



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

DESARROLLO DE MOLÉCULAS CONSTITUIDAS POR TRES ANDAMIOS ESTRUCTURALES
COMO ENTIDADES DE ACCIÓN POLIVALENTE: DISEÑO, SÍNTESIS, EVALUACIÓN BIOLÓGICA Y
ESTUDIOS *IN SILICO*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
LUIS ROBERTO GARDUÑO VILLAVICENCIO

TUTOR PRINCIPAL:
FRANCISCO HERNÁNDEZ LUIS
FACULTAD DE QUÍMICA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
ALFONSO SEBASTIÁN LIRA ROCHA
FACULTAD DE QUÍMICA
ELIZABETH ORTÍZ SÁNCHEZ
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX., MAYO, 2024



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.

COMITÉ TUTOR

Dr. Francisco Hernández Luis	FQ, UNAM	Tutor principal
Dr. Alfonso Sebastián Lira Rocha	FQ, UNAM	Comité Tutor
Dra. Elizabeth Ortiz Sánchez	INCan, UNAM	Comité Tutor

SITIOS DONDE SE DESARROLLÓ EL PROYECTO

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

Laboratorio de Células TumORAles y Tumores Sólidos, Subdirección de Investigación Básica, INCan.

ARTÍCULO

Garduño-Villavicencio, L. Roberto; Martínez-Ortega, Ulises; Ortiz-Sánchez, Elizabeth; Tinajero-Rodríguez, J. Manuel; Hernández-Luis, Francisco. Compounds Consisting of Quinazoline, Ibuprofen, and Amino Acids with Cytotoxic and Anti-Inflammatory Effects. *Chem. Med. Chem.* 2024, 19 (4), 1–15.

JURADO

Dr. Roberto Martínez	IQ, UNAM	Presidente
Dr. José Luis Medina Franco	FQ, UNAM	Vocal
Dr. Alfonso Sebastián Lira Rocha	FQ, UNAM	Vocal
Dr. Juan Francisco Cortés Benítez	UAM-X	Vocal
Dr. Fernando Ortega Jiménez	FES-C, UNAM	Secretario



SUSTENTANTE

M. en C. Luis Roberto Garduño Villavicencio



TUTOR

Dr. Francisco Hernández Luis

AGRADECIMIENTOS

Para las instituciones de las cuales recibí apoyo para el desarrollo del proyecto, expreso mis agradecimientos:

A la Universidad Nacional Autónoma de México de la que me siento orgulloso de pertenecer. Agradezco a los profesores que han sido parte de mi formación académica a lo largo del Bachillerato, Licenciatura, Maestría y Doctorado. Por ser la Institución de la que obtuve la mejor educación y mi segundo hogar.

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

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada con CVU **848859** y no. de apoyo **748393**; además, por la ayuda en la compra de reactivos de importación a través del proyecto **SEP-CONACyT 220664**.

A la DGAPA, por el apoyo otorgado en la compra de materiales de vidrio y reactivos, a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica **UNAM-DGAPA PAPIIT IN215824**.

A la Facultad de Química, por el financiamiento otorgado para la caracterización de las moléculas, además del ensayo *in vivo*, realizado en el Laboratorio de Pruebas Biológicas LSA del Instituto de Química, a través del programa **PAIP-5000-9136**.

A la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI) de la Facultad de Química, por el servicio de análisis, especialmente, al personal técnico de las áreas de Resonancia Magnética Nuclear (Nayeli López Balbiaux, Rosa Isela del Villar Morales), Espectroscopía de Infrarrojo (Marisela Gutiérrez Franco) y Espectrometría de Masas (Jessica Amacosta Castillo)

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

Al Dr. Francisco Hernández Luis, que me ha permitido ser parte de su grupo de investigación, apoyando mi desarrollo académico y alentando la mejora de mis capacidades como investigador.

A los integrantes del Comité Tutor que, con sus valiosas aportaciones, ayudaron a complementar mi proyecto durante el Doctorado.

También agradezco a la Dra. Elizabeth Ortiz Sánchez, por permitirme ser parte de su grupo de investigación en una estancia doctoral en el Instituto Nacional de Cancerología donde realicé los ensayos *in vitro* con la colaboración del M. en C. José Manuel Tinajero Rodríguez.

Al M. en C. Ulises Martínez Ortega, por su colaboración con los estudios *in silico*, por su tiempo, dedicación y, sobre todo, por su amistad.

A los miembros del jurado, por el tiempo invertido en las correcciones para mejorar mi escrito de tesis.



ÍNDICE

Abstract/Resumen	1
Introducción	2
Marco teórico	3
Epidemiología	3
Definición del cáncer	4
Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR)	8
Relación cáncer e inflamación	10
Planteamiento del problema, Hipótesis y Objetivos	16
Metodología	17
Diseño de moléculas	17
Acoplamiento molecular	22
Síntesis	23
Evaluación biológica	28
Tinción de células	28
Citotoxicidad en líneas celulares	29
Determinación de IC ₅₀ en EGFR-TKD	30



Estudio del tipo de muerte celular	33
Inhibición de edema provocado por TPA	35
Dinámica molecular	36
Resultados y análisis	37
Acoplamiento molecular	37
Síntesis	42
Evaluación biológica	52
Tinción de células	52
Citotoxicidad en líneas celulares	54
Determinación de IC ₅₀ en EGFR-TKD	55
Estudio del tipo de muerte celular	56
Inhibición de edema provocado por TPA	58
Dinámica molecular	59
Conclusiones y Perspectivas	63
Referencias bibliográficas	64
Anexo I: Caracterización	71
Anexo II: Acoplamiento molecular	110
Anexo III: Curvas IC ₅₀	123



Abstract

In this work, 16 compounds were synthesized by quinazoline, ibuprofen and an amino acid. The compounds were designed as dual target to inhibit Epidermic Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Domain (EGFR-TKD) and Cyclooxygenase-2 (COX-2). In the first case, emphasizes interaction with M793 residue at the hinge region of ATP pocket, and in the second case, the interaction with S531 residue. The molecules were evaluated as cytotoxic agents in breast cancer cells (MCF-7 and MDA-MB-231), stomach cancer (AGS), skin cancer (A-431), and one non-tumor cell line (HaCaT). The amount of EGFR in cells was determined by staining with Brilliant Violet 605 clone AY13. Most of the tested compounds showed greater cytotoxic activity than gefitinib (reference drug), especially derivative **6** ($IC_{50}=0.034 \mu\text{M}$ in A-431 cells), so this molecule was used in subsequent assays. Cell death was determined by flow cytometry with Annexin V/Propidium Iodide (AV/PI) in MDA-MB-231 and HaCaT cells, revealing apoptosis as a predominant outcome. In addition, *in vitro* EGFR-TKD inhibition by **6** was determined with ADP-Glo kit, obtaining a value of $IC_{50}=0.2396 \mu\text{M}$, a discrete value compared to gefitinib. Since derivative **6** obtained the best results in *in vitro* assays, it was used for the anti-inflammation test by TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) method and resulted in 29.53% edema inhibition, more than 5 times the value obtained by ibuprofen (5.62%), which was used as reference drug. The EGFR-TKD molecular dynamics studies showed interactions between **6** with M793, K721, and D800; in the case of M793, a water bridge within the active site was observed. On the other hand, in COX-2, two relevant interactions were observed, S531 and Y386; S531 showed a water bridge within then active site. In RMSD graph for both receptors we observed that this ligand remains stable from 10 to 50 ns of the simulation time.

Resumen

Se sintetizaron 16 compuestos constituidos por quinazolina, ibuprofeno y un aminoácido. Los compuestos se diseñaron como inhibidores de EGFR-TKD, enfatizando la interacción con M793 y como agentes antiinflamatorios, con interés en la interacción con S531 en COX-2. Las moléculas se evaluaron como agentes citotóxicos por el método de MTT y se determinó la IC_{50} en células de cáncer de mama (MCF-7 y MDA-MB-231), cáncer de estómago (AGS), cáncer de piel (A-431) y, como línea celular no tumoral, HaCaT. En este ensayo se usó gefitinib como fármaco de referencia. Se determinó la cantidad de EGFR en las células mediante una tinción con Brilliant Violet 605 clona AY13. La mayoría de los compuestos evaluados mostraron mayor actividad citotóxica que gefitinib, especialmente el derivado **6** ($IC_{50}=0.034 \mu\text{M}$ en A-431), por lo que esta molécula se utilizó en ensayos posteriores. Se estudió la muerte celular provocada por la molécula **6**, por la técnica citometría de flujo, con Anexina V/Yoduro de Propidio (AV/PI), en células MDA-MB-231 y HaCaT, obteniendo muerte celular por apoptosis como efecto principal. También se determinó la IC_{50} en EGFR-TKD con el kit ADP-Glo, dando como resultado un valor de $IC_{50}=0.2396 \mu\text{M}$, valor discreto comparado con el gefitinib. Dado que el derivado **6** presentó el mejor perfil en los ensayos *in vitro*, se usó para la prueba de acción antiinflamatoria mediante el método de TPA. Se obtuvo como resultado una reducción de edema del 29.53%, 5 veces más que el valor obtenido con (S)-ibuprofeno (5.62%), usado como fármaco de referencia. Los datos de dinámica molecular sugieren que, en EGFR-TKD, hay interacción entre el compuesto **6** con M793, K721 y D800. Para M793, se observa un enlace de agua con el sitio activo. Por otra parte, en COX-2 se presentan dos interacciones en mayor proporción, con S531 y Y386. En el caso de S531, se presenta un enlace de agua en el sitio activo. El gráfico RMSD de ambos receptores, muestra que el ligando permanece estable de 10 hasta 50 ns del tiempo de simulación.



Introducción

De acuerdo con Hanahan y Weinberg, el cáncer se define como “un conjunto de enfermedades que se caracterizan por el desequilibrio entre la división y muerte celular”.^{1,2} Para su tratamiento se cuenta con la radioterapia, la cirugía o la quimioterapia. Ésta última se basa en el uso de sustancias con actividad citotóxica y, de acuerdo con el avance de la enfermedad, es la primera elección terapéutica. Sin embargo, en su aplicación clínica, se ha observado que los fármacos antitumorales presentan severas reacciones adversas, poca selectividad en la acción preferente sobre células tumorales, pobre solubilidad acuosa, y baja de biodisponibilidad en el organismo.³

Dos de los fármacos anticancerígenos de uso clínico son el erlotinib y el gefitinib los cuales actúan inhibiendo el dominio tirosina cinasa del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR-TKD por sus siglas en inglés), uno de los blancos de primera elección en el diseño de moléculas con actividad antitumoral. Este receptor está relacionado con la proliferación celular, ya que participa en el proceso de autorrenovación y se expresa tanto en células no tumorales como en células cancerosas, con la diferencia que, en estas últimas, se encuentra sobreexpresado.⁴ El gefitinib y erlotinib cuentan en su estructura con el núcleo de quinazolina, andamio estructural con versatilidad para ser modificado y generar compuestos inhibidores de EGFR-TKD y, adicionalmente, presentar interacciones con otras dianas biológicas. Como ya se mencionó anteriormente, uno de los problemas que tiene el uso de derivados de quinazolina como agentes citotóxicos, es su baja solubilidad acuosa (0.01–1.0 mg/mL), por lo que, la adición de ciertos andamios con grupos funcionales susceptibles a la formación de sales, como los aminoácidos, mejoraría esta propiedad fisicoquímica.⁵

Por otro lado, se sabe que durante todo el proceso tumoral hay producción exacerbada de prostaglandinas (PGs), debido a la concentración elevada de citocinas, oncogenes y carcinógenos, excretados por las células tumorales. La PGE₂, es la molécula encargada de generar inflamación en el organismo, desarrollando así, el microambiente idóneo para dar lugar al proceso de angiogénesis, proliferación celular e invasión tumoral, entre otros. Esta PG se forma a partir del ácido araquidónico con la participación de la ciclooxigenasa 2 (COX-2). Por lo tanto, esta enzima también es un blanco potencial en el tratamiento del cáncer. Debido a lo anterior, el grupo de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), que actúan inhibiendo COX-2, fue considerado para tal cometido.⁶

Teniendo en cuenta lo antes mencionado, el presente trabajo se enfoca en el diseño, síntesis, evaluación biológica y estudios de dinámica molecular, de compuestos constituidos por andamios orgánicos que mostraron actividad citotóxica *in vitro* y actividad antiinflamatoria *in vivo*. Esta actividad biológica estuvo apoyada por el aumento en la solubilidad acuosa dada por un aminoácido, con el fin de contar con moléculas de acción dual (citotóxica-antiinflamatoria) que puedan presentar ventajas en el tratamiento del cáncer.

Luis Roberto Garduño Villavicencio



Marco teórico

En este capítulo se presenta información referenciada y organizada en subcapítulos que dan sustento al planteamiento del problema y la hipótesis, para su comprobación mediante el trabajo experimental.

Epidemiología

Las causas de muerte con mayor recurrencia en el año 2020 se encuentran enlistadas en la **Tabla 1**. Se observa que el cáncer de vías respiratorias, estómago, colon y recto, se encuentran entre las afecciones con mayor prevalencia, sumando casi 1.5 millones de fallecimientos cada año. En el año 2021, las diez principales causas de defunción representaron el 55% de los 55.4 millones de muertes en todo el mundo. En países con ingresos medios, entre los que se encuentra México, se ha producido un notable aumento de los fallecimientos por cáncer de pulmón, que han aumentado en 411 000 personas, lo que supone un incremento de más del doble en comparación a años anteriores. Otro tipo de cáncer, el de estómago, también tiene gran incidencia en México, siendo en este país, el único en el que aparece entre las principales causas de muerte.⁷ Una de las enfermedades con el mayor número de fallecimientos es el de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), que ha disminuido en cerca de 264 000 muertes, situándose en 1.6 millones. Sin embargo, las muertes por cardiopatía isquémica han aumentado en más de 1.2 millones, el mayor aumento de acuerdo con el número absoluto de muertes por esta causa. Actualmente, solo hay una enfermedad transmisible (infecciones de las vías respiratorias inferiores) entre las diez causas principales de muerte en países de ingresos medios.⁸

Tabla 1. Número de muertes causadas por las principales enfermedades a nivel mundial.

Enfermedad	Muertes (millones)
Cardiopatía isquémica	3.8
Accidente cerebrovascular	3.3
EPOC	1.6
Cáncer de tráquea, bronquios y pulmón	1.0
Enfermedades de las vías respiratorias	0.7
Diabetes mellitus	0.6
Cardiopatía hipertensiva	0.5
Enfermedad de Alzheimer y otras demencias	0.5
Cáncer de estómago, colon y recto	0.4
Lesiones por accidentes de tránsito	0.4

La Organización Panamericana de la Salud informó que, en el continente americano, el cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial. Se estima que cuatro millones de personas fueron diagnosticadas en 2021 y uno punto cuatro millones, murieron por alguna complicación de este padecimiento. El tipo de cáncer que causó mayor número de fallecimientos entre hombres fue el de pulmón (18%), próstata (11.1%), colorrectal (9.4%), hígado (6.1%) y estómago (5.6%). Por otra parte, en mujeres, el cáncer de mama (13.2%) ocupó el primer puesto, seguido del de pulmón (12.3%), colorrectal (7%), cervicouterino (5.3%) y, en quinta posición, el de ovario (3.9%). La distribución porcentual por sexo indica que hay más fallecimientos en mujeres (51%) que en los hombres (49%). A nivel mundial, se considera que en 2021 hubo veinte millones de nuevos casos y diez millones de muertes por esta enfermedad y, se prevé, que la tasa de incidencia aumente en un 60% durante las siguientes dos décadas.⁹



Definición del cáncer

El cáncer es una enfermedad en que células del cuerpo se multiplican sin control y se diseminan a otras partes del cuerpo. Es posible que un proceso canceroso comience en cualquier parte del cuerpo y estará formado por millones de células. En condiciones normales, las células se forman y multiplican mediante el proceso de división celular, con el fin de formar células nuevas a medida que el cuerpo las necesita. Cuando las células envejecen o se dañan, éstas mueren y son remplazadas por células jóvenes. No obstante, en ocasiones el proceso de renovación celular no sigue el orden normal y las células dañadas se multiplican. Cuando el proceso de división y muerte celular no se encuentra regulados, se dice que se ha formado un tumor.¹⁰

Durante la progresión del cáncer, las células tumorales experimentan cambios moleculares y fenotípicos a los que se denomina "plasticidad celular". Dichos cambios son el resultado de señales en el microambiente, alteraciones genéticas y epigenéticas, y/o presiones selectivas impuestas por el tratamiento, lo que contribuye a la heterogeneidad del tumor y la resistencia a la terapia. Si bien, la pérdida de la identidad y función de las células normales es intrínseca al proceso tumoral, las células cancerosas experimentan cambios fenotípicos adicionales durante la progresión y el tratamiento. Las células tumorales están expuestas a diversas condiciones metabólicas y moléculas de señalización que, en conjunto, forman el microambiente idóneo que impulsa cambios en el fenotipo celular. La flexibilidad del estado celular puede facilitar aspectos de la progresión tumoral, incluida la iniciación del tumor, metástasis, evasión inmunitaria y quimiorresistencia.¹¹

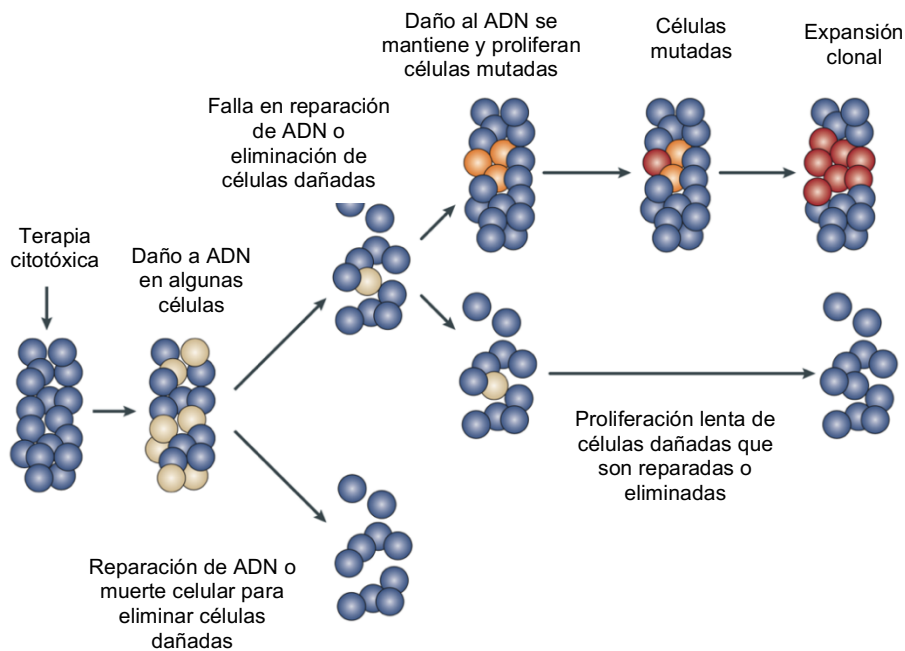


Figura 1. Muerte y proliferación celular relacionada a la terapia. La exposición de tejido normal a la quimioterapia induce daños al ADN. La falla en la reparación o eliminación de las células dañadas resulta en una mutación.

En la **Figura 1**, se ejemplifica el proceso por el cual una célula sana se transforma en cancerosa debido a la acción de ciertas terapias y como el organismo se puede encargarse de repararlo. En caso de no ser así, se da origen a un tumor. En el caso de que se origine un tumor, estos se clasifican según el órgano en el que se producen y sus perfiles histológicos y/o moleculares. Aunque el origen de los tumores sigue sin estar claro, prevalecen dos hipótesis. La primera hipótesis propone que, diferentes tipos de tumores surgen de diversas células de origen. La segunda hipótesis indica que, diversos tipos de tumores pueden surgir a partir de un solo tipo celular a través de plasticidad celular.¹²



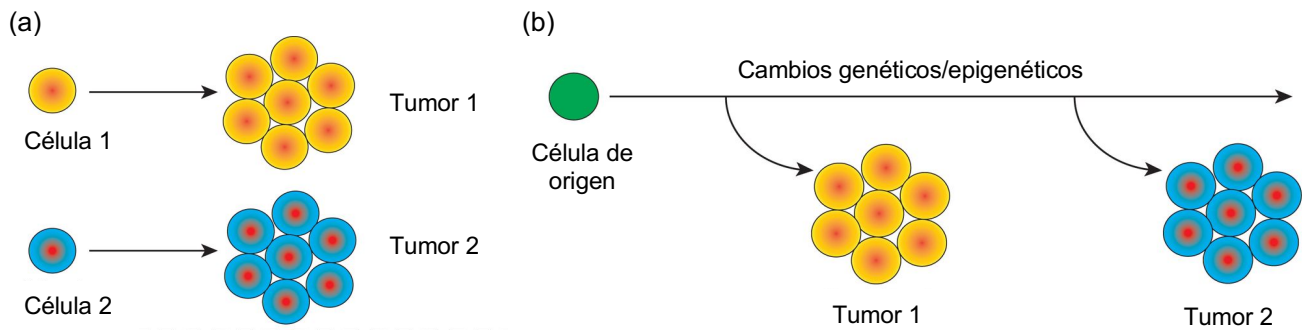


Figura 2. Origen de los tumores. (a) Diversos tipos de células generan diferentes tipos de tumores. (b) Un tipo de células genera múltiples tipos de tumores.

El proceso de origen de los tumores se ilustra en la **Figura 2**. A partir de diversos tipos de células (a) o debido a la diferenciación de una célula de origen (b). En tejidos adultos, las células cambian de identidad como parte de una respuesta fisiológica a una lesión o inflamación. Dichos cambios pueden ocurrir en células individuales, este fenómeno se conoce comúnmente como transdiferenciación o, a nivel de un tejido completo, se denomina metaplasia. Se cree que la metaplasia cumple una función protectora frente al daño crónico, ya sea reemplazando el tejido perdido o formando barreras más adecuadas para resistir condiciones hostiles. Sin embargo, en múltiples órganos, particularmente en el tracto gastrointestinal y otros tejidos del endodermo, el fenómeno se asocia con una predisposición al cáncer.¹³ Los cambios celulares más comunes se indican en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Ejemplos de metaplasia en cáncer.

Tejido	Estado asociado	Célula de origen	Conversión celular	Tipo de cáncer
Esófago	Reflujo gastroesofágico, ácido/bilis	Desconocido (células escamosas, células basales, células gástricas)	Escamosa esofágica → Intestinal columnar	Adenocarcinoma esofágico
Estómago	<i>Helicobacter pylori</i> , fumar, alcohol, ingesta de sales	Desconocido (células primarias, células del istmo, células de la cripta)	Escamosa gástrica → columnar intestinal	Adenocarcinoma gástrico
Páncreas	Pancreatitis	Células acinares	Acinares → Ductales	Adenocarcinoma pancreático
Hígado	Lesiones crónicas (hígado graso, hepatitis viral)	Hepatocitos	Hepatocito → Biliar	Colangiocarcinoma intrahepático
Pulmón	Humo de cigarro	Desconocido (células neuroendocrinas, células tipo II)	Cuboidal → Escamosa estratificada	Carcinoma de células escamosas
Cuello uterino	Disminución de pH, Virus de Papiloma Humano (VPH)	Células endocervicales	Columnar endocervical → Escamosa cervical → Gástrica	Carcinoma de células de útero Adenocarcinoma gástrico



Es importante destacar que la metaplasia y la transdiferenciación no son sinónimos, no obstante, los tejidos metaplásicos pueden surgir a través de la conversión de un tipo de células diferenciadas. Mecanismos alternativos, como la proliferación selectiva, el daño de células o alteraciones en patrones de diferenciación, también podrían explicar el cambio en el tejido metaplásico.¹⁴

Las conversiones celulares se dividen en dos categorías: desdiferenciación y transdiferenciación.¹⁵ La desdiferenciación se refiere a la reversión de una célula comprometida o diferenciada en una célula con mayor potencial de desarrollo, como una célula madre o una célula progenitora.¹⁶ La transdiferenciación, por el contrario, indica la conversión de un tipo celular diferenciado en otro. Tales interconversiones pueden involucrar un paso de desdiferenciación, por el cual las células pasan por un estado primitivo o pueden estar asociadas a una ruta más directa (**Figura 3**).¹⁷

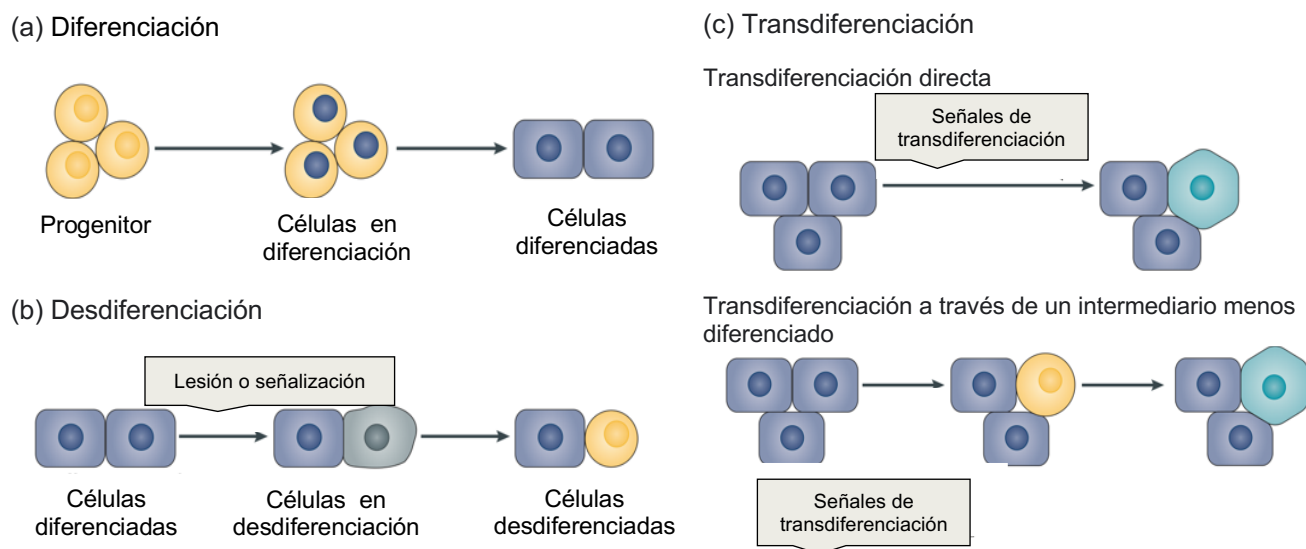


Figura 3. Modelo de diferenciación, desdiferenciación y transdiferenciación. (a) Durante el desarrollo y la regeneración, las células madre y las progenitoras se diferencian. (b) En algunos casos de lesión o formación de células madre, las células diferenciadas pueden desdiferenciarse, volviendo a un destino anterior y convirtiéndose en células progenitoras. (c) Las lesiones también pueden inducir a las células diferenciadas a asumir un destino diferente de células maduras, proceso conocido como transdiferenciación.

En el cáncer, los tumores de alto grado o poco diferenciados, conllevan un peor pronóstico que los tumores de bajo grado o bien diferenciados. Es importante destacar que, tales esquemas de clasificación describen el fenotipo celular dominante dentro de un tumor.¹⁸ En los tumores poco diferenciados, el equilibrio se desplaza al estado mesenquimatoso, mientras que en los tumores altamente diferenciados se desplaza al estado epitelial. Por lo tanto, es la abundancia relativa de células, lo que indica el grado del tumor.¹⁹ La transición epitelio-mesénquima (TEM), también parece influir en la sensibilidad a varios fármacos quimioterapéuticos y agentes dirigidos. En general, la resistencia a la terapia se asocia más comúnmente a un estado mesenquimatoso que a un estado epitelial. Estudios clínicos que están asociados con el cultivo de células, sugieren que las líneas celulares tumorales diferenciadas, con un fenotipo epitelial, son más sensibles a los inhibidores de EGFR-TKD. En cambio, los tumores poco diferenciados, tienen un fenotipo mesenquimatoso.²⁰

En las muestras clínicas, a menudo se piensa que la resistencia al cáncer está impulsada por el crecimiento de clones resistentes, como se muestra en la **Figura 4a**. Alternativamente, las clones resistentes pueden emerger de *novo*, a través de programas asociados a la transición celular como resultado de presión selectiva inducida por la terapia, tal como se muestra en la **Figura 4b**.²¹



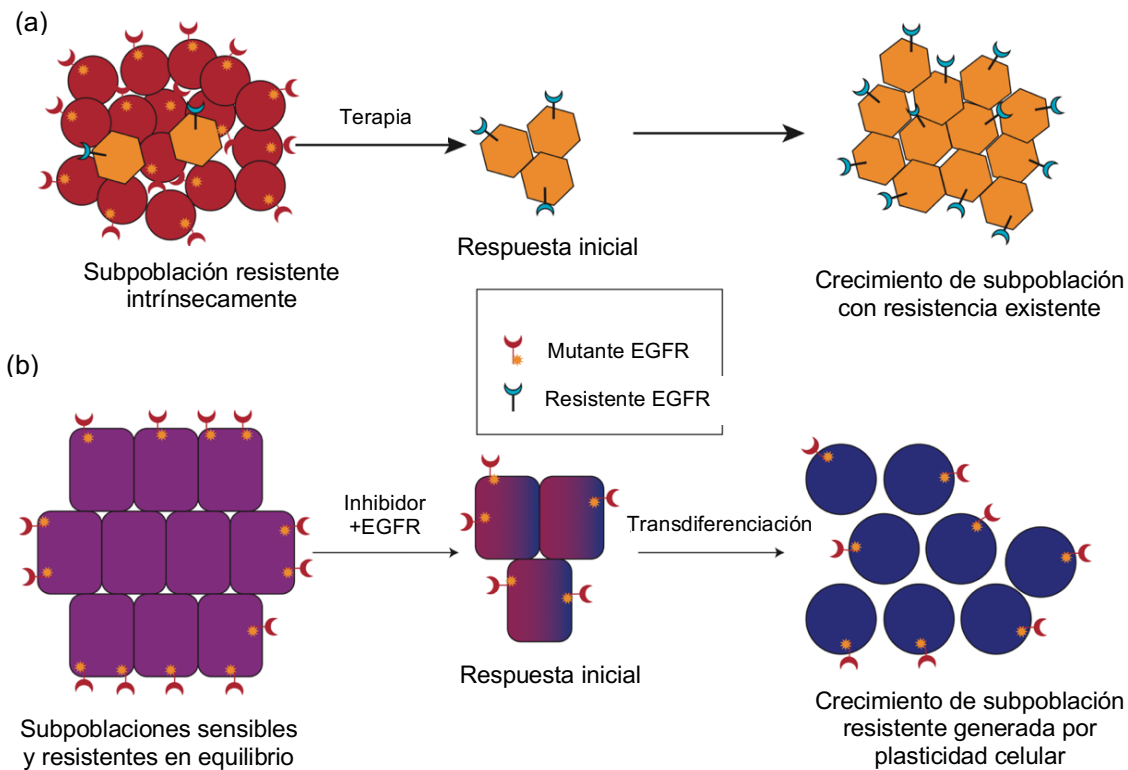


Figura 4. Resistencia a la terapia. (a) La resistencia está mediada por una población preexistente de células resistentes. (b) Las células pueden alternar entre un estado sensible y un estado resistente. En tumores con una subpoblación de células resistentes la respuesta a la inhibición de EGFR es seguida por una recaída.

Es importante recordar que la TEM, implica cambios en la expresión génica y la composición proteica. Por lo tanto, aunque el campo se ha centrado en la resistencia asociada a la TEM, es probable que estos cambios celulares den lugar a nuevas vulnerabilidades. De hecho, las células de carcinoma, cultivadas con un fenotipo mesenquimatoso muestran resistencia a inhibidores de EGFR-TKD. En cambio, exhiben sensibilidad a la gemcitabina, con respecto a células con un fenotipo epitelial, conexión que se mantiene *in vivo*.²²

La mayoría de pacientes con cáncer de pulmón que tienen mutaciones de EGFR, exhiben buena respuesta inicial a los inhibidores del dominio tirosina-cinasa de EGFR, pero éstas suelen ir seguidas de recaídas mediadas por mutaciones en el EGFR-TKD mismo.²³ En algunos casos, los tumores experimentan un gran cambio en la progenie, lo que resulta en la conversión de un fenotipo epitelial a un fenotipo neuroendocrino, que recuerda al cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC).²⁴ Es probable que la inhibición de EGFR-TKD suprima las vías que dirigen o mantienen la progenie, creando un grado de plasticidad que permite la transdiferenciación a un estado que ya no depende de la señalización de EGFR-TKD para sobrevivir.²⁵ Estas células utilizan mutaciones en el gen supresor de tumores de retinoblastoma (RB) para sobrevivir. La pérdida de RB ocurre en prácticamente el 100% de las muestras de tumores primarios de SCLC y líneas celulares derivadas de pacientes con EGFR resistentes a inhibidores de tirosina cinasa.²⁶ Aunque estos resultados sugieren que la pérdida de RB es necesaria para la resistencia a inhibidores de EGFR-TKD, no es suficiente por sí solo para inducir estos fenotipos. Esto implica que a) la pérdida de RB hace que las células sean permisivas para otros procesos de formación de progenie y se requiere un segundo estimulante genómico o epigenómico para el cambio de estado celular, o b) la pérdida de RB es simplemente un marcador, y no un regulador de la identidad SCLC.²⁷



Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR)

El EGFR es una entidad transmembranal, presentando un dominio tirosina-cinasa dentro de la célula. Para iniciar su efecto, el ligando (EGF) se acopla en la porción extracelular.²⁸ La activación del EGFR humano (llamado "ErbB1", "receptor 1 de EGF humano" o Her1), resulta de la homodimerización o heterodimerización inducida por unión con uno de los tres miembros de la familia Her2/ErbB2/neu, Her3/ErbB3 o Her4/ErbB4.²⁹ La activación alostérica de una cinasa dentro de este dímero por la otra cinasa, da como resultado la autofosforilación de múltiples tirosinas dentro de las colas C-terminales de ambos monómeros.³⁰ La fosfotirosina resultante puede servir como sitio de unión para proteínas intracelulares que contienen dominios de homología 2 de Src (SH2). Con la actividad enzimática, estas proteínas propagan señales en la célula,³¹ proceso que se muestra en la **Figura 5**.

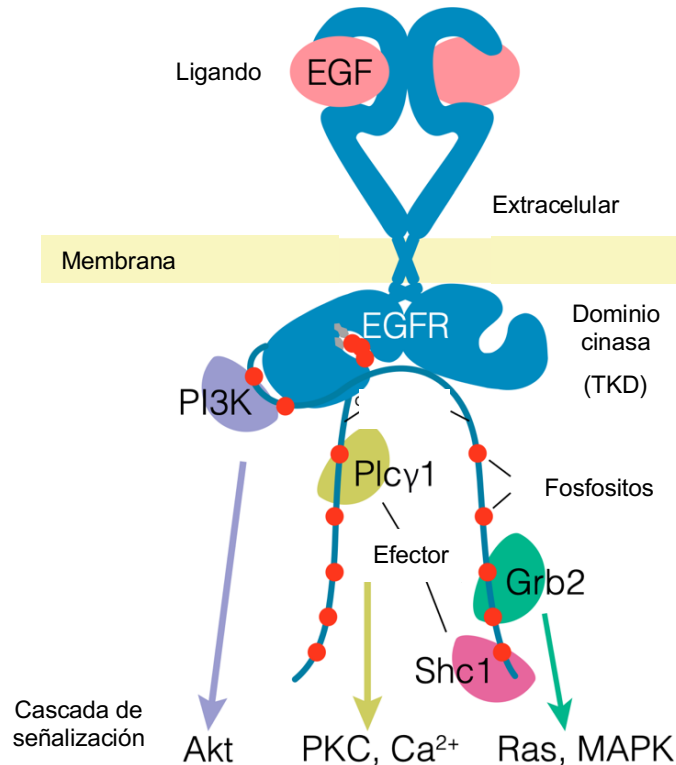


Figura 5. Transducción de señales en EGFR para analizar la especificidad de las tirosina-cinasas y las proteínas de unión a fosfotirosina. La autofosforilación de los fosfositos de tirosina en la cola citoplásmica C-terminal, produce sitios de unión para muchos efectores. Los efectores pasan a activar vías del segundo mensajero.

Las tirosina-cinasas actúan reconociendo sus sustratos a través de la formación de una interacción de la cadena β corta antiparalela, entre el péptido y el asa del dominio cinasa.³² Este hecho contribuye a la impresión de que las tirosina cinasas son poco específicas y es consistente con la dificultad en el desarrollo de inhibidores que imiten el sustrato con igual o mayor afinidad.³³ No obstante, los dominios catalíticos de las tirosina cinasas tienen preferencias intrínsecas por algunas secuencias de sustrato sobre otras, con especificidad determinada por el patrón de residuos de aminoácidos directamente adyacentes a la tirosina.³⁴

En los miembros de la familia del EGFR, la alta concentración de fosfositos respecto a los dominios de cinasa puede permitir que estos sitios sean fosforilados sin mucha consideración por la secuencia. Se cree que el subconjunto de tirosinas que se fosforilan durante la señalización de EGFR define el subconjunto de vías de segundo mensajero que se activan.³⁵



Las propiedades que determinan la eficiencia de la unión de los dominios SH2 o PTB a los fosfatos de la familia EGFR tampoco se entienden completamente, porque varios dominios SH2 o PTB pueden unirse a un fosfato en particular y cada dominio puede usar múltiples fosfatos.³⁶ El EGFR se encarga, además, de regular varios eventos y juega un papel importante en el desarrollo de células no pequeñas de cáncer pulmonar (NSCLC). Las mutaciones en L858R y G719S desestabilizan la conformación inactiva de EGFR y aumentan su actividad de cinasa.³⁷

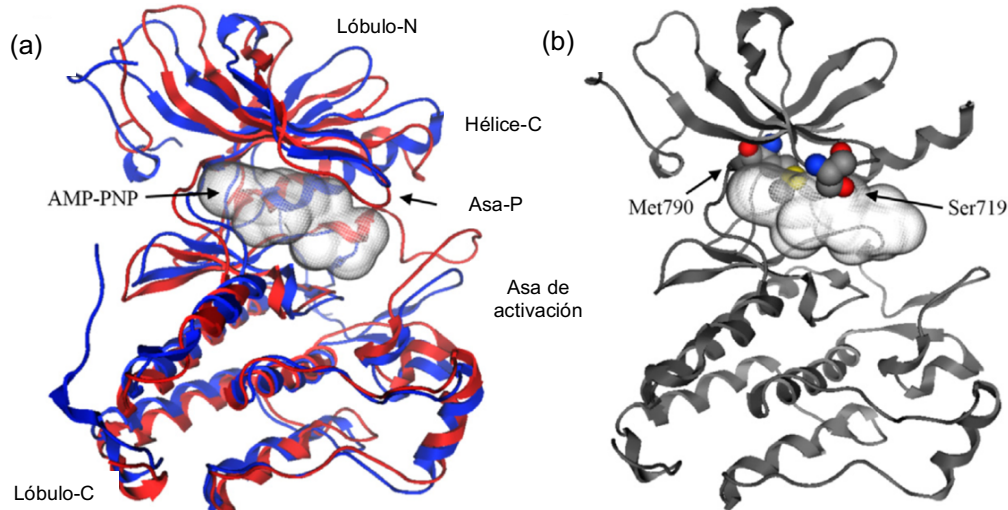


Figura 6. Estructura 3D EGFR. (a) Conformación inactiva wild type (WT) (PDB: 2GS7, rojo) y conformación activa (PDB: 2GS6, azul). En 2GS7 se muestra AMP-PNP en el sitio de unión a ATP. (b) Estructura de EGFR^{G719S/T790M}.

La **Figura 6** muestra las estructuras del dominio cinasa del EGFR “wild type” y mutante (**Figura 6a** y **6b**, respectivamente). Estas estructuras revelaron que, S719 en EGFR G719S y G719S/T790M está ubicada en la base del asa-P. El movimiento del asa-P está asociado con la activación de la cinasa del receptor. Se considera que la mutación G719S mantiene fija el asa-P en la posición activante y desestabiliza la conformación inactiva de EGFR.³⁸ En 2008 Yun *et al.* revelaron que la mayoría de los inhibidores de EGFR-TKD basados en quinazolina (en la **Figura 7** se ilustran algunas estructuras), pueden unirse a T793M, ya que el N1 del anillo de la pirimidina, interactúa con este residuo, con lo que este anillo se vuelve esencial para inhibir EGFR-TKD. Sin embargo, la resistencia a estos fármacos a menudo es causada por la mutación en este residuo.³⁹ La mutación T793M aumenta el volumen de la cadena lateral, por lo tanto, la región hidrofóbica del sitio de unión de ATP se vuelve más pequeña.⁴⁰ El análisis de la afinidad de unión, mostró que el valor K_m de EGFR-TKD y ATP disminuyó por la mutación L858R al principio y luego, se restauró cuando se produjo la mutación T793M, mientras que los valores K_i de gefitinib para WT y EGFR-TKD^{L858R/T790M} fueron casi las mismas. Por lo tanto, la resistencia a los fármacos de la mutación T793M puede deberse a la mayor afinidad entre EGFR-TKD y ATP.⁴¹ También es conocido que la sobreexpresión de EGFR y su homólogo más cercano, p185neu, induce una progresión tumoral agresiva y reduce la sensibilidad a los fármacos antitumorales.⁴² Con el fin de combatir el cáncer, se acuñó el concepto de “focalización” que buscaba combinar inhibidores de tirosina-cinasa de EGFR-TKD con agentes intercalantes de ADN, con el fin de bloquear irreversiblemente la progresión tumoral.⁴³ En el caso de los agentes duales, se esperaba que tuvieran un efecto “knock-out” múltiple de la actividad inhibitoria de EGFR-TKD, sumado al daño en el ADN inducido por las especies alquilantes, dando como resultado, actividad antiproliferativa sostenida en las células que sobreexpresan EGFR.⁴⁴ Si bien se han sintetizado un gran número de inhibidores de tirosina-cinasa altamente específicos y potentes, como gefitinib, erlotinib o afatinib (**Figura 7**), actualmente se hace hincapié en la combinación con otros fármacos para potenciar su eficacia.⁴⁵ Por lo tanto, el concepto de focalización engloba a la quimiosensibilidad y la quimioselectividad.⁴⁶



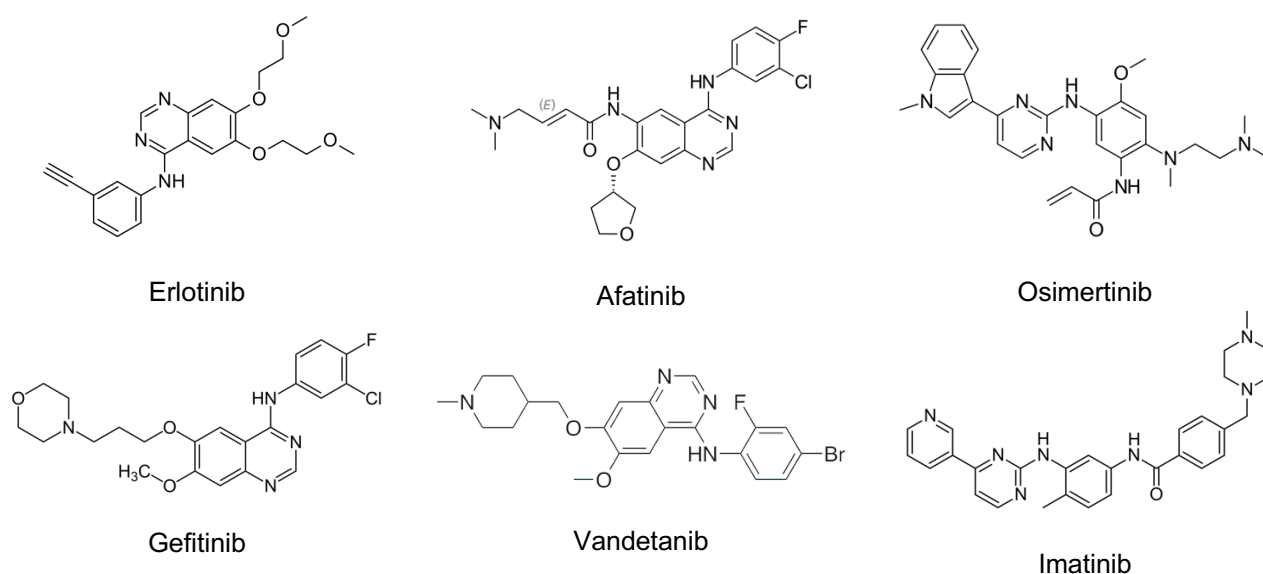


Figura 7. Estructuras de fármacos inhibidores de EGFR-TKD.

Con el paso del tiempo, se ha descubierto que las moléculas duales bloquean la señalización por EGFR y, por otro lado, dañan significativamente al ADN, de acuerdo con un mecanismo similar al de las triazinas clásicas.⁴⁷ Sabiendo que el EGFR es una glicoproteína transmembranal, esencial en las vías de señalización que regulan la proliferación y apoptosis celular,⁴⁸ se han desarrollado diversas generaciones de inhibidores de EGFR-TKD para el tratamiento de NSCLC y de otros tipos de cáncer.⁴⁹ La primera generación de inhibidores reversibles de EGFR-TKD, gefitinib y erlotinib, produjo efectos terapéuticos significativos para pacientes con NSCLC.⁵⁰ La mutación puntual L858R y la delección del exón 19 son las mutaciones más comunes, con una mayor sensibilidad a los inhibidores.⁵¹ Sin embargo, después de 12 meses de tratamiento clínico, la mutación T793M apareció en el 50-60% de los pacientes resistentes a la terapia.⁵² La presencia de T793M aumenta la afinidad del receptor por ATP, lo que reduce la capacidad de los inhibidores de EGFR-TKD para competir eficazmente con esta molécula endógena.⁵³ Luego se desarrollaron los inhibidores irreversibles de segunda (afatinib) y tercera (osimertinib) generación, que tenían una potencia celular creciente contra los mutantes T793M, principalmente mediante la unión covalente a C797.⁵⁴ No obstante, debido a que la fracción anilina de los inhibidores de EGFR-TKD de segunda generación, puede no interactuar tan eficazmente con la cadena lateral de M793, la actividad de T793M es menor frente a las mutaciones activadoras de EGFR-TKD.⁵⁵ Los inhibidores de tercera generación se dirigen selectiva e irreversiblemente a T793M,⁵⁶ como ejemplo, se tiene la molécula AZD9291 (osimertinib),⁵⁷ que es el único fármaco aprobado por la FDA como inhibidor de EGFR-TKD de tercera generación.⁵⁸ Esta molécula tiene buena potencia contra el mutante T793M, toxicidad mínima, y buena selectividad para EGFR-TKD de tipo salvaje.⁵⁹

Relación cáncer e inflamación

Dentro del cáncer, existen características que se presentan en todo proceso tumoral sin importar el órgano en que se presenten, estas características se conocen como "Hallmarks" y se propusieron como el conjunto de capacidades adquiridas por las células, a medida que pasan de la normalidad a los estados de crecimiento neoplásico, propiedades para formar tumores malignos.

En el año 2000, Weinberg y Hanahan, enumeraron puntos en común que tienen las células cancerosas a nivel del fenotipo. Inicialmente, se contemplaron seis capacidades, aunque luego se amplió a ocho.⁶⁰ El desarrollo de las características estuvo influenciado por el reconocimiento de que el cáncer se produce como el producto de efectos múltiples y que, la adquisición de estas características funcionales podría mapearse en la patogénesis del tumor.⁶¹



Las características iniciales se encuentran en la **Figura 8** (izquierda), y comprenden las capacidades adquiridas para mantener la señalización proliferativa. A la derecha, se muestran características que fueron añadidas posteriormente. Estos “Hallmarks”, no incluyen los mecanismos moleculares y celulares que hacen que las células preneoplásicas, se desarrollen y adquieran capacidades fenotípicas que impulsan la formación de tumores.⁶² También se agregaron la inestabilidad del genoma y la inflamación promotora de tumores, que proporcionan los medios por los cuales las células cancerosas y los tumores pueden adoptar rasgos funcionales.⁶³

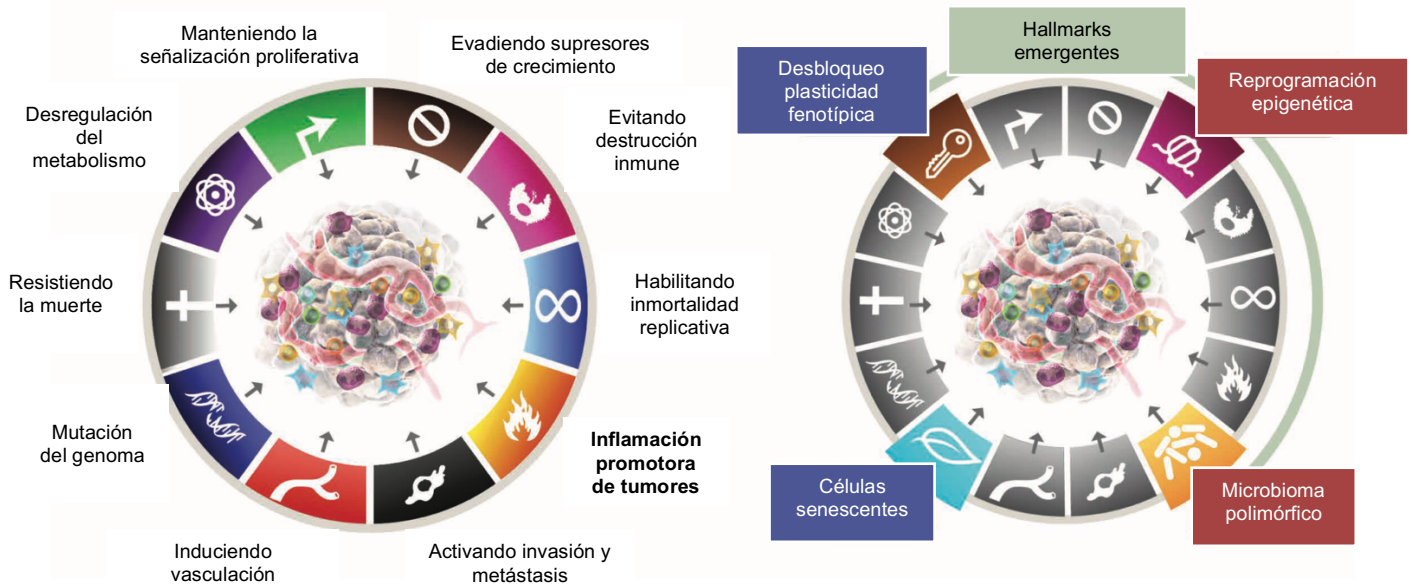


Figura 8. Hallmarks del cáncer. Incorporan ocho capacidades distintivas y dos características habilitadoras. En 2011 se incorporó la inflamación promotora de tumores, complementando la inestabilidad y mutación del genoma.

Hay una característica que destaca sobre los demás en relación con este proyecto, la función inflamatoria como promotora de tumores en el organismo, pues se ha observado que las condiciones inflamatorias en órganos seleccionados aumentan el riesgo de cáncer. En el microambiente tumoral, la inflamación latente contribuye a la proliferación, angiogénesis, metástasis, subversión de la inmunidad adaptativa, respuesta reducida a hormonas o agentes quimioterapéuticos.⁶⁴

El uso de agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) está asociado con la protección contra tumores, un hallazgo que refleja a la inflamación como factor de riesgo para ciertos tipos de cáncer. La inflamación está presente en la mayoría de los tejidos neoplásicos, incluidos aquellos que no están causalmente relacionados con un proceso inflamatorio evidente.⁶⁵ Esfuerzos recientes han arrojado conocimientos sobre los circuitos celulares y moleculares que vinculan la inflamación y el cáncer.⁶⁶ Con respecto a la relación que existe entre la inflamación y el cáncer, han identificado dos vías, en la vía intrínseca, los eventos genéticos que causan la neoplasia, inician la expresión de programas relacionados con la inflamación que guían la construcción de un microambiente inflamatorio.⁶⁷ En cuanto a la vía extrínseca, las condiciones inflamatorias facilitan el desarrollo del cáncer. Los desencadenantes de la inflamación crónica, que aumentan el riesgo o la progresión del cáncer incluyen enfermedades autoinmunes y afecciones inflamatorias de origen incierto.⁶⁸ Los puntos clave en la intersección de la vía intrínseca y extrínseca incluyen factores de transcripción y citocinas proinflamatorias primarias.⁶⁹ Por lo tanto, la relación inflamación-cáncer es un componente esencial para la formación de tumores y puede representar el séptimo “Hallmark”.⁷⁰ Esta relación representa un objetivo a considerar en la estrategia de prevención y tratamiento de la enfermedad.⁷¹



Dentro de los factores involucrados en la inflamación crónica, se pueden identificar los promotores primarios. Estos incluyen factores como el NF- κ B, el activador del transductor de señal de la transcripción-3 (Stat3) y citocinas inflamatorias primarias (IL-1 β , IL-6 y TNF- α).⁷² El NF- κ B es un promotor clave de la inmunidad/inflamación innata y se ha observado una regulación de NF- κ B en muchos tipos de cáncer.⁷³ Además, la activación de NF- κ B puede ser el resultado de alteraciones genéticas autónomas en células cancerosas. La evidencia sugiere que pueden existir intersecciones y vías compensatorias entre los sistemas NF- κ B y HIF-1 α , que vinculan la inmunidad innata con la respuesta hipóxica.⁷⁴ Asimismo, NF- κ B induce la expresión de citocinas inflamatorias, moléculas de adhesión, enzimas clave en la vía de la prostaglandina sintasa, óxido nítrico sintasa y factores angiogénicos. Al inducir genes antiapoptóticos (por ejemplo, Bcl-2), promueve la supervivencia en células tumorales y en células epiteliales.⁷⁵ La orientación del gen NF- κ B en las células epiteliales puede tener efectos divergentes en diferentes modelos de carcinogénesis, dependiendo del equilibrio entre la promoción de apoptosis y el desencadenamiento de la proliferación celular compensatoria.⁷⁶ La inactivación de NF- κ B en leucocitos infiltrantes, inhibe el cáncer asociado a la colitis, lo que proporcionó evidencia genética del papel de NF- κ B y las células inflamatorias en la carcinogénesis intestinal.⁷⁷ En un modelo de ratón con carcinogénesis intestinal, los ratones deficientes en *Tir8* exhibieron una susceptibilidad marcada a la inflamación y mostraron mayor carcinogénesis en colon, asociada con la producción local de PGE₂, citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6) y quimiocinas (KC/CXC, JE/CCL2 y CCL3).⁷⁸ Por lo tanto, la falta de un punto de control de activación de NF- κ B conduce a un aumento de la carcinogénesis en el tracto gastrointestinal, lo que subyace una vez más a la conexión entre la inflamación crónica y la promoción del cáncer.⁷⁹

Junto con NF- κ B, STAT3 es un punto de convergencia para numerosas vías de señalización oncogénicas, Lee y col.,⁸⁰ demostraron que el mantenimiento de la activación de NF- κ B en tumores requiere STAT3. Este factor de transcripción se activa en tumores y en células inmunitarias, y juega un papel en la carcinogénesis, al dificultar la maduración de las células dendríticas.⁸¹ Los estudios sobre el cáncer de colon, revelaron que STAT3 es un importante controlador de la proliferación y supervivencia celular, ya que regula la expresión de c-Myc, Mcl-1, ciclina D y Bcl-2.⁸² En los adenocarcinomas de pulmón, la fosforilación constitutiva de STAT3 se encuentra cascada abajo de las mutaciones activadoras en EGFR.⁸³ Los intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno (ERONs) son mediadores generados por la inflamación en el daño del ADN.⁸⁴ La **Figura 9** sugieren que las células inflamatorias y los mediadores pueden desestabilizar el genoma, ya sea induciendo daño al ADN o afectando los sistemas de reparación y los puntos de control del ciclo celular.⁸⁵

Estudios basados en la población, de caso y ensayos clínicos, indican que el uso regular de AINEs durante un período de 10 a 15 años reduce el riesgo de desarrollar cáncer colorrectal en un 40 a 50%.⁸⁶ Dado que se informa que muchos tipos de cáncer tienen niveles elevados de COX-2 y sobreproducen PGs, existe un gran interés en evaluar el papel de los AINEs como estrategias de tratamiento para otros tipos de cáncer como mama, estómago, páncreas, tracto urinario, pulmón y próstata. Sin embargo, el uso prolongado de AINEs se asocia con efectos secundarios como náuseas, dispepsia, gastritis, dolor abdominal, úlcera péptica y sangrado gastrointestinal.⁸⁷ Se ha planteado que los AINEs ejercen su acción antiinflamatoria y antitumoral a través de la inhibición de COX-2,⁸⁸ mientras que los efectos no deseados de estos fármacos, como el daño a la mucosa gástrica y el sangrado gastrointestinal, surgen de la inhibición de la COX-1.⁸⁹ A partir de lo anterior se condujo al desarrollo de los COXIBs. Los inhibidores altamente selectivos de la COX-2 retienen los efectos antiinflamatorios y antitumorales de los AINEs sin interferir con la COX-1.⁹⁰ Estos fármacos fueron aprobados por la FDA, como agentes antiinflamatorios y su uso está asociado con una reducción del 50% en la toxicidad gastrointestinal.⁹¹ Consecuentemente, el uso prolongado de inhibidores de COX-2 se asocia con un aumento de los eventos trombóticos en humanos.⁹² La inflamación crónica causada por infecciones o enfermedades autoinmunes, está asociada con un mayor riesgo de cáncer. Se estima que la inflamación crónica contribuye al desarrollo del 15% de los tumores malignos. La conexión entre la inflamación y el cáncer respalda que los AINEs pueden tener actividad antineoplásica.⁹³



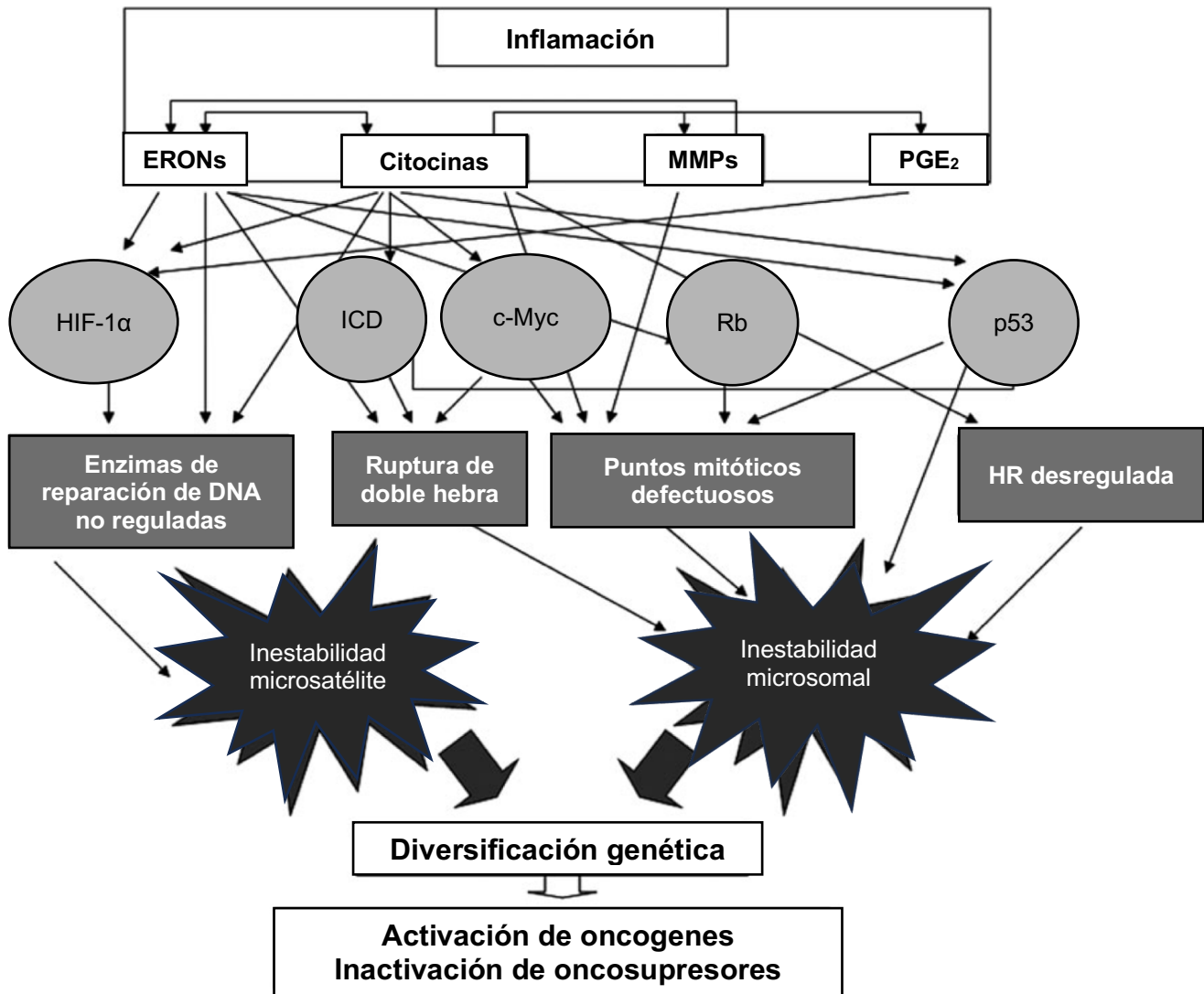


Figura 9. Vías que vinculan la relación inflamación-cáncer. Las células producen ERONs, citocinas, MMP y PGE₂ que amplifican la cascada inflamatoria. TNF también regula al alza la inducción de citidina deaminasa (ICD).

La aspirina es un inhibidor irreversible de la COX al bloquear el acceso del ácido araquidónico. En cambio, la indometacina, el ibuprofeno y el sulindaco son inhibidores competitivos a la unión al sustrato. Cuando la COX convierte el ácido araquidónico, el paso regulador en este proceso es la conversión enzimática del araquidonato en PGG₂, que luego se reduce a un endoperóxido intermedio inestable, PGH₂. Las PGs sintasas, metabolizan la PGH₂ en, al menos, cinco moléculas estructuralmente relacionadas, la PGE₂, la PGD₂, la PGF_{2α}, la PGI₂ y el tromboxano A2 (TXA₂)⁹⁴ (**Figura 10**).

La COX existe en dos isoformas comúnmente conocidas como COX-1 y COX-2. Aunque ambas están reguladas al alza, normalmente la COX-1 se expresa de forma constitutiva en una amplia gama de células y tejidos.⁹⁵ La COX-1 está relacionada con la función renal, el mantenimiento de la mucosa gástrica, la estimulación de la agregación plaquetaria y la vasoconstricción.⁹⁶ En contraste, la COX-2 es un gen de respuesta inmediata y su expresión está ausente en la mayoría de las células y tejidos, esta enzima es altamente inducida en respuesta a citocinas proinflamatorias, hormonas y promotores tumorales.⁹⁷ La PGE₂, derivada de la COX-2, es la principal PG producida en muchos tumores, incluido en el cáncer de colon, estómago y mama.⁹⁸ Investigaciones recientes indican que PGE₂, es un mediador clave de las respuestas inflamatorias agudas, la artritis, y la enfermedad inflamatoria intestinal.⁹⁹



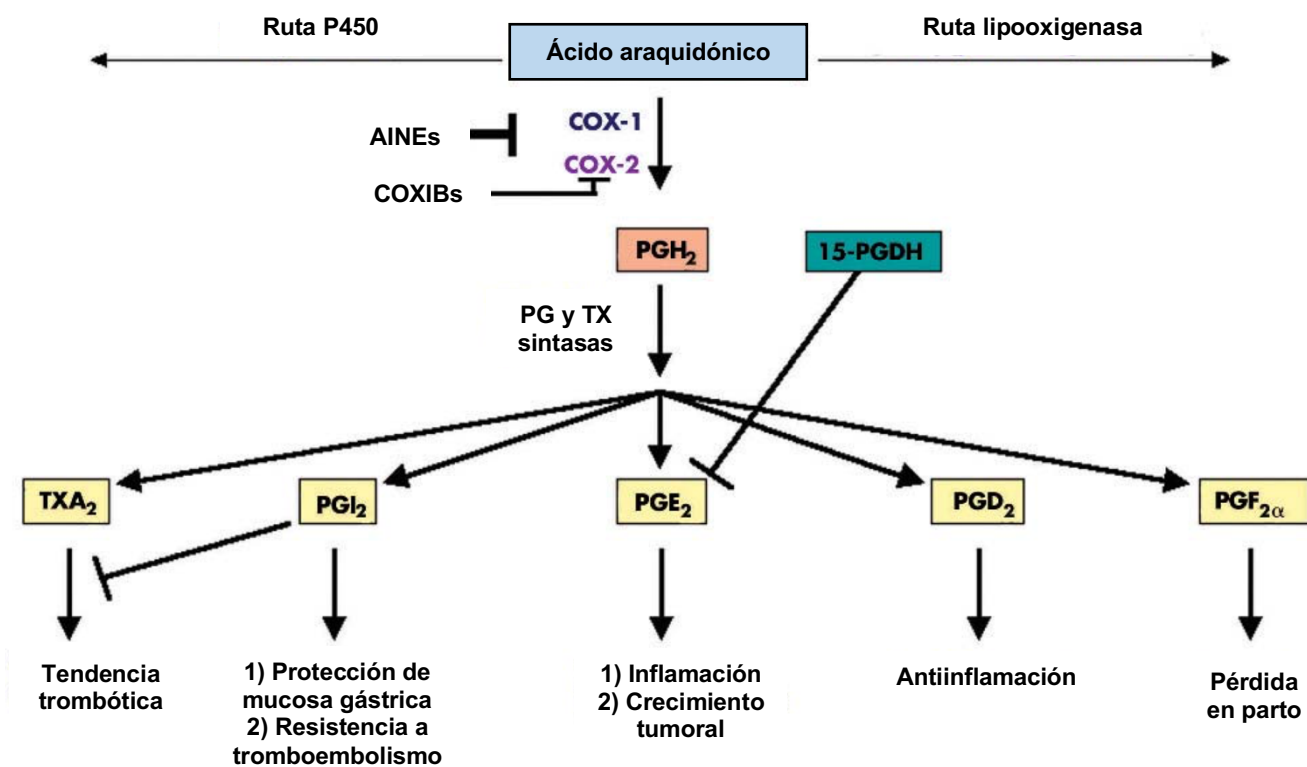


Figura 10. Descripción de la síntesis de PGs. El ácido araquidónico se puede metabolizar a través de la vía de la COX. Cada PG derivada de COX-2 (PGI₂, PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}) o tromboxano A₂ (TxA₂) tiene su función.

La evidencia de que PGE₂ promueve el crecimiento tumoral proviene de que: PGE₂ revirtió la regresión del adenoma inducido por AINEs en ratones *Apc^{Min}*.¹⁰⁰ PGE₂ mejoró significativamente la incidencia y multiplicidad de tumores inducidos por carcinógenos de colon en ratas.¹⁰¹ Estudios informan que PGE₂ acelera el crecimiento del adenoma intestinal en ratones *Apc^{Min}*.¹⁰² Aunque los inhibidores de la COX-2 suprimen la producción de PGE₂, su inhibición puede promover la agregación plaquetaria y conducir a trombosis coronaria y accidente cerebrovascular.¹⁰³ Como la PGI₂ antagoniza el TxA₂ producido por las plaquetas, su inhibición puede cambiar el equilibrio homeostático. Por lo tanto, es importante desarrollar agentes que no inhiban la producción de otros prostanoides, como PGI₂.¹⁰⁴

Dado que solo PGE₂ parece ser carcinógena, si se inhibe su producción cascada abajo de COX-2, puede producir menos efectos secundarios. Estudios recientes, muestran que, dosis altas de AINEs inhiben el crecimiento de células tumorales e inducen apoptosis a través de mecanismos independientes a COX mediante la regulación de 15-LOX-1,¹⁰⁵ Par-4,¹⁰⁶ Bcl-X_L y NF-κB.¹⁰⁷ No obstante, existe, la dificultad para lograr altas concentraciones *in vivo* de AINEs sin una toxicidad significativa. Por ejemplo, los efectos proapoptóticos de los AINEs que se observan en concentraciones superiores a 50 mM, por lo que es probable que muchos de los efectos quimiopreventivos de los AINEs se lleven a cabo mediante la inhibición de la COX-2.¹⁰⁸

Los niveles celulares de PGE₂ obedecen las tasas relativas de biosíntesis de COX-2/PGE₂ sintasa y degradación de 15-hidroxi prostaglandina deshidrogenasa (15-PGDH).¹⁰⁹ La 15-PGDH, es una enzima que degrada la prostaglandina y cataliza la oxidación del grupo 15-(S)-hidroxilo de la PGE₂ para producir una 15-ceto PGE₂.¹¹⁰ Aunque 15-PGDH puede promover el cáncer de próstata, se informó que la pérdida de expresión de 15-PGDH se correlaciona con la formación de tumores.¹¹¹ Curiosamente, se ha demostrado que los AINEs regulan al alza la expresión de 15-PGDH.¹¹² Cada vez hay mayor evidencia de que PGE₂ promueve el crecimiento tumoral al estimular la señalización del receptor EP¹¹³ con el aumento de la proliferación celular, promoción de la angiogénesis, inhibición de la apoptosis y supresión de las respuestas inmunitarias¹¹⁴. Estos procesos se ejemplifican en la **Figura 11**.



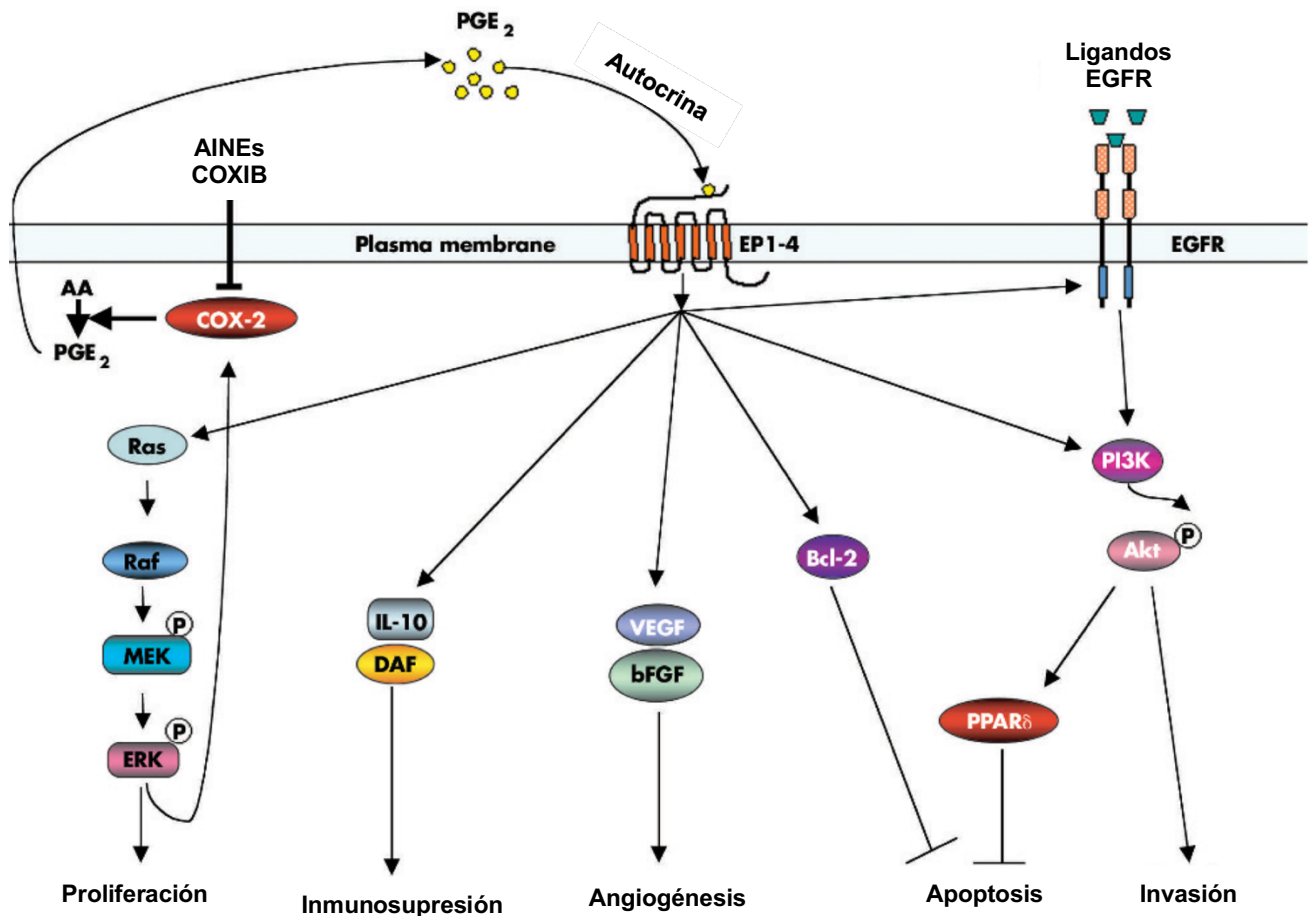


Figura 11. PGE₂ en la carcinogénesis. La PGE₂ promueve crecimiento tumoral, aumento en la proliferación, promoción de angiogénesis, inhibición de apoptosis y supresión de la respuesta inmunitaria.

Aunque las quimiocinas juegan un papel crucial en las reacciones inmunitarias e inflamatorias, estudios indican que tienen un papel igualmente importante en el cáncer.¹¹⁵ Estas quimiocinas son cruciales para la infiltración de macrófagos y linfocitos en cáncer de mama, cuello uterino, páncreas y gliomas.¹¹⁶ La expresión forzada de COX-2 estimula la proliferación celular a través de la inducción de EGFR indicó la probabilidad de intersección entre estos dos caminos.¹¹⁷ Como la expresión de EGFR se correlaciona directamente con la capacidad de las células para realizar metástasis en el hígado, es posible que la inhibición tanto del EGFR como de la COX-2 pueda producir efectos aditivos, bloqueando la propagación de la enfermedad metastásica.¹¹⁸ Además, los estudios preclínicos respaldan la idea de que el tratamiento combinado entre AINEs e inhibidores del EGFR es más efectivo que cualquiera de los agentes solos.¹¹⁹



Planteamiento del problema

Actualmente se cuenta con diversos métodos para el tratamiento del cáncer, uno de ellos es la quimioterapia. No obstante, la insolubilidad acuosa de los fármacos, su baja selectividad para actuar sobre células cancerosas y la resistencia de estas a ser afectadas, dificultan la terapia de la enfermedad. Por ello, surge la necesidad de contar con compuestos alternativos, que presenten un perfil de acción diferente a la mayoría de los fármacos de primera elección, con el fin de evitar la resistencia de las células tumorales al tratamiento y que cuenten con propiedades fisicoquímicas más favorables para su administración.

Hipótesis

Si se sintetizan moléculas formadas por tres andamios estructurales, una fragmento de quinazolina, que proporcione acción citotóxica, ibuprofeno, que contribuya al comportamiento antiinflamatorio y un aminoácido que incremente la solubilidad acuosa, estas sustancias presentarán la actividad biológica de cada uno de sus andamios estructurales al interactuar con los receptores EGFR-TKD y COX-2.

Objetivos

General

Sintetizar moléculas constituidas por tres andamios orgánicos, evaluarlos *in vitro* e *in vivo* y realizar el estudio *in silico* en las dianas EGFR-TKD y COX-2, que participan en la actividad biológicas de interés.

Particulares

- a) Diseñar moléculas constituidas por una quinazolina, ibuprofeno y un aminoácido, tomando en consideración las reglas de Lipinski y Veber
- b) Determinar la ΔG de los ligandos en EGFR-TKD y COX-2 mediante acoplamiento molecular.
- c) Sintetizar 16 compuestos diseñados como agentes citotóxicos y antiinflamatorios.
- d) Establecer el índice de expresión de EGFR en las líneas celulares de interés.
- e) Determinar la IC_{50} de los compuestos en líneas celulares tumorales (A-431, MCF-7, MDA-MB-231 y AGS) y una línea no tumoral (HaCaT).
- f) Obtener la IC_{50} en EGFR-TKD del compuesto que presentó mayor potencia en líneas celulares.
- g) Evaluar el tipo de muerte celular en HaCaT y MDA-MB-231, provocada la molécula más potente.
- h) Estudiar el efecto antiinflamatorio de la molécula el mejor perfil en la evaluación *in vitro*.
- i) Conocer las interacciones presentes entre el compuesto más activo sobre EGFR-TKD y COX-2 con dinámica molecular.



Metodología

Diseño de moléculas

Teniendo como referencia el trabajo realizado por los equipos de investigación de Xu y col.,¹²⁰ y Patel y col.,¹²¹ se consideraron ciertos grupos funcionales y porciones farmacofóricas que apoyaran el efecto inhibitorio en EGFR-TKD. Del trabajo de Xu y col., se observó que los derivados de 4-anilinoquinazolininas son inhibidores potentes y selectivos de EGFR-TKD. Como resultado de su unión en el sitio del ATP, se describieron grupos químicos esenciales para unirse en sitio activo. El anillo de pirimidina es obligatorio, y un grupo funcional NH libre es óptimo para formar enlaces de hidrógeno, preferentemente en posición 2 de la pirimidina. Los sustituyentes lipofílicos electro-atradores en posición 3 de la anilina, en posición 4 de la quinazolina pueden ser favorables, siendo óptimos halógenos como el Cl y Br. Además, se prefieren grupos electro-donadores en posición 6 y 7 de este núcleo heterocíclico. La estructura con los sustituyentes se muestra en la **Figura 12** (izquierda).

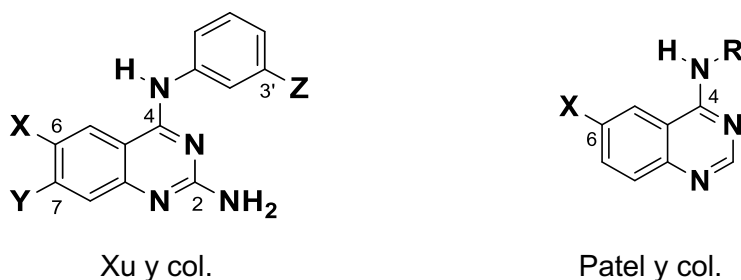


Figura 12. Farmacóforo del grupo de investigación de Xu y col. y Patel y col.

En los estudios computacionales, se observó que el N1 de la quinazolina forma un enlace de hidrógeno con M793 (también nombrado MET793) en el sitio receptor, por lo que esta interacción es importante para inhibir EGFR-TKD, tal como se muestra en la **Figura 13**. En un artículo de Wissner y col.,¹²² se indica otro modo de unión de un inhibidor de quinazolina con EGFR-TKD. Esta unión sugiere que en los inhibidores de EGFR-TKD basados en quinazolina, el átomo N1 forma un enlace de hidrógeno con el NH de M793, mientras que el átomo N3 forma un enlace de hidrógeno con una molécula de agua; misma que interactúa con el grupo OH de T830.

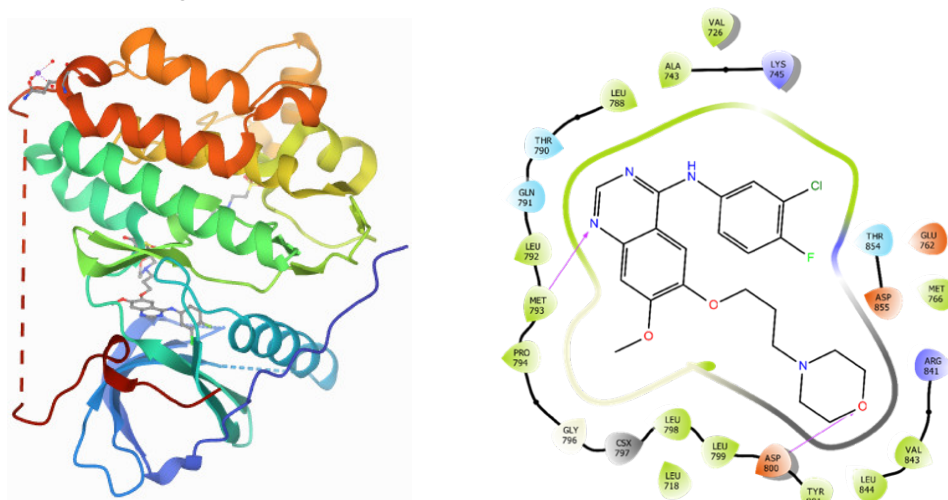


Figura 13. A la izquierda se muestra el dominio interno del EGFR-TKD (PDB ID: 4WQK) cristalizado con gefitinib. A la derecha se observa el modo de unión y la interacción con M793.

Por otra parte, en el equipo de investigación de Patel y col. (**Figura 12** derecha), observaron ciertas características que contienen las moléculas para ser candidatas a inhibidores de EGFR-TKD. Región adenina: contiene dos enlaces de hidrógeno, formados por la interacción del grupo amino N1 y N6 del anillo de adenina. Muchos inhibidores utilizan al menos uno de estos enlaces de hidrógeno (Hin). Región ribosa: región hidrofílica (Sug1, Hyp1 Hyc1). Porción hidrofóbica: aunque no es utilizado por ATP, tiene importancia en la selectividad del inhibidor (Hyp). Canales hidrofóbicos: puede aprovecharse para la especificidad del inhibidor (Huc). Región de unión a fosfato: utilizada para mejorar la selectividad del inhibidor. Cada una de estas regiones se muestran en la **Figura 14**. También, agregaron el anillo de fenilo en posición 2 de la quinazolina, un enlace libre NH en posición 4, no necesariamente proveniente de una anilina y grupos donadores y/o atractores de electrones en posiciones 6 y 7, por ejemplo, Cl en posición 7. Aprovechando la investigación de Patel y col., mediante un enlace amida, se colocó la estructura de ibuprofeno en posición 4 de la quinazolina, conservando NH libre del grupo funcional.

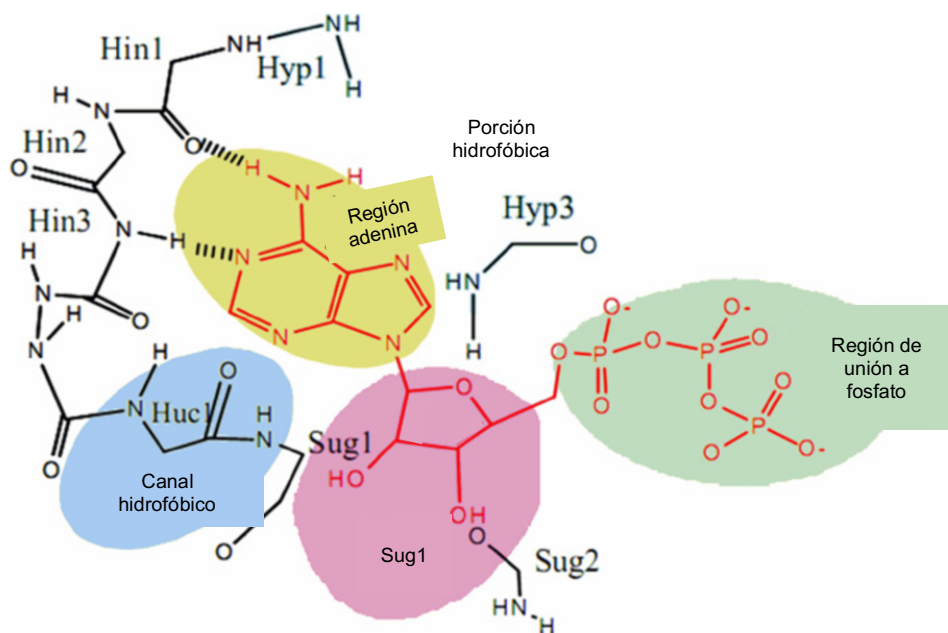


Figura 14. Modelo del sitio de unión del ATP a EGFR-TKD. Región para la ribosa, Sug1, Hyp1 e Hyc1. Porción hidrofóbica (Hyp). Canal hidrofóbico (Huc). Región bisagra de unión a enlaces de hidrógeno (Hin).

Otro grupo de investigación, el de Jean-Claude y col.,¹²³ propusieron el modelo que sugiere que el átomo N1 en la quinazolina acepta un enlace de hidrógeno de M793, mientras que N3, de la cadena lateral de T766. Añadieron a las regiones mencionadas, una anilina sustituida, la cual interactúa en una cavidad hidrofóbica adyacente. Por otro lado, en posiciones 6 y 7 de la quinazolina, colocaron grupo funcionales electro-donadores, que pueden formar enlaces de hidrógeno con aminoácidos cercanos.

En el caso del grupo de los AINEs, estos inhiben a la COX-2, encargada de la biosíntesis de PGE₂. En algunos estudios, este grupo de fármacos han sido utilizados como agentes quimiopreventivos en el desarrollo del cáncer.¹²⁴ En el caso del ibuprofeno, actúa como inhibidor de COX-2, bloqueando el sitio de unión del ácido araquidónico, mediante un enlace de hidrógeno con S531,¹²⁵ por lo que esta interacción se considera esencial en el diseño de las moléculas de este trabajo.



Se utilizó el isómero *S* y la mezcla racémica del ibuprofeno para realizar la síntesis de los compuestos de la **Serie a**, con el fin de observar si la estereoquímica del carbono α a carbonilo, es un aspecto determinante en la actividad biológica. Por otra parte, para la **Serie b**, se decidió colocar únicamente el (*S*)-ibuprofeno en la posición 6 de la quinazolina. También, se incluyeron diversos aminoácidos formando un enlace C-N alifático en posición 4 del núcleo.¹²⁶ En el caso de la **Serie a**, solo se utilizó la β -alanina para formar un enlace amida en posición 6 de la quinazolina.

La razón de colocar aminoácidos en las estructuras de los compuestos fue para favorecer su solubilidad acuosa. Además, se conoce que transportadores como PEPT1 son afines para internalizar aminoácidos a la célula.¹²⁷ Existen ejemplos de profármacos de ésteres de aminoácidos, como valaciclovir, que mejoran significativamente la biodisponibilidad oral de su predecesor, el aciclovir y, varios informes sugieren que la mejora de la absorción se atribuye a los transportadores de oligopéptidos, dentro de los que se encuentra PEPT1.¹²⁸ Asimismo, hay reportes que indican que los profármacos de gemcitabina mostraron una mejor actividad antiproliferativa que su progenitor. Debido a esto, el uso de aminoácidos podría demostrar disminución en la toxicidad por parte de los profármacos.¹²⁹

Cabe recalcar que los fármacos antes mencionados forman ésteres, a diferencia de las moléculas en este proyecto en que se forman amidas, debido a ello, su uso como profármaco, aunque posible, no es el objetivo de estudio en este trabajo. Considerando los puntos mencionados se propusieron las moléculas de la **Figura 15**.

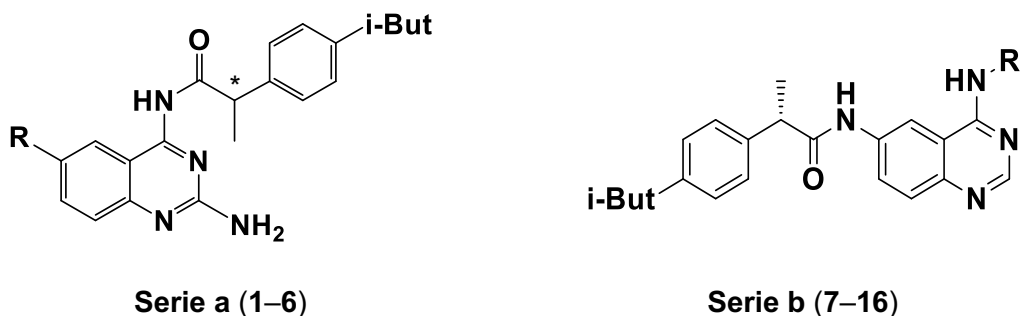
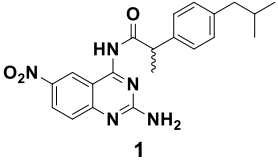
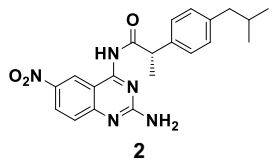
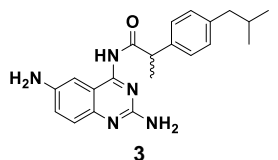
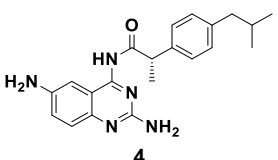
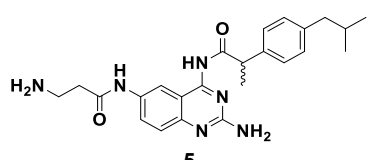
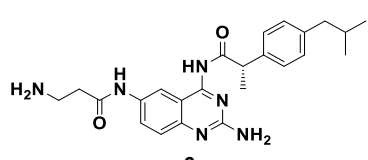
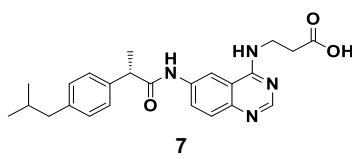
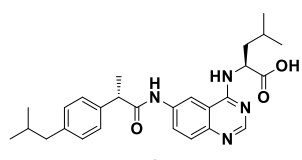


Figura 15. Moléculas propuestas como inhibidores de EGFR-TKD y COX-2. **Serie a.** R: NO₂, NH₂, β -alanina, *: (*S*) o (*R, S*). **Serie b.** R: β -alanina, leucina, histidina, PABA, asparagina, ácido glutámico, triptófano, glutamina, alanina, fenilalanina.

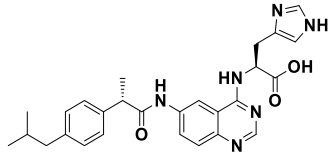
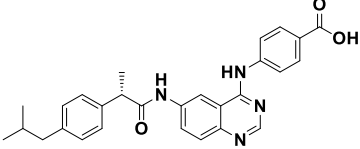
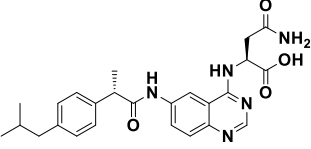
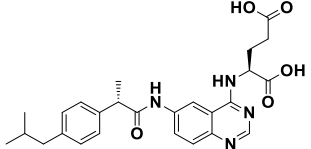
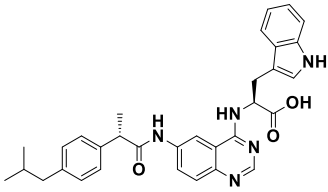
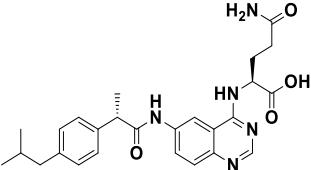
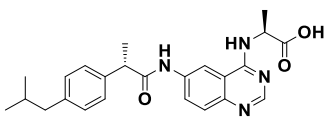
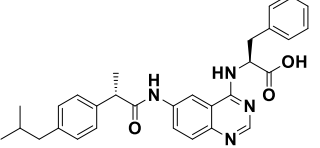
También se consideraron las reglas de Lipinski¹³⁰ y Veber¹³¹ para predecir si las moléculas son parcialmente solubles en disoluciones acuosas y, por lo tanto, son lo suficientemente permeables para ingresar a las células, por difusión pasiva, dando lugar a una correcta biodisponibilidad oral. Los descriptores químicos considerados fueron el área polar superficial ($\leq 140 \text{ \AA}^2$), masa molar ($\leq 500 \text{ uma}$), donadores de enlace de hidrógeno (≤ 5), aceptores de enlace de hidrógeno (≤ 10), enlaces rotables (≤ 10) y LogP (≤ 5). Los valores de los descriptores son mostrados en la **Tabla 3**, se resaltan los datos que no cumplen con ambas reglas semiempíricas. Esto podría traer como consecuencia que los compuestos no ingresaran a la célula y, por lo tanto, el efecto causado por las moléculas sea menor al esperado. Estas implicaciones se discuten en mayor profundidad en conjunto con el ensayo de citotoxicidad en líneas celulares. Hay que tener en consideración que las dianas farmacológicas de interés se encuentran al interior de la célula.



Tabla 3. Descriptores químicos de las moléculas 1–16.

Molécula	LogP	Donador EH	Aceptor EH	PSA (Å ²)	MM (Da)	Enlaces rotables
 <p>1</p>	1.75	3	5	130.5	393.45	7
 <p>2</p>	1.75	3	5	130.5	393.45	7
 <p>3</p>	3.22	3	3	106.9	363.46	7
 <p>4</p>	3.22	3	3	106.9	363.46	7
 <p>5</p>	2.95	4	5	136.2	434.26	10
 <p>6</p>	2.95	4	5	136.2	434.26	10
 <p>7</p>	3.80	3	5	104.2	420.42	10
 <p>8</p>	4.26	3	5	104.2	462.57	11



	3.13	4	6	132.8	486.57	11
9						
	4.58	3	5	104.2	468.53	9
10						
	2.35	4	6	147.3	463.54	11
11						
	3.03	4	7	141.5	478.51	12
12						
	4.67	4	5	120.0	535.62	11
13						
	2.65	4	6	147.3	477.51	12
14						
	3.34	3	5	104.2	420.45	9
15						
	4.43	3	5	104.21	496.67	11
16						



Acoplamiento molecular

El propósito de este estudio fue determinar las moléculas que serían sintetizadas. Con el diseño basado en el ligando y los reactivos químicos con los que se contaban, se plantearon las moléculas del proyecto. Para establecer que moléculas eran idóneas para sintetizar, se tomó como criterio el que presentaran un $\Delta G \leq -6$ kcal/mol en el caso de EGFR-TKD y $\Delta G \leq -5$ kcal/mol para COX-2. Estos parámetros fueron adaptados de Mansourian y col.¹³² y Ponnulakshmi y col.¹³³, que indican el valor ΔG de un ligando, para que se considere como inhibidor de un receptor.

Como primera etapa, se realizó el acoplamiento molecular con UCSF Chimera entre los compuestos 1–16 en EGFR-TKD (PDB ID: 4WKQ) y COX-2 (PDB ID: 5JW1), para determinar el modo de unión de las moléculas y asociar la energía de unión con los datos de citotoxicidad y antiinflamación. En EGFR-TKD se buscó la interacción con M793, mientras que, en COX-2, la interacción que se tuvo en mayor consideración fue S531. Cabe señalar que se usaron como control, moléculas que poseen la actividad biológica de interés y que actúan inhibiendo a los receptores mediante la interacción con los aminoácidos mencionados. Las estructuras cristalizadas se obtuvieron de Protein Data Bank.¹³⁴ Los estudios de acoplamiento molecular se procesaron en una PC con 1TB de memoria interna, 16MB de memoria RAM, un procesador Rayzen 7 con 16 núcleos y una tarjeta gráfica NVIDIA RTX3060.

Validación

Para validar que el protocolo de acoplamiento es confiable y reproducible, se utilizó el software Maestro v.12.9 para determinar el valor de RMSD. La validación se llevó a cabo con gefitinib en EGFR-TKD y celecoxib en COX-2. Las estructuras de las proteínas se obtuvieron del PDB. Tanto el compuesto usado en el acoplamiento molecular, como la estructura que se encuentra cristalizada con la proteína, se sobrepusieron para obtener el valor de la raíz de la desviación cuadrática media (“Root-Mean-Square-Deviation”, RMSD), utilizada para medir la distancia promedio entre los átomos de ambas estructuras acopladas. De acuerdo con la literatura, valores de RMSD menor a 2.0 Å consideran al método como válido.¹³⁵

Ligando

La optimización de la geometría de las moléculas se realizó en Maestro 12.9. Para construir los ligandos se tomó en cuenta la estereoquímica de los aminoácidos y del ibuprofeno. Se agregaron cargas electrostáticas de tipo Gasteiger¹³⁶ y se simuló el ambiente fisiológico a pH 7.2±0.2 para determinar si alguna porción en las moléculas se encontraba cargada. Se ubicó la raíz de las estructuras y se revisaron los enlaces rotables posterior a la minimización energética. Los archivos se guardaron en formato *.mol2.

Proteína

A partir de los archivos en formato PBD de cada proteína, con el software UCSF Chimera,¹³⁷ se retiraron hidrógenos polares, iones y los ligandos con los que se encuentran cristalizadas. El sistema se colocó a pH fisiológico de 7.4 y se agregaron iones Na⁺ y Cl⁻ aleatoriamente. Los archivos de las dianas farmacológicas se guardaron en formato *.pdb, con las condiciones parametrizadas para realizar el acoplamiento molecular.

Acoplamiento

En el sistema operativo Linux, con Ubuntu, se realizó el acoplamiento, usando los comandos descritos en la literatura,¹³⁸ colocando 100 poses como muestra representativa del ensayo. La preparación de la caja donde se encuentra el residuo de interés fue con LeDock. Se empleó la función de energía libre con un algoritmo Lamarckiano. Los resultados se analizaron en Maestro v.12.9, usando el archivo *.mol2 para los ligandos y *.pdb de las proteínas. Se obtuvieron las representaciones en 2D y 3D de los ligandos, las interacciones hidrofóbicas y polares con los aminoácidos, la eficiencia del ligando (EL) y se eligió el conformero de menor ΔG con el mayor número de clúster.



Síntesis

La descripción de la metodología para la obtención de los intermediarios y de los compuestos finales se muestra junto con la caracterización física. El título de cada reacción está dado de acuerdo con la transformación química que se lleva a cabo.

Serie a

Reacción de formación del núcleo de quinazolina (**1a**)

Se agregó 9.51 mmol (1 eq) de 2-amino-5-nitrobenzonitrilo, 6.89 mmol (0.75 eq) de carbonato de guanidina y 45 mL de una mezcla (1:2) EtOH/*n*-PrOH. La reacción se mantuvo en agitación constante a temperatura ambiente durante 30 min. Posteriormente se agregaron 11 mmol (1.2 eq) de KOH y el sistema se colocó a reflujo de 95 °C.

Después de 10 h en calentamiento continuo, la suspensión se filtró al vacío y el sólido se purificó mediante una extracción sólido-líquido con 100 mL de agua, seguido de 20 mL de EtOH. El producto se secó al vacío durante 16 h. Para determinar la pureza del producto se realizó ccf (CHCl₃/MeOH (9:1), 254 nm). No se observó presencia de impurezas. (%R: 87, p.f.=352.7-354.1°C, *F_R*: 0.36)

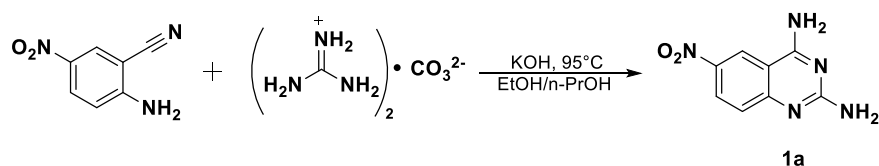


Figura 16. Reacción de formación del intermediario **1a**.

Reacción de formación del derivado imidazólico (**2a**, **3a**)

En un matraz bola de 100 mL, previamente secado, se añadió 4.84 mmol (1 eq) de (*R*, *S*)-ibuprofeno o (*S*)-ibuprofeno, 5.81 mmol de CDI y 5 mL de CHCl₃. El sistema se colocó en agitación constante, a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno. Pasadas 2 h de reacción, se realizó ccf para determinar la presencia de materia prima (CHCl₃/MeOH (9:1), 254 nm). Al no observarse presencia del reactivo se asumió que el producto se formó en su totalidad. El compuesto obtenido no fue aislado debido a su reactividad. (**2a**: %R: ~100, *F_R*: 0.43; **3a**: %R: ~100, *F_R*: 0.43)

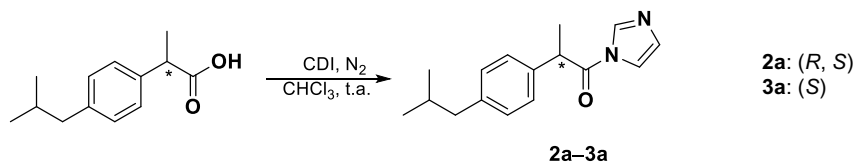


Figura 17. Reacción de formación de los intermediarios **2a** y **3a**.

Reacción de formación de amida (**1** y **2**)

En el matraz bola de 100 mL en el que se encontraba disueltos 4.84 mmol (1 eq) de **2a** o **3a** en 5 mL de CHCl₃, se añadieron 2.90 mmol (0.6 eq) de **1a** parcialmente disueltos en 40 mL de DMF. La mezcla de reacción se colocó en agitación constante a 100 °C en atmósfera de nitrógeno. Después de 24 h en calentamiento constante, se realizó una extracción líquido-líquido con 10 mL de HCl al 10% y CH₂Cl₂ (3x20 mL) para retirar las impurezas remanentes. El producto se colocó al vacío durante 48 h y pasado este tiempo, se precipitó con 15 mL de acetona y se filtró al vacío. Para observar si había presencia de impurezas junto con el compuesto de interés, se realizó ccf (CHCl₃/MeOH (9:1), 254 nm). (**1**: %R: 69, p.f.=251.7-253.1 °C, *F_R*: 0.59; **2**: %R: 73, p.f.=252.7-253.5 °C, *F_R*: 0.57)



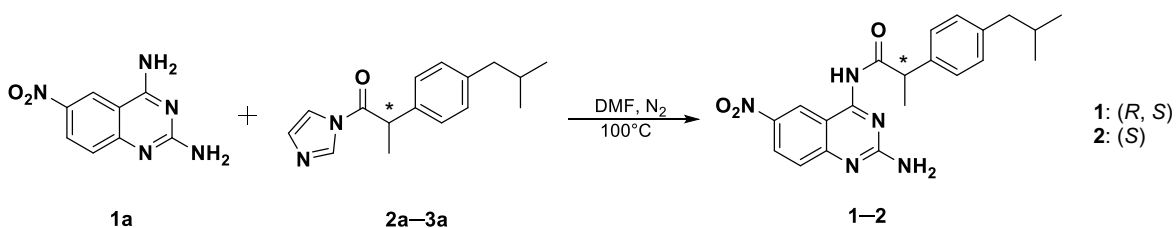


Figura 18. Reacción de formación de los productos **1** y **2**.

Reacción de reducción del grupo nitro (**3** y **4**)

En un vaso de precipitados de 20 mL se colocaron 1.34 mmol (1 eq) de **1** o **2** y 60 mg de Pd-C, equivalente al 12% m/m de la cantidad del compuesto nitrado correspondiente. Se realizó la mezcla en sólido hasta que ambos reactivos se observaran homogéneos. La mezcla sólida se colocó en un matraz de 50 mL, se agregaron 8.08 mmol (6 eq) de HCO_2NH_4 y, de manera lenta, teniendo cuidado durante la adición, se añadieron 20 mL de MeOH.

El sistema se colocó a reflujo de 65 °C en agitación constante. Pasadas 2 h de reacción, la disolución se filtró a través de un embudo poroso con papel filtró y una capa de celita. El filtrado se concentró *in vacuo*, el producto se precipitó con 10 mL de acetona y se filtró al vacío.

Para observar que el producto se encontraba puro, se realizó ccf ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1), 254 nm) del sólido. (**3**: %R: 94, p.f.=191.7-194.0 °C, F_R : 0.23; **4**: %R: 97, p.f.=193.1-194.2 °C, F_R : 0.24)

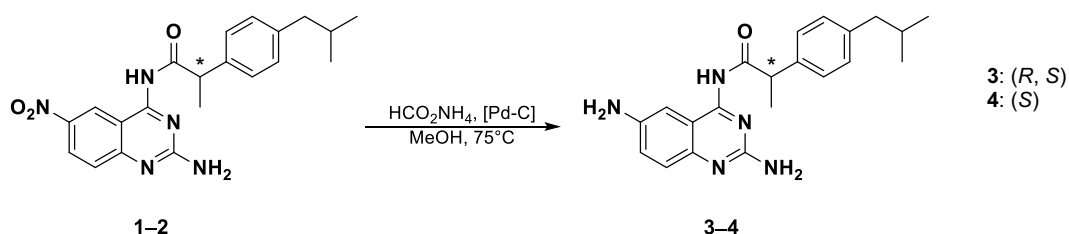


Figura 19. Reacción de formación de los productos **3** y **4**.

Reacción de acetilación (**4a** y **5a**)

Se agregó 1.27 mmol (1 eq) de **1** o **2**, junto con 3 mL de anhídrido acético al 85%. El sistema de reacción se colocó en agitación constante a 55 °C. Pasadas 3 h de reacción, la suspensión se filtró al vacío y se efectuó una extracción sólido-líquido con 25 mL de agua con sal. Se realizó ccf del producto ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1), 254 nm) para observar presencia de impurezas junto con el sólido. El compuesto se mantuvo en vacío hasta sequedad. (**4a**: %R: 68, p.f.=232.1-233.9 °C, F_R : 0.78; **5a**: %R: 73, p.f.=193.1-194.2 °C, F_R : 0.78)

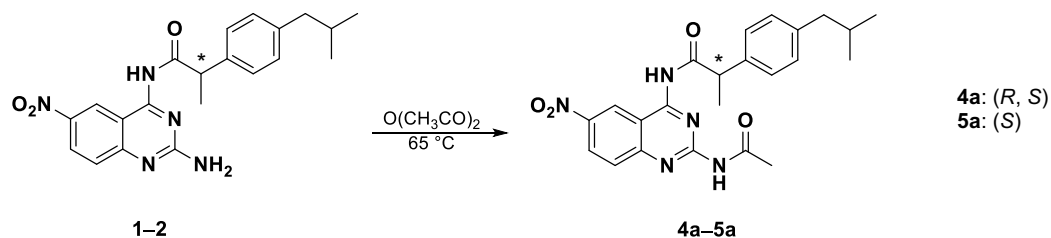


Figura 20. Reacción de formación de los intermediarios **4a** y **5a**.



Reacción de formación del derivado benzotriazólico (**6a**)

A un matraz bola secado previamente, se agregó 5.61 mmol (1 eq) de β -alanina junto con 8.41 mmol (1.5 eq) de PyBOP y 5 mL de CH_2Cl_2 . La reacción se mantuvo en agitación constante a temperatura ambiente y en atmósfera de nitrógeno durante 30 min. Posteriormente se adicionaron 5.61 mmol (1eq) de DIPEA y el sistema se colocó a 40 °C a las condiciones antes descritas.

Pasadas 2 h de reacción se realizó la ccf ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1), 254 nm) y, al no observarse presencia de subproductos ni de materia prima, se dio por concluida la reacción. El producto no fue aislado debido a su reactividad. (%R: ~100, F_R : 0.33)

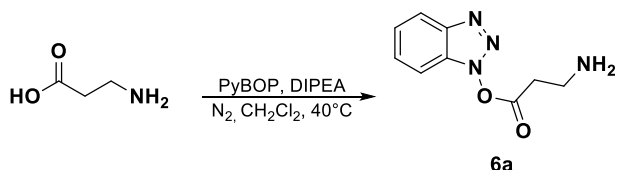


Figura 21. Reacción de formación del intermediario **6a**.

Reacción de reducción del grupo nitro (**7a** y **8a**)

En un vaso de precipitados de 20 mL se colocaron 1.83 mmol (1 eq) de **4a** o **5a** junto con 85 mg de Pd-C, equivalente al 12% m/m de la cantidad del compuesto nitrado correspondiente y se realizó la mezcla en sólido hasta que ambos compuestos se observaran homogéneos. Los compuestos se colocaron en un matraz de 50 mL, se agregaron 10.98 mmol (6 eq) de HCO_2NH_4 y, de manera lenta, manteniendo cuidado durante la adición, se agregaron 20 mL de MeOH.

El sistema se colocó a reflujo de 65 °C en agitación constante. Pasadas 2 h de reacción, la disolución se filtró a través de un embudo poroso con papel filtró y una capa de celita. El filtrado se concentró *in vacuo*. El producto se precipitó con 10 mL de acetona y se filtró al vacío.

Se realizó ccf ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1), 254 nm) para observar presencia de impurezas en el producto de reacción. (**7a**: %R: 71, p.f.=154.3-156.1 °C, F_R : 0.35; **8a**: %R: 75, p.f.=157.2-158.2 °C, F_R : 0.36)

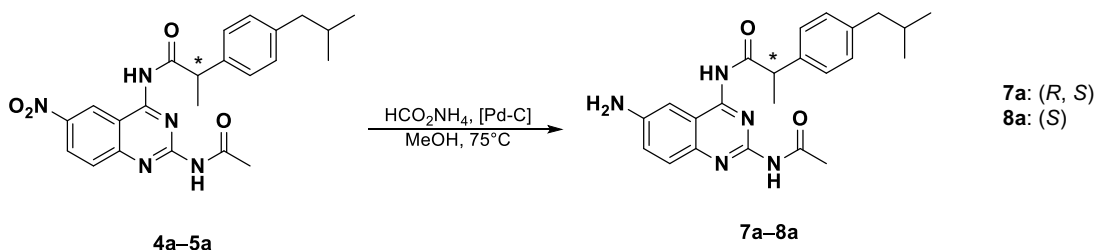


Figura 22. Reacción de formación de los intermediarios **7a** y **8a**.

Reacción de formación de amida (**9a** y **10a**)

En el matraz donde se encontraban previamente disueltos 5.61 mmol (1 eq) de **6a** en 5 mL de CH_2Cl_2 , se adicionaron 7.29 mmol (1.3 eq) de **7a** u **8a** parcialmente disueltos en 15 mL de DMF. La reacción se colocó en agitación constante, bajo atmósfera de nitrógeno, a una temperatura de 70 °C.

Pasadas 8 h de reacción, se realizó la ccf correspondiente ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1), 254 nm) y se observó presencia de materia prima, por lo que se procedió a purificar el compuesto.

El producto se purificó mediante una extracción líquido-líquido con 10 mL de HCl al 10% y CH_2Cl_2 (5x5 mL) y la disolución se concentró *in vacuo*, para después dejarlo al vacío durante 48 h y, pasado este tiempo, el producto se precipitó con 10 mL de acetona. (**9a**: %R: 47, p.f.=167.8-170.3 °C, F_R : 0.25; **10a**: %R: 51, p.f.=171.1-172.3 °C, F_R : 0.24)



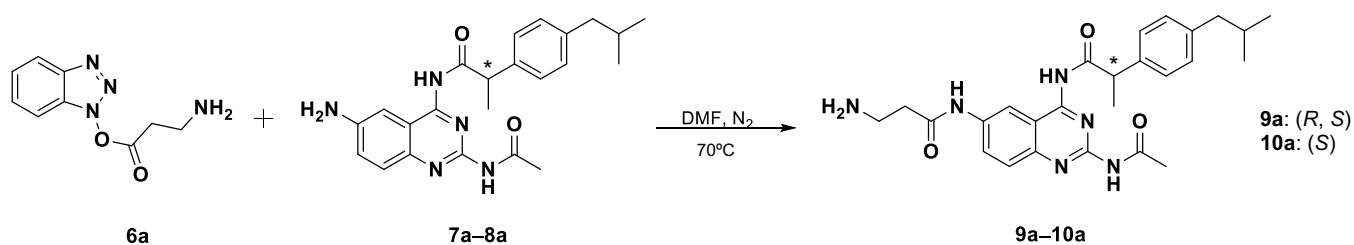


Figura 23. Reacción de formación de los intermediarios **9a** y **10a**.

Reacción de hidrólisis de grupo acetilo (**5** y **6**)

Se añadió 1.05 mmol (1 eq) de **9a** o **10a**, junto con 10 mL de MeOH y el sistema se colocó a 4 °C en agitación constante. Después de 20 min se añadieron 0.95 mmol (0.9 eq) de LiH y la reacción se mantuvo en agitación durante 1 h. Posteriormente el sistema se colocó a 65 °C durante 2 h y al finalizar el tiempo de reacción se realizó ccf (CHCl₃/MeOH (9:1), 254 nm). Aunque se observó 20% de materia prima se decidió detener la reacción para evitar la hidrólisis de las amidas en posición 4 y 6. El producto se concentró *in vacuo*, se colocó al vacío por 24 h y se precipitó con 5 mL de una disolución saturada de NaCl. (**5**: %R: 39, p.f.=176.7-178.4 °C, *F_R*: 0.17; **6**: %R: 42, p.f.=177.1-178.4 °C, *F_R*: 0.16)

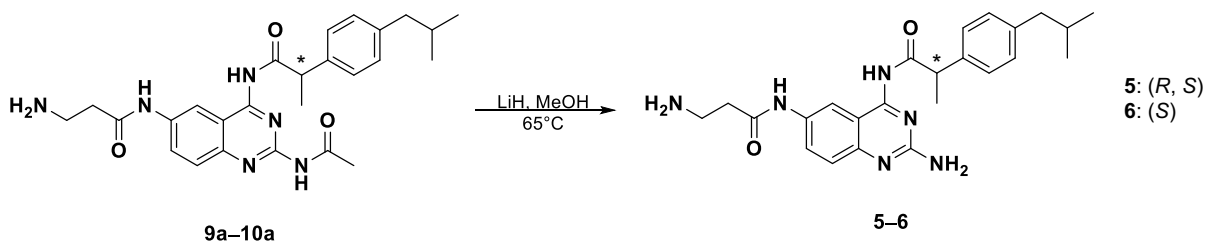


Figura 24. Reacción de formación de los intermediarios **5** y **6**.

Serie b

Reacción de iminación (**1b**)

Se agregó 18.39 mmol (1 eq) de 2-amino-5-nitrobenzocitrilo junto con 5 mL de DMF-DMA y 20 mL de MeOH. La reacción se colocó a reflujo de 95 °C en agitación constante. Pasadas 8 h se filtró el producto y se efectuaron extracciones sólido-líquido con 20 mL de MeOH frío para retirar las impurezas presentes. Se realizó la ccf al producto (CHCl₃/MeOH (9:1), 254 nm) y se mantuvo secando al vacío durante 24 h. (%R: 95, p.f.=144.0-145.2 °C, *F_R*: 0.91)

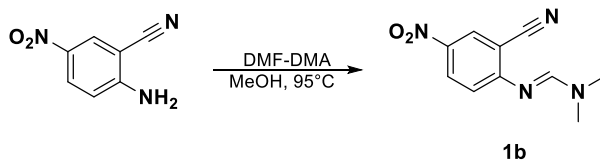


Figura 25. Reacción de formación del intermediario **1b**.

Reacción de formación del núcleo de quinazolina (**2b-11b**)

Se añadió 4.59 mmol (1 eq) de **1b** y 5.05 mmol (1.1 eq) del aminoácido correspondiente: β-alanina, leucina, histidina, PABA, asparagina, ácido glutámico, triptófano, glutamina, alanina o fenilalanina. Posteriormente se añadieron 20 mL de una mezcla (1:3) CH₃CN/CH₃CO₂H y la reacción se colocó en agitación constante a 55 °C. Después de 4 h de reacción, el sólido se filtró al vacío y se realizó ccf (CHCl₃/MeOH (9:1), 254 nm). El producto se purificó mediante extracciones sólido-líquido con 15 mL de CH₃CN seguido de 5 mL de acetona.



(**2b**: %R: 84, p.f.=240.2-241.6 °C, F_R : 0.20; **3b**: %R: 89, p.f.=229.9-231.4 °C, F_R : 0.82; **4b**: %R: 74, p.f.=204.8-206.1 °C, F_R : 0.15; **5b**: %R: 75, p.f.=347.8-348.9 °C, F_R : 0.91; **6b**: %R: 87, p.f.=236.8-238.1 °C, F_R : 0.11; **7b**: %R: 63, p.f.=202.3-202.8 °C, F_R : 0.14; **8b**: %R: 75, p.f.=263.7-265.8 °C, F_R : 0.47; **9b**: %R: 82, p.f.=248.5-250.1 °C, F_R : 0.49; **10b**: %R: 67, p.f.=276.5-277.8 °C, F_R : 0.42; **11b**: %R: 77, p.f.=208.2-210.7 °C, F_R : 0.67)

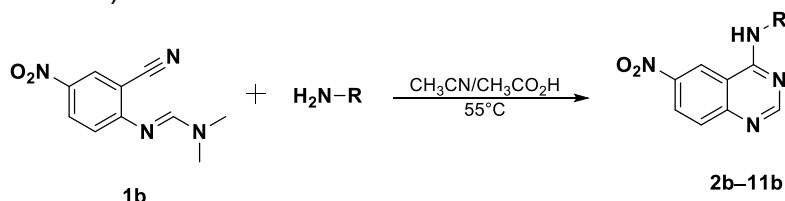


Figura 26. Reacción de formación de los intermediarios **2b–11b**. (**2b**: β-alanina, **3b**: leucina, **4b**: histidina, **5b**: PABA, **6b**: asparagina, **7b**: ácido glutámico, **8b**: triptófano, **9b**: glutamina, **10b**: alanina, **11b**: fenilalanina)

Reacción de reducción del grupo nitro (**12b–21b**)

En un vaso de precipitado de 20 mL se añadieron 2.67 mmol (1 eq) del compuesto nitrado **2b–11b** y 12% m/m de Pd-C de acuerdo con el peso de la materia prima. Se realizó la mezcla en sólido de los compuestos y se colocó en un matraz de 50 mL, junto con 16.02 mmol (6 eq) de HCO_2NH_4 y 20 mL de MeOH. El sistema se colocó en agitación constante a reflujo de 75 °C durante 2 h.

Al término de la reacción, la suspensión se filtró en un embudo poroso con papel filtró y una capa de celita. Se realizó la ccf ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1), 254 nm) y la disolución se concentró *in vacuo*. El producto se precipitó con 15 mL de CHCl_3 y se colocó al vacío.

(**12b**: %R: 90, p.f.=262.2-264.2 °C, F_R : 0.17; **13b**: %R: 87, p.f.=209.2-210.7 °C, F_R : 0.43; **14b**: %R: 85, p.f.=131.1-133.7 °C, F_R : 0.07; **15b**: %R: 92, p.f.=288.7-290.1 °C, F_R : 0.27; **16b**: %R: 59, p.f.=237.2-239.2 °C, F_R : 0.04; **17b**: %R: 67, p.f.=200.9-201.7 °C, F_R : 0.74; **18b**: %R: 82, p.f.=268.7-269.9 °C, F_R : 0.79; **19b**: %R: 77, p.f.=207.3-209.8 °C, F_R : 0.56; **20b**: %R: 57, p.f.=263.4-265.2 °C, F_R : 0.52; **21b**: %R: 52, p.f.=203.2-204.7 °C, F_R : 0.46)

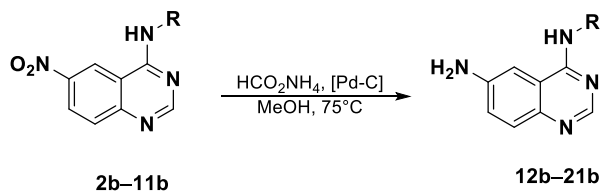


Figura 27. Reacción de formación de los intermediarios **12–21b**. (**12b**: β-alanina, **13b**: leucina, **14b**: histidina, **15b**: PABA, **16b**: asparagina, **17b**: ácido glutámico, **18b**: triptófano, **19b**: glutamina, **20b**: alanina, **21b**: fenilalanina)

Reacción de formación del derivado imidazólico (**22b**)

En un matraz de 50 mL previamente secado, se añadieron 2.42 mmol (1 eq) de (S)-ibuprofeno, 2.91 mmol (1.2 eq) de CDI y 5 mL de CHCl_3 . El sistema se colocó en agitación, en atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente. Después de 2 h, se realizó la ccf correspondiente ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1), 254 nm), al no observar presencia de materia prima se dio por finalizada la reacción. El producto no fue aislado debido a su reactividad. (**22b**: %R: ~100, F_R : 0.43)

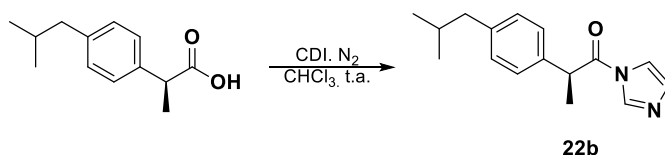


Figura 28. Reacción de formación del intermediario **22b**.



Reacción de formación de amida (7–16)

En el matraz de 50 mL en el que previamente se encontraban disueltos 2.42 mmol de **22b** en 5 mL de CHCl_3 , se añadieron 1.94 mmol (0.8 eq) del intermediario correspondiente **12b–21b** disuelto en 5 mL de DMF y la reacción se colocó en agitación constante, bajo atmósfera de nitrógeno, a 70 °C.

Pasadas 4 h de reacción, se realizó ccf ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1), 254 nm) y la disolución se colocó en el vacío durante 48 h para retirar el exceso de disolvente. El producto se precipitó con 10 mL de CH_3CN , el sólido se filtró al vacío hasta sequedad.

(**7**: %R: 49, p.f.=233.2-235.7 °C, F_R : 0.47; **8**: %R: 42, p.f.=189.3-191.1 °C, F_R : 0.57; **9**: %R: 57, p.f.=144.1-146.4 °C, F_R : 0.19; **10**: %R: 67, p.f.=254.5-255.3 °C, F_R : 0.38; **11**: %R: 37, p.f.=222.9-224.2 °C, F_R : 0.14; **12**: %R: 48, p.f.=187.4-189.1 °C, F_R : 0.89; **13**: %R: 45, p.f.=247.2-248.1 °C, F_R : 0.85; **14**: %R: 53, p.f.=176.4-178.8 °C, F_R : 0.67; **15**: %R: 32, p.f.=224.3-225.7 °C, F_R : 0.52; **16**: %R: 54, p.f.=189.7-191.8 °C, F_R : 0.54)

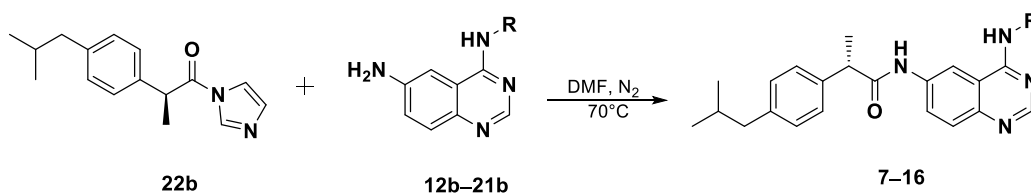


Figura 29. Reacción de formación de los compuestos **7–16**. (**7**: β -alanina, **8**: leucina, **9**: histidina, **10**: PABA, **11**: asparagina, **12**: ácido glutámico, **13**: triptófano, **14**: glutamina, **15**: alanina, **16**: fenilalanina)

Evaluación biológica

Tinción de células

Las líneas celulares que se utilizaron en el proyecto se muestran en la **Tabla 4**. Se indica el órgano del que provienen y el número de pase al inició el trabajo, cabe recalcar que este número de pase no es el mismo que con el que se realizó el ensayo. La elección de las celulares fue debido al índice de EGFR que expresan.¹³⁹

Tabla 4. Líneas celulares de interés farmacológico.

Célula	Tejido	Medio de cultivo	Enfermedad	Pase
AGS	Estómago	F12	Adenocarcinoma	8
A-431	Piel	F12	Adenocarcinoma	8
MCF-7	Mama	DMEM/F12	Adenocarcinoma	15
MDA-MB-231	Mama	DMEM/F12	Adenocarcinoma	12
HaCaT	Piel	DMEM	-	33

La línea celular A-431 sobreexpresa EGFR y es usada como control en ensayos de viabilidad celular que evalúan compuestos que inhiben a EGFR-TKD. La línea AGS, al igual que MCF-7, son líneas celulares que tiene un nivel de expresión intermedio de EGFR. Por otra parte, la línea MDA-MB-231, tiene un nivel de expresión del receptor más bajo en comparación con las células antes mencionadas. Por último, se utilizó como línea celular no tumoral HaCaT, para determinar la potencial toxicidad de los compuestos, y que tiene un nivel de expresión similar a AGS o MCF-7.



Durante el proyecto, las condiciones de crecimiento de las células fueron con medio de cultivo enriquecido con SFB al 10%, sin antibiótico, mientras que la incubación se efectuó a 37 °C y 5% CO₂. El primer experimento fue la tinción de las células con Brilliant Violet 605 clona AY13 (BioLegend) para determinar la cantidad de EGFR disponible y relacionarlo con el valor de intensidad de fluorescencia media (IFM). Este es un parámetro que indica el índice de anticuerpo que se une al receptor. Cabe destacar que el anticuerpo se une en la porción externa de EGFR, no en la que tiene función de tirosinacinas, donde actúan los inhibidores de EGFR-TKD de este proyecto.

A partir de una caja P100 con una confluencia de al menos 85% (la **Tabla 5** indica el número de pase utilizado), se cosecharon todas las células en 1 mL de PBS y se tomó el 50% del pellet. Las células se centrifugaron a las condiciones de cada célula, se retiró el sobrenadante y posteriormente se añadieron 200 µL de PBS. El contenido celular se dividió en dos tubos Eppendorf de 1.5 mL con 100 µL cada uno. A uno de los tubos se le colocaron 2.5 µL de anticuerpo, se homogenizó el contenido y ambos tubos se incubaron durante 30 min en oscuridad a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación, se añadieron 400 µL de PBS, los tubos se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 min, se retiró el sobrenadante y las células se fijaron con 400 µL de PFA al 1%. Los tubos se colocaron a 4 °C y se cubrieron con aluminio hasta el momento de la lectura. En cada ensayo se leyeron al menos 10 000 eventos. Este ensayo se realizó por duplicado para cada línea celular.

Tabla 5. Número de pase de las células para la tinción con antiEGFR.

Línea Celular	Pase
AGS	13
MDA-MB-231	17
MCF-7	21
A-431	12
HaCaT	39

Citotoxicidad en líneas celulares con MTT

Los ensayos se realizaron en placas de 96 pozos a partir de cajas de cultivo P100 con al menos el 80% de confluencia celular. Para obtener el total de las células, se retiró el medio de cultivo de la caja y se lavaron las células con 2 mL de PBS. Posteriormente se retiró el PBS y se añadieron 1.5 mL de verceno. La caja se incubó durante 5 min a 37 °C y 5% CO₂. Las células se colectaron en un tubo Eppendorf y se centrifugaron a las condiciones cada línea celular. El sobrenadante se retiró y se suspendió el pellet con 1 mL de PBS. Las células se centrifugaron nuevamente a las condiciones antes indicadas, se retiró el sobrenadante y el pellet se suspendió con 1 mL del medio de cultivo correspondiente.

Para realizar el conteo de células, se mezclaron 10 µL de células junto con 10 µL de azul de tripano en una cámara de Neubauer. El número de células colocadas en cada pozo se muestra en la **Tabla 6**, además se indica el número pase utilizado en este ensayo.

Tabla 6. Número de células colocadas para el ensayo de viabilidad por el método de MTT.

Línea	Células/Pozo	Pase
AGS	9000	18
MDA-MB-231	12000	21
MCF-7	12000	22
A-431	12000	17
HaCaT	15000	43



Las células se colocaron en placas de 96 pozos y, después de 24 h, se añadieron 100 μL del tratamiento correspondiente de acuerdo con la **Figura 30**. Los compuestos se disolvieron en DMSO y, como control positivo de citotoxicidad, se usó *cis*-platino.

A continuación, se indican las claves con las condiciones de cada tratamiento:

B: medio de cultivo

DMSO: DMSO al 0.1%

0: células sin compuesto

0.01: células + 0.01 μM de compuesto

0.1: células + 0.1 μM de compuesto

1: células + 1 μM de compuesto

10: células + 10 μM de compuesto

100: células + 100 μM de compuesto

CP: células + 25 μM de *cis*-platino

Después de haber colocado el tratamiento, las células se incubaron a 37 $^{\circ}\text{C}$ y 5% CO_2 durante 24 h. Pasado el tiempo de incubación, se añadieron 20 μL de MTT en cada pozo y las células se incubaron durante 3 h. Posterior a la incubación, se retiró el medio de cultivo y se adicionaron 100 μL de DMSO. La determinación de la IC_{50} de **1–16** y gefitinib se realizó por duplicado en cada línea celular.

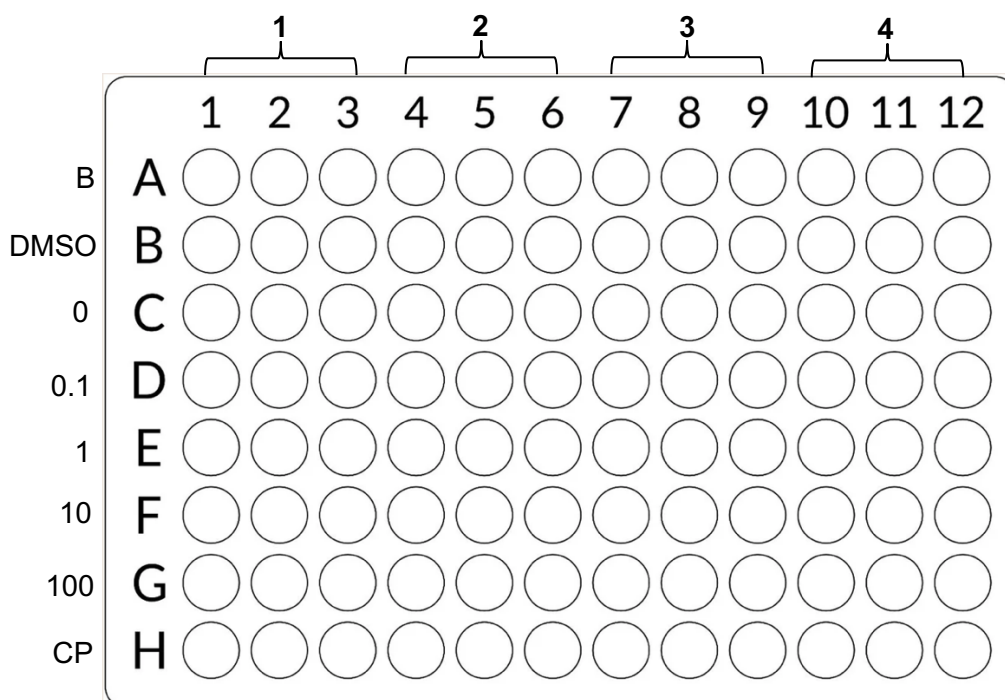


Figura 30. Cada placa se usó para el estudio de 4 compuestos con tres réplicas. En cada placa solo hay un tipo de célula. En A-431 el rango de concentración fue de 0.01 a 10 μM puesto que la IC_{50} está por debajo de 0.1 μM .

Determinación de IC_{50} en EGFR-TKD

La molécula **6** presentó la mayor potencia en células cancerosas y no mostró ser tóxico a 100 μM en células no tumorales (HaCaT), por lo tanto, se usó para obtener la IC_{50} en EGFR-TKD con el kit ADP-Glo (Promega). Se prepararon 300 μL de las disoluciones iniciales de cada compuesto a 5 mM y se disolvieron en DMSO.



Los reactivos y las disoluciones se mantuvieron en hielo durante el experimento. A continuación, se indica el volumen de cada reactivo que se usó para preparar las disoluciones de trabajo, el volumen total está considerado para dos compuestos.

Preparación de la disolución de DTT 1:100:

- 49.5 μL de H_2O
- 0.5 μL de DTT concentrado

Preparación del buffer de cinasa 4x:

- 180 μL de la disolución 5x buffer
- 45 μL de DTT (1:100)
- 2.5 μL de MnCl_2

Preparación de la disolución de cada compuesto:

- 5 μL de la disolución stock 5 mM del compuesto correspondiente
- 25 μL de buffer de cinasa 4x
- 70 μL de H_2O

Se prepararon 5 μL de los compuestos a evaluar. Las concentraciones van de 0.0025 μM a 250 μM . Se utilizó buffer de cinasa 1x para llevar al volumen final.

Preparación de la disolución de cinasa:

- 2.25 μL del receptor EGFR
- 28.2 μL de buffer de cinasa 4x
- 82.2 μL de H_2O

Preparación de la mezcla de sustrato:

- 25 μL de ATP 100 μM
- 50 μL del péptido
- 25 μL de H_2O

Preparación de la disolución de ATP 100 μM :

- 2.5 μL de ATP concentrado
- 22.5 μL de H_2O

Preparación del buffer de cinasa 1x:

- 6.25 μL de DMSO
- 31.25 μL de buffer de cinasa 4x
- 87.5 μL de H_2O

El experimento se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo:

En tubos Eppendorf de 300 μL , se colocaron 2 μL de disolución de cinasa en los tubos G, R y (+), mientras que, a los tubos (-) y B se añadieron 2 μL de H_2O . Posteriormente, se adicionó 1 μL de cada compuesto en los tubos G y R, mientras que, para los tubos (+), (-) y B, se colocaron 1 μL de H_2O . Se mezcló el contenido de cada tubo y se incubó por 10 min en oscuridad. Después de la incubación, se adicionaron 2 μL de la mezcla de sustrato a los tubos G, R, (+) y (-) y, en el tubo B se adicionaron 2 μL de H_2O . El contenido se mezcló durante 60 min. Posterior a la incubación, se agregaron 5 μL de ADP-Glo[®] en los tubos G, R, (+), (-) y, al tubo B, se añadieron 5 μL de H_2O . Los tubos se agitaron durante los 30 min del tiempo de incubación. Al término de la incubación, se adicionaron 10 μL de Kinase Detection[®] a G, R, (+), (-) y 10 μL de H_2O al tubo B, y se incubaron por 45 min en agitación constante.



El volumen en cada tubo es 20 μL . Al finalizar la incubación de los tratamientos, el contenido de los tubos Eppendorf se colocó en una placa de 384 pozos como se muestra en la **Figura 31** y se midió la fluorescencia a 0.5 s. Para cada compuesto se realizó el ensayo por triplicado.

Las claves de los tratamientos se indican a continuación:

B: H_2O

(+): tratamiento sin compuesto

(-): tratamiento sin compuesto sin EGFR

G: concentraciones de gefitinib

R: concentraciones de **6**

50: tratamiento + 50 μM de compuesto

5: tratamiento + 5 μM de compuesto

0.5: tratamiento + 0.5 μM de compuesto

0.05: tratamiento + 0.05 μM de compuesto

0.005: tratamiento + 0.005 μM de compuesto

0.0005: tratamiento + 0.0005 μM de compuesto

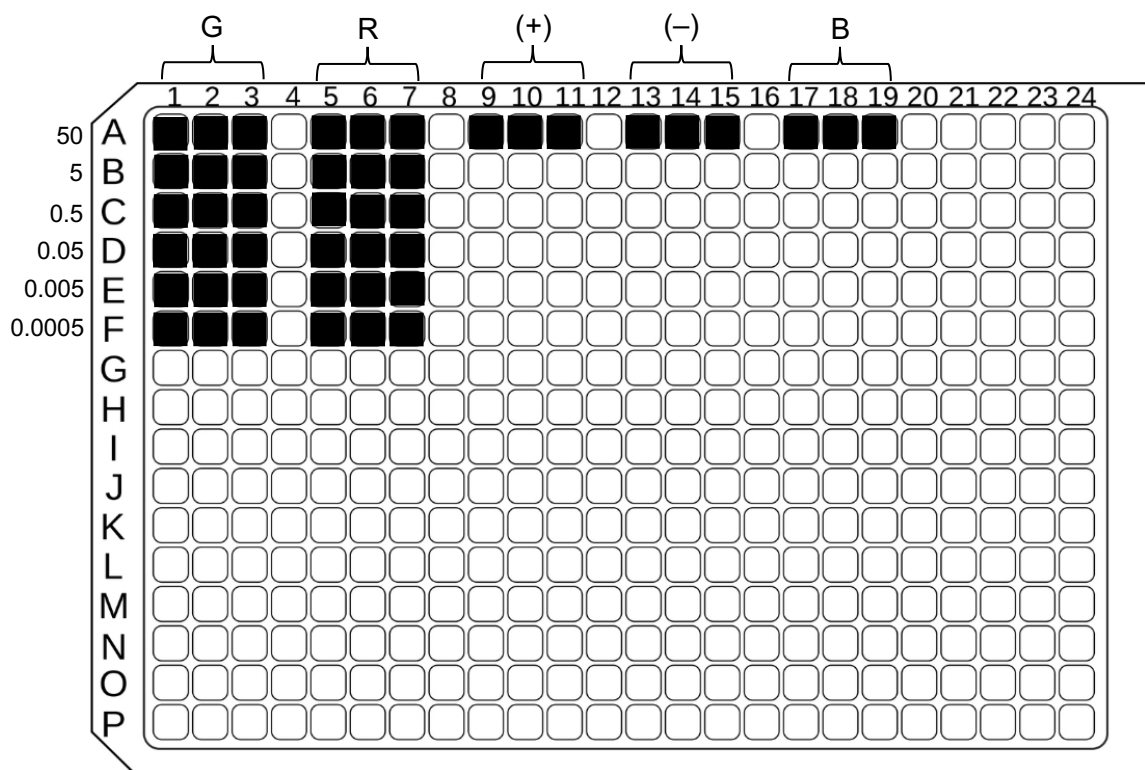


Figura 31. Placa de 384 pozos usada para determinar la IC_{50} de **6** y gefitinib en EGFR-TKD. El rango de concentraciones es de 0.0005 μM a 50 μM . Se toma 1 μL de la concentración correspondiente y se lleva a 5 μL con 2 μL de la disolución de cinasa y 2 μL de la mezcla de sustrato (proporción 1:5). El volumen de ADP-Glo[®] y de Kinase Detection[®] no se toman en cuenta en la concentración final, puesto que no participan en la reacción.



Estudio del tipo de muerte celular

Los compuestos **6** y gefitinib se evaluaron en HaCaT y MDA-MB-231, recordando que, la primera es una línea no tumoral y la segunda, de acuerdo con la tinción con el anticuerpo, mostró ser la línea celular con la menor cantidad de EGFR disponible.

El ensayo se realizó a partir de una caja P100 con al menos 80% de confluencia. Se colectaron las células y se colocó la cantidad correspondiente de acuerdo con la **Tabla 7**, también se indica el número de pase usado. En este ensayo se usó una placa de 6 pozos y 2 cajas P60 por cada línea celular.

Tabla 7. Número de células colocadas por pozo de la caja de 6 pozos y en la caja P60.

Línea celular	Células/Pozo	Células/P60	Pase
MDA-MB-231	400 000	900 000	14
HaCaT	350 000	800 000	41

Después de colocar las células, se incubaron a 37 °C, 5% CO₂ durante 24 h y, pasado el tiempo de incubación, se añadieron los tratamientos tal como se indica en la **Figura 32**. Tanto la placa de 6 pozos como las cajas P60 se incubaron en las condiciones antes mencionadas por un periodo de 48 h.

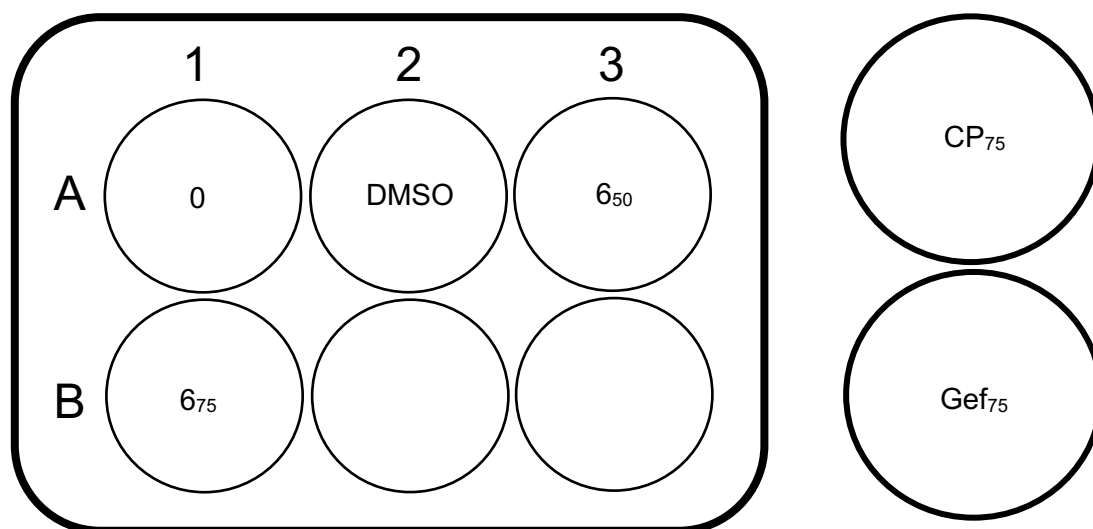


Figura 32. Placa de 6 pozos y cajas P60 usadas para determinar el tipo de muerte celular con AV/PI de **6** y gefitinib en HaCaT y MDA-MB-231. En HaCaT, **6** no presentó toxicidad a 100 μ M, así que se colocó la IC₅₀ a 100 μ M e IC₇₅ a 150 μ M para asegurar la muerte de las células.

Las claves con las características de cada tratamiento son las siguientes:

0: células

DMSO: células + DMSO 0.1%

6₅₀: células + **6** a IC₅₀

6₇₅: células + **6** a IC₇₅

Gef₇₅: células + gefitinib a IC₇₅

CP₇₅: células + *cis*-platino a IC₇₅



En los pozos de la placa se añadieron 2.5 mL y en las cajas P60 5 mL del tratamiento correspondiente. La IC₅₀ e IC₇₅ de los compuestos se determinó previamente en el ensayo de viabilidad celular con MTT, los valores se indican en la **Tabla 8**. El *cis*-platino se usó como control positivo de muerte.

Tabla 8. Valores de IC₅₀ e IC₇₅ de **6**, gefitinib y *cis*-platino en MDA-MB-231 y HaCaT.

Compuesto	MDA-MB-231		HaCaT	
	IC ₅₀ (μM)	IC ₇₅ (μM)	IC ₅₀ (μM)	IC ₇₅ (μM)
6	10.51±0.99	27.27±2.14	>100	>100
gefitinib	17.24±1.48	35.37±6.45	49.63±4.89	79.33±6.78
<i>cis</i> -platino	36.3±3.44	69.82±7.43	22.78±2.25	51.84±3.43

El experimento se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo:

Se programó la centrifuga a 4 °C y se colocaron los tubos Falcon dentro de un recipiente con hielo. Las células de cada tratamiento se cosecharon en tubos Falcon de 15 mL y se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 min. Se retiró el sobrenadante y el pellet se suspendió con 600 μL de PBS. La células se dividieron en tubos Eppendorf de 1.5 mL de acuerdo con el siguiente esquema (11 tubos):

0	1. ST	300 μL
	2. AV/PI	300 μL
DMSO	1. AV/PI	600 μL
	1. AV	200 μL
Gef ₇₅	2. PI	200 μL
	3. AV/PI	200 μL
	1. AV	200 μL
CP ₇₅	2. PI	200 μL
	3. AV/PI	200 μL
	1. AV/PI	600 μL
6 ₇₅	1. AV/PI	600 μL

Nuevamente las células se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 min y se retiró el sobrenadante. A cada tubo se añadieron 25 μL de buffer de Annexina 1x y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min. Mientras transcurrió el tiempo de incubación, se prepararon las disoluciones de tinción.

Preparación de la disolución de buffer de Annexina 1x:

- 480 μL H₂O MilliQ
- 120 μL buffer de Annexina 5x

Preparación de la disolución de Annexina V (AV):

- 57.5 μL buffer de Annexina 1x
- 5 μL Annexina V

Preparación de la disolución de Yoduro de Propidio (PI):

- 60 μL buffer de Annexina 1x
- 2.5 μL Yoduro de Propidio 100 μg/mL



Preparación de la disolución de Annexina V/Yoduro de Propidio (AV/PI):

- 143 µL buffer de Annexina 1x
- 13 µL Annexina V
- 6.5 µL Yoduro de Propidio

Al término de la incubación, se transfirió el contenido de los tratamientos en tubos de citometría y se colocaron en hielo nuevamente. Se añadieron 25 µL de la disolución de tinción correspondiente y los tubos se incubaron a temperatura ambiente durante 20 min. Se agregaron 400 µL de PFA al 1% para fijar las células y se mezcló el contenido de los tubos de citometría. Los tubos se cubrieron con aluminio y se refrigeraron a 4 °C hasta que fueran leídos. Las determinaciones se realizaron por duplicado en cada línea celular.

Inhibición de edema provocado por TPA

En este ensayo, se evaluó a **6**, puesto que mostró el mejor perfil en los ensayos *in vitro* y (S)-ibuprofeno, puesto que, además de ser un fármaco con la actividad biológica de interés, es parte de la estructura de **6**.

El experimento se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo:

En cajas de acrílico transparentes, se colocaron de manera individual, tres ratones macho sepa CD1 por tratamiento (**6** o (S)-ibuprofeno), con un peso de entre 25-30 g. Los animales se mantuvieron a temperatura constante de 24-26 °C, en fotoperiodos de 12 h luz/oscuridad con agua y alimento *ad libitum* de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-199. Los ratones se anestesiaron de forma intraperitoneal con pentobarbital sódico a una dosis 63 mg/Kg y se aplicaron tópicamente, 10 µL de una disolución 0.25 mg/mL de 13-acetato-12-O-tetradecanoil-forbol (TPA) disuelto en EtOH, distribuidos en ambas caras de la oreja derecha. En la oreja izquierda se administraron 10 µL de EtOH únicamente. Después de 10 min, se aplicó de forma tópica, en la oreja derecha, 1 mg del compuesto disuelto en 20 µL de una mezcla MeOH/acetona 1:1, obteniendo una dosis de 1 mg/oreja. Por otra parte, en la oreja izquierda se aplicaron 20 µL de la mezcla de disolventes MeOH/acetona 1:1. Después de 4 h de la aplicación del TPA, los animales se sacrificaron en la cámara de CO₂ y se tomó una biopsia de ambas orejas de 7 mm de diámetro.

El incremento del peso de la biopsia de la oreja derecha con respecto a la oreja izquierda representa el edema formado.

La inhibición del edema se calcula de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de inhibición} = \left(\frac{\text{Control} - \text{Experimento}}{\text{Control}} \right) 100$$

Donde:

Control=Edema del grupo control (TPA)

Experimento=Edema del grupo experimental (TPA + **6** o TPA + (S)-ibuprofeno)

Se analizan los resultados obtenidos mediante una prueba t-Student, considerando los valores $p \leq 0.05$ como significativos. El valor final es el promedio de las tres repeticiones \pm error estándar de la media ($\bar{x} \pm \text{EEM}$).



Dinámica molecular

Con el fin de determinar el tipo interacciones presentes entre **6** en EGFR-TKD y COX-2, y relacionarlas con el efecto citotóxico *in vivo* y antiinflamatorio *in vivo*, se realizó el estudio de dinámica molecular. La metodología se indica a continuación.

Proteína

La estructura de las proteínas EGFR (PDB ID: 4WQK) y COX-2 (PDB ID: 5JW1) se obtuvieron del Protein Data Bank y se prepararon con UCSF Chimera.¹³⁷ En EGFR-TKD, los átomos faltantes se añadieron utilizando la biblioteca Dunbrack 2010.¹⁴⁰ Los hidrógenos se agregaron a la estructura, considerando los estados de protonación de los aminoácidos a pH fisiológico (7.2 ± 0.2) y la interacción de los enlaces de hidrógeno obtenidas en el acoplamiento molecular. En EGFR-TKD se modificó el estado de protonación de M793 y, en el caso de COX-2, el residuo S531, con el fin de generar los sistemas de simulación. Se retiraron las moléculas de agua, MES, NA y los ligandos cocrystalizados.

Ligando

Los ligandos se prepararon con el software Avogadro¹⁴¹ utilizando el campo de fuerza universal (UFF) y se sometieron a la optimización geométrica y minimización de energía en el nivel B3LYP/6-31G con Gaussian 16.¹⁴² Finalmente, las cargas parciales, calculadas con el método AM1-BCC y la topología de los ligandos, se generaron con el servidor ACPYPE.¹⁴³

Simulación de dinámica molecular

Se simularon los sistemas [6/EGFR-TKD], [gefitinib/EGFR-TKD], [6/COX-2] e [ibuprofeno/COX-2] durante 50 ns, utilizando el campo de fuerza AMBER14SB, implementado en el software GROMACS 2019.¹⁴⁴ La elección de las condiciones usadas en la dinámica fueron tomadas de las referencias bibliográficas citadas. Los sistemas se solvataron con moléculas de agua TIP3P en una caja cúbica que se extendía al menos 1.0 nm en la proteína. Se agregaron aleatoriamente iones Na^+ y Cl^- para neutralizar los sistemas y alcanzar una concentración de 0.15 M. Cada sistema se minimizó energéticamente y se equilibró la energía durante 1.0 ns en conjuntos canónicos (NVT) e isotérmico-isobáricos (NPT) antes de ejecutar la dinámica molecular.¹⁴⁵ Se aplicaron restricciones holonómicas a todos los enlaces con átomos de hidrógeno, utilizando el algoritmo LINCS de GROMACS 2019 (LINCS es un algoritmo que restablece las longitudes de los enlaces a sus valores correctos después de una actualización no restringida. El método es no iterativo y solo se puede utilizar con restricciones de enlace y restricciones de ángulo aisladas, como el ángulo de protones en OH. Debido a su estabilidad, LINCS es especialmente útil para la dinámica browniana). La temperatura se fijó en 300 K con el termostato de acoplamiento v-rescale, mientras que la presión se mantuvo en 1.0 bar con el baróstato Parrinello-Rahman.¹⁴⁶ El radio de corte del potencial de Lennard-Jones se limitó a 1.2 nm. Las interacciones electrostáticas de corto alcance (Coulombic) se establecieron en 1.2 nm y se utilizó el método Ewald de malla de partículas (PME) para las interacciones electrostáticas de largo alcance.¹⁴⁷

Análisis y visualización

El RMSD de los ligandos, después del ajuste por mínimos cuadrados, el número de enlaces de hidrógeno principales (Q), el tipo de contacto entre el ligando y las proteínas (OF), el factor B de estabilidad de los ligandos, junto con el análisis de agrupamiento basado en el RMSD, se generaron con las herramientas integradas de GROMACS 2019. Los enlaces de agua e hidrógeno se calcularon con scripts internos de Python utilizando las bibliotecas MDAnalysis.¹⁴⁸

Los gráficos se construyeron con Gnuplot v5.0¹⁴⁹ y las figuras se generaron con PyMOL v1.7.

Se consideró como un sistema válido a un rango de RMSD menor a 3.0 nm, una estabilidad del ligando con un $\Delta_{\text{FactorB}} \leq 150 \text{ \AA}$, un valor de Q mayor a 0.1 y, en el caso del tipo de interacción entre el ligando y el aminoácido, una proporción OF mayor a 0.05.



Resultados y análisis

Acoplamiento molecular

Para determinar si el protocolo de acoplamiento era confiable, se superpuso la estructura del ligando cristalizado con la diana farmacológica y la estructura construida para el acoplamiento, posteriormente, se determinó el RMSD entre ambas estructuras.

En el caso de EGFR-TKD (PDB ID: 4WKQ) se encuentra cristalizado con gefitinib, mientras que, para COX-2 (PDB ID: 5JW1) se encuentra está cristalizada con celecoxib. En EGFR-TKD el valor de RMSD fue de 0.756 Å. Por otra parte, en COX-2, se obtuvo un valor de 0.525 Å. En ambos casos, el valor es menor a 2.0 Å, valores por debajo de este número hacen que se considere el protocolo como válido.

De acuerdo con la **Figura 33**, en EGFR-TKD, ambas estructuras de gefitinib se encuentran superpuestas, con diferencia del fragmento de morfolina, que era de esperarse debido a los grados de libertad que poseen los átomos con hibridación sp^3 . Debido a lo anterior, la porción de la morfolina hace que la estructura adquiera mayor movilidad y que el valor de RMSD aumente. Por otra parte, en COX-2, se puede observar como las estructuras del celecoxib se encuentran superpuestas en prácticamente todos los átomos, solo con una ligera desviación en la porción del *p*-tolil.

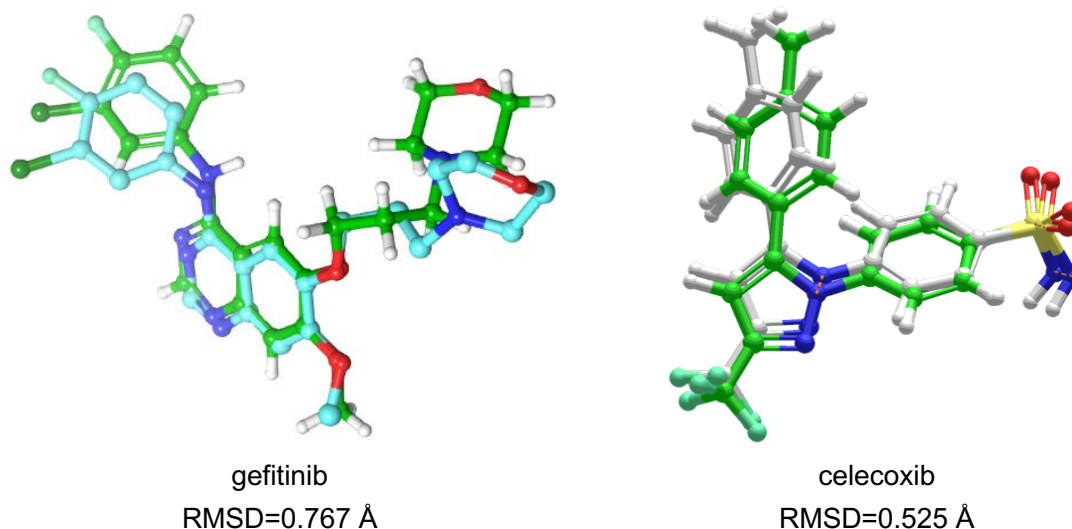


Figura 33. Estructura de gefitinib en EGFR-TKD y celecoxib en COX-2. La estructura cristalizada de gefitinib se muestra en azul y del producto de acoplamiento en verde. En el caso del celecoxib, la estructura cristalizada se encuentra en gris y del producto de acoplamiento en verde.

Como los resultados de la validación mostraron que el protocolo es confiable, se procedió a realizar el acoplamiento molecular. De las moléculas que fueron diseñadas inicialmente, los compuestos **1–16** cumplieron el criterio de $\Delta G \leq -6.0$ kcal/mol en EGFR-TKD y $\Delta G \leq -5.0$ kcal/mol para COX-2. Las imágenes de todos los acoplamientos se encuentran en el **Anexo II**.

Los resultados en EGFR-TKD se muestran en la **Tabla 9**. Se indica el número del clúster, el valor de ΔG , la eficiencia de ligando (EL) y las principales interacciones con el receptor. El gefitinib se usó como molécula control. Se puede notar que la mayoría de los ligandos tienen interacción por enlace de hidrógeno con M793, contacto esencial para inhibir EGFR-TKD. También se observa otra interacción con K745, que se mantiene con la mayoría de los ligandos de la **Serie b**, al igual que con gefitinib. En el caso de la energía de unión, gefitinib obtuvo un valor de -8.12 kcal/mol, siendo la molécula **6** con un valor de -7.85 kcal/mol, la que presentó el perfil energético más cercano al fármaco de referencia.



Tabla 9. Resultados del acoplamiento molecular en EGFR-TKD. HA: átomos pesados

	Molécula	ΔG (kcal/mol)	EL ($\Delta G/HA$)	Clúster	Interacciones
a	1	-6.11	-0.211	21	K745, E762, M793
	2	-6.85	-0.236	27	M793 , T854
	3	-6.22	-0.230	15	M793
	4	-6.66	-0.245	19	K745, M793
	5	-7.12	-0.223	15	M793 , D800, T854
	6	-7.85	-0.247	22	E762, M793
b	7	-6.29	-0.203	10	K745, M793
	8	-6.73	-0.198	11	M793
	9	-6.75	-0.188	11	K745, D837
	10	-6.81	-0.195	28	K745
	11	-7.03	-0.206	16	K745, N842, G857
	12	-6.46	-0.185	13	K745, M793
	13	-7.34	-0.179	5	K745, D855
	14	-6.18	-0.177	11	K745, G857
	15	-6.62	-0.214	38	K745, M793
	16	-6.78	-0.183	11	K745, M793
	gefitinib	-8.12	-0.262	30	K745, L788, M793

Como **6** obtuvo el mejor perfil energético, en la **Figura 34** se muestran las interacciones presentes con EGFR-TKD. Se observa un doble enlace de hidrógeno entre K762 con la amina de β -alanina, por lo que evidencia la importancia de incluir un grupo funcional, que a pH fisiológico, pueda donar un hidrógeno. También se observa un segundo doble enlace de hidrógeno entre M793 con el N1 y con el grupo amino en 2. Algo a destacar en la **Serie a**, son las moléculas **2**, **4** y **6**, que fueron construidas con el isómero S del ibuprofeno y estas mostraron un mejor perfil energético que las moléculas **1**, **3** y **5**, donde se usó la mezcla racémica del fármaco, lo que indica la importancia del carbono estereogénico.

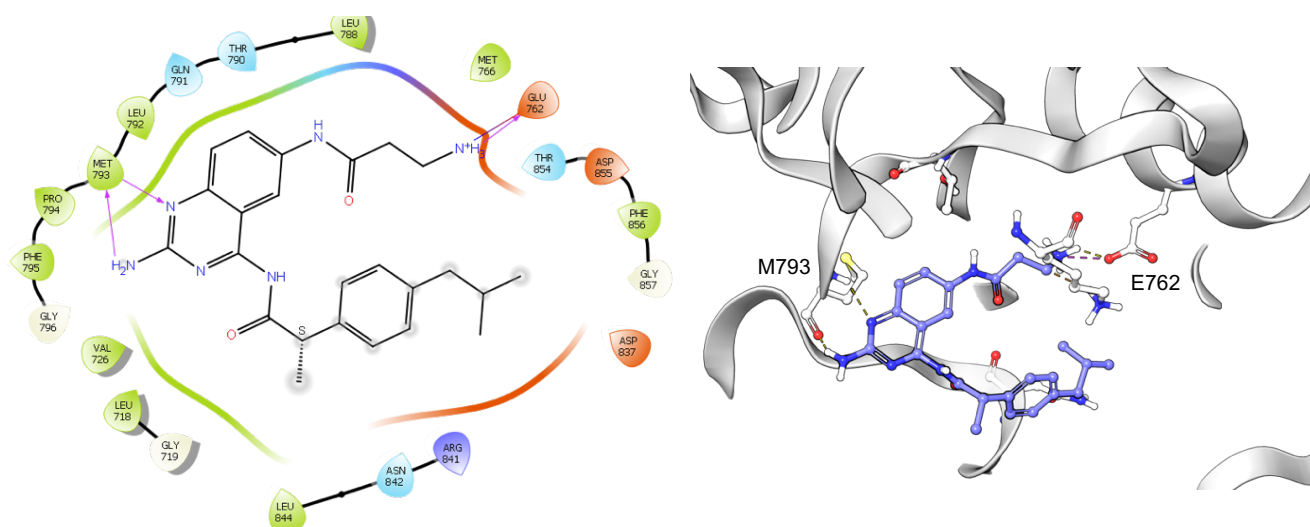


Figura 34. Acoplamiento molecular de **6** en EGFR-TKD.

El conjunto de interacciones que presenta **6** se traduce en un mejor perfil energético. En comparación, el acoplamiento con la molécula **14**, muestra que, aunque se conservan las interacciones con K745 y G857, no hay interacción con M793 (**Figura 35**). Como resultado, **14** tiene el perfil energético más discreto con un valor de -6.18 kcal/mol. El valor ΔG indicaría que la interacción con el receptor está menos favorecida.

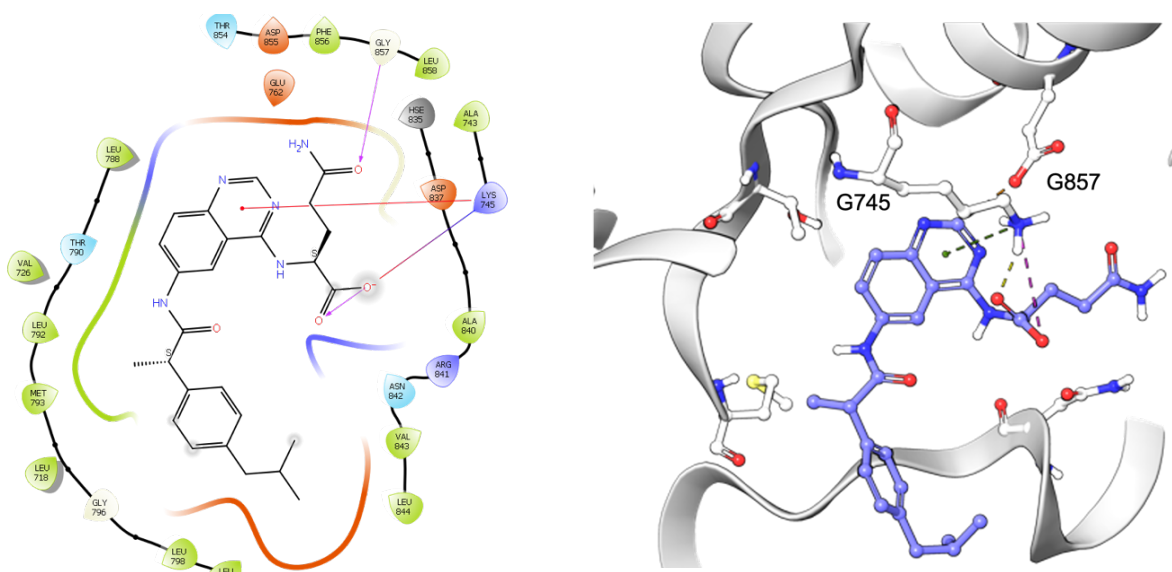


Figura 35. Acoplamiento molecular de **14** en EGFR-TKD.

Con respecto a la eficiencia de ligando, cabe recalcar que, de acuerdo con Kaaksma y col.,¹⁵⁰ un valor de $EL \geq -0.3$ kcal/mol/HA indica que un compuesto puede ser considerado como un “hit”.

La eficiencia de ligando es la aportación que cada átomo de una molécula, tiene en la energía de unión. Por ello se busca que moléculas más grandes, tengan asociados valores de ΔG mayores, pues significa que cada átomo tiene una contribución relevante en la energía de unión y, por ende, todos los fragmentos de la molécula son esenciales para la interacción con el receptor. Caso contrario, cuando una molécula tiene un tamaño grande y una ΔG baja, se traduce en que cada átomo tiene una contribución pobre en relación a la interacción con el receptor. En este supuesto, habría átomos que no son esenciales para interactuar con la diana farmacológica, por lo que debe realizarse la optimización del ligando.¹⁵¹

En el caso de las moléculas de este proyecto, todas presentaron valores mayores a -0.3 kcal/mol/HA, por lo que, en principio, ninguna puede ser considerada como “hit” y deberían optimizarse antes de continuar con su evaluación. Sin embargo, se puede observar que, así como las moléculas de este proyecto, gefitinib tampoco tiene un valor igual o menor a -0.3 kcal/mol/HA. El compuesto **6** sigue conservando el mejor perfil energético, pues tiene el valor EL más negativo de toda la serie y, por tanto, los átomos en esta molécula tienen mayor contribución al ΔG . De igual manera que con la ΔG , **14** tiene el valor EL menos negativo de la serie, por lo que los átomos de este compuesto tienen baja contribución en la interacción con EGFR-TKD y hay diversas porciones de la molécula que no son esenciales. De acuerdo con el EL, los ligandos de este proyecto deberían modificarse, puesto que la contribución de los átomos, con respecto a la energía de unión con EGFR-TKD, es baja. No obstante, hay que considerar que ciertas porciones tienen otros propósitos como la adición de aminoácidos, que mejora la solubilidad acuosa, o la integración del ibuprofeno, que aporta el efecto antiinflamatorio *in vivo*, como se muestra más adelante. También debe tenerse en cuenta que la EL de la **Tabla 9** únicamente involucra el acoplamiento con EGFR-TKD. En el caso de que los ligandos fueran optimizados deberían tomarse en cuenta otros parámetros, como por ejemplo, la eficiencia lipofílica de ligando (ELL).¹⁵²



También se realizó el acoplamiento en COX-2. Los resultados se encuentran en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Resultados del acoplamiento molecular en COX-2. HA: átomos pesados

	Molécula	ΔG (kcal/mol)	EL ($\Delta G/HA$)	Clúster	Interacciones
a	1	-5.94	-0.205	24	V117, S120, R514
	2	-6.20	-0.214	40	S120, R514, E525
	3	-5.71	-0.211	18	S120, E525
	4	-5.76	-0.213	36	E525
	5	-5.73	-0.179	35	L353, R514, S531
	6	-6.59	-0.206	28	Y386, L353, G527, S531
b	7	-5.52	-0.178	17	M523
	8	-5.88	-0.173	14	L353, Y386, S531
	9	-6.34	-0.176	14	V117, R121
	10	-5.43	-0.155	25	S120, R121
	11	-5.77	-0.169	23	L353, TY386, M523, S531
	12	-5.64	-0.161	13	S531
	13	-5.46	-0.133	10	L353, S531
	14	-6.23	-0.178	20	Q193, I518, F519, S531
	15	-5.09	-0.164	19	GQ351
	16	-5.41	-0.146	12	S531 , G520
	(S)-ibuprofeno	-3.59	-0.239	35	Y386, S531

Como la interacción con S531 es esencial en COX-2, de acuerdo con la tabla anterior, se puede observar que varios ligandos presentan este contacto mediante enlace de hidrógeno. También tienen interacción con V117, S120, R121, L353 y/o E525. En este estudio se observa mayor variabilidad en cuanto a las interacciones en el sitio de unión. La **Figura 36** muestra el acomodo y las interacciones entre **6** y COX-2, pues presentó el mejor perfil energético con -6.59 kcal/mol, siendo más favorable incluso que (S)-ibuprofeno, con -3.59 kcal/mol. Se observa un enlace de hidrógeno entre S531 y el oxígeno del carbonilo en posición 4. También un doble enlace de hidrógeno entre L353 con la amina y amida de la β -alanina y un enlace de hidrógeno entre la amina en posición 2 con G527.

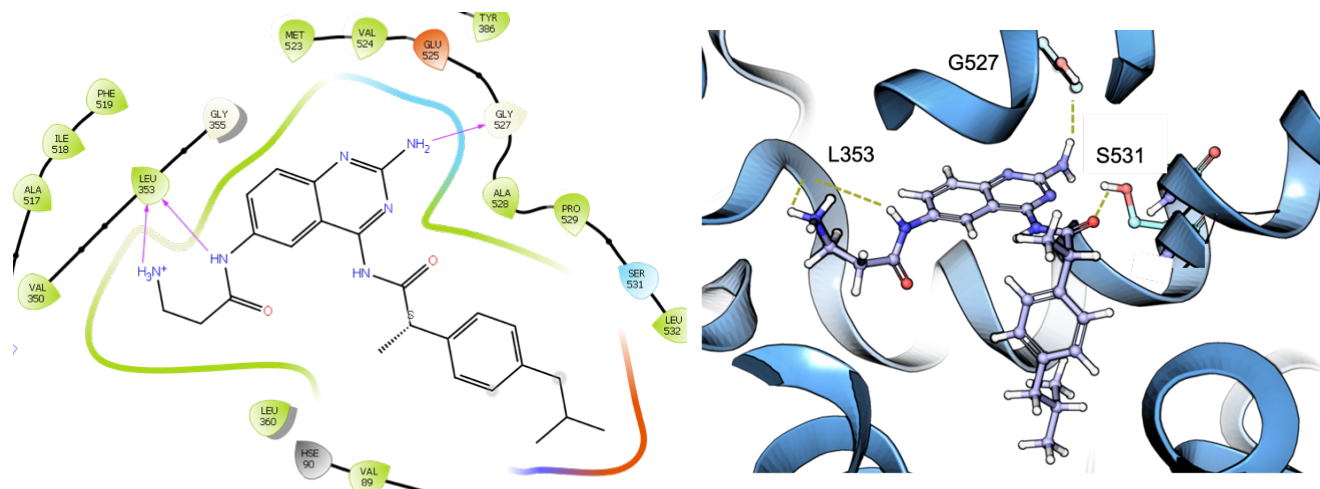


Figura 36. Acoplamiento molecular de **6** en COX-2.

En general, todos los ligandos mostraron una energía de unión más favorable al (S)-ibuprofeno. De toda la serie, la molécula **15** obtuvo el valor menos negativo de ΔG y solo presentó una interacción entre la Q351 y el oxígeno del carbonilo en posición 4 de la quinazolina, además de no presentar la interacción con S531 (**Figura 37**). Adicionalmente, la **Serie a** muestra que los ligandos con el isómero S de ibuprofeno (**2**, **4**, y **6**), presentan una ΔG más favorable que los que contienen la mezcla racémica, por lo que, nuevamente, se evidencia la importancia del centro estereogénico.

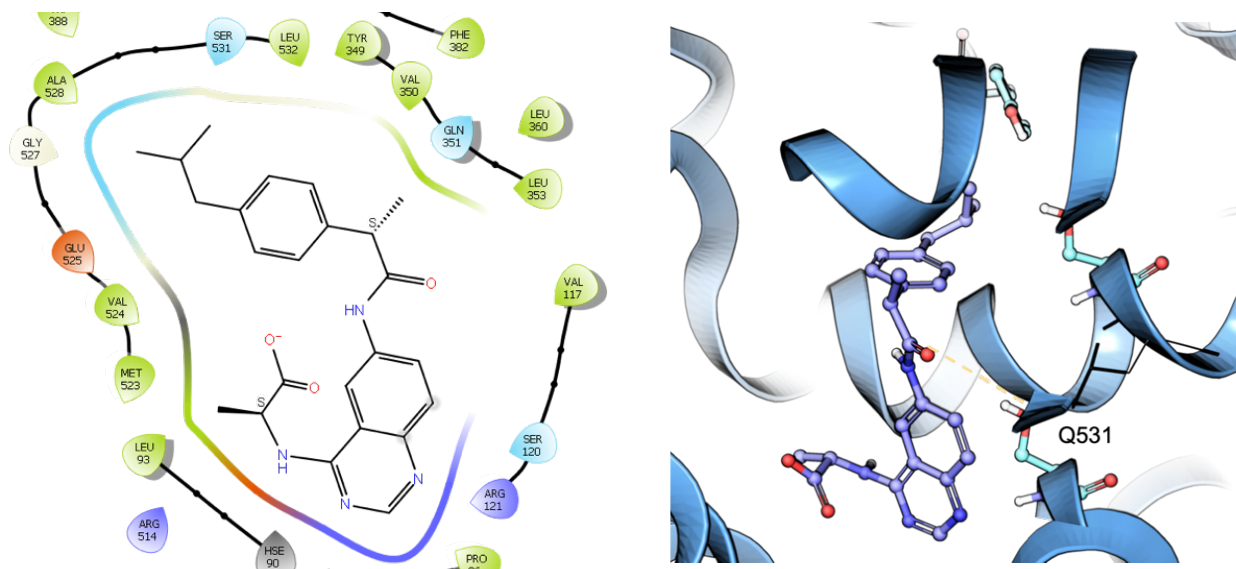


Figura 37. Acoplamiento molecular de **15** en COX-2.

Haciendo uso de la eficiencia del ligando, en la **Tabla 10** se muestra que, de igual manera que en EGFR-TKD, todos los ligandos, incluyendo al (S)-ibuprofeno, tienen valores menos negativos a -0.3 kcal/mol/HA, por lo que la contribución de los átomos a la energía de unión es limitada. De acuerdo con ésta aseveración, las moléculas de la **Serie a** tienen valores más negativos de EL comparado con la **Serie b**, por lo que es mayor la contribución energética por parte de los átomos en las moléculas de la **Serie a**. De todas las moléculas, **2** obtuvo el valor EL más negativo, aunque se encuentra lejos del resultado del (S)-ibuprofeno. Por el contrario, **13** tiene el valor EL menos negativo, lo que indica que hay diversas porciones de la molécula que no contribuyen a la interacción con el receptor de manera eficiente. En el caso de **6**, que obtuvo el valor ΔG más negativo, no concuerda con lo mostrado respecto a la eficiencia de ligando, donde si bien, se encuentra entre las moléculas con EL más negativo, no todos los átomos que componen esta molécula contribuyen a la energía de unión.

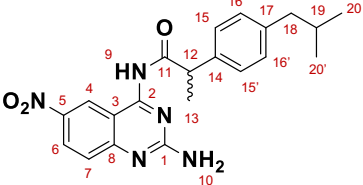
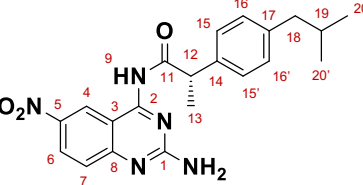
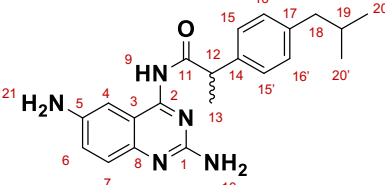
En el estudio sobre COX-2, con respecto a los valores de EL, también se observa que la estructura de los ligandos podría optimizarse, pues hay fragmentos de las moléculas que no aportan energía a la interacción con el receptor de forma significativa. Sin embargo, así como con EGFR-TKD, ciertos fragmentos, como los aminoácidos, se añadieron para mejorar la solubilidad acuosa. De igual manera, otros parámetros como ELL o LogP, podrían aportar mayor información para optimizar los ligandos.



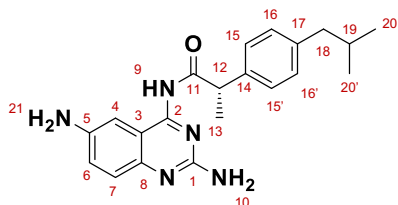
Síntesis

La caracterización de las moléculas **1–16** por la técnica de infrarrojo (IR), resonancia magnética nuclear (RMN) de hidrógeno, carbono 13 y por espectrometría de masas (EM), se encuentran en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Caracterización espectroscópica y espectrométrica de los compuestos **1–16**.

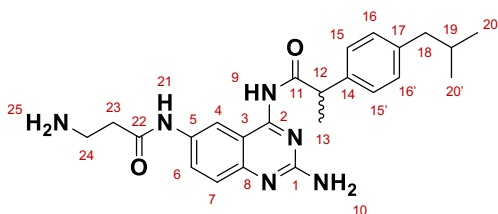
Molécula	Caracterización
 <p>1: N-(2-amino-6-nitroquinazolin-4-yl)-2-(4-isobutilfenil)propanamida</p>	<ul style="list-style-type: none"> EM-APCI (m/z): C₂₁H₂₃N₅O₃ (393.18 g/mol) [M+H]⁺=394.187 IR-ATR (cm⁻¹): 3266, 3129(NH₂); 2967, 1499 (C-N); 1618, 815, 788 (C=C); 1592 (C=O); 1571, 844 (C=N); 1432 (CH₃); 1329, 1281 (C-NO₂); 748, 730 (CH₂) RMN-¹³C (400 MHz, DMSO-<i>d</i>₆) δ (ppm): 172.6 (C₁₁), 165.6 (C₂), 157.4 (C₁₄), 154.9 (C₁₇), 142.3 (C₁), 139.4 (C₅), 138.9 (C₈), 128.8 (C₁₅), 127.3 (C_{15'}), 127.2 (C₁₆), 126.8 (C_{16'}), 123.9 (C₆), 121.4 (C₇), 110.9 (C₃), 103.3 (C₄), 44.9 (C₁₉), 44.2 (C₁₈), 29.5 (C₁₂), 22.1 (C_{20-20'}), 18.5 (C₁₃) RMN-¹H (400 MHz, DMSO-<i>d</i>₆) δ (ppm): 1.55 (H_{20-20'}) (d, J=8.0 Hz, 6H); 2.10 (H₁₃) (d, J=4.0 Hz, 3H); 3.11 (H₁₉) (m, J=8.0 Hz, 1H); 3.23 (H₁₈) (d, J=2.0 Hz, 2H); 4.97 (H₁₂) (dd, J=4.0 Hz, 4.0 Hz, 1H); 7.80 (H_{16-16'}) (d, J=8.0 Hz, 2H); 8.02 (H_{15-15'}) (d, J=8.0 Hz, 2H); 8.31 (H₇) (d, J=12.0 Hz, 1H); 8.82 (H₁₀) (sa, 2H); 9.11 (H₆) (dd, J=8.0 Hz, 12 Hz, 1H); 9.23 (H₄) (d, J=4.0 Hz, 1H); 11.02 (H₉) (s, 1H)
 <p>2: (S)-N-(2-amino-6-nitroquinazolin-4-yl)-2-(4-isobutilfenil)propanamida</p>	<ul style="list-style-type: none"> EM-APCI (m/z): C₂₁H₂₃N₅O₃ (393.18 g/mol) [M+H]⁺=394.187 IR-ATR (cm⁻¹): 3330, 3122 (NH₂); 2953, 1499 (C-N); 1618, 815, 786 (C=C); 1592 (C=O), 1570, 844 (C=N); 1433 (CH₃), 1328, 1281 (C-NO₂), 747, 730 (CH₂) RMN-¹³C (400 MHz, DMSO-<i>d</i>₆) δ (ppm): 172.6 (C₁₁), 163.6 (C₂), 157.4 (C₁₄), 155.0 (C₁₇), 142.3 (C₁), 139.4 (C₅), 138.9 (C₈), 128.8 (C₁₅), 127.3 (C_{15'}), 127.2 (C₁₆), 126.8 (C_{16'}), 121.4 (C₆), 121.7 (C₇), 110.9 (C₃), 102.7 (C₄), 45.1 (C₁₉), 44.2 (C₁₈), 29.5 (C₁₂), 22.1 (C_{20-20'}), 18.5 (C₁₃) RMN-¹H (400 MHz, DMSO-<i>d</i>₆) δ (ppm): 1.55 (H_{20-20'}) (d, J=8.0 Hz, 6H); 2.10 (H₁₃) (d, J=8.0 Hz, 3H); 3.11 (H₁₉) (m, J=8.0 Hz, 1H); 3.24 (H₁₈) (d, J=4.0 Hz, 2H); 4.98 (H₁₂) (dd, J=4.0 Hz, 4.0 Hz, 1H); 7.80 (H_{16-16'}) (d, J=4.0 Hz, 2H); 8.01 (H_{15-15'}) (d, J=8.0 Hz, 2H); 8.31 (H₇) (d, J=12.0 Hz, 1H); 8.81 (H₁₀) (sa, 2H); 9.11 (H₆) (dd, J=8.0 Hz, 12 Hz, 1H); 9.24 (H₄) (d, J=4.0 Hz, 1H); 11.02 (H₉) (s, 1H)
 <p>3: N-(2,6-diaminoquinazolin-4-yl)-2-(4-isobutilfenil)propanamida</p>	<ul style="list-style-type: none"> EM-APCI (m/z): C₂₁H₂₅N₅O (363.21 g/mol) [M+H]⁺=364.214 IR-ATR (cm⁻¹): 3343, 3212, 3108 (NH₂); 2954, 1496 (C-N); 1645, 817, 763 (C=C); 1586 (C=O); 1524, 916 (C=N), 1425 (CH₃), 763, 729 (CH₂) RMN-¹³C (400 MHz, DMSO-<i>d</i>₆) δ (ppm): 175.7 (C₁₁), 162.4 (C₂), 161.3 (C₁₄), 153.9 (C₁₇), 150.9 (C₁), 143.4 (C₅), 139.4 (C₈), 131.3 (C₁₈), 128.7 (C₁₅), 127.2 (C_{15'}), 124.0 (C₁₆), 123.7 (C_{16'}), 117.8 (C₆), 113.2 (C₇), 105.0 (C₃), 102.8 (C₄), 46.3 (C₁₉), 44.2 (C₁₈), 29.6 (C₁₂), 20.1 (C_{20-20'}), 18.5 (C₁₃) RMN-¹H (400 MHz, DMSO-<i>d</i>₆) δ (ppm): 0.84 (H_{20-20'}) (d, J=6.64 Hz, 6H); 1.35 (H₁₃) (d, J=7.0 Hz, 3H); 1.79 (H₁₉) (m, J=6.72 Hz, 1H); 2.39 (H₁₈) (d, J=7.12 Hz, 2H); 4.11 (H₁₂) (sa, 1H); 5.21 (H₂₁) (s, 2H); 7.29 (H_{15-15'}) (d, J=7.92 Hz, 2H); 7.08 (H_{16-16'}) (d, J=8.16 Hz, 2H); 7.09 (H₆) (d, J=2.42 Hz, 1H); 7.26 (H₇) (dd, J=7.88 Hz, 1H); 7.27 (H₄) (d, J=7.56 Hz, 1H); 8.51 (H₁₀) (s, 2H); 10.22 (H₉) (s, 1H)





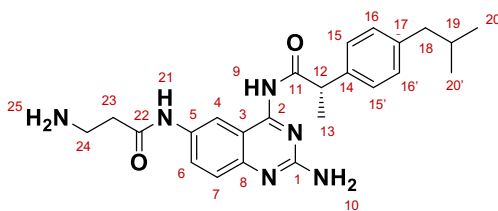
4: (S)-N-(2,6-diaminoquinazolin-4-yl)-2-(4-isobutilfenil)propanamida

- EM-APCI (m/z): C₂₁H₂₅N₅O (363.21 g/mol) [M+H]⁺=364.213
- IR-ATR (cm⁻¹): 3329, 3214, 3054 (NH₂); 2953, 1502 (C-N); 1644, 827, 757 (C=C); 1585 (C=O); 1524, 899 (C=N), 1421 (CH₃), 757, 721 (CH₂)
- RMN-¹³C (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 174.2 (C₁₁), 162.5 (C₂), 161.7 (C₁₄), 153.4 (C₁₇), 149.6 (C₁), 139.6 (C₅), 138.5 (C₈), 130.0 (C₁₈), 128.9 (C₁₅), 127.2 (C_{15'}), 124.1 (C₁₆), 124.0 (C_{16'}), 117.3 (C₆), 112.9 (C₇), 105.2 (C₃), 103.2 (C₄), 44.6 (C₁₉), 44.2 (C₁₈), 29.6 (C₁₂), 22.1 (C_{20-20'}), 18.3 (C₁₃)
- RMN-¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1.56 (H_{20-20'}) (d, J=8.0 Hz, 6H); 2.10 (H₁₃) (d, J=8.0 Hz, 3H); 3.10 (H₁₉) (m, J=8.0 Hz, 1H); 3.22 (H₁₈) (d, J=4.0 Hz, 2H); 4.88 (H₁₂) (sa, 1H); 6.19 (H₂₁) (s, 2H); 7.80 (H_{15-15'}) (d, J=2.0 Hz, 2H); 7.86 (H_{16-16'}) (d, J=8.0 Hz, 2H); 7.88 (H₆) (dd, J=8.0 Hz, 12.0 Hz, 1H); 7.92 (H₇) (d, J=8.0 Hz, 1H); 8.20 (H₄) (d, J=12.0 Hz, 1H); 8.81 (H₁₀) (s, 2H); 10.21 (H₉) (s, 1H)



5: 3-amino-N-(2-amino-4-(2-(4-isobutilfenil)propanamido)quinazolin-6-yl)propanamida

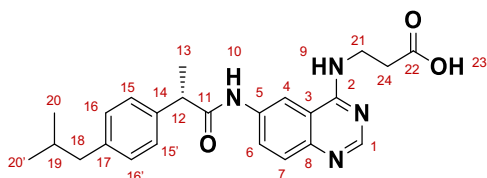
- EM-APCI (m/z): C₂₄H₃₀N₆O₂ (434.24 g/mol) [M+H]⁺=435.244
- IR-ATR (cm⁻¹): 3339, 3211, 3091 (NH₂); 2957, 1494 (C-N); 1650, 825, 758 (C=C); 1592 (C=O); 1515, 894 (C=N), 1419 (CH₃), 758, 729 (CH₂)
- RMN-¹³C (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 176.0 (C₁₁), 175.4 (C₂₂), 162.4 (C₂), 161.3 (C₁₄), 154.3 (C₁₇), 151.0 (C₁), 142.3 (C₅), 137.8 (C₈), 128.9 (C₁₅), 128.8 (C_{15'}), 127.2 (C₁₆), 127.1 (C_{16'}), 118.0 (C₆), 113.2 (C₇), 104.2 (C₃), 102.8 (C₄), 44.7 (C₁₉), 44.5 (C₁₈), 44.2 (C₂₃), 44.2 (C₂₄), 29.6 (C₁₂), 22.2 (C_{20-20'}), 18.5 (C₁₃)
- RMN-¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 0.84 (H_{20-20'}) (d, J=8.0 Hz, 6H); 1.34 (H₁₃) (d, J=8.0 Hz, 3H); 1.79 (H₁₉) (m, J=8.0 Hz, 1H); 2.41 (H₂₃) (t, J=8.0 Hz, 8.0 Hz, 2H); 3.28 (H₁₈) (d, J=8.0 Hz, 2H); 3.60 (H₂₄) (dd, J=2.0 Hz, 2.0 Hz, 2H); 4.13 (H₁₂) (sa, 1H); 5.55 (H₂₅) (s, 2H); 7.14 (H_{15-15'}) (d, J=8.0 Hz, 2H); 7.15 (H₁₀) (s, 2H); 7.15 (H₆) (dd, J=4.0 Hz, 4.0 Hz, 1H); 7.17 (H_{16-16'}) (d, J=4.0 Hz, 2H); 7.30 (H₇) (d, J=8.0 Hz, 1H); 7.90 (H₄) (d, J=8.0 Hz, 1H); 8.33 (H₂₁) (s, 1H); 10.22 (H₉) (s, 1H)



6: (S)-3-amino-N-(2-amino-4-(2-(4-isobutilfenil)propanamido)quinazolin-6-yl)propanamida

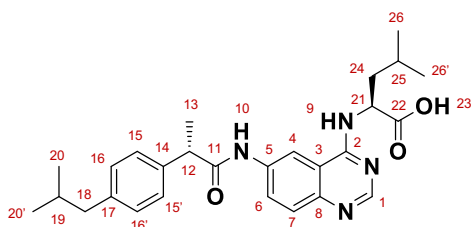
- EM-APCI (m/z): C₂₄H₃₀N₆O₂ (434.24 g/mol) [M+H]⁺=435.243
- IR-ATR (cm⁻¹): 3338, 3214, 3124, (NH₂); 2953, 1461 (C-N); 1644, 823, 764 (C=C); 1586, 1567 (C=O); 1510, 881 (C=N); 1420 (CH₃); 764, 722 (CH₂)
- RMN-¹³C (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 175.4 (C₁₁), 173.1 (C₂₂), 163.1 (C₂), 161.5 (C₁₄), 150.3 (C₁₇), 145.9 (C₁), 139.5 (C₅), 138.5 (C₈), 128.9 (C₁₅), 128.8 (C_{15'}), 127.2 (C₁₆), 127.1 (C_{16'}), 123.8 (C₆), 113.1 (C₇), 104.7 (C₃), 102.9 (C₄), 44.9 (C₁₉), 44.6 (C₁₈), 44.3 (C₂₃), 44.2 (C₂₄), 29.6 (C₁₂), 22.1 (C_{20-20'}), 18.5 (C₁₃)
- RMN-¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 0.84 (H_{20-20'}) (d, J=8.0 Hz, 6H); 1.33 (H₁₃) (d, J=8.0 Hz, 3H); 1.80 (H₁₉) (m, J=8.0 Hz, 1H); 2.39 (H₂₃) (t, J=8.0 Hz, 8.0 Hz, 2H); 3.37 (H₁₈) (d, J=8.0 Hz, 2H); 3.63 (H₂₄) (dd, J=2.0 Hz, 2.0 Hz, 2H); 4.23 (H₁₂) (sa, 1H); 5.35 (H₂₅) (s, 2H); 7.09 (H_{15-15'}) (d, J=8.0 Hz, 2H); 7.09 (H₁₀) (s, 2H); 7.10 (H₆) (dd, J=4.0 Hz, 4.0 Hz, 1H); 7.17 (H_{16-16'}) (d, J=8.0 Hz, 2H); 7.37 (H₇) (d, J=8.0 Hz, 1H); 7.65 (H₄) (d, J=8.0 Hz, 1H); 8.78 (H₂₁) (s, 1H); 10.21 (H₉) (s, 1H)





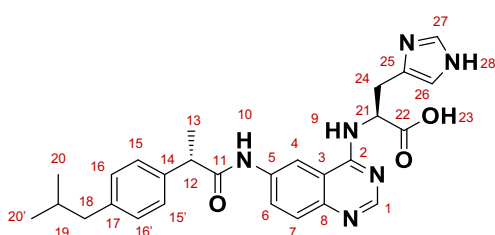
7: ácido (S)-3-((6-(2-(4-isobutilfenil)propanamido)quinazolin-4-il)amino)propanoico

- EM-APCI (m/z): C₂₄H₂₈N₄O₃ (420.22 g/mol) [M+H]⁺=421.220
- IR-ATR (cm⁻¹): 3218, 3036 (C-N); 2600 (C-OH); 1614, 878, 767 (C=C); 1538, 1508 (C=O); 1462, 844 (C=N); 1420 (CH₃); 746, 717 (CH₂)
- RMN-¹³C (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 175.6 (C₁₁), 173.3 (C₂₂), 157.8 (C₂), 155.5 (C₁₄), 150.6 (C₁₇), 146.7 (C₁), 141.5 (C₅), 139.4 (C₈), 131.5 (C₁₈), 128.9 (C₁₅), 128.2 (C_{15'}), 127.2 (C₁₆), 127.1 (C_{16'}), 114.7 (C₆), 122.8 (C₇), 103.9 (C₃), 101.1 (C₄), 44.4 (C₁₉), 44.2 (C₁₈), 34.8 (C₂₄), 34.1 (C₂₁), 29.6 (C₁₂), 22.1 (C_{20-20'}), 18.6 (C₁₃)
- RMN-¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 0.84 (H_{20-20'}) (d, J=8.0 Hz, 6H); 1.33 (H₁₃) (d, J=8.0 Hz, 3H); 1.79 (H₁₉) (m, J=8.0 Hz, 1H); 1.83 (H₂₁) (dd, J=8.0 Hz, 12.0 Hz, 2H); 2.61 (H₁₂) (dd, J=8.0 Hz, 8.0 Hz, 1H); 3.27 (H₁₈) (d, J=8.0 Hz, 2H); 3.65 (H₂₄) (dd, J=8.0 Hz, 8.0 Hz, 2H); 5.45 (H₉) (d, J=4.0 Hz, 1H), 7.14 (H_{15-15'}) (d, J=8.0 Hz, 2H); 7.14 (H₆) (dd, J=4.0 Hz, 4.0 Hz, 1H); 7.16 (H_{16-16'}) (d, J=8.0 Hz, 2H); 7.19 (H₇) (d, J=8.0 Hz, 1H); 7.43 (H₄) (d, J=4.0 Hz, 1H); 8.28 (H₁) (s, 1H); 9.78 (H₁₀) (s, 1H); 10.67 (H₂₃) (s, 1H)



8: (6-((S)-2-(4-isobutilfenil)propanamido)quinazolin-4-il)-L-leucina

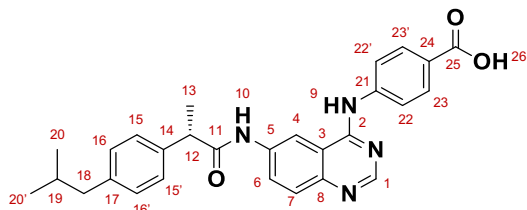
- EM-APCI (m/z): C₂₇H₃₄N₄O₃ (462.26 g/mol) [M+H]⁺=463.270
- IR-ATR (cm⁻¹): 3225, 2958 (C-N); 2539 (C-OH); 1632, 868, 768 (C=C); 1552, 1494 (C=O); 1472, 857 (C=N); 1409 (CH₃); 735, 714 (CH₂)
- RMN-¹³C (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 175.4 (C₂₂), 173.0 (C₁₁), 167.3 (C₂), 153.4 (C₁₄), 149.3 (C₁₇), 148.6 (C₁), 139.5 (C₅), 138.3 (C₈), 128.9 (C₁₅), 128.9 (C_{15'}), 128.7 (C₁₆), 127.1 (C_{16'}), 119.3 (C₆), 117.3 (C₇), 105.5 (C₃), 101.4 (C₄), 44.2 (C₁₉), 44.2 (C₂₅), 29.7 (C₁₂), 27.8 (C₂₁), 23.0 (C₂₄), 22.9 (C₁₈), 22.4 (C_{26-26'}), 22.1 (C_{20-20'}), 18.5 (C₁₃)
- RMN-¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 0.83 (H_{20-20'}) (d, J=8.0 Hz, 6H); 0.91 (H_{26-26'}) (d, J=8.0 Hz, 6H); 1.34 (H₁₃) (d, J=8.0 Hz, 3H); 1.81 (H₁₉) (m, J=4.0 Hz, 1H); 1.93 (H₂₁) (t, J=12.0 Hz, 1H); 2.40 (H₂₄) (d, J=4.0 Hz, 2H); 2.74 (H₁₂) (d, J=8.0 Hz, 2H); 3.62 (H₁₈) (d, J=8.0 Hz, 2H); 5.71 (H₉) (d, J=4.0 Hz, 1H); 7.17 (H_{15-15'}) (d, J=8.0 Hz, 2H); 7.19 (H_{16-16'}) (d, J=8.0 Hz, 2H); 7.21 (H₆) (dd, J=4.0 Hz, 4.0 Hz, 1H); 7.22 (H₇) (d, J=8.0 Hz, 1H); 7.54 (H₄) (d, J=8.0 Hz, 1H); 8.34 (H₁) (s, 1H); 8.71 (H₁₀) (s, 1H); 10.51 (H₂₃) (s, 1H)



9: (6-((S)-2-(4-isobutilfenil)propanamido)quinazolin-4-il)-L-histidina

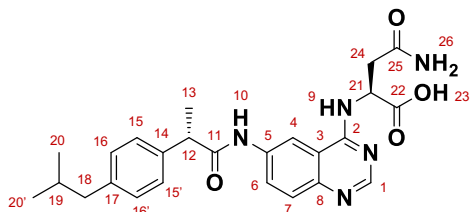
- EM-APCI (m/z): C₂₇H₃₀N₆O₃ (486.58 g/mol) [M+H]⁺=487.581
- IR-ATR (cm⁻¹): 3086, 3019 (C-N); 2852 (C-OH); 1701, 865, 778 (C=C); 1508, 1465 (C=O); 1446, 851 (C=N); 1417 (CH₃); 746, 692 (CH₂)
- RMN-¹³C (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 175.5 (C₂₂), 171.3 (C₁₁), 165.1 (C₂), 152.7 (C₁₄), 147.4 (C₁₇), 147.1 (C₁), 139.5 (C₅), 138.5 (C₈), 133.1 (C₂₇), 129.0 (C₁₅), 128.8 (C_{15'}), 127.7 (C₁₆), 127.1 (C_{16'}), 118.1 (C₆), 117.9 (C₇), 115.2 (C₂₆), 113.3 (C₂₅), 104.1 (C₃), 101.6 (C₄), 44.3 (C₁₉), 44.2 (C₁₈), 29.6 (C₁₂), 26.9 (C₂₁), 23.0 (C₂₄), 22.2 (C_{20-20'}), 18.5 (C₁₃)
- RMN-¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 0.82 (H_{20-20'}) (d, J=8.0 Hz, 6H); 1.32 (H₁₃) (d, J=8.0 Hz, 3H); 1.78 (H₁₉) (m, J=4.0 Hz, 1H); 2.68 (H₁₂) (d, J=8.0 Hz, 2H); 3.11 (H₂₁) (t, J=12.0 Hz, 1H); 3.59 (H₁₈) (d, J=8.0 Hz, 2H); 4.57 (H₂₄) (d, J=4.0 Hz, 2H); 5.47 (H₉) (d, J=4.0 Hz, 1H); 7.07 (H_{15-15'}) (d, J=8.0 Hz, 2H); 7.16 (H₂₆) (s, 1H); 7.17 (H_{16-16'}) (d, J=8.0 Hz, 2H); 7.41 (H₆) (dd, J=8.0 Hz, 8.0 Hz, 1H); 7.57 (H₇) (d, J=8.0 Hz, 1H); 7.64 (H₄) (d, J=0 Hz, 1H); 7.57 (H₂₈) (s, 1H); 8.26 (H₁) (s, 1H); 9.23 (H₁₀) (s, 1H); 11.74 (H₂₃) (s, 1H)





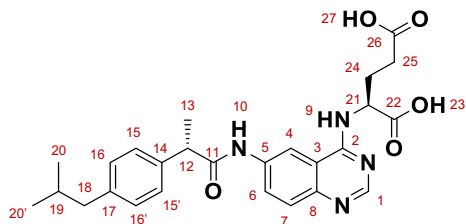
10: ácido (S)-4-((6-(2-(4-isobutilfenil) propanamido)quinazolin-4-il)amino)benzoico

- EM-APCI (m/z): C₂₈H₂₈N₄O₃ (468.56 g/mol) [M+H]⁺=469.571
- IR-ATR (cm⁻¹): 3350, 3221 (C-N); 2632 (C-OH); 1703, 864, 777 (C=C); 1511, (C=O); 1464 (C=N); 1419 (CH₃); 746, 692 (CH₂)
- RMN-¹³C (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 175.6 (C₁₁), 167.2 (C₂₅), 155.6 (C₂), 149.5 (C₁₄), 147.5 (C₁₇), 144.3 (C₁), 142.9 (C₂₁), 139.5 (C₅), 138.6 (C₈), 135.4 (C₂₂), 135.2 (C_{22'}), 135.1 (C₂₃), 134.8 (C_{23'}), 130.0 (C₁₅), 128.9 (C_{15'}), 128.7 (C₁₆), 127.1 (C_{16'}), 124.5 (C₂₄), 124.0 (C₆), 120.1 (C₇), 117.0 (C₃), 100.9 (C₄), 44.5 (C₁₉), 44.2 (C₁₈), 29.6 (C₁₂), 22.2 (C_{20-20'}), 18.6 (C₁₃)
- RMN-¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 0.84 (H_{20-20'}) (d, J=4.0 Hz, 6H); 1.34 (H₁₃) (d, J=4.0 Hz, 3H); 1.79 (H₁₉) (m, J=4.0 Hz, 1H); 2.40 (H₁₂) (d, J=8.0 Hz, 2H); 3.62 (H₁₈) (d, J=8.0 Hz, 2H); 5.63 (H₉) (d, J=4.0 Hz, 1H), 7.15 (H_{15-15'}) (d, J=8.0 Hz, 2H); 7.18 (H_{16-16'}) (d, J=8.0 Hz, 2H); 7.27 (H₆) (dd, J=4.0 Hz, 4.0 Hz, 1H); 7.40 (H₇) (d, J=4.0 Hz, 1H); 7.57 (H_{22-22'}) (d, J=4.0 Hz, 1H); 7.58 (H_{23-23'}) (d, J=4.0 Hz, 1H); 8.07 (H₄) (d, J=4.0 Hz, 1H); 8.34 (H₁₀) (s, 1H); 8.42 (H₁) (s, 1H); 9.62 (H₁₀) (s, 1H); 11.01 (H₂₆) (s, 1H)



11: (6-((S)-2-(4-isobutilfenil) propanamido)quinazolin-4-il)-L-asparagina

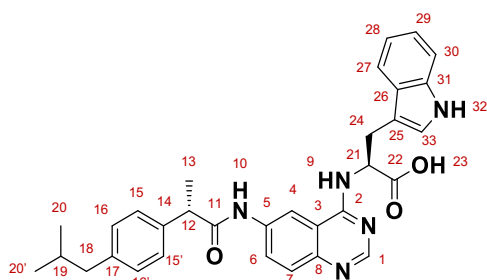
- EM-APCI (m/z): C₂₅H₂₉N₅O₄ (463.22 g/mol) [M+H]⁺=464.231
- IR-ATR (cm⁻¹): 3439, 3333 (C-N); 2560 (C-OH); 1703, 863, 777 (C=C); 1508, 1482 (C=O); 1465, 836 (C=N); 1419 (CH₃); 746, 674 (CH₂)
- RMN-¹³C (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 175.6 (C₂₂), 173.8 (C₁₁), 172.3 (C₂₅), 139.4 (C₂), 139.4 (C₁₄), 138.7 (C₁₇), 138.2 (C₁), 137.4 (C₂₁), 136.1 (C₅), 131.7 (C₈), 131.4 (C₁₅), 131.2 (C_{15'}), 128.8 (C₁₆), 128.7 (C_{16'}), 126.1 (C₆), 124.3 (C₇), 117.5 (C₃), 101.2 (C₄), 44.5 (C₁₉), 44.2 (C₁₈), 29.6 (C₁₂), 26.7 (C₂₁), 24.6 (C₂₄), 22.1 (C_{20-20'}), 18.6 (C₁₃)
- RMN-¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 0.84 (H_{20-20'}) (d, J=4.0 Hz, 6H); 1.32 (H₁₃) (d, J=4.0 Hz, 3H); 1.80 (H₁₉) (m, J=4.0 Hz, 1H); 2.40 (H₁₂) (d, J=8.0 Hz, 2H); 2.65 (H₂₁) (t, J=4.0 Hz, 1H); 3.60 (H₁₈) (d, J=8.0 Hz, 2H); 3.74 (H₂₄) (d, J=4.0 Hz, 2H); 5.25 (H₉) (d, J=4.0 Hz, 1H), 7.09 (H_{15-15'}) (dd, J=8.0 Hz, 2H); 7.17 (H_{16-16'}) (d, J=8.0 Hz, 2H); 7.22 (H₆) (dd, J=4.0 Hz, 4.0 Hz, 1H); 8.11 (H₁) (s, 1H); 8.42 (H₄) (d, J=4.0 Hz, 1H); 10.35 (H₁₀) (s, 1H); 11.67 (H₂₃) (s, 1H)



12: ácido(6-((S)-2-(4-isobutilfenil) propanamido)quinazolin-4-il)-L-glutámico

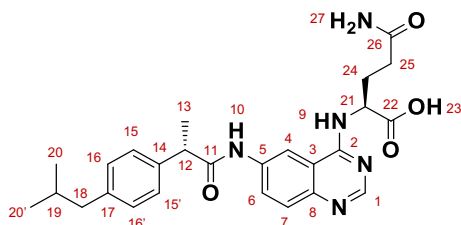
- EM-APCI (m/z): C₂₆H₃₀N₄O₅ (478.22 g/mol) [M+H]⁺=479.230
- IR-ATR (cm⁻¹): 3420, 3227 (C-N); 2653 (C-OH); 1703, 864, 777 (C=C); 1521, 1509 (C=O); 1464, 807 (C=N); 1419 (CH₃); 746, 700 (CH₂)
- RMN-¹³C (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 175.8 (C₂₂), 175.0 (C₂₆), 173.0 (C₁₁), 139.3 (C₂), 139.1 (C₁₄), 137.5 (C₁₇), 137.2 (C₁), 135.8 (C₅), 132.4 (C₈), 128.7 (C₁₅), 128.6 (C_{15'}), 127.5 (C₁₆), 127.1 (C_{16'}), 125.2 (C₆), 124.8 (C₇), 115.2 (C₃), 100.7 (C₄), 45.0 (C₁₉), 44.2 (C₁₈), 29.6 (C₁₂), 28.9 (C₂₅), 26.7 (C₂₁), 24.7 (C₂₄), 22.1 (C_{20-20'}), 18.8 (C₁₃)
- RMN-¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 0.84 (H_{20-20'}) (d, J=8.0 Hz, 6H); 1.31 (H₁₃) (d, J=8.0 Hz, 3H); 1.80 (H₁₉) (m, J=4.0 Hz, 1H); 2.18 (H₂₁) (t, J=8.0 Hz, 1H); 2.40 (H₂₄) (dd, J=4.0 Hz, 4.0 Hz, 2H); 2.75 (H₁₂) (d, J=4.0 Hz, 2H); 3.58 (H₁₈) (d, J=8.0 Hz, 2H); 4.75 (H₂₅) (d, J=4.0 Hz, 2H); 5.57 (H₉) (d, J=4.0 Hz, 1H); 7.06 (H_{15-15'}) (d, J=8.0 Hz, 2H); 7.17 (H_{16-16'}) (d, J=8.0 Hz, 2H); 7.33 (H₆) (dd, J=4.0 Hz, 4.0 Hz, 2H); 7.49 (H₄) (d, J=8.0 Hz, 1H); 8.24 (H₁) (s, 1H); 9.89 (H₂₇) (s, 1H); 10.35 (H₂₃) (s, 1H)





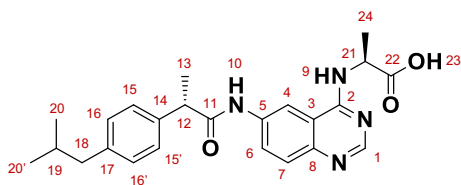
13: (6-((S)-2-(4-isobutilfenil)propanamido)quinazolin-4-il)-L-triptófano

- EM-APCI (m/z): C₃₂H₃₃N₅O₃ (535.65 g/mol) [M+H]⁺=536.660
- IR-ATR (cm⁻¹): 3008,2956 (C-N); 2560 (C-OH); 1702, 864, 778 (C=C); 1509 (C=O); 1456, 803 (C=N); 1413 (CH₃); 743, 678 (CH₂)
- RMN-¹³C (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 175.6 (C₁₁), 170.5 (C₂₂), 139.4 (C₂), 138.8 (C₁₄), 136.3 (C₁₇), 136.0 (C₁), 135.4 (C₅), 133.0 (C₈), 128.9 (C₁₅), 128.5 (C₁₅), 127.3 (C₁₆), 127.1 (C₁₆), 124.1 (C₆), 120.8 (C₇), 118.3 (C₃), 118.2 (C₂₅), 118.0 (C₂₇), 116.8 (C₃₁), 114.8 (C₂₆), 111.3 (C₃₃), 109.3 (C₃₀), 108.7 (C₂₈), 105.2 (C₂₉), 104.6 (C₄), 44.5 (C₁₉), 44.2 (C₁₈), 29.6 (C₁₂), 27.0 (C₂₁), 24.6 (C₂₄), 22.1 (C_{20-20'}), 18.6 (C₁₃)
- RMN-¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 0.85 (H_{20-20'}) (d, J=4.0 Hz, 6H); 1.34 (H₁₃) (d, J=8.0 Hz, 3H); 1.80 (H₁₉) (m, J=8.0 Hz, 1H); 2.41 (H₂₁) (t, J=4.0 Hz, 1H); 3.33 (H₁₂) (d, J=8.0 Hz, 2H); 3.53 (H₁₈) (d, J=8.0 Hz, 2H); 3.65 (H₂₄) (d, J=8.0 Hz, 2H); 5.65 (H₉) (d, J=4.0 Hz, 1H); 6.96 (H₃₀) (d, J=4.0 Hz, 8.0 Hz, 1H); 6.98 (H₂₉) (dd, J=8.0 Hz, 1H); 7.06 (H₂₈) (dd, J=8.0 Hz, 8.0 Hz, 1H); 7.09 (H_{15-15'}) (d, J=8.0 Hz, 2H); 7.18 (H_{16-16'}) (d, J=8.0 Hz, 2H); 7.23 (H₃₃) (s, 1H); 7.35 (H₆) (dd, J=8.0 Hz, 1H); 7.57 (H₇) (d, J=8.0 Hz, 1H); 7.58 (H₄) (d, J=4.0 Hz, 1H); 7.78 (H₃₂) (s, 1H); 8.53 (H₁) (s, 1H); 9.25 (H₁₀) (s, 1H); 11.00 (H₂₃) (s, 1H)



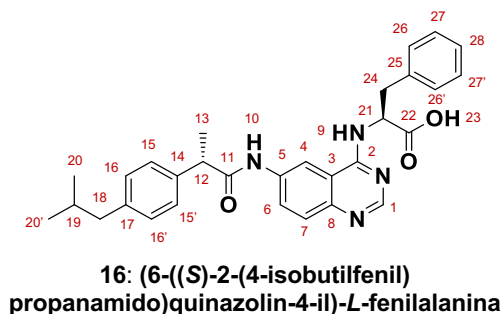
14: (6-((S)-2-(4-isobutilfenil)propanamido)quinazolin-4-il)-L-glutamina

- EM-APCI (m/z): C₂₆H₃₁N₅O₄ (477.56 g/mol) [M+H]⁺=478.570
- IR-ATR (cm⁻¹): 3467, 3362, 2953 (C-N); 2543 (C-OH); 1697, 863, 778 (C=C); 1508 (C=O); 1508 (C=O); 1465, 836 (C=N); 1417 (CH₃); 745, 692 (CH₂)
- RMN-¹³C (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 175.5 (C₂₂), 174.2 (C₂₆), 171.8 (C₁₁), 163.3 (C₂), 160.3 (C₁₄), 150.5 (C₁₇), 146.7 (C₁), 141.0 (C₂₁), 139.5 (C₅), 138.5 (C₈), 128.9 (C₁₅), 128.7 (C₁₅), 127.4 (C₁₆), 127.1 (C₁₆), 125.3 (C₆), 123.6 (C₇), 115.5 (C₃), 102.0 (C₄), 44.3 (C₁₉), 44.2 (C₁₈), 29.6 (C₁₂), 28.2 (C₂₅), 26.9 (C₂₁), 24.1 (C₂₄), 22.2 (C_{20-20'}), 18.5 (C₁₃)
- RMN-¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 0.83 (H_{20-20'}) (d, J=4.0 Hz, 6H); 1.32 (H₁₃) (d, J=8.0 Hz, 3H); 1.79 (H₁₉) (m, J=4.0 Hz, 1H); 2.23 (H₂₁) (t, J=4.0 Hz, 1H); 2.40 (H₂₄) (dd, J=8.0 Hz, 2H); 2.68 (H₁₂) (d, J=4.0 Hz, 1H); 3.63 (H₁₈) (d, J=8.0 Hz, 2H); 4.58 (H₂₅) (t, J=8.0 Hz, 2H); 5.75 (H₉) (d, J=4.0 Hz, 1H); 7.06 (H_{15-15'}) (d, J=8.0 Hz, 2H); 7.16 (H₇) (d, J=8.0 Hz, 1H); 7.18 (H_{16-16'}) (d, J=8.0 Hz, 2H); 7.41 (H₆) (dd, J=8.0 Hz, 8.0 Hz, 1H); 7.43 (H₄) (d, J=4.0 Hz, 1H); 8.18 (H₁) (s, 1H); 9.67 (H₂₇) (s, 2H); 9.89 (H₁₀) (s, 1H); 11.15 (H₂₃) (s, 1H)



15: (6-((S)-2-(4-isobutilfenil)propanamido)quinazolin-4-il)-L-alanina

- EM-APCI (m/z): C₂₄H₂₈N₄O₃ (420.22 g/mol) [M+H]⁺=421.230
- IR-ATR (cm⁻¹): 3072, 2952 (C-N); 2601 (C-OH); 1703, 864, 777 (C=C); 1508 (C=O); 1454, 850 (C=N); 1412 (CH₃); 746, 692 (CH₂)
- RMN-¹³C (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 175.4 (C₁₁), 173.5 (C₂₂), 166.6 (C₂), 161.5 (C₁₄), 149.1 (C₁₇), 149.0 (C₁), 139.5 (C₂₁), 138.5 (C₅), 136.0 (C₈), 128.9 (C₁₅), 128.8 (C₁₅), 127.6 (C₁₆), 127.1 (C₁₆), 125.7 (C₆), 124.6 (C₇), 105.6 (C₃), 86.0 (C₄), 44.3 (C₁₉), 44.2 (C₁₈), 29.5 (C₁₂), 22.8 (C₂₁), 22.1 (C_{20-20'}), 18.5 (C₁₃), 16.0 (C₂₄)
- RMN-¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 0.84 (H_{20-20'}) (d, J=4.0 Hz, 6H); 1.32 (H₁₃) (d, J=8.0 Hz, 3H); 1.80 (H₁₉) (m, J=2.0 Hz, 1H); 2.25 (H₂₁) (dd, J=8.0 Hz, 8.0 Hz, 1H); 2.40 (H₂₄) (d, J=4.0 Hz, 3H); 3.35 (H₁₂) (d, J=4.0 Hz, 2H); 3.62 (H₁₈) (d, J=8.0 Hz, 2H); 4.64 (H₉) (d, J=4.0 Hz, 1H); 7.10 (H_{15-15'}) (d, J=4.0 Hz, 2H); 7.18 (H_{16-16'}) (d, J=8.0 Hz, 2H); 7.24 (H₆) (dd, J=8.0 Hz, 8.0 Hz, 1H); 7.54 (H₄) (d, J=8.0 Hz, 1H); 8.37 (H₁) (s, 1H); 9.89 (H₁₀) (s, 1H); 11.36 (H₂₃) (s, 1H)



- EM-APCI (m/z): C₃₀H₃₂N₄O₃ (496.25 g/mol) [M+H]⁺=497.261
- IR-ATR (cm⁻¹): 3023, 2953 (C-N); 2868 (C-OH); 1698, 846, 777 (C=C); 1507, 1481 (C=O); 1452, 883 (C=N); 1402 (CH₃); 740, 699 (CH₂)
- RMN-¹³C (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 175.8 (C₁₁), 174.6 (C₂₂), 139.2 (C₂), 139.2 (C₂₅), 139.1 (C₁₄), 131.6 (C₂₈), 129.7 (C₁₇), 129.3 (C₁), 128.8 (C₂₁), 128.6 (C₅), 128.5 (C₈), 128.2 (C₁₅), 128.1 (C_{15'}), 127.1 (C₁₆), 127.0 (C_{16'}), 126.5 (C₂₇), 126.8 (C_{27'}), 124.4 (C₆), 123.4 (C₇), 122.4 (C₂₆), 122.1 (C_{26'}), 106.1 (C₃), 102.7 (C₄), 44.9 (C₁₉), 44.2 (C₁₈), 35.2 (C₂₄), 29.6 (C₁₂), 22.7 (C₂₁), 22.1 (C_{20-20'}), 18.8 (C₁₃)
- RMN-¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 0.84 (H_{20-20'}) (d, J=4.0 Hz, 6H); 1.32 (H₁₃) (d, J=12.0 Hz, 3H); 1.80 (H₁₉) (m, J=4.0 Hz, 1H); 2.18 (H₂₁) (d, J=8.0 Hz, 1H); 2.39 (H₂₄) (d, J=8.0 Hz, 2H); 3.30 (H₁₂) (d, J=8.0 Hz, 2H); 3.57 (H₁₈) (d, J=8.0 Hz, 2H); 4.25 (H₂₅) (d, J=8.0 Hz, 2H); 4.99 (H₉) (d, J=4.0 Hz, 1H); 6.94 (H_{27-27'}) (dd, J=8.0 Hz, 8.0 Hz, 2H); 7.07 (H_{15-15'}) (d, J=4.0 Hz, 2H); 7.18 (H_{16-16'}) (d, J=4.0 Hz, 2H); 7.41 (H₆) (dd, J=8.0 Hz, 4.0 Hz, 1H); 7.47 (H₇) (d, J=8.0 Hz, 1H); 7.49 (H_{26-26'}) (d, J=8.0 Hz, 1H); 8.26 (H₁) (s, 1H); 8.38 (H₄) (d, J=4.0 Hz, 1H); 9.93 (H₁₀) (s, 1H); 10.75 (H₂₃) (s, 1H)

Serie a

En el **Esquema 1** se muestra la ruta sintética que se llevó a cabo para la formación de los compuestos de la **Serie a (1–6)**. Los detalles de la síntesis de intermediarios y productos finales se describen a continuación.

Para la obtención del núcleo de quinazolina (**1a**) se usó una variación de la reacción de Niementowski. Aunque el rendimiento de la reacción fue aceptable, no ocurre al de forma cuantitativa debido al mecanismo de reacción que sigue la transformación química. El paso limitante para la formación del compuesto pasa por el efecto del grupo nitro en la materia prima. El grupo nitro retira densidad electrónica del anillo y perturba al par electrónico sobre la amina, haciendo que no esté disponible para realizar la adición nucleofílica sobre la guanidina y, por lo tanto, que ocurra un mecanismo de SNA y no ácido-base.

La formación de los intermediarios **2a** y **3a** ocurre por la adición de la mezcla racémica (**2a**) o del isómero S de ibuprofeno (**3a**) junto con 1,1-carbonildiimidazol (CDI). En esta reacción, se usó atmósfera de nitrógeno debido a la inestabilidad del producto, por lo que no fue aislado. Como no se observó presencia de materia prima, se dio por concluida la reacción con rendimiento del ~100%.

Con respecto a la síntesis de los compuestos **1** y **2**, hay una reacción en competencia entre las amina en posición 2 y 4 del intermediario **1a**, por lo que se decidió colocar 0.6 equivalentes de la quinazolina por cada 1.0 equivalente del ácido carboxílico activado. El motivo de usar estas proporciones fue disminuir la formación de subproductos y hacer que el producto mayoritario estuviera en posición 4.

Para determinar la posición en la que se formó la amida, se realizó el estudio NOESY de las moléculas **1** y **2**. A manera de ejemplo, en la **Figura 38** se muestra el espectro bidimensional de **2**, donde se observa la interacción a través del espacio del hidrógeno 9 en la amida con el hidrógeno 4 del núcleo de quinazolina.



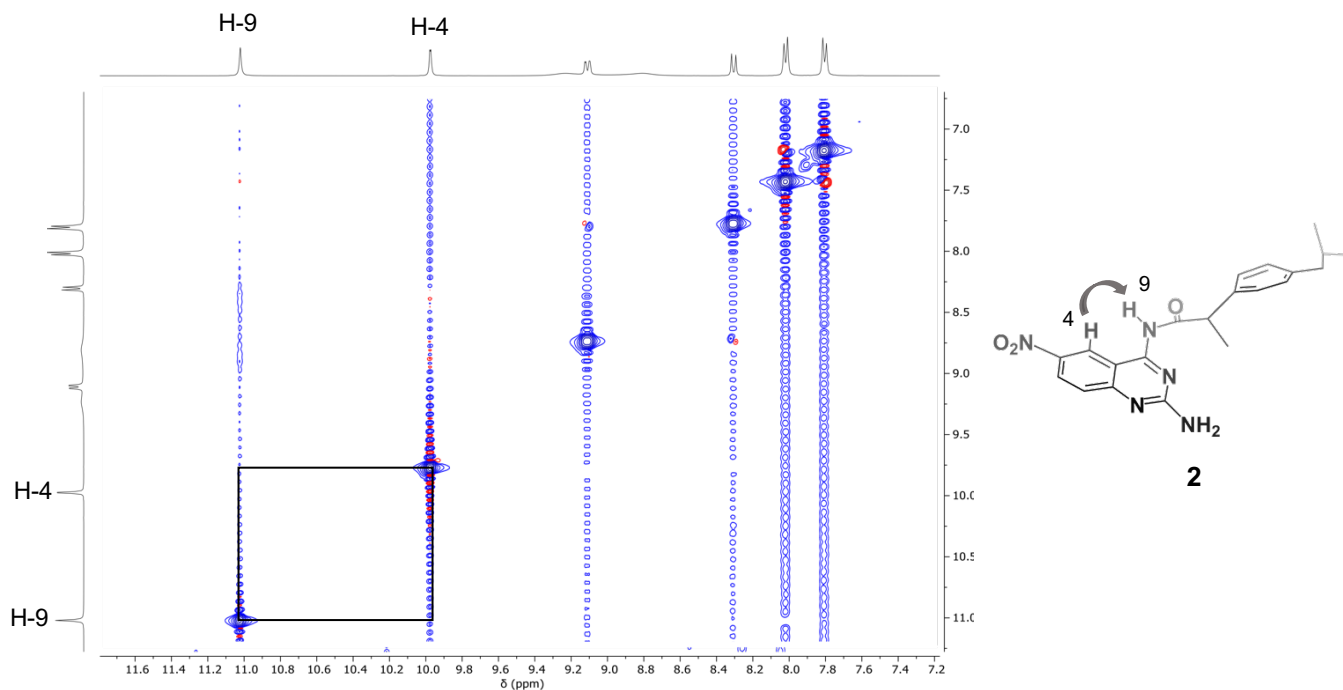


Figura 38. Espectro NOESY de la molécula **2**.

Para explicar la formación de los productos **1** y **2**, en la **Figura 39** se presentan algunas estructuras del híbrido de resonancia, teniendo como regiones de interés las aminas en **2** y **4**. Se observa que para la amina en **2** (**Figura 39a**) hay una estructura en donde se pierde la aromaticidad de ambos anillos del núcleo (**I**). Debido a ello, el par electrónico sobre la amina compensa la carga y se encuentra menos disponible para realizar ataques nucleofílicos, incluso la imina que se forma tiene mayor carácter ácido que básico. Con respecto a la amina en **4** (**Figura 39b**), las estructuras resonantes llevan nuevamente a la formación de **I**, evidenciando que el par electrónico de la amina en **4** se encuentra más disponible para llevar a cabo ataques nucleofílicos. Este efecto se ve potenciado, por el grupo nitro, que retira densidad de electrónica de quinazolinona y condiciona al par electrónico de la amina en **2**.

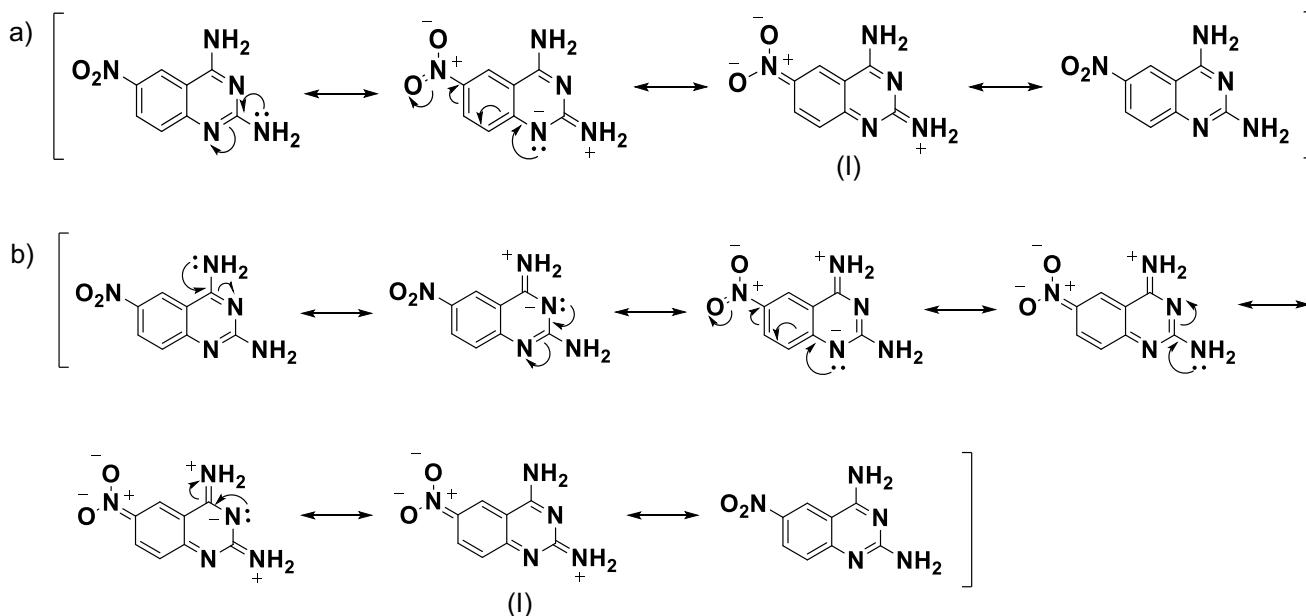


Figura 39. Híbrido de resonancia de aminas en posición **2** (a) y posición **4** (b).



En cuanto a la síntesis de los compuestos **3** y **4**, la reducción del grupo nitro a amina con Pd/C, se llevó a cabo, prácticamente, de manera cuantitativa. No se observó presencia de materia prima, sin embargo, hubo trazas de impurezas. El rendimiento fue mayor para el compuesto con el isómero S que cuando se usó la mezcla racémica de ibuprofeno.

En la formación de los intermediarios **4a** y **5a** se visualizaron impurezas, conforme transcurría el tiempo. Se cree que el ácido acético que se forma *in situ* en la reacción puede hidrolizar a la amida en posición 4, además, el anhídrido acético que se encuentra en el medio podría acetilar la amina en posición 4 que ahora se encuentra libre. Por ello, al repetir la reacción se decidió reducir la temperatura y el tiempo. Debido a todas estas variables, el rendimiento para los intermediarios **4a** y **5a** es bajo.

Para la formación del intermediario **6a**, se usó la reacción de activación del grupo carbonilo del ibuprofeno con PyBOP en medio básico. Este agente se usó porque requiere de temperatura para reaccionar, por lo que ayuda en la solubilidad de la materia prima. En cambio, agentes como CDI, DCC o HBTU, donde la activación se realiza a temperatura ambiente, dificultan la formación de compuestos que son poco solubles en medios poco polares. El rendimiento de la reacción fue cuantitativo y no se observó presencia de impurezas. El producto no fue aislado debido a su reactividad. El intermediario **6a** se usó para formar la amida en posición 6 con β -alanina.

La formación de los intermediarios **7a** y **8a** se llevó a cabo con las condiciones reductoras antes usadas. El rendimiento obtenido en este paso fue menor comparado con la reducción anterior, incluso se observó presencia de 2,4,6-triaminoquinazolina, por ende, además de reducir el grupo nitro en 6, las condiciones de reacción fueron propicias para hidrolizar las amida en 2 y 4. Se redujo el tiempo y la temperatura de reacción para evitar la hidrólisis de las amidas.

Con respecto a la obtención de los intermediarios **9a** y **10a**, el mayor inconveniente presentado fue la solubilidad de las materias primas, puesto que el medio de reacción en el que se encontraban los reactivos es CH_2Cl_2 . Esto se refleja en un rendimiento más discreto de los compuestos (69% y 73%). Para propiciar un efecto de cosolvenancia, se adicionó DMF con el fin de aumentar la constante dieléctrica del medio para que pudiera ocurrir la reacción. No obstante, la purificación de estos compuestos requirió de técnicas adicionales.

De manera similar a la formación de la amida en 4, para la obtención de **5** y **6**, hay competencia entre las aminas en 2 y 6. Para resolver este problema, primero se realizó la acetilación de la amina en 2 de las moléculas **1** y **2**. Posteriormente, se redujo el grupo nitro de 6 a amina, para formar la respectiva amida en esta posición. La metanólisis de la amida en 2, se realizó mediante la adición LiH en MeOH con el fin de formar MeOLi y llevar a cabo la ruptura del enlace amida en posición 2. El rendimiento de los compuestos **5** y **6** fue bajo (39% y 42%), debido a que también se hidrolizan las amidas en 4 y 6, por ende se decidió reducir la temperatura y aumentar el tiempo de reacción. Teóricamente, todas las amidas tienen la misma reactividad, sin embargo, la hidrólisis ocurre mayoritariamente en 2. Este efecto se debe a que los nitrógenos en 1 y 3, deslocalizan la densidad de carga del anillo de pirimidina, provocando que el par electrónico del nitrógeno de la amida en 2 compense este efecto y sea más lábil al ataque nucleofílico del ión MeO^- (**Figura 40**).

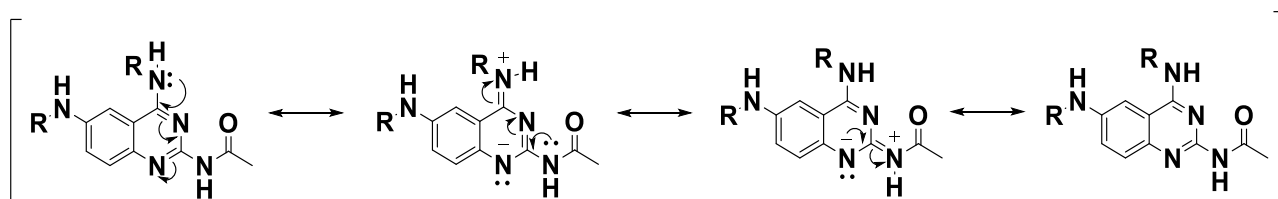
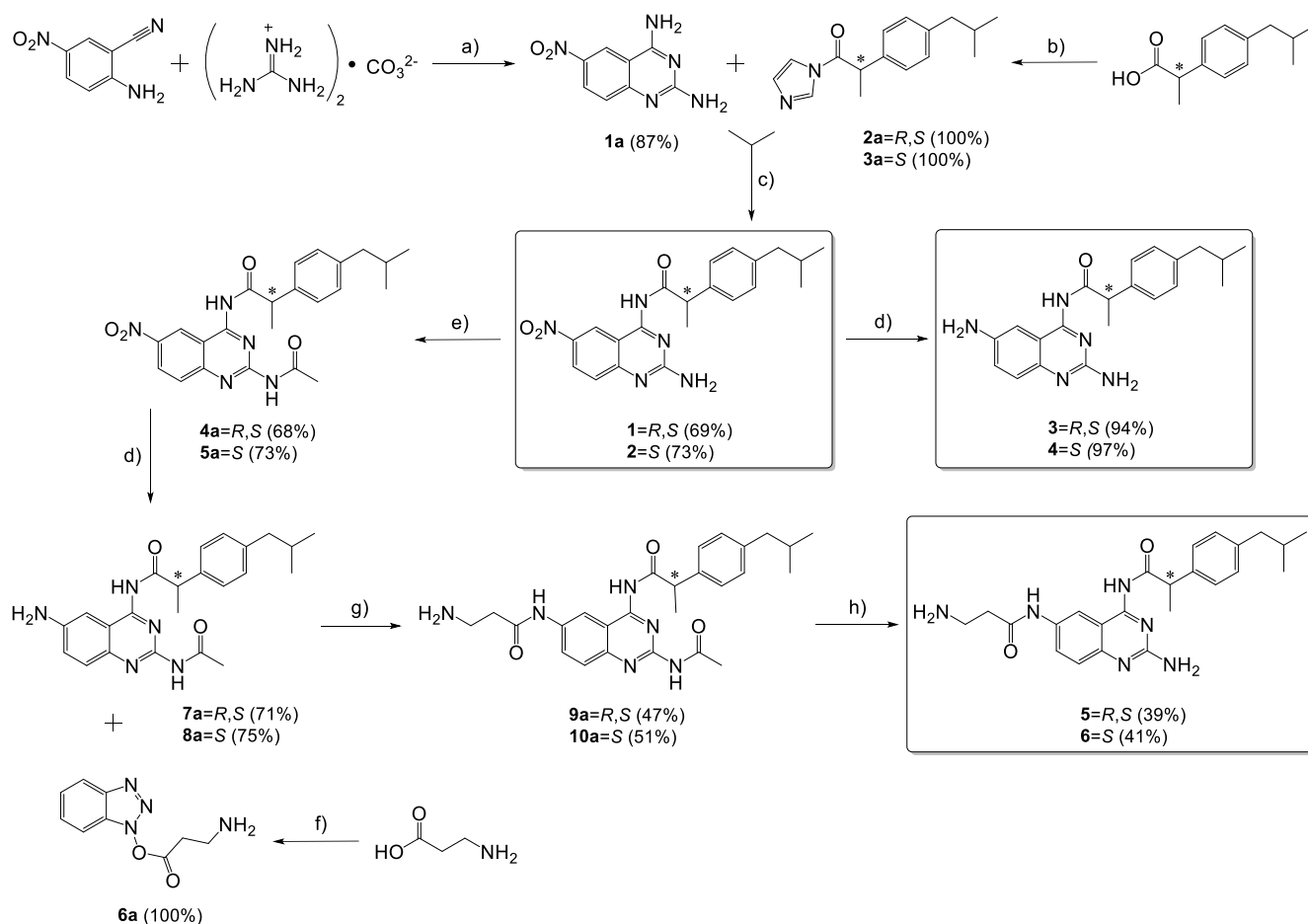


Figura 40. Estructuras resonantes que indican la donación del par electrónico de la amida en posición 2.

De forma general, los intermediarios y compuestos finales que fueron sintetizados con (*S*)-ibuprofeno, se obtuvieron con mayor rendimiento que en los que se usó la mezcla racémica. Esto puede deberse a que en la molécula pura no hay competencia para reaccionar con los reactivos del medio.





Esquema 1. Síntesis de **1–6**. Reactivos y condiciones de reacción: (a) KOH, EtOH/*n*-PrOH; (b) CDI, N₂, CHCl₃; (c) DMF/CHCl₃, N₂; (d) HCO₂NH₄, Pd/C, MeOH; (e) anhídrido acético; (f) PyBOP, DIPEA, N₂, CH₂Cl₂; (g) DMF/CH₂Cl₂, N₂; (h) LiH, MeOH.

Serie b

La obtención de los intermediarios y los productos finales de la **Serie B (7–16)** se muestra en el **Esquema 2**. Los detalles de cada reacción se indican a continuación.

Para la obtención del intermediario **1b** se usó DMF-DMA para formar el derivado tipo imina. El rendimiento de la reacción fue bueno. Como medio de reacción, se usó MeOH para desplazar el equilibrio hacia la formación de los productos por la adición de ión común (MeO⁻).

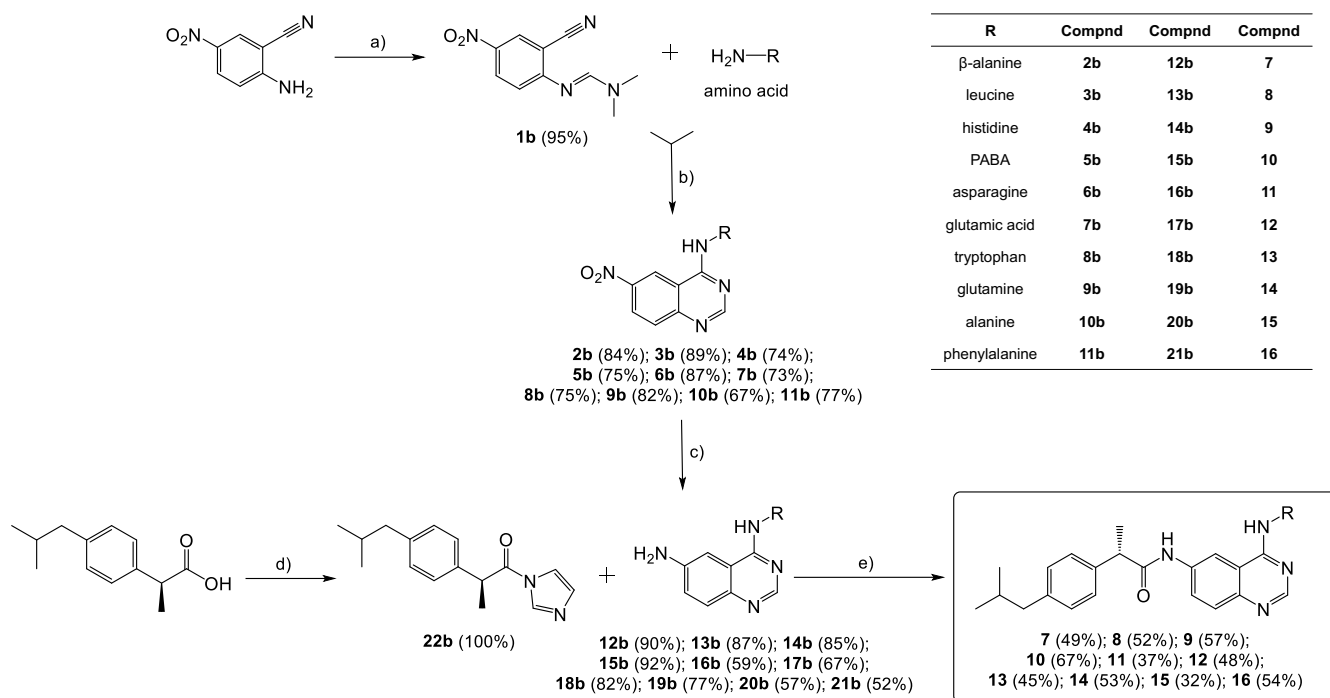
Con respecto a la formación de los intermediarios **2b–11b**, hay variación en el rendimiento de cada compuesto, siendo el compuesto **3b** (89%) el de mejor rendimiento y **10b** el de rendimiento más discreto. Con la inserción de los diferentes aminoácidos se formó la quinazolina, mediante una reacción intramolecular, dando lugar al enlace C–N en posición 4 del núcleo. Cabe destacar que en esta reacción ocurre la eliminación de dimetilamina, por lo que el medio tiene un pH básico.

En cuanto a la obtención de los intermediarios **12b–21b**, también se observa que hay gran variabilidad en el rendimiento de los compuestos, que se encuentran entre 52% a 92%. La molécula con el mejor rendimiento en la reacción fue **15b**, la cual contiene el aminoácido PABA. Por otra parte, la molécula con el rendimiento más discreto fue **21b**, que posee a la fenilalanina como parte de su estructura. En general, la reacción de reducción del grupo nitro, formó más impurezas en comparación a cuando se empleó en la **Serie a**, lo que indica que las moléculas de la Serie b, son menos estables en este tipo de transformaciones, posiblemente debido a la adición de átomos alifáticos de los aminoácidos.



Para hacer más reactivo al carbono del grupo carbonilo en el (*S*)-ibuprofeno, se usó CDI y las condiciones de la **Serie a**. El intermediario **22b**, no fue aislado debido a su reactividad y se asume ~100% de rendimiento al no observar presencia de materia prima o de impurezas. Con esta reacción se adicionó el fármaco que pasaría a ser parte de la estructura de los compuestos finales.

El rendimiento de los compuestos finales (**7–16**) fue bajo, además, la obtención de estas moléculas se dificultó porque para activar el (*S*)-ibuprofeno, el medio de reacción debe ser poco polar y aquí se adicionan los derivados de quinazolina, que son mucho más polares. Para mejorar la solubilidad de los intermediarios con quinazolina, se disolvieron con DMF antes de agregarlos a la reacción. El efecto de cosolventación ayudó a que procediera la reacción. Sin embargo, que la amina en 6 sea aromática, provoca que disminuya la nucleofilia y dificulta la obtención de los compuestos de interés, debido a ello, el rendimiento decae.



Esquema 2. Síntesis de **7–16**. Reactivos y condiciones: (a) DMF-DMA, MeOH; (b) CH₃CN/CH₃CO₂H; (c) HCO₂NH₄, Pd/C, MeOH; (d) CDI, N₂, CHCl₃; (e) DMF/CHCl₃, N₂.

En general, el rendimiento global de los productos tiende a ser discreto. En el caso de la **Serie A**, hay diversas reacciones en competencia, por lo que el rendimiento disminuye debido a los subproductos que se forman en las reacciones de formación de las amidas. Con respecto a la **Serie B**, la formación del núcleo de quinazolina con la inserción de los aminoácidos y posterior reacción de reducción del grupo nitro, son los pasos que influyen en la formación de los productos. Se cree que la porción alifática que tienen algunos aminoácidos les confiere inestabilidad a las moléculas.

En ambas series, la baja solubilidad de los intermediarios que contienen quinazolina dificultan la formación de los productos de interés, por lo que el uso de disolventes con una polaridad mayor, como DMF, se vuelven fundamentales, sin embargo, la purificación de las moléculas requiere de técnicas adicionales que merman el rendimiento de los compuestos.



Evaluación biológica

Tinción de células

Para determinar el nivel de expresión de EGFR, se realizó una tinción simple con Brilliant Violet 605 (clona AY13), se leyeron al menos 10 000 eventos y se obtuvieron los histogramas de la **Figura 41**, donde se indica el porcentaje de células positivas y negativas al receptor en cada línea celular.

Se puede observar que AGS es la línea celular que expresa la mayor cantidad de EGFR, seguida de HaCaT, A-431 en tercera posición, luego MCF-7 y, con un valor mucho menor a las demás, se encuentra MDA-MB-231, siendo ésta última, la que expresan menor cantidad de EGFR.

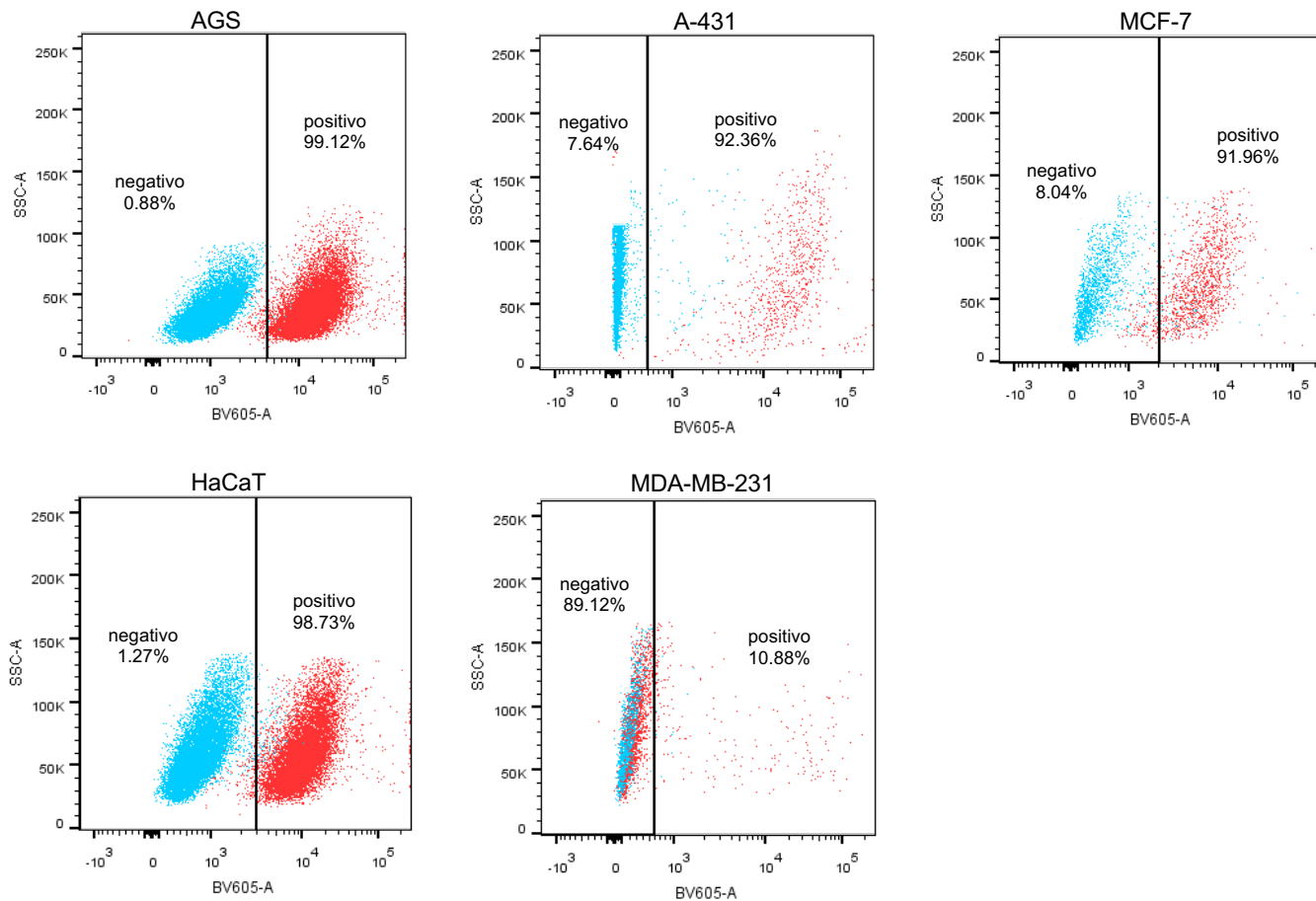


Figura 41. Histogramas obtenidos de la tinción con Brilliant Violet 605 clona AY13.

Si bien, la cantidad de EGFR es un parámetro que se puede relacionar con potencia de las moléculas, esto no es concluyente pues, aunque el receptor se encuentre expresado, no necesariamente se encuentra disponible para que se active con su ligando endógeno, EGF. Además, se debe de considerar que las moléculas fueron diseñadas para que inhiban EGFR-TKD, que se encuentra en el dominio intracelular, por lo que primero se debe activar el dominio externo, para que se libere la porción de tirosina-cinasa y las moléculas se unan en el sitio del ATP. No obstante, también se puede relacionar la potencia del efecto de las moléculas con la intensidad de fluorescencia media (IFM). La IFM es un parámetro que indica la cantidad de EGFR disponible e indica la proporción de anticuerpo que está unido a las células. Por lo tanto, valores mayores de IFM, indican una mayor cantidad de EGFR que puede ser activado .



Se obtuvo el valor de IFM de las células teñidas y sin teñir. El IFM se muestra en la **Tabla 12**. Hay que considerar que las células por sí mismas emiten fluorescencia, no obstante, cuando se realiza la tinción, el fluorocromo acoplado al anticuerpo incrementa la fluorescencia. Cabe aclarar, que la cantidad de EGFR y el valor de IFM en las células, pueden variar de acuerdo con el número de pase utilizado, sin embargo, la tendencia entre las células no debería cambiar.

Tabla 12. Valores de IFM de las células. ST: células sin teñir; T: células teñidas.

IFM									
AGS		A-431		MDA-MB-231		MCF-7		HaCaT	
ST	T	ST	T	ST	T	ST	T	ST	T
1 153	18 933	95.6	26 846	199	2 019	827	9 546	897	13 176

A partir de los datos anteriores, se determinó el índice de intensidad de fluorescencia media (IIFM) entre el cociente de la IFM de las células teñidas y el IFM de las células sin teñir, para determinar la disponibilidad de EGFR en la línea celular correspondiente y así relacionarlo con la potencia de los compuestos.

$$IIFM = \left(\frac{IFM_{\text{Células teñidas}}}{IFM_{\text{Células sin teñir}}} \right)$$

El valor de IIFM se indica en la **Tabla 13**. Se observa una diferencia significativa entre la cantidad de EGFR en la línea A-431 comparado con las demás células. Hay que recordar que HaCaT son células no tumorales, por lo que, en primera instancia, se pensaría que tiene menor cantidad de EGFR en comparación de las células cancerosas, no obstante, a pesar de que se lleve a cabo la activación de EGFR en el dominio externo, la porción tirosina-cinasa dentro de la célula, se encuentran regulada y no realiza el proceso de autofosforilación de manera constante. Debido a lo anterior, no se llevan a cabo las señales que conducen a la proliferación celular.

Tabla 13. IIFM de las células.

IIFM				
AGS	A-431	MDA-MB-231	MCF-7	HaCaT
16.42	280.81	10.04	11.54	14.69

Con el valor de IIFM se realizó una escala decreciente, que indica que la línea celular con el mayor índice de EGFR es A-431. Por otra parte, las células con el menor índice de EGFR es MDA-MB-231. En el caso de HaCaT, se encuentra en la mitad de la escala.

$$A-431 > AGS > HaCaT > MCF-7 > MDA-MB-231$$

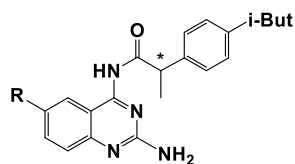
Esta escala es importante, puesto que se esperaba una relación entre la disponibilidad de EGFR y la potencia de las moléculas, demostrando que a mayor valor de IIFM la IC₅₀ del compuesto es menor. Cabe aclarar que, con los valores de IFM o IIFM, no se puede conocer la cantidad de EGFR que expresan las células, pese a esto, ayudan a relacionar de manera indirecta, el índice de EGFR que se encuentra biodisponible para ejercer su efecto.



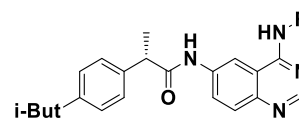
Citotoxicidad en líneas celulares

Se determinó la IC₅₀ de los compuestos y se usó gefitinib como control. Los experimentos se leyeron a las 24 h de colocado el tratamiento. Las curvas de viabilidad para la obtención de la IC₅₀ se encuentran en el **Anexo III**. De acuerdo con la **Tabla 14**, todos los compuestos obtuvieron una IC₅₀ menor que gefitinib en la línea A-431, por lo que son más potentes. Como las células A-431 tienen mayor expresión de EGFR, este fue el primer indicio de que los compuestos actúan inhibiendo EGFR-TKD.

Tabla 14. IC₅₀ de los compuestos 1–16 y gefitinib. También se muestra el valor de IIFM de la línea celular.



Serie a (1–6)



Serie b (7–16)

Molécula	IC ₅₀ (μM)				
	AGS (16.42)	A-431 (280.81)	MCF-7 (11.54)	MDA-MB-231 (10.04)	HaCaT (14.69)
1	15.26±1.15	0.11±0.01	7.62±0.54	26.81±1.76	>100
2	11.41±0.98	0.067±0.001	7.01±0.67	21.23±2.07	>100
3	6.28±0.78	0.11±0.02	5.68±0.45	31.36±2.76	>100
4	4.82±0.23	0.078±0.001	4.26±0.52	27.81±2.32	>100
5	5.83±0.73	0.63±0.04	6.04±0.68	20.72±1.79	>100
6	3.64±0.45	0.034±0.003	2.67±0.19	10.51±0.99	>100
7	16.54±1.34	0.13±0.02	12.14±1.12	18.31±1.43	>100
8	14.42±1.24	0.83±0.11	8.29±0.34	13.42±1.76	98.42±4.87
9	23.01±2.08	0.12±0.001	13.03±1.43	27.88±1.47	>100
10	28.82±2.45	0.75±0.07	12.32±0.98	32.96±2.87	>100
11	15.64±1.89	0.43±0.03	11.29±1.23	34.92±2.91	>100
12	22.09±2.93	0.52±0.06	17.98±1.87	29.68±2.56	>100
13	30.47±2.36	0.87±0.09	12.69±0.64	26.32±2.31	>100
14	23.10±2.76	1.06±0.12	10.87±0.69	30.15±3.29	>100
15	40.57±3.14	1.6±0.17	14.08±1.12	26.72±2.11	76.91±6.89
16	27.74±2.89	1.97±0.23	9.16±0.79	23.85±1.89	84.17±5.98
gefitinib	23.87±2.35	3.84±0.34	11.27±1.32	17.24±1.48	49.63±4.89

De manera general, los compuestos de la **Serie a** resultaron ser más potentes que los de la **Serie b**, manteniendo el mismo comportamiento del acoplamiento molecular. El efecto puede explicarse debido a que las moléculas de la **Serie a**, pueden formar un enlace de hidrógeno extra mediante la amina en 2. En el caso de la **Serie b**, solo tienen un hidrógeno en esta posición, por lo que no presenta el mismo tipo de interacción. Dentro de la **Serie a**, las moléculas que fueron sintetizadas con el isómero S del ibuprofeno (**2**, **4** y **6**) fueron más potentes, lo que confirma que el centro estereogénico tiene la orientación espacial idónea para potenciar el efecto biológico. En el caso de **1**, **3** y **5**, aunque también son más potentes que gefitinib, el uso de la mezcla racémica del ibuprofeno, puede afectar el acomodo espacial de las moléculas en el sitio de unión.

En relación con la **Serie a** se observa que los compuestos con el grupo nitrógeno en posición 6, son menos potentes en comparación con las moléculas con una amina. Estas últimas, de acuerdo con el acoplamiento molecular, forman otro enlace de hidrógeno con el receptor y también, al tener un LogP mayor, ingresan con mayor facilidad a la célula. Las moléculas **5** y **6**, fueron las más potentes de ambas series. Estos compuestos cuentan con el fragmento de β-alanina en posición 6, que aporta mayor solubilidad acuosa al incluir una amina alifática. En este proyecto, la molécula **6** fue quien que mostró mayor citotoxicidad en todas las células tumorales, siendo 6.5, 112.9, 4.2 y 1.7 veces más potente que gefitinib, en AGS, A-431, MCF-7 y MDA-MB-231, respectivamente. Que la molécula **6** haya sido la más potente corresponde con los resultados del acoplamiento, puesto que presentó el menor valor ΔG. Sin embargo, que **6** presentara mayor potencia que gefitinib, siendo que el fármaco tiene un ΔG más negativo puede deberse a dos factores, a) que **6** esté involucrado en la inhibición de otra diana que también regule la proliferación celular o b) que al tener una mejor solubilidad acuosa permita que el compuesto ingrese con mayor facilidad a la célula para inhibir EGFR-TKD, puesto que el acoplamiento molecular es solo un estudio teórico y no toma en cuenta la solubilidad de los compuestos.

Por otra parte, de acuerdo con la **Serie b**, las moléculas tuvieron valores de IC₅₀ más discretos comparados con la **Serie a**, aunque también fueron más potentes que gefitinib en A-431. Solo el compuesto **8** mostró ser más potente que el fármaco en todas las células tumorales. Sin embargo, las demás moléculas de la **Serie b** tienen una potencia comparable con gefitinib. De acuerdo con los parámetros de Lipinski, las moléculas **8**, **9**, **11**, **12**, **13**, **14**, y **16**, no cumplen con el número de enlaces rotables permitido (<10), esto se debe a los carbonos con hibridación sp³ que están en la fracción del aminoácido, aumentando con ello el número de grados de libertad, por lo que se dificulta la interacción con los aminoácidos del sitio activo. Este puede ser un factor que reduzca la potencia de los compuestos en líneas celulares. Los aminoácidos se incluyeron para mejorar la solubilidad acuosa de las moléculas, no obstante, también adquieren mayor movilidad.

Que gefitinib presente un ΔG menor a la molécula **6**, indica que este fármaco no solo participa en procesos citotóxicos, sino que también afecta la proliferación de células no tumorales, debido a la toxicidad en HaCaT. En la línea celular no tumoral, se observa que todas las moléculas fueron menos tóxicas que gefitinib, que presentó una IC₅₀ de 49.63 μM. Aunque **8**, **15** y **16** fueron las únicas moléculas que mostraron valores de toxicidad menores a 100 μM. Además, cabe destacar que el compuesto **8** presentó un valor de 98.42 μM. En el caso de las moléculas con IC₅₀>100 μM, no significa que no sean tóxicas, más bien, a esta concentración (la mayor a la que se evaluaron los compuestos) no mostraron efecto. Esto es de resaltar, puesto que uno de los problemas en el tratamiento contra el cáncer son los efectos secundarios de la terapia. Debido a que los compuestos mostraron ser menos tóxicos que gefitinib, da lugar a pensar que el tratamiento con las moléculas **1–16** podría ser menos perjudicial. También se observó cierta tendencia entre el valor de IIFM con la IC₅₀, pues a mayor IIFM, la IC₅₀ de los compuestos fue menor en la respectiva línea celular.

Determinación de IC₅₀ en EGFR-TKD

Debido a que **6** mostró la mayor potencia en líneas celulares tumorales y no presentó toxicidad en HaCaT, se decidió utilizar para realizar el ensayo *in vitro* en EGFR-TKD. Gefitinib fue usado como control de inhibición. Se realizó el ensayo mediante diluciones de 0.0005 a 50 μM. El ensayo con cada concentración se realizó por triplicado. En la **Tabla 15** se muestran los resultados.



Tabla 15. Valores de IC₅₀ de **6** y gefitinib en EGFR-TKD

IC ₅₀ (μM)	
6	gefitinib
0.2396±0.0249	0.02839±0.0095

De acuerdo con la tabla anterior, se puede notar que **6** es 8 veces menos potente que gefitinib, no obstante, la molécula **6** si inhibe EGFR-TKD, que es el propósito del ensayo. Estos valores no corresponden con los datos de citotoxicidad en células tumorales, donde gefitinib mostró ser menos potente que **6**. A pesar de esto, se debe tener en consideración que en células se ejecutan diversos procesos de manera simultánea que no están presentes en ensayos sobre un receptor. Ejemplo de lo anterior, es el metabolismo en las células o las bombas de expulsión de fármacos, así que también hay que tener en cuenta que estos procesos alteran el efecto de las moléculas.

La IC₅₀ de **6** en EGFR-TKD no es un valor necesariamente desalentador, ya que indica que el compuesto participa en conjunto con otros procesos. Es sabido que los derivados de quinazolina, debido a su similitud con el ATP, pueden inhibir otros receptores de tipo tirosina-cinasa que están involucrados en la proliferación celular, como VEGFR o Her2. Este experimento indica, que si bien el compuesto **6** inhibe EGFR-TKD, los datos de citotoxicidad en células revelan que también puede estar participando sobre otros receptores, a diferencia de gefitinib, que es más selectivo en EGFR-TKD.

Retomando los resultados en HaCaT, la IC₅₀ en este ensayo indicaría que gefitinib actúa inhibiendo al receptor con tal fuerza que causa toxicidad, puesto que no permite que las células no tumorales ejerzan su función proliferativa y homeostática normal. Que se inhiba fuertemente un receptor no siempre es bueno, porque también se puede producir un efecto dañino en el organismo, en especial receptores como EGFR-TKD que, aunque se sobreexpresan en células tumorales, se encuentran en células sanas del cuerpo humano.

De acuerdo con el acoplamiento molecular, aunque en ambos compuestos se mantiene el enlace de hidrógeno entre N1 en la quinazolina y M793, en el compuesto **6**, la amina de 2 forma otro enlace de hidrógeno con M793, provocando que la interacción con el residuo sea más débil, puesto que la energía de unión se distribuye entre más átomos.

Estudio del tipo de muerte celular

Para determinar el tipo de muerte celular producida por **6** y compararlo con gefitinib, se realizó el ensayo por citometría de flujo con Annexina V (AV) y Yoduro de Propidio (PI). Cabe puntualizar que AV es un anticuerpo que se une a fosfatidilserina, marcador presente en células que se encuentran en apoptosis, por otra parte, el PI es un compuesto que se intercala al ADN cuando las células liberan el material genético de su interior.

El experimento se llevó a cabo en células MDA-MB-231 y HaCaT. La línea MDA-MB-231 se eligió porque tiene la menor cantidad de EGFR, mientras que HaCaT se usó como control de toxicidad. Los resultados se obtuvieron a las 48 h de añadido el tratamiento y se usó *cis*-platino como control positivo de citotoxicidad, sin embargo, no se muestra el gráfico con *cis*-platino, porque al actuar mediante la alquilación del ADN, el mecanismo de acción no es comparable a **6** y gefitinib, que actúan inhibiendo a EGFR-TKD.

En los histogramas que se obtuvieron por citometría de flujo, se indica el porcentaje de células que se ubican en cada cuadrante. Por lo tanto, en el cuadrante Q1 se observan las células que han muerto por un mecanismo diferente a apoptosis, en Q2 se encuentran las células en apoptosis tardía, en Q3 se ubican las células en apoptosis temprana y, por último, en Q4 están las células que permanecen viables.



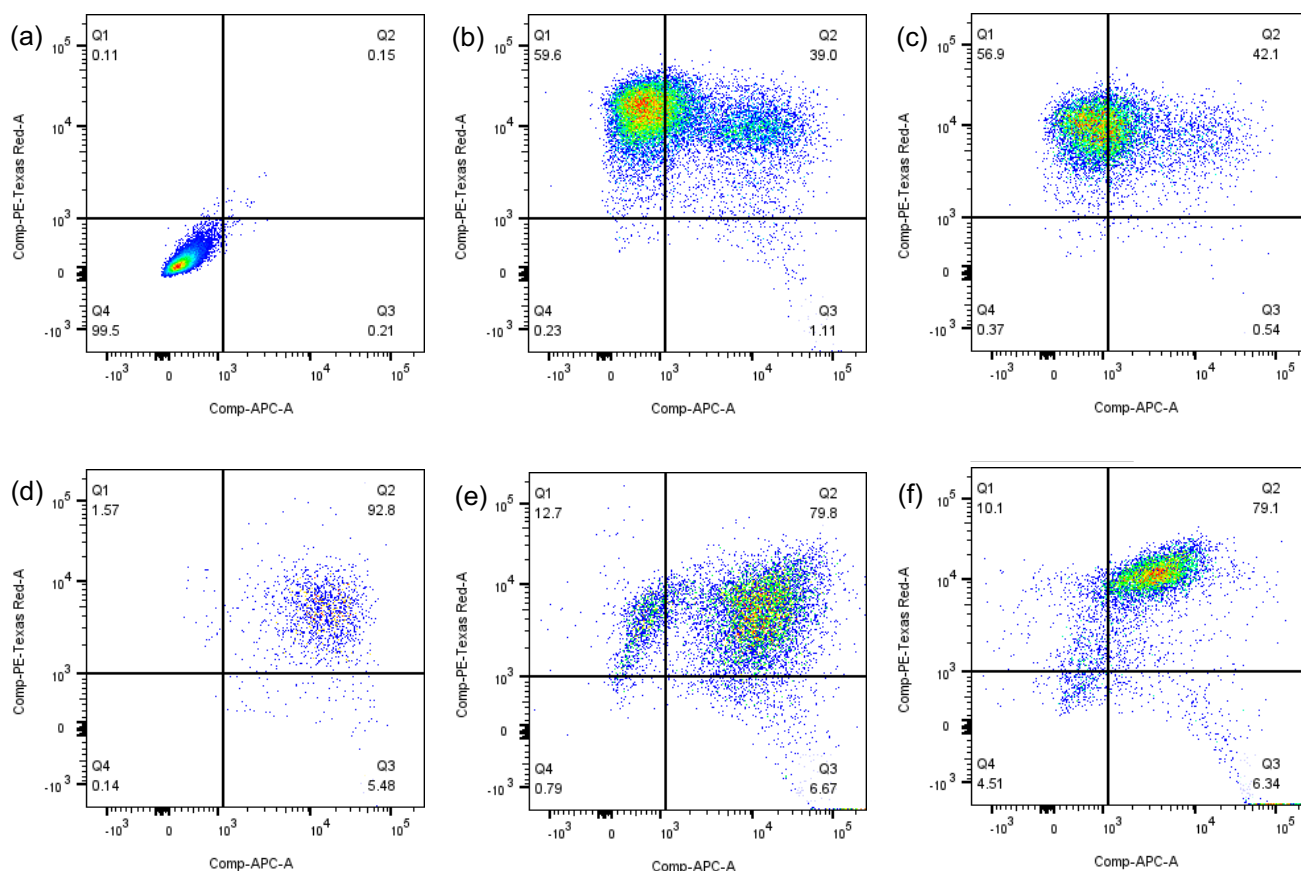


Figura 42. Histogramas en MDA-MB-231. (a) Células no teñidas; (b) Células con AV/PI; (c) Células + DMSO con AV/PI; (d) Células + IC₇₅ gefitinib con AV/PI; (e) Células + IC₅₀ **6** con AV/PI; (f) Células + IC₇₅ **6** con AV/PI.

En cuanto a MDA-MB-231, en la **Figura 42** se observan que para todos los tratamientos, hay células cerca o sobre el eje horizontal, indicando que algunas murieron antes de ser teñidas, a pesar de ello, se puede observar el efecto. La **Figura 42a**, donde se colocaron células sin teñir, indica que la mayor parte se encuentran viables, como era de esperarse, con 99.5%. Posteriormente, la **Figura 42b** muestra las células teñidas y se observa que el porcentaje principal se encuentran como muerte diferente a apoptosis con 59.6%. La **Figura 42c** indica el efecto del DMSO y con 56.9%, muestra que el disolvente por si solo mata una gran cantidad de células por un mecanismo diferente a apoptosis. En la **Figura 42d**, donde hay células con gefitinib a la IC₇₅ se observa que, el fármaco principalmente induce apoptosis, con la suma de 97.78%. En el caso de la **Figura 42e**, donde hay células con **6** a la IC₅₀, se observa que el mayor porcentaje se encuentra en apoptosis con un valor total de 86.47%. Por último, la **Figura 42f**, que muestra células con **6** a la IC₇₅, indica un comportamiento similar que con IC₅₀, con total de 85.44% por apoptosis.

Con respecto a los resultados en HaCaT, la **Figura 43** evidencia también, que hay células que murieron antes de ser teñidas. La **Figura 43a** muestra las células sin teñir, con 99.3% de células viables. Por otra parte, en la **Figura 43b** donde se colocaron células teñidas, indica un valor total de 69% para apoptosis y, 17.0% por algún otro mecanismo. Siguiendo con la **Figura 43c**, el efecto provocado por DMSO, fue principalmente 71.2% mediante apoptosis, indicando de nueva cuenta, que el disolvente induce muerte celular. Pasando a la **Figura 43d**, indica como gefitinib a la IC₇₅, muestra mayoritariamente muerte celular por apoptosis con un total del 89.3%. Por otra parte, la **Figura 43e**, muestra que **6** a la IC₅₀ provoca mayoritariamente, muerte celular por apoptosis, con la suma de 80.0%. Para terminar, en la **Figura 43f**, donde se colocaron células con **6** a la IC₇₅ se visualiza un comportamiento similar que con IC₅₀ donde suman 89.2% de muerte celular por apoptosis.



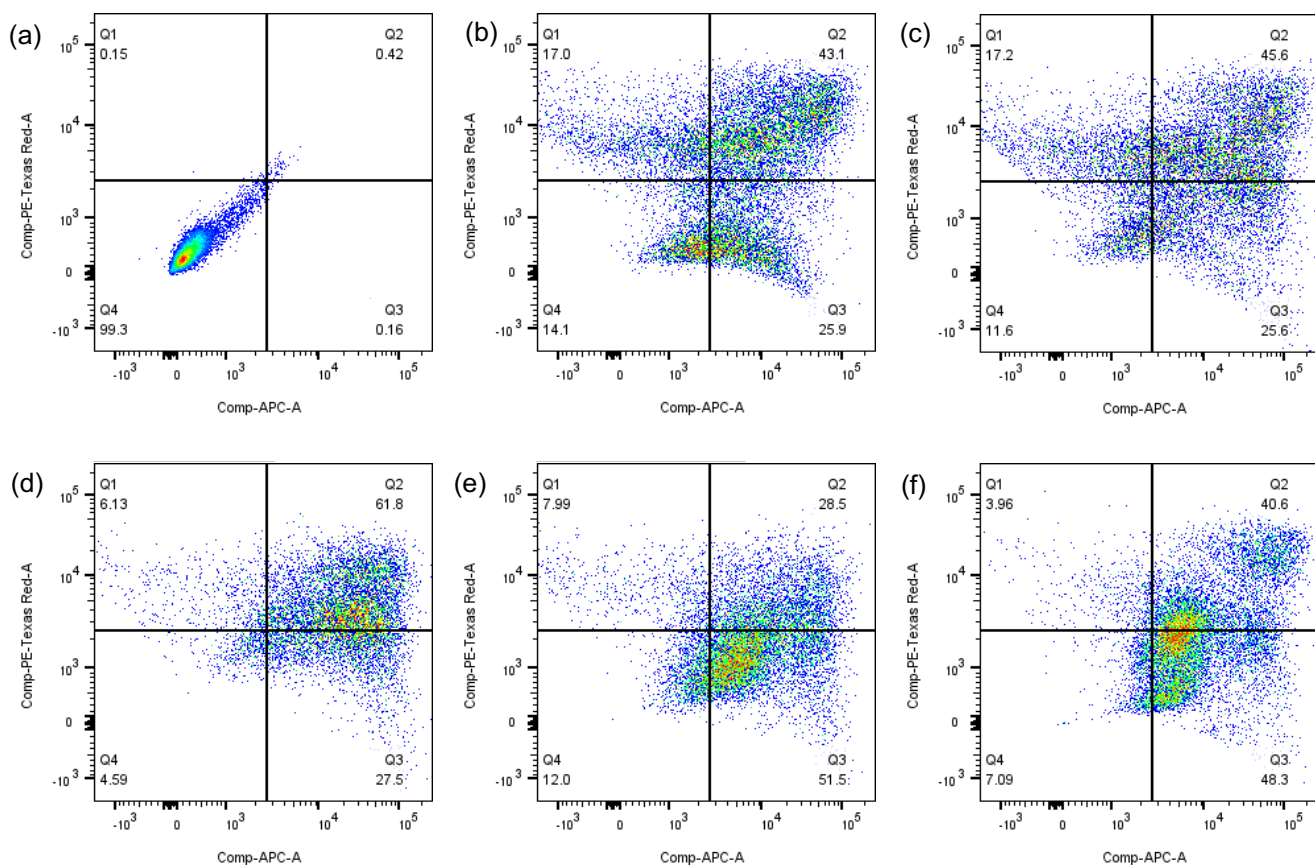


Figura 43. Hitogramas en HaCaT. (a) Células no teñidas; (b) Células con AV/PI; (c) Células+DMSO con AV/PI; (d): Células + IC₇₅ gefitinib con AV/PI; (e) Células + IC₅₀ **6** con AV/PI; (f) Células + IC₇₅ **6** con AV/PI.

Con base en los gráficos obtenidos en MDA-MB-231 y HaCaT, **6** y gefitinib pueden compararse de acuerdo al tipo de muerte celular que provocan. No obstante, el porcentaje varía debido a que hay un número considerable de células que murieron antes de ser teñidas, por ende, el experimento debería repetirse. Estos resultados indican que **6** y gefitinib inducen principalmente apoptosis en células de mama (MDA-MB-231) y de piel (HaCaT). La importancia de que los fármacos induzcan apoptosis como mecanismo de muerte, recae en que pueden activarse los mecanismos de reparación celular y pueden corregir daños que presenten las células y transformarlas a un fenotipo no tumoral mediante desdiferenciación. En caso de no ser reparadas, las células son degradadas por el sistema inmune. Las células apoptóticas presentan marcadores de membrana que activan una señal inmunitaria que hace que células B, células T y macrófagos, las identifiquen como antígenos y eliminen del organismo, aumentando el reconocimiento de células cancerígenas sobre células sanas. Por otra parte, la muerte por necrosis se produce cuando las células tienen lesiones, por lo que el contenido celular se disemina al exterior, produciendo inflamación en el organismo. Como se discutió anteriormente, la inflamación promueve el microambiente idóneo para iniciar procesos tumorales, por ende, este mecanismo se desea evitar cuando se desarrollan moléculas para combatir el cáncer.

Inhibición de edema provocado por TPA

Uno de los objetivos en este trabajo fue obtener moléculas que, además de presentar citotoxicidad *in vitro*, también aportaran antiinflamación *in vivo*, que hiciera menos favorecedor el microambiente que conduce a la formación de tumores. Debido a ello, incluir una porción antiinflamatoria en las moléculas, como es (S)-ibuprofeno, puede potenciar tal efecto.



Se sabe que en el organismo hay diversas vías que producen inflamación, siendo una de las más estudiadas la vía de las prostaglandinas, esta vía es mediada por acción de COX-2. De acuerdo con acoplamiento molecular, **6** tuvo el mejor perfil energético con un valor de -6.59 kcal/mol, mientras que (S)-ibuprofeno un valor de -3.59 kcal/mol. Considerando estos resultados, se evaluó el efecto de **6** y (S)-ibuprofeno con la prueba de TPA. El resultado del ensayo se encuentra en la **Tabla 16**, se indica el peso de la biopsia, la concentración administrada y el porcentaje de inhibición del edema.

Tabla 16. Efecto de **6** y (S)-ibuprofeno a dosis de 1mg/oreja. *Valores $p \leq 0.05$ como significativos. n=3

Tratamiento	Biopsia (mg)	Concentración (M)	Inhibición edema (%)
TPA	16.00±0.21	-	-
TPA + 6	11.28±0.91*	0.12	29.53±5.70*
TPA + (S)-ibuprofeno	15.10±0.15	0.24	5.62±0.95

El compuesto **6** disminuyó 29.53% el edema, siendo 5.8 veces más potente que (S)-ibuprofeno, con valor de 5.62%. También se observa que la concentración para alcanzar el efecto de **6** fue solo la mitad que con (S)-ibuprofeno, por lo que **6** tiene un mayor actividad antiinflamatoria. Los valores concuerdan con el acoplamiento molecular, en el que la molécula **6** presentó mejor perfil energético que se traduce en un ΔG más negativo. Además, tanto **6** como (S)-ibuprofeno, presentan interacción con S531 en el sitio de unión del ácido araquidónico de COX-2.

Hay enfatizar que, si bien los resultados experimentales y teóricos fueron favorables, con respecto a la actividad antiinflamatoria, la forma inequívoca de conocer si una molécula inhibe COX-2, es con el ensayo sobre la enzima. En la evaluación *in vivo*, los compuestos pueden actuar sobre otros mecanismos que producen inflamación, por lo que no es posible conocer si el efecto se da solo por la inhibición de COX-2. Aunque es importante realizar el ensayo sobre la enzima, la molécula **6** es candidata para su uso como agente antiinflamatorio, demostrando así el efecto dual de **6**, citotóxico *in vitro* y antiinflamatorio *in vivo*.

Dinámica molecular

Con el fin de obtener más datos que aporten información a la actividad citotóxica y antiinflamatoria, se realizó el estudio de dinámica molecular de **6** y gefitinib en EGFR-TKD (PDB ID: 4WKQ) y de **6** y (S)-ibuprofeno en COX-2 (PDB ID: 5JW1).

Comenzando por EGFR-TKD, en la **Figura 44**, se observa el comportamiento de **6**. El gráfico RMSD (**Figura 44a**) indica que el complejo se mantiene estable a partir de 10 hasta 50 ns, aunque en 30 ns aproximadamente, se observa una fluctuación en el sistema, posiblemente debido a un cambio en la conformación del ligando. Al no presentar valores de RMSD mayores a 0.4 nm, el sistema se considera estable. Cabe destacar que antes de 10 ns, el ligando está entrando al sitio de unión, por ello presenta valores de RMSD menores, pues el sistema se encuentra más relajado. Posteriormente, la **Figura 44b** indica el movimiento de los átomos del ligando en el receptor. Se observa que el núcleo de quinazolina se mantiene con poca movilidad, mientras que el *isobutilo* del (S)-ibuprofeno tiene más movimiento. Este comportamiento se relaciona con los grados de libertad de los átomos con hibridación sp^3 . También se observa que la porción de β -alanina tiene poco movimiento, pues de acuerdo con el acoplamiento molecular, la amina libre forma un doble enlace de hidrógeno con el receptor, provocando que el ligando esté más fijo. La **Figura 44c** muestra los aminoácidos que interaccionan con el ligando, siendo que K721 se encuentra en mayor proporción, seguido de M793 y por último D800. Por último, la proporción del tipo de interacción entre **6** y los aminoácidos, está en la **Figura 44d**. En mayor índice se presenta un puente de agua con M793, seguido por enlace de hidrógeno con M793, K721 y D800.



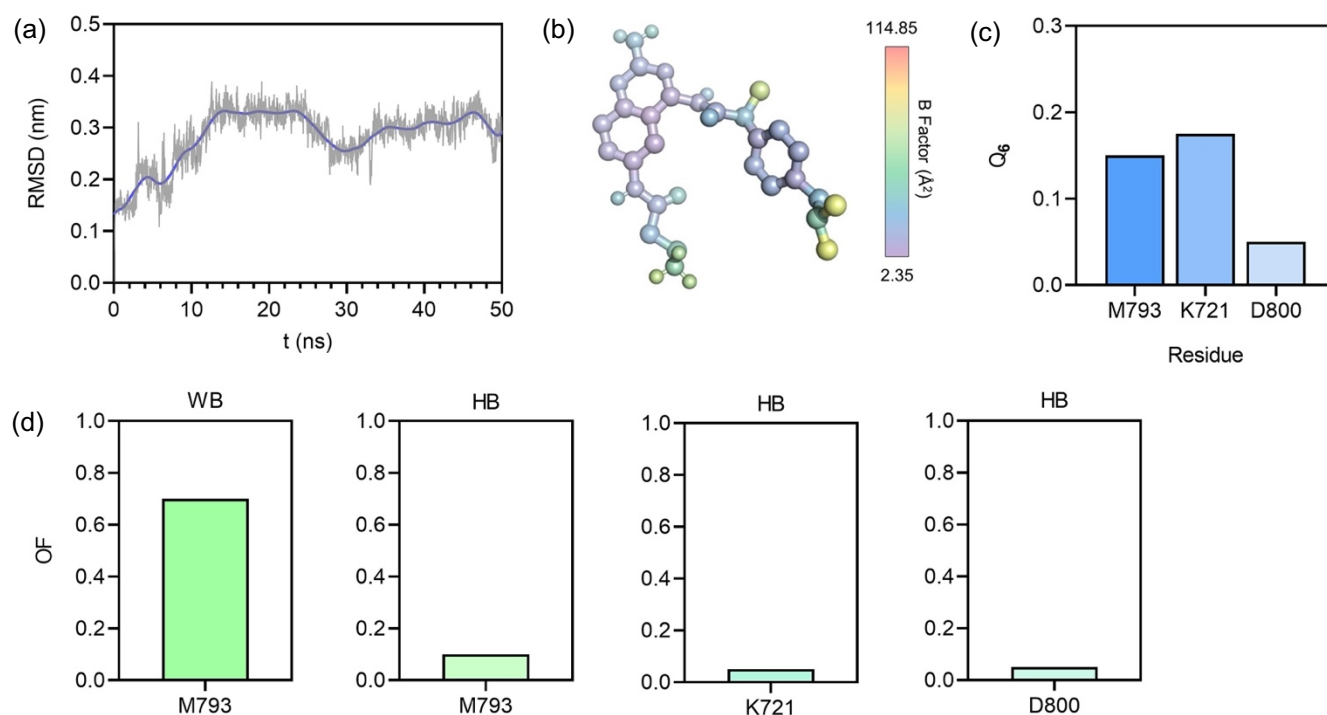


Figura 44. Dinámica [6/EGFR]. (a) Gráfico RMSD; (b) Factor B de **6**; (c) Proporción de interacción con los aminoácidos; (d) Fracción de enlace de hidrógeno (HB) y puente de agua (WB).

También se realizó la dinámica de gefitinib en EGFR-TKD con el fin de contrastar el comportamiento de ambos compuestos. En el gráfico RMSD (**Figura 45a**), se observa que gefitinib permanece con menos fluctuaciones, aunque con valores más altos, por lo que este sistema es menos estable comparado con **6**. Posteriormente la **Figura 45b** muestra que los átomos en el gefitinib permanecen con poco movimiento, siendo la porción de *p*-tolil la que presenta mayor movilidad, debido a la hibridación sp^3 de los átomos en el anillo. Por otra parte, en la **Figura 45c**, se observa que los aminoácidos que interactúan en mayor proporción con el receptor son K721, seguido de M793 y D800, al igual que **6**, aunque la proporción es menor. La **Figura 45d** indica que la interacción principal es por puente de agua con M793, seguido por enlace de hidrógeno con M793, K721 y D800.

El estudio en EGFR-TKD, demostró que ambos compuestos tienen contacto con M793, residuo esencial para inhibir al receptor, aunque esta interacción permanece por más tiempo en el complejo con **6**. La dinámica muestra la misma tendencia que el ensayo de citotoxicidad, pues **6** es más potente en líneas celulares cancerosas. Por otra parte, **6** y gefitinib fueron estables durante el estudio, aunque el gráfico RMSD y el factor B indican que gefitinib permanece con menor movilidad en el sitio de unión. Hay que considerar que la mutación T793M produce resistencia a fármacos. En este caso, **6** actúa interactuando con M793, no obstante, no es descartable que, de presentarse la reversión a la mutación, las células puedan crear resistencia al tratamiento, por lo que sería interesante realizar la dinámica con un receptor que tenga T793 para observar el comportamiento del ligando.

Posteriormente se realizó la dinámica en COX-2. Comenzando con **6**, la **Figura 46a** muestra que el complejo [6/COX-2] permanece estable, con valores de RMSD por debajo de 0.3 nm. Además, a partir de 4 ns no se observan fluctuaciones significativas, con lo que el ligando permanece sin perturbaciones en el sitio de unión. Este comportamiento se apoya con la **Figura 46b**, que indica que los átomos del ligando no presentan mucho movimiento. En la **Figura 46c** se observa que las principales interacciones entre el ligando y COX-2, son con S531 seguido de Y386. El contacto que permanece por mayor tiempo es por puente de agua con S531, seguido de enlace de hidrógeno con S531 y Y386, como lo indica la **Figura 46d**.



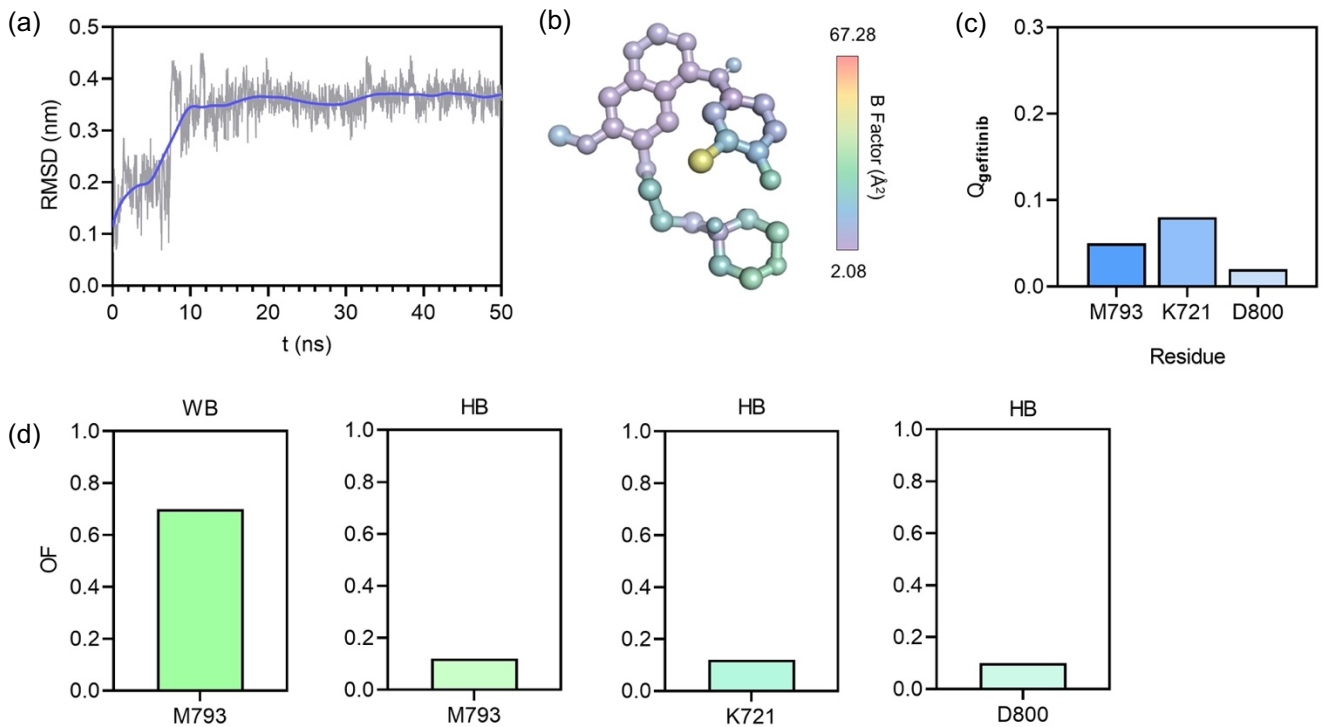


Figura 45. Dinámica [gefitinib/EGFR]. (a) Gráfico RMSD; (b) Factor B de gefitinib; (c) Proporción de interacción con los aminoácidos; (d) Fracción de enlace de hidrógeno (HB) y puente de agua (WB).

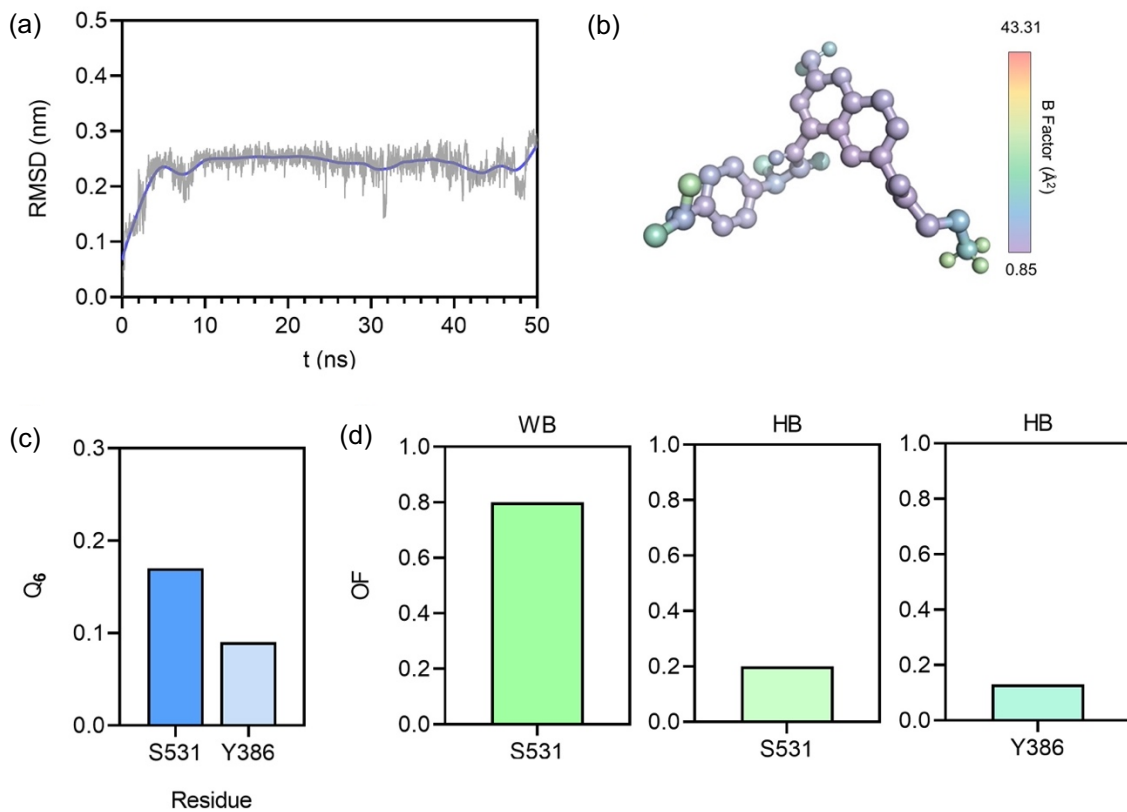


Figura 46. Dinámica [6/COX-2]. (a) Gráfico RMSD; (b) Factor B de 6; (c) Proporción de interacción con los aminoácidos; (d) Fracción de enlace de hidrógeno (HB) y puente de agua (WB).



En la **Figura 47**, indican los datos con (S)-ibuprofeno. El gráfico RMSD (**Figura 47a**) presenta valores por debajo a 0.2 nm, indicando que el complejo [ibuprofeno/COX-2] es más estable que con **6**. Las fluctuaciones en el gráfico RMSD se explican con el factor B (**Figura 47b**). Aquí se observa que los átomos en las porciones alifáticas tienen mayor movilidad. Como resultado la interacción con los aminoácidos está menos favorecida. Además, el (S)-ibuprofeno al ser una molécula pequeña, puede entrar y salir del sitio de unión con mayor facilidad, dando lugar a las fluctuaciones del sistema. En la **Figura 47c**, se muestran las interacciones con el sitio de unión en COX-2. La que se mantiene por más tiempo es con S531 seguida de Y386. Por otra parte, el tipo de unión con los aminoácidos, como lo indica la **Figura 47d**, es por puente de agua con S531, que se mantiene durante toda la simulación, seguido por enlace de hidrógeno con S531 y Y386.

Se confirma que (S)-ibuprofeno y **6** interactúan con S531, residuo esencial para inhibir COX-2. El (S)-ibuprofeno, presenta la interacción con S531 por más tiempo, pero el complejo con **6** es más estable, pues presenta menos fluctuaciones. Los resultados son consistentes con el acoplamiento molecular donde **6** presentó menor ΔG . También mantienen la tendencia del ensayo de antiinflamación *in vivo*, en el que **6** demostró ser más potente que (S)-ibuprofeno.

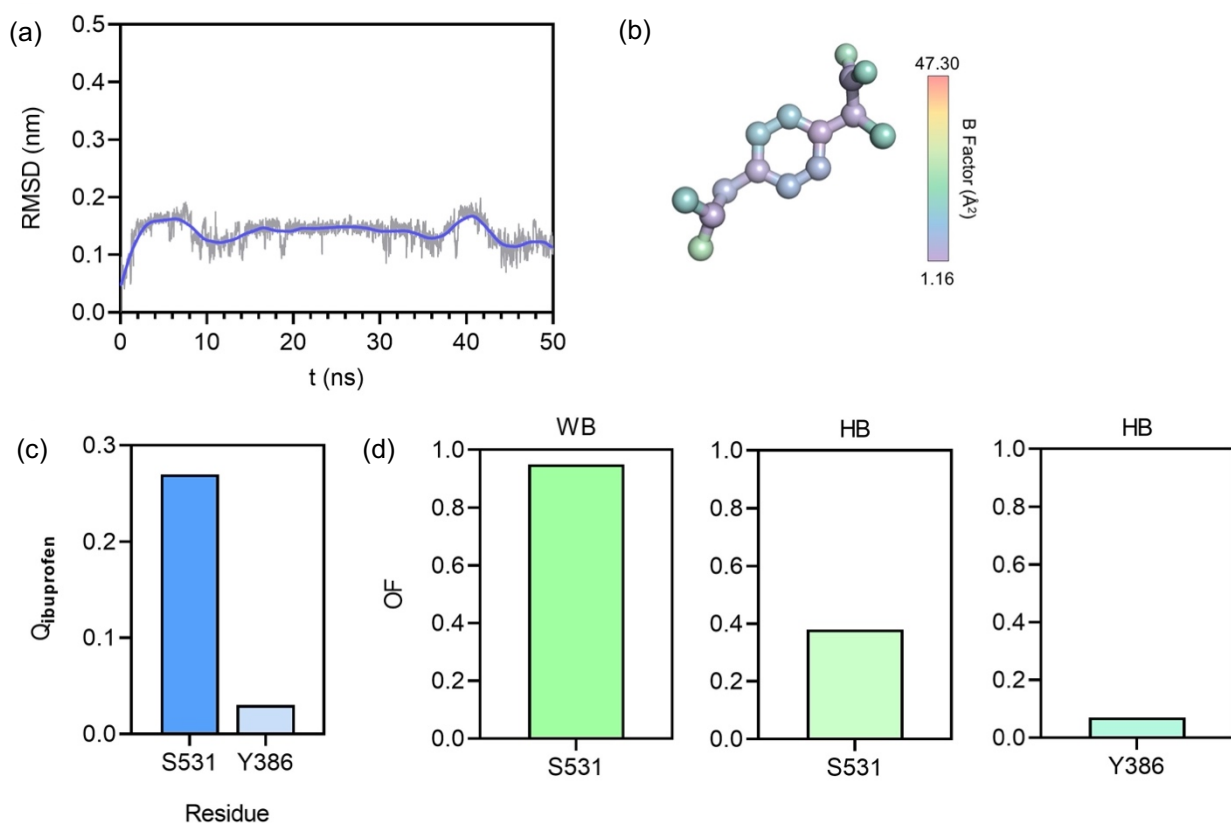


Figura 47. Dinámica de [ibuprofeno/COX-2]. (A) Gráfico RMSD; (B) Factor B de ibuprofeno; (C) Proporción de interacción con los aminoácidos; (D) Fracción de enlace de hidrógeno (HB) y puente de agua (WB).

Uno de los problemas para inhibir EGFR-TKD con respecto al tratamiento con derivados de quinazolina, es la resistencia debido a la mutación T793M. En este proyecto se demostró que **6** inhibe EGFR-TKD mediante la interacción con M793, no obstante, el tratamiento con este compuesto también puede crear resistencia a largo plazo. Sin embargo, a diferencia de gefitinib, **6** no posee una 4-anilina, que es la encargada de activar la mutación que produce resistencia. Además, el acomodo que adopta **6** en el sitio de unión no es similar a los derivados de 4-anilino quinazolina típicos, por ende, aunque ocurra la mutación, el compuesto puede ingresar al sitio activo e inhibir al receptor.



Conclusiones

Se obtuvieron 16 compuestos constituidos por una quinazolina, ibuprofeno y un aminoácido, diseñados como inhibidores de EGFR-TKD y COX-2. El acoplamiento molecular mostró que los compuestos presentan energías de unión comparables a gefitinib, inhibidor de EGFR-TKD, y superiores a ibuprofeno, inhibidor de COX-2. La molécula **6** presentó el menor ΔG en ambos receptores. Respecto valor EL, en EGFR-TKD, **6** mostró que sus átomos tienen una mayor contribución a la energía de unión. Por otra parte, en COX-2, la molécula **2** presenta la mejor EL, por lo que sus átomos contribuyen más eficientemente al ΔG . No obstante, para toda la serie, los valores EL son más positivos que -0.3 kcal/mol/HA. Por ende, los ligandos deberían ser optimizados para que la eficiencia de los átomos aumente junto con el valor ΔG . En relación con el IIFM, se observa una tendencia entre el EGFR disponible y la potencia de las moléculas en líneas celulares cancerosas, donde a mayor valor de IIFM, la citotoxicidad de los compuestos también aumenta. En el ensayo sobre células cancerosas, algunos compuestos mostraron ser más potentes que gefitinib, destacando a **6** como el compuesto líder, sobre todo en células A-431. Un hecho a enfatizar son los resultados en HaCaT (células no tumorales), donde todos los compuestos mostraron ser menos tóxicos que gefitinib. El experimento en EGFR-TKD demostró que **6**, comparado con gefitinib, inhibe con menor potencia al receptor. Este comportamiento también indica que **6** podría participar en la inhibición de otras dianas involucradas en la proliferación celular. Respecto al tipo de muerte celular, la molécula **6** induce apoptosis principalmente. Este resultado es de suma importancia pues la activación de este mecanismo provoca menos efectos adversos. En cuanto a la prueba de antiinflamación *in vivo*, la molécula **6**, a la mitad de la concentración, fue 5 veces más potente que ibuprofeno, por lo que **6** tiene mayor actividad antiinflamatoria. La dinámica en EGFR-TKD indica que **6** interacciona con M793 por puente de agua y el complejo permanece estable. Por otra parte, en COX-2, está presente la interacción entre **6** y S531 mediante puente de agua y, de manera similar, indica que el sistema es estable y las interacciones entre el ligando y los aminoácidos se ven favorecidas. De acuerdo con los resultados en la evaluación biológica, en apoyo de los estudios teóricos, se obtuvo una molécula con efecto citotóxico *in vitro* y antiinflamatorio *in vivo*, por lo tanto, se demostró la hipótesis de este trabajo.

Perspectivas

Para confirmar que las moléculas son menos tóxicas que gefitinib, es necesario obtener resultados en al menos dos líneas celulares no tumorales más (por ejemplo, COS-7, FGH o macrófagos). Es importante recalcar que, para aumentar la potencia en EGFR-TKD, se pueden optimizar la estructura de **6** (molécula líder), haciendo uso de parámetros como EL, ELL o cLogP, con el fin de mejorar el perfil energético con base en la contribución de los átomos de las moléculas. Con el ligando optimizado, se debe repetir el experimento *in vitro* en EGFR-TKD, para corroborar si la potencia del compuesto incrementa. Con respecto a la actividad antiinflamatoria, además de realizar el acoplamiento y la dinámica molecular en COX-2 de la molécula optimizada, hay dos experimentos que añaden información. El primero es un ensayo *in vitro* con un kit de citocinas antiinflamatorias (IL-4, IL10, NF- κ B), donde se activan las citocinas propias de cada vía. También se necesita realizar el ensayo sobre COX-2, para determinar si el efecto antiinflamatorio es provocado únicamente por inhibición de esta enzima. Si el resultado de los ensayos anteriores es prometedor, la molécula **6** y/o los derivados obtenidos de la optimización pueden ser evaluados en ensayos clínicos de fase 0 como agentes anticancerígenos o antiinflamatorios, pues el propósito de estos estudios es agilizar el proceso de aprobación del fármaco por la FDA para las etapas posteriores.



Referencias bibliográficas

- [1] *American Cancer Society*. <https://www.cancer.org/es/cancer/> (2023-05-01)
- [2] Hanahan, D.; Weinberg, R. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **2000**, *100* (7), 57–70. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9
- [3] *Medline Plus*. <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/002324> (2024-02-07)
- [4] *NIH. Instituto Nacional del Cáncer*. <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/> (2024-02-07)
- [5] *SEBBM*. <https://sebbm.es/> (2024-02-07)
- [6] *QUIMICA.ES*. <https://www.quimica.es/enciclopedia/Zwitterion> (2023-05-01)
- [7] *Organización Mundial de la Salud*. <https://www.who.int/> (2023-05-01)
- [8] *Organización Panamericana de la Salud*. <https://www.paho.org/> (2023-05-01)
- [9] *Sistema Nacional de Información Estadística y Geográfica*. <https://www.inegi.org.mx/> (2023-05-01)
- [10] *NIH. Instituto Nacional del Cáncer*. <https://www.cancer.gov/> (accedido 2023-05-10)
- [11] Allan, J.; Travis, L. Mechanism of Therapy-Related Carcinogenesis. *Nat. Rev.* **2005**, *5* (1), 943–955. DOI: 10.1038/nrc1749
- [12] Yuan, S.; Nordgard, R.; Stranger, B. Cellular Plasticity in Cancer. *Cancer Discov.* **2019**, *9* (7), 837–851. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-19-0015
- [13] Tata, P.; Rajagopal, J.; Cellular Plasticity: 1972 to the Present Day. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2016**, *43* (1), 46–54. DOI: 10.1016/j.ceb.2016.07.005
- [14] Merrell, A.; Stranger, B. Adult Cell Plasticity *in vivo*: Dedifferentiation and Transdifferentiation are Back in Style. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2016**, *17* (7), 413–425. DOI: 10.1038/nrm.2016.24
- [15] Raff, M. Adult Stem Cell Plasticity: Fact or Artifact? *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2003**, *19* (1), 1–22. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.19.111301.143037
- [16] Jopling, C.; Boue, S.; Izpisua, J. C. Dedifferentiation, Transdifferentiation and Reprogramming: Three Routes to Regeneration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2011**, *12* (1), 79–89. DOI: 10.1038/nrm3043
- [17] Takahashi, K.; Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **2006**, *126* (4), 663–676. DOI: 10.1016/j.cell.2006.07.024
- [18] Davis, R. L.; Weintraub, H.; Lassar, A. B.; Expression of a Single Transfected cDNA Converts Fibroblasts to Myoblasts. *Cell* **1987**, *51* (6), 987–1000. DOI: 10.1016/0092-8674(87)90585-x
- [19] Nieto, M. A.; Huang, R.; Jackson, R.; Thiery, J. P. EMT: 2016. *Cell* **2016**, *166* (1), 21–45. DOI: 10.1016/j.cell.2016.06.028
- [20] Latil, M.; Nassar, D.; Beck, B.; Boumadhi, S.; Wang, L.; Brisebarre, A.; DuBois, C.; Nkusi, E.; Lenglez, S.; Checinska, A.; Drubbel, A.; Devos, M.; Declercq, W.; Yi, R.; Blanpain, C. Cell-Type-Specific Chromatin States Differentially Prime Squamous Cell Carcinoma Tumor-Initiating Cells for Epithelial to Mesenchymal Transition. *Cell Stem Cell* **2017**, *20* (2), 191–204. DOI: 10.1016/j.stem.2016.10.018
- [21] Collisson, E.; Sadanandam, A.; Olson, P.; Gibb, W.; Truitt, M.; Gu, S.; Cooc, J.; Weinkle, J.; Kim, G.; Jakkula, L.; Feiler, H.; Ko, A.; Olshen, A.; Danenberg, K.; Tempero, M.; Spellman, P.; Hanahan, D.; Gray, J. Subtypes of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Their Differing Responses to Therapy. *Nat. Med.* **2011**, *17* (4), 500–503. DOI: 10.1038/nm.2344
- [22] Shaffer, S.; Dunagin, M.; Torborg, S.; Torre, E.; Emert, B.; Kepler, C.; Bequiri, M.; Sproesser, K.; Brafford, P.; Xiao, M.; Eggan, E.; Anastopoulos, I.; Vargas-Garcia, C.; Singh, A.; Nathanson, K.; Herlyn, M.; Raj, A. Rare Cell Variability and Drug-Induced Reprogramming as a Mode of Cancer Drug Resistance. *Nature* **2017**, *546* (7658), 431–435. DOI: 10.1038/nature22794
- [23] Aiello, N.; Bajor, D.; Norgard, R.; Sahnoud, A.; Bhagwat, N.; Pham, M.; Cornish, T.; Vonderheide, R.; Stranger, B. Metastatic Progression is Associated with Dynamic Changes in the Local Microenvironment. *Nat. Commun.* **2016**, *7* (12819), 1–9. DOI: 10.1038/ncomms12819
- [24] Sequist, L.; Waltman, B.; Dias-Santagata, D.; Digumarthy, S.; Shaw, A.; Gettinger, S.; Cospers, A.; Akhavanfard, S.; Heist, R.; Temel, J.; Christensen, J.; Wain, J.; Lynch, T.; Vernosky, K.; Mark, E.; Lanuti, M.; Iafrate, A.; Mino-Kenudson, M.; Engelman, J. Genotypic and Histological Evolution of Lung Cancers Acquiring Resistance to EGFR Inhibitors. *Sci. Transl. Med.* **2011**, *3* (75), 1–12. DOI: 10.1126/scitranslmed.3002003
- [25] Yu, H.; Arcila, M.; Rekhtman, N.; Sima, C.; Zakowski, M.; Pao, W.; Kris, M.; Miller, V.; Ladanyi, M.; Riely, G. Analysis of Tumor Specimens at the Time of Acquired Resistance to EGFR-TKI Therapy in 155 Patients with EGFR-Mutant Lung Cancers. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19* (8), 2240–2247. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2246
- [26] Byers, L.; Wang, J.; Nilsson, M.; Fujimoto, J.; Saintigny, P.; Liu, W.; Weinstein, J.; Minna, J.; Heymach, J. Proteomic Profiling Identifies Dysregulated Pathways in Small Cell Lung Cancer and Novel Therapeutic Targets Including PARP1. *Cancer Discov.* **2012**, *2* (9), 798–811. DOI: 10.1158/2159-8290



- [27] Rudin, C.; Durinck, S.; Stawiski, E.; Poirier, J.; Modrusan, Z.; Shames, D.; Bergbower, E.; Guan, Y.; Shin, J.; Guillory, J.; Rivers, C.; Foo, C.; Bhatt, D.; Stinson, J.; Gnad, F.; Haverty, P.; Gentleman, R.; Chaudhuri, S.; Janakirama, V.; Jaiswal, B.; Parikh, C.; Yuan, W.; Zhang, Z.; Koeppen, H.; Wu, T.; Stern, H.; Yauch, R.; Huffman, K.; Paskulin, D.; Illei, P.; Varella-Garcia, M.; Gazdar, A.; Sauvage, F.; Bourgon, R.; Minna, J.; Brock, M.; Seshagiri, S. Comprehensive Genomic Analysis Identifies SOX2 as a Frequently Amplified Gene in Small-Cell Lung Cancer. *Nat. Genet.* **2012**, *44* (10), 1111–1116. DOI: 10.1038/ng.2405
- [28] Neiderst, M.; Sequist, L.; Poirier, J.; Mermel, C.; Lockerman, E.; Garcia, A.; Katayama, R.; Costa, C.; Ross, K.; Moran, T.; Howe, E.; Fulton, L.; Mulvey, H.; Bernardo, L.; Mohamoud, F.; Miyoshi, N.; VanderLaan, P.; Costa, D.; Janne, P.; Borger, D.; Ramaswamy, S.; Shioda, T.; Iafrate, A.; Getz, G.; Rudin, C.; Mino-Kenudson, M.; Engelman, J. RB Loss in Resistant EGFR Mutant Lung Adenocarcinomas That Transform to Small-Cell Lung Cancer. *Nat. Commun.* **2015**, *6* (6377), 1–10. DOI: 10.1038/ncomms7377
- [29] Kovacs, E.; Zorn, J.; Huang, Y.; Barros, T.; Kuriyan, J. A Structural Perspective on the Regulation of the Epidermal Growth Factor Receptor. *Annu. Rev. Biochem.* **2015**, *84* (1), 739–764. DOI: 10.1146/annurev-biochem-060614-034402
- [30] Tzahar, E.; Waterman, H.; Chen, X.; Levkowitz, G.; Karunakaran, D.; Lavi, S.; Ratzkin, B.; Yarden, Y. A Hierarchical Network of Interreceptor Interactions Determines Signal Transduction by Neu Differentiation Factor/Neuregulin and Epidermal Growth Factor. *Mol. Cell Biol.* **1996**, *16* (10), 5276–5287. DOI: 10.1128/MCB.16.10.5276
- [31] Pawson, T.; Scott, J. Signaling Through Scaffold, Anchoring, and Adaptor Proteins. *Science* **1997**, *278* (5346), 2075–2080. DOI: 10.1126/science.278.5346.2075
- [32] Cantor, A. Shah, N.; Kuriyan, J. Deep Mutational Analysis Reveals Functional Trade-Offs in the Sequences of EGFR Autophosphorylation Sites. *PNAS* **2018**, *115* (31), 1–10. DOI: 10.1073/pnas.1803598115
- [33] Bose, R.; Holbert, M.; Pickin, K.; Cole, P. Protein Tyrosine Kinase-Substrate Interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2006**, *16* (6), 668–675. DOI: 10.1016/j.sbi.2006.10.012
- [34] Mayer, B. Perspective: Dynamics of Receptor Tyrosine Kinase Signaling Complexes. *FEBS Lett.* **2012**, *586* (17), 2575–2579. DOI: 10.1016/j.febslet.2012.05.002
- [35] Deng, Y.; Alicea-Velázquez, N.; Bannwarth, L.; Lethonen, S.; Boggon, T.; Cheng, H.; Hytonen, V.; Turk, B. Global Analysis of Human Nonreceptor Tyrosine Kinase Specificity Using High-Density Peptide Microarrays. *J. Proteome Res.* **2014**, *13* (10), 4339–4346. DOI: 10.1021/pr500503q
- [36] Knudsen, S.; Mac, A.; Henriksen, L.; van Deurs, B. EGFR Signaling Patterns are Regulated by its Different Ligands. *Growth Factors* **2014**, *32* (5) 155–163. DOI: 10.3109/08977194.2014.952410
- [37] Gil, K.; McDonald-Obermann, J.; Pike, L. Epidermal Growth Factor Receptors Containing a Single Tyrosine in Their C-Terminal Tail Bind Different Effector Molecules and are Signaling-Competent. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292* (50), 20744–20755. DOI: 10.1074/jbc.M117.802553
- [38] Paez, G.; Janne, P.; Lee, J.; Tracy, S.; Greulich, H.; Gabriel, S.; Herman, P.; Kaye, F.; Lindeman, N.; Boggon, T.; Naoki, K.; Sasaki, H.; Fujii, Y.; Eck, M.; Sellers, W.; Johnson, B.; Meyerson, M. EGFR Mutations in Lung Cancer: Correlation with Clinical Response to Gefitinib Therapy. *Science* **2004**, *304* (5676), 1497–1500. DOI: 10.1126/science.1099314
- [39] Lynch, T.; Bell, D.; Sordella, R.; Gurubhagavatula, S.; Okimoto, R.; Brannigan, B.; Harris, P.; Haserlat, S.; Supko, J.; Haluska, F.; Louis, D.; Christiani, D.; Settleman, J.; Haber, D. Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *350* (21), 2129–2139. DOI: 10.1056/NEJMoa040938
- [40] Yun, C.; Mengwasser, K.; Toms, A.; Woo, M.; Greulich, H.; Wong, K.; Meyerson, M.; Eck, M. The T790M Mutation in EGFR Kinase Causes Drug Resistance by Increasing the Affinity for ATP. *PNAS* **2008**, *105* (6), 2070–2075. DOI: 10.1073/pnas.0709662105
- [41] Sato, T.; Watanabe, H.; Tsuganezawa, K.; Yuki, H.; Mikuni, J.; Yoshikawa, S.; Kukimoto-Niino, M.; Fujimoto, T.; Terazawa, Y.; Wakiyama, M.; Kojima, H.; Okabe, T.; Nagano, T.; Shirouzu, M.; Yokoyama, S.; Tanaka, A.; Honma, T. Identification of Novel Drug-Resistant EGFR Mutant Inhibitors by *in silico* Screening Using Comprehensive Assessments of Protein Structures. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20* (1), 3756–3767. DOI: 10.1016/j.bmc.2012.04.042
- [42] Meden, H.; Kuhn, W. Overexpression of the Oncogene c-erbB-2 (Her2/neu) in Ovarian Cancer: A New Prognostic Factor. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **1997**, *71* (2), 173–179. DOI: 10.1016/s0301-2115(96)02630-9
- [43] Modjtahedi, H.; Dean, C. The Receptor for EGF and its Ligands-Expression, Prognostic Value and Target for Therapy in Cancer. *Int. J. Oncol.* **1994**, *4* (2), 277–296. DOI: 10.3892/ijo.4.2.277
- [44] Chen, X.; Yeung, T.; Wang, Z. Enhanced Drug Resistance in Cells Coexpressing ErbB2 with EGF Receptor or ErbB3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *3* (277), 757–773. DOI: 10.1006/bbrc.2000.3731



- [45] Hsieh, S.; Malerczyk, C.; Aigner, A.; Czubyko, F. ERB-2 Expression is Rate-Limiting for Epidermal Growth Factor-Mediated Stimulation of Ovarian Cancer Cell Proliferation. *Int. J. Cancer* **2000**, *86* (5), 644–651. DOI: 10.1002/(sici)1097-0215(20000601)86:5<644:aid-ijc7>3.0.co;2-t
- [46] Banerjee, R.; Rachid, Z.; Qiu, Q.; McNamee, J.; Tari, A.; Jean-Claude, B. Sustained Antiproliferative Mechanisms by RB, a Targeted Precursor of Multiple Inhibitors of Epidermal Growth Factor Receptor, and a DNA Alkylating Agent in the A-431 Epidermal Carcinoma of the Vulva Cell Line. *Br. J. Cancer* **2004**, *91* (1), 1066–1073. DOI: 10.1038/sj.bjc.6602098
- [47] Qiu, Q.; Dudouit, F.; Matheson, S.; Brahimi, F.; Bajernee, R.; McNamee, J.; Jean-Claude, B. The Combi-Targeting Concept: A Novel 3,3-disubstituted Nitrosourea with EGFR Tyrosine Kinase Inhibitory Properties. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2002**, *51* (1), 1–10. DOI: 10.1007/s00280-002-0524-5
- [48] Sharma, S.; Bell, D.; Settleman, J.; Haber, D. Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Lung Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7* (3) 169–181. DOI: 10.1038/nrc2088
- [49] Shia, J.; Klimstra, D.; Li, A.; Qin, J.; Saltz, L.; Teruya-Feldstein, J.; Akram, M.; Chung, K.; Yao, D.; Paty, P.; Gerald, W.; Chen, B. Epidermal Growth Factor Receptor Expression and Gene Amplification in Colorectal Carcinoma: An Immunohistochemical and Chromogenic *in situ* Hybridization Study. *Mod. Pathol.* **2005**, *18* (10), 1350–1356. DOI: 10.1038/modpathol.3800417
- [50] Wang, X.; Zhang, S.; MacLennan, G.; Eble, J.; Lopez-Beltran, A.; Yang, X.; Chong-Xian, P.; Zhou, H.; Montorini, R.; Cheng, L. Epidermal Growth Factor Receptor Protein Expression and Gene Amplification in Small Cell Carcinoma of the Urinary Bladder. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13* (3), 953–957. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2167
- [51] Simmonds, H.; Miles, D. Adjuvant Treatment of Breast Cancer: Impact of Monoclonal Antibody Therapy Directed Against the Her2 Receptor. *Expert. Opin. Biol. Ther.* **2007**, *7* (4), 487–491. DOI: 10.1517/14712598.7.4.487
- [52] Torre, L.; Bray, F.; Siegel, R.; Ferlay, J.; Lortet-Tieulent, J.; Jemal, A. Global Cancer Statistics, 2012. *CA Cancer J. Clin.* **2015**, *65* (2), 87–108. DOI: 10.3322/caac.21262
- [53] Cohen, M.; Williams, G.; Sridhara, R.; Chen, G.; McGuinn, W.; Morse, D.; Abraham, S.; Rahman, A.; Liang, C.; Lostritto, R.; Baird, A.; Pazdur, R. United States Food and Drug Administration Drug Approval Summary: Gefitinib (ZD1839; Iressa) Tablets. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10* (4), 12–18. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-03-0564
- [54] Xu, Y.; Liu, H.; Chen, J.; Zhou, Q. Acquired Resistance of Lung Adenocarcinoma to EGFR-Tyrosine Kinase Inhibitors Gefitinib and Erlotinib. *Cancer Biol. Ther.* **2010**, *9* (8), 572–582. DOI: 10.1371/journal.pmed.0020073
- [55] Tiseo, M.; Bartolotti, M.; Gelsomino, F.; Bordi, P. Emerging Role of Gefitinib in the Treatment of Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC). *Drug Des. Dev. Ther.* **2010**, *4* (1), 81–98. DOI: 10.2147/t. s6594
- [56] Gazdar, A. Activating and Resistance Mutations of EGFR in Non-Small-Cell Lung Cancer: Role in Clinical Response to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors. *Oncogene* **2009**, *28 Supp 1* (Supp 1), S24–S31. DOI: 10.1038/onc.2009.198
- [57] Yu, H.; Arcila, M.; Rekhtman, N.; Sima, C.; Zakowski, M.; Pao, W.; Kris, M.; Miller, V.; Ladanyi, M.; Riley, G. Analysis of Tumor Specimens at the Time of Acquired Resistance to EGFR-TKI Therapy in 155 Patients with EGFR-Mutant Lung Cancers. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19* (8), 2240–2247. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2246
- [58] Yun, C.-H.; Mengwasser, K. E.; Toms, A. V.; Woo, M. S.; Greulich, H.; Wong, K.-K.; Meyerson, M.; Eck, M. J. The T793M Mutation in EGFR Kinase Causes Drug Resistance by Increasing the Affinity for ATP. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **2008**, *105* (6), 2070–2075. DOI: 10.1073/pnas.0709662105
- [59] Zhou, W.; Ercan, D.; Chen, L.; Yun, C.; Li, D.; Capelletti, M.; Cortot, A.; Chirieac, L.; Iacob, R.; Padera, R.; Engen, J.; Wong, K.; Eck, M.; Gray, N.; Janne, P. Novel Mutant-Selective EGFR Kinase Inhibitors Against EGFR T793M. *Nature* **2009**, *462* (7276), 1070–1074. DOI: 10.1038/nature08622
- [60] Hanahan, D.; Weinberg, R. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **2011**, *144* (5), 646–674. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013
- [61] Barker, N.; Ridgway, J.; van de Wetering, M.; Begthel, H.; van der Born, M.; Danenberg, E.; Clarke, A.; Sansom, O.; Clevers, H. Cryptic Stem Cells as The Cells of Origin of Intestinal Cancer. *Nature* **2009**, *457* (4), 608–611. DOI: 10.1038/nature07602
- [62] Perekatt, A.; Shah, P.; Cheung, S.; Jariwala, N.; Wu, A.; Gandhi, V.; Kumar, N.; Feng, Q.; Patel, N.; Chen, L.; Joshi, S.; Zhou, A.; Taketo, M.; Xing, J.; White, E.; Gao, N.; Gatzka, M.; Verzi, M. SMAD4 Suppresses WNT-Driven Dedifferentiation and Oncogenesis in the Differentiated Gut Epithelium. *Cancer Res.* **2018**, *18* (17), 4878–4890. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-18-0043
- [63] Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* **2022**, *12* (1), 31–46. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059
- [64] Colotta, F.; Allavena, P.; Garlanda, C.; Mantovani, A. Cancer-Related Inflammation, the Seven Hallmark of Cancer: Links to Genetic Instability. *Carcinogenesis* **2009**, *30* (7), 1073–1081. DOI: 10.1093/carcin/bgp127



- [65] Balkwill, F.; Charles, K.; Mantovani, A. Smoldering and Polarized Inflammation in the Initiation and Promotion of Malignant Disease. *Cancer Cell* **2005**, *7* (3), 2011–2017. DOI: 10.1016/j.ccr.2005.02.013
- [66] Mantovani, A.; Allavena, P.; Sica, A.; Balkwill, F. Cancer-Related Inflammation. *Nature* **2008**, *454* (7203), 436–444. DOI: 10.1038/nature07205
- [67] Borello, M.; Alberti, L.; Fischer, A.; Degl'innocenti, D.; Ferrario, C.; Gariboldi, M.; Marchesi, F.; Allavena, P.; Greco, A.; Collini, P. Pilotti, S.; Cassinelli, G.; Bressan, P.; Fugazzola, L.; Mantovani, A.; Pierotti, M. Induction of a Proinflammatory Program in Normal Human Thyrocytes by the RET/PTC1 Oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102* (41), 14825–14830. DOI: 10.1073/pnas.0503039102
- [68] Mantovani, A. Cancer: Inflammation Metastasis. *Nature* **2009**, *457* (7225), 36–37. DOI: 10.1038/457036b
- [69] Rius, J.; Guma, M.; Schachtrup, C.; Akassoglou, K.; Zinkernagel, A.; Nizet, V.; Johnson, R.; Haddad, G.; Karin, M. NF-KappaB Links Innate Immunity to the Hypoxic Response Through Transcriptional Regulation of HIF-1alpha. *Nature* **2008**, *453* (7196), 807–811. DOI: 10.1038/nature06905
- [70] Balkwill, F. Tumor Necrosis Factor and Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9* (5), 361–371. DOI: 10.1038/nrc2628
- [71] Loberg, R.; Ying, C.; Craig, M.; Day, L.; Sargent, E.; Neeley, C.; Wojno, K.; Snyder, L.; Yan, L.; Pienta, K. Targeting CCL2 with Systemic Delivery of Neutralizing Antibodies Induces Prostate Cancer Tumor Regression *in vivo*. *Cancer Res.* **2007**, *67* (19), 9417–9424. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1286
- [72] Karin, M. Nuclear Factor-KappaB in Cancer Development and Progression. *Nature* **2006**, *441* (7092), 431–436. DOI: 10.1038/nature04870
- [73] Yu, H.; Kortylewski, M.; Pardoll, D. Crosstalk Between Cancer and Immune Cells: Role of STAT3 in the Tumour Microenvironment. *Nat. Rev. Immunol.* **2007**, *7* (1), 41–51. DOI: 10.1038/nri1995
- [74] Taylor, C. Interdependent Roles for Hypoxia Inducible Factor and Nuclear Factor- κ B in Hypoxic Inflammation. *J. Physiol.* **2008**, *586* (17), 4055–4059. DOI: 10.1113/jphysiol.2008.157669
- [75] Greten, F.; Eckmann, L.; Greten, T.; Park, J.; Li, Z-W.; Egan, L.; Kagnoff, M.; Karin, M. IKK β Links Inflammation and Tumorigenesis in a Mouse Model of Colitis-Associated Cancer. *Cell* **2004**, *118* (3), 285–296. DOI: 10.1016/j.cell.2004.07.013
- [76] Pikarsky, E.; Porat, R.; Stein, I.; Abramovitch, R.; Amit, S.; Kasem, S.; Gutkovich-Pyest, E.; Urieli-Shoval, S.; Galun, E.; Ben-Neriah, Y. NF-KappaB Functions as a Tumour Promoter in Inflammation-Associated Cancer. *Nature* **2004**, *431* (7007), 461–466. DOI: 10.1038/nature02924
- [77] Maeda, S.; Kamata, H.; Luo, J-L.; Leffert, H.; Karin, M. IKK β Couples Hepatocyte Death to Cytokine-Driven Compensatory Proliferation That Promotes Chemical Hepatocarcinogenesis. *Cell* **2005**, *127* (7), 977–990. DOI: 10.1016/j.cell.2005.04.014
- [78] Garlanda, C.; Riva, F.; Veliz, T.; Polentarutti, N.; Pasqualini, F.; Radaelli, E.; Sironi, M.; Nebuloni, M.; Zorini, E.; Scanziani, E.; Mantovani, A. Increased Susceptibility to Colitis-Associated Cancer of Mice Lacking *TIR8*, an Inhibitory Member of the Interleukin-1 Receptor Family. *Cancer Res.* **2007**, *67* (13), 6017–6021. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0560
- [79] Lech, M.; Kulkarni, O.; Pfeiffer, S.; Savarase, E.; Krug, A.; Garlanda, C.; Mantovani, A.; Anders, H. Tir8/Sigirr Prevents Murine Lupus by Suppressing the Immunostimulatory Effects of Lupus Autoantigens. *J. Exp. Med.* **2008**, *205* (8), 1879–1888. DOI: 10.1084/jem.20072646
- [80] Lee, H.; Herrmann, A.; Deng, J.; Kujawski, M.; Niu, G.; Li, Z.; Forman, S.; Jove, R.; Pardoll, D.; Yu, H. Persistently Activated Stat3 Maintains Constitutive NF-KappaB Activity in Tumors. *Cancer Cell* **2009**, *15* (4), 283–293. DOI: 10.1016/j.ccr.2009.02.015
- [81] Kortylewski, M.; Kujawski, M.; Wang, T.; Wei, S.; Zhang, S.; Pilon-Thomas, S.; Niu, G.; Kay, H.; Mulé, J.; Kerr, W.; Jove, R.; Pardoll, D.; Yu, H. Inhibiting Stat3 Signaling in the Hematopoietic System Elicits Multicomponent Antitumor Immunity. *Nat. Med.* **2005**, *11* (12), 1314–1321. DOI: 10.1038/nm1325
- [82] Becker, C.; Fantini, C.; Schramm, C.; Lehr, H.; Wirtz, S.; Nikolaev, A.; Burg, J.; Strand, S.; Kiesslich, R.; Huber, S.; Ito, H.; Nishimoto, N.; Yoshizaki, K.; Kishimoto, T.; Galle, P.; Blessing, M.; Rose-John, S.; Neurath, S. TGF- β Suppresses Tumor Progression in Colon Cancer by Inhibition of IL-6 Trans-Signaling. *Immunity* **2004**, *21* (4), 491–501. DOI: 10.1016/j.immuni.2004.07.020
- [83] Gao, S.; Mark, K.; Leslie, K.; Pao, W.; Motoi, N.; Gerald, W.; Travis, W.; Bornmann, W.; Veach, D.; Clarkson, B.; Bromberg, J. Mutations in the EGFR Kinase Domain Mediate STAT3 Activation Via IL-6 Production in Human Lung Adenocarcinomas. *J. Clin. Invest.* **2007**, *117* (12), 3846–3856. DOI: 10.1172/JCI31871
- [84] Mantovani, A.; Allavena, P.; Sica, A.; Balkwil, F. Cancer-Related Inflammation. *Nature* **2008**, *454* (7203), 436–444. DOI: 10.1038/nature07205
- [85] Wang, D.; DuBois, R. Prostaglandins and Cancer. *Gut* **2006**, *55* (1), 115–122. DOI: 10.1136/gut.2004.047100
- [86] Smalley, W.; DuBois, R. Colorectal Cancer, and Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Adv. Pharmacol.* **1997**, *39* (1), 1–20. DOI: 10.1016/s1054-3589(08)60067-8
- [87] Gupta, R.; DuBois, R. Colorectal Cancer Prevention and Treatment by Inhibition of COX-2. *Nat. Rev. Cancer* **2001**, *1* (1), 11–21. DOI: 10.1038/35094017



- [88] Wolfe, M.; Lichtenstein, D.; Singh, G. Gastrointestinal Toxicity of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs. *N. Engl. J. Med.* **1999**, *340* (24), 1888–1899. DOI: 10.1056/NEJM199906173402407
- [89] Vane, J.; Bakhle, Y.; Botting, R. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1998**, *38* (1), 97–120. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.38.1.97
- [90] Grover, J.; Yadav, S.; Vats, V.; Joshi, Y. Cyclo-Oxygenase 2 Inhibitors: Emerging Roles in the Gut. *Int. J. Colorectal Dis.* **2003**, *18* (4), 279–291. DOI: 10.1007/s00384-002-0443-2
- [91] Vane, J. Inhibition of Prostaglandin Synthesis as a Mechanism of Action for Aspirin-like Drugs. *Nat. New Biol.* **1971**, *231* (23), 232–235. DOI: 10.1038/newbio231232a0
- [92] Laine, L.; Harper, S.; Simon, T.; Bath, R.; Johanson, J.; Schwartz, H.; Stern, S.; Quan, H.; Bolognese, J. A Randomized Trial Comparing the Effect of Rofecoxib, a Cyclooxygenase 2-Specific Inhibitor, with that of Ibuprofen on the Gastroduodenal Mucosa of Patients with Osteoarthritis. Rofecoxib Osteoarthritis Endoscopy Study Group. *Gastroenterology* **1999**, *117* (4), 776–783. DOI: 10.1016/s0016-5085(99)70334-3
- [93] Bombardier, C.; Laine, L.; Reicin, A.; Shapiro, D.; Burgos-Vargas, R.; Davis, R.; Day, R.; Ferraz, M.; Hawkey, C.; Hochberg, M.; Kvien, T.; Schnitzer, T. Comparison of Upper Gastrointestinal Toxicity of Rofecoxib and Naproxen in Patients with Rheumatoid Arthritis. VIGOR Study Group. *N. Engl. J. Med.* **2000**, *343* (21), 1520–1528. DOI: 10.1056/NEJM200011233432103
- [94] Kuper, H.; Adami, H.; Trichopoulos, D. Infections as a Major Preventable Cause of Human Cancer. *J. Intern. Med.* **2000**, *248* (3), 171–183. DOI: 10.1046/j.1365-2796.2000.00742.x
- [95] Wang, D.; Mann, J.; DuBois, R. The Role of Prostaglandins and Other Eicosanoids in the Gastrointestinal Tract. *Gastroenterology* **2005**, *128* (5), 1445–1461. DOI: 10.1053/j.gastro.2004.09.080
- [96] McAdam, B.; Catella-Lawson, F.; Mardini, I.; Kapoor, S.; Lawson, J.; FitzGerald, G. Systemic Biosynthesis of Prostacyclin by Cyclooxygenase COX-2: the Human Pharmacology of a Selective Inhibitor of COX-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96* (1), 272–277. DOI: 10.1073/pnas.96.1.272
- [97] Grosser, T.; Yusuff, S.; Cheskis, E.; FitzGerald, G. Developmental Expression of Functional Cyclooxygenases in Zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99* (12), 8418–8423. DOI: 10.1073/pnas.112217799
- [98] Cha, Y.; Kim, S.; Solnica-Krezel, L.; DuBois, R. Cyclooxygenase-1 Signaling is Required for Vascular Tube Formation During Development. *Dev. Biol.* **2005**, *282* (1), 274–283. DOI: 10.1016/j.ydbio.2005.03.014
- [99] Dubois, R.; Abramson, S.; Crofford, L.; Gupta, R.; Simon, L.; Van De Putte, L.; Lipsky, P. Cyclooxygenase in Biology and Disease. *FASEB J.* **1998**, *12* (12), 1063–1073. PMID: 9737710
- [100] Rigas, B.; Goldman, S.; Levine, L. Altered Eicosanoid Levels in Human Colon Cancer. *J. Lab. Clin. Med.* **1993**, *122* (5), 518–523. PMID: 8228569
- [101] Uefuji, K.; Ichikura, T.; Mochizuki, H. Cyclooxygenase-2 Expression is Related to Prostaglandin Biosynthesis and Angiogenesis in Human Gastric Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6* (1), 135–138. PMID: 10656441
- [102] Rolland, P.; Martin, P.; Jacquemier, J.; Rolland, A.; Toga, M. Prostaglandin in Human Breast Cancer: Evidence Suggesting that an Elevated Prostaglandin Production is a Marker of High Metastatic Potential for Neoplastic Cells. *J. Nat. Cancer Inst.* **1980**, *64* (5), 1061–1070. PMID: 6767871
- [103] Needleman, P.; Isakson, P. The Discovery and Function of COX-2. *J. Rheumatol. Suppl.* **1997**, *49* (1), 6–8. PMID: 9249644
- [104] Portanova, J.; Zhang, Y.; Anderson, G.; Hauser, S.; Masferrer, J.; Seibert, K.; Gregory, S.; Isakson, P. Selective Neutralization of Prostaglandin E2 Blocks Inflammation, Hyperalgesia, and Interleukin 6 Production *in vivo*. *J. Exp. Med.* **1996**, *184* (3), 883–891. DOI: 10.1084/jem.184.3.883
- [105] Anderson, G.; Hauser, S.; McGarity, K.; Bremer, M.; Isakson, P.; Gregory, S. Selective Inhibition of Cyclooxygenase (COX-2) Reverses Inflammation and Expression of COX-2 and Interleukin 6 in Rat Adjuvant Arthritis. *J. Clin. Invest.* **1996**, *97* (11), 2672–2679. DOI: 10.1172/JCI118717
- [106] Amin, A.; Attur, M.; Abramson, S. Nitric Oxide Synthase and Cyclooxygenases: Distribution, Regulation, and Intervention in Arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* **1999**, *11* (3), 202–209. DOI: 10.1097/00002281-199905000-00009
- [107] McDermott, R. Alterations in the Mucosal Immune System in Ulcerative Colitis and Crohn's Disease. *Med. Clin. North Am.* **1994**, *78* (6), 1207–1231. DOI: 10.1016/s0025-7125(16)30096-7
- [108] Gould, S.; Brash, A.; Conolly, M.; Lennard-Jones, J. Studies of Prostaglandins and Sulphasalazine in Ulcerative Colitis. *Prostaglandins Med.* **1981**, *6* (2), 165–182. DOI: 10.1016/0161-4630(81)90088-4
- [109] Coggins, K.; Latour, A.; Nguyen, M.; Audoly, L.; Coffman, T.; Koller, B. Metabolism of PGE₂ by Prostaglandin Dehydrogenase is Essential for Remodeling the Ductus Arteriosus. *Nat. Med.* **2002**, *8* (2), 91–92. DOI: 10.1038/nm0202-91
- [110] Tong, M.; Tai, H. Synergistic Induction of the Nicotinamide Adenine Dinucleotide-Linked 15-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase by an Androgen and Interleukin-6 or Forskolin in Human Prostate Cancer Cells. *Endocrinology* **2004**, *145* (5), 2141–2147. DOI: 10.1210/en.2003-1229



- [111] Watanabe, K.; Kawamori, T.; Nakatsugi, S.; Ohta, T.; Ohuchida, S.; Yamamoto, H.; Maruyama, T.; Kondo, K.; Ushikubi, F.; Narumiya, S.; Sugimura, T.; Wakabayashi, K. Role of the Prostaglandin E Receptor Subtype EP1 in Colon Carcinogenesis. *Cancer Res.* **1999**, *59* (20), 5093–5096. PMID: 10537280
- [112] Mutoh, M.; Watanabe, K.; Kitamura, T.; Shoji, Y.; Takahashi, M.; Kawamori, T.; Tani, K.; Kobayashi, M.; Maruyama, T.; Kobayashi, K.; Ohuchida, S.; Sugimoto, Y.; Narumiya, S.; Sugimura, T.; Wakabayashi, K. Involvement of Prostaglandin E Receptor Subtype EP (4) in Colon Carcinogenesis. *Cancer Res.* **2002**, *62* (1), 28–32. PMID: 11782353
- [113] Sonoshita, M.; Takaku, K.; Sasaki, N.; Sugimoto, Y.; Ushikubi, F.; Narumiya, S.; Oshima, M.; Taketo, M. Acceleration of Intestinal Polyposis Through Prostaglandin Receptor EP2 in Apc (Delta 716) Knockout Mice. *Nat. Med.* **2001**, *7* (9), 1048–1051. DOI: 10.1038/nm0901-1048
- [114] Chang, SH.; Liu, C.; Conway, R.; Han, D.; Nithipatikom, K.; Trifan, O.; Lane, T.; Hla, T. Role of Prostaglandin E2-Dependent Angiogenic Switch in Cyclooxygenase 2-Induced Breast Cancer Progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101* (2), 591–596. DOI: 10.1073/pnas.2535911100
- [115] Davis, T.; O'Neal, J.; Pagel, M.; Zweifel, B.; Mehta, P.; Heuvelman, D.; Masferrer, J. Synergy Between Celecoxib and Radiotherapy Results from Inhibition of Cyclooxygenase-2-Derived Prostaglandin E2, a Survival Factor for Tumor and Associated Vasculature. *Cancer Res.* **2004**, *64* (1), 279–285. DOI: 10.1158/0008-5472.can-03-1168
- [116] Kelloff, G.; Fay, J.; Steele, V.; Lubet, R.; Boone, C.; Crowell, J.; Sigman, C. Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors as Potential Cancer Chemopreventives. *Cancer Epidemiol. Biom. Prev.* **1996**, *5* (8), 657–666. PMID: 8824370
- [117] Buchanan, F.; Wang, D.; Bargiacchi, F.; DuBois, R. Prostaglandin E2 Regulates Cell Migration Via the Intracellular Activation of the Epidermal Growth Factor Receptor. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (37), 35451–35457. DOI: 10.1074/jbc.M302474200
- [118] Radinsky, R. Modulation of Tumor Cell Gene Expression and Phenotype by the Organ-Specific Metastatic Environment. *Cancer Metast. Rev.* **1995**, *14* (4), 323–338. DOI: 10.1007/BF00690601
- [119] Mann, M.; Sheng, H.; Shao, J.; Williams, C.; Pisacane, P.; Sliwkowski, M.; DuBois, R. Targeting Cyclooxygenase 2 and Her-2/neu Pathways Inhibits Colorectal Carcinoma Growth. *Gastroenterology* **2001**, *120* (7), 1713–1719. DOI: 10.1053/gast.2001.24844
- [120] Tortora, G.; Caputo, R.; Damiano, V.; Melisi, D.; Bianco, R.; Fontanini, G.; Veneziani, B.; De Placido, S.; Bianco, R.; Ciardiello, F. Combination of a Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitor with Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor ZD1839 and Protein Kinase an Antisense Causes Cooperative Antitumor and Antiangiogenic Effect. *Clin. Cancer Res.* **2003**, *9* (4), 1566–1572. PMID: 12684433
- [121] Hou, T.; Zhu, L.; Chen, L.; Xu, X. Mapping the Binding Site of a Large set of Quinazoline Type EGFR Inhibitors Using Molecular Field Analyses and Molecular Docking Studies. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2003**, *43* (1), 273–287. DOI: 10.1021/ci025552a
- [122] Noolvi, M.; Patel, H. Synthesis, Method Optimization, Anticancer Activity of 2,3,7-Trisubstituted Quinazoline Derivatives and Targeting EGFR-Tyrosine Kinase by Rational Approach: 1st Cancer Update. *Arab. J. Chem.* **2013**, *6* (1), 35–48. DOI: 10.1016/j.arabjc.2010.12.031
- [123] Torrance, C.; Jackson, P.; Montgomery, E.; Kinzler, K.; Vogelstein, B.; Wissner, A.; Nunes, M.; Frost, P.; Discafani, C. Combinatorial Chemoprevention of Intestinal Neoplasia. *Nat. Med.* **2000**, *6* (9), 1024–1028. DOI: 10.1038/79534
- [124] Rachid, Z.; Brahimi, F.; Katsoulas, A.; Teoh, N.; Jean-Claude. The Combi-Targeting Concept: Chemical Dissection of the Dual Targeting Properties of a Series of Combi-Triazenes. *J. Med. Chem.* **2003**, *46* (1), 4313–4321. DOI: 10.1021/jm030142e
- [125] Cha, Y. I.; DuBois, R. N. NSAIDs and Cancer Prevention: Targets Downstream of COX-2. *Annu. Rev. Med.* **2007**, *58* (1), 239–252. DOI: 10.1146/annurev.med.57.121304.131253
- [126] Lu, H.; Ouyang, W.; Huang, C. Inflammation, a Key Event in Cancer Development. *Mol. Cancer Res.* **2006**, *4* (4), 221–233. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-05-0261
- [127] Ninomiya, M.; Tanaka, K.; Tsuchida, Y.; Muto, Y.; Koketsu, M.; Watanabe, K. Increased Bioavailability of Tricin-Amino Acid Derivatives Via a Prodrug Approach. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (24), 1529–1536. DOI: 10.1021/jm1015457
- [128] Shin, H.; Kim, J.; Vig, B.; Song, X.; Drach, J.; Amidon, G. Interaction of Intestinal Nucleoside Transporter HCNT2 with Amino Acid Ester Prodrugs of Floxuridine and 2-Bromo-5,6-Dichloro-1-β-D-Ribofuranosylbenzimidazole. *Biol. Pharm. Bull.* **2006**, *29* (7), 247–252. DOI: 10.1248/bpb.29.247
- [129] Song, X.; Lorenzi, P.; Landowski, C.; Vig, B.; Hilfinger, J.; Amidon, G. Amino Acid Ester Prodrugs of the Anticancer Agent Gemcitabine: Synthesis, Bioconversion, Metabolic Bioevasion, and HPEPT1-Mediated Transport. *Mol. Pharm.* **2005**, *2* (1), 157–167. DOI: 10.1021/mp049888e



- [130] Lipinski, C.; Lombardo, F.; Dominy, B.; Feeney, P. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Adv. Drug Del. Rev.* **2001**, *46* (1), 3–26. DOI: 10.1016/s0169-409x(00)00129-0
- [131] Veber, D.; Johnson, F.; Cheng, H-Y.; Smith, B.; Ward, K.; Kopple, K. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *J. Med. Chem.* **2002**, *45* (1), 2615–2623. DOI: 10.1021/jm020017n
- [132] Nasab, R. R.; Mansourian, M.; Hassanzadeh, F.; Shahlaei, M. Exploring the Interaction Between Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase and Some of the Synthesized Inhibitors Using Combination of In Silico and In Vitro Cytotoxicity Methods. *Res. Pharm. Sci.* **2018**, *13* (6), 509–522. DOI: 10.4103/1735-5362.245963
- [133] Selvaraj, J.; Vishnupriya, V.; Sardar, H.; Balakrishna, J. P.; Rex, J.; Mohan, S. K.; Vijayalakshmi, P.; Ponnulakshmi, R. Molecular Docking Analysis of COX-2 for Potential Inhibitors. *Bioinformation* **2020**, *16* (10), 753–758. DOI: 10.6026/97320630016753
- [134] RCSB. PDB. Protein Data Bank. <https://www.rcsb.org> (2024-03-27)
- [135] Castro, A.; Costa, A.; Vilarrasa, J. The Performance of Several Docking Programs at Reproducing Protein–Marolide-Like Crystal Structures. *Molecules* **2017**, *22* (1), 1–14. DOI: 10.3390/molecules22010136
- [136] Geidl, S.; Bouchal, T.; Raček, T.; Vařeková, R. S.; Hejret, V.; Křenek, A.; Abagyan, R.; Koča, J. High-Quality and Universal Empirical Atomic Charges for Chemoinformatics Applications. *J. Cheminform.* **2015**, *7* (59), 1–10. DOI: 10.1186/s13321-015-0107-1
- [137] Pettersen, E. F.; Goddard, D. T.; 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. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25* (13), 1605–1612. DOI: 10.1002/jcc.20084
- [138] Morris, G. M.; Goodsell, D.S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J. Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm, and an Empirical Binding Free Energy Function. *J. Comput. Chem.* **1998**, *19* (14), 1639–1662. DOI: 10.1002/(SICI)1096-987X(19981115)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2
- [139] *The Human Protein Atlas*. <https://www.proteinatlas.org/> (2024-01-12)
- [140] 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. DOI: 10.1016/j.str.2011.03.019
- [141] Hanwell, M. D.; Curtis, D. E.; Lonie, D. C.; Vandermeersch, T.; Zurek, E.; Hutchison, G. R. Avogadro: An Advanced Semantic Chemical Editor, Visualization, and Analysis Platform. *J. Cheminform.* **2012**, *4* (1), 17. DOI: 10.1186/1758-2946-4-17
- [142] Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, G.; Scalmani, J. R.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H., et al. Gaussian 16. *Gaussian, Inc., Wallingford CT* **2016**.
- [143] Sousa da Silva, A. W.; Vranken, W. F. ACPYPE - AnteChamber PYthon Parser interfacE. *BMC Res. Notes* **2012**, *5* (367), 1–8. DOI: 10.1186/1756-0500-5-367
- [144] Abraham, M. J.; Murtola, T.; Schulz, R.; Páll, S.; Smith, J. C.; Hess, B.; Lindahl, E. GROMACS: High Performance Molecular Simulations Through Multi-Level Parallelism from Laptops to Supercomputers. *SoftwareX* **2015**, *1* (2), 19–25. DOI: 10.1016/j.softx.2015.06.001
- [145] Hess, B.; Bekker, H.; Berendsen, H. J. C.; Fraaije, J. G. E. M. LINCS: A Linear Constraint Solver for Molecular Simulations. *J. Comput. Chem.* **1997**, *18*, 1463–1472. DOI: 10.1002/(SICI)1096-987X(199709)18:12<1463::AID-JCC4>3.0.CO;2-H
- [146] Bussi, G.; Donadio, D.; Parrinello, M. Canonical Sampling Through Velocity Rescaling. *J. Chem. Phys.* **2007**, *126* (1), 1–7. DOI: 10.1063/1.2408420.
- [147] Parrinello, M.; Rahman, A. Strain Fluctuations and Elastic Constants. *J. Chem. Phys.* **1982**, *76* (1), 2662–2666. DOI: 10.1063/1.443248
- [148] Gowers, R.; Linke, M.; Barnoud, J.; Reddy, T.; Melo, M.; Seyler, S.; Domański, J.; Dotson, D.; Buchoux, S.; Kenney, I.; Ian, M.; Oliver, B. MDAAnalysis: A Python Package for the Rapid Analysis of Molecular Dynamics Simulations. *Python Sci. Conf.* **2016**, 98–105. DOI: 10.25080/Majora-629e541a-00e
- [149] Williams, T.; Kelley, C.; Bersch, C.; Bröker, H.-B.; Campbell, J.; Cunningham, R.; Denholm, D.; Elber, G.; Fearick, R.; Grammes, C. Gnuplot 5.2. An Interactive Plotting Program. **2017**, *7*, 1–270.
- [150] Schultes, S.; de Graaf, C.; Haaksma, E.; de Esch, I.; Leurs, R.; Krämer, O. Ligand Efficiency as a Guide in Fragment Hit Selection and Optimization. *Drug Discov. Today Technol.* **2010**, *7* (3), e157–e162. DOI: 10.1016/j.ddtec.2010.11.003
- [151] Hopkins, A. L.; Groom, C. R.; Alex, A. Ligand Efficiency: A Useful Metric for Lead Selection. *Drug Discov. Today* **2004**, *9* (1), 430–431. DOI: 10.1016/S1359-6446(04)03069-7
- [152] Hopkins, A. L.; Keserü, G. M.; Leeson, P. D.; Rees, D. C.; Reynolds, C. H. The Role of Ligand Efficiency Metrics in Drug Discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13* (2), 105–121. DOI: 10.1038/nrd4163



Anexo I: Caracterización



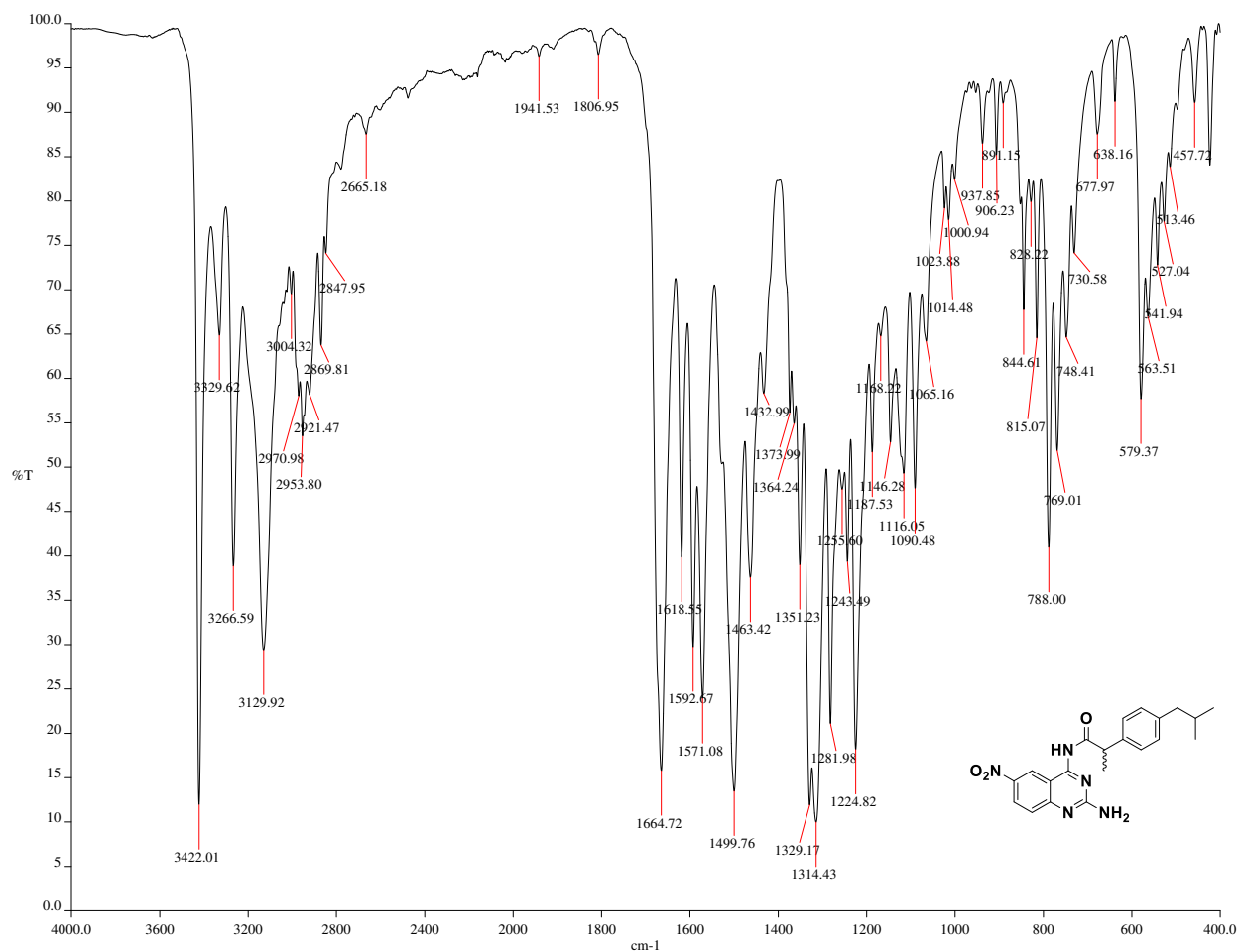


Figura 48. Espectro de IR-ATR de 1.

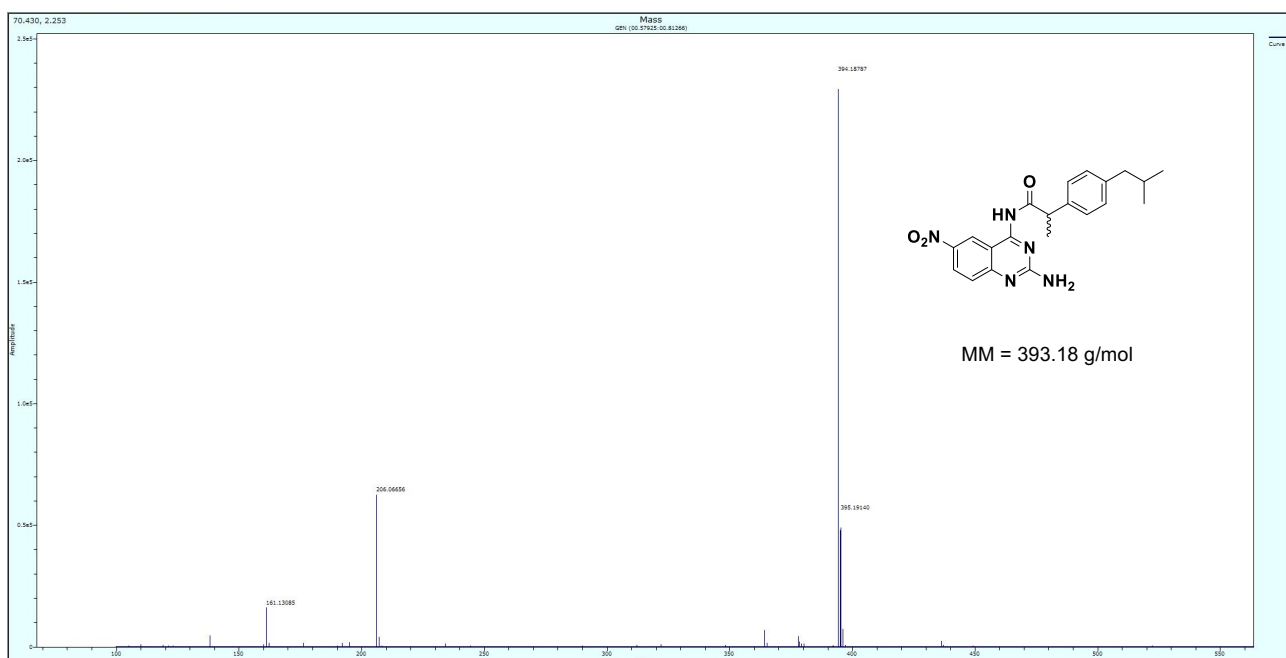


Figura 49. Espectro de EM-APCI de 1.



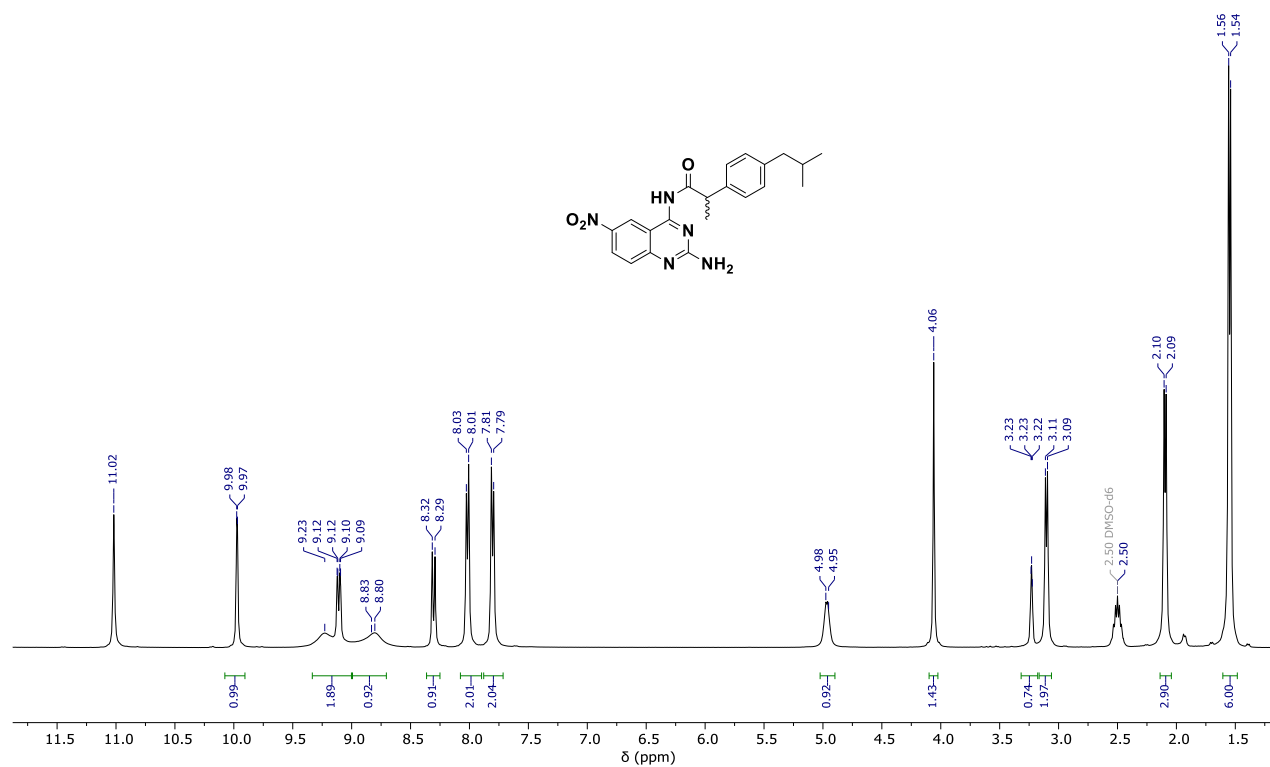


Figura 50. Espectro de RMN-¹H de 1.

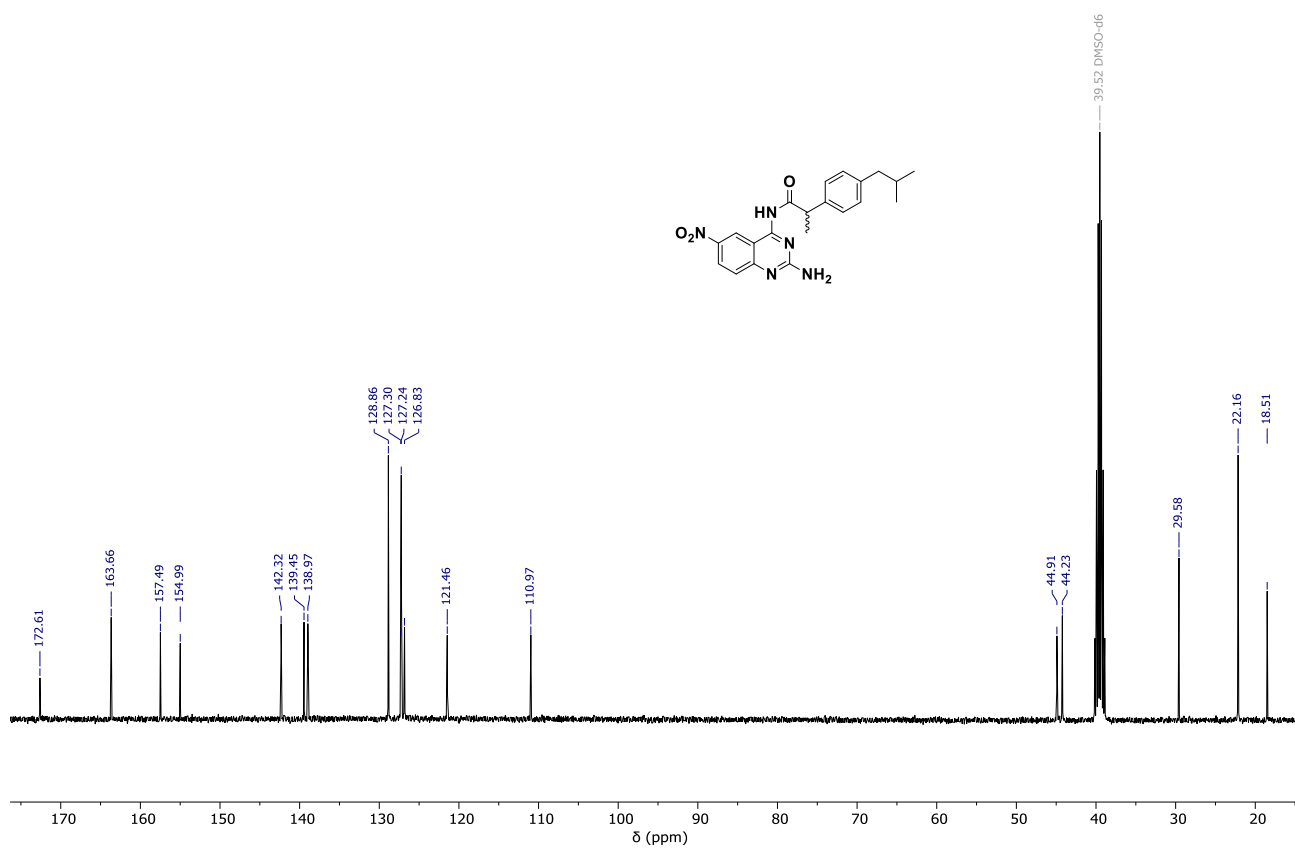
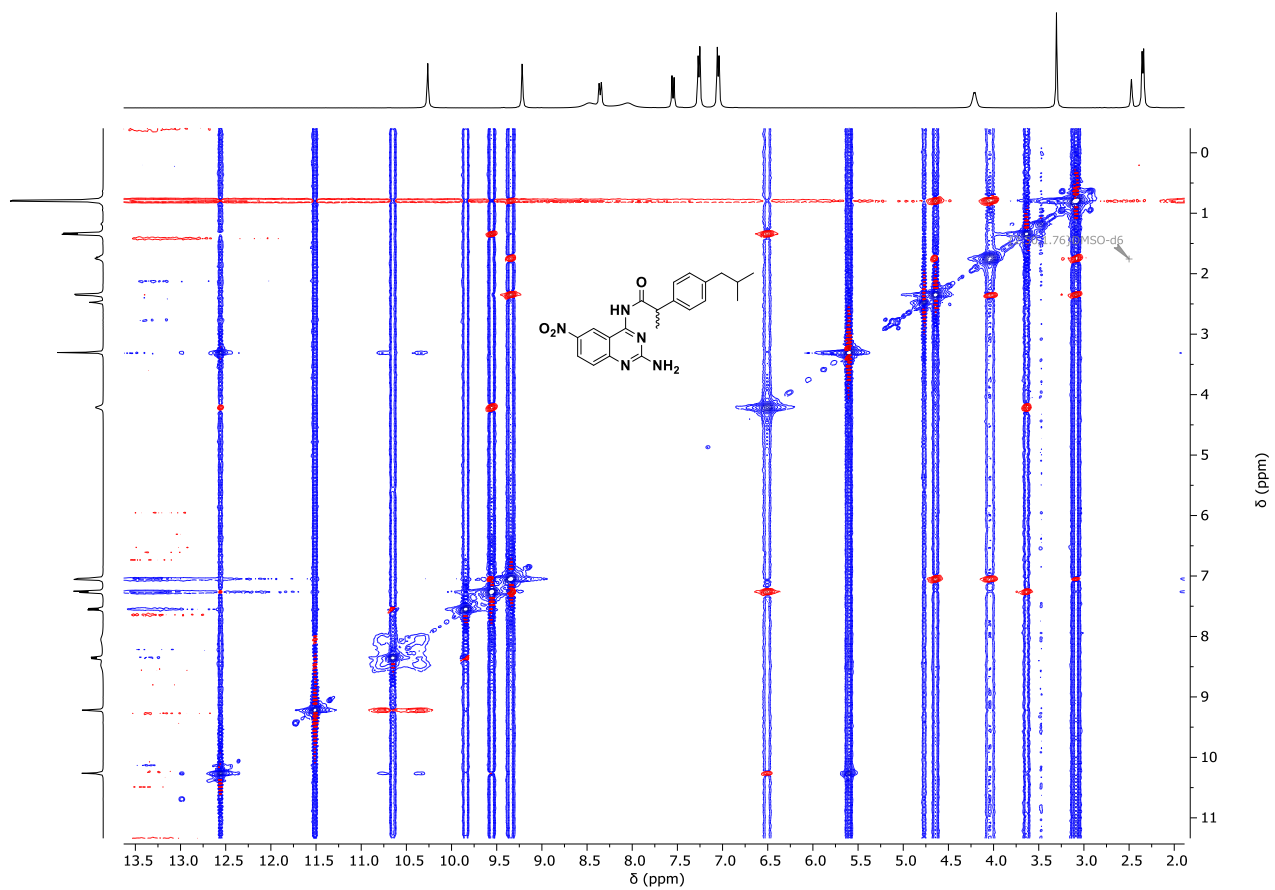


Figura 51. Espectro de RMN-¹³C de 1.





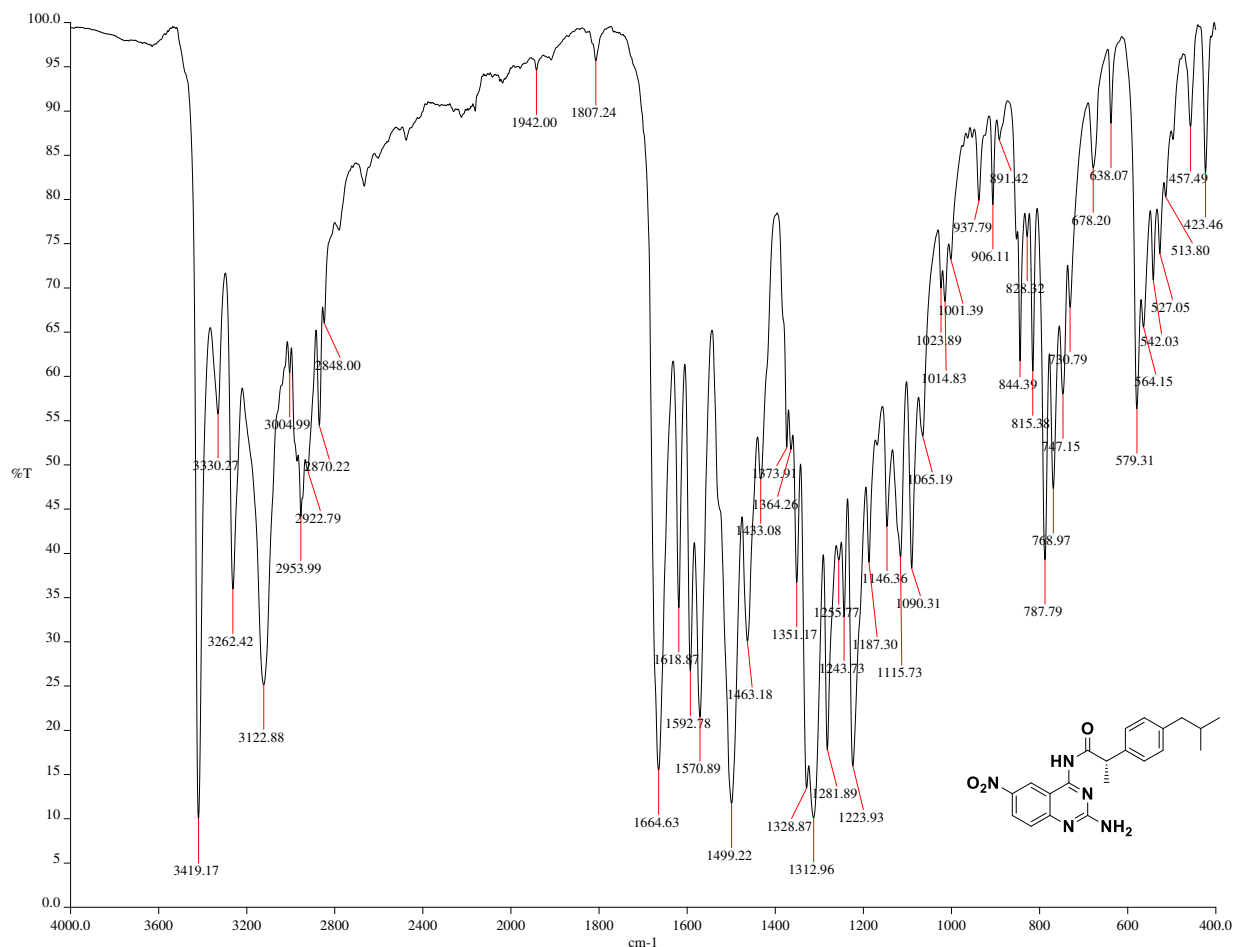


Figura 53. Espectro de IR-ATR de 2.

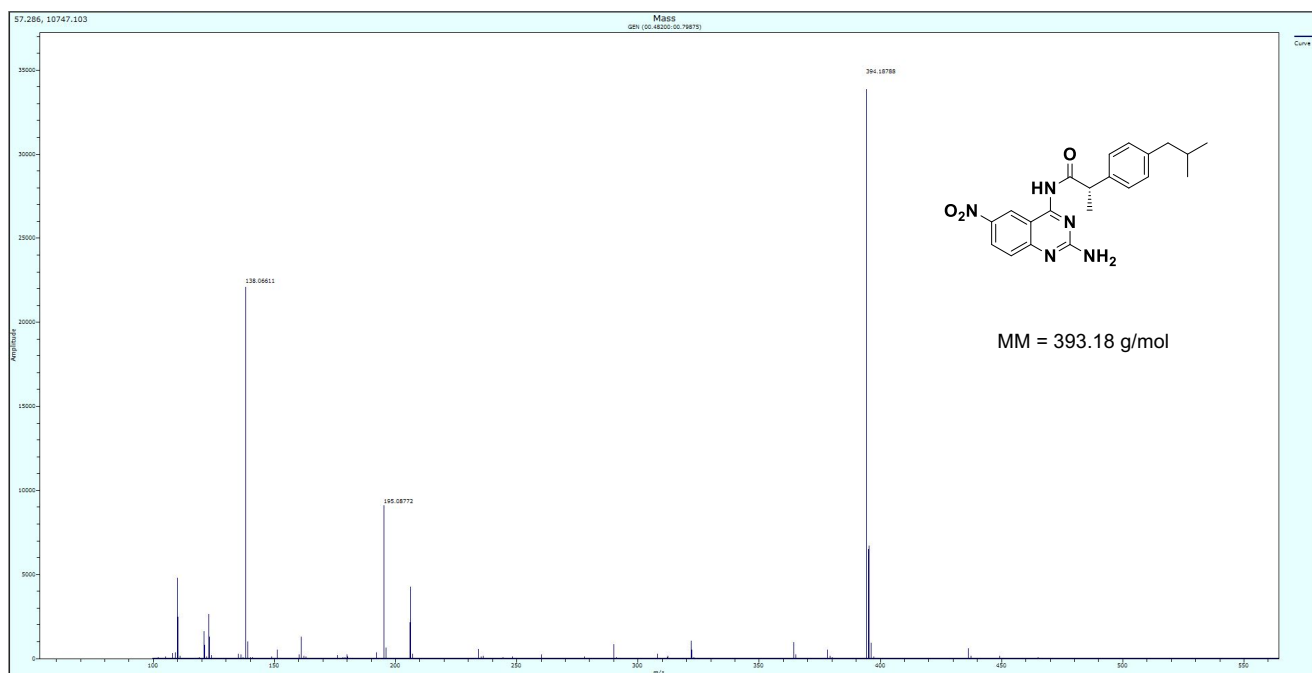


Figura 54. Espectro de EM-APCI de 2.



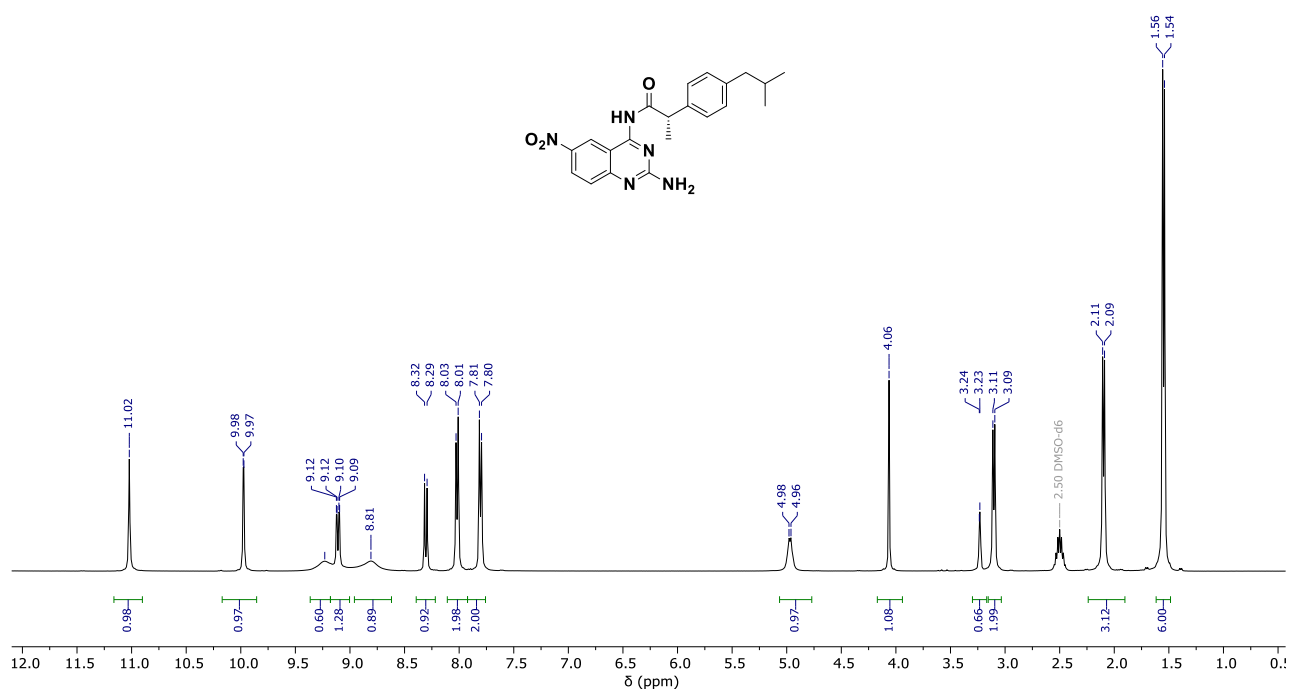


Figura 55. Espectro de RMN-¹H de 2.

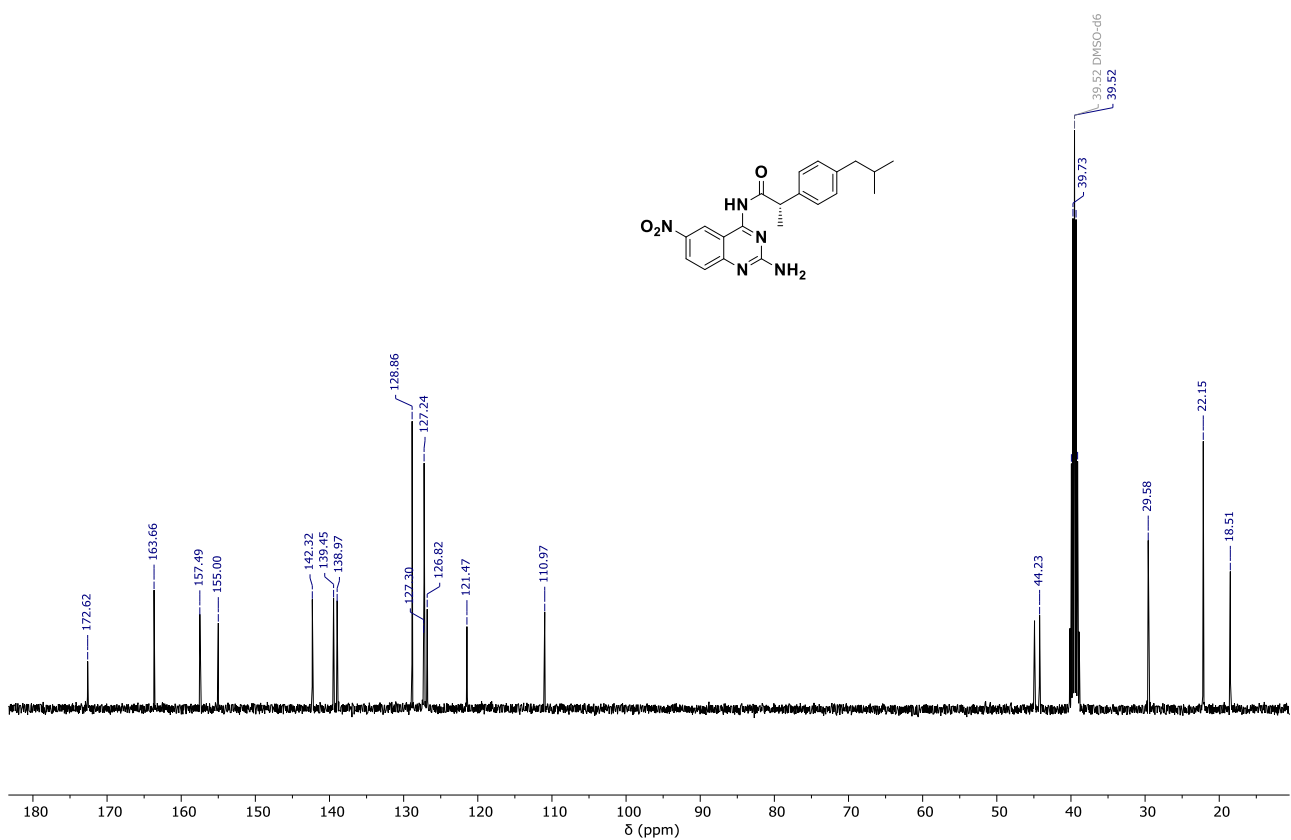


Figura 56. Espectro de RMN-¹³C de 2.



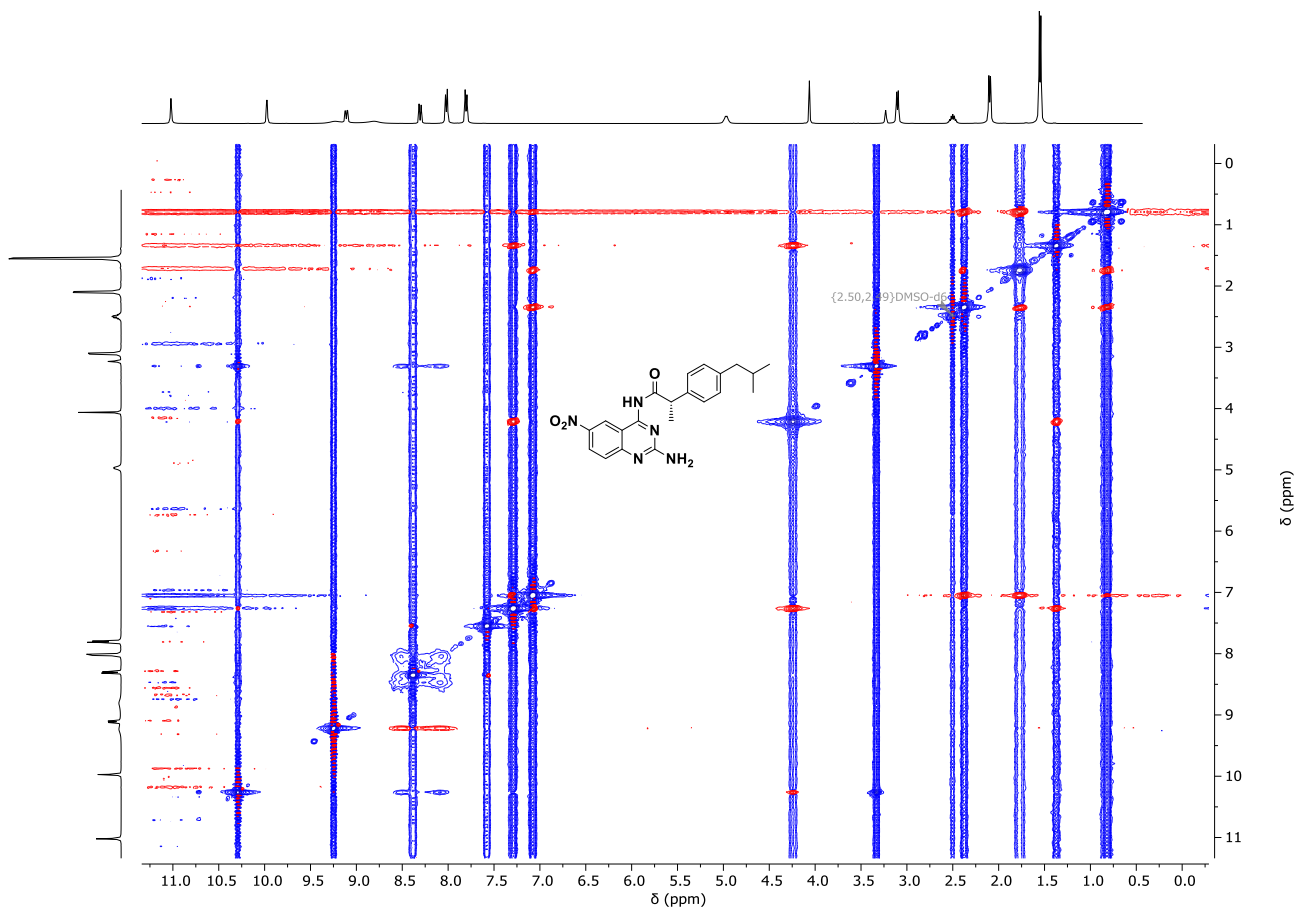


Figura 57. Espectro de RMN-NOESY de 2.



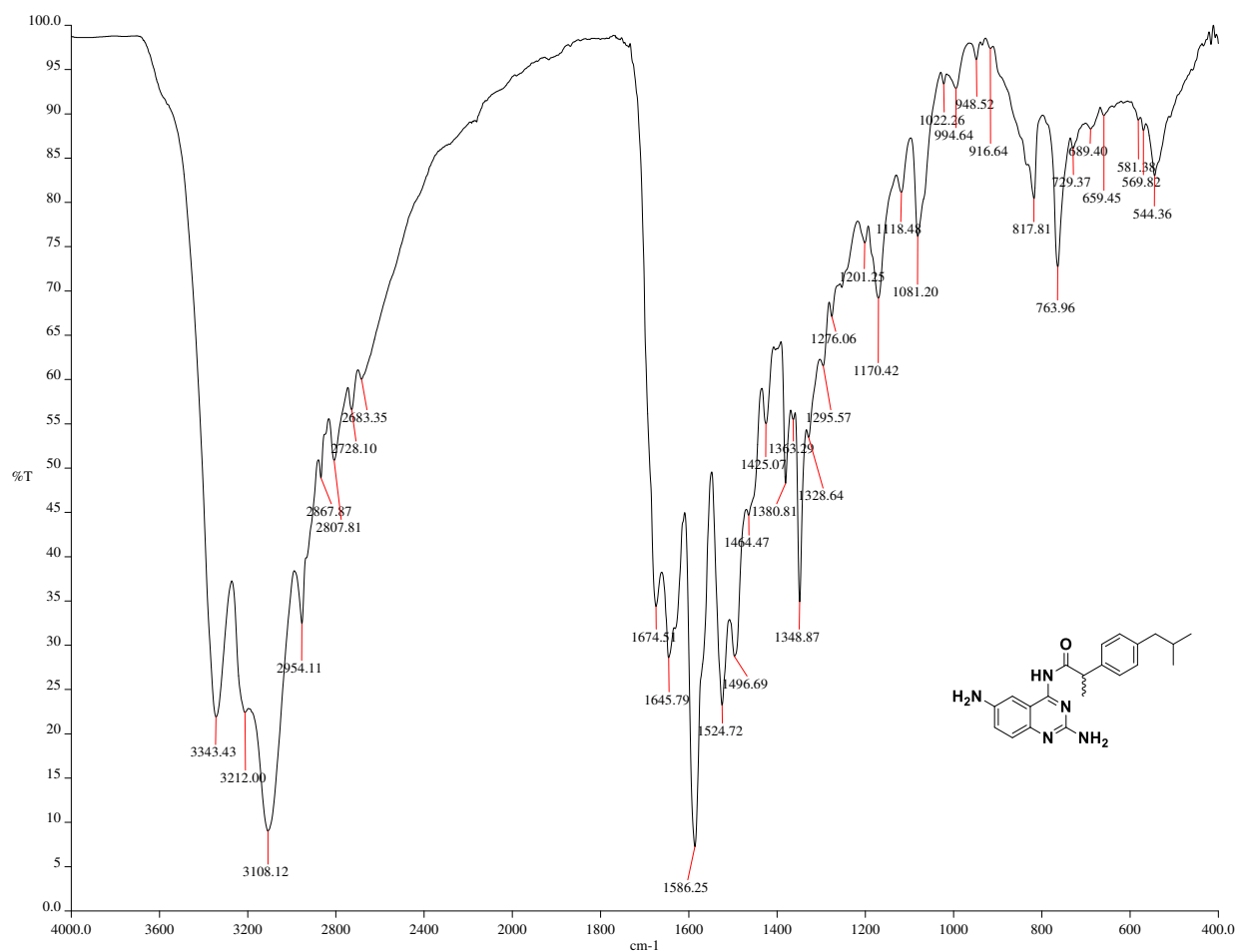


Figura 58. Espectro de IR-ATR de 3.



Figura 59. Espectro de EM-APCI de 3.



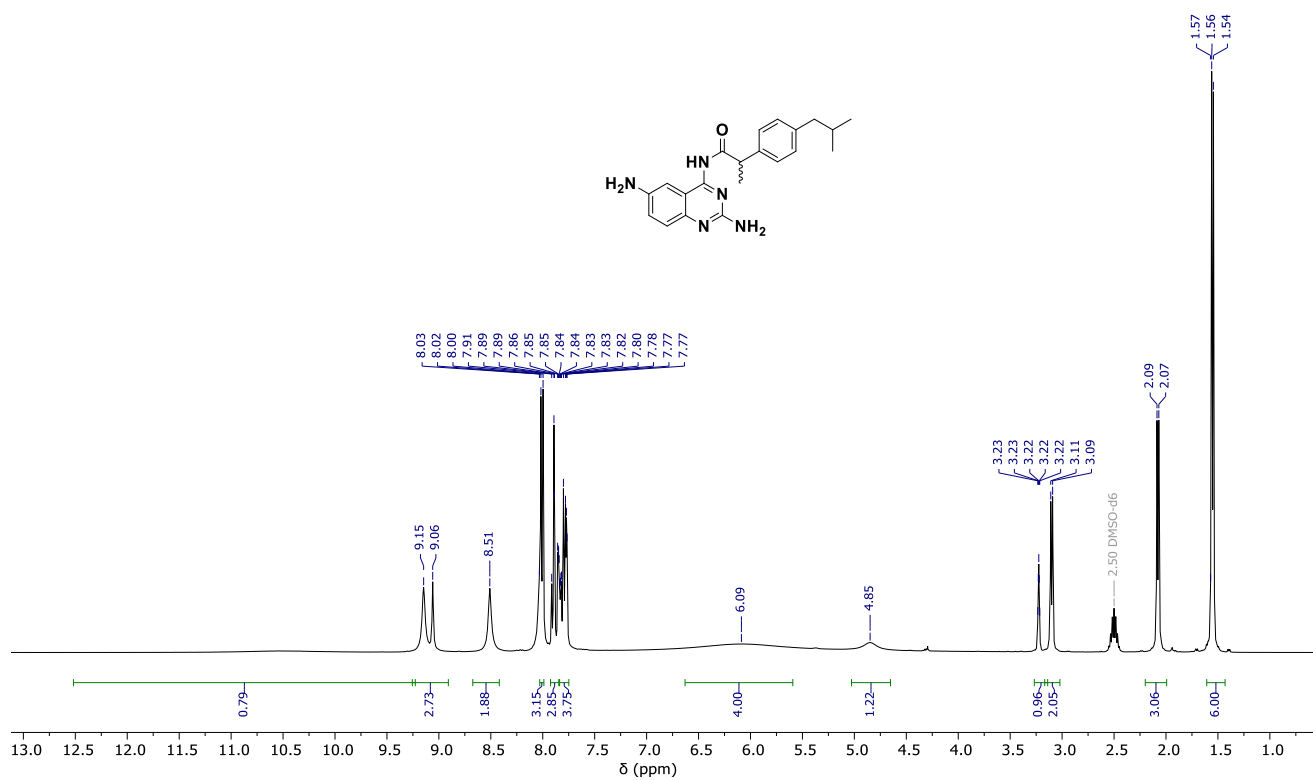


Figura 60. Espectro de RMN-¹H de 3.

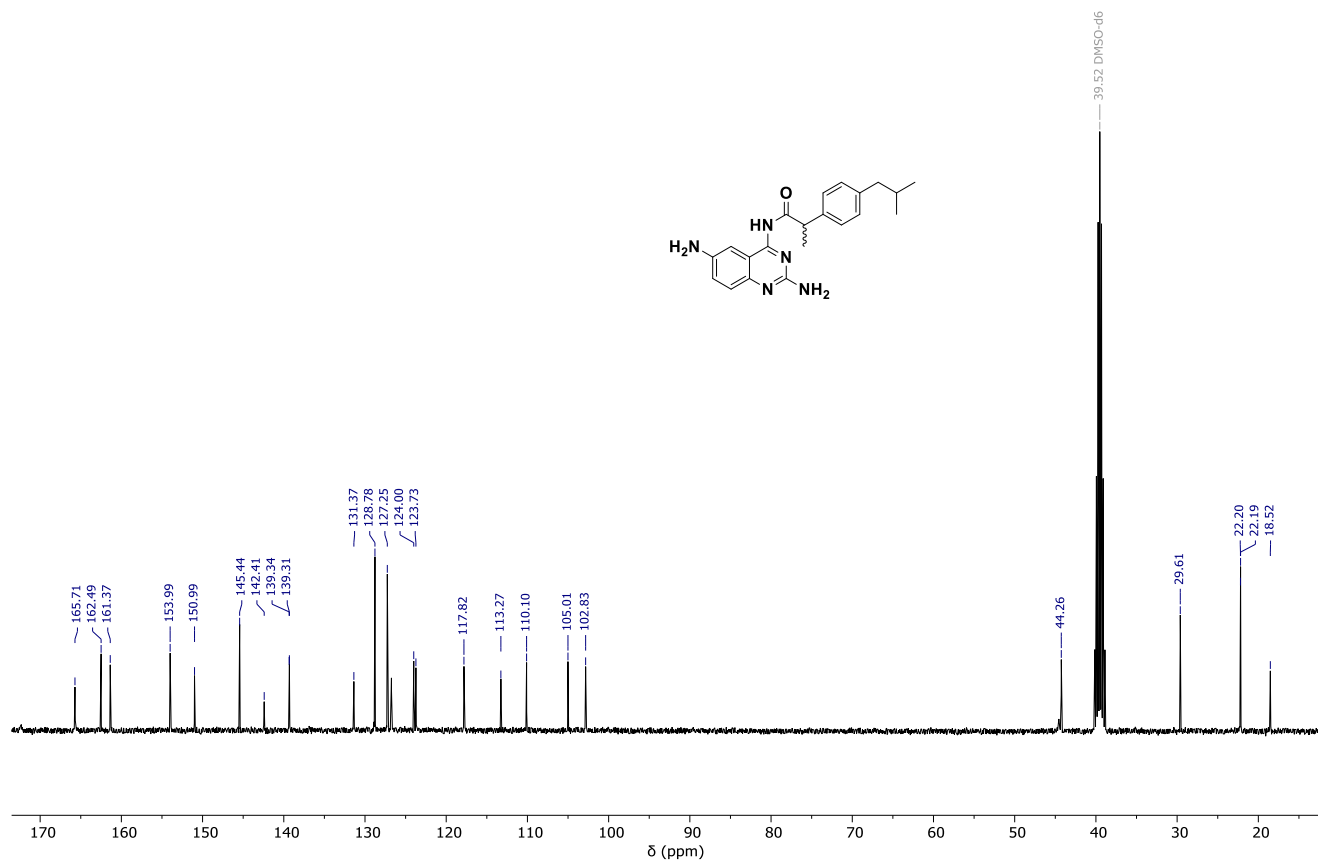


Figura 61. Espectro de RMN-¹³C de 3.



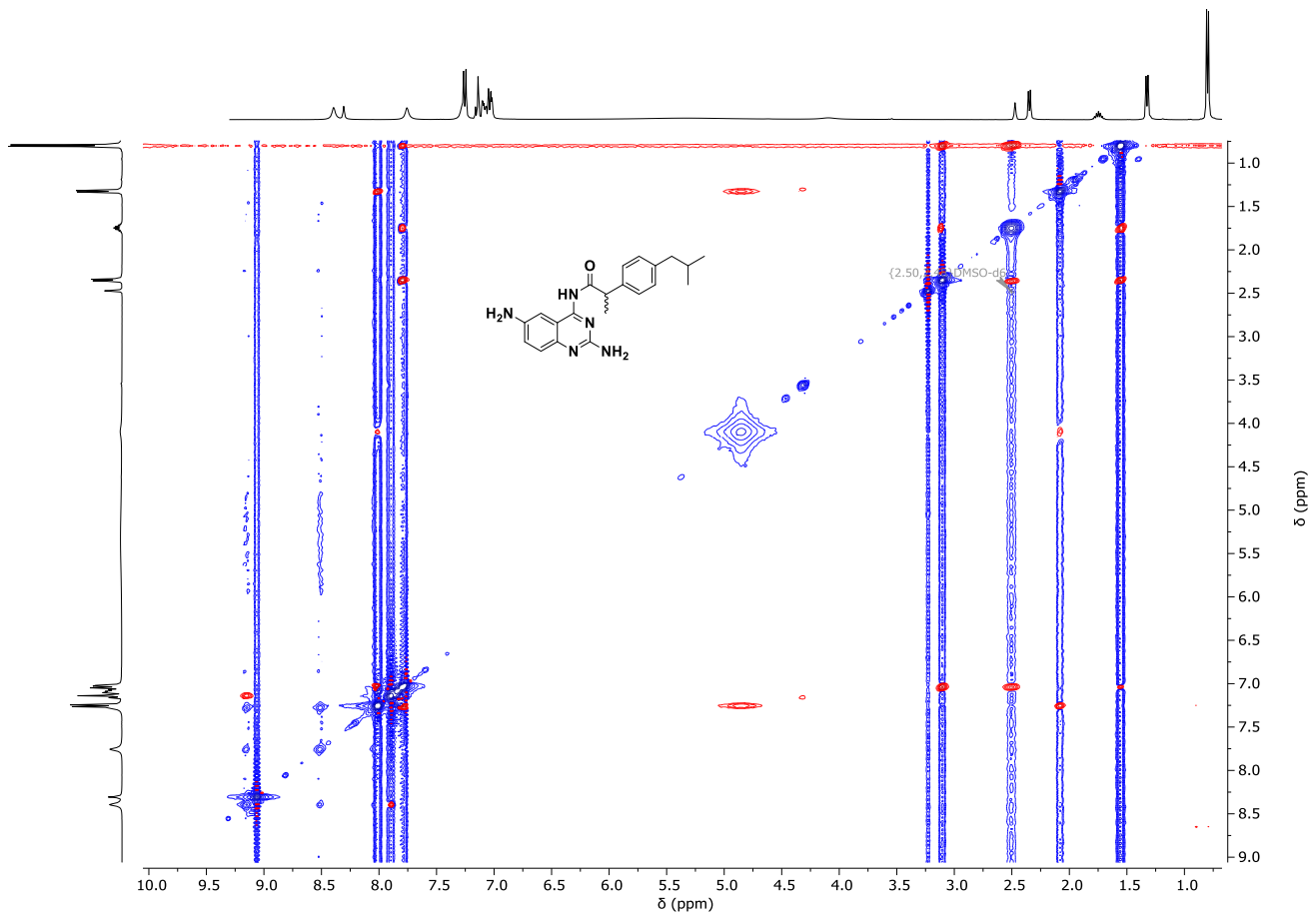


Figura 62. Espectro de RMN-NOESY de 3.



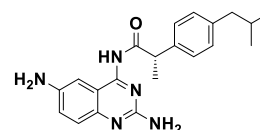
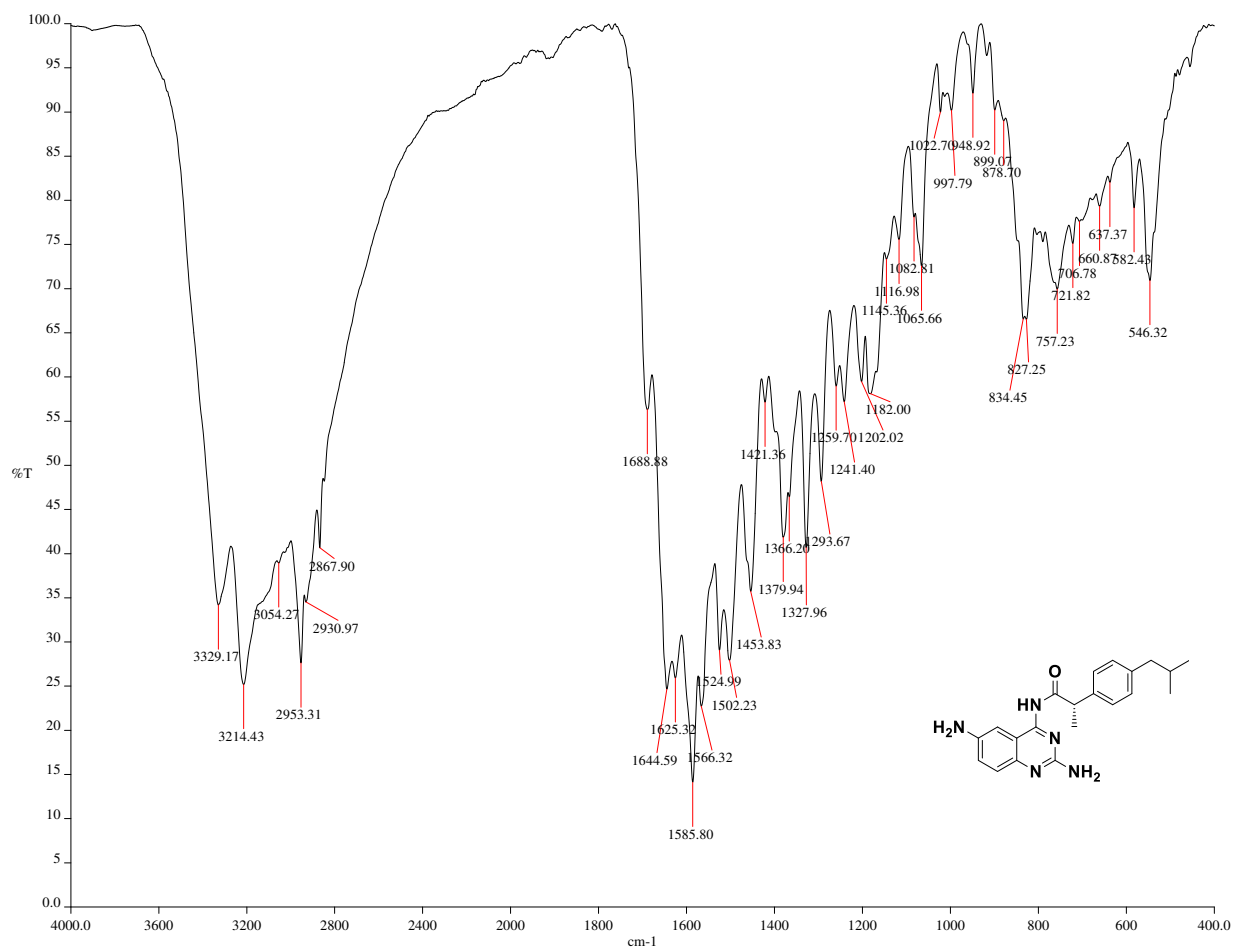


Figura 63. Espectro de IR-ATR de 4.

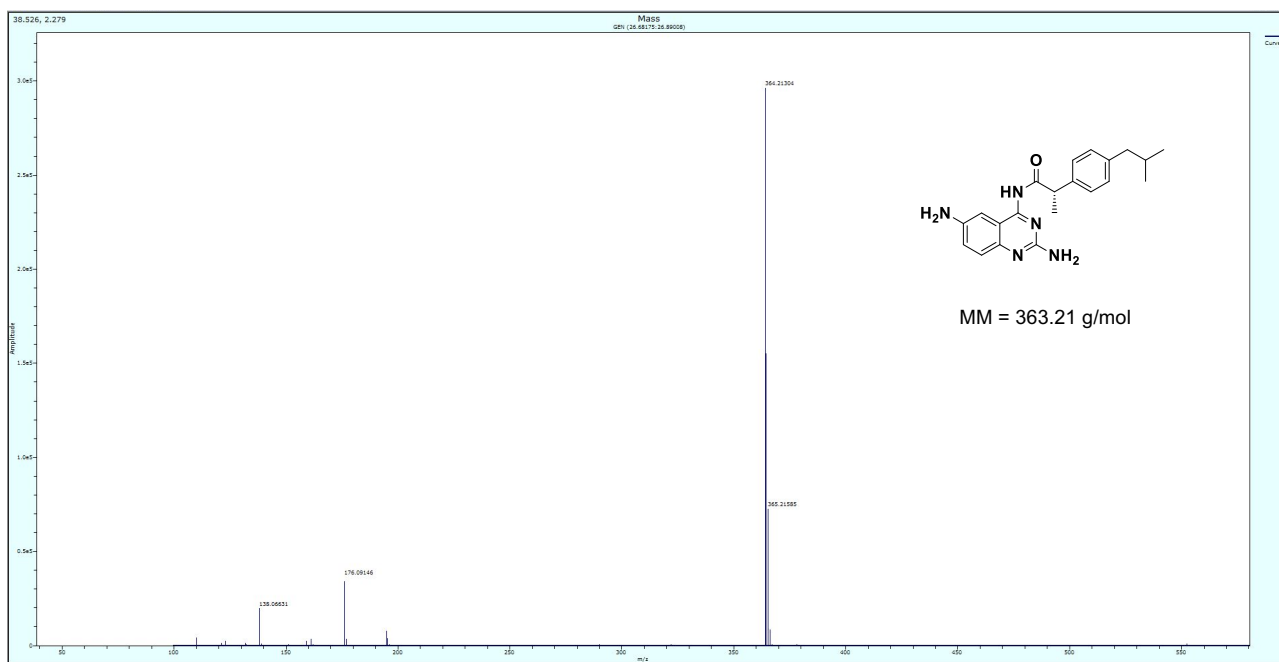


Figura 64. Espectro de EM-APCI de 4.



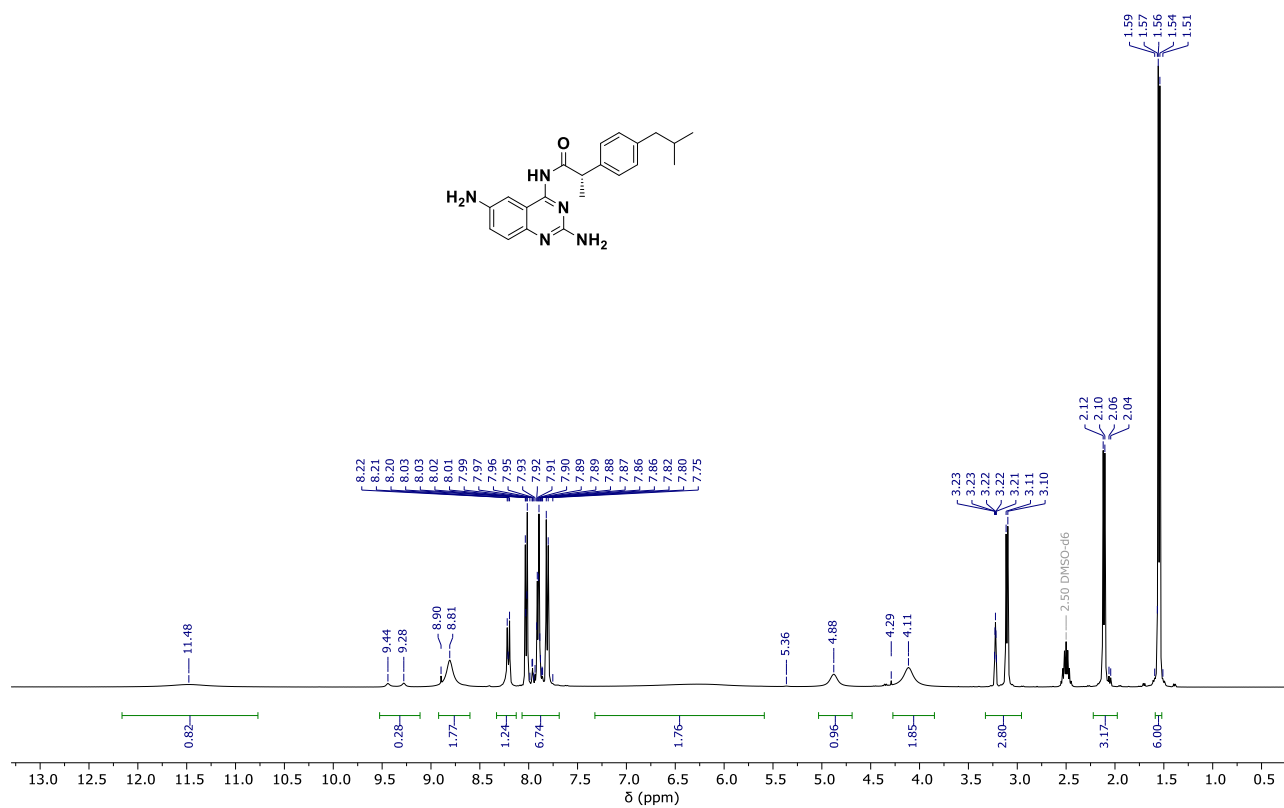


Figura 65. Espectro de RMN-¹H de 4.

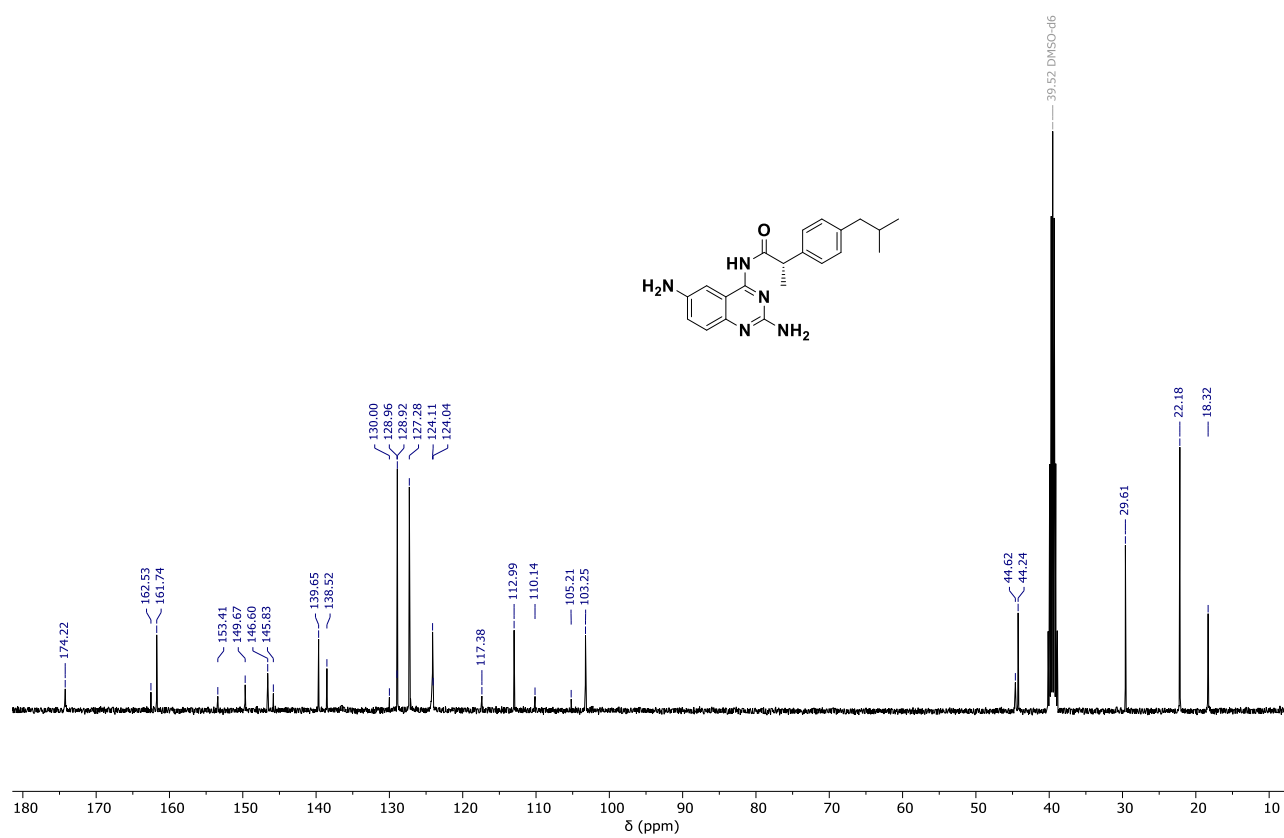


Figura 66. Espectro de RMN-¹³C de 4.



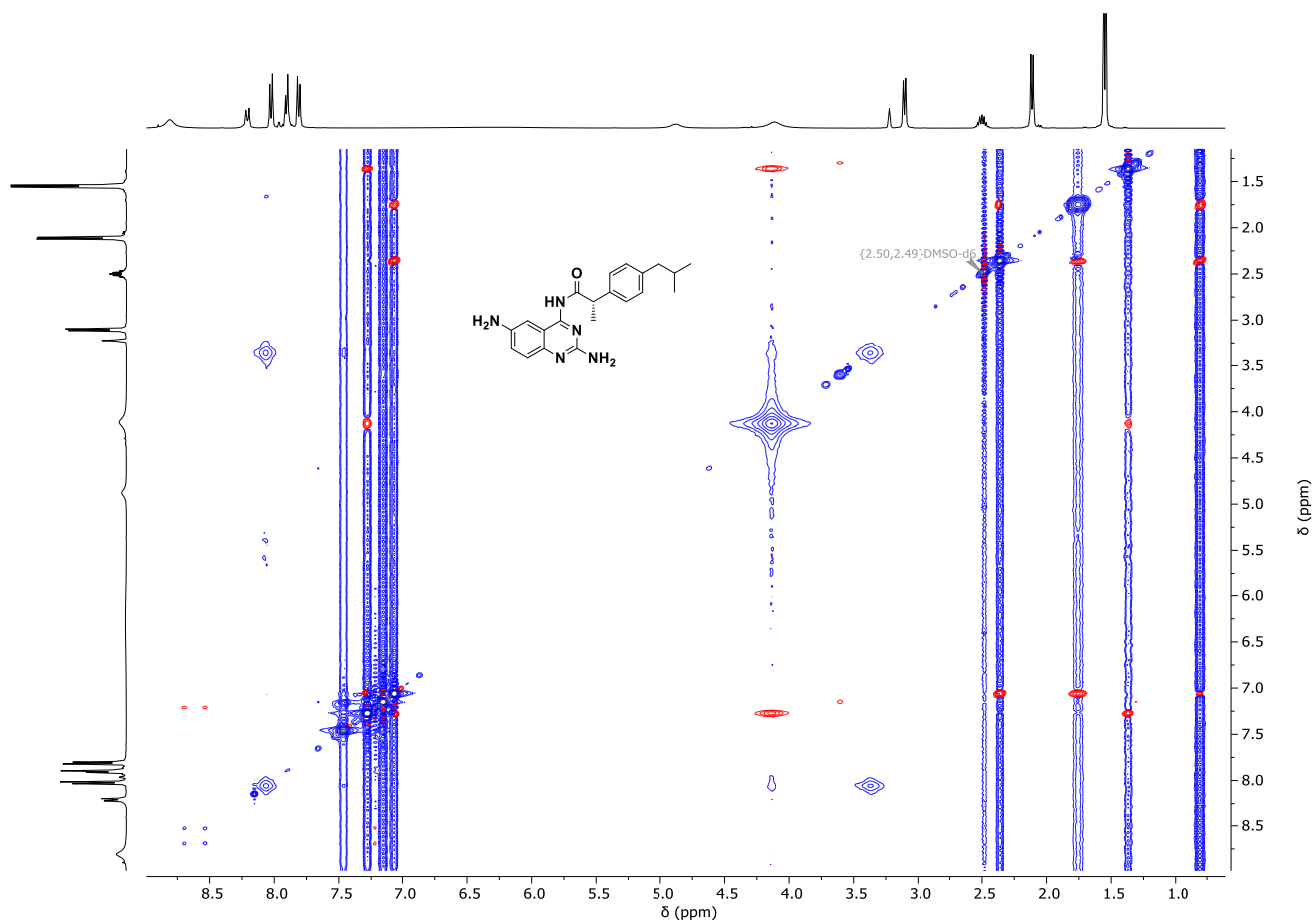


Figura 67. Espectro de RMN-NOESY de 4.



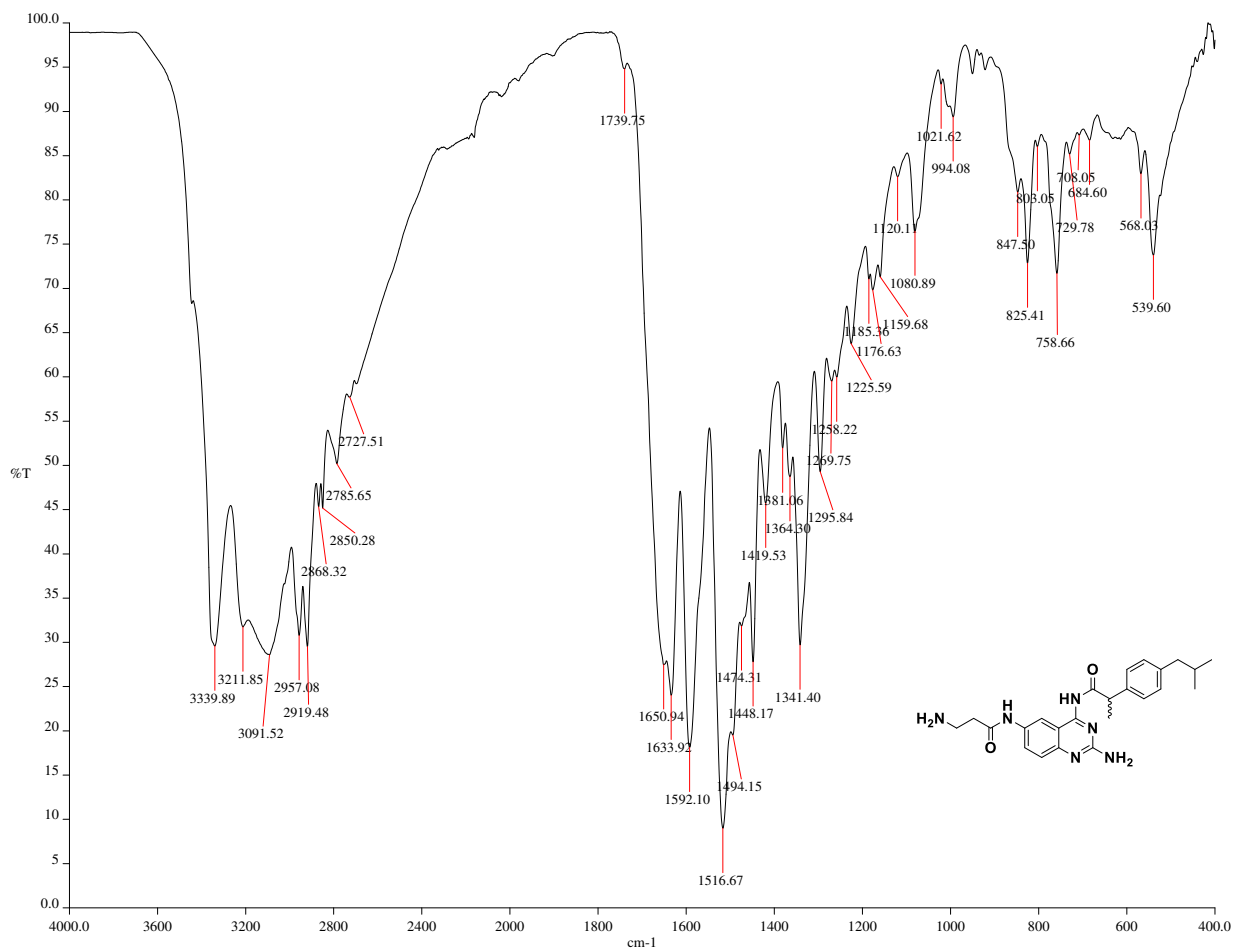


Figura 68. Espectro de IR-ATR de 5.

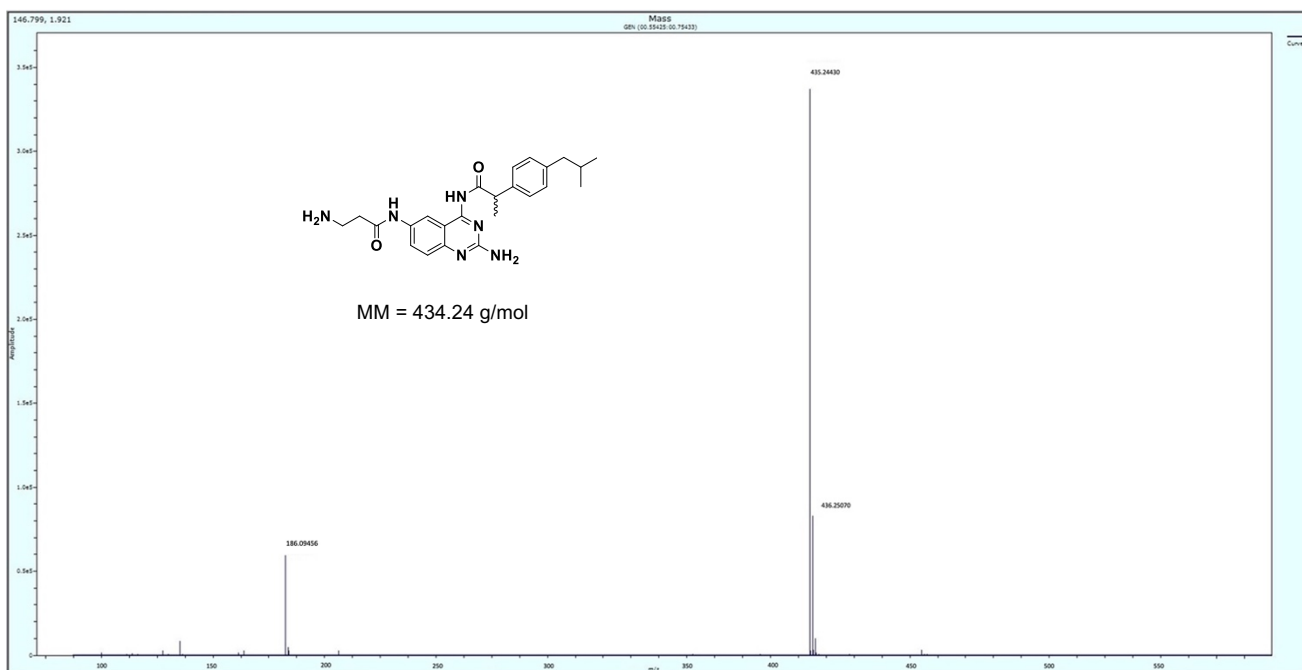


Figura 69. Espectro de EM-APCI de 5.



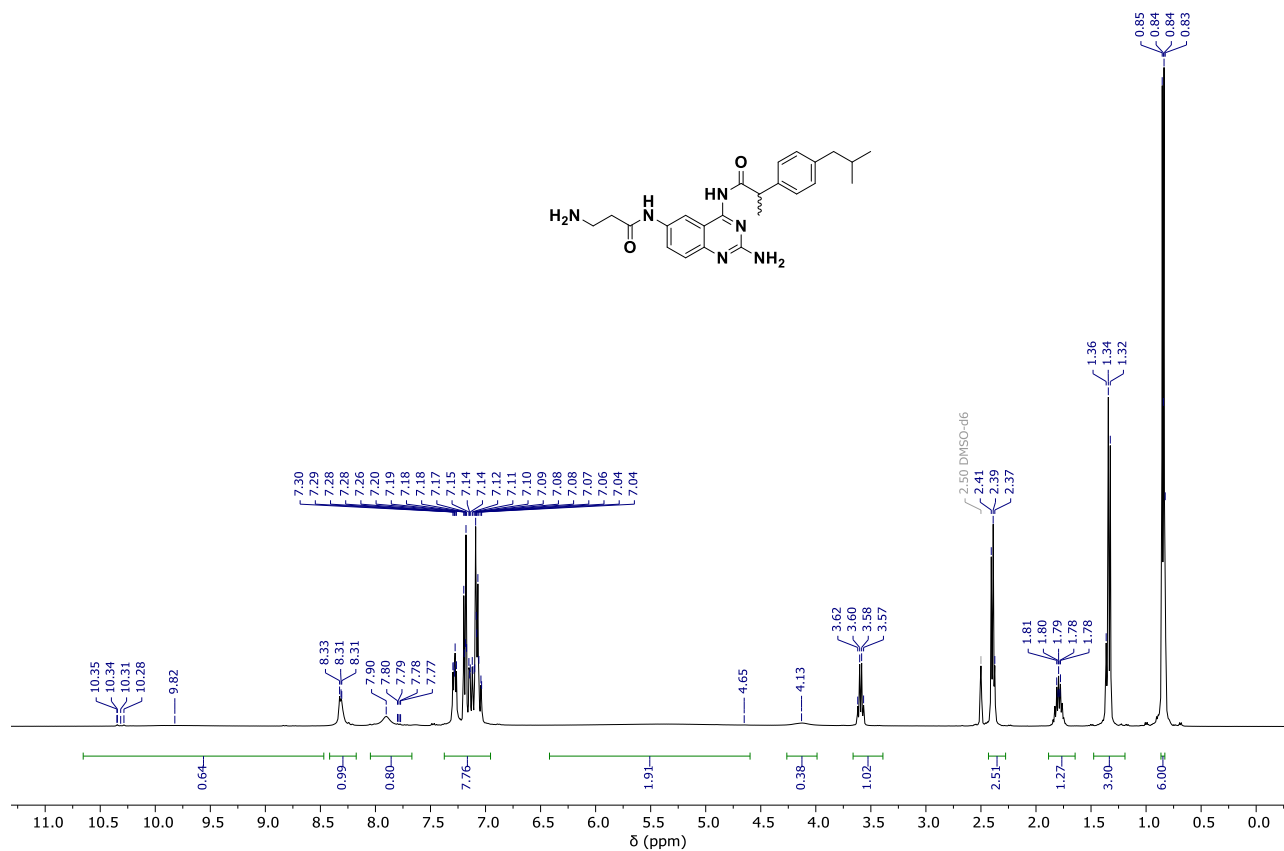


Figura 70. Espectro de RMN-¹H de 5.

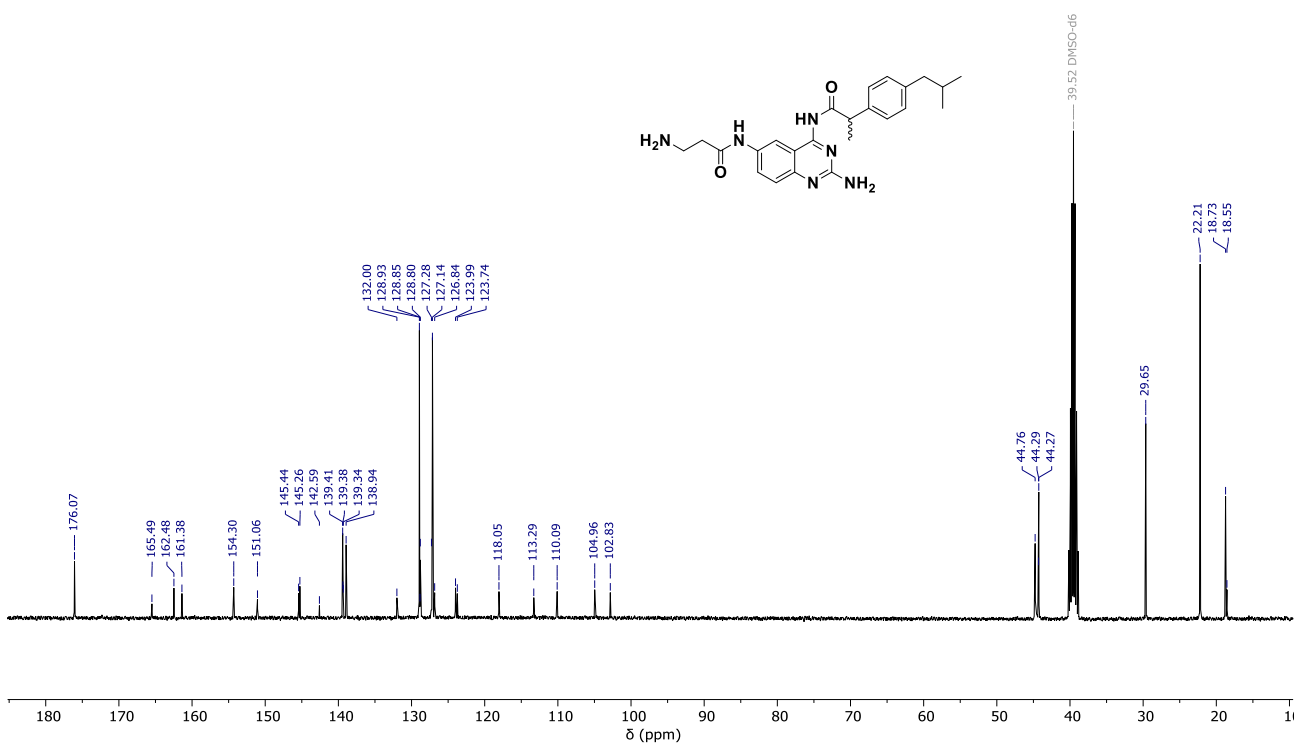


Figura 71. Espectro de RMN-¹³C de 5.

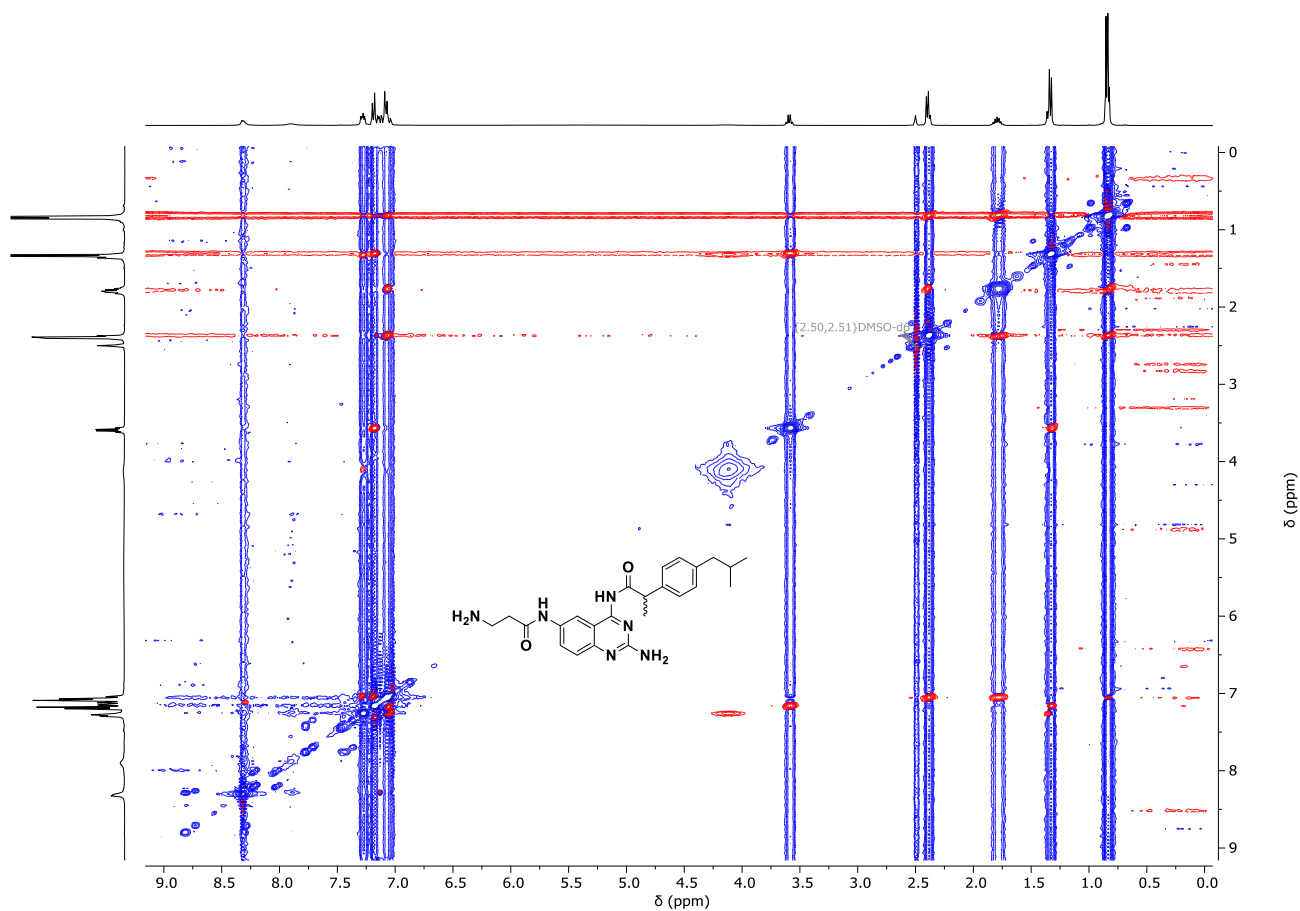


Figura 72. Espectro de RMN-NOESY de 5.



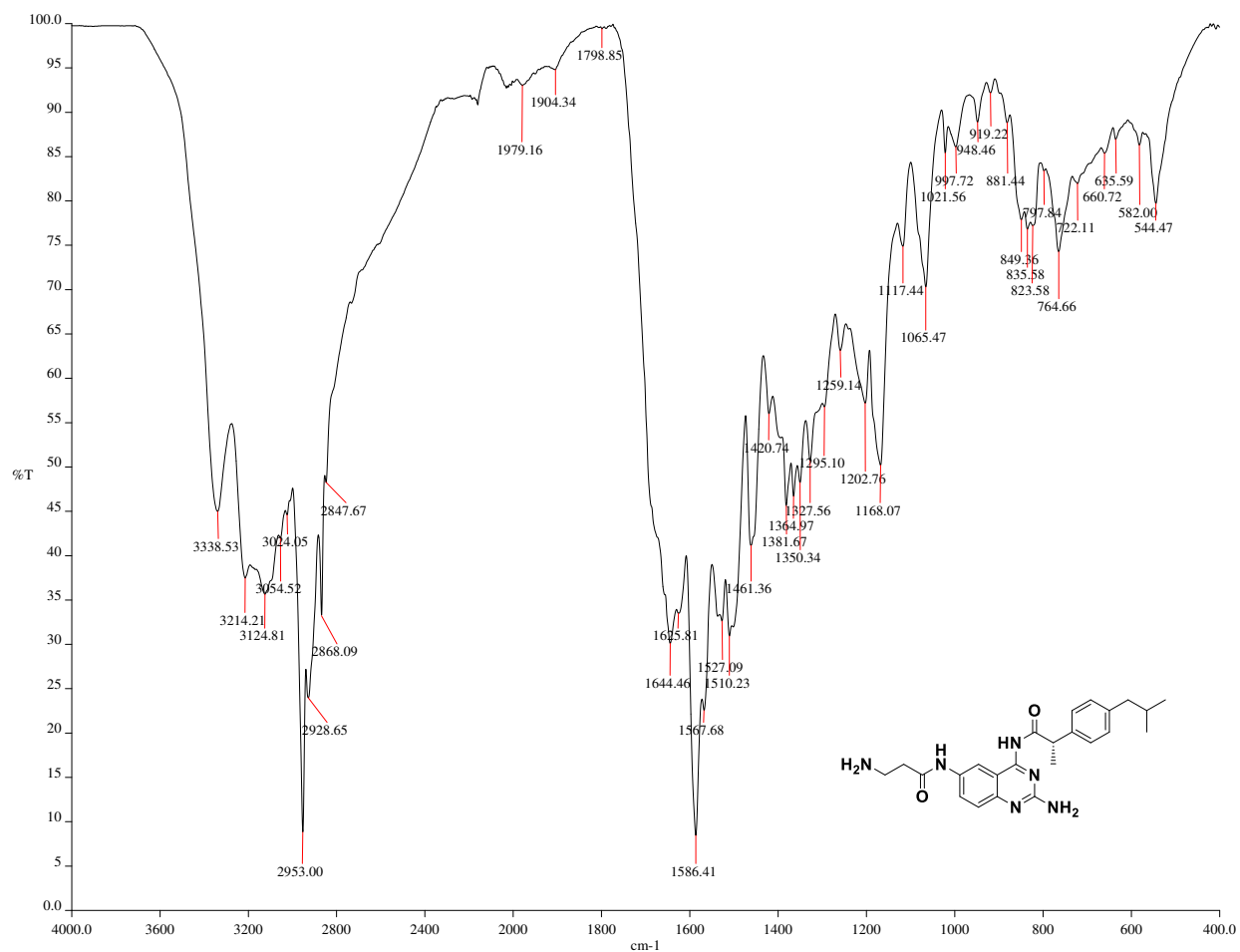


Figura 73. Espectro de IR-ATR de 6.

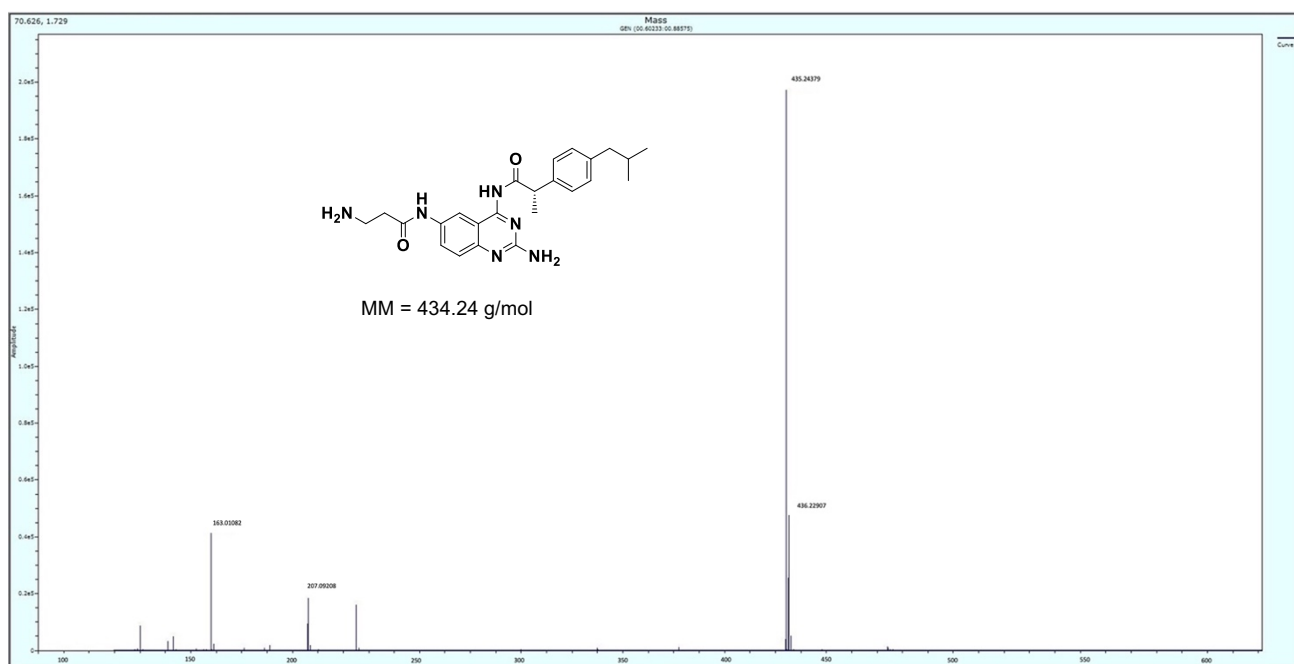


Figura 74. Espectro de EM-APCI de 6.



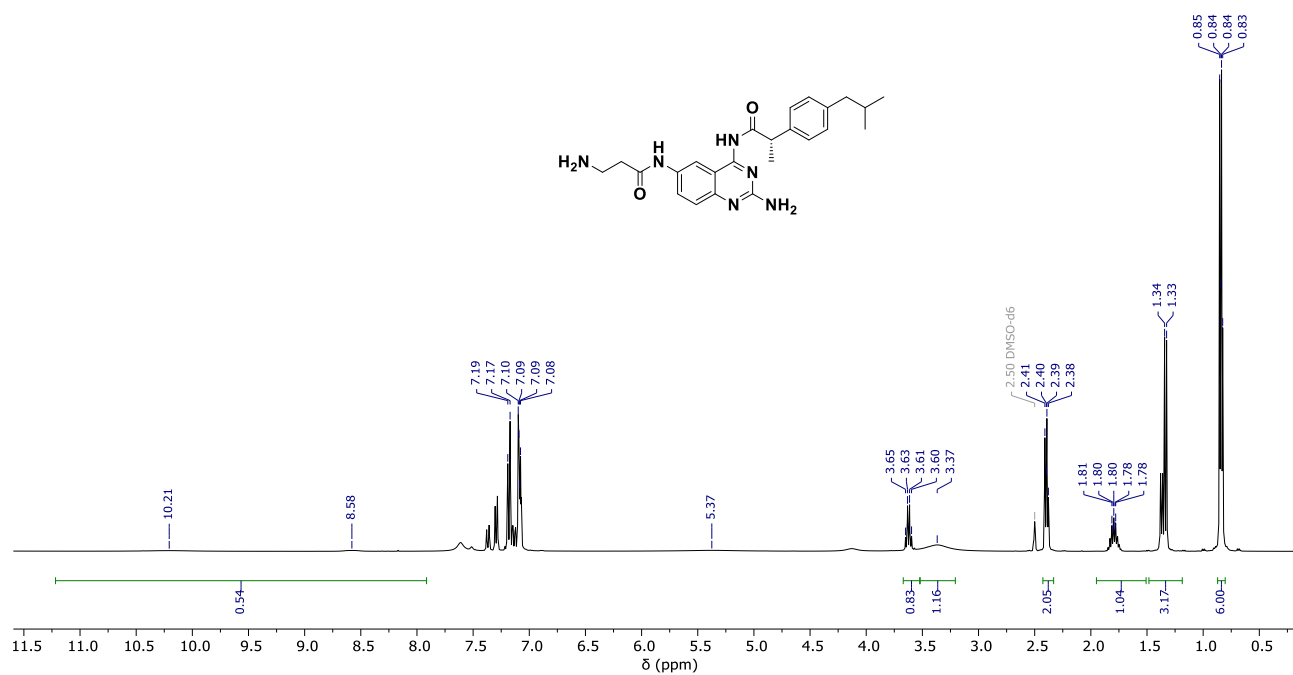


Figura 75. Espectro de RMN-¹H de 6.

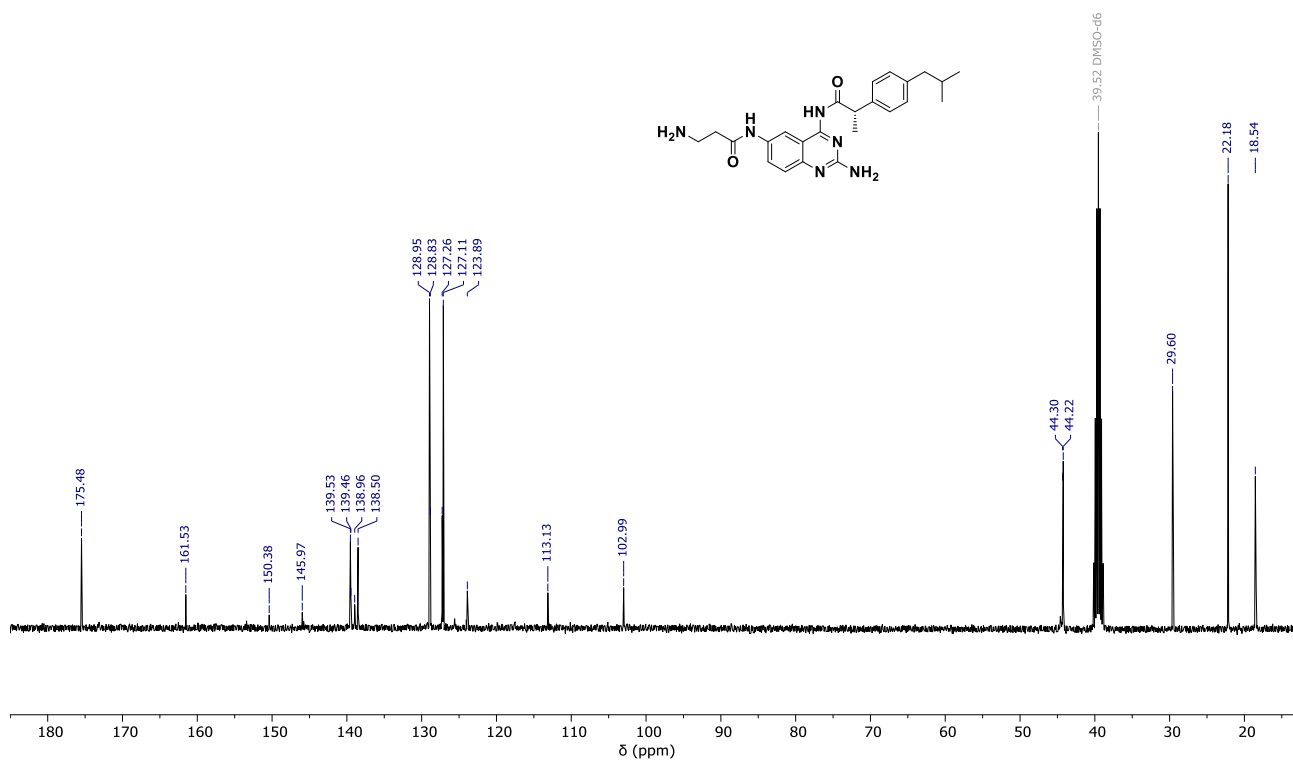


Figura 76. Espectro de RMN-¹³C de 6.



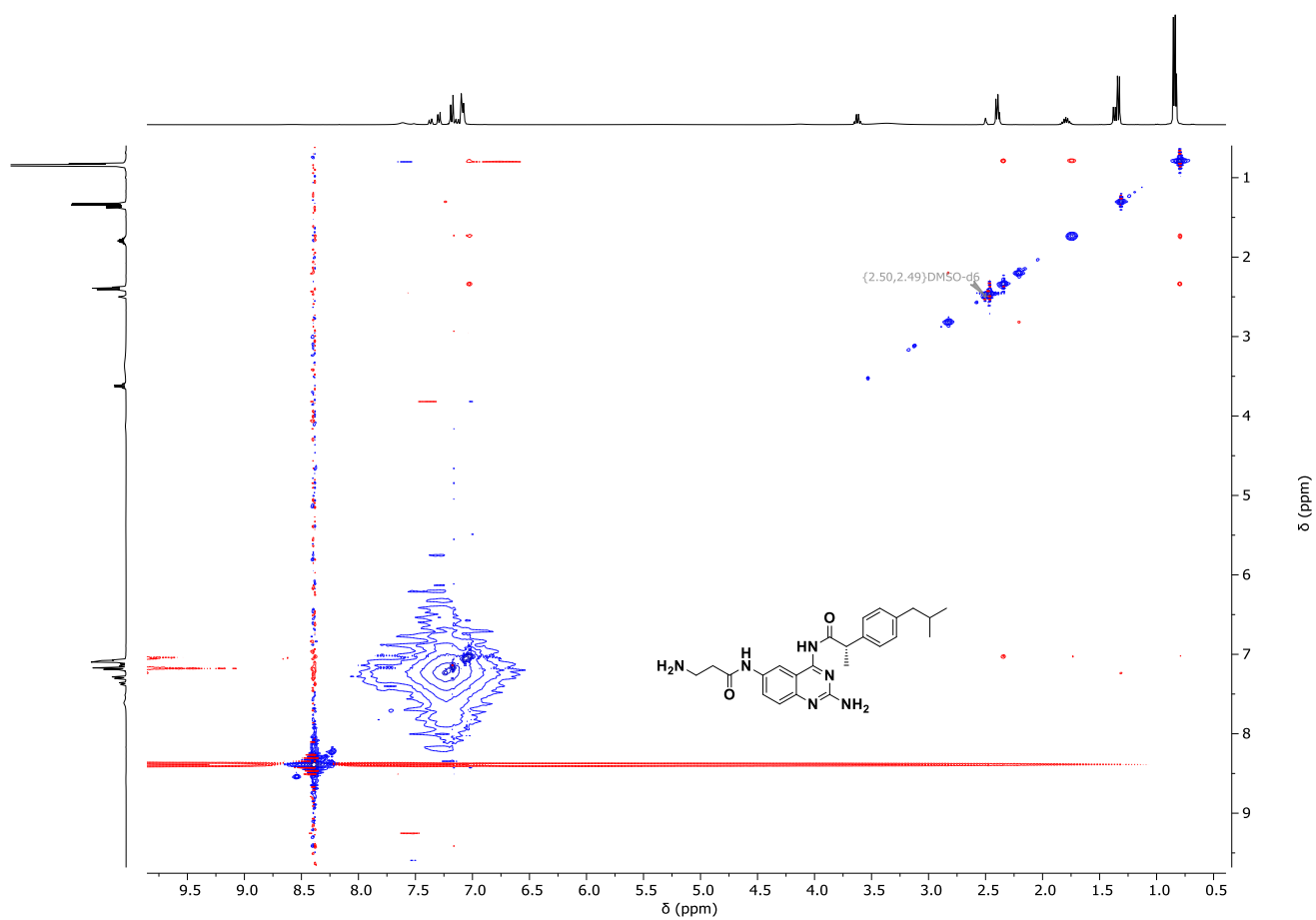


Figura 77. Espectro de RMN-NOESY de **6**.



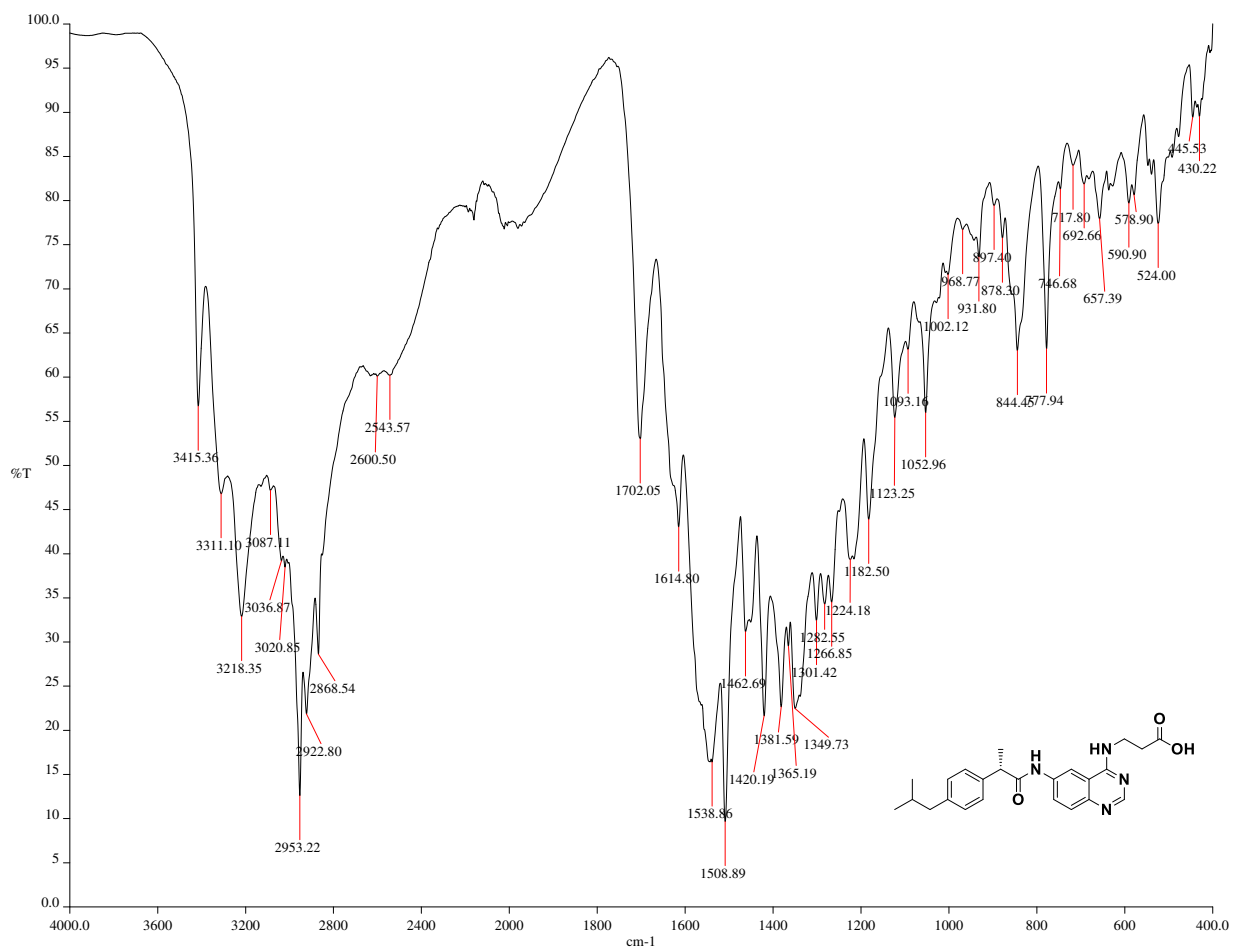


Figura 78. Espectro de IR-ATR de 7.

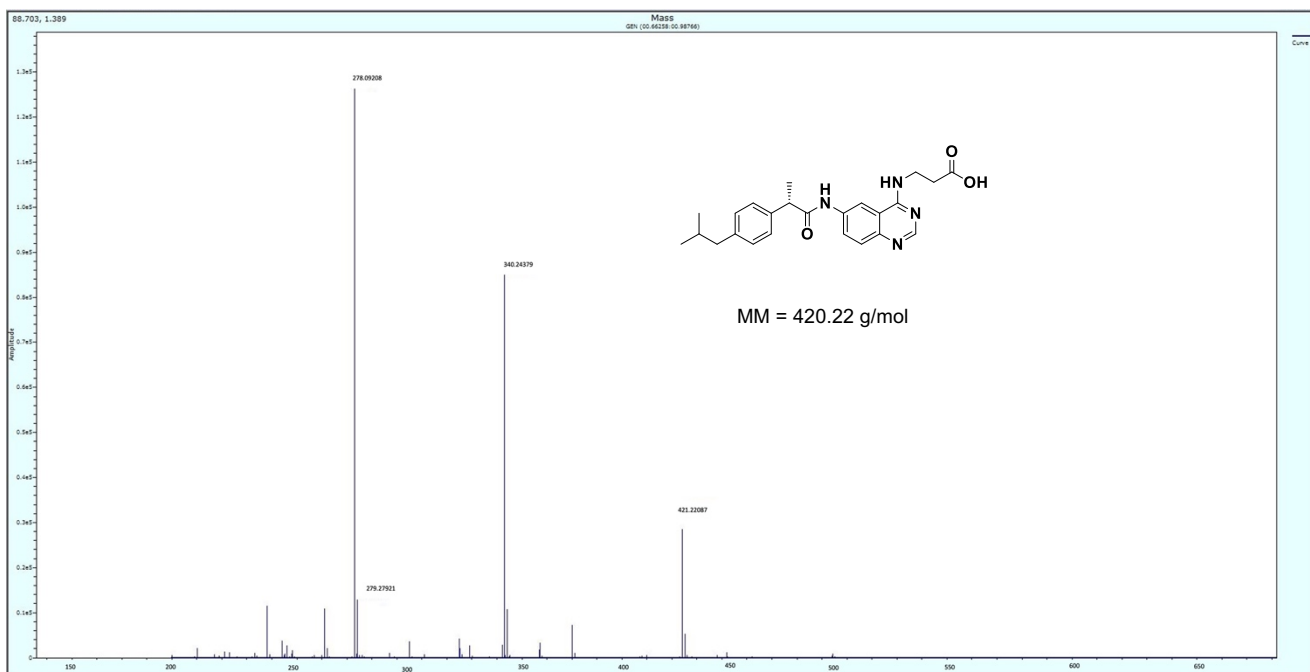


Figura 79. Espectro de EM-APCI de 7.



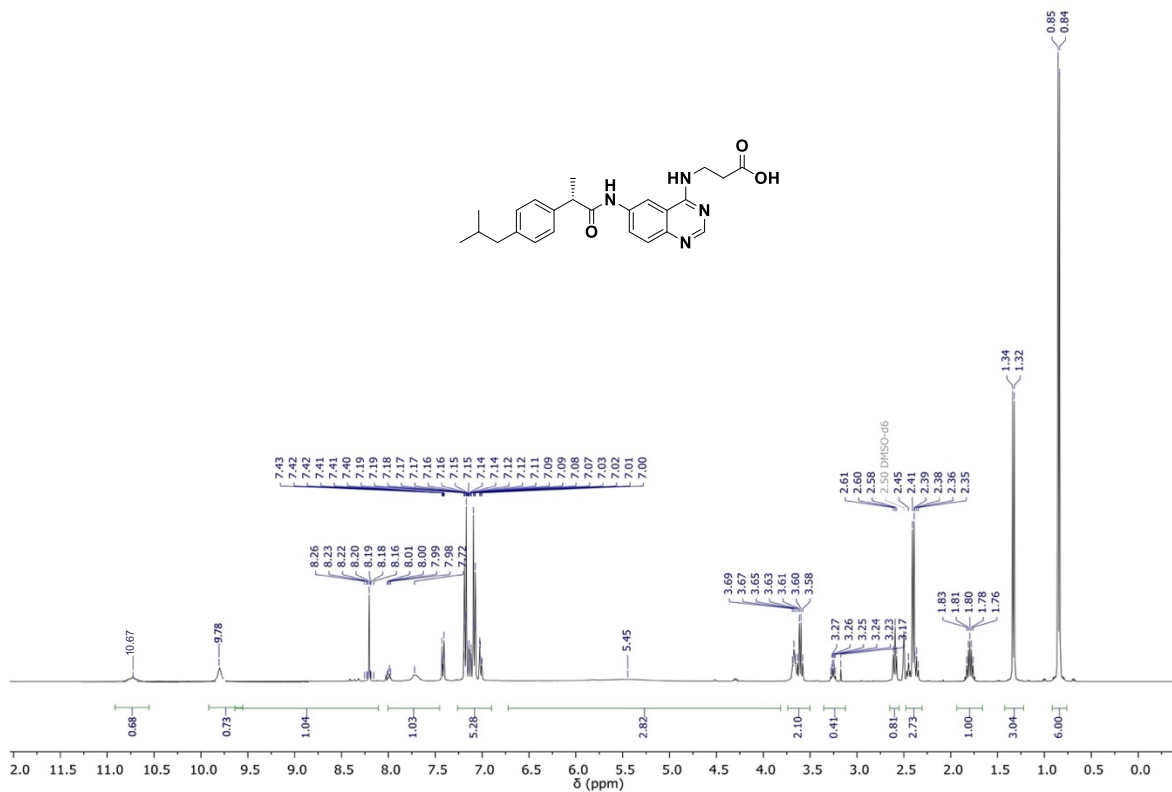


Figura 80. Espectro de RMN-¹H de 7.

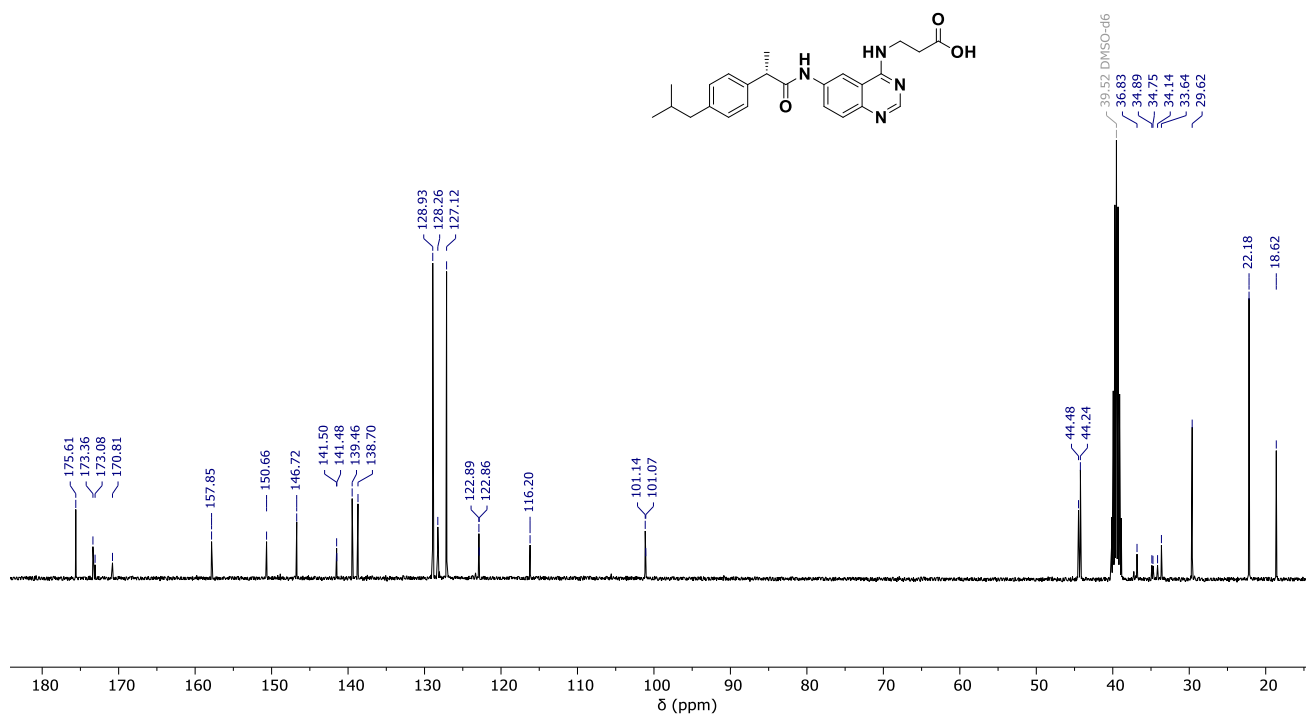


Figura 81. Espectro de RMN-¹³C de 7.



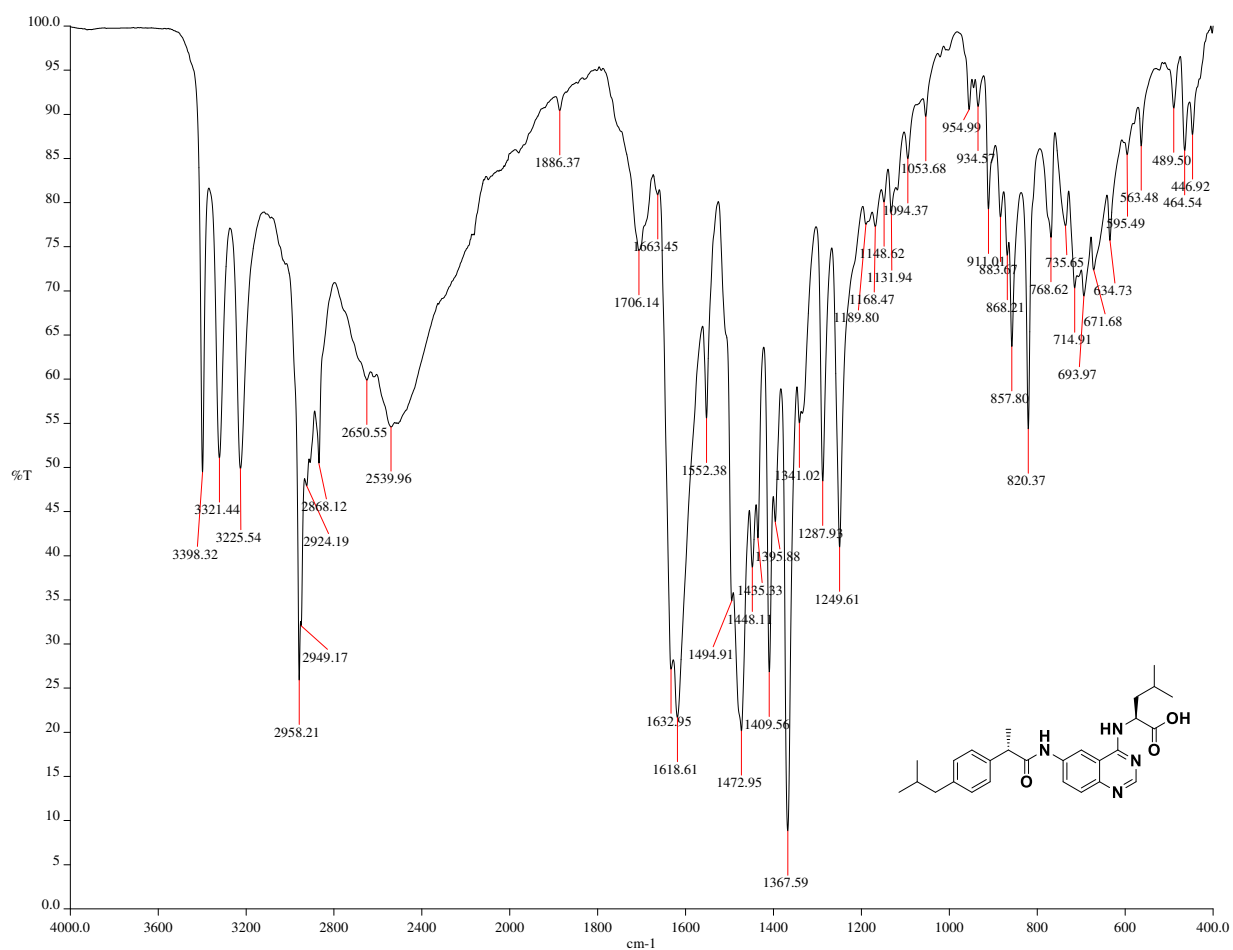


Figura 82. Espectro de IR-ATR de 8.

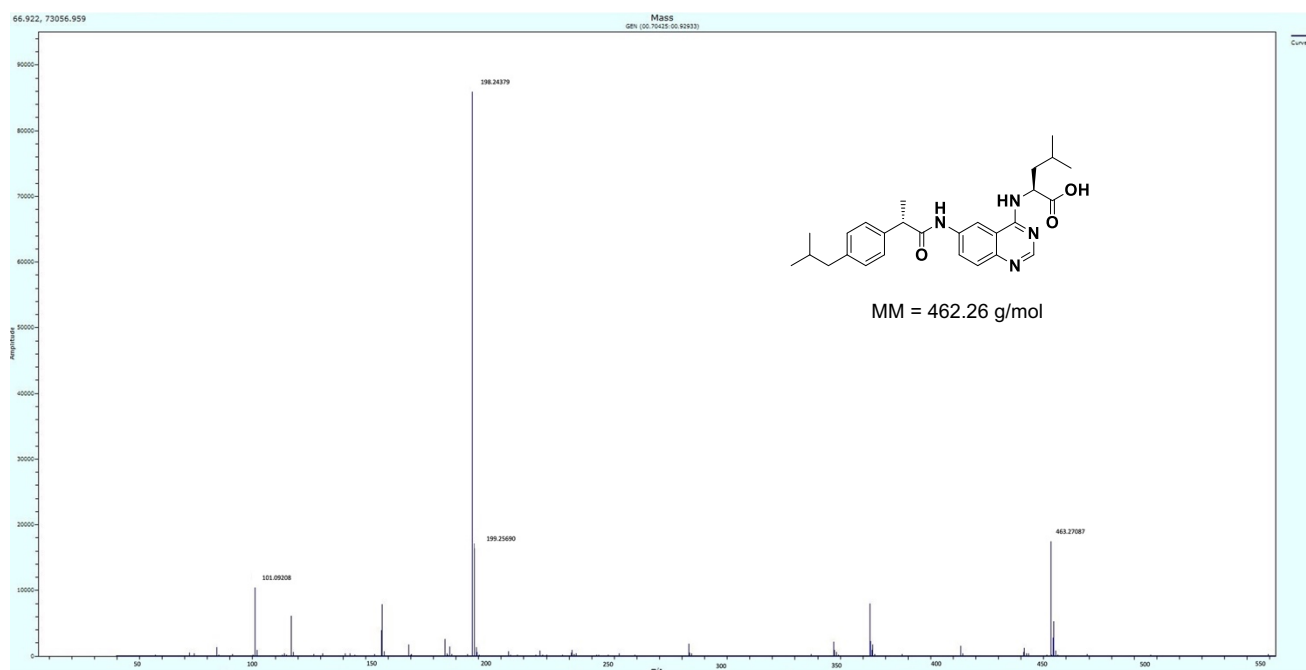


Figura 83. Espectro de EM-APCI de 8.



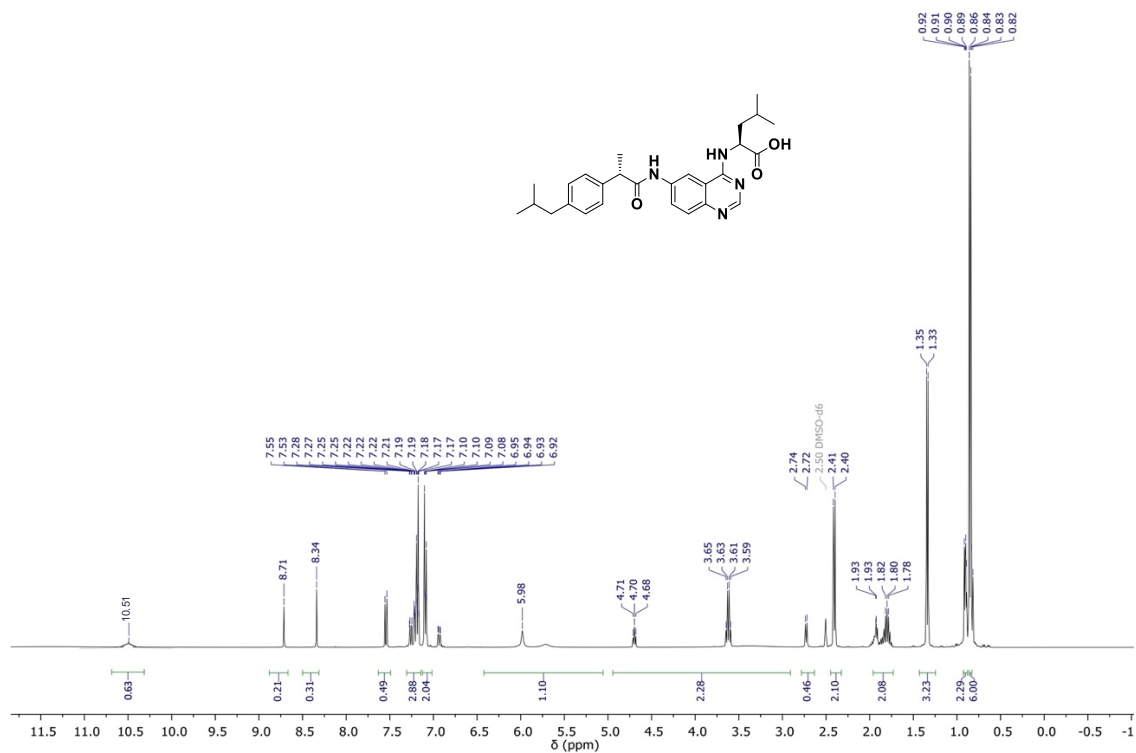


Figura 84. Espectro de RMN-¹H de 8.

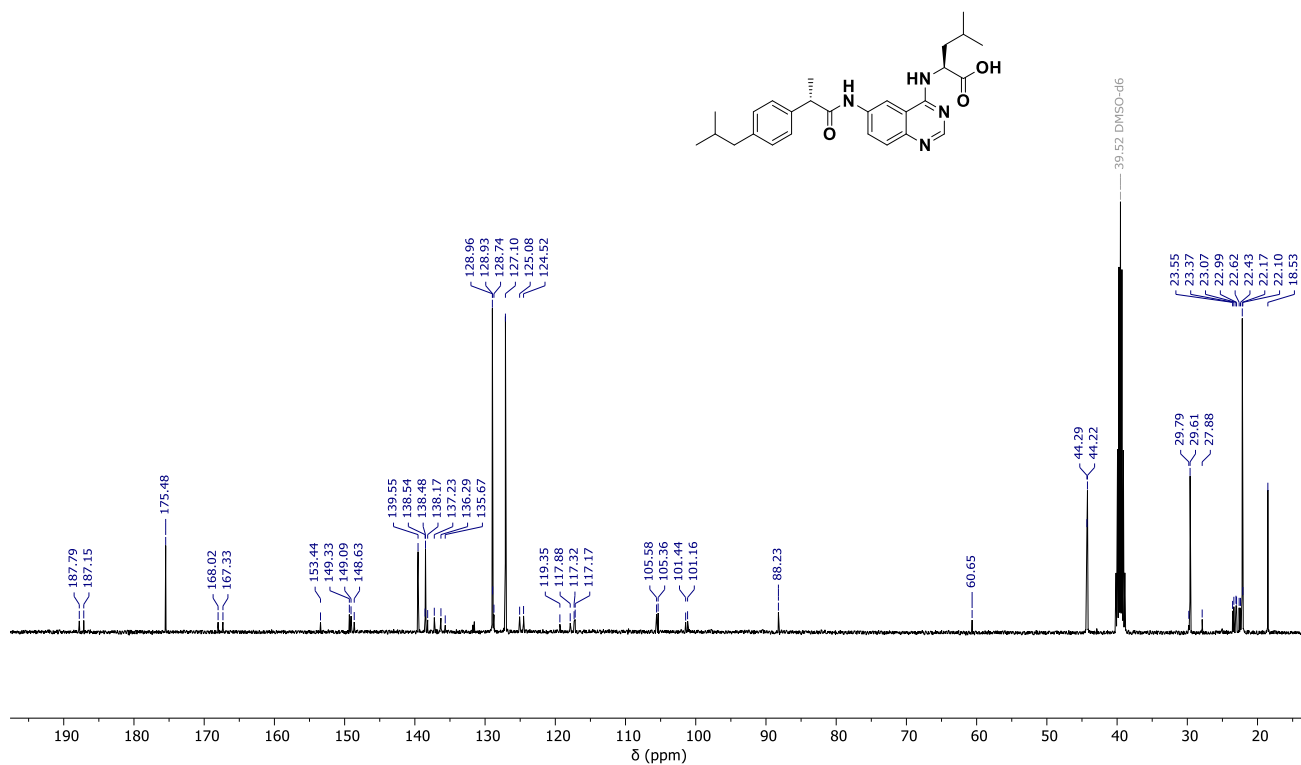


Figura 85. Espectro de RMN-¹³C de 8.

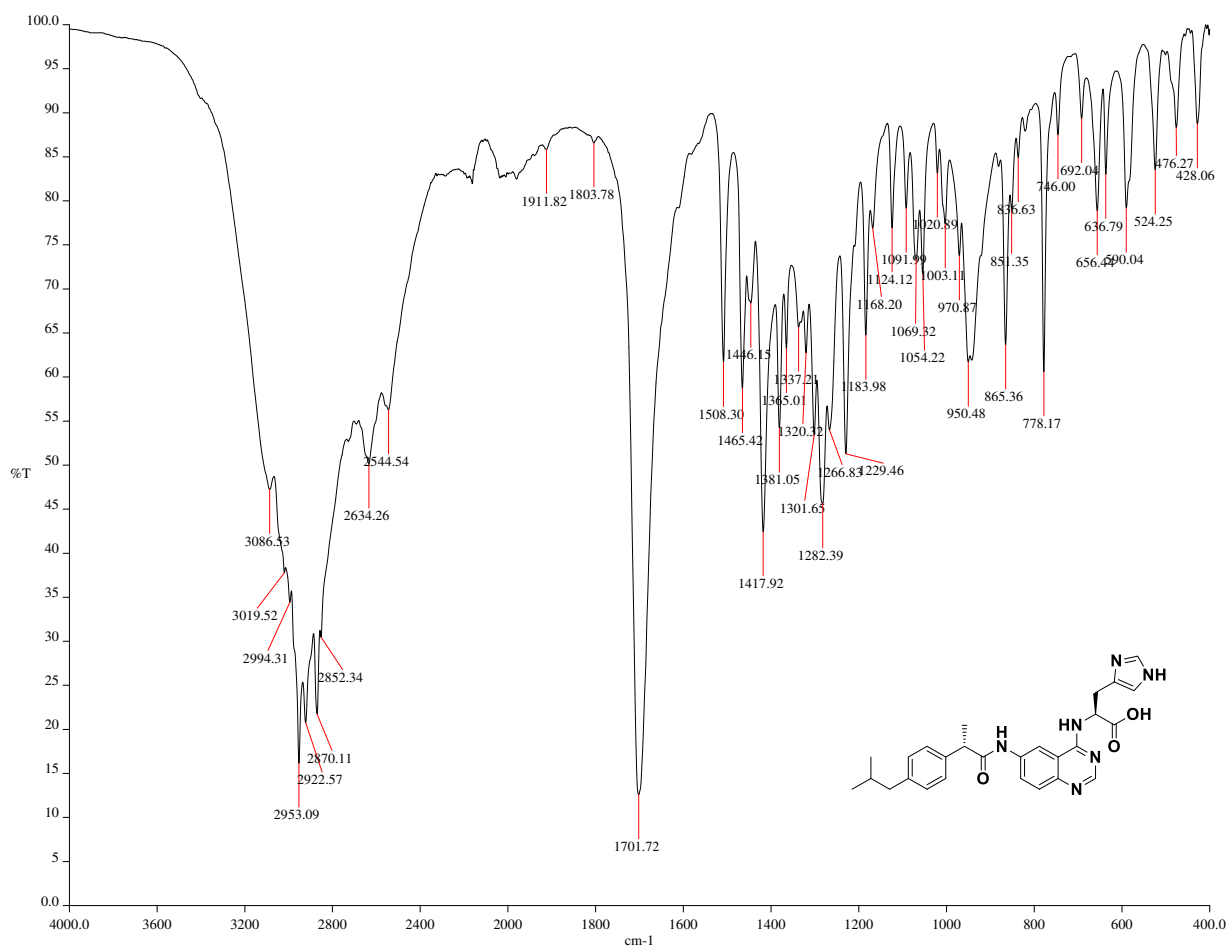


Figura 86. Espectro de IR-ATR de 9.

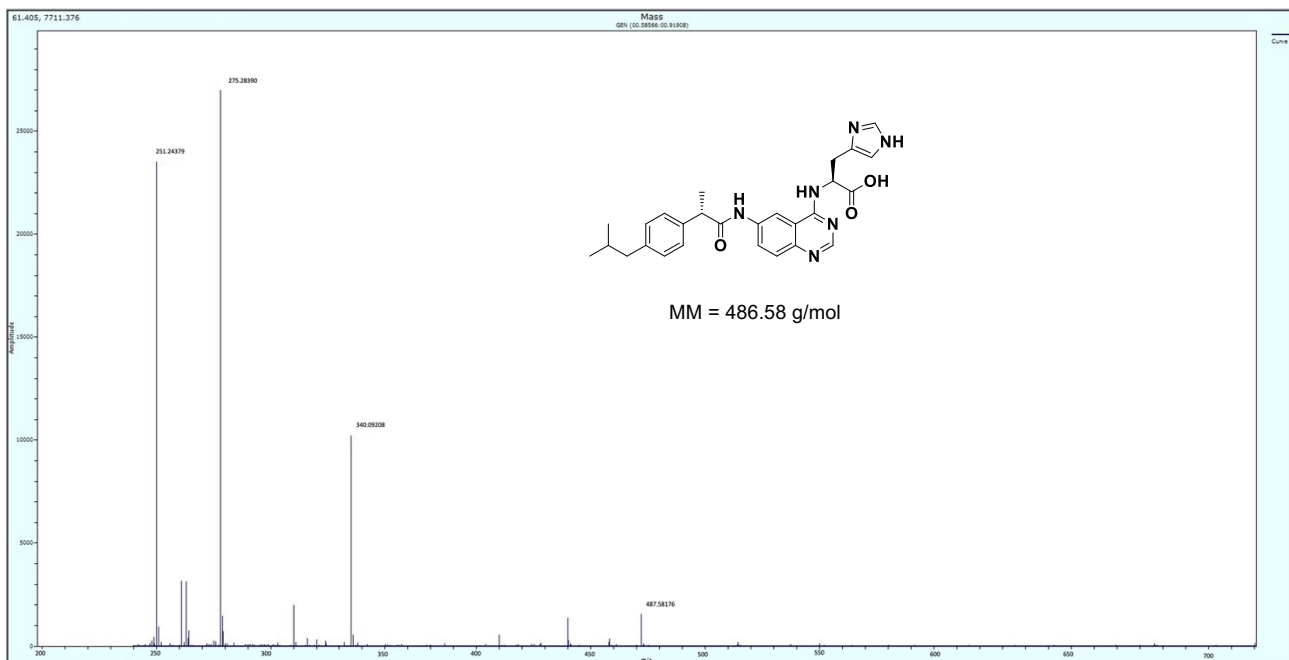


Figura 87. Espectro de EM-APCI de 9.



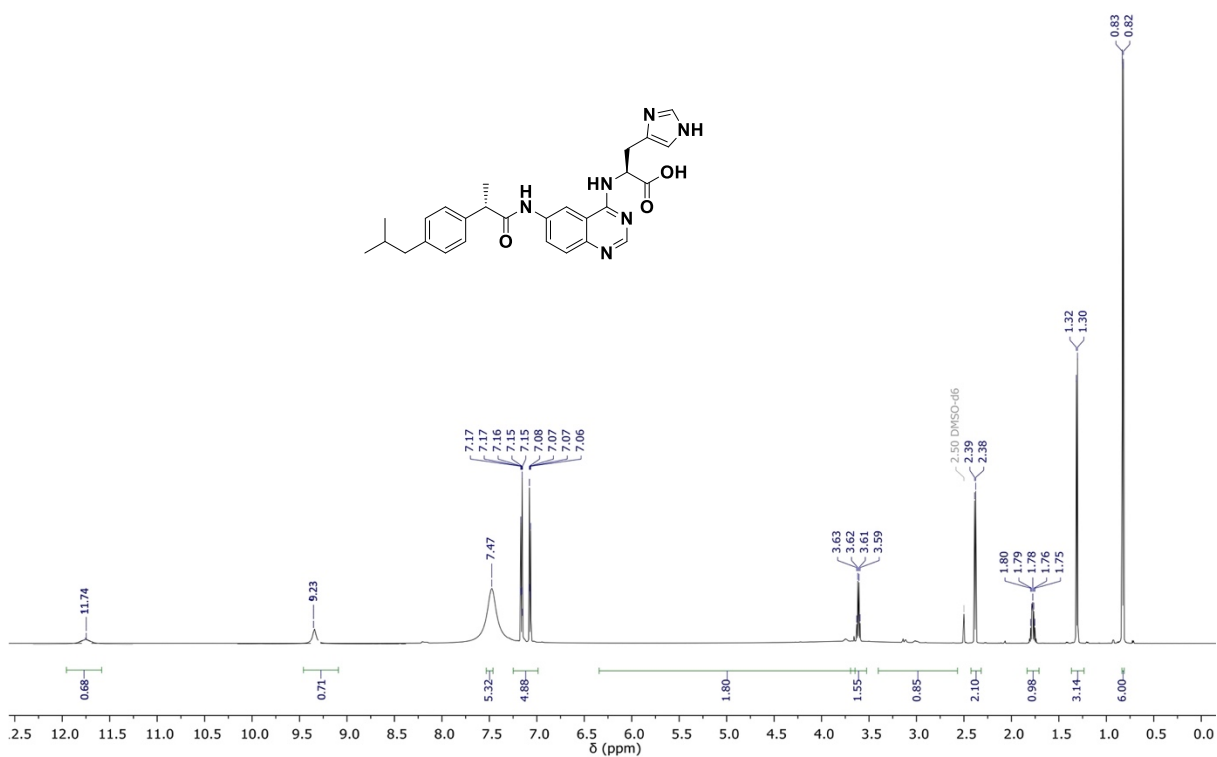


Figura 88. Espectro de RMN-¹H de 9.

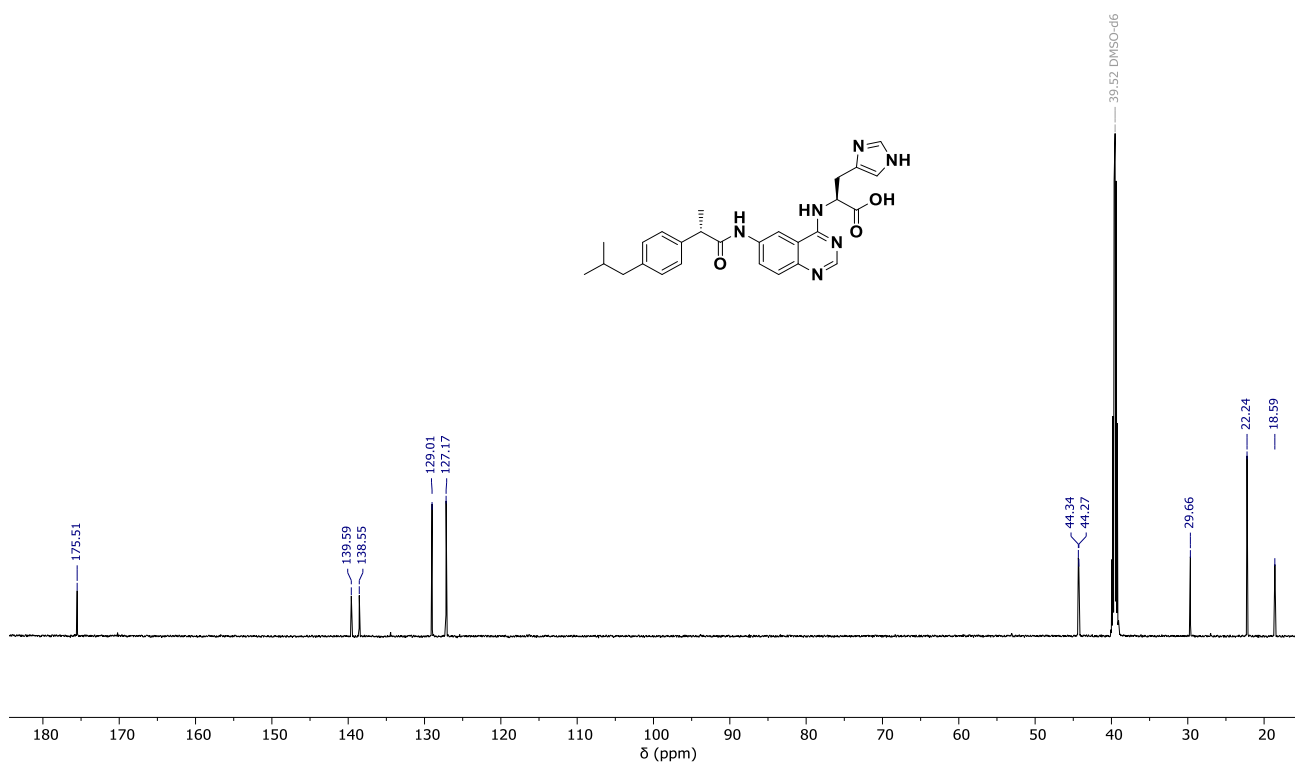


Figura 89. Espectro de RMN-¹³C de 9.



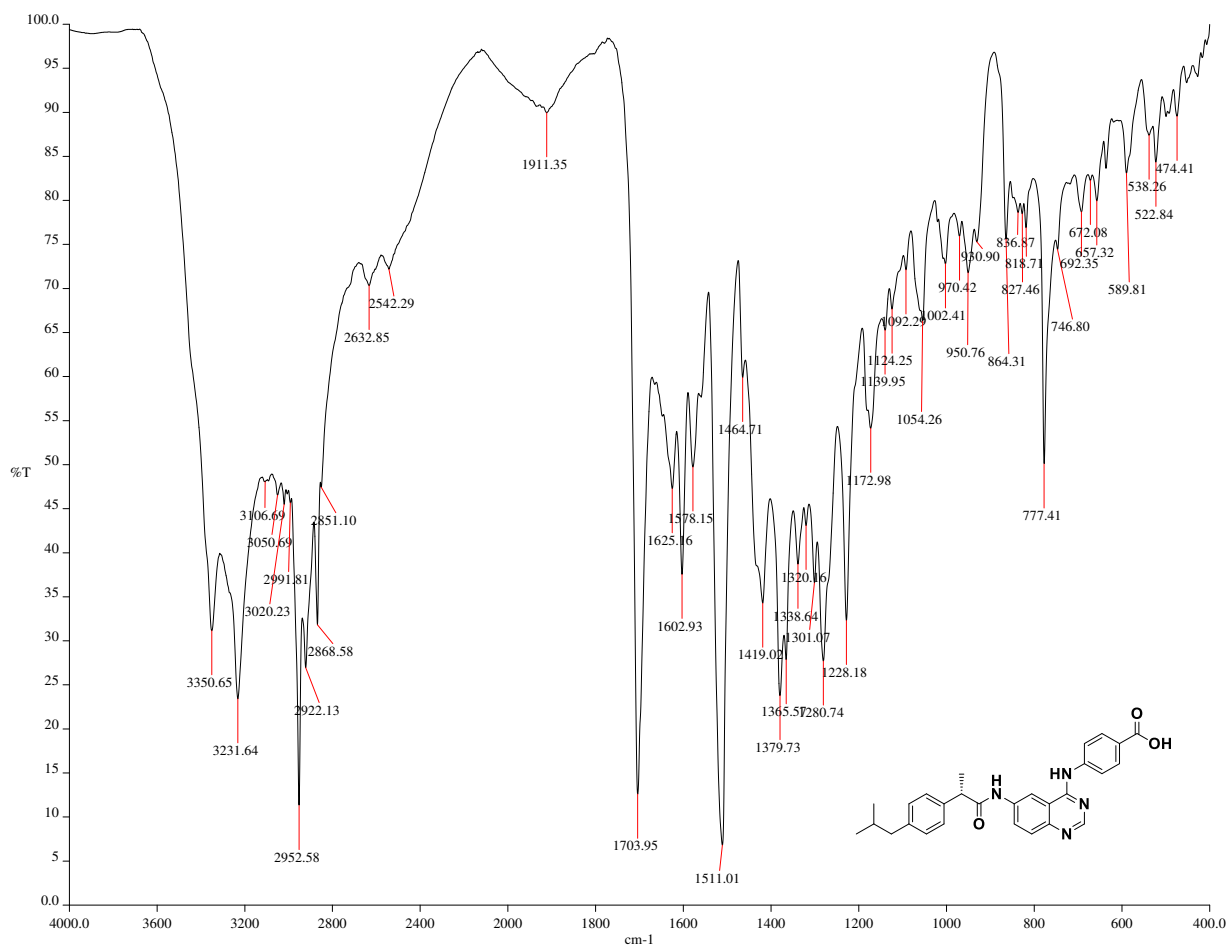


Figura 90. Espectro de IR-ATR de 10.

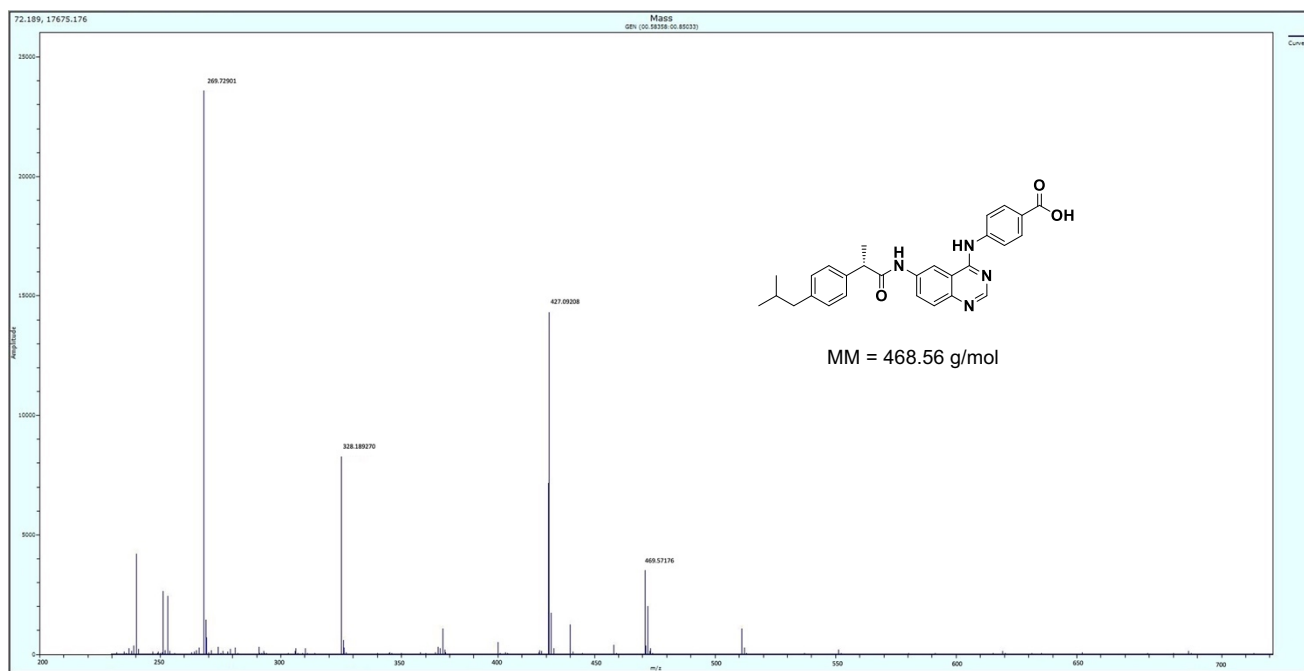


Figura 91. Espectro de EM-APCI de 10.



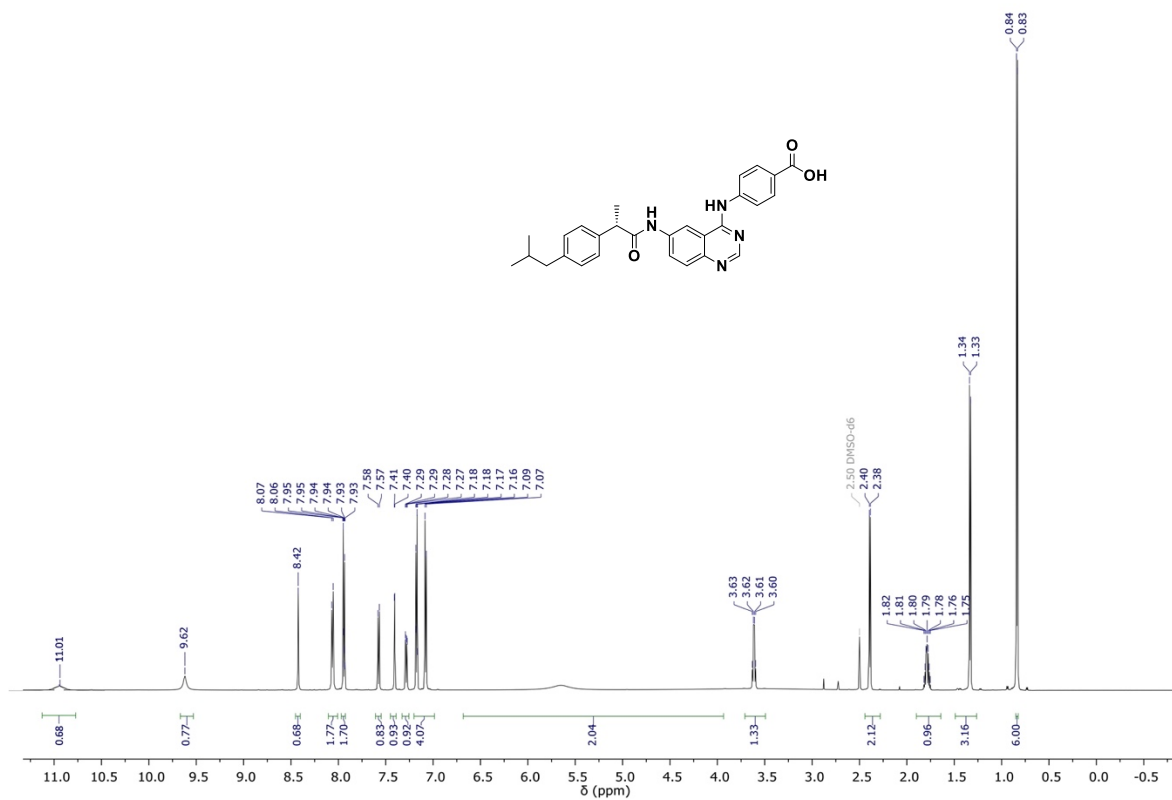


Figura 92. Espectro de RMN-¹H de 10.

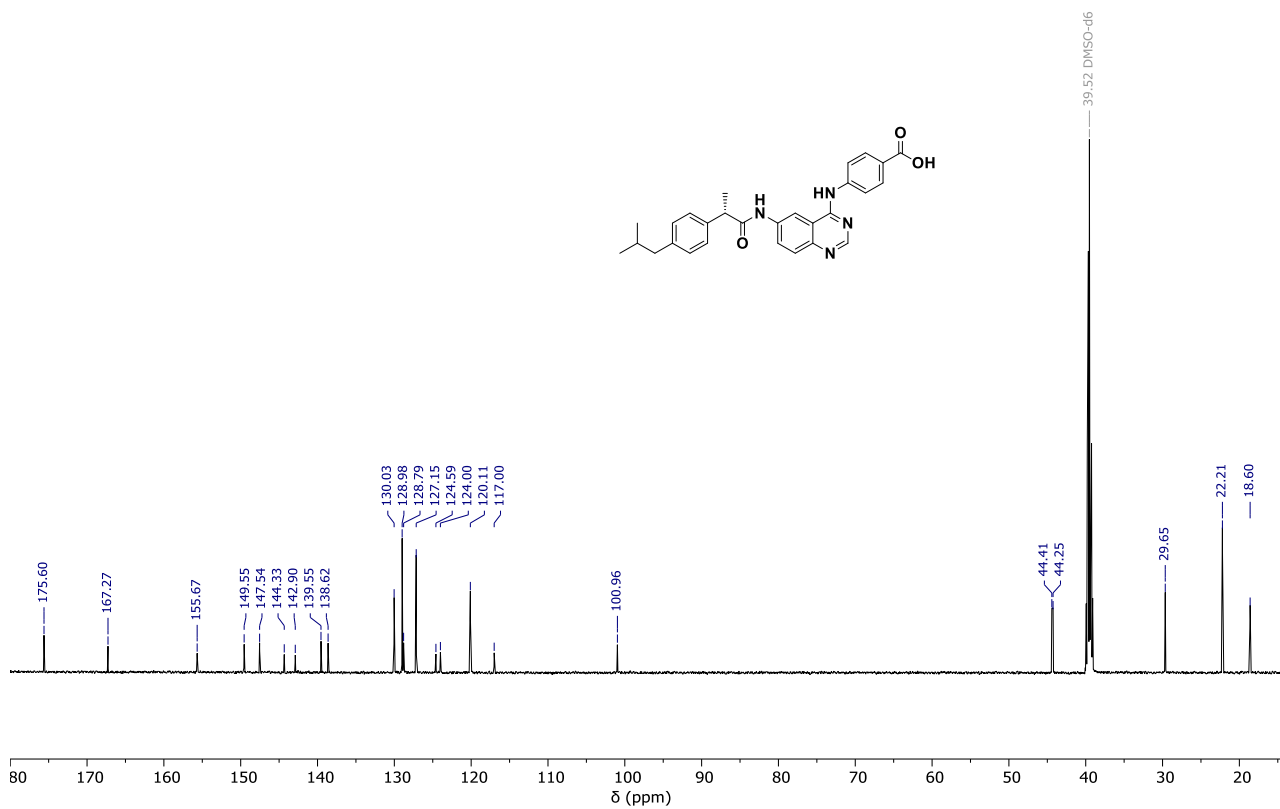


Figura 93. Espectro de RMN-¹³C de 10.



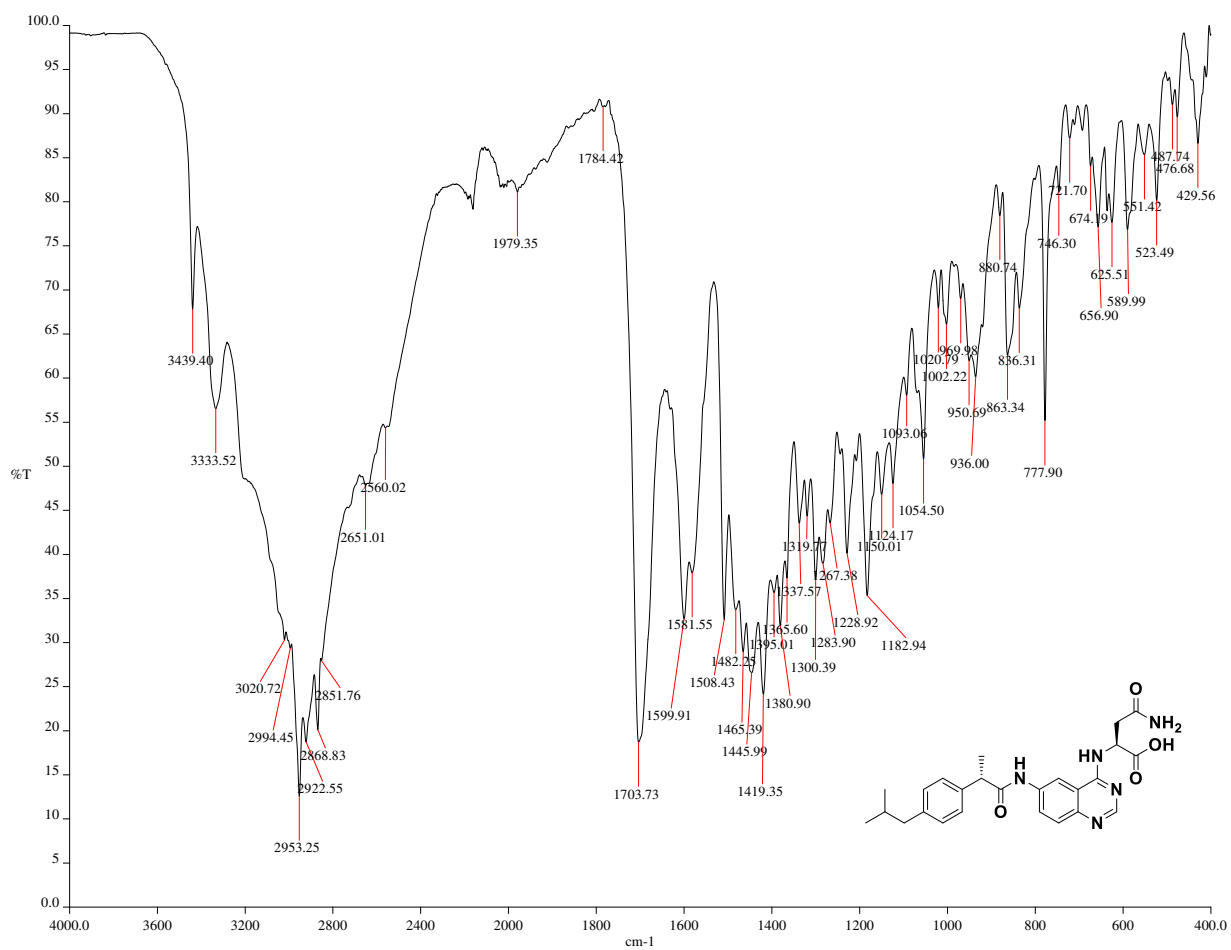


Figura 94. Espectro de IR-ATR de 11.

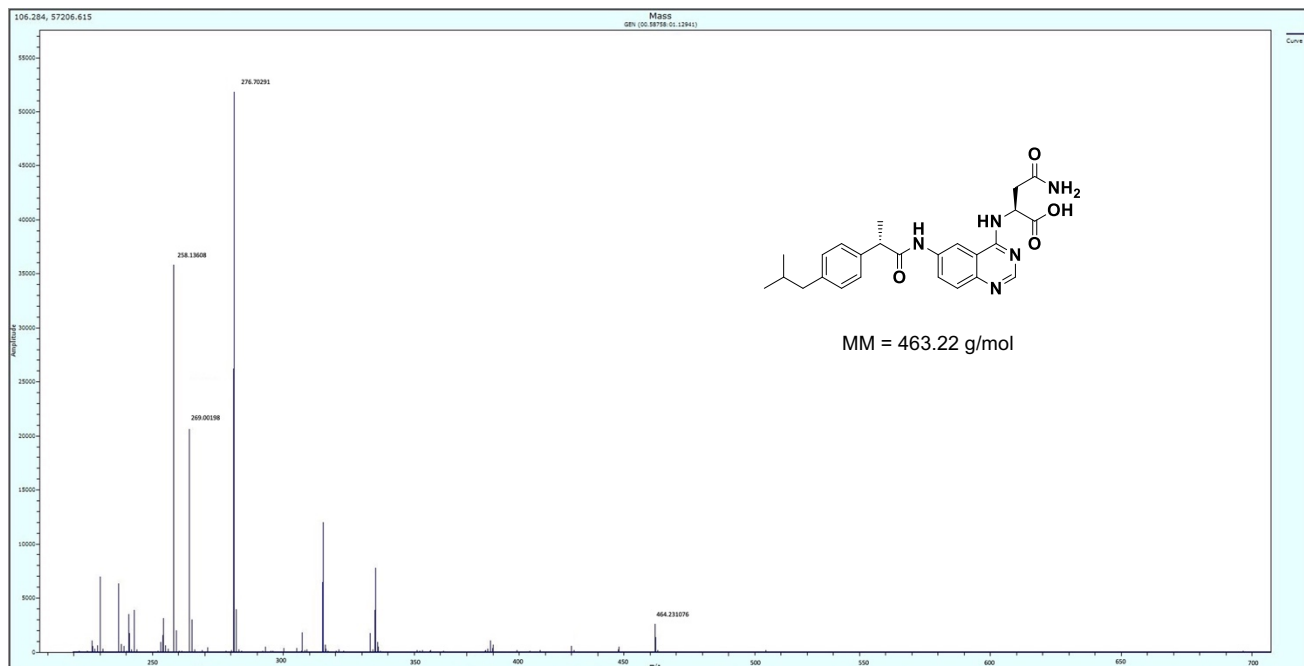


Figura 95. Espectro de EM-APCI de 11.



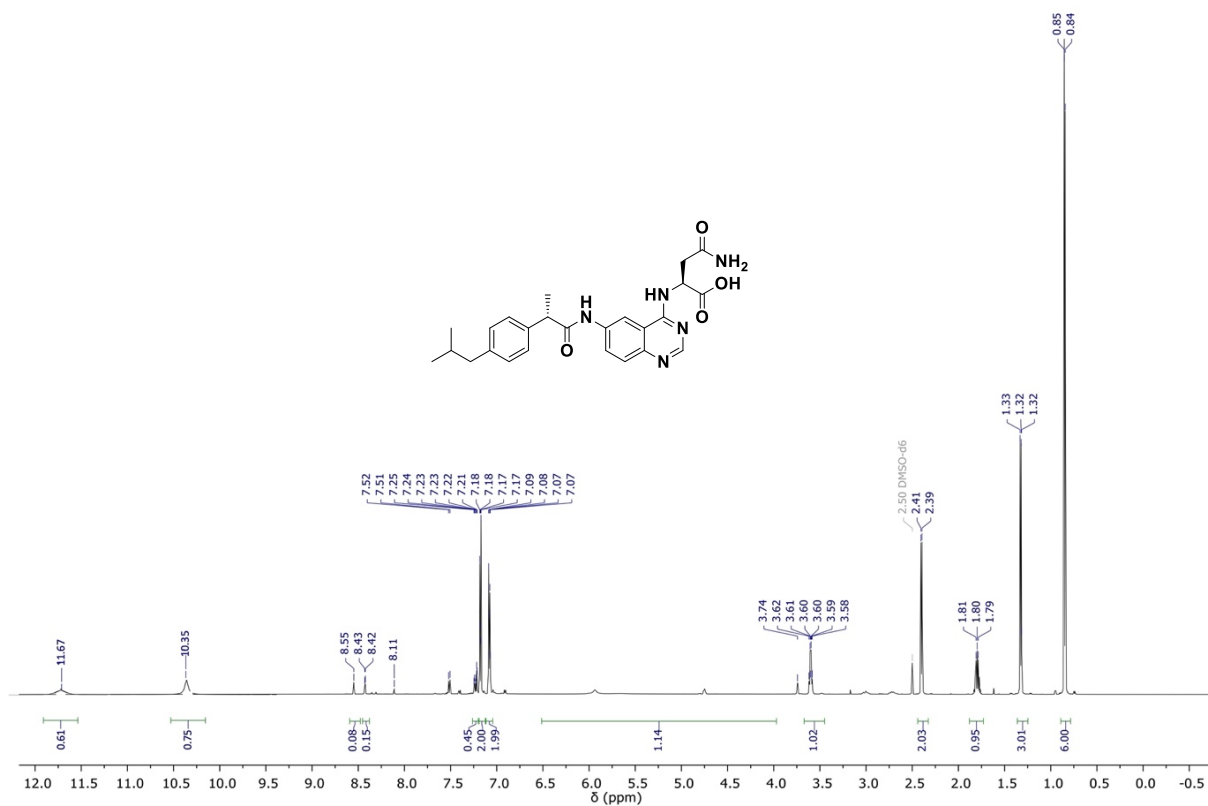


Figura 96. Espectro de RMN-¹H de 11.

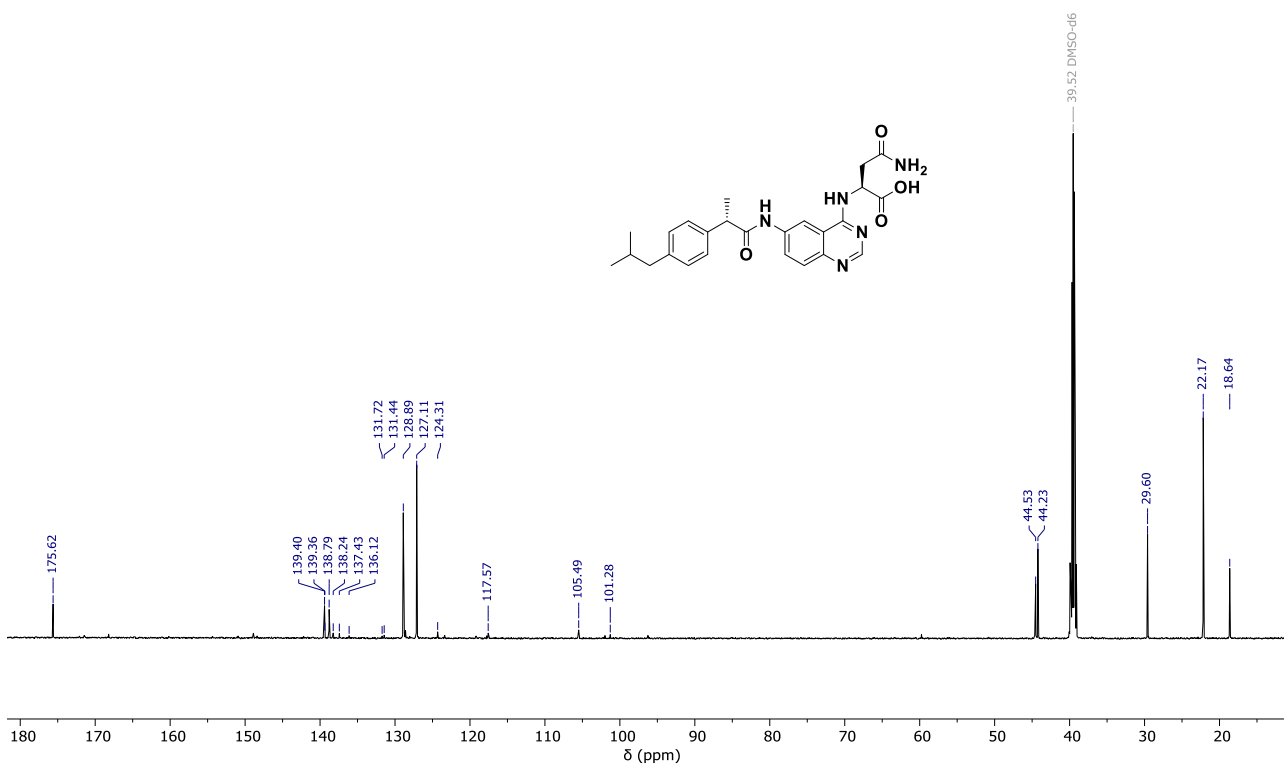


Figura 97. Espectro de RMN-¹³C de 11.

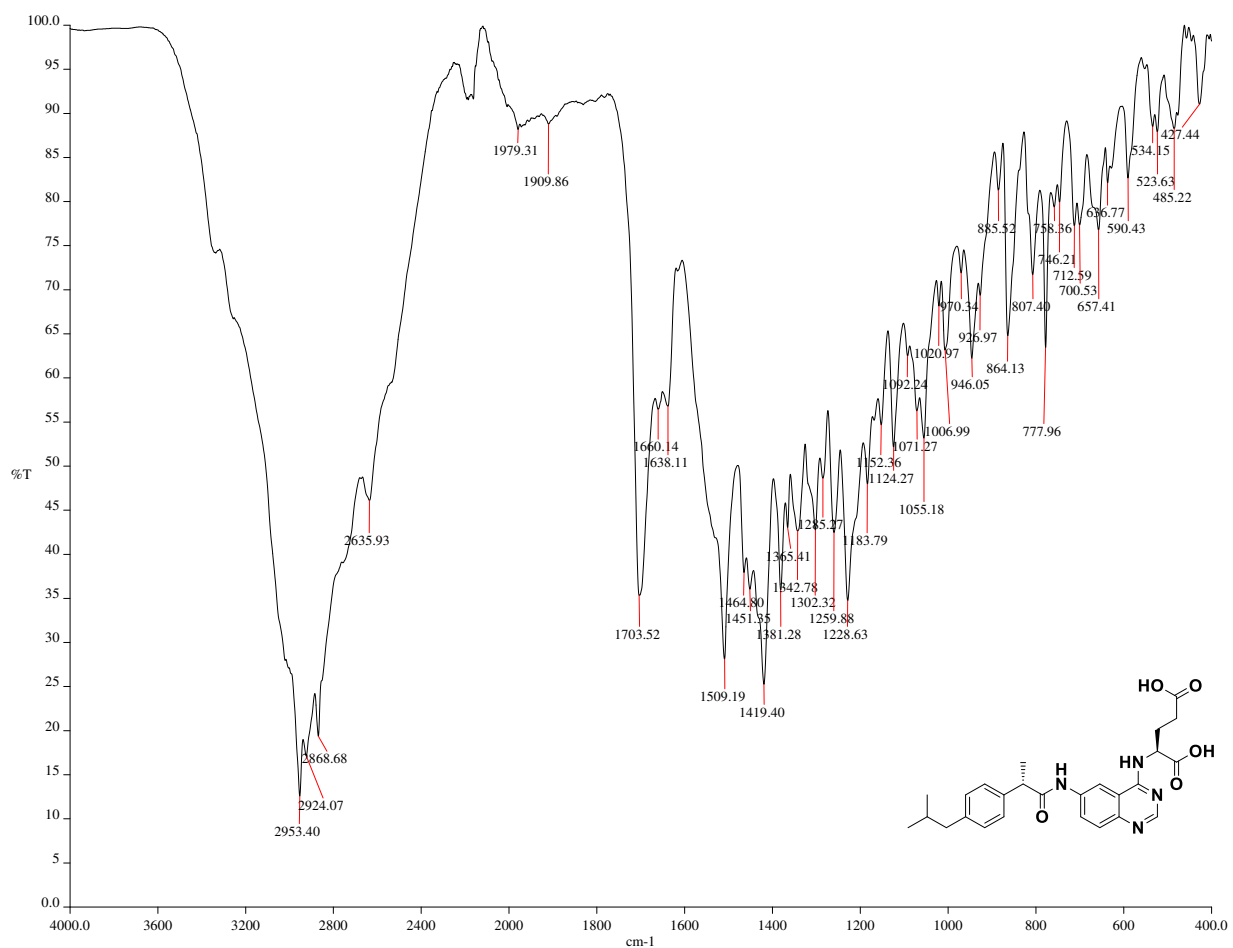


Figura 98. Espectro de IR-ATR de 12.



Figura 99. Espectro de EM-APCI de 12.



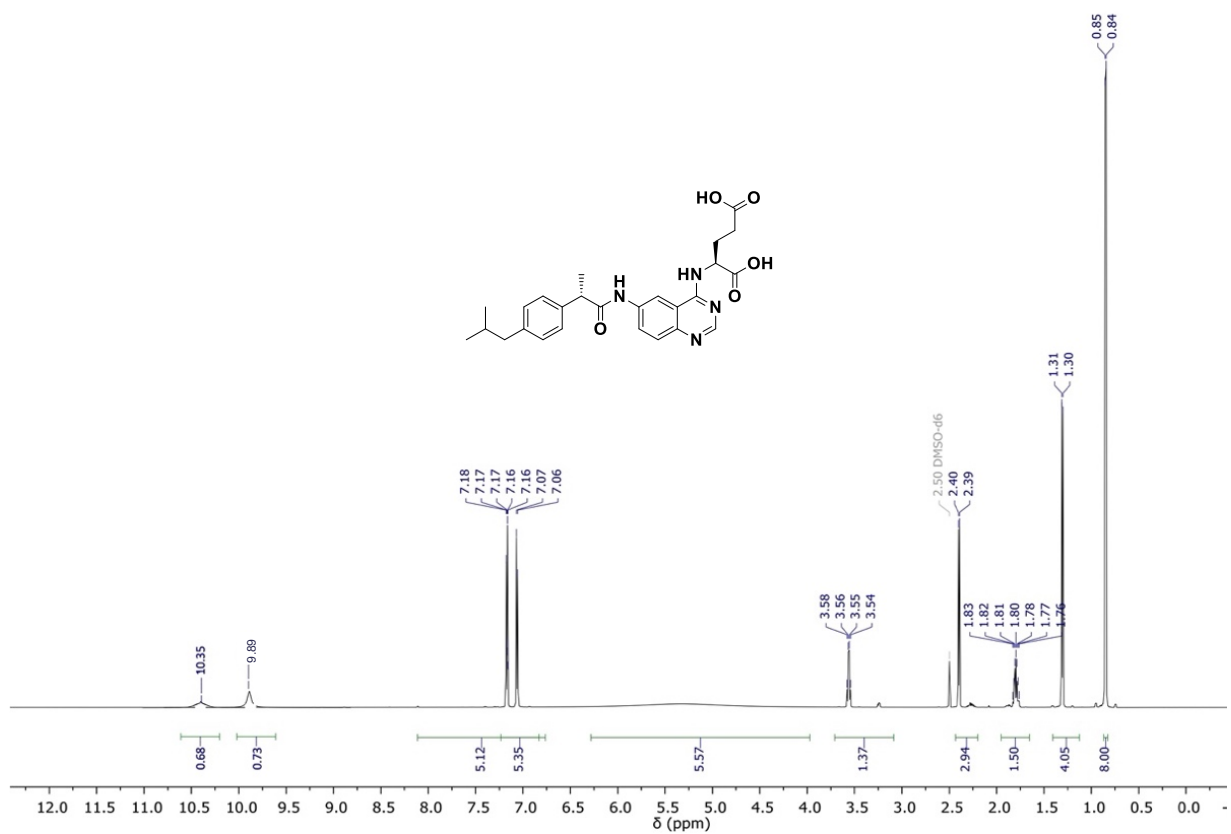


Figura 100. Espectro de RMN-¹H de 12.

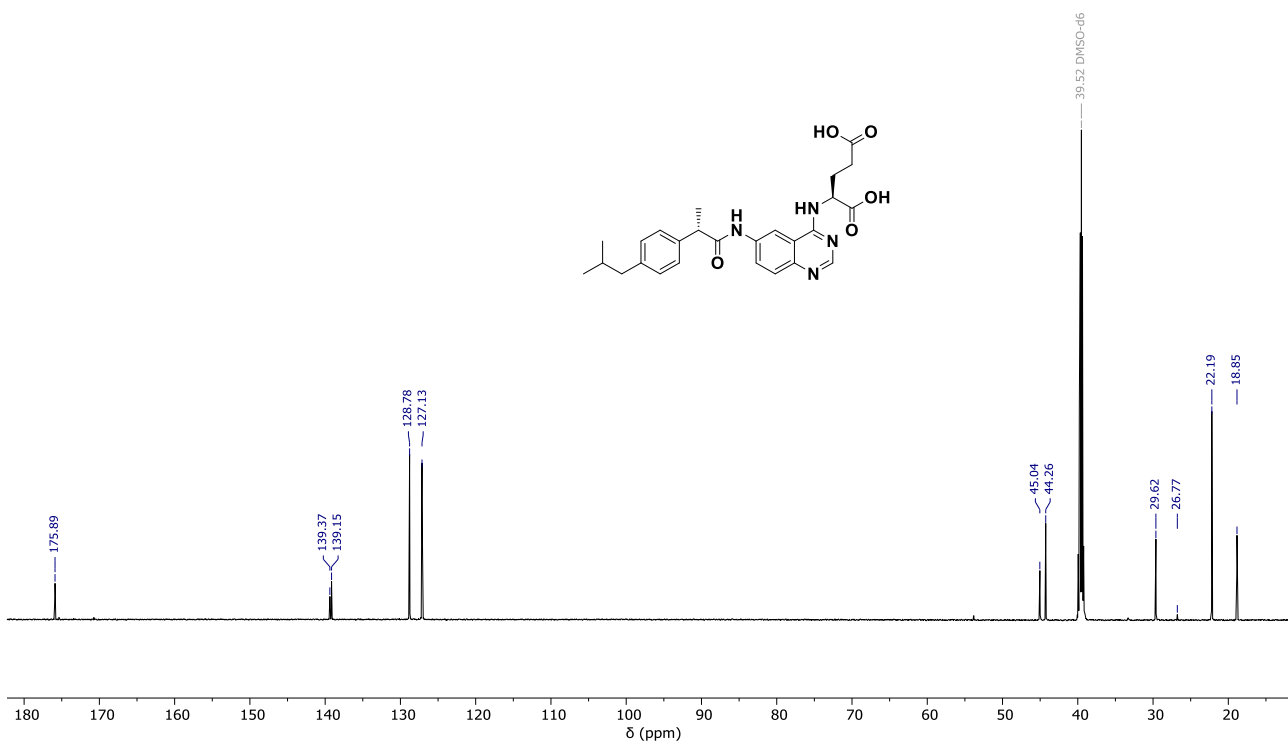


Figura 101. Espectro de RMN-¹³C de 12.



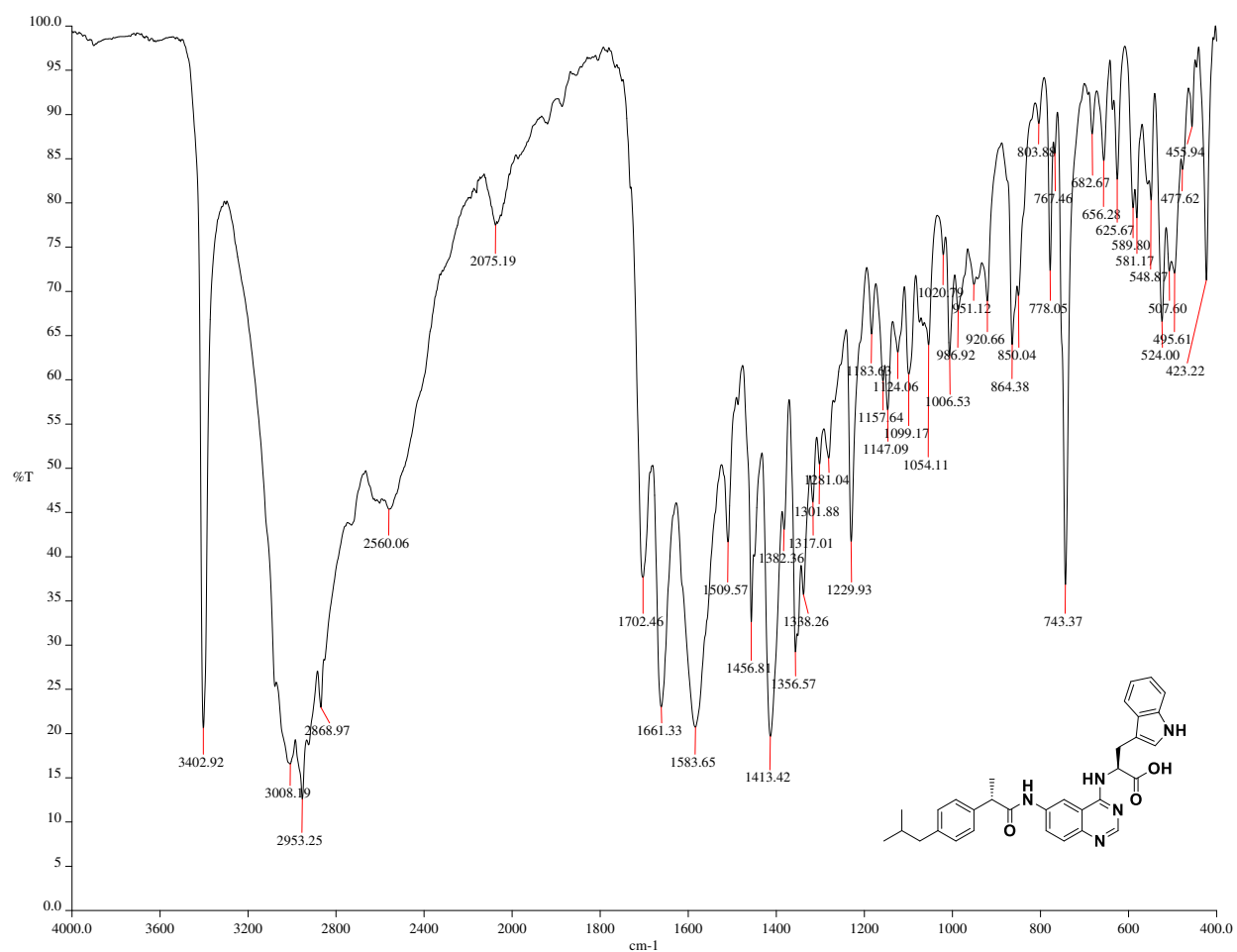


Figura 102. Espectro de IR-ATR de 13.

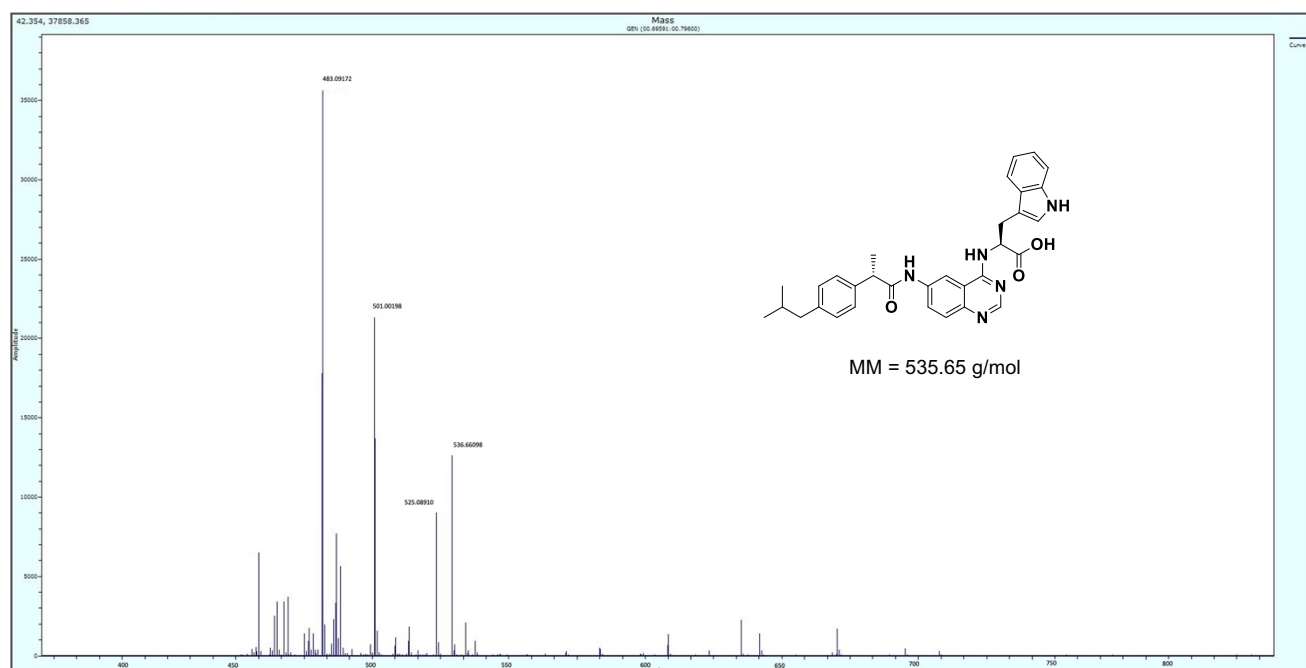


Figura 103. Espectro de EM-APCI de 13.



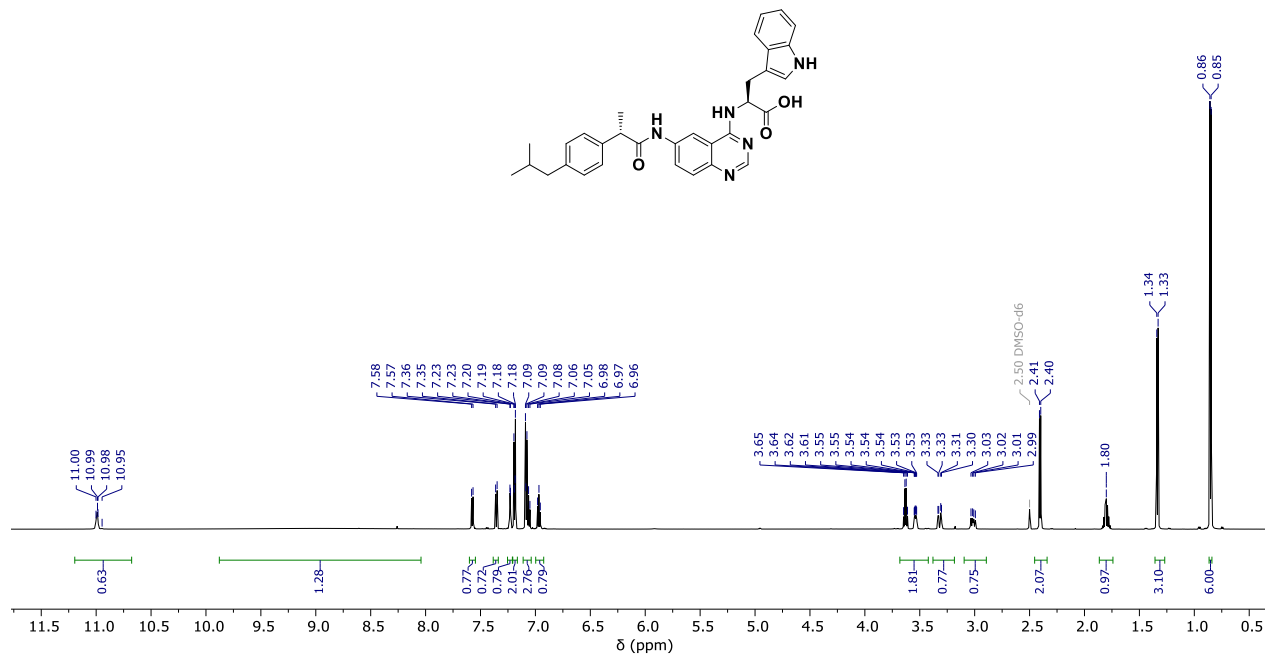


Figura 104. Espectro de RMN-¹H de 13.

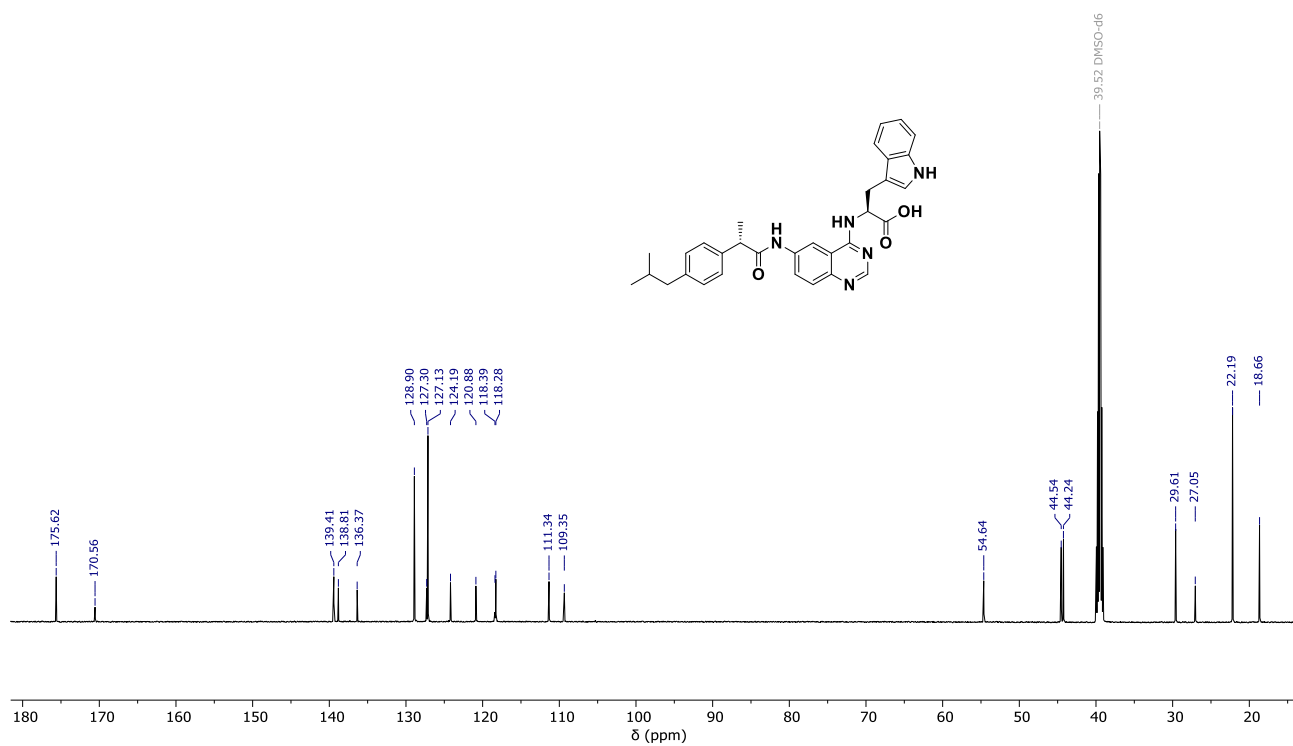


Figura 105. Espectro de RMN-¹³C de 13.



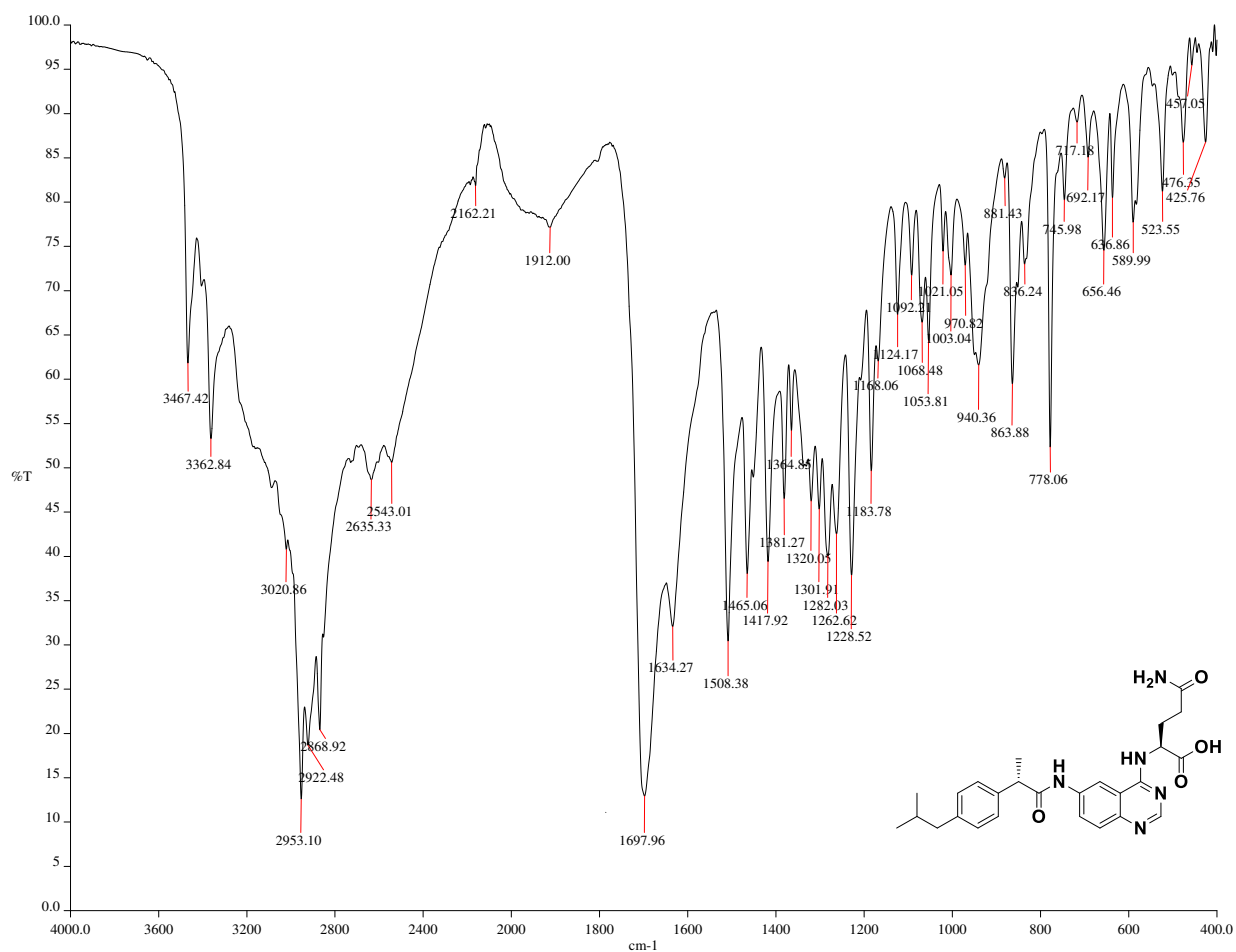


Figura 106. Espectro de IR-ATR de 14.

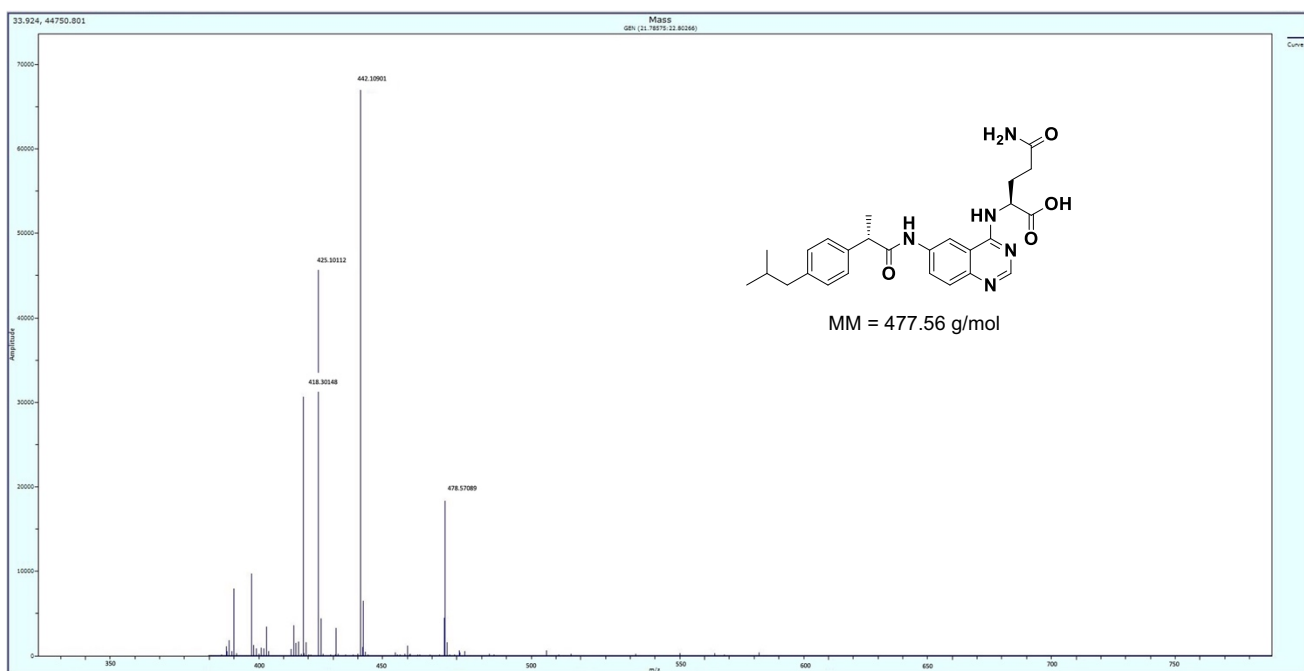


Figura 107. Espectro de EM-APCI de 14.



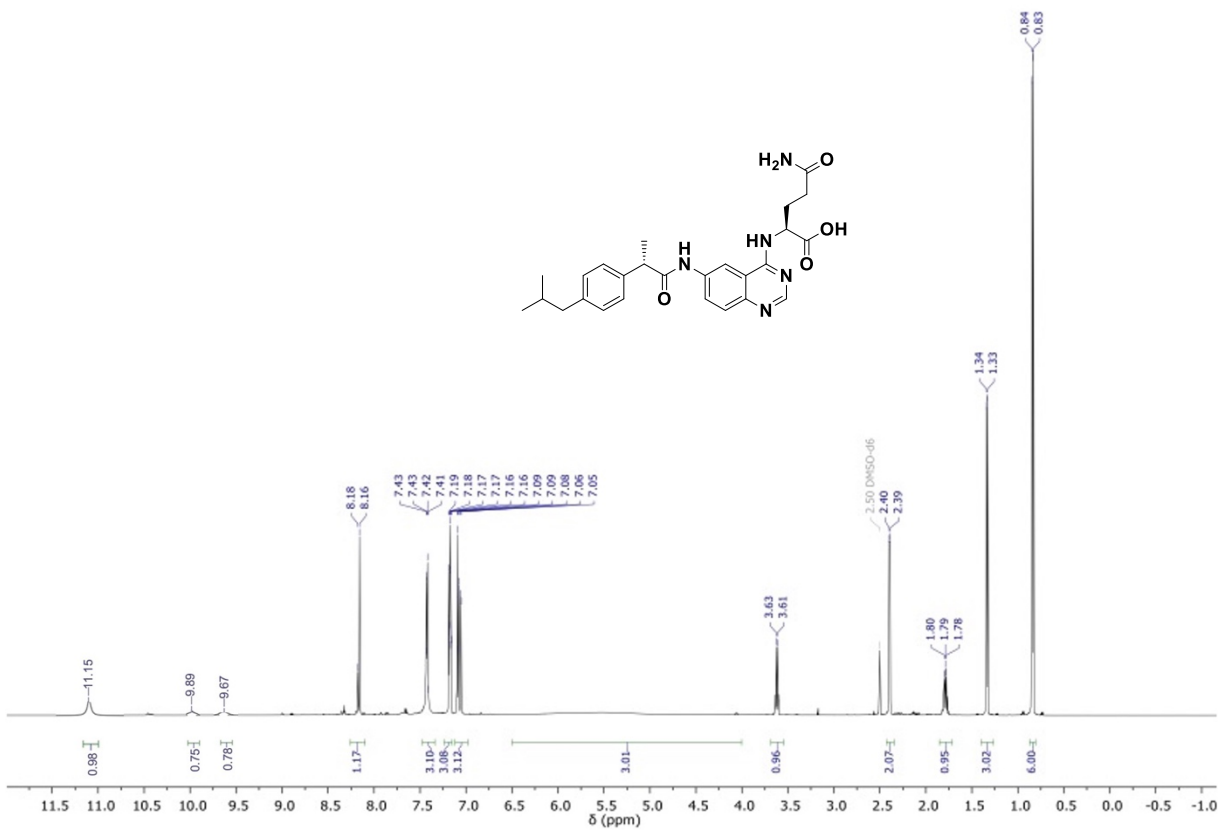


Figura 108. Espectro de RMN-¹H de 14.

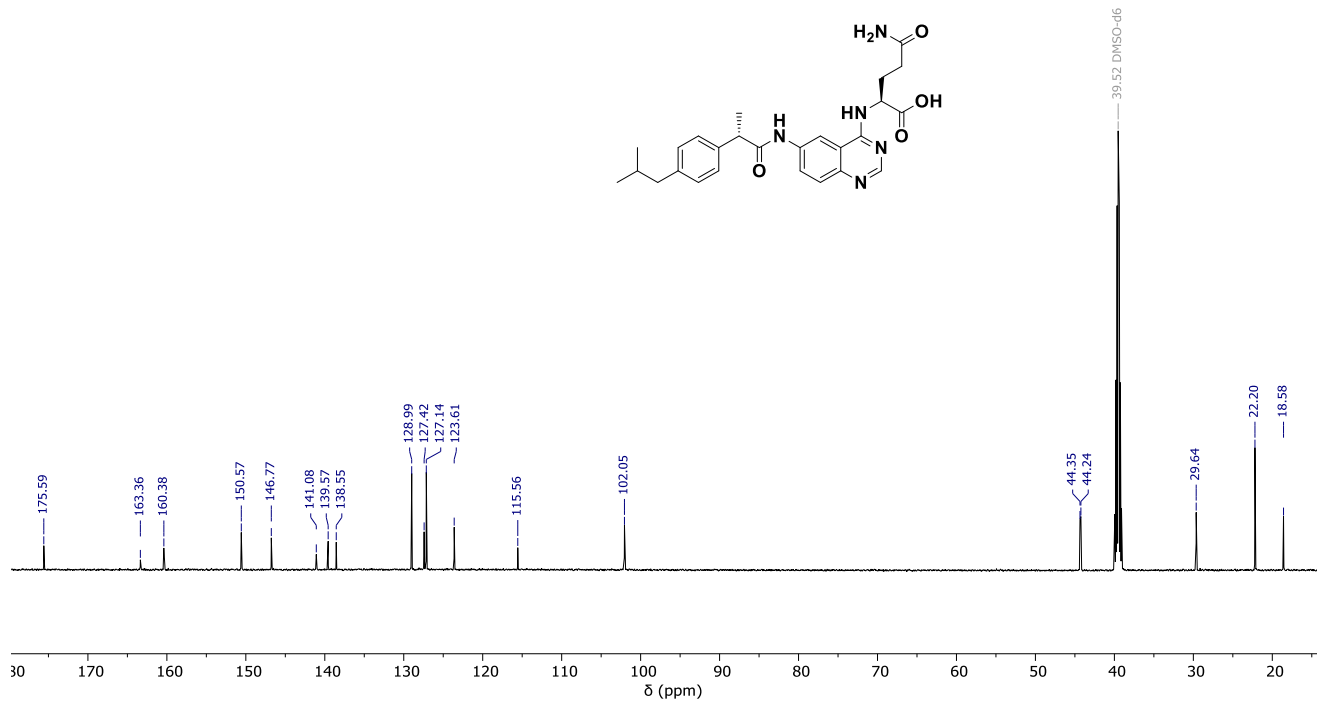


Figura 109. Espectro de RMN-¹³C de 14.



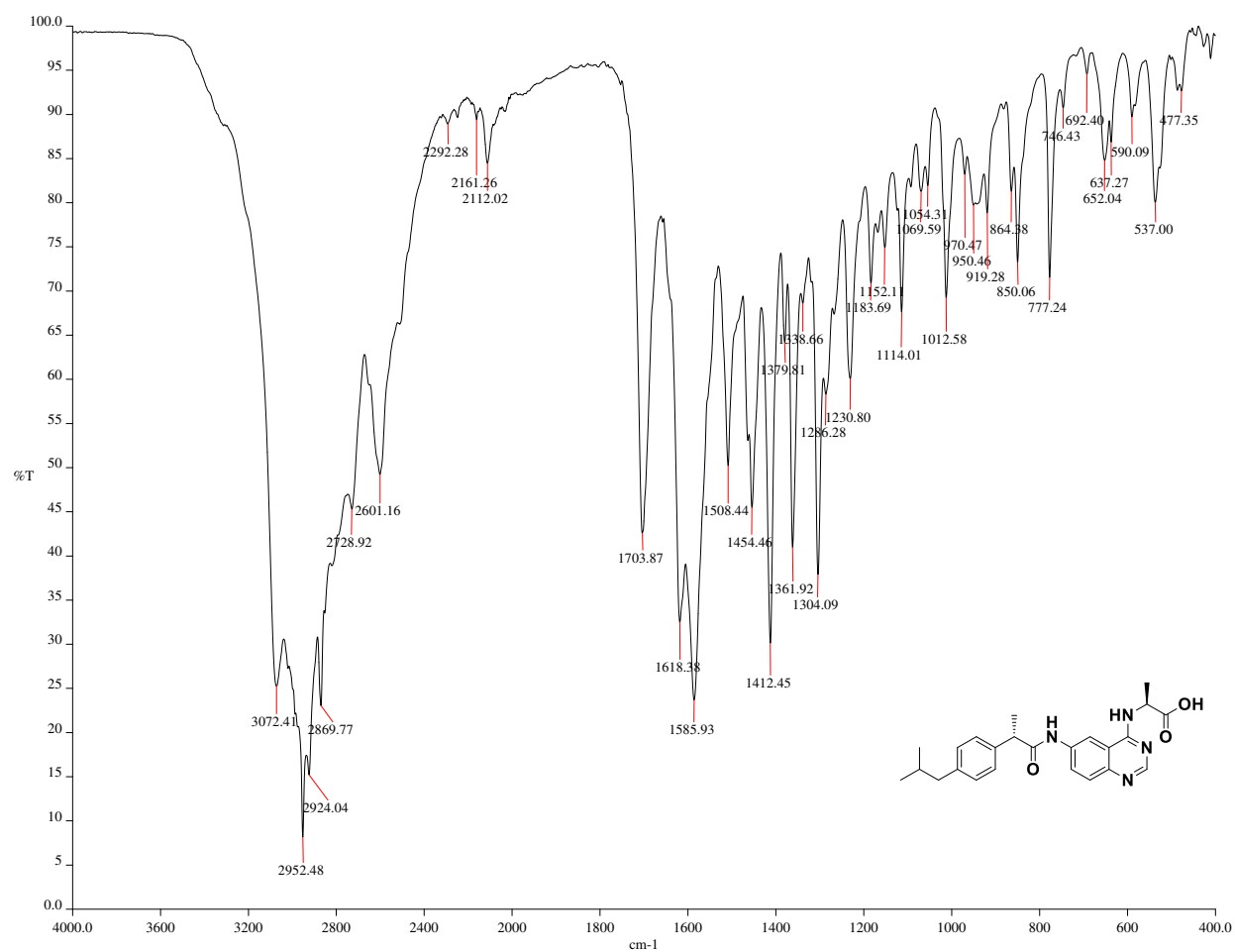


Figura 110. Espectro de IR-ATR de 15.

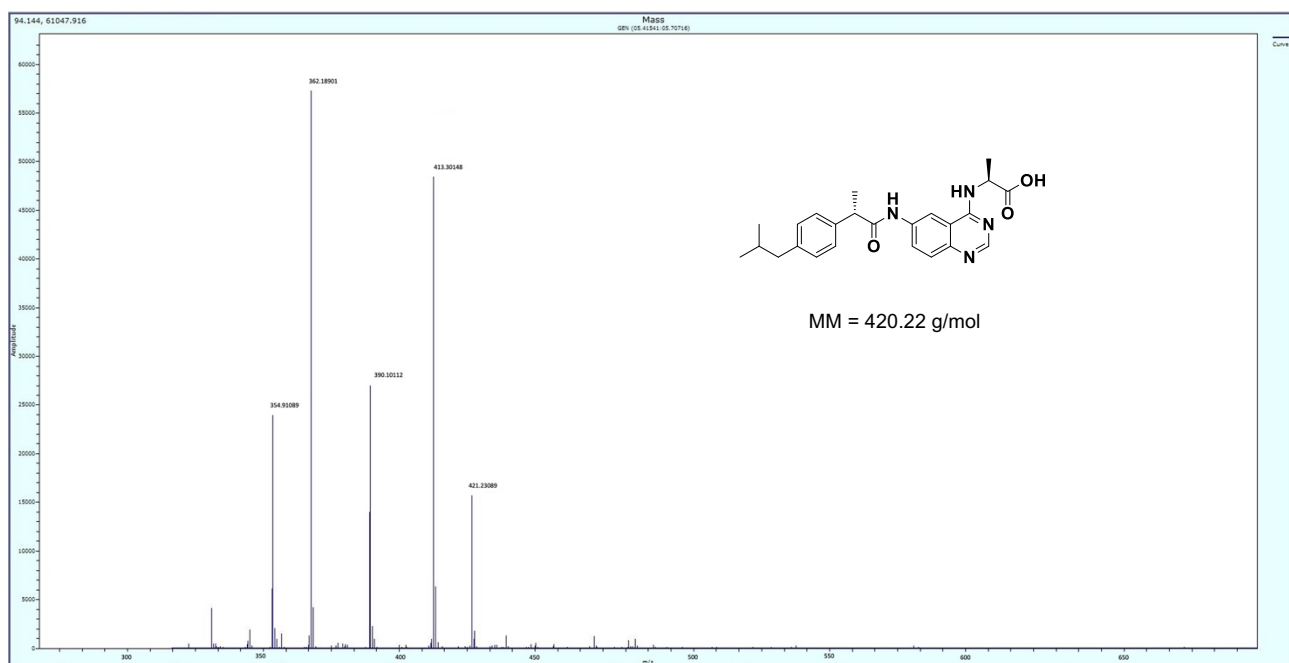


Figura 111. Espectro de EM-APCI de 15.



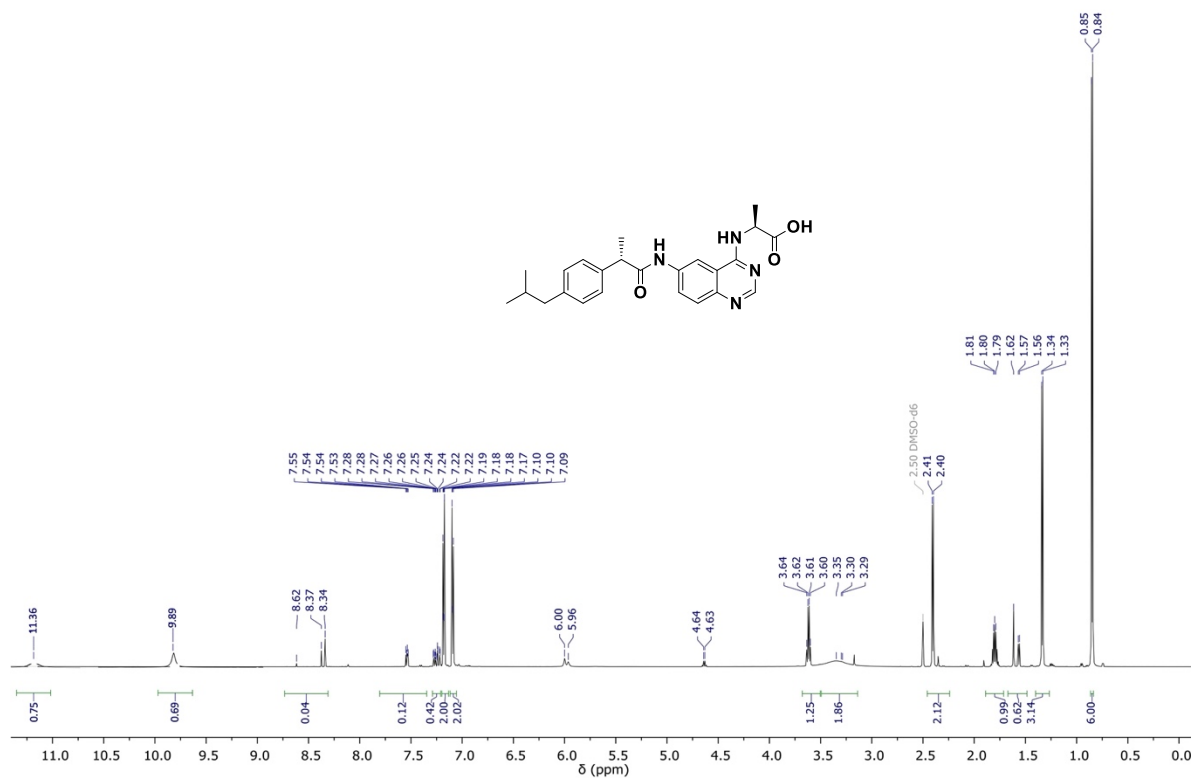


Figura 112. Espectro de RMN-¹H de 15.

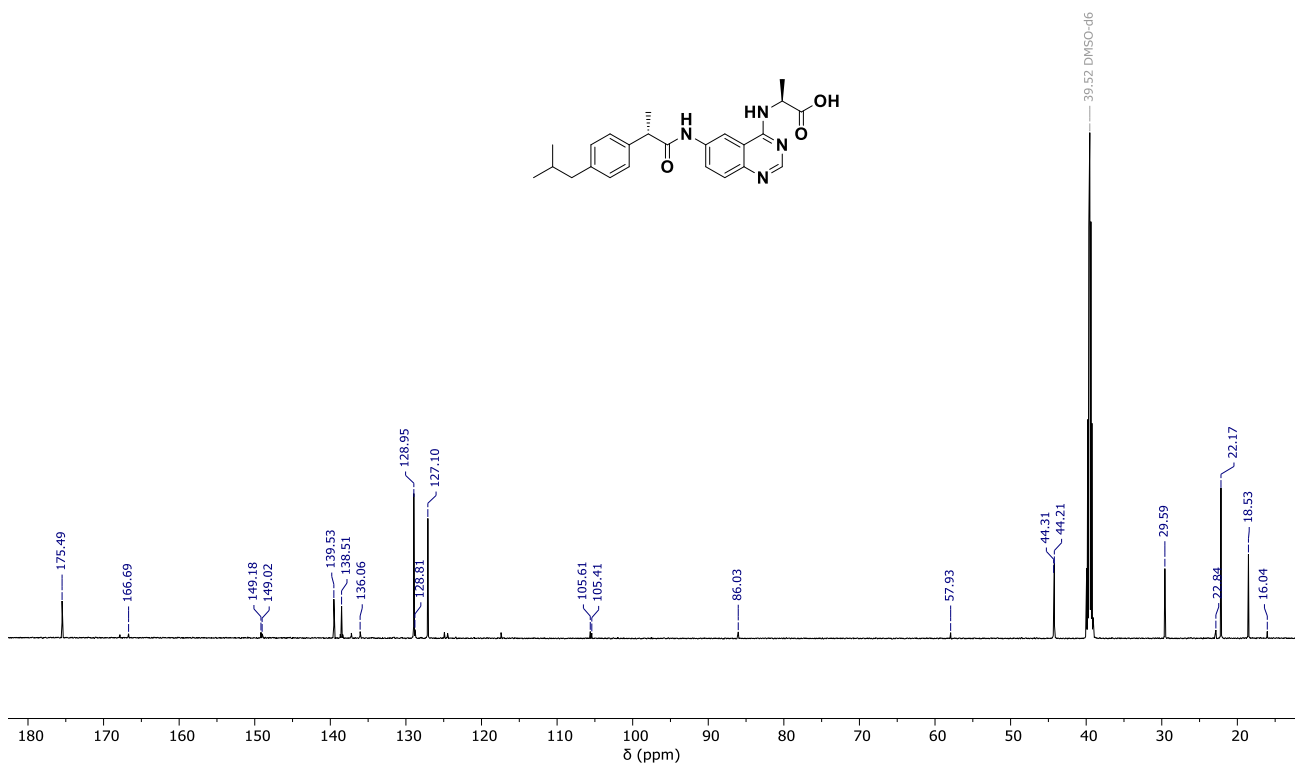


Figura 113. Espectro de RMN-¹³C de 15.



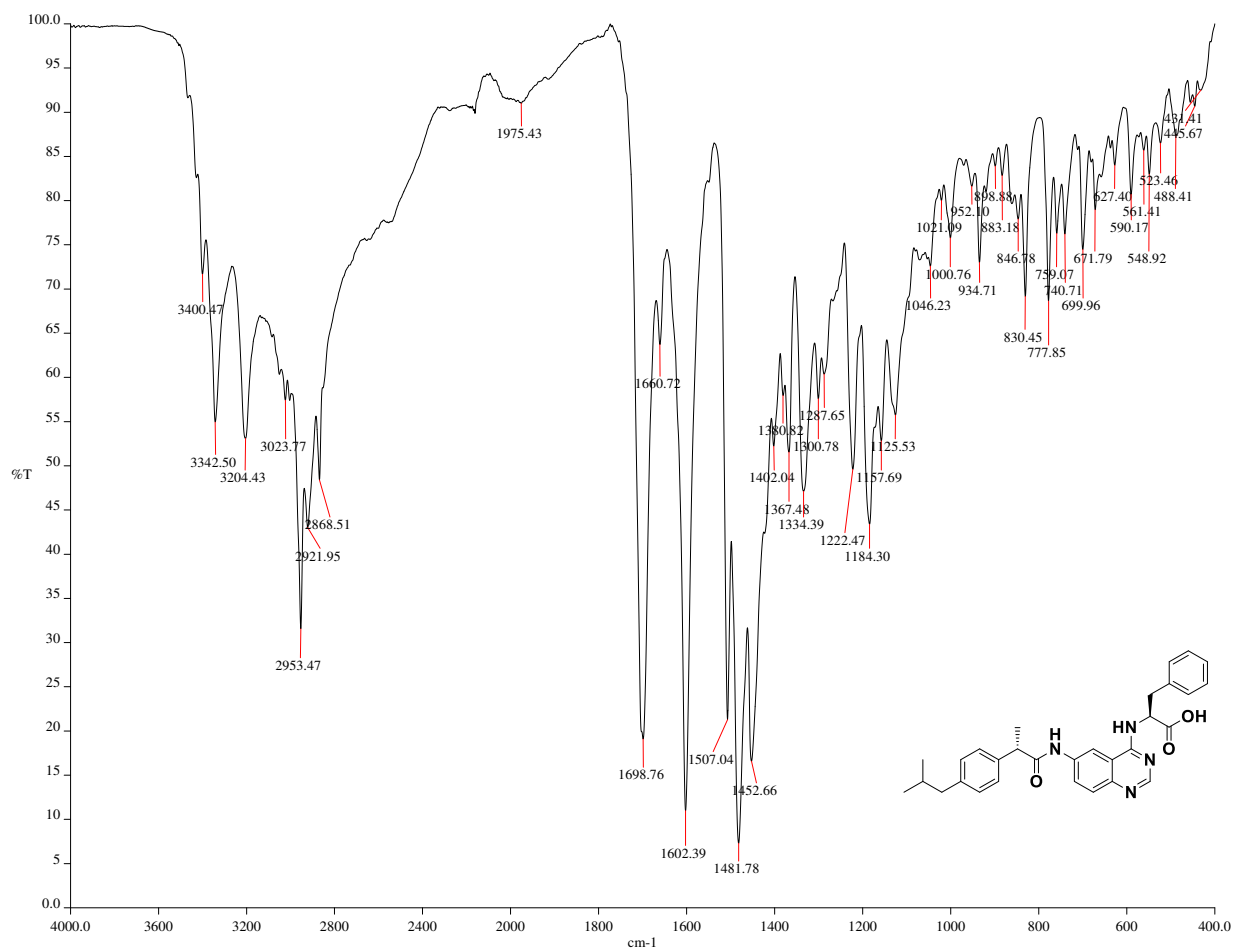


Figura 114. Espectro de IR-ATR de 16.

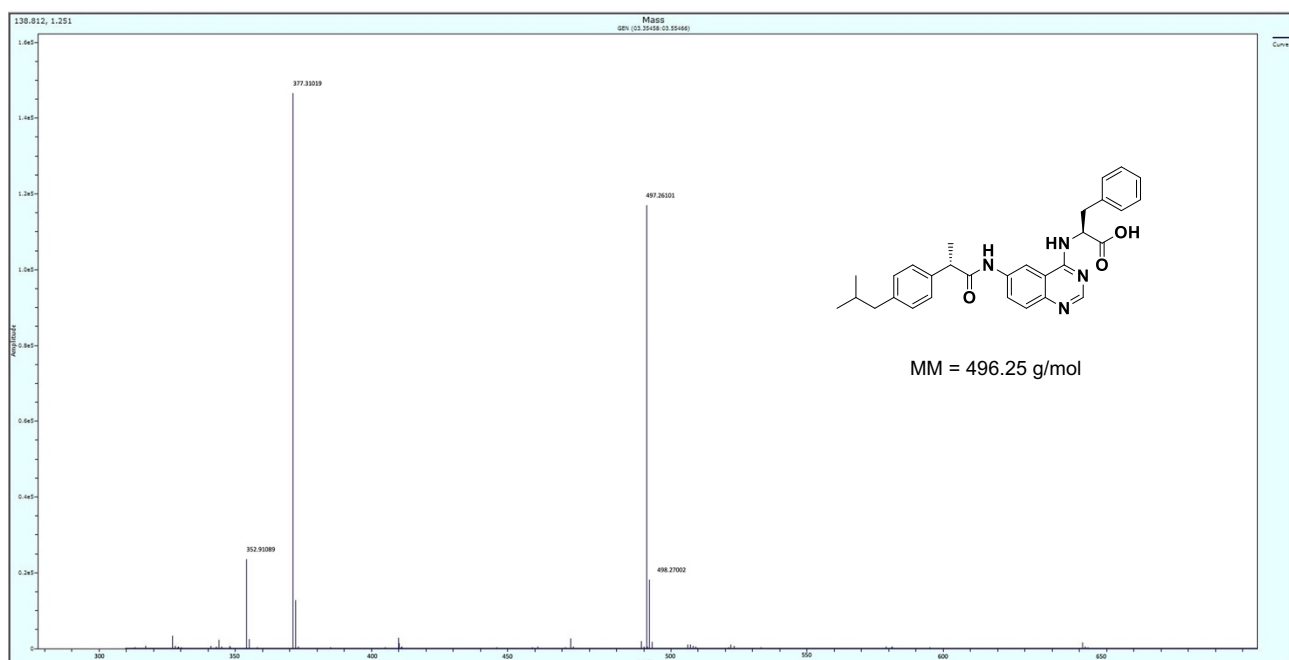


Figura 115. Espectro de EM-APCI de 16.



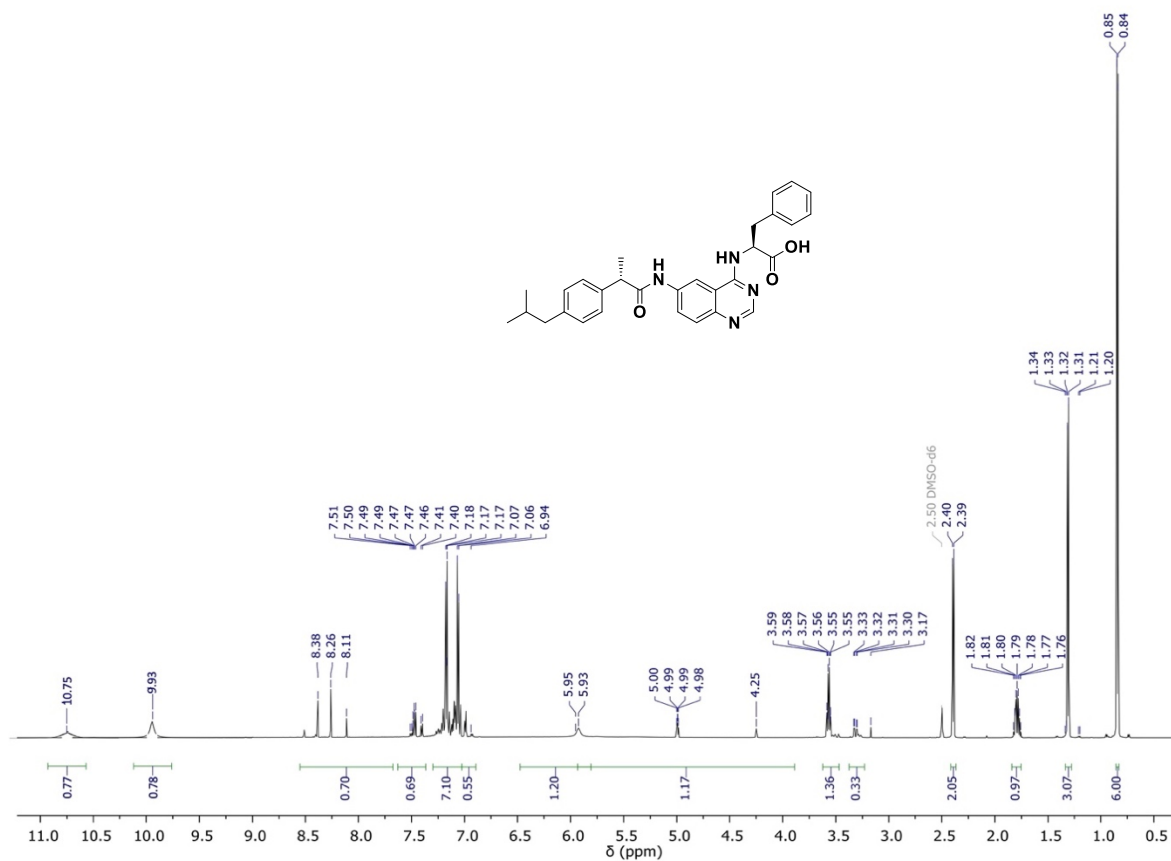


Figura 116. Espectro de RMN- ^1H de 16.

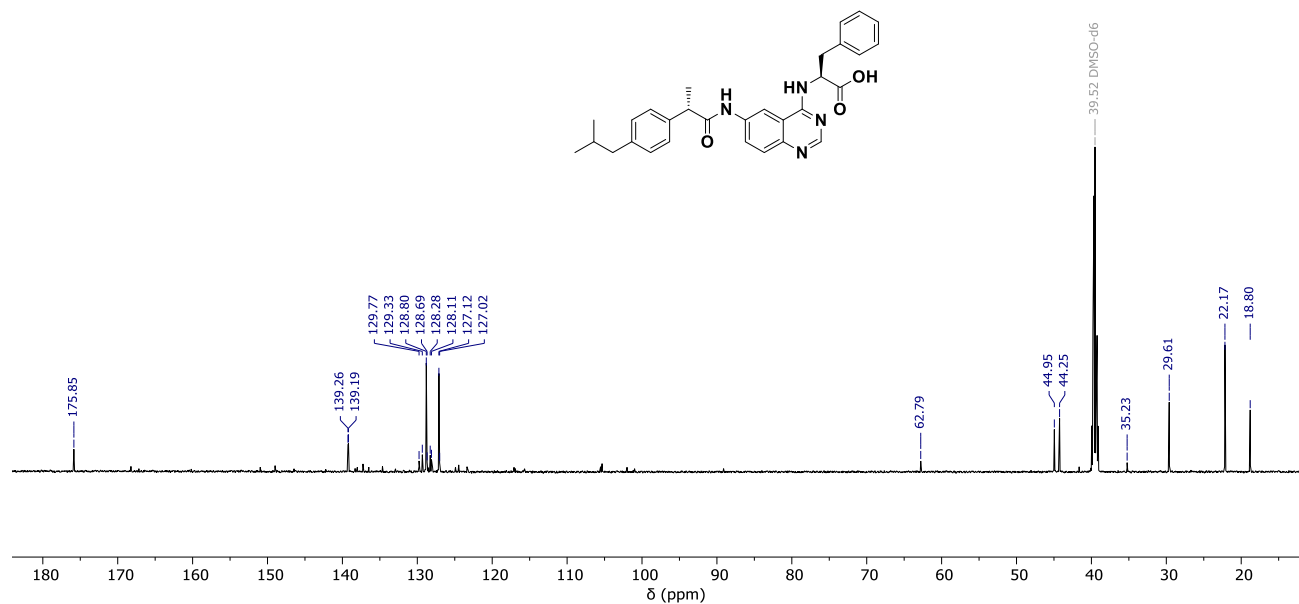


Figura 117. Espectro de RMN- ^{13}C de 16.



Anexo II: Acoplamiento molecular



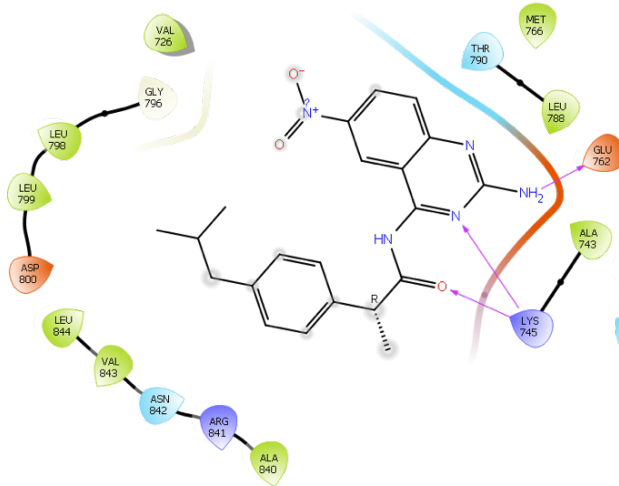


Figura 118. Visualización 2D de 1 en EGFR.

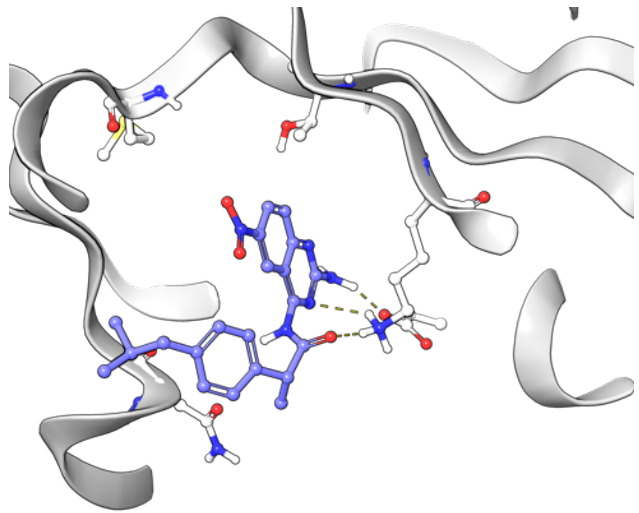


Figura 119. Visualización 3D de 1 en EGFR.

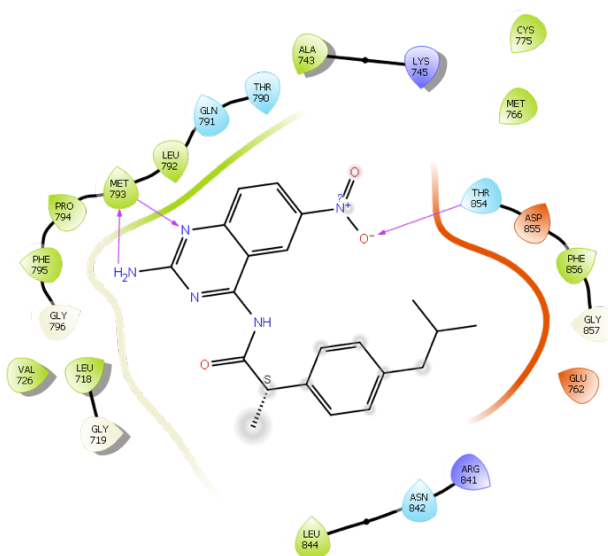


Figura 120. Visualización 2D de 2 en EGFR.

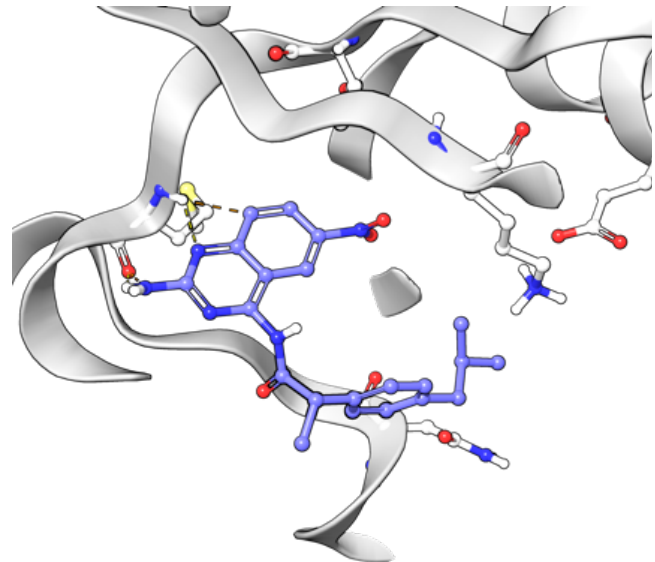


Figura 121. Visualización 3D de 2 en EGFR.

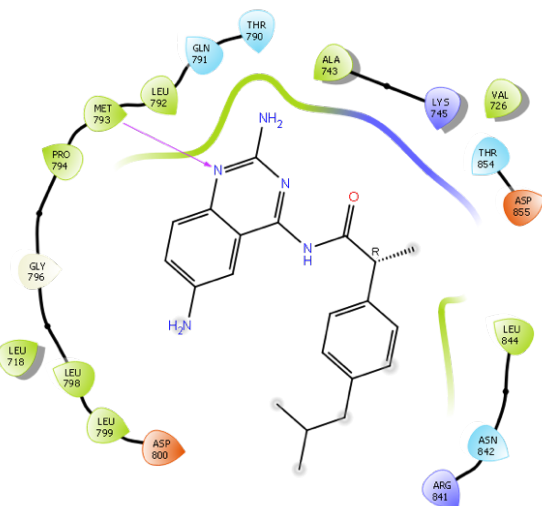


Figura 122. Visualización 2D de 3 en EGFR.

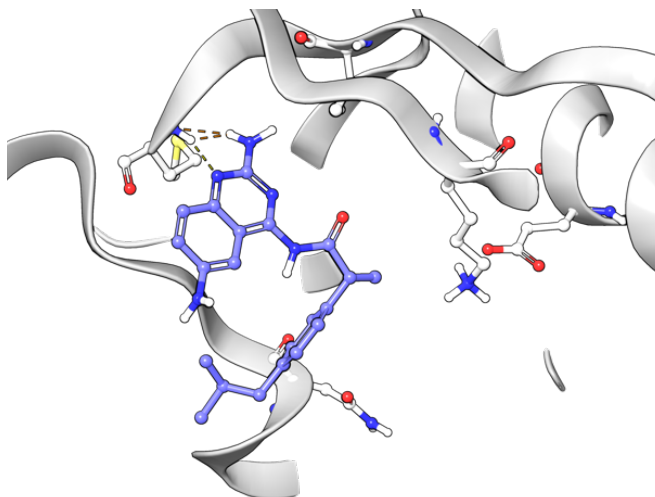


Figura 123. Visualización 3D del 3 en EGFR.

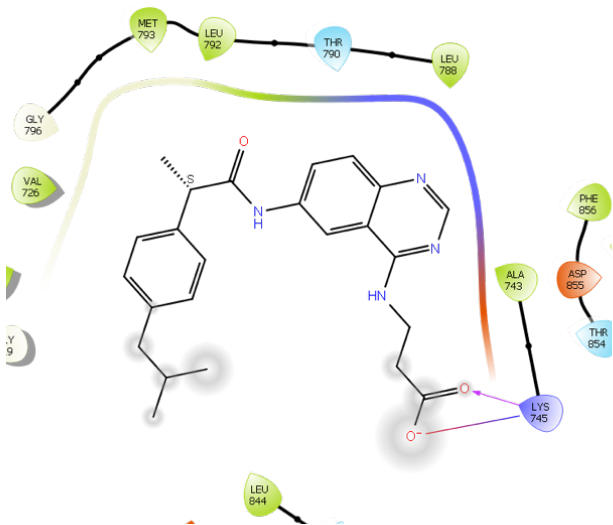


Figura 130. Visualización 2D de 7 en EGFR.

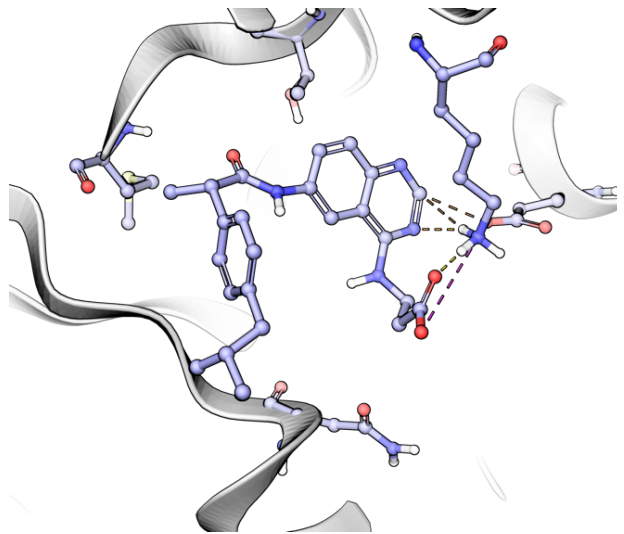


Figura 131. Visualización 3D de 7 en EGFR.

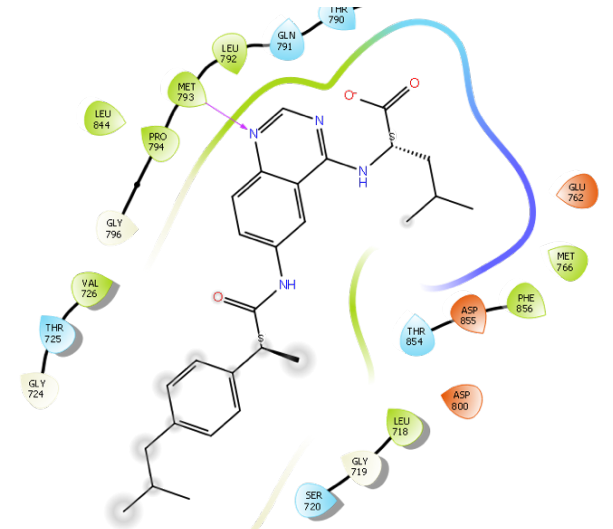


Figura 132. Visualización 2D de 8 en EGFR.

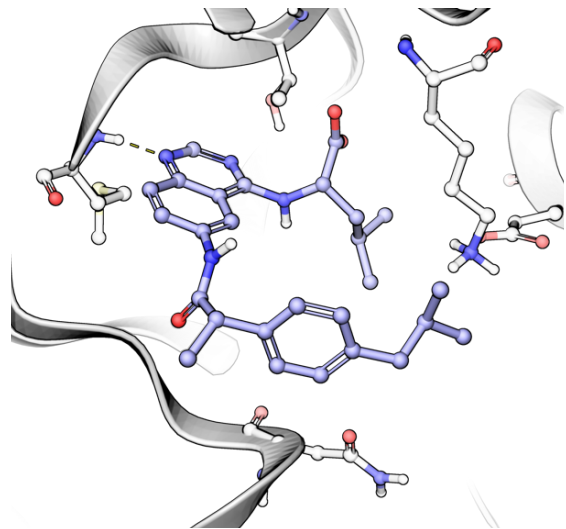


Figura 133. Visualización 3D de 8 en EGFR.

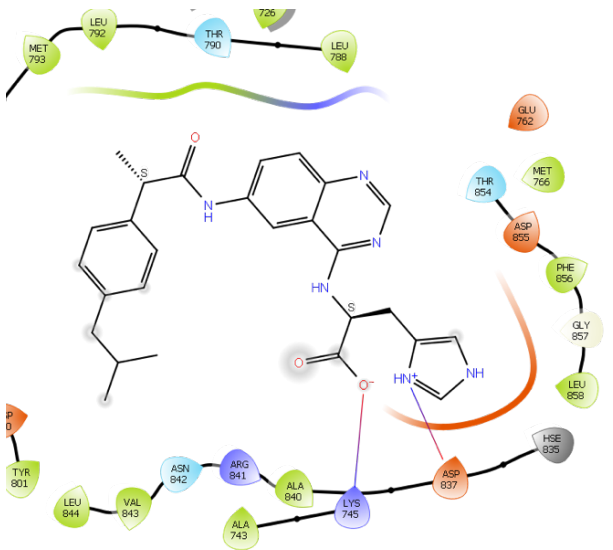


Figura 134. Visualización 2D de 9 en EGFR.

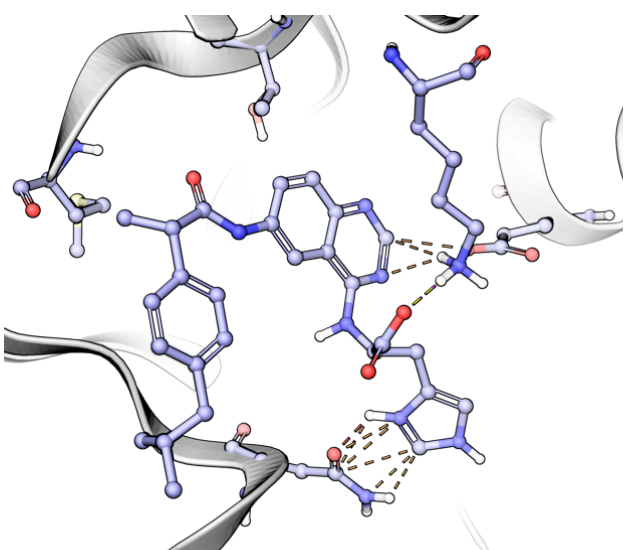


Figura 135. Visualización 3D de 9 en EGFR.

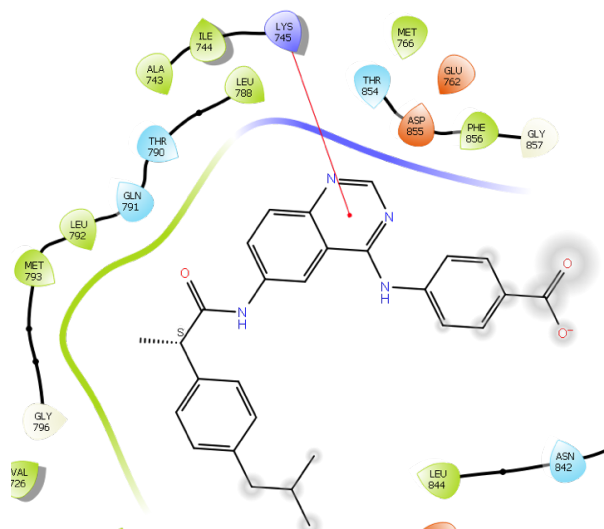


Figura 136. Visualización 2D de 10 en EGFR.

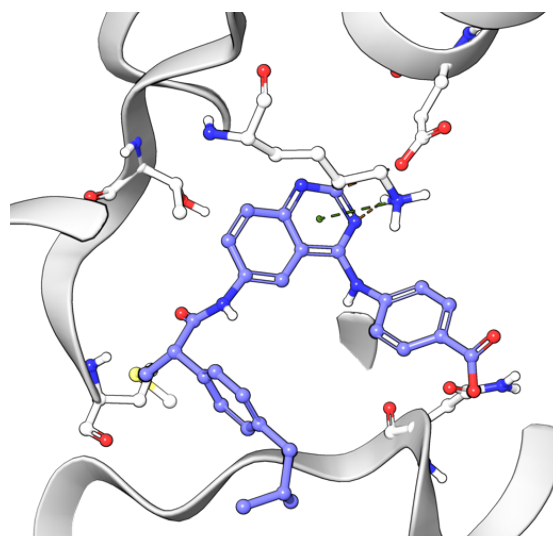


Figura 137. Visualización 3D de 10 en EGFR.

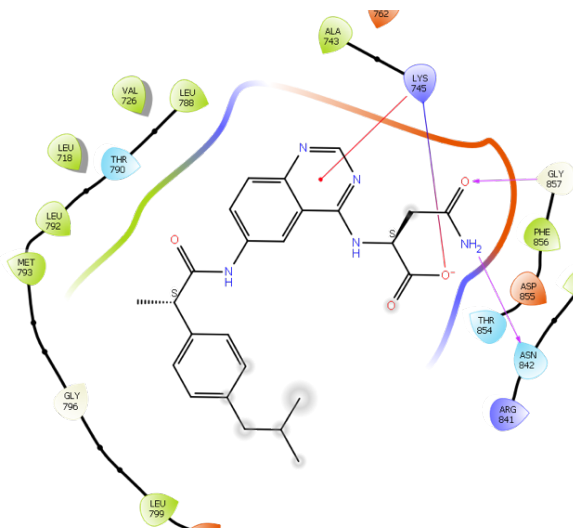


Figura 138. Visualización 2D de 11 en EGFR.

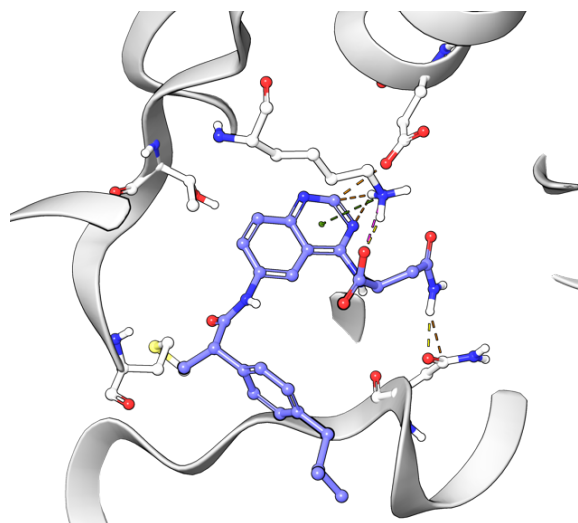


Figura 139. Visualización 3D de 11 en EGFR.

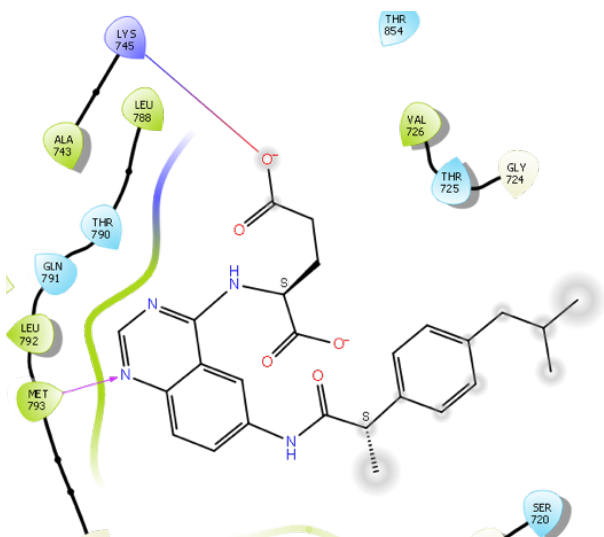


Figura 140. Visualización 2D de 12 en EGFR.

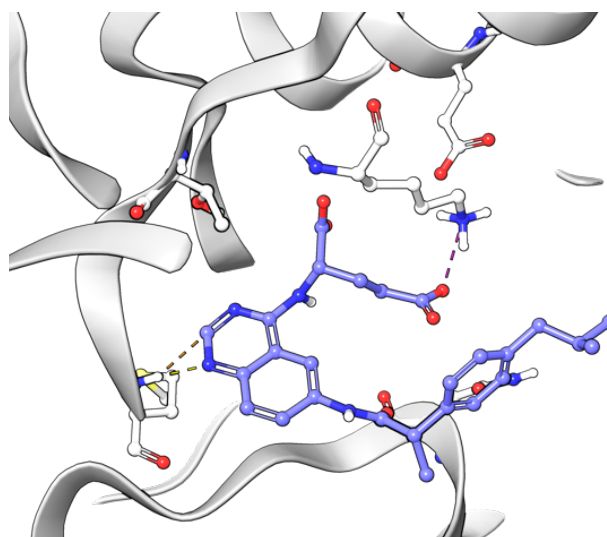


Figura 141. Visualización 3D de 12 en EGFR.

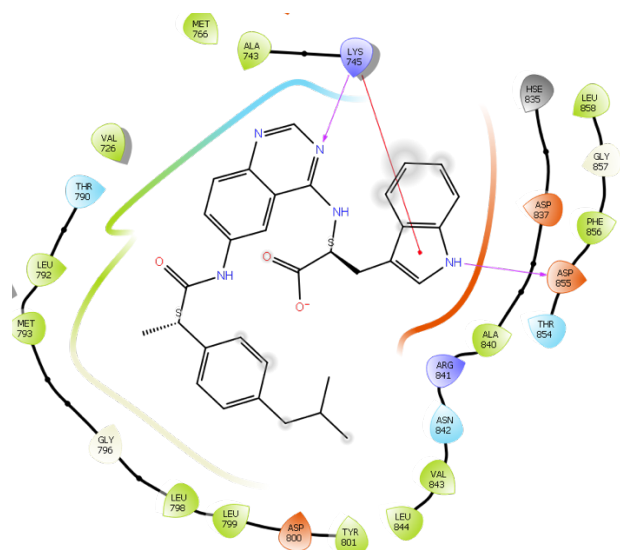


Figura 142. Visualización 2D de 13 en EGFR.

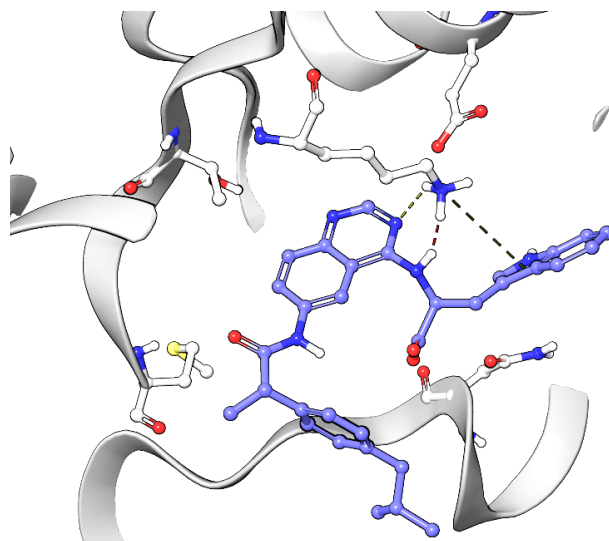


Figura 143. Visualización 3D de 13 en EGFR.

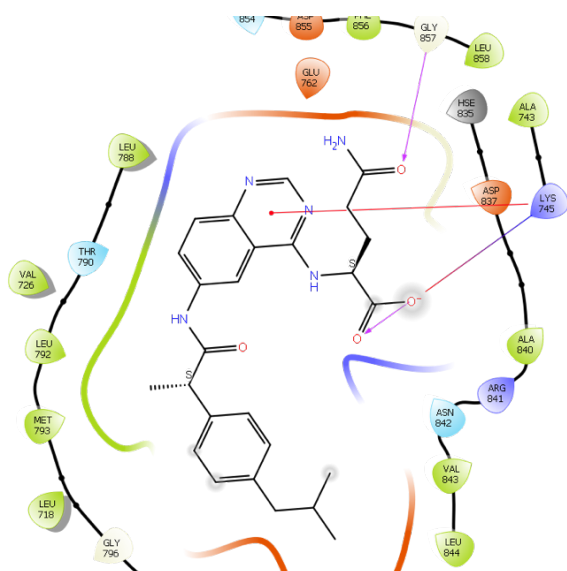


Figura 144. Visualización 2D de 14 en EGFR.

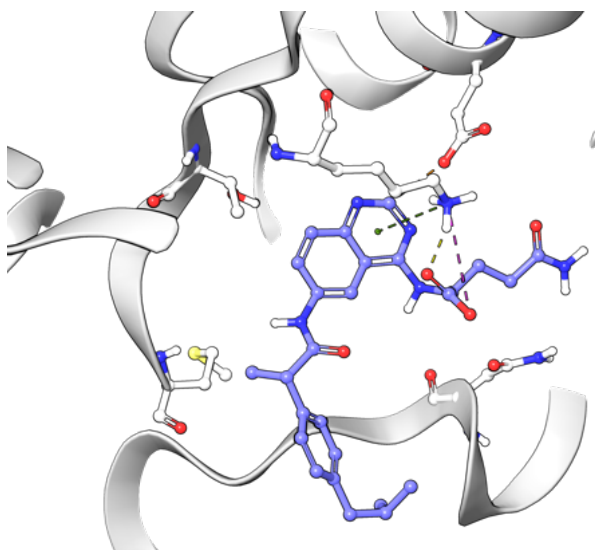


Figura 145. Visualización 3D de 14 en EGFR.

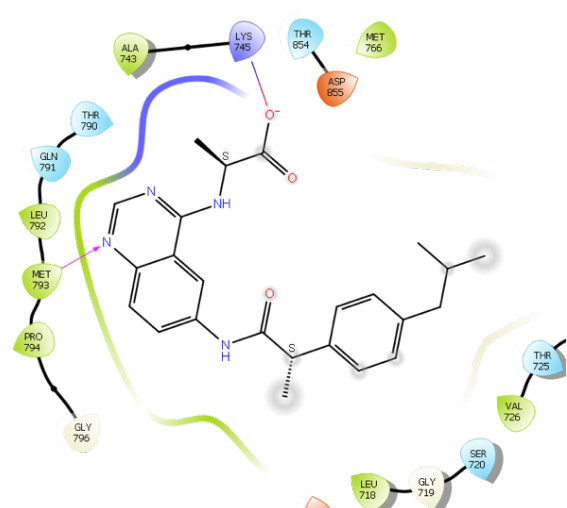


Figura 146. Visualización 2D de 15 en EGFR.

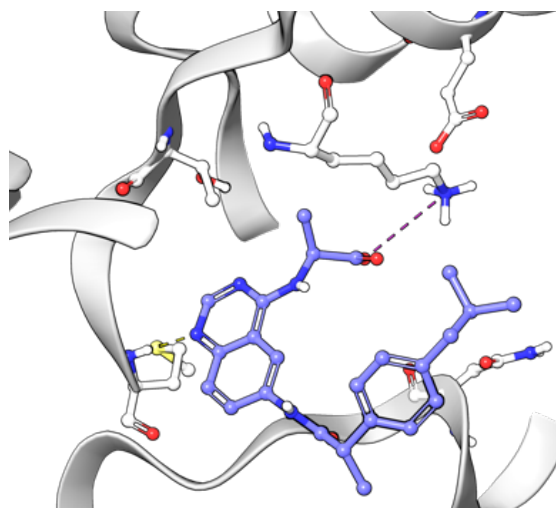


Figura 147. Visualización 3D de 15 en EGFR.



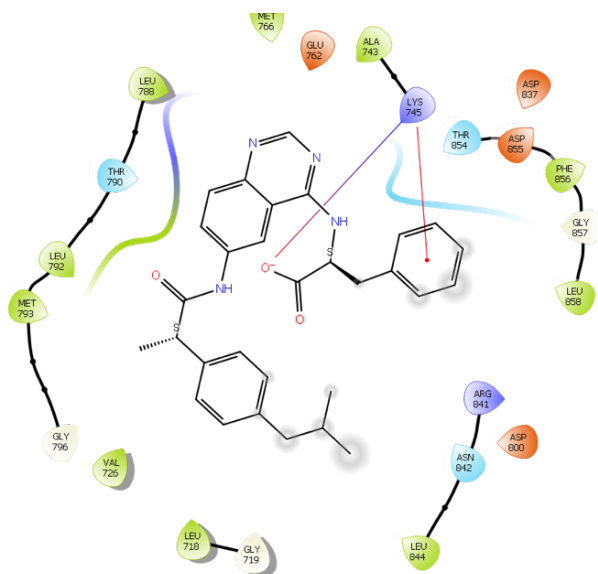


Figura 148. Visualización 2D de **16** en EGFR.

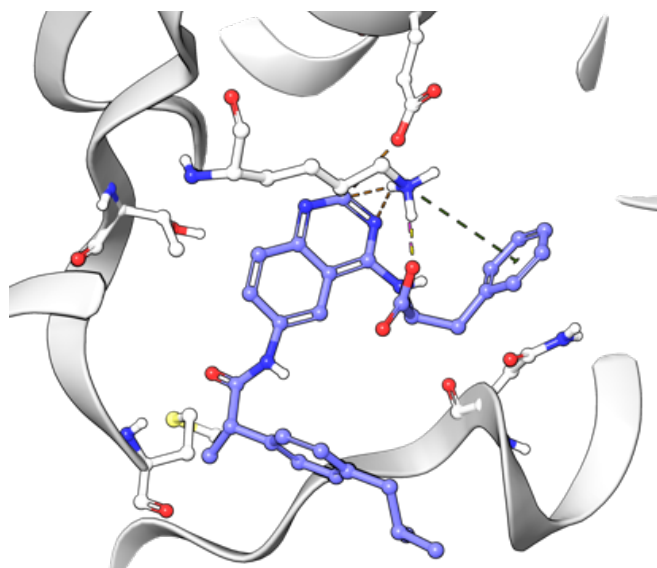


Figura 149. Visualización 3D de **16** en EGFR.

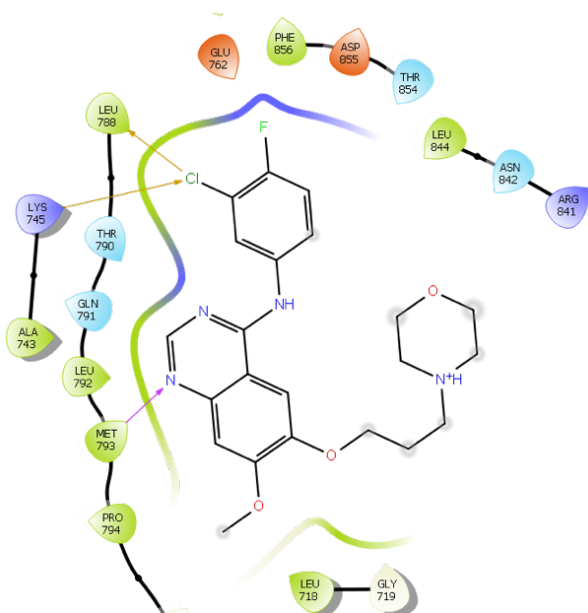


Figura 150 Visualización 2D de gefitinib en EGFR.

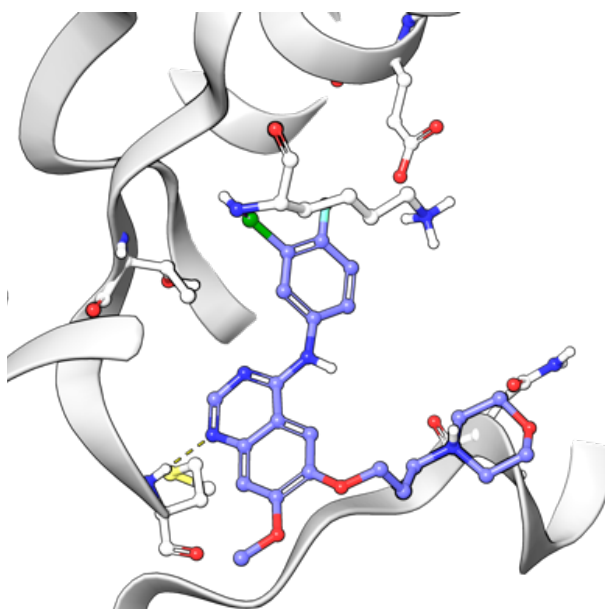


Figura 151. Visualización 3D de gefitinib en EGFR.



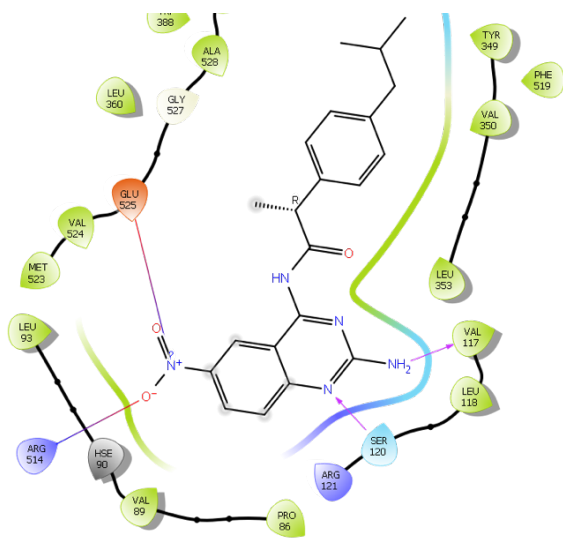


Figura 152. Visualización 2D de 1 en COX-2.

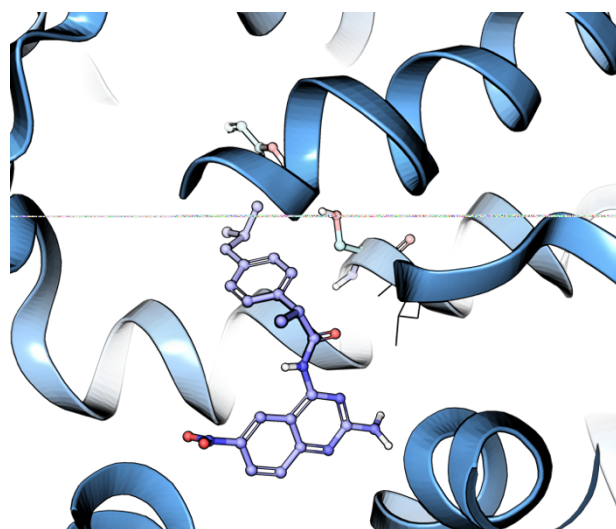


Figura 153. Visualización 3D de 1 en COX-2.

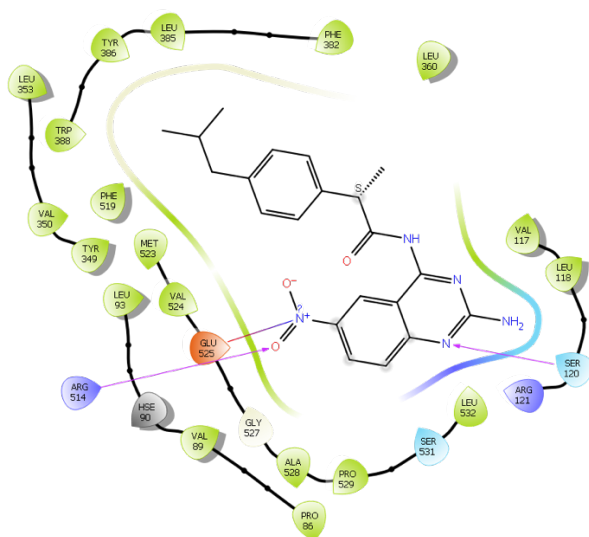


Figura 154. Visualización 2D de 2 en COX-2.

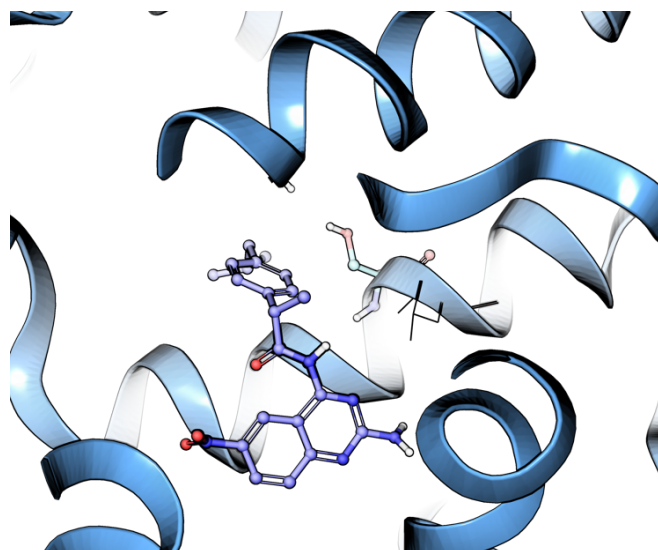


Figura 155. Visualización 3D de 2 en COX-2.

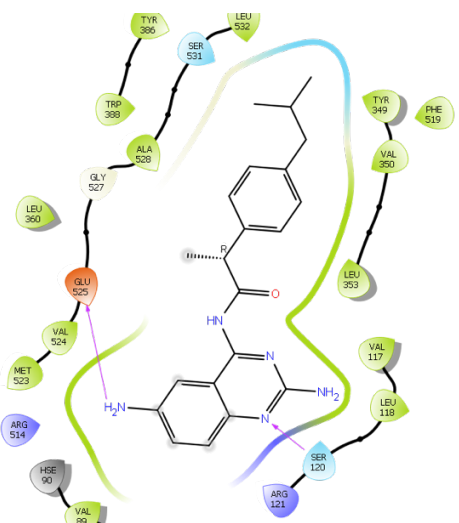


Figura 156. Visualización 2D de 3 en COX-2.

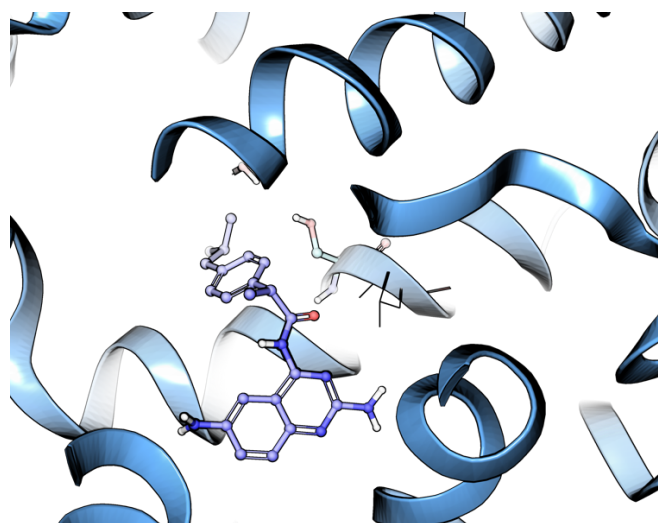


Figura 157. Visualización 3D de 3 en COX-2.

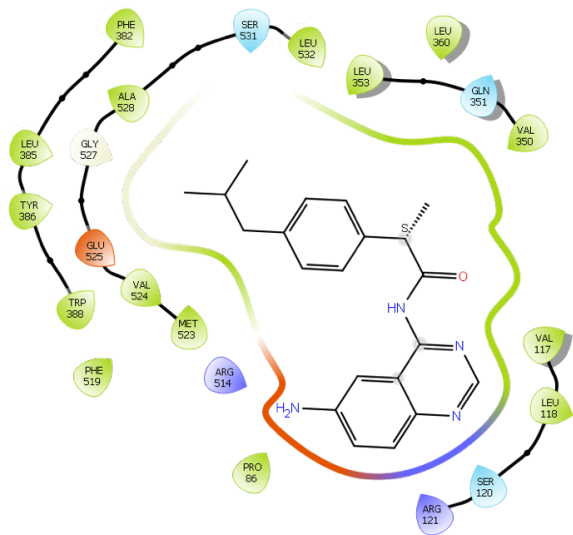


Figura 158. Visualización 2D de 4 en COX-2.

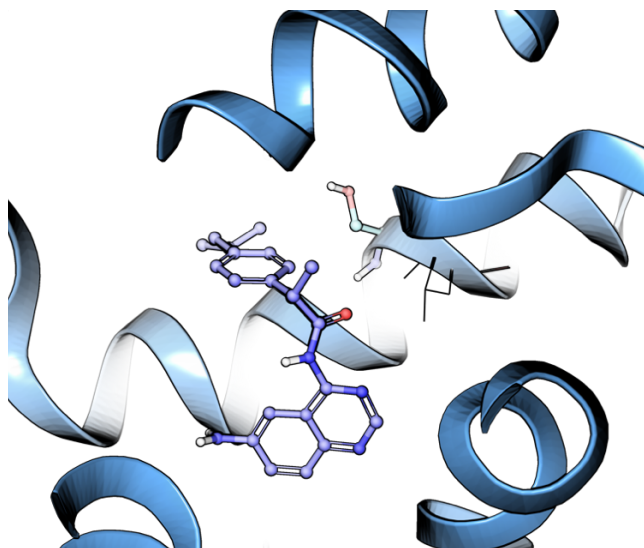


Figura 159. Visualización 3D de 4 en COX-2.

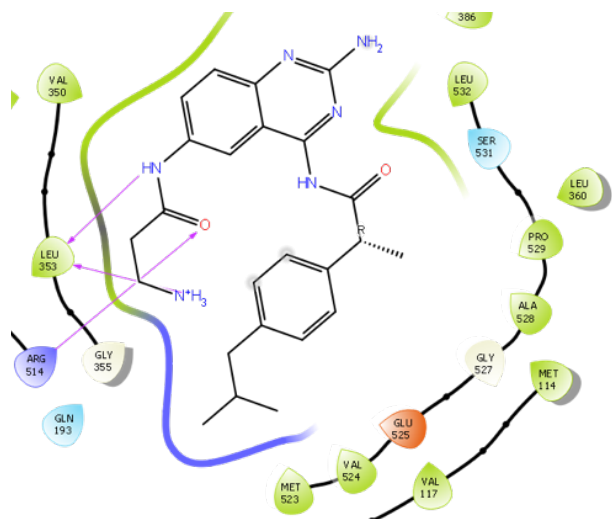


Figura 160. Visualización 2D de 5 en COX-2.

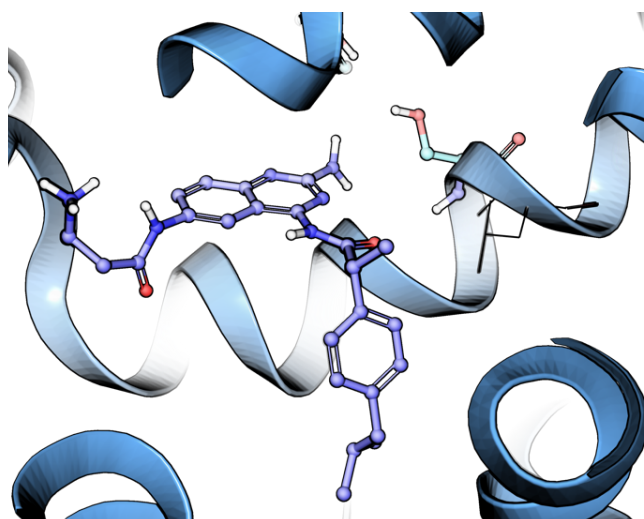


Figura 161. Visualización 3D de 5 en COX-2.

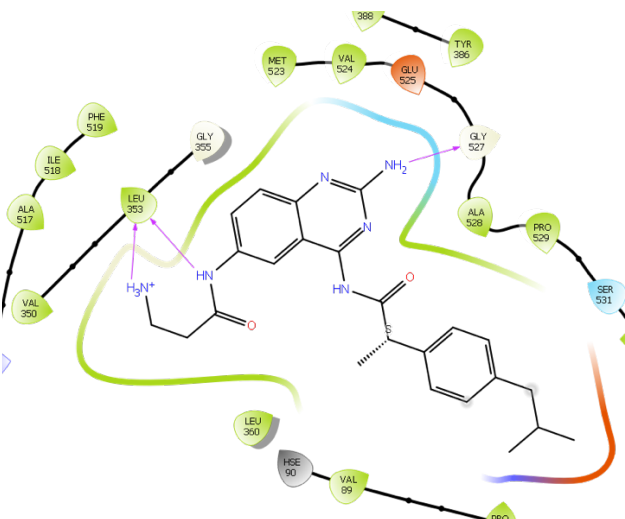


Figura 162. Visualización 2D de 6 en COX-2.

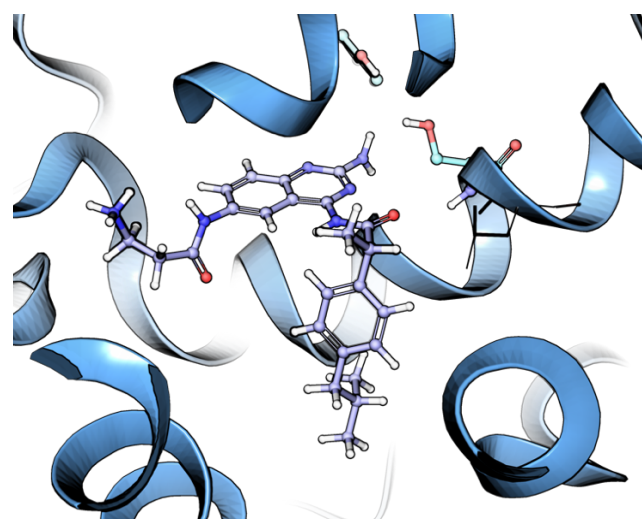


Figura 163. Visualización 3D de 6 en COX-2.



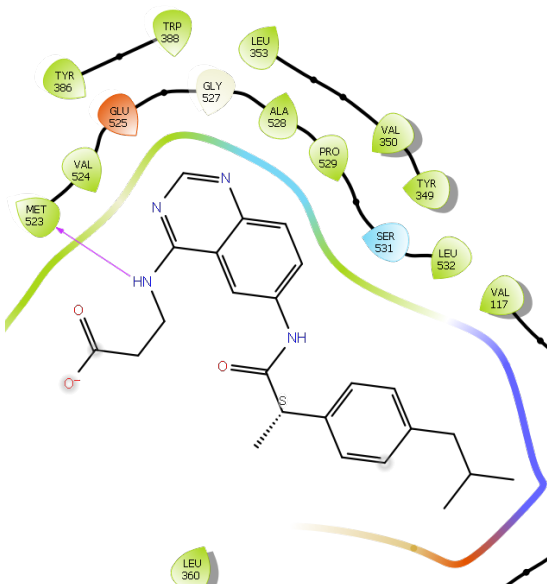


Figura 164. Visualización 2D de 7 en COX-2.

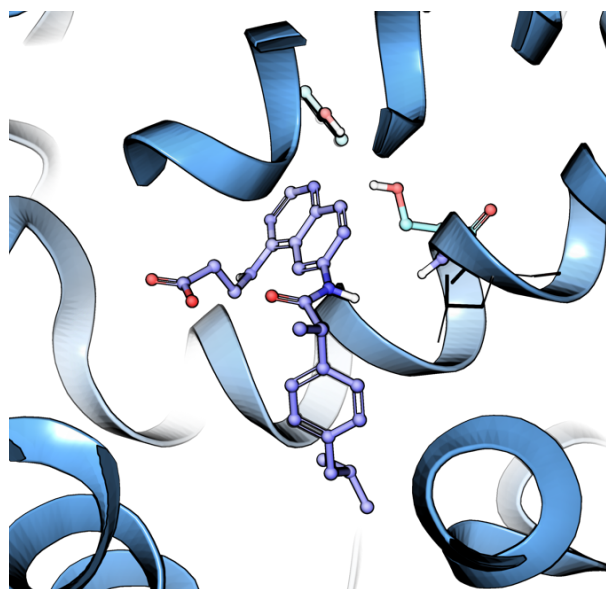


Figura 165. Visualización 3D de 7 en COX-2.

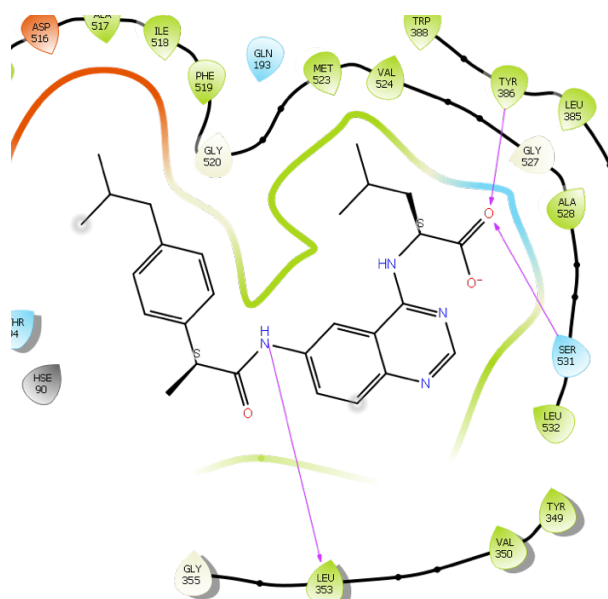


Figura 166. Visualización 2D de 8 en COX-2.

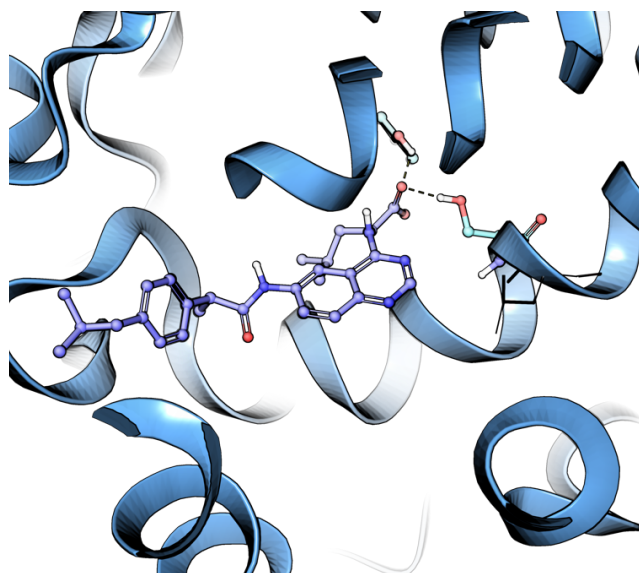


Figura 167. Visualización 3D de 8 en COX-2.

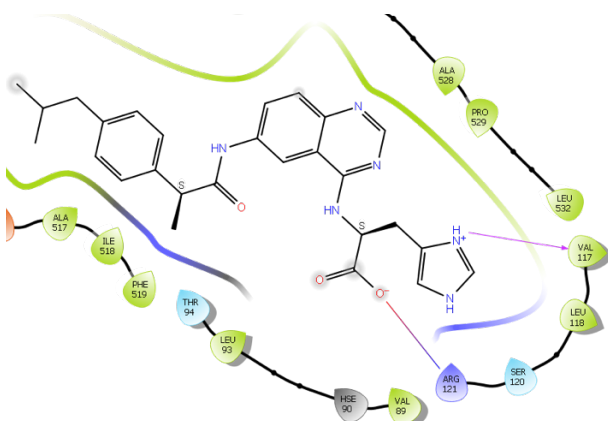


Figura 168. Visualización 2D de 9 en COX-2.

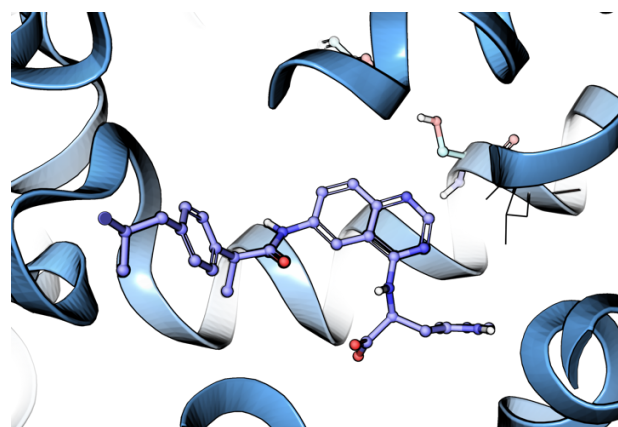


Figura 169. Visualización 3D de 9 en COX-2.

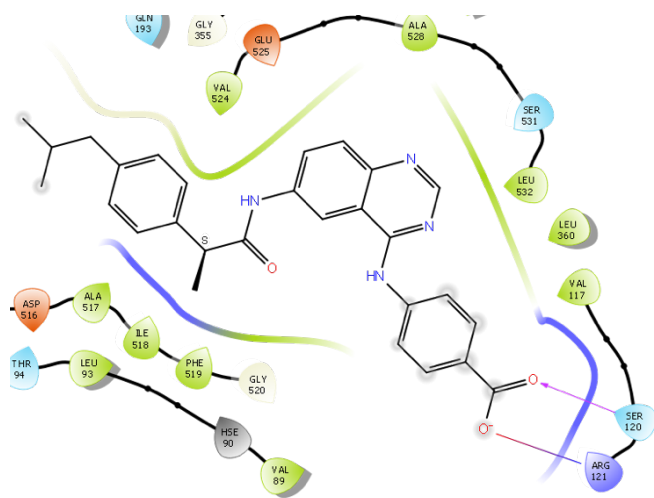


Figura 170. Visualización en 2D de **10** en COX-2.

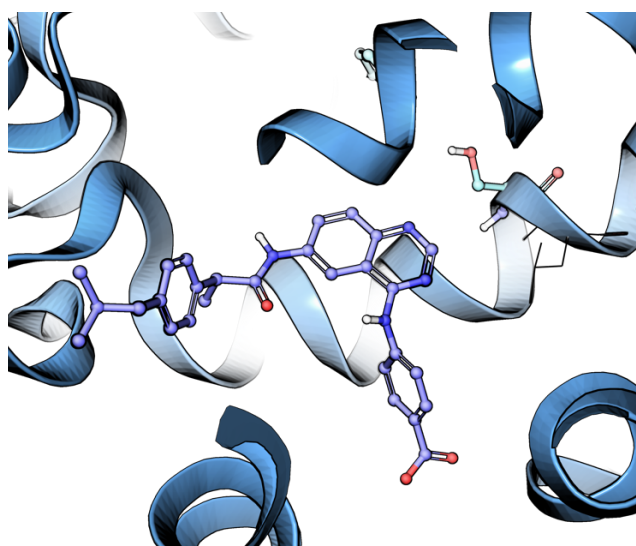


Figura 171. Visualización en 3D de **10** en COX-2.

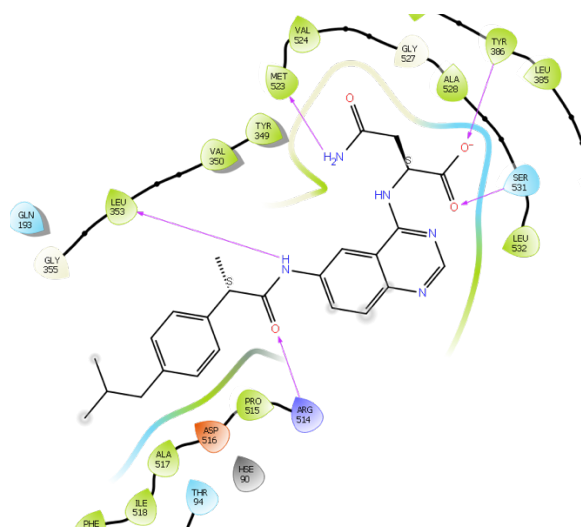


Figura 172. Visualización 2D de **11** en COX-2.

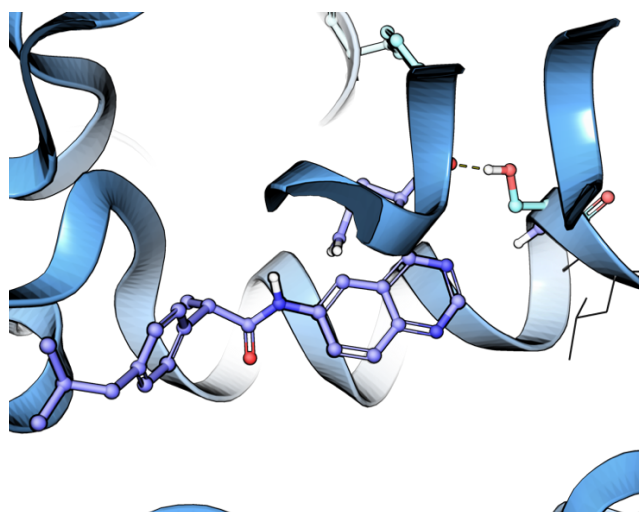


Figura 173. Visualización 3D de **11** en COX-2.

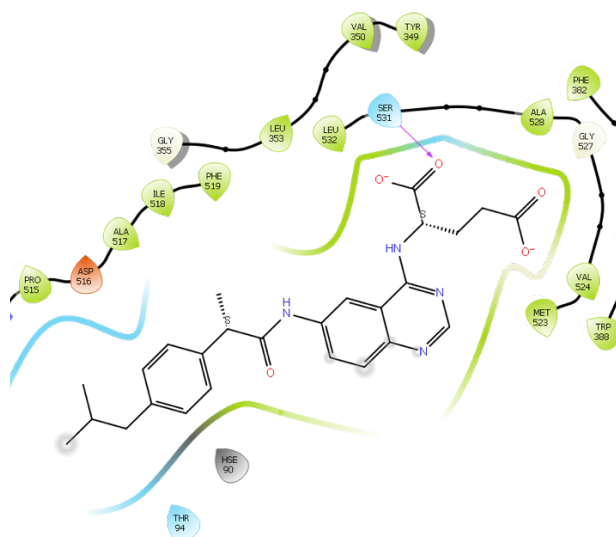


Figura 174. Visualización 2D de **12** en COX-2.

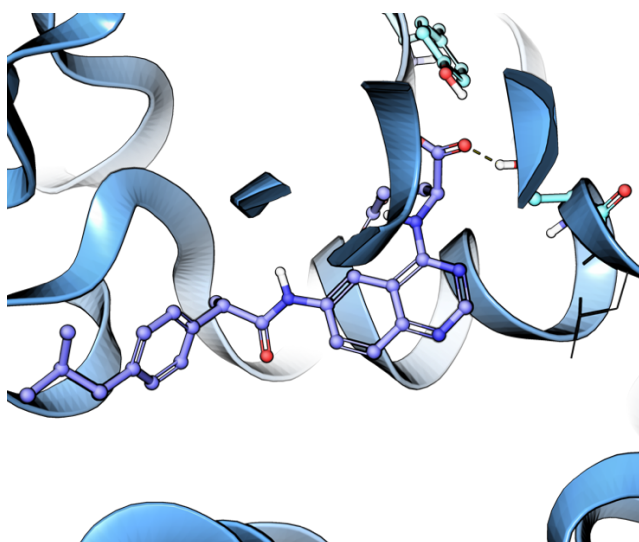


Figura 175. Visualización 3D de **12** en COX-2.

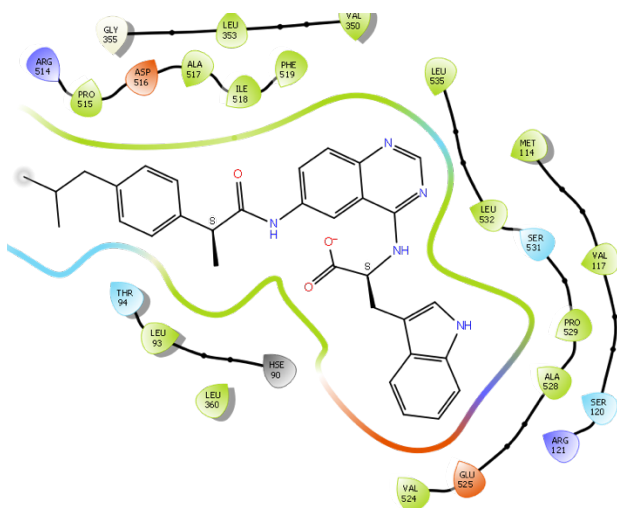


Figura 176. Visualización 2D de **13** en COX-2.

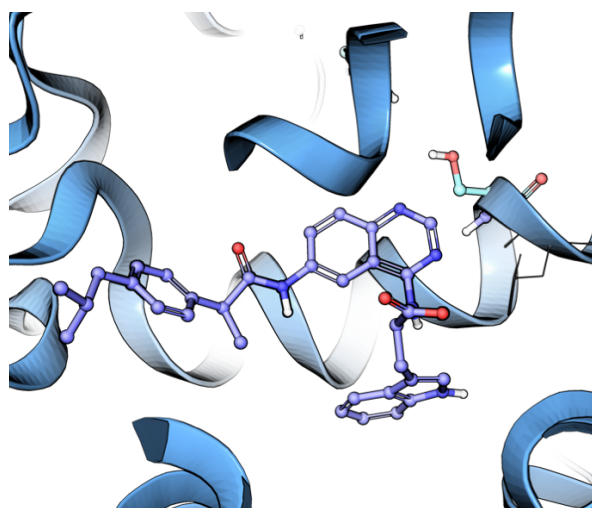


Figura 177. Visualización 3D de **13** en COX-2.

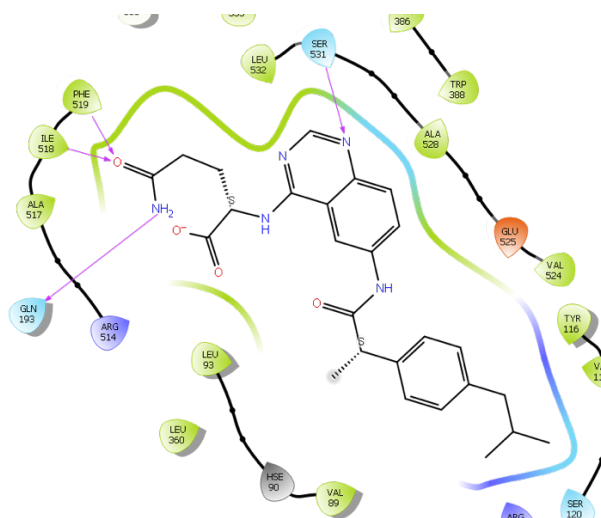


Figura 178. Visualización 2D de **14** en COX-2.

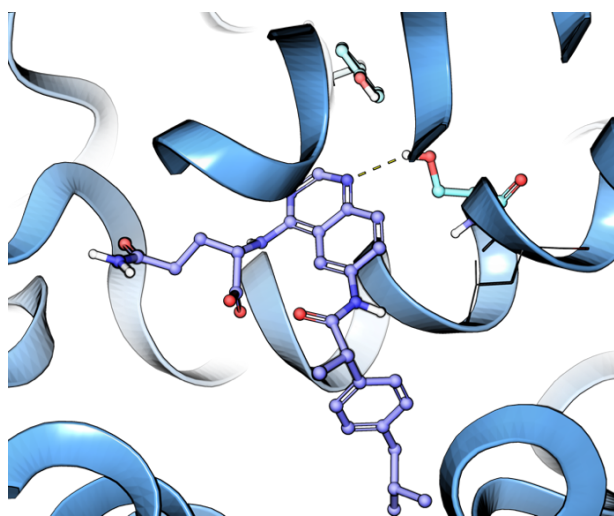


Figura 179. Visualización 3D de **14** en COX-2.

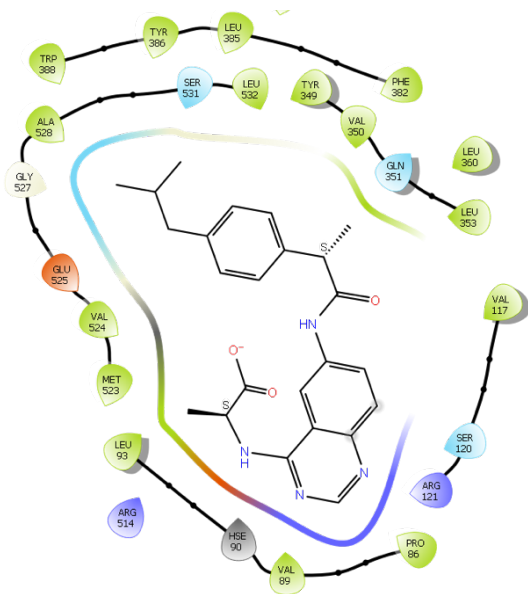


Figura 180. Visualización 2D de **15** en COX-2.

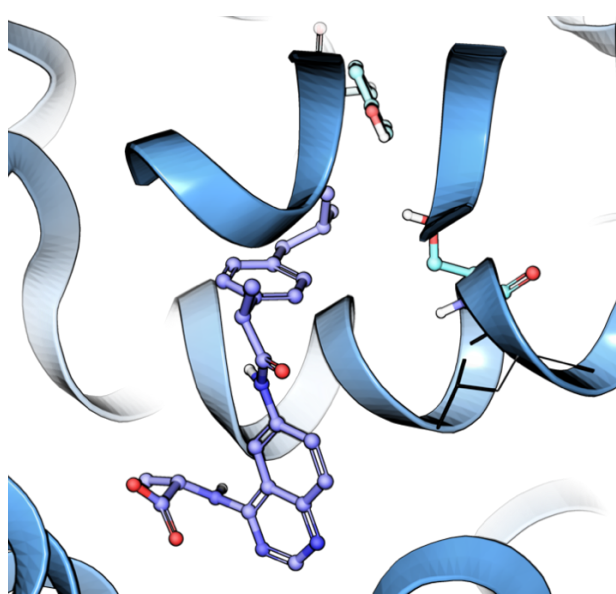


Figura 181. Visualización 3D de **15** en COX-2.

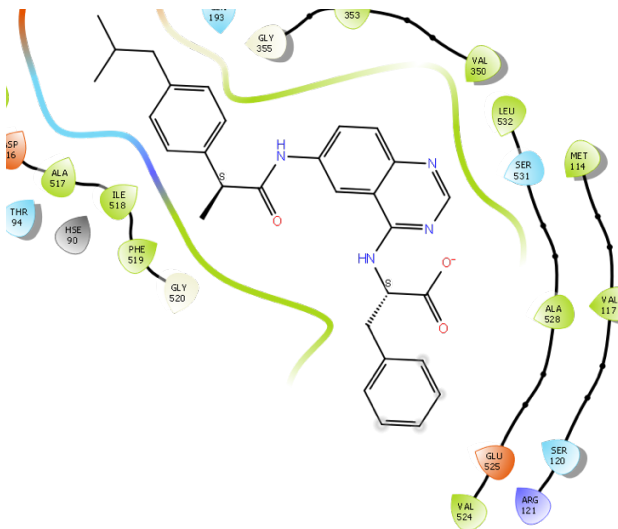


Figura 182. Visualización 2D de 16 en COX-2.

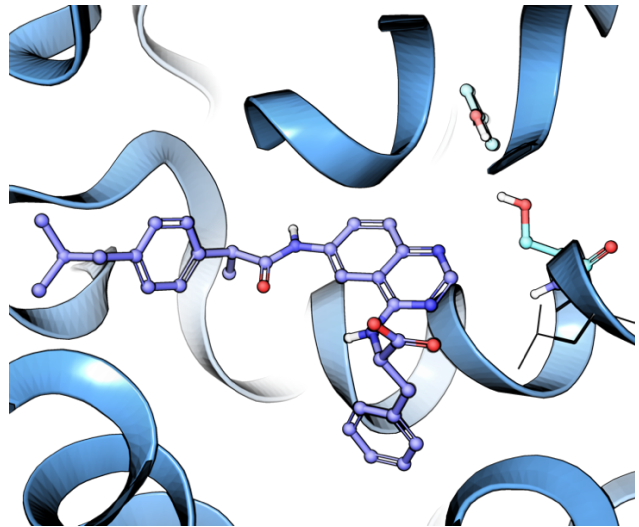


Figura 183. Visualización 3D de 16 en COX-2.

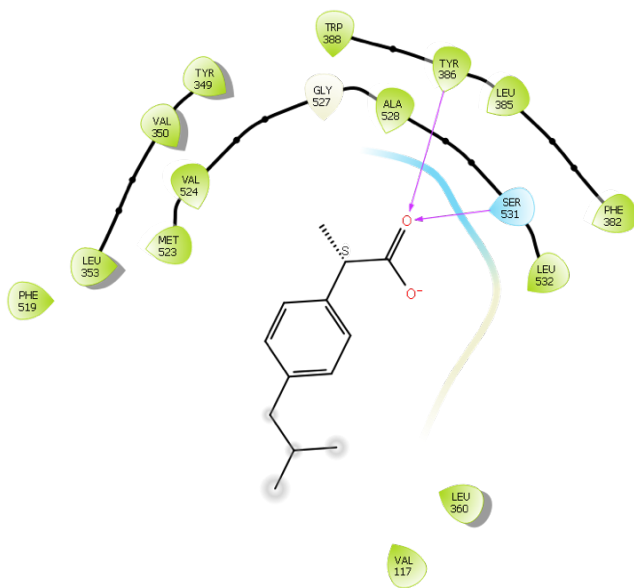


Figura 184. Visualización 2D ibuprofeno en COX-2.

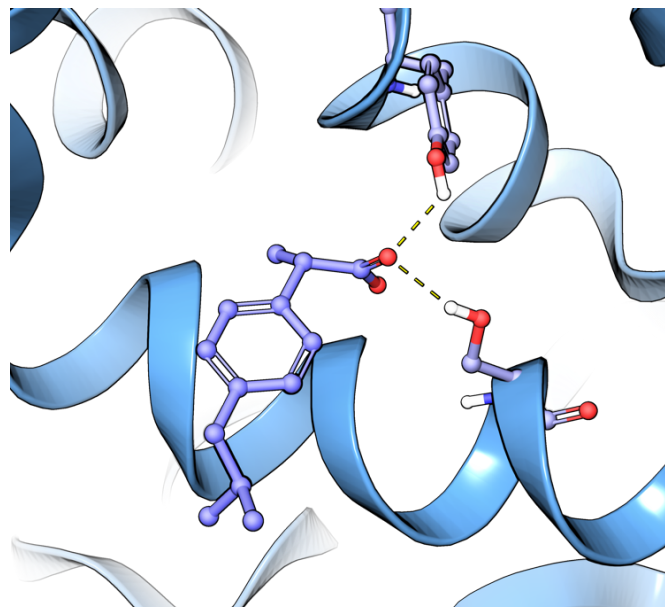


Figura 185. Visualización 3D de ibuprofeno COX-2.



Anexo III: Curvas IC₅₀



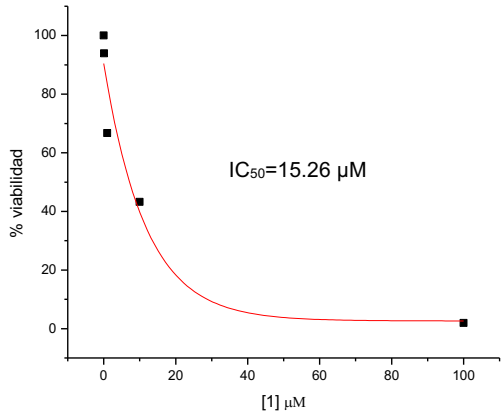


Figura 186. Gráfico IC₅₀ de 1 en AGS.

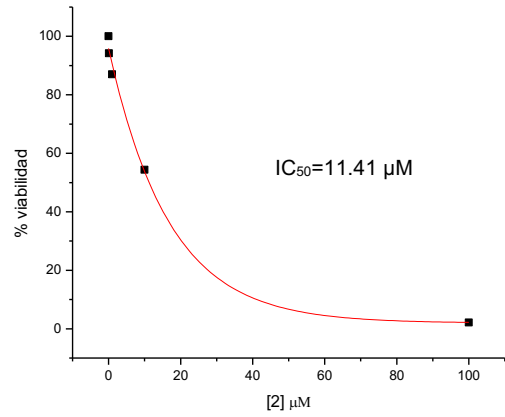


Figura 187. Gráfico IC₅₀ de 2 en AGS.

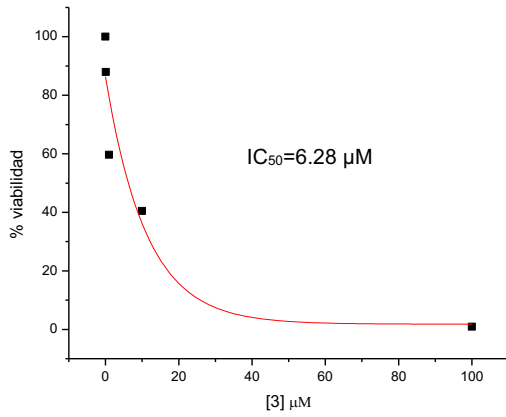


Figura 188. Gráfico IC₅₀ de 3 en AGS.

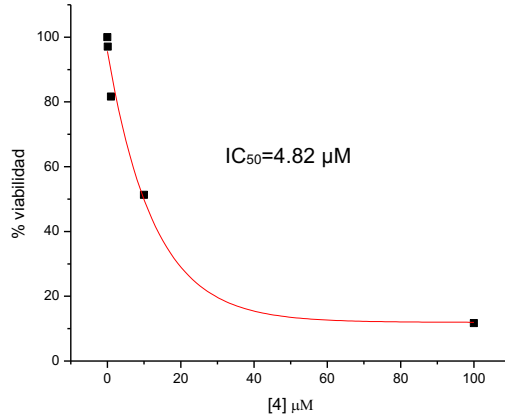


Figura 189. Gráfico IC₅₀ de 4 en AGS.

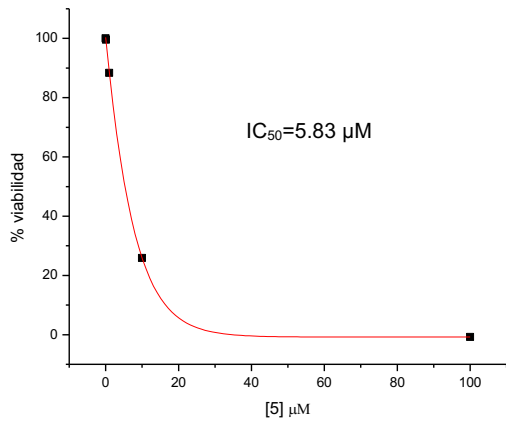


Figura 190. Gráfico IC₅₀ de 5 en AGS.

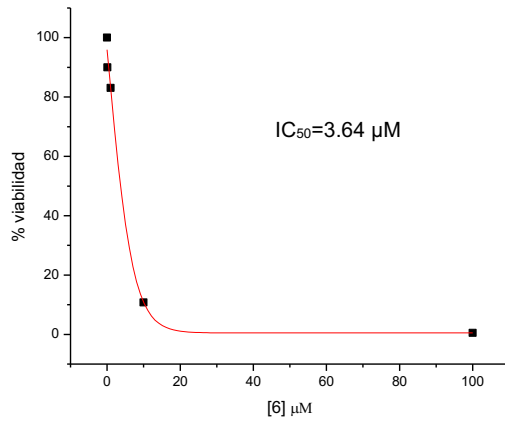


Figura 191. Gráfico IC₅₀ de 6 en AGS.



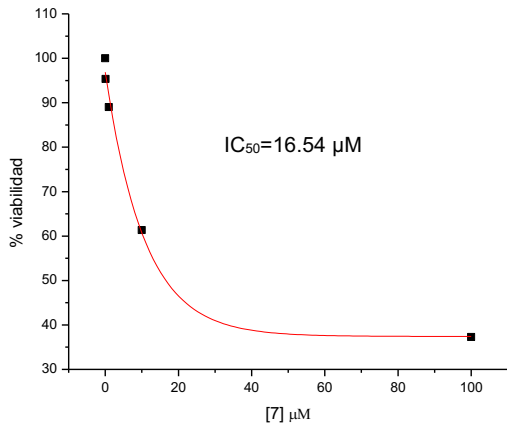


Figura 192. Gráfico IC_{50} de 7 en AGS.

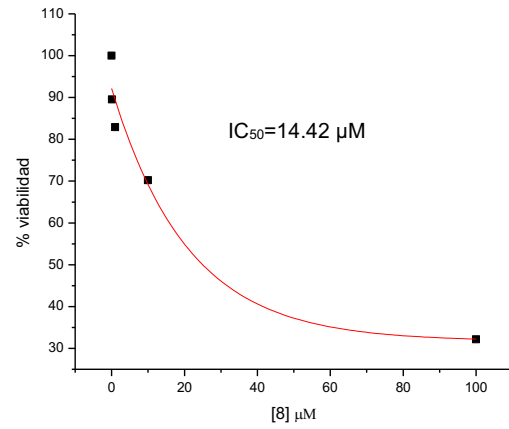


Figura 193. Gráfico IC_{50} de 8 en AGS.

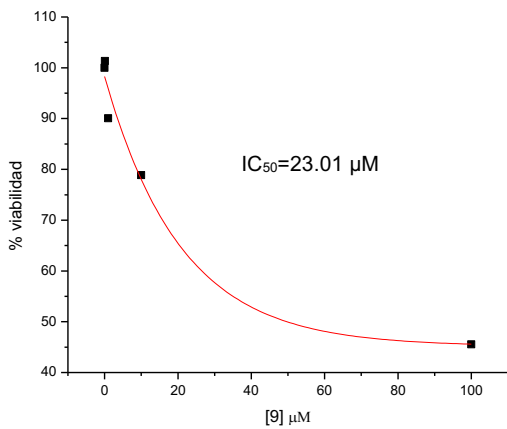


Figura 194. Gráfico IC_{50} de 9 en AGS.

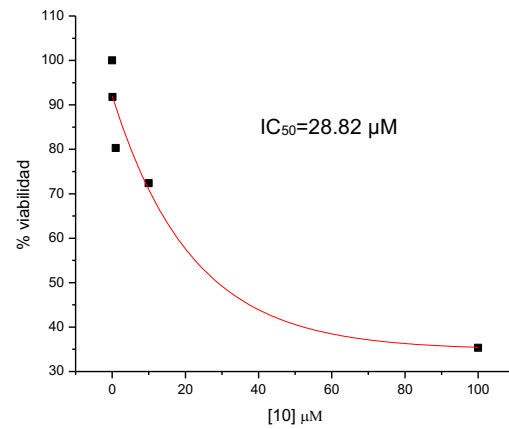


Figura 195. Gráfico IC_{50} de 10 en AGS.

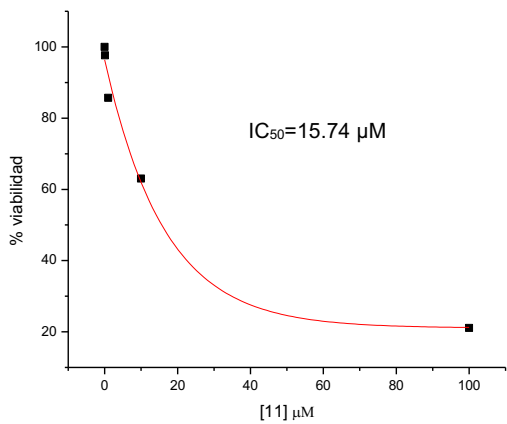


Figura 196. Gráfico IC_{50} de 11 en AGS.

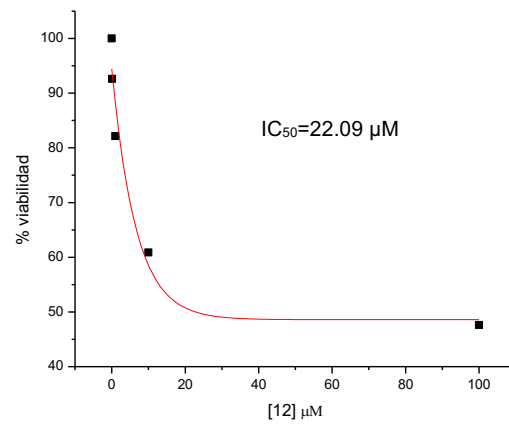


Figura 197. Gráfico IC_{50} de 12 en AGS.



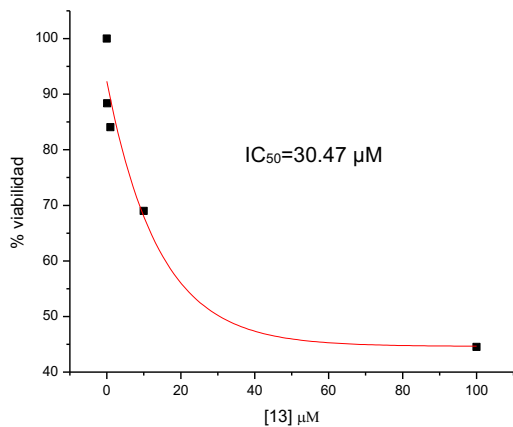


Figura 198. Gráfico IC_{50} de 13 en AGS.

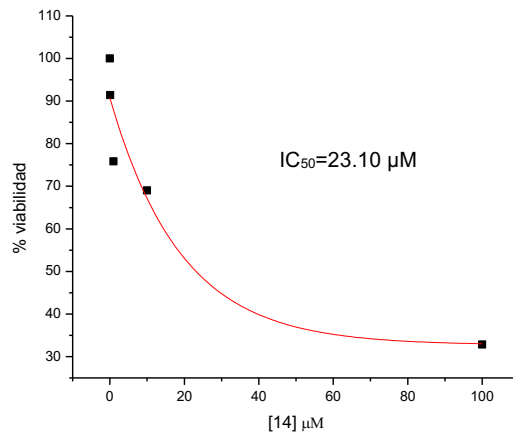


Figura 199. Gráfico IC_{50} de 14 en AGS.

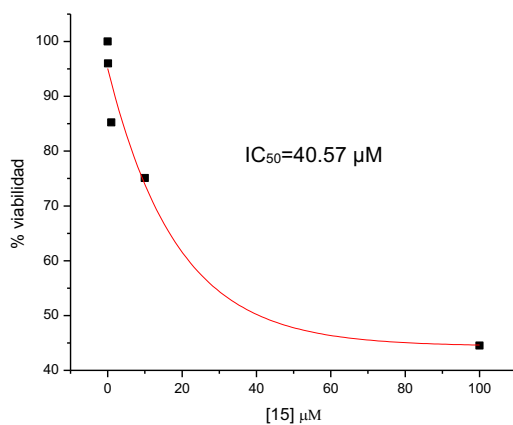


Figura 200. Gráfico IC_{50} de 15 en AGS.

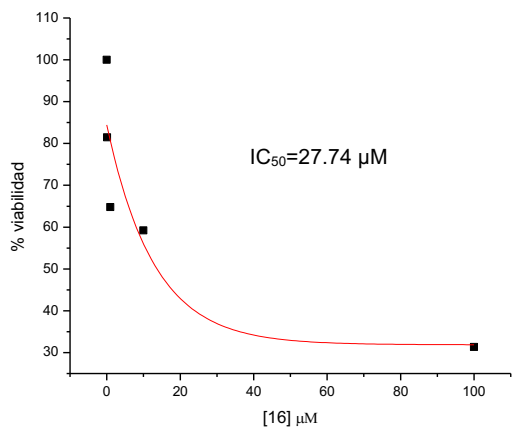


Figura 201. Gráfico IC_{50} de 16 en AGS.

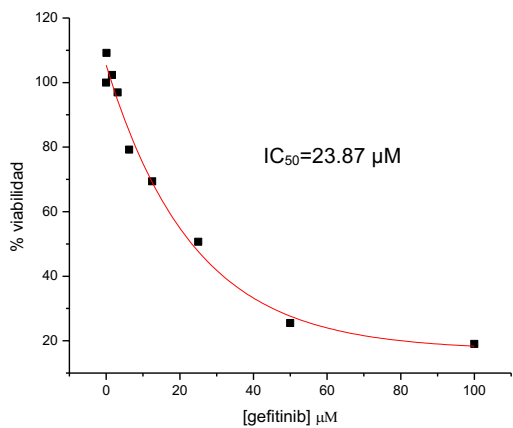


Figura 202. Gráfico IC_{50} de gefitinib en AGS.



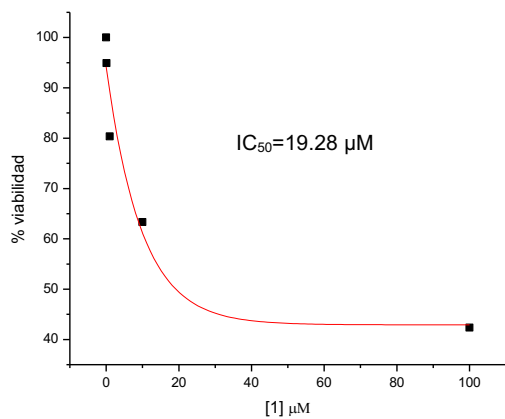


Figura 203. Gráfico IC_{50} de 1 en MDA-MB-231.

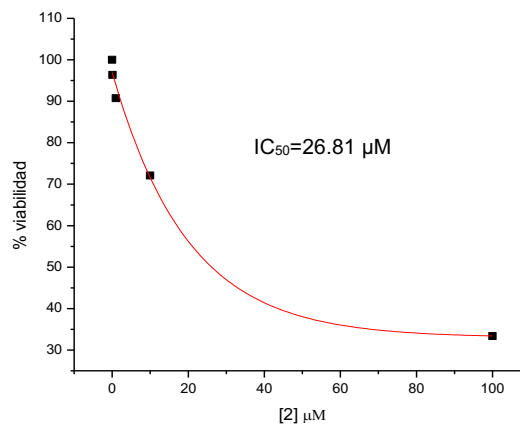


Figura 204. Gráfico IC_{50} de 2 en MDA-MB-231.

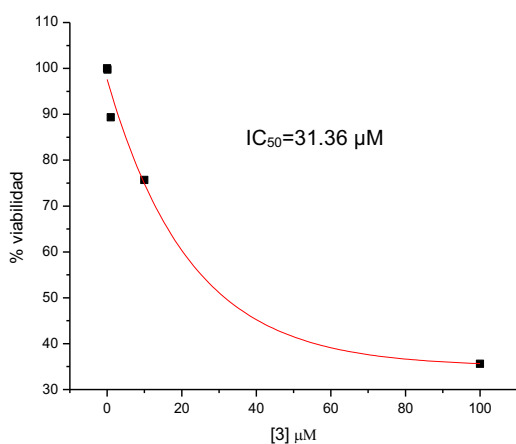


Figura 205. Gráfico IC_{50} de 3 en MDA-MB-231.

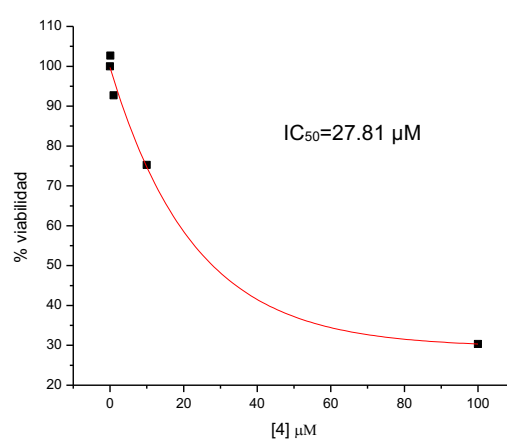


Figura 206. Gráfico IC_{50} de 4 en MDA-MB-231.

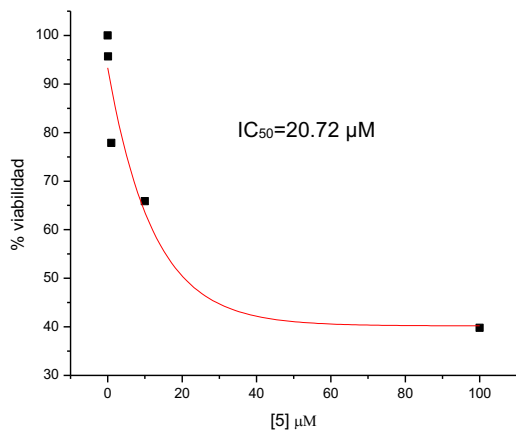


Figura 207. Gráfico IC_{50} de 5 en MDA-MB-231.

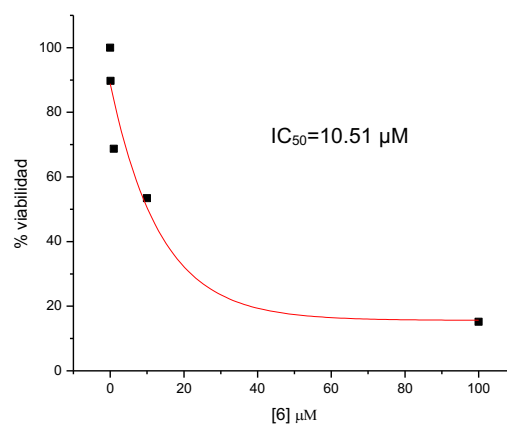


Figura 208. Gráfico IC_{50} de 6 en MDA-MB-231.



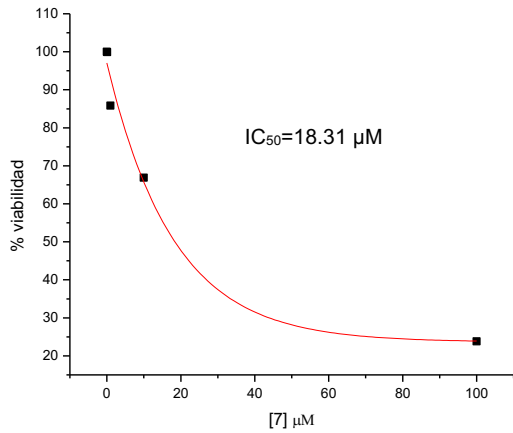


Figura 209. Gráfico IC_{50} de 7 en MDA-MB-231.

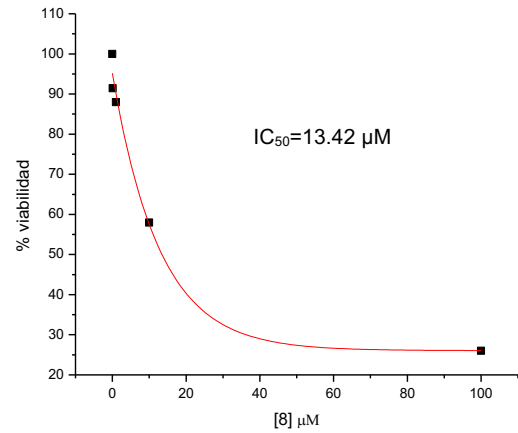


Figura 210. Gráfico IC_{50} de 8 en MDA-MB-231.

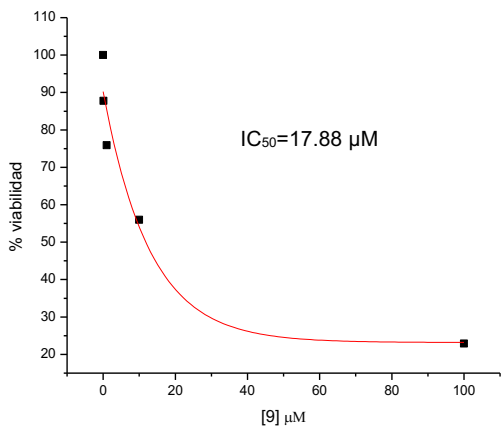


Figura 211. Gráfico IC_{50} de 9 en MDA-MB-231.

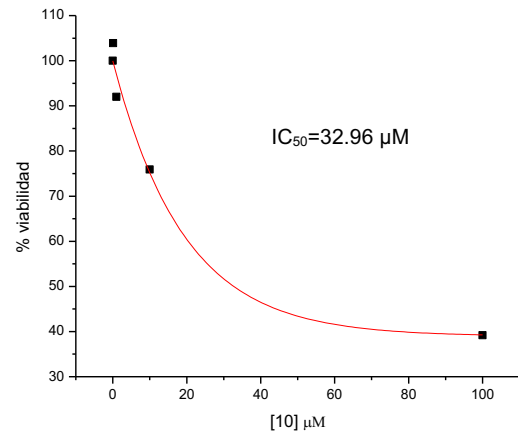


Figura 212. Gráfico IC_{50} de 10 en MDA-MB-231.

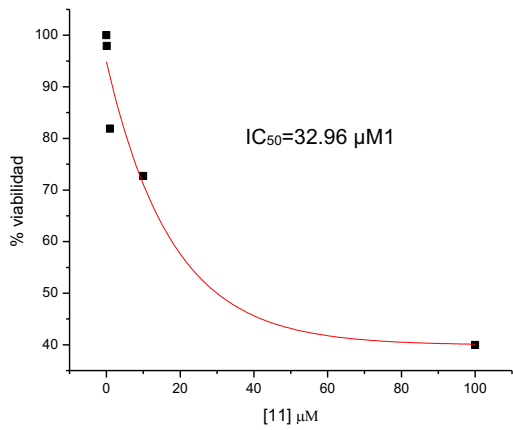


Figura 213. Gráfico IC_{50} de 11 en MDA-MB-231.

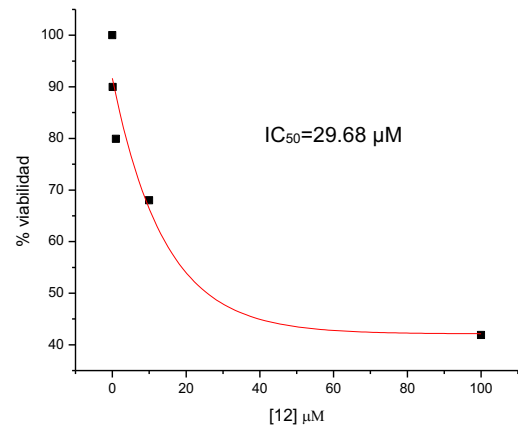


Figura 214. Gráfico IC_{50} de 12 en MDA-MB-231.



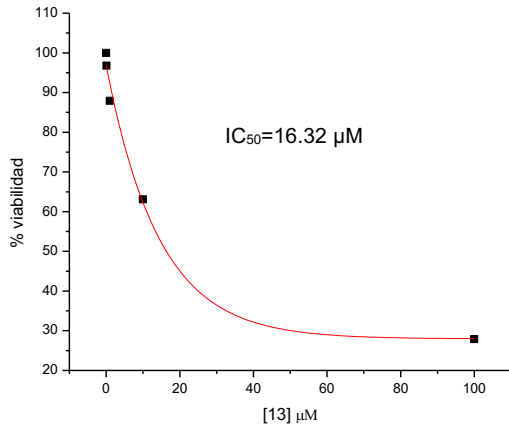


Figura 215. Gráfico IC₅₀ de 13 en MDA-MB-231.

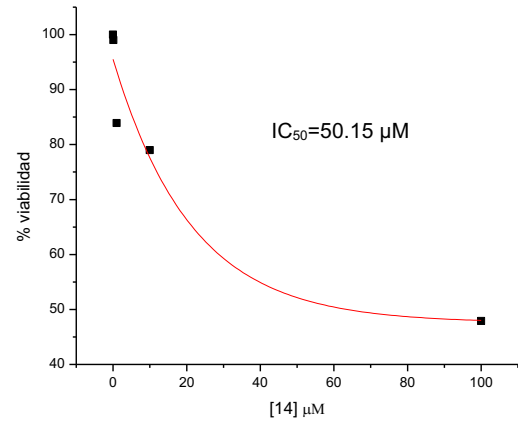


Figura 216. Gráfico IC₅₀ de 14 en MDA-MB-231.

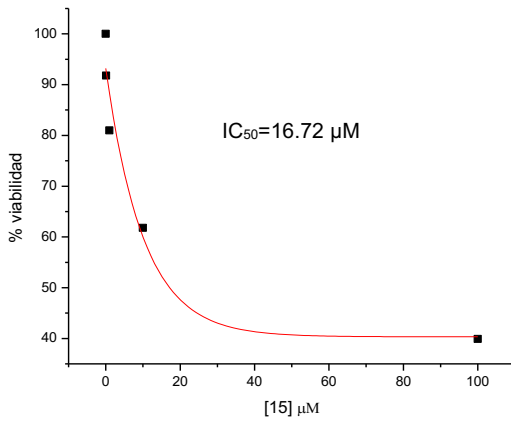


Figura 217. Gráfico IC₅₀ de 15 en MDA-MB-231.

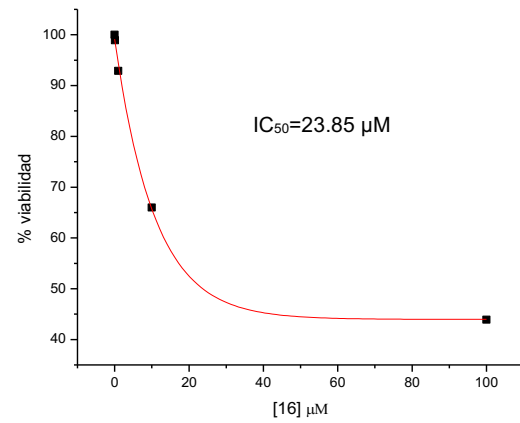


Figura 218. Gráfico IC₅₀ de 16 en MDA-MB-231.

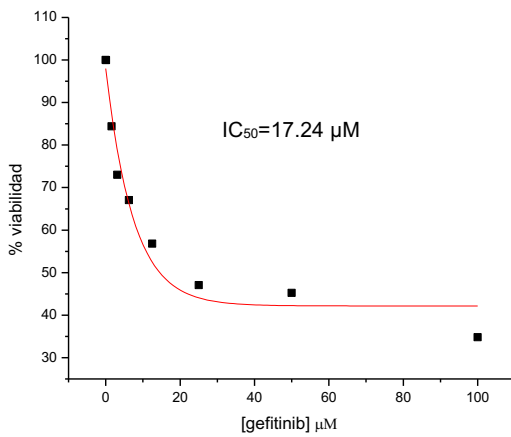


Figura 219. Gráfico IC₅₀ de gefitinib en MDA-MB-231.



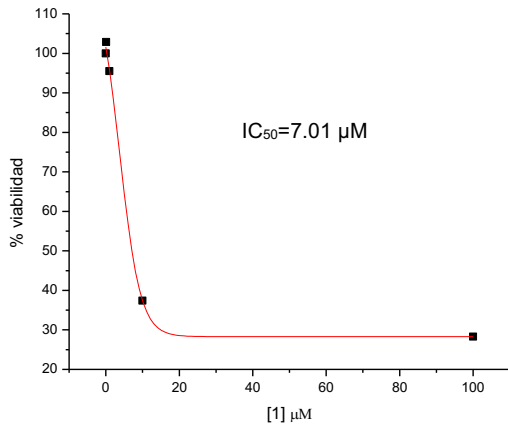


Figura 220. Gráfico IC_{50} de 1 en MCF-7.

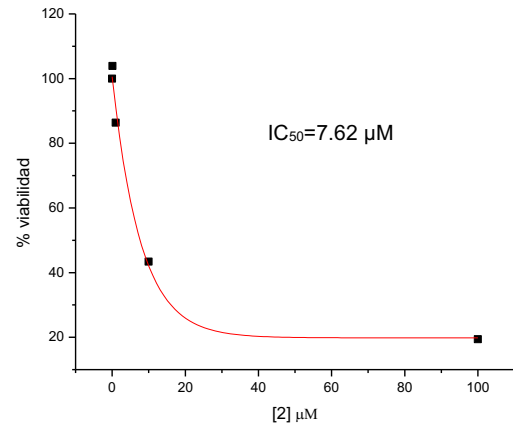


Figura 221. Gráfico IC_{50} de 2 en MCF-7.

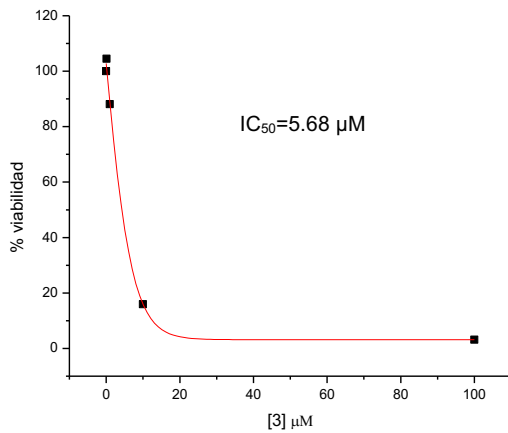


Figura 222. Gráfico IC_{50} de 3 en MCF-7.

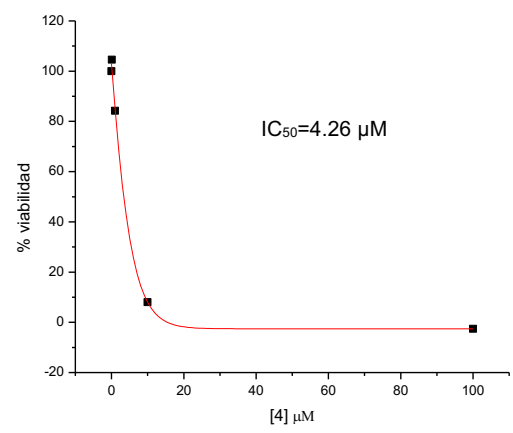


Figura 223. Gráfico IC_{50} de 4 en MCF-7.

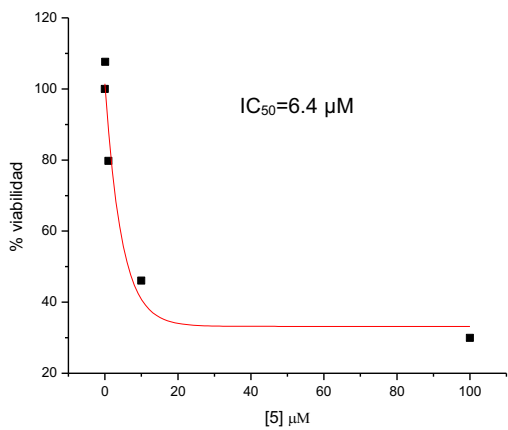


Figura 224. Gráfico IC_{50} de 5 en MCF-7.

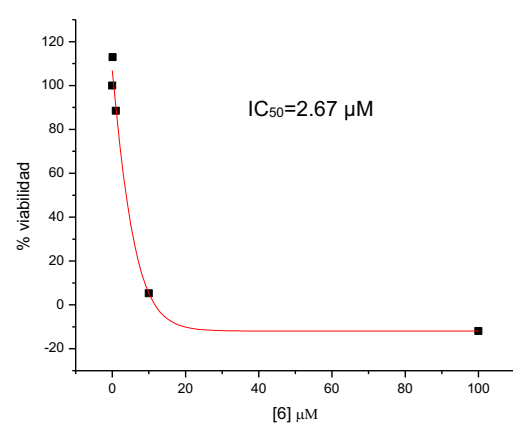


Figura 225. Gráfico IC_{50} de 6 en MCF-7.



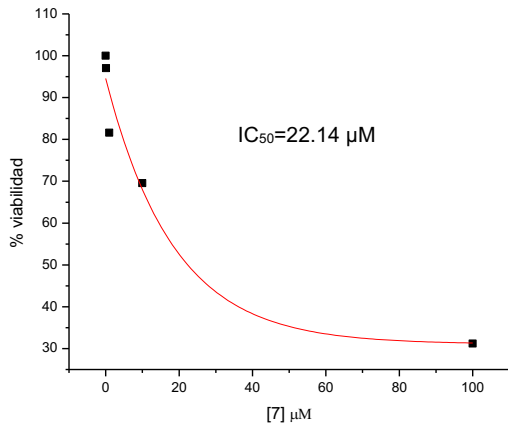


Figura 226. Gráfico IC_{50} de 7 en MCF-7.

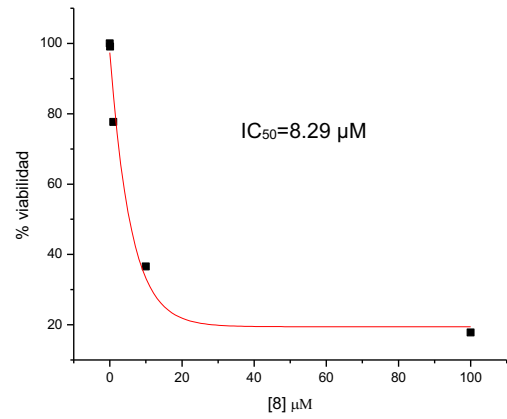


Figura 227. Gráfico IC_{50} de 8 en MCF-7.

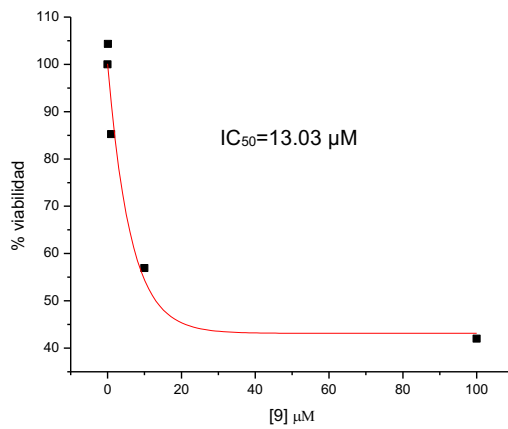


Figura 228. Gráfico IC_{50} de 9 en MCF-7.

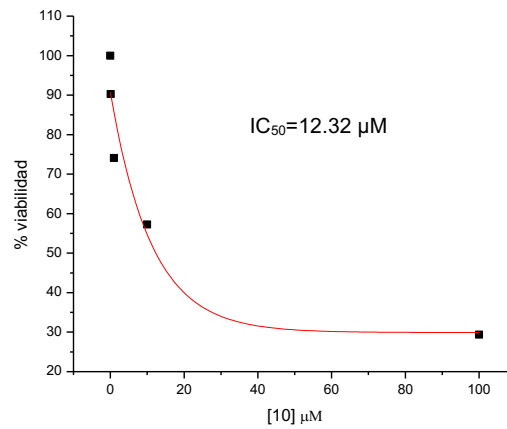


Figura 229. Gráfico IC_{50} de 10 en MCF-7.

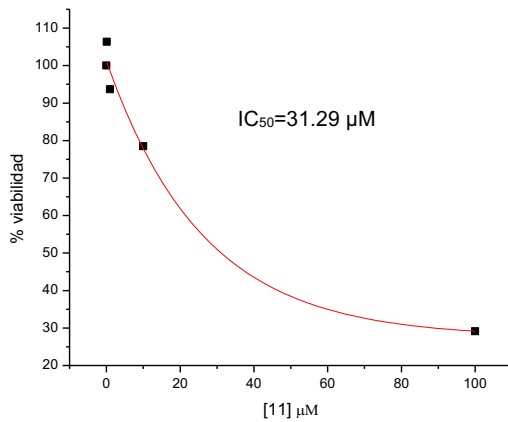


Figura 230. Gráfico IC_{50} de 11 en MCF-7.

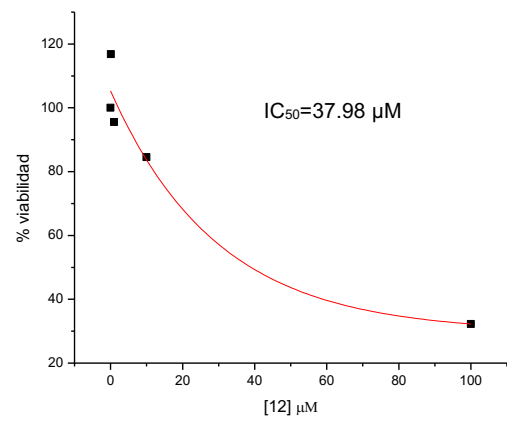


Figura 231. Gráfico IC_{50} de 12 en MCF-7.



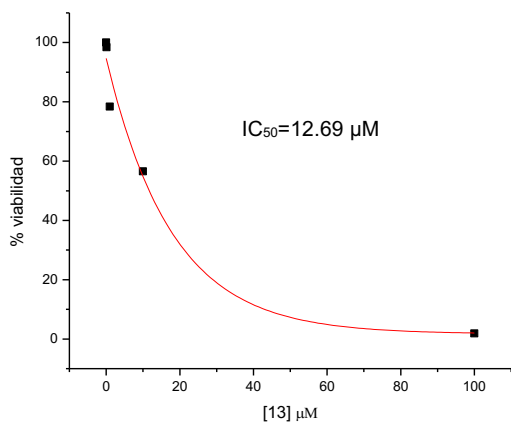


Figura 232. Gráfico IC_{50} de **13** en MCF-7.

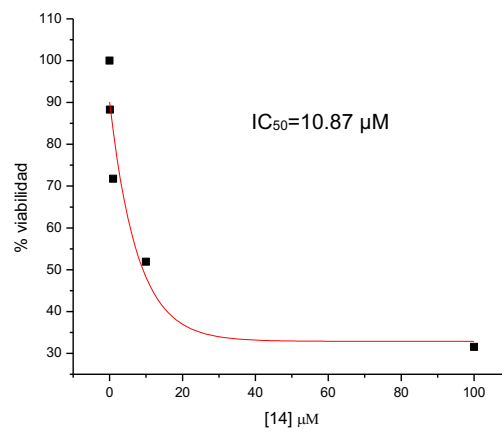


Figura 233. Gráfico IC_{50} de **14** en MCF-7.

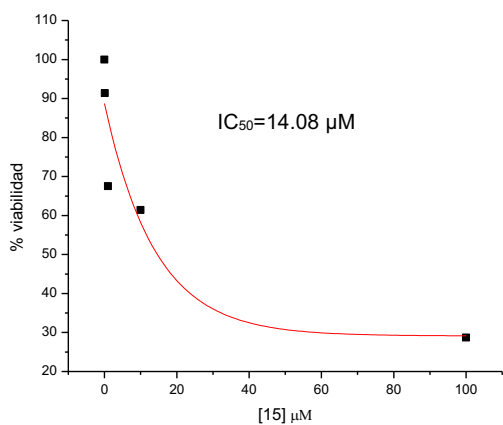


Figura 234. Gráfico IC_{50} de **15** en MCF-7.

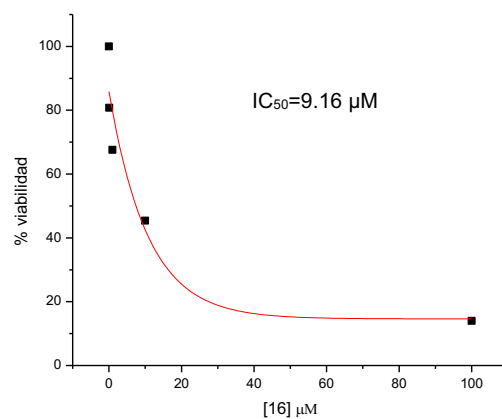


Figura 235. Gráfico IC_{50} de **16** en MCF-7.

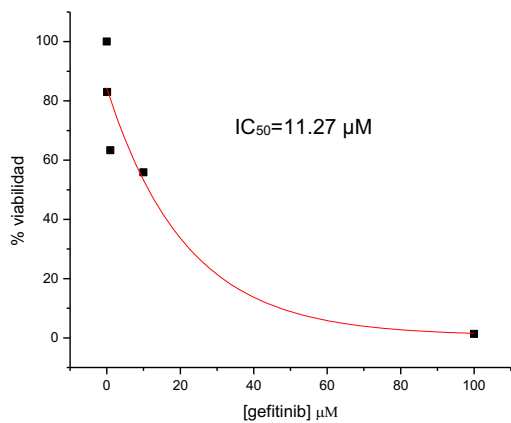


Figura 236. Gráfico IC_{50} de gefitinib en MCF-7.



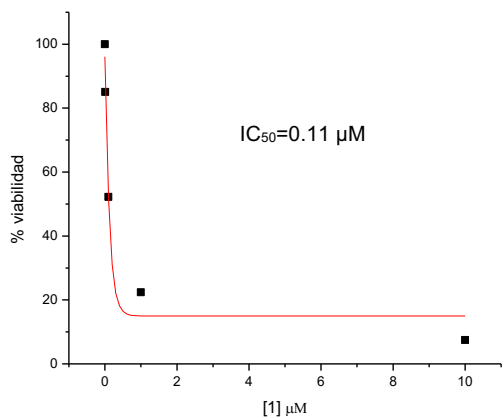


Figura 237. Gráfico IC_{50} de 1 en A-431.

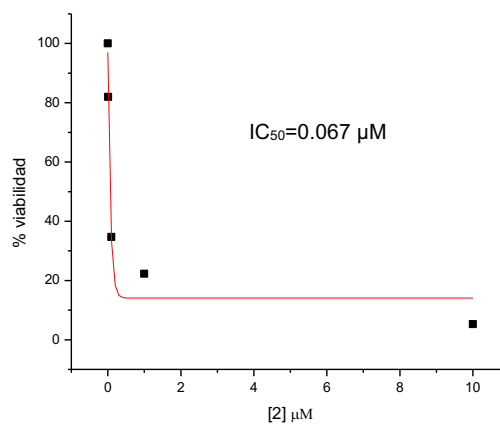


Figura 238. Gráfico IC_{50} de 2 en A-431.

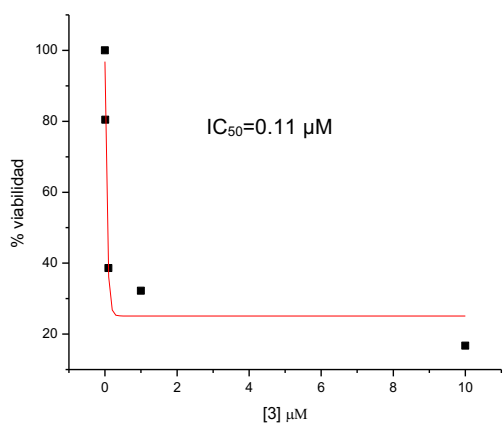


Figura 239. Gráfico IC_{50} de 3 en A-431.

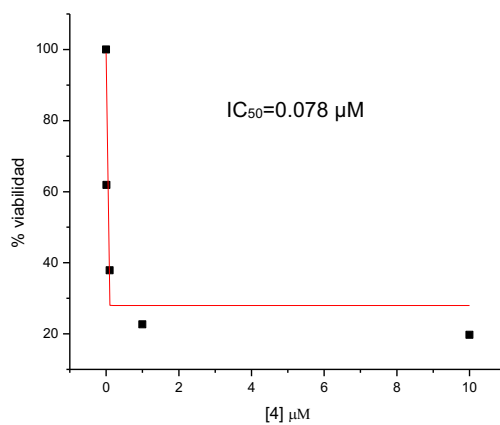


Figura 240. Gráfico IC_{50} de 4 en A-431.

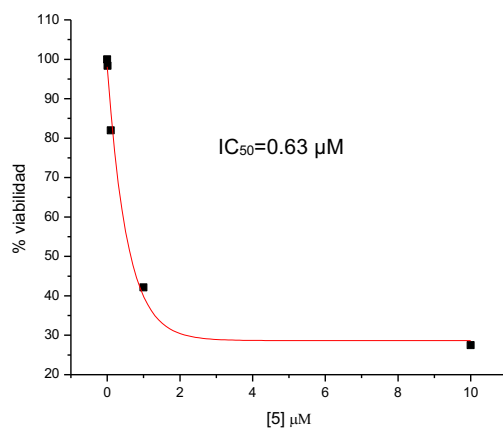


Figura 241. Gráfico IC_{50} de 5 en A-431.

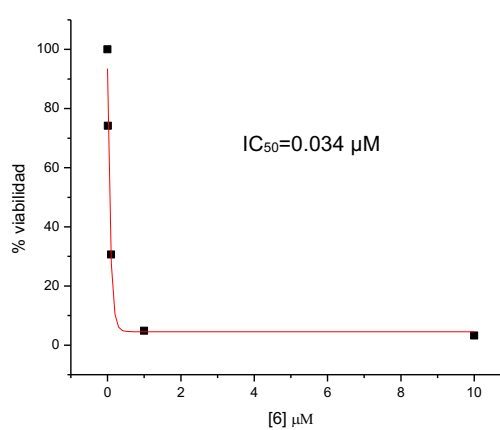


Figura 242. Gráfico IC_{50} de 6 en A-431.



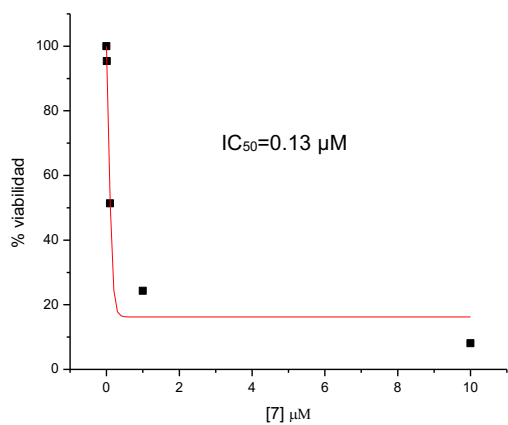


Figura 243. Gráfico IC_{50} de 7 en A-431.

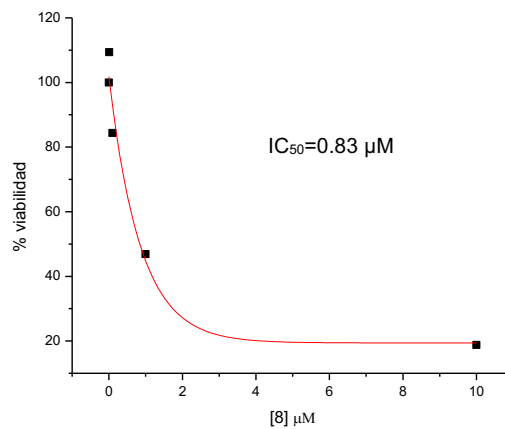


Figura 244. Gráfico IC_{50} de 8 en A-431.

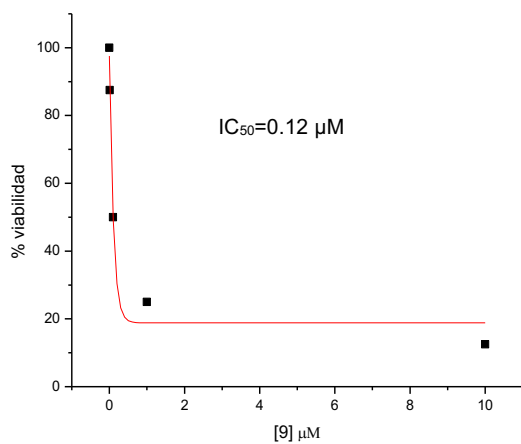


Figura 245. Gráfico IC_{50} de 9 en A-431.

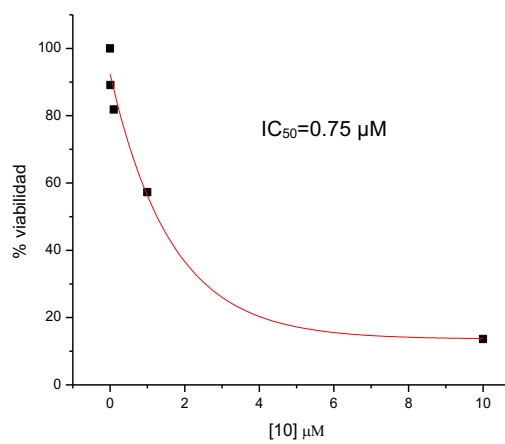


Figura 246. Gráfico IC_{50} de 10 en A-431.

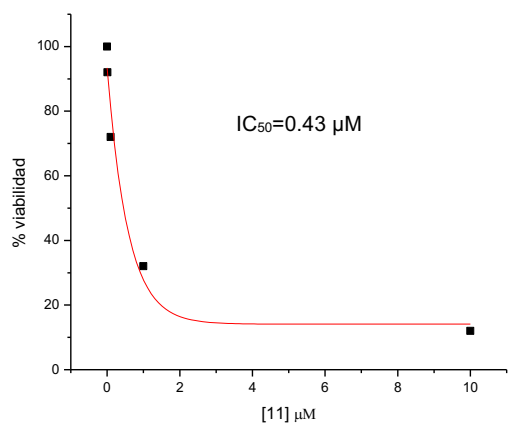


Figura 247. Gráfico IC_{50} de 11 en A-431.

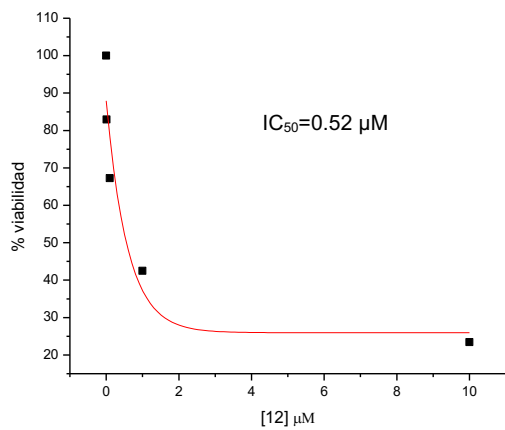


Figura 248. Gráfico IC_{50} de 12 en A-431.



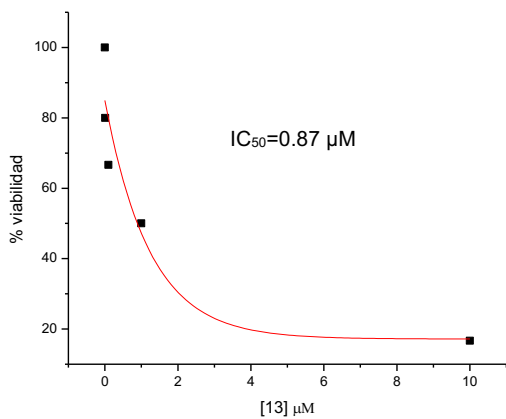


Figura 249. Gráfico IC₅₀ de 13 en A-431.

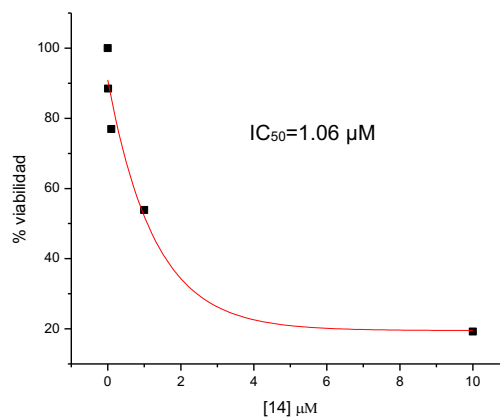


Figura 250. Gráfico IC₅₀ de 14 en A-431.

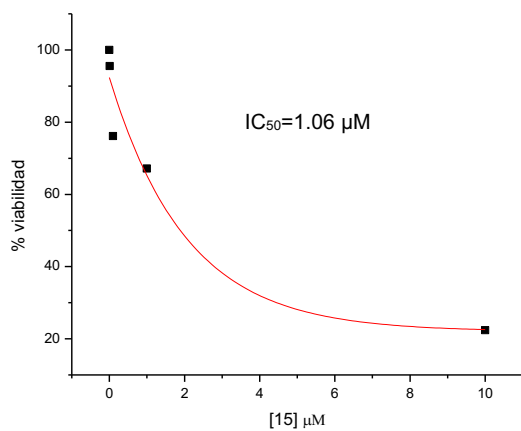


Figura 251. Gráfico IC₅₀ de 15 en A-431.

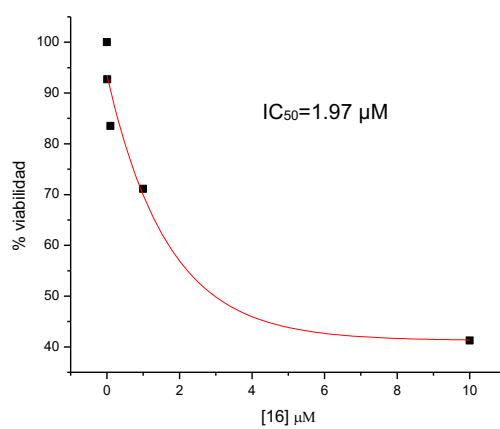


Figura 252. Gráfico IC₅₀ de 16 en A-431.

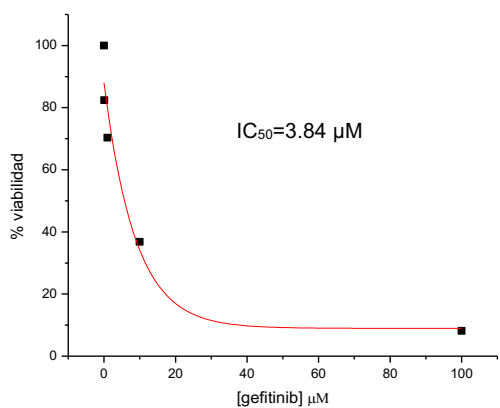


Figura 253. Gráfico IC₅₀ de gefitinib en A-431.



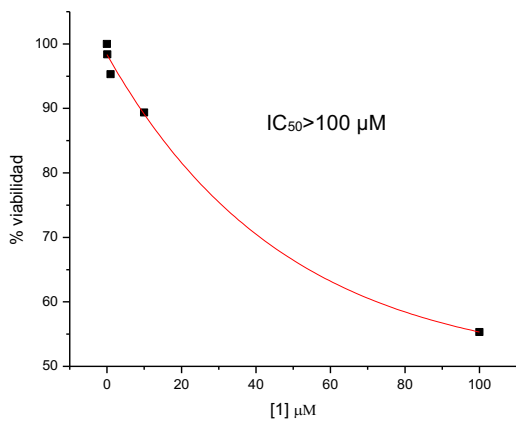


Figura 254. Gráfico IC_{50} de 1 en HaCaT.

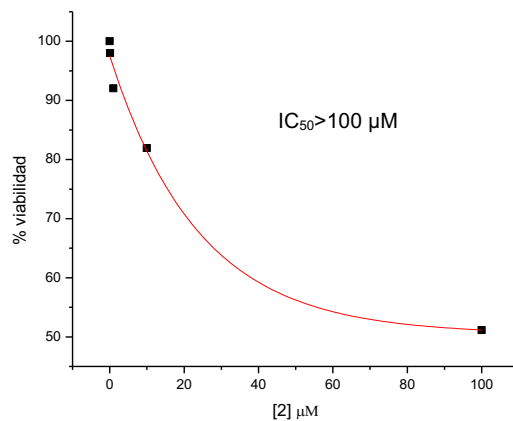


Figura 255. Gráfico IC_{50} de 2 en HaCaT.

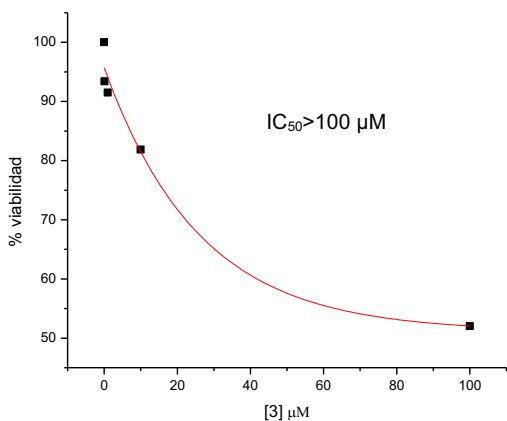


Figura 256. Gráfico IC_{50} de 3 en HaCaT.

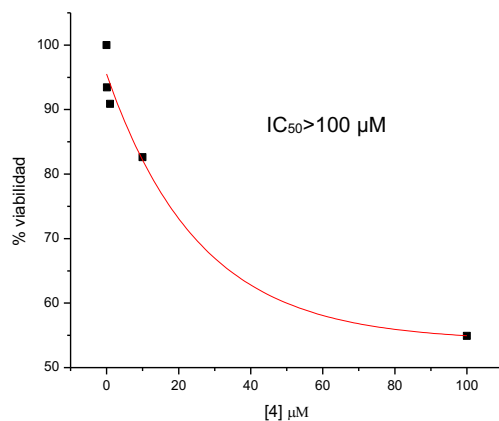


Figura 257. Gráfico IC_{50} de 4 en HaCaT.

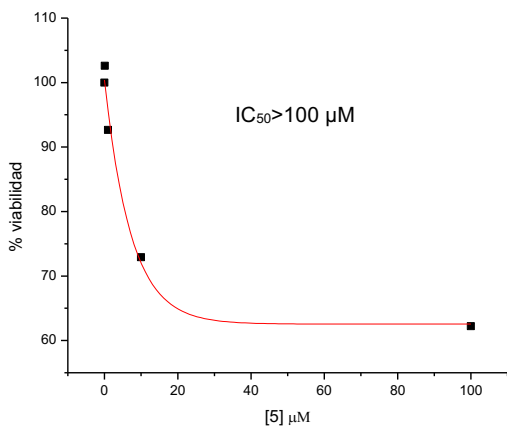


Figura 258. Gráfico IC_{50} de 5 en HaCaT.

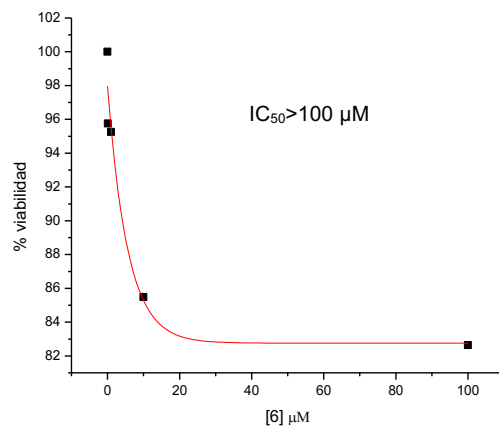


Figura 259. Gráfico IC_{50} de 6 en HaCaT.



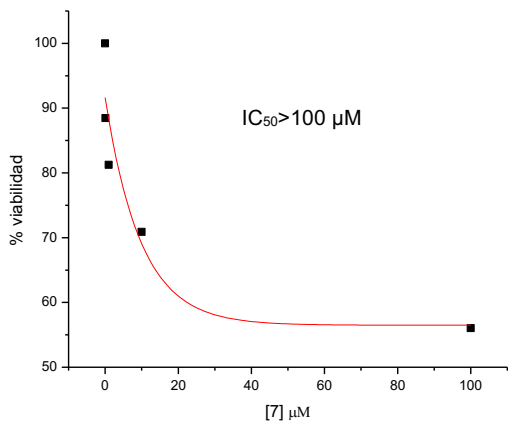


Figura 260. Gráfico IC_{50} de 7 en HaCaT.

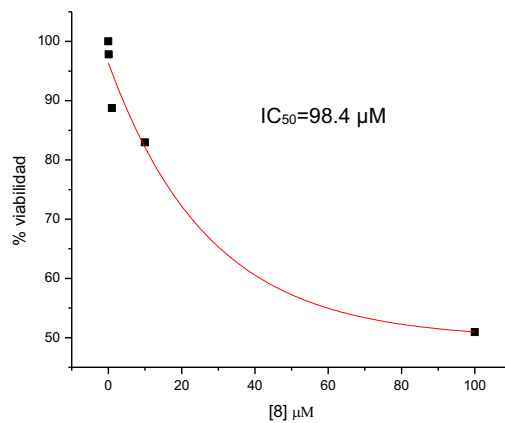


Figura 261. Gráfico IC_{50} de 8 en HaCaT.

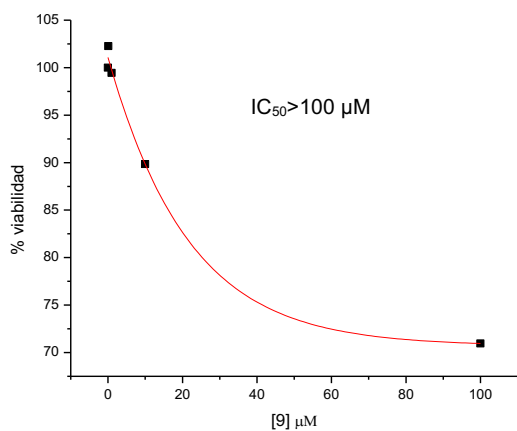


Figura 262. Gráfico IC_{50} de 9 en HaCaT.

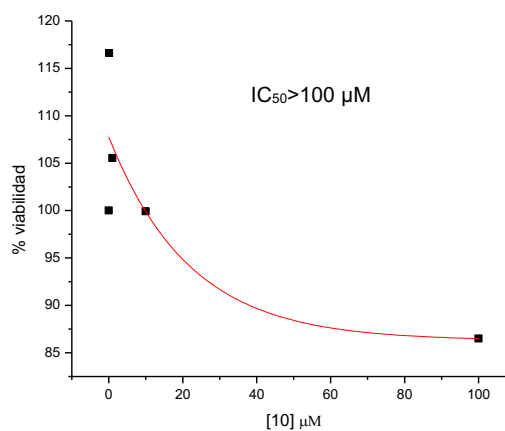


Figura 263. Gráfico IC_{50} de 10 en HaCaT.

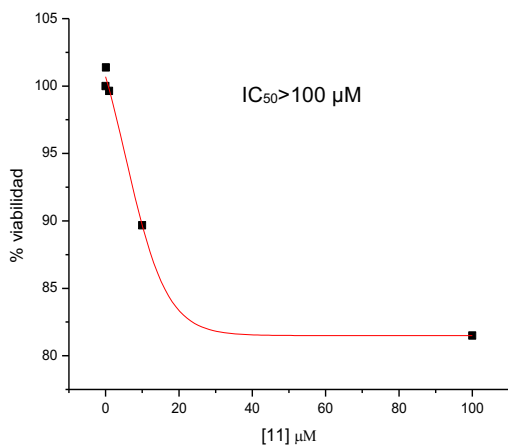


Figura 264. Gráfico IC_{50} de 11 en HaCaT.

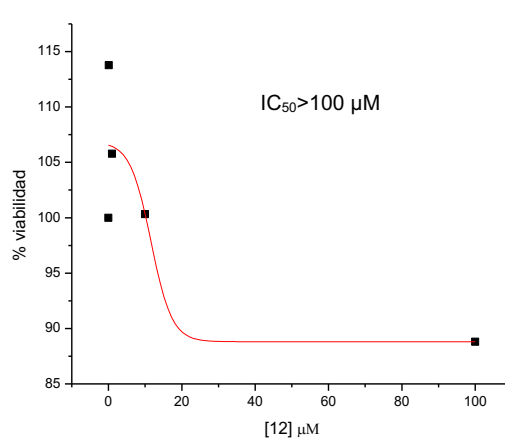


Figura 265. Gráfico IC_{50} de 12 en HaCaT.



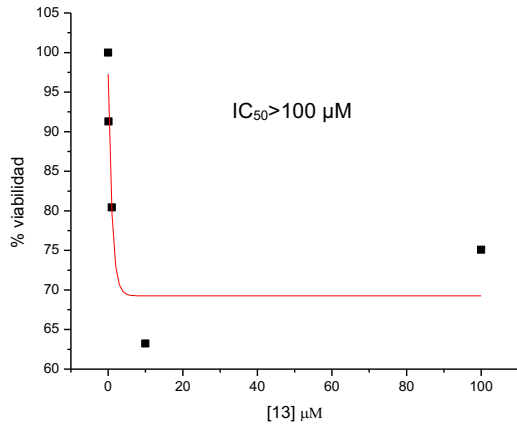


Figura 266. Gráfico IC_{50} de 13 en HaCaT.

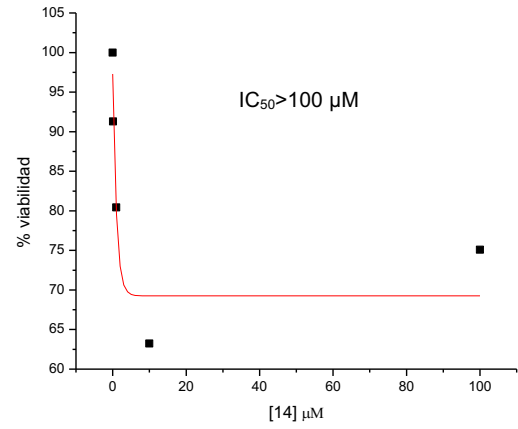


Figura 267. Gráfico IC_{50} de 14 en HaCaT.

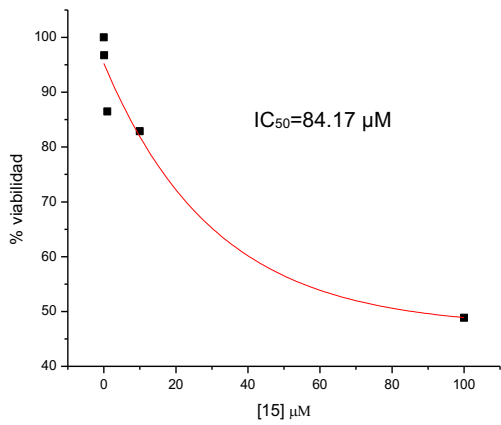


Figura 268. Determinación IC_{50} de 15 HaCaT.

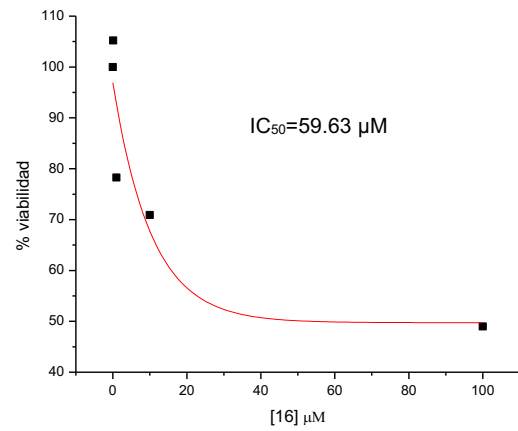


Figura 269. Gráfico IC_{50} de 16 en HaCaT.

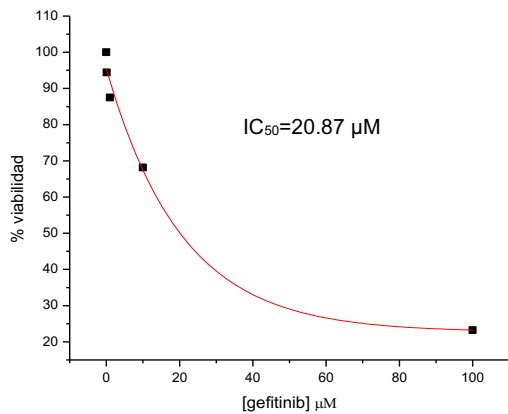


Figura 270. Gráfico IC_{50} de gefitinib en HaCaT.



Compounds Consisting of Quinazoline, Ibuprofen, and Amino Acids with Cytotoxic and Anti-Inflammatory Effects

Luis Roberto Garduño-Villavicencio,^[a] Ulises Martínez-Ortega,^[a] Elizabeth Ortiz-Sánchez,^[b] José Manuel Tinajero-Rodríguez,^[b] and Francisco Hernández-Luis^{*[a]}

In this research work, a series of 16 quinazoline derivatives bearing ibuprofen and an amino acid were designed as inhibitors of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase domain (EGFR-TKD) and cyclooxygenase-2 (COX-2) with the intention of presenting dual action in their biological behavior. The designed compounds were synthesized and assessed for cytotoxicity on epithelial cancer cells lines (AGS, A-431, MCF-7, MDA-MB-231) and epithelial non-tumorigenic cell line (HaCaT). From this evaluation, derivative **6** was observed to exhibit higher cytotoxic potency (IC₅₀) than gefitinib (reference drug) on three cancer cell lines (0.034 μM in A-431, 2.67 μM in MCF-7,

and 3.64 μM in AGS) without showing activity on the non-tumorigenic cell line (> 100 μM). Furthermore, assessment of EGFR-TKD inhibition by **6** showed a discreet difference compared to gefitinib. Additionally, **6** was used to conduct an in vivo anti-inflammatory assay using the 12-O-tetradecanoyl-phorbol-3-acetate (TPA) method, and it was shown to be 5 times more potent than ibuprofen. Molecular dynamics studies of EGFR-TKD revealed interactions between compound **6** and M793. On the other hand, one significant interaction was observed for COX-2, involving S531. The RMSD graph indicated that the ligand remained stable in 50 ns.

Introduction

Cancer is a disease in which certain cells in the body multiply uncontrollably and spread to other parts of the body.^[1] It is a multifactorial complex disorder, and chemotherapy regimens often lead to unsatisfactory results due the drugs presenting various serious and sometimes intolerable toxic limitations. Despite advances that have led to the development of new therapies, cancer continues to be a major health problem worldwide. A lack of selectivity has been a major obstacle for anticancer drug discovery in recent decades.^[2]

In the field of medicinal chemistry, nitrogen-containing heterocyclic compounds have gained particular importance due to their presence in various compounds for clinical use. Within this group, quinazolines represent an attractive scaffold for designing anticancer agents that can act through different molecular targets.^[3] Particularly, some quinazoline derivatives (e.g., gefitinib, erlotinib, afatinib) are well-known potent

inhibitors of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase domain (EGFR-TKD). This receptor is a cellular transmembrane that is over-expressed in a significant number of human tumors (e.g., breast, ovarian, colon, and prostate).^[4] Its expression level is often associated with poor prognosis in patients. Some clinical studies are linked to experiments conducted on cell cultures, suggesting that tumor cell lines that are well-differentiated and display an epithelial phenotype tend to be more responsive to EGFR inhibitors.^[5] Inhibiting the activity of the receptors could block the downstream signaling pathways of growth factors and effectively inhibit tumor growth.^[6]

On the other hand, epidemiological studies have suggested the effectiveness of long-term and regularly-used non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), such as ibuprofen, for preventing and treating certain cancers including prostate, colon, breast, lung, and gastric.^[7] Triggers for chronic inflammation that elevate the risk and progression of cancer include infections or autoimmune diseases.^[8,9] This relationship not only serves as a target for innovative therapeutic and preventive strategies against the disease, but also underscores its significance.^[10] It is known that NSAIDs exert their anti-inflammatory and antitumoral effects by inhibiting the inducible cyclooxygenase-2 (COX-2) enzyme, which is highly expressed in response to tissue injury and inflammation. The association between inflammation and cancer further bolsters the notion that NSAIDs possess antineoplastic activity.^[11]

As seen in the literature, molecular combinations derived from two biologically active molecules can often result in novel hybrid molecules with enhanced biological activities.^[12] The research fields of multitarget drug discovery and polypharmacology have since grown at a remarkable pace, offering new paradigms with potential to overcome some of the major limitations of classic “one target, one drug” strategies.^[13,14]

[a] L. R. Garduño-Villavicencio, U. Martínez-Ortega, Prof. F. Hernández-Luis
Departamento de Farmacia
Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México
Av. Universidad 3000, C.U., Coyoacán, CDMx 04510, Mexico
E-mail: franher@unam.mx

[b] E. Ortiz-Sánchez, J. M. Tinajero-Rodríguez
E. Ortiz-Sánchez, J. M. Tinajero-Rodríguez
Subdirección de Investigación Básica
Instituto Nacional de Cancerología, Secretaría de Salud
Av. San Fernando 22, Belisario Domínguez, CDMx 14080, Mexico

Supporting information for this article is available on the WWW under <https://doi.org/10.1002/cmdc.202300651>

© 2024 The Authors. ChemMedChem published by Wiley-VCH GmbH. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

In the last two decades, a new approach for the rational design of new drug candidates, also called multitarget-directed ligands (MTDLs) strategy, has emerged and has been used in the design and for the development of a variety of hybrid compounds capable to act simultaneously in diverse biological targets.^[15] The design of hybrids was aimed to achieve higher efficacy through possible multi-target interactions, selective delivery of the drug to the site of action with the aim to improve bioavailability, alleviate toxicity and circumvent drug resistances.^[16] In this work, a knowledge-based approach was used to explore MTDL compounds that combines computational tools and known structural information.^[17] Incorporating amino acids into compound structures is often performed to enhance the latter's aqueous solubility, thereby improving its bioavailability. Furthermore, transporters such as PEPT1 have been shown to exhibit an inclination to internalize amino acids into cells.^[18] For example, the amino acid ester prodrug valacyclovir notably enhanced the oral bioavailability of its precursor, acyclovir.^[19] Moreover, reports suggest that gemcitabine prodrugs containing amino acids display superior anti-proliferative activity compared to the original compound in pancreatic cancer cells. Importantly, these prodrugs did not manifest heightened toxicity in non-tumoral MCDK cell lines. Consequently, the utilization of amino acids has also demonstrated a reduction in the toxicity associated with pro-drugs.^[20] Based on the information presented above, we hypothesize that the synthesis of compounds containing a quinazoline scaffold and ibuprofen could potentially result in *in vitro* cytotoxic and *in vivo* anti-inflammatory effects. This hypothesis is underpinned by the anticipated enhancement in aqueous solubility facilitated by the addition of an amino acid.

Results and Discussion

Compound Design

Drawing inspiration from the research conducted by the Xu^[21] research group and the work of Patel,^[22] specific functional groups and pharmacophoric elements were carefully considered to increase the potential inhibitory impact on EGFR. Guided by this rationale, a CADD approach was employed. From the research conducted by the Xu research group (Figure 1A), it was observed that derivatives of 4-anilinoquinazolines exhibit potent and highly selective inhibition of EGFR phosphorylation. This effect stems from their competitive

binding at the ATP-binding site. The researchers outlined various crucial chemical groups necessary for effective receptor binding. The presence of a pyrimidine ring is imperative, while the presence of a free NH functional group, preferably located at the 2-position of the pyrimidine, is optimal for hydrogen bonding. Lipophilic electron-attracting substituents at the 3-position of the aniline, positioned in the 4-position of the quinazoline, can be advantageous. Halogens such as chlorine and bromine are considered optimal in this context. Additionally, electron-donating groups at the 6 and 7 positions of the quinazoline are preferred, as they can form hydrogen bonds with the active site. Their computational studies revealed that the N1 of the quinazoline ring forms a critical hydrogen bond with the NH group of M793. According to their findings, this interaction was identified as indispensable for the inhibition of EGFR. In a 2000 article authored by Wissner *et al.*,^[23] an alternative mode of binding for quinazoline inhibitors with EGFR was reported. According to this mode, the N1 atom of quinazoline-based inhibitors forms a hydrogen bond with the main NH group of M793, and the N3 atom can establish a hydrogen bond mediated by water. The approach employed by the Patel group (Figure 1B) aimed to create ligands with diverse chemical properties by introducing an alternative binding group. For instance, a phenyl ring was added at the 2-position of quinazoline, and a free NH bond at the 4-position of quinazoline was considered, without necessarily deriving it from an aniline. Moreover, electron-donating or electron-attracting groups were positioned at the 6 and 7 positions of quinazoline, with the specific inclusion of Cl at the 7 positions. Recognizing the significance of quinazoline-type inhibitors in their interaction with the M793 residue, the design process focused on ensuring that the newly formulated molecules retained this crucial interaction.

Additionally, there is a significant aspiration to mitigate inflammation within the body, as it creates a microenvironment conducive to tumor development. As previously noted, NSAIDs are responsible for the inhibition of COX-2, an enzyme crucial in the biosynthesis of PGE2 from arachidonic acid – a substance contributing to bodily inflammation.^[24] Non-selective COX-2 inhibitors are included within this category. Ibuprofen, for example, functions by irreversibly blocking COX-2 by hydrogen bonding with S531. This specific interaction was also targeted in the designed compounds. Leveraging the insights from Patel's research, we decided to incorporate the structural motif of ibuprofen at the fourth position of the quinazoline nucleus through an amide linkage. This arrangement ensures the presence of a free NH functional group, thereby preserving the cytotoxic impact of quinazoline while augmenting the *in vivo* anti-inflammatory influence of ibuprofen. Compounds 1–6 were synthesized using (*S*)-ibuprofen and the racemic mixture of ibuprofen to explore whether stereochemistry plays a pivotal role in their activity. Conversely, for compounds 7–16, (*S*)-ibuprofen was positioned at the sixth position of the quinazoline structure, while still maintaining the NH linkage at the fourth position. Several amino acids were introduced to establish aliphatic C–N bonds. For compounds 1–6, β -alanine was utilized to generate an amide linkage at the sixth position

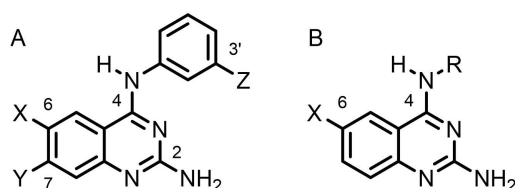


Figure 1. Pharmacophore structures from the research groups of Xu (A) and Patel (B) were employed as references for the molecular design in the present study.

of the quinazoline scaffold. The rationale behind incorporating amino acids into the molecular structures of these compounds revolves around the aim to improve aqueous solubility by forming zwitterions.

In the context of the binding site's intracellular location, Lipinski's, and Veber's rules (as shown in Table S1) were also considered. Accordingly, the compounds depicted in Figure 2 were proposed.

Several chemical descriptors were considered, including polar surface area ($\leq 150 \text{ \AA}^2$), molecular weight ($\leq 500 \text{ Da}$), hydrogen bond donors (≤ 5), hydrogen bond acceptors (≤ 10), rotatable bonds (≤ 10), and LogP (≤ 5), to assess their likelihood of fulfilling these criteria.

Molecular Docking Studies

To establish the reliability and effectiveness of the method in this study, validation was conducted on both pharmacological

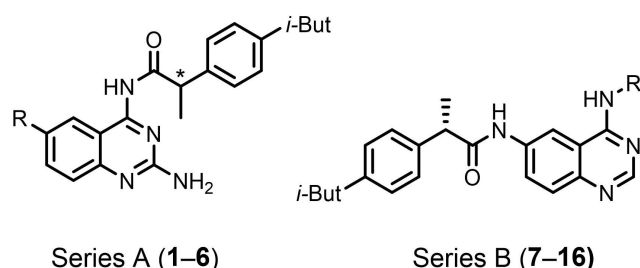


Figure 2. Proposed compounds as EGFR inhibitors and anti-inflammatory agents. Series A. R: NO₂, NH₂, β-alanine, *: R,S or S. Series B. R: β-alanine, leucine, histidine, PABA, asparagine, glutamic acid, tryptophan, glutamine, alanine, phenylalanine.

Table 1. Molecular docking results in EGFR.				
Series	Compounds	ΔG (kJ/mol)	Cluster	Interactions
A	1	−6.85	21	K745, E762, M793
	2	−6.11	27	M793, T854
	3	−6.22	15	M793
	4	−6.66	19	K745, M793
	5	−7.12	15	M793, D800, T854
	6	−7.85	22	E762, M793
B	7	−6.29	10	K745, M793
	8	−6.73	11	M793
	9	−6.75	11	K745, D837
	10	−6.81	28	K745
	11	−7.03	16	K745, N842, G857
	12	−6.46	13	K745, M793
	13	−7.34	5	K745, D855
	14	−6.18	11	K745, G857
	15	−6.62	38	K745, M793
	16	−6.78	11	K745, M793
		gefitinib	−8.12	30

targets. EGFR (4WKQ) was docked with gefitinib, while COX-2 (5JW1) was docked with celecoxib. The RMSD values for EGFR and COX-2 validation were 0.756 and 0.525 Å, respectively. In both instances, the values below 2.0 Å signify the method's validity, according to the literature (Figure S1). To ascertain which molecules were suitable for synthesis, we employed the criterion of a ΔG value lower than −5 kJ/mol. The outcomes for EGFR are presented in Table 1. Most ligands were observed to interact with M793, which was a sought-after contact throughout the study. Furthermore, a noteworthy interaction was observed with K745, which is prevalent in compounds of series B, like gefitinib, except for 8. Regarding binding energy, gefitinib displayed a value of −8.12 kJ/mol, while 6 exhibited a value of −7.85 kJ/mol, showcasing an energy profile closest to gefitinib.

Since 6 displayed the most favorable energetic profile, Figure 3 depicts the interactions present in the EGFR binding site. Notably, a dual hydrogen bond is formed between E762 and the amine group of the β-alanine segment, underscoring the significance of incorporating a functional group capable of hydrogen bonding at the sixth position of the quinazoline structure. Furthermore, an additional dual hydrogen bond is observed between M793 and the N1 atom, as well as an amino group at the second position of the quinazoline. Noteworthy, compounds 2, 4, and 6, which were constructed using the S isomer of ibuprofen, demonstrated a more favorable energetic profile compared to compounds 1, 3, and 5, which were constructed with the racemic mixture of ibuprofen. This implies that the stereogenic center plays a significant role in the interaction with the receptor. The formation of four hydrogen bonds with the active site could contribute to the observed differences in ΔG values. When compared to other molecules such as compound 14, it is evident that no interaction with M793 was formed, despite retaining interactions with Lys745 and G857 (Figure S2). As a result, compound 14 exhibits a lower energy profile with a value of −6.18 kJ/mol,

Similarly, molecular docking was conducted for COX-2. In this case, (S)-ibuprofen served as the reference drug. The outcomes are outlined in Table 2. Noticeably, considering that the primary target of interaction in COX-2 is S531, as indicated in the preceding table, numerous compounds were observed to exhibit this contact. However, other compounds showed

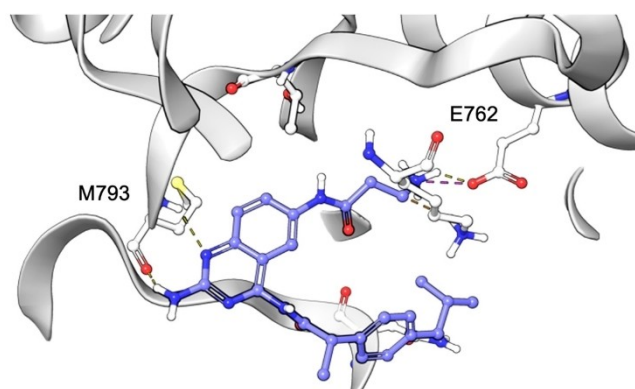


Figure 3. Ribbon representation of molecular docking between 6 and EGFR.

Series	Compounds	ΔG (kJ/mol)	Cluster	Interactions	
A	1	-5.94	24	V117, S120, R514	
	2	-6.20	40	S120, R514, E525	
	3	-5.71	18	S120, E525	
	4	-5.76	36	E525	
	5	-5.73	35	L353, R514, S531	
	6	-6.59	28	L353, G527, S531	
B	7	-5.52	17	M523	
	8	-5.88	14	L353, Y386, S531	
	9	-6.34	14	V117, R121	
	10	-5.43	25	S120, R121	
	11	-5.77	23	L353, Y386, S531	
	12	-5.64	13	S531	
	13	-5.46	10	L353, S531	
	14	-6.23	20	Q193, F519, S531	
	15	-5.09	19	Q351	
	16	-5.41	12	S531, G520	
		(S)-ibuprofen	-3.59	30	Y386, S531

engagement with V117, S120, R121, L353, and/or E525, leading to a greater diversity in the interactions observed within this study.

Figure 4 illustrates the pose and interactions of compound 6 in COX-2. Notably, a hydrogen bond is formed between S531 and the carbonyl oxygen at the fourth position of the quinazoline structure. Additionally, a dual hydrogen bond interaction occurs involving L353 and both the amine and amide of the β -alanine segment. Lastly, a hydrogen bond is observed between the amine at the second position of the quinazoline and G527. Like EGFR, 6 displayed the most favorable energy profile in COX-2 docking, with a ΔG of -6.59 kJ/mol. Interestingly, this value was even more favorable than that obtained with (S)-ibuprofen, which showed a ΔG of -3.59 kJ/mol. However, this

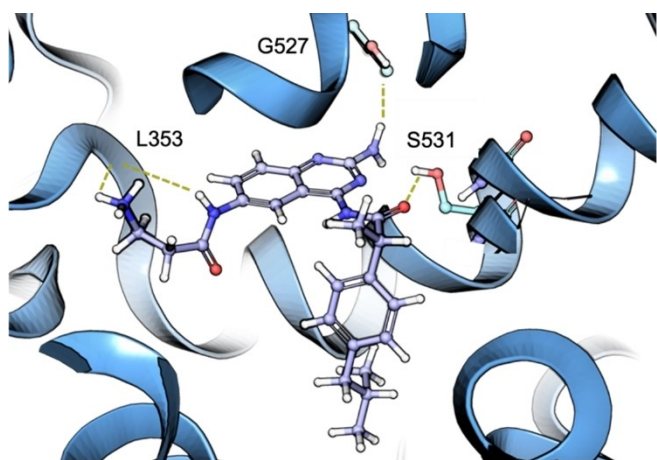


Figure 4. Ribbon representation of molecular docking between 6 and COX-2.

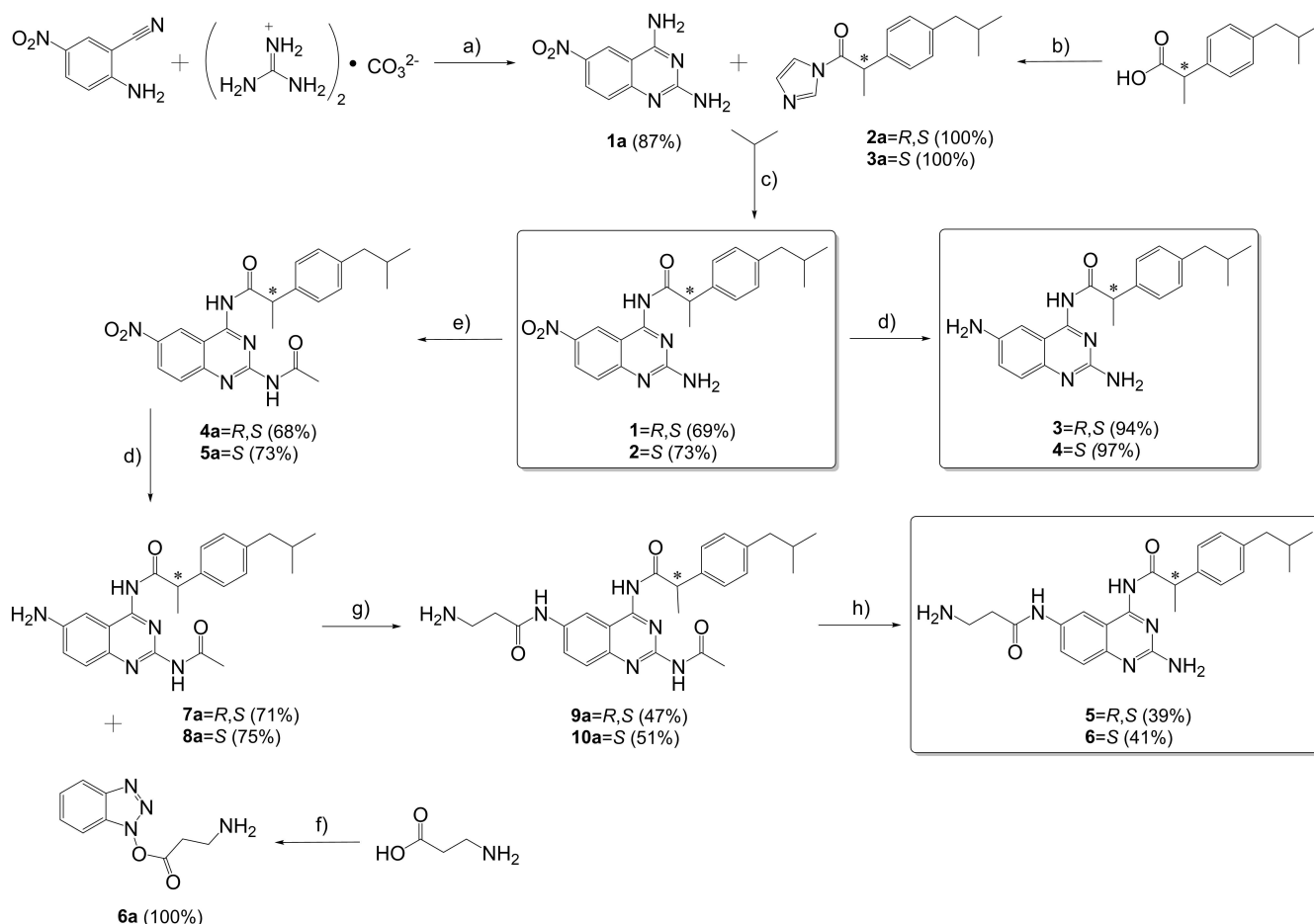
trend of more negative binding energy values compared to (S)-ibuprofen was consistent across all ligands. Compound 15 obtained the least negative value in terms of binding energy and exhibited only one hydrogen bond interaction between Q351 and the carbonyl oxygen at the fourth position of the quinazoline structure. Moreover, it did not show an interaction with S531 (Figure S3).

Once again, compounds 2, 4, and 6, which involve the S isomer of ibuprofen, displayed a more favorable binding energy compared to 1, 3, and 5. This reaffirms the significance of the stereogenic center in influencing binding affinity.

Compound Synthesis

Compounds 1–6 (Series A) were prepared in accordance with Scheme 1. The synthesis of the quinazoline core (1a) was initiated by employing 2-amino-5-nitrobenzonitrile and guanidine carbonate within a basic medium. To activate ibuprofen, either the racemic mixture or the S isomer (2a, 3a), CDI was utilized. Compounds 1 and 2 were then synthesized by reacting 1a with 2a or 3a in DMF. Catalytic reduction of 1 and 2 using palladium and ammonium formate yielded compounds 3 and 4. Intermediates 4a and 5a were obtained by acetylating compounds 1 and 2 with acetic anhydride. Activation of β -alanine was performed using PyBOP and DIPEA to produce intermediate 6a. Following the previously described reaction conditions, the catalytic reduction of intermediates 4a and 5a was executed to yield compounds 7a and 8a. To create the amide at the sixth position of the quinazoline (9a, 10a), 6a was reacted with 7a or 8a in DMF. The deacetylation of intermediates 9a and 10a was carried out using LiH and MeOH, leading to the formation of compounds 5 and 6. To pinpoint the location of amide formation at position 4 of quinazoline, a NOESY spectrum was conducted for molecules 1 and 2 (Figure S4). The rationale behind the formation of 1 and 2 can be elucidated through resonance hybrid structures (Figure S5). For the amine at position 2, a resonance structure exists where the aromaticity of both rings in the quinazoline core is disrupted. This disruption compels the free pair of electrons on the amine to counterbalance the resulting charge, thus rendering it less accessible for nucleophilic attacks. Moreover, the formed imine exhibits a more acidic character rather than a basic one. This effect is further amplified by the presence of a nitro group, which withdraws electron density from the core and consequently affects the availability of the free pair of electrons in the amine at position 2.

Similar to the synthesis of 5 and 6, competition between the amines at positions 2 and 6 was observed in the quinazoline structure. As a result, a strategic decision was made to acetylate the amine at position 2 of 1 and 2 using acetic anhydride, followed by the subsequent formation of the amide at position 6 using β -alanine. To execute the hydrolysis at position 2 of the quinazoline, lithium hydride in methanol was employed. The formation of MeOLi made possible the methanolysis of the amide linkage. Lithium hydride exhibits a preference for reacting with the carbon of the carbonyl group, which is an



Scheme 1. Synthesis of 1–6. Reagents and conditions: (a) KOH, EtOH/*n*-PrOH; (b) CDI, N₂, CHCl₃; (c) DMF/CHCl₃, N₂; (d) HCO₂NH₄, Pd/C, MeOH; (e) acetic anhydride; (f) PyBOP, DIPEA, N₂, CH₂Cl₂; (g) DMF/CH₂Cl₂, N₂; (h) LiH, MeOH.

electrophile. The yields of 5 and 6 were relatively low (39% and 42%, respectively) due to concurrent hydrolysis occurring at positions 4 and 6 of the amides. Consequently, a decision was taken to lower the temperature and reduce the reaction time to mitigate this issue. Although amides theoretically have comparable reactivity, the primary rationale behind the hydrolysis predominantly occurring at position 2 lies in the presence of nitrogen atoms at positions 1 and 3. These nitrogen atoms withdraw electron density from the carbon at position 2, thereby prompting the nitrogen of the amide to compensate by donating its free pair of electrons. When the lone pair on nitrogen gets delocalized the ring, its delocalization to the carbonyl becomes less. This could increase the electrophilicity of the carbonyl carbon. Furthermore, the acetyl group is smaller when contrasted with the amides at positions 4 and 6, resulting in diminished steric hindrance at position 2 (Figure S6).

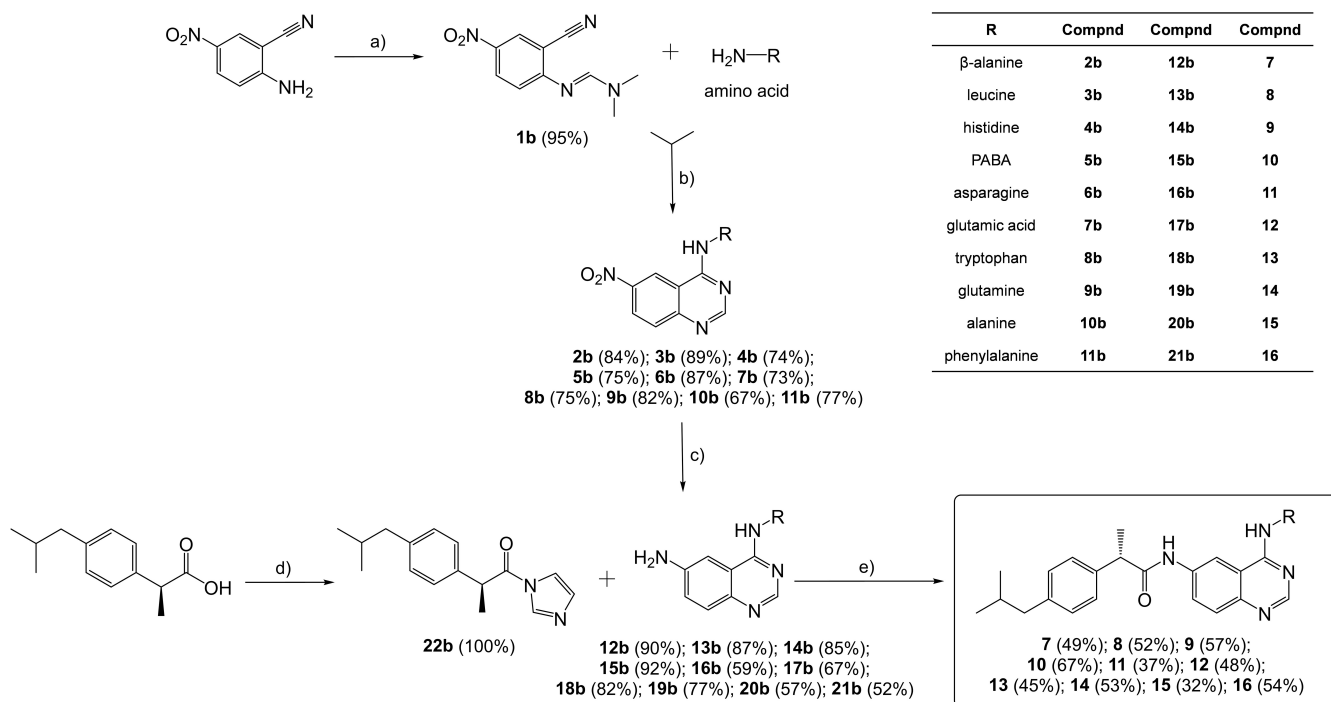
Synthesis of compounds 7–16 (Series B) followed Scheme 2. The preparation of compound 1b was achieved by reacting 2-amino-5-nitrobenzonitrile with DMF-DMA in MeOH. The formation of the quinazoline core conjugated with the respective amino acids was accomplished by reacting 1b with β-alanine, leucine, histidine, PABA, asparagine, glutamic acid, tryptophan, glutamine, alanine, or phenylalanine. This resulted in the

generation of intermediates 2b–11b. To proceed, the reduction of the NO₂ group was performed under the specified conditions, yielding intermediates 12b–21b. The activation of (S)-ibuprofen was conducted utilizing the conditions established for the synthesis from series A, resulting in compound 22b. The formation of the amide at position 6, for the synthesis of compounds 7–16, was accomplished by reacting the respective intermediates 12b–21b with 22b in DMF.

Biological Evaluation

EGFR Expression on Cancer Cells

Staining procedure was analyzed by flow cytometry (Figure 5). Among the cell lines, the AGS gastric cancer cell displayed the highest EGFR expression, followed by non-tumorigenic HaCaT cells, the A-431 skin cancer cells in the third position, then MCF-7 breast cancer cells, and finally another breast cancer cells, MDA-MB-231, with significantly lower EGFR expression. The percentage of EGFR expression in each cell line is shown in Figure 5A. While this parameter can aid in establishing correlations between cytotoxic effects and the quantity of cells



Scheme 2. Synthetic route for preparation of 7–16. Reagents and conditions: (a) DMF-DMA, MeOH; (b) CH₃CN/CH₃CO₂H; (c) HCO₂NH₄, Pd/C, MeOH; (d) CDI, N₂, CHCl₃; (e) DMF/CHCl₃, N₂.

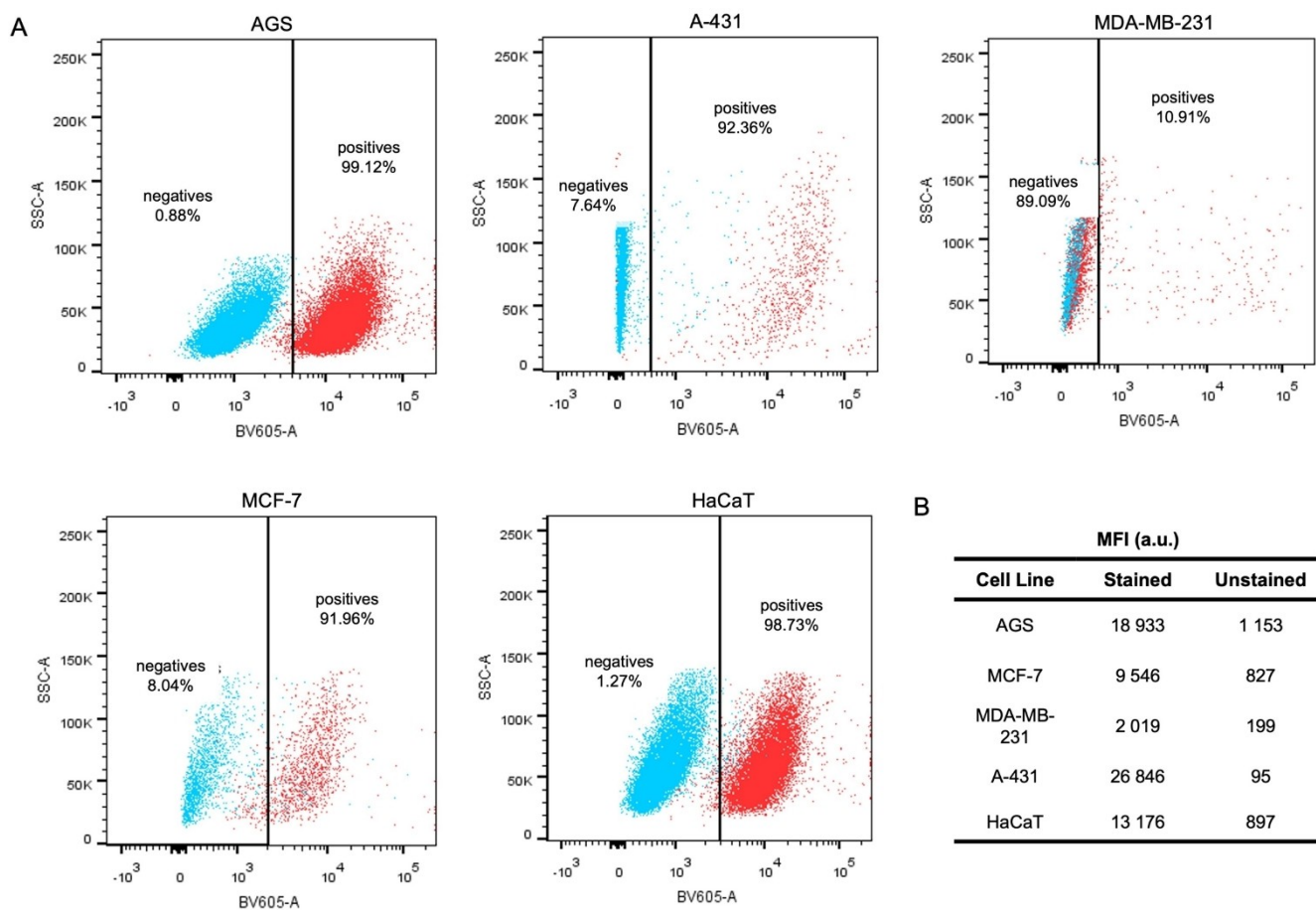


Figure 5. Study of EGFR expression. (A) Histograms with the percentage of EGFR expression in cell lines. (B) MFI values of stained and unstained cell lines.

expressing EGFR, its implications are not conclusive. This is due to the possibility that even if the receptor is expressed, it might not be readily accessible in the extracellular domain to engage with its endogenous ligand and exert a proliferative impact. Moreover, it's essential to recognize that the design of the molecules focused on inhibiting EGFR within the intracellular domain. An initial activation outside the cell is necessary for the release of the tyrosine kinase segment within the cell. This activation enables the receptor to be inhibited at the same binding site as ATP. However, despite acknowledging that the quantity of expressed EGFR may not definitively correlate with the cytotoxicity levels of the compounds in the cells, another parameter can be extracted from the staining data – namely, the mean fluorescence intensity (MFI). MFI values were determined from both stained and unstained cells, and the results are displayed in Figure 5B. It is important to note that cells inherently emit fluorescence, but when the antigen-antibody reaction takes place, the fluorescence intensity – attributed to the fluorochrome linked to the antibody – increases leading to higher values. It is worth clarifying that variations in both the quantity of expressed EGFR and the MFI value can arise based on the number of passages employed; nonetheless, the trends among the cell lines should remain consistent.

Based on the data, the Mean Fluorescence Intensity Index (MFII) was calculated by dividing the MFI of stained cells by the MFI of unstained cells. This was performed to evaluate the available EGFR quantity in each cell line and establish a connection with the cytotoxic effect. Notably, there was a noticeable disparity in EGFR quantities among the different cell lines. The A-431 cell line displayed the highest MFII value at 280.81, followed by 16.42 for AGS, 14.69 for HaCaT, 11.54 for

MCF-7, and finally 10.04 for MDA-MB-231. Considering that HaCaT cells represent non-tumorigenic cells, one might intuitively assume that they should possess a lower amount of available EGFR in comparison to tumor cells. However, in non-tumorigenic cell lines, even if there is an initial activation in the extracellular domain, the tyrosine kinase tails within the cells remain mostly inactive. As a result, ATP does not trigger the autophosphorylation reaction, and the signaling cascades leading to cell proliferation are not consistently activated. The order of MFII is crucial, as higher MFII values are anticipated to correspond to lower IC₅₀ values of the compounds. Importantly, MFI or MFII values do not directly indicate the quantity of EGFR in the cells.

Cancer Cell Viability

The IC₅₀ value of 1–16 were determined on cancer cells 24 h after adding the treatment, testing the cell lines described above using gefitinib as a control to induce cell death. The results are presented in Table 3. All the compounds exhibited greater potency than gefitinib in A-431 for cell viability inhibition, which has an overexpression of EGFR. In general, compounds from series A demonstrated higher cytotoxicity compared to those from series B. This observation aligns with the findings from molecular docking studies, where compounds from series A appeared to form a hydrogen bond with the amine at position 2 of the quinazoline nucleus. In contrast, compounds from series B do not form the same interaction, due to a hydrogen atom at position 2 and its presence on an aromatic carbon. Among compounds 1–6, the molecules synthesized using the *S* isomer of ibuprofen displayed lower

Table 3. IC₅₀ values obtained for compounds 1–16 and gefitinib in cell lines.

Compound	IC ₅₀ (μM)				
	AGS	A-431	MCF-7	MDA-MB-231	HaCaT
1	15.26 ± 1.15	0.11 ± 0.01	7.62 ± 0.54	26.81 ± 1.76	> 100
2	11.41 ± 0.98	0.067 ± 0.001	7.01 ± 0.67	21.23 ± 2.07	> 100
3	6.28 ± 0.78	0.11 ± 0.02	5.68 ± 0.45	31.36 ± 2.76	> 100
4	4.82 ± 0.23	0.078 ± 0.001	4.26 ± 0.52	27.81 ± 2.32	> 100
5	5.83 ± 0.73	0.63 ± 0.04	6.04 ± 0.68	20.72 ± 1.79	> 100
6	3.64 ± 0.45	0.034 ± 0.003	2.67 ± 0.19	10.51 ± 0.99	> 100
7	16.54 ± 1.34	0.13 ± 0.02	12.14 ± 1.12	18.31 ± 1.43	> 100
8	14.42 ± 1.24	0.83 ± 0.11	8.29 ± 0.34	13.42 ± 1.76	98.42 ± 4.87
9	23.01 ± 2.08	0.12 ± 0.001	13.03 ± 1.43	27.88 ± 1.47	> 100
10	28.82 ± 2.45	0.75 ± 0.07	12.32 ± 0.98	32.96 ± 2.87	> 100
11	15.64 ± 1.89	0.43 ± 0.03	11.29 ± 1.23	34.92 ± 2.91	> 100
12	22.09 ± 2.93	0.52 ± 0.06	17.98 ± 1.87	29.68 ± 2.56	> 100
13	30.47 ± 2.36	0.87 ± 0.09	12.69 ± 0.64	26.32 ± 2.31	> 100
14	23.10 ± 2.76	1.06 ± 0.12	10.87 ± 0.69	30.15 ± 3.29	> 100
15	40.57 ± 3.14	1.6 ± 0.17	14.08 ± 1.12	26.72 ± 2.11	76.91 ± 6.89
16	27.74 ± 2.89	1.97 ± 0.23	9.16 ± 0.79	23.85 ± 1.89	84.17 ± 5.98
gefitinib	23.87 ± 2.35	3.84 ± 0.34	11.27 ± 1.32	17.24 ± 1.48	49.63 ± 4.89

IC₅₀ values in the cells. These molecules include **2**, **4**, and **6**. This emphasizes the significance of the stereochemical center on the molecule's biological effect. While **1**, **3**, and **5** demonstrate substantial potency compared to the control, the utilization of the racemic mixture of ibuprofen might potentially diminish the effect. This could lead to the disruption of specific interactions with the receptor or alterations in the spatial arrangement of substituents on the stereogenic carbon, which could affect the interaction sterically. Within series A, it is evident that compounds nitrated at position 6 exhibit a weaker effect compared to molecules with an amine in the same position. Moreover, owing to their higher LogP values, they might possess an enhanced ability to permeate the cell membrane and execute their intended action. Compounds **5** and **6** demonstrated the highest effect within series A and more generally across all molecules. These compounds feature the amino acid β-alanine at position 6 of the quinazoline nucleus, contributing to greater solubility due to the presence of the free aliphatic amine. This characteristic facilitates their cellular uptake. Additionally, as observed in the molecular docking, the amino acid segment of these compounds engages in a dual hydrogen bond formation, one with E762 and another with M793. This dual hydrogen bonding could contribute to the increased stability of these molecules at the active site, resulting in heightened potency. On the other hand, molecules in series B displayed more varied IC₅₀ values. As mentioned earlier, although **7** to **16** were more potent than gefitinib in A-431 cells, only **8** exhibited a stronger effect than gefitinib across all cell lines. However, all molecules in series B showcased competitive values with gefitinib. The reduced cytotoxicity of series B could be attributed to the absence of a hydrogen bond-forming amine at position 2 on the quinazoline nucleus. This functional group plays a crucial role in interacting with the receptor. This interaction was absent in compounds **7** to **16**.

Furthermore, adhering to Veber's parameters, within series B, **8**, **9**, **11**, **12**, **13**, **14**, and **16** exceeded the permissible number of rotatable bonds due to the presence of sp³ carbons, primarily situated within the amino acid portion of the molecule. This increased structural complexity might impede the ligand's effective interaction with the receptor, potentially leading to a reduced overall effect. Introducing amino acids into the structures was intended to enhance the aqueous solubility of the molecules, which was successfully achieved. Nevertheless, this addition also introduces greater flexibility due to the increased degrees of freedom in this portion of the molecules.

Compound **6** displayed the highest cytotoxicity among all the compounds, exhibiting 6.5, 112.9, 4.2, and 1.7-times greater effect than gefitinib in AGS, A-431, MCF-7, and MDA-MB-231, respectively. This pattern also aligns with the outcomes of the molecular docking, where **6** demonstrated the lowest ΔG value across the entire series of compounds. However, it is noteworthy that gefitinib showed a lower ΔG value, which does not correspond to the cytotoxicity results in which gefitinib exhibited less cytotoxicity than **6**. This discrepancy could be explained by the potential for **6** to possibly engage in inhibiting another receptor associated with cell proliferation, in addition to targeting EGFR. Moreover, the observation that

gefitinib presents a lower ΔG value while not aligning with the trend in cancerous cell lines implies that this compound is involved not only in cytotoxic processes but also in cell proliferation within non-tumorigenic cells. This is supported by the observed toxic effect in HaCaT cells. Of note, all synthesized compounds demonstrated lower toxicity than gefitinib, which exhibited an IC₅₀ of 49.63 μM. Among the compounds, values below 100 μM were achieved by **8**, **15**, and **16**, although the value for **8** was 98.42 μM. Compounds with values exceeding 100 μM do not necessarily imply non-toxicity; rather, this indicates that at this concentration – the highest tested – they did not manifest an effect.

This observation is particularly significant, as managing adverse effects is an important challenge in cancer treatment. Furthermore, there is an inversely proportional relationship between MFI and IC₅₀ – as the MFI value increases, a compound's IC₅₀ value decreases. This suggests that the compounds may act by inhibiting EGFR.

IC₅₀ determination in EGFR

As **6** displayed the most pronounced cytotoxic effect across cell lines, a decision was made to conduct an *in vitro* assay on EGFR using the ADP-Glo® kit (Promega). The primary objective was to ascertain whether this compound inhibits the receptor and to determine its IC₅₀ value. Once again, gefitinib was employed as a control due to its established inhibition of EGFR at the tyrosine kinase site. The assay involved conducting serial decimal dilutions spanning a range of 50 to 0.0005 μM. Compound **6** yielded an IC₅₀ value of 0.2396 ± 0.0249 μM, rendering it approximately 8 times less potent than gefitinib, which registered an IC₅₀ value of 0.02839 ± 0.0095 μM. Despite not sharing identical potency levels, **6** demonstrated the ability to inhibit EGFR, which aligns with the intended purpose of the assay. While these values might not directly correspond with the data obtained from the cell line experiments, this discrepancy can be attributed to the various intricate processes occurring within cells, which cannot be fully replicated in the receptor assay. These processes encompass factors such as drug metabolism and drug efflux pumps, both of which can diminish the compound's effects within cells. Furthermore, metabolites resulting from these processes can contribute to the induced toxicity, thus correlating with the outcomes observed in HaCaT cells. The obtained IC₅₀ value for **6** should not be considered inherently unfavorable, as it offers insights into potential additional effects that might be at play. Molecules resembling ATP, such as gefitinib and the compounds in this study, often exert inhibition on various tyrosine kinase receptors like VEGFR or HER2,^[25] leading to cell death through alternative pathways. Consequently, while the outcomes of this experiment propose that **6** indeed acts by inhibiting EGFR, the cytotoxicity data suggests its potential involvement in other cellular processes. In contrast, gefitinib primarily focuses on EGFR inhibition. A significant distinction between these two compounds likely stems from the presence of an amine at position 2 in compound **6**. Molecular docking indicates that while both

compounds maintain the hydrogen bond between N1 in the quinazoline ring and M793, the amine at position 2 of **6** forms an additional hydrogen bond with this residue. This interaction potentially weakens the bond with N1, as the interaction with M793 becomes shared between different parts of the compound. In the case of gefitinib, the absence of a substituent at position 2 other than hydrogen might result in a more favorable interaction, promoting stable binding to the binding site. The observed binding energies in molecular docking for **6** and gefitinib mirror the trend seen in the inhibition of EGFR. Compound **6**, with a less negative ΔG , displayed a higher IC_{50} value, while gefitinib, with a more negative ΔG , demonstrated a lower IC_{50} value.

Considering the outcomes in HaCaT cells and the restricted availability of the tyrosine kinase domain of EGFR in healthy cells for autophosphorylation reactions, the findings regarding EGFR indicate that gefitinib's impact on the receptor could be by means of remaining tightly bound to the active site for a prolonged period. This prolonged binding might lead to toxicity by hindering healthy cells from effectively conducting their proliferative and homeostatic functions. It is worth noting that achieving high inhibition results is not always desirable, as this implies that the compound's action persists to an extent that could lead to toxicity by interfering with the normal physiological processes of the organism. This aspect is particularly significant when dealing with receptors like EGFR. While these receptors are overexpressed in tumor cells, they also maintain a basal level of expression in healthy cells where they play a role in promoting cell proliferation. Hence, maintaining a balanced approach in modulating receptor activity is crucial to avoiding undesirable outcomes in healthy tissues.

Anti-Inflammatory Assay. Various pathways exist to mitigate inflammation within the body, with one of the extensively studied routes involving the inhibition of COX-2. Compound **6** exhibited the most favorable energy profile in the molecular docking with COX-2, registering a value of -6.59 kJ/mol, in contrast to (*S*)-ibuprofen, which displayed a value of -3.59 kJ/mol. This result suggests that **6** could exhibit a higher inhibition over COX-2. Ibuprofen is a drug known for its anti-inflammatory effects, which are achieved through the inhibition of COX-2. To assess **6** and (*S*)-ibuprofen, a dosage of 1 mg/ear was administered. The summarized outcomes are presented in Table 4.

We observed that **6** reduced edemas by 29.53%, making it 5.2 times more potent than (*S*)-ibuprofen, which only resulted in a 5.62% reduction. This indicates that **6** has a stronger anti-inflammatory effect. Additionally of note is that the concen-

tration required to achieve the effect of **6** was only half of that used for (*S*)-ibuprofen. Furthermore, the molecular docking also revealed an interaction between S531 and the carbonyl oxygen at position 4 of the quinazoline ring in **6**, which is known to be crucial for COX-2 inhibition, much like how ibuprofen functions. While the experimental results are promising and can be related to the theoretical study, a more accurate way to determine if the compound inhibits COX-2 is by directly conducting the assay on the enzyme.

In vivo evaluations, despite having COX-2 present, could find the compound's effects to extend beyond inhibiting the targeted enzyme, potentially involving other pathways contributing to inflammation. This makes it challenging to unequivocally conclude whether the effect solely results from COX-2 inhibition or is influenced by other mechanisms.

Molecular Dynamics Studies

Figure 6 illustrates the dynamic behavior of **6** on the EGFR complex. The RMSD graph (Figure 6A) shows that the complex maintains stability from 10 to 50 ns. However, at around 30 ns, a decreased fluctuation in the system is observed, potentially stemming from a change in ligand conformation. Nevertheless, since RMSD values do not exceed 0.4 nm, the system is considered stable. It is worth noting that before 10 ns, the ligand is in the process of reaching dynamic equilibrium, resulting in lower RMSD values and a more relaxed system. On the other hand, Figure 6B portrays the fluctuations of atoms in **6** within the active site. It is evident that the quinazoline core remains fixed, which is necessary to inhibit EGFR, while greater mobility is observed in the isobutyl portion; however, this does not affect the activity in EGFR. This effect is correlated with the number of degrees of freedom in this segment, which might be causing the fluctuations observed in the RMSD graph. Additionally, it was noticeable that in the β -alanine segment, despite being aliphatic, less movement was exhibited. This is likely due to the double hydrogen bond formation, as indicated by molecular docking, which results in a firmer binding within the active site. Figure 6C portrays the residues primarily engaged in interactions with the ligand, with K721 being the most prominent, followed by M793, and finally D800. This confirms the presence of the interaction with M793, a critical factor for EGFR inhibition. Lastly, the interaction types between **6** and the residues are depicted in Figure 6D. An interaction with M793 is established through a water bridge, while a smaller portion occurs through hydrogen bonding. Similar interactions are observed with K721 and D800. The ligand remains stable throughout the study duration, maintaining its interaction with M793. This indicates that the complex [**6**/EGFR] is stable. Molecular dynamics simulations were also conducted for gefitinib, with the results illustrated in Figure S7. Molecular dynamics simulations in EGFR revealed that both compounds primarily interact with M793, a crucial residue for receptor inhibition. However, this interaction persists for a longer duration in **6**, which correlates with the cytotoxicity assay results that showed compound **6** to demonstrate a greater

Table 4. Impact of topical application of **6** and (*S*)-ibuprofen at a dosage of 1 mg/ear in mice. *Values with $p \leq 0.05$ were considered statistically significant.

Treatment	Biopsy (mg)	Concentration (M)	Edema Inhibition (%)
TPA	16.00 \pm 0.21	–	–
TPA + 6	11.28 \pm 0.91*	0.12	29.53 \pm 5.70*
TPA + (<i>S</i>)-ibuprofen	15.10 \pm 0.15	0.24	5.62 \pm 0.95

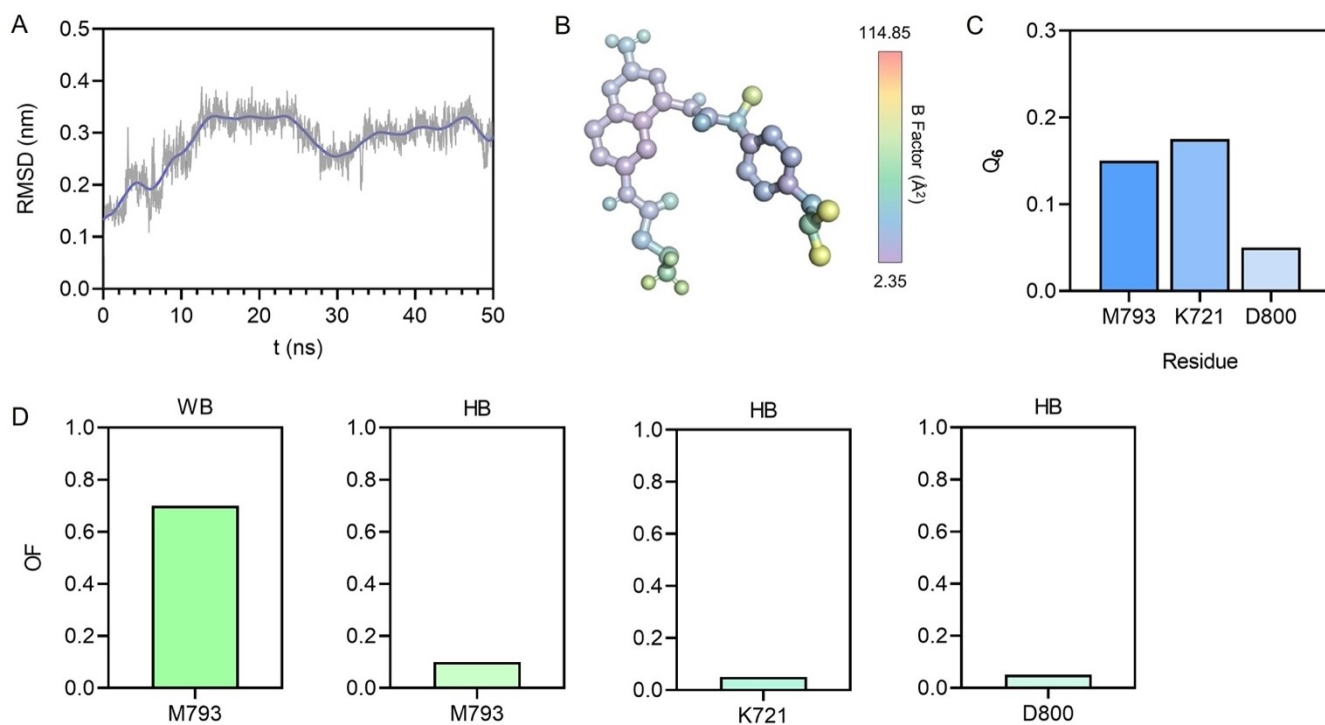


Figure 6. Molecular dynamics of **6** in EGFR. (A) RMSD of **6** computed after least-square fit to EGFR backbone. (B) Depiction of **6** structure color-coded by the B factor computed from the per-atom RMSD data. (C) Fraction of the number of contacts of **6** with the main residues of EGFR (Q_6). (D) Occupancy fraction (OF) of hydrogen bond (HB) and water bridge (WB) interactions between **6** and EGFR.

potency in cell lines. On the other hand, both ligands remained stable during the study period.

A molecular dynamic simulation was also carried out with **6** and (*S*)-ibuprofen on COX-2. For molecule **6**, it can be observed in Figure 7A that the [**6**/COX-2] complex remained stable throughout the study period with RMSD values below 0.3 nm. After 4 ns, there were no significant fluctuations, resulting in the ligand remaining consistently bound to the active site. This behavior is supported by Figure 7B, which shows a low B Factor for **6**, indicating reduced movement at the binding site. Once again, the aliphatic portion of β -alanine and the isobutyl part of ibuprofen exhibit greater mobility. In the case of the β -alanine segment, molecular docking suggests the formation of a double hydrogen bond, restricting movement and maintaining complex stability. Figure 7C indicates that the significant interactions with **6** are primarily with S531, followed by Y386. The main type of interaction is a water bridge with S531, along with hydrogen bonds with both S531 and Y386, as depicted in Figure 7D.

The interaction with S531 is significant, as this residue is crucial for inhibiting COX-2 activity. According to the observations, the proportion of contact with S531 was high. The results for (*S*)-ibuprofen are shown in Figure S8. In this case, **6** and (*S*)-ibuprofen were observed to interact with S531. While the assay shows that (*S*)-ibuprofen maintained this interaction for a longer period, the complex formed with **6** was more stable, as evidenced by fewer fluctuations. It is possible that the interaction between (*S*)-ibuprofen with amino acids is hindered due to the drug is smaller size. Additionally, based on the B

Factor, (*S*)-ibuprofen displays higher mobility than **6**, which remains in the active site with reduced movement, facilitating interactions. These results also correspond with the *in vivo* anti-inflammatory study, in which **6** demonstrated greater potency than (*S*)-ibuprofen.

Conclusions

The molecular docking study revealed that **6** had the most favorable energy profile for both EGFR and COX-2. In cancer cell lines, specific compounds displayed significant potency, with **6** emerging as the most potent within the series. Higher MFI values were shown to correspond with increased compound potency. Moreover, the compounds demonstrated lower effects compared to gefitinib on HaCaT cell viability. In the evaluation involving EGFR, **6** exhibited lower potency than gefitinib, suggesting that its effect might extend beyond EGFR inhibition to other receptors involved in cell proliferation. In the *in vivo* anti-inflammatory assay, **6** demonstrated an effect 5 times greater than (*S*)-ibuprofen, making it a potential candidate as an anti-inflammatory agent. The molecular dynamics study on EGFR revealed that **6** interacts with M793 but maintains stability throughout the study period. Similarly, in the case of COX-2, an interaction with S531 was observed, and the complex remained stable at the active site. While additional trials are needed to complement this work, the results obtained suggest that **6** may be considered a candidate drug with activity against neoplastic cells, due to its potent cytotoxic activity and evident anti-

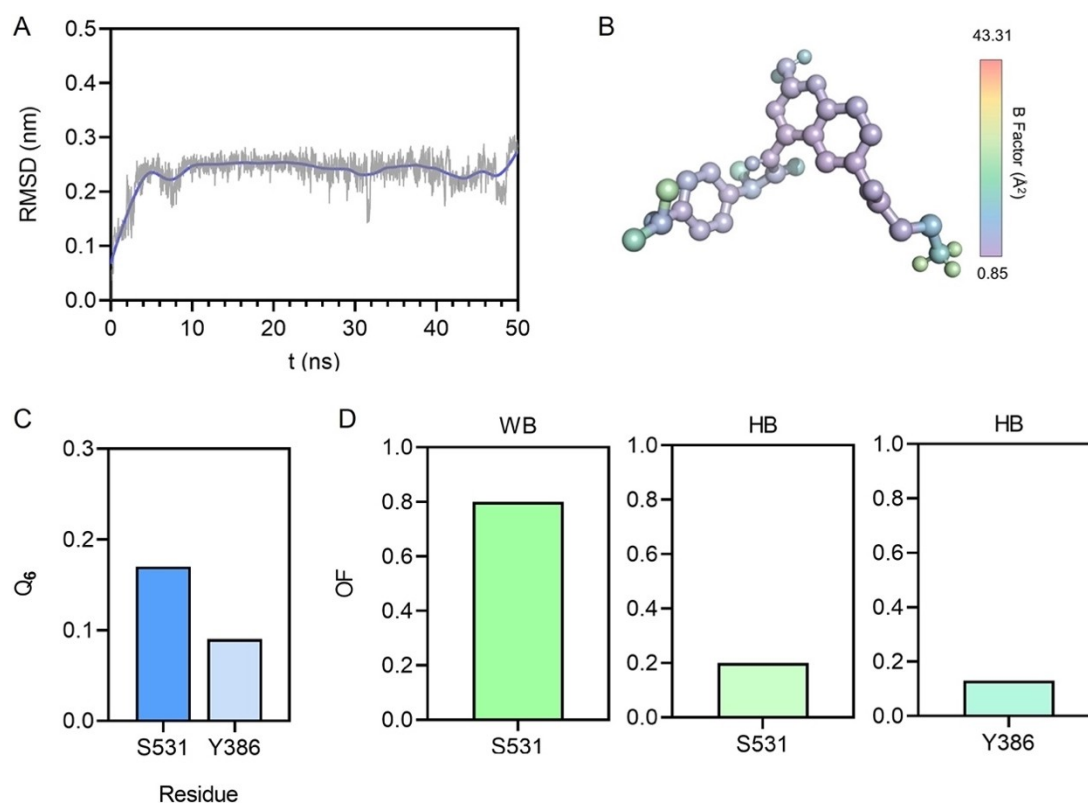


Figure 7. Molecular dynamics of **6** in COX-2. (A) RMSD of **6** computed after least-square fit to COX-2 backbone. (B) Depiction of **6** structure color-coded by the B factor computed from the per-atom RMSD data. (C) Fraction of the number of contacts of **6** with the main residues of COX-2 (Q_6). (D) Occupancy fraction (OF) of hydrogen bond (HB) and water bridge (WB) interactions between **6** and COX-2.

inflammatory effect. Therefore, preclinical studies would be appropriate to further evaluate this compound.

Experimental Section

Materials

Melting points were determined in open capillary tubes with a Büchi B-540 melting point apparatus and are uncorrected. Reactions were monitored by TLC on 0.2 mm precoated silica gel 60F254 plates (E. Merck) and visualized by irradiation with a UV lamp. The NMR spectra were acquired using a Jeol ECZ600R 400 MHz NMR spectrometer. The data were processed using MestReNova software. Chemical shifts are given in parts per million relative to tetramethylsilane (Me₄Si, d 1/4 0); J values are given in Hz. Splitting patterns have been designated as follows: s, singlet; d, doublet; q, quartet; dd, doublet of doublet; t, triplet; m, multiplet; bs, broad singlet. Mass spectrometry data were collected on a AxION 2 TOF instrument. The data were processed using TOF MS Driver software. Throughout the assay, cell cultures were maintained in growth medium supplemented with 10% FBS without antibiotics. Cell staining was carried out using antiEGFR Brilliant Violet 605 clone AY13. The cytotoxicity determination was performed using MTT. Cell incubation was conducted at 37 °C with 5% CO₂. Computational studies were performed on a PC equipped with 1TB of internal memory, 16GB of RAM, an AMD Ryzen 7 processor with 16 cores, and an NVIDIA RTX 3060 graphics card.

Synthetic Procedures

Compound 1a. A mixture of 9.51 mmol (1 eq) of 2-amino-5-nitrobenzonitrile, 6.89 mmol (0.75 eq) of guanidine carbonate, and 45 mL of a mixture (1:2) of EtOH/*n*-PrOH was prepared. The reaction mixture was stirred at room temperature for 30 min. Then, 11 mmol (1.2 eq) of KOH was added, and the reaction mixture was refluxed at 100 °C with continuous stirring. After 10 h of refluxing, the resulting suspension was vacuum-filtered, and the obtained solid was subjected to solid/liquid extraction using 100 mL of water, followed by 20 mL of EtOH. The product was subsequently vacuum-dried for 16 h. The purity of the product was assessed using TLC, revealing the absence of impurities. (87% yield, m.p. = 352.7–354.1 °C, R_f = 0.36)

Compounds 2a–3a. In a 100 mL round-bottom flask, which had been dried for 2 h, 4.84 mmol (1 eq) of (*R,S*)-ibuprofen or (*S*)-ibuprofen, along with 5.81 mmol of CDI and 7 mL of CHCl₃, were combined. The system was placed under constant stirring at room temperature within a N₂ atmosphere. After 2 h of the reaction, TLC was conducted, revealing no presence of the starting material, and indicating complete product formation. The product was not isolated. (**2a**: 100% yield, m.p. = not determined, R_f : 0.43; **3a**: 100% yield, m.p. = not determined, R_f : 0.43)

Compounds 1–2. In the same 100 mL round-bottom flask containing 4.84 mmol (1 eq) of **2a** or **3a** dissolved in 7 mL of CHCl₃, 2.90 mmol (0.6 eq) of **1a**, partially dissolved in 40 mL of DMF, was introduced. The reaction mixture was continually stirred at 100 °C under a N₂ atmosphere. After 24 h of uninterrupted heating, a liquid/liquid extraction was performed using 10% HCl and CH₂Cl₂ to eliminate remaining impurities. The product was subjected to

vacuum conditions for 48 h, and after this duration, the resulting solid was precipitated using 20 mL of acetone. The product was then vacuum-filtered, and TLC was carried out to assess the presence of impurities. (**1**: 69% yield, m.p. = 251.7–253.1 °C, R_f : 0.59; **2**: 73% yield, m.p. = 252.7–253.5 °C, R_f : 0.58)

Compounds **3–4**. In a 20 mL beaker, 1.34 mmol (1 eq) of **1** or **2** and 60 mg of Pd/C, equivalent to 12% w/w of the corresponding nitrated compound, were placed. The mixture was stirred until both compounds appeared homogeneous. The solid mixture was transferred to a 50 mL flask, and 8.08 mmol (6 eq) of HCO_2NH_4 were added. Slowly and steadily, 25 mL of MeOH were added to the flask. The system was refluxed at 75 °C under constant stirring. After 2 h of reaction, the solution was filtered through a porous funnel with filter paper and a layer of celite. The filtrate was concentrated under vacuum, and the product was precipitated using 10 mL of acetone and then vacuum-filtered. TLC was performed to detect possible impurities. (**3**: 94% yield, m.p. = 191.7–194.0 °C, R_f : 0.23; **4**: 97% yield, m.p. = 193.1–194.2 °C, R_f : 0.24)

Compounds **4a–5a**. To a reaction flask, 1.27 mmol (1 eq) of **1** or **2** was added, along with 5 mL of 85% acetic anhydride. The reaction mixture was constantly stirred at 65 °C. After 4 h of the reaction, the suspension was vacuum-filtered, followed by a solid/liquid extraction using 50 mL of saltwater (brine). TLC was conducted on the product to detect the presence of impurities. The resulting solid was dried under vacuum until complete dryness was achieved. (**4a**: 68% yield, m.p. = 232.1–233.9 °C, R_f : 0.78; **5a**: 73% yield, m.p. = 193.1–194.2 °C, R_f : 0.78)

Compound **6a**. In a previously dried round-bottom flask, 5.61 mmol (1 eq) of β -alanine was combined with 8.41 mmol (1.5 eq) of PyBOP and 10 mL of CH_2Cl_2 . The reaction mixture was stirred continuously at room temperature under a N_2 atmosphere for 10 min. Subsequently, 5.61 mmol (1 eq) of DIPEA was added, and the system was maintained at 40 °C under the specified conditions. After 1 h of reaction, TLC was performed, revealing no presence of byproducts, or starting material. Due to its reactivity, the product was not isolated. (100% yield, m.p. = not determined, R_f : 0.33)

Compounds **7a–8a**. In a 20 mL beaker, 1.83 mmol (1 eq) of **4a** or **5a** was combined with 85 mg of Pd/C, equivalent to 12% w/w of the corresponding nitrated compound. The solid mixture was stirred until both compounds appeared homogeneous. The mixture was transferred to a 50 mL flask, and 10.98 mmol (6 eq) of HCO_2NH_4 were added. Gradually, 15 mL of MeOH were added to the flask. The system was refluxed at 75 °C under constant stirring. After 2 h of reaction, the solution was filtered through a porous funnel with filter paper and a layer of celite. The filtrate was concentrated under vacuum. The resulting product was precipitated using 10 mL of acetone and then vacuum-filtered. TLC was performed. (**7a**: 71% yield, m.p. = 154.3–156.1 °C, R_f : 0.35; **8a**: 75% yield, m.p. = 157.2–158.2 °C, R_f : 0.36)

Compounds **9a–10a**. In the flask containing 5.61 mmol (1 eq) of **6a** dissolved in 10 mL of CH_2Cl_2 , 7.29 mmol of **7a** or **8a** (1.3 eq), partially dissolved in 20 mL of DMF, were added. The reaction mixture was stirred continuously under a N_2 atmosphere at 70 °C. After 8 h of reaction, TLC was conducted, revealing the presence of starting material. The product was purified through a liquid/liquid extraction using 10% HCl and CH_2Cl_2 . The resulting solution was concentrated under vacuum and left under vacuum for 48 h. The solid was precipitated using 15 mL of acetone. (**9a**: 47% yield, m.p. = 167.8–170.3 °C, R_f : 0.25; **10a**: 51% yield, m.p. = 171.1–172.3 °C, R_f : 0.24)

Compounds **5–6**. To a reaction flask, 1.05 mmol (1 eq) of **9a** or **10a** was added, along with 10 mL of MeOH, and the system was maintained at 4 °C under continuous stirring. After 15 minutes,

0.95 mmol (0.9 eq) of LiH was introduced. Following 1 h, the reaction was heated to 65 °C for 2 h. After this period, TLC was performed, indicating the presence of 20% starting material. The product was concentrated under vacuum, left under vacuum for 24 h, and precipitated with 5 mL of a saturated NaCl solution. (**5**: 39% yield, m.p. = 176.7–178.4 °C, R_f : 0.17; **6**: 42% yield, m.p. = 177.1–178.4 °C, R_f : 0.16)

Compound **1b**. To a reaction flask, 18.39 mmol (1 eq) of 2-amino-5-nitrobenzotrile was added along with 5 mL of DMF-DMA and 25 mL of MeOH. The reaction mixture was refluxed at 90 °C under continuous stirring. After 8 h, the product was filtered, and solid/liquid extractions were carried out using 20 mL of cold MeOH. The resulting TLC analysis of the product was performed, and it was then vacuum-dried for 24 h. (95% yield, m.p. = 144.0–145.2 °C, R_f : 0.91)

Compounds **2b–11b**. To the reaction flask, 4.59 mmol (1 eq) of **1b** and 5.05 mmol (1.1 eq) of the corresponding amino acid was added. Subsequently, 20 mL of a mixture (1:3) of $\text{CH}_3\text{CN}/\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ was added, and the reaction was stirred at 55 °C. After 4 h of reaction, the solid was vacuum-filtered, and the corresponding TLC analysis was performed. The product was purified through solid/liquid extractions using 15 mL of CH_3CN and 5 mL of acetone. (**2b**: 84% yield, m.p. = 240.2–241.6 °C, R_f : 0.20; **3b**: 89% yield, m.p. = 229.9–231.4 °C, R_f : 0.82; **4b**: 74% yield, m.p. = 204.8–206.1 °C, R_f : 0.15; **5b**: 75% yield, m.p. = 347.8–348.9 °C, R_f : 0.91; **6b**: 87% yield, m.p. = 236.8–238.1 °C, R_f : 0.11; **7b**: 63% yield, m.p. = 202.3–202.8 °C, R_f : 0.14; **8b**: 75% yield, m.p. = 263.7–265.8 °C, R_f : 0.47; **9b**: 82% yield, m.p. = 248.5–250.1 °C, R_f : 0.49; **10b**: 67% yield, m.p. = 276.5–277.8 °C, R_f : 0.42; **11b**: 77% yield, m.p. = 209.2–210.7 °C, R_f : 0.67)

Compounds **12b–21b**. In a 20 mL beaker, 2.67 mmol (1 eq) of the nitrated compound **2b–11b** and Pd/C at 12% w/w proportion to the raw material weight were combined. The resulting mixture was then transferred to a 50 mL flask, along with 16.02 mmol (6 eq) of HCO_2NH_4 and 20 mL of MeOH. The system was continuously stirred and refluxed at 75 °C for 2 h. After the reaction was complete, the suspension was filtered through a porous funnel with filter paper and a layer of celite. A TLC analysis was performed, and the solution was concentrated. The product was precipitated using 15 mL of CHCl_3 and then vacuum-filtered for drying. (**12b**: 90% yield, m.p. = 262.2–264.2 °C, R_f : 0.17; **13b**: 87% yield, m.p. = 209.2–210.7 °C, R_f : 0.43; **14b**: 85% yield, m.p. = 131.1–133.7 °C, R_f : 0.07; **15b**: 92% yield, m.p. = 288.7–290.1 °C, R_f : 0.27; **16b**: 59% yield, m.p. = 237.2–239.2 °C, R_f : 0.04; **17b**: 67% yield, m.p. = 200.9–201.7 °C, R_f : 0.74; **18b**: 82% yield, m.p. = 268.7–269.9 °C, R_f : 0.79; **19b**: 77% yield, m.p. = 207.3–209.8 °C, R_f : 0.56; **20b**: 57% yield, m.p. = 263.4–265.2 °C, R_f : 0.52; **21b**: 52% yield, m.p. = 203.2–204.7 °C, R_f : 0.46)

Compound **22b**. In a 50 mL flask that had been dried for 2 h, 2.42 mmol (1 eq) of (*S*)-ibuprofen, 2.91 mmol (1.2 eq) of CDI, and 5 mL of CHCl_3 were combined. The system was stirred under a N_2 atmosphere at room temperature. After 2 h, a TLC analysis was conducted. Since no presence of starting material was observed, the reaction was considered complete. The product was not isolated due to its reactivity. (100% yield, m.p. = not determined, R_f : 0.43)

Compounds **7–16**. In the 50 mL flask where 2.42 mmol of **22b** had been previously dissolved in 5 mL of CHCl_3 , 1.94 mmol (0.8 eq) of the corresponding intermediate **12b–21b**, dissolved in 5 mL of DMF, was added. The reaction mixture was stirred under a N_2 atmosphere at 70 °C. After 4 h of reaction, TLC was performed, and the solution was placed under vacuum for 48 h to remove excess solvent. The product was precipitated using 10 mL of CH_3CN cold, the solid was filtered, and then vacuum-dried until dry. (**7**: 49% yield, m.p. = 233.2–235.7 °C, R_f : 0.47; **8**: 42% yield, m.p. = 189.3–

191.1 °C, R_f : 0.57; **9**: 57% yield, m.p.=144.1–146.4 °C, R_f : 0.19; **10**: 67% yield, m.p.=254.5–255.3 °C, R_f : 0.38; **11**: 37% yield, m.p.=222.9–224.2 °C, R_f : 0.14; **12**: 48% yield, m.p.=187.4–189.1 °C, R_f : 0.89; **13**: 45% yield, m.p.=247.2–248.1 °C, R_f : 0.85; **14**: 53% yield, m.p.=176.4–178.8 °C, R_f : 0.67; **15**: 32% yield, m.p.=224.3–225.7 °C, R_f : 0.52; **16**: 54% yield, m.p.=189.7–191.8 °C, R_f : 0.54)

Characterization of Compounds

N-(2-amino-6-nitroquinazolin-4-yl)-2-(4-isobutylphenyl)propanamide (**1**)

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 1.55 (d, $J=8.0$ Hz, 6H); 2.10 (d, $J=4.0$ Hz, 3H); 3.11 (m, $J=8.0$ Hz, 1H); 3.23 (d, $J=2.0$ Hz, 2H); 4.97 (dd, $J=4.0$ Hz, 4.0 Hz, 1H); 7.80 (d, $J=8.0$ Hz, 2H); 8.02 (d, $J=8.0$ Hz, 2H); 8.31 (d, $J=12.0$ Hz, 1H); 8.82 (s, 2H); 9.11 (dd, $J=8.0$ Hz, 12 Hz, 1H); 9.23 (d, $J=4.0$ Hz, 1H); 11.02 (s, 1H). ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 172.6, 165.6, 157.4, 154.9, 142.3, 139.4, 138.9, 128.8, 127.3, 127.2, 126.8, 123.9, 121.4, 110.9, 103.3, 44.9, 44.2, 29.5, 22.1, 18.5. APCI-MS: $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}_3$ (393.18 g/mol) $[\text{M} + \text{H}]^+$: $m/z = 394.1878$.

(S)-*N*-(2-amino-6-nitroquinazolin-4-yl)-2-(4-isobutylphenyl)propanamide (**2**)

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 1.55 (d, $J=8.0$ Hz, 6H); 2.10 (d, $J=8.0$ Hz, 3H); 3.11 (m, $J=8.0$ Hz, 1H); 3.24 (d, $J=4.0$ Hz, 2H); 4.98 (dd, $J=4.0$ Hz, 4.0 Hz, 1H); 7.80 (d, $J=4.0$ Hz, 2H); 8.01 (d, $J=8.0$ Hz, 2H); 8.31 (d, $J=12.0$ Hz, 1H); 8.81 (s, 2H); 9.11 (dd, $J=8.0$ Hz, 12 Hz, 1H); 9.24 (d, $J=4.0$ Hz, 1H); 11.02 (s, 1H). ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 172.6, 163.6, 157.4, 155.0, 142.3, 139.4, 138.9, 128.8, 127.3, 127.2, 126.8, 121.4, 121.7, 110.9, 102.7, 45.1, 44.2, 29.5, 22.1, 18.5. APCI-MS: $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}_3$ (393.18 g/mol) $[\text{M} + \text{H}]^+$: $m/z = 394.1878$.

N-(2,6-diaminoquinazolin-4-yl)-2-(4-isobutylphenyl)propanamide (**3**)

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 0.84 (d, $J=6.64$ Hz, 6H); 1.35 (d, $J=7.0$ Hz, 3H); 1.79 (m, $J=6.72$ Hz, 1H); 2.39 (d, $J=7.12$ Hz, 2H); 4.11 (s, 1H); 5.21 (s, 2H); 7.29 (d, $J=7.92$ Hz, 2H); 7.08 (d, $J=8.16$ Hz, 2H); 7.09 (d, $J=2.42$ Hz, 1H); 7.26 (dd, $J=7.88$ Hz, 12.0 Hz, 1H); 7.27 (d, $J=7.56$ Hz, 1H); 8.51 (s, 2H); 10.22 (s, 1H). ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 175.7, 162.4, 161.3, 153.9, 150.9, 143.4, 139.4, 131.3, 128.7, 127.2, 124.0, 123.7, 117.8, 113.2, 105.0, 102.8, 46.3, 44.2, 29.6, 20.1, 18.5. APCI-MS: $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}$ (363.21 g/mol) $[\text{M} + \text{H}]^+$: $m/z = 364.2140$.

(S)-*N*-(2,6-diaminoquinazolin-4-yl)-2-(4-isobutylphenyl)propanamide (**4**)

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 1.56 (d, $J=8.0$ Hz, 6H); 2.10 (d, $J=8.0$ Hz, 3H); 3.10 (m, $J=8.0$ Hz, 1H); 3.22 (d, $J=4.0$ Hz, 2H); 4.88 (s, 1H); 6.19 (s, 2H); 7.80 (d, $J=2.0$ Hz, 2H); 7.86 (d, $J=8.0$ Hz, 2H); 7.88 (dd, $J=8.0$ Hz, 12.0 Hz, 1H); 7.92 (d, $J=8.0$ Hz, 1H); 8.20 (d, $J=12.0$ Hz, 1H); 8.81 (s, 1H); 9.78 (s, 1H); 10.21 (s, 1H). ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 174.2, 162.5, 161.7, 153.4, 149.6, 139.6, 138.5, 130.0, 128.9, 127.2, 124.1, 124.0, 117.3, 112.9, 105.2, 103.2, 44.6, 44.2, 29.6, 22.1, 18.3. APCI-MS: $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}$ (363.21 g/mol) $[\text{M} + \text{H}]^+$: $m/z = 364.2130$.

3-amino-*N*-(2-amino-4-(2-(4-isobutylphenyl)propanamido)quinazolin-6-yl)propanamide (**5**)

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 0.84 (d, $J=8.0$ Hz, 6H); 1.34 (d, $J=8.0$ Hz, 3H); 1.79 (m, $J=8.0$ Hz, 1H); 2.41 (t, $J=8.0$ Hz, 8.0 Hz, 2H); 3.28 (d, $J=8.0$ Hz, 2H); 3.60 (dd, $J=2.0$ Hz, 2.0 Hz, 2H); 4.13 (s, 1H); 5.55 (s, 2H); 7.14 (d, $J=8.0$ Hz, 2H); 7.15 (s, 2H); 7.15 (dd, $J=4.0$ Hz, 4.0 Hz, 1H); 7.17 (d, $J=4.0$ Hz, 2H); 7.30 (d, $J=8.0$ Hz, 1H); 7.90 (d, $J=8.0$ Hz, 1H); 8.33 (s, 1H); 10.22 (s, 1H). ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 176.0, 175.4, 162.4, 161.3, 154.3, 151.0, 142.3, 137.8, 128.9, 128.8, 127.2, 127.1, 118.0, 113.2, 104.2, 102.8, 44.7, 44.5, 44.2, 44.2, 29.6, 22.2, 18.5. APCI-MS: $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_6\text{O}_2$ (434.24 g/mol) $[\text{M} + \text{H}]^+$: $m/z = 435.2443$.

(S)-*3*-amino-*N*-(2-amino-4-(2-(4-isobutylphenyl)propanamido)quinazolin-6-yl)propanamide (**6**)

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 0.84 (d, $J=8.0$ Hz, 6H); 1.33 (d, $J=8.0$ Hz, 3H); 1.80 (m, $J=8.0$ Hz, 1H); 2.39 (t, $J=8.0$ Hz, 8.0 Hz, 2H); 3.37 (d, $J=8.0$ Hz, 2H); 3.63 (dd, $J=2.0$ Hz, 2.0 Hz, 2H); 4.23 (s, 1H); 5.35 (s, 2H); 7.09 (d, $J=8.0$ Hz, 2H); 7.09 (s, 2H); 7.10 (dd, $J=4.0$ Hz, 4.0 Hz, 1H); 7.17 (d, $J=8.0$ Hz, 2H); 7.37 (d, $J=8.0$ Hz, 1H); 7.65 (d, $J=8.0$ Hz, 1H); 8.78 (s, 1H); 10.21 (s, 1H). ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 175.4, 173.1, 163.1, 161.5, 150.3, 145.9, 139.5, 138.5, 128.9, 128.8, 127.2, 127.1, 123.8, 113.1, 104.7, 102.9, 44.9, 44.6, 44.3, 44.2, 29.6, 22.1, 18.5. APCI-MS: $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_6\text{O}_2$ (434.24 g/mol) $[\text{M} + \text{H}]^+$: $m/z = 435.2437$.

(S)-3-((6-(2-(4-isobutylphenyl)propanamido)quinazolin-4-yl)amino)propanoic acid (**7**)

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 0.84 (d, $J=8.0$ Hz, 6H); 1.33 (d, $J=8.0$ Hz, 3H); 1.79 (m, $J=8.0$ Hz, 1H); 1.83 (dd, $J=8.0$ Hz, 12.0 Hz, 2H); 2.61 (dd, $J=8.0$ Hz, 8.0 Hz, 1H); 3.27 (d, $J=8.0$ Hz, 2H); 3.65 (dd, $J=8.0$ Hz, 8.0 Hz, 2H); 5.45 (d, $J=4.0$ Hz, 1H); 7.14 (d, $J=8.0$ Hz, 2H); 7.14 (dd, $J=4.0$ Hz, 4.0 Hz, 1H); 7.16 (d, $J=8.0$ Hz, 2H); 7.19 (d, $J=8.0$ Hz, 1H); 7.43 (d, $J=4.0$ Hz, 1H); 8.28 (s, 1H); 9.78 (s, 1H); 10.67 (s, 1H). ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 175.6, 173.3, 157.8, 155.5, 150.6, 146.7, 141.5, 139.4, 131.5, 128.9, 128.2, 127.2, 127.1, 114.7, 122.8, 103.9, 101.1, 44.4, 44.2, 34.8, 34.1, 29.6, 22.1, 18.6. APCI-MS: $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_3$ (420.22 g/mol) $[\text{M} + \text{H}]^+$: $m/z = 421.2208$.

(6-((S)-2-(4-isobutylphenyl)propanamido)quinazolin-4-yl)-*L*-leucine (**8**)

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 0.83 (d, $J=8.0$ Hz, 6H); 0.91 (d, $J=8.0$ Hz, 6H); 1.34 (d, $J=8.0$ Hz, 3H); 1.81 (m, $J=4.0$ Hz, 1H); 1.93 (t, $J=12.0$ Hz, 1H); 2.40 (d, $J=4.0$ Hz, 2H); 2.74 (d, $J=8.0$ Hz, 2H); 3.62 (d, $J=8.0$ Hz, 2H); 5.71 (d, $J=4.0$ Hz, 1H); 7.17 (d, $J=8.0$ Hz, 2H); 7.19 (d, $J=8.0$ Hz, 2H); 7.21 (dd, $J=4.0$ Hz, 4.0 Hz, 1H); 7.22 (d, $J=8.0$ Hz, 1H); 7.54 (d, $J=8.0$ Hz, 1H); 8.34 (s, 1H); 8.71 (s, 1H); 10.51 (s, 1H). ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 175.4, 173.0, 167.3, 153.4, 149.3, 148.6, 139.5, 138.3, 128.9, 128.9, 128.7, 127.1, 119.3, 117.3, 105.5, 101.4, 44.2, 44.2, 29.7, 27.8, 23.0, 22.9, 22.4, 22.1, 18.5. APCI-MS: $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_3$ (462.26 g/mol) $[\text{M} + \text{H}]^+$: $m/z = 463.2708$.

(6-((S)-2-(4-isobutylphenyl)propanamido)quinazolin-4-yl)-*L*-histidine (**9**)

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 0.82 (d, $J=8.0$ Hz, 6H); 1.32 (d, $J=8.0$ Hz, 3H); 1.78 (m, $J=4.0$ Hz, 1H); 2.68 (d, $J=8.0$ Hz, 2H); 3.11 (t, $J=12.0$ Hz, 1H); 3.59 (d, $J=8.0$ Hz, 2H); 4.57 (d, $J=4.0$ Hz,

2H); 5.47 (d, $J=4.0$ Hz, 1H); 7.07 (d, $J=8.0$ Hz, 2H); 7.16 (s, 1H); 7.17 (d, $J=8.0$ Hz, 1H); 7.23 (d, $J=4.0$ Hz, 1H); 7.41 (dd, $J=8.0$ Hz, 8.0 Hz, 1H); 7.57 (d, $J=8.0$ Hz, 1H); 7.64 (d, $J=0$ Hz, 1H); 7.57 (s, 1H); 8.26 (s, 1H); 9.23 (s, 1H); 11.74 (s, 1H). ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 175.5, 171.3, 165.1, 152.7, 147.4, 147.1, 139.5, 138.5, 133.1, 129.0, 128.8, 127.7, 127.1, 118.1, 117.9, 115.2, 113.3, 104.1, 101.6, 44.3, 44.2, 29.6, 26.9, 23.0, 22.2, 18.5. APCI-MS: $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{N}_6\text{O}_3$ (486.58 g/mol) $[\text{M} + \text{H}]^+$: $m/z=487.5817$.

(S)-4-((6-(2-(4-isobutylphenyl)propanamido)quinazolin-4-yl)amino)benzoic acid (10)

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 0.84 (d, $J=4.0$ Hz, 6H); 1.34 (d, $J=4.0$ Hz, 3H); 1.79 (m, $J=4.0$ Hz, 1H); 2.40 (d, $J=8.0$ Hz, 2H); 3.62 (d, $J=8.0$ Hz, 2H); 5.63 (d, $J=4.0$ Hz, 1H), 7.15 (d, $J=8.0$ Hz, 2H); 7.18 (d, $J=8.0$ Hz, 2H); 7.27 (dd, $J=4.0$ Hz, 4.0 Hz, 1H); 7.40 (d, $J=4.0$ Hz, 1H); 7.57 (d, $J=4.0$ Hz, 1H); 7.58 (d, $J=4.0$ Hz, 1H); 8.07 (d, $J=4.0$ Hz, 1H); 8.34 (s, 1H); 8.42 (s, 1H); 9.62 (s, 1H); 11.01 (s, 1H). ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 175.6, 167.2, 155.6, 149.5, 147.5, 144.3, 142.9, 139.5, 138.6, 135.4, 135.2, 135.1, 134.8, 130.0, 128.9, 128.7, 127.1, 124.5, 124.0, 120.1, 117.0, 100.9, 44.5, 44.2, 29.6, 22.2, 18.6. APCI-MS: $\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_3$ (468.56 g/mol) $[\text{M} + \text{H}]^+$: $m/z=469.5717$.

(6-((S)-2-(4-isobutylphenyl)propanamido)quinazolin-4-yl)-L-asparagine (11)

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 0.84 (d, $J=4.0$ Hz, 6H); 1.32 (d, $J=4.0$ Hz, 3H); 1.80 (m, $J=4.0$ Hz, 1H); 2.40 (d, $J=8.0$ Hz, 2H); 2.65 (t, $J=4.0$ Hz, 1H); 3.60 (d, $J=8.0$ Hz, 2H); 3.74 (d, $J=4.0$ Hz, 2H); 5.25 (d, $J=4.0$ Hz, 2H), 7.09 (d, $J=8.0$ Hz, 2H); 7.17 (d, $J=8.0$ Hz, 2H); 7.22 (dd, $J=4.0$ Hz, 4.0 Hz, 1H); 7.25 (d, $J=4.0$ Hz, 1H); 8.11 (s, 1H); 8.42 (d, $J=4.0$ Hz, 1H); 10.35 (s, 1H) 11.67 (s, 1H). ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 175.6, 173.8, 172.3, 139.4, 139.4, 138.7, 138.2, 137.4, 136.1, 131.7, 131.4, 131.2, 128.8, 128.7, 126.1, 124.3, 117.5, 101.2, 44.5, 44.2, 29.6, 26.7, 24.6, 22.1, 18.6. APCI-MS: $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{O}_4$ (463.22 g/mol) $[\text{M} + \text{H}]^+$: $m/z=464.2310$.

(6-((S)-2-(4-isobutylphenyl)propanamido)quinazolin-4-yl)-L-glutamic acid (12)

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 0.84 (d, $J=8.0$ Hz, 6H); 1.31 (d, $J=8.0$ Hz, 3H); 1.80 (m, $J=4.0$ Hz, 1H); 2.18 (t, $J=8.0$ Hz, 1H); 2.40 (dd, $J=4.0$ Hz, 4.0 Hz, 2H); 2.75 (d, $J=4.0$ Hz, 2H); 3.58 (d, $J=8.0$ Hz, 2H); 4.75 (d, $J=4.0$ Hz, 1H); 5.57 (d, $J=4.0$ Hz, 1H); 7.06 (d, $J=8.0$ Hz, 2H); 7.17 (d, $J=8.0$ Hz, 2H); 7.33 (dd, $J=4.0$ Hz, 4.0 Hz, 2H); 7.38 (d, $J=8.0$ Hz, 1H); 7.49 (d, $J=8.0$ Hz, 1H); 8.24 (s, 1H); 9.89 (s, 1H); 10.35 (s, 1H). ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 175.8, 175.0, 173.0, 139.3, 139.1, 137.5, 137.2, 135.8, 132.4, 128.7, 128.6, 127.5, 127.1, 125.2, 124.8, 115.2, 100.7, 45.0, 44.2, 29.6, 28.9, 26.7, 24.7, 22.1, 18.8. APCI-MS: $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_5$ (478.22 g/mol) $[\text{M} + \text{H}]^+$: $m/z=479.2309$.

(6-((S)-2-(4-isobutylphenyl)propanamido)quinazolin-4-yl)-L-tryptophan (13)

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 0.85 (d, $J=4.0$ Hz, 6H); 1.34 (d, $J=8.0$ Hz, 3H); 1.80 (m, $J=8.0$ Hz, 1H); 2.41 (t, $J=4.0$ Hz, 1H); 3.33 (d, $J=8.0$ Hz, 2H); 3.53 (d, $J=8.0$ Hz, 2H); 3.65 (d, $J=8.0$ Hz, 2H); 5.65 (d, $J=4.0$ Hz, 1H); 6.96 (d, $J=4.0$ Hz, 8.0 Hz 1H); 6.98 (dd, $J=8.0$ Hz, 1H); 7.06 (dd, $J=8.0$ Hz, 8.0 Hz 1H); 7.09 (d, $J=8.0$ Hz, 1H); 7.18 (d, $J=8.0$ Hz, 2H); 7.19 (d, $J=8.0$ Hz, 1H); 7.23 (s, 1H); 7.35 (dd, $J=8.0$ Hz, 1H); 7.57 (d, $J=8.0$ Hz, 1H); 7.58 (d, $J=4.0$ Hz, 1H); 7.78 (s, 1H) 8.53 (s, 1H); 9.25 (s, 1H); 11.00 (s, 1H). ^{13}C NMR (400 MHz,

DMSO- d_6) δ (ppm): 175.6, 170.5, 139.4, 138.8, 136.3, 136.0, 135.4, 133.0, 128.9, 128.5, 127.3, 127.1, 124.1, 120.8, 118.3, 118.2, 118.0, 116.8, 114.8, 111.3, 109.3, 108.7, 105.2, 104.6, 44.5, 44.2, 29.6, 27.0, 24.6, 22.1, 18.6. APCI-MS: $\text{C}_{32}\text{H}_{33}\text{N}_5\text{O}_3$ (535.65 g/mol) $[\text{M} + \text{H}]^+$: $m/z=536.6609$.

(6-((S)-2-(4-isobutylphenyl)propanamido)quinazolin-4-yl)-L-glutamine (14)

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 0.83 (d, $J=4.0$ Hz, 6H); 1.32 (d, $J=8.0$ Hz, 3H); 1.79 (m, $J=4.0$ Hz, 1H); 2.23 (t, $J=4.0$ Hz, 1H); 2.40 (dd, $J=8.0$ Hz, 2H); 2.68 (d, $J=4.0$ Hz, 1H); 3.63 (d, $J=4.0$ Hz, 2H); 4.58 (t, $J=8.0$ Hz, 2H); 5.75 (d, $J=4.0$ Hz, 1H); 7.06 (d, $J=8.0$ Hz, 2H); 7.16 (d, $J=8.0$ Hz, 1H); 7.18 (d, $J=8.0$ Hz, 2H); 7.41 (dd, $J=8.0$ Hz, 8.0 Hz, 1H); 7.43 (d, $J=4.0$ Hz, 1H); 8.18 (s, 1H); 9.67 (s, 2H); 9.89 (s, 1H); 11.15 (s, 1H). ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 175.5, 174.2, 171.8, 163.3, 160.3, 150.5, 146.7, 141.0, 139.5, 138.5, 128.9, 128.7, 127.4, 127.1, 125.3, 123.6, 115.5, 102.0, 44.3, 44.2, 29.6, 28.2, 26.9, 24.1, 22.2, 18.58. APCI-MS: $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{N}_5\text{O}_4$ (477.56 g/mol) $[\text{M} + \text{H}]^+$: $m/z=478.5708$.

(6-((S)-2-(4-isobutylphenyl)propanamido)quinazolin-4-yl)-L-alanine (15)

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 0.84 (d, $J=4.0$ Hz, 6H); 1.32 (d, $J=8.0$ Hz, 3H); 1.80 (m, $J=2.0$ Hz, 1H); 2.25 (dd, $J=8.0$ Hz, 8.0 Hz, 1H); 2.40 (d, $J=4.0$ Hz, 3H); 3.35 (d, $J=4.0$ Hz, 2H); 3.62 (d, $J=8.0$ Hz, 2H); 4.64 (d, $J=4.0$ Hz, 1H); 7.10 (d, $J=4.0$ Hz, 1H); 7.18 (d, $J=8.0$ Hz, 2H); 7.24 (dd, $J=8.0$ Hz, 8.0 Hz, 1H); 7.27 (d, $J=4.0$ Hz, 1H); 7.54 (d, $J=8.0$ Hz, 1H); 8.37 (s, 1H); 9.89 (s, 1H); 11.36 (s, 1H). ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 175.9, 173.5, 166.6, 161.5, 149.1, 149.0, 139.5, 138.5, 136.0, 128.9, 128.8, 127.6, 127.1, 125.7, 124.6, 105.6, 86.0, 44.3, 44.2, 29.5, 22.8, 22.1, 18.5, 16.0. APCI-MS: $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_3$ (420.22 g/mol) $[\text{M} + \text{H}]^+$: $m/z=421.2308$.

(6-((S)-2-(4-isobutylphenyl)propanamido)quinazolin-4-yl)-L-phenylalanine (16)

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 0.84 (d, $J=4.0$ Hz, 6H); 1.32 (d, $J=12.0$ Hz, 3H); 1.80 (m, $J=4.0$ Hz, 1H); 2.18 (d, $J=8.0$ Hz, 1H); 2.39 (d, $J=8.0$ Hz, 2H); 3.30 (d, $J=8.0$ Hz, 2H); 3.57 (d, $J=8.0$ Hz, 2H); 4.25 (d, $J=8.0$ Hz, 2H); 4.99 (d, $J=4.0$ Hz, 1H); 7.07 (d, $J=4.0$ Hz, 2H); 6.94 (dd, $J=8.0$ Hz, 8.0 Hz, 2H); 7.18 (d, $J=4.0$ Hz, 1H); 7.41 (dd, $J=8.0$ Hz, 4.0 Hz, 1H); 7.47 (d, $J=8.0$ Hz, 1H); 7.51 (dd, $J=4.0$ Hz, 8.0 Hz, 1H); 8.26 (s, 1H); 8.38 (d, $J=4.0$ Hz, 1H); 9.93 (s, 1H); 10.75 (s, 1H). ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 175.8, 174.6, 139.2, 139.2, 139.1, 131.6, 129.7, 129.3, 128.8, 128.6, 128.5, 128.2, 128.1, 127.1, 127.0, 126.5, 126.8, 124.4, 123.4, 122.4, 122.1, 106.1, 102.7, 44.9, 44.2, 35.2, 29.6, 22.7, 22.1, 18.8. APCI-MS: $\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_3$ (496.25 g/mol) $[\text{M} + \text{H}]^+$: $m/z=497.2610$.

IC₅₀ determination in EGFR

The IC₅₀ on EGFR were determined using the ADP-Glo® kit (Promega). Details are given in the Supporting Information.

Anti-Inflammatory Assay using the TPA Method

It was carried out in accordance with The Bioethics Committee of the "Chemistry Institute, UNAM" approved the experimental conditions and TPA protocols (Code: CICAL-IQ-004-17). All details are given in the Supporting Information.

Supporting Information

Supporting Information contains methodology of procedures, Supplementary Tables and Supplementary Figures. Molecular formula strings and the associated biological data.

Acknowledgements

L. R. Garduño-Villavicencio (848859) and U. Martínez-Ortega (1002367) are very grateful to the Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) for the scholarships granted. F. Hernández-Luis thank the Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de Información y Comunicación (LANCAD-UNAM-DGTIC-207) for the support received in the use of the HP Cluster Platform 3000 SL supercomputer "Miztli"; to the Dirección General de Asuntos del Personal Académico through Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (UNAM-DGAPA-PAPIIT IN215824), and to the Facultad de Química for the funding provided through PAIP-5000-9136 program. E. Ortiz-Sanchez acknowledge Proyecto CONAHCYT A1-S40601 for financial support. The authors thanks to Flow Cytometry Unit, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias for its technical support in flow cytometry equipment.

Conflict of Interests

All authors have given approval to the final version of the manuscript. The authors declare no competing financial interest.

Data Availability Statement

Research data are not shared

Keywords: EGFR · COX-2 · quinazoline · ibuprofen · amino acid · antiproliferative activity

- [1] B. Li, H. L. Chan, P. Chena, *Curr. Med. Chem.* **2019**, *26*, 3009–3025.
- [2] K. Engle, G. Kumar, *Eur. J. Med. Chem.* **2022**, *239*, 114542.
- [3] K. Haider, S. Das, A. Joseph, M. S. Yar, *Drug Dev. Res.* **2022**, *83*, 859–890.
- [4] B. Sharma, V. J. Singh, P. A. Chawla, *Bioorg. Chem.* **2021**, *116*, 105393.
- [5] M. Latil, D. Nassar, B. Beck, S. Boumahdi, L. Wang, A. Brisebarre, C. Dubois, E. Nkusi, S. Lenglez, A. Checinska, A. V. Drubbel, M. Devos, W. Declercq, R. Yi, C. Blanpain, *Cell Stem Cell* **2017**, *20*, 191–204.
- [6] R. Das, D. K. Mehta, M. Dhanawat, *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2021**, *21*, 1350–1368.
- [7] K. Chudy-Onwugaje, W. Y. Huang, L. J. Su, M. P. Purdue, C. C. Johnson, L. Wang, H. A. Katki, K. H. Barry, S. I. Berndt, *Cancer* **2021**, *127*, 3145–3155.
- [8] A. Mantovani, *Nature* **2009**, *457*, 36–37.
- [9] F. Balkwill, *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9*, 361–371.
- [10] R. D. Loberg, C. Ying, M. Craig, L. L. Day, E. Sargent, C. Neeley, K. Wojno, L. A. Snyder, L. Yan, K. J. Pienta, *Cancer Res.* **2007**, *67*, 9417–9424.
- [11] A. Sakr, S. Rezaq, S. M. Ibrahim, E. Soliman, M. M. Baraka, D. G. Romero, H. Kothayer, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2021**, *36*, 1810–1828.
- [12] B. Meunier, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 69–77.
- [13] L. H. Evangelista Castro, C. M. R. Sant'Anna, *Curr. Top. Med. Chem.* **2022**, *22*, 333–346.
- [14] J. Zhou, X. Jiang, S. He, H. Jiang, F. Feng, W. Liu, W. Qu, H. Sun, *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 8881–8914.
- [15] V. Silva Gontijo, F. P. Dias Viegas, C. J. Cristancho Ortiz, M. de Freitas Silva, C. Miranda Damasio, M. Chagas Rosa, T. Gaspar Campos, D. Souza Couto, K. S. Tranches Dias, Claudio Viegas, *Curr. Neuropharmacol.* **2020**, *18*, 348–407.
- [16] H. M. Sampath Kumar, L. Herrmann, S. B. Tsogoeva, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2020**, *30*, 1–15.
- [17] P. Kumari, S. Dang, *Curr. Pharm. Des.* **2021**, *27*, 4530–4538.
- [18] M. Ninomiya, K. Tanaka, Y. Tsuchida, Y. Muto, M. Koketsu, K. Watanabe, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 1529–1536.
- [19] H. C. Shin, J. S. Kim, B. S. Vig, X. Song, J. C. Drach, G. L. Amidon, *Biol. Pharm. Bull.* **2006**, *29*, 247–252.
- [20] Y. Tsume, A. J. Drelich, D. E. Smith, G. L. Amidon, *Molecules* **2017**, *22*, 1–16.
- [21] T. Hou, L. Zhu, L. Chen, X. Xu, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2003**, *43*, 273–287.
- [22] M. N. Noolvi, H. M. Patel, *Arab. J. Chem.* **2013**, *6*, 35–48.
- [23] A. Wissner, D. M. Berger, D. H. Boschelli, M. B. Floyd Jr, L. M. Greenberger, B. C. Gruber, B. D. Johnson, N. Mamuya, R. Nilakantan, M. F. Reich, R. Shen, H. R. Tsou, E. Upešlacis, Y. F. Wang, B. Wu, F. Ye, N. Zhang, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3244–3256.
- [24] B. Rigas, I. S. Goldman, L. Levine, *J. Lab. Clin. Med.* **1993**, *122*, 518–523.
- [25] H. Meden, W. Kuhn, *Reprod. Biol.* **1997**, *71*, 173–179.

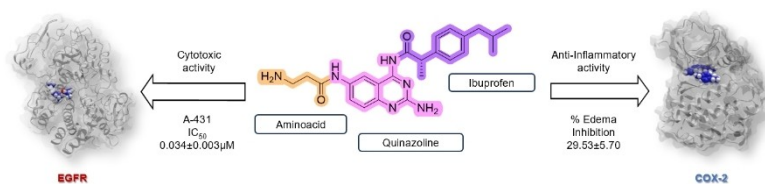
Manuscript received: November 21, 2023

Revised manuscript received: February 9, 2024

Accepted manuscript online: February 14, 2024

Version of record online: ■■■, ■■■

RESEARCH ARTICLE



In this work, the design, synthesis, biological evaluation, and molecular dynamics studies of compounds consisting of quinazoline, ibuprofen, and amino acids were carried out,

showing cytotoxic effects *in vitro* and anti-inflammatory effects *in vivo*. Molecule 6 emerged as a candidate for an antineoplastic drug.

L. R. Garduño-Villavicencio, U. Martínez-Ortega, E. Ortiz-Sánchez, J. M. Tinajero-Rodríguez, Prof. F. Hernández-Luis*

1 – 16

Compounds Consisting of Quinazoline, Ibuprofen, and Amino Acids with Cytotoxic and Anti-Inflammatory Effects

