



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Síntesis y evaluación biológica de derivados de quinazolina diseñados como potenciales agentes citotóxicos y moduladores de la actividad de dianas biológicas de importancia terapéutica

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. Diego Ignacio Figueroa Figueroa

Tutor: Dr. Francisco Hernández Luis
Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM

Ciudad de México, septiembre de 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PARTE DEL PRESENTE TRABAJO FUE PRESENTADO EN EL 7° SIMPOSIO DE QUÍMICA FARMACÉUTICA

- 7° Simposio de Química Farmacéutica celebrado del 30 de junio al 2 de julio de 2021 en la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México. Trabajo: “Novel quinazoline-type inhibitors of bovine xanthine oxidase and cytotoxic activity against cancer cell lines.” **Figuroa-Figuroa Diego I.**, Hernández-Luis Francisco. Departamento de Farmacia. Facultad de Química, UNAM.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE:	Dr. Mariano Martínez Vázquez	Instituto de Química, UNAM
VOCAL:	Dra. Adela Rodríguez Romero	Instituto de Química, UNAM
VOCAL:	Dr. Alfonso Sebastián Lira Rocha	Facultad de Química, UNAM
VOCAL:	Dr. Alfredo Téllez Valencia	Universidad Juárez del Estado de Durango
SECRETARIO:	Dr. Eduardo Hernández Vázquez	Instituto de Química, UNAM

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**Laboratorio 121, Edificio de Bioquímica y Farmacia, Conjunto E, Facultad de Química,
Universidad Nacional Autónoma de México**

A mis padres por su ejemplo y su amor incondicional, a Jessy por ser lo mejor que me ha pasado y a mi tía Luz por todo su apoyo y cariño.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser un ejemplo de desarrollo y vanguardia para la sociedad mexicana y en el mundo.

A la Facultad de Química, UNAM por brindarnos todos los recursos para dar lo mejor de nosotros. Especialmente por el apoyo a la realización de estudios de espectroscopía y espectrometría a través del PAIP 5000-9136

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado (No. CVU 1002365)

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas por la oportunidad brindada para obtener el grado de maestría.

A la Dirección General de Profesiones (DGAPA) por el apoyo otorgado para la compra de reactivos y materiales para los procesos de síntesis de los compuestos a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), proyecto No. IN223120

A la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAII) de la Facultad de Química por el servicio de análisis, especialmente, al personal técnico de las áreas de Resonancia Magnética Nuclear (M.C. Nayeli López Balbiaux) y Espectrometría de Masas (Dra. Jessica Amacosta Castillo)

Al Laboratorio de Pruebas Biológicas LSA del Instituto de Química de la UNAM, por llevar a cabo los estudios de citotoxicidad en las líneas celulares solicitadas.

A la Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de la Información (DGTIC) de la UNAM, por el soporte brindado para el uso de supercomputadora HP Cluster Platform 3000SL "Miztli" (LANCAD-UNAM-DGTIC-207)

Al Dr. Francisco Hernández Luis por permitirme pertenecer a su grupo de investigación. Agradezco también todo su apoyo, todos sus consejos, toda su paciencia y motivación para llevar a cabo los proyectos propuestos.

A la Dra. Marina Gavilanes Ruiz por acceder a ser mi tutora en el Subprograma 121 "Formación de Profesores". Actividad desarrollada durante los estudios de maestría.

Al Dr. Rodrigo Aguayo Ortiz por todos sus consejos, su apoyo y su disposición para colaborar en el artículo publicado en junio de 2021.

Al Dr. Salvador Audifáz Matus Meza por todos sus consejos y sus enseñanzas en las técnicas para llevar a cabo la síntesis de las moléculas presentadas.

A mis amigos del laboratorio 121 Frida Herrera, Cecilia Arenas, Andrés del Valle, Roberto Garduño, Bárbara Lerate, Nancy Allende, Andrea Martínez, Michelle Barbosa y especialmente, quiero agradecer a Ulises Martínez por toda su amistad; sería muy difícil trabajar sin un amigo que te saque una sonrisa cuando más se necesita, que te dé un buen consejo y que siempre sea un apoyo y no un desaliento.

A mis padres, Magdalena y Arturo por ser los responsables de quién soy y de quién seré. Es un honor ser su hijo y ustedes son mi motor que me impulsa siempre a seguir adelante. Por ustedes y para ustedes es este trabajo.

A Jessica Morales Feroso por ser mi guía, mi luz, mi motivación y todo lo que necesito en esta vida. Me has acompañado en mis mejores y peores momentos. Este trabajo también te lo dedico y ten por seguro que todo mi esfuerzo y cariño siempre van a estar contigo.

Agradezco de todo corazón a Araceli Feroso, Gerardo Morales y Angélica Morales por todo su apoyo incondicional. Son una pieza fundamental en mi vida y gracias a ustedes he podido salir adelante.

A mi tía Luz, por ser un gran apoyo y una gran motivación para todo lo que he hecho en mi vida. Siempre me sacas una sonrisa y me impulsas a sacar lo mejor de mi aun cuando las cosas no van bien.

A mi hermana Magdalena por ser mi soporte, confidente y la mejor hermana del mundo. Ahora más que nunca, no sabes cuánto aprecio el hecho de tenerte cerca y dejarme ser el padrino de Ximena y Sofía.

A mis amigos y compañeros que de alguna o de otra forma siempre han estado presentes, de verdad los tengo en mi corazón.

A los miembros del jurado por sus valiosos aportes a este trabajo.

Contenido

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	9
1. INTRODUCCIÓN	11
2. ANTECEDENTES	12
2.1. CÁNCER	12
2.1.1. CARCINOGENÉISIS	12
2.1.2. CARACTERÍSTICAS DEL CÁNCER	13
2.1.3. ADICCIÓN ONCOGÉNICA Y LETALIDAD SINTÉTICA	14
2.1.4. EPIDEMIOLOGÍA MUNDIAL Y EN MÉXICO	15
2.1.5. TERAPIA ANTITUMORAL	16
2.1.5.1. Quimioterapia	17
2.2. SEÑALIZACIÓN DE CRECIMIENTO CELULAR	17
2.2.1. RECEPTORES ACOPLADOS A TIROSINA KINASA	18
2.2.1.1. EGFR	19
2.3. ESTRÉS OXIDANTE	21
2.3.1. ESPECIES REACTIVAS	22
2.3.2. XANTINA OXIDORREDUCTASA	23
2.3.2.1. Inhibidores de xantina oxidoreductasa	26
2.4. INVESTIGACIONES PREVIAS EN NUESTRO GRUPO DE TRABAJO	27
2.4.1. DERIVADOS TIPO QUINAZOLINA-2,4,6-TRIAMINA	27
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	31
4. HIPÓTESIS	31
5. OBJETIVOS	32
5.1. OBJETIVOS GENERALES	32
6. DISEÑO DE LOS DERIVADOS DE QUINAZOLINA	32
7. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS	35
7.1. SÍNTESIS DEL INTERMEDIARIO INT1	35
7.2. SÍNTESIS DE LOS INTERMEDIARIOS INT2A,B	37
7.3. SÍNTESIS DE LOS INTERMEDIARIOS INT3A,B	38
7.4. SÍNTESIS DE PRODUCTOS 4A,B(1-5)	41

7.5. ANÁLISIS INSTRUMENTAL DE PRODUCTOS FINALES 4A,B(1-5)	42
8. ENSAYOS DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA	46
8.1. INHIBICIÓN DE bXO	46
8.1.1. METODOLOGÍA	46
8.1.1.1. Porcentaje de la actividad de bXO	46
8.1.1.2. Estudio cinético de bXO en ausencia y en presencia de inhibidores	47
8.1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
8.2. INHIBICIÓN DE HEGFR	49
8.2.1. METODOLOGÍA	50
8.2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
9. ESTUDIOS DE ACOPLAMIENTO MOLECULAR	51
9.1. ACOPLAMIENTO MOLECULAR EN bXOR	51
9.1.1. METODOLOGÍA	53
9.1.1.1. Preparación de la proteína	53
9.1.1.2. Preparación de los ligandos	53
9.1.1.3. Producción del acoplamiento molecular	53
9.1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
9.1.2.1. Acoplamiento molecular en el sitio de unión de bXO	54
9.1.2.2. Identificación del sitio alostérico mediante acoplamiento molecular ciego	58
9.2. ACOPLAMIENTO MOLECULAR EN HEGFR	60
9.2.1. METODOLOGÍA	60
9.2.1.1. Preparación de la proteína	60
9.2.1.2. Preparación de los ligandos	60
9.2.1.3. Producción del acoplamiento molecular	60
9.2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
10. EVALUACIÓN BIOLÓGICA EN LÍNEAS CELULARES	62
10.1. METODOLOGÍA	62
10.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	63
11. CONCLUSIONES	65
12. REFERENCIAS	67

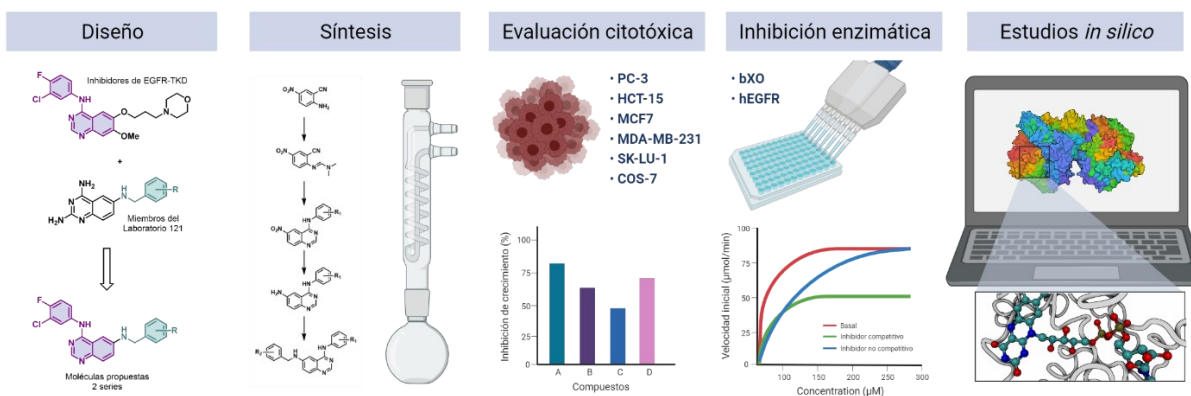
Abreviaturas y Acrónimos

°C	grados Celsius	μM	micromolar (10^{-6} M)
AcOEt	Acetato de etilo	mU	miliunidades proteicas (10^{-3} U)
AcOH	Ácido acético	nm	nanómetros
Ar	Arilo	OD	Densidad óptica
ATP	Adenosina trifosfato	OMS	Organización Mundial de la Salud
CCF	Cromatografía en capa fina	p.f.	Punto de fusión
DCM	Diclorometano	Pd/C	Paladio sobre carbono
DMF	Dimetilacetal de la dimetilformamida	pH	Logaritmo inverso de la concentración de protones
DMF-DMA	Dimetilformamida dimetilacetal	R.f.	Factor de retención
hEGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano	RMN	Resonancia magnética nuclear
EtOH	Etanol	ROS	Especies reactivas de oxígeno
FOX	Oxidación ferrosa-anaranjado de xilenol	T	temperatura
g	gramos	t	tiempo
h	horas	TFA	Ácido trifluoroacético
HEPES	Amortiguador de HEPES pH 7.5	U	unidades proteicas
iPrOAc	Acetato de isopropilo	UV	Ultravioleta
L	litro	UV-Vis	Ultravioleta-visible
λ	longitud de onda	X	xantina
M	molar	XDH	Xantina deshidrogenasa
MeCN	Acetonitrilo	bXO	Xantina oxidasa bovina
MeOH	Metanol	XOR	Xantina óxidoreductasa
mg	miligramos	δ	Desplazamiento químico
min	minutos	EM-APCI	Espectrometría de masas – por ionización química a presión atmosférica
mL	mililitro (10^{-3} L)	FADH₂/FAD	Flavina adenina dinucleótido
μL	microlitro (10^{-6} L)	NADH/NAD⁺	Nicotina adenina dinucleótido
mM	milimolar (10^{-3} M)	PDB	Protein Data Bank

Resumen

En este trabajo se siguieron dos estrategias, enmarcadas bajo el rubro de letalidad sintética, para encontrar nuevas moléculas con acción citotóxica en células cancerosas. La primera, contempló inhibir una enzima que participa en la homeostasis redox de la célula, la xantina oxidorreductasa (XO). La segunda estrategia consideró provocar la inhibición de la porción de tirosina cinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), responsable de diversas vías de señalización que conducen al crecimiento celular descontrolado. Los compuestos diseñados, derivados de quinazolina, fueron sintetizados. Con ellos, se llevó a cabo un estudio de inhibición en las dos enzimas antes mencionadas. La búsqueda del posible modo de acción sobre XO se realizó mediante la evaluación de parámetros implicados en el comportamiento del inhibidor en la cinética enzimática. Se realizaron estudios de acoplamiento molecular para buscar el modo de unión en ambas enzimas y posibles sitios de modificación para futuras moléculas. Finalmente, los compuestos sintetizados se evaluaron en su comportamiento citotóxico frente a cinco líneas celulares cancerosas.

In order to advance research into new therapies for cancer treatment, two strategies were pursued in the search for new active molecules. The first sought to inhibit an enzyme known to cause an imbalance in the ROS species generated in the cell, xanthine oxidase (XO). The second strategy involved inhibiting a prototype receptor for altering cell growth and signaling, the epidermal growth factor receptor (EGFR). The synthesis of a series of 10 quinazoline-derived compounds divided into two series, A and B, was carried out. With these, an enzymatic inhibition study was carried out on bOX and hEGFR. The possible mode of action of the compounds on bXO was determined with an enzyme kinetics study. Molecular docking studies were performed to look for the possible binding mode in both enzymes and possible modification sites for future molecules. Finally, a cytotoxicity study in five cancer cell lines provided information on possible molecules with high levels of cell growth inhibition.



1. Introducción

El cáncer es una enfermedad que afecta a todos por igual sin importar la edad, el sexo, comorbilidades o clase social. De igual forma, todos los órganos del cuerpo pueden entrar en un estado canceroso después de ciertas fallas que ocurren al interior de las células debido a ciertos factores externos o internos o bien, una combinación de ambos.

Por años, diversos grupos de investigación y empresas farmacéuticas han estado buscando alternativas cada vez más seguras y eficaces para tratar el cáncer. Y es que no es un problema menor, el cáncer actualmente ocupa el segundo lugar en mortalidad debida a enfermedades, seguido por las afecciones cardiovasculares.

Se han empleado múltiples estrategias para lograr prevenir o detener el cáncer, desde las más efectivas y que, actualmente forman parte de la primera línea de tratamiento como la quimioterapia, la cirugía o la radioterapia, hasta metodologías modernas que avanzan con el descubrimiento de nuevas características de las células cancerosas o el desarrollo de nuevas moléculas, biomoléculas o materiales.

Diversas proteínas, catalogadas por la FDA como dianas terapéuticas (*FDA approved drug targets*), son una de las principales formas por las que se puede abordar el tema de diseño de moléculas para una enfermedad específica. En el contexto del trabajo aquí presentado, una variedad enorme de proteínas se ha asociado con el proceso de cáncer, entre ellas el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), la proteína p53, la telomerasa, entre otras. También, otras proteínas catalogadas como dianas terapéuticas pero que no se han relacionado directamente con el proceso canceroso, han cobrado fuerza en los últimos años debido a la implementación de estrategias como la polifarmacología (el uso de una misma molécula para actuar en múltiples dianas). Así, en este trabajo se implementó esa estrategia para modular la actividad de dos dianas terapéuticas distintas, EGFR y xantina oxidasa, involucradas en la formación de ácido úrico y la producción de especies reactivas de oxígeno.

Además, este trabajo se suma a otros desarrollados por nuestro grupo de investigación en cuanto al descubrimiento de moléculas con actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer. Estudios previos realizados por nuestro grupo, han modificado diversas posiciones del anillo de quinazolina, desde compuestos tipo quiazolin-2,4,6-triamina hasta compuestos tipo 4-anilinoquinazolina. De manera general, se han obtenido resultados que retrasan o detienen el crecimiento celular de algunas líneas cancerosas. Tomando como base esos resultados que se han obtenido, se buscó llevar a cabo la estrategia de hibridación, es decir, conjuntar en una sola molécula, fragmentos que han resultado importantes para la actividad citotóxica, y otros fragmentos de moléculas cuya actividad antitumoral ya ha sido comprobada y, que actualmente, se encuentran disponibles para su uso en quimioterapia.

2. Antecedentes

2.1. Cáncer

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) el cáncer o neoplasia maligna, es un grupo de enfermedades que pueden iniciar en cualquier órgano o tejido del cuerpo cuando un conjunto de células anormales crece descontroladamente e invaden partes del cuerpo aledañas para extenderse hacia otros órganos.¹ Las estadísticas indican que el cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial, antecedida por las enfermedades cardiovasculares². Los factores demográficos, como el aumento del tamaño de la población, la esperanza de vida y -sobre todo en los países de altos ingresos- el envejecimiento de la población, hacen que el número total de muertes por cáncer siga aumentando.

2.1.1. Carcinogénesis

El proceso por el cual las células normales se transforman en células cancerosas se denomina carcinogénesis u oncogénesis. El desarrollo de un tumor maligno en un tejido sano es el resultado de una compleja serie de acontecimientos que comienzan con una sola célula que ha adquirido propiedades malignas a través del daño del ADN celular.

La mayoría de las teorías actuales sobre la carcinogénesis la caracterizan como un proceso de varios pasos que incluye la iniciación, la promoción, la progresión, la invasión y la metástasis (Figura 2.1).³

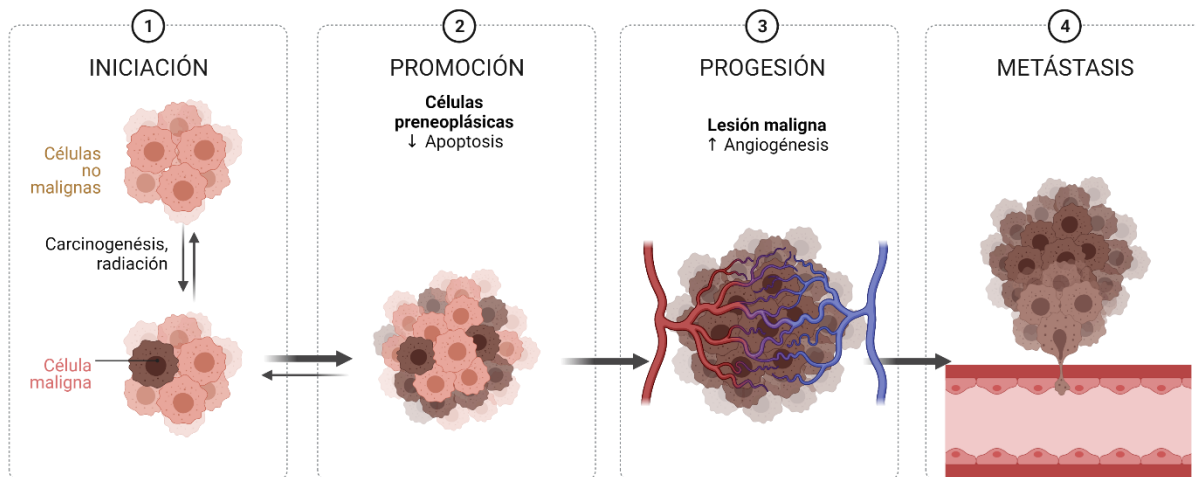


Figura 2.1. Etapas del desarrollo de una neoplasia maligna. Cuando por diversos factores una célula no maligna irreversiblemente se pueden convertir en células malignas se denomina iniciación. La etapa en que una célula maligna propicia la formación de más células malignas se denomina promoción. Posteriormente, cuando existe una lesión maligna, es decir un conglomerado de células cancerosas con la característica de que comienzan a requerir oxígeno y nutrientes tenemos el fenómeno de progresión. Finalmente, cuando el tumor migra hacia otras partes del cuerpo se denomina metástasis. (Creada con BioRender.com)

Las causas por las que una célula adquiere propiedades malignas son diversas y normalmente asociadas a múltiples factores. De hecho, se ha mostrado que sólo un tercio de los casos de cáncer son atribuibles a factores ambientales o a predisposiciones heredadas (factores extrínsecos); la gran mayoría son el resultado de mutaciones aleatorias que pueden producirse cuando el ADN se replica en células normales no cancerosas.⁴⁻⁶ Sin embargo, otros estudios concluyen que los factores intrínsecos (relacionados con errores en el ADN) son responsables de menos del 10–30% del desarrollo del cáncer, y que la mayoría se debe a factores de riesgo extrínsecos.⁷

Aunque exista debate entre cuál de los factores -extrínsecos o intrínsecos- son mayormente responsables de la formación de células malignas, es un hecho que la carcinogénesis puede ser resultado de alteraciones físicas, químicas, biológicas en las células individuales. (Figura 2.2)

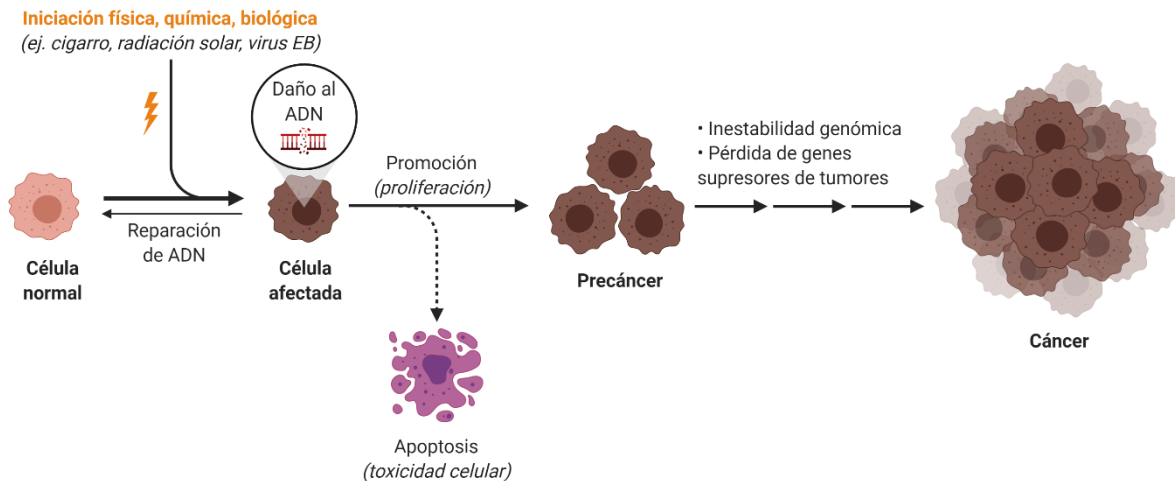


Figura 2.2. La carcinogénesis es un proceso multifactorial, la genética y el medio ambiente influyen en la adquisición de características que desencadenan la proliferación descontrolada de las células del cuerpo. (Creada con BioRender.com)

2.1.2. Características del cáncer

En el año 2000, los científicos estadounidenses, Douglas Hanahan y Robert A. Weinberg publicaron un estudio en el que presentaron seis capacidades moleculares, bioquímicas y celulares, adquiridas por muchas o quizá, por la mayoría de los tipos de células cancerosas.⁸ El progreso en el estudio del cáncer, llevó al conocimiento de nuevas

características que se agregaron a la lista original. Esto dio lugar a una segunda publicación de los mismos autores una década después.⁹ (Figura 2.3)

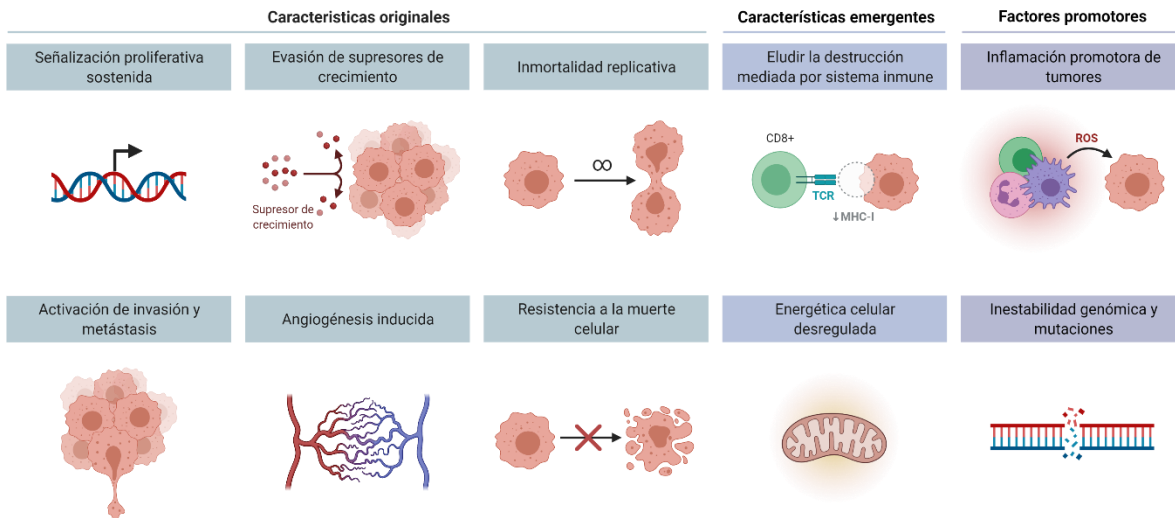


Figura 2.3. Características del cáncer. Se muestran las características originales descritas por Hanahan y Weinberg, características emergentes descritas por estudios posteriores y factores que promueven el desarrollo de dichas distinciones. (Creada con BioRender.com)

Aún a la fecha, el avance en las investigaciones sobre cáncer sigue actualizando el conjunto de características que poseen las células cancerosas. Una de las más recientes sugiere que los tumores se pueden dividir en dos categorías: aquellos que presentan la expresión de la proteína YAP (Yes-Associated Protein) -un factor de transcripción previamente identificado en procesos de proliferación y apoptosis-¹⁰ y aquellos que no lo manifiestan.¹¹

2.1.3. Adicción oncogénica y letalidad sintética

El término adicción oncogénica fue acuñado por primera vez por Bernard Weinstein¹², postula que, a pesar de la diversidad de lesiones genéticas típicas del cáncer, algunos tumores dependen de un oncogén dominante único para su crecimiento y supervivencia, por lo que la inhibición de este oncogén específico es suficiente para detener el fenotipo neoplásico. El término ha sido reforzado por varios hallazgos reportados en modelos animales donde los tumores inducidos por oncogenes, ya sea generados como xenoinjertos o mediante el uso de modelos modificados por ingeniería genética, se han encontrado que experimentan regresión, asociada con paro proliferativo, apoptosis, y/o diferenciación después de la inhibición aguda de la función oncoproteica.^{13,14}

Numerosos estudios sobre líneas celulares de cáncer humano indican que, aunque estas células son aneuploides y portan varios genes y anomalías epigenéticas, también pueden ser altamente dependientes de la actividad de un único oncogén para la continua proliferación celular y supervivencia.^{13–17}

Unos años antes de describir el proceso de adición oncogénica, otro término importante surgió como pilar en la investigación para la búsqueda de tratamientos para el cáncer, la letalidad sintética. Esta, establece que dos genes son letales sintéticos si la mutación de uno de ellos es compatible con la viabilidad, pero la mutación de ambos conduce a la muerte.¹⁸ Por lo tanto, la inhibición de los productos de genes que son letales sintéticos para las células cancerígenas debería, por definición, matar a las células que son susceptibles a dicho efecto al tiempo que se preservan las células normales.¹⁹ En el contexto del trabajo aquí presentado no se pretende mutar un gen para alterar la viabilidad de las células cancerosas sino afectar a los productos de sus genes, es decir, inhibir a ciertas proteínas involucradas en algunos procesos que promueven el cáncer.

2.1.4. Epidemiología mundial y en México

Se estimó que en 2017 murieron 9.6 millones de personas en todo el mundo por las distintas formas de cáncer. Uno de cada seis decesos en el mundo se debe al cáncer, lo que lo convierte en la segunda causa de fallecimientos —sólo superada por las enfermedades cardiovasculares—². Dado que el cáncer es una de las principales causas de muerte, es uno de los problemas más urgentes del mundo.

Si se desglosa por tipo de cáncer, el cáncer de mama es el más frecuente a nivel mundial. Tras el cáncer de mama se encuentran el de próstata y el de colon y recto. (Figura 2.4A)

Los datos de cáncer en México no son muy diferentes al panorama mundial, pues es la tercera causa de muerte, después de las enfermedades cardiovasculares y la diabetes.²⁰ Además, de acuerdo con cálculos de organismos internacionales, los casos de cáncer de mama, próstata, cervicouterino, colorrectal y de pulmón son los más recurrentes en la población mexicana de ambos sexos.²⁰ Al igual que en el mundo, México ha tenido un aumento de casos en los últimos 20 años debido al crecimiento y envejecimiento de la población.^{21–23}

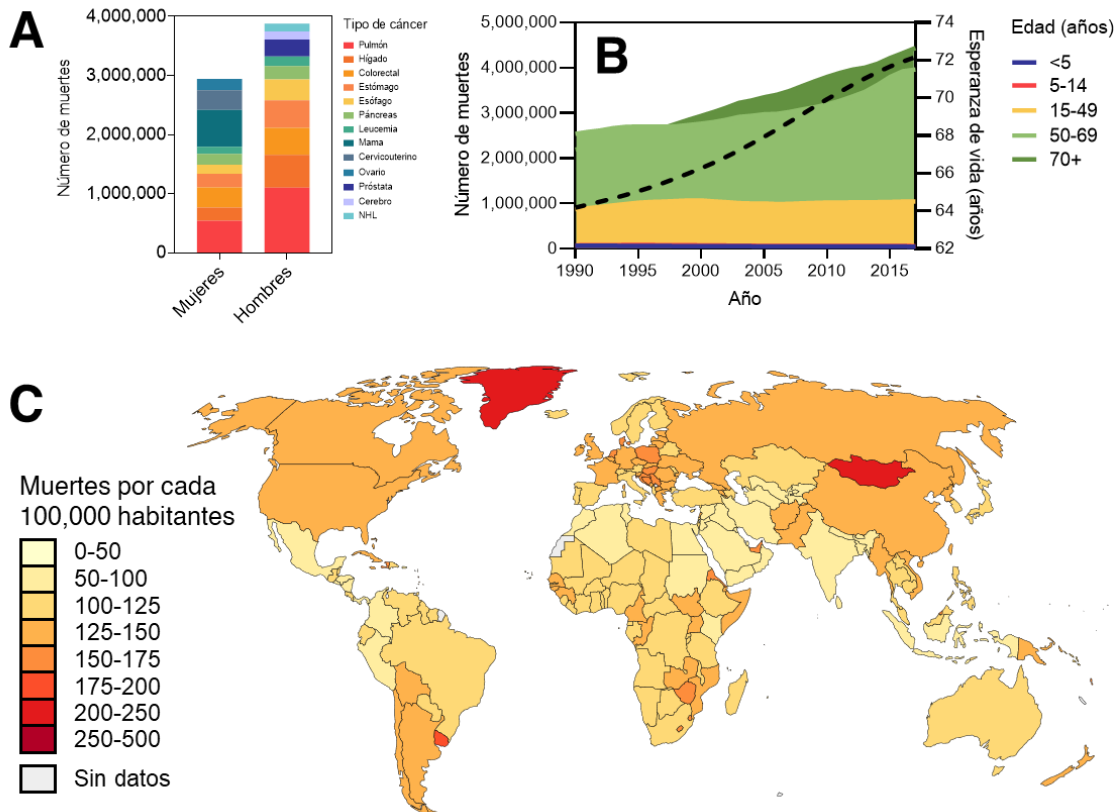


Figura 2.4. Epidemiología del cáncer. (A) Gráfica de comparación entre hombres y mujeres por número de muertes por cáncer. (B) Gráfica que muestra la relación por grupo de edad y el número de muertes desde 1990 hasta 2017. En línea punteada se muestra la esperanza de vida en ese mismo intervalo de tiempo y su relación con el aumento de casos en las personas de 70 años o más. (C) Mapa coloreado de acuerdo con el número de muertes por cada 100,000 habitantes. Los países con más alto desarrollo tienden a tener los índices más altos de muertes por cáncer por tener una mayor esperanza de vida. (Fuente: IHME, Global Burden of Disease)

2.1.5. Terapia antitumoral

Existen muchos tipos de tratamientos para el cáncer.²⁴ (Figura 2.5). Los tipos que una persona reciba dependerán del tipo de cáncer que tenga y qué tan avanzado esté. Algunos pacientes reciben solo un tratamiento. Pero a la mayoría se les aplica una combinación, como cirugía con quimioterapia o radioterapia.

Este proyecto está basado en la quimioterapia antitumoral, por lo que se omiten detalles acerca de los otros tipos de terapia.

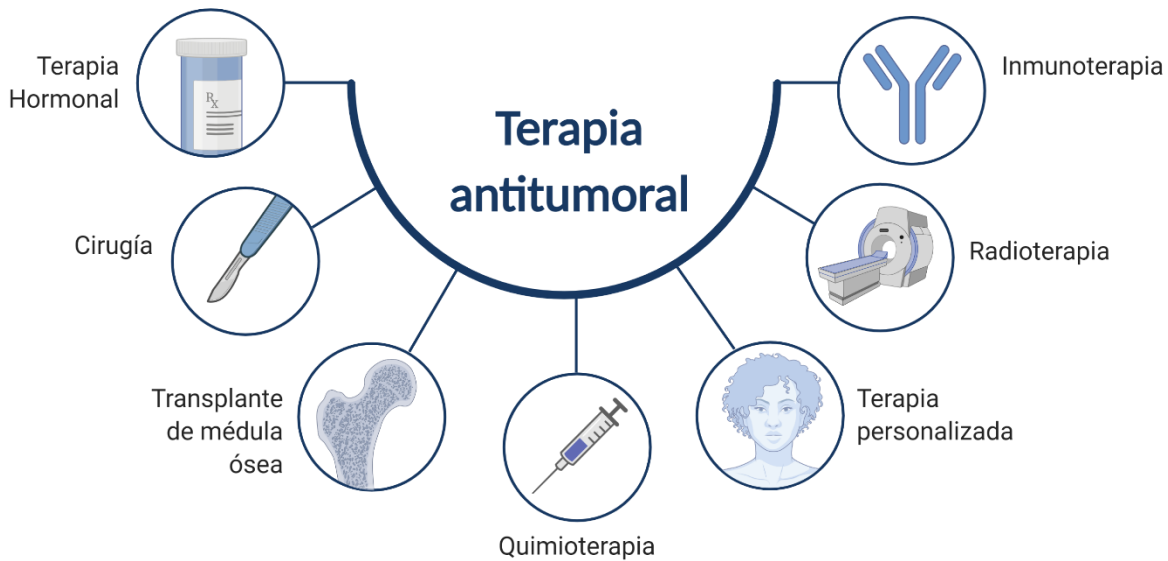


Figura 2.5. Opciones actuales de terapia antitumoral. (Creada con BioRender.com)

2.1.5.1. Quimioterapia

El término "quimioterapia" fue acuñado por el químico alemán Paul Ehrlich, quien investigó el uso de fármacos para tratar enfermedades infecciosas.

La quimioterapia consiste en la aplicación de uno o más agentes químicos. Para el caso particular del cáncer, la quimioterapia funciona sobre células que crecen y se dividen rápidamente. La quimioterapia se utiliza con dos objetivos principales: 1) tratar el cáncer y 2) aliviar los síntomas de cáncer.

La quimioterapia representa la columna vertebral del tratamiento de muchos cánceres en diferentes etapas de la enfermedad. Por lo tanto, la resistencia quimioterapéutica resulta en el fracaso terapéutico y, por lo general, (eventualmente) en la muerte.²⁵

Uno de los problemas más graves de la quimioterapia es que no sólo elimina las células cancerosas, sino que también afecta el crecimiento de las células sanas que crecen y se dividen rápidamente. Algunos ejemplos son las células que recubren la boca, los intestinos y las que hacen que el cabello crezca. El daño a las células sanas puede causar efectos secundarios, como llagas en la boca, náuseas y alopecia. Los efectos secundarios a menudo mejoran o desaparecen después de haber terminado la quimioterapia.

2.2. Señalización de crecimiento celular

La señalización celular es uno de los procesos más complejos e importantes de las células para comunicarse. El estudio de la comunicación celular se centra en cómo una célula da y recibe mensajes con su entorno y consigo misma. En efecto, las células no viven aisladas. Su supervivencia depende de la recepción y el procesamiento de la información procedente del entorno exterior, ya sea la relativa a la disponibilidad de nutrientes, los cambios de temperatura o las variaciones en los niveles de luz.²⁶

El papel de la señalización impulsada por los factores de crecimiento en la patogénesis del cáncer humano está establecido desde hace tiempo. Una de las primeras teorías sobre la señalización en el cáncer se denominó la teoría de la secreción autocrina. Esta teoría propone que las células cancerosas generalmente muestran una disminución de factores de crecimiento exógenos para mantener una tasa de proliferación elevada. Esta relajación en la dependencia del factor de crecimiento se debe en parte a la capacidad de las células tumorales de producir altos niveles de factores de crecimiento peptídicos.²⁷ Desde entonces, se ha reconocido que diferentes mecanismos podrían contribuir a amplificar la señal impulsada por los factores de crecimiento. Por ejemplo, la sobreexpresión de receptores en la superficie de las células tumorales como ocurre con la línea celular A431.²⁸

2.2.1. Receptores acoplados a tirosina cinasa

Los receptores acoplados a tirosina cinasa (RTK) son de superficie celular con alta afinidad por muchos factores de crecimiento polipeptídicos, citocinas y hormonas. Los RTK son reguladores fundamentales de los principales procesos celulares, como la proliferación, la diferenciación, la supervivencia, el metabolismo, la migración y el control del ciclo celular. Todos los RTK, de acuerdo con su estructura, son receptores tipo 3 que incluyen una región de unión al ligando extracelular, una única hélice transmembrana y una región citoplasmática que contiene el dominio de la proteína tirosina cinasa (TKD) y otras regiones reguladoras carboxi terminales (C-) y yuxta-membrana. (Figura 2.6)

El TKD puede fosforilar residuos de tirosina en proteínas tanto en la conformación *cis* (dentro de la misma molécula) como en la *trans* (residiendo en una molécula diferente).

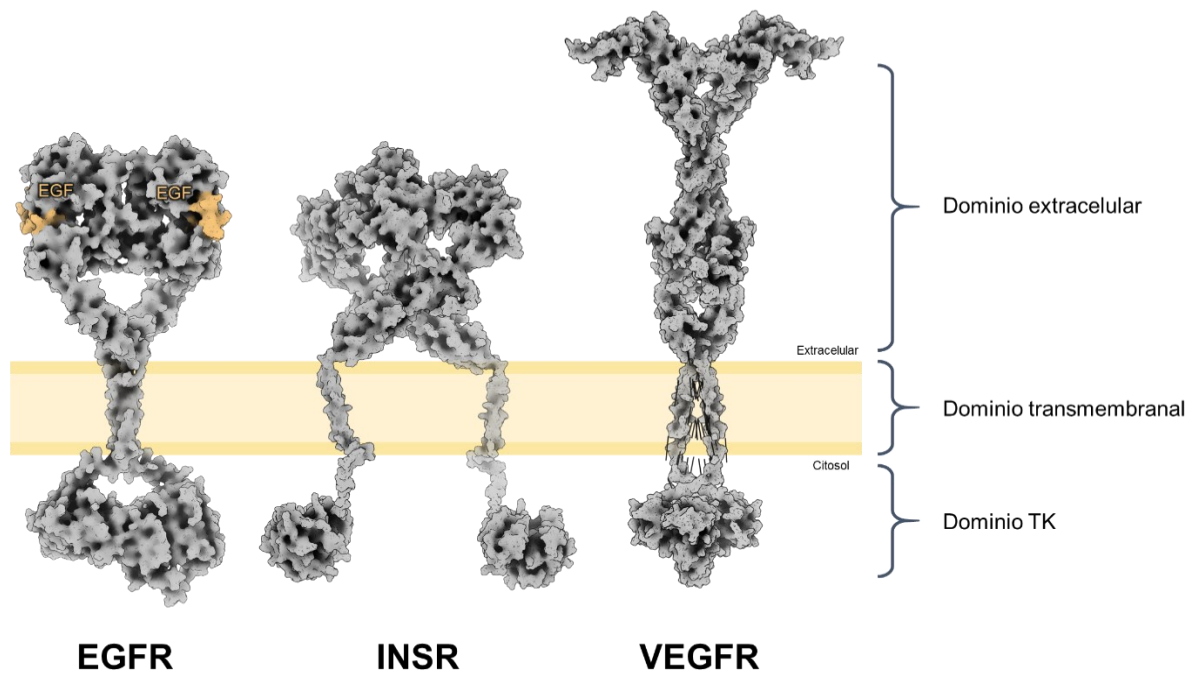


Figura 2.6. Receptores acoplados a tirosina cinasa (TKR). Los receptores de factores de crecimiento que señalizan al interior de la célula poseen tres dominios: un dominio extracelular de unión a ligando, un dominio transmembranal y un dominio intracelular con actividad tirosina cinasa (TK). Se ilustran tres ejemplos de TKR: el receptor del factor de crecimiento epidérmico EGFR con su ligando EGF (amarillo) (PDB ID: 3NJP, 2N5S, 2GS7), el receptor de insulina (INSR) (PDB ID: 2AUH, 2MRF, 6SOF) y el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR). (PDB ID: 2XV7,2XIR)

2.2.1.1. EGFR

El factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es uno de los cuatro miembros de la familia de TKR conocidos de forma global como ErbB. La activación de este receptor supone tanto un beneficio de proliferación como un importante freno a la apoptosis, al estimular rutas oncogénicas como MAPK y PI3K/Akt/PTEN/mTOR. La unión de la proteína a un ligando como el factor de crecimiento epidérmico (Figura 2.7A) induce la dimerización del receptor y la autofosforilación de residuos de tirosina que conducen a la proliferación celular.

El dominio tirosina cinasa intracelular de los receptores ErbB está muy conservado; aunque el dominio del ErbB-3 contiene sustituciones de aminoácidos críticos por lo que carece de actividad cinasa.²⁹

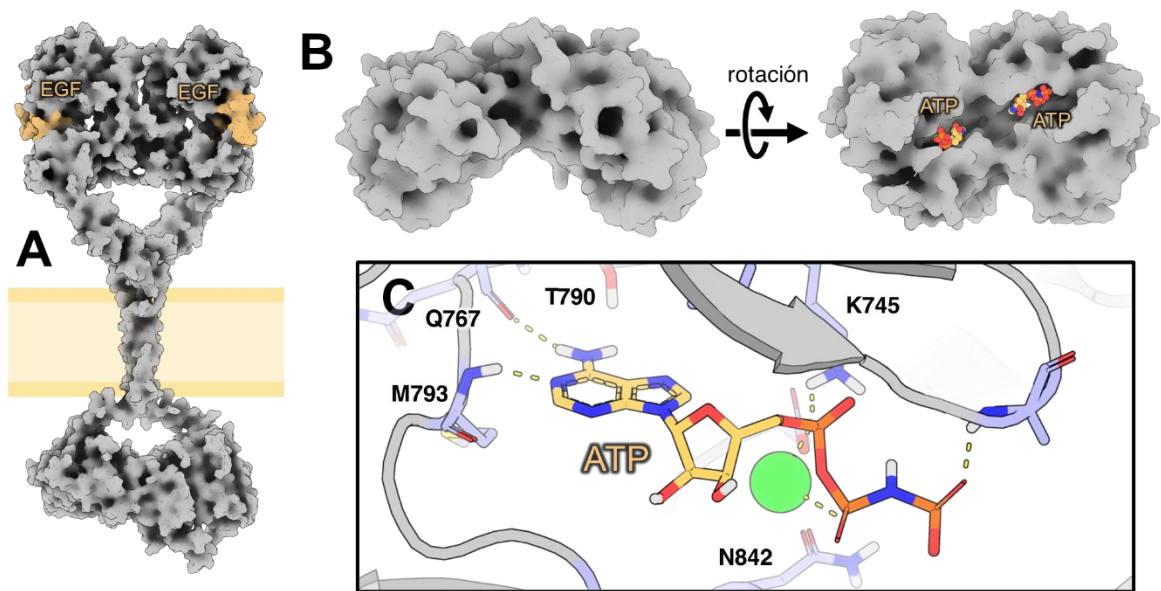


Figura 2.7. Estructura de EGFR. (A) EGFR dimerizado en su forma completa, en amarillo en la parte superior se muestra su ligando EGF. (B) Acercamiento al TKD. Con una rotación vertical de 90° con respecto a la estructura de la izquierda observamos que en la parte inferior del receptor se encuentra el sitio de unión a ATP-Mg²⁺ (C) Sitio de unión a ATP-Mg²⁺. Este sitio está bien conservado entre la mayoría de las cinasas, se muestran algunas interacciones importantes para el reconocimiento del sustrato. En verde se muestra el átomo de Mg²⁺ importante para la estabilización y el reconocimiento de ATP en el sitio activo. (PDB ID: 2GS7)

EGFR es un receptor prototipo en el estudio de cáncer ya que diversos hallazgos clínicos y experimentales han señalado que la mayoría de los cánceres epiteliales humanos sobreexpresan a este receptor, lo que hace que el bloqueo de la vía que lo involucra sea una estrategia terapéutica anticancerosa prometedora.³⁰⁻³² Fármacos como erlotinib (Tarceva® Pfizer) y gefitinib (Iressa® AstraZeneca) (Figura 2.8) son inhibidores del dominio tirosina cinasa de EGFR (EGFR-TKI) reversibles y competitivos por ATP que han demostrado ser eficaces *in vitro* e *in vivo* en modelos de cáncer de células escamosas de cabeza y cuello. En concreto, erlotinib bloquea el ciclo celular en la fase G1 y en algunas líneas celulares induce la apoptosis.³³ Por otro lado, gefitinib fue introducido como una molécula EGFR-TKI para mejorar la biodisponibilidad oral y la toxicidad.³⁰ Además, mantiene una relación dosis dependiente en una gran variedad de líneas celulares epiteliales incluyendo a la línea A431, bien conocida por sobreexpresar exageradamente EGFR.³⁴

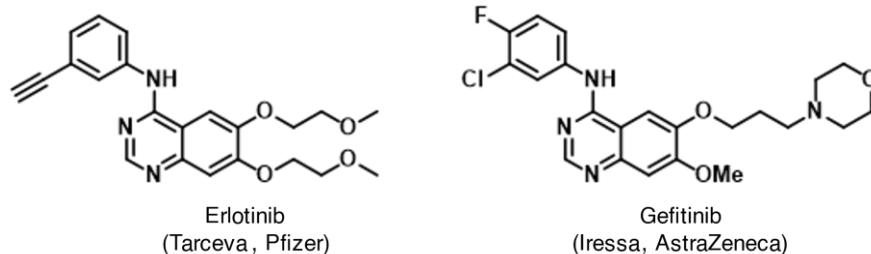


Figura 2.8. Estructura de erlotinib y gefitinib.

Las estructuras en tres dimensiones de EGFR silvestre (EGFR^{WT}) cocristalizado con erlotinib, gefitinib, así como con otros inhibidores reversibles e irreversibles, han sido reportados previamente y depositados en el Protein Data Bank (PDB).³⁵⁻³⁸ Dichas estructuras muestran las interacciones más importantes que mantienen a estos inhibidores dentro del sitio activo de EGFR^{WT} (Figura 2.9). Para el caso del erlotinib, éste ocupa el sitio de ATP por lo que se describe como un inhibidor competitivo reversible. El nitrógeno N1 de la quinazolina actúa como un aceptor de puente de hidrógeno (HB) el cual es donado por el nitrógeno de la amida del residuo Met793. Por otro lado, el nitrógeno N3, a través de un puente de agua (WB) tiene interacción con la Thr790. Este aminoácido tiene mucha relevancia en la resistencia de EGFR a algunos inhibidores^{39,40} ya que, su mutación por un residuo de metionina (EGFR^{T790M}), impide la formación del WB que estabiliza el complejo TKI-EGFR y además, aumenta la afinidad por ATP junto con la mutación EGFR^{L858R}.⁴¹

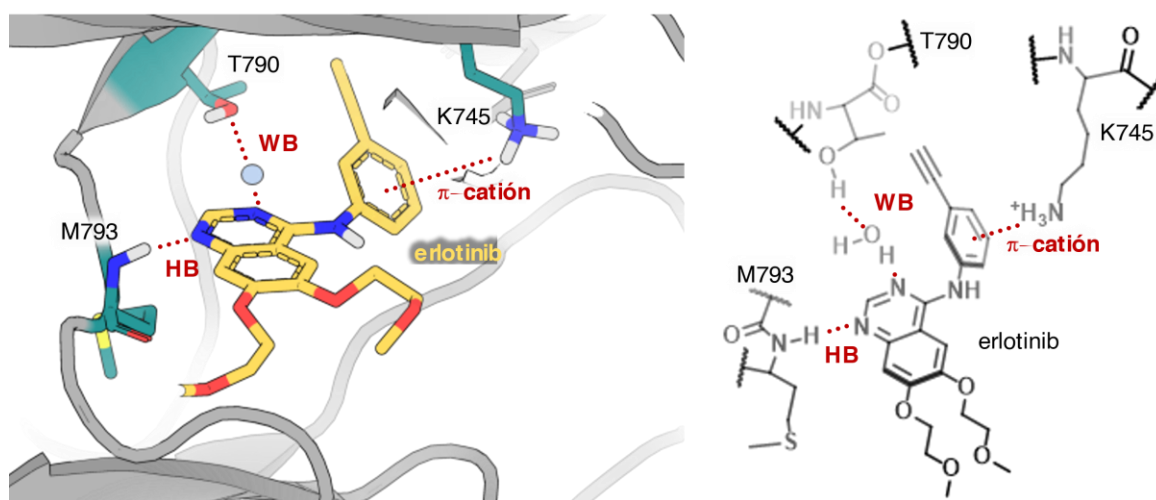


Figura 2.9. Modo de unión en 3D (izquierda) y en 2D (derecha) de erlotinib en el TKD de EGFR^{WT}. En turquesa se muestran algunos aminoácidos importantes para la estabilización del ligando en el sitio activo. En rojo se muestran las interacciones. (PDB ID: 1M17)

2.3. Estrés oxidante

El estrés oxidante es un fenómeno causado por un desequilibrio entre la producción y la acumulación de especies reactivas en las células y los antioxidantes. La definición actual de estrés oxidante se ha perfeccionado⁴² para dar cuenta de dos resultados mecánicos diferentes, el daño macromolecular y la alteración de los circuitos tiol redox, que conduce a una señalización celular aberrante y a un control redox disfuncional. El daño macromolecular suele considerarse en términos de mecanismos oxidativos relacionados con los radicales libres. En el contexto biológico, diversos procesos como la peroxidación de lípidos ocurren mediante este tipo de mecanismos.⁴³⁻⁴⁵ Por otro lado, la hipótesis redox sugiere que la disrupción de los circuitos redox, controlados principalmente por los residuos de cisteína de algunas proteínas, la tioredoxina y el glutatión, es la principal causa del estrés oxidante. Durante los últimos años, una gran cantidad de investigaciones han revelado el mecanismo por el cual el estrés oxidante persistente puede dar lugar a la inflamación crónica, que luego puede promover la mayoría de las enfermedades crónicas como el cáncer, la diabetes, las enfermedades cardiovasculares, neurológicas y pulmonares. Algunas investigaciones han puesto en evidencia que las especies reactivas de oxígeno (ROS) están implicadas en la relación entre la inflamación crónica y el cáncer.^{46,47}

2.3.1. Especies reactivas

Especies reactivas es el término común para referirse a especies químicas con una vida media muy corta en términos cinéticos. Las especies reactivas incluyen radicales libres, como el anión radical superóxido e hidroxilo, y no radicales, como el peróxido de hidrógeno. (Figura 2.10) Los radicales libres son especies químicas que poseen, al menos, un electrón desapareado. Un electrón desapareado es uno que ocupa un orbital atómico o molecular por sí mismo. Los radicales libres tienden a ser reactivos y pueden participar en diversos tipos de reacciones, por ejemplo, reacciones en cadena en las que, a través de eventos de iniciación, propagación y término pueden modificar múltiples moléculas.

	ROS		RNS		RCS	
Radicales	Superóxido	$\bullet\text{O}_2^-$	Nitrosilo	$\bullet\text{NO}$	Cloro	$\bullet\text{Cl}$
	Hidroxilo	$\bullet\text{OH}$	Nitrito	$\bullet\text{NO}_2$		
	Peroxilo	$\bullet\text{O}_2\text{R}$			Hipoclorito	ClO^-
	Alcoxilo	$\bullet\text{OR}$			Cloro	Cl_2
No Radicales	Oxígeno	O_2	Peroxinitrito	ONO_2^-	Cloro	Cl_2
	Ozono	O_3	Alquilperoxinitrito	ONO_2R	Dióxido de cloro	ClO_2
	Peróxido de hidrógeno	H_2O_2	Trióxido de dinitrógeno	N_2O_3		
	Oxígeno		Tetraóxido de dinitrógeno	N_2O_4		
	singulete	$^1\text{O}_2$				

Figura 2.10. Especies reactivas. La figura muestra algunas de las especies reactivas más estudiadas dentro de los seres vivos. Se pueden clasificar de acuerdo con el átomo que carga el electrón desapareado como: Especies reactivas de oxígeno (ROS), especies reactivas de nitrógeno (RNS) y especies reactivas de halógeno, o específicamente, de cloro (RCS). Otra forma de clasificarlas es de acuerdo con si son especies reactivas radicalarias o no radicalarias.

2.3.2. Xantina oxidorreductasa

El metabolismo consiste en la síntesis (anabolismo) y en la degradación (catabolismo) de moléculas fundamentales para la vida. En este sentido, las células disponen de un mecanismo que les permite mantener las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos - ADN y ARN- en un cierto equilibrio. En concreto, el metabolismo de las purinas mantiene las reservas celulares de adenilato y guanilato mediante la síntesis y degradación de los nucleótidos de purina. La enzima fundamental en este proceso es la xantina oxidorreductasa (XOR, EC. 1.17.1.4, 1.17.3.2), una flavoproteína de molibdeno que contiene dos centros de hierro y azufre tipo ferredoxina [2Fe-2S]. Su papel fundamental es la hidroxilación de xantina, el principal producto de degradación de adenilato y guanilato, a ácido úrico. (Figura 2.11A) También, lleva a cabo hidroxilación de hipoxantina, algunas otras purinas, pteridinas y aldehídos siendo ésta distinta de la aldehído oxidasa (AOX, EC 1.2.3.1). La xantina oxidorreductasa bovina (bXOR) es una enzima prototipo y es una de las enzimas más estudiadas, habiendo sido purificada por primera vez hasta su homogeneidad en 1924.⁴⁸

El mecanismo por el cual XOR cataliza la conversión de hipoxantina y xantina es complejo y ha sido descrito previamente en detalle.⁴⁹ (Figura 2.11B)

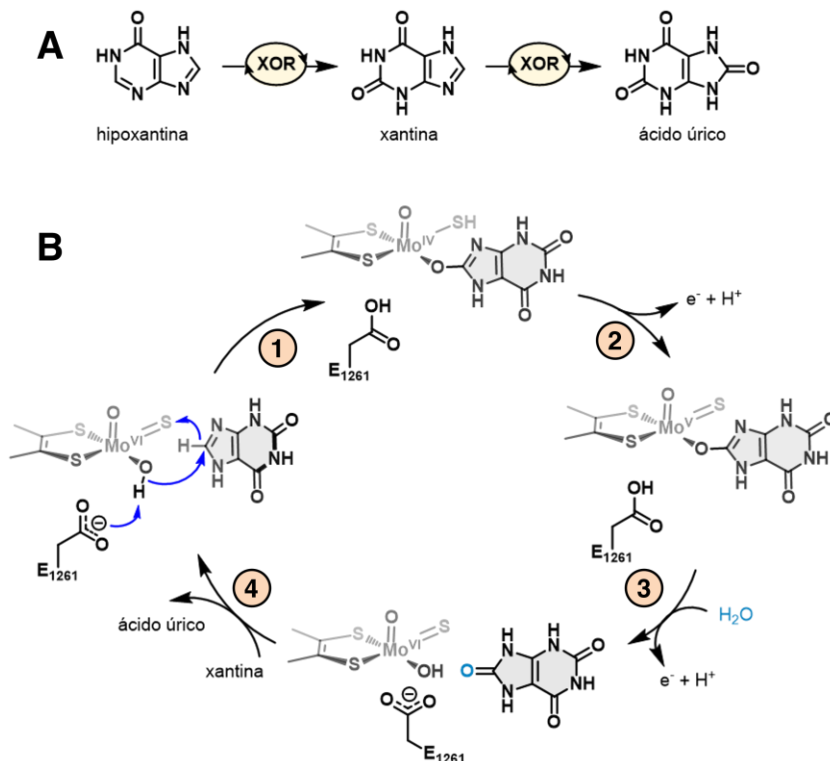


Figura 2.11. Actividad general de la xantina oxidasa. (A) Se muestran las reacciones generales llevadas a cabo por XOR. La primera reacción es la hidroxilación oxidativa de hipoxantina a xantina; la segunda reacción es la hidroxilación oxidativa de xantina a ácido úrico (B) Mecanismo de reacción de XOR. La reacción se lleva a cabo en cuatro pasos generales. Imagen tomada y traducida de *J. Biol. Chem.* **2010**, *285* (36), 28044–28053.

En los primeros años del estudio de XOR, ésta se purificó en una forma que utiliza NAD y otra forma diferente que utiliza oxígeno, como aceptores finales de electrones. Se pensó en un principio, que se trataba de dos enzimas diferentes y les dieron dos nombres: xantina deshidrogenasa (XDH) y xantina oxidasa (XO). Sin embargo, cuando se logró ver la secuencia de aminoácidos, ambas enzimas resultaron ser la misma. La xantina deshidrogenasa de los mamíferos se convierte de forma reversible en la oxidasa por oxidación de los tioles a disulfuros, o se convierte de forma irreversible por una proteólisis cerca del sitio de FAD.⁵⁰ (Figura 2.12) Debido a que la deshidrogenasa y la oxidasa son producto del mismo gen, es preferible llamar genéricamente a la enzima como xantina oxidoreductasa.

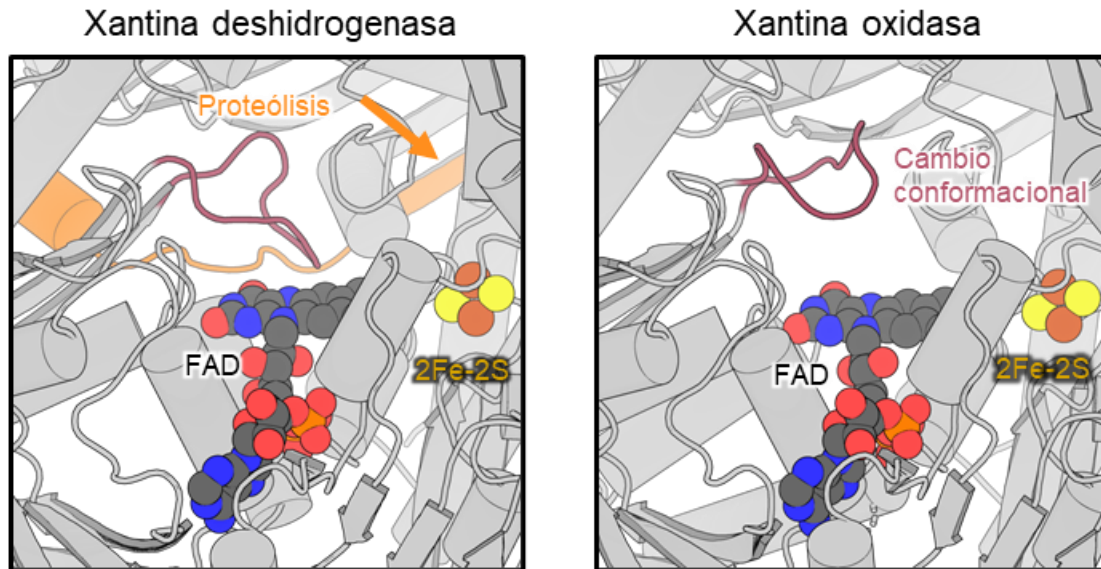


Figura 2.12. Comparación del dominio de unión a FAD entre la XDH y la XO. En gris fuerte se muestra el FAD cerca de un clúster Fe-S. En anaranjado se ilustra el sitio de proteólisis que conlleva a la formación de la oxidasa, mismo que no se observa del lado derecho. Dicha proteólisis lleva a un cambio conformacional que impide la entrada de NAD^+ pero sí permite la entrada de O_2 . PDB ID: 3UNA, 3AX7

La XOR, en su forma activa, es un homodímero de 290 kDa distribuido principalmente en tejidos de mamíferos. Cada subunidad (Figura 2.13B) se compone de (1) un dominio de molibdopterina (Mo-pt) (2) un dominio de unión a dos centros hierro y azufre tipo ferredoxina [2Fe-2S] distintos y (3) un dominio de unión a FAD (Figura 2.13C). La hidroxilación de xantina a ácido úrico ocurre en el dominio Mo-pt, posteriormente, los electrones, producto de la reacción de oxidación, se distribuyen mediante transferencia intramolecular a través de los centros 2Fe-2S hasta llegar al FAD.⁵¹ En XDH el FAD transfiere finalmente los electrones a NAD^+ y en XO los electrones son aceptados por O_2 formando H_2O_2 y $\text{O}_2^{\cdot-}$ en proporciones que varían dependiendo de las condiciones en las que se encuentre la enzima.^{52,53} Se estima que a pH 7 con bXOR aislada en condiciones normales de presión y temperatura, el 20% del flujo de electrones se transfieren de forma univalente al oxígeno, es decir, formando el radical anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$). El resto de los electrones se transfieren de forma divalente, formando peróxido de hidrógeno.

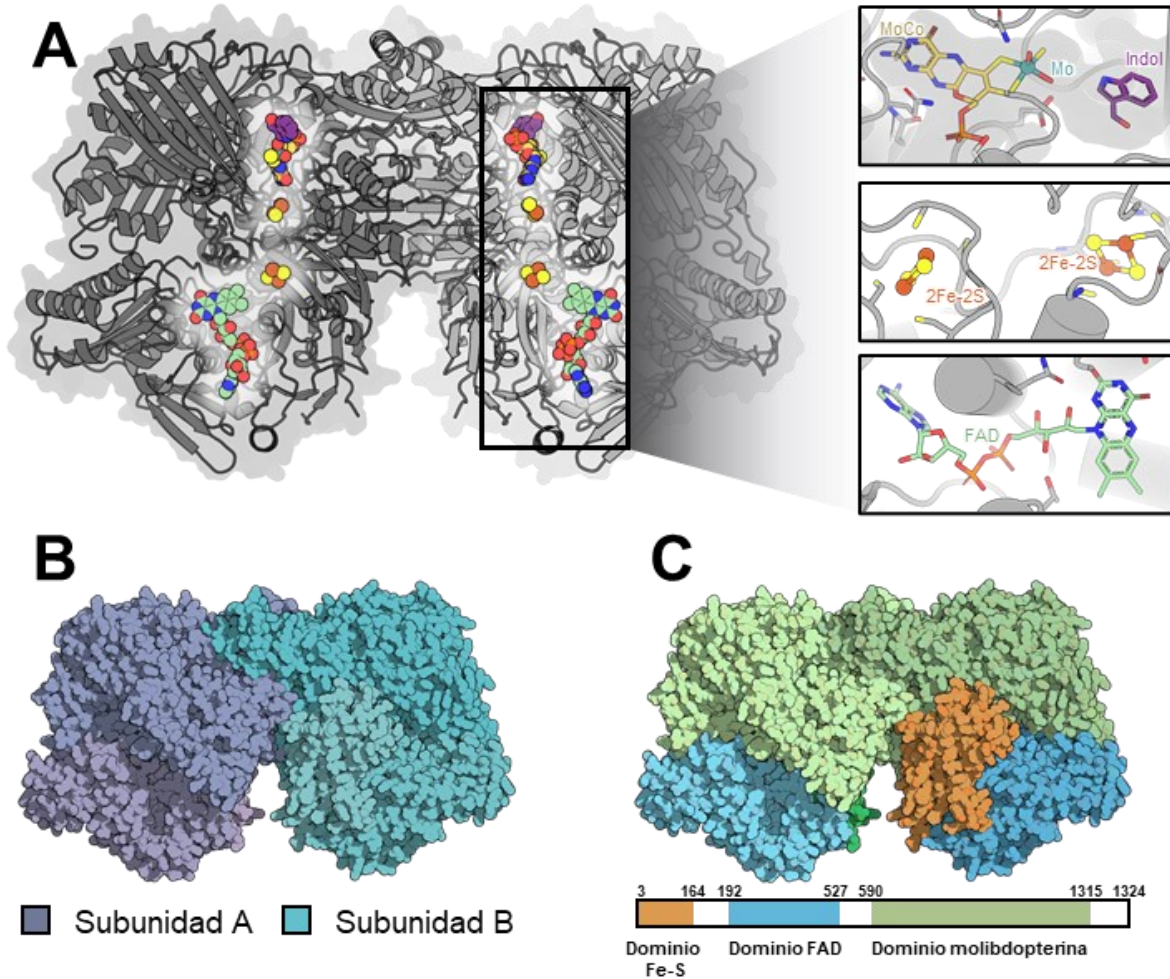


Figura 2.13. Estructura de la xantina oxidoreductasa bovina (bXOR). (A) Con el modelo de listones se observa el interior de la xantina oxidasa. En amarillo se ilustra el complejo formado por la molibdopterina unida al átomo de molibdeno en color verde. En morado se muestra un ligando cocristalizado. (B) Ilustración de las dos subunidades de la bXOR recordando que esta enzima es un homodímero. (C) Representación de los dominios de la bXOR. Empezando por el extremo amino nos encontramos con el dominio de unión a los dos centros Fe-S (Sec. 3-164), después el dominio de unión a FAD (Sec. 192-527) y finalmente, el dominio más grande que corresponde al de unión a molibdopterina, donde se encuentra el sitio activo (Sec. 590-1315). PDB ID: 3UNA

2.3.2.1. Inhibidores de xantina oxidoreductasa

Los inhibidores de la xantina oxidoreductasa (XOI) son moléculas que, a nivel sistémico, reducen los niveles de ácido úrico y que quizá tengan efectos positivos sobre aspectos cardiovasculares, además de su acción positiva consolidada sobre la enfermedad de la gota.⁵⁴

Hasta la fecha, sólo un inhibidor de la XOR de tipo purina, el alopurinol (1966) y dos inhibidores de la XOR no purínicos, febuxostat (2009) y topiroxostat (2013), han sido aprobados para el tratamiento de la hiperuricemia y la gota.⁵⁵ (Figura 2.14) Por una parte, el alopurinol tiene una acción antioxidante directa⁵⁶ e indirecta.^{57,58} Por otro lado, febuxostat, fue obligado a tener una advertencia de riesgo por la FDA en febrero de 2019, considerando que la mortalidad cardiovascular de febuxostat era mayor que la del alopurinol.⁵⁹

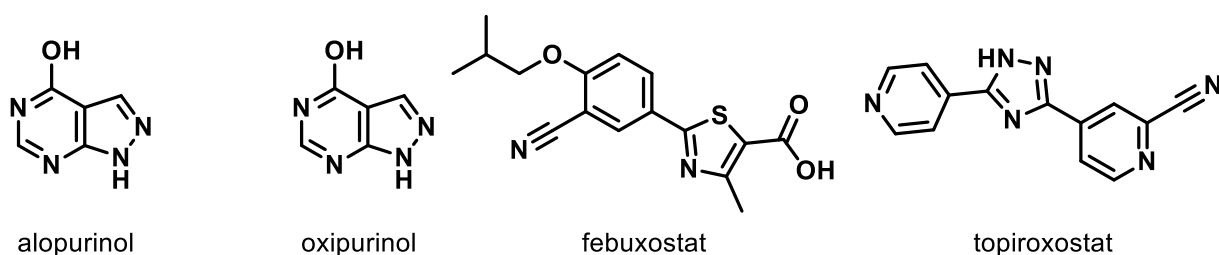


Figura 1.14. Estructuras de los inhibidores de xantina oxidasa aprobados para su uso en tratamientos como la gota. Oxipurinol es un metabolito obtenido del alopurinol el cual, también posee actividad inhibitoria de XOR

2.4. Investigaciones previas en nuestro grupo de trabajo

Las moléculas propuestas en este trabajo se suman a una serie de moléculas diseñadas y sintetizadas previamente por otros miembros de nuestro grupo de trabajo. Cabe destacar que, aunque el trabajo aquí presentado no es el primero que lleva a cabo estudios de citotoxicidad en líneas celulares de cáncer, sí es el primero junto con Martínez-Ortega⁶⁰ en llevar a cabo estudios de inhibición enzimática a la vez de un estudio cinético enzimático sobre dos dianas de interés terapéutico en cáncer. A continuación, se lleva a cabo un resumen sobre los avances que se han logrado en nuestro grupo de trabajo y cómo, cada uno de ellos, es una pequeña contribución al trabajo que aquí se presenta.

2.4.1. Derivados tipo quinazolina-2,4,6-triamina

La primera estrategia para obtener moléculas con cierto potencial citotóxico se llevó a cabo por Rosales V.⁶¹ obteniendo moléculas del tipo quinazolina-2,4,6-triamina. Las moléculas consistieron en tres iminas obtenidas a partir de derivados de benzaldehído con la quinazolina-2,4,6-triamina (TAQ) y sus respectivos derivados reducidos. En este trabajo evaluó la citotoxicidad *in vitro* en las líneas celulares HeLa (adenocarcinoma cérvicouterino), MCF-7 (adenocarcinoma epitelial mamario) y HCT-15 (adenocarcinoma epitelial colorectal) ocupando como molécula de referencia al cisplatino. Los resultados obtenidos sobre la línea celular MCF-7 revelaron la importancia de tener un grupo metileno como conector de la quinazolina y el fenilo. Los compuestos tipo imina no fueron tan potentes como sus derivados reducidos; estos últimos obtuvieron valores similares a los del cisplatino. (Figura 2.15)

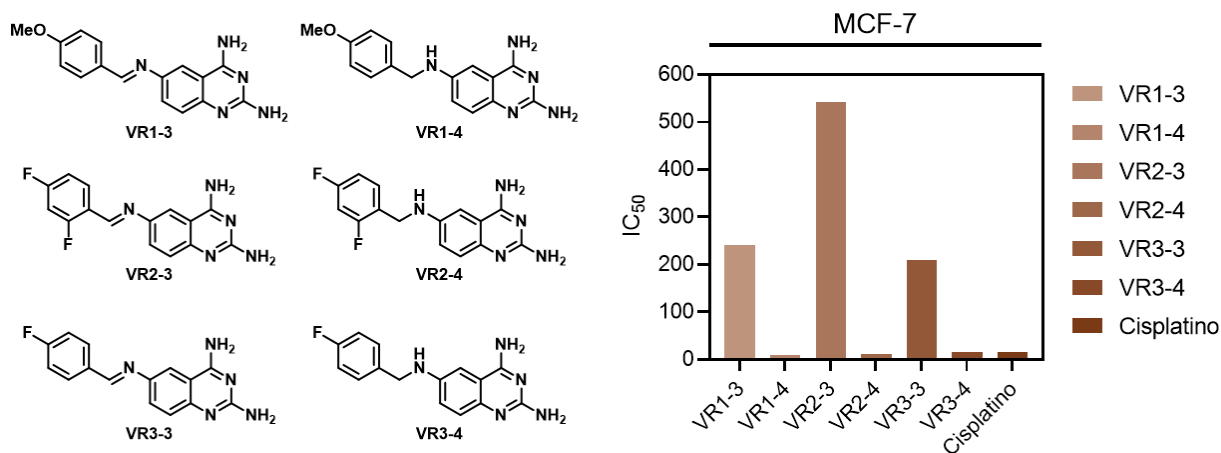


Figura 2.15. Estructuras de las moléculas sintetizadas por Rosales V. y resultados de IC₅₀ (μM) en la línea celular MCF-7

Con base en los resultados de Rosales V., López-Sánchez, M.⁶² diseñó una serie de 12 compuestos derivados de quinazolina, diez de ellos del tipo quinazolina-2,4,6-triamina (**B1-14**) y dos de ellos del tipo fenilamino quinazolinilbenzamida (**E11**, **E31**). Además, durante su síntesis detectó un subproducto (**MG12**) el cual, también evaluó. Aquí se planteó la estrategia de inhibición de bXO, captura del radical anión superóxido y estudios de actividad citotóxica en la línea celular HCT-15. (Figura 2.16)

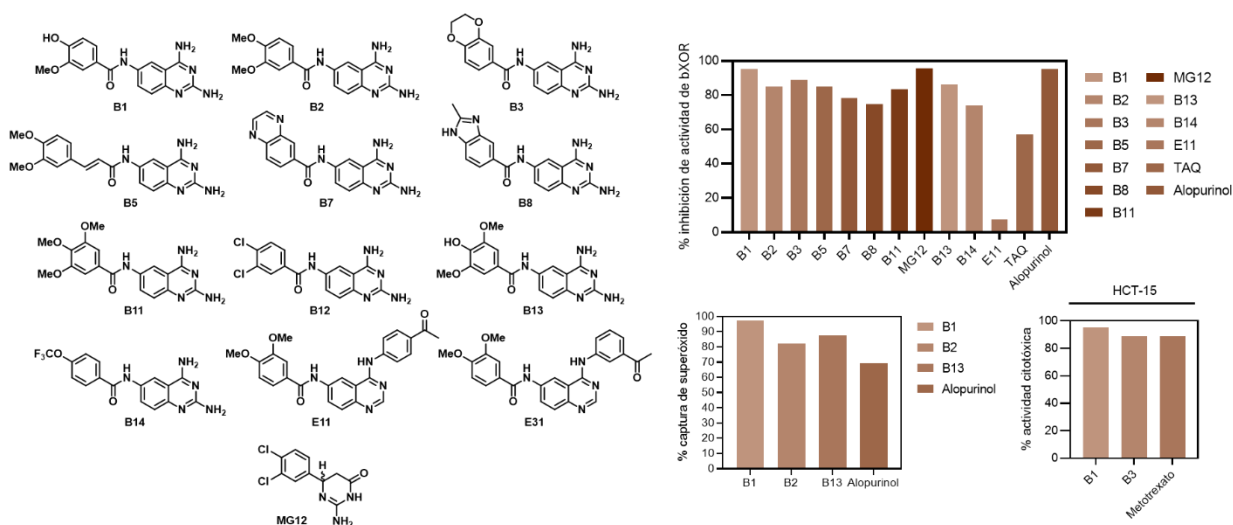


Figura 2.16. Estructuras de **B1-14**, **E11**, **E31** y **MG12** sintetizadas por López-Sánchez M. y sus resultados de inhibición de la actividad de bXO, captura del radical superóxido y % de actividad citotóxica en la línea celular HCT-15

Resulta complicado llevar a cabo una comparación de citotoxicidad entre las moléculas de antes presentadas debido a que se ocuparon distintas líneas. Aun así, en ambas líneas celulares cancerosas las moléculas resultaron con una muy buena actividad, resultando incluso, más activas que las referencias. Se encontró que estos compuestos son buenos inhibidores de bXO.

En el 2016 Nieto-Lara Abril A. llevó a cabo un estudio con quinazolininas pero modificando los sustituyentes que previamente se habían empleado.⁶³ Aquí, se realizó un estudio en más líneas celulares.

La molécula **A1** resultó ser la más activa en todas las líneas celulares y, al parecer, tenía un índice de selectividad elevado, es decir, tenía preferencia por tener actividad citotóxica contra células cancerosas que contra células sanas como FGH. La molécula **A3** resultó ser la menos activa en la mayoría de las células donde incluso en algunas, no tuvo actividad citotóxica.

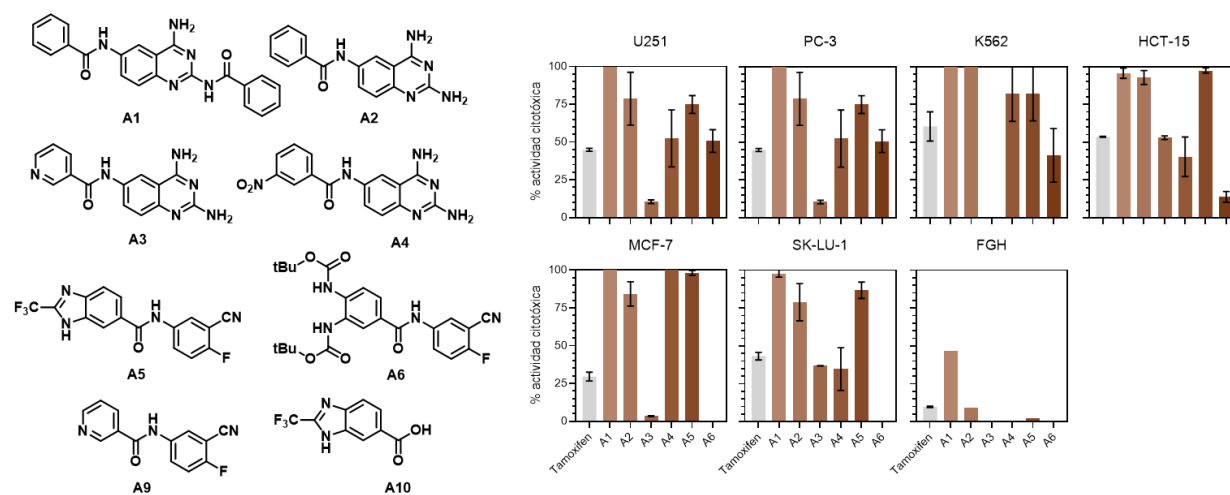


Figura 2.17. Estructuras de las moléculas **A1-10** y su actividad citotóxica en cinco líneas celulares de cáncer distintas (U251, PC-3, K562, HCT-15, MCF-7, SK-LU-1) y una línea celular sana (FGH)

Poco después, se evaluó en líneas celulares de cáncer, un conjunto de quinazolininas que ya habían sido sintetizadas previamente pero con el objetivo de afectar al parásito *Trypanosoma cruzi* (*T.cruzi*).⁶⁴

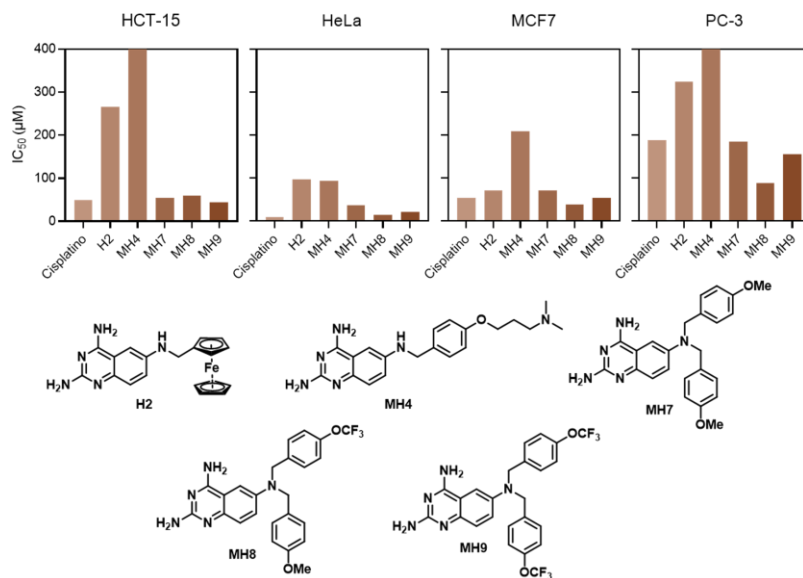


Figura 2.18. Estructuras de las moléculas previamente reportadas como tripanocidas, y su resultado de actividad citotóxica en tres líneas celulares de cáncer (HCT-15, HeLa, MCF7 y PC-3)

Se encontró que el compuesto **MH8** (una quinazolina-2,4,6-triamina) fue el compuesto con las IC₅₀ más bajas, superando en algunos casos al cisplatino. En la mayoría de las líneas celulares, en cambio, el compuesto **MH4** que de igual forma es una quinazolina-2,4,6-triamina sustituida con 4-(3-(dimetilamino)propoxi)benzaldehído fue el compuesto menos potente, llegando incluso a valores mM de IC₅₀

En el 2017, se realizó la síntesis y evaluación biológica de cinco quinazolininas y un éster de fosfonio en cinco líneas celulares distintas. Para ello, únicamente evaluó tres de sus cinco compuestos sintetizados.⁶⁵ Se encontró que los tres compuestos evaluados presentaron actividad antitumoral ya que mostraron inhibición del crecimiento de las células de todas las líneas de cáncer que fueron probadas. Incluso, todas las moléculas presentaron mayor potencia que el fármaco control, tamoxifeno. El patrón de sustitución de los compuestos **N3** y **N5** es similar, con una pequeña variación. En cambio, el compuesto **N2** es diferente y la comparación con los otros dos resulta complicada.

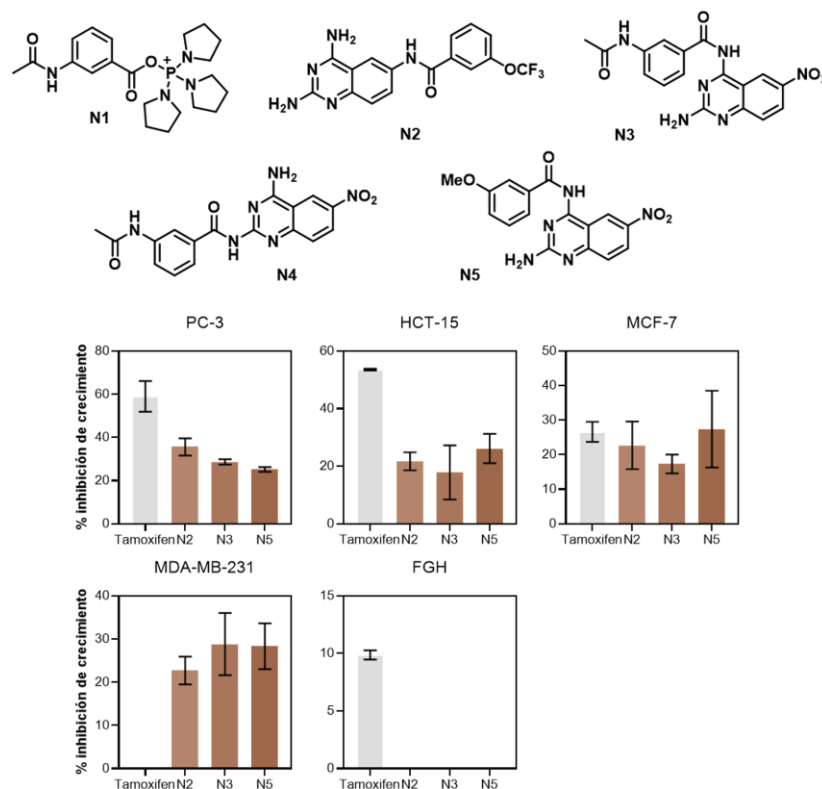


Figura 2.19. Estructuras de las moléculas sintetizadas y evaluadas por Trujillo-Madero Nicole N. y sus resultados de actividad citotóxica en cuatro líneas celulares de cáncer distintas (HCT-15, MDA-MB-231, MCF7 y PC-3) y una línea celular sana (FGH)

3. Planteamiento del problema

Considerando que el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es una diana validada en la investigación de búsqueda de moléculas antitumorales y la xantina oxidoreductasa (XO) una enzima vital para el crecimiento de las células, ¿podrán encontrarse derivados de quinazolina que reúnan las características estructurales que les permitan afectar de forma dual la funcionalidad de estas dos dianas con el consecuente efecto citotóxico en células cancerosas?

4. Hipótesis

Hay algunos compuestos que afectan el funcionamiento de la xantina oxidoreductasa, mientras que otros afectan a la tirosina cinasa del receptor del factor de crecimiento

epidérmico y dado que ambos grupos de compuestos tienen al núcleo de quinazolina como andamio estructural, resulta factible o probable que la combinación del patrón de sustitución de ambos grupos de origen a sustancias con actividad sobre las enzimas mencionadas y afectando en consecuencia la proliferación de células tumorales malignas.

5. Objetivos

5.1. Objetivos generales

Diseñar, sintetizar y evaluar el comportamiento de un conjunto de quinazolininas frente a las enzimas tirosina cinasas, del receptor del factor de crecimiento epidérmico, y xantina oxidasa; así como determinar su potencial citotóxico frente a líneas celulares cancerosas.

Objetivos particulares

- Diseñar un conjunto de quinazolininas como inhibidores duales potenciales sobre las dianas bXO y hEGFR.
- Sintetizar y caracterizar las moléculas propuestas del diseño.
- Cuantificar el porcentaje de actividad de bXO en ausencia y en presencia de los compuestos.
- Determinar el posible mecanismo de acción de las moléculas con el mejor desempeño en el estudio anterior, llevando a cabo estudios de cinética enzimática, obteniendo así parámetros de cinética clásica como K_m y V_{max} .
- Realizar estudios de acoplamiento molecular en bXO para determinar el posible modo de unión de los compuestos en la enzima.
- Determinar el porcentaje de actividad de hEGFR en ausencia y en presencia de los compuestos propuestos.
- Realizar estudios de acoplamiento molecular en hEGFR para determinar el posible modo de unión en el dominio TK del receptor.
- Determinar el porcentaje de actividad antiproliferativa de los compuestos en distintas líneas celulares de cáncer.

6. Diseño de los derivados de quinazolina

Con base a los trabajos realizados con diferentes derivados de quinazolina modificadas en las posiciones 2, 4 y 6, en su evaluación frente a la xantina oxidoreductasa y tirosina cinasa del EGFR, se puede considerar que la combinación de algunos de estos sustituyentes daría lugar a compuestos que actúen, de forma dual, sobre ambas enzimas.

En ese sentido se propuso el diseño de moléculas similares a **E11** y **E31**, con un anillo aromático en posición 4 de la quinazolina pero que contuvieran un fragmento del fármaco gefitinib, esto con el fin de lograr una interacción con la tirosina cinasa del EGFR. Por el otro lado, se planteó sustituir con diversos derivados bencílicos, en la posición 6 de la quinazolina, para conferir la propiedad de interacción con la XO. (Figura 6.1) En la Tabla 6.1 se muestran de forma explícita todos los compuestos diseñados con las claves correspondientes, particulares de este trabajo.

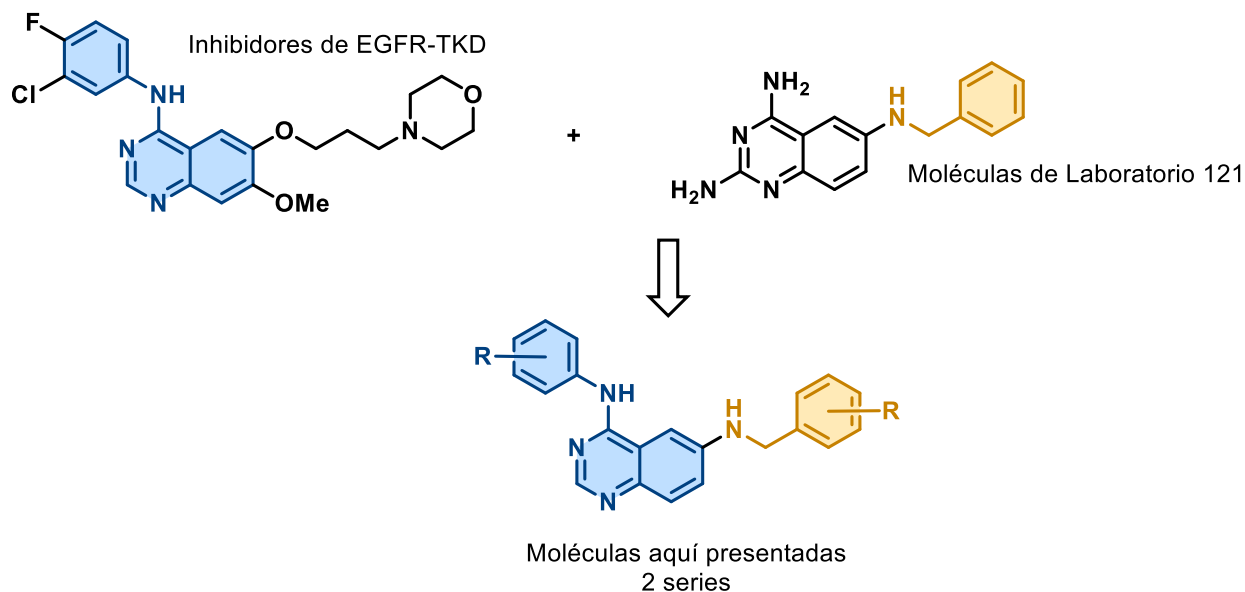
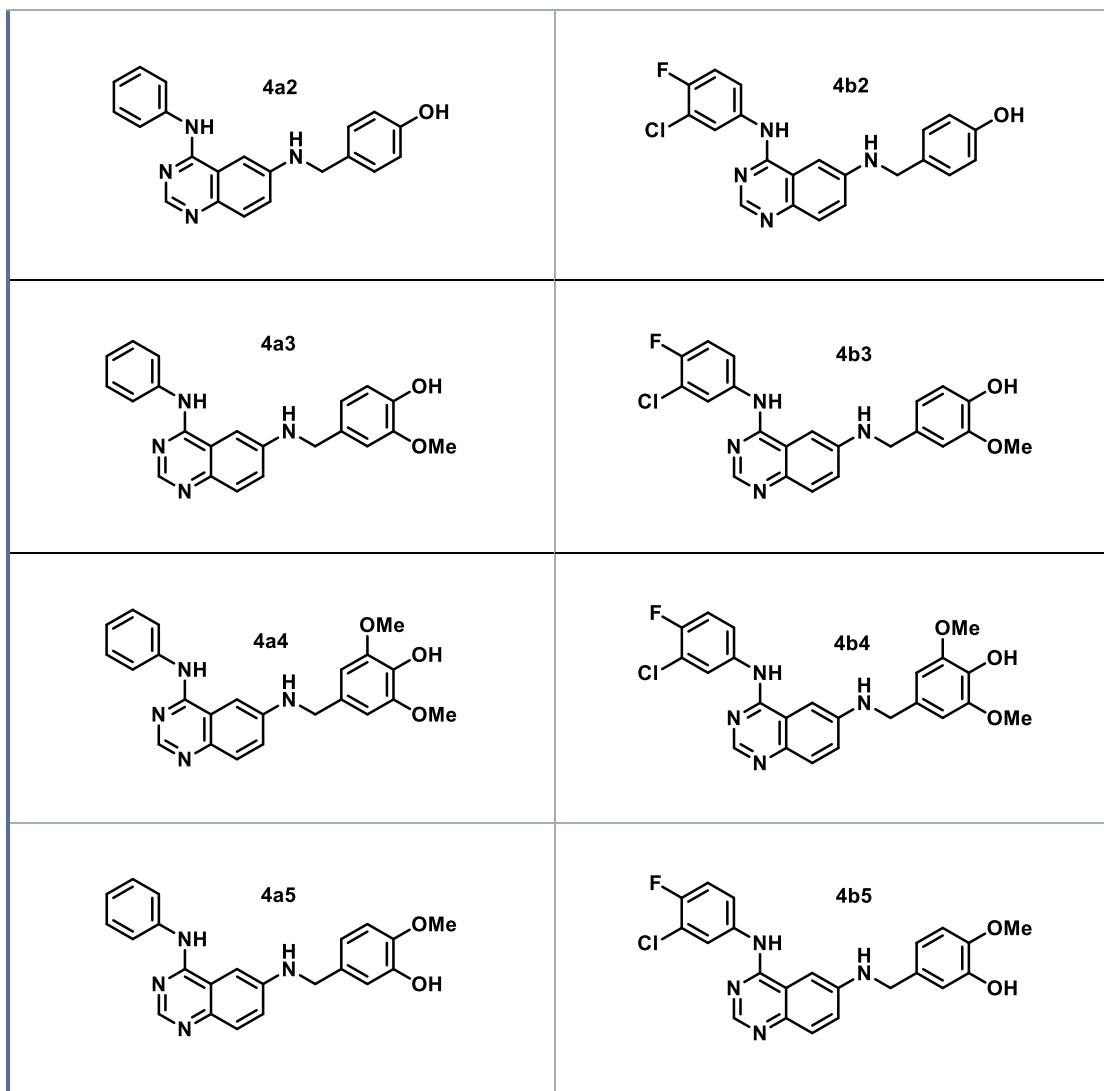


Figura 6.1. Estructura general de las moléculas diseñadas de novo con base en moléculas con actividad ya conocida en EGFR (TKI), y moléculas diseñadas y sintetizadas por nuestro grupo de investigación con actividad inhibitoria de XOR e inhibición de crecimiento celular en algunas líneas celulares de cáncer.

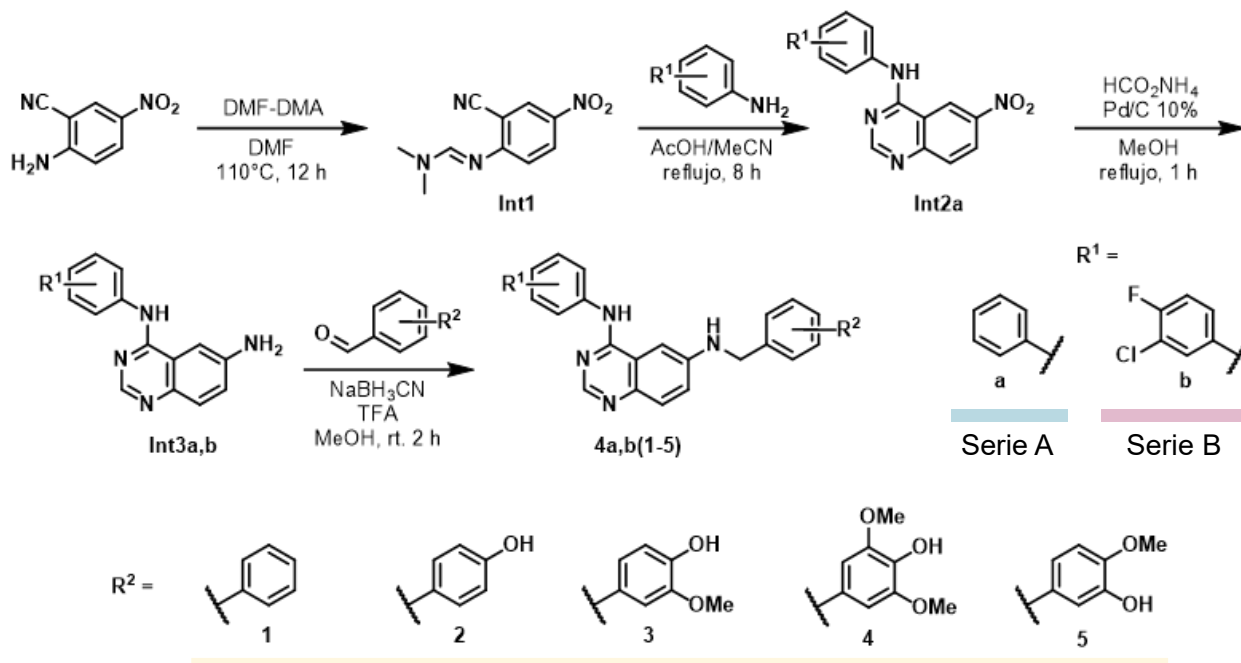
Tabla 6.1 Estructura y clave de las moléculas diseñadas de novo.

Estructura y clave	
Serie A	Serie B
<p>4a1</p>	<p>4b1</p>



7. Síntesis y caracterización de compuestos

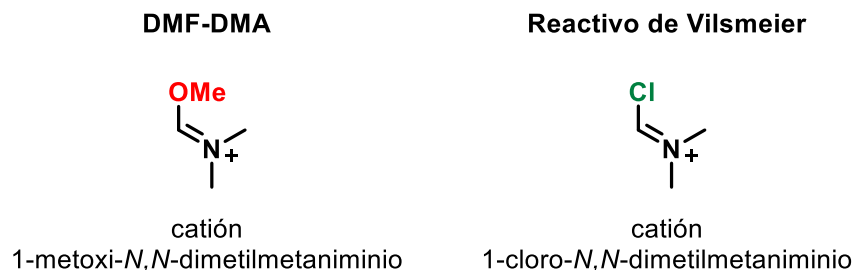
En este capítulo, se describen, de forma general, los métodos para obtener los derivados de quinazolina diseñados. La síntesis de los compuestos se siguió con la ruta planteada en el Esquema 6.1. En los subcapítulos de este apartado se muestran los resultados y la discusión de los intermediarios y productos finales obtenidos; únicamente se describe la caracterización instrumental de los productos finales, así como su punto de fusión. En el Anexo 1 se especifica con más detalle el procedimiento para obtener cada uno de estos.



Esquema 7.1. Procedimiento para la síntesis de las moléculas propuestas. La síntesis consiste en cuatro pasos y el empleo de reactivos que permiten la sustitución de anillos aromáticos en diferentes posiciones como derivados de anilina y derivados de benzaldehído.

7.1. Síntesis del intermediario **Int1**

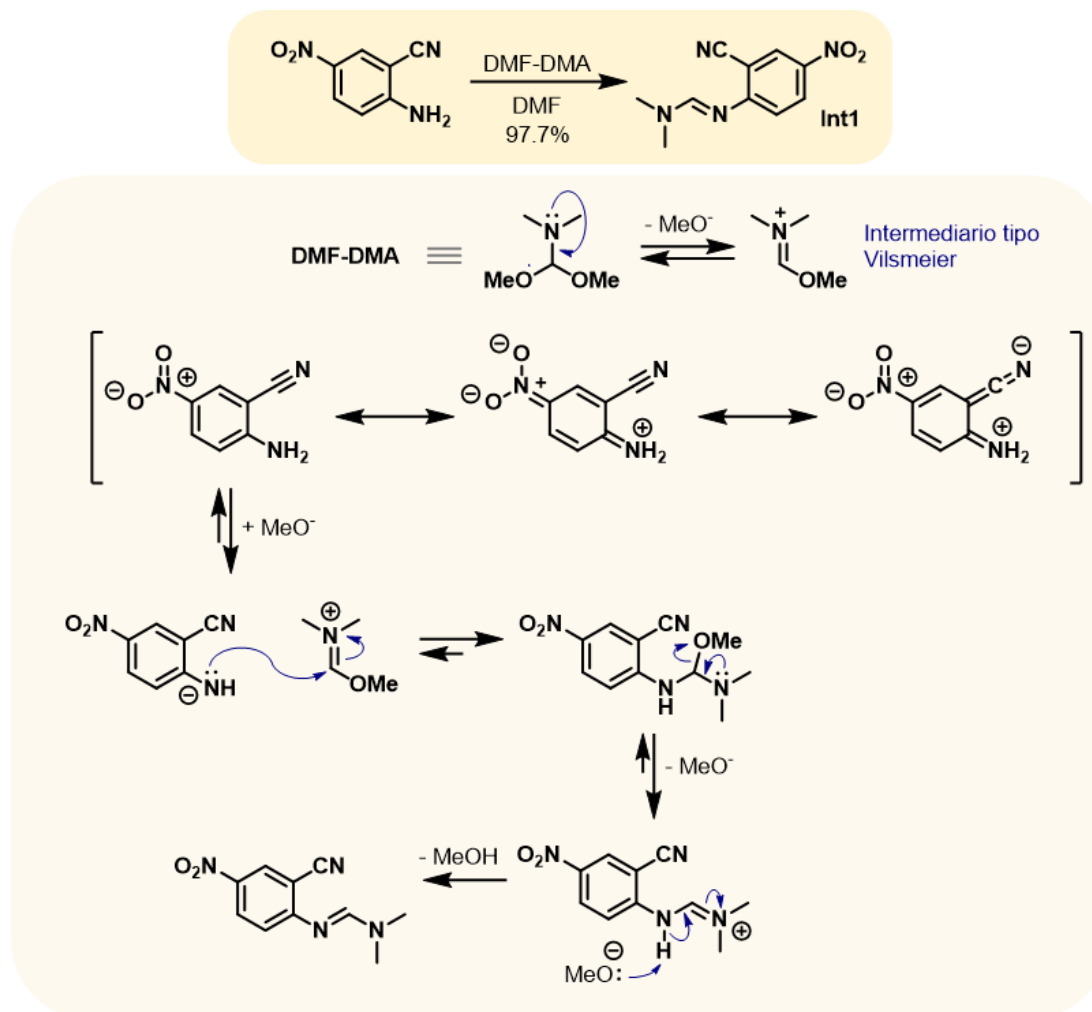
La reacción de aminas primarias, secundarias, aminas aromáticas y aminoácidos con *N,N*-dimetilformamida dimetilacetal (DMF-DMA) ha servido como una estrategia importante para la síntesis de moléculas de interés farmacéutico.^{66,67} La DMF-DMA así como otros dialquilacetales de la *N,N*-dimetilformamida (DMF) se utilizan en síntesis orgánica en dos tipos de reacciones principales: alquilación y formilación. El mecanismo de estas reacciones mencionadas involucra la generación del catión 1-metoxi-*N,N*-dimetilmetaniminio estabilizado por resonancia entre el átomo de oxígeno y el átomo de nitrógeno.⁶⁸ Dicho catión, tiene parecido con el reactivo de Vilsmeier, ocupado también en reacciones de formilación (Esquema 7.2).⁶⁹



Esquema 7.2. Comparación entre el intermediario formado a partir de la DMF-DMA y el reactivo de Vilsmeier. Se resaltan en colores los grupos funcionales que fungen como grupos salientes durante la reacción de adición-eliminación

El mecanismo propuesto para la obtención de **Int1** se describe en el Esquema 7.3. La síntesis del intermediario **Int1** consistió en la reacción de 2-amino-5-nitrobenzonitrilo con DMF-DMA en DMF como disolvente a 110°C por 12 horas; ambos reactivos se encuentran comercialmente disponibles. El objetivo de esta reacción fue obtener un intermediario tipo imidamida que serviría posteriormente para formar el núcleo de quinazolina mediante ciclocondensación con derivados de anilina. El compuesto **1** se obtuvo con muy buenos rendimientos (97.7%).

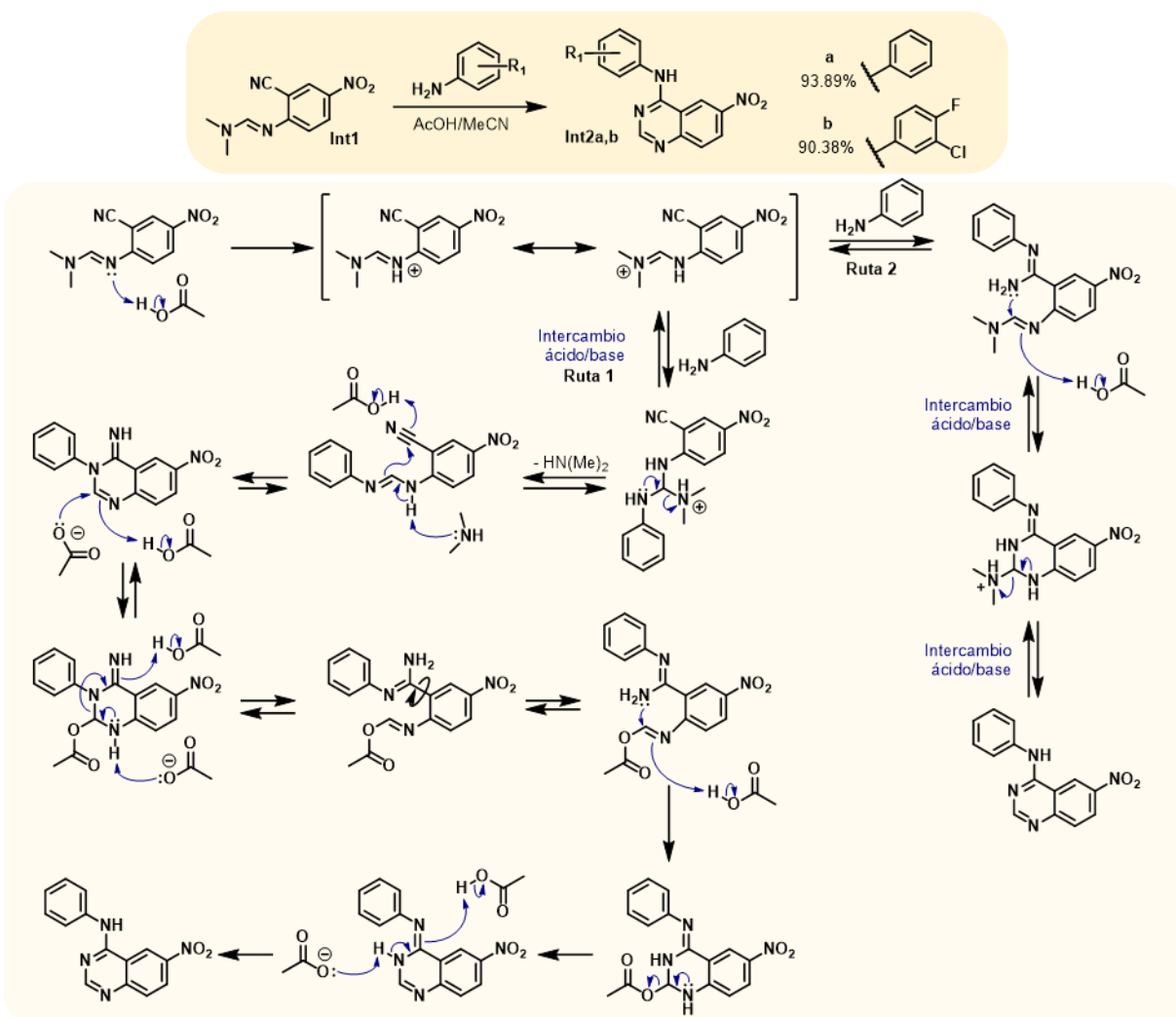
El primer paso de la reacción consiste en la activación de la DMF-DMA. Las condiciones de disolvente y temperatura promueven la formación del catión 1-metoxi-*N,N*-dimetilmetaniminio y la eliminación del anión metóxido. El anión metóxido funge como base, capturando el protón del grupo amino ya que es el más ácido por efectos de resonancia. Posteriormente, éste reacciona con el catión 1-metoxi-*N,N*-dimetilmetaniminio formilando así, la posición 2 del 2-amino-5-nitrobenzonitrilo. Una reacción de eliminación, causada por el par de electrones del fragmento dimetilamino, libera el grupo metoxi restante de la DMF-DMA generando un nuevo intermediario tipo imidamidinio. Finalmente, el grupo metoxi que se liberó en la reacción anterior, toma el protón del amino en posición 2 del benzonitrilo resultando en el primer intermediario, un compuesto color amarillo que cristaliza en el medio de reacción empleado.



Esquema 7.3. Mecanismo de reacción propuesto para la formación del intermediario **Int1**.

7.2. Síntesis de los intermediarios **Int2a,b**

La síntesis de los intermediarios **Int2a** y **Int2b** siguió la misma secuencia de pasos en ambos compuestos, únicamente variando el sustituyente en la posición 4 del anillo de quinazolina. La síntesis consistió en una reacción de ciclocondensación partiendo del intermediario **Int1**, anilina —para el caso de los compuestos de la serie A— y un análogo de anilina, 3-cloro-4-fluoranilina —para el caso de los compuestos de la serie B—. Cabe destacar que este tipo de ciclocondensación y su mecanismo (Esquema 7.4, Ruta 1) ya habían sido reportados previamente⁶⁷. Dicho mecanismo involucra una transposición tipo Dimroth, el cual, es una translocación de dos heteroátomos en un sistema heterocíclico, con o sin cambiar su estructura de anillo.⁷⁰ Una ruta alternativa al mecanismo propuesto mediante transposición de Dimroth es una donde, el ataque nucleofílico de la anilina se realiza directamente sobre el nitrilo (Esquema 7.4, Ruta 2).



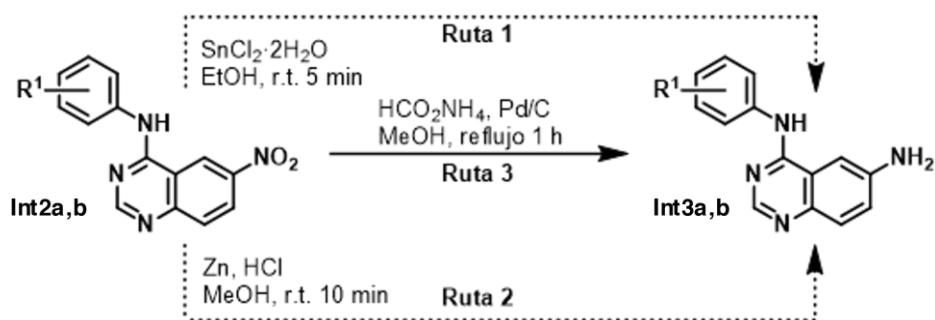
Esquema 7.4. Mecanismo de reacción propuesto para la formación de los intermediarios **Int2a,b**.

Una variación al método ocupado por otros autores es que, se ocupó una mezcla de ácido acético en acetonitrilo al 30% en lugar de sólo ácido acético. Esto, con el fin de inducir la precipitación del compuesto una vez que se encuentre en altas concentraciones en la mezcla de reacción debido a su insolubilidad en acetonitrilo. La función del ácido acético, además de ser disolvente es ser aun activador de ciertos pasos de la reacción.

7.3. Síntesis de los intermediarios **Int3a,b**

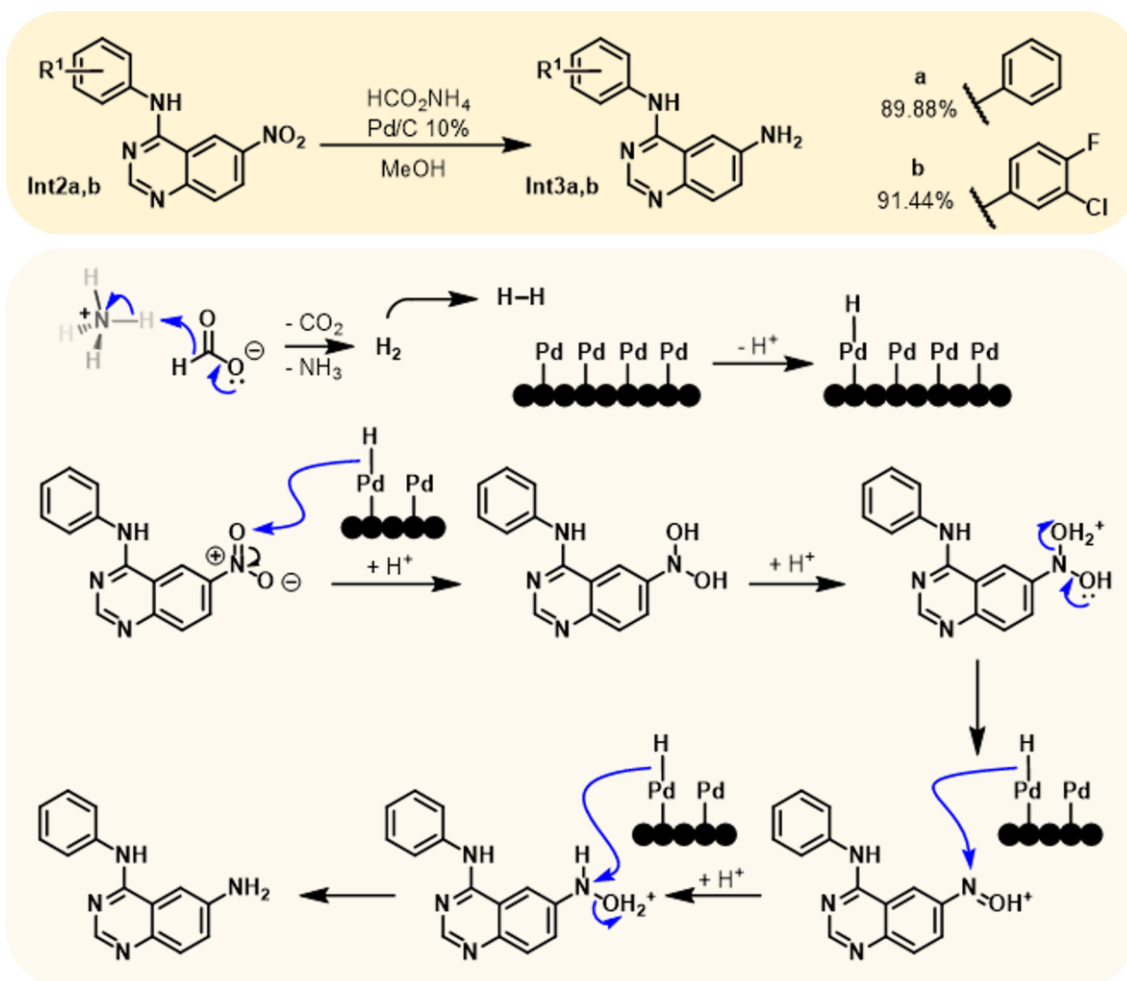
Un problema cotidiano en la reducción de moléculas orgánicas es la selectividad hacia ciertos grupos funcionales por parte del compuesto reductor. Diversos estudios han llevado a cabo distintas técnicas para la reducción de moléculas orgánicas con buenos resultados.⁷¹⁻⁷⁴ En particular, para este trabajo se llevaron a cabo tres técnicas distintas para la reducción del grupo nitro de los intermediarios **Int2a** y **Int2b** (Esquema 7.5). La

primera forma consistió en la reacción de los intermediarios con cloruro de estaño (II) en etanol a temperatura ambiente por 5 minutos. Aunque esta reacción se llevó a cabo en muy poco tiempo, con pocas cantidades de metanol y cloruro de estaño (II) en cantidades subestequiométricas, la principal desventaja es la purificación de los compuestos, ya que, se requieren enormes cantidades de disolventes como acetato de etilo o cloroformo para lograr quitar el estaño a los compuestos reducidos. La segunda forma consistió en la generación *in situ* de hidrógeno mediante zinc en polvo y ácido clorhídrico en metanol por 15 minutos. En esta reacción, si bien la purificación es un proceso sencillo, los rendimientos son muy bajos y requieren una mejora en la técnica en futuras ocasiones. La tercera consistió en la hidrogenación catalítica con formiato de amonio y paladio sobre carbón activado como catalizador en metanol por 1 hora. Esta reacción fue, de las tres, la que tiene una purificación sencilla y buenos rendimientos.



Esquema 7.5. Estrategias de reducción del grupo nitro empleadas **Int2a,b**.

Es bien sabido que el paladio sobre carbón activado (Pd/C), un catalizador heterogéneo para una gran variedad de reacciones es un gran absorbente de hidrógeno molecular.⁷⁵ El mecanismo aquí descrito involucra la generación de dos intermediarios antes de lograr la reducción del grupo nitro a la amina correspondiente —un grupo nitroso y una hidroxilamina—.⁷⁶ En total, un grupo nitro requiere seis electrones para su reducción completa. Dichos electrones son aportados por hidruros provenientes del formiato de amonio, soportados en el paladio. Otros mecanismos, con metales como zinc (0) involucran la formación de radicales libres. Algo importante a resaltar del paladio sobre carbón activado es que algunos grupos funcionales como cloro, bromo o yodo son susceptibles a ruptura en las moléculas que se requiere reducir. Incluso, el paladio sobre carbono se ha utilizado en reacciones de acoplamiento carbono-carbono o carbono-heteroátomo partiendo de anillos con sustituyentes tipo halógeno.^{77,78} Aunque el intermediario **Int3b** contiene un átomo de cloro, este no se vio afectado por las condiciones ocupadas. Esto se comprobó sintetizando el derivado con flúor en la posición 4 del anillo de benceno y checando puntos de fusión de ambos compuestos.



Esquema 7.6. Mecanismo de reacción planteado para la formación de los intermediarios **Int3a,b**.

La reacción comienza con la descomposición del formiato de amonio a la temperatura de ebullición del metanol. Se sabe que este compuesto se descompone en dióxido de carbono e hidrógeno molecular en presencia de Pd/C.⁷⁹ Se requiere agregar un exceso de formiato de amonio ya que, si bien el hidrógeno es absorbido en gran cantidad por el paladio sobre carbón, éste también puede escapar del sistema a la temperatura de ebullición del metanol. Esto se observó cuando se intentó poner el formiato en cantidades estequiométricas resultando en una reacción incompleta después de 15 minutos.⁸⁰ Aunque hay muchas pruebas que demuestran que el hidrógeno disuelto en el interior de la fase metálica activa es un ingrediente esencial en la hidrogenación heterogénea de algunos grupos funcionales en catalizadores de Pd,^{81,82} el papel real del hidrógeno absorbido en el mecanismo catalítico aún no se conoce bien a nivel microscópico. Sin embargo, se han propuesto mecanismos que involucran al ácido fórmico como fuente de hidruro y paladio como catalizador.⁸³

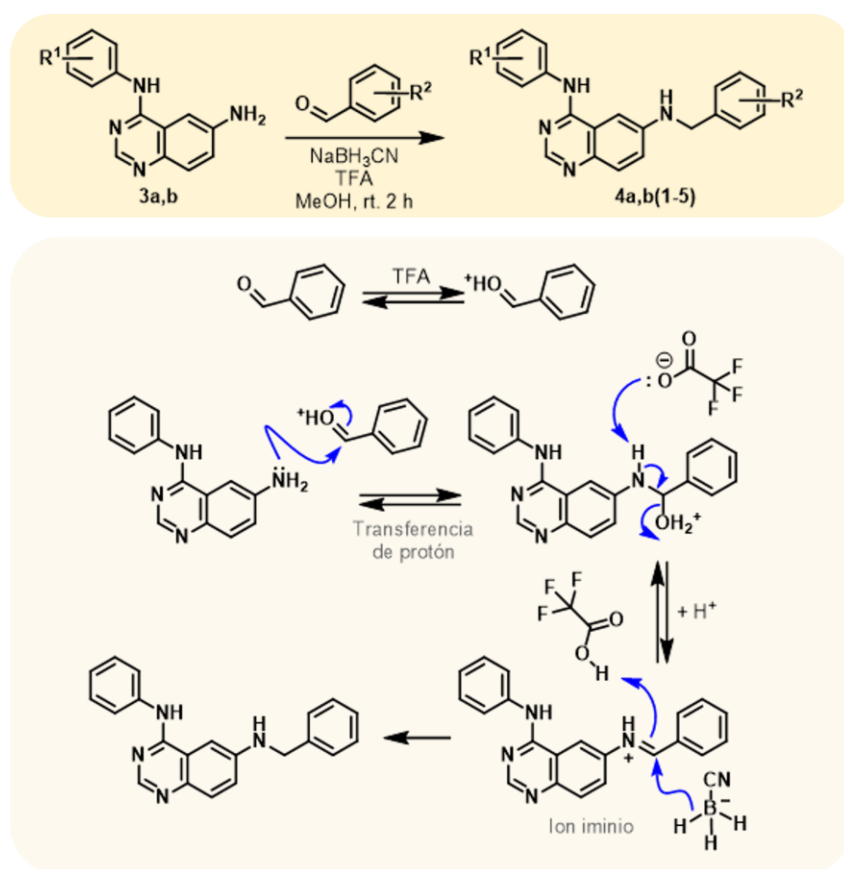
La preparación de los dos intermediarios **Int3a** y **Int3b** resulta en un procedimiento sencillo que ofrece buena pureza de los compuestos y rendimientos favorables. Incluso,

el compuesto **Int3a** se obtiene como finos cristales color verde claro, mientras que el compuesto **Int3b** se observa como un sólido amorfo color amarillo.

7.4. Síntesis de productos **4a,b(1-5)**

Las reacciones de aldehídos o cetonas con amoníaco, aminas primarias o aminas secundarias en presencia de agentes reductores para dar aminas primarias, secundarias o terciarias, respectivamente, conocidas como aminaciones reductivas, se encuentran entre las herramientas más útiles e importantes en la síntesis de diferentes tipos de aminas.

La reacción implica la formación inicial de intermediario carbinol que se deshidrata para formar una imina. En las condiciones de reacción, que suelen ser fuertemente ácidas, la imina se protona para formar un ion iminio.⁸⁴ La reducción posterior de este ion iminio produce la amina correspondiente. (Esquema 7.7)



Esquema 7.7. Mecanismo de reacción planteado para la formación de los productos finales **4a1-5** y **4b1-5**

Los rendimientos logrados en la síntesis de los productos van desde 74.3% para el caso del compuesto **4a5** hasta un 89.8% para el caso del compuesto **4b3**. Con ayuda de un equipo térmico digital se determinó el punto de fusión de los compuestos (Tabla 7.1).

Tabla 7.1. Rendimiento, punto de fusión y factor de retención en una mezcla cloroformo metanol de los productos finales **4a1-5** y **4b1-5**

Compuesto	Rendimiento (%)	Punto de fusión (°C)	R.f. (CHCl ₃ /MeOH 8:2)
4a1	80.6	205–207	0.66
4a2	86.3	212–214	0.52
4a3	78.6	200–202	0.65
4a4	84.2	196–198	0.68
4a5	74.3	198–199	0.68
4b1	80.4	191–192	0.63
4b2	84.9	195–196	0.50
4b3	89.8	192–193	0.63
4b4	81.3	190–192	0.63
4b5	82.1	193–194	0.63

7.5. Análisis instrumental de productos finales **4a,b(1-5)**

El análisis instrumental de los productos finales se realizó mediante espectrofotometría de masas de alta resolución, para todos los compuestos se muestra el gráfico con la espectrometría de masas en el Anexo 1. También, se realizaron experimentos de RMN en una dimensión de protón (¹H) y de carbono (¹³C).

El análisis de las señales de RMN muestran un patrón similar entre las moléculas sintetizadas. En la Figura 7.7 se muestran las señales representativas comunes entre cada serie de las moléculas. Por el lado de la RMN de protón resalta entre ambas series el metileno que funge como conector entre la quinazolina y el fenilo en posición 4 que como es de esperar de carbonos unidos a un átomo como nitrógeno, su desplazamiento es bajo por efecto de desprotección.

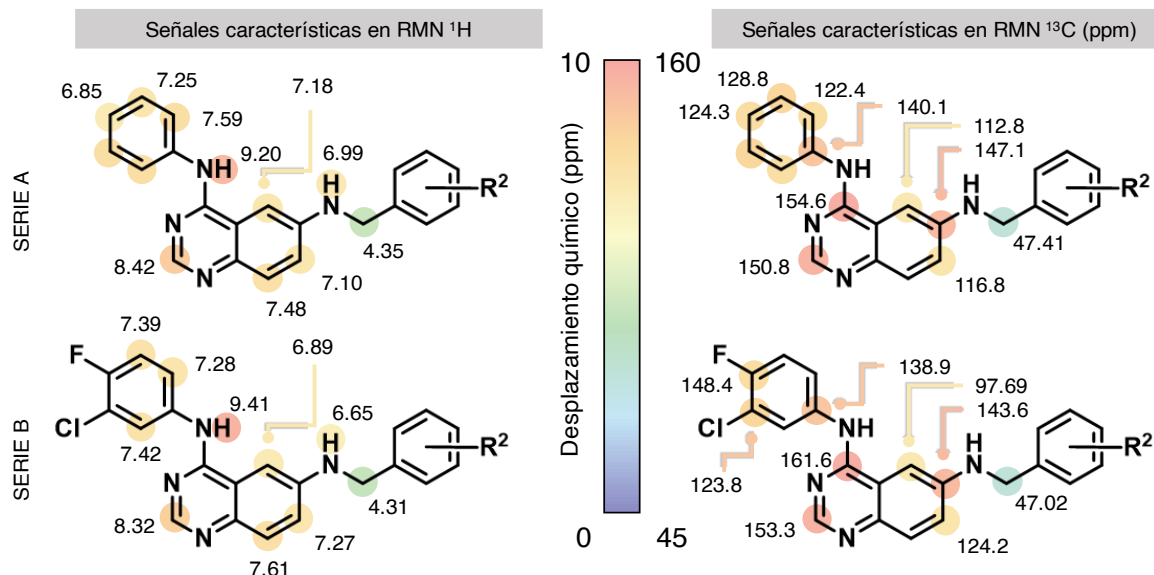
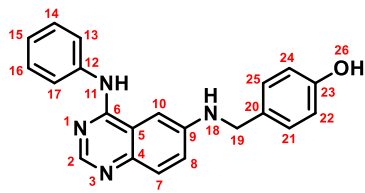


Figura 7.1. Señales características de resonancia magnética nuclear de protón (¹H NMR, 0-10 ppm en la barra de espectro) y resonancia magnética nuclear de carbono 13 (¹³C NMR, 45-160 ppm en la barra de espectro) de las moléculas sintetizadas. Las señales marcadas tienen unidades de ppm y representan el promedio de las señales obtenidas por cada átomo en las cinco moléculas de cada serie.

En la Tabla 7.2 se desglosa las señales de cada una de las moléculas con el detalle de su masa molecular obtenida a partir de la espectrometría de masas, las señales de los hidrógenos y carbonos en sus respectivos experimentos.

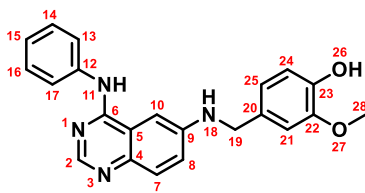
Tabla 7.2. Caracterización instrumental mediante resonancia magnética nuclear de protón (¹H NMR), resonancia magnética nuclear de carbono 13 (¹³C NMR) y espectrometría de masas de alta resolución APCI de los compuestos **4a1-5** y **4b1-5**

Compuesto	Información espectroscópica
<p>4a1 MM: 326.40 g/mol</p>	<p>EMAR, APCI+ (m/z) 327.1711 [M+H]⁺. Anexo A1.4.1.</p> <p>¹H NMR (400 MHz, TMS, DMSO-d₆) δ 9.3 (s, 1H, H₁₁), 8.3 (s, 1H, H₂), 7.8 (d, J = 8.0 Hz, 2H, H₁₃, H₁₇), 7.5 (d, J = 8.8 Hz, 1H, H₇), 7.5 (d, J = 7.5 Hz, 2H, H₈, H₁₀), 7.4 – 7.3 (m, J = 7.9 Hz, 6H, H₁₄, H₁₆, H₂₁, H₂₂, H₂₄, H₂₅), 7.3 (t, J = 7.3 Hz, 1H, H₂₃), 7.1 (t, J = 7.4 Hz, 1H, H₁₅), 6.7 (t, J = 5.9 Hz, 1H, H₁₈), 4.5 (d, J = 5.7 Hz, 2H, H₁₉). Anexo A1.4.1.</p> <p>¹³C NMR (101 MHz, TMS, DMSO-d₆) δ 156.491 (C-6), 150.434 (C-2), 147.729 (C-9), 143.34 (C-4), 139.85 (C-12), 139.85 (C-20), 128.78 (C-14, C-16), 128.78 (C-21, C-25), 128.19 (C-22, C-24), 127.377 (C-7), 127.377 (C-23), 124.12 (C-5), 123.57 (C-15), 122.69 (C-13), 122.69 (C-17), 116.93 (C-8, C-10), 47.2 (C-19). Anexo A1.4.1.</p>



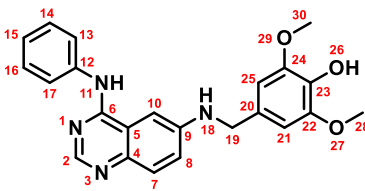
4a2 MM: 342.40 g/mol

EMAR, APCI+ (m/z) 343.1570 [M+H]⁺. Anexo A1.4.2.
¹H NMR (400 MHz, TMS, DMSO-d₆) δ 9.3 (s, 1H, H₁₁), 9.3 (s, 1H, H₂₆), 8.3 (s, 1H, H₂), 7.8 – 7.7 (m, 2H, H₇, H₁₀), 7.5 (d, J = 9.6 Hz, 1H, H₈), 7.4 – 7.3 (m, 4H, H₁₃, H₁₄, H₁₆, H₁₇), 7.3 – 7.2 (m, 2H, H₂₁, H₂₅), 7.1 – 7.0 (m, 1H, H₁₅), 6.7 – 6.7 (m, 2H, H₂₂, H₂₄), 6.5 (t, J = 5.6, 5.6 Hz, 1H, H₁₈), 4.3 (d, J = 5.5 Hz, 2H, H₁₉). Anexo A1.4.2.
¹³C NMR (101 MHz, TMS, DMSO-d₆) δ 156.86 (C-6), 156.42 (C-23), 150.3 (C-2), 147.76 (C-9), 143.25 (C-4), 140.13 (C-12), 129.78 (C-20), 129.56 (C-21, C-25), 128.77 (C-14, C-16), 124.23 (C-7), 123.54 (C-15), 122.11 (C-13, C-17), 116.9 (C-22, C-24), 116.9 (C-5), 116.9 (C-8), 115.35 (C-10), 46.97 (C-19). Anexo A1.4.2.



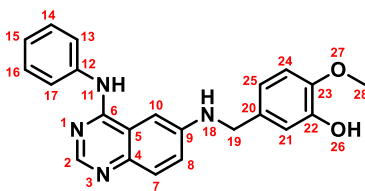
4a3 MM: 372.43 g/mol

EMAR, APCI+ (m/z) 373.1702 [M+H]⁺. Anexo A1.4.3.
¹H NMR (400 MHz, TMS, DMSO-d₆) δ 9.3 (s, 1H, H₂₆) 8.8 (s, 1H, H₁₁), 8.4 (d, 1H, H₂), 8.0 (d, 1H, H₇), 7.4 (dd, 3H, H₁₃, H₁₇), 7.1 – 7.2 (m, 6H, H₁₄, H₁₅, H₁₆, H₂₁, H₂₄, H₂₅), 6.8 (dd, 1H, H₁₀), 6.8 (d, 1H, H₈), 6.6 (d, 1H, H₁₈), 4.5 (s, 2H, H₁₉), 3.8 (s, 3H, H₂₈). Anexo A1.4.3.
¹³C NMR (101 MHz, TMS, DMSO-d₆) δ 153.57 (C-23), 152.74 (C-2), 147.13 (C-9), 147.11 (C-6), 147.11 (C-22), 145.36 (C-4), 138.4 (C-12), 138.38 (C-20), 128.53 (C-25), 128.53 (C-14, C-16), 126.42 (C-7), 126.42 (C-15), 123.49 (C-13, C-17), 121.37 (C-5), 116.99 (C-8), 114.89 (C-24), 111.62 (C-21), 108.33 (C-10), 55.96 (C-28), 48.69 (C-19). Anexo A1.4.3.



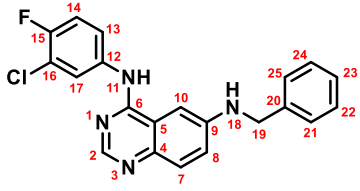
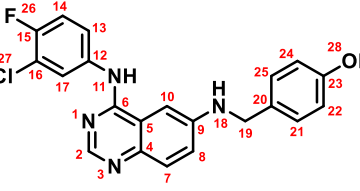
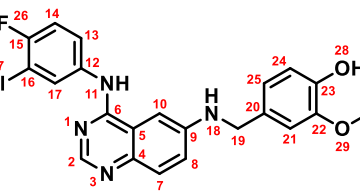
4a4 MM: 402.45 g/mol

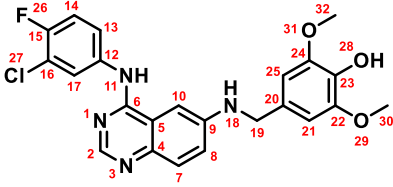
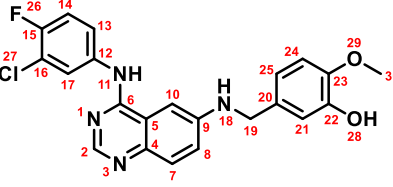
EMAR, APCI+ (m/z) 403.0716 [M+H]⁺. Anexo A1.4.4.
¹H NMR (400 MHz, TMS, DMSO-d₆) δ 9.3 (s, 1H, H₂₆), 9.3 (s, 1H, H₁₁) 8.8 (s, 1H, H₂), 8.3 (d, J = 7.4 Hz, 1H, H₁₀), 8.0 – 7.9 (m, 1H, H₁₈), 7.5 (d, J = 9.0 Hz, 1H, H₇), 7.4 – 7.2 (m, 6H, H₁₃, H₁₄, H₁₆, H₁₇), 7.0 (d, J = 2.0 Hz, 1H, H₂₁, H₂₅), 6.8 (dd, J = 8.0, 2.0 Hz, 1H), 6.7 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H₈), 6.6 (t, J = 5.6, 5.6 Hz, 1H, H₁₅), 4.3 (d, J = 5.5 Hz, 2H, H₁₉), 3.7 (s, 6H, H₂₈, H₃₀). Anexo A1.4.4.
¹³C NMR (101 MHz, TMS, DMSO-d₆) δ 156 (C-6), 150.38 (C-2), 148.51 (C-22, C-24), 147.86 (C-4), 146.02 (C-9), 141.48 (C-12), 130.84 (C-23), 130.84 (C-20), 128.95 (C-14, C-16), 126.3 (C-7), 124.35 (C-15), 121.63 (C-13, C-17), 116.08 (C-8), 114.08 (C-5), 110.62 (C-25, C-21), 110.62 (C-10), 55.98 (C-28, C-30), 47.33 (C-19) Anexo A1.4.4.



4a5 MM: 372.43 g/mol

EMAR, APCI+ (m/z) 343.1570 [M+H]⁺. Anexo A1.4.5.
¹H NMR (400 MHz, TMS, DMSO-d₆) δ 9.3 (s, 1H, H₂₆), 8.9 (s, 1H, H₁₁), 8.3 (s, 1H, H₂), 7.8 – 7.7 (m, 2H, H₁₃, H₁₇), 7.5 (d, 1H, H₇), 7.4 – 7.3 (m, 4H, H₁₄, H₁₆, H₁₀, H₈), 7.1 – 7.0 (m, 1H, H₂₄), 6.9 – 6.8 (m, 3H, H₁₈, H₂₁, H₂₅), 6.5 (t, J = 5.7, 5.7 Hz, 1H, H₅), 4.3 (d, J = 5.7 Hz, 2H, H₁₉), 3.7 (s, 3H, H₂₈). Anexo A1.4.5.
¹³C NMR (101 MHz, TMS, DMSO-d₆) δ 156.47 (C-6), 150.32 (C-2), 147.15 (C-4), 146.92 (C-22), 146.92 (C-9), 146.92 (C-23), 140.1 (C-12), 132.24 (C-20), 128.78 (C-

	<p>14, C-16), 124.18 (C-7), 123.57 (C-15), 122.67 (C-5), 122.12 (C-13, C-17), 118.91 (C-25), 116.91 (C-8), 115.6 (C-21), 112.54 (C-24), 112.54 (C-10), 56.09 (C-28), 46.87 (C-19). Anexo A1.4.5.</p>
 <p>4b1 MM: 378.84 g/mol</p>	<p>EMAR, APCI+ (m/z) 379.1127 [M+H]⁺. Anexo A1.4.6.</p> <p>¹H NMR (400 MHz, TMS, DMSO-d₆) δ 9.8 (s, 1H, H₁₁), 8.4 (d, J = 2.8 Hz, 1H, H₂), 8.1 (dd, J = 6.8, 2.6 Hz, 1H, H₇), 7.8 – 7.7 (m, 1H, H₁₄), 7.6 (dd, J = 8.9, 4.4 Hz, 1H, H₁₃), 7.5 – 7.4 (m, 2H, H₁₀, H₁₇), 7.4 – 7.2 (m, 4H, H₂₁, H₂₂, H₂₄, H₂₅), 7.3 – 7.2 (m, 1H, H₂₃), 6.8 (t, J = 6.0, 6.0 Hz, 1H, H₁₈), 6.5 (s, 1H, H₈), 4.4 (d, J = 5.3 Hz, 2H, H₁₉). Anexo A1.4.6.</p> <p>¹³C NMR (101 MHz, TMS, DMSO-d₆) δ 156.62 (C-6), 152.63 (C-2), 148.25 (C-15), 148.23 (C-4), 148.23 (C-9), 139.63 (C-12), 139.63 (C-20), 128.81 (C-21, C-25), 128.21 (C-7), 127.41 (C-22, C-24), 126.81 (C-23), 124.85 (C-5), 124.39 (C-8), 123.28 (C-13, C-16, C-17), 119.18 (C-14), 97.77 (C-10), 47.07 (C-19) Anexo A1.4.6.</p>
 <p>4b2 MM: 394.83 g/mol</p>	<p>EMAR, APCI+ (m/z) 395.1467 [M+H]⁺. Anexo A1.4.7.</p> <p>¹H NMR (400 MHz, TMS, DMSO-d₆) δ 9.5 (s, 1H, H₂₈), 9.3 (s, 1H, H₁₁), 8.3 (s, 1H, H₂), 7.8 – 7.7 (m, 2H, H₁₇), 7.5 (dd, J = 8.9, 7.0 Hz, 1H, H₁₄), 7.4 – 7.1 (m, 6H, 7, H₁₃, H₂₁, H₂₂, H₂₄, H₂₅), 6.7 – 6.6 (m, 2H, H₈, H₁₀), 6.6 (t, J = 5.4, 5.4 Hz, 1H, H₁₈), 4.3 (d, J = 4.8 Hz, 2H, H₁₉). Anexo A1.4.7.</p> <p>¹³C NMR (101 MHz, TMS, DMSO-d₆) δ 170.77 (C-6), 157.56 (C-23), 152.28 (C-2), 147.98 (C-15), 142.79 (C-9), 141.99 (C-4), 137.36 (C-12), 133.16 (C-20), 129.57 (C-21, C-25), 128.46 (C-7), 124.93 (C-8), 124.93 (C-16), 119.26 (C-13), 119.08 (C-17), 116.1 (C-5), 115.55 (C-22, C-24), 115.19 (C-14), 97.52 (C-10), 46.93 (C-19). Anexo A1.4.7.</p>
 <p>4b3 MM: 424.86 g/mol</p>	<p>EMAR, APCI+ (m/z) 425.1223 [M+H]⁺. Espectro A1.4.8.</p> <p>¹H NMR (400 MHz, TMS, DMSO-d₆) δ 9.50 (s, 1H, H₁₁), 8.97 (s, 1H, H₂₈), 8.32 (s, 1H, H₂), 8.08 (dd, J = 6.8, 2.6 Hz, 1H, H₁₇), 7.74 (tdd, J = 9.5, 4.7, 2.4 Hz, 1H, H₇), 7.50 (t, J = 8.0 Hz, 1H, H₁₄), 7.41 – 7.20 (m, 3H, H₈, H₁₃, H₂₅), 7.01 (d, J = 1.9 Hz, 1H, H₁₀), 6.81 (dd, J = 8.0, 1.9 Hz, 1H, H₁₈), 6.70 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H₂₄), 6.58 (t, J = 6.2 Hz, 1H, H₂₁), 4.27 (s, 1H, H₁₉), 3.71 (s, 3H, H₃₀).</p> <p>¹³C NMR (101 MHz, TMS, DMSO-d₆) δ 156.63 (C-6), 155.04 (C-2), 148.88 (C-4), 148.88 (C-15), 139.63 (C-9), 139.63 (C-12), 139.63 (C-22), 139.63 (C-23), 128.81 (C-20), 128.81 (C-25), 128.23 (C-7), 123.28 (C-8), 123.28 (C-13), 123.28 (C-16), 123.28 (C-17), 119.18 (C-14), 119.18 (C-24), 116.72 (C-5), 115.5 (C-21), 97.77 (C-10), 63.28 (C-30), 47.06 (C-19)</p>

 <p>4b4 MM: 454.89 g/mol</p>	<p>EMAR, APCI+ (m/z) 455.1245 [M+H]⁺. Espectro A1.4.4. ¹H NMR (400 MHz, TMS, DMSO-d₆) δ 9.5 (s, 1H, H₁₁), 8.4 (s, 1H, H₂), 8.3 (s, 1H, H₁₀), 8.2 (s, 1H, H₂₈), 7.9 – 7.7 (m, 1H, H₇), 7.5 (dd, J = 9.3, 7.1 Hz, 1H, H₁₄), 7.4 – 7.3 (m, 2H, H₁₃, H₁₇), 7.2 – 7.1 (m, 1H, H₈), 6.7 (s, 2H, H₂₁), 6.6 (d, J = 5.2 Hz, 1H, H₁₈), 4.3 (d, J = 4.2 Hz, 2H, H₁₉), 3.7 (s, 6H, H₃₀, H₃₂). ¹³C NMR (101 MHz, TMS, DMSO-d₆) δ 162.7 (C-15), 151.4 – 146.4 (C-22, C-24), 135.0 (C-23), 128.6 (C-20), 128.1 (C-12), 126.3 (C-13, C-17), 123.1 (C-16), 122.5 (C-7), 119.1 (C-8), 115.4 (C-5, C-14), 106.1 (C-21, C-25), 56.4 (C-30, C-32).</p>
 <p>4b5 MM: 424.86 g/mol</p>	<p>EMAR, APCI+ (m/z) 425.1176 [M+H]⁺. Espectro A1.4.4. ¹H NMR (400 MHz, TMS, DMSO-d₆) δ 9.6 (s, 1H, H₁₁), 9.0 (s, 1H, H₂, H₂₈), 8.4 (d, J = 9.5 Hz, 1H, H₁₀), 8.1 (dd, J = 6.9, 2.6 Hz, 1H, H₁₇), 7.8 – 7.7 (m, 1H, H₈), 7.5 (d, J = 8.8 Hz, 1H, H₇), 7.4 – 7.3 (m, 3H, H₁₃), 7.2 – 7.3 (m, 1H, H₁₄), 6.9 – 6.8 (m, 3H, H₁₈, H₂₁, H₂₄, H₂₅), 4.3 (d, J = 4.8 Hz, 2H, H₁₉), 3.7 (s, 3H, H₃₀). ¹³C NMR (101 MHz, TMS, DMSO-d₆) δ 152.4 (C-6), 147.5 (C-4), 140.0 (C-9), 137.2 (C-12), 132.1 (C-20), 128.0 (C-7), 125.3 (C-25, C-21), 124.7 (C-17), 118.9 (C-8, C-13), 116.9 (C-14), 115.5 (C-5, C-16), 112.6 (C-24), 97.5 (C-10), 56.1 (C-19), 46.8 (C-30).</p>

8. Ensayos de inhibición enzimática

Este capítulo presenta la metodología y los resultados obtenidos al llevar a cabo los estudios de inhibición enzimática en dos dianas distintas, xantina oxidoreductasa bovina (bXO) y la tirosina cinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (hEGFR). Cabe destacar que la xantina oxidasa humana (hXO) y bXO tienen en común el 95.3% de similitud en sus aminoácidos y un RMSD de 0.575 Å cuanto a su estructura cuaternaria; ello hace que bXO sea un excelente modelo para extrapolar la actividad en hXO.

Con bXO se llevó a cabo un screening primario con las 10 quinazolininas sintetizadas y además se llevó a cabo un ensayo de cinética enzimática para saber, de manera muy general, cómo afectan las moléculas a la enzima. Por otra parte, con hEGFR únicamente se llevó a cabo un screening primario para medir cómo afecta el porcentaje de actividad de hEGFR que tienen las moléculas sintetizadas.

8.1. Inhibición de bXO

8.1.1. Metodología

8.1.1.1. Porcentaje de la actividad de bXO

La potencia de inhibición de bXOR in vitro con alopurinol como control positivo se midió mediante la determinación espectrofotométrica de la formación de ácido úrico a 290 nm

a 25°C. La solución de enzima (40 mU/mL) se preparó disolviendo bXO en amortiguador HEPES (150 mM, pH 7.5).

La solución de sustrato se preparó disolviendo xantina en hidróxido de sodio 1 M; a continuación, se diluyó con amortiguador hasta alcanzar una concentración de 75 μ M. Los compuestos sintetizados se disolvieron en DMSO para hacer una solución stock. La concentración final de DMSO es inferior al 1%. Posteriormente, estos fueron diluidos con la solución amortiguadora hasta alcanzar la concentración de 10 μ M. La reacción se realizó en placas de 96 pozos que contenían 200 μ L de mezcla de ensayo. Los volúmenes exactos de cada componente de la mezcla de reacción se detallan en el Anexo 2.1. Después de incubar durante 25 minutos a 25°C, la reacción se inició mediante la adición de una solución de xantina (40 mU/mL), y la potencia inhibidora de bXOR de los compuestos probados se midió por la producción de ácido úrico en los primeros 15 min. Todos los compuestos se probaron por triplicado.

Los análisis estadísticos se realizaron con GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, LLC).

8.1.1.2. Estudio cinético de bXO en ausencia y en presencia de inhibidores

El modo de acción de los compuestos representativos **4b2**, **4b3**, **4b4** y **4b5** se investigó mediante estudios de cinética enzimática, variando las concentraciones de xantina a 10, 25, 75, 150 y 300 μ M. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Las velocidades iniciales se obtuvieron sacando la pendiente de la línea recta formada durante los primeros 2 minutos de la reacción. Los resultados se analizaron mediante un gráfico de Lineweaver-Burk y un análisis con regresión no lineal en GraphPad Prism 9, a partir del cual se pudo calcular el valor de K_m y V_{max} , en presencia y ausencia de inhibidor.

8.1.2. Resultados y Discusión

Se evaluó el porcentaje de actividad in vitro de la xantina oxidasa bovina en presencia de los compuestos **4aX** y **4bX**, y se resume en la Figura 8.1. Como se describió previamente, se sabe que alopurinol es un inhibidor competitivo de bXO. Además, se ha demostrado que alopurinol se disocia muy lentamente de la enzima.⁸⁵ En general, los compuestos de la serie B (**4bX**) mostraron actividades inhibitorias superiores al alopurinol. En cambio, los compuestos de la serie A (**4aX**) disminuyeron muy poco la actividad de bXO. Incluso, el compuesto **4a1** incrementó la actividad de la enzima un 7%. Estos resultados indican que la sustitución en el anillo de fenilo de la posición 4 de la quinazolina es esencial para la inhibición de la enzima. Además, no se encontró un patrón que indique una mejora en la actividad variando los sustituyentes del bencilo de la posición 6 de la quinazolina. Resalta el compuesto **4b1** que, a pesar de tener la doble sustitución con halógenos del anillo de fenilo de la posición 4 de la quinazolina no alcanzó a disminuir la actividad de bXO ni un 10%. La molécula **4b1** comparte con todas las moléculas de la serie A un fenilo sin sustituciones. Con este estudio podemos concluir que tener al menos un fenilo sin sustituciones afecta muy poco a la actividad de la enzima.

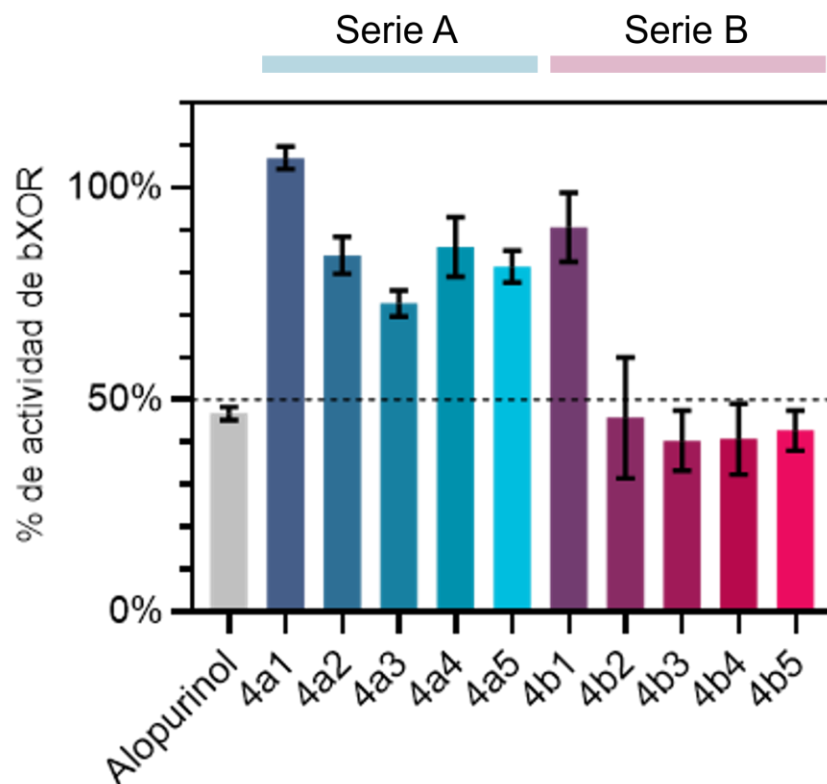


Figura 8.1. Actividad de bXO en presencia de alopurinol (gris), compuestos de la serie A **4aX**(degradado azul) y **4bX** (degradado morado)

Debido a que a la fecha no existen moléculas estructuralmente similares a las obtenidas en este trabajo que inhiban a bXO, se realizó un ensayo que permitió dar a conocer el probable mecanismo por el que estos compuestos ejercen su acción inhibitoria en bXO.

Para explorar el tipo de inhibición enzimática de los derivados de quinazolina diseñados, se realizó un experimento cinético de estado estacionario de la enzima con los compuestos más activos en el primer screening a diferentes concentraciones de sustrato (xantina 100-300 μM). Como se muestra en la Figura 8.2, los datos cinéticos revelaron un modo de inhibición competitivo con alopurinol al aumentar la K_m de 18.87 μM a 78.19 μM mientras que los cuatro compuestos probados podrían ser inhibidores de tipo mixto de bXO ya que afectaron tanto a la K_m como a la V_{max} significativamente con respecto a la actividad basal. El tipo de inhibición mixta que presentaron las moléculas es del tipo que aumenta la afinidad de la enzima por el sustrato, disminuyendo la K_m y la V_{max} .

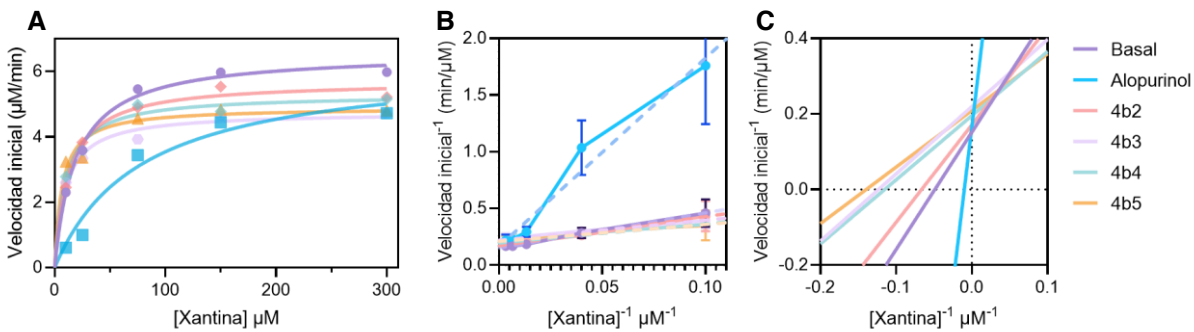


Figura 8.2. Ensayo de cinética enzimática. (A) Gráfico de hipérbolas de Michaelis-Menten de bXO en presencia de alopurinol (azul), compuestos de la serie B **4b2-5** (rosa, lila, verde y naranja) y la actividad basal de la enzima. (B) Gráfico de dobles recíprocos (Lineweaver-Burk) mostrando los puntos de cada determinación con sus barras de error. (C) Acercamiento del gráfico de dobles recíprocos en la región cercana a los valores de intersección con los ejes.

Muy pocos datos en la literatura muestran datos de inhibición de bXOR con estructuras semejantes a las presentadas, sin embargo, algunos autores que han hecho moléculas con algunos fragmentos que contienen algún anillo sustituido con halógenos han reportado valores con una interpretación parecida a la aquí indicada. En el 2011, K.R. Sathisa et.al. publicaron una serie de derivados de 7-metil-2-(fenoximetil)-5H-[1,3,4]tiadiazolo[3,2-a]pirimidin-5-ona.⁸⁶ Los valores de IC₅₀ de sus compuestos **6b** (461 nM), **6c** (603 nM), los cuales contienen un fragmento fenilo con halógenos sustituidos, presentaron valores de IC₅₀ más bajos que alopurinol (730 nM). (Figura 8.3)

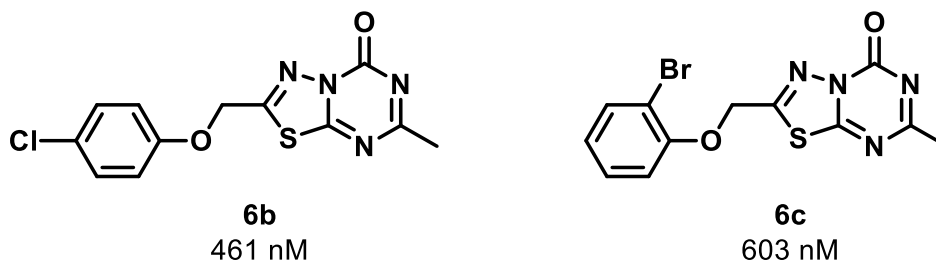


Figura 8.3. Estructura de las moléculas **6b** y **6c** sintetizadas y estudiadas por K.R. Sathisa et.al. como posibles inhibidores de bXO.

Incluso la molécula **MG12**, previamente descrita, también demostró que fenilos con sustituciones de halógeno disminuyen significativamente la actividad de la enzima.⁶²

Con todo lo anterior, este estudio cobra relevancia y abre una puerta a la comprensión de las sustituciones con halógeno en anillos aromáticos para la inhibición de bXO. Claramente, se requiere un estudio con más derivados para comprobar dicha hipótesis.

8.2. Inhibición de hEGFR

8.2.1. Metodología

Todos los componentes del ensayo se disolvieron en el amortiguador de pH para la reacción. El amortiguador de pH fue preparado a partir del 2-amino-2-hidroximetilpropan-1,3-diol (Tris base) y la disolución se llevó a pH 7.5 adicionando HCl concentrado, la concentración final fue 40 mM. Adicionalmente, al amortiguador se adicionó MgCl₂ y albúmina sérica bovina (BSA) a concentración de 20 mM y 0.1 mg/mL respectivamente. Se prepararon disoluciones stock de los compuestos a evaluar en dimetilsulfóxido (DMSO).

Los ensayos de inhibición se llevaron a cabo en 25 µL en una placa de 96 pozos blanca. Se adicionaron 100 ng de enzima en cada pozo, los sustratos, Poly(Glu,Tyr) 4:1 y ATP tuvieron una concentración final de 1 µM en tanto que la de los inhibidores fue de 10 nM. Los ensayos se realizaron a 5 horas de incubación, después de las cuales, se utilizó el sistema de detección de ADP para cinasas ADP-Glo™ Kinase Assay (#catV6930). Como control de inhibición se ocupó gefitinib.

8.2.2. Resultados y Discusión

En la Figura 8.4 se observan los resultados del estudio de inhibición de la actividad de hEGFR. Como control de inhibición se ocupó gefitinib, adquirido comercialmente. Como muestran los resultados, gefitinib mostró un 84% de inhibición de la actividad de EGFR, el cual se sabe es un reconocido inhibidor de hEGFR ocupado en la práctica clínica con el objetivo de tratar el carcinoma de pulmón de células no pequeñas (CPNM).^{87,88} así mismo, la mayoría de las moléculas de ambas series mostraron una inhibición de hEGFR menor que las de gefitinib, excepto la molécula **4a2**. Esta molécula alcanzó un 88.20% de inhibición de hEGFR, en ese sentido, cabe la posibilidad de realizar modificaciones a dicha molécula para incrementar la inhibición. Es de resaltar que su análogo de la serie B, **4b2**, disminuyó su actividad de manera significativa, indicando que la sustitución del anillo en posición 4 de la quinazolina es importante de manera particular para estos dos compuestos. Sin embargo, esto no ocurrió con los demás análogos ya que, por ejemplo, el compuesto **4a3** tuvo menor actividad que su análogo de la serie B, **4b3**. Esto da a entender que las modificaciones en la posición 6 de la quinazolina en combinación con las sustituciones del anillo de fenilo de la posición 4 provocan muy poca variación en las actividades encontradas

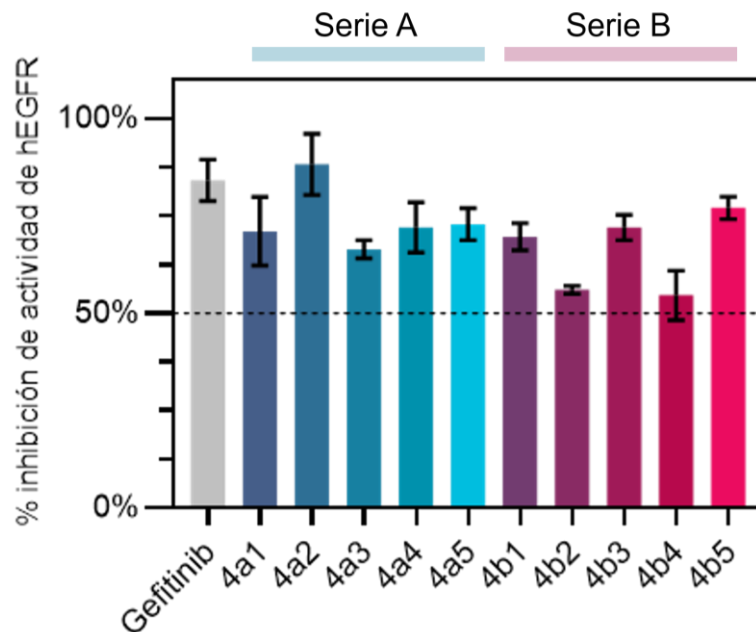


Figura 8.4. Porcentaje de actividad de hEGFR en presencia de gefitinib (gris), compuestos de la serie A **4aX** (degradado azul) y **4bX** (degradado morado)

9. Estudios de acoplamiento molecular

9.1. Acoplamiento molecular en bXOR

El acoplamiento molecular en bXOR se realizó con base en los resultados obtenidos en el estudio cinético de la enzima con las quinazolininas sintetizadas. En muchas investigaciones llevadas a cabo con diferentes moléculas diseñadas como potenciales inhibidores de xantina oxidasa se ha encontrado con que estas moléculas también son inhibidores mixtos⁸⁹⁻⁹⁹ y se ha tratado de elucidar su sitio de unión mediante acoplamiento molecular. Por definición sabemos que un inhibidor competitivo es aquel que se une solamente a la enzima libre, un inhibidor no competitivo es aquel que puede unirse a la apoenzima o al complejo enzima-sustrato y un inhibidor mixto es aquel que puede presentar ambos tipos de inhibición. Se han propuesto diversas opciones que cumplen con cada una de las definiciones antes mencionadas¹⁰⁰ (Figura 9.1). Para fines de este estudio, se consideró para la inhibición competitiva de los compuestos el modelo de inhibición señalado en la Figura 9.1A. Para el caso de la inhibición no competitiva, se contempló el modelo de inhibición de la Figura 9.1G; esto, debido a que algunos estudios demuestran sitios de unión alostéricos en enzimas semejantes a bXO.

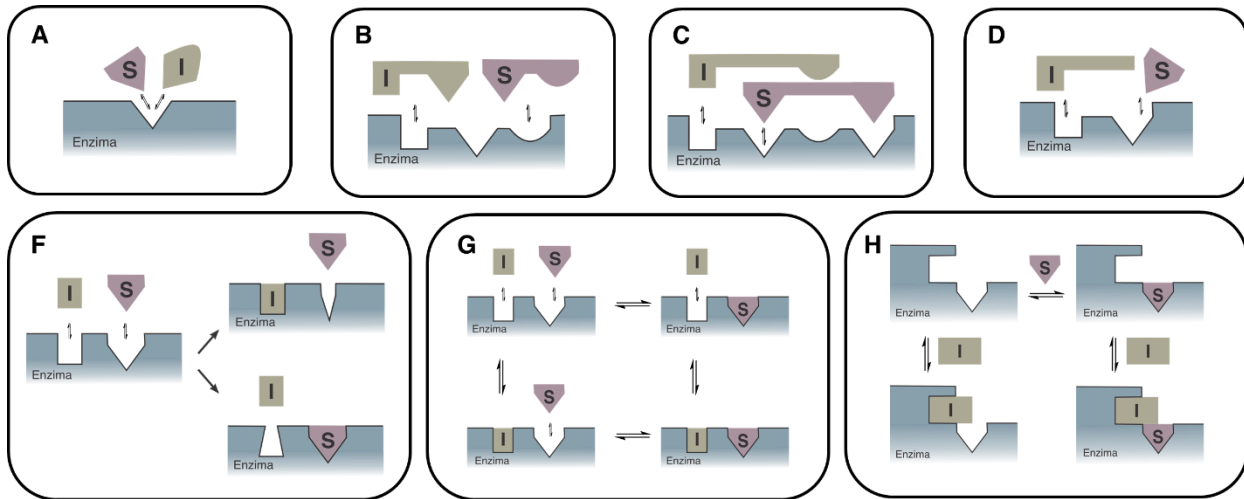


Figura 9.1. (A-D) Tipos de inhibición competitiva. (F-G) Tipos de inhibición no competitiva.

Por ejemplo, en un estudio llevado a cabo por Coelho et. al. encontraron un sitio alostérico en la aldehído oxidasa humana (hAOX).¹⁰¹ (Figura 9.2) En él, describieron a un compuesto tipo fenotiazina que actúa como inhibidor no competitivo en hAOX e inhibidor mixto en bXO. Los autores refieren a que dicho sitio alostérico encontrado en hAOX, puede ser también sitio alostérico en bXO. Dicha hipótesis fue probada en este trabajo haciendo un estudio de acoplamiento molecular ciego, es decir, acoplar un ligando en toda la superficie de una proteína sin ningún conocimiento previo del sitio de unión.

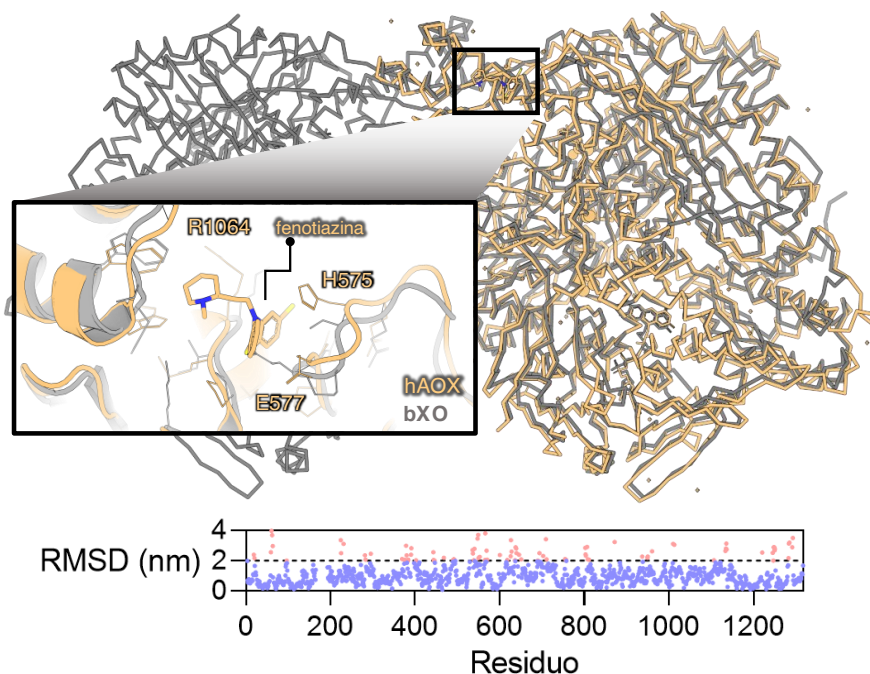


Figura 9.2. Sitio alostérico de hAOX y superposición con bXO. En amarillo se muestra una de las subunidades de hAOX cocrystalizado con el inhibidor tipo fenotiazina (PDB ID: 4UHX, 2.7 Å) en gris se muestra la estructura de bXO. La gráfica de abajo muestra el RMSD en nm de la superposición de ambas estructuras; en azul se muestran los residuos con RMSD < 1 nm y en rosa se muestran los residuos con RMSD > 1 nm

9.1.1. Metodología

9.1.1.1. Preparación de la proteína

Los estudios de acoplamiento molecular sobre la estructura cristalina de alta resolución de bXOR (PDB 3UNA, 1.90 Å) se llevaron a cabo con Autodock Vina 1.2.1^{102,103}. La preparación de la enzima se llevó a cabo con el módulo Dock Prep de UCSF Chimera 1.15¹⁰⁴. Se añadieron átomos de hidrógeno, y se eliminaron las moléculas de agua. Las cadenas laterales incompletas fueron corregidas con la biblioteca de rotámeros de Dunbrack 2010¹⁰⁵. Los elementos de proteína faltantes se modelaron con el servidor Modeller¹⁰⁶.

9.1.1.2. Preparación de los ligandos

Todos los ligandos se construyeron y minimizaron en Avogadro 1.2.0. utilizando el campo de fuerza universal (UFF)¹⁰⁷. Posteriormente, los compuestos se sometieron a optimización de la geometría y a la minimización de la energía en el nivel teórico B3LYP/6-31G(d)^{108,109} con Gaussian 16¹¹⁰.

9.1.1.3. Producción del acoplamiento molecular

La rejilla, los ligandos y los archivos de parámetros de acoplamiento se crearon ocupando los módulos `prepare_receptor`, `prepare_ligand` y la versión ejecutable para Linux de Autodock Vina 1.2.1. Para el acoplamiento molecular en el sitio activo de bXO, se usó el tamaño predeterminado de la caja alrededor del centro del ligando (ácido salicílico, SAL) y se ocupó la función de scoring de Vina. Para el acoplamiento molecular ciego, se construyó una caja alrededor de una de las subunidades de bXO y se ocupó la función de scoring de AutoDock 4.2.^{111,112} Debido a que el átomo de molibdeno no se encuentra parametrizado en Autodock Vina y no se realizó el proceso de parametrización, éste se cambió por un átomo de hierro conservando las distancias de los átomos coordinantes al metal; esto se puede llevar a cabo con cualquier otro átomo que se encuentre parametrizado en AD4 como Fe, Mn, Zn, Ca debido a que el receptor se mantuvo rígido y las distancias de los enlaces se conservaron en todo el proceso. Se llevó a cabo un acoplamiento molecular con múltiples ligandos para estudiar el comportamiento de inhibición competitiva de los compuestos evaluados. La conformación con la puntuación más alta fue seleccionada para la discusión. Además, los resultados del acoplamiento se visualizaron con el software PyMOL 2.4.1© Schrödinger, LCC.

9.1.2. Resultados y discusión

9.1.2.1. Acoplamiento molecular en el sitio de unión de bXO

Tomando en cuenta que las moléculas sintetizadas al ser inhibidores mixtos pueden presentar inhibición competitiva y no competitiva, se llevó a cabo un acoplamiento con dos ligandos a la vez (xantina-**4aX**, **4bX**) para estudiar su comportamiento competitivo en el sitio activo de bXO.

El primer análisis surge a partir de la unión del control positivo de inhibición, alopurinol. La pose con el score más alto es el que se muestra en la Figura 9.2 indicando que es posible que la interacción entre alopurinol y bXO es preferente sobre la interacción con su mismo sustrato, xantina. Alopurinol presenta tres interacciones relevantes para la unión; la primera, es un puente de hidrógeno (HB) con Arg880, la segunda es también un HB con Glu802, la tercera en una interacción π - π entre Phe914 y el sistema de anillos del alopurinol; también, es posible que el grupo hidroxilo de la Thr1010 pueda donar un HB al alopurinol, sin embargo, ésta última interacción estaría en competencia o añadida al HB con la Arg880. El modo de unión de alopurinol concuerda con los reportes que indican que éste realmente es una molécula suicida.^{53,113} Esto quiere decir durante la inhibición que lleva a cabo esta molécula también es sustrato de la enzima. En ese sentido, el C2 del anillo de pirimidina del alopurinol sufre una hidroxilación oxidativa formando oxipurinol. El acoplamiento molecular muestra que, justamente, el C2 de la pirimidina queda muy cerca del cofactor donde se lleva a cabo la reacción.

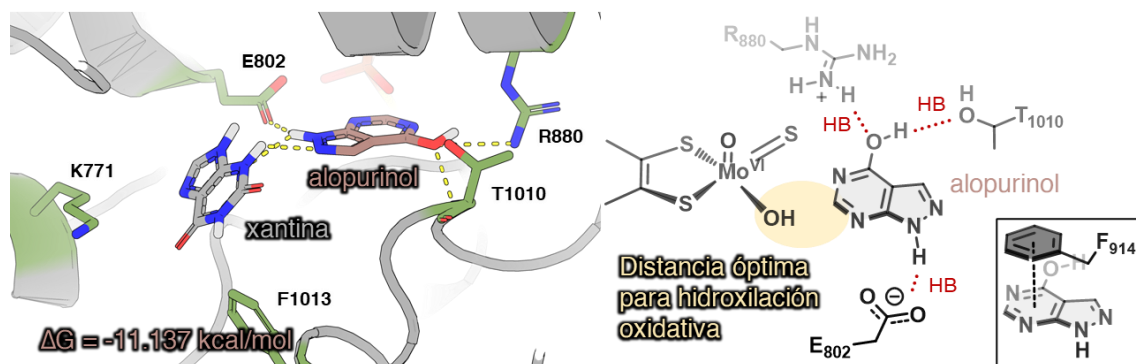


Figura 9.3. Modo de unión 3D y 2D y energía de allopurinol. A la izquierda se muestra allopurinol (café) y xantina (gris); se ilustran de color verde algunos aminoácidos del sitio activo importantes para la interacción de los ligandos. Del lado derecho se muestra el modo de unión en 2D resaltando las interacciones más importantes. Además, se representa la interacción de allopurinol con la Phe914.

Por otro lado, el acoplamiento molecular señala que es más favorable que xantina quede en su sitio de unión a bXO que las moléculas de la serie A. Esto tendría mucho sentido ya que, de acuerdo con los resultados de porcentaje de actividad de bXO, estas moléculas disminuyeron muy poco la actividad de la enzima. Los valores de energía mostrados en la tabla de la Figura 9.3 indican que la energía total de cada uno de los sistemas (xantina-4aX) tiene un valor menor que el del sistema allopurinol-xantina. Esto se puede deber a la cantidad de átomos involucrados en los sistemas. Las interacciones que mantienen a la xantina unida al sitio activo son con algunos aminoácidos que también mantienen a allopurinol en el sitio activo. Probablemente la interacción π - π entre Phe914 y el sistema de anillos de la xantina y un HB con Glu802, son las más importantes para mantener a moléculas del estilo de las xantinas en el sitio activo.

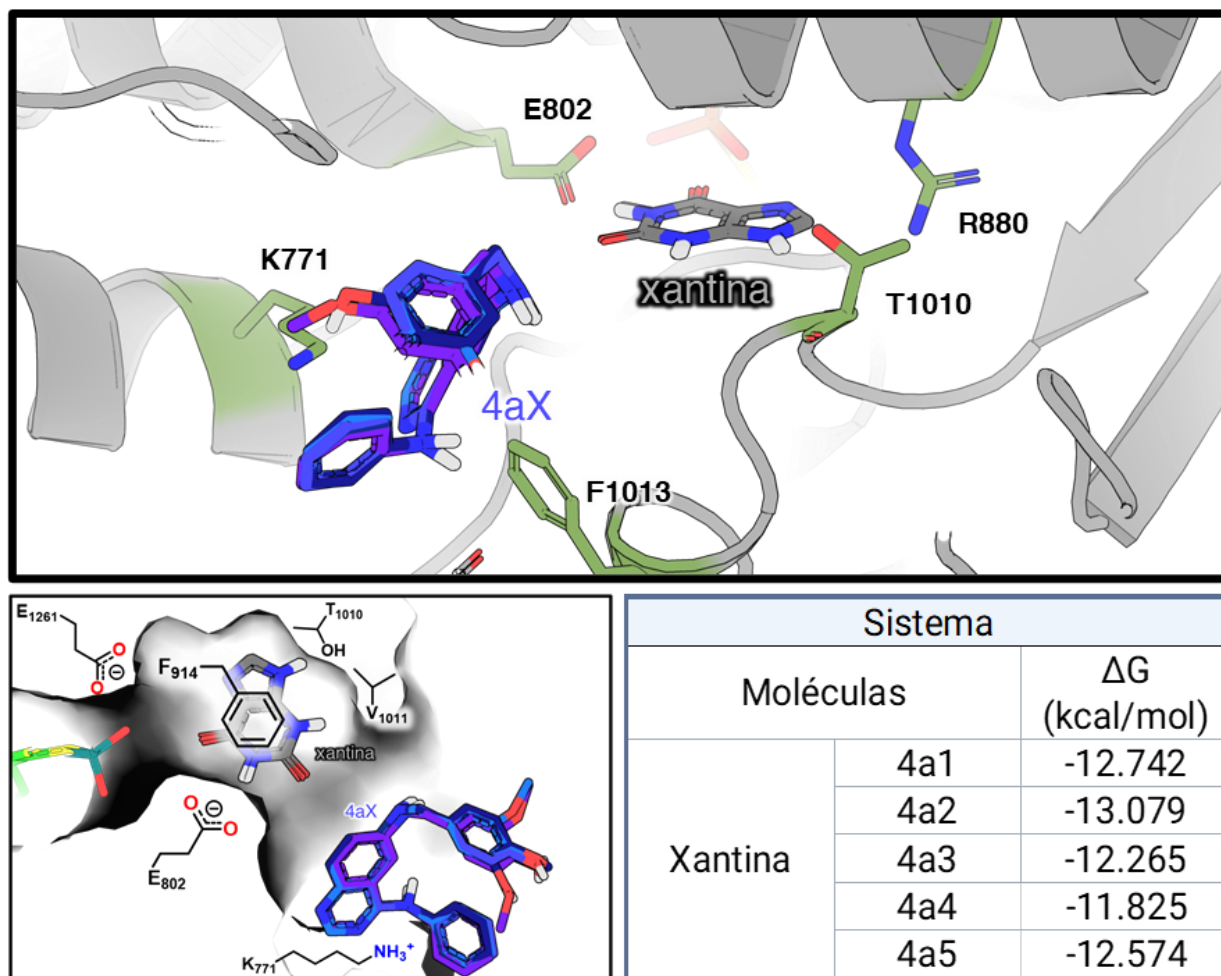


Figura 9.4. Modo y energía de unión de xantina (gris) y los compuestos de la serie A (**4aX**, degradado azul). En la imagen de arriba se ilustran de color verde algunos aminoácidos del sitio activo importantes para la interacción de los ligandos. Al fondo se muestra el cofactor de molibdeno. En la imagen inferior izquierda se muestra la silueta del sitio activo y la posición que los ligandos ocupan en él; también se muestran en 2D los residuos de aminoácidos importantes para la interacción del ligando con bXO. La tabla muestra la energía de unión obtenida para la interacción de los ligandos.

Un efecto totalmente contrario se observa con las moléculas de la serie B. En los sistemas xantina-**4bX**, son las moléculas de la serie B las que ocupan el sitio activo de la enzima salvo la molécula **4b1**. Estos hallazgos coinciden con el % de actividad de la enzima reportados en el capítulo anterior. Cabe destacar la importancia de los halógenos en el anillo aromático de la posición 4 de la quinazolina; estos podrían fortalecer la interacción π - π con la Phe914 siendo ésta, la interacción más importante, salvo que en futuros estudios se encuentre algún tipo de interacción tipo puentes de halógeno. En el estudio de acoplamiento molecular de K. R *et al.* en bXO se muestra que el anillo aromático que contiene las sustituciones de halógeno es probable que ocupe el sitio de

unión tal como lo ocupan las moléculas de la serie B.⁷⁵ Junto con los estudios de inhibición enzimática, estos estudios refuerzan la hipótesis de que los anillos aromáticos sustituidos con halógeno inhiben muy bien a la enzima.

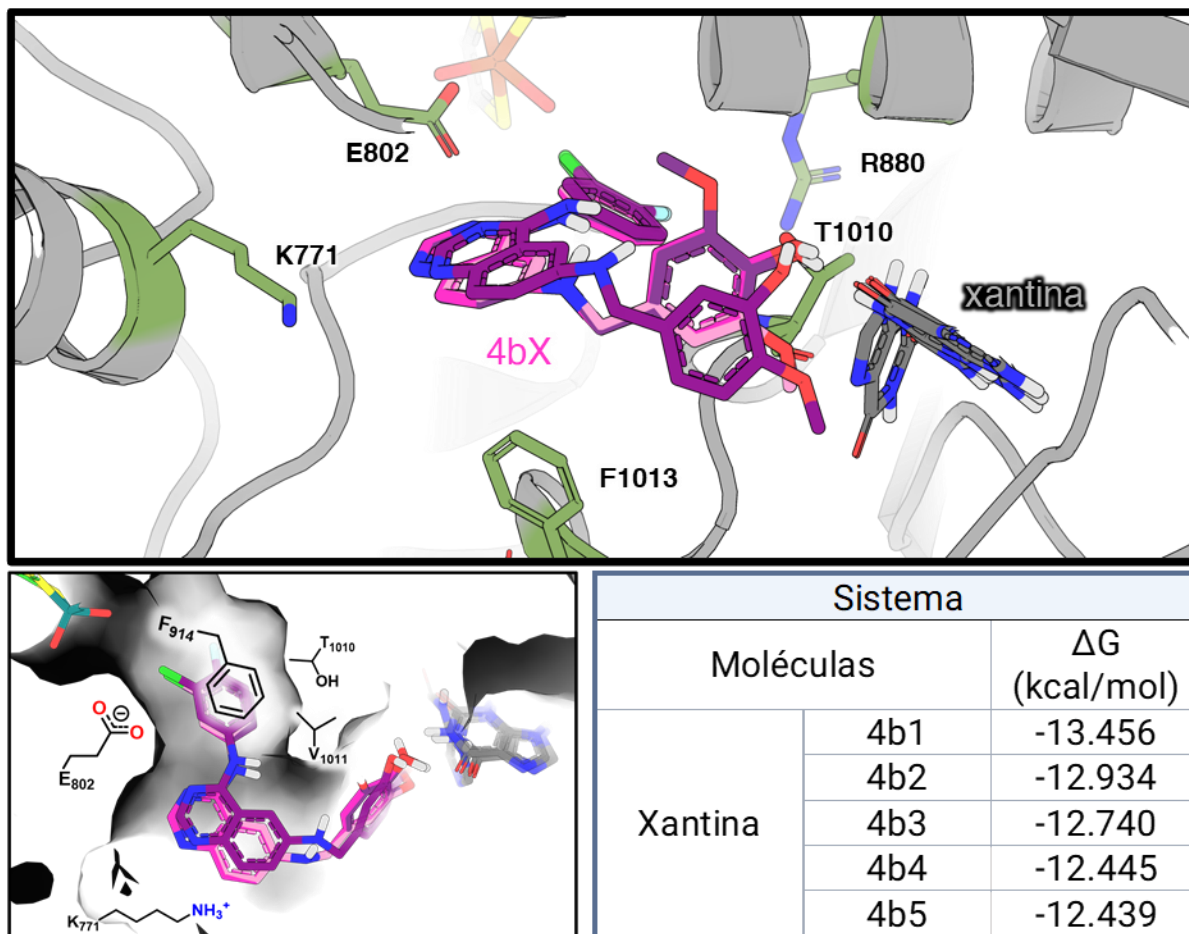


Figura 9.5. Modo y energía de unión de xantina (gris) y los compuestos de la serie B (**4bX**, degradado morado, excepto el compuesto **4b1**). En la imagen de arriba se ilustran de color verde algunos aminoácidos del sitio activo importantes para la interacción de los ligandos. Al fondo se muestra el cofactor de molibdeno. En la imagen inferior izquierda se muestra la silueta del sitio activo y la posición que los ligandos ocupan en él; también se muestran en 2D los residuos de aminoácidos importantes para la interacción del ligando con bXO. La tabla muestra la energía de unión obtenida para la interacción de los ligandos.

La gráfica de la Figura 9.6 pretende correlacionar la actividad experimental de los compuestos con su energía de unión en bXO. Aunque no hay un patrón claro con estos resultados, podemos ver la dispersión que existe en los valores por debajo de 30% de inhibición, es decir, con la actividad y la energía de unión de las moléculas de la serie A

y la molécula **4b1**. En cambio, las moléculas de la serie B se concentran más en los valores entre -12 y -13 kcal/mol.

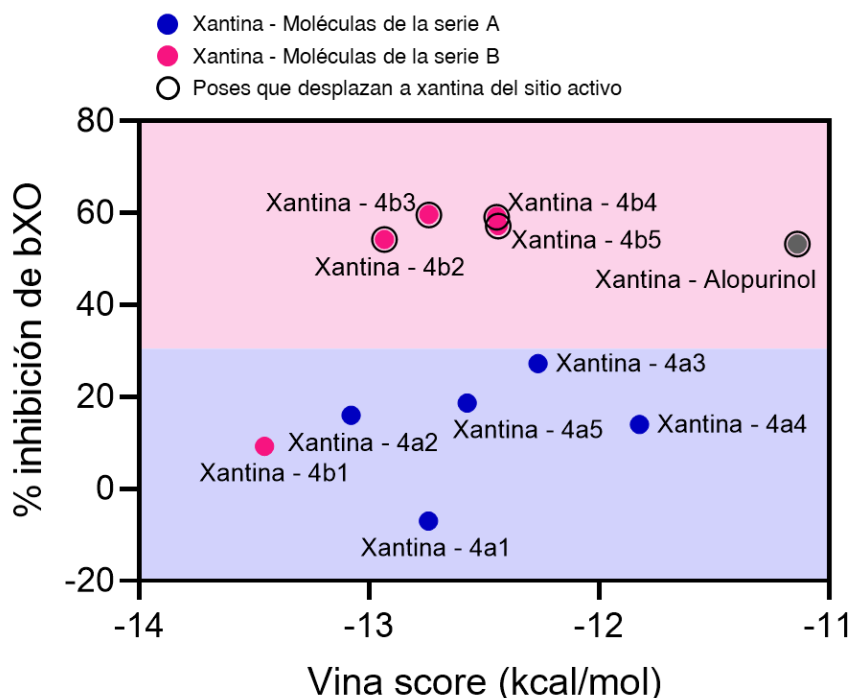


Figura 9.6. Correlación entre la energía de unión y el porcentaje de inhibición de bXO con las moléculas **4aX** y **4bX**.

9.1.2.2. Identificación del sitio alostérico mediante acoplamiento molecular ciego

Se llevó a cabo un estudio de acoplamiento molecular ciego para elucidar un posible sitio de unión alostérico de las moléculas sintetizadas. Para ello, primero se llevó a cabo el acoplamiento molecular en hAOX donde, como se muestra en la Figura 9.7 la mayoría de los compuestos se ubicaron dentro del sitio activo de hAOX. Únicamente la molécula **4b5** y la fenotiazina (Anexo 4) no ocuparon el sitio activo sino se colocaron en el sitio alostérico donde previamente ya se ha reportado a inhibidores de hAOX.¹⁰¹ Por otro lado, el acoplamiento molecular en bXO tuvo un patrón distinto. Algunas moléculas incluyendo la fenotiazina se colocaron en un posible sitio alostérico de bXO y solamente alopurinol en el sitio activo. Este resultado concordaría con los hallazgos sobre el modo de inhibición de los compuestos, ya que, al presentar inhibición mixta, es posible que dicho sitio encontrado pueda ser el que les dé el tipo de inhibición no competitiva.

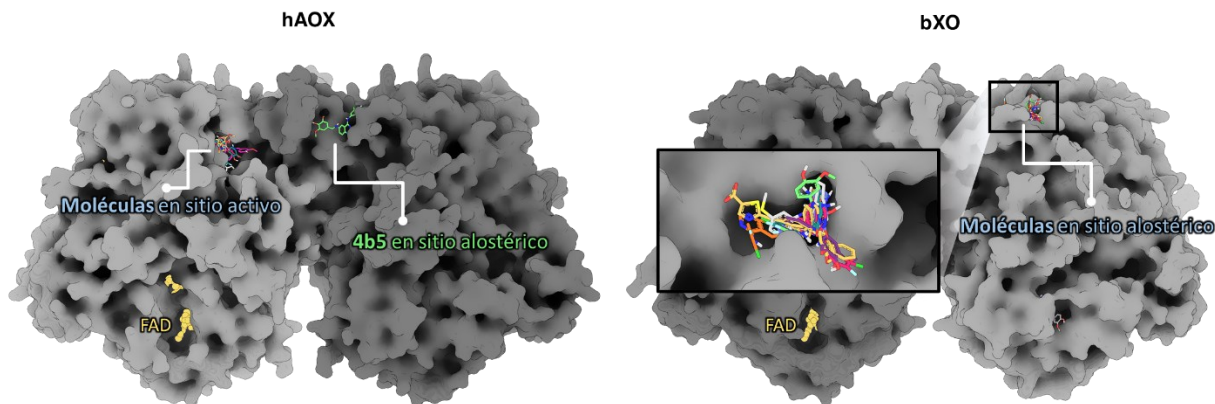


Figura 9.7. Acoplamiento molecular ciego en las estructuras de hAOX (izquierda) y de bXO (derecha) en diferentes colores se muestran todas las moléculas de la serie **4aX** y **4bX**,

Cabe destacar que el sitio alostérico predicho por el acoplamiento molecular para bXO no está situado en el mismo lugar de hAOX aunque ambos se encuentren en el dominio Mo-pt (Figura 9.8). Aunque habría de demostrar experimentalmente el sitio alostérico encontrado, la predicción concuerda con que las moléculas pueden tener un sitio de unión distinto al del sitio activo.

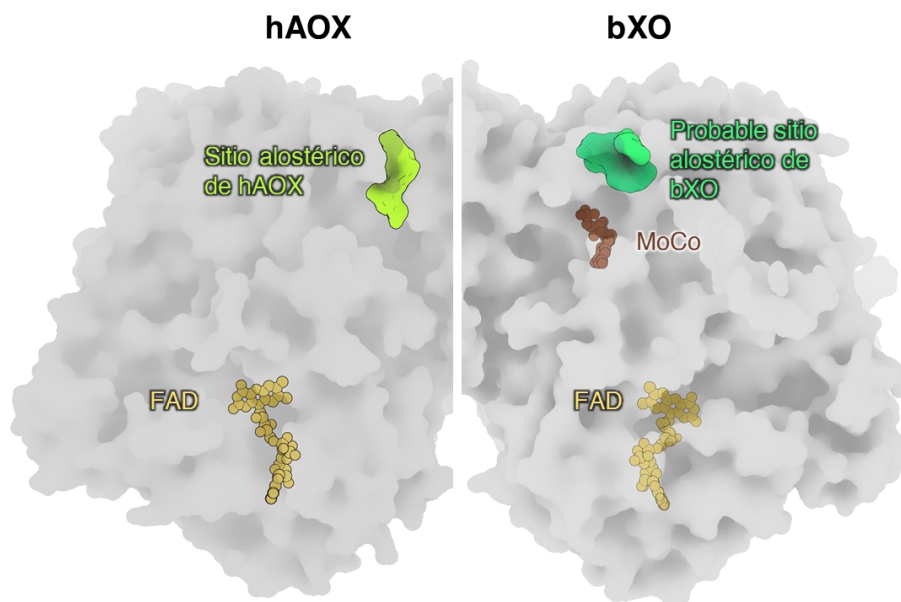


Figura 9.8. Comparación del sitio alostérico de hAOX (izquierda) y el sitio alostérico predicho por acoplamiento molecular ciego de bXO (derecha) en verde se muestra la superficie de todas las moléculas halladas en cada sitio. Como referencia de la ubicación de ambos sitios se muestran los factores FAD y MoCo.

9.2. Acoplamiento molecular en hEGFR

9.2.1. Metodología

9.2.1.1. Preparación de la proteína

Los estudios de acoplamiento molecular sobre la estructura cristalina hEGFR (PDB 1M17, 2.60 Å) se llevaron a cabo con Autodock Vina 1.2.1^{90,91}. La preparación de la enzima se llevó a cabo con el módulo Dock Prep de UCSF Chimera 1.15⁹². Se añadieron átomos de hidrógeno, y se eliminaron las moléculas de agua. Las cadenas laterales incompletas fueron corregidas con la biblioteca de rotámeros de Dunbrack 2010⁹³. Los elementos de proteína faltantes se modelaron con el servidor Modeller⁹⁴.

9.2.1.2. Preparación de los ligandos

Todos los ligandos se construyeron y minimizaron en Avogadro 1.2.0. utilizando el campo de fuerza universal (UFF)⁹⁵. Posteriormente, los compuestos se sometieron a optimización de la geometría y a la minimización de la energía en el nivel teórico B3LYP/6-31G(d)^{96,97} con Gaussian 16⁹⁸.

9.2.1.3. Producción del acoplamiento molecular

La rejilla, los ligandos y los archivos de parámetros de acoplamiento se crearon ocupando los módulos prepare_receptor, prepare_ligand y la versión ejecutable para Linux de Autodock Vina 1.2.1. Se usó el tamaño predeterminado de la caja alrededor del centro del ligando ubicado en el sitio activo de la enzima (erlotinib, AQ4). La conformación con la puntuación más alta fue seleccionada para la discusión. Además, los resultados del acoplamiento se visualizaron con el software PyMOL 2.4.1© Schrödinger, LCC

9.2.2. Resultados y discusión

El acoplamiento molecular en hEGFR-TKD muestra la posición que las quinazolininas adoptan en el sitio activo de la enzima. Esta posición se confirma con las estructuras de hEGFR cocrystalizadas con erlotinib (PDB ID: 1M17)¹⁰⁰ y gefitinib (PDB ID: 4WKQ)¹⁰¹. Como indican los autores de estas estructuras proteicas, gefitinib y erlotinib se mantienen en el sitio activo de hEGFR gracias a una interacción HB del N1 de la quinazolina con la cadena principal de la Met793. Por otro lado, la interacción de HB con la Thr790 y N3 de la quinazolina no es de manera directa sino a través de un puente de agua la cual, se conserva entre varias estructuras reportadas en PDB.^{100–102} En este estudio no se incluyó la molécula de agua, sin embargo, la posición que adquieren las moléculas con el acoplamiento molecular es tal que se conserva el espacio donde debería de ir dicha molécula de agua. (Figura 9.9) El ángulo de rotación interplanar del anillo de fenilo de la posición 4 de la quinazolina posiciona este fragmento de tal manera que se acomoda dentro de un pocket hidrofóbico en el sitio activo de hEGFR-TKD. Esta posición no se ve afectada por la sustitución con flúor y con cloro en el caso de las moléculas de la serie B, de hecho, gefitinib es similar en ese fragmento y adquiere la misma posición

mencionada. Por último, se puede observar que prácticamente las sustituciones en la posición 6 de la quinazolina quedan en un espacio expuesta al disolvente. Fármacos como gefitinib aprovechan esa posición para realizar modificaciones que mejoren las propiedades farmacocinéticas de la molécula. En estudios previos se ha mostrado que, en inhibidores de cinasa, fragmentos de tipo piperazina o posiblemente morfolina, desestabilizan sistemas proteína-ligando.¹⁰³ Aun así, las moléculas de la serie A y B dejan abierta una posible extensión o modificación en la posición 6 para mejorar la inhibición de este receptor.

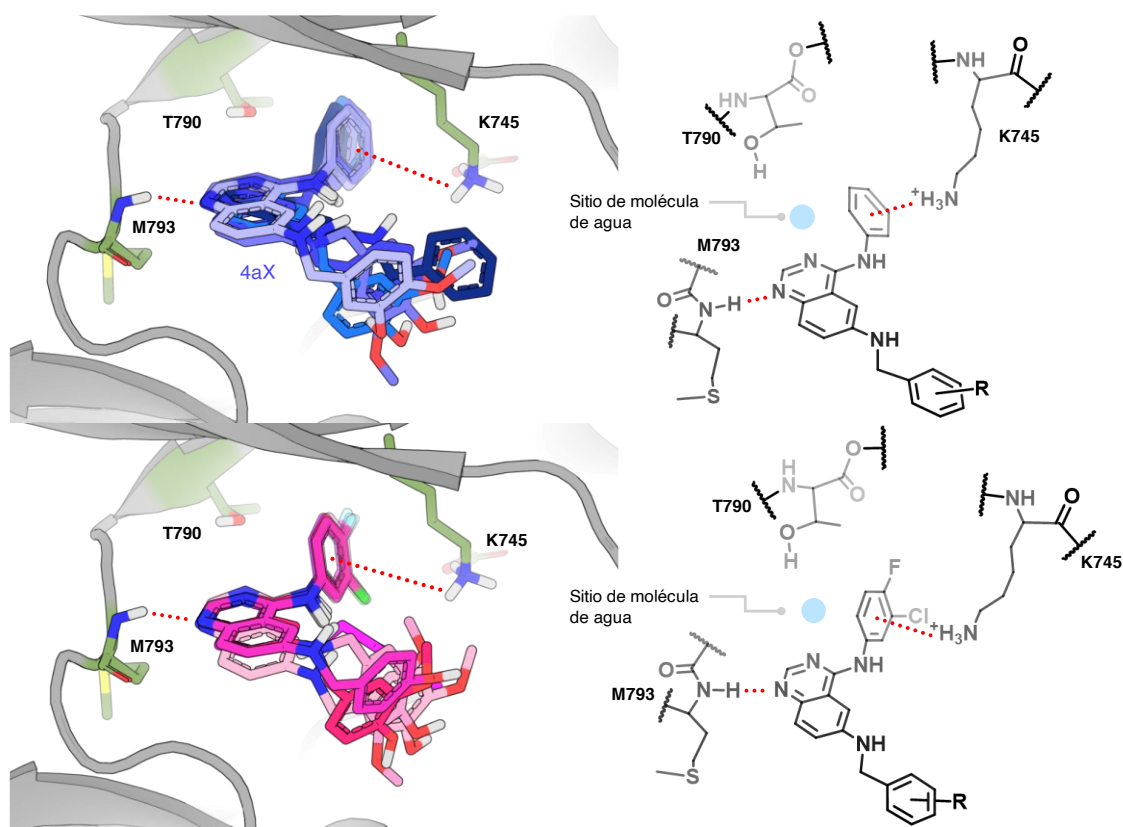


Figura 9.9. Modo de unión 3D y 2D de los compuestos de la serie A (**4aX**, degradado azul) y los compuestos de la serie B (**4bX**, degradado rosa). En las imágenes en 3D se ilustran de color verde algunos aminoácidos del sitio activo importantes para la interacción de los ligandos. En todas las imágenes se muestra de color rojo las interacciones que estabilizan al ligando.

Tabla 9.1. Energía de unión de los compuestos de la serie A, B y erlotinib como control.

Molécula	ΔG (kcal/mol)
Erlotinib	-6.869
4a1	-8.661
4a2	-8.031
4a3	-8.607
4a4	-8.164
4a5	-8.614
4b1	-7.999
4b2	-8.075
4b3	-8.439
4b4	-8.604
4b5	-8.984

En cuestión de la energía de unión, los compuestos en general tuvieron en promedio -8 kcal/mol mientras que erlotinib presentó la energía de unión más baja, aproximadamente de -7 kcal/mol. Es evidente que no hay una mejora significativa variando los sustituyentes de la posición 6 de la quinazolina. Quizá, vale la pena destacar al compuesto **4b5**; fue el compuesto con la energía de unión más baja y su análogo de la serie B, no tuvo el mismo resultado a pesar de tener prácticamente la misma estructura. Como se mencionó anteriormente, la interacción principal que gobierna la estabilización de estos compuestos en el sitio activo es con la Met793, se observa que todos los compuestos conservan dicha interacción HB y también todos los compuestos mantienen la posición del anillo de fenilo de la posición 4 de la quinazolina dentro de un pocket hidrofóbico. Por lo tanto, por lo único que podemos deducir el cambio de valor en las energías de unión es por los sustituyentes de la posición 4 de la quinazolina.

10. Evaluación biológica en líneas celulares

A continuación, se presenta la metodología empleada y los resultados de evaluación citotóxica obtenidos con los derivados de quinazolina. Los resultados aquí mostrados corresponden a un screening primario de las diez moléculas sintetizadas a una sola concentración en cinco líneas celulares cancerosas y una línea celular no cancerosa. Se utilizó como control positivo de inhibición de líneas celulares al inhibidor de TKR, gefitinib.

10.1. Metodología

Las líneas celulares que se utilizaron para este estudio pertenecen al NCI (PC-3, MCF7), ATTC (MDA-MB23) y el Centro Médico (SKLU-1, COS-7). Para este ensayo los compuestos se solubilizaron en dimetilsulfoxido (DMSO), se realizaron las diluciones correspondientes de tal forma que todos los compuestos se evaluaron a una concentración final de 25 μM ; los compuestos que lograron 100% de inhibición celular a 25 μM se les realizó un segundo screening a una concentración final de 12.5 μM . La viabilidad de las líneas celulares se determinó mediante el método colorimétrico de sulforrodamina B (SRB). Los análisis estadísticos se realizaron con GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, LLC).

10.2. Resultados y discusión

El diseño inicial de las moléculas sintetizadas contemplaba una posible inhibición del crecimiento de las líneas celulares señaladas ya que éstas tienen similitud con inhibidores reconocidos de esta enzima como el fármaco gefitinib. Existe una clara diferencia en actividades entre las distintas líneas celulares esto se puede deber a variaciones en la cantidad e isoformas de los distintos TKR y a la presencia de xantina oxidasa dentro del núcleo celular.¹¹⁸ Un patrón evidente es que los compuestos de la serie A tuvieron mayor actividad en todas las líneas celulares si lo comparamos con las moléculas de la serie B. Esto se explica por varias razones, siendo la principal, la falta de sustitución en el anillo de la posición 4 de la quinazolina. Sabemos que, para eliminar un xenobiótico, las células deben biotransformarlo. Esto lo pueden lograr con ayuda de la superfamilia de enzimas denominadas citocromo P450 (CYP450). En especial, el CYP2D6, encargado del metabolismo de sustancias endógenas¹⁰⁴ y xenobióticos, se encuentra en grandes cantidades en hígado. Sin embargo, líneas celulares como MCF7 y PC-3 también producen este CYP. La biotransformación de las moléculas diseñadas implicaría la formación de un intermediario epóxido que podría afectar algunas vías de las células estudiadas.

Una característica muy importante, fue la observada en la línea celular SK-LU-1 la cual, no mostró valores de inhibición favorables con la mayoría de las moléculas incluyendo al gefitinib. Esto nos indica que, la poca inhibición que mostraron las moléculas es presumible que no es por la alteración de la vía que involucra a EGFR y a otras cinasas, ya que, el control positivo, gefitinib, es reconocido como inhibidor de EGFR.

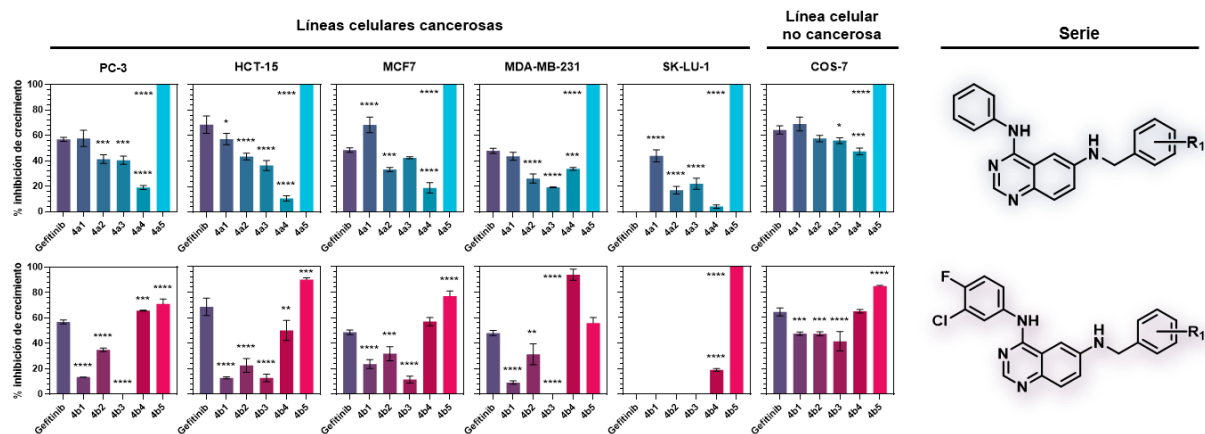


Figura 10.1. Porcentaje de inhibición de crecimiento de seis líneas celulares en presencia de los compuestos de la serie A (**4aX**) y de la serie B (**4bX**). Las líneas celulares PC-3, HCT-15, MCF7, MDA-MB-231 y SK-LU-1 corresponden a líneas celulares de cáncer humano, mientras que la línea COS-7 corresponde a una línea celular sana de riñón de mono. Los compuestos fueron evaluados a una sola concentración (25 μ M) empleando el método de tinción con sulforrodamina B.

Cabe destacar el porcentaje de inhibición que alcanzó el compuesto **4a5** en todas las líneas celulares. Se trata del compuesto que contiene el fragmento derivado de la isovainillina en la posición 6 de la quinazolina. Es claro que la sustitución en el fenilo de posición 4 de la quinazolina es importante para la actividad citotóxica, cosa que se puntualiza con el análogo de la serie B, **4b5**, el cual, también tuvo valores elevados de actividad citotóxica, sin embargo, como se mencionó anteriormente, su potencia disminuye debido a los halógenos. También, el análogo que contiene el fragmento que proviene de la vainillina no mostró la misma potencia, dejando en evidencia que, un hidroxilo en posición 3 y un grupo metoxilo en posición 4 son importantes para la actividad citotóxica de estos compuestos.

En un ensayo subsecuente a una concentración más baja del compuesto **4a5** aún se sigue observando un efecto citotóxico elevado. (Figura 10.2) En este estudio se observa una disminución significativa de la inhibición en la línea celular MDA-MB-231, la cual, se sabe que carece de receptores de estrógeno (ER), progesterona (PR) y amplificación del receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 (HER2) por lo que comúnmente se le conoce como células de cáncer de mama triple negativo. En cuanto a las demás líneas celulares podemos ver un ligero descenso en la inhibición excepto en la línea celular PC3 que aún continúa con 100% de inhibición. Esto nos indica una excelente oportunidad para estudiar con mayor profundidad el efecto que está teniendo esta molécula particularmente en la línea PC3, la cual se trata de una línea celular de cáncer de próstata con bajos niveles de la enzima testosterona-5-alfa-reductasa.

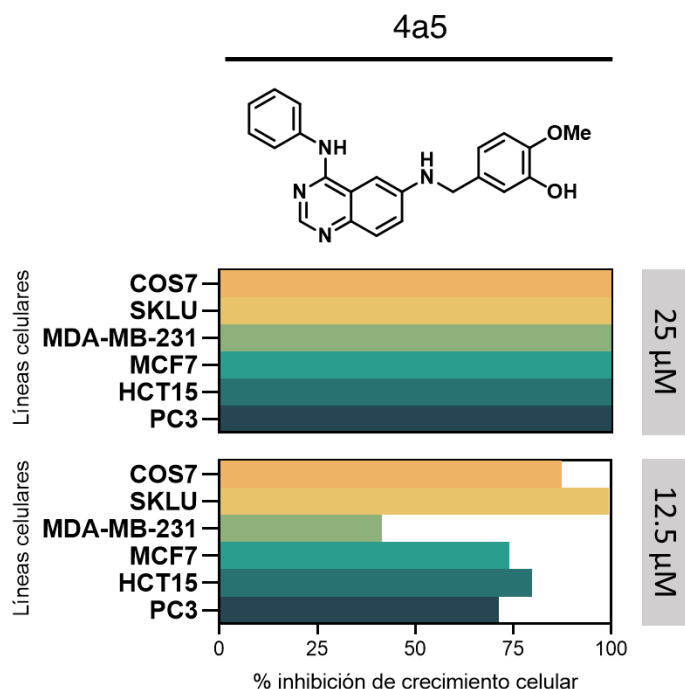


Figura 10.2. Porcentaje de inhibición de crecimiento de seis líneas celulares en presencia del compuesto **4a5**. A dos concentraciones distintas, 25 µM y 12.5 µM.

Aunque en el acoplamiento molecular se observó que, justamente el compuesto **4a5** fue el que obtuvo la energía de unión más baja con hEGFR sería muy precipitado correlacionar la energía de unión obtenida con ese compuesto y la actividad observada en las líneas celulares, aunque en algunas de ellas, EGFR sea un biomarcador de expresión. Recordemos que una célula no solo se compone de un receptor o una enzima únicamente, la cantidad de variables que están en juego no permite correlacionar ambos efectos.

11. Conclusiones

Con base en moléculas previamente sintetizadas por distintos miembros de nuestro grupo de investigación y en moléculas con aprobadas como fármacos y en fases de investigación, se diseñaron de novo dos series de quinazolininas (**4aX**, **4bX**). Estos compuestos se sintetizaron posteriormente mediante un procedimiento de cuatro pasos con buenos rendimientos.

Utilizando alopurinol como fármaco prototipo, se encontró que las quinazolininas sintetizadas son potenciales inhibidores de la bXO. En particular, los resultados de la evaluación bioquímica *in vitro* revelaron que los compuestos **4b2**, **4b3**, **4b4** y **4b5** fueron los que disminuyeron más la actividad de bXO, incluso más que alopurinol. En general,

se encontró que tener al menos un anillo aromático sin sustituciones disminuye la potencia de las moléculas.

Además, los estudios cinéticos de la enzima indicaron que los cuatro compuestos representativos del estudio anterior actúan como inhibidores de bXOR de tipo mixto, es decir, tienen una combinación entre inhibición competitiva y no competitiva.

Los resultados del acoplamiento molecular en bXO ayudaron a elucidar que las sustituciones con halógeno en anillos aromáticos presentes en las quinazolininas podrían favorecer la interacción π - π con la fenilalanina 914, generando así que la energía de unión de estas moléculas sea más favorable que la energía de los sustratos naturales de la enzima.

También, se llevó a cabo un estudio de acoplamiento molecular ciego para encontrar un posible sitio distinto al sitio activo a través del cual, las moléculas puedan llevar a cabo una inhibición diferente al tipo competitivo. Se encontró que las moléculas tienen afinidad por un sitio cercano al reportado en la enzima aldehído oxidasa humana aunque sean enzimas diferentes de organismos diferentes.

Por lo tanto, los resultados descritos anteriormente sugieren que los compuestos **4b2**, **4b3**, **4b4** y **4b5** podrían someterse a diversas modificaciones en la posición 6 de la quinazolinina (ej. Sustituciones tipo halógeno en anillo de benceno, homología de cadena, reemplazo de anillo aromático, etc.) para incrementar la actividad como inhibidores de bXO.

La inhibición sobre hEGFR indica que los compuestos son potenciales inhibidores del receptor. Especialmente el compuesto **4a2** el cuál, mostró valores de inhibición de la actividad del receptor mayores que el del gefitinib. Los estudios de acoplamiento molecular refuerzan la razón por la que estas moléculas inhiben el dominio cinasa del receptor. Las moléculas mostraron un modo de unión semejante al del erlotinib y al del gefitinib, esto abre la posibilidad a realizar distintas modificaciones a las moléculas de tal forma que se pueda incrementar la potencia de inhibición.

Finalmente, se realizaron estudios de porcentaje de inhibición del crecimiento celular ocupando para ello cinco líneas celulares de cáncer y una línea celular sana. Los resultados indican que las moléculas de la serie A, inhiben el crecimiento celular, más que las moléculas de la serie B. La molécula **4a5** mostró una inhibición del crecimiento celular de 100% a 25 μ M en todas las líneas celulares y disminuye la actividad a una concentración de 12.5 μ M, aun así, teniendo valores elevados en la mayoría de las líneas celulares. Secundando, la molécula análoga **4b5**, también mostró actividad inhibitoria alta a 25 μ M, aunque no tanto como **4a5**.

12. Referencias

- (1) World Health Organization. Cancer https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1 (accessed 2021 -02 -01).
- (2) Naghavi, M. Global, Regional, and National Age-Sex Specific Mortality for 264 Causes of Death, 1980–2016: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet* **2017**, *390* (10100), 1151–1210. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32152-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32152-9).
- (3) Bertram, J. S. The Molecular Biology of Cancer. *Molecular Aspects of Medicine* **2000**, *21* (6), 167–223. [https://doi.org/10.1016/S0098-2997\(00\)00007-8](https://doi.org/10.1016/S0098-2997(00)00007-8).
- (4) Tomasetti, C.; Vogelstein, B. Variation in Cancer Risk among Tissues Can Be Explained by the Number of Stem Cell Divisions. *Science* **2015**, *347* (6217), 78–81. <https://doi.org/10.1126/science.1260825>.
- (5) Aldaz, C. M.; Conti, C. J.; Klein-Szanto, A. J. P.; Slaga, T. J. Progressive Dysplasia and Aneuploidy Are Hallmarks of Mouse Skin Papillomas: Relevance to Malignancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1987**, *84* (7), 2029–2032. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.7.2029>.
- (6) Bremner, R.; Balmain, A. Genetic Changes in Skin Tumor Progression: Correlation between Presence of a Mutant Ras Gene and Loss of Heterozygosity on Mouse Chromosome 7. *Cell* **1990**, *61* (3), 407–417. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90523-H](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90523-H).
- (7) Wu, S.; Powers, S.; Zhu, W.; Hannun, Y. A. Substantial Contribution of Extrinsic Risk Factors to Cancer Development. *Nature* **2016**, *529* (7584), 43–47. <https://doi.org/10.1038/nature16166>.
- (8) Hanahan, D.; Weinberg, R. a. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **2000**, *100* (1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9).
- (9) 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>.
- (10) Huang, J.; Wu, S.; Barrera, J.; Matthews, K.; Pan, D. The Hippo Signaling Pathway Coordinately Regulates Cell Proliferation and Apoptosis by Inactivating Yorkie, the Drosophila Homolog of YAP. *Cell* **2005**, *122* (3), 421–434. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2005.06.007>.
- (11) Pearson, J. D.; Huang, K.; Pacal, M.; McCurdy, S. R.; Lu, S.; Aubry, A.; Yu, T.; Wadosky, K. M.; Zhang, L.; Wang, T.; Gregorieff, A.; Ahmad, M.; Dimaras, H.; Langille, E.; Cole, S. P. C.; Monnier, P. P.; Lok, B. H.; Tsao, M.-S.; Akeno, N.; Schramek, D.; Wikenheiser-Brokamp, K. A.; Knudsen, E. S.; Witkiewicz, A. K.; Wrana, J. L.; Goodrich, D. W.; Bremner, R. Binary Pan-Cancer Classes with Distinct Vulnerabilities Defined by pro- or Anti-Cancer YAP/TEAD Activity. *Cancer Cell* **2021**, *39* (8), 1115-1134.e12. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.06.016>.

- (12) Weinstein, I. B.; Joe, A. Oncogene Addiction. *Cancer Research*. Cancer Res May 1, 2008, pp 3077–3080. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-3293>.
- (13) Felsher, D. W.; Bishop, J. M. Reversible Tumorigenesis by MYC in Hematopoietic Lineages. *Molecular Cell* **1999**, *4* (2), 199–207. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80367-6](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80367-6).
- (14) Giuriato, S.; Ryeom, S.; Fan, A. C.; Bachireddy, P.; Lynch, R. C.; Rieth, M. J.; van Riggelen, J.; Kopelman, A. M.; Passequé, E.; Tang, F.; Folkman, J.; Felsher, D. W. Sustained Regression of Tumors upon MYC Inactivation Requires P53 or Thrombospondin-1 to Reverse the Angiogenic Switch. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, *103* (44), 16266–16271. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608017103>.
- (15) Skorski, T.; Nieborowska-Skorska, M.; Nicolaides, N. C.; Szczylik, C.; Iversen, P.; Iozzo, R. v.; Zon, G.; Calabretta, B. Suppression of Philadelphia1 Leukemia Cell Growth in Mice by BCR-ABL Antisense Oligodeoxynucleotide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1994**, *91* (10), 4504. <https://doi.org/10.1073/PNAS.91.10.4504>.
- (16) Kohl, N. E.; Wilson, F. R.; Mosser, S. D.; Giuliani, E.; deSolms, S. J.; Conner, M. W.; Anthony, N. J.; Holtz, W. J.; Gomez, R. P.; Lee, T. J.; al., et. Protein Farnesyltransferase Inhibitors Block the Growth of Ras-Dependent Tumors in Nude Mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1994**, *91* (19), 9141. <https://doi.org/10.1073/PNAS.91.19.9141>.
- (17) Druker, B. J.; Tamura, S.; Buchdunger, E.; Ohno, S.; Segal, G. M.; Fanning, S.; Zimmermann, J.; Lydon, N. B. Effects of a Selective Inhibitor of the Abl Tyrosine Kinase on the Growth of Bcr–Abl Positive Cells. *Nature Medicine* **1996**, *2* (5), 561–566. <https://doi.org/10.1038/nm0596-561>.
- (18) Kaelin, W. G. The Concept of Synthetic Lethality in the Context of Anticancer Therapy. *Nature Reviews Cancer*. Nat Rev Cancer September **2005**, pp 689–698. <https://doi.org/10.1038/nrc1691>.
- (19) Kaelin, W. G. The Concept of Synthetic Lethality in the Context of Anticancer Therapy. *Nature Reviews Cancer* **2005**, *5* (9), 689–698. <https://doi.org/10.1038/nrc1691>.
- (20) Sociedad Mexicana de Oncología A.C. Prevención Y Diagnóstico Oportuno En Cáncer. *México* **2016**, 1–23.
- (21) Gómez-Dantés, H.; Lamadrid-Figueroa, H.; Cahuana-Hurtado, L.; Silverman-Retana, O.; Montero, P.; González-Robledo, M. C.; Fitzmaurice, C.; Pain, A.; Allen, C.; Dicker, D. J.; Hamavid, H.; López, A.; Murray, C.; Naghavi, M.; Lozano, R. The Burden of Cancer in Mexico, 1990-2013. *Salud Publica de Mexico* **2016**, *58* (2), 118–131. <https://doi.org/10.21149/spm.v58i2.7780>.
- (22) Ríos, P. R.; Rivera, A. G.; Cervantes, F. S.; Martínez, P. M. Tendencia de La Mortalidad Por Cáncer En México: 1990-2012. *Evidencia Médica e Investigación en Salud* **2015**, *8* (1), 5–15.

- (23) Aldaco-Sarvide, F.; Pérez-Pérez, P.; Cervantes-Sánchez, G.; Torrecillas-Torres, L.; Erazo-Valle-Solís, A. A.; Cabrera-Galeana, P.; Motola-Kuba, D.; Anaya, P.; Rivera-Rivera, S.; Cárdenas-Cárdenas, E. Mortality from Cancer in Mexico: 2015 Update. *Gaceta Mexicana de Oncología* **2018**, *17* (1), 28–34. <https://doi.org/10.24875/j.gamo.M18000105>.
- (24) Types of Cancer Treatment - National Cancer Institute <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types> (accessed 2021 -07 -02).
- (25) Alfarouk, 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.; Reshkin, S. J.; Ibrahim, M. E.; Rauch, C. Resistance to Cancer Chemotherapy: Failure in Drug Response from ADME to P-Gp. *Cancer Cell International* **2015**, *15* (1), 71. <https://doi.org/10.1186/s12935-015-0221-1>.
- (26) Cell Communication | Learn Science at Scitable <https://www.nature.com/scitable/topic/cell-communication-14122659/> (accessed 2020 -07 -06).
- (27) Sporn, M. B.; Roberts, A. B. Autocrine Growth Factors and Cancer. *Nature* **1985** *313*:6005 **1985**, *313* (6005), 745–747. <https://doi.org/10.1038/313745a0>.
- (28) Zhang, F.; Wang, S.; Yin, L.; Yang, Y.; Guan, Y.; Wang, W.; Xu, H.; Tao, N. Quantification of Epidermal Growth Factor Receptor Expression Level and Binding Kinetics on Cell Surfaces by Surface Plasmon Resonance Imaging. *Analytical Chemistry* **2015**, *87* (19), 9960–9965. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b02572>.
- (29) Guy, P. M.; Platko, J. v; Cantley, L. C.; Cerione, R. A.; Carraway, K. L.; 3rd. Insect Cell-Expressed P180erbB3 Possesses an Impaired Tyrosine Kinase Activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1994**, *91* (17), 8132. <https://doi.org/10.1073/PNAS.91.17.8132>.
- (30) JR, W. The Epidermal Growth Factor Receptor and Its Inhibition in Cancer Therapy. *Pharmacology & therapeutics* **1999**, *82* (2–3), 241–250. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(98\)00045-X](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(98)00045-X).
- (31) JB, G. Anticancer Drug Targets: Growth Factors and Growth Factor Signaling. *The Journal of clinical investigation* **2000**, *105* (1), 9–13. <https://doi.org/10.1172/JCI9084>.
- (32) Salomon, D. S.; Brandt, R.; Ciardiello, F.; Normanno, N. Epidermal Growth Factor-Related Peptides and Their Receptors in Human Malignancies. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **1995**, *19* (3), 183–232. [https://doi.org/10.1016/1040-8428\(94\)00144-I](https://doi.org/10.1016/1040-8428(94)00144-I).
- (33) Moyer, J. D.; Barbacci, E. G.; Iwata, K. K.; Arnold, L.; Boman, B.; Cunningham, A.; DiOrio, C.; Doty, J.; Morin, M. J.; Moyer, M. P.; Neveu, M.; Pollack, V. A.; Pustilnik, L. R.; Reynolds, M. M.; Sloan, D.; Theleman, A.; Miller, P. Induction of Apoptosis and Cell Cycle Arrest by CP-358,774, an Inhibitor of Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase. *Cancer Research* **1997**, *57* (21).
- (34) Fabricant, R. N.; de Larco, J. E.; Todaro, G. J. Nerve Growth Factor Receptors on Human Melanoma Cells in Culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1977**, *74* (2), 565–569. <https://doi.org/10.1073/PNAS.74.2.565>.

- (35) Stamos, J.; Sliwkowski, M. X.; Eigenbrot, C. Structure of the Epidermal Growth Factor Receptor Kinase Domain Alone and in Complex with a 4-Anilinoquinazoline Inhibitor. *The Journal of biological chemistry* **2002**. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207135200>.
- (36) Yun, C.-H.; Boggon, T. J.; Li, Y.; Woo, M. S.; Greulich, H.; Meyerson, M.; Eck, M. J. Structures of Lung Cancer-Derived EGFR Mutants and Inhibitor Complexes: Mechanism of Activation and Insights into Differential Inhibitor Sensitivity. *Cancer Cell* **2007**, *11* (3), 217–227. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2006.12.017>.
- (37) Qiu, C.; Tarrant, M. K.; Choi, S. H.; Sathyamurthy, A.; Bose, R.; Banjade, S.; Pal, A.; Bornmann, W. G.; Lemmon, M. A.; Cole, P. A.; Leahy, D. J. Mechanism of Activation and Inhibition of the HER4/ErbB4 Kinase. *Structure* **2008**, *16* (3), 460–467. <https://doi.org/10.1016/J.STR.2007.12.016>.
- (38) Solca, F.; Dahl, G.; Zoepfel, A.; Bader, G.; Sanderson, M.; Klein, C.; Kraemer, O.; Himmelsbach, F.; Haakma, E.; Adolf, G. R. Target Binding Properties and Cellular Activity of Afatinib (BIBW 2992), an Irreversible ErbB Family Blocker. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2012**, *343* (2), 342–350. <https://doi.org/10.1124/JPET.112.197756>.
- (39) Pao, W.; Miller, V. A.; Politi, K. A.; Riely, G. J.; Somwar, R.; Zakowski, M. F.; Kris, M. G.; Varmus, H. Acquired Resistance of Lung Adenocarcinomas to Gefitinib or Erlotinib Is Associated with a Second Mutation in the EGFR Kinase Domain. *PLoS Medicine* **2005**, *2*, 0225–0235. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PMED.0020073>.
- (40) Kobayashi, S.; Boggon, T. J.; Dayaram, T.; Jänne, P. A.; Kocher, O.; Meyerson, M.; Johnson, B. E.; Eck, M. J.; Tenen, D. G.; Halmos, B. EGFR Mutation and Resistance of Non–Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. *New England Journal of Medicine* **2005**, *352* (8), 786–792. <https://doi.org/10.1056/NEJM0A044238>.
- (41) Yun, C. H.; Mengwasser, K. E.; Toms, A. v.; Woo, M. S.; Greulich, H.; Wong, K. K.; Meyerson, M.; Eck, M. J. The T790M Mutation in EGFR Kinase Causes Drug Resistance by Increasing the Affinity for ATP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**, *105* (6), 2070–2075. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0709662105>.
- (42) Jones, D. P. Redefining Oxidative Stress. *Antioxidants and Redox Signaling*. Antioxid Redox Signal September 2006, pp 1865–1879. <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.1865>.
- (43) Welles Kellogg, E.; Fridovich, I. Superoxide, Hydrogen Peroxide, and Singlet Oxygen in Lipid Peroxidation by a Xanthine Oxidase System. *Journal of Biological Chemistry* **1975**, *250* (22), 8812–8817. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)40745-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)40745-x).
- (44) Kanner, J.; German, J. B.; Kinsella, J. E. Initiation of Lipid Peroxidation in Biological Systems. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **1987**, *25* (4), 317–364.
- (45) King, M. M.; Lai, E. K.; McCay, P. B. Singlet Oxygen Production Associated with Enzyme Catalyzed Lipid Peroxidation in Liver Microsomes. *Journal of Biological Chemistry* **1975**, *250* (16), 6446–6502.

- (46) H, O.; H, B. Chronic Infections and Inflammatory Processes as Cancer Risk Factors: Possible Role of Nitric Oxide in Carcinogenesis. *Mutation research* **1994**, *305* (2), 253–264. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(94\)90245-3](https://doi.org/10.1016/0027-5107(94)90245-3).
- (47) Rosin, M. P.; el Din Zaki, S. S.; Ward, A. J.; Anwar, W. A. Involvement of Inflammatory Reactions and Elevated Cell Proliferation in the Development of Bladder Cancer in Schistosomiasis Patients. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **1994**, *305* (2), 283–292. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(94\)90248-8](https://doi.org/10.1016/0027-5107(94)90248-8).
- (48) Dixon, M.; Thurlow, S. Studies on Xanthine Oxidase: The Dynamics of the Oxidase System. *The Biochemical journal* **1924**, *18* (5), 976–988.
- (49) CE, B.; JM, H. Xanthine Oxidoreductase and Cardiovascular Disease: Molecular Mechanisms and Pathophysiological Implications. *The Journal of physiology* **2004**, *555* (Pt 3), 589–606. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.2003.055913>.
- (50) Enroth, C.; Eger, B. T.; Okamoto, K.; Nishino, T.; Nishino, T.; Pai, E. F. Crystal Structures of Bovinemilk Xanthine Dehydrogenase and Xanthine Oxidase: Structure-Based Mechanism of Conversion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2000**, *97* (20), 10723–10728. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.20.10723>.
- (51) Olson, J. S.; Ballou, D. P.; Palmer, G.; Massey, V. The Mechanism of Action of Xanthine Oxidase. *Journal of Biological Chemistry* **1974**, *249* (14), 4363–4382. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)42428-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)42428-9).
- (52) Kelley, E. E.; Khoo, N. K. H.; Hundley, N. J.; Malik, U. Z.; Freeman, B. A.; Tarpey, M. M. Hydrogen Peroxide Is the Major Oxidant Product of Xanthine Oxidase. *Free Radical Biology and Medicine* **2010**, *48* (4), 493–498. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.11.012>.
- (53) Fridovich, I. Quantitative Aspects of the Production of Superoxide Anion Radical by Milk Xanthine Oxidase. *Journal of Biological Chemistry* **1970**, *245* (16), 4053–4057. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)62884-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)62884-4).
- (54) Mercurio, G.; Vitale, C.; Cerquetani, E.; Zoncu, S.; Deidda, M.; Fini, M.; Rosano, G. M. C. Effect of Hyperuricemia upon Endothelial Function in Patients at Increased Cardiovascular Risk. *The American Journal of Cardiology* **2004**, *94* (7), 932–935. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2004.06.032>.
- (55) Kumar, R.; Joshi, G.; Kler, H.; Kalra, S.; Kaur, M.; Arya, R. Toward an Understanding of Structural Insights of Xanthine and Aldehyde Oxidases: An Overview of Their Inhibitors and Role in Various Diseases. *Medicinal Research Reviews* **2018**, *38* (4), 1073–1125. <https://doi.org/10.1002/med.21457>.
- (56) Das, D. K.; Engelman, R. M.; Clement, R.; Otani, H.; Prasad, M. R.; Rao, P. S. Role of Xanthine Oxidase Inhibitor as Free Radical Scavenger: A Novel Mechanism of Action of Allopurinol and Oxypurinol in Myocardial Salvage. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1987**, *148* (1), 314–319. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(87\)91112-0](https://doi.org/10.1016/0006-291X(87)91112-0).
- (57) R, B.; AD, M.; JJ, B.; A, H.; AD, S. Allopurinol Normalizes Endothelial Dysfunction in Type 2 Diabetics with Mild Hypertension. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* **2000**, *35* (3), 746–751. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.35.3.746>.

- (58) Engberding, N.; Spiekermann, S.; Schaefer, A.; Heineke, A.; Wiencke, A.; Müller, M.; Fuchs, M.; Hilfiker-Kleiner, D.; Hornig, B.; Drexler, H.; Landmesser, U. Allopurinol Attenuates Left Ventricular Remodeling and Dysfunction After Experimental Myocardial Infarction. *Circulation* **2004**, *110* (15), 2175–2179. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000144303.24894.1C>.
- (59) Messerli, F. H.; Burnier, M. Cardiovascular Disease and Uric Acid: Is the Not-so-Innocent Bystander Becoming a True Culprit and Does the US Black Box Warning for Febuxostat Indicate That Not All Uric Acid Lowering Is Beneficial? *European Heart Journal* **2019**, *40* (22), 1787–1789. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz199>.
- (60) Martínez-Ortega, U. Diseño, Síntesis y Evaluación Biológica de Derivados de Quinazolina Como Agentes Con Potencial Citotóxico En Líneas Celulares de Interés Farmacéutico, Universidad Nacional Autónoma de México, 2021.
- (61) Rosales Zariñana, V. A. Síntesis de Derivados de Quinazolina Con Potencial Actividad Citotóxica, 2015.
- (62) López-Sánchez, M. A. Síntesis de Derivados de Quinazolin-2,4,6-Triamina Para Evaluar Su Potencial Actividad Antioxidante, 2015.
- (63) Nieto-Lara, A. A. Preparación de Derivados de Quinazolina Como Agentes Citotóxicos Potenciales En Líneas Celulares TumORAles Malignas, 2016.
- (64) Mouret-Hernández, C. M. Evaluación de La Actividad Citotóxica de 5 Derivados de Quinazolina En Diferentes Líneas Celulares, 2016.
- (65) Trujillo-Minero, N. N. Síntesis y Evaluación de Derivados de Quinazolina Con Potencial Actividad Antitumoral, 2017.
- (66) Lee, J. Y.; Shin, Y. S.; Lee, J.; Kwon, S.; Jin, Y.; Jang, M. S.; Kim, S.; Song, J. H.; Kim, H. R.; Park, C. M. Identification of 4-Anilino-6-Aminoquinazoline Derivatives as Potential MERS-CoV Inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2020**, *30* (20), 127472. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127472>.
- (67) Chandregowda, V.; Rao, G. V.; Reddy, G. C. Convergent Approach for Commercial Synthesis of Gefitinib and Erlotinib. *Organic Process Research and Development* **2007**, *11* (5), 813–816. <https://doi.org/10.1021/op700054p>.
- (68) Abdulla, R. F.; Brinkmeyer, R. S. The Chemistry of Formamide Acetals. *Tetrahedron* **1979**, *35* (14), 1675–1735. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(79\)88001-1](https://doi.org/10.1016/0040-4020(79)88001-1).
- (69) Vilsmeier, A.; Haack, A. Über Die Einwirkung von Halogenphosphor Auf Alkyl-formanilide. Eine Neue Methode Zur Darstellung Sekundärer Und Tertiärer P-Alkylamino-benzaldehyde. *Jahrg.* **60** **1926**, 4–7.
- (70) el Ashry, E. S. H.; Nadeem, S.; Shah, M. R.; Kilany, Y. el. Recent Advances in the Dimroth Rearrangement. In *Advances in Heterocyclic Chemistry*; Academic Press, 2010; Vol. 101, pp 161–228. [https://doi.org/10.1016/S0065-2725\(10\)01005-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2725(10)01005-6).
- (71) Ram, S.; Ehrenkauf, R. E. A General Procedure for Mild and Rapid Reduction of Aliphatic and Aromatic Nitro Compounds Using Ammonium Formate as a Catalytic Hydrogen

- Transfer Agent. *Tetrahedron Letters* **1984**, 25 (32), 3415–3418. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)91034-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)91034-2).
- (72) Bellamy, F. D.; Ou, K. Selective Reduction of Aromatic Nitro Compounds with Stannous Chloride in Non Acidic and Non Aqueous Medium. *Tetrahedron Letters* **1984**, 25 (8), 839–842. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)80041-1](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)80041-1).
- (73) Yuste, F.; Saldaña, M.; Walls, F. Selective Reduction of Aromatic Nitro Compounds Containing O- and n-Benzyl Groups with Hydrazine and Raney Nickel. *Tetrahedron Letters* **1982**, 23 (2), 147–148. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)86770-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)86770-2).
- (74) Lyle, R. E.; Lammattina, J. L. Selective Hydrogenation of 2,6-Dinitroanilines. *Synthesis* **1974**, No. 10, 726–727. <https://doi.org/10.1055/s-1974-23423>.
- (75) Alefeld, G.; Völkl, J. *Hydrogen in Metals I*; Springer: Berlin, 1978. https://doi.org/10.1007/3540087052_40.
- (76) El-Hout, S. I.; El-Sheikh, S. M.; Hassan, H. M. A.; Harraz, F. A.; Ibrahim, I. A.; El-Sharkawy, E. A. A Green Chemical Route for Synthesis of Graphene Supported Palladium Nanoparticles: A Highly Active and Recyclable Catalyst for Reduction of Nitrobenzene. *Applied Catalysis A: General* **2015**, 503, 176–185. <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2015.06.036>.
- (77) Marck, G.; Villiger, A.; Buchecker, R. Aryl Couplings with Heterogeneous Palladium Catalysts. *Tetrahedron Letters* **1994**, 35 (20), 3277–3280. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)76884-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)76884-5).
- (78) Julia, M.; Duteil, M. Condensation of Aromatic Halides with Olefins, Catalyzed by Palladium. *Bulletin De La Societe Chimique De France Partie II-Chimie Moleculaire Organique Et Biologique* **1973**, No. 9–10, 2790.
- (79) Dobrovolná, Z.; Červený, L. Ammonium Formate Decomposition Using Palladium Catalyst. *Research on Chemical Intermediates* **2000**, 26 (5), 489–497. <https://doi.org/10.1163/156856700X00480>.
- (80) Entwistle, I. D.; Jackson, A. E.; Johnstone, R. A. W.; Telford, R. P. Reduction of Nitro-Compounds. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1977**, No. 4, 443. <https://doi.org/10.1039/p19770000443>.
- (81) Doyle, A. M.; Shaikhutdinov, S. K.; Jackson, S. D.; Freund, H.-J. Hydrogenation on Metal Surfaces: Why Are Nanoparticles More Active than Single Crystals? *Angewandte Chemie International Edition* **2003**, 42 (42), 5240–5243. <https://doi.org/10.1002/anie.200352124>.
- (82) Doyle, A. Alkene Chemistry on the Palladium Surface: Nanoparticles vs Single Crystals. *Journal of Catalysis* **2004**, 223 (2), 444–453. <https://doi.org/10.1016/j.jcat.2004.02.020>.
- (83) Romero, A. H. Reduction of Nitroarenes via Catalytic Transfer Hydrogenation Using Formic Acid as Hydrogen Source: A Comprehensive Review. *ChemistrySelect* **2020**, 5 (42), 13054–13075. <https://doi.org/10.1002/slct.202002838>.

- (84) Emerson, W. S. The Preparation of Amines by Reductive Alkylation. In *Organic Reactions*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2011; pp 174–255. <https://doi.org/10.1002/0471264180.or004.03>.
- (85) Massey, V.; Komai, H.; Palmer, G.; Elion, G. B. On the Mechanism of Inactivation of Xanthine Oxidase by Allopurinol and Other Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidines. *Journal of Biological Chemistry* **1970**, *245* (11), 2837–2844. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)63065-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)63065-0).
- (86) Sathisha, K. R.; Khanum, S. A.; Narendra, J. N.; Chandra, S.; Ayisha, F.; Balaji, S.; Marathe, G. K.; Gopal, S.; Rangappa, K. S. Synthesis and Xanthine Oxidase Inhibitory Activity of 7-Methyl-2-(Phenoxymethyl)-5H-[1,3,4]Thiadiazolo[3,2-a]Pyrimidin-5-One Derivatives. **2011**. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.11.034>.
- (87) Pao, W.; Miller, V. A.; Politi, K. A.; Riely, G. J.; Somwar, R.; Zakowski, M. F.; Kris, M. G.; Varmus, H. Acquired Resistance of Lung Adenocarcinomas to Gefitinib or Erlotinib Is Associated with a Second Mutation in the EGFR Kinase Domain. *PLoS Medicine* **2005**, *2*, 0225–0235. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PMED.0020073>.
- (88) Pao, W.; Miller, V.; Zakowski, M.; Doherty, J.; Politi, K.; Sarkaria, I.; Singh, B.; Heelan, R.; Rusch, V.; Fulton, L.; Mardis, E.; Kupfer, D.; Wilson, R.; Kris, M.; Varmus, H. EGF Receptor Gene Mutations Are Common in Lung Cancers from “Never Smokers” and Are Associated with Sensitivity of Tumors to Gefitinib and Erlotinib. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, *101* (36), 13306–13311. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405220101>.
- (89) Mohos, V.; Fliszár-Nyúl, E.; Poór, M. Inhibition of Xanthine Oxidase-Catalyzed Xanthine and 6-Mercaptopurine Oxidation by Flavonoid Aglycones and Some of Their Conjugates. *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, *21* (9). <https://doi.org/10.3390/ijms21093256>.
- (90) Iio, M.; Moriyama, A.; Matsumoto, Y.; Takaki, N.; Fukumoto, M. Inhibition of Xanthine Oxidase by Flavonoids. *Agricultural and Biological Chemistry* **1985**, *49* (7), 2173–2176. <https://doi.org/10.1080/00021369.1985.10867027>.
- (91) Theoduloz, C.; Pacheco, P.; Schmeda-Hirschmann, G. Xanthine Oxidase Inhibitory Activity of Chilean Myrtaceae. *Journal of Ethnopharmacology* **1991**, *33* (3), 253–255. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(91\)90085-R](https://doi.org/10.1016/0378-8741(91)90085-R).
- (92) Quy, T.; Xuan, T. Xanthine Oxidase Inhibitory Potential, Antioxidant and Antibacterial Activities of *Cordyceps Militaris* (L.) Link Fruiting Body. *Medicines* **2019**, *6* (1), 20. <https://doi.org/10.3390/medicines6010020>.
- (93) Tang, H. J.; Li, W.; Zhou, M.; Peng, L. Y.; Wang, J. X.; Li, J. H.; Chen, J. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Novel Xanthine Oxidase Inhibitors Bearing a 2-Arylbenzo[b]Furan Scaffold. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2018**, *151*, 849–860. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.01.096>.
- (94) Ahmane, N.; Atmani-Kilani, D.; Chaheer, N.; Ayouni, K.; Rahmani-Berboucha, M.; da Costa, G.; Debbache-Benaïda, N.; Richard, T.; Atmani, D. Identification of Bioactive Compounds from *Fraxinus Angustifolia* Extracts with Anti-NADH Oxidase Activity of Bovine Milk

- Xanthine Oxidoreductase. *Turkish Journal of Biology* **2019**, *43*, 133–147. <https://doi.org/10.3906/biy-1810-26>.
- (95) Santi, M. D.; Paulino Zunini, M.; Vera, B.; Bouzidi, C.; Dumontet, V.; Abin-Carriquiry, A.; Grougnet, R.; Ortega, M. G. Xanthine Oxidase Inhibitory Activity of Natural and Hemisynthetic Flavonoids from Gardenia Oudiepe (Rubiaceae) in Vitro and Molecular Docking Studies. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2018**, *143*, 577–582. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.11.071>.
- (96) Zhang, L.; Wang, S.; Yang, M.; Shi, A.; Wang, H.; Guan, Q.; Bao, K.; Zhang, W. Design, Synthesis and Bioevaluation of 3-Oxo-6-Aryl-2,3-Dihydropyridazine-4-Carbohydrazide Derivatives as Novel Xanthine Oxidase Inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2019**, *27* (9), 1818–1823. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.03.027>.
- (97) Zhang, H. J.; Hu, Y. J.; Xu, P.; Liang, W. Q.; Zhou, J.; Liu, P. G.; Cheng, L.; Pu, J. B. Screening of Potential Xanthine Oxidase Inhibitors in *Gnaphalium Hypoleucum* DC. by Immobilized Metal Affinity Chromatography and Ultrafiltration-Ultra Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Molecules* **2016**, *21* (9). <https://doi.org/10.3390/molecules21091242>.
- (98) Gao, J.; Liu, X.; Zhang, B.; Mao, Q.; Zhang, Z.; Zou, Q.; Dai, X.; Wang, S. Design, Synthesis and Biological Evaluation of 1-Alkyl-5/6-(5-Oxo-4,5-Dihydro-1,2,4-Oxadiazol-3-Yl)-1H-Indole-3-Carbonitriles as Novel Xanthine Oxidase Inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2020**, *190*, 112077. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112077>.
- (99) Abbasi, S.; Gharaghani, S.; Benvidi, A.; Rezaeinasab, M.; Saboury, A. A. An In-Depth View of Potential Dual Effect of Thymol in Inhibiting Xanthine Oxidase Activity: Electrochemical Measurements in Combination with Four Way PARAFAC Analysis and Molecular Docking Insights. *International Journal of Biological Macromolecules* **2018**, *119*, 1298–1310. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.018>.
- (100) Strelow, J.; Dewe, W.; Iversen, P. W.; Brooks, H. B.; Radding, J. A.; McGee, J.; Weidner, J. *Mechanism of Action Assays for Enzymes*; Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004.
- (101) Coelho, C.; Foti, A.; Hartmann, T.; Santos-Silva, T.; Leimkühler, S.; Romão, M. J. Structural Insights into Xenobiotic and Inhibitor Binding to Human Aldehyde Oxidase. *Nature Chemical Biology* **2015**, *11* (10), 779–783. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1895>.
- (102) Eberhardt, J.; Santos-Martins, D.; Tillack, A. F.; Forli, S. AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2021**. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00203>.
- (103) Trott, O.; Olson, A. J. AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. *Journal of computational chemistry* **2010**, *31* (2), 455–461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.
- (104) Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E. UCSF Chimera?A Visualization System for Exploratory Research and Analysis. *Journal of Computational Chemistry* **2004**, *25* (13), 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>.

- (105) Shapovalov, M. V.; Dunbrack, R. L. A Smoothed Backbone-Dependent Rotamer Library for Proteins Derived from Adaptive Kernel Density Estimates and Regressions. *Structure* **2011**, *19* (6), 844–858. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.03.019>.
- (106) Šali, A.; Blundell, T. L. Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints. *Journal of Molecular Biology* **1993**, *234* (3), 779–815. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1626>.
- (107) Rappé, A. K.; Casewit, C. J.; Colwell, K. S.; Goddard, W. A.; Skiff, W. M. UFF, a Full Periodic Table Force Field for Molecular Mechanics and Molecular Dynamics Simulations. *Journal of the American Chemical Society* **1992**, *114* (25), 10024–10035. <https://doi.org/10.1021/ja00051a040>.
- (108) Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. Development of the Colle-Salvetti Correlation-Energy Formula into a Functional of the Electron Density. *Physical Review B* **1988**, *37* (2), 785–789. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.37.785>.
- (109) Becke, A. D. Density-Functional Thermochemistry. III. The Role of Exact Exchange. *The Journal of Chemical Physics* **1993**, *98* (7), 5648–5652. <https://doi.org/10.1063/1.464913>.
- (110) M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. A. Petersson, H. N. Gaussian, Inc. Wallingford, CT 2016.
- (111) Morris, G. M.; Ruth, H.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. Software News and Updates AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *Journal of Computational Chemistry* **2009**, *30* (16), 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>.
- (112) Steffen, C.; Thomas, K.; Huniar, U.; Hellweg, A.; Rubner, O.; Schroer, A. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *Journal of computational chemistry* **2010**. <https://doi.org/10.1002/jcc>.
- (113) Spector, T.; Johns, D. G. Stoichiometric Inhibition of Reduced Xanthine Oxidase by Hydroxypyrazolo [3,4-d]Pyrimidines. *Journal of Biological Chemistry* **1970**, *245* (19), 5079–5085. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)62820-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)62820-0).
- (114) Stamos, J.; Sliwkowski, M. X.; Eigenbrot, C. Structure of the Epidermal Growth Factor Receptor Kinase Domain Alone and in Complex with a 4-Anilinoquinazoline Inhibitor *. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277* (48), 46265–46272. <https://doi.org/10.1074/JBC.M207135200>.
- (115) RCSB PDB - 4WKQ: 1.85 angstrom structure of EGFR kinase domain with gefitinib <https://www.rcsb.org/structure/4WKQ> (accessed 2021 -08 -30).
- (116) Lisa Shewchuk; Anne Hassell; Bruce Wisely; Warren Rocque; William Holmes; James Veal, and; Kuyper*, L. F. Binding Mode of the 4-Anilinoquinazoline Class of Protein Kinase Inhibitor: X-Ray Crystallographic Studies of 4-Anilinoquinazolines Bound to Cyclin-Dependent Kinase 2 and P38 Kinase. *Journal of Medicinal Chemistry* **1999**, *43* (1), 133–138. <https://doi.org/10.1021/JM990401T>.

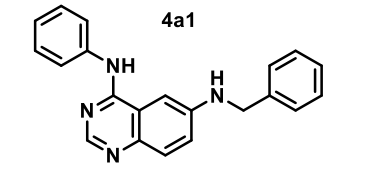
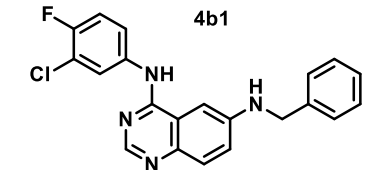
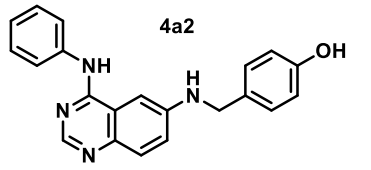
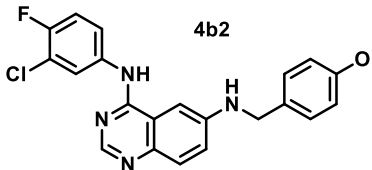
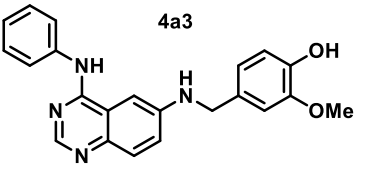
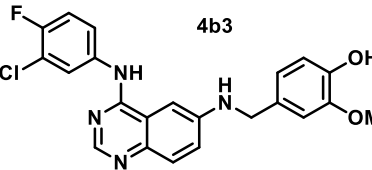
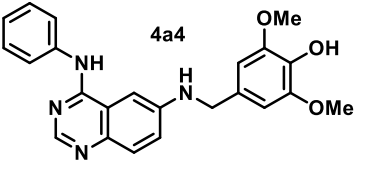
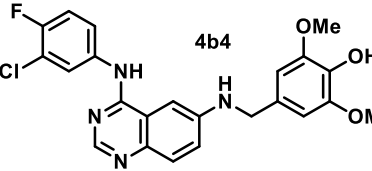
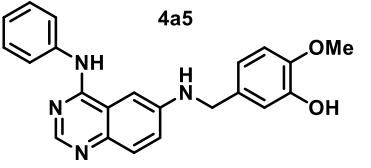
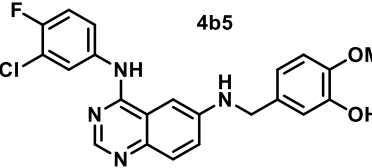
- (117) Martínez-Ortega, U.; Figueroa-Figueroa, D. I.; Hernández-Luis, F.; Aguayo-Ortiz, R. In Silico Characterization of Masitinib Interaction with SARS-CoV-2 Main Protease. *ChemMedChem* **2021**, *16* (15), 2339–2344. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202100375>.
- (118) Crabtree, G. W.; Dexter, D. L.; Stoeckler, J. D.; Savarese, T. M.; Ghoda, L. Y.; Rogler-Brown, T. L.; Calabresi, P.; Parks, R. E. Activities of Purine-Metabolizing Enzymes in Human Colon Carcinoma Cell Lines and Xenograft Tumors. *Biochemical Pharmacology* **1981**, *30* (7), 793–798. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(81\)90167-2](https://doi.org/10.1016/0006-2952(81)90167-2).
- (119) Snider, N. T.; Sikora, M. J.; Sridar, C.; Feuerstein, T. J.; Rae, J. M.; Hollenberg, P. F. The Endocannabinoid Anandamide Is a Substrate for the Human Polymorphic Cytochrome P450 2D6. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2008**, *327* (2), 538–545. <https://doi.org/10.1124/jpet.108.141796>.

ANEXO 1

Síntesis y caracterización instrumental de compuestos

A1.1. Estructura química de los compuestos derivados de quinazolina obtenidos

Tabla A1 I. Estructura y clave de los productos finales obtenidos. Las claves de cada uno son particulares del trabajo realizado.

Estructura y clave	
 <p>4a1</p>	 <p>4b1</p>
 <p>4a2</p>	 <p>4b2</p>
 <p>4a3</p>	 <p>4b3</p>
 <p>4a4</p>	 <p>4b4</p>
 <p>4a5</p>	 <p>4b5</p>

A1.2. Instrumentos y Materiales

- El peso de los compuestos se midió con la balanza analítica Sartorius™ CP124 S.
- Las reacciones llevadas a cabo se realizaron en las parrillas de agitación magnética IKA® RET basic e IKA® Plate RTC digital.
- La evaporación de los disolventes se realizó en el rotaevaporador marca Büchi modelo RC-114 incorporado a una bomba de vacío Vacuubrand PC160 con regulador CVC-3000 y refrigerante en espiral Brinkmann™.
- Para agilizar la síntesis de los intermediarios, se utilizó el microondas Anton Parr Monowave 300 Extra, adaptado a un automuestreador MAS 24 con un sensor de temperatura de infrarrojo.

- Como prueba de pureza se determinó el punto de fusión de los compuestos. La determinación de los puntos de fusión se llevó a cabo en un equipo térmico digital Electrothermal Equipar 9300 con tubos capilares. Los puntos de fusión no están corregidos.
- Las reacciones se siguieron por CCF en placas de aluminio recubiertas con gel de sílice y fluoresceína CF 254 de Merk™. Éstas, fueron reveladas con una lámpara de luz ultravioleta Spectroline® ENF-240C, cámara de yodo y una disolución de ninhidrina al 10% en ácido acético/metanol.
- La caracterización analítica-instrumental se llevó a cabo con los servicios ofrecidos por la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI) de la Facultad de Química de la UNAM.
- Los experimentos de RMN se efectuaron a temperatura ambiente en un espectrofotómetro de RMN de 9.4 T marca Varian modelo VNMRS de 400 MHz y de 300 MHz. Los desplazamientos químicos (δ) se reportan en partes por millón (ppm) teniendo como referencia al tetrametilsilano en DMSO- d_6 (Me_4Si , $\delta=0$). Los espectros fueron obtenidos por la Dra. Nayeli López Balbiaux.
- Los espectros de masas se obtuvieron mediante la técnica de ionización química a presión atmosférica (APCI) de alta resolución en el espectrofotómetro de masas modelo AxION-2 TOF MS de PerkinElmer® realizado por la Dra. Jessica Amacosta Castillo, utilizando disolventes grado LC-MS. La introducción de las muestras se lleva a cabo de manera directa a través del módulo DSA (Direct Sample Analysis).

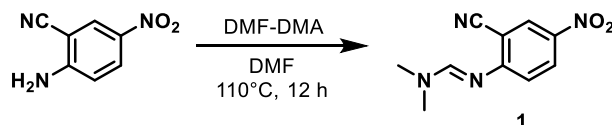
A1.3. Reactivos, disolventes y metodología

Los compuestos obtenidos se sintetizaron con los disolventes y reactivos enlistados a continuación:

Disolventes		
Nombre	Marca	Código
DMF	J.T.Baker	9221-03
AcOH	J.T.Baker	9515-03
MeCN	J.T.Baker	9011-03
EtOH	J.T.Baker	-
MeOH	J.T.Baker	9070-03
Cloroformo	J.T.Baker	-
AcOEt	ALVI	-
Éter etílico	Química Rique	-
Reactivos		
Nombre	Marca	Código
2-amino-5-nitrobenzotrilo	Sigma Aldrich	153494
DMF-DMA	Sigma Aldrich	140732
Anilina	Sigma Aldrich	242284
3-cloro-4-fluoranilina	Sigma Aldrich	228683

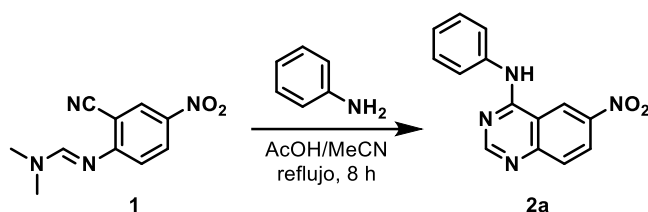
Formiato de amonio	Sigma Aldrich	156264
Paladio sobre carbón activado	Sigma Aldrich	
Ácido trifluoroacético	Sigma Aldrich	-
Cianoborohidruro de sodio	Sigma Aldrich	156169
Ferroceno	Sigma Aldrich	F408
POCl ₃	Sigma Aldrich	201170
Benzaldehído	Sigma Aldrich	B1334
4-hidroxibenzaldehído	Sigma Aldrich	H19808
3-hidroxi-4-metoxibenzaldehído (isovainillina)	Sigma Aldrich	143685
4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (vainillina)	Sigma Aldrich	V1104
4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldehído (siringaldehído)	Sigma Aldrich	S7602
4-nitrobenzaldehído	Sigma Aldrich	-
5-nitrofuran-2-carbaldehído	Sigma Aldrich	-

A1.3.1 Síntesis de (*E*)-*N'*-(2-ciano-4-nitrofenil)-*N,N*-dimetilformimidamida (**1**)



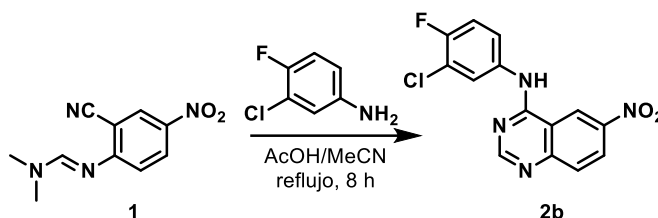
En un matraz de fondo redondo de 100 mL con esmerilado 14/20 se colocaron 16.0 g de 2-amino-5-nitrobenzonitrilo (0.098 mol) suspendidos en 50 mL de DMF. Posteriormente, se agregó 13.86 mL de DMF-DMA (0.098 mol) y se dejó en agitación a 110°C por 12 h en un baño de aceite de silicón con un condensador tipo Graham. Todos los componentes de la reacción se observan solubles al añadir la DMF en frío. La reacción se siguió por CCF observando, con ayuda de una lámpara de UV, la desaparición del benzonitrilo y la aparición del intermediario **1** como un punto color amarillo fluorescente con la longitud de 355 nm. Al consumirse los reactivos, se detuvo el calentamiento y al enfriarse aparece un precipitado color amarillo. La mezcla de reacción fue filtrada en un sistema de vacío equipado con un matraz Kitasato y un embudo Büchner; se lavó en repetidas ocasiones con metanol hasta que el filtrado resultante fuera incoloro. Se obtuvo un sólido color amarillo correspondiente a 20.90 g (97.7%) del intermediario **1** con Rf: 0.73 (CHCl₃/MeOH, 80:20) y pf. 143-144°C

A1.3.2 Síntesis de 6-nitro-*N*-fenilquinazolin-4-amina (**2a**)



En un matraz de fondo redondo de 100 mL con esmerilado 14/20 se colocaron 5 g de (E)-N'-(2-ciano-4-nitrofenil)-N,N-dimetilformimidamida (0.023 mol) suspendidos en 50 mL de una mezcla de ácido acético al 30% en acetonitrilo. Posteriormente se agregaron 3 mL de 3-bromoanilina (0.027 mol) y se dejó en agitación a reflujo durante 8 h en un baño de aceite de silicón con un condensador tipo Graham; la mezcla de reacción se observa como una suspensión en frío y conforme se incrementa la temperatura todos los componentes se solubilizan en la mezcla de disolventes. La reacción se siguió por CCF hasta observar la desaparición del intermediario **1**. Al término de la reacción, se detuvo el calentamiento y al enfriarse se observa un precipitado color amarillo. La mezcla de reacción se filtró en un sistema de vacío equipado con un matraz Kitasato y un embudo Büchner; se realizaron abundantes lavados con acetonitrilo hasta que el líquido filtrado resultara incoloro. El sólido se dejó secar por arrastre con vacío por una noche. Se obtuvo un sólido color amarillo correspondiente a 6.31 g (93.89%) del intermediario **2a** con Rf: 0.73 (CHCl₃/MeOH, 80:20) y pf. 235-237°C

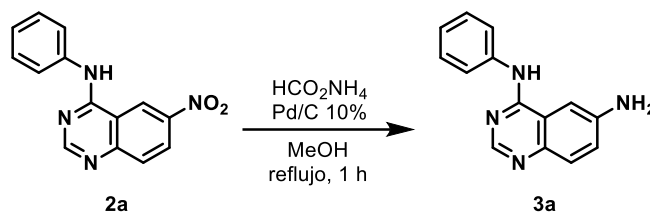
A1.3.3 Síntesis de N-(3-cloro-4-fluorofenil)-6-nitroquinazolin-4-amina (**2b**)



En un matraz de fondo redondo de 100 mL con esmerilado 14/20 se colocaron 5 g de (E)-N'-(2-ciano-4-nitrofenil)-N,N-dimetilformimidamida (0.023 mol) y 4 g de 3-cloro-4-fluorofenilamina (0.027 mol) suspendidos en 50 mL de una mezcla de ácido acético al 30% en acetonitrilo. La mezcla se dejó en agitación a reflujo durante 8 h en un baño de aceite de silicón con un condensador tipo Graham; la mezcla de reacción se observa como una suspensión en frío y conforme se incrementa la temperatura todos los componentes se observan solubles en los disolventes ocupados. La reacción se siguió por TLC hasta observar la desaparición del intermediario **1**. Al término de la reacción se observa la aparición de un precipitado amarillo que ocupa la mayor parte del volumen de la reacción; seguido de esto, se detuvo el calentamiento. La mezcla de reacción se filtró en un sistema de vacío equipado con un matraz Kitasato y un embudo Büchner; se realizaron abundantes lavados con acetonitrilo hasta que el líquido filtrado resultara incoloro. El sólido se dejó secar por arrastre con vacío por una noche. Se obtuvo un sólido color

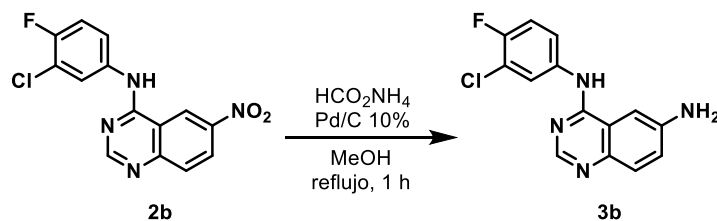
amarillo correspondiente a 6.06 g (90.38%) del intermediario **2b** con Rf: 0.73 (CHCl₃/MeOH, 80:20) y pf. 274-276°C

A1.3.4 Síntesis de *N*⁴-fenilquinazolin-4,6-diamina (**3a**)



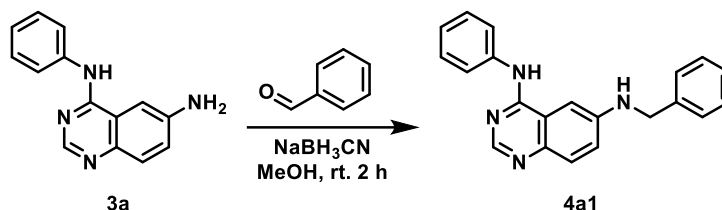
En un matraz de fondo redondo de 100 mL con esmerilado 14/20 se colocaron 8 g de 6-nitro-*N*-fenilquinazolin-4-amina (0.023 mol), 8.92 g de formiato de amonio (0.027 mol) y 0.5 g de Pd/C suspendidos en 50 mL de metanol. La mezcla se dejó en agitación a reflujo durante 1 h en un baño de aceite de silicón con un condensador tipo Graham; la mezcla de reacción se observa como una suspensión verde. La reacción se siguió por TLC hasta observar la desaparición del intermediario **2a**. Al término de la reacción se observa que todos los componentes de la reacción, excepto el Pd/C, quedan disueltos en la mezcla; seguido de esto, se detuvo el calentamiento. La mezcla de reacción se filtró en un sistema de vacío equipado con un matraz Kitasato y un embudo de vidrio poroso; se realizaron abundantes lavados con metanol hasta que el líquido filtrado resultara incoloro. La disolución resultante se evaporó en un rotaevaporador sin llevar a sequedad. Al líquido resultante se le agregó un poco de agua para inducir la cristalización del compuesto. El sólido suspendido se filtró en un sistema de vacío equipado con un matraz Kitasato y un embudo Büchner; se realizaron abundantes lavados con agua hasta que el líquido filtrado resultara incoloro. Se obtuvo un sólido color verde pálido correspondiente a 6.06 g (89.88%) del intermediario **3a** con Rf: 0.42 (CHCl₃/MeOH, 80:20) y pf. 253-254°C

A1.3.5 Síntesis de *N*⁴-(3-cloro-4-fluorofenil)quinazolin-4,6-diamina (**3a**)



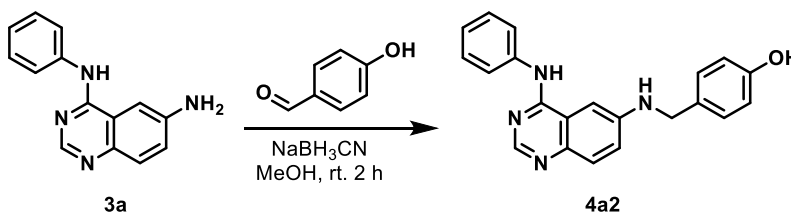
Misma metodología del intermediario **3a**. Se obtuvo un sólido color amarillo correspondiente a 4.32 g (86.40%) del intermediario **3b** con Rf: 0.42 (CHCl₃/MeOH, 70:30) y pf. 261-263°C

A1.3.6 Síntesis de *N*⁴-bencil-*N*⁴-fenilquinazolin-4,6-diamina (**4a1**)



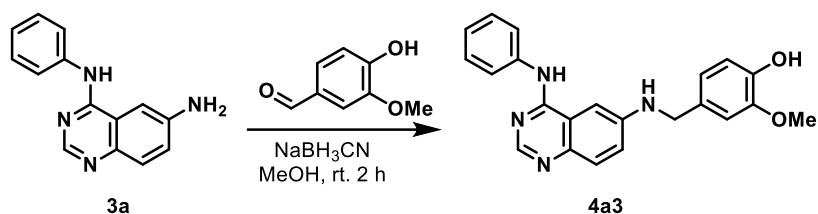
En un matraz de fondo redondo de 50 mL con esmerilado 14/20 se colocaron 200 mg de *N*⁴-fenilquinazolin-4,6-diamina (846.46 μmol), 129 μL benzaldehído (1.27 mmol) y 167 μL de ácido trifluoroacético (2.54 mmol) suspendidos en 25 mL de metanol. La mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 1 h sobre una parrilla de agitación; la mezcla de reacción se observa como una suspensión amarilla y al añadir el ácido trifluoroacético se vuelve una disolución verde. La reacción se siguió por TLC hasta observar la desaparición del intermediario **3a**. Al término de la reacción se añadieron lentamente 53.19 mg (846.46 μmol) de cianoborohidruro de sodio. La reacción se siguió por TLC hasta observar la desaparición del intermediario imina que se produjo en el paso anterior. La reacción se detuvo con la adición de una solución saturada de bicarbonato de sodio. Se observa la aparición de un precipitado amarillo y la mezcla de reacción se filtró en un sistema de vacío equipado con un matraz Kitasato y un embudo Büchner; se realizaron abundantes lavados con agua hasta que el líquido filtrado resultara incoloro. El sólido se dejó secar por arrastre con vacío por una noche. Se obtuvo un sólido color amarillo correspondiente a 222.7 mg (80.6%) del intermediario **4a1** con Rf: 0.66 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 80:20) y pf. 205-207°C

A1.3.7 Síntesis de 4-(((4-(fenilamino)quinazolin-6-il)amino)metil)fenol (**4a2**)



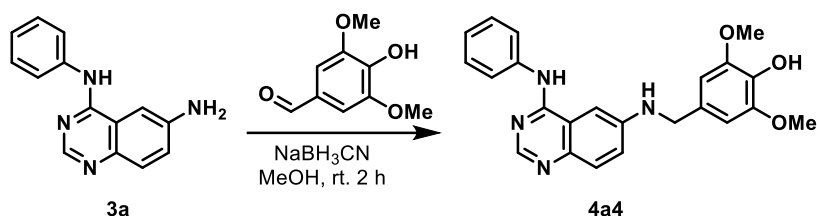
Misma metodología del compuesto **4a1**. Se obtuvo un sólido color amarillo correspondiente a 250.2 mg (86.3%) del intermediario **4a2** con Rf: 0.52 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 70:30) y pf. 212-214°C

A1.3.8 Síntesis de 2-metoxi-4-(((4-(fenilamino)quinazolin-6-il)amino)metil)fenol (**4a3**)



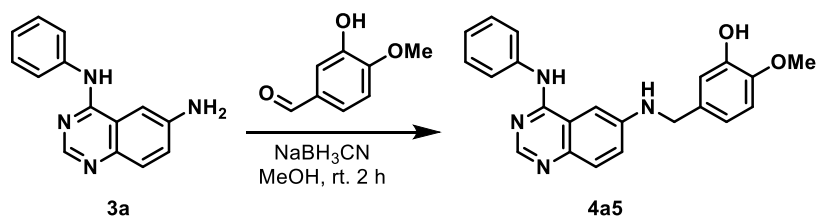
Misma metodología del compuesto **4a1**. Se obtuvo un sólido color amarillo correspondiente a 247.8 mg (78.6%) del intermediario **4a3** con Rf: 0.65 (CHCl₃/MeOH, 70:30) y pf. 200-202°C

A1.3.9 Síntesis de 2,6-dimetoxi-4-(((4-(fenilamino)quinazolin-6-il)amino)metil)fenol (**4a4**)



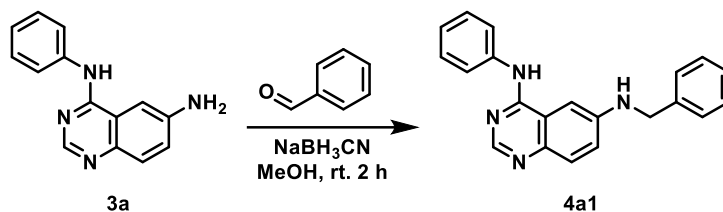
Misma metodología del compuesto **4a1**. Se obtuvo un sólido color amarillo correspondiente a 286.8 mg (84.2%) del intermediario **4a4** con Rf: 0.68 (CHCl₃/MeOH, 70:30) y pf. 196-198°C

A1.3.10 Síntesis de 2-metoxi-5-(((4-(fenilamino)quinazolin-6-il)amino)metil)fenol (**4a4**)



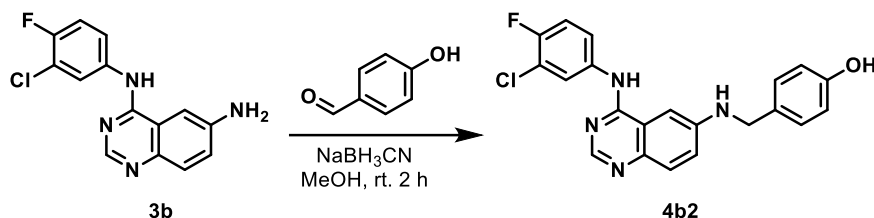
Misma metodología del compuesto **4a1**. Se obtuvo un sólido color amarillo correspondiente a 286.8 mg (84.2%) del intermediario **4a5** con Rf: 0.68 (CHCl₃/MeOH, 70:30) y pf. 198-199°C

A1.3.11 Síntesis de N⁶-bencil-N⁴-(3-cloro-4-fluorofenil)quinazolin-4,6-diamina (**4b1**)



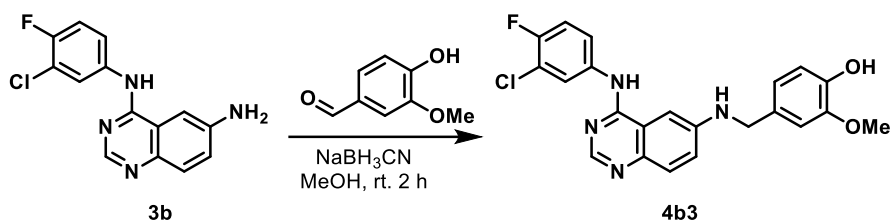
En un matraz de fondo redondo de 50 mL con esmerilado 14/20 se colocaron 200 mg de N⁴-(3-cloro-4-fluorofenil)quinazolin-4,6-diamina (692.74 μmol), 106 μL benzaldehído (846.46 μmol) y 137 μL de ácido trifluoroacético suspendidos en 25 mL de metanol. La mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 1 h sobre una parrilla de agitación; la mezcla de reacción se observa como una suspensión amarilla y al añadir el ácido trifluoroacético se vuelve una disolución verde. La reacción se siguió por TLC hasta observar la desaparición del intermediario **3a**. Al término de la reacción se añadieron lentamente 217.66 mg (3.46 mmol) de cianoborohidruro de sodio. La reacción se siguió por TLC hasta observar la desaparición del intermediario imina que se produjo en el paso anterior. La reacción se detuvo con la adición de una solución saturada de bicarbonato de sodio. Se observa la aparición de un precipitado amarillo y la mezcla de reacción se filtró en un sistema de vacío equipado con un matraz Kitasato y un embudo Büchner; se realizaron abundantes lavados con agua hasta que el líquido filtrado resultara incoloro. El sólido se dejó secar por arrastre con vacío por una noche. Se obtuvo un sólido color amarillo correspondiente a 210.9 mg (80.4%) del intermediario **4b1** con Rf: 0.63 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 80:20) y pf. 191-192°C

A1.3.12 Síntesis de 4-(((4-((3-cloro-4-fluorofenil)amino)quinazolin-6-il)amino)metil)fenol (**4b2**)



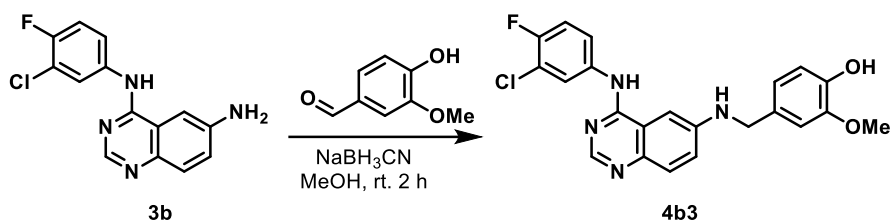
Misma metodología del compuesto **4b1**. Se obtuvo un sólido color amarillo correspondiente a 232.2 mg (84.9%) del intermediario **4b2** con Rf: 0.50 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 70:30) y pf. 195-196°C

A1.3.13 Síntesis de 4-(((4-((3-cloro-4-fluorofenil)amino)quinazolin-6-il)amino)metil)fenol (**4b3**)



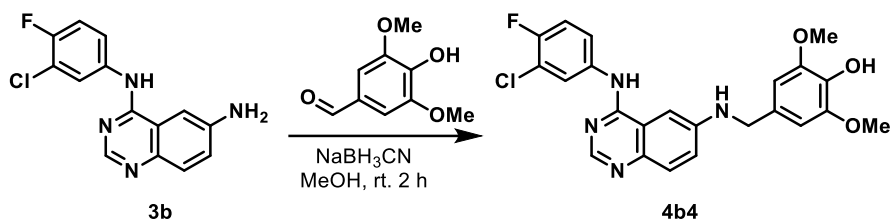
Misma metodología del compuesto **4b1**. Se obtuvo un sólido color amarillo correspondiente a 232.2 mg (84.9%) del intermediario **4b3** con Rf: 0.63 (CHCl₃/MeOH, 70:30) y pf. 195-196°C

A1.3.14 Síntesis de 4-(((4-((3-cloro-4-fluorofenil)amino)quinazolin-6-il)amino)metil)fenol (**4b3**)



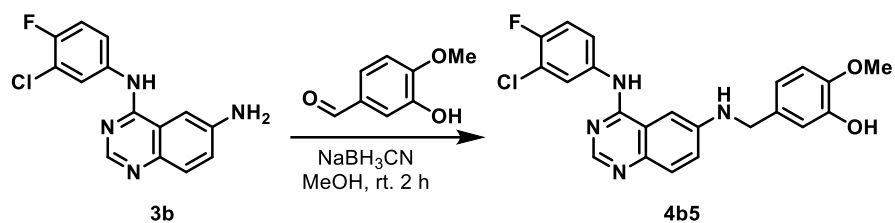
Misma metodología del compuesto **4b1**. Se obtuvo un sólido color amarillo correspondiente a 232.2 mg (84.9%) del intermediario **4b4** con Rf: 0.50 (CHCl₃/MeOH, 70:30) y pf. 195-196°C

A1.3.15 Síntesis de 4-(((4-((3-cloro-4-fluorofenil)amino)quinazolin-6-il)amino)metil)-2,6-dimetoxifenol (**4b4**)



Misma metodología del compuesto **4b1**. Se obtuvo un sólido color amarillo correspondiente a 256.2 mg (81.3%) del intermediario **4b4** con Rf: 0.63 (CHCl₃/MeOH, 70:30) y pf. 190-192°C

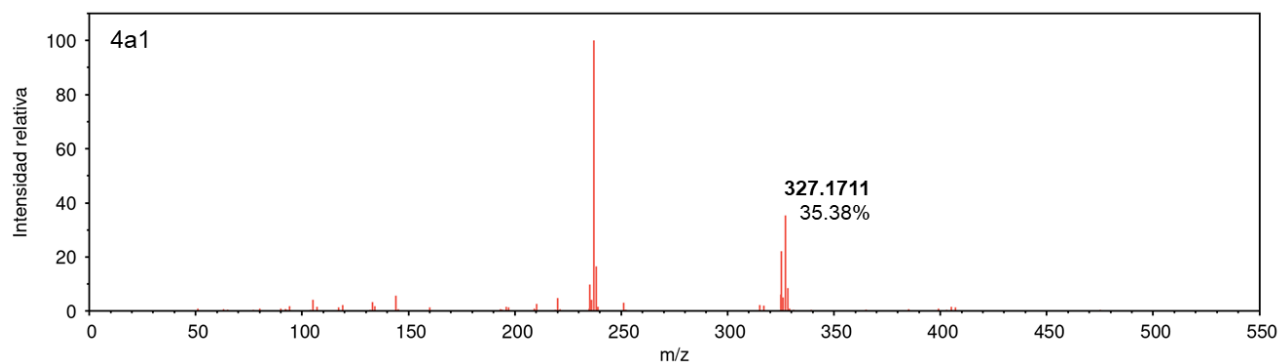
A1.3.16 Síntesis de 5-(((4-((3-cloro-4-fluorofenil)amino)quinazolin-6-il)amino)metil)-2-metoxifenol (**4b5**)



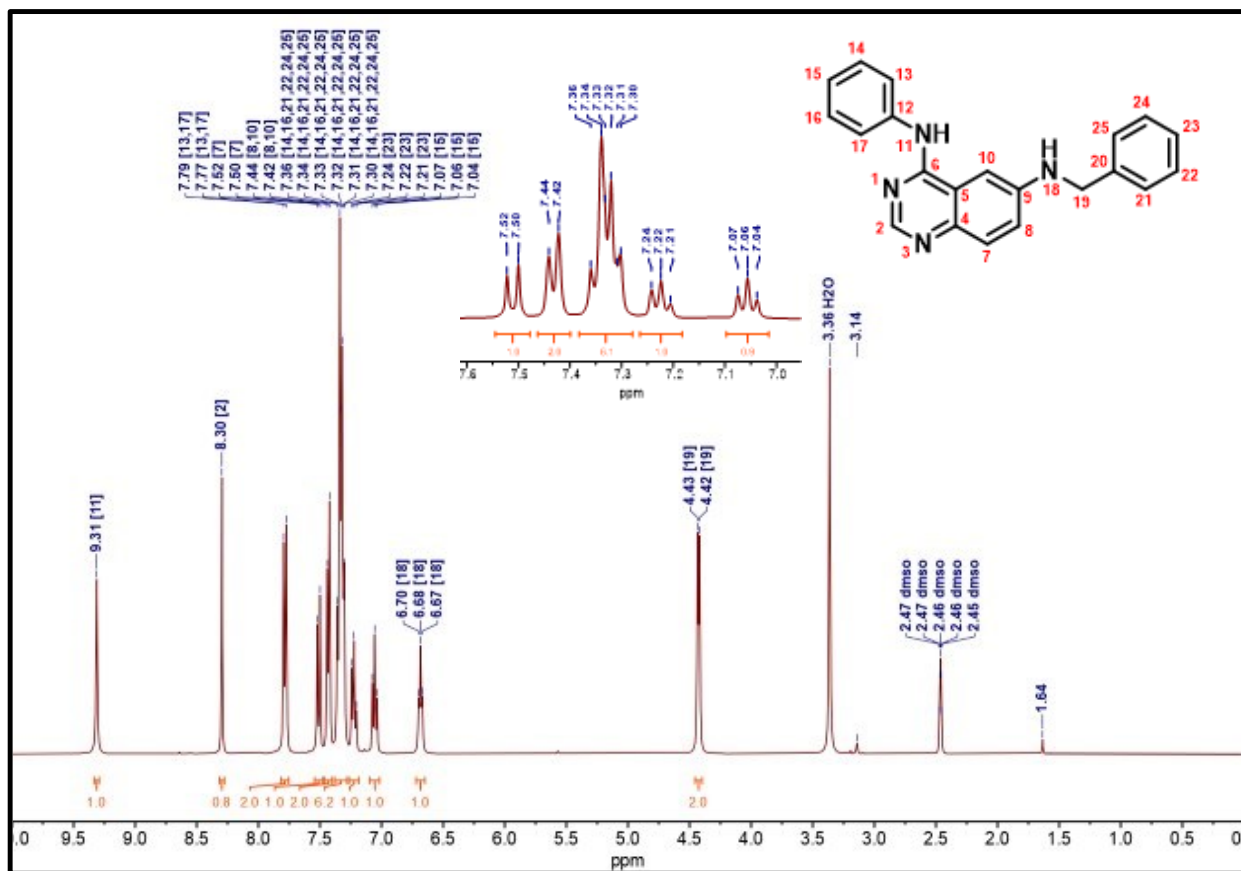
Misma metodología del compuesto **4b1**. Se obtuvo un sólido color amarillo correspondiente a 241.6 mg (82.1%) del intermediario **4b5** con Rf: 0.63 (CHCl₃/MeOH, 70:30) y pf. 193-194°C

A1.4. Caracterización Instrumental de productos finales

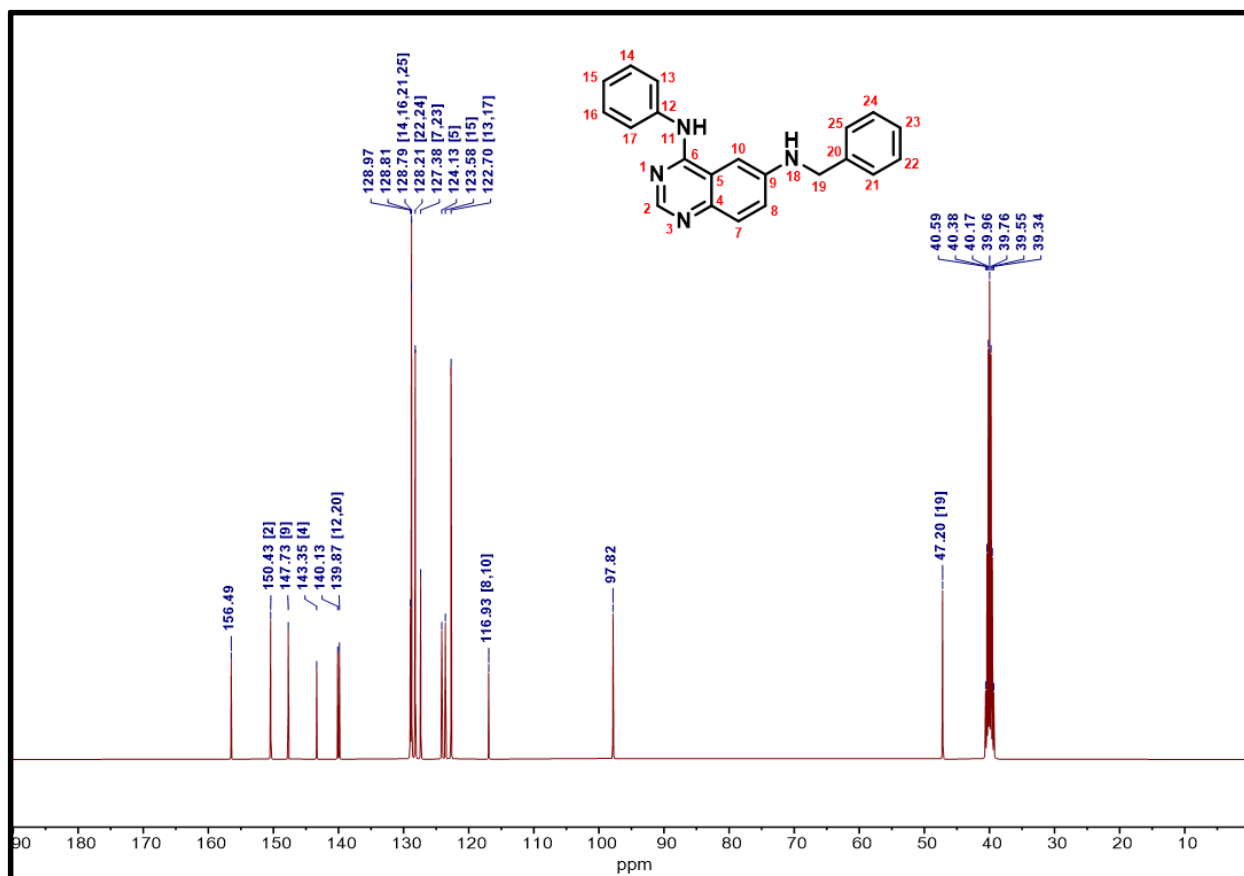
A1.4.1 Caracterización de *N*⁶-bencil-*N*⁴-fenilquinazolin-4,6-diamina (**4a1**)



Espectro 1. Espectrometría de masas APCI de **4a1**. Encima del ion molecular se muestra la masa monoisotópica y su abundancia relativa.

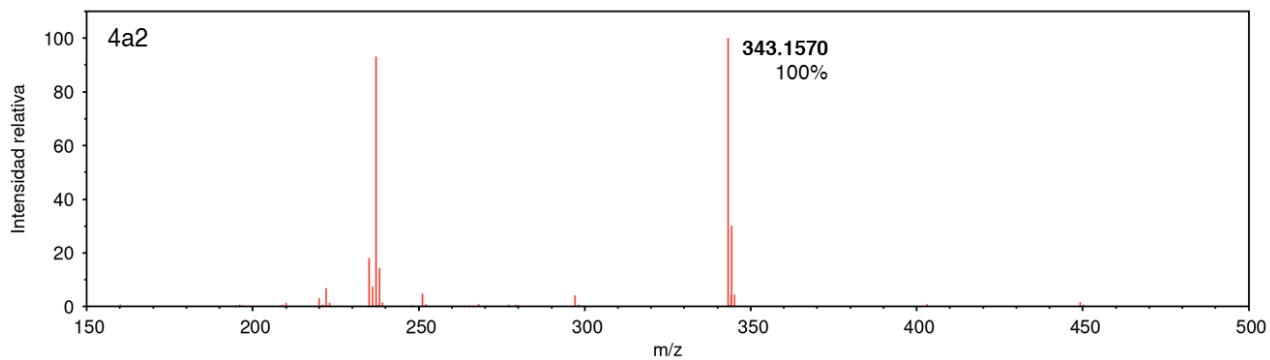


Espectro 2. Espectro de RMN H^1 de **4a1** en DMSO-d_6 a 300 MHz TMS, δ en ppm. Encima de cada pico se muestra el átomo correspondiente a dicha señal. También, se hace un acercamiento a las señales de los anillos de fenilo.

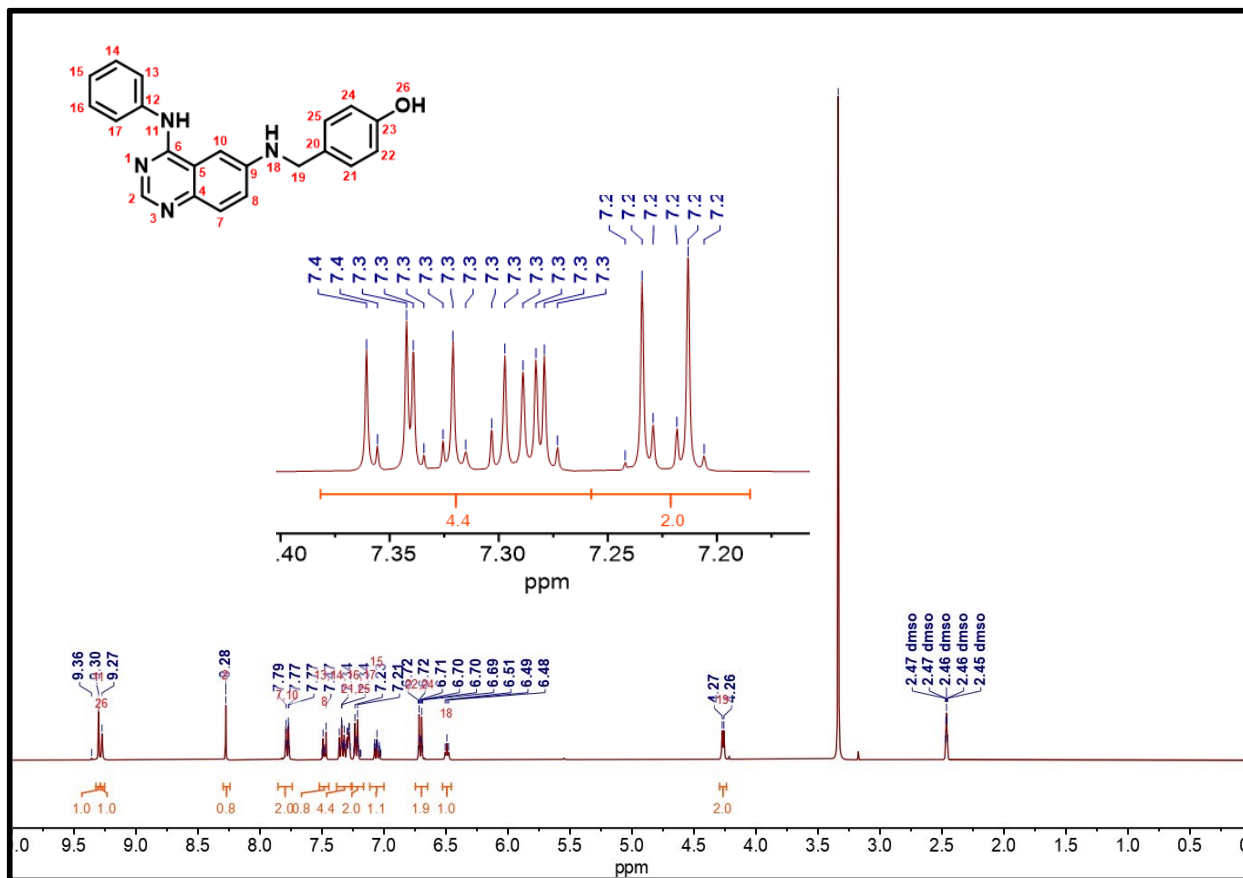


Espectro 3. RMN C^{13} de **4a1** en DMSO- d_6 a 100 MHz TMS, δ en ppm. Encima de cada pico se muestra el átomo correspondiente a dicha señal.

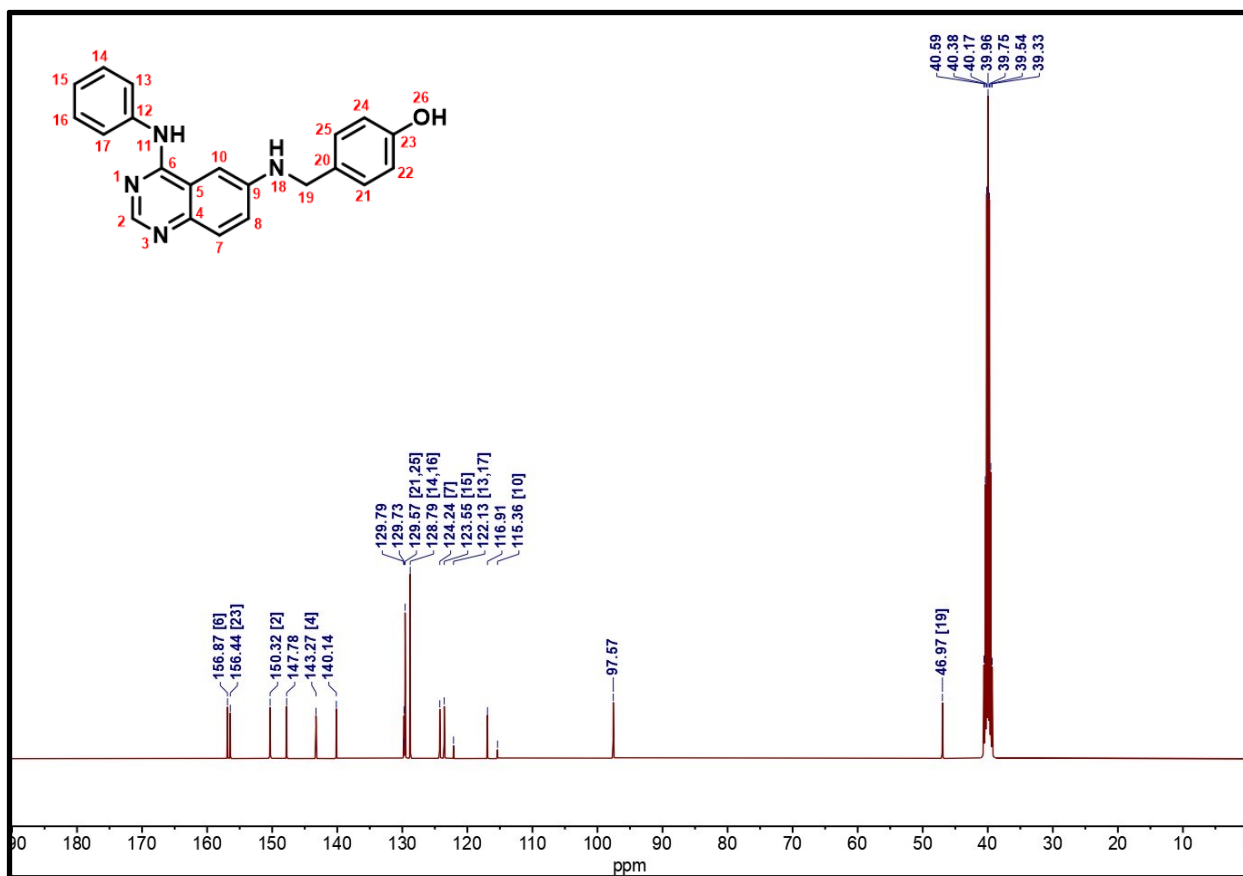
A1.4.2 Caracterización de 4-(((4-(fenilamino)quinazolin-6-il)amino)metil)fenol (**4a2**)



Espectro 4. Espectrometría de masas APCI de **4a2**. Encima del ion molecular se muestra la masa monoisotópica y su abundancia relativa.

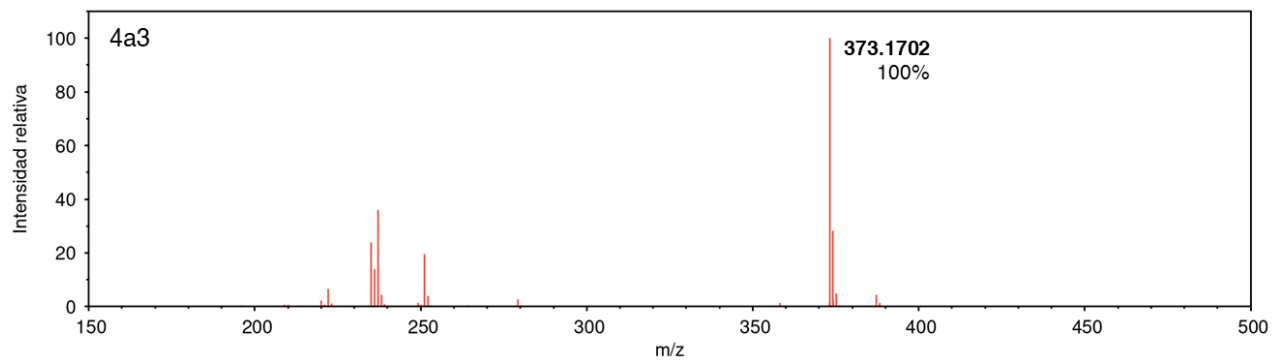


Espectro 5. RMN H^1 de **4a2** en DMSO-d_6 a 300 MHz TMS, δ en ppm. Encima de cada pico se muestra el átomo correspondiente a dicha señal. También, se hace un acercamiento a las señales de los anillos de fenilo.

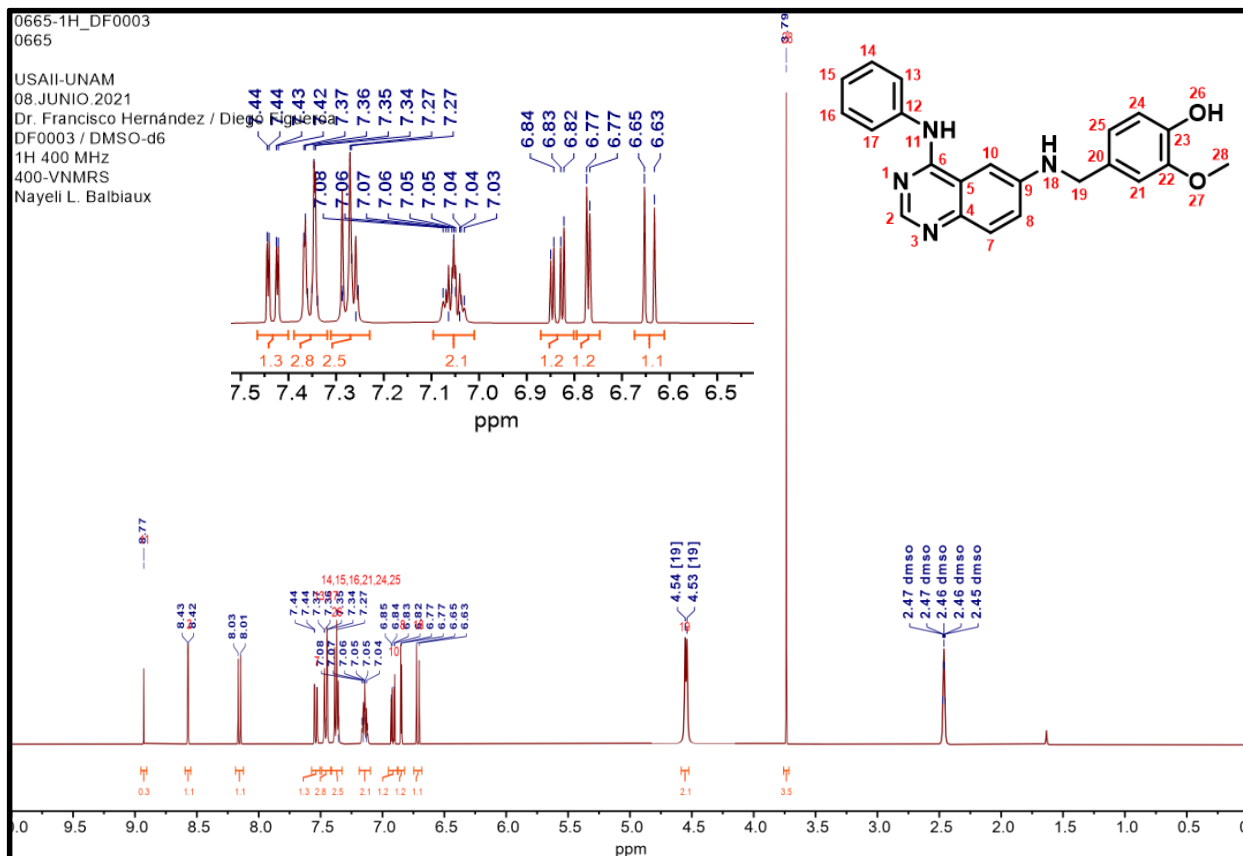


Espectro 6. RMN C^{13} de **4a2** en DMSO-d_6 a 100 MHz TMS, δ en ppm. Encima de cada pico se muestra el átomo correspondiente a dicha señal.

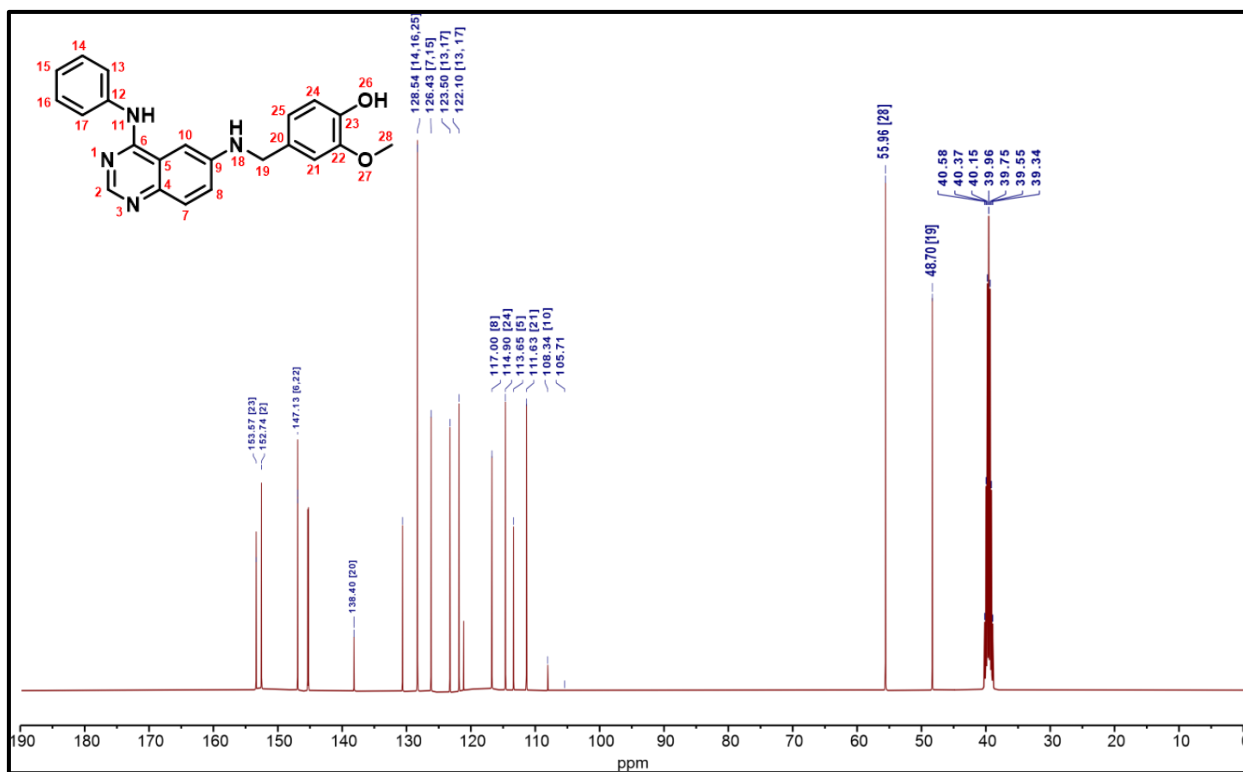
A1.4.3 Caracterización de 2-metoxi-4-(((4-(fenilamino)quinazolin-6-il)amino)metil)fenol (**4a3**)



Espectro 7. Espectrometría de masas APCI de **4a3**. Encima del ion molecular se muestra la masa monoisotópica y su abundancia relativa.

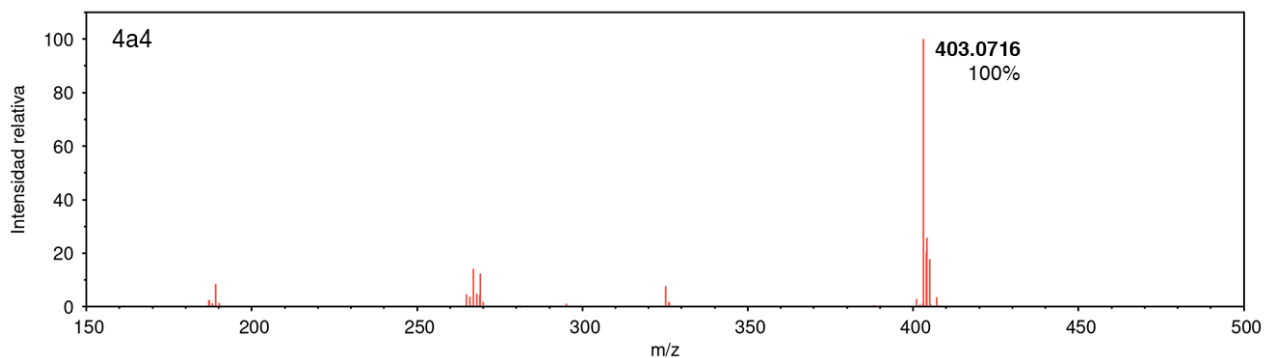


Espectro 8. RMN H^1 de **4a3** en DMSO- d_6 a 300 MHz TMS, δ en ppm. Encima de cada pico se muestra el átomo correspondiente a dicha señal. También, se hace un acercamiento a las señales de los anillos de fenilo.



Espectro 9. RMN C^{13} de **4a3** en DMSO-d_6 a 100 MHz TMS, δ en ppm. Encima de cada pico se muestra el átomo correspondiente a dicha señal.

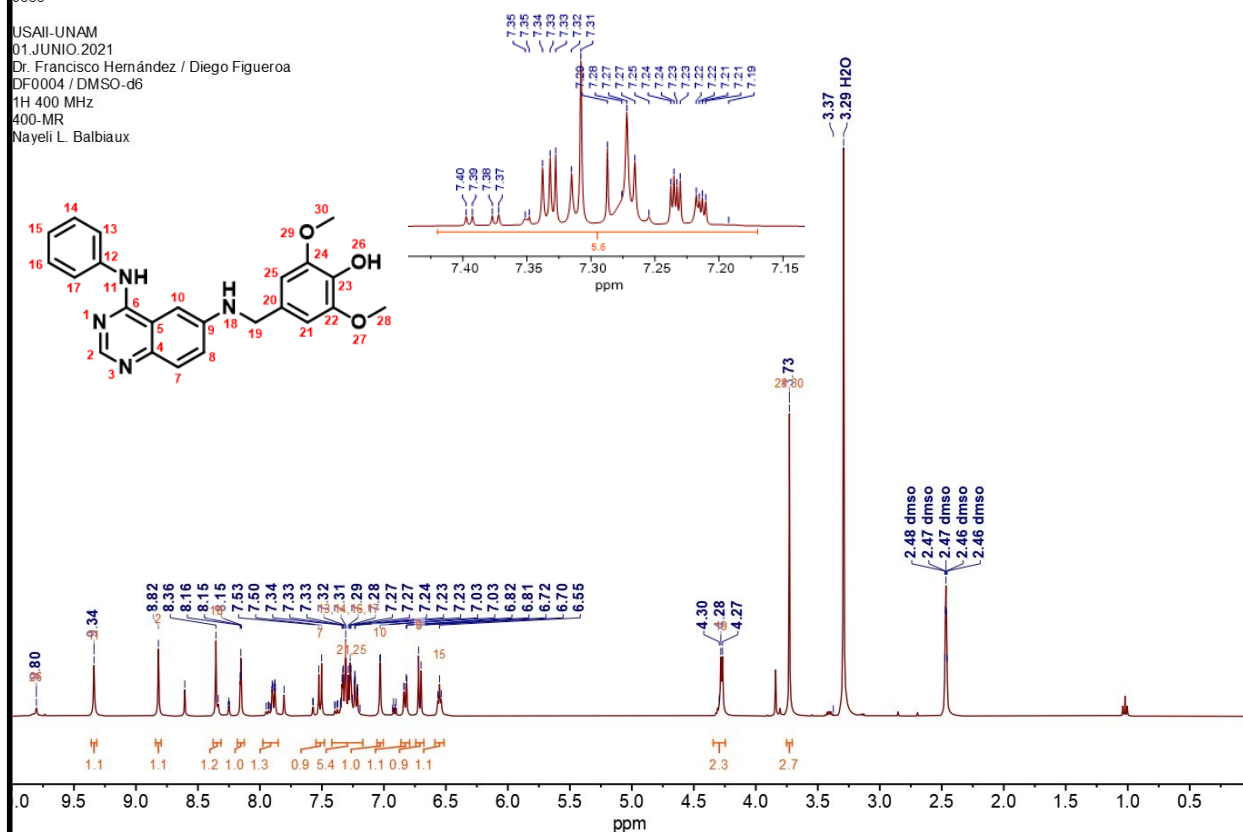
A1.4.4 Caracterización de 2,6-dimetoxi-4-(((4-(fenilamino)quinazolin-6-il)amino)metil)fenol (**4a4**)



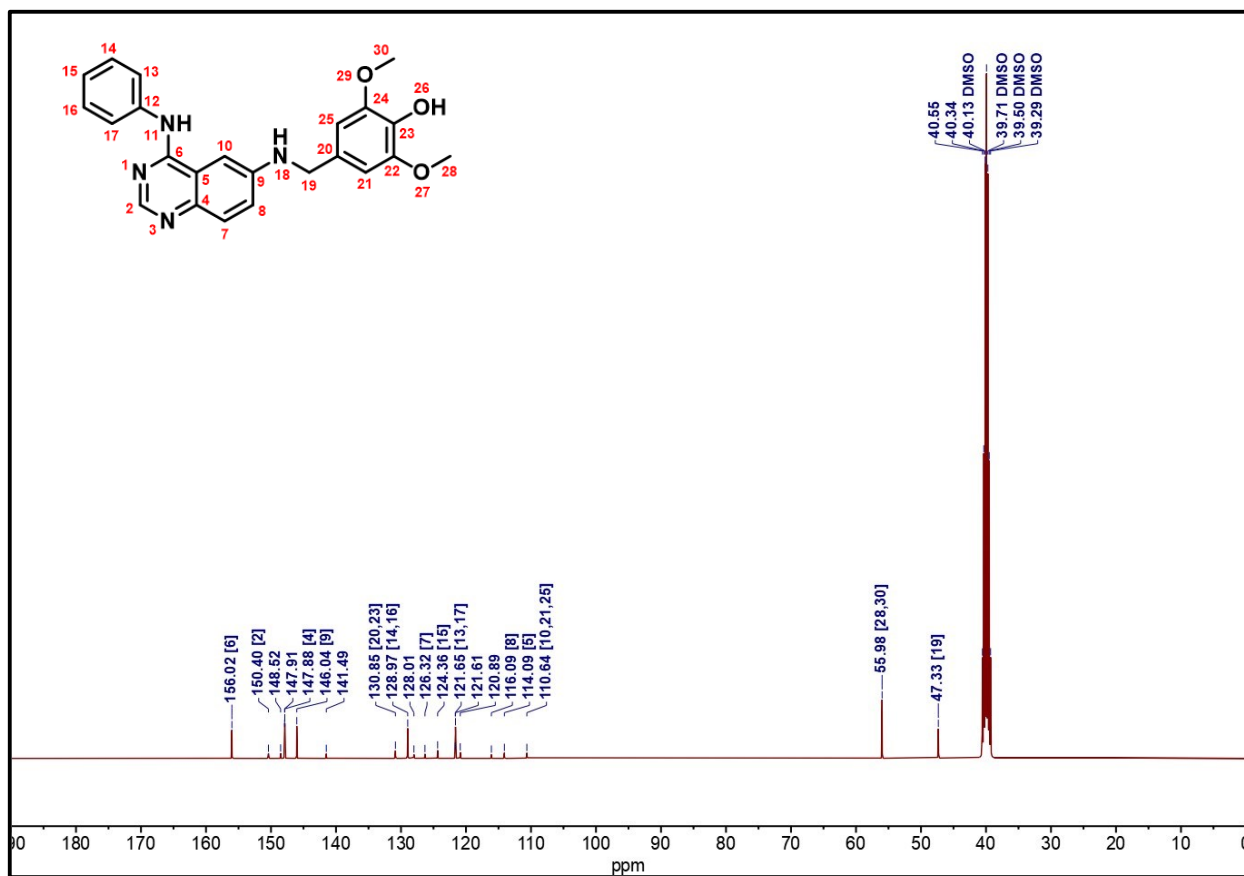
Espectro 10. Espectrometría de masas APCI de **4a4**. Encima del ion molecular se muestra la masa monoisotópica y su abundancia relativa.

0666-1H-2_DF0004
0666

USAI-UNAM
01 JUNIO, 2021
Dr. Francisco Hernández / Diego Figueroa
DF0004 / DMSO-d₆
1H 400 MHz
400-MR
Nayeli L. Balbiaux

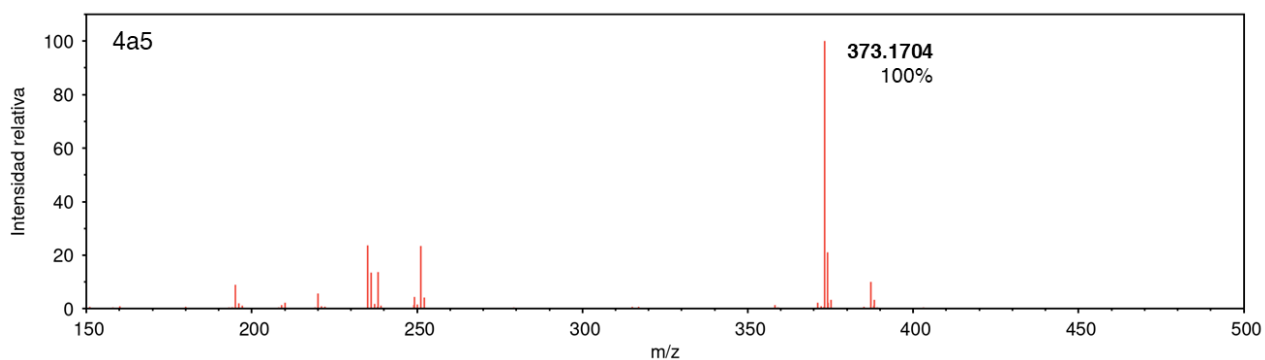


Espectro 11. RMN H¹ de 4a4 en DMSO-d₆ a 300 MHz TMS, δ en ppm. Encima de cada pico se muestra el átomo correspondiente a dicha señal. También, se hace un acercamiento a las señales de los anillos de fenilo.

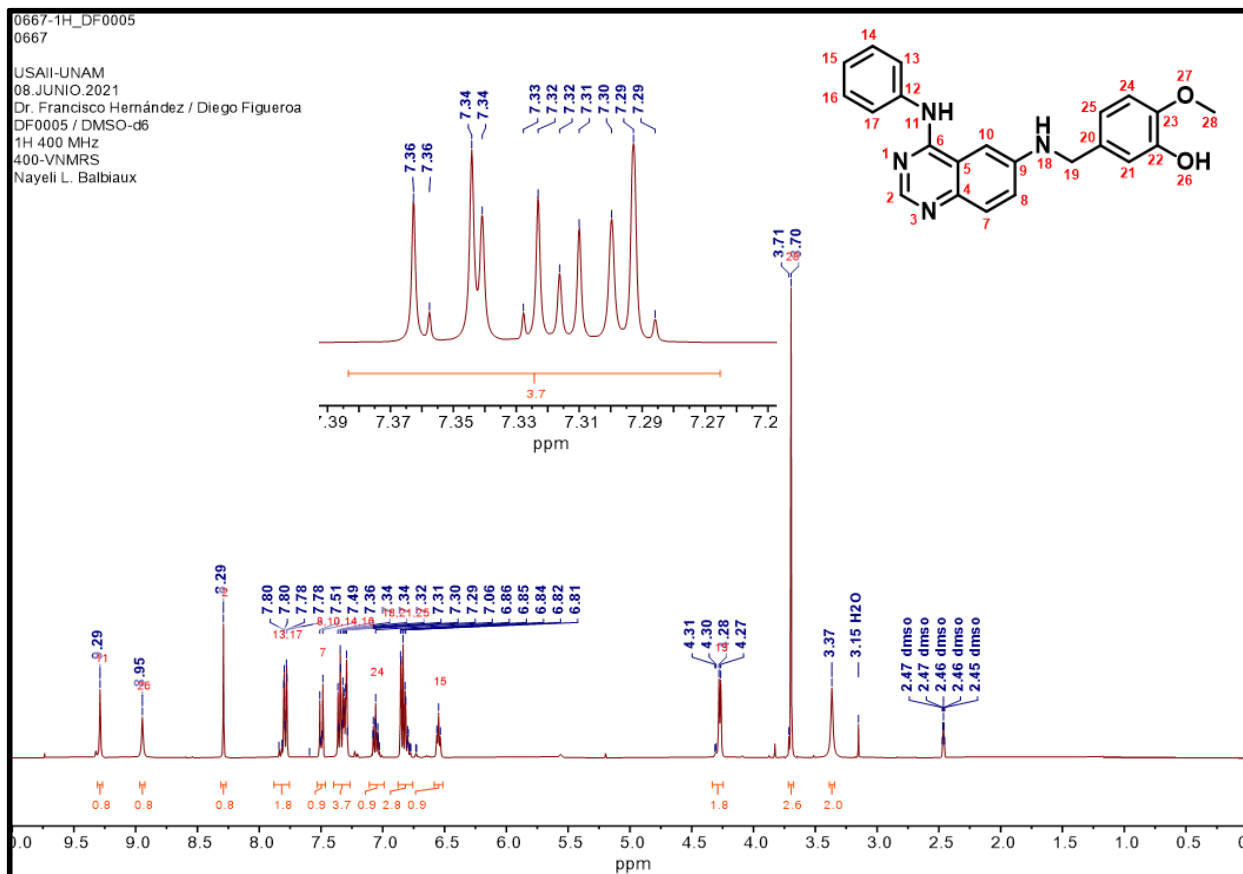


Espectro 12. RMN C^{13} de **4a4** en DMSO- d_6 a 100 MHz TMS, δ en ppm. Encima de cada pico se muestra el átomo correspondiente a dicha señal.

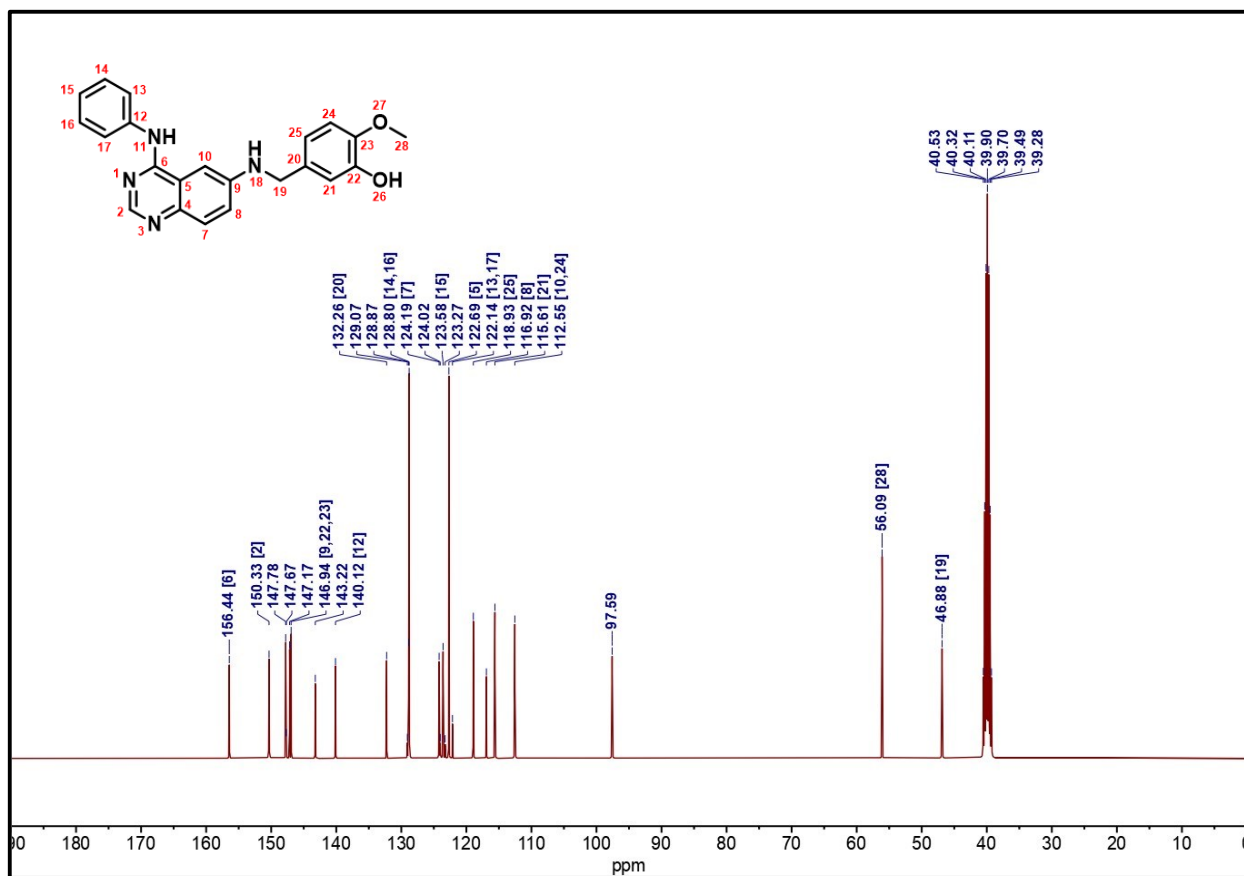
A1.4.5 Caracterización de 2,6-dimetoxi-4-(((4-(fenilamino)quinazolin-6-il)amino)metil)fenol (**4a5**)



Espectro 13. Espectrometría de masas APCI de **4a5**. Encima del ion molecular se muestra la masa monoisotópica y su abundancia relativa.

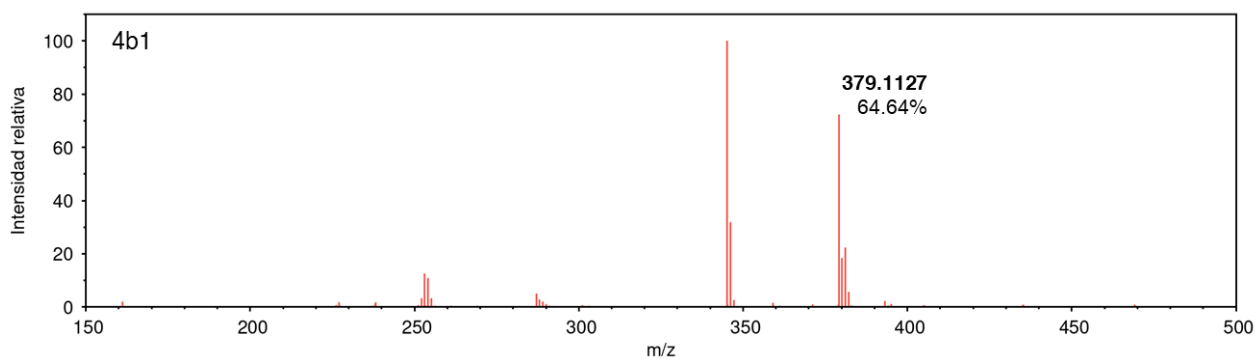


Espectro 14. RMN H^1 de **4a5** en DMSO- d_6 a 300 MHz TMS, δ en ppm. Encima de cada pico se muestra el átomo correspondiente a dicha señal. También, se hace un acercamiento a las señales de los anillos de fenilo.

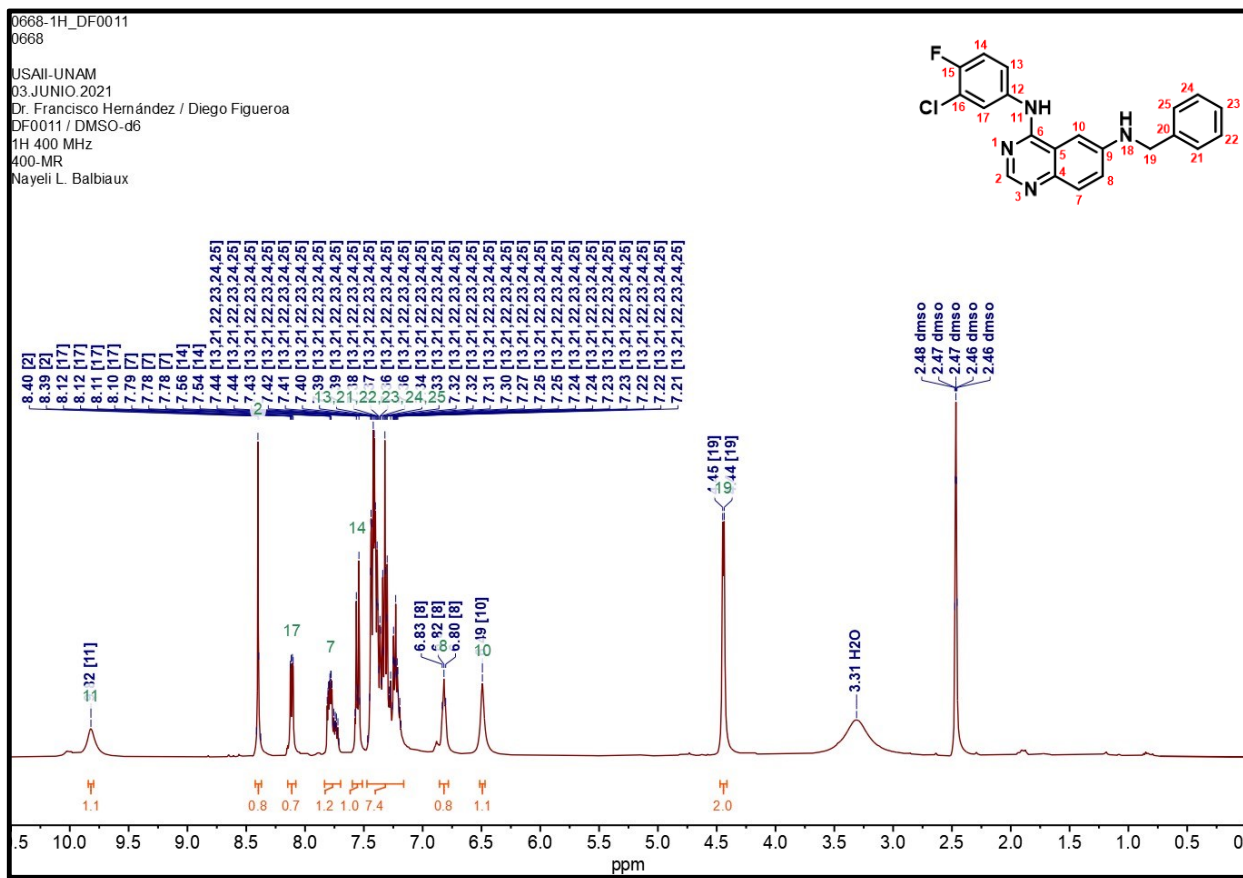


Espectro 15. RMN C^{13} de **4a5** en $DMSO-d_6$ a 100 MHz TMS, δ en ppm. Encima de cada pico se muestra el átomo correspondiente a dicha señal.

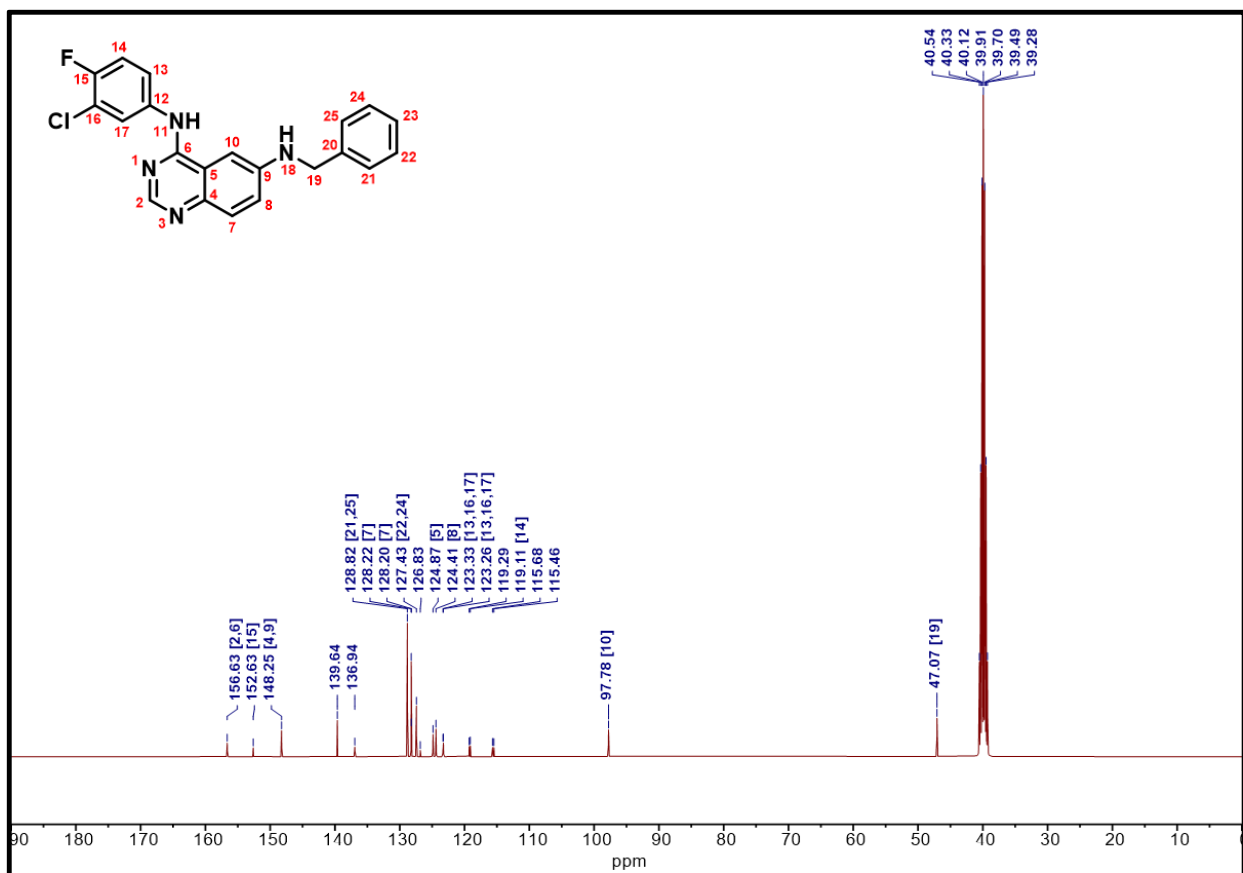
A1.4.6 Caracterización de N^6 -bencil- N^4 -(3-cloro-4-fluorofenil)quinazolin-4,6-diamina (**4b1**)



Espectro 16. Espectrometría de masas APCI de **4b1**. Encima del ion molecular se muestra la masa monoisotópica y su abundancia relativa.

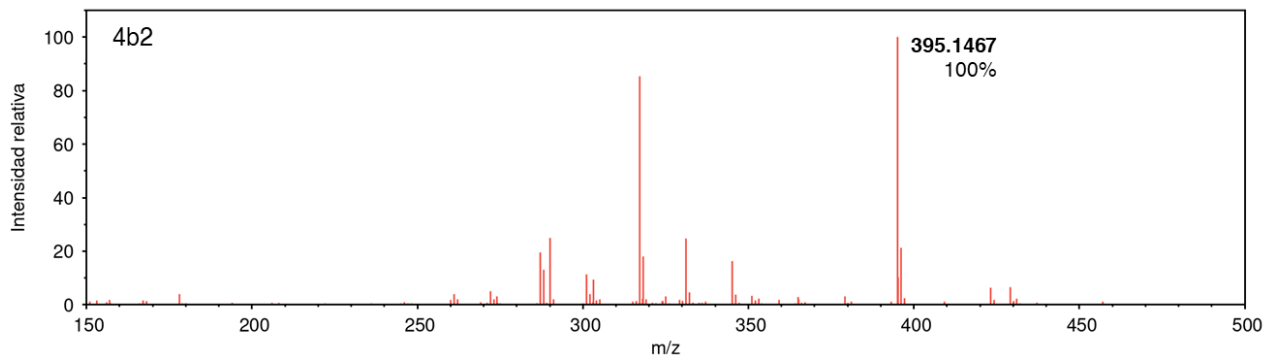


Espectro 17. RMN H^1 de **4b1** en DMSO- d_6 a 300 MHz TMS, δ en ppm. Encima de cada pico se muestra el átomo correspondiente a dicha señal. También, se hace un acercamiento a las señales de los anillos de fenilo.

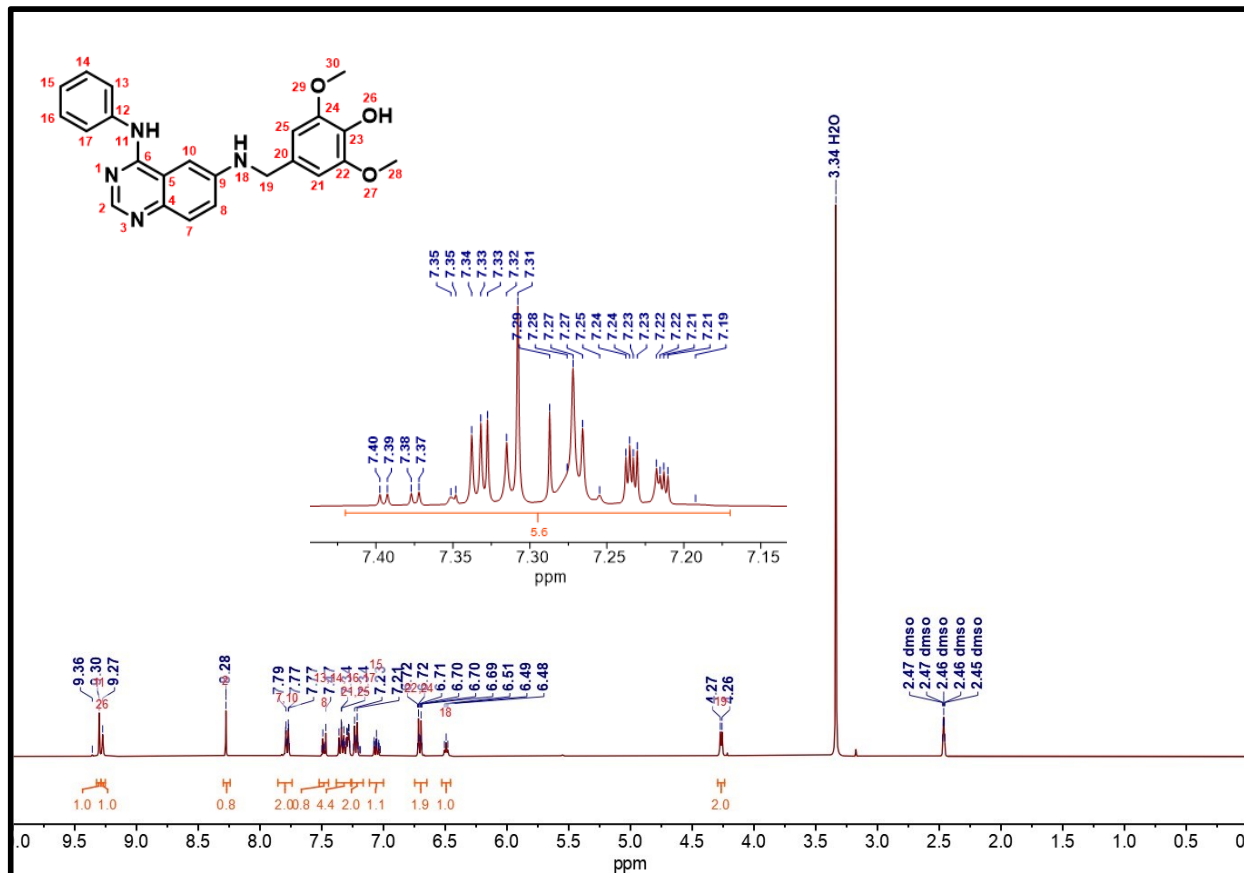


Espectro 18. RMN C^{13} de **4b1** en DMSO-d_6 a 100 MHz TMS, δ en ppm. Encima de cada pico se muestra el átomo correspondiente a dicha señal.

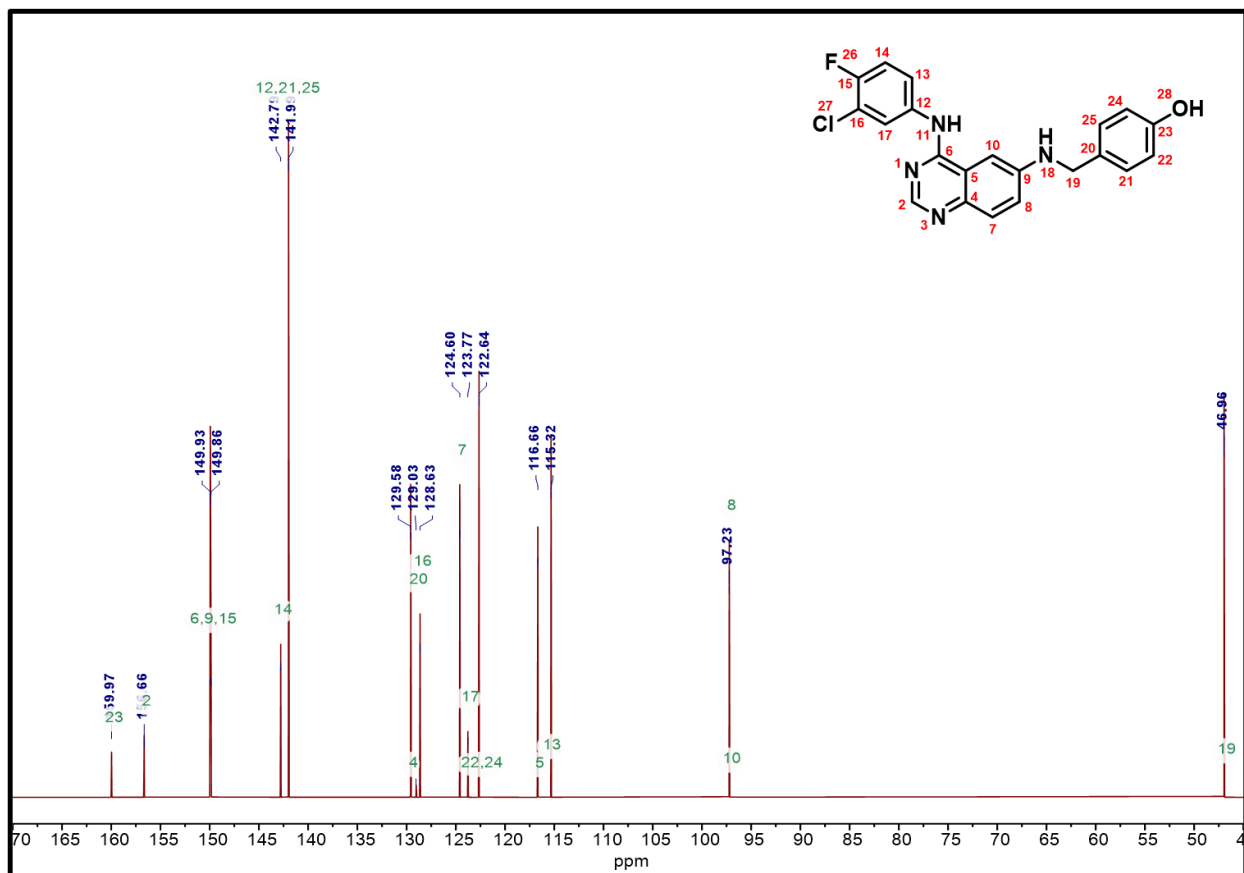
A1.4.7 Caracterización de 4-(((4-((3-cloro-4-fluorfenil)amino)quinazolin-6-il)amino)metil)fenol (**4b2**)



Espectro 19. Espectrometría de masas APCI de **4b2**. Encima del ion molecular se muestra la masa monoisotópica y su abundancia relativa.

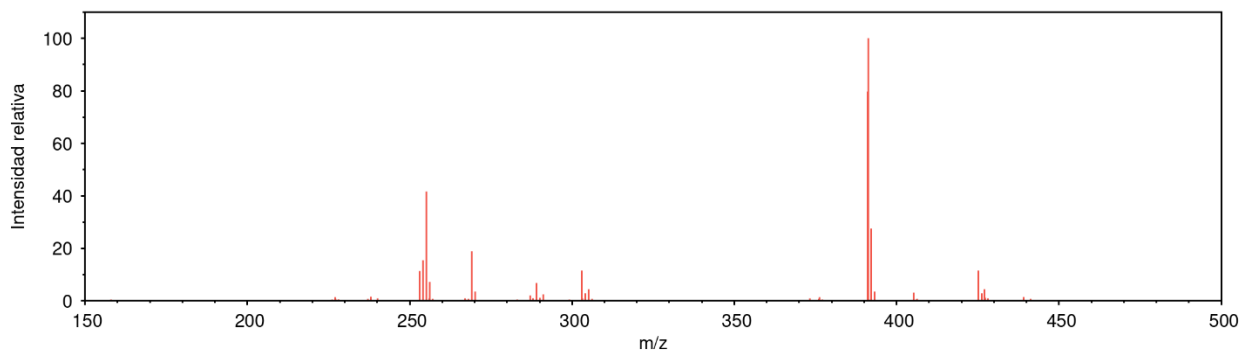


Espectro 20. RMN H^1 de **4b2** en DMSO- d_6 a 300 MHz TMS, δ en ppm. Encima de cada pico se muestra el átomo correspondiente a dicha señal. También, se hace un acercamiento a las señales de los anillos de fenilo.



Espectro 21. RMN C^{13} de **4b2** en DMSO- d_6 a 100 MHz TMS, δ en ppm. Encima de cada pico se muestra el átomo correspondiente a dicha señal.

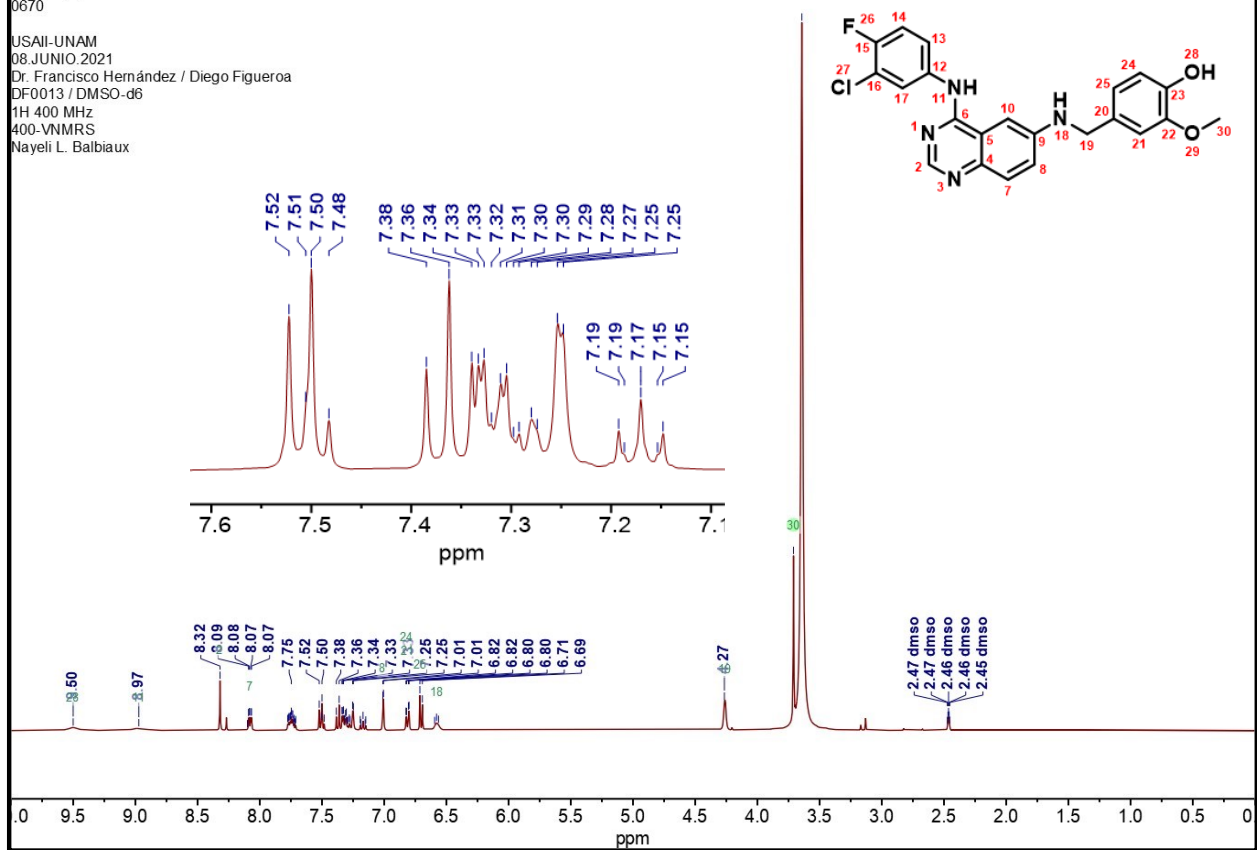
A1.4.8 Caracterización de 4-(((4-((3-cloro-4-fluorofenil)amino)quinazolin-6il)amino)metil)fenol (**4b3**)



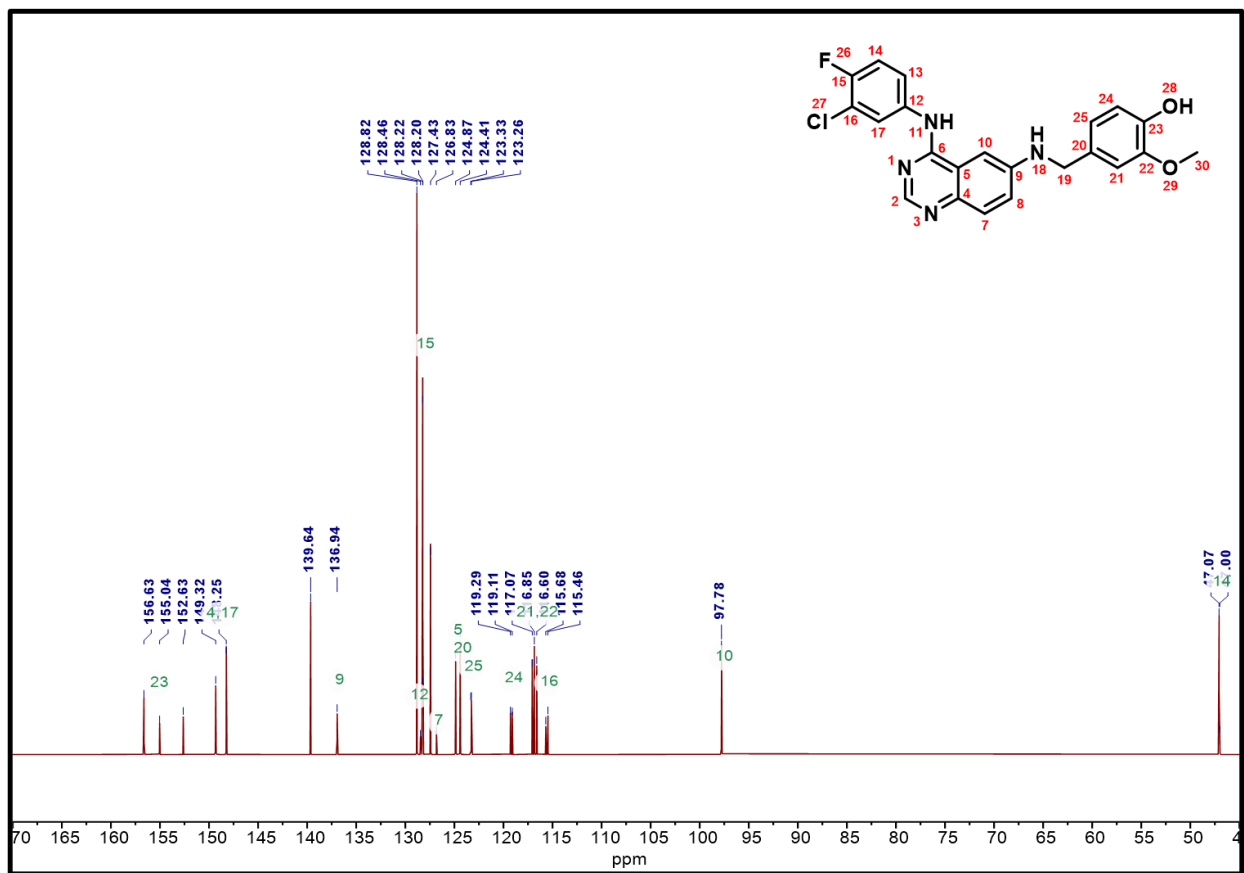
Espectro 22. Espectrometría de masas APCI de **4b3**. Encima del ion molecular se muestra la masa monoisotópica y su abundancia relativa.

0670-1H_DF0013
0670

USAI-UNAM
08 JUNIO, 2021
Dr. Francisco Hernández / Diego Figueroa
DF0013 / DMSO-d6
1H 400 MHz
400-VNMRS
Nayeli L. Balbiaux

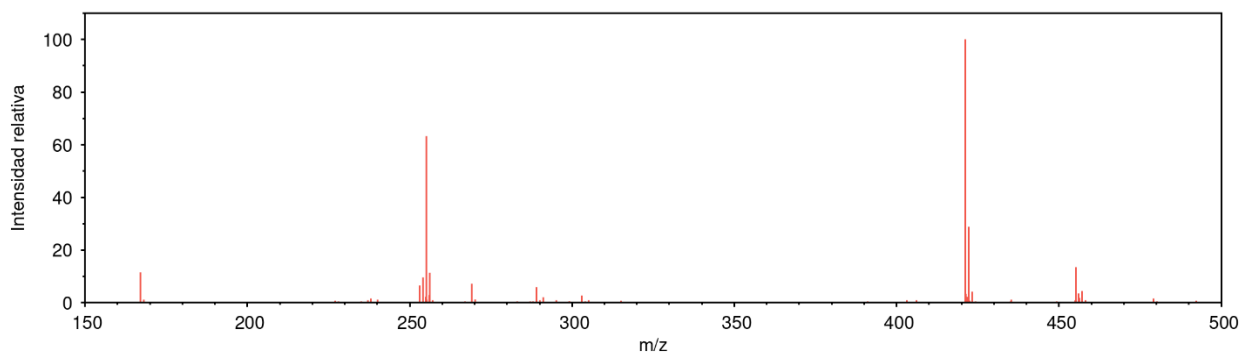


Espectro 23. RMN H^1 de **4b3** en DMSO- d_6 a 300 MHz TMS, δ en ppm. Encima de cada pico se muestra el átomo correspondiente a dicha señal. También, se hace un acercamiento a las señales de los anillos de fenilo.

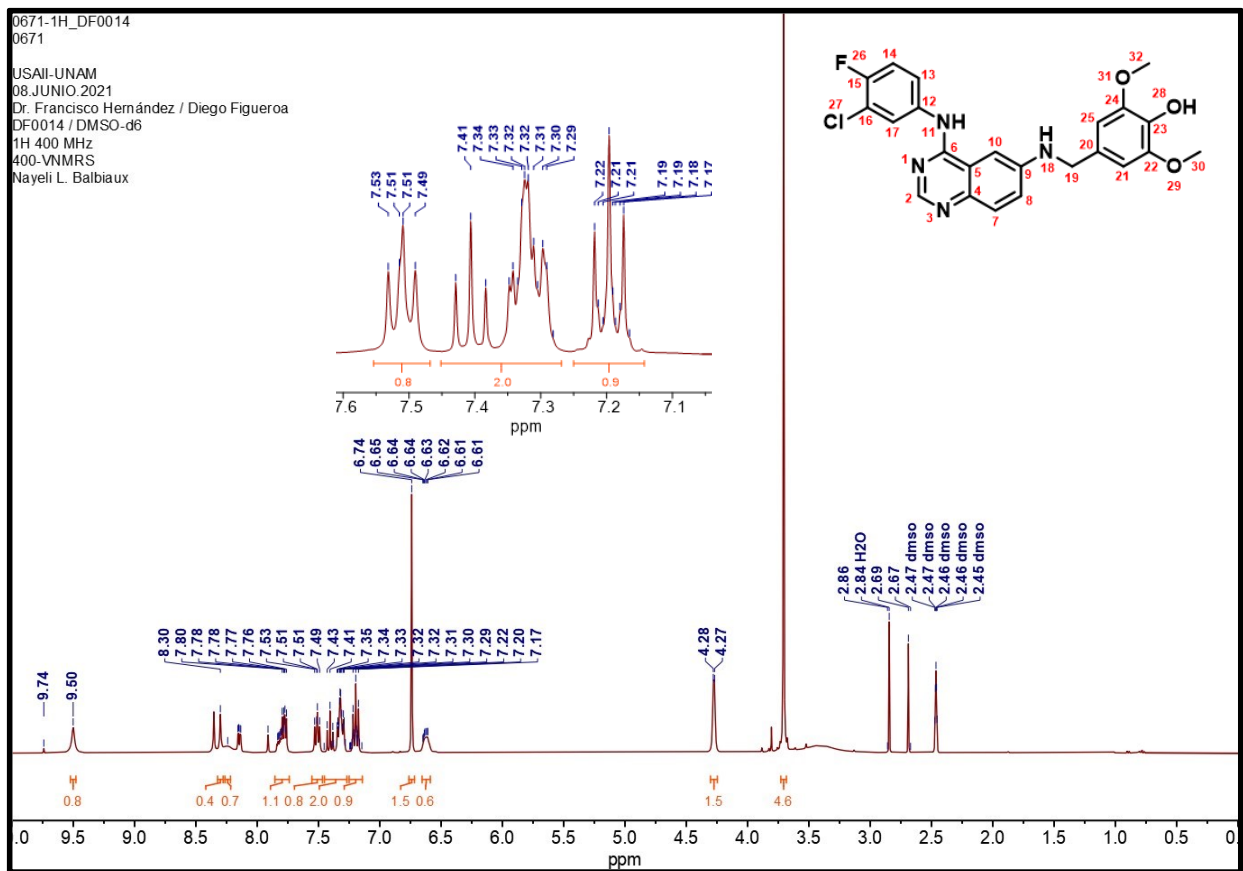


Espectro 24. RMN C^{13} de **4b3** en DMSO-d_6 a 100 MHz TMS, δ en ppm. Encima de cada pico se muestra el átomo correspondiente a dicha señal.

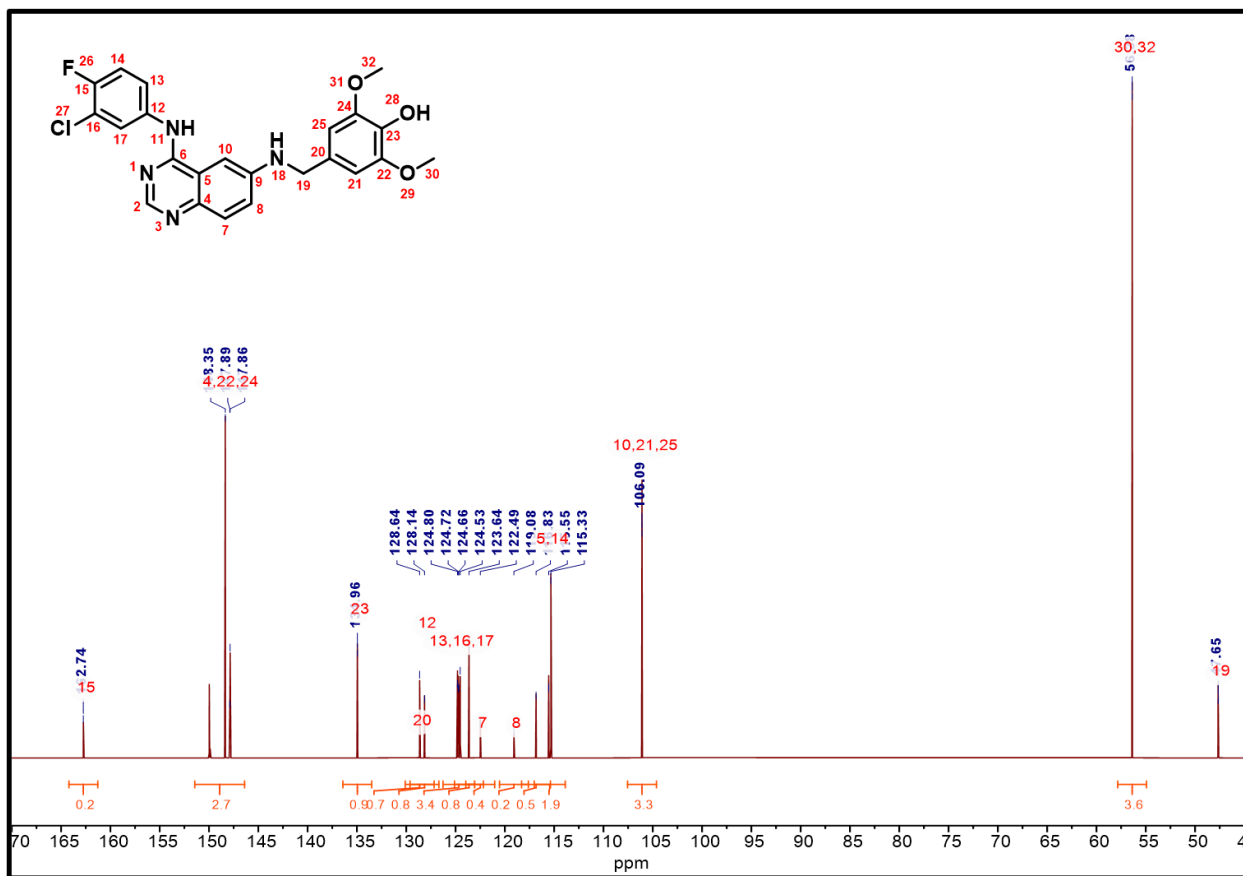
A1.4.9 Caracterización de 4-(((4-((3-cloro-4-fluorofenil)amino)quinazolin-6-il)amino)metil) 2,6-dimetoxifenol (**4b4**)



Espectro 25. Espectrometría de masas APCI de **4b4**. Encima del ion molecular se muestra la masa monoisotópica y su abundancia relativa.

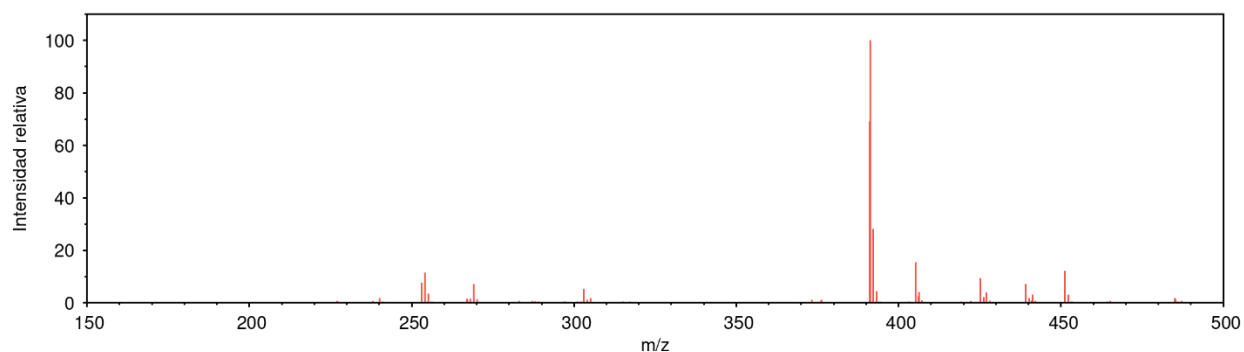


Espectro 26. RMN H^1 de **4b4** en DMSO- d_6 a 300 MHz TMS, δ en ppm. Encima de cada pico se muestra el átomo correspondiente a dicha señal. También, se hace un acercamiento a las señales de los anillos de fenilo.

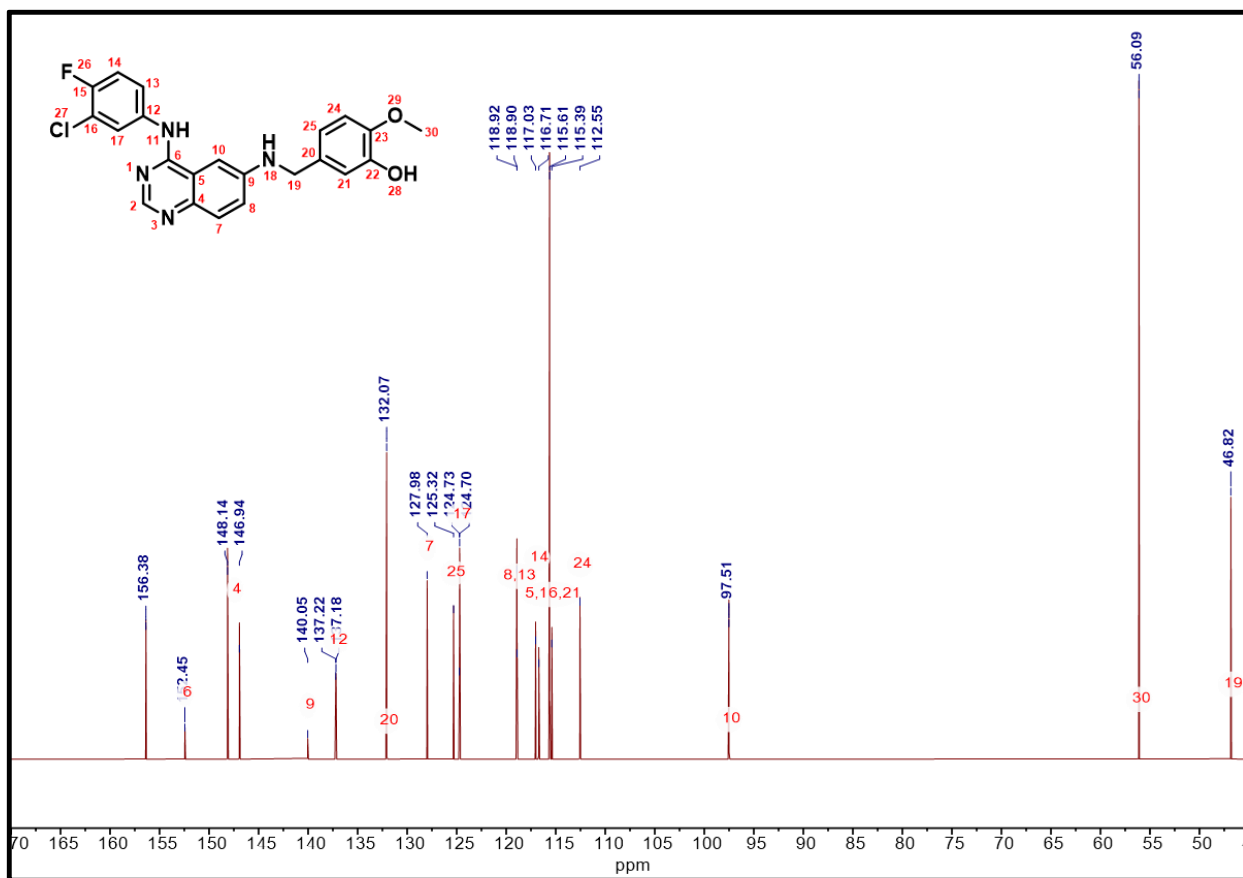


Espectro 27. RMN C^{13} de **4b4** en DMSO- d_6 a 100 MHz TMS, δ en ppm. Encima de cada pico se muestra el átomo correspondiente a dicha señal.

A1.4.10 Caracterización de 5-(((4-((3-cloro-4-fluorofenil)amino)quinazolin-6-il)amino)metil)-2-metoxifenol (**4b5**)

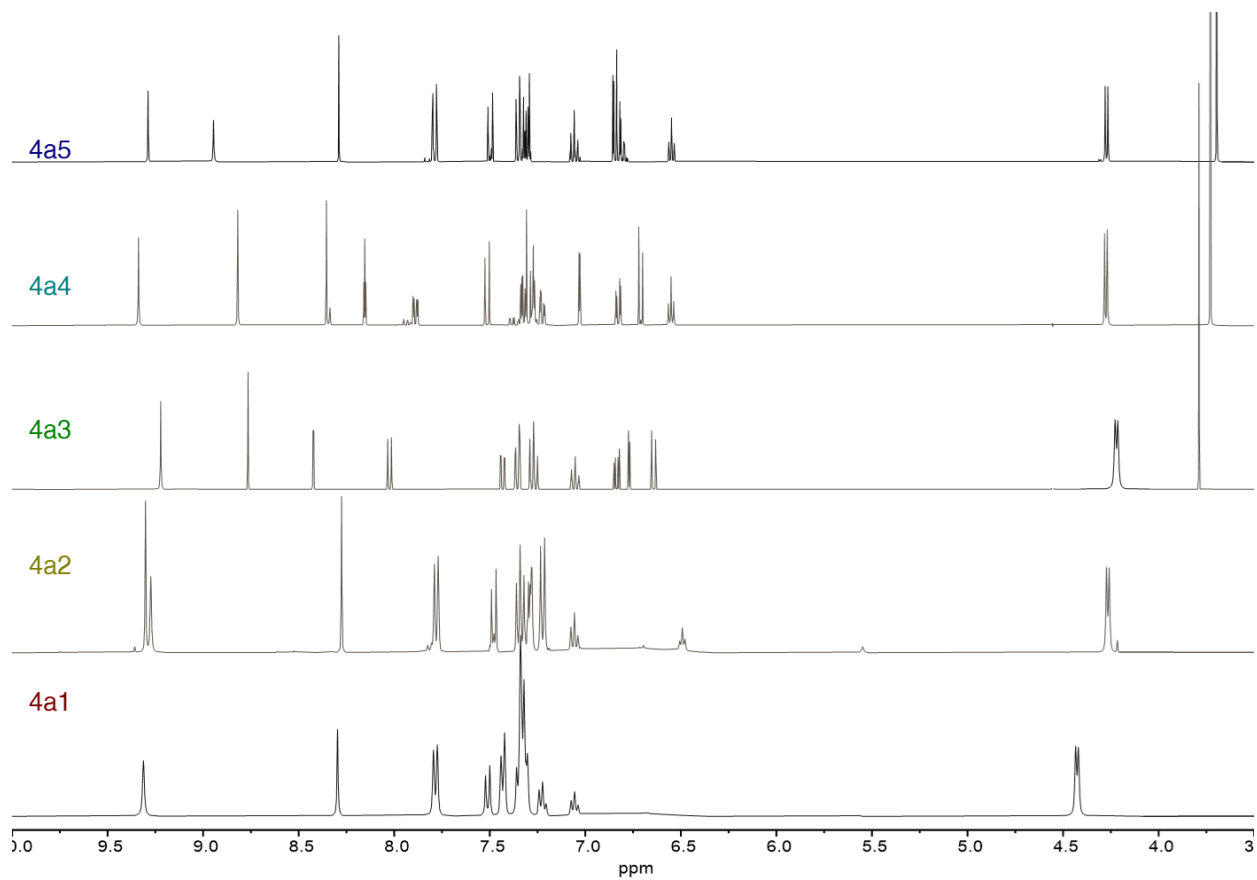


Espectro 28. Espectrometría de masas APCI de **4b5**. Encima del ion molecular se muestra la masa monoisotópica y su abundancia relativa.

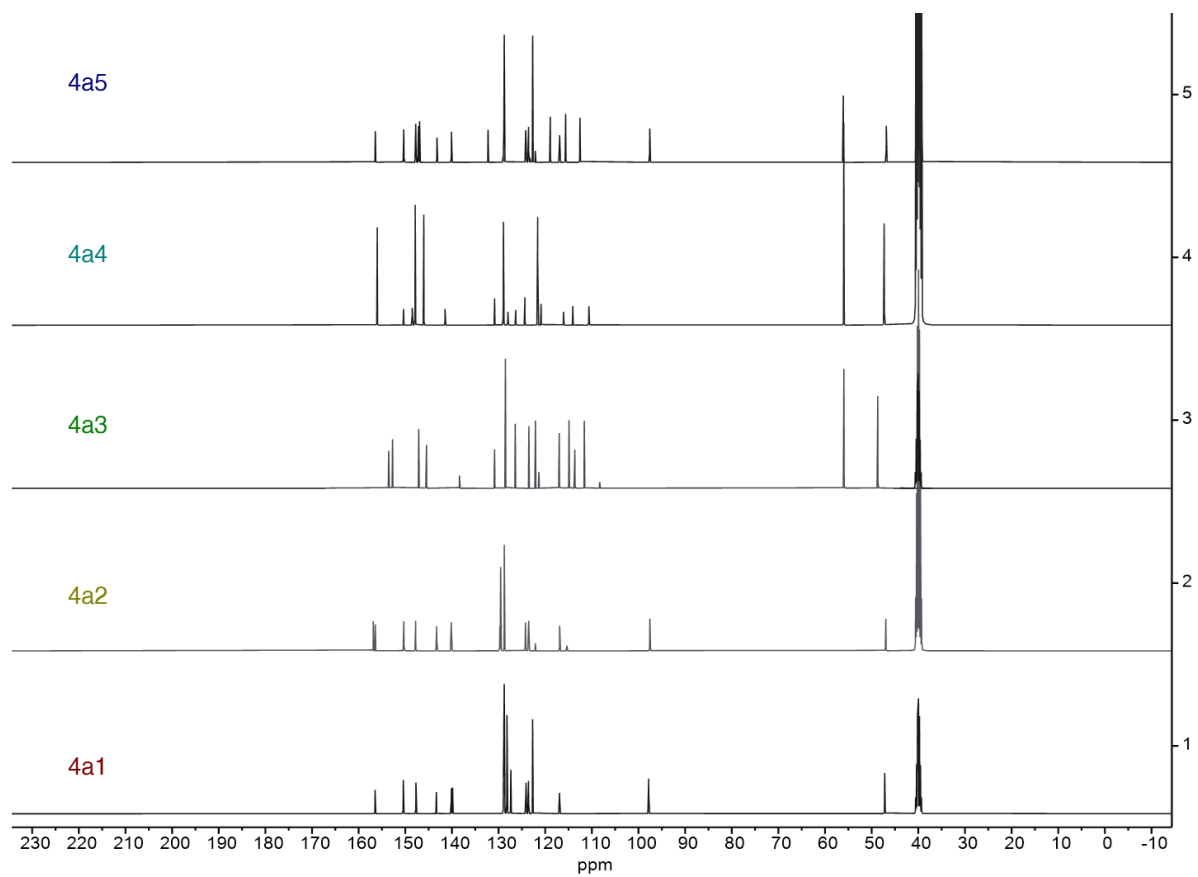


Espectro 30. RMN C^{13} de **4b5** en DMSO-d_6 a 100 MHz TMS, δ en ppm. Encima de cada pico se muestra el átomo correspondiente a dicha señal.

A1.4.11 Espectros apilados de RMN de los compuestos de la serie A



Espectro 31. Espectros RMN H^1 de compuestos de la serie A en DMSO-d_6 a 300 MHz TMS, δ en ppm.



Espectro 32. *Espectros RMN C^{13} de compuestos de la serie A en DMSO-d_6 a 100 MHz TMS, δ en ppm.*

ANEXO 2

Ensayos de inhibición enzimática

A2.1 Instrumentos y Materiales

- El peso de los compuestos se midió con la balanza analítica Sartorius™ CP124 S.
- Para preparar las disoluciones se ocuparon tubos de microcentrifuga de polipropileno con tapa a presión de 1.5 mL y un matraz volumétrico de 100 mL.
- Para tomar las disoluciones se ocuparon micropipetas de 0.5-10 μL , 10-100 μL , 20-200 μL , 100-1000 μL
- La adición de la enzima se llevó a cabo de manera simultánea en diferentes pozos con ayuda de una pipeta multicanal de
- Para la lectura de las propiedades espectrales se ocuparon placas de 96 pozos de policarbonato y el lector de placas Multi-Modal Synergy™ HTX

Reactivos		
Nombre	Marca	Código
Xantina oxidasa bovina 25U (bXO)	Sigma Aldrich	X1875
Xantina	Sigma Aldrich	X7375
Ácido úrico	Sigma Aldrich	U2625
HEPES	Sigma Aldrich	H3375
HEPES sal sódica	Sigma Aldrich	H7006
Anaranjado de xilenol sal tetrasódica	Sigma Aldrich	398187
Cloruro ferroso amoniacal hexahidratado	Sigma Aldrich	215406
Ácido sulfúrico concentrado	Sigma Aldrich	-

A2.2 Preparación de disoluciones

A3.2.1. Preparación del amortiguador HEPES Ácido N-(2-Hidroxietil)piperazin-N'-(2-etanosulónico) 150 mM, pH 7.5

En una nave para pesar, se colocaron 1.6312 g de HEPES ácido. La nave se lavó con aproximadamente 20 mL de agua destilada y el contenido se vertió en un vaso de precipitados de 100 mL. Posteriormente, el proceso se repitió colocando 2.1420 g de la sal sódica de HEPES. A la disolución resultante se le midió el pH resultando en 7.53, no se requirió ajuste. Esta misma disolución fue vertida en un matraz volumétrico de 100 mL y se ajustó a la marca de volumen con agua destilada.

A3.2.2. Preparación de la disolución madre de bXO

En un tubo para microcentrífuga se colocaron 996 μL de disolución amortiguadora. A continuación, se agregaron 3.68 μL de bXO obtenida comercialmente. La disolución resultante contenía 40 mU/mL de bXO. (Solución A)

A3.2.3. Preparación de disoluciones de xantina

En un tubo para microcentrífuga se pesaron 0.00152 g (100 μmol) de xantina. Posteriormente, se colocó 1000 μL de NaOH 1 M previamente preparada, esta disolución contenía 100 mM de xantina en 1 mL (Solución A). Después, se tomaron 990 μL de solución amortiguadora y se colocaron en otro tubo para microcentrífuga; el tubo se llevó a 1000 μL agregando 10 μL de la Solución A de xantina. La solución resultante contenía 1 mM de xantina y 10 mM de NaOH en 1 mL (Solución B).

A3.2.4. Preparación de disoluciones de alopurinol

En un tubo para microcentrífuga se pesaron 0.00136 g (100 μmol) de alopurinol. Posteriormente, se colocó 1000 μL de DMSO, esta disolución contenía 100 mM de alopurinol en 1 mL (Solución A). Después, se tomaron 990 μL de solución amortiguadora y se colocaron en otro tubo para microcentrífuga; el tubo se llevó a 1000 μL agregando 10 μL de la Solución A de alopurinol. La solución resultante contenía 1 mM de alopurinol y 141 mM de DMSO en 1 mL (Solución B). En este punto la concentración de DMSO era aproximadamente de 1.1%.

A3.2.5. Preparación de disoluciones de los compuestos

En un tubo para microcentrífuga se pesó lo equivalente a (5 μmol) de los diez compuestos diseñados. Posteriormente, se colocó 1000 μL de DMSO, esta disolución contenía 5 mM de compuestos en 1 mL (Solución A). Después, se tomaron 990 μL de solución amortiguadora y se colocaron en otro tubo para microcentrífuga; el tubo se llevó a 1000 μL agregando 10 μL de la Solución A de compuestos. La solución resultante contenía 50 μM de compuestos y 141 mM de DMSO en 1 mL (Solución B). En este punto la concentración de DMSO era aproximadamente de 1.1%.

A2.3 Caracterización espectrofotométrica de ácido úrico, xantina y alopurinol

Se llevó a cabo un barrido a distintas longitudes de onda para encontrar aquella en donde los compuestos involucrados en el estudio tuvieran la mayor absorción de luz. Para ello, se diluyeron los compuestos en un volumen de 200 μL en una placa de 96 pozos para tener una concentración final de ácido úrico, xantina y alopurinol de 75 μM . El barrido se muestra en la Figura A2.3.

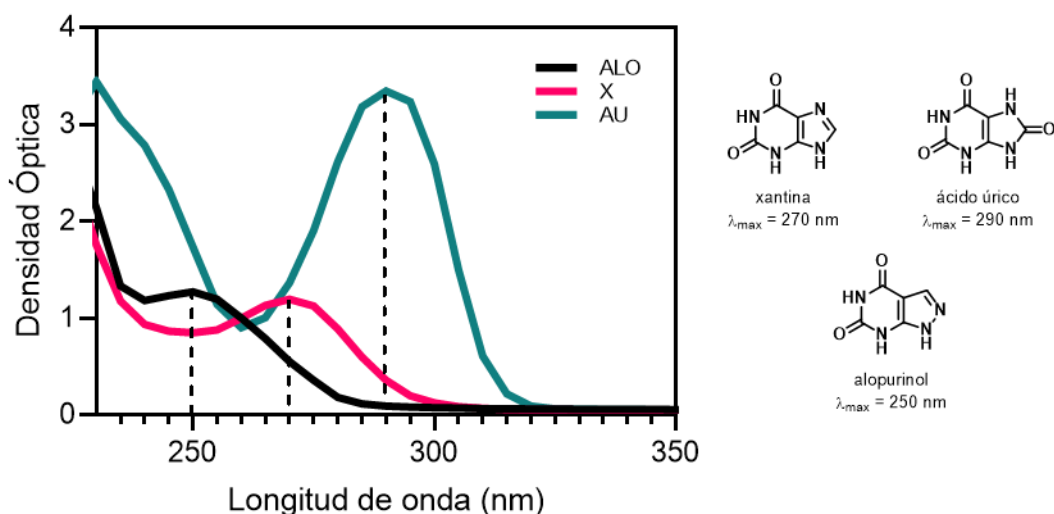


Figura A2.1. Caracterización espectrofotométrica de ácido úrico, xantina y alopurinol

A2.4 Caracterización de actividad de bXOR

Previo a los ensayos con los compuestos evaluados se llevó a cabo la caracterización de la actividad de bXOR, esto con el fin de verificar que la enzima tuviera la actividad adecuada para llevar a cabo los estudios requeridos.

La caracterización consistió en 2 experimentos:

- En el primero se ve el progreso de la reacción con el aumento de ácido úrico a 290 nm y la disminución de xantina a 270 nm (Figura A2.2)

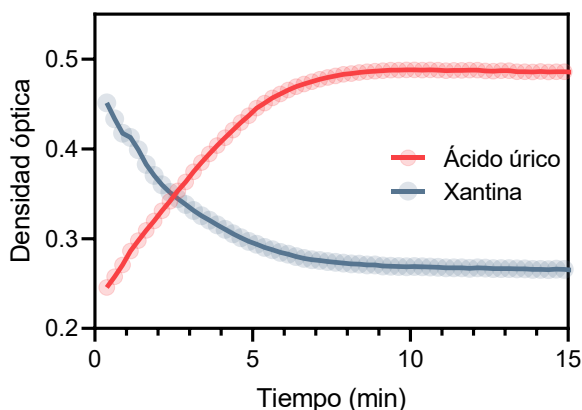


Figura A2.2. Progreso de la reacción. Se muestra el aumento de ácido úrico a 290 nm y la disminución de xantina a 270 nm

- En el segundo experimento se trata de un ensayo colorimétrico con el reactivo de FOX (ferrous-oxidation xylenol orange). (Figura A2.3) El ensayo tiene como base la formación de peróxido de hidrógeno como subproducto de la oxidación de xantina a ácido úrico. Los electrones procedentes de la hidroxilación oxidativa de xantina llegan a un aceptor final que es el oxígeno (O_2) formando así, peróxido de hidrógeno y el radical anión superóxido. Estos dos últimos reaccionan con el hierro (II) del complejo formado con el anaranjado de xilenol en un pH ácido. La solución inicial es de color amarillo mientras que la formación de una disolución color azul indica la formación de peróxido de hidrógeno.

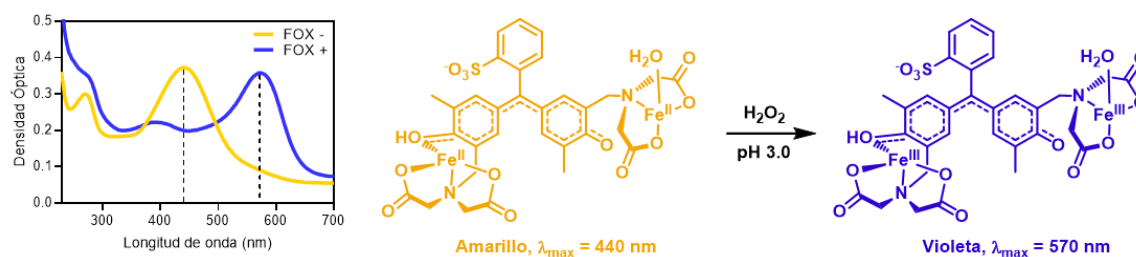


Figura A2.3. Ensayo colorimétrico con el reactivo de FOX (ferrous-oxidation xylenol orange). A la izquierda se muestra el espectrograma de ambas especies (oxidada, reducida). A la derecha se muestra un esquema con la reacción involucrada.

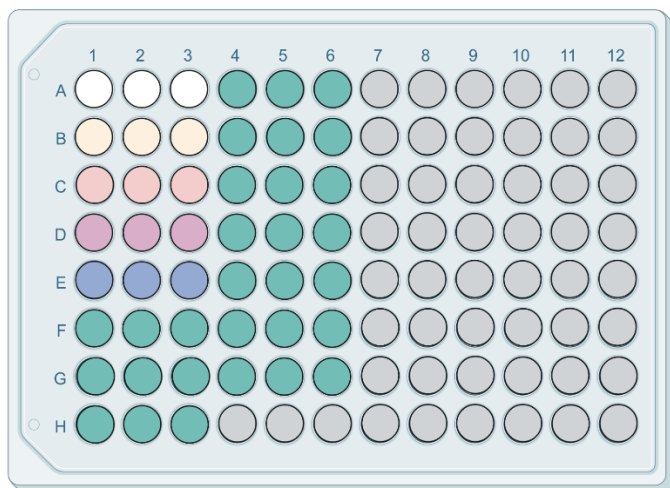
Los resultados de la caracterización mostraron que la actividad de la enzima estaba tal como mencionaba el proveedor, por lo que se procedió con los ensayos siguientes.

A2.5 Porcentaje de inhibición de actividad de bXO

Para el estudio de inhibición enzimática de bXO se tomaron los volúmenes de la disolución A de xantina y de las soluciones B para el resto de los reactivos marcados en la Figura A2.4 y el orden de adición mostrado ahí mismo. La configuración de la placa de pozos para este estudio se muestra en la Figura A2.5. El control de actividad negativo consistió en dos experimentos diferentes; en el primero, únicamente se colocó solución amortiguadora con bXO, el segundo experimento también contenía el volumen indicado de amortiguador, pero se colocó solución de xantina en vez de la enzima. Los resultados con ambos controles no fueron diferentes, por lo que, para evitar gasto de materiales en experimentos posteriores, únicamente se consideró como control negativo la solución que contiene amortiguador y xantina.

Pozo	Ensayo	Orden de adición						TOTAL
		1°	2°	3°	4°	5°	6°	
		PBS	Xantina	Compuestos	Alopurinol	DMSO	Xantina oxidasa	
A	Blanco	200	-	-	-	-	-	200
B	Ctrl -	200	-	-	-	-	50	200
C	Ctrl -	185	15	-	-	-	-	200
D	Ctrl act+	185	15	-	-	-	50	200
E	Ctrl act+ DMSO	165	15	-	-	20	50	200
F	Ctrl Alopurinol	183	15	-	2	-	50	200
G	Compuestos	165	15	20	-	-	50	200
H		-	-	-	-	-	-	

Figura A2.4. Volúmenes y ordenes de adición de los reactivos empleados para el estudio de inhibición de bXO. Todos los volúmenes están marcados en uL y corresponden a la solución B de todos los reactivos excepto para xantina.



Características del experimento

- 1 Todos los ensayos se realizaron por **triplicado**
- 2 Los pozos se llevaron a un volumen final de **200 µL**
- 3 El **blanco** es una solución que contiene **HEPES 150 mM, pH 7.5**
- 4 La placa se leyó en un equipo Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate Reader

Leyenda de color

- Blanco
- Ctrl act+ DMSO
- Ctrl alopurinol
- Pozos sin ocupar
- Ctrl act+
- Ctrl act-
- Compuestos

Figura A2.5. Configuración de la placa de pozos para el estudio de % de actividad de bXO.

A2.6 Estudios de cinética enzimática de bXO en presencia de los compuestos obtenidos

Para el estudio de cinética enzimática de bXO se tomaron los volúmenes de la disolución A de xantina y de las soluciones B para el resto de los reactivos marcados en la Figura A2.4 y el orden de adición mostrado ahí mismo. La configuración de la placa de pozos para este estudio se muestra en la Figura A2.6.

Configuración de la placa de 96 pozos para el estudio de cinética enzimática:

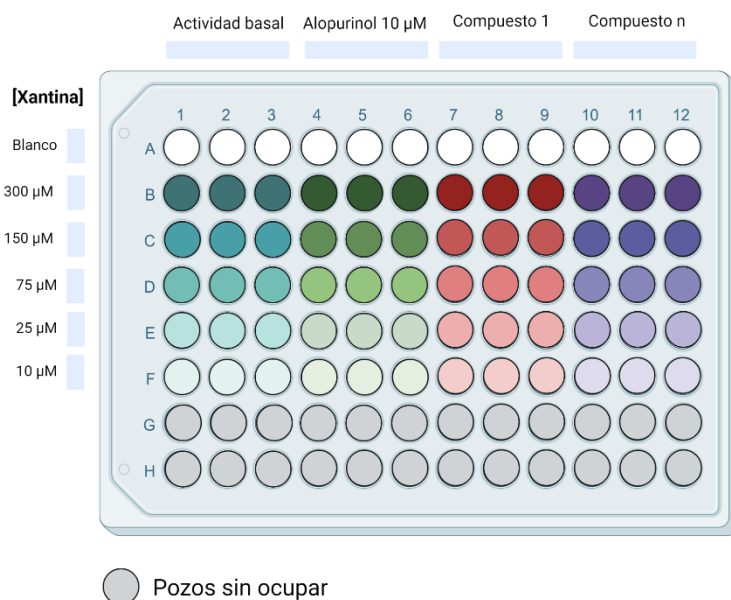


Figura A2.6. Configuración de la placa de posos para el estudio de cinética enzimática de bXO.

Para este estudio, todos los ensayos se realizaron por triplicado como se muestra en la Figura A2.6. Los volúmenes finales en cada pozo fueron de 200 µL. Como blanco se ocupó una solución de HEPES 150 mM pH 7.5, el cual fue ocupado para restar la absorbancia intrínseca del sistema utilizado. La placa de pozos fue leída con el equipo Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate reader. La adición de la enzima se realizó de manera simultánea en cada columna con ayuda de una micropipeta multicanal.

Para realizar el cálculo de la velocidad máxima (V_{max}) y la constante de Michaelis (K_m) se realizó una curva patrón a partir de la cual, con los datos de absorbancia obtenidos en el lector de placas, se obtuvieron los valores de concentración de ácido úrico, interpolando en la curva patrón. Para ello, se empleó la Ley de Lambert-Beer la cual, correlaciona la absorbancia con la concentración de determinados solutos.

En la Figura A2.7 se muestran las gráficas obtenidas a partir de la curva patrón y en la Figura A2.8 se muestran las gráficas obtenidas a partir de la lectura de la placa de 96 pozos con el progreso de reacción de bXO durante 20 minutos.

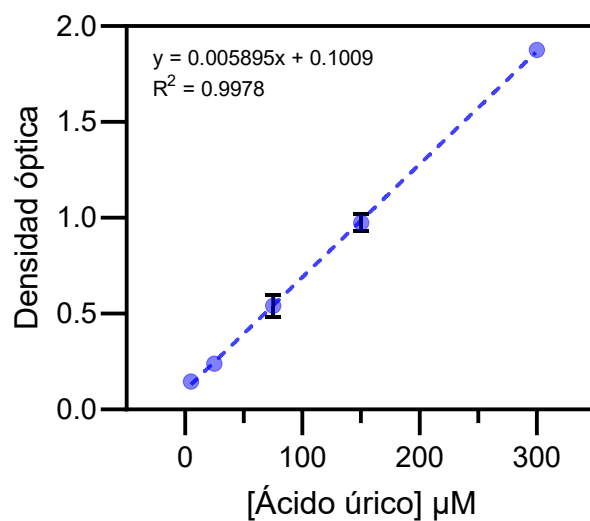


Figura A2.7. Curva patrón de ácido úrico obtenida con una lectura a 290 nm de longitud de onda.

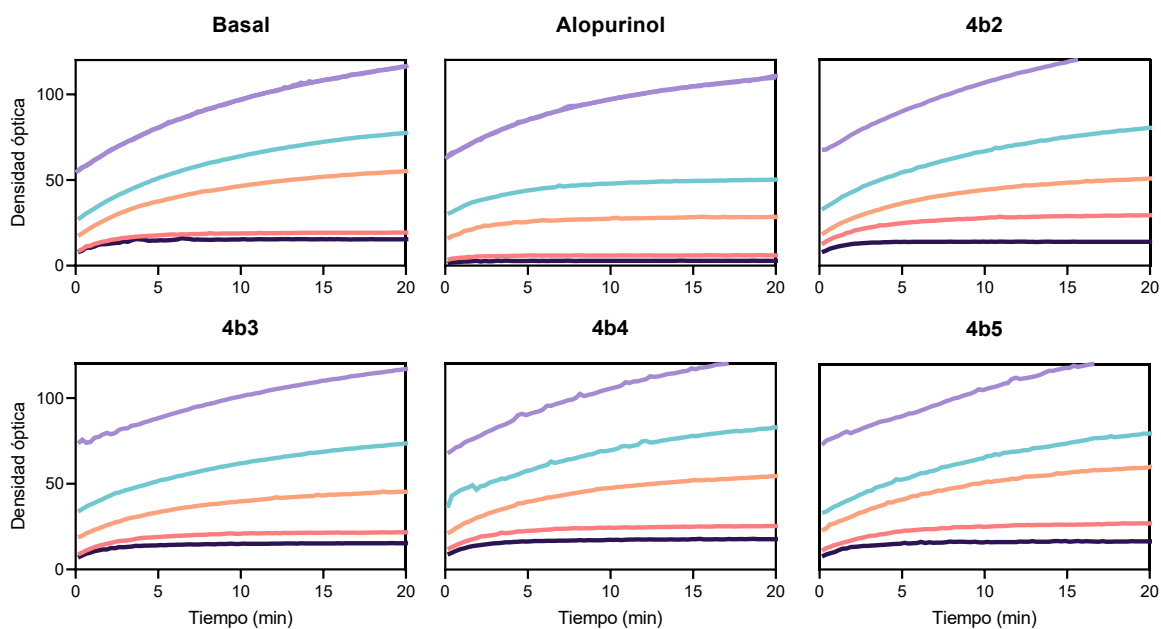


Figura A2.8. Progreso de la reacción de xantina, produciendo ácido úrico y leyendo a 290 nm durante 20 minutos. Se observa la gráfica basal, es decir, únicamente con el sistema xantina-xantina oxidasa, con allopurinol y con las cuatro moléculas ocupadas para este estudio.

Tabla A2.1. Constantes de Michaelis-Menten y Velocidades máximas de las moléculas estudiadas mediante cinética enzimática.

	Vmax	Km
Basal	18.87±3.27	18.87±3.27
Alopurinol	6.31±0.74	78.19±24.94
4b2	5.7±0.21	12.54±2.48
4b3	4.75±0.26	9.42±2.75
4b4	5.29±0.23	9.75±2.24
4b5	4.89±0.33	6.66±2.87

ANEXO 3

Validación de acoplamiento molecular

A3.1 Validación de acoplamiento molecular en el sistema xantina oxidasa

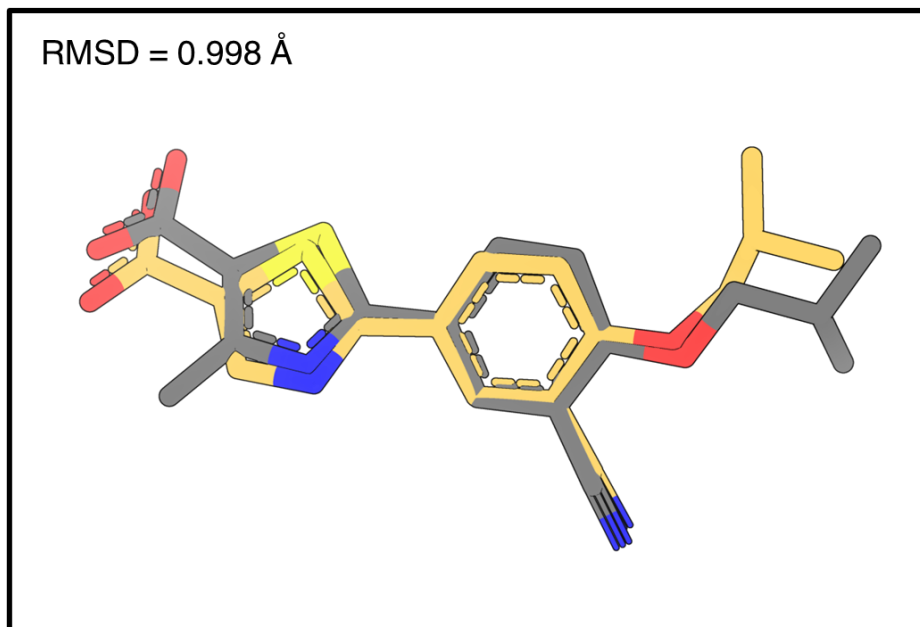


Figura A3.1. Superposición de febusostat (amarillo) y un análogo (TEI-6720, gris). Se indica el RMSD de la superposición obtenido con el servidor DockRMSD

La validación del acoplamiento molecular consistió en la capacidad de Autodock Vina 1.2.0 en poder reproducir de manera correcta la posición de moléculas cocrystalizadas con las proteínas estudiadas.

La primera validación consistió en el acoplamiento molecular de febusostat en el sitio de unión de bXO (Figura A3.1). En el sitio de unión del cristal con código de PDB: 3UNA se encuentra una molécula de ácido salicílico, Sin embargo, su acoplamiento fue muy variable y no reprodujo la posición original en ninguna de las conformaciones calculadas. Para evitar eso, se llevó a cabo una superposición del cristal con PDB ID: 1N5X, que tiene como inhibidor al febusostat, con la estructura 3UNA; de tal manera que febusostat quedó en el sitio de unión del cristal 3UNA. El RMSD de los compuestos, calculado con el servidor DockRMSD arrojó un valor de 0.998 Å indicando un alto parecido en la posición de ambas moléculas.

A3.2

Validación de acoplamiento molecular en el sistema EGFR

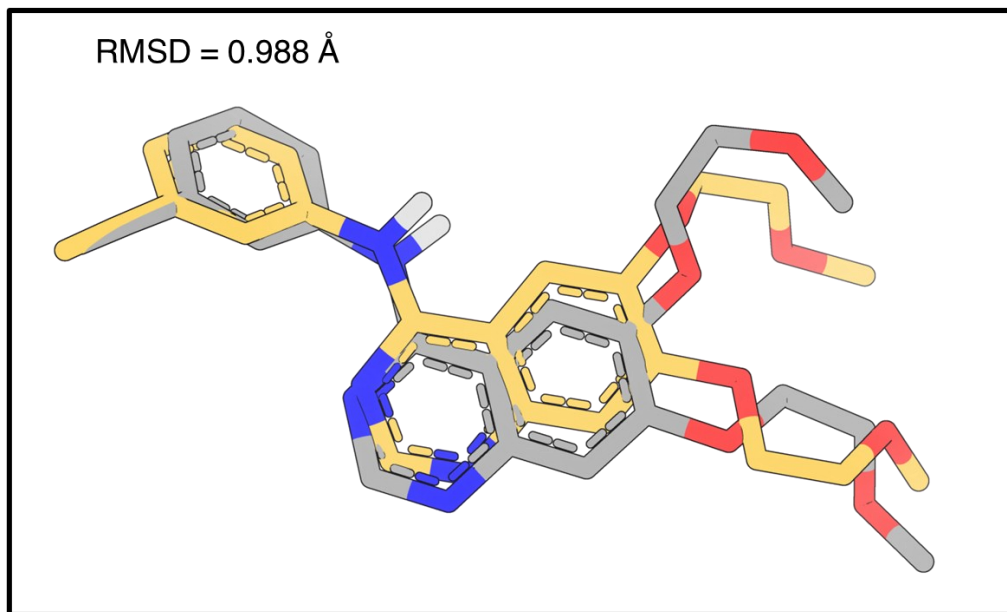


Figura A3.1. Superposición de erlotinib-acoplado (amarillo) y erlotinib-cocristalizado (gris). Se indica el RMSD de la superposición obtenido con el servidor DockRMSD

La segunda validación consistió en el acoplamiento molecular de erlotinib en el sitio de unión de hEGFR (Figura A3.2). En el sitio de unión se encuentra cocristalizado erlotinib (PDB ID: 1M17). El RMSD de los compuestos, calculado con el servidor DockRMSD arrojó un valor de 0.988 Å indicando un alto parecido en la posición de ambas moléculas.

Special
Collection

In Silico Characterization of Masitinib Interaction with SARS-CoV-2 Main Protease

Ulises Martínez-Ortega⁺,^[a] Diego I. Figueroa-Figueroa⁺,^[a] Francisco Hernández-Luis,^[a] and Rodrigo Aguayo-Ortiz^{*[a]}

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection continues to be a global health problem. Despite the current implementation of COVID-19 vaccination schedules, identifying effective antiviral drug treatments for this disease continues to be a priority. A recent study showed that masitinib (MST), a tyrosine kinase inhibitor, blocks the proteolytic activity of SARS-CoV-2 main protease (M^{pro}). Although MST is a potential candidate for COVID-19 treatment, a comprehensive analysis of its interaction with M^{pro} has not been done. In this work, we performed molecular dynamics simulations of the MST- M^{pro} complex crystal structure. The effect of the protonation states of M^{pro} H163 residue and MST titratable groups were studied. Furthermore, we identified the MST substituents and M^{pro} mutations that affect the stability of the complex. Our results provide valuable insights into the design of new MST analogs as potential treatments for COVID-19.

Coronavirus disease 2019 (COVID-19), caused by the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), has caused an ongoing pandemic with more than 185 million cases and over 4.0 million deaths.^[1] Currently, vaccines are being applied in numerous countries; however, more time is needed to reach levels that could control this global outbreak that would likely become a seasonal disease.^[2,3] Despite some antiviral drugs received emergency authorization by different regulatory drug agencies around the world, their use are limited.^[4] This situation elevates the need for specific antivirals that would help reduce morbidity and mortality caused by this disease.

To date, different druggable targets against SARS-CoV-2 have been identified for the development of a potential treatment, for example, RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), papain-like protease (PL^{pro}), and main protease (M^{pro}).^[5] The latter has gained relevance because, in addition to being

vital for the viral life cycle, it has been observed that this enzyme prefers specific substrates not present in humans, speeding up the identification and design of molecules with high selectivity and low toxic effects.^[6,7] Several peptidomimetics and small-molecules have been tested with good activity, which has led to the development of new M^{pro} covalent and non-covalent inhibitors.^[8–11]

In this tireless effort to develop a molecule that could be a great solution to the problem caused by COVID-19, a recent study showed that masitinib (MST), a well-known tyrosine kinase inhibitor, had excellent inhibitory activity on M^{pro} (IC_{50} = 2.5 μ M).^[12] The MST- M^{pro} complex was solved by X-ray crystallography and deposited in the Protein Data Bank (PDB) (Figure 1A). Interestingly, MST was also identified as a M^{pro} inhibitor in a later high-throughput screening study carried out by another research group.^[13] Despite MST could be a promising treatment for COVID-19, no further studies have been done to understand the interactions of MST with M^{pro} to design more active compounds.

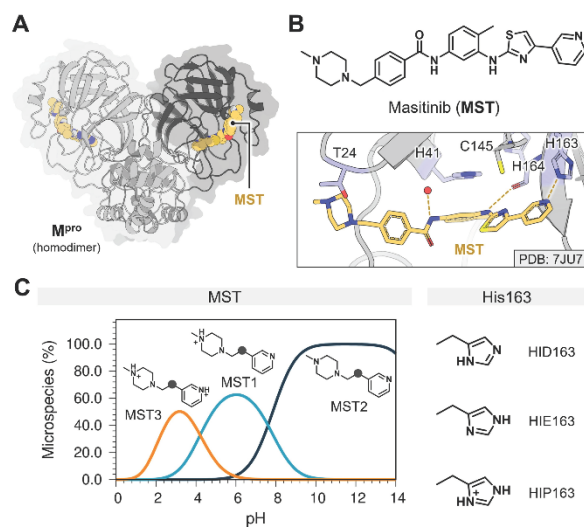


Figure 1. MST binding within M^{pro} homodimer active sites and protonation states. (A) Depiction of SARS-CoV-2 M^{pro} homodimer complexed with MST (PDB: 7JU7^[12]). (B) MST binding mode and interaction with M^{pro} active site residues. MST is shown in stick format with its C atoms colored in yellow. Fundamental hydrogen bond interactions are shown as dashed lines. (C) Microspecies distribution of MST protonation states (MST1, MST2, and MST3) computed with Chemicalize^[13] (left) and representation of the three H163 protonation states (HID163, HIE163, and HIP163) used in this study (right).

[a] U. Martínez-Ortega,⁺ D. I. Figueroa-Figueroa,⁺ Prof. F. Hernández-Luis, Prof. R. Aguayo-Ortiz
 Departamento de Farmacia
 Facultad de Química
 Universidad Nacional Autónoma de México
 Mexico City 04510 (Mexico)
 E-mail: rodaguayo@comunidad.unam.mx

[†] These authors contributed equally to this work.

Supporting information for this article is available on the WWW under <https://doi.org/10.1002/cmdc.202100375>

This article belongs to the Special Collection "BrazMedChem 2019: Medicinal Chemistry in Latin America".