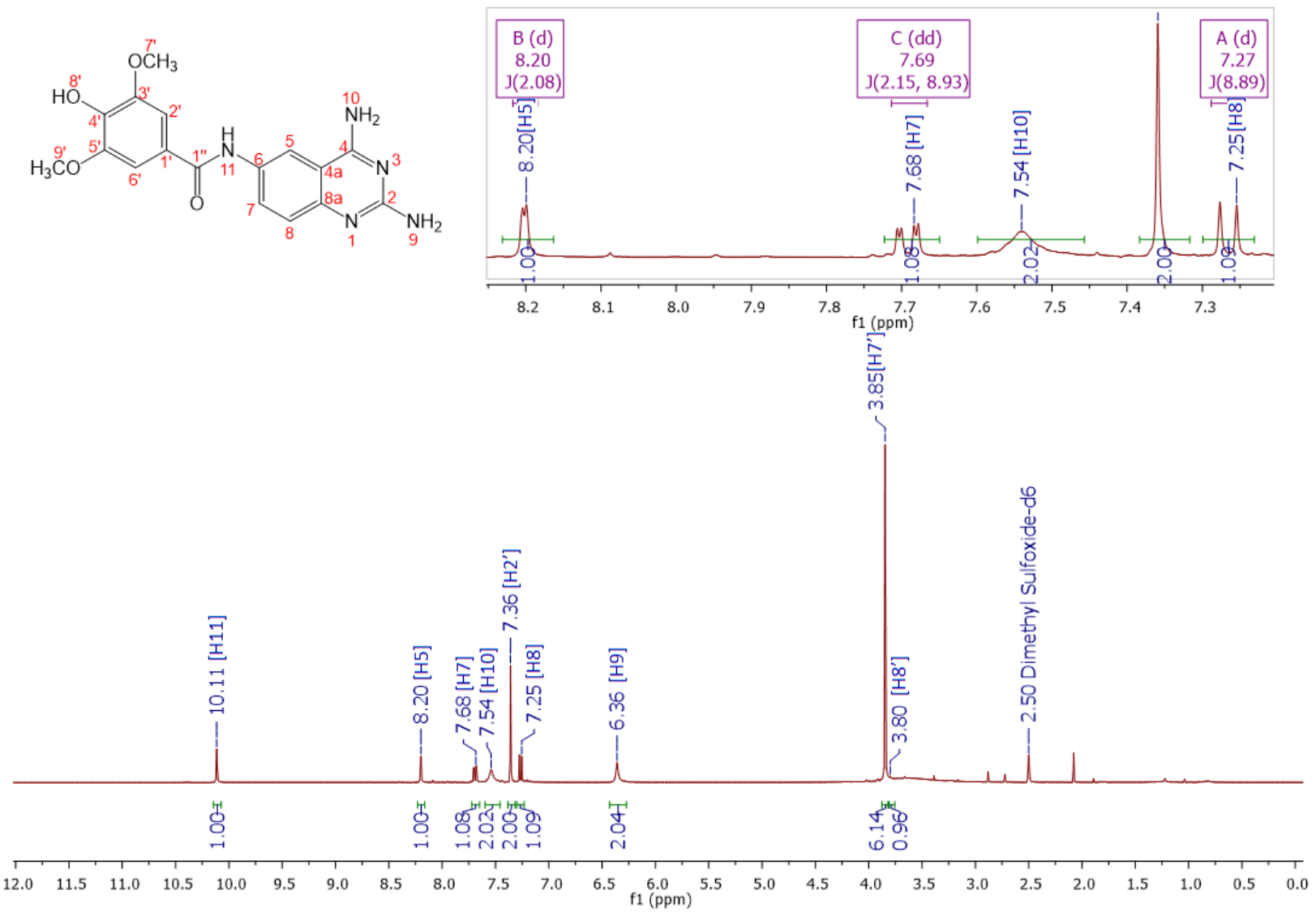


Figura 9. Espectro de experimento de intercambio de D_2O en RMN ^1H de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzamida (MLB13) obtenido mediante ruta C

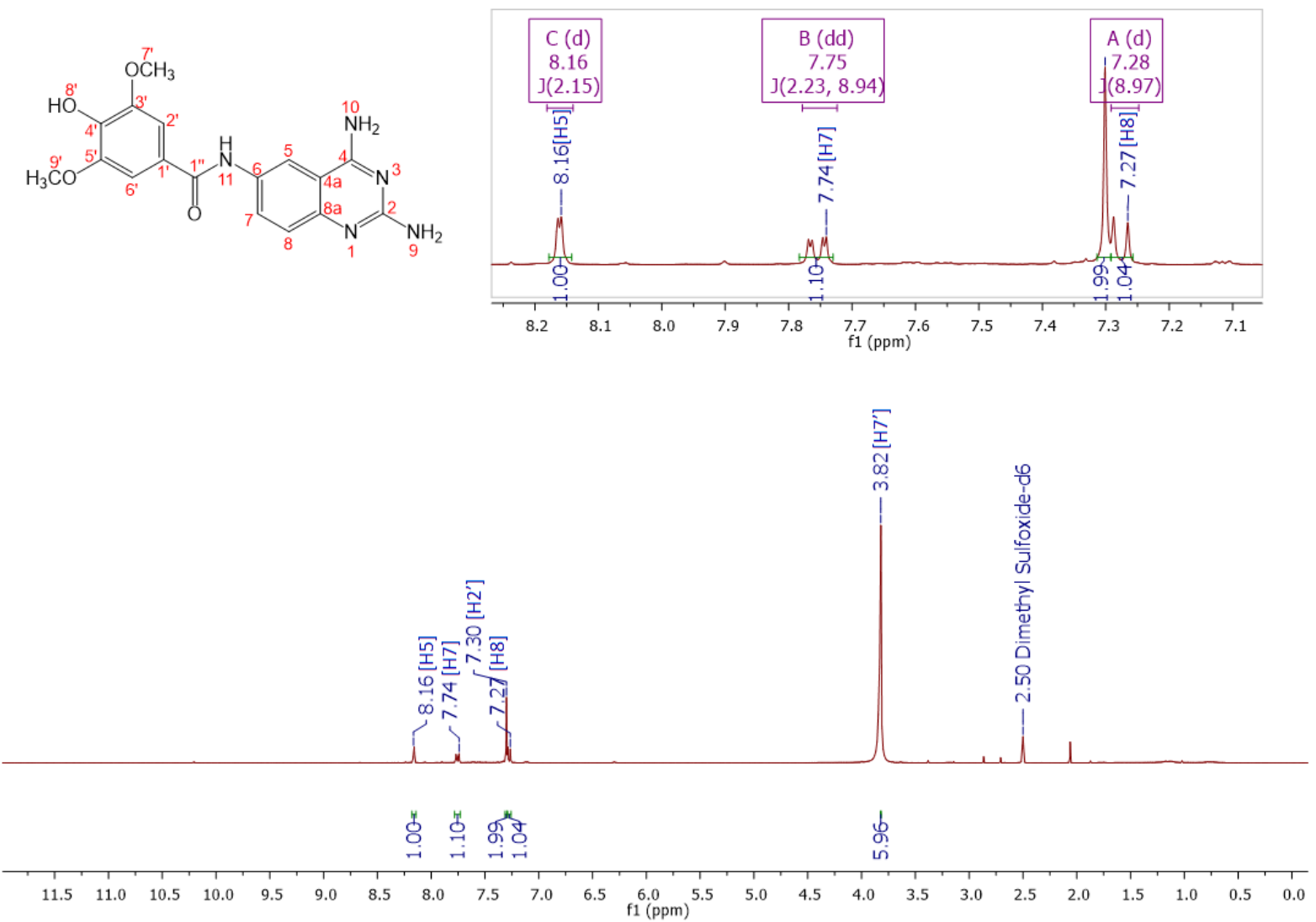


Figura 10. Espectro de RMN COSY de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-*il*)-4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzamida (MLB13) obtenido mediante ruta C

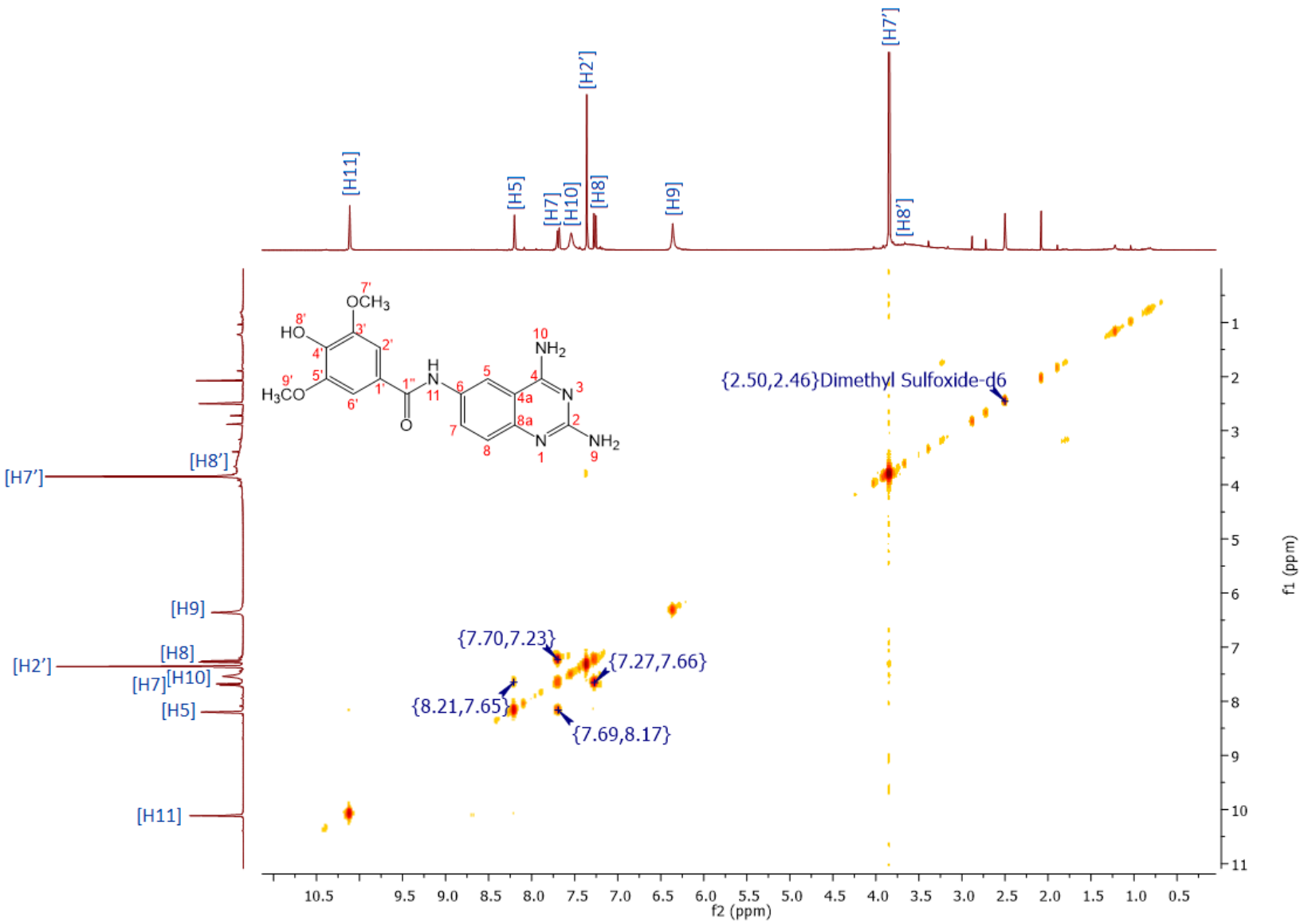


Figura 11. Espectro de RMN ^{13}C de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-*il*)-4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzamida (MLB13) obtenido mediante ruta C

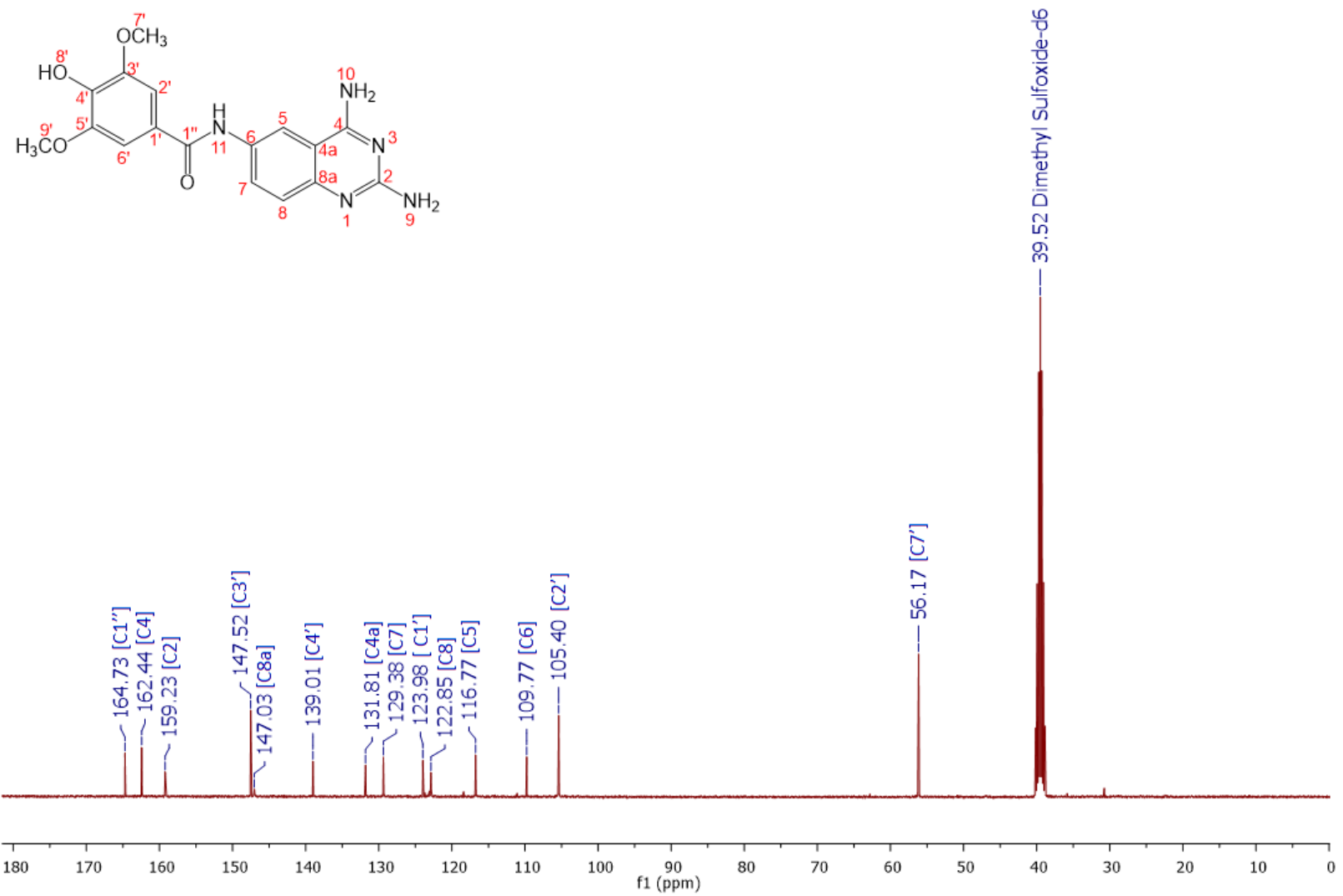


Figura 12. Espectro de RMN HSQC de N-(2,4-diaminoquinazolin-6-yl)-4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzamida (MLB13) obtenido mediante ruta C

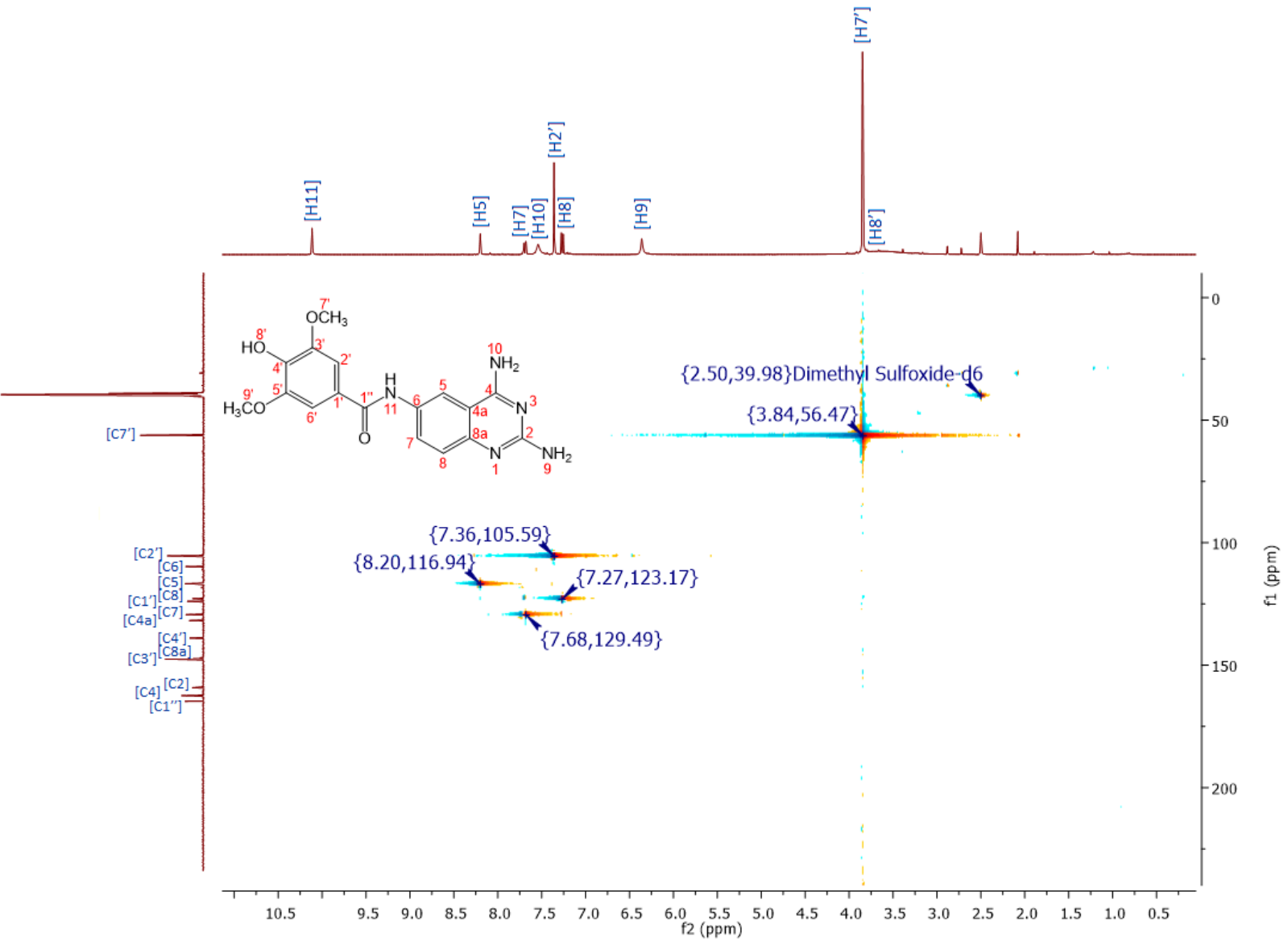


Figura 13. Espectro de RMN HMBC de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-*il*)-4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzamida (MLB13) obtenido mediante ruta C

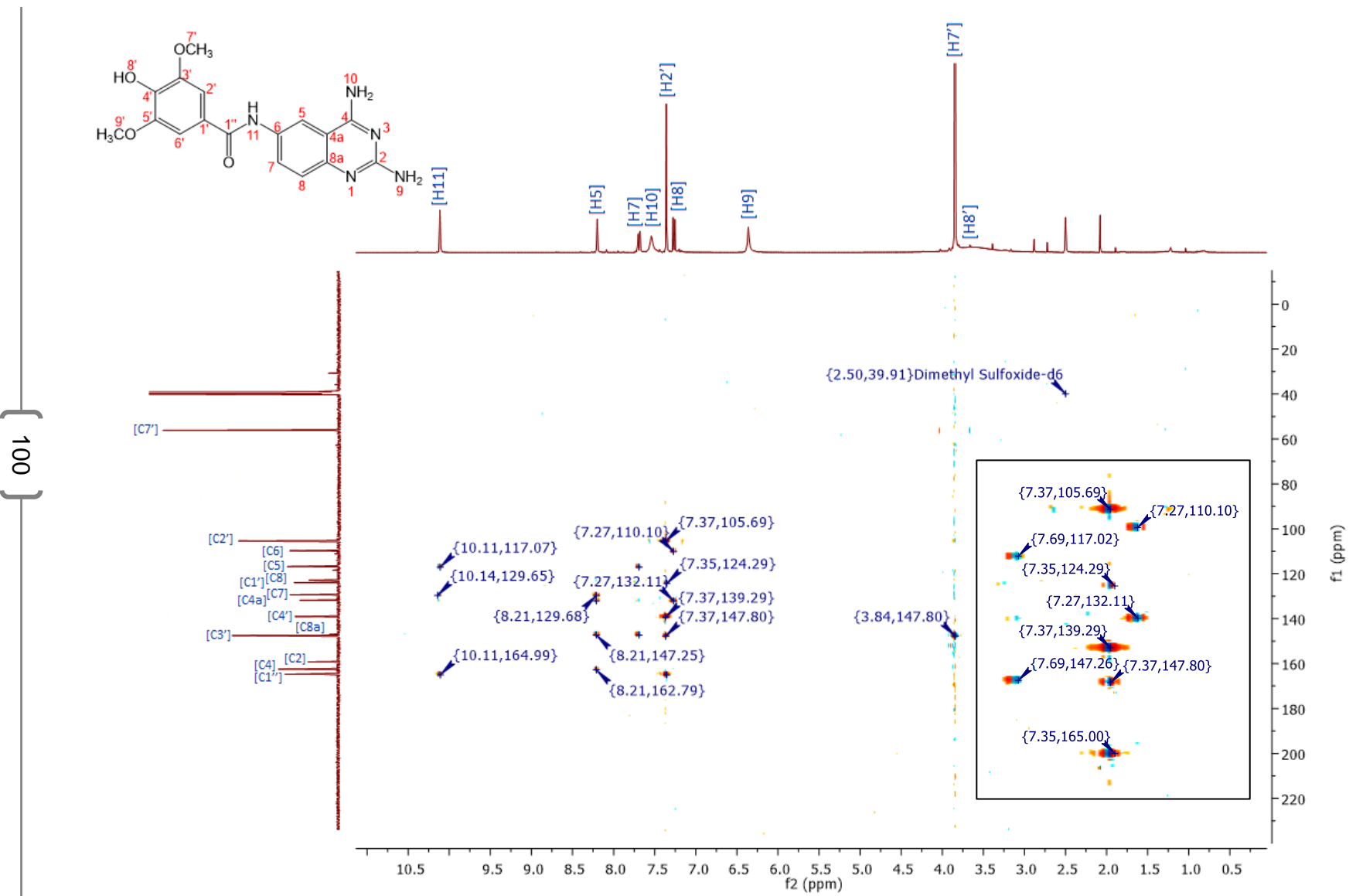


Figura 14. Espectro de RMN NOESY de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzamida (MLB13) obtenido mediante ruta C

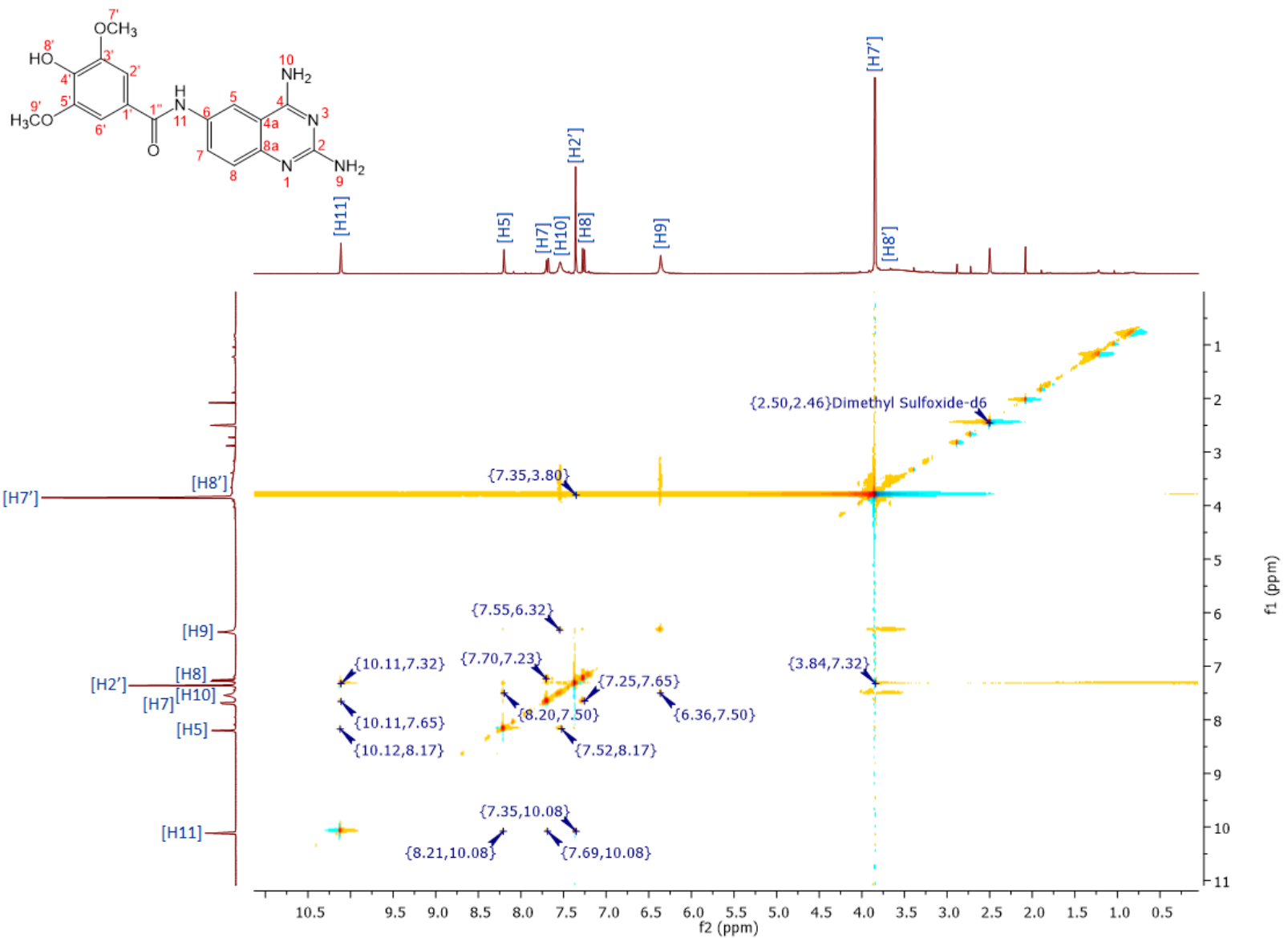


Figura 15. Espectro de FT-IR de 4-[2-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)carbamoil]-2,6-dimetoxifenil 3-(diethylamino)propanoato (LCAC137)

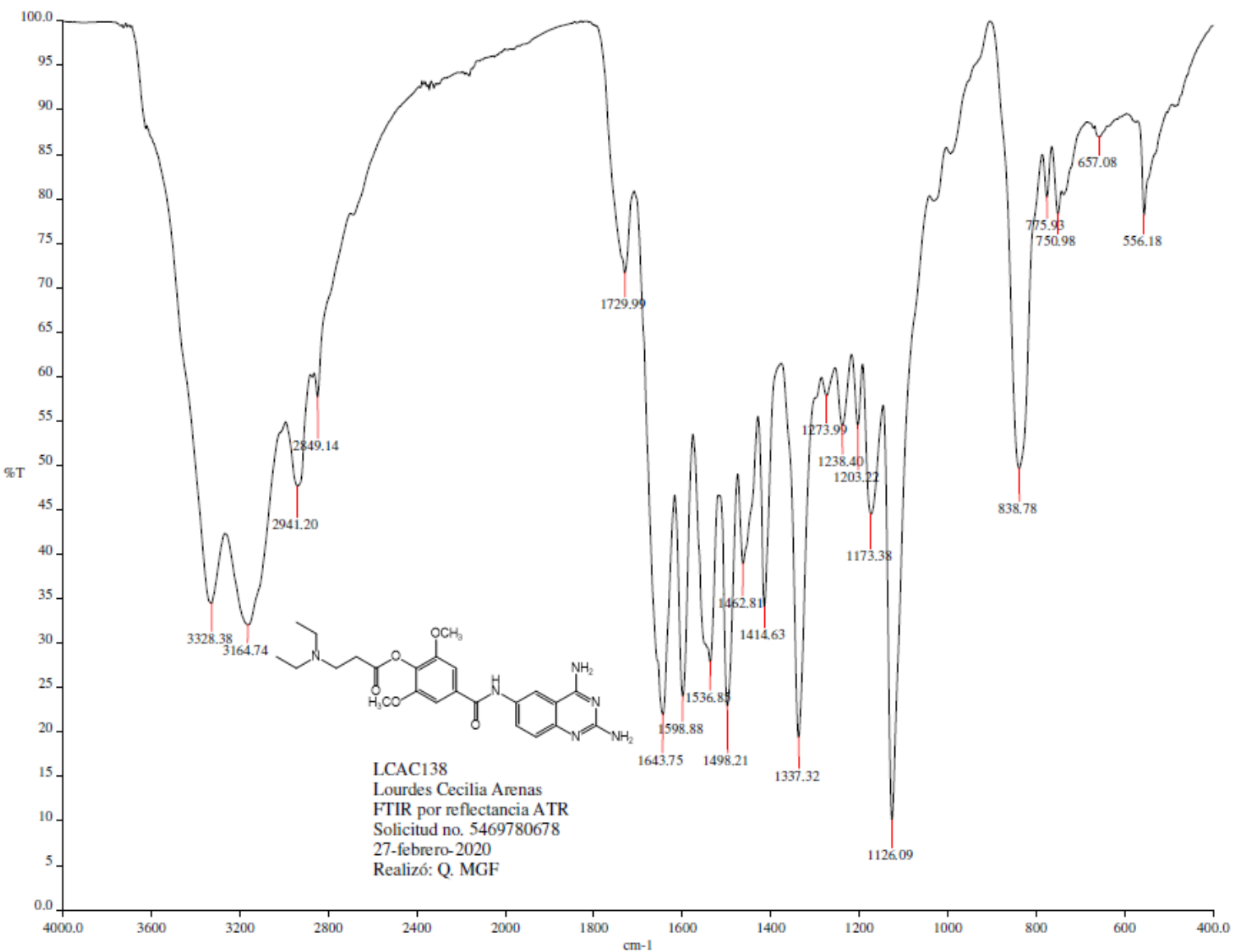


Figura 16. Espectro de masas por APCI de alta resolución de 4-[2,4-diaminoquinazolin-6-il]carbamoil]-2,6-dimetoxifenil 3-(diethylamino)propanoato (LCAC137)

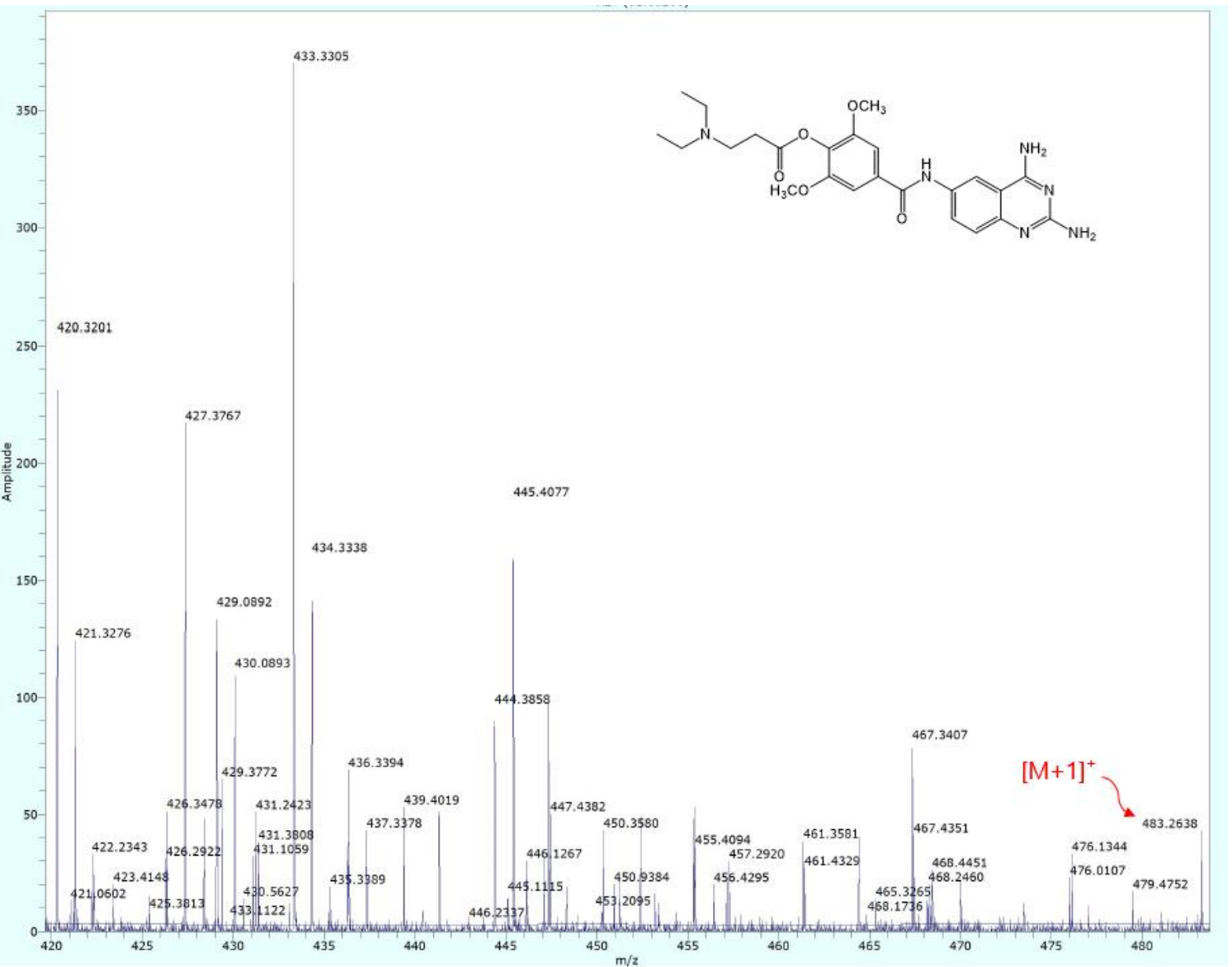


Figura 17. Espectro de RMN ^1H de 4-[(2,4-diaminoquinazolin-6-il)carbamoil]-2,6-dimetoxifenil 3-(dietilamino)propanoato (LCAC137)

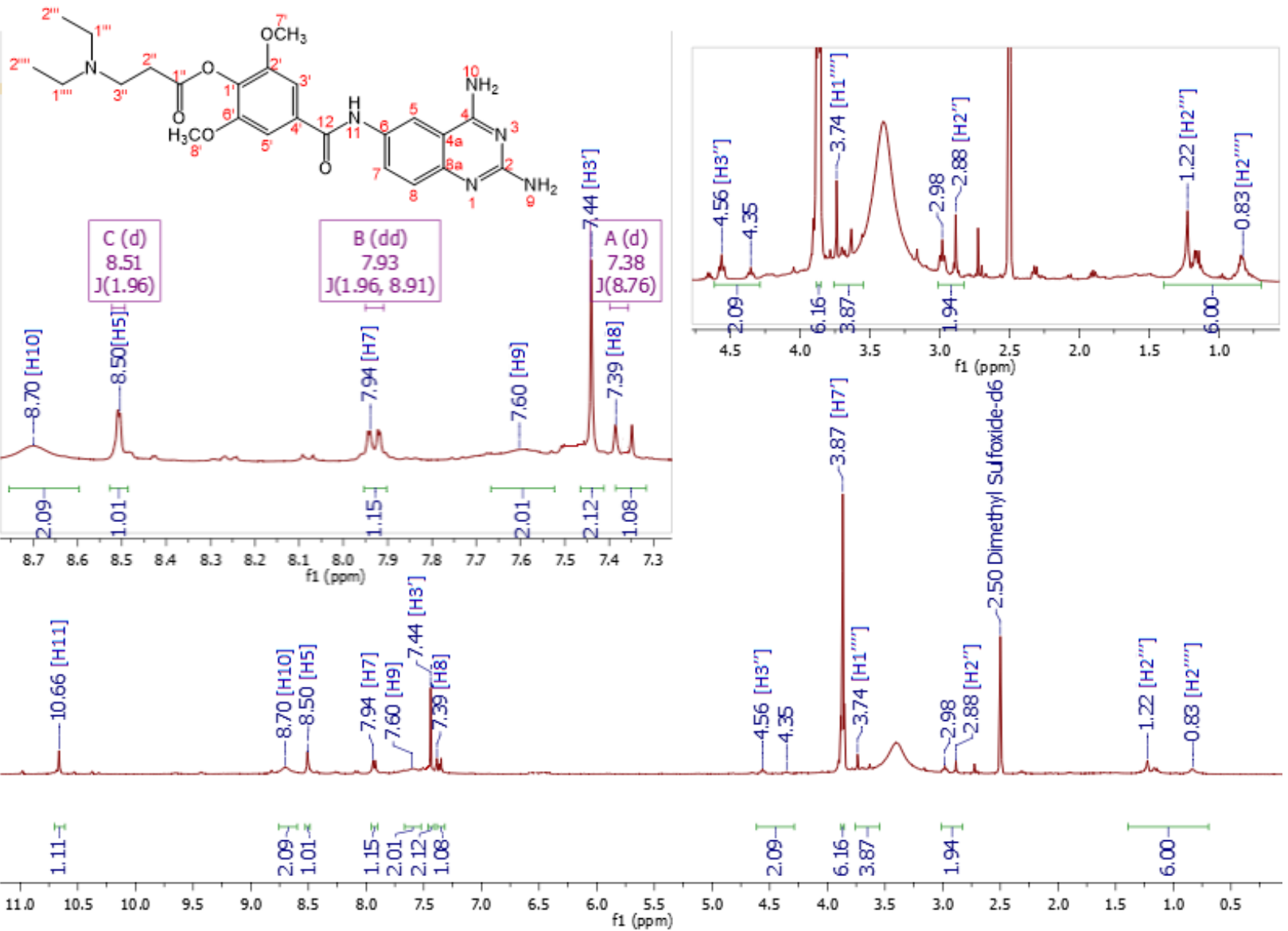


Figura 18. Espectro de RMN COSY de 4-[2,4-diaminoquinazolin-6-il]carbamoil]-2,6-dimetoxifenil 3-(diethylamino)propanoato (LCAC137)

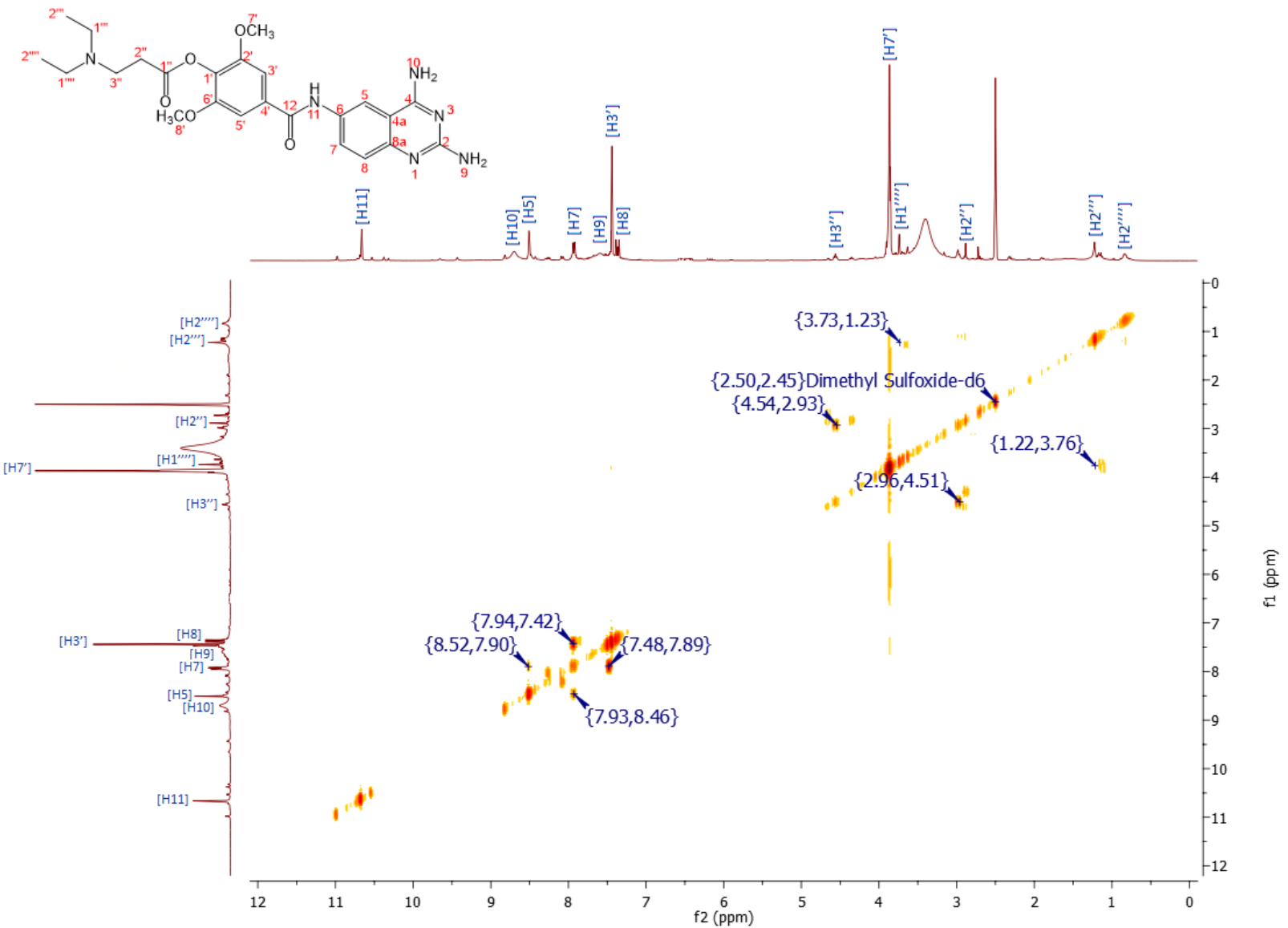


Figura 19. Espectro de RMN ^{13}C de 4-[(2,4-diaminoquinazolin-6-il)carbamoil]-2,6-dimetoxifenil 3-(dietilamino)propanoato (LCAC137)

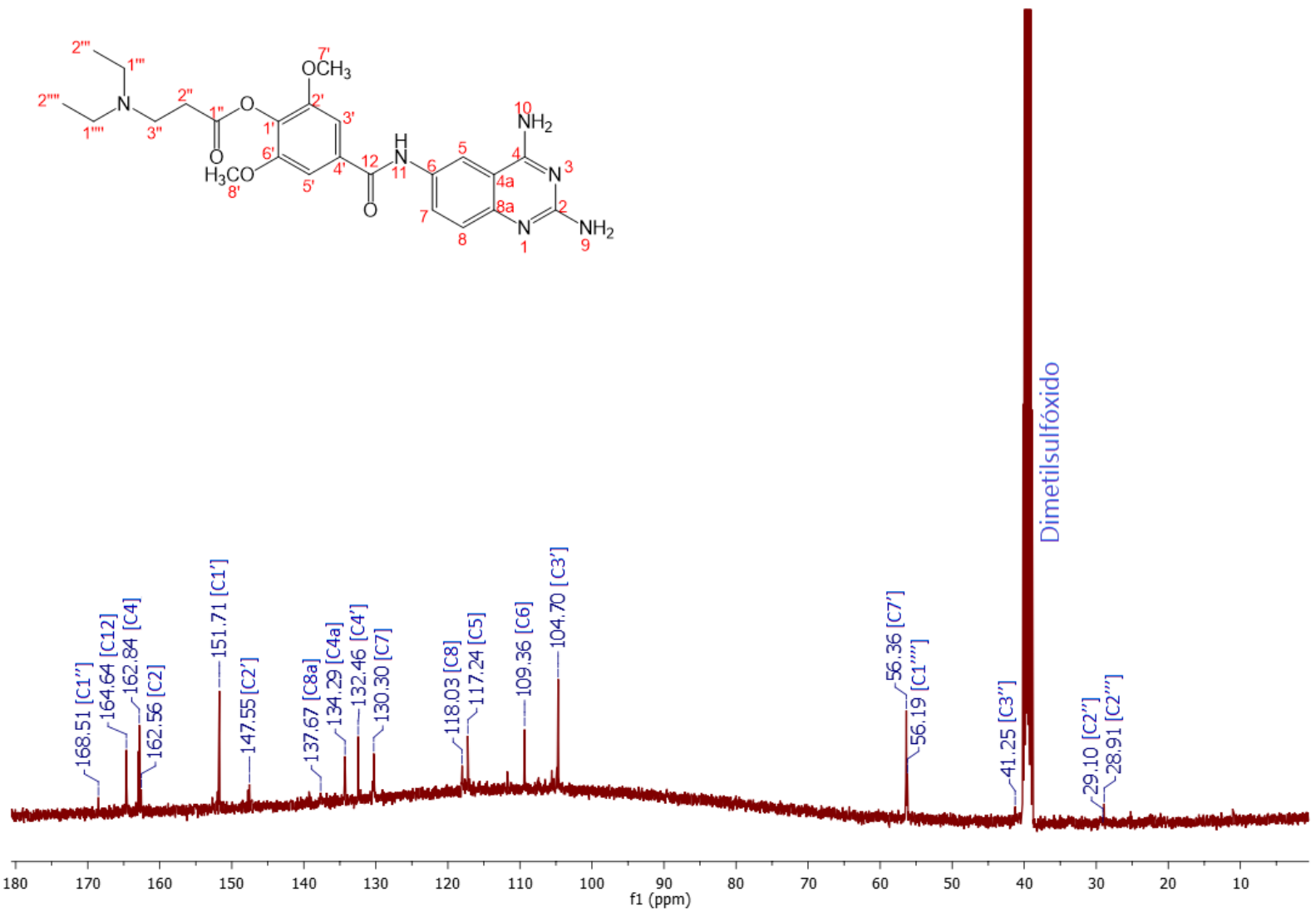


Figura 20. Espectro de RMN HSQC de 4-[(2,4-diaminoquinazolin-6-*il*)carbamoil]-2,6-dimetoxifenil 3-(dietilamino)propanoato (LCAC137)

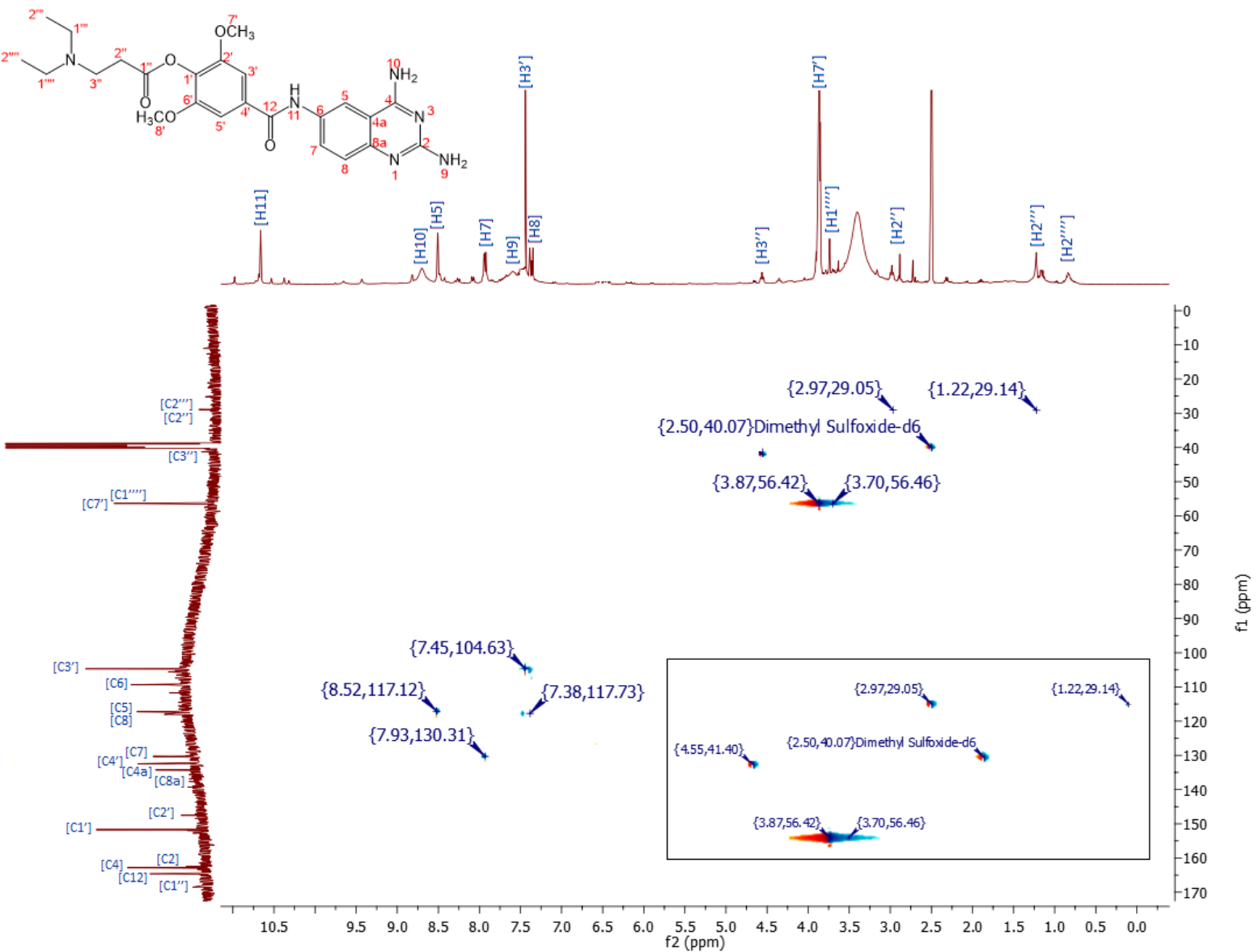


Figura 21. Espectro de RMN HMBC de 4-[(2,4-diaminoquinazolin-6-il)carbamoil]-2,6-dimetoxifenil 3-(dietilamino)propanoato (LCAC137)

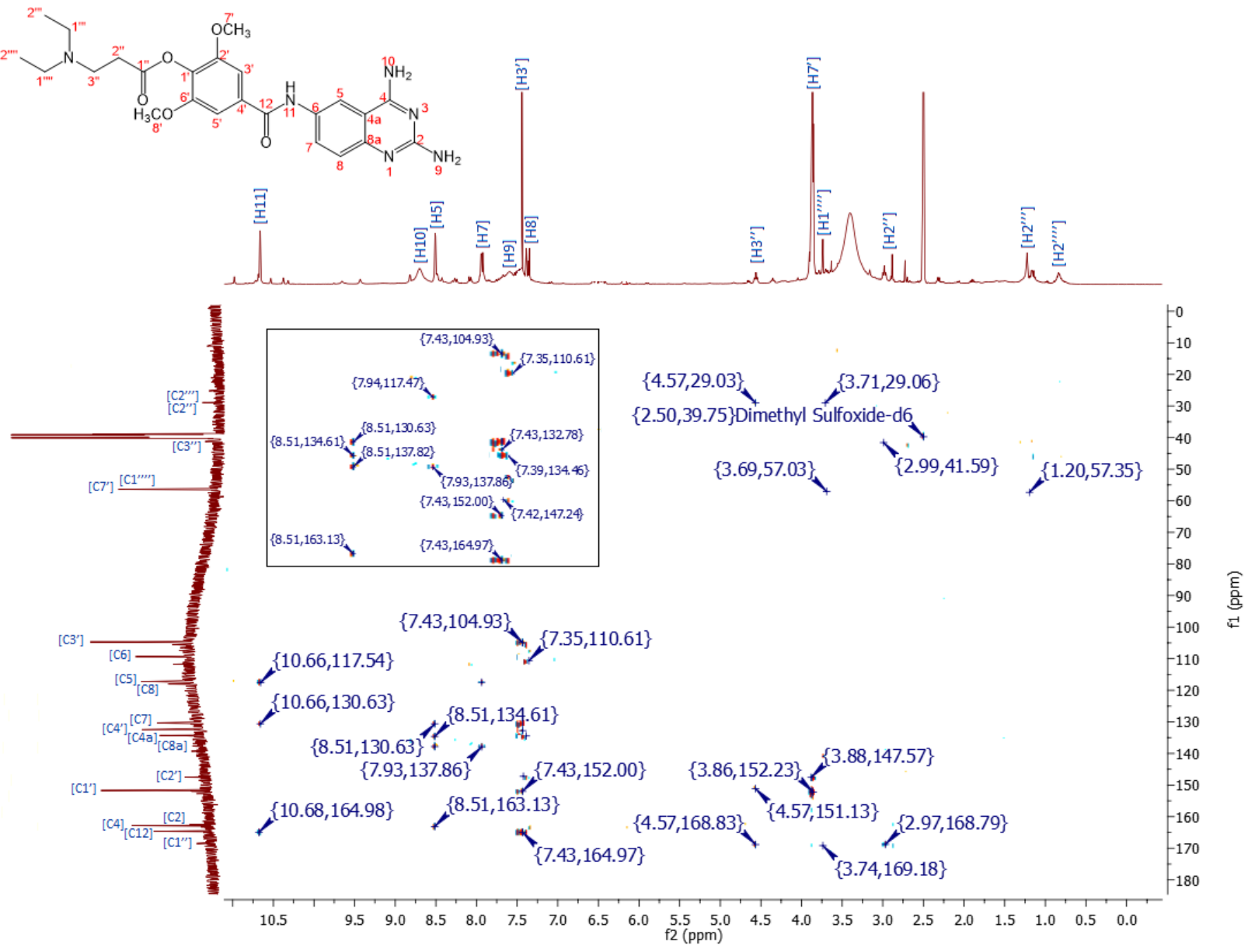


Figura 22. Espectro de RMN NOESY de 4-[(2,4-diaminoquinazolin-6-*il*)]carbamoil]-2,6-dimetoxifenil 3-(dietilamino)propanoato (LCAC137)

