



Universidad de Jaén

Escuela de Doctorado

# Síntesis de Sistemas Moleculares Híbridos Integrando Fragmentos Azólicos con Reconocidos Farmacóforos Inspirados en Compuestos Naturales.

Autor: Daniel Ernesto Vicentes Pérez

Director de la tesis: Dr. Justo Cobo Domingo

Departamento: Química Inorgánica y Orgánica

Fecha: 08/02/2024

ISBN:  
Licencia CC

RUJJA



**Universidad de Jaén**

Escuela de Doctorado

**TESIS DOCTORAL**



**Síntesis de Sistemas Moleculares Híbridos  
Integrando Fragmentos Azólicos con  
Reconocidos Farmacóforos Inspirados en  
Compuestos Naturales.**

**PRESENTADA POR:  
Daniel Ernesto Vicentes Pérez**

**DIRIGIDA POR:  
PhD. Justo Cobo Domingo**

**JAÉN, 8 de febrero de 2024**

**ISBN**



*A mi esposa y mi familia*



## Agradecimientos

A la AUIP y a su PROGRAMA DE FORMACIÓN DE DOCTORES EN CIENCIAS BÁSICAS por la beca otorgada para la realización de los estudios de doctorado.

Al profesor Justo Cobo por brindarme la oportunidad de desarrollar el trabajo de investigación bajo su dirección, por sus enseñanzas y la calidez con la que me acogió durante las estancias doctorales, así como por su paciencia a lo largo de todo este tiempo.

A Patricia Ochoa, Antonio Marchal, Ricaurte Rodríguez y Diego Moreno por sus valiosos aportes en diferentes etapas del proyecto.

Al Centro de Instrumentación Científico-Técnica (CICT) de la Universidad de Jaén y a su equipo humano por el apoyo técnico proporcionado.

A la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales y a su Programa de Desarrollo Profesorado, que facilitó mi participación en los estudios de doctorado.

A mi familia, padres, hermanos y sobrinos, por su apoyo incondicional en todo momento.

Muy especialmente, a mi esposa, Juli, por estar siempre presente, por su amor, paciencia, por sobrellevar con la mejor disposición mis largas ausencias y aceptar, sin necesidad de expresarlo, postergar nuestros proyectos.

Muchas gracias.



## Resumen

Basados en la necesidad de generar nuevas estructuras bioactivas para actuar frente a dianas de interés farmacológico, este proyecto propone abordar el diseño y la síntesis de nuevos sistemas heterocíclicos híbridos en la búsqueda de nuevas estructuras moleculares como potenciales agentes antineoplásicos.

El diseño de las estructuras moleculares se basa en el uso de sistemas heterocíclicos nitrogenados del tipo azol, los cuales se presentan conectados con pirimidinas e isocumarinas. La elección de estos núcleos se basó en su reconocida bioactividad y en la versatilidad sintética que ofrecen para la generación de nuevas moléculas, así como en que su estructura se encuentra presente en una diversidad de sistemas de origen natural. Se ha observado que estos núcleos desempeñan un papel relevante en procesos biológicos, lo cual sirvió de inspiración para que el diseño de las estructuras híbridas cuente con esos núcleos.

En la ejecución de este proyecto, se llevó a cabo la síntesis de nuevos sistemas híbridos mediante dos estrategias. La primera consistió en la preparación de sistemas híbridos o policíclicos a partir de la 2-amino-4,6-dimetoxipirimidina, mediante reacciones en las posiciones 5 y/o 6.

Este reactivo de partida fue seleccionado debido a que incluye el fragmento 2-aminopirimidina, el cual cuenta con características estéricas y electrónicas que permiten establecer interacciones óptimas con algunas dianas moleculares. Por lo tanto, ha sido reconocido como un residuo farmacofórico presente en diversas moléculas bioactivas.

Como resultado, se logró sintetizar nuevos sistemas moleculares del tipo pirimidina-imidazol, algunos de los cuales fueron evaluados frente a 60 líneas celulares cancerígenas. Sin embargo, ninguno de los compuestos evaluados mostró bioactividad promisoria.

La segunda estrategia utilizada consistió en diseñar sistemas híbridos inspirados en el uso de núcleos presentes en productos naturales. Para ello, se llevó a cabo la síntesis de isocumarinas mediante reacciones multicomponentes, las cuales fueron modificadas posteriormente para generar sistemas fusionados del tipo isocumarina-azol (imidazol y triazol).

Ambas estrategias sintéticas utilizadas dieron como resultado compuestos susceptibles de ser modificados posteriormente, lo cual puede contribuir a la diversificación de estos sistemas híbridos en la búsqueda de ampliar el conocimiento de estas estructuras moleculares.

Este proyecto se llevó a cabo dentro del Grupo de Investigación en Compuestos de Interés Biológico (GICIB) del Departamento de Química Inorgánica y Orgánica de la UJA, enmarcado en la línea de investigación "Búsqueda de compuestos bioactivos: derivados heterocíclicos nitrogenados".

Este documento de tesis se presenta como un conjunto de trabajos publicados, acogiéndose a lo establecido en el artículo 25.2 del Reglamento de Estudios de Doctorado de la UJA.



## Abstract

Based on the need to generate new bioactive structures that can act against targets of pharmacological interest, this project proposes addressing the design and synthesis of new hybrid heterocyclic systems in the search for novel molecular structures as potential antineoplastic agents.

The design of molecular structures is based on the use of nitrogen-containing heterocyclic systems of the azole type, which are fused with pyrimidines and isocoumarins. The choice of these nuclei was based on their outstanding bioactivity and the synthetic versatility they offer for the generation of new molecules, as well as the fact that their molecular structure is present in a diversity of species of natural origin. It has been observed that these nuclei play a relevant role in biological processes, serving as inspiration for incorporating them into the design of hybrid structures.

In the execution of this project, the synthesis of new hybrid systems was carried out through two strategies. The first involved the preparation of hybrid or polycyclic systems from 2-amino-4,6-dimethoxypyrimidine, through reactions at positions 5 and/or 6.

This starting reagent was chosen because it includes the 2-aminopyrimidine fragment, which has steric and electronic characteristics that allow optimal interactions with some molecular targets. Therefore, it has been recognized as a pharmacophoric residue present in various bioactive molecules.

As a result, new molecular systems of the pyrimidine-imidazole type were synthesized, some of which were evaluated against 60 cancer cell lines. However, none of the evaluated compounds showed promising bioactivity.

The second strategy used was to design hybrid systems inspired by the use of nuclei present in natural products. For this purpose, the synthesis of isocoumarins was carried out through multicomponent reactions, which were subsequently modified to generate fused systems of the isocoumarin-azole type (imidazole and triazole).

Both synthetic strategies resulted in compounds susceptible to subsequent modification, which can contribute to the diversification of these hybrid systems in the quest to expand the knowledge of these molecular structures.

This project was carried out within the Research Group on Compounds of Biological Interest (GICIB), framed in the research line "Search for bioactive compounds: nitrogen-containing heterocyclic derivatives."

This thesis document is presented as a collection of published works, adhering to the provisions of Article 25.2 of the Doctoral Studies Regulations of the UJA.



## Contenido

Agradecimientos .....	v
Resumen .....	vii
Abstract.....	ix
Lista de figuras .....	xiii
Lista de esquemas .....	xvii
Lista de símbolos y abreviaturas .....	xxi
Materiales y Métodos .....	xxiii
Capítulo 1. Introducción General y Objetivos .....	27
1.1. Introducción General .....	27
1.1.1. Diseño de fármacos.....	27
Generación de quimiotecas.....	28
Síntesis Orientada al Objetivo (TOS, Target Oriented Synthesis).....	28
Síntesis orientada a la diversidad (DOS, Diversity Oriented Synthesis).....	32
1.1.2. Núcleos heterocíclicos de interés en el tratamiento del cáncer: .....	34
2-Aminopirimidinas: Un clásico de los bloques de construcción de fármacos.....	40
Azoles: una alternativa frente al cáncer .....	48
Isocumarinas: un núcleo poco explorado .....	52
1.2. Objetivos y estrategia general.....	57
1.2.1. Objetivo General:.....	57
1.2.2. Objetivos Específicos .....	57
1.2.3. Estrategia general y estructura del manuscrito .....	57
Capítulo 2. Sistemas híbridos del tipo Pirimidina-Azol .....	61

2.1. Síntesis de sistemas híbridos a partir de nitroso compuestos .....	61
2.2. Reducción del grupo nitroso en la búsqueda de la generación de sistemas híbridos .....	69
2.3. Debencilación de sistemas híbridos .....	76
2.4. Caracterización de compuestos que no aparecen en las publicaciones .....	82
2.5. Estudios de actividad biológica .....	83
2.6. <i>Resumen de artículos publicados de sistemas híbridos tipo aminopirimidina-azol</i> .....	85
A concise synthesis of a highly substituted 6-(1 <i>H</i> -benzimidazol-1-yl)-5-nitrosopyrimidin-2-amine: Synthetic sequence and the molecular and supramolecular structures of one product and two intermediates. ....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
A concise and efficient synthesis of amino-substituted (1 <i>H</i> -benzo[ <i>d</i> ]imidazol-1-yl)pyrimidine hybrids: synthetic sequence and the molecular and supramolecular structures of six examples .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Synthesis of 5-(arylmethylideneamino)-4-(1 <i>H</i> -benzo[ <i>d</i> ]imidazol-1-yl)pyrimidine hybrids: synthetic sequence and the molecular and supramolecular structures of two intermediates and three final products .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Capítulo 3. Sistemas híbridos del tipo Isocumarina-Azol .....	91
3.1. Sistemas híbridos Isocumarina-Imidazol .....	92
3.2. Sistemas híbridos Isocumarina-Triazol .....	97
3.3. <i>Resumen de artículos publicados de sistemas híbridos tipo isocumarina-azol</i> .....	105
Synthesis of new 1,2-diaryl[2]benzopyrano[3,4- <i>d</i> ]imidazol-5(1 <i>H</i> )-one derivatives mediated by ceric ammonium nitrate .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Conversion of 3-amino-4-arylamino-1 <i>H</i> -isochromen-1-ones to 1-arylisochromeno[3,4- <i>d</i> ][1,2,3]triazol-5(1 <i>H</i> )-ones: synthesis, spectroscopic characterization and the structures of four products and one ring-opened derivative .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Conclusiones .....	111
Bibliografía .....	115

## Lista de figuras

Figura 1.1 Ejemplos de moléculas de uso farmacológico.....	27
Figura 1.2 Fases en el desarrollo de un nuevo fármaco <sup>1</sup> . .....	28
Figura 1.3 Síntesis orientada al objetivo. ....	29
Figura 1.4 Métodos de generación de fármacos bajo la estrategia FBDD. ....	31
Figura 1.5 Sistema híbrido por unión de restos farmacofóricos.....	32
Figura 1.6 Sistemas híbridos por fusión de moléculas enteras. ....	32
Figura 1.7 Utilización metodología DOS en busca de moléculas anti HBV.....	33
Figura 1.8 Principales medicamentos aprobados por la FDA para el tratamiento del cáncer <sup>35</sup> . ....	35
Figura 1.9 Principales medicamentos aprobados por la FDA para el tratamiento del cáncer <sup>35</sup> . ....	36
Figura 1.10 Inhibidores de topoisomerasa e inhibidores del huso mitótico. ....	37
Figura 1.11 Fármacos que actúan como agentes alquilantes. ....	38
Figura 1.12 Fármacos antagonistas de pirimidina y Fármacos antagonistas de purina.....	38
Figura 1.13 Medicamentos con fragmento de 2-aminopirimidina. ....	40
Figura 1.14 Medicamentos con fragmentos 2-aminopirimidínicos usados en tratamientos contra el cáncer. .....	41
Figura 1.15 Medicamentos que actúan como antifolatos.....	41
Figura 1.16 Estructura de la Alfuzosina. ....	42
Figura 1.17 Aminopirimidina con actividad inhibitoria de $\beta$ -glucoronidasa. ....	45
Figura 1.18. Medicamentos comerciales que incluyen benzimidazoles en su estructura. ....	49
Figura 1.19 Azoles en medicamentos usados en tratamientos del cáncer. Las imágenes correspondientes a Abemaciclib y Alpelisib fueron visualizadas en PoseView de la plataforma protein.plus a partir de los PDB 5L2S y 4JPS respectivamente. ....	49
Figura 1.20. Sistemas tipo triazol e imidazol con actividad anticancerígena.....	51
Figura 1.21 Isocumarinas naturales con actividad anticancerígena. ....	52

Figura 1.22. Ácido elágico con actividad inhibitoria de SphK1. ....	53
Figura 2.1 Espectro <sup>1</sup> H-RMN del compuesto <b>37</b> . ....	66
Figura 2.2 Espectro MS (EI, 70 eV) del compuesto <b>37</b> . ....	66
Figura 2.3 Espectro HRMS del compuesto <b>37</b> . ....	67
Figura 2.4 Estructura polarizada (A) y representación clásica de las 6-amino-5nitrosopirimidinas .....	69
Figura 2.5 Espectro <sup>1</sup> H-RMN compuesto <b>39</b> .....	71
Figura 2.6 Espectro <sup>1</sup> H-RMN compuesto <b>40</b> .....	72
Figura 2.7 Espectro <sup>1</sup> H-RMN compuesto <b>48</b> .....	73
Figura 2.8 Espectro <sup>13</sup> C-RMN compuesto <b>48</b> . ....	74
Figura 2.9 Espectro <sup>1</sup> H-RMN compuesto <b>58</b> .....	77
Figura 2.10 Figura 2.11 Espectro <sup>13</sup> C-RMN compuesto <b>58</b> .....	77
Figura 2.12 Espectros <sup>1</sup> H-RMN de los compuestos <b>66</b> y <b>67</b> .....	80
Figura 2.13 Mayores % de inhibición de crecimiento para cada uno de los compuestos evaluados. ....	84
Figura 3.1 Propuesta de sistemas híbridos del tipo isocumarina-azol. ....	92
Figura 3.2 (A y B) Docking $\Delta G_{\text{unión}} = -6.508$ kcal/mol (violeta: ligando cocrystalizado, rosado: sistema híbrido), (C) RMSD, y (D) principales contactos ligando-proteína con mayor permanencia del sistema híbrido isocumarina-imidazol sobre VEGFR-2. ....	93
Figura 3.3 (A y B) Docking $\Delta G_{\text{unión}} = -10.352$ kcal/mol. (violeta: ligando cocrystalizado, rosado: sistema híbrido), (C) RMSD, y (D) principales contactos ligando-proteína con mayor permanencia del sistema híbrido isocumarina-imidazol sobre BRAF. ....	93
Figura 3.4 (A y B) Docking $\Delta G_{\text{unión}} = -9.555$ kcal/mol. (violeta: ligando cocrystalizado, rosado: sistema híbrido), (C) RMSD, y (D) principales contactos ligando-proteína con mayor permanencia del sistema híbrido isocumarina-imidazol sobre SphK1.]. ....	94
Figura 3.5 (A y B) Docking $\Delta G_{\text{unión}} = -8.904$ kcal/mol. (violeta: ligando cocrystalizado, rosado: sistema híbrido), (C) RMSD, y (D) principales contactos ligando-proteína con mayor permanencia del sistema híbrido isocumarina-imidazol sobre DHFR. ....	94

Figura 3.6 (A y B) Docking $\Delta G_{\text{unión}} = -8.597$ kcal/mol. (violeta: ligando cocrystalizado, rosado: sistema híbrido), (C) RMSD, (D) principales contactos ligando-proteína con mayor permanencia del sistema híbrido isocumarina-triazol sobre VEGFR-2.....	98
Figura 3.7 (A y B) Docking $\Delta G_{\text{unión}} = -9.758$ kcal/mol. (violeta: ligando cocrystalizado, rosado: sistema híbrido), (C) RMSD, (D) principales contactos ligando-proteína con mayor permanencia del sistema híbrido isocumarina-triazol sobre BRAF.....	99
Figura 3.8 (A y B) Docking $\Delta G_{\text{unión}} = -9.234$ kcal/mol. (violeta: ligando cocrystalizado, rosado: sistema híbrido), (C) RMSD, (D) principales contactos ligando-proteína con mayor permanencia del sistema híbrido isocumarina-triazol sobre SphK1. ....	99
Figura 3.9 (A y B) Docking $\Delta G_{\text{unión}} = -9.767$ kcal/mol. (violeta: ligando cocrystalizado, rosado: sistema híbrido), (C) RMSD, (D) principales contactos ligando-proteína con mayor permanencia del sistema híbrido isocumarina-triazol sobre DHFR. ....	100
Figura 3.10 Superposición de los espectros infrarrojo (ATR) de las estructuras <b>77</b> y su isocumarina de partida.....	101
Figura 3.12 Espectro $^1\text{H}$ -RMN del compuesto <b>77</b> .....	102
Figura 3.13 Espectro $^{13}\text{C}$ -RMN del compuesto <b>77</b> .....	102
Figura 3.14 Producto de la apertura de la isocumarina en medio ácido fuerte. ....	104



## Lista de esquemas

Esquema 1.1 Diseño de hidrazonas con actividad antiproliferativa sobre la línea celular H1975.....	30
Esquema 1.2 Metodología sintética para la obtención de hidrazonas con actividad antiproliferativa sobre la línea celular H1975.....	30
Esquema 1.3 Metodología DOS inspirada en un producto natural <sup>26</sup> .....	33
Esquema 1.4 Metodología DOS en busca de moléculas inspiradas en flavonoides.....	34
Esquema 1.5 Reducción del ácido fólico por acción de DHFR.....	39
Esquema 1.6 Sistemas híbridos del tipo hidrazona-aminopirimidina. ....	42
Esquema 1.7 Derivados aminopirimidínicos a partir de floroglucinol. ....	43
Esquema 1.8 Derivado aminopirimidínico <b>10</b> inhibidor FAK.....	43
Esquema 1.9 Sistemas híbridos quinolina-pirimidina con actividad antiproliferativa.....	44
Esquema 1.10 Ruta sintética de sistemas aminopirimidínicos basado en screening virtual.....	44
Esquema 1.11 Aminopirimidinas como inhibidores de distona demetilasa LSD1. ....	45
Esquema 1.12 Purinas como inhibidores multidiana. ....	45
Esquema 1.13 Quinazolina con actividad inhibitoria frente a FGFR4. ....	46
Esquema 1.14 Síntesis de Quinazolina <b>17</b> con actividad multidiana.....	47
Esquema 1.15 Ejemplos de reacción de 2-aminopirimidinas con el grupo amino interno en el producto. ....	47
Esquema 1.16 Reacciones sobre el anillo pirimidínico.....	48
Esquema 1.17 Pirimido-benzimidazol <b>18</b> como inhibidores de USP5. ....	50
Esquema 1.18 Sistema híbrido quinazolina-benzimidazol <b>19</b> , inhibidor de DHFR.....	50
Esquema 1.19 Sistema híbrido pirimido-benzimidazol <b>20</b> con actividad antitumoral. ....	51
Esquema 1.20 Síntesis del benzimidazol <b>21</b> que presenta actividad antiproliferativa frente a HCT116....	51
Esquema 1.21 Modificaciones sobre el anillo aromático de la bergenia. ....	53

Esquema 1.22 Derivatización de la bergenia en búsqueda de una estructura multidiana. ....	54
Esquema 1.23 Acoplamiento de Castro–Stephens para la obtención de la isocumarina <b>(30)</b> . ....	54
Esquema 1.24 Síntesis del híbrido pirimidina-isocumarina <b>(31)</b> con actividad multidiana. ....	55
Esquema 2.1 Síntesis de la triamina <b>34</b> . ....	61
Esquema 2.2 Metodologías usadas para la obtención de sistemas pirimidina-benzimidazol. ....	62
Esquema 2.3 Intento de ciclación usando FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O. ....	62
Esquema 2.4 Otras metodologías empleadas para lo obtención de sistemas pirimidina-benzimidazol. ...	63
Esquema 2.5 Generación de azoles mediados por CAN. ....	64
Esquema 2.6 Metodología para lo obtención de sistemas pirimidina-benzimidazol usando CAN como catalizador. ....	64
Esquema 2.7 Metodología para lo obtención de sistemas pirimidina-benzimidazol en THF. ....	65
Esquema 2.8 Síntesis por microondas del compuesto <b>37</b> . ....	65
Esquema 2.9 Intento de ciclación de la imina <b>37</b> usando CAN. ....	67
Esquema 2.10 Efecto del CAN sobre la aminopirimidina precursora <b>34</b> . ....	68
Esquema 2.11 Propuesta para la obtención de sistemas diaminopirimidino-benzimidazol. ....	69
Esquema 2.12 Generación de tetraminas. ....	69
Esquema 2.13 Síntesis de sistemas híbridos por oxido-reducción intramolecular. ....	70
Esquema 2.14 Ruta sintética para la generación de sistemas híbridos. ....	71
Esquema 2.15 Propuesta de mecanismo para la generación de sistemas híbridos tipo <b>41</b> . ....	72
Esquema 2.16 Reacción para la obtención de sistemas híbridos con salicilaldehído. ....	73
Esquema 2.17 Propuesta de resumida del mecanismo para la generación de sistemas híbridos de salicilaldehído. ....	75
Esquema 2.18 Síntesis de benzimidazoles por oxido-reducción intramolecular. ....	75
Esquema 2.19 Debencilación de aminas secundarias. ....	76
Esquema 2.20 Ruptura del enlace O-C catalizada por I <sub>2</sub> . ....	76

Esquema 2.21 Eliminación del grupo bencilo de los sistemas híbridos <sup>170</sup> .....	76
Esquema 2.22 Escisión oxidativa de N-bencilaminas <sup>172</sup> .....	78
Esquema 2.23 Debencilación oxidativa de sistemas híbridos pirimido-benzimidazol.....	78
Esquema 2.24 Esquema para la derivatización de las diaminopirimidinas.....	79
Esquema 2.25 Formación de amidas a partir de TFA.....	79
Esquema 2.26 Metodología más eficiente para la obtención de los sistemas híbridos.....	80
Esquema 2.27 Esquema de nuevos sistemas 2-aminopirimidinicos sintetizados (negro). Posibles derivados que se pueden obtener a partir de los sistemas sintetizados (azul).....	81
Esquema 3.1 Metodología para la síntesis de las isocumarinas precursoras.....	91
Esquema 3.2 Metodología para la síntesis de las isocumarinas precursoras.....	95
Esquema 3.3 Esquema de productos de reacción en condiciones ácidas.....	96
Esquema 3.4 Síntesis de sistemas híbridos isocumarina-imidazol.....	96
Esquema 3.5 Metodología sintética para la obtención de híbridos isocumarina-imidazol.....	97
Esquema 3.6 Metodología sintética para la obtención de híbridos isocumarina-triazol.....	101
Esquema 3.7 Reacción de apertura del anillo isocumarinico.....	103
Esquema 3.8 Esquema general de resultados publicados referentes a los híbridos isocumarina-azol...	106



## Lista de símbolos y abreviaturas

<b>Símbolo</b>	<b>Término</b>
AcOEt	Acetato de etilo
CAN	Nitrato cérico amónico
CCF	Cromatografía en capa delgada
COSY	Espectroscopia de correlación homonuclear $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ( <i>Correlation spectroscopy</i> )
d	Doblete
dd	Doble doblete
DCM	Diclorometano
DHFR	Dihidrofolato reductasa
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOS	Síntesis orientada a la diversidad ( <i>Diversity Oriented Synthesis</i> )
ESI	Ionización por electrospray ( <i>Electrospray ionization</i> )
FDA	Administración de alimentos y medicamentos ( <i>Food and Drug Administration</i> )
FBDD	Diseño de drogas basado en fragmentos ( <i>Fragment-based drug Discovery</i> )
Hex	Hexano
HMBC	Correlación de Múltiples Enlaces Heteronucleares ( <i>Heteronuclear correlation through multiple bond coherence</i> )
HMQC	Correlación Cuántica Múltiple Heteronuclear ( <i>Heteronuclear multiple quantum correlation</i> )
HRESIMS	Espectrometría de Masas de Alta Resolución por Ionización con Electrospray ( <i>High resolution electrospray ionization mass spectrometry</i> )
HSQC	Coherencia Cuántica Única Heteronuclear ( <i>Heteronuclear single quantum correlation</i> )
HTS	Barrido de alta eficiencia ( <i>High Throughput Screening</i> )
IC <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria media ( <i>Half maximal Inhibitory Concentration</i> )
IR	Infrarrojo
J	Constante de acoplamiento
M	Multiplete
MeOH	Metanol
NCEs	Nuevas entidades químicas ( <i>New Chemical Entities</i> )

q	Cuadruplete
RMN	Espectroscopia de resonancia magnética nuclear
RMSD	Desviación cuadrática media ( <i>Root Mean Square Deviation</i> )
s	Singlete
SphK	Esfingosina quinasa
t	Triplete
THF	Tetrahidrofurano
TFA	Ácido trifluoroacético
TOS	Síntesis orientada al objetivo ( <i>Target Oriented Synthesis</i> )
UV	Ultravioleta
WHO	Organización mundial de la salud ( <i>World Health Organization</i> )
$\delta$	Desplazamiento químico (ppm)

## Materiales y Métodos

Cromatografía en columna flash: Gel de sílice (Merck, kieselgel 60, 230 - 240 mesh). Fases móviles usando de hexano-acetato de etilo o cloroformo.

Cromatografía en capa fina: el seguimiento de la síntesis empleando cromatofolios Merck (DC-Alufolien, kieselgel 60 F254) de 0.2 mm de espesor usando como reveladores luz ultravioleta a 254 y 366 nm, o una disolución etanólica de ácido fosfomolibdico al 15%, con posterior calentamiento. Fases móviles usando de hexano-acetato de etilo o cloroformo.

*Los procedimientos y datos experimentales se describen en los respectivos artículos. Los compuestos que no han sido reportados se describen en el capítulo correspondiente.*

*Todos los equipos utilizados que se mencionan a continuación hacen parte del Centro de Instrumentación Científico-Técnica (CICT) de la Universidad de Jaén (UJA).*

Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN): Los espectros fueron registrados en un equipo Bruker Avance III-400. Los desplazamientos químicos se registran en la escala (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) en Hz. Los solventes empleados según el caso fueron  $\text{CDCl}_3$  o DMSO- $d_6$  usando TMS, o los protones residuales de los respectivos disolventes como referencia interna.

Espectrometría de masas de baja resolución: Los espectros fueron registrados en un espectrómetro Shimadzu-GCMS-QP2010, con detector selectivo de masas HP 5972 y acoplado a un cromatógrafo de gases HP 5890 A Serie II, con ionización por impacto de electrones (EM-IE) a 70 eV y analizador de cuadrupolo.

Espectrometría de masas de alta resolución (HRMS): El equipo utilizado fue un espectrómetro QTOF Agilent modelo 6520B, acoplado a un HPLC Agilent-1200 con ionización por electrospray (ESI), en modo positivo.

Difracción de rayos X: Fue utilizado un difractómetro de rayos X de monocristal Bruker D8-Venture con doble fuente de radiación, tubos microfoco de molibdeno y cobre, y detector Photon II.

Espectroscopía Infrarroja (IR): Equipo: FT - IR modelo Bruker Vertex 70. Detector DLaTGS con ventana de KBr para MIR, refrigerado por aire. Rango de respuesta de 12500 a 350  $\text{cm}^{-1}$ , y equipado con accesorio ATR.

Síntesis asistida por MW: Reactor de microondas CEM Discover monomodo de 300 W de potencia máxima trabajando en modo estándar a la temperatura que se indica en cada caso, perteneciente al Departamento de Química Inorgánica y Orgánica de la UJA.

Métodos de docking y dinámica molecular: Se realizó modelado molecular utilizando las estructuras cristalinas tridimensionales del Protein Data Bank con las siguientes codificaciones: VEGFR-2: 2OH4; BRAF: 3OG7; SphK1: 4V24 y DHFR: 1DLS.

Se llevó a cabo una preparación de los complejos proteína ligante empleando Dock Prep, una herramienta incorporada en UCSF Chimera, donde se adicionan aminoácidos (y átomos) faltantes, adición de átomos de hidrógeno y cargas tipo Gastgeiger, pasos necesarios para las estructuras antes del acoplamiento. Posteriormente, las proteínas se guardaron en formato PDBQT.

La minimización de la energía de los ligandos se realizó en Open Babel 3.1.1 utilizando el campo de fuerza MMFF94, y se archivaron en formato PDBQT antes de llevar a cabo el análisis de acoplamiento molecular.

Después de la preparación de receptores y ligandos, se llevó a cabo un análisis de acoplamiento molecular de verificación entre cada proteína y su correspondiente ligando cocrystalizado utilizando AutoDock Vina. Los parámetros del grid que proporcionaron los mejores resultados en el redocking se utilizaron para realizar el acoplamiento con los ligandos propuestos. Las coordenadas y el tamaño del grid para cada proteína fueron los siguientes:

<b>Proteína/PDB</b>	<b>RMSD redocking</b>	<b>Coordenadas (X,Y,Z)</b>	<b>Tamaño (X,Y,Z)</b>
VEGFR-2 / 2OH4	0.484771	2.96, 33.71, 17.66	10.32, 21.77, 10.87
BRAF / 3OG7	0.562221	2.68, -2.49, -21.85	26.93, 15.35, 17.42
SphK1 / 4V24	1.50917	-27.27, 10.38, -13.88	17.69, 15.44, 18.53
DHFR / 1DLS	1.00911	29.99, 17.27, -2.52	16.80, 14.97, 13.07

Nivel de exhaustividad: 32 para cada acoplamiento.

Los resultados del acoplamiento molecular se visualizaron con el programa computacional Maestro 12.4.

Las simulaciones de dinámica molecular se llevaron a cabo con el paquete de simulación Desmond v.6.6 de Schrödinger (D. E. Shaw Research, Nueva York, NY, EE. UU., 2021), empleando el campo de fuerza OPLS 2005. Se preparó el sistema con solvatación de carga puntual simple. La carga total del sistema se neutralizó con los correspondientes contraiones y a una concentración de NaCl 0.15 M en una caja ortorrómbica con 10 Angstroms hacia cada lado desde el átomo más cercano. Se definió el sistema conjunto NPT (número de partículas, presión y temperatura constantes), con una temperatura de 310 K, presión de 1,01325 bares y a una trayectoria de 100 ns.

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS



## Capítulo 1. Introducción General y Objetivos

### 1.1. Introducción General

#### 1.1.1. Diseño de fármacos

Ante la aparición de nuevas enfermedades, el resurgimiento de algunas que ya se consideraban extintas y la resistencia de otras frente a los tratamientos actuales, se hace necesario contar con bibliotecas de compuestos disponibles, con la expectativa de que allí se encuentren algunos que puedan ser implementados en el desarrollo de nuevos tratamientos ya sea deteniendo, ralentizando o revertiendo el avance de una enfermedad. Es allí donde la estrategia que se aborde para la consecución de nuevas entidades moleculares (NECs) cobra gran importancia.

A través de la historia se ha podido llegar a un gran número de medicamentos por diferentes vías, algunas incluyen productos naturales a partir de los cuales se extrae el compuesto que tiene la acción farmacéutica, ejemplos de ello, se muestran en la figura 1.1, como la morfina que se encuentra en la adormidera y que se usa como analgésico, la Efedrina obtenida de *Ephedra distachya* y utilizada en el tratamiento del asma bronquial y el Paclitaxel extraído de la corteza del Tejo de Pacífico (*Taxus brevifolia*), utilizado para el tratamiento del cáncer de mama y comercializado bajo el nombre de Taxol, entre otros. Como también se han dado casos donde las nuevas terapias tienen un alto componente de serendipia como la penicilina, o casos donde los medicamentos ya existentes se reposicionan en nuevos tratamientos como el sildenafil, el minoxidilo, entre otros.

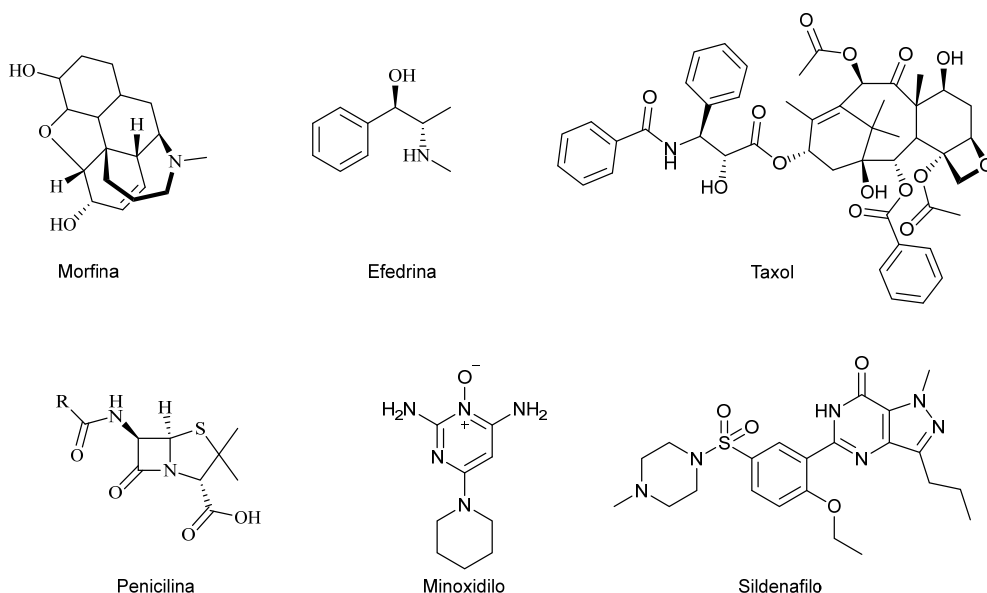


Figura 1.1 Ejemplos de moléculas de uso farmacológico.

Sin embargo, es necesario el uso de estrategias sintéticas que permitan proveer nuevos candidatos. Siendo esta vía una herramienta importante en la búsqueda de nuevos fármacos (ver fig. 1.2.), implementándose en las etapas tempranas en los procesos de desarrollo de nuevos medicamentos.



Figura 1.2 Fases en el desarrollo de un nuevo fármaco<sup>1</sup>.

Entre las estrategias que se pueden abordar para el diseño y síntesis de búsqueda de compuestos bioactivos se incluyen la generación de quimitecas<sup>2</sup>, la síntesis orientada al objetivo (TOS) y la síntesis orientada a la diversidad (DOS)<sup>3</sup>, siendo imprescindibles las herramientas computacionales en algunas de las estrategias<sup>4</sup>.

#### Generación de quimiotecas

Son bibliotecas de compuestos estructuralmente similares, obtenidas principalmente mediante *síntesis combinatoria* que permite desarrollar grandes colecciones de compuestos a partir de uno o varios reactivos en común. Esta estrategia va ligada con el Cribado de Alta Eficiencia (HTS, High Throughput Screening), con la dificultad de que a pesar que se puede obtener un gran número de nuevos compuestos, no se garantiza que dentro de cada colección se incremente el número de compuestos líder en etapas posteriores, puesto que, al conservarse una gran relación estructural, solo se abarca una pequeña región del espacio químico, siendo este último definido por aquellas moléculas -similares a un fármaco- de hasta 30 átomos que se ajustan a la regla de cinco (Lipinski) para biodisponibilidad oral, donde se estima que en esa región se encuentran entre  $10^{20}$  y  $10^{24}$  moléculas.<sup>5</sup>

#### Síntesis Orientada al Objetivo (TOS, Target Oriented Synthesis)

Esta estrategia ha sido de gran utilidad durante varias décadas en la búsqueda de compuestos bioactivos, estando dirigida a la obtención de un compuesto o familia específica de compuestos de los que se espera que puedan llegar a tener una bioactividad interesante.

La bioactividad esperada se fundamenta sobre la base de estudios previos *in vitro* o *in vivo*, por análisis con compuestos que conservan una relación estructural con el que se va a sintetizar, o mediante estudios *in silico*, donde luego de una serie de análisis computacionales se propone para la síntesis la estructura que mejores resultados presente cuando se evalúa frente a la diana biológica de interés (ver fig. 1.3).

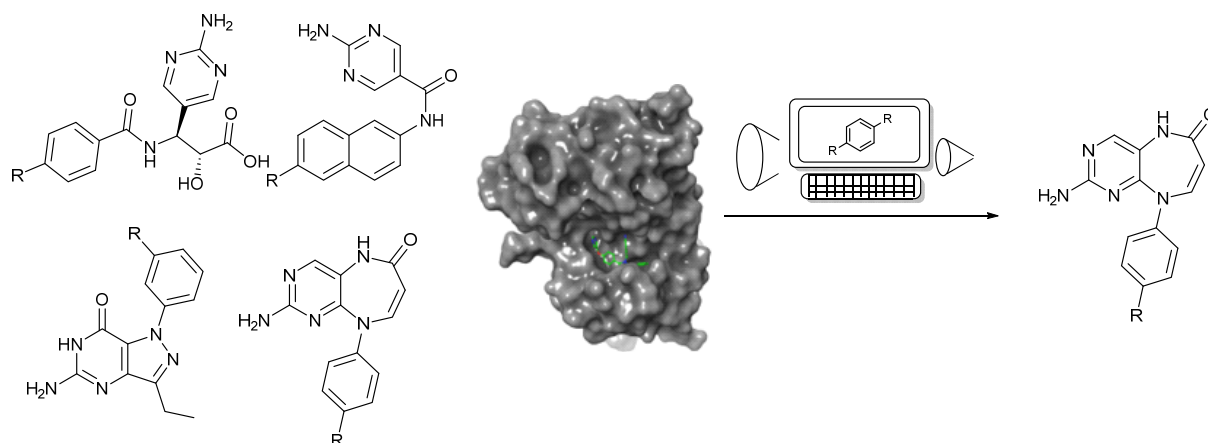


Figura 1.3 Síntesis orientada al objetivo.

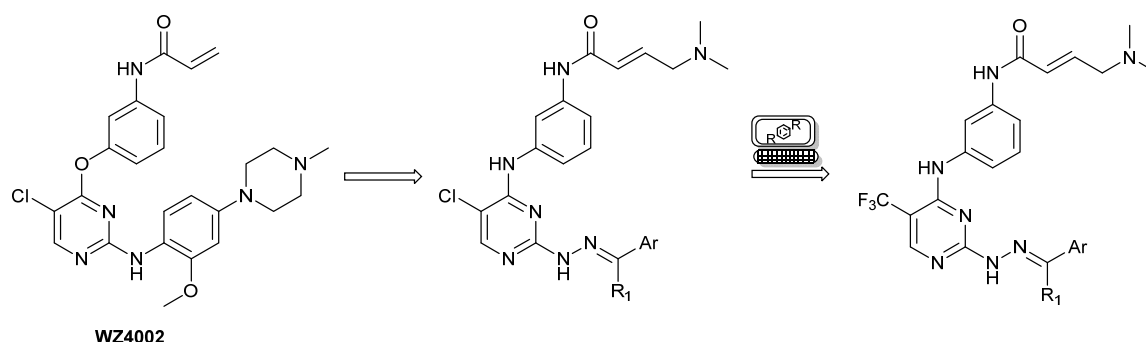
En este tipo de estrategia, el análisis retrosintético<sup>6</sup> adquiere gran relevancia por ser una herramienta para el diseño y consecución de la estructura deseada, de esta manera se puede abordar una ruta sintética dirigida a estructuras complejas a partir de compuestos sencillos o comerciales, manteniendo el enfoque en las reacciones de acoplamiento, en la estereoselectividad y demás consideraciones que se deban tener en cuenta durante el diseño de una estructura en particular<sup>3</sup>.

En la síntesis orientada al objetivo, el uso de herramientas computacionales juega un papel fundamental, ya que el diseño se puede abordar desde diferentes enfoques (basados en la estructura, en el ligando o en los fragmentos), aumentando así las posibilidades de encontrar potenciales fármacos.

#### Diseño de Drogas Basado en la Estructura (SBDD)

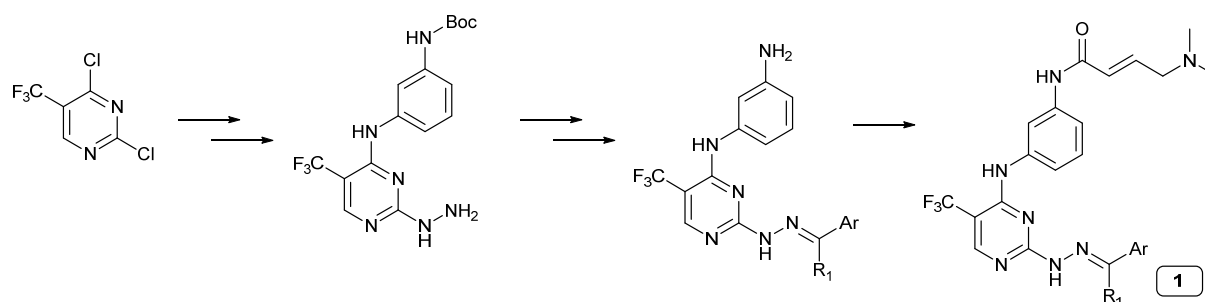
Este diseño se basa en el conocimiento de las proteínas de importancia terapéutica, de las cuales se debe conocer su estructura tridimensional y los sitios de unión con el fármaco, y con esta información se realiza el diseño de los potenciales fármacos de una forma más específica<sup>7</sup>, bajo la premisa de que los candidatos interactuarán con alta afinidad y selectividad con el objetivo. De esa manera, una vez diseñada una biblioteca de candidatos, se realizan los estudios computacionales de docking y dinámica molecular frente a la proteína, de donde las estructuras que mejores resultados presenten serán las que potencialmente pueden modular mejor la función de la proteína de interés, de manera que serán las seleccionadas para una posterior optimización en la búsqueda de los compuestos líder<sup>8</sup>.

Un ejemplo de esto se puede observar a continuación, donde la estrategia de diseño se fundamentó en el conocimiento de la diana molecular (EGFR T790M) y de un inhibidor potente (WZ4002)<sup>9</sup> (ver esq. 1.1). A partir de esta base, se crearon nuevas estructuras que se optimizaron mediante el análisis de resultados computacionales. Este análisis reveló que la presencia de  $-CF_3$  en lugar de  $-Cl$  generaba una conformación más favorable y, además, podía aumentar las interacciones hidrofóbicas con el residuo de aminoácido Met 790<sup>10</sup>.



Esquema 1.1 Diseño de hidrazonas con actividad antiproliferativa sobre la línea celular H1975.

Teniendo en cuenta esos resultados, se planteó la síntesis divergente, logrando obtener compuestos (**1**) (ver esq. 1.2) que presentan potente actividad inhibitoria ( $IC_{50}$ : 0.45 - 0.2  $\mu\text{mol/L}$ ) en la línea celular de cáncer de pulmón H1975 resistente a gefitinib<sup>10</sup>.



Esquema 1.2 Metodología sintética para la obtención de hidrazonas con actividad antiproliferativa sobre la línea celular H1975.

#### Diseño de Drogas Basado en el Ligando (LBDD)

Cuando no hay disponibilidad de estructuras tridimensionales fiables de la proteína objetivo, se puede hacer uso de la información química y estructural conocida de otros ligandos que puedan modular la función de la proteína, en este caso con el uso de métodos estadísticos y analizando la relación estructura-actividad se identifican los posibles farmacóforos o las características químicas responsables de la actividad<sup>11</sup>. Así, con los resultados obtenidos se diseñan nuevos candidatos (o se seleccionan de bases de datos) que se ajusten a esas características, lo cual puede resultar incluso en candidatos estructuralmente diversos (scaffold hopping) que puedan presentar interacciones y efectos biológicos similares<sup>12</sup>.

En este diseño, se presta especial atención en las propiedades ADMET (absorción química, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad)<sup>11</sup> de la moléculas consideradas como posibles candidatos, utilizando la regla de Lipinski como una métrica para evaluar estas características<sup>13</sup>. Los criterios que se tienen en cuenta en la *regla de cinco* de Lipinski comprenden un peso molecular no superior a 500 daltones, un valor de LogP (coeficiente de partición octanol-agua) inferior a 5, y la restricción de no contener más de 5 donadores y 10 aceptores de enlace de hidrógeno en su estructura<sup>14-16</sup>.

### Diseño de Drogas Basado en Fragmentos (FBDD)

Esta estrategia se basa en el conocimiento previo de fragmentos farmacofóricos para la obtención de nuevos medicamentos, en la cual los fragmentos son seleccionados de una variada biblioteca de estructuras químicas<sup>17</sup>, donde por medio de un barrido sobre una diana determinada se identifican los mejores candidatos en función de sus interacciones con el objetivo biológico<sup>18</sup>, ya sea usando técnicas computacionales o la experimentación como la fluorimetría diferencial de barrido, RMN entre otras<sup>19</sup>.

Se espera que el fragmento tenga un peso molecular inferior a 500 Da y que cuente con valores de ClogP, así como de aceptores y donadores de hidrógeno, inferiores a 5. Esto se debe a que el fragmento seleccionado formará parte de una estructura de mayor tamaño que, en lo posible, deberá cumplir con la regla de 5. De esta manera, se espera que el fragmento se aproxime a ser una estructura pequeña y de baja complejidad que puede establecer un número limitado de interacciones con la proteína, pero que estas interacciones sean de alta calidad<sup>20</sup>.

Una vez seleccionado el fragmento base se procede al diseño de estructuras, lo cual se puede realizar por diferentes vías (ver fig. 1.4), entre las más utilizadas se encuentran; el crecimiento de fragmentos, si se conoce la estructura tridimensional de la diana molecular; la fusión de fragmentos y la unión de fragmentos, donde se incluye la generación de sistemas híbridos<sup>21</sup>.

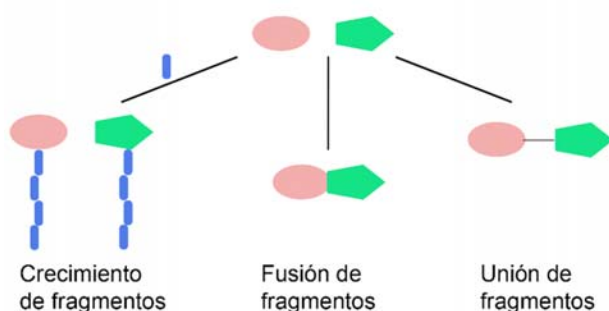


Figura 1.4 Métodos de generación de fármacos bajo la estrategia FBDD.

Un ejemplo de la formación de nuevas entidades químicas basado en la unión de fragmentos se puede ver en la figura 1.6, donde los restos farmacofóricos imidazol y tiazolidinona, se introdujeron en un mismo esqueleto (ver fig. 1.5) y como resultado los productos obtenidos (**2**) presentan una interesante actividad bactericida donde la concentración mínima inhibitoria fue de 2.0 µg/mL, valor semejante al obtenido con el medicamento de referencia (estreptomicina)<sup>22</sup>.

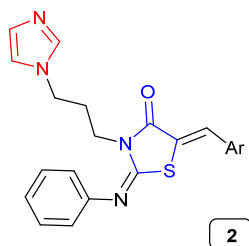


Figura 1.5 Sistema híbrido por unión de restos farmacofóricos.

Otro caso similar, en la figura 1.6 se muestra la estructura híbrida **5**, que es una combinación de las moléculas **3** y **4**, que presentaban actividad inhibitoria frente a c-Src y HDAC respectivamente, dando como resultado un producto con actividad inhibitoria dual<sup>23</sup>.

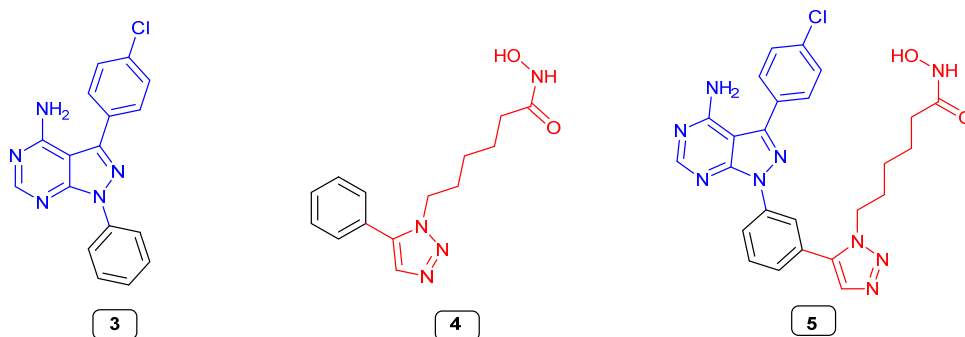


Figura 1.6 Sistemas híbridos por fusión de moléculas enteras.

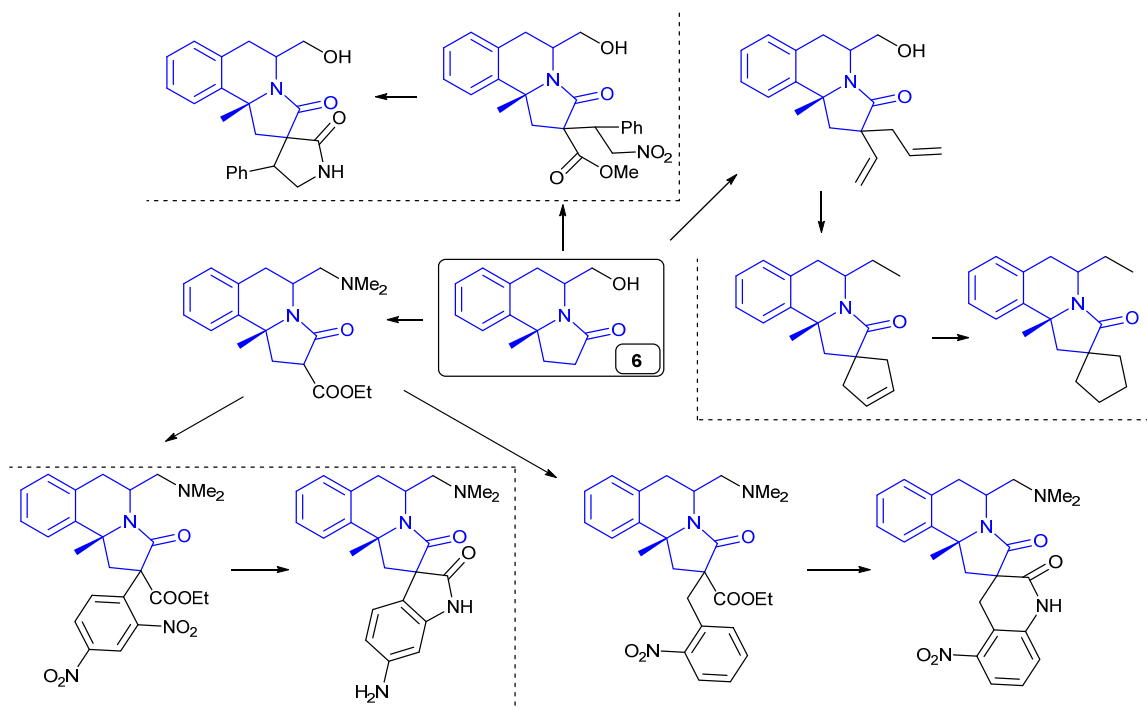
#### Síntesis orientada a la diversidad (DOS, Diversity Oriented Synthesis)

El enfoque de esta metodología se centra en la obtención eficiente de entidades moleculares estructuralmente diversas por medio de un análisis sintético directo<sup>24</sup>. Esto permite ocupar un mayor volumen dentro del espacio químico, saliéndose de la linealidad o de la síntesis en una dimensión, hacía la generación de sistemas variados.

Además, se aprovecha la información disponible relacionada con la bioactividad de pequeñas moléculas, ya sea de origen natural o sintético<sup>25</sup>.

Existen diferentes maneras para abordar la metodología DOS:

- Modificar el núcleo conservando una estructura base de la cual se desprenden otros sistemas (ejemplo esq. 1.3), de esta forma se mantiene el núcleo común (**6**) al cual se asocia en gran parte la bioactividad.



Esquema 1.3 Metodología DOS inspirada en un producto natural<sup>26</sup>.

- Modificar el núcleo central, conservando la semejanza estructural y de densidad de carga entre los diferentes compuestos. La figura 1.7 muestra la eficiente utilización de la metodología DOS para obtener seis familias de compuestos estructuralmente diferentes que conservan grupos funcionales relacionados entre sí, sin ser idénticos, con el fin de hallar moléculas que presenten actividad anti HBV (virus hepatitis B)<sup>27</sup>.

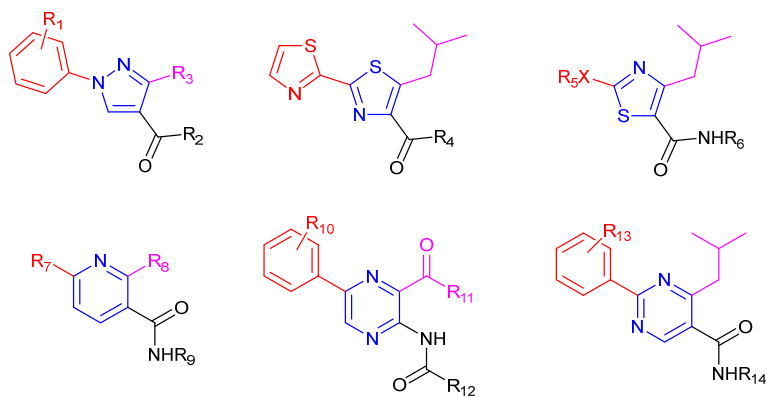
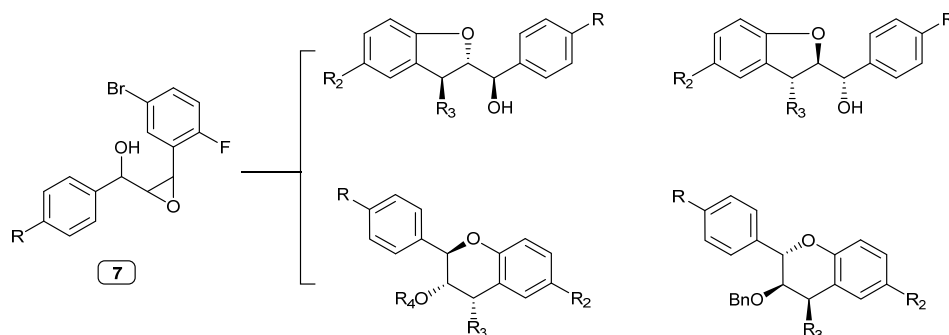


Figura 1.7 Utilización metodología DOS en busca de moléculas anti HBV.

- Generar transformaciones diversas a partir de productos naturales, o inspirarse en compuestos presentes en la naturaleza que cuenten con un amplio rango de actividad previamente corroborado y a partir de allí generar familias de compuestos, lo cual maximizaría la posibilidad de que los nuevos productos tengan una bioactividad promisorio. En un ejemplo de este tipo de estrategia

sintética se muestra en el esquema 1.4, donde se generaron una serie de productos con una estructura cercana a la de los flavonoides presentes en la naturaleza<sup>28</sup>.



Esquema 1.4 Metodología DOS en busca de moléculas inspiradas en flavonoides.

De esa manera, contrario a la química combinatoria donde se presenta una conservación estructural y la diferencia dentro las bibliotecas generadas se debe “pequeñas” variaciones entre las moléculas que componen la librería, en la metodología DOS se pretende generar moléculas con diferencias estructurales notables pero que mantienen una relación entre ellas.

#### 1.1.2. Núcleos heterocíclicos de interés en el tratamiento del cáncer:

Se proyecta que para 2040 se registren cerca de 27 millones de nuevos casos cáncer por año<sup>29</sup>, siendo en 2020 cerca de 10 millones de muertes atribuidas a enfermedades de este tipo<sup>30</sup>. A pesar de ello, cerca del 33% de los casos de cáncer en hombres y del 44 % en mujeres son considerados evitables por estar asociados a factores de riesgo considerados tratables<sup>31</sup>.

Los tratamientos más comunes frente al cáncer son la cirugía, la radioterapia, la inmunoterapia, la terapia hormonal, la quimioterapia y la terapia dirigida<sup>32</sup>, pudiéndose emplear de forma combinada en algunos casos<sup>33</sup>, incluso en algunas poblaciones el uso de la medicina tradicional sigue vigente, siendo la medicina china tradicional la que lidera su uso como alternativa para enfrentar la enfermedad<sup>34</sup>.

Actualmente la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) cuenta con 253 medicamentos aprobados para tratamiento de los diferentes tipos de cáncer siendo el Linfoma no Hodgkin, el cáncer de mama y el de pulmón los que tienen más tratamientos aprobados<sup>35</sup>. (ver fig. 1.8)

Sin embargo, a pesar de contar con un alto número de medicamentos aprobados para el tratamiento del cáncer, pocos pueden ser utilizados en un número amplio de tipos de cáncer (ver fig. 1.9), lo cual por un lado deja ver la especificidad de uso de cada medicamento, pero por otro lado los pacientes de algunos tipos de cáncer cuentan con un número muy limitado de tratamientos a los que pueden acceder, por lo que su calidad y expectativa de vida se puede ver afectada.

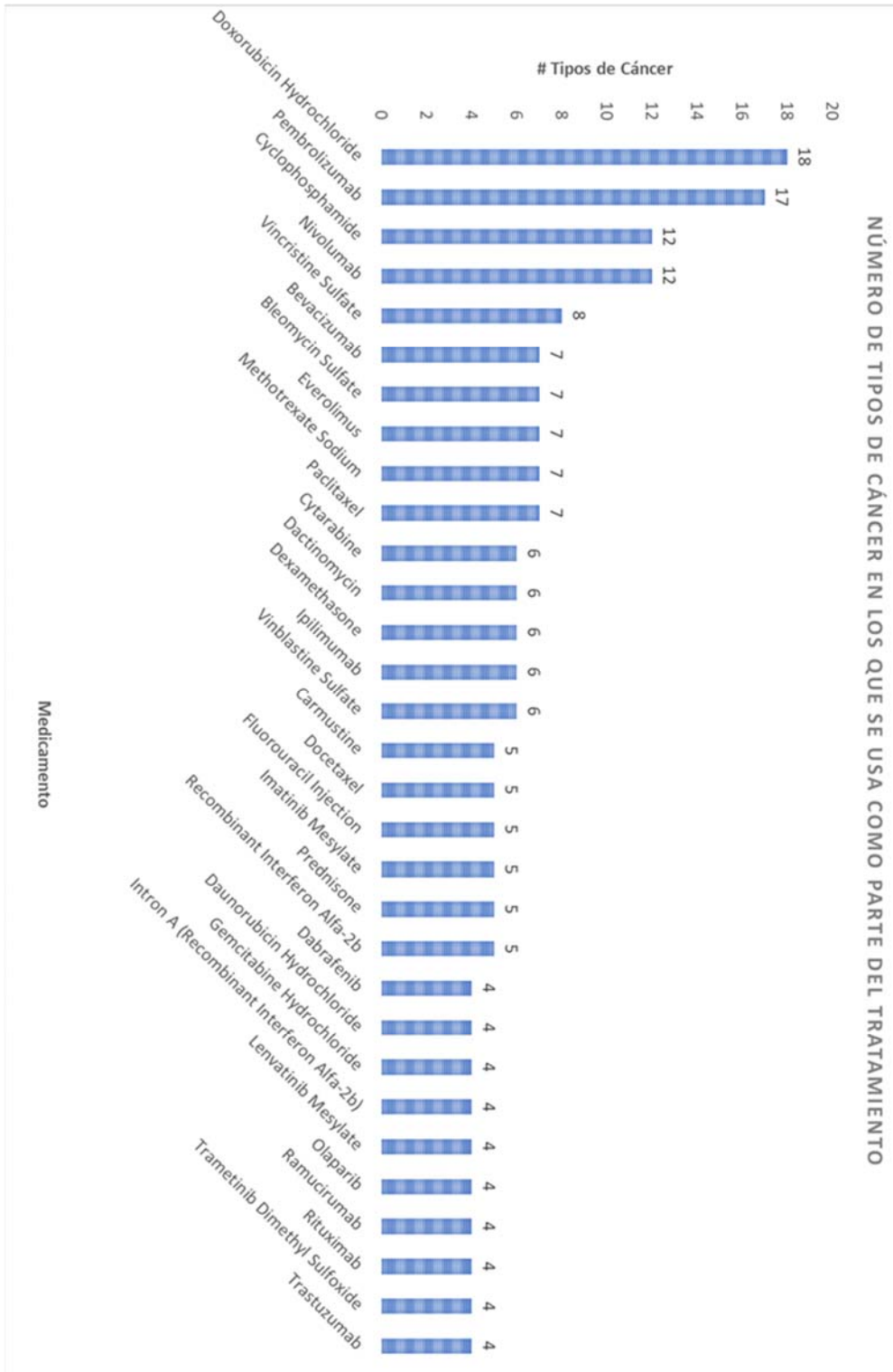


Figura 1.8 Principales medicamentos aprobados por la FDA para el tratamiento del cáncer<sup>35</sup>.

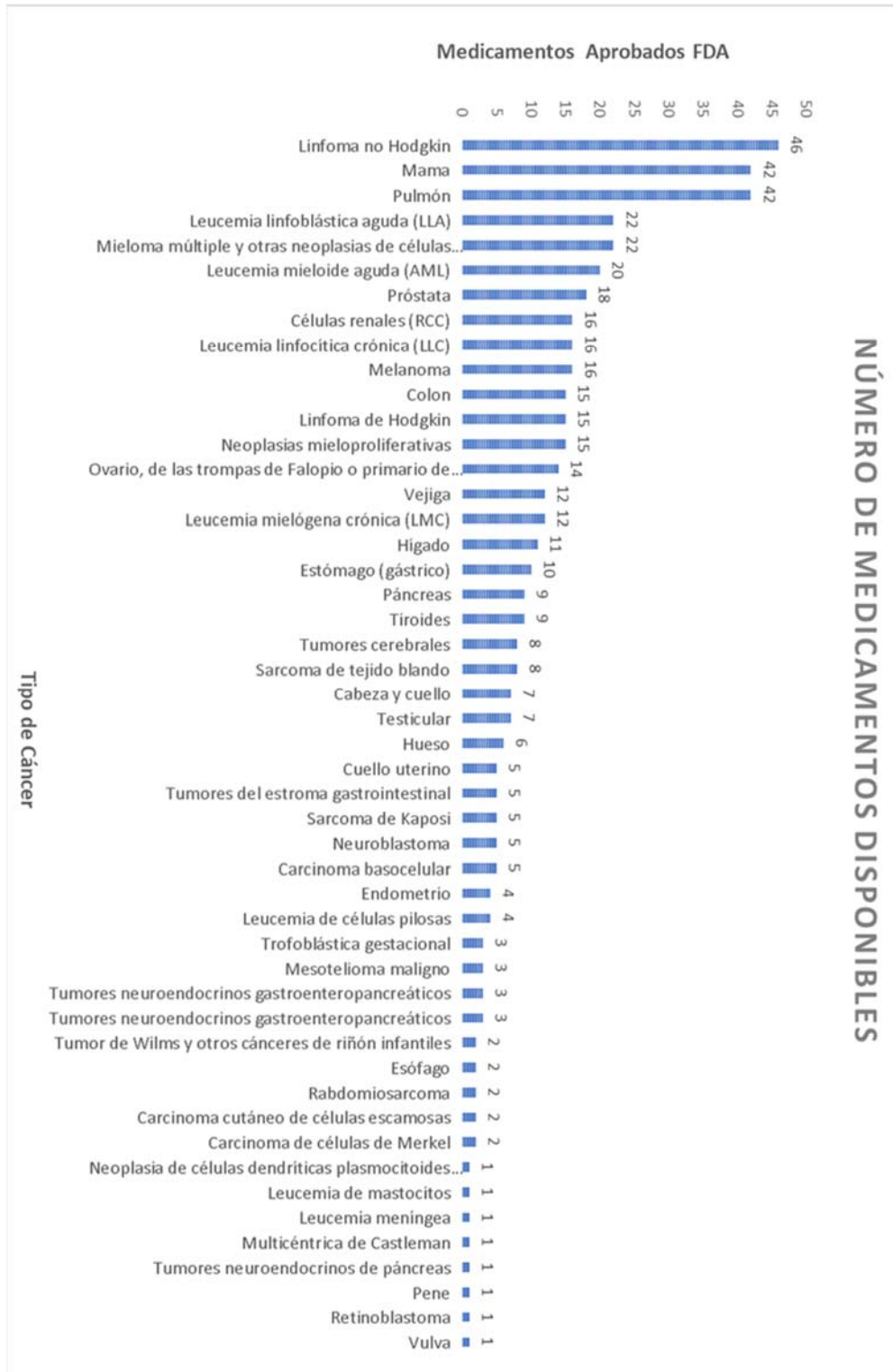


Figura 1.9 Principales medicamentos aprobados por la FDA para el tratamiento del cáncer<sup>35</sup>.

En este contexto, los tipos de estrategias sintéticas mencionadas antes son especialmente interesantes para descubrir nuevas moléculas que puedan ser utilizadas en las terapias para enfrentar enfermedades

de alto impacto como el cáncer, que, como se sabe, presenta altos índices de mortalidad y de aparición de nuevos casos en poblaciones específicas<sup>36</sup>.

### Quimioterapia.

De los medicamentos aprobados, varios de ellos hacen parte de los tratamientos de quimioterapia que se basa en los efectos tóxicos que puede generar el medicamento de forma selectiva en las células cancerígenas<sup>37</sup>, y su uso incluye el tratamiento de cáncer gástrico<sup>38</sup>, de páncreas<sup>39</sup>, oral<sup>40</sup>, de ovarios<sup>41</sup>, de mama<sup>42</sup>, de pulmón<sup>43</sup>, melanoma<sup>44</sup> entre otros.

Dentro de los medicamentos que se utilizan como agentes quimioterapéuticos se puede realizar una clasificación según su mecanismo de acción en cinco grupos: agentes alquilantes, inhibidores de topoisomerasa, inhibidores del huso mitótico, antimetabolitos y otros (grupo sin homogeneidad en su mecanismo de acción)<sup>45</sup>.

Los inhibidores de topoisomerasa y los inhibidores del huso mitótico comparten como característica que algunos de ellos son originados o derivados de productos naturales (excepto el Mitoxantrone e Ispinesib en la figura 1.10), sin embargo, su modo de acción es diferente. Los primeros interactúan con las topoisomerasas evitando el desenrollamiento y promoviendo rupturas en las cadenas de ADN, mientras que los inhibidores del huso mitótico se caracterizan por impedir que las células cancerosas se dividan, ejerciendo su función sobre tubulina evitando su polimerización (Vinca alcaloides) o su despolimerización (taxanos)<sup>46</sup>.

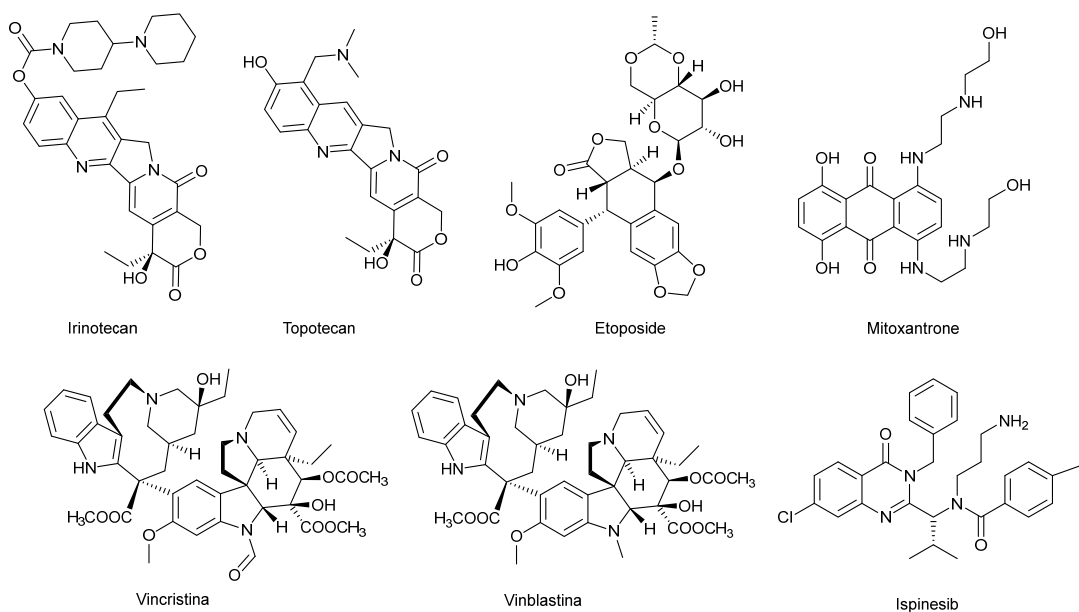


Figura 1.10 Inhibidores de topoisomerasa e inhibidores del huso mitótico.

Por otro lado, los agentes alquilantes y los antimetabolitos se encuentran más relacionados con el diseño y síntesis química ya que su origen no es mayoritariamente natural.

Los agentes alquilantes son un grupo de compuestos que promueven daños en el DNA por medio de la alquilación de la guanina, que una vez alquilada genera un emparejamiento erróneo con timina, lo que conduce a la activación de la vía de reparación de errores que finaliza en la apoptosis celular<sup>47</sup> (ver fig. 1.11).

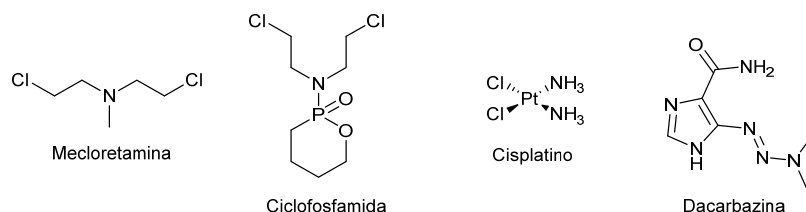


Figura 1.11 Fármacos que actúan como agentes alquilantes.

En cuanto a los antimetabolitos, este grupo de estructuras antineoplásicas se caracterizan porque inhiben la división celular al interferir con la formación de algunas biomoléculas esencial para la supervivencia y proliferación celular, ejemplos de ellos son los antagonistas de pirimidina, antagonistas de purina y los antifolatos.

Los antagonistas pirimidinas actúan bloqueando la formación de nucleótidos púricos, lo que finalmente afecta las síntesis de DNA y RNA, en este caso los derivados de uracilo como el 5-fluorouracilo (5-FU) cumplen esta función y también las prodrogas de 5-FU como el tegafur<sup>48</sup> (ver fig. 1.12).

Los antagonistas de purina inhiben la síntesis de DNA inhibiendo la producción de nucleótidos púricos o incorporándose en el DNA durante su síntesis, actuando como análogos estructurales de las purinas normales entre los que se incluyen medicamentos como la mercaptopurina y la tioguanina<sup>49</sup>.

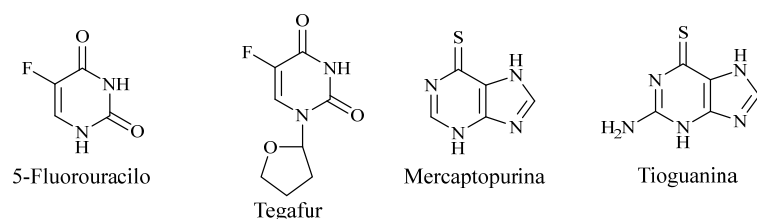
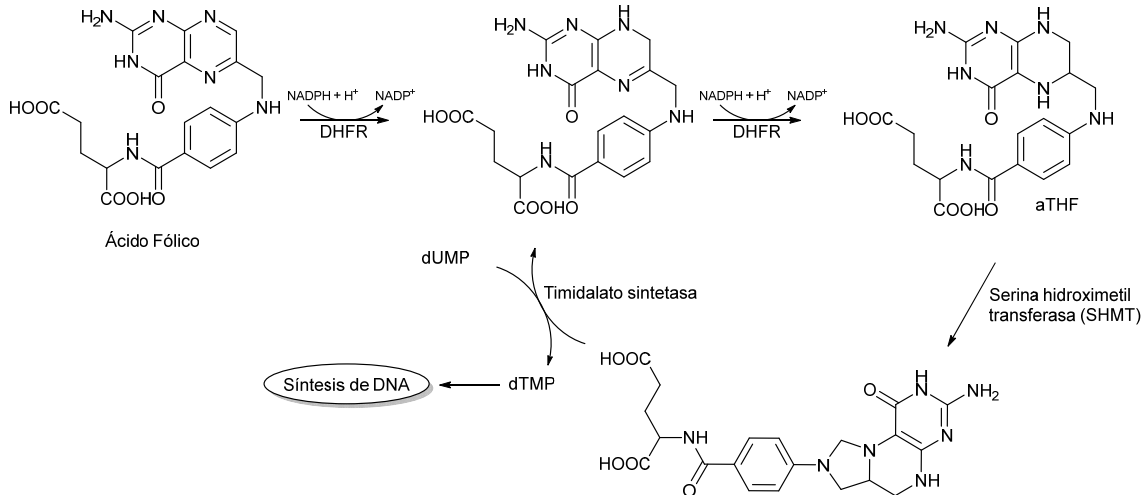


Figura 1.12 Fármacos antagonistas de pirimidina y Fármacos antagonistas de purina.

Mientras que la función de los antifolatos consiste en impedir que las células usen ácido fólico para la elaboración del ADN<sup>50</sup>, lo que puede ocurrir al bloquear el metabolismo de los folatos vía inhibición competitiva de enzimas como la dihidrofolato reductasa (DHFR) u otras como la timidilato sintasa (TS). En el caso de la inhibición de la DHFR se bloquea la formación de ácido tetrahidrofólico (aTHF), una biomolécula clave en las transferencias de carbono en diferentes reacciones biosintéticas<sup>51</sup> como la de

ácidos nucleicos y aminoácidos<sup>52</sup>, lo cual está directamente relacionado con la división celular (ver esq. 1.5).



Esquema 1.5 Reducción del ácido fólico por acción de DHFR.

Aunque los tratamientos de quimioterapia son ampliamente utilizados se han evidenciado algunas desventajas en este tipo de tratamientos, como lo es que la erradicación de células cancerosas no llega a darse completamente en la totalidad de los casos, pudiéndose deber a que los fármacos utilizados pueden generar una inflamación en el microambiente de las células cancerígenas favoreciendo la promoción del cáncer<sup>53</sup>.

Otro aspecto por considerar es el impacto negativo en las células normales, lo que convierte a la quimioterapia en una terapia agresiva, incluso poco recomendada para ser utilizada en las últimas semanas de vida del paciente<sup>54</sup>, de modo que el empleo de otro tipo de terapias como las dirigidas o personalizadas pueden ser una alternativa en muchos casos.

### Terapia dirigida

En las terapias dirigidas se busca que el medicamento afecte a las células cancerosas minimizando el impacto sobre células normales<sup>55</sup>. Se busca ralentizar la multiplicación o inducir la muerte selectiva de células cancerosas incidiendo sobre procesos transducción, crecimiento, proliferación, sobrevivencia o apoptosis celular, actuando directamente sobre genes o proteínas específicas relacionadas con el desarrollo del cáncer. Para ello es clave el papel de la biología molecular en el desarrollo de este tipo de terapias dirigidas<sup>56</sup>, al igual que el avance en los procedimientos encapsulamiento y transporte de fármacos y de selección de órgano-tejido en el que liberar el fármaco<sup>57-59</sup>.

Diferentes objetivos moleculares han sido identificados como responsables en la progresión de la tumor, contando incluso para algunos de ellos con medicamentos aprobados para su uso clínico. El sorafenib un inhibidor de quinasas que actúa sobre VEGFR1-3, PDGFR, RET, c-kit y BRAF, el cabozantinib un inhibidor

de quinasas múltiples (MKI) y el apatinib un inhibidor de tirosina quinasas con múltiples dianas<sup>60</sup>, son algunos ejemplos de medicamentos utilizados en terapias dirigidas en cáncer.

Si bien los efectos adversos que se esperan por el uso de terapia dirigida son menores que los asociados a la quimioterapia, su incidencia sigue siendo alta. Un ejemplo de ello son los efectos cutáneos, que pueden alcanzar una incidencia del 90 % para algunos medicamentos<sup>61</sup>. Esto, sumado a la resistencia que se puede generar a los medicamentos, hace necesario el diseño de nuevos tratamientos que puedan llegar a compensar la pérdida de eficacia<sup>62</sup> de los actualmente utilizados.

### 2-Aminopirimidinas: Un clásico de los bloques de construcción de fármacos

Dentro de las moléculas orgánicas el fragmento 2-aminopirimidínico ha sido ampliamente estudiado y el hecho de que aparezca incluido en la estructura de una variedad de medicamentos comerciales hace que su relevancia sea aún mayor. Este motivo estructural es considerado biológicamente privilegiado, y por tanto como un farmacóforo de referencia.<sup>63,64</sup>

Si bien son varios los medicamentos que portan este núcleo, es también amplio su rango de actividad. En la figura 1.13 se muestran algunos ejemplos, como la Rilpivirina usada en el tratamiento del VIH, la buspirona usada como agente ansiolítico, o la sulfadiazina empleada como antibiótico.

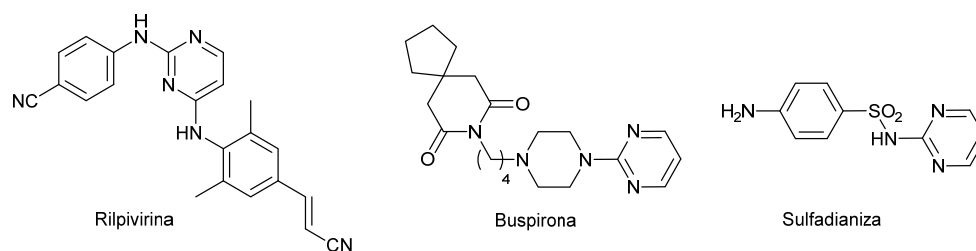


Figura 1.13 Medicamentos con fragmento de 2-aminopirimidina.

No obstante, el enfoque hacia el uso de derivados 2-aminopirimidínicos para enfrentar enfermedades de cáncer ha sido uno de los más estudiados<sup>65</sup>, (ver algunos ejemplos en figura 1.14). Hay una amplia variedad de medicamentos aprobados por la FDA que contienen ese núcleo, como lo son el pazopanib, el imatinib mesilato y el pacritinib<sup>66</sup>, este último utilizado en el tratamiento de la mielofibrosis, sumándose a otros que se encuentran en fases experimentales como defactinib y buparlisib<sup>66,67</sup>.

Desde la década de 1940 que se suministró aminopeptina para uso humano en pacientes con leucemia y que mostró resultados positivos<sup>68</sup>, se ha encontrado que las estructuras miméticas al ácido fólico pueden impedir que las células lo sintetizen e impiden por tanto su funcionamiento correcto. Dichas moléculas al igual que el ácido fólico, conservan el fragmento 2-aminopirimidínico en su estructura.

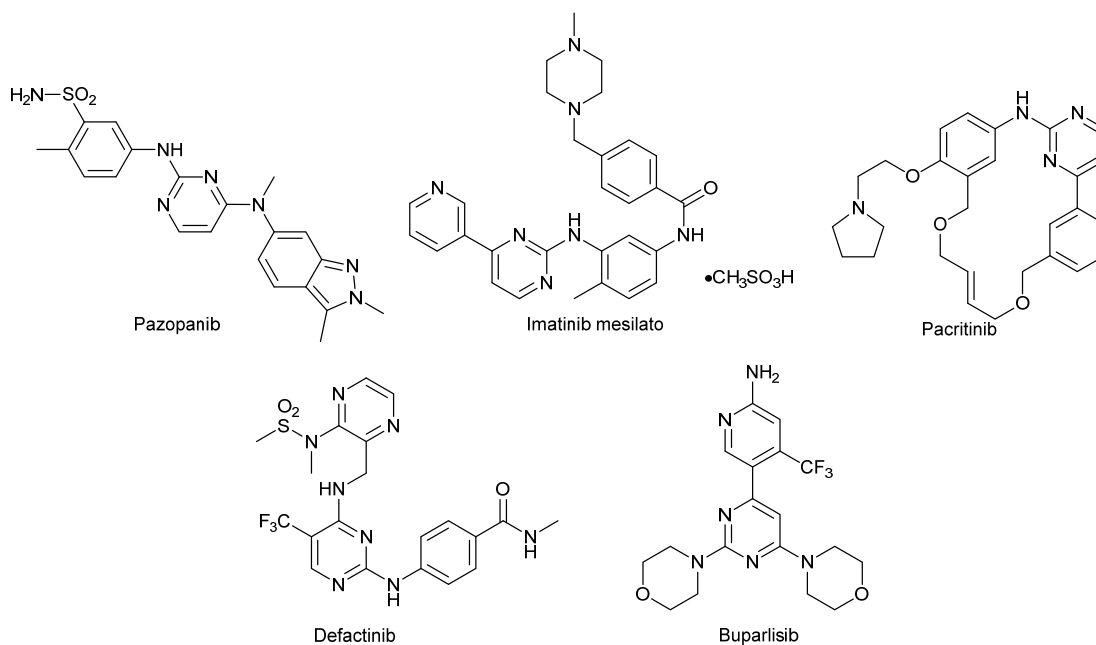


Figura 1.14 Medicamentos con fragmentos 2-aminopirimidínicos usados en tratamientos contra el cáncer.

Algunos de estos antifolatos (ver fig. 1.15), como se les conoce, incluyen al perimetrexed, pralatrexato, nolatrexed hidrocloreuro, talotrexin amonio<sup>69</sup> y metotrexato, siendo este último el más exitoso hasta el momento, del cual se han obtenido resultados terapéuticos muy favorables<sup>70</sup>.

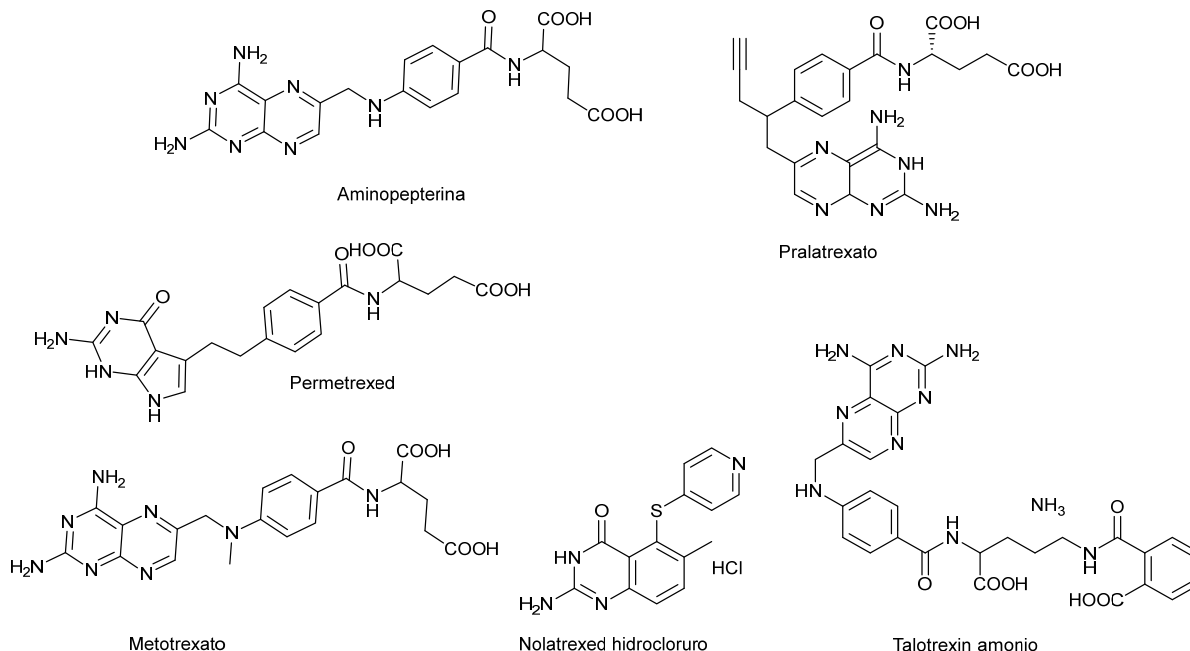


Figura 1.15 Medicamentos que actúan como antifolatos.

Por medio de herramientas computacionales se han podido analizar grandes bibliotecas de fármacos para su reposicionamiento, encontrando que algunos que contienen el fragmento 2-aminopirimidínico y que son empleados en tratamientos diferentes del cáncer, pueden ser potencialmente eficaces frente a otras dianas relacionadas con el desarrollo de la enfermedad. En la figura 1.16 se muestra el caso del Alfuzosina, usado en el tratamiento de la hiperplasia prostática, que según resultados computacionales podría llegar a interactuar en el sitio activo de la proteína MELK (Maternal Embryonic Leucine Zipper Kinase), sobreexpresada en el cáncer de mama triple negativo y correlacionada con el desarrollo del cáncer<sup>71</sup>.

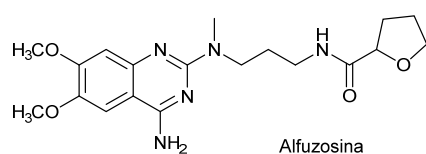
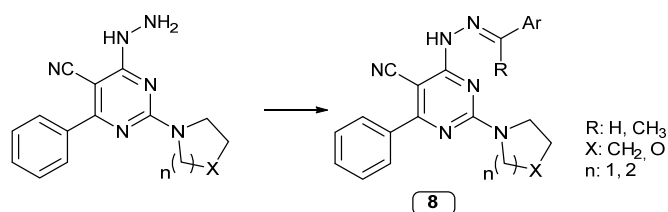


Figura 1.16 Estructura de la Alfuzosina.

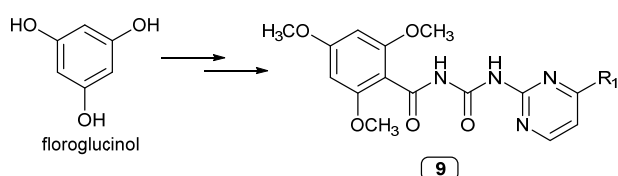
Adicional a los compuestos comerciales con fragmentos 2-aminopirimidínicos existe un gran número de investigaciones alrededor de este núcleo con el fin de hallar nuevos compuestos con potencial farmacológico para ser utilizados en futuros tratamientos del cáncer.

Un ejemplo del uso de este resto farmacofórico, es el reciente desarrollo de nuevos sistemas híbridos del tipo hidrazona-aminopirimidina (**8**) (ver esq. 1.6) como nuevos inhibidores de aromataza y del receptor de crecimiento epidérmico (EGFR), ambos relacionados con la proliferación celular en el cáncer de mama ER-ve y con el triple negativo respectivamente. Sus resultados mostraron que los derivados aminopirimidínicos presentan actividad antiproliferativa frente a la línea celular MCF-7 con valores entre 0.87  $\mu\text{M}$  – 12.91  $\mu\text{M}$  y frente a MDA-MB-231 en el rango entre 1.75  $\mu\text{M}$  – 9.46  $\mu\text{M}$ , asociando su actividad con la inhibición de las proteínas mencionadas, la cual se ve impactada por los sustituyentes sobre el núcleo pirimidínico en las posiciones C2N, C4 y C6<sup>72</sup>.



Esquema 1.6 Sistemas híbridos del tipo hidrazona-aminopirimidina.

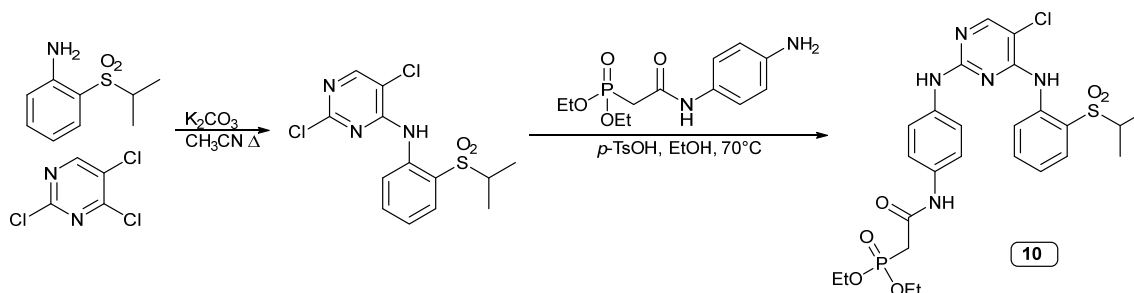
Por otro lado, se ha reportado la generación de tres derivados aminopirimidínicos (**9**) a partir de floroglucinol (ver esq. 1.7), encontrando que presentan actividad antiproliferativa comparable con el 5-fluorouracil sobre las líneas celulares A-549, MCF-7, Hela y HepG2 correspondientes a cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer cérvico uterino y cáncer de hígado respectivamente. Adicionalmente sus estudios mostraron que el compuesto R: CH<sub>3</sub> promueve la apoptosis en la línea celular MCF-7<sup>73</sup>.



R <sub>1</sub>	IC <sub>50</sub> (μM)			
	A-549	MCF-7	Hela	HepG2
a) H	34.45	26.24	38.20	28.50
b) CH <sub>3</sub>	19.67	18.49	29.73	27.62
c) Cl	56.17	19.78	34.73	37.65
5-fluorouracilo	21.04	19.99	17.98	19.85

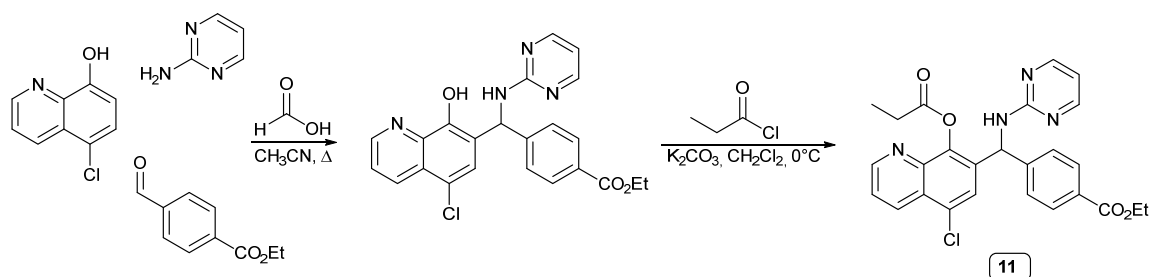
Esquema 1.7 Derivados aminopirimidínicos a partir de floroglucinol.

Alrededor de la proteína FAK (Focal adhesion kinase) se han tratado de desarrollar nuevas moléculas que inhiban su actividad, ya que es considerada como un objetivo potencial importante para el tratamiento de tumores malignos y resistentes a fármacos, debido a sus efectos reguladores sobre múltiples vías de señalización, especialmente en la invasión y adhesión celular. El compuesto **10** (ver esq. 1.8) fue diseñado y sintetizado como un potencial inhibidor de FAK para el tratamiento del cáncer pancreático, encontrándose que inhibía fuertemente FAK (IC<sub>50</sub> 0.1165 nM) y que presentaba actividad antiproliferativa contra la línea celular AsPC-1 (IC<sub>50</sub> 0.1596 μM), mientras que la toxicidad frente a células normales de la línea celular L-02 fue considerablemente menor (IC<sub>50</sub> 1.398 μM). Adicionalmente al realizar ensayos *in vivo* con ratones xenograft encontraron que el volumen del tumor disminuía considerablemente (cerca de 85%), sin presentarse mortalidad, ni pérdidas de peso importantes luego de un tratamiento intravenoso durante 10 días después, lo que permite considerarlo un buen candidato en la búsqueda de tratamiento frente contra el cáncer pancreático<sup>74</sup>.



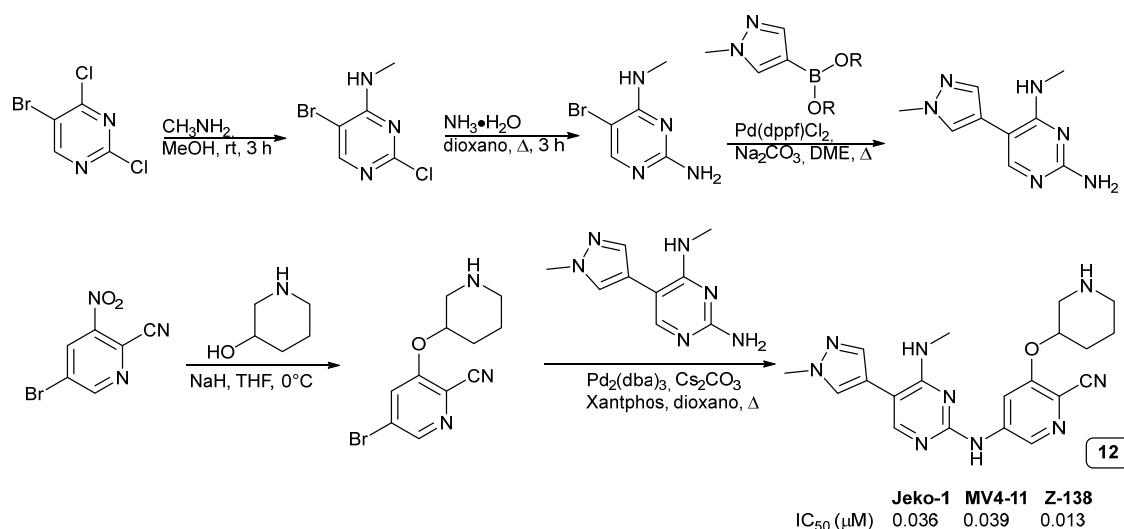
Esquema 1.8 Derivado aminopirimidínico **10** inhibidor FAK.

La proteína supresora de tumores (p53 o TP53) ha sido reconocida como una diana para el desarrollo de nuevos medicamentos debido a que induce la regresión del tumor. Sin embargo, su actividad se ve inhibida por las proteínas MDM2 y MDM4 que a su vez promueven la ubiquitinación de p53. Basados en lo anterior se ha reportado la síntesis y caracterización de pequeñas moléculas entre los que se encuentra un derivado aminopirimidínico (**11**) (ver esq. 1.9) que mostró la mejor actividad antiproliferativa independiente de p53 en células de leucemia IC<sub>50</sub> 0.23 μM en la línea celular NALM6 y 0.29 μM en shP53NALM6<sup>75</sup>.



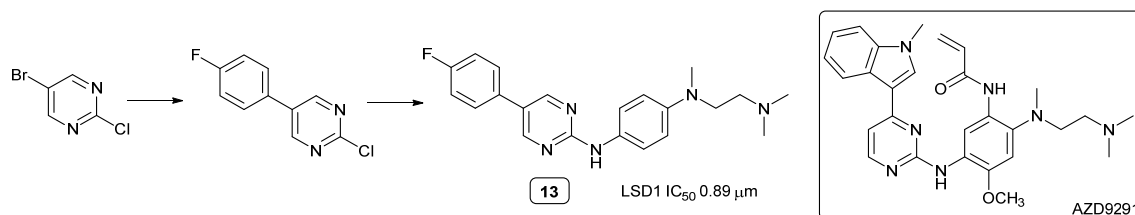
Esquema 1.9 Sistemas híbridos quinolina-pirimidina con actividad antiproliferativa.

El uso del diseño racional que incluye fragmentos aminopirimidínicos también ha mostrado resultados positivos, como lo es el caso del compuesto **12** (ver esq. 1.10), que fue diseñado después de realizar screening virtual a frente a la serina/treonina cinasa CHK1 (enzima reguladora del ciclo celular), a partir del cual se escogió como mejor candidato según los resultados obtenidos, y posteriormente fue optimizado estructuralmente y evaluado frente a las líneas celulares Z-138, Jeko-1 y MV4-11 resultando ser un candidato promisorio en la búsqueda de nuevas entidades químicas con potencial farmacéutico<sup>76</sup>.



Esquema 1.10 Ruta sintética de sistemas aminopirimidínicos basado en screening virtual.

Otro ejemplo interesante de optimización estructural de compuestos con actividad inhibitoria de enzimas relacionadas con la progresión del cáncer mostró que a partir de la estructura AZD9291 de la cual se conocía su actividad inhibitoria frente a la distona demetilasa LSD1 (importante durante la carcinogénesis)<sup>77</sup>, se diseñaron y sintetizaron una serie de compuestos aminopirimidínicos, donde el compuesto **13** (ver esq. 1.11), sobresale por su alto poder de inhibición (IC<sub>50</sub> 0.89 μM) probablemente presentando interacciones de tipo pi-Val 433 y enlaces de hidrógeno con His 564 según los resultados obtenidos por el docking molecular<sup>78</sup>.



Esquema 1.11 Aminopirimidinas como inhibidores de distona demetilasa LSD1.

El aumento en la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa se ha asociado al desarrollo de algunas patologías, como el cáncer de colon<sup>79</sup>. Se ha encontrado que aminopirimidinas, como la **14** (ver fig. 1.17), presentan buena actividad inhibitoria sobre esta enzima. Este hallazgo también fue soportado con estudios computacionales de docking que indican que esa estructura puede ser ubicada espacialmente de forma similar al ligando cocrystalizado con la proteína, permitiendo que el fragmento  $\text{N}=\text{C}-\text{NH}_2$  interactúe por medio de enlaces de hidrógeno con el grupo hidroxilo de Tyr 472 de la enzima<sup>80</sup>.

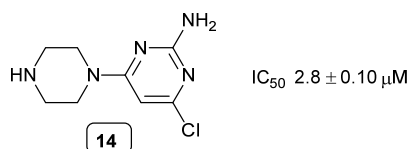
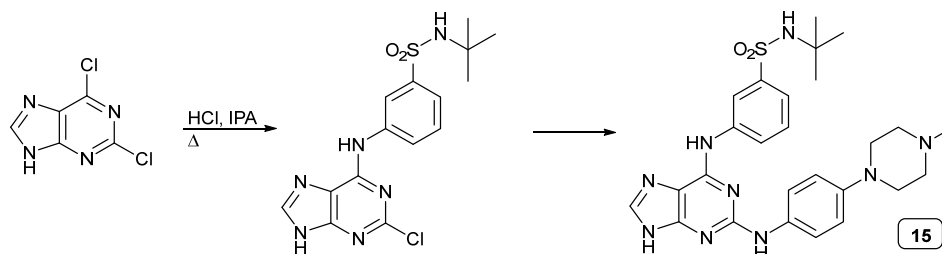


Figura 1.17 Aminopirimidina con actividad inhibitoria de  $\beta$ -glucuronidasa.

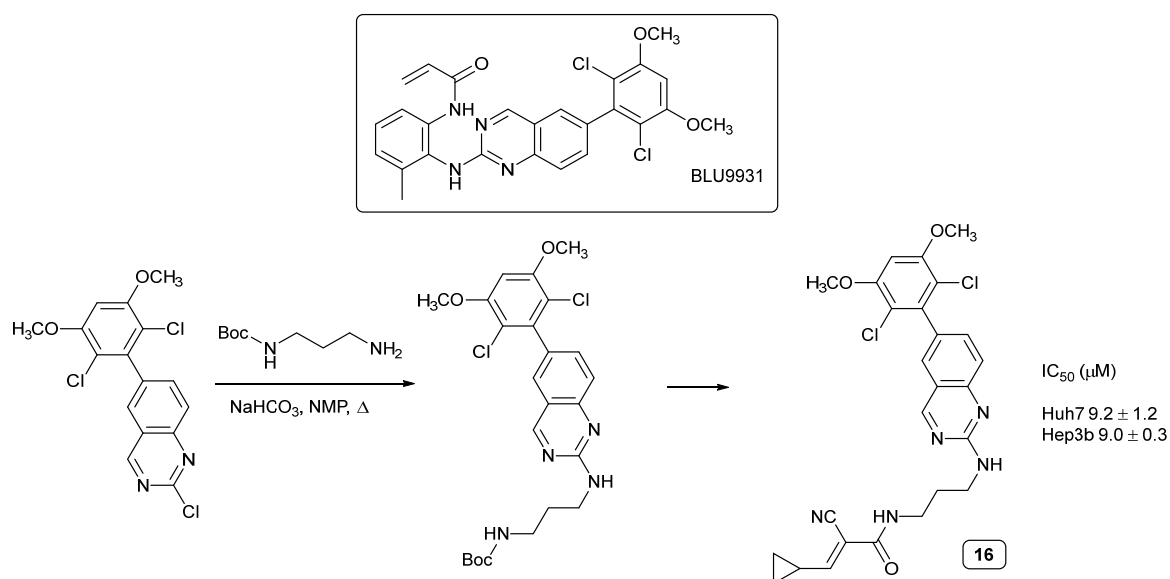
Dentro de los sistemas pirimidínicos fusionados, las estructuras policíclicas constituyen un capítulo aparte debido a su importancia biológica. Sin embargo, no es solo su abundancia en organismos biológicos lo que la hace de particular interés, sino también la bioactividad asociada a ese núcleo.

Algunas de las purinas sustituidas en la posición 2 con el grupo amino han mostrado resultados positivos como inhibidores de entidades relacionadas con la progresión de algunos tipos de cáncer, siendo éste el caso de la estructura **15** (ver esq. 1.12) con características multidiana al inhibir con potencia aceptable a la enzima JAK2 ( $IC_{50}$  22 nM) y la proteína BRD4 (BD2,  $IC_{50}$  13 nM), relacionadas con el desarrollo de las neoplasias mieloproliferativas. Adicionalmente, mediante estudios computacionales se evidencia la importancia del grupo amino de la posición 2 en la estabilidad del complejo diana-ligando, al generar enlaces de hidrógeno con el residuo Leu 932 en JAK2 y con el residuo Pro 375 en BRD4(BD2)<sup>81</sup>.



Esquema 1.12 Purinas como inhibidores multidiana.

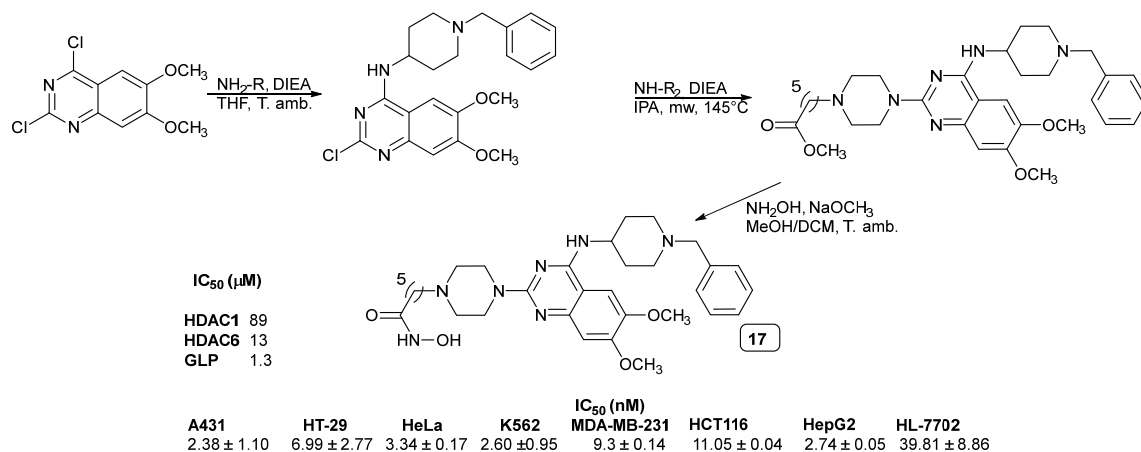
Las quinazolininas o benzopirimidinas han mostrado tener buena actividad antitumoral en algunos ensayos realizados<sup>82-84</sup>. Es el caso de un estudio realizado alrededor de receptor 4 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR4, diana molecular en la búsqueda de medicamentos contra el carcinoma hepatocelular) y su inhibición mediante enlaces covalentes reversibles, se encontró que el compuesto **16** (ver esq. 1.13) diseñado con base en la estructura de BLU9931 exhibía actividad inhibitoria de FGFR4 con un  $IC_{50}$   $0.42 \pm 0.16 \mu\text{M}$ , posiblemente relacionada la formación de enlaces covalentes reversibles entre Cys 552 y el carbono  $\beta$ -carbonílico. Sumado a esto se halló que bloqueaba la vía de señalización FGFR4 en las líneas celulares Hep3b and Huh7, en las cuales también presentó actividad inhibitoria moderada<sup>85</sup>.



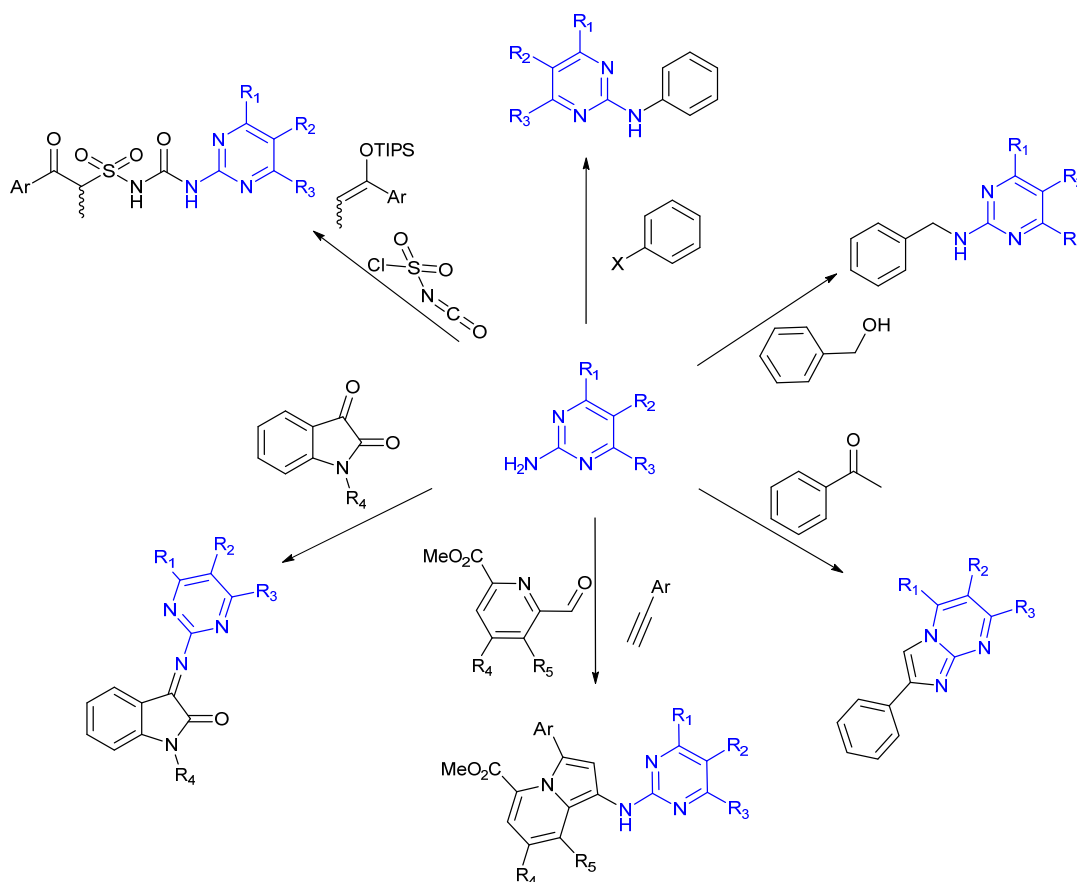
Esquema 1.13 Quinazolinina con actividad inhibitoria frente a FGFR4.

Otras quinazolininas han sido diseñadas como moléculas multidiana para inhibir histonas deacetilasas (HDACs) y G9a/GLP, las cuales no solo presentan una buena inhibición de esas proteínas ( $IC_{50}$  1.3, 89 y 13 nM para GLP, HDAC1 y HDAC6 respectivamente), sino que también en estudios in vitro actúan como antiproliferativos con una buena potencia en 8 líneas celulares de cáncer evaluadas, obteniéndose para la estructura más prometedora (**17**) (ver esq. 1.14) valores de  $IC_{50}$  inferiores a 10.0 nM en la mayoría de los casos, e induciendo apoptosis en la línea celular HepG2<sup>86</sup>.

Algunos de los ejemplos anteriores permiten evidenciar no solo la importancia biológica que puede llegar a tener el fragmento aminopirimidínico, sino también la reactividad de ese fragmento, donde una buena parte de las reacciones reportadas se basan en las características nucleofílicas del grupo amino, dando origen a productos que presentan el grupo amino interno y no como un  $-NH_2$  libre, entre las que se incluyen reacciones de acoplamiento<sup>87,88</sup>, de N-alkilación<sup>89</sup>, de ciclación<sup>90</sup>, y de adición nucleofílica<sup>91-93</sup> (ver esq. 1.15).



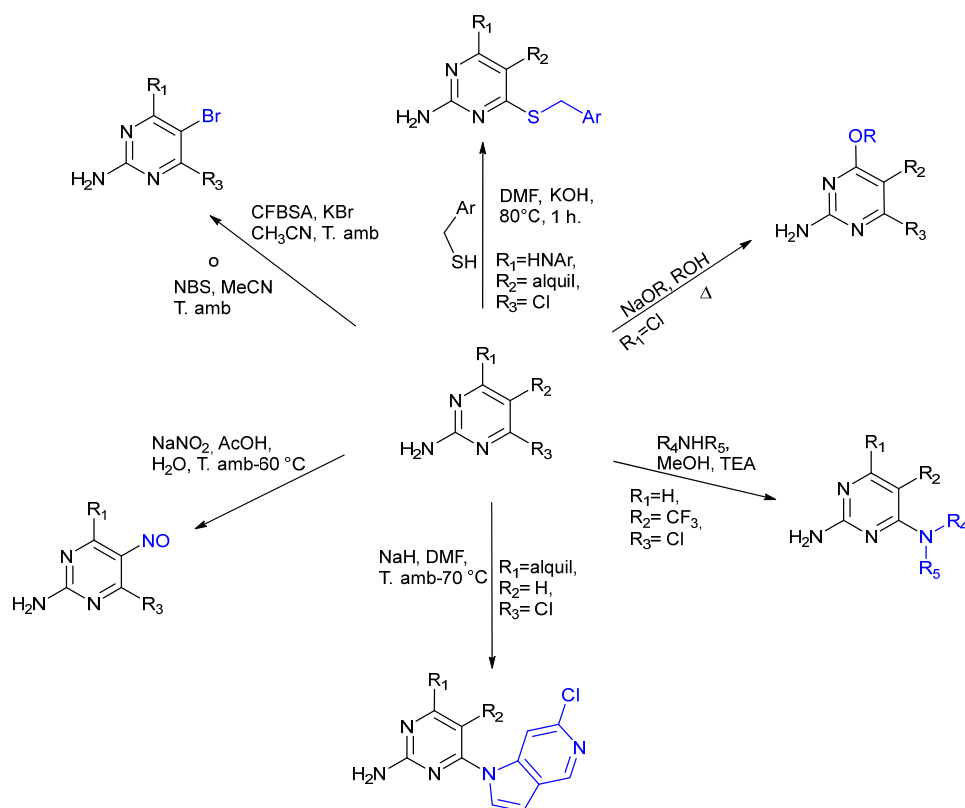
Esquema 1.14 Síntesis de Quinazolina 17 con actividad multidiana.



Esquema 1.15 Ejemplos de reacción de 2-aminopirimidinas con el grupo amino interno en el producto.

No obstante, el sistema 2-aminopirimidínico es muy versátil y permite la modificación o derivatización de la estructura directamente sobre el anillo aromático, de esa manera es posible obtener productos de halogenación<sup>94</sup>, formación de tioéteres<sup>95</sup>, éteres<sup>96</sup>, aminación a partir de amina alifáticas<sup>97</sup> y aromáticas<sup>98</sup>, nitrosación<sup>99</sup> entre otras reacciones (ver esq. 1.16).

Ese tipo de modificación permite que el grupo NH<sub>2</sub> quede libre ya sea para posteriores reacciones, por ejemplo, la obtención de sistemas fusionados<sup>100</sup>, o por interés biológico, donde el NH<sub>2</sub> puede actuar como un donador de enlaces de hidrógeno, lo cual puede ser interesante en las interacciones con las dianas moleculares.



Esquema 1.16 Reacciones sobre el anillo pirimidínico.

### Azoles: una alternativa frente al cáncer

En 2014 se publicó que el 59 % de los medicamentos aprobados por la FDA contenían al menos un sistema heterocíclico nitrogenado entre los que se incluían una gran variedad de anillos de 5 miembros como imidazoles, triazoles, tiazoles y demás<sup>101</sup>. Estos sistemas heterocíclicos cuentan con un amplio espectro de bioactividad, solo el núcleo del benzimidazol cuenta con una variedad de estructuras disponibles comercialmente para el tratamiento de diferentes afecciones, como el omeprazol, alendazol, envirodina y benzoxapofen (ver figura 1.18), las cuales tienen actividad antiulcerante<sup>102</sup>, antihelmíntico<sup>103</sup>, antiviral<sup>104</sup> y antiinflamatorio<sup>105</sup> respectivamente.

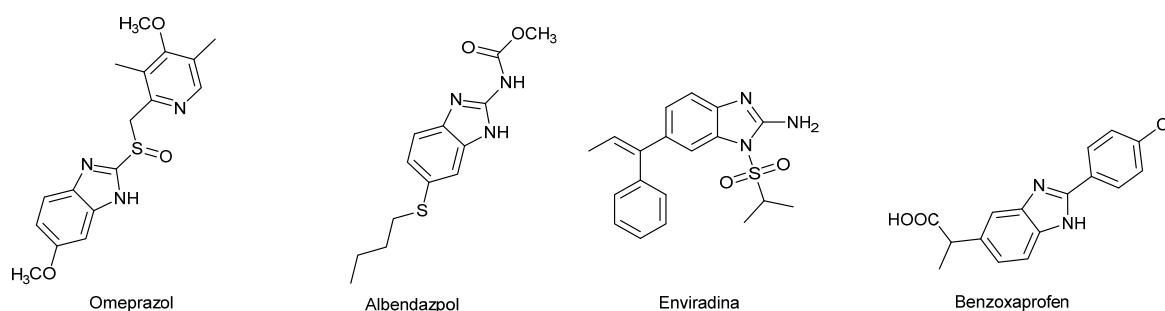


Figura 1.18. Medicamentos comerciales que incluyen benzimidazoles en su estructura.

Su uso como anticancerígenos también ha sido ampliamente explorado, algunas moléculas que contienen azoles en su estructura ya han sido aprobadas y otras se encuentran en las fases clínicas<sup>106</sup>. En la figura 1.19 se recogen las estructuras de fármacos como tucanitib, bendamustin, la atorvastatina, el ribociclib, el abemaciclib y el alpelisib, que presentan fragmentos de tipo azol como triazol, benzimidazol, pirrol o tiazol, siendo en gran parte estos fragmentos los responsables de la actividad, ya que pueden establecer enlaces de hidrógeno con algunos restos de aminoácidos en los sitios de unión, como se ha podido evidenciar en estructuras cocrystalizadas de algunas dianas moleculares (PDB: 5L2S, 4JPS) y también en estudios computacionales<sup>107</sup>.

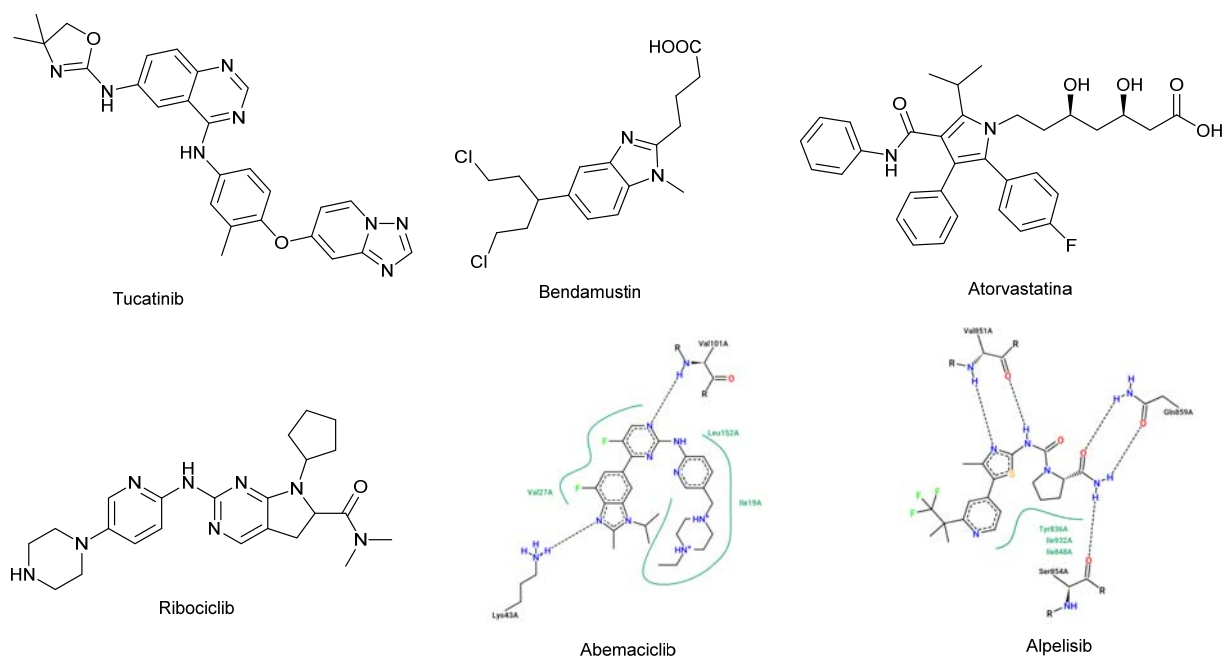
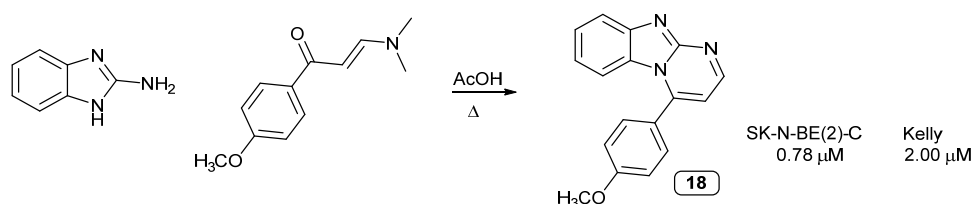


Figura 1.19 Azoles en medicamentos usados en tratamientos del cáncer. Las imágenes correspondientes a Abemaciclib y Alpelisib fueron visualizadas en PoseView de la plataforma protein.plus a partir de los PDB 5L2S y 4JPS respectivamente.

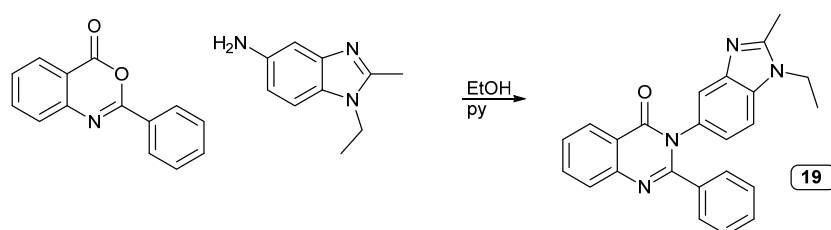
Dentro de los heterociclos de 5 miembros, los benzimidazoles son particularmente relevantes ya que varias estructuras que los contienen presentan propiedades anticancerígenas prometedoras, por ejemplo, por vía sintética se ha podido llegar a diversas estructuras que contienen el núcleo de benzimidazol.

La sobreexpresión de la peptidasa 5 específica de ubiquitina (USP5) ha sido asociada con la tumorigenesis de diferentes tipos de cáncer entre los que se incluye el neuroblastoma. Es así como se han hecho esfuerzos para desarrollar nuevas estructuras que puedan actuar como inhibidores USP5 para bloquear el crecimiento de células de neuroblastoma, una de esas nuevas estructuras es el pirimido[1,2-a]benzimidazol (**18**) (ver esq. 1.17) que ha mostrado una interesante actividad al ser evaluado frente a líneas celulares de ese tipo de cáncer y baja toxicidad frente a líneas celulares normales<sup>108</sup>.



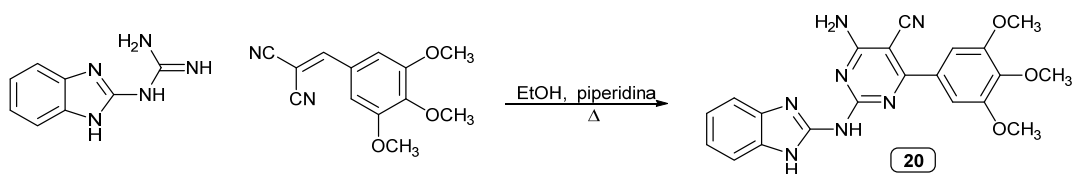
Esquema 1.17 Pirimido-benzimidazol **18** como inhibidores de USP5.

Así como en las aminopirimidinas, la actividad de algunos benzimidazoles como inhibidores de DHFR ha sido evaluada previamente, encontrándose casos donde la inhibición puede llegar a ser más potente que la asociada al metotrexato ( $\text{IC}_{50}$  0.011  $\mu\text{M}$  vs  $\text{IC}_{50}$  0.02  $\mu\text{M}$ ) en el mejor de los casos, esto cuando se analizan diferentes sustituyentes sobre el anillo de la posición 2 de la quinazolina (**19**) (ver esq. 1.18), en el sistema híbrido obtenido por la reacción entre una oxazinona y un 5-aminobenzimidazol<sup>109</sup>.



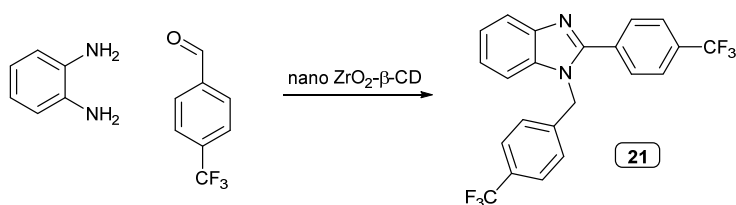
Esquema 1.18 Sistema híbrido quinazolina-benzimidazol **19**, inhibidor de DHFR.

Similar al caso anterior, los sistemas híbridos del tipo pirimido-benzimidazol también han sido objeto de estudio en la búsqueda de nuevas moléculas con actividad antitumoral, ya que los dos fragmentos cuentan con un amplio espectro de bioactividad como se ha ejemplificado anteriormente. De forma análoga a la obtención de pirimidinas a partir de derivados de guanidina se reportó la síntesis de una serie de estructuras híbridas (ver esq. 1.19). Los resultados de actividad frente a líneas celulares cancerígenas muestran que con el compuesto **20** se obtienen resultados favorables, particularmente frente a los paneles de líneas celulares de cáncer de colon, melanoma, próstata y mama, con valores de  $\text{GI}_{50}$  MG-MID (actividad inhibitoria del crecimiento) de 6.92, 7.93, 7.30 y 5.57  $\mu\text{M}$ <sup>110</sup>.



Esquema 1.19 Sistema híbrido pirimido-benzimidazol **20** con actividad antitumoral.

En la búsqueda de dianas moleculares el dirigir los esfuerzos hacia la Tankirasa puede ser una estrategia atractiva en el desarrollo de nuevos tratamientos, ya que esta enzima se encuentra relacionada con la regulación de TERF1, que a su vez está implicada con la estabilidad y el mantenimiento de la longitud de los telómeros, longitud que limita la multiplicación celular cuando estos alcanzan un mínimo<sup>74,111</sup>. El benzimidazol **21** (ver esq. 1.20) obtenido usando como catalizador nanopartículas de ZrO<sub>2</sub> soportadas sobre β-cilodextrina, mostró una potente actividad antiproliferativa en la línea celular HCT116 de cáncer de colon con un IC<sub>50</sub> 32.9 μM, induciendo muerte celular por apoptosis al dirigirse a Tankirasa y Bcl-2 presentando fuertes interacciones de acoplamiento con valores de -6.70 y -6.16 kcal/mol respectivamente, según los análisis computacionales<sup>112</sup>.



Esquema 1.20 Síntesis del benzimidazol **21** que presenta actividad antiproliferativa frente a HCT116.

Otros ejemplos de la interesante actividad biológica de los sistemas heterocíclicos de 5 miembros como triazol, tiazol e imidazol se han evidenciado en diferentes reportes, como en el caso del carboxiamidotriazol (CAI) que inhibe la angiogénesis y crecimiento tumoral<sup>113</sup>, la estructura **22** que presenta actividad inhibitoria frente a DHFR más potente que el metotrexato<sup>114</sup>, y el compuesto **23** que es un potente inhibidor de BRAF (ver fig. 1.20).

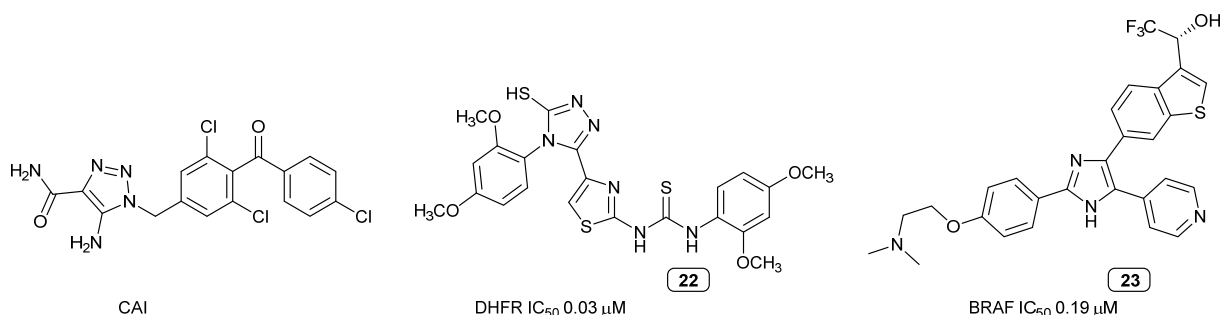


Figura 1.20. Sistemas tipo triazol e imidazol con actividad anticancerígena.

Isocumarinas: un núcleo poco explorado

En la búsqueda de fragmentos que puedan llegar a tener actividad anticancerígena la naturaleza tiene un rol importante dada la amplia variedad de compuestos que existen en los productos naturales. Es tan variada la cantidad de compuestos que se pueden generar en los diferentes organismos vivos y tan diferentes sus aplicaciones, que aún queda un espacio inexplorado muy grande que permite concebir la idea de llegar a obtener nuevas moléculas obtenidas, modificadas o inspiradas en fuentes naturales.

Uno de los núcleos presentes en una variedad de productos de origen natural es el núcleo isocumarínico<sup>115-118</sup>, del cual se ha demostrado que posee un amplio espectro de actividad biológica como lo es fungicida<sup>119</sup>, herbicida<sup>120</sup>, insecticida<sup>120</sup>, antiinflamatoria<sup>121</sup>, antibacteriana<sup>121</sup>, antitumoral<sup>121</sup> entre otras<sup>122</sup>.

Incluso algunas isocumarinas extraídas de productos naturales presentan algún tipo de actividad frente a dianas moleculares o células cancerosas. Por ejemplo la estructura **24** (ver fig. 1.21) que presenta buena actividad inhibitoria de PI3K $\delta$  (quinasa involucrada en procesos de proliferación, diferenciación, migración y supervivencia celular)<sup>123</sup>, la estructura **25** obtenida a partir de *Selaginella moellendorffii* Hieron donde se encontró que inhibe la proliferación celular en la línea HT29 (cáncer de colon) induciendo apoptosis celular<sup>124</sup>, el saccharonol B con actividad citotóxica frente a la línea celular de cáncer pancreático MIAPaCa-2<sup>125</sup> o la estructura **26** extraída de *Penicillium chrysogenum* SCSIO 41001 que muestra actividad citotóxica importante frente a las líneas celulares K562 (leucemia mielógena), A549 (carcinoma de pulmón) y Huh-7 (tumor hepático)<sup>126</sup>.

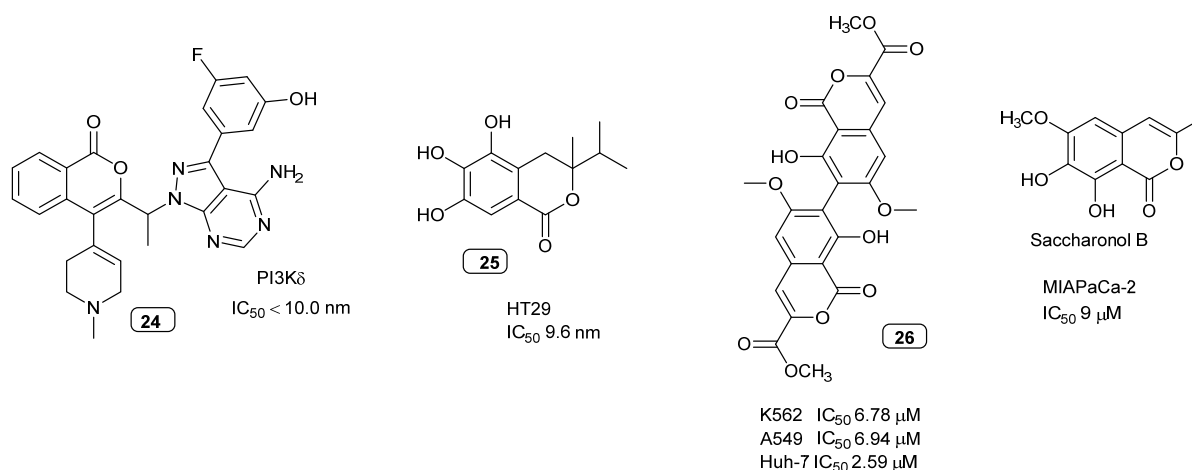


Figura 1.21 Isocumarinas naturales con actividad anticancerígena.

También se han obtenido resultados positivos frente a dianas moleculares ampliamente reconocidas como la esfingosino-quinasa-1 (SphK1)<sup>127,128</sup>, una de las isoenzimas involucradas en la generación de la esfingosina-1-fosfato, un lípido relacionado a una serie de procesos biológicos asociados al desarrollo celular, y relacionado con la proliferación de algunos tipos de cáncer como melanomas<sup>129</sup> y cáncer de mama<sup>130-132</sup>.

El ácido elágico (**27**) (ver fig. 1.22), que se ha encontrado en productos naturales como frutas<sup>133</sup>, tiene dos núcleos isocumarínicos fusionados y ha mostrado diversos efectos terapéuticos. Por ejemplo, se ha sido estudiado frente a SphK1 junto con un grupo de compuestos de origen natural. Los resultados computacionales revelaron que dentro de los compuestos evaluados el ácido elágico fue el que presentó mayor afinidad. En el ensayo de inhibición de quinasas, muestra acción inhibitoria de SphK1 con  $IC_{50}$   $0.74 \pm 0.06 \mu M$ , mientras que los estudios de viabilidad celular indican efectos antiproliferativos en las líneas celulares A549 de cáncer de pulmón  $IC_{50}$   $23.44 \pm 1.33 \mu M$ , sin afectar las células renales embrionarias humanas (HEK293)<sup>134</sup>.

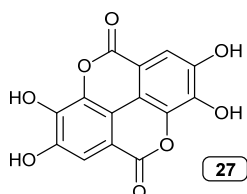
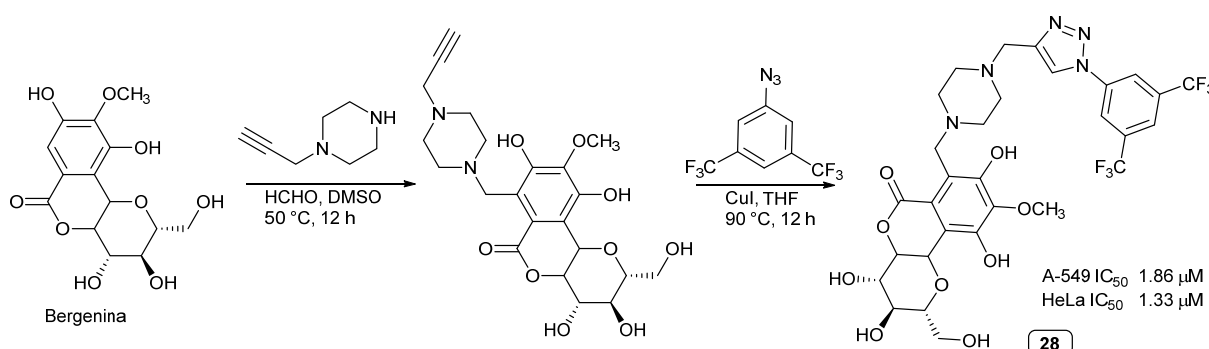


Figura 1.22. Ácido elágico con actividad inhibitoria de SphK1.

Otro ejemplo es la bergenia, una isocumarina de origen natural con un amplio espectro de actividad biológica<sup>135</sup>, que ha sido una estructura útil en la generación de nuevos sistemas isocumarínicos, ya que su núcleo permite la derivatización en el anillo aromático o en los grupos hidroxilo (fig. 1.40).

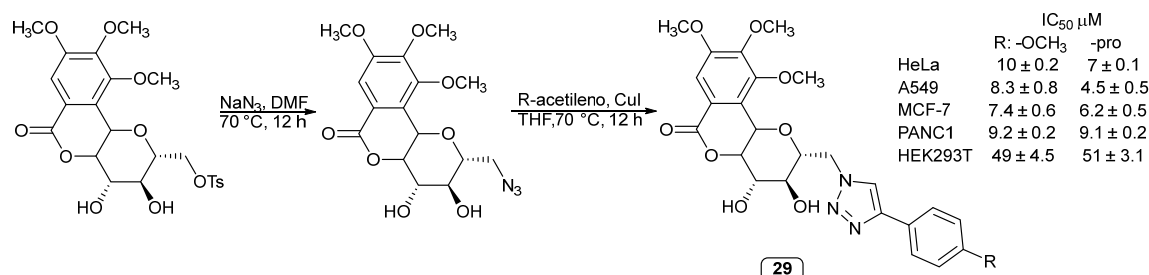
Una de las modificaciones realizadas sobre el anillo aromático y por medio de una sucesión de pasos, incluye un fragmento de triazol insertado mediante una reacción tipo click, lo que condujo a una estructura (**28**) con potencia similar a la doxorrubicina frente a las líneas celulares HeLa y A-549 (adenocarcinoma de pulmón) (ver esq. 1.21). Adicionalmente los ensayos de polimerización de tubulina y los estudios de docking molecular indicaron que el derivado de bergenia interrumpe el ensamblaje de la tubulina, la cual es esencial para la mitosis<sup>136</sup>.



Esquema 1.21 Modificaciones sobre el anillo aromático de la bergenia.

El uso de derivados de bergenia como antimetabólico (ver esq. 1.22) también ha sido estudiado en modificaciones realizadas sobre los grupos hidroxilo, que de manera semejante al caso anterior se han logrado generar híbridos (**29**) que incluyen un triazol y que exhiben una significativa actividad frente a cuatro

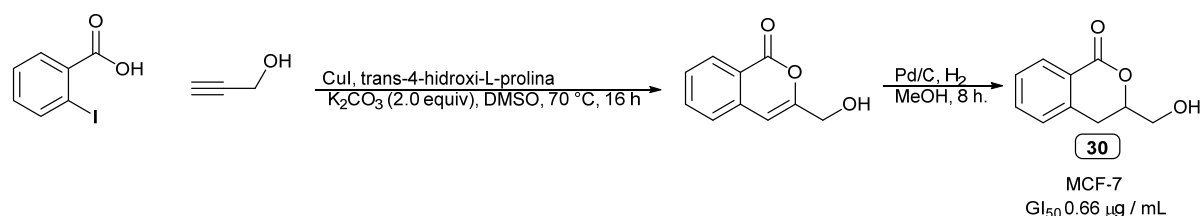
líneas celulares de cáncer, sumado a que generan estrés oxidativo e inducen apoptosis en la línea celular HeLa<sup>137</sup>.



Esquema 1.22 Derivatización de la berberina en búsqueda de una estructura multidiana.

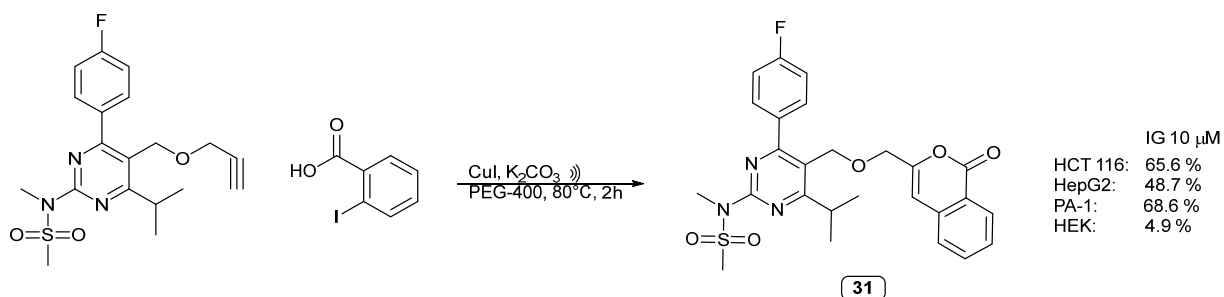
Si bien, la actividad anticancerígena del núcleo isocumarínico ha sido estudiada previamente, la mayoría de los estudios son a partir de estructuras obtenidas de productos naturales<sup>138</sup>, mientras que de compuestos obtenidos por vías sintéticas los estudios aún son muy escasos.

Una de las metodologías que permiten acceder a núcleos isocumarínicos vía sintética es a partir del acoplamiento de Castro–Stephens que involucra la reacción entre un derivado acetilénico y un ácido *o*-halurobenzoico (ver esq. 1.23). La aplicación de esta ha sido utilizada para la generación de derivados isocumarínicos en búsqueda de actividad anticancerígena como el que se muestra en el siguiente esquema donde una de las estructuras obtenidas (**30**) presentó un GI<sub>50</sub> de 0,66 μg/mL frente a línea celular de cáncer de mama MCF-7<sup>139</sup>.



Esquema 1.23 Acoplamiento de Castro–Stephens para la obtención de la isocumarina (**30**).

Otro ejemplo del uso del acoplamiento de Castro–Stephens se evidencia en el desarrollo de análogos de rosuvastatina (ver esq. 1.24), donde el compuesto **31** presentó efectos citotóxicos sobre líneas celulares HCT 116, HepG2 y PA-1 de cáncer de colon, cáncer de hígado y de teratocarcinoma de ovario respectivamente. Mientras que al ser evaluado sobre la línea celular no cancerosa HEK no se evidenciaron efectos significativos, lo cual es un indicativo de su potencial selectividad hacia las células cancerosas<sup>140</sup>.



Esquema 1.24 Síntesis del híbrido pirimidina-isocumarina (**31**) con actividad multiana.

Considerando lo expuesto, resulta evidente que los sistemas aminopirimidínicos, de tipo azol e isocumarínicos, poseen una versatilidad farmacológica excepcional, brindando un abanico de posibilidades para la generación de estructuras potencialmente activas. No obstante, es crucial explorar su diversificación estructural no solo a partir de productos naturales, sino también a través de vías completamente sintéticas que permitan el descubrimiento de nuevas estructuras y profundizar en el estudio de sistemas híbridos como posibles agentes anticancerígenos.

Así, en la búsqueda de la diversificación estructural mediante sistemas híbridos, y basándonos en la destacada bioactividad antitumoral asociada a las aminopirimidinas, azoles e isocumarinas, este trabajo propone desarrollar nuevos sistemas híbridos que integren, al menos, dos de los tres núcleos mencionados. Se espera que con esto se aporte al estudio de los sistemas moleculares que puedan ser potencialmente activos frente a líneas celulares de cáncer.



## 1.2. Objetivos y estrategia general

### 1.2.1. Objetivo General:

El propósito fundamental de este proyecto de investigación es la creación de sistemas moleculares híbridos con potencial actividad antiproliferativa, que incorporen en su estructura fragmentos nitrogenados de tipo azol en combinación con núcleos inspirados en productos naturales, como aminopirimidinas e isocumarinas, y analizar su potencial bioactividad.

### 1.2.2. Objetivos Específicos

- O1. Generar una serie de derivados con el núcleo 2-aminopirimidínico para posibilitar su diversificación.
- O2. Desarrollar sistemas híbridos del tipo pirimido-imidazol a partir de los derivados generados en el objetivo O1.
- O3. Analizar, mediante métodos teórico-computacionales, la capacidad de los sistemas híbridos isocumarina-azol para actuar como posibles ligandos frente a dianas moleculares relacionadas con la proliferación celular en contextos específicos de cáncer.
- O4. Generar una serie de derivados con el núcleo isocumarínico para facilitar su diversificación.
- O5. Diseñar sistemas moleculares híbridos que integren una estructura de isocumarina-azol a partir de los derivados generados en el objetivo O4.
- O6. Caracterizar estructuralmente todos los nuevos derivados sintetizados utilizando métodos espectroscópicos y espectrométricos.
- O7. Someter los compuestos diseñados y sintetizados a la mayor diversidad posible de bioensayos.

### 1.2.3. Estrategia general y estructura del manuscrito

Correlacionada con la introducción presentada, la continuación del documento se divide en dos capítulos, esto fundamentado en el diseño y la estructura de los sistemas híbridos. El primer capítulo aborda los sistemas del tipo 2-aminopirimidina-azol, mientras que el segundo se desarrolla en torno a estructuras del tipo isocumarina-azol.

El Capítulo 2, denominado "Sistemas Híbridos del Tipo Pirimidina-Azol", se concentra en la diversificación del núcleo 2-aminopirimidínico. Inicia explorando metodologías para la generación de nuevos compuestos que integren aminopirimidinas y azoles en su estructura. Posteriormente, se presentan los resultados más relevantes obtenidos de los ensayos de inhibición de algunas de las estructuras sintetizadas frente a líneas celulares cancerígenas.

El cierre de este capítulo incluye el contenido exacto de los artículos publicados, donde se socializan algunos de los resultados obtenidos en relación con este tema. Estos artículos se presentan a continuación en el orden de su aparición en el documento.

- *A concise synthesis of a highly substituted 6-(1H-benzimidazol-1-yl)-5-nitrosopyrimidin-2-amine: Synthetic sequence and the molecular and supramolecular structures of one product and two intermediates.* Acta Crystallographica Section C: Structural Chemistry. 74, 696–702 (2018).
- *A concise and efficient synthesis of amino-substituted (1H-benzo[d]imidazol-1-yl)pyrimidine hybrids: Synthetic sequence and the molecular and supramolecular structures of six examples.* Acta Crystallographica Section C: Structural Chemistry. 75, 1405–1416 (2019).
- *Synthesis of 5-(arylmethylideneamino)-4-(1H-benzo[d]imidazol-1-yl)pyrimidine hybrids: synthetic sequence and the molecular and supramolecular structures of two intermediates and three final products.* Acta Crystallographica Section C: Structural Chemistry. 79, 227–236 (2023)

El Capítulo 3, titulado "Búsqueda de Diversidad Estructural en Sistemas Isocumarínicos", se centra en el diseño y síntesis de sistemas del tipo isocumarina-azol. Comienza con un análisis teórico computacional enfocado en la estabilidad de complejos ligando-proteína. En este análisis, se seleccionan sistemas híbridos isocumarina-azol como ligandos y como proteínas cinco dianas moleculares relacionadas con el desarrollo de diferentes tipos de cáncer.

En este estudio se examina principalmente la dinámica molecular para evaluar el aporte a la estabilidad que cada uno de los núcleos puede proporcionar como resultado de interacciones permanentes con residuos de aminoácidos en el sitio de unión. El objetivo es determinar la viabilidad de sintetizar familias de compuestos con estos núcleos en busca de actividad anticancerígena.

Posteriormente, el capítulo presenta los resultados y análisis de las metodologías sintéticas utilizadas, concluyendo con la exposición del contenido de los artículos publicados en relación con este tema, cuya identificación se presenta a continuación según el orden de aparición en el presente escrito.

- *Synthesis of new 1,2-diaryl[2]benzopyrano[3,4-d]imidazol-5(1H)-one derivatives mediated by ceric ammonium nitrate.* Tetrahedron Letters. 58, 1487–1489 (2017).
- *Conversion of 3-amino-4-arylamino-1H-isochromen-1-ones to 1-arylisochromeno[3,4-d][1,2,3]triazol-5(1H)-ones: Synthesis, spectroscopic characterization and the structures of four products and one ring-opened derivative.* Acta Crystallographica Section C: Structural Chemistry. 76, 446–453 (2020).

## CAPÍTULO 2:

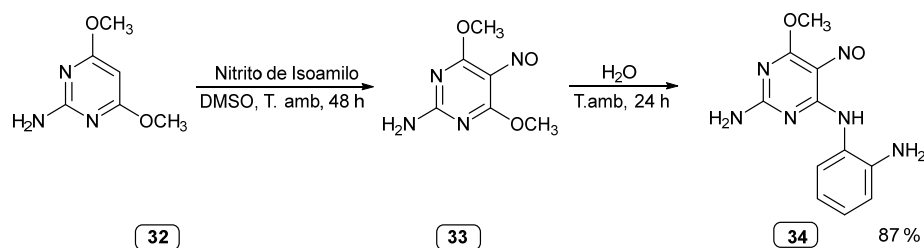
# SISTEMAS HÍBRIDOS DEL TIPO PIRIMIDINA-AZOL



## Capítulo 2. Sistemas híbridos del tipo Pirimidina-Azol

### 2.1. Síntesis de sistemas híbridos a partir de nitroso compuestos

En este trabajo se empleó una 2-aminopirimidina comercial que presenta dos características importantes. La primera es que puede sufrir reacciones de nitrosación en la posición 5 del anillo<sup>141</sup>. La segunda es que, una vez nitrosada, los grupos metoxilo pueden ser sustituidos mediante reacciones de aminólisis (ver esq. 2.1).



Esquema 2.1 Síntesis de la triamina 34

La reacción de sustitución se llevó a cabo bajo condiciones ambientalmente amigables, a temperatura ambiente durante 24 horas, utilizando agua como solvente. La identificación se realizó mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos, encontrando en <sup>1</sup>H-RMN las señales más características para este compuesto, como la aparición de las señales de los dos grupos amino, así como las señales correspondientes a los hidrógenos aromáticos<sup>142</sup>.

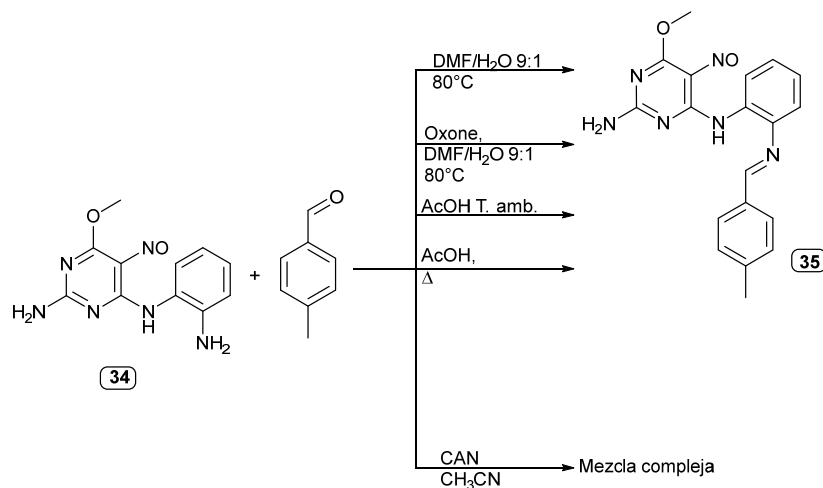
Mientras que en el espectro de masas se logra corroborar el ion molecular en la relación 260 m/z y el pico base en 229 m/z, correspondiente a la pérdida del grupo -OCH<sub>3</sub>. Lo anterior se correlaciona con el espectro de masas de alta resolución, obteniendo un valor de 261.1095 m/z para la fórmula C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>, con un [M + H]<sup>+</sup> esperado de 261.1094 m/z.

Después de verificar la estructura del compuesto anterior, se procede a la obtención de sistemas híbridos utilizando diversas metodologías para la síntesis de benzimidazoles<sup>143</sup>. Sin embargo, en el mejor de los casos, la reacción progresa hasta formar la imina como resultado de la condensación, sin lograr la formación del producto de ciclación (ver esq. 2.2).

En <sup>1</sup>H-RMN, se pueden identificar las señales más importantes para confirmar la obtención de la imina. Entre ellas, se destaca la aparición de un singlete a 8.80 ppm correspondiente al hidrógeno del carbono imínico, dos dobletes en la región aromática (8.44 y 7.43 ppm) propios del anillo con sustitución 1-4, y la señal del metilo proveniente del aldehído a 2.42 ppm.

Además, en el espectro de masas de baja resolución se evidencia el ion molecular con una relación de 362 m/z, siendo este el pico más abundante o pico padre. El segundo ion de mayor abundancia relativa corresponde al fragmento resultante de la pérdida del anillo pirimidínico, con una relación de 209 m/z.

Lo anterior concuerda con los resultados de espectrometría de masas de alta resolución, donde se obtuvo un valor de 363.1562 m/z para la fórmula  $C_{19}H_{18}N_6O_2$ , con un  $[M + H]^+$  esperado de 363.1564 m/z.

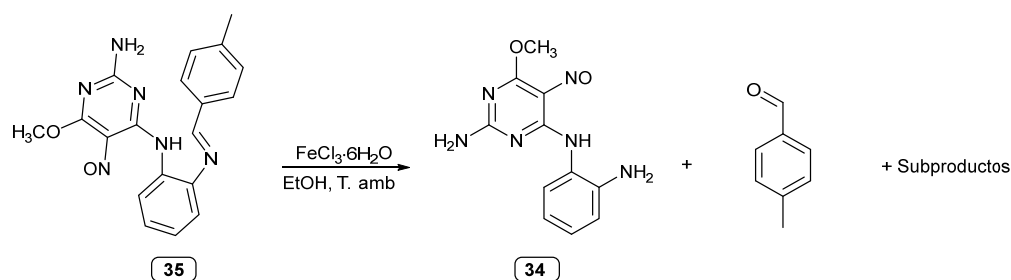


Esquema 2.2 Metodologías usadas para la obtención de sistemas pirimidina-benzimidazol.

Teniendo en cuenta que preferentemente se forma el producto de la condensación, se procedió a intentar la ciclación a partir de la imina intermediaria, una vez aislada y purificada previamente.

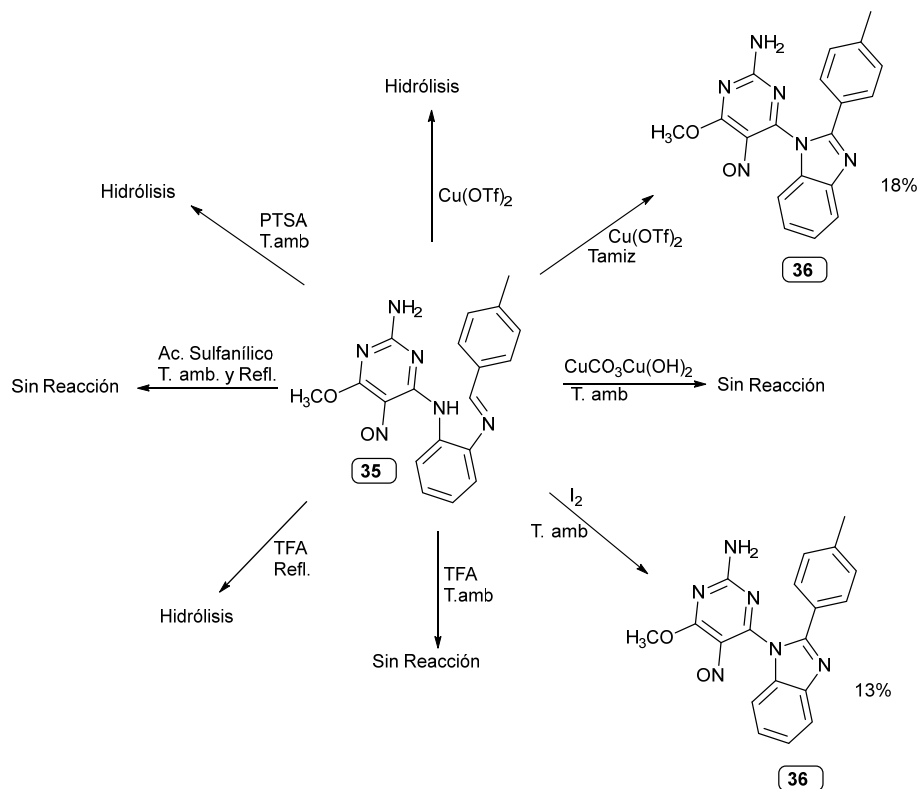
Aunque varias metodologías conducen exitosamente a la obtención de la imina, decidimos utilizar un enfoque mucho más simple. Este método implica la mezcla de los reactivos en ácido acético con agitación durante dos horas a temperatura ambiente, seguida de filtración y lavado con una solución saturada de bicarbonato de sodio y agua.

Una vez obtenida la imina correspondiente, se procede a la generación de la ciclación utilizando una metodología previamente informada que ha demostrado ser exitosa en la síntesis de benzimidazoles mediante el empleo de  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ . Sin embargo, en nuestro caso, observamos la regeneración de los reactivos de partida y la aparición de una mezcla de productos de difícil separación (ver esq. 2.3).



Esquema 2.3 Intento de ciclación usando  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ .

Considerando que la metodología anterior no condujo a la obtención del sistema híbrido **36**, se llevaron a cabo diferentes ensayos partiendo de la imina intermediaria y variando el catalizador, como se puede observar en el esquema 2.4.

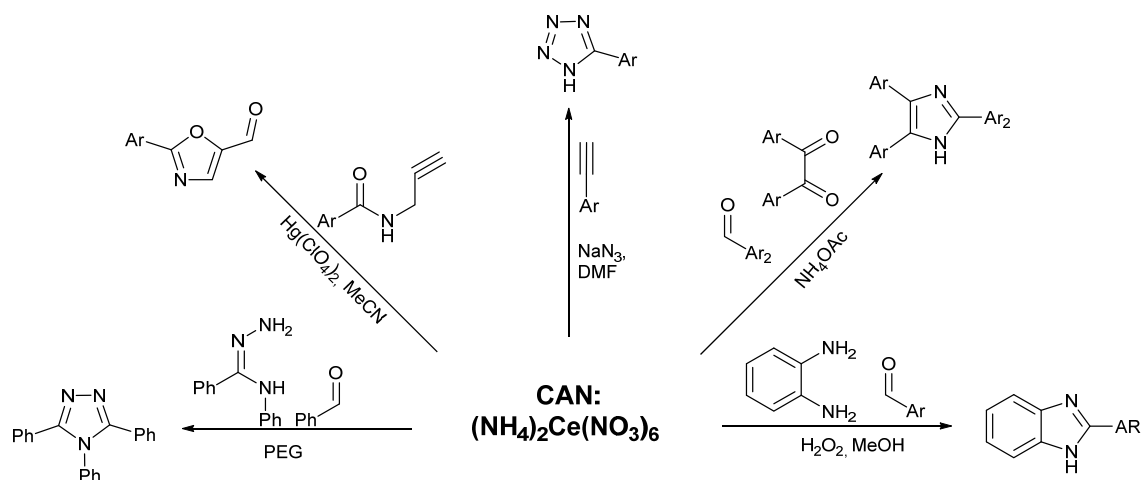


Esquema 2.4 Otras metodologías empleadas para lo obtención de sistemas pirimidina-benzimidazol.

Se puede apreciar que se realizaron varios ensayos con el fin de obtener el benzimidazol. En algunos casos, se observó la hidrólisis de la imina, lo cual es característico de este tipo de sistemas, regenerando así los reactivos iniciales. En otros casos, utilizando triflato de cobre II o yodo molecular, se logró obtener el producto deseado; sin embargo, el rendimiento fue muy bajo. De esta manera, continuamos con la búsqueda de un catalizador que presentara mejores resultados.

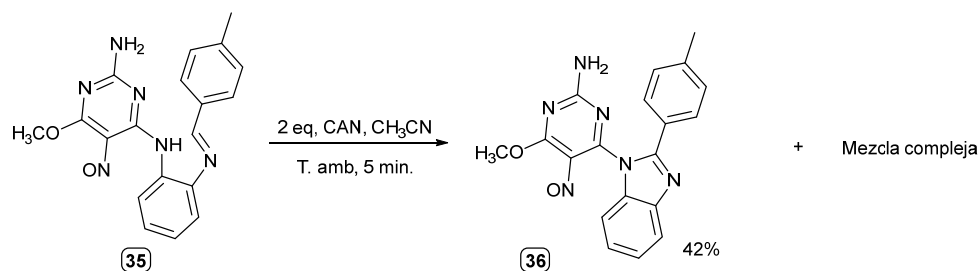
El nitrato cérico amónico (CAN) ha sido ampliamente utilizado en la obtención de diversos sistemas heterocíclicos debido a sus características catalíticas como ácido de Lewis<sup>145</sup> y a su capacidad para actuar como agente oxidante. En algunos casos, esto ha contribuido a la aromatización<sup>146</sup> de sistemas anulares o a la inserción de sustituyentes sobre núcleos heterocíclicos<sup>147</sup>.

El CAN ha demostrado ser efectivo en la formación de diferentes tipos de azoles, como triazoles<sup>148</sup>, oxazoles<sup>149</sup>, tetrazoles<sup>150</sup>, imidazoles<sup>145</sup>, benzimidazoles<sup>151</sup>, entre otros<sup>152</sup> (ver esq. 2.5), lo cual resalta su utilidad en la obtención de sistemas heterocíclicos nitrogenados.



Esquema 2.5 Generación de azoles mediados por CAN.

Considerando lo anterior, se evaluó el uso de CAN como opción para favorecer la ciclación intramolecular de la imina **35** (ver esq. 2.6).



Esquema 2.6 Metodología para la obtención de sistemas pirimidina-benzimidazol usando CAN como catalizador.

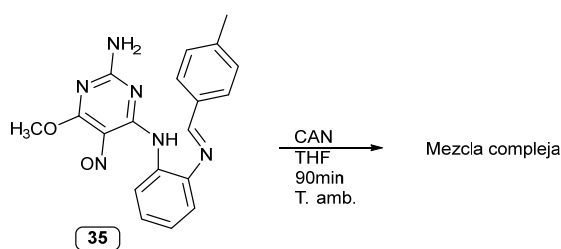
En este caso, se observó que el uso de CAN conduce efectivamente a la formación del sistema híbrido mediante la ciclación, generándose el benzimidazol como un producto completamente aromático. Esto indica que el CAN también actúa como un agente oxidante, consumiéndose durante la reacción.

En el análisis estructural, el cambio más importante a resaltar entre el precursor y el producto es la desaparición de la señal a 8.80 ppm correspondiente al hidrógeno imínico de la estructura **43**. Además, se evidencia la diferencia en masa, la cual se puede observar en HRMS (ESI-QTOF), donde para la imina se tiene una relación  $m/z$  de 363.1563 y para el benzimidazol  $m/z$  361.1406, concordando con el valor esperado de  $[M + H]^+$  361.1408 para la fórmula  $C_{19}H_{16}N_6O_2$ .

Es importante destacar que, aunque el CAN presentó los mejores resultados, la reacción conduce a la formación de una cantidad significativa de subproductos de difícil separación, lo que complicó la extracción y purificación del sistema híbrido. Además, se evidenció que pequeñas cantidades de agua promueven la hidrólisis de la imina, volviendo a los reactivos de partida y generando subproductos de manera rápida.

Dado que las condiciones estudiadas hasta este punto no conducen mayoritariamente a la formación del producto deseado, se analiza la formación del benzimidazol en dos condiciones generales: primero, en ausencia de agua para evitar la hidrólisis, y segundo, evitando el uso de aldehídos aromáticos para la formación del benzimidazol, disminuyendo así efectos estéricos.

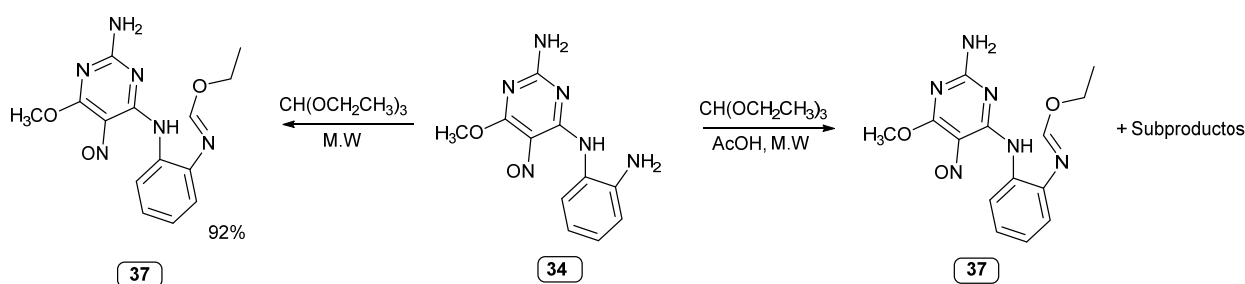
En el primer caso, se consideró el uso de THF seco para evitar la hidrólisis, utilizando CAN como catalizador. Sin embargo, los resultados no fueron los mejores, ya que de igual forma se obtuvo una mezcla compleja como producto de reacción (ver esq. 2.7).



Esquema 2.7 Metodología para la obtención de sistemas pirimidina-benzimidazol en THF.

Con el fin de evitar el uso de aldehídos, se decidió intentar la reacción a partir de ortoformiato de etilo. De esta manera, se esperaba favorecer la ciclación, ya que el ortoformiato de etilo no presenta el anillo aromático que puede generar impedimento estérico, dificultando la ciclación. Además, los tres grupos etoxilo pueden ser sustituidos por grupos amino, evitando así un paso de óxido-reducción para alcanzar la aromaticidad del compuesto.

La reacción se llevó a cabo en ausencia de solvente mediante el uso de microondas, y se observó que la reacción avanza hasta la formación de la imina sin alcanzar la ciclación. Incluso cuando se hace uso de ácido acético, se observa la formación adicional de subproductos (ver esq. 2.8).



Esquema 2.8 Síntesis por microondas del compuesto 37.

En el espectro de <sup>1</sup>H-RMN (ver fig. 2.1), se pueden evidenciar las señales más características del compuesto obtenido. Las señales a 1.45 y 4.09 ppm corresponden al etoxilo proveniente del ortoformiato, la señal a 8.15 ppm es del hidrógeno sobre el carbono imínico, y la señal a 13.50 ppm es del NH proveniente de la aminopirimidina de partida.

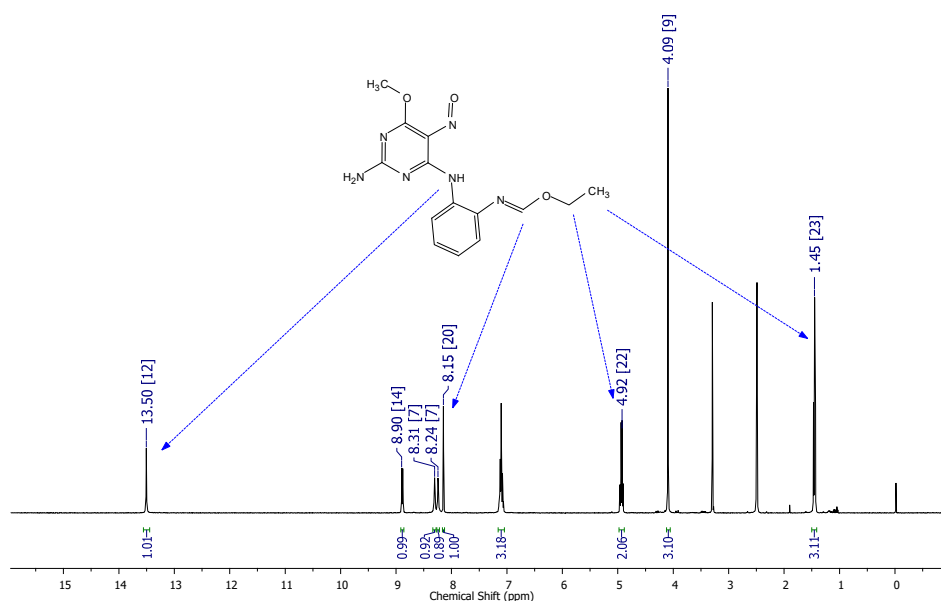


Figura 2.1 Espectro  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto 37.

En espectrometría de masas de baja (ver fig. 2.2) y alta resolución (ver fig. 2.3), se puede apreciar que la relación  $m/z$  concuerda con los valores esperados. Se observa un valor de ion molecular de 315.953  $m/z$ , siendo el pico de mayor frecuencia relativa en espectrometría de baja resolución. En HRMS, se obtiene un pico en 317.1719 para la fórmula  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_2$ , con un valor esperado de  $[\text{M} + \text{H}]^+$  de 317.1721.

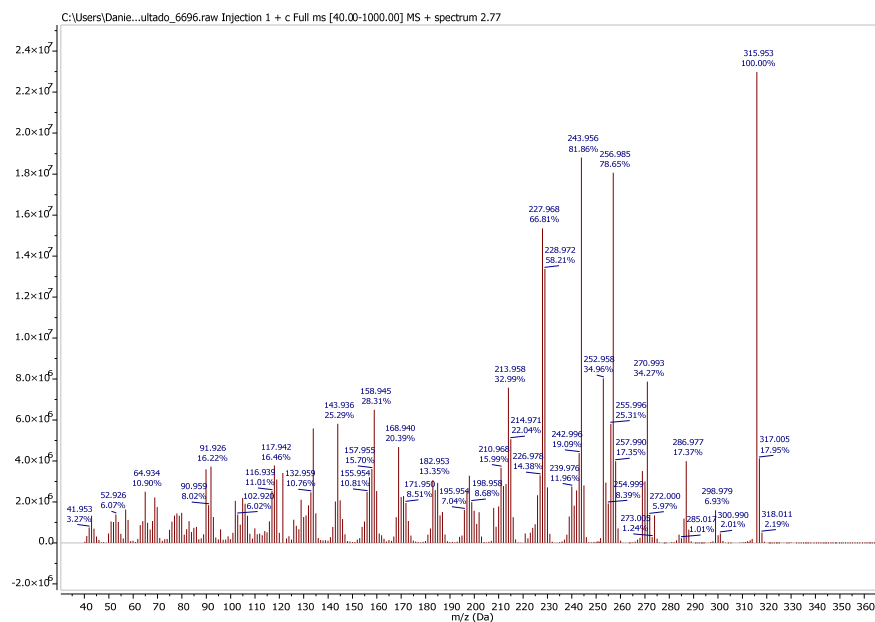


Figura 2.2 Espectro MS (EI, 70 eV) del compuesto 37.

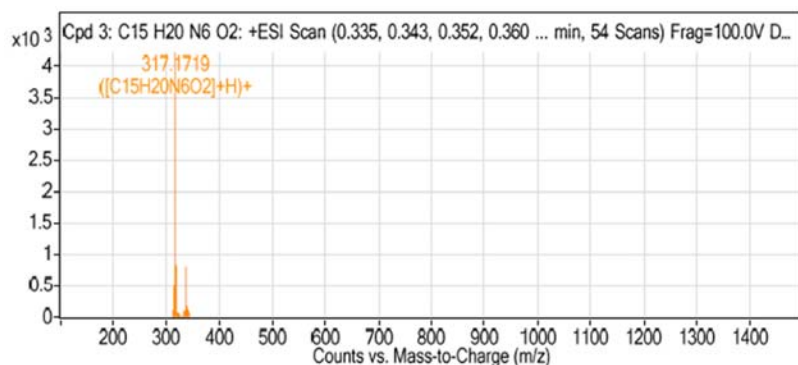
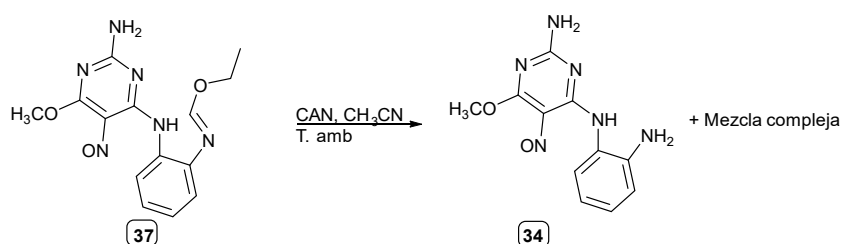


Figura 2.3 Espectro HRMS del compuesto **37**.

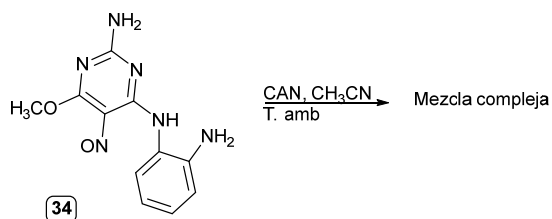
Con el objetivo de reproducir las condiciones mediante las cuales se obtuvo el sistema híbrido **36**, se utilizó la imina **37** en presencia de CAN y acetonitrilo. Sin embargo, a partir de los 5 minutos de reacción, se observó la regeneración de la aminopirimidina de partida y la formación de una mezcla compleja. Así, según estos resultados, se puede evidenciar que el impedimento estérico asociado al aldehído no es el factor principal que impide la formación del benzimidazol, ya que en el caso del ortoformiato tampoco ocurre la ciclación (esq. 2.9).



Esquema 2.9 Intento de ciclación de la imina **37** usando CAN.

La dificultad para obtener los sistemas tipo imidazol puede deberse a diferentes factores, como la generación de enlaces de hidrógeno intramoleculares debido a la presencia del grupo nitroso<sup>153</sup>, la reversión de la imina a la correspondiente amina y aldehído, y la formación de complejos con el CAN. Tanto la imina como la amina regenerada pueden actuar como ligandos tridentados, donde el grupo nitroso puede actuar como un donante de electrones desde el nitrógeno y el oxígeno para la formación de complejos<sup>154,155</sup>, lo que consumiría los reactivos necesarios para la formación del imidazol.

En este sentido, se realizó la reacción con la aminopirimidina precursora en condiciones similares a las utilizadas para la imina (acetonitrilo como solvente a 0 °C) en ausencia de aldehído. Se observó que la aminopirimidina se consume rápidamente, generando una mezcla compleja de sólidos insolubles. Esto permite deducir que la formación del benzimidazol se ve afectada por la rápida degradación de la imina, la cual se hidroliza regenerando la aminopirimidina de partida y dando origen a una mezcla compleja de productos insolubles (ver esq. 2.10).



Esquema 2.10 Efecto del CAN sobre la aminopirimidina precursora **34**.

Basados en el resultado obtenido, se puede considerar que el CAN participa en la reacción como mediador, ya que actúa como ácido de Lewis y posiblemente como un agente oxidante que ayudaría a conducir la reacción hacia la obtención del sistema completamente aromático. Esto respaldaría el hecho de que sea necesario el uso de cantidades superiores a las equimolares, lo que también se correlaciona con la gran cantidad de subproductos generados.

Las estructuras elucidadas por análisis estructural de los compuestos fueron corroboradas mediante difracción de rayos X, como se indica en la bibliografía<sup>142</sup>, esto demuestra que efectivamente la reacción conduce al sistema propuesto, adicionalmente es posible ver que en las dos iminas analizadas se presenta un enlace de hidrógeno intramolecular que genera que en los dos casos el grupo nitroso se encuentre orientado hacia el grupo amino de la posición 5 entre el grupo nitroso y el -NH de la posición 5. Mientras que en el sistema **36** la orientación del grupo nitroso se encuentra hacia el exterior de la estructura, debido que el nitrógeno del benzimidazol ya no es un donador de hidrógeno.

Las distancias interatómicas en los componentes de pirimidina en los solvatos de las bases de Schiff **35** y **37** exhiben algunas características interesantes. El parámetro  $\Delta$ , que representa la diferencia entre las distancias C—N y N—O en el fragmento C-nitroso, que son formalmente enlaces simples y dobles, respectivamente, proporciona una medida conveniente de la extensión de la polarización electrónica: las estructuras altamente polarizadas exhiben valores pequeños de  $\Delta$ , mientras que las estructuras no polarizadas exhiben valores grandes de  $\Delta$ , indicativos de una fuerte fijación de enlaces<sup>156,157</sup>. Se ha observado anteriormente que estructuras electrónicas altamente polarizadas ocurren en una amplia variedad de nitrosopirimidinas amino sustituidas<sup>156–160</sup> y que esta polarización está asociada con extensas interacciones de enlace de hidrógeno asistidas por carga<sup>161</sup>, que conducen a una amplia variedad de agregados supramoleculares, desde agregados finitos hasta estructuras tridimensionales de marco.

Así, en **35** y **37**, el parámetro tiene valores inferiores a 0.01 Å, a pesar de la naturaleza formal de enlaces simples y dobles de los enlaces C5—N51 y N51—O51; además, las distancias N1—C2, N1—C6, C2—N21 y C6—N61 son todas muy similares, aunque los enlaces C—N exocíclicos son formalmente enlaces simples, mientras que los enlaces C—N dentro del anillo son formalmente deslocalizados con carácter aromático; finalmente, el enlace N3—C4 es, en ambos compuestos, significativamente más corto que cualquier otro enlace C—N asociado con el anillo de pirimidina. Estas observaciones indican una contribución significativa a la estructura electrónica general de la forma polarizada (A) (ver figura 2.4),

además de la forma deslocalizada clásica (B), lo cual aumenta las características electrodonoras del sistema y eventualmente facilitaría la interacción con especies metálicas como hierro y cerio, lo que justificaría la rápida formación de subproductos entre los nitrosoderivados y los catalizadores que incluían estas especies.

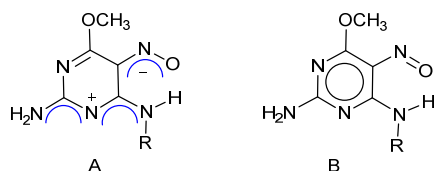
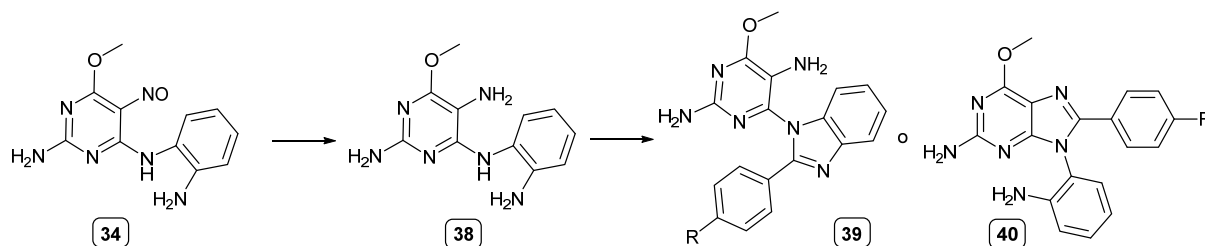


Figura 2.4 Estructura polarizada (A) y representación clásica de las 6-amino-5nitrosopirimidinas

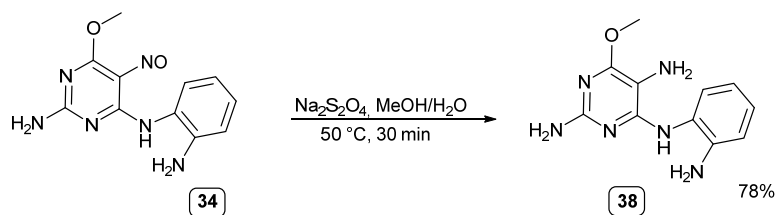
## 2.2. Reducción del grupo nitroso en la búsqueda de la generación de sistemas híbridos

Teniendo en cuenta que el grupo nitroso es susceptible a la reducción para generar aminas primarias y considerando que esto podría interferir desfavorablemente en la generación de los benzimidazoles, se decidió realizar la reducción de la aminopirimidina **38** con miras a obtener posteriormente un sistema del tipo diaminopirimidino-benzimidazol. De esta manera, el C5-NH<sub>2</sub> podría sufrir reacciones posteriores (ver esq. 2.11), con la posibilidad de obtener la mezcla con la purina correspondiente.



Esquema 2.11 Propuesta para la obtención de sistemas diaminopirimidino-benzimidazol.

De esa manera, el compuesto **38** fue reducido mediante ditionito de sodio en una solución metanol-agua (3/1 v/v) a 50 °C durante 30 minutos y posteriormente aislado (ver esq. 2.12).

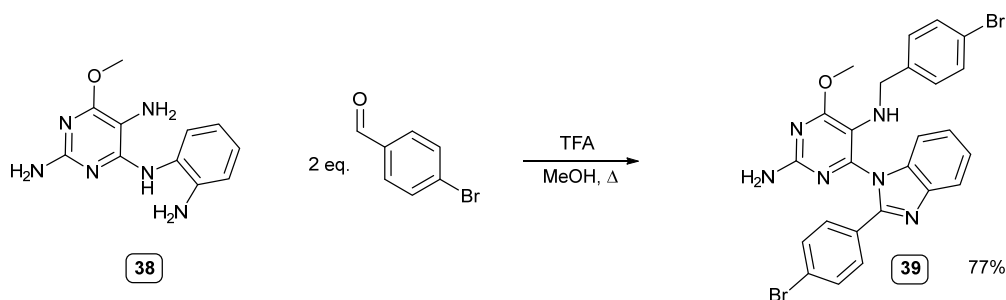


Esquema 2.12 Generación de tetraminas.

Una vez caracterizado el producto **38**, se intentó realizar la reacción con un aldehído calentando a reflujo, usando metanol como solvente y TFA como catalizador. Esto se hizo con el fin de propiciar la ciclación, conduciendo la reacción hacia la formación del benzimidazol o del dihidrobenzimidazol correspondiente.

Sin embargo, en este caso, la reacción condujo hacia la formación de un nuevo producto, sin que el compuesto **38** se consumiera completamente.

Al realizar el análisis estructural, se evidenció que, aunque se logró generar la ciclación, sobre el C5-NH<sub>2</sub> se dio una aminación reductiva con el aldehído utilizado (ver esq. 2.13). Es decir, se consumieron dos equivalentes de aldehído por cada equivalente de aminopirimidina utilizada. Esto sustenta que el reactivo de partida no se hubiera consumido completamente. Por lo tanto, se realizó una modificación a la metodología, incluyendo 2.2 equivalentes de aldehído, con el fin de propiciar el consumo total de la pirimidina de partida.



Esquema 2.13 Síntesis de sistemas híbridos por oxido-reducción intramolecular.

La estructura fue corroborada mediante las diferentes técnicas de análisis estructural, donde se destaca la presencia del grupo -CH<sub>2</sub>, identificado por la señal a 3.59 ppm, como la más representativa en el espectro de <sup>1</sup>H-RMN (ver fig. 2.5). Además, se evidencian los 12 átomos de hidrógeno en disposición aromática, junto con las señales correspondientes a los grupos NH y NH<sub>2</sub>. El análisis completo y la asignación correspondiente se llevaron a cabo con base en los experimentos de <sup>13</sup>C, DEPT 135, HSQC, HMBC y COSY.

En espectrometría de masas, se observa que el ion molecular tiene un valor m/z de 579.9, lo cual indica una relación m/z notablemente alta. Esta observación es consistente con la inserción de dos grupos arilo en la estructura, como se confirma mediante HRMS, donde se obtuvo un valor de [M + H]<sup>+</sup> de 581.0116 para la fórmula C<sub>25</sub>H<sub>20</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O, coincidiendo de manera cercana con el valor esperado de m/z de 581.0119.

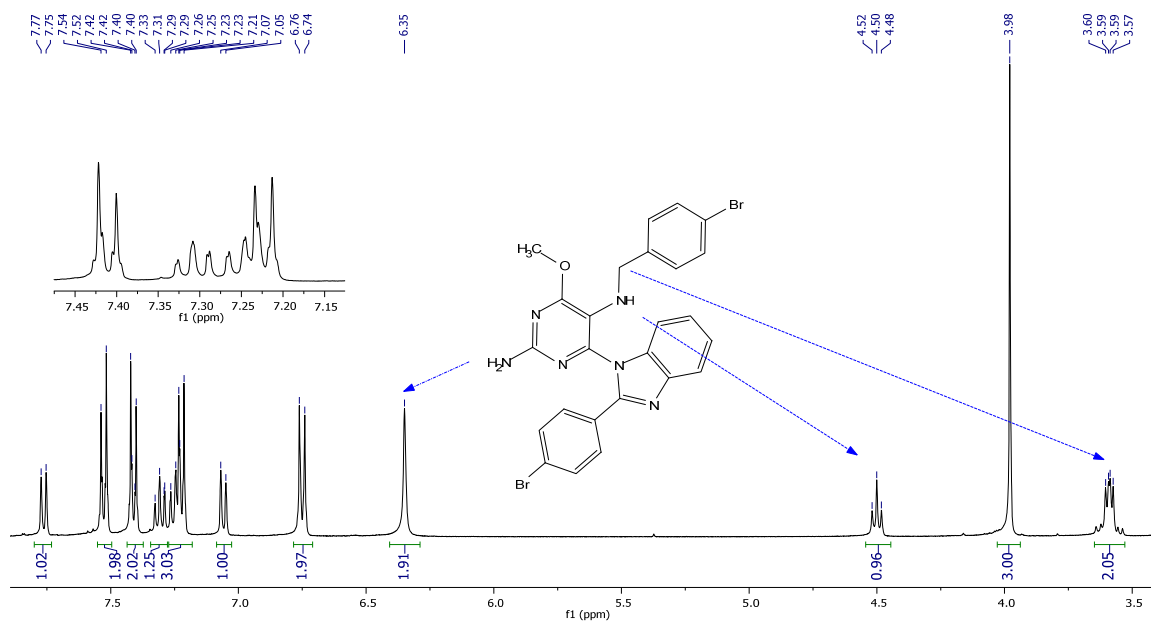
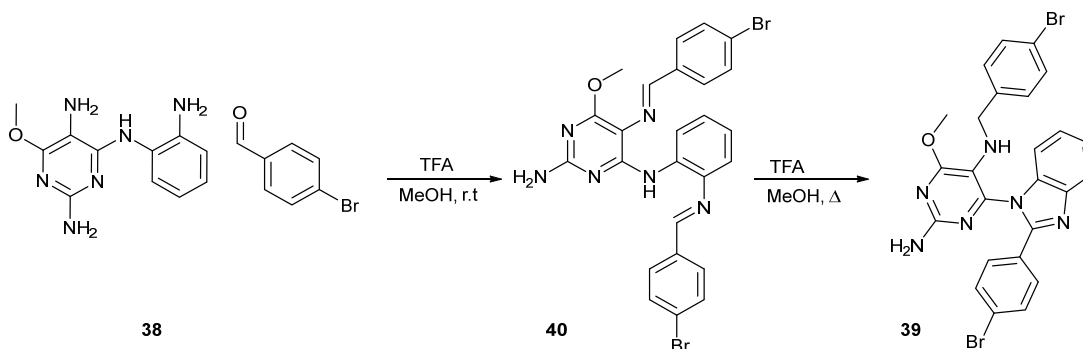


Figura 2.5 Espectro  $^1\text{H}$ -RMN compuesto **39**

Es importante destacar que los benzimidazoles formados a partir de aldehídos requieren un medio oxidante que promueva la aromaticidad. En nuestro caso, se podría inferir que dicho agente es la imina generada in situ en C5-NH<sub>2</sub>. Esta imina conduce a la formación del benzimidazol cuando se reduce para dar lugar a la respectiva amina secundaria observada en el producto. Por lo tanto, el mecanismo de reacción implica la formación de una diimina intermediaria, la cual se pudo aislar al llevar a cabo la reacción a temperatura ambiente. Posteriormente, esta diimina genera el producto **56** al aumentar la temperatura hasta el punto de reflujo (ver esq. 2.14).



Esquema 2.14 Ruta sintética para la generación de sistemas híbridos.

En el espectro que se presenta en la figura 2.15, se pueden destacar las señales más características, como los dos grupos -CH de las iminas formadas, así como el -NH que posteriormente da origen al benzimidazol como producto de la ciclación. Además, de manera similar al producto **56**, se observan las señales características de dos sistemas p-sustituídos, correspondientes a los dos anillos aromáticos del 4-bromobenzaldehído.

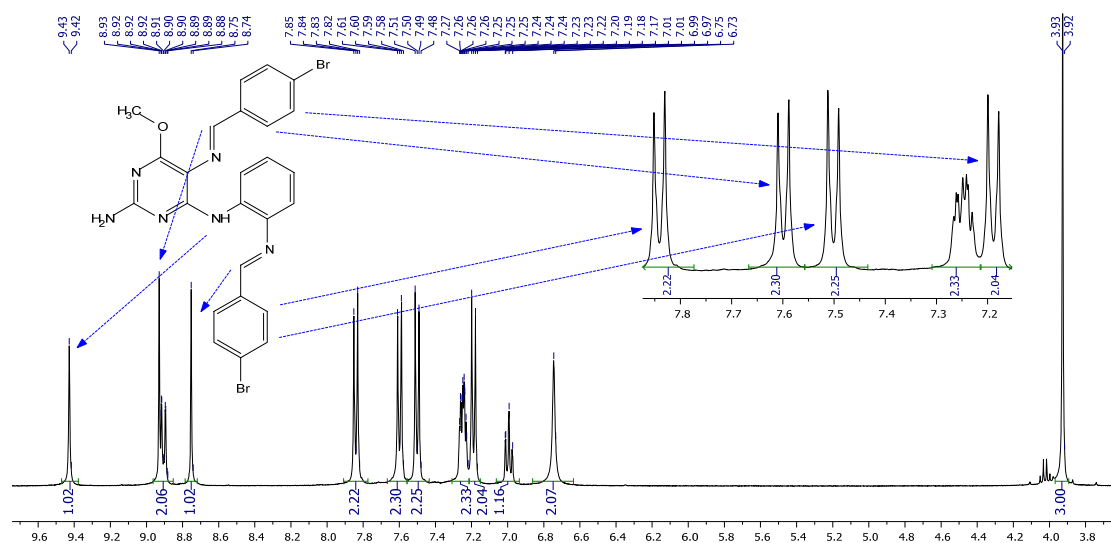
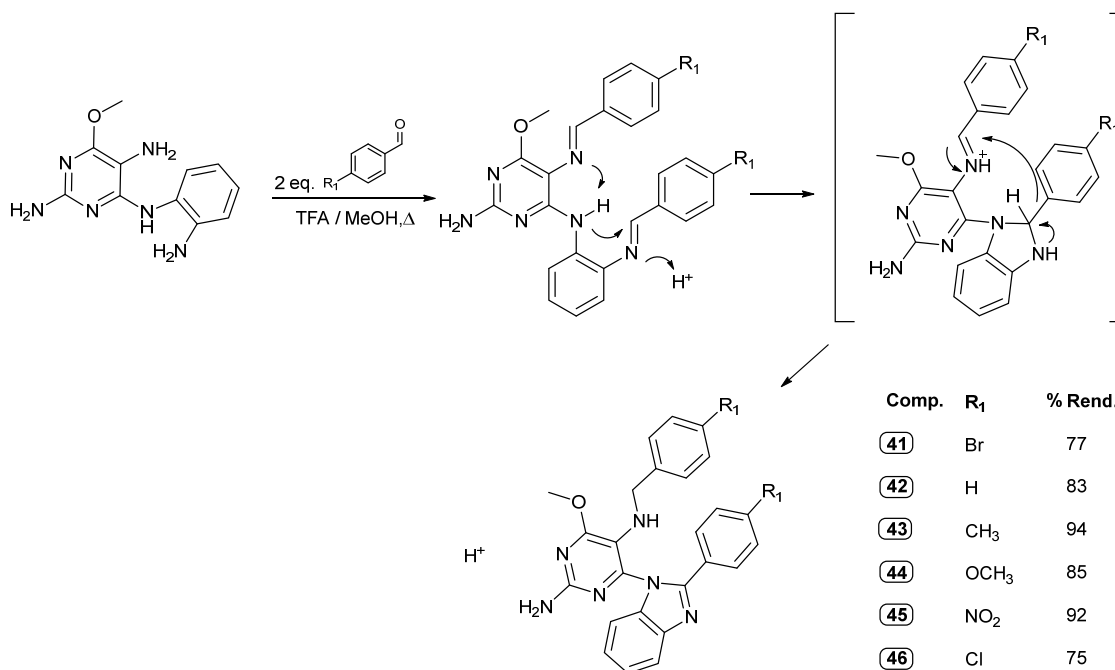


Figura 2.6 Espectro  $^1\text{H}$ -RMN compuesto **40**

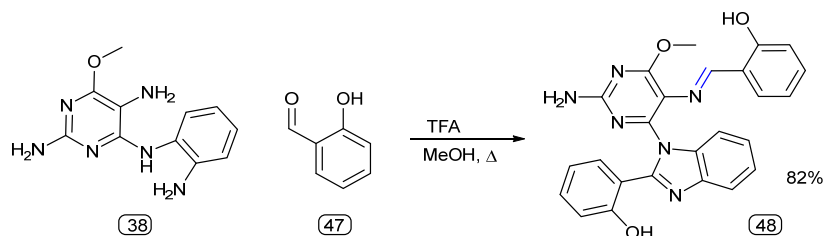
Considerando la formación del intermediario **40**, se propone el mecanismo de reacción que se muestra en el esquema 2.15. Allí, el TFA actúa como catalizador en la formación de las iminas, mientras que la aromaticidad se lograría mediante un proceso concertado con la reducción de la imina  $\text{C5N}=\text{CHAr}$ .



Esquema 2.15 Propuesta de mecanismo para la generación de sistemas híbridos tipo **41**.

Bajo esta metodología, se llevó a cabo la síntesis e identificación de cinco estructuras híbridas, partiendo de **38** y variando el aldehído utilizado. De los productos obtenidos, se logró cristalizar tres de ellos, los cuales fueron difractados, obteniendo como resultado las estructuras inequívocas de los compuestos **42**, **44** y **45**.

Uno de los aldehídos utilizados en este tipo de reacción fue el salicilaldehído. Sin embargo, el producto obtenido difiere estructuralmente de los presentados en el esquema 2.15, como se muestra a continuación (ver esq. 2.16):



Esquema 2.16 Reacción para la obtención de sistemas híbridos con salicilaldehído.

En los espectros, se puede notar la ausencia del grupo  $-\text{CH}_2$  presente en los otros productos de este tipo de reacción. En su lugar, se observa el grupo  $-\text{CH}$  imínico a 8.91 ppm en  $^1\text{H}$ -RMN, junto con las demás señales características para este compuesto. Estas incluyen los 12 H anulares, el  $-\text{NH}_2$  en la zona aromática, el metoxilo y los dos grupos OH a campo bajo (ver fig. 2.7).

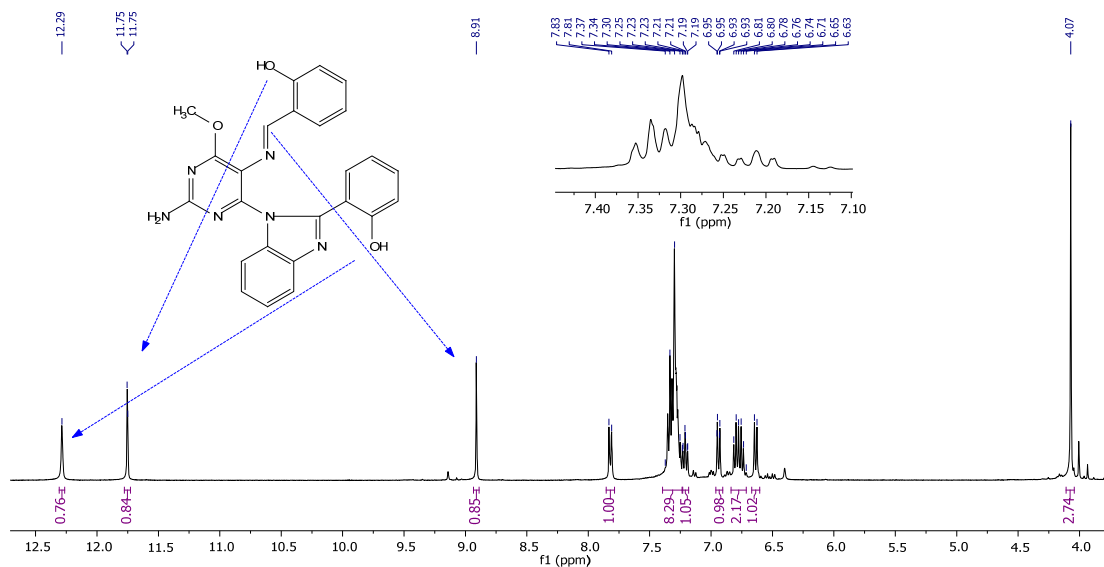


Figura 2.7 Espectro  $^1\text{H}$ -RMN compuesto 48

En  $^{13}\text{C}$ -RMN se encuentran las señales esperadas para este tipo de compuesto, y se pudo corroborar mediante DEPT 135 que la imina no se redujo a la correspondiente amina secundaria. Esto quedó confirmado con la señal a 163.3 ppm, que corresponde a  $\text{N}=\text{CH}$  (ver fig. 2.8).

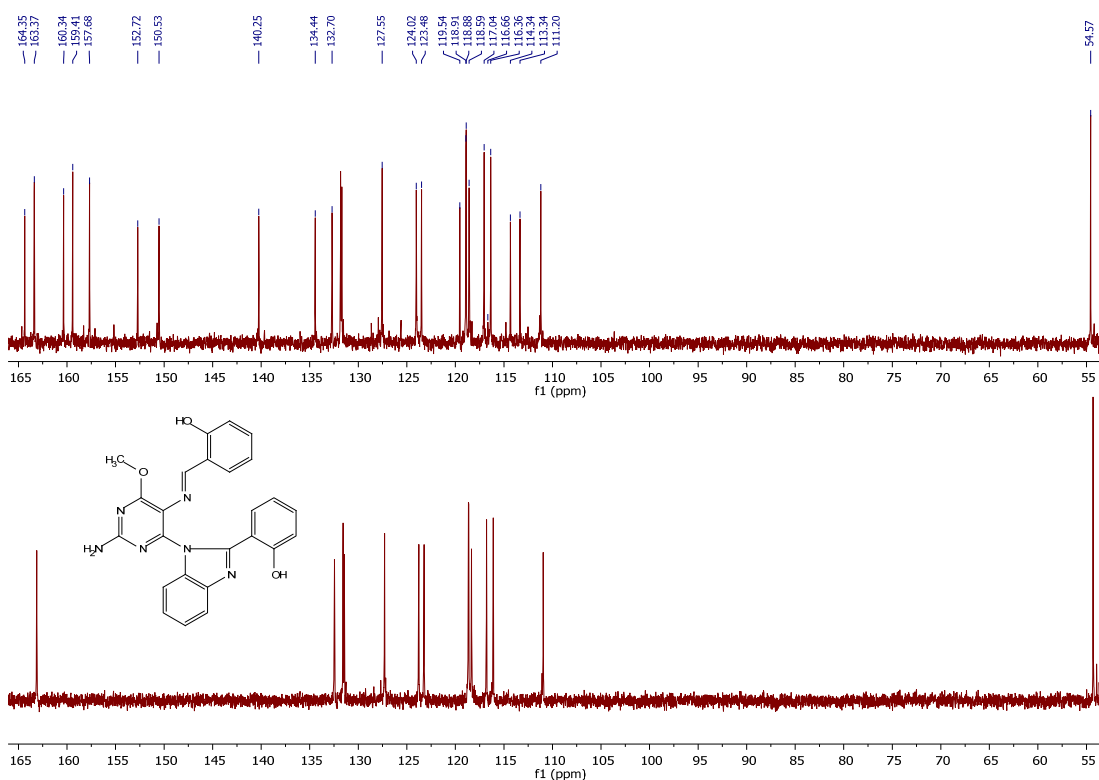
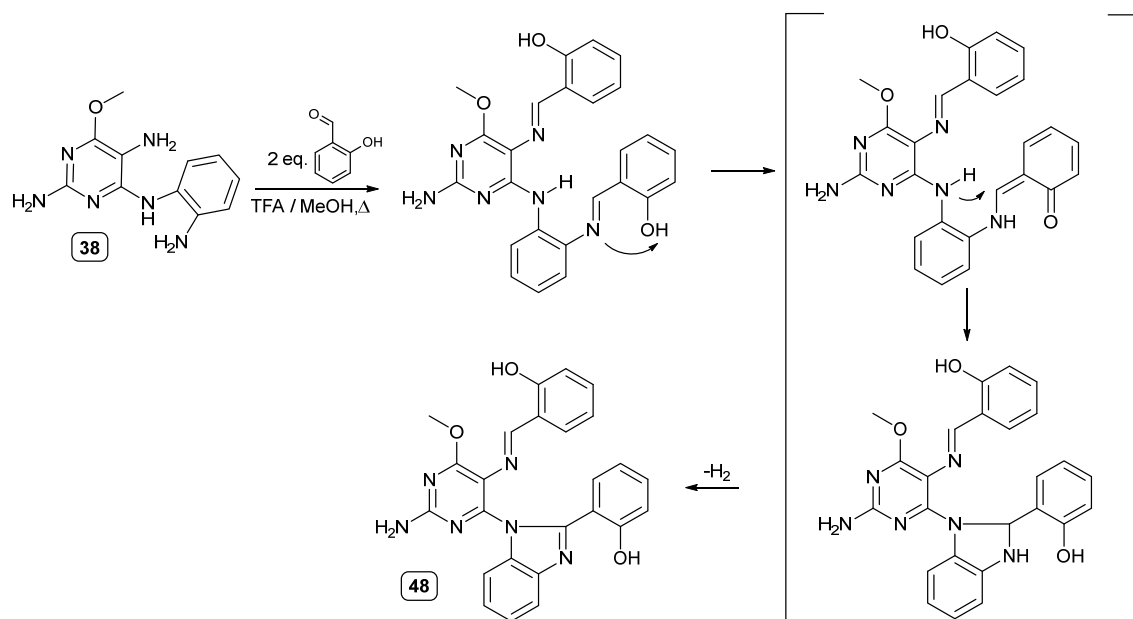


Figura 2.8 Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN compuesto **48**.

En espectrometría de masas, se observa el pico principal en  $m/z$  332.0, correspondiente a la pérdida del grupo imino completo de la posición C5, y el ion molecular en  $m/z$  452.1. Esto se corrobora con los resultados de HRMS, donde se obtiene un pico de  $m/z$  453.1667 para la fórmula  $\text{C}_{25}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_3$ , con un valor esperado de  $[\text{M} + \text{H}]^+$  de 453.1670.

Si bien el mecanismo previamente comentado para el compuesto **41** (ver esq. 2.15) no explica la formación del producto **48**, es posible que, en este caso, la reacción proceda mediante la formación del correspondiente *o*-quinometano. Se ha informado previamente sobre diferentes métodos para obtener *o*-quinometanos, incluyendo el uso de salicilaldehído como reactivo de partida<sup>162</sup>.

De esta manera, al regenerarse el fenol, se promueve la ciclación intramolecular, lo que finalmente conduce al sistema aromático. Así, durante la formación del sistema cíclico, la imina sobre la posición 5 no intervendría, ya que el fragmento del salicilaldehído que forma el benzimidazol actuaría como agente oxidante. Esto explicaría que el grupo imino se conserve en el producto (ver esq. 2.17).

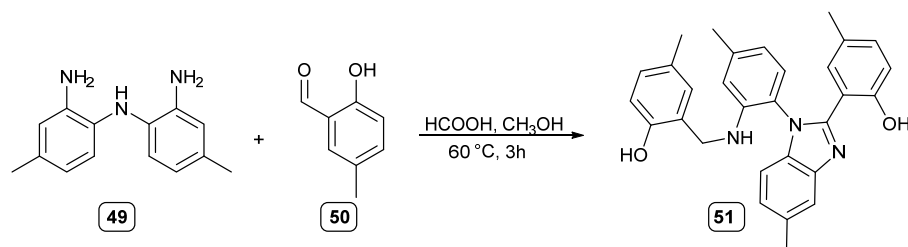


Esquema 2.17 Propuesta de resumida del mecanismo para la generación de sistemas híbridos de salicilaldehído.

Las reacciones representadas en las figuras 2.35 y 2.41 resultan interesantes debido a la singularidad de su obtención y al hecho de que, a pesar de que las condiciones de reacción son similares, los tipos de productos obtenidos son diferentes.

En la bibliografía, se ha reportado una reacción similar a partir de derivados de salicilaldehído y la triamina **49**<sup>163</sup>. Se puede observar que el producto correspondiente es el sistema benzimidazol-amina secundaria y no el benzimidazol-imina, como en nuestro caso (ver esq. 2.18). Esto iría en contra de la propuesta de la formación del *o*-quinometano como intermediario.

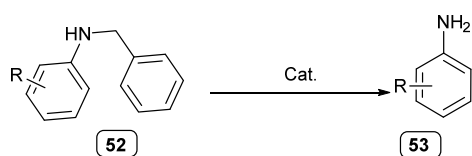
Es importante destacar que en la reacción reportada en la bibliografía se utiliza ácido fórmico, el cual puede actuar como un agente reductor de iminas<sup>164</sup>. Esto justificaría la obtención de la amina secundaria, a pesar de que la reacción proceda por formación de *o*-quinometanos.



Esquema 2.18 Síntesis de benzimidazoles por oxido-reducción intramolecular.

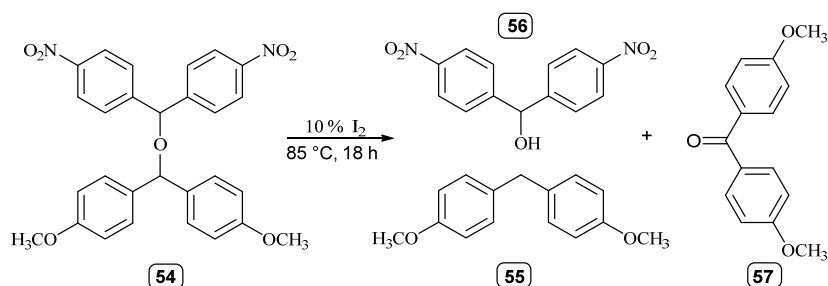
### 2.3. Debencilación de sistemas híbridos

Una de las ventajas de los compuestos con fragmentos de bencilaminas, es que pueden ser transformadas por medio de una reacción de desprotección (ver esq. 2.19), lo que permite que el grupo bencilo presente en la estructura sea eliminado generando así una amina primaria que puede ser modificada posteriormente<sup>165-167</sup>.



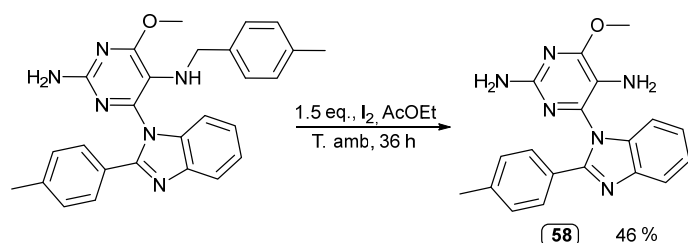
Esquema 2.19 Debencilación de aminas secundarias.

Uno de los catalizadores más versátiles es iodo molecular<sup>168</sup>, incluso su uso se ha extendido en reacciones donde se busca la ruptura del enlace O-C, como el del esquema 2.20 donde se logra la eliminación del grupo bencililo<sup>169</sup>.



Esquema 2.20 Ruptura del enlace O-C catalizada por I<sub>2</sub>.

Considerando lo anterior, en nuestro caso se propuso el uso de iodo molecular para generar la ruptura N-C y así eliminar el grupo bencilo de los sistemas híbridos tipo **41**, y de esa manera obtener un grupo amino muy reactivo en la posición C5 que permitiera modificaciones posteriores (ver esq. 2.21). Si bien, el camino de reacción no ha sido dilucidado, se logró comprobar la eliminación del grupo bencilo por diferentes métodos instrumentales<sup>170</sup>.



Esquema 2.21 Eliminación del grupo bencilo de los sistemas híbridos<sup>170</sup>.

La figura 2.9 correspondiente al espectro  $^1\text{H}$ -RMN permite evidenciar la conversión en el producto **58**, la integración de señales corresponde al sistema sin el grupo bencilo, sumado a esto se observan dos señales en 4.08 y 5.97 ppm debidas a los dos grupos amino sobre la estructura.

Correlacionándose con lo anterior en los espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN y DEPT 135 (ver fig. 2.10) se observan las seis señales de los CH aromáticos y una única señal para grupos metilos en anillos aromáticos en 20.9 ppm, sumado a esto se puede notar que no hay ninguna señal que corresponda al metileno del grupo bencilo inicialmente presente en la estructura, corroborándose la pérdida de ese grupo.

Lo anterior se comprueba mediante espectrometría de masas obteniéndose un ion molecular en 346.1 m/z y un pico en 330.0 m/z correspondiente a la pérdida de  $-\text{NH}_2$ . Se obtuvo un valor m/z para  $[\text{M} + \text{H}]^+$  de 347.1613 para la formula  $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{N}_6\text{O}$ , en comparación con un valor esperado de 347.1615 m/z.

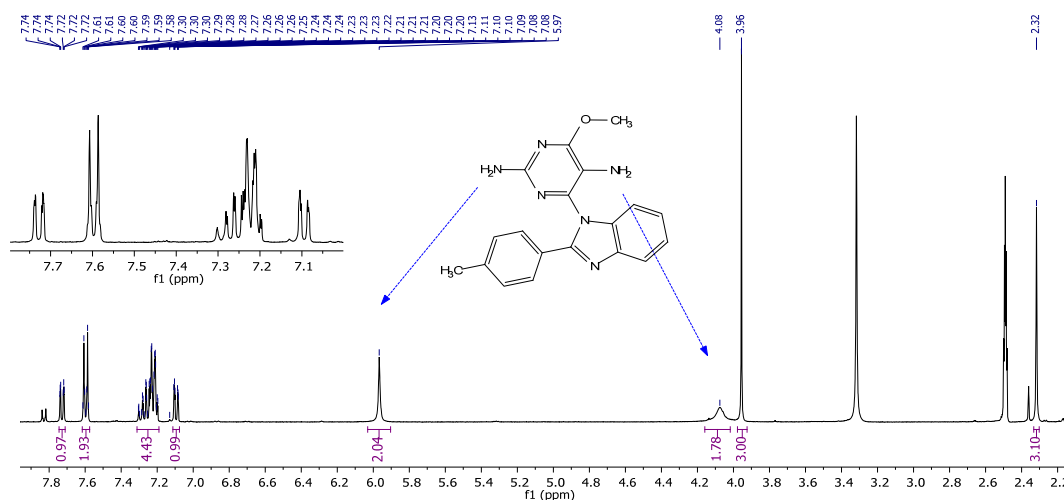


Figura 2.9 Espectro  $^1\text{H}$ -RMN compuesto **58**

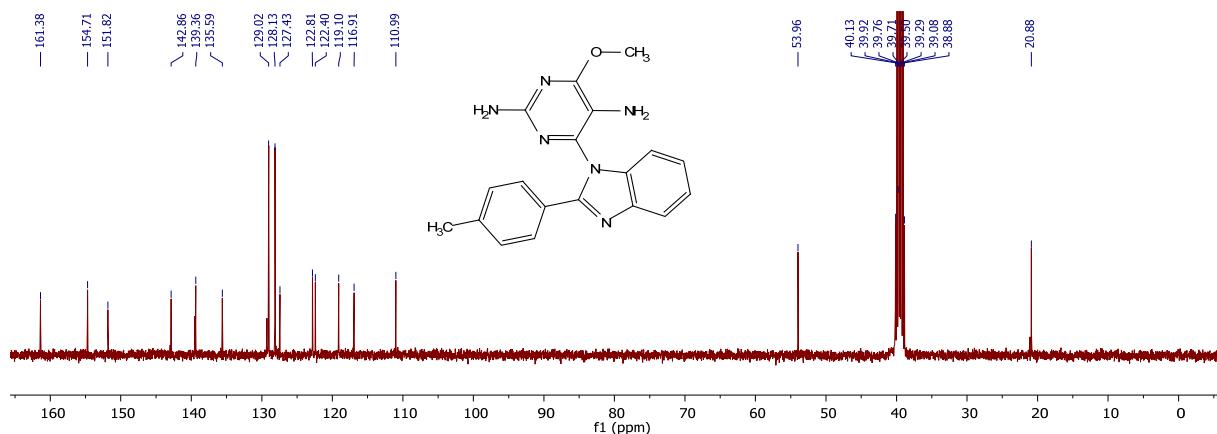
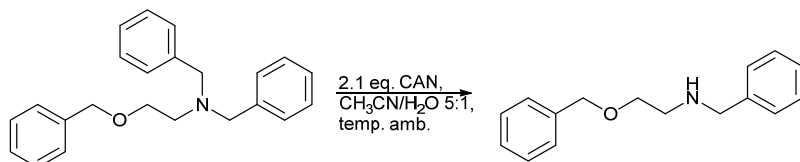


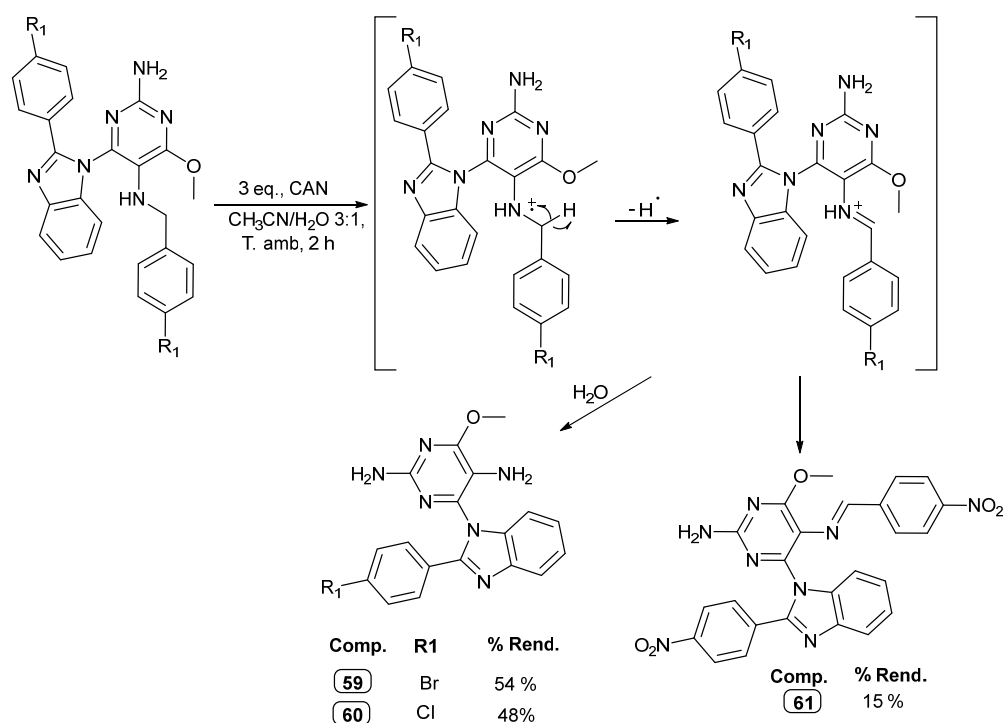
Figura 2.10 Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN compuesto **58**

Si bien, la escisión del grupo bencilo con iodo molecular genera el grupo amino libre como era esperado, también se observó que la reacción toma tiempos muy largos y no se completa totalmente. Como método alternativo algunos reportes de bibliografía indican que el CAN ha mostrado ser efectivo en este tipo de ruptura<sup>171-173</sup> (esq. 2.22).



Esquema 2.22 Escisión oxidativa de N-bencilaminas<sup>172</sup>.

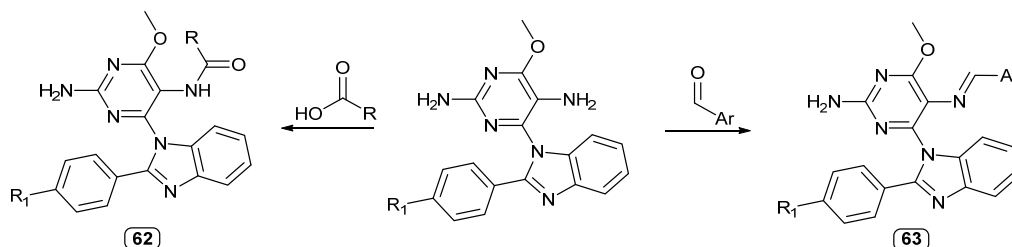
El uso del CAN resultó ser efectivo en este tipo de reacción para la generación de sistemas homólogos al **58**, sin embargo, se observó que con el grupo nitro en la posición 4 de los anillos aromático, el producto que se obtiene corresponde a la imina, lo que corroboraría que probablemente el mecanismo de reacción procede por vía oxidativa, donde la hidrólisis de la imina es menos factible, ya que al ser el grupo nitro un electroattractor fuerte hace que el carbono bencilico sea muy electrodeficiente, haciendo más fuerte el enlace N=C (ver esq. 2.23).



Esquema 2.23 Debencilación oxidativa de sistemas híbridos pirimido-benzimidazol.

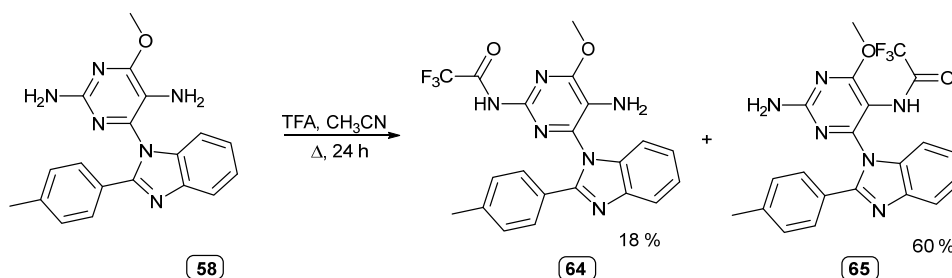
Como se puede ver las estructuras debenciladas cuentan con dos grupos amino disponibles donde se podrían realizar posteriores modificaciones, de manera que se plantearon dos tipos de reacción sobre los productos debencilados. El primero de ellos una reacción con ácidos orgánicos para la formación de amidas

y en la segunda una reacción de condensación con aldehídos para generar homólogos del compuesto **61** (ver esq. 2.24).



Esquema 2.24 Esquema para la derivatización de las diaminopirimidinas.

Siguiendo la ruta a por medio del uso de ácido trifluoroacético se lograron obtener dos diferentes amidas correspondientes a la reacción sobre C2-NH<sub>2</sub> y C5-NH<sub>2</sub>, como era de esperar el producto **65** fue obtenido en mayor proporción, esto debido a que el metoxilo activa preferentemente la posición C5 introduciendo carga, lo cual no es tan factible para la posición C2 (ver esq. 2.25).



Esquema 2.25 Formación de amidas a partir de TFA.

Así, en la figura 2.12 se presentan los espectros de <sup>1</sup>H-RMN donde se evidencian las principales diferencias entre los dos compuestos obtenidos, siendo la señal de NH tipo amida la principal diferencia, ya que la posición C5 se encuentra más influenciada por la desprotección generada por el benzimidazol de la posición C6.

Se llevó a cabo un análisis espectroscópico y espectrométrico de ambos compuestos para su correcta identificación y caracterización. Además, se realizó un análisis de DRX para ambas estructuras, confirmando así la identidad de los compuestos **64** y **65**. Esto respalda la idea de que el sistema **58** puede diversificarse mediante la generación de amidas en las posiciones C2-NH<sub>2</sub> y C5-NH<sub>2</sub>.

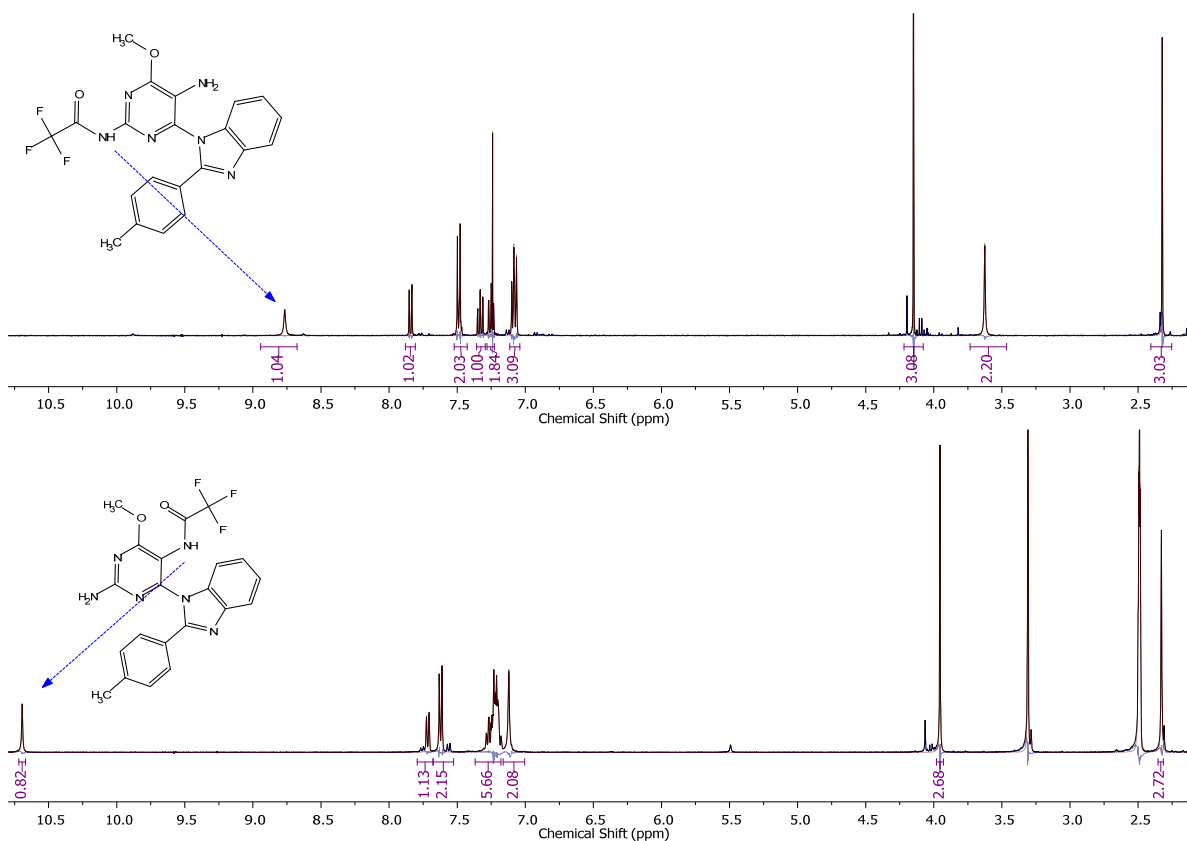
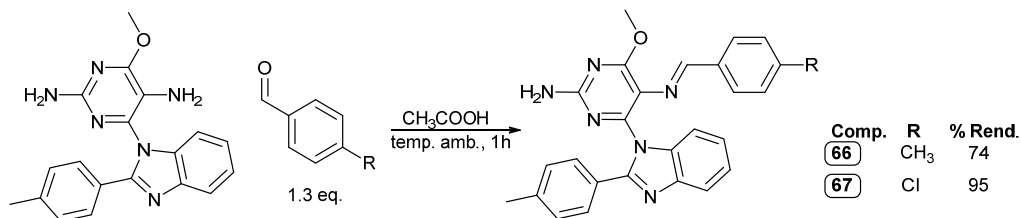


Figura 2.12 Espectros <sup>1</sup>H-RMN de los compuestos **66** y **67**

Formación de iminas a partir de aldehídos aromáticos

La síntesis de una familia de iminas se realizó a partir de aldehídos aromáticos en condiciones suaves (ver esq. 2.26).

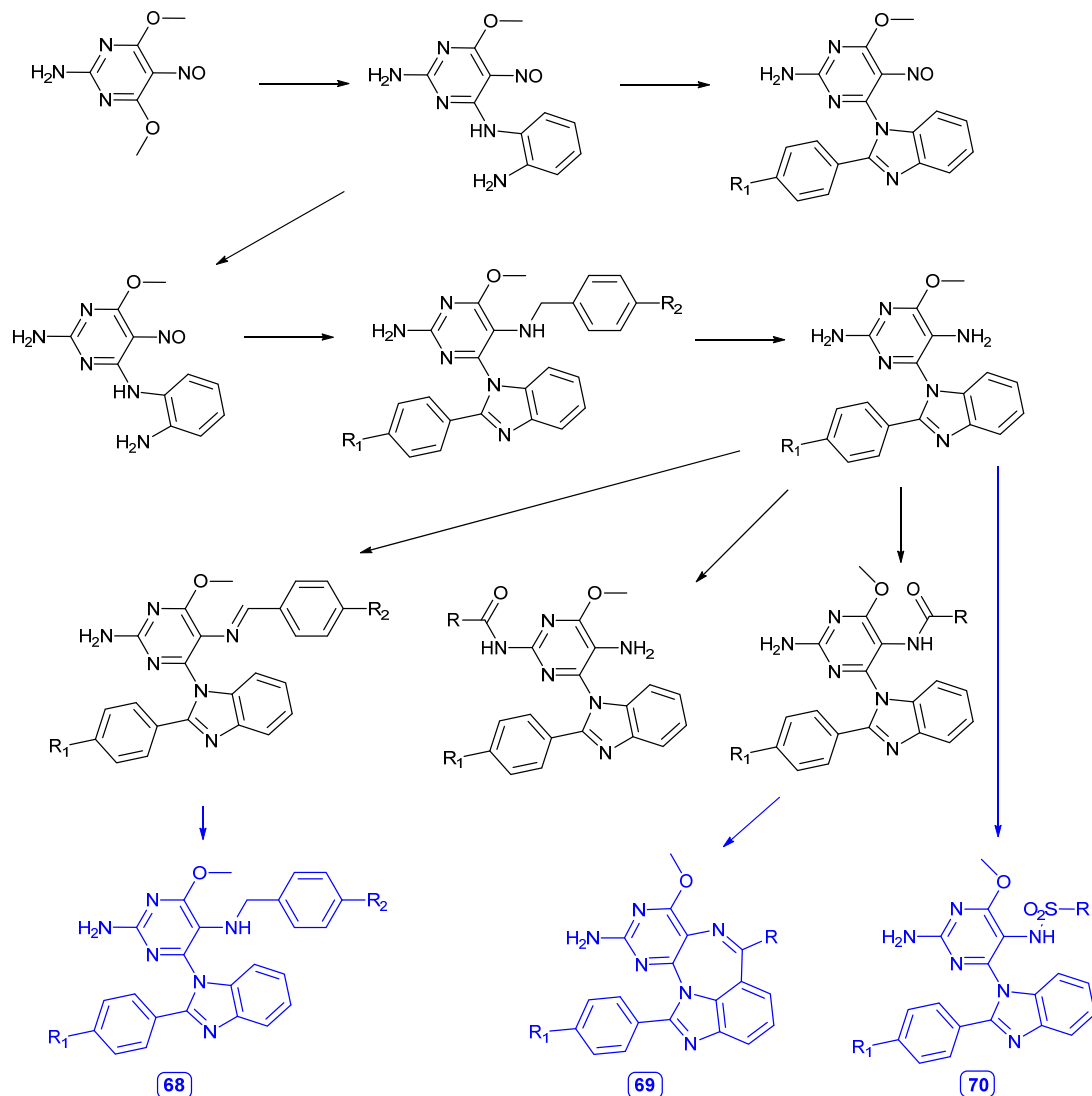
Este procedimiento se realizó con el fin de establecer una metodología para obtener estructuras con sustituyentes diferentes sobre los anillos aromáticos, los cuales posteriormente pueden ser reducidos a las correspondientes aminas secundarias.



Esquema 2.26 Metodología más eficiente para la obtención de los sistemas híbridos.

Teniendo en cuenta el trabajo desarrollado, se pudo realizar una serie de modificaciones sobre del sistema 2-aminopirimidínico que permiten generar una amplia diversidad de compuestos híbridos que a partir de

los cuales se pueden generar nuevas modificaciones con el fin de estudiar su reactividad frente a diferentes dianas moleculares (ver esq. 2.27).



Esquema 2.27 Esquema de nuevos sistemas 2-aminopirimidínicos sintetizados (negro). Posibles derivados que se pueden obtener a partir de los sistemas sintetizados (azul).

## 2.4. Caracterización de compuestos que no aparecen en las publicaciones

*5-((4-bromobenciliden)amino)-N<sup>4</sup>-(2-((4-bromobenciliden)amino)fenil)-6-metoxipirimidina-2,4-diamina (40)*  
Se preparó una solución del intermediario **38** (1.0 g, 4.1 mmol), 4-bromobenzaldehído (9.3 mmol) y ácido trifluoroacético (1.00 g, 8.3 mmol) en metanol (15 ml). Esta mezcla se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. El producto resultante se recogió mediante filtración, se lavó primero con agua y finalmente con una solución acuosa saturada de carbonato de sodio. Posteriormente, se secó en horno a 323 K. Sólido amarillo (70 %). <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO) δ = 9.43 (s, 1H, 7), 8.93 (s, 1H, 9), 8.91 (dd, J = 8.6, 1.1 Hz, 1H, 18), 8.75 (s, 1H, 11), 7.84 (d, J = 8.4 Hz, 2H, 26, 30), 7.60 (d, J = 8.4 Hz, 2H, 20, 24), 7.50 (d, J = 8.4 Hz, 2H, 27, 29), 7.31 – 7.22 (m, 2H, 15, 17), 7.19 (d, J = 8.4 Hz, 2H, 21, 23), 6.99 (t, J = 7.6 Hz, 1H, 16), 6.75 (s, 2H, 33), 3.93 (s, 3H, 34). <sup>13</sup>C-RMN (101 MHz, DMSO) δ = 161.28 (6), 159.88 (2), 159.26 (11), 157.62 (4), 152.45 (9), 138.72 (13), 136.81 (10), 135.01 (14), 134.74 (19), 131.82 (21), 131.44 (27), 130.69 (20), 128.86 (26), 127.26 (17), 125.24 (22), 122.99 (28), 121.36 (16), 118.62 (18), 117.56 (15), 103.55 (5), 53.12 (34). IR (ATR):  $\tilde{\nu}$  = 3399, 3317, 1615, 1517, 1448, 1068, 816, 740 cm<sup>-1</sup>. MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 580 (91) [M]<sup>+</sup>, 396 (100), 273 (80), 227 (41), 89 (51). HRMS (ESI-QTOF) encontrado 581,0120, (M+H)<sup>+</sup> requerido para C<sub>25</sub>H<sub>22</sub>N<sub>8</sub>O<sub>5</sub>: 581,0119.

Para la síntesis de los compuestos **41**, **46** y **48**, se calentó a reflujo una mezcla de **38** (1.0 g, 4.1 mmol), el benzaldehído correspondiente (9.3 mmol) y ácido trifluoroacético (1.00 g, 8.3 mmol) en metanol (15 ml) durante 10 horas. El solvente se eliminó bajo presión reducida y el sólido resultante se recogió mediante filtración. Posteriormente, se lavó primero con una solución acuosa saturada de carbonato de sodio y luego con agua. El producto resultante se cristalizó a partir de metanol-agua y luego se secó en horno a 323 K.

*N<sup>5</sup>-(4-bromobencil)-4-(2-(4-bromofenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)-6-metoxipirimidina-2,5-diamina (41)*. Sólido amarillo (54 %). <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO) δ = 7.76 (d, J = 7.9 Hz, 1H, 15), 7.53 (d, J = 8.5 Hz, 2H, 20, 24), 7.41 (d, J = 8.5 Hz, 2H, 21, 23), 7.31 (t, J = 7.6 Hz, 1H, 16), 7.25 (m, 1H, 17), 7.22 (d, J = 8.3 Hz, 2H, 27, 29), 7.06 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 18), 6.75 (d, J = 8.3 Hz, 2H, 26, 30), 6.35 (s, 2H, 33), 4.50 (t, J = 7.3 Hz, 1H, 8), 3.98 (s, 3H, 34), 3.59 (dd, J = 7.1, 4.7 Hz, 2H, 9). <sup>13</sup>C-RMN (101 MHz, DMSO) δ = 164.49 (6), 156.89 (2), 150.47 (11), 144.82 (4), 142.47 (10), 139.62 (14), 135.83 (13), 131.29 (20, 24), 130.76 (21, 23), 129.86 (27, 29), 129.58 (26, 30), 129.19 (19), 123.36 (22), 123.24 (17), 122.86 (16), 119.81 (28), 119.31 (15), 115.73 (5), 111.38 (18), 54.10 (34), 48.60 (9). IR (ATR):  $\tilde{\nu}$  = 3320, 3173, 1650, 1604, 1467, 1451, 1403, 1009, 741 cm<sup>-1</sup>. MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 580 (100) [M]<sup>+</sup>, 578 (47), 411 (39), 394 (49), 330 (66), 169 (57). HRMS (ESI-QTOF) encontrado: 581,0116, (M+H)<sup>+</sup> requerido para C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub> (M+H)<sup>+</sup>: 581,0119.

*N<sup>5</sup>-(4-clorobencil)-4-(2-(4-clorofenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)-6-metoxipirimidina-2,5-diamina (46)*. Sólido amarillo (75 %). <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO) δ = 7.75 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 15), 7.48 (d, J = 8.6 Hz, 1H, 17, 21), 7.38 (d, J = 8.7 Hz, 2H, 18, 20), 7.30 (t, J = 7.0 Hz, 1H, 14), 7.23 (t, J = 7.5 Hz, 1H, 13), 7.08 (d, J = 8.3 Hz, 2H, 28, 30), 7.05 (d, J = 8.2 Hz, 1H, 12), 6.80 (d, J = 8.4 Hz, 2H, 27, 31), 6.36 (s, 2H, 23), 4.50 (t, J = 7.4 Hz, 1H, 24), 3.97 (s, 3H, 34), 3.59 (d, J = 7.4 Hz, 2H, 25). <sup>13</sup>C-RMN (101 MHz, DMSO) δ = 164.48 (6),

156.88 (2), 150.35 (11), 144.81 (4), 142.44 (9), 139.17 (26), 135.80 (8), 134.37 (16), 131.23 (29), 129.63 (17), 129.17 (27), 128.82 (19), 128.35 (18), 127.82 (28), 123.32 (13), 122.83 (14), 119.28 (15), 115.74 (5), 111.36 (12), 54.10 (34), 48.55 (25). MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 492 (46) [M]<sup>+</sup>, 490 (70), 365 (100), 330 (43), 125 (39).

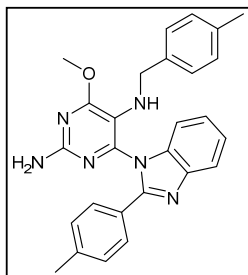
*2-(((2-amino-4-(2-(2-hidroxifenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)-6-metoxipirimidin-5-il)imino)metil)fenol* (**48**). Sólido amarillo (82 %). <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO) δ = 12.29 (s, 1H, 33), 11.75 (s, 1H, 24), 8.91 (s, 1H, 9), 7.82 (d, J = 8.9 Hz, 1H, 14), 7.38 – 7.24 (m, 8H, 15, 16, 17, 19, 21, 25, 30), 7.21 (td, J = 7.8, 7.3, 1.7 Hz, 1H, 27), 6.94 (dd, J = 8.2, 1.3 Hz, 1H, 22), 6.84 – 6.71 (m, 2H, 20, 26), 6.64 (d, J = 8.3 Hz, 1H, 28), 4.07 (s, 3H, 34). <sup>13</sup>C-RMN (101 MHz, DMSO) δ = 164.33 (6), 163.35 (9), 160.32 (2), 159.39 (31), 157.66 (10), 152.70 (4), 150.51 (23), 140.23 (12), 134.42 (13), 132.68 (27), 131.80 (21), 131.67 (25), 127.53 (19), 124.00 (16), 123.46 (15), 119.52 (32), 118.89 (20), 118.86 (26), 118.57 (14), 117.02 (22), 116.34 (28), 114.32 (5), 113.32 (18), 111.18 (17), 54.55 (34). IR (ATR):  $\tilde{\nu}$  = 3474, 3357, 1604, 1582, 1482, 1308, 1249, 739 cm<sup>-1</sup>. MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 452 (36) [M]<sup>+</sup>, 359 (26), 333 (30), 332 (100), 298 (35), 243 (40), 210 (42). HRMS (ESI-QTOF) encontrado: 453,1667, (M+H)<sup>+</sup> requerido para C<sub>25</sub>H<sub>22</sub>N<sub>8</sub>O<sub>5</sub>: 453,167.

## 2.5. Estudios de actividad biológica

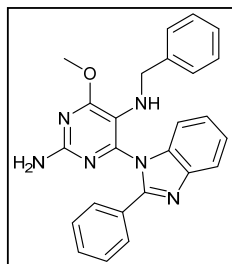
Para evaluar el potencial de los sistemas híbridos como moléculas con actividad antiproliferativa, los compuestos sintetizados en este capítulo fueron sometidos a dos tipos de estudios. El primero de ellos consistió en la realización de estudios como inhibidores de DHFR y SphK, en colaboración con el grupo de investigación del profesor Daniel Enriz de la Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia; Instituto Multidisciplinario de Investigaciones Biológicas (IMIBIO-SL) de la Universidad Nacional de San Luis, Argentina. Sin embargo, los resultados no se incluyen en este documento, ya que indicaron que los compuestos no presentan la actividad evaluada y algunos se degradan fácilmente (bases de Schiff).

El segundo estudio se llevó a cabo en colaboración con el Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos de América (NCI) dentro del Programa de Desarrollo de Terapéuticos (DPT)<sup>174</sup>. De los compuestos sintetizados, el NCI seleccionó 5 para su evaluación dentro del programa NCI-60 one dose, frente a 60 líneas celulares que incluyen leucemia, melanoma, cáncer renal, así como cánceres de pulmón, colon, ovario, mama, próstata y del sistema nervioso central (SNC).

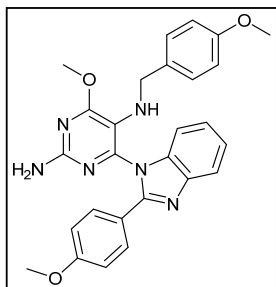
En la figura 2.13 se observan las líneas celulares sobre las que cada compuesto presentó mayor inhibición de crecimiento. Como se puede observar según los resultados ninguno de los compuestos sintetizados presenta actividad inhibitoria del crecimiento promisoría, ya que solo uno de los compuestos produjo una inhibición superior al 70 % en una de las líneas celulares. Con lo cual y según los estándares del NCI, ninguno de los compuestos superó los requerimientos mínimos para realizar un estudio a diferentes concentraciones.



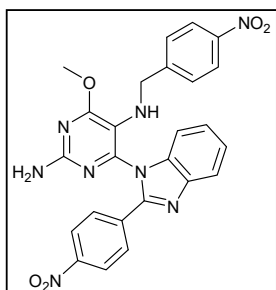
Tipo de cáncer	Línea celular	% Inhibición de crecimiento
Cáncer renal	CAKI-1	59,33
Cáncer renal	UO-31	40,15
Melanoma	UACC-62	35,59



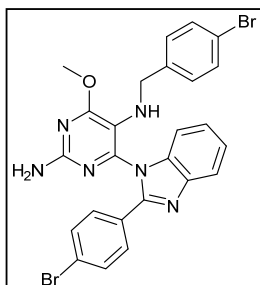
Tipo de cáncer	Línea celular	% Inhibición de crecimiento
Cáncer de mama	HS 578T	82,11
Cáncer del SNC	SNB-75	46,06
Cáncer renal	CAKI-1	44,68



Tipo de cáncer	Línea celular	% Inhibición de crecimiento
Cáncer renal	UO-31	24,94
Cáncer del SNC	SNB-75	24,48
Cáncer	CAKI-1	23,94



Tipo de cáncer	Línea celular	% Inhibición de crecimiento
Cáncer renal	UO-31	52,28
Cáncer renal	CAKI-1	41,25
Laucemia	SR	27,19



Tipo de cáncer	Línea celular	% Inhibición de crecimiento
Cáncer renal	CAKI-1	63,83
Melanoma	UACC-62	44,06
Leucemia	SR	41,18

Figura 2.13 Mayores % de inhibición de crecimiento para cada uno de los compuestos evaluados.

### 2.6. Resumen de artículos publicados de sistemas híbridos tipo aminopirimidina-azol

Los artículos publicados se encuentran enfocados en el análisis estructural de nuevos compuestos obtenidos durante el desarrollo de metodologías sintéticas concisas y eficientes, en la búsqueda de la diversificación de sistemas 2-aminopirimidínicos.

En el artículo titulado "A concise synthesis of a highly substituted 6-(1*H*-benzimidazol-1-yl)-5-nitrosopyrimidin-2-amine: synthetic sequence and the molecular and supramolecular structures of one product and two intermediates," se detalla la síntesis de 6-benzimidazolil-5-nitrosopirimidinas utilizando intermediarios tipo base de Schiff derivados de  $N^4$ -(2-aminofenil)-6-metoxi-5-nitrosopirimidina-2,4-diamina y un medio oxidante de nitrato cérico amónico. Los intermediarios bases de Schiff analizadas (Ia y IIIa) cristalizan como solvatos 1:1 de una solución de dimetil sulfóxido, y sus distancias interatómicas indican que los compuestos exhiben una significativa polarización electrónica dentro del núcleo pirimidínico, mayor que la presentada en 4-metoxi-6-[2-(4-metilfenil)-1*H*-benzimidazol-1-il]-5-nitrosopirimidin-2-amina (II), producto de la ciclación. Una combinación de enlaces de hidrógeno  $N-H\cdots N$  y  $C-H\cdots O$  une las moléculas de (II) en láminas complejas.

En la publicación "A concise and efficient synthesis of amino-substituted (1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-yl)pyrimidine hybrids: synthetic sequence and the molecular and supramolecular structures of six examples," se enfoca en la síntesis y el análisis estructural de híbridos de benzimidazol-pirimidina sustituidos en la posición C5 por grupos amino tipo bencilaminas, partiendo de la  $N^4$ -(2-aminofenil)-6-metoxi-5-nitroso-pirimidina-2,4-diamina. Se destaca en cada uno de  $N^5$ -bencil-6-metoxi-4-(2-fenil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-il)pirimidina-2,5-diamina,  $C_{25}H_{22}N_6O$ , (I), 6-metoxi- $N^5$ -(4-metoxibencil)-4-[2-(4-metoxifenil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-il]pirimidina-2,5-diamina,  $C_{27}H_{26}N_6O_3$ , (III), 6-metoxi- $N^5$ -(4-nitrobencil)-4-[2-(4-nitrofenil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-il]pirimidina-2,5-diamina,  $C_{25}H_{20}N_6O_5$ , (IV), las estructuras tridimensionales se forman a partir de diferentes combinaciones de enlaces de hidrógeno ( $N-H\cdots N$ ,  $N-H\cdots O$ ,  $C-H\cdots O$ ,  $C-H\cdots N$  y  $C-H\cdots \pi$ ). También se ejemplifica la ruptura oxidativa de los sistemas híbridos (II) con diiodo para producir 6-metoxi-4-[2-(4-metilfenil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-il]pirimidina-2,5-diamina (V), que cristaliza como un monohidrato, y se muestra que estos productos pueden generar nuevas especies, como amidas en las posiciones C2 y C5 de la pirimidina, a saber,  $N$ -{5-amino-6-metoxi-6-[2-(4-metilfenil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-il]pirimidin-2-il}-2,2,2-trifluoroacetamida, que cristaliza como un etil acetato monosolvato,  $C_{21}H_{17}F_3N_6O_2C_4H_8O_2$ , (VI), y  $N$ -{2-amino-6-metoxi-4-[2-(4-metilfenil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-il]pirimidin-5-il}-2,2,2-trifluoroacetamida, que cristaliza como un metanol monosolvato,  $C_{21}H_{17}F_3N_6O_2CH_4O$ , (VIIa).obtenidas a través de la reacción con ácido trifluoroacético. En cada uno de (V), (VI) y (VIIa), el ensamblaje supramolecular es bidimensional, basado en diferentes combinaciones de enlaces de hidrógeno  $O-H\cdots N$ ,  $N-H\cdots O$ ,  $N-H\cdots N$ ,  $C-H\cdots O$  y  $C-H\cdots \pi$  en cada caso.

Por último, el artículo "Synthesis of 5-(arylmethylideneamino)-4-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-yl)pyrimidine hybrids: synthetic sequence and the molecular and supramolecular structures of two intermediates and

three final products" está estrechamente relacionado con el anterior al presentar una vía alternativa para la ruptura oxidativa de los híbridos de benzimidazol-pirimidina sustituidos en la posición C5 con bencilaminas, utilizando nitrato cérico amónico. En este caso se plantean tres ejemplos de una síntesis concisa y versátil de 5-(arilmetilideneamino)-4-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-il)pirimidinas, partiendo de 4-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-il)pirimidinas, se presenta la caracterización espectroscópica y estructural, junto con dos intermediarios en la vía de reacción. Los intermediarios 4-[2-(4-clorofenil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-il]-6-metoxipirimidina-2,5-diamina, (II), y 4-[2-(4-bromofenil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-il]-6-metoxipirimidina-2,5-diamina, (III), cristalizan como los monohidratos isoestructurales  $C_{18}H_{15}ClN_5O \cdot H_2O$  y  $C_{18}H_{15}BrN_5O \cdot H_2O$ , respectivamente, en los cuales los componentes están enlazados en láminas complejas mediante enlaces de hidrógeno  $O-H \cdots N$  y  $N-H \cdots O$ . En el producto (*E*)-4-metoxi-5-[(4-nitrobencilideno)amino]-6-[2-(4-nitrofenil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-il]pirimidin-2-amina, que cristaliza como un solvato 1:1 con dimetilsulfóxido,  $C_{25}H_{18}N_8O_5 \cdot C_2H_6OS$ , (IV), los pares relacionados por inversión del componente pirimidina están enlazados por enlaces de hidrógeno  $N-H \cdots N$  para formar dímeros cíclicos centrosimétricos  $R \frac{2}{2}(8)$ , a los cuales se enlazan pares de moléculas de solvente mediante enlaces de hidrógeno  $N-H \cdots O$ . El producto análogo (*E*)-4-metoxi-5-[(4-metilbencilideno)amino]-6-[2-(4-metilfenil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-il]pirimidin-2-amina,  $C_{27}H_{24}N_6O$ , (V), cristaliza con  $Z' = 2$  y las moléculas están enlazadas en una estructura tridimensional mediante una combinación de enlaces de hidrógeno  $N-H \cdots N$ ,  $C-H \cdots N$  y  $C-H(\text{areno})$ . El producto análogo (*E*)-4-metoxi-5-[(4-clorobencilideno)amino]-6-[2-(4-metilfenil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-il]pirimidin-2-amina,  $C_{26}H_{27}ClN_6O$ , cristaliza desde dimetilsulfóxido en dos formas: una, denominada (VIa), es isoestructural con (V), y la otra, denominada (VIb), cristaliza con  $Z' = 1$ , pero como un solvato desconocido en el cual las moléculas de pirimidina están enlazadas por enlaces de hidrógeno  $N-H \cdots N$  para formar una cinta que contiene dos tipos de anillos centrosimétricos.

Aquí irían los Artículos 1, 2 y 3



## CAPÍTULO 3:

# SISTEMAS HÍBRIDOS DEL TIPO ISOCUMARINA-AZOL

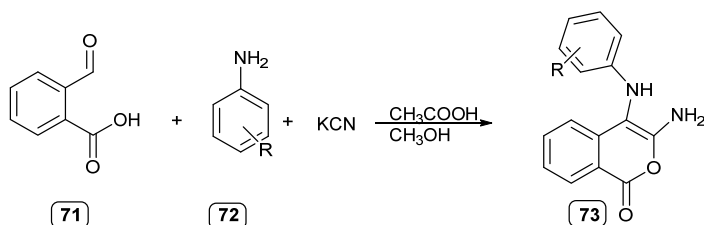


## Capítulo 3. Sistemas híbridos del tipo Isocumarina-Azol

La síntesis de sistemas heterocíclicos fusionados que incorporan azoles, como los derivados de isocumarinas, representa un campo de investigación con alto potencial. Estas estructuras han mostrado una amplia gama de actividades biológicas, lo que las convierte en objetivos atractivos para el diseño de compuestos con propiedades terapéuticas destacadas. No obstante, la coexistencia de estos dos núcleos heterocíclicos en una sola molécula no ha sido estudiada ampliamente.

Así, en la primera etapa y mediante herramientas computacionales, se busca realizar una aproximación a la estabilidad de los sistemas híbridos isocumarina-imidazol e isocumarina-triazol en el sitio de unión de diversas proteínas relacionadas con el desarrollo de algunos tipos de cáncer. Estas proteínas son relevantes para el diseño de tratamientos de terapia dirigida y quimioterapia. El enfoque principal de este estudio se centra en las interacciones permanentes que cada núcleo (isocumarina y azol) puede aportar en el sitio de unión, más que en la selectividad y especificidad hacia residuos de aminoácidos específicos. Las dianas moleculares propuestas para este estudio son VEGFR-2, BRAF, SphK1 y DHFR.

De esa manera, y dando continuidad a una línea de trabajo en sistemas isocumarínicos<sup>175</sup>, se propuso la diversificación de una serie de isocumarinas **73** obtenidas por una reacción tipo Strecker como se reporta en la literatura<sup>176</sup> (ver esq. 3.1)



Esquema 3.1 Metodología para la síntesis de las isocumarinas precursoras.

Las estructuras que se evaluaron fueron los sistemas híbridos **74** y **75** (ver fig. 3.1), los cuales pueden ser obtenidos a partir de la estructura **73**. Es importante tener en cuenta que los ligandos evaluados corresponden a los esqueletos básicos de los sistemas híbridos, lo anterior considerando que la síntesis se propone incluyendo diversos sustituyentes que pueden aportar mayores interacciones proteína-ligando, las cuales pueden aumentar la estabilidad en el sitio de unión, de modo que podrían mejorar la estabilidad del sistema básico que se evaluará a continuación.

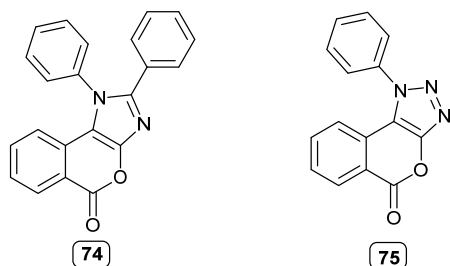


Figura 3.1 Propuesta de sistemas híbridos del tipo isocumarina-azol.

Para cada una de las dianas moleculares se realizó el docking frente al ligando cocrystalizado, esto con el fin de validar la metodología y hacer uso posterior de los mismos parámetros para evaluar el esqueleto básico de los sistemas híbridos propuestos. Una vez encontrada la pose de menor energía de cada uno de los ligandos diseñados, se procedió a evaluar la estabilidad del complejo ligando-receptor haciendo uso de dinámica molecular a 310 K durante 100 ns.

### 3.1. Sistemas híbridos Isocumarina-Imidazol

El estudio de dinámica molecular a 100 ns reveló que las interacciones hidrofóbicas juegan un papel crucial en la estabilidad de los complejos formados con el híbrido **74**, siendo los más estables los correspondientes al sistema híbrido isocumarina-imidazol y las dianas VEGFR-2, BRAF y SphK1.

En VEGFR-2, a pesar de los cambios conformacionales en la zona expuesta al solvente, el anillo isocumarínico se mantuvo en el sitio de unión, interactuando de manera constante con CYS 917 (95%) a través de enlaces de hidrógeno y estableciendo puentes de agua entre el nitrógeno imidazólico y LYS 918, lo que contribuyó a la estabilidad del complejo (fig. 3.2).

En BRAF, las interacciones de hidrógeno con TYR 538 (44%), así como las interacciones con LYS 483 y ASN 580 con el nitrógeno del imidazol y las interacciones  $\pi$ - $\pi$  stacking entre PHE 583 y uno de los anillos aromáticos sustituyentes, fueron fundamentales para la estabilidad del complejo (ver fig. 3.3).

En SphK1, a pesar de la ausencia de interacciones polares importantes, el complejo se mantuvo en el sitio activo gracias a las interacciones hidrofóbicas, principalmente con PHE 259, y a interacciones  $\pi$ - $\pi$  stacking entre el residuo PHE 389 y el anillo aromático sustituyente del sistema imidazólico (ver fig. 3.4).

En DHFR, se observaron cambios importantes hasta los 20 ns, seguidos de una estabilización proporcionada principalmente por interacciones hidrofóbicas con los residuos PHE 31, PHE 34 y PRO 61 (ver fig. 3.5). En este caso, la estabilidad del complejo se asoció al sistema híbrido en su conjunto, ya que no hubo interacciones duraderas con residuos específicos durante la trayectoria.

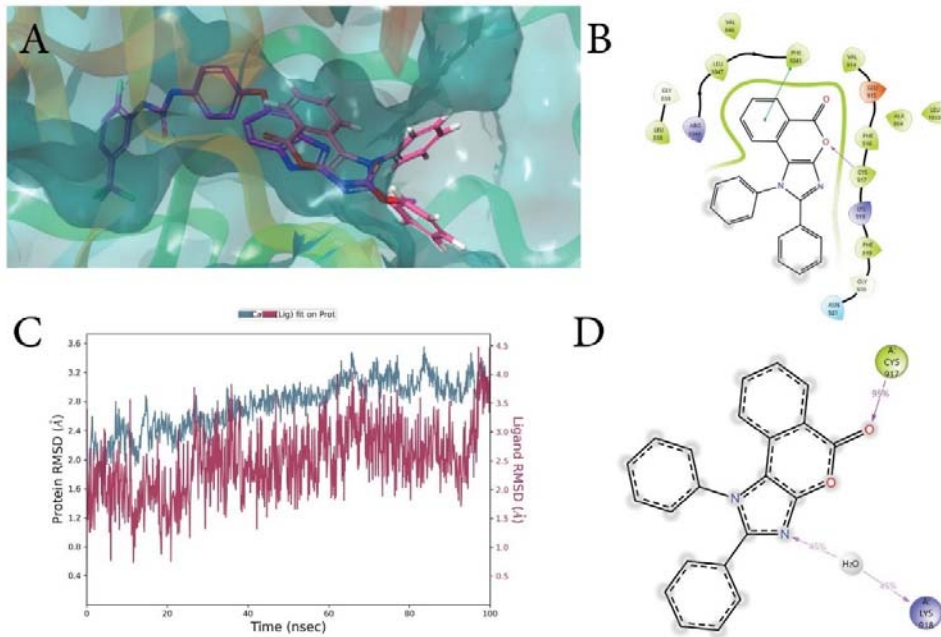


Figura 3.2 (A y B) Docking  $\Delta G_{unión} = -6.508$  kcal/mol (violeta: ligando cocristalizado, rosado: sistema híbrido), (C) RMSD, y (D) principales contactos ligando-proteína con mayor permanencia del sistema híbrido isocumarina-imidazol sobre VEGFR-2.

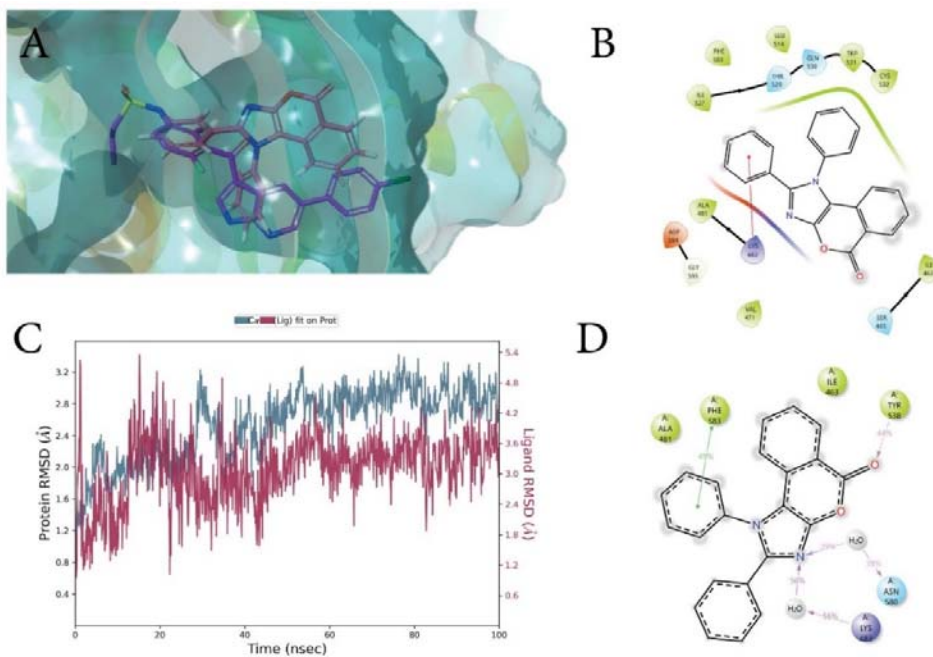


Figura 3.3 (A y B) Docking  $\Delta G_{unión} = -10.352$  kcal/mol. (violeta: ligando cocristalizado, rosado: sistema híbrido), (C) RMSD, y (D) principales contactos ligando-proteína con mayor permanencia del sistema híbrido isocumarina-imidazol sobre BRAF.

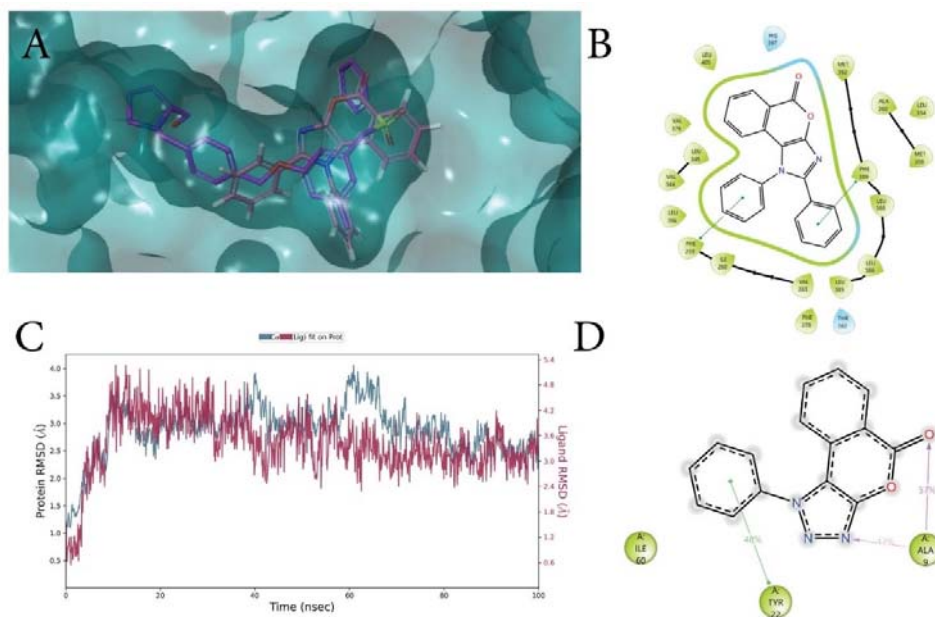


Figura 3.4 (A y B) Docking  $\Delta G_{unión} = -9.555$  kcal/mol. (violeta: ligando cocristalizado, rosado: sistema híbrido), (C) RMSD, y (D) principales contactos ligando-proteína con mayor permanencia del sistema híbrido isocumarina-imidazol sobre SphK1.

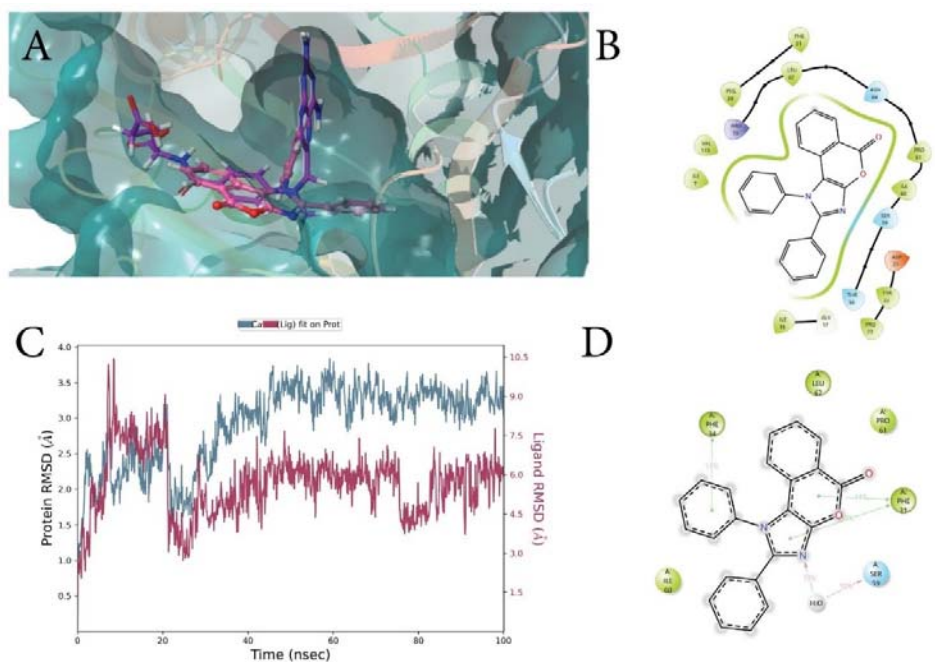
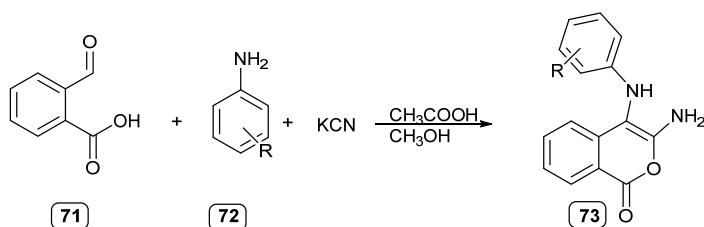


Figura 3.5 (A y B) Docking  $\Delta G_{unión} = -8.904$  kcal/mol. (violeta: ligando cocristalizado, rosado: sistema híbrido), (C) RMSD, y (D) principales contactos ligando-proteína con mayor permanencia del sistema híbrido isocumarina-imidazol sobre DHFR.

Los resultados obtenidos sugieren que, en sistemas dinámicos, los híbridos del tipo isocumarina-imidazol pueden adoptar posiciones estables en los sitios de unión de las dianas moleculares evaluadas bajo los parámetros establecidos. Esto se logra incluso sin la presencia de sustituyentes en los anillos fenólicos. Es plausible que, al introducir diferentes grupos en estos anillos, se puedan generar interacciones adicionales que fortalezcan aún más la estabilidad del complejo proteína-ligando, sin alterar de manera significativa la estructura del sistema híbrido de tipo isocumarina-imidazol.

Teniendo en cuenta lo anterior, se considera viable desarrollar la síntesis de sistemas híbridos con sustituyentes sobre los anillos aromáticos no isocumarínicos.

Así, se propuso la síntesis del anillo isocumarínico basados en una reacción tipo Strecker según reportes de literatura<sup>176</sup> (ver esq. 3.2).

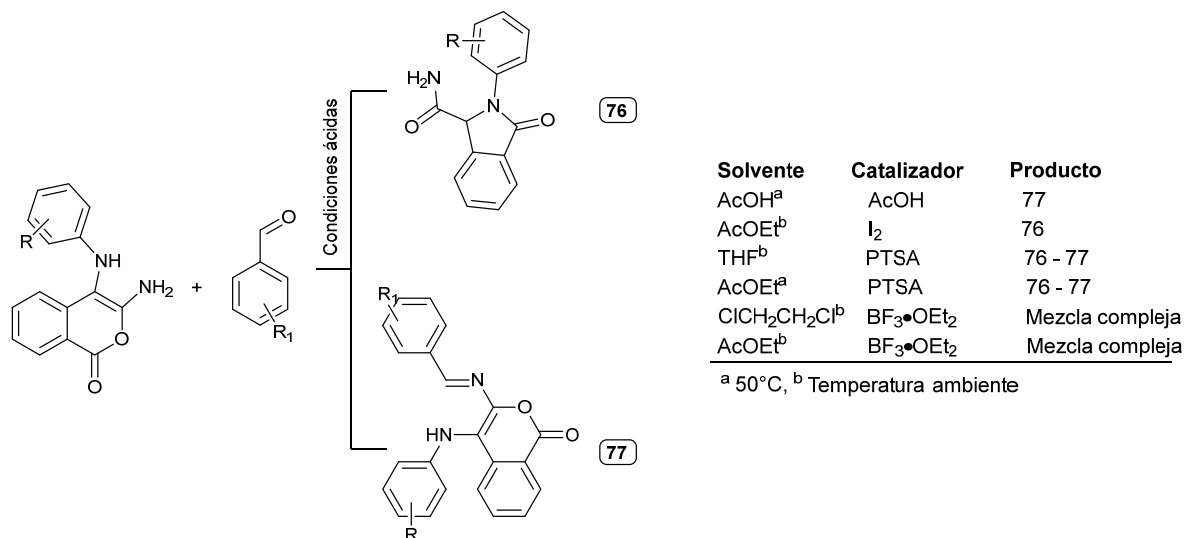


Esquema 3.2 Metodología para la síntesis de las isocumarinas precursoras.

Como se puede evidenciar, la isocumarina formada cuenta con dos aminas adyacentes, la cuales tienen características nucleofílicas que permiten la generación de sistemas cíclicos sobre la cara C.

Haciendo uso de esas características nucleofílicas y continuando con un trabajo previo realizado alrededor de sistemas heterocíclicos tipo isocumarina<sup>175</sup> se realizó la síntesis de los sistemas híbridos 78.

Como lo reportamos<sup>177</sup>, la obtención de los sistemas isocumarina-imidazol no fue posible en las metodologías implementadas, el uso de ácidos próticos conducen a la formación de las iminas 77 o a las correspondientes lactamas producto de una reorganización intramolecular<sup>178</sup> (ver esq. 3.3).

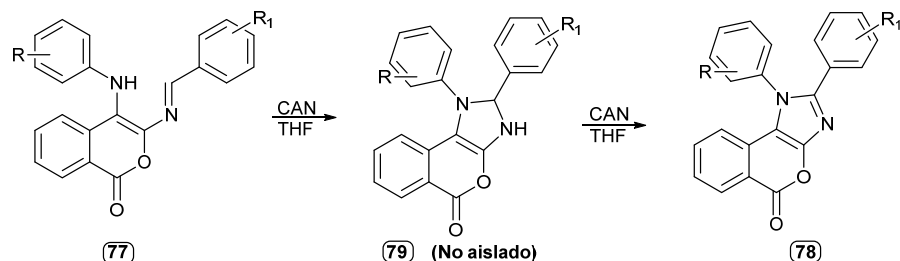


Esquema 3.3 Esquema de productos de reacción en condiciones ácidas.

Teniendo en cuenta que las iminas formadas se pueden aislar y purificar sin comprometer su estabilidad, se propuso realizar la síntesis en etapas con el fin de generar los sistemas híbridos.

De esa forma, y con el fin de tener la menor cantidad de interferentes y reducir los subproductos de la reacción se partió de las iminas purificadas, continuando con la ciclación usando catalizadores ácidos, encontrando que con el CAN como mediador, se logra la generación de los sistemas híbridos, lo cual puede ser atribuido no solo a sus características ácidas, sino a que también puede actuar como agente oxidante<sup>179</sup>, siendo esta última característica de gran importancia en este tipo de reacción, ya que permite que el dihidroimidazol (**79**) producto de la ciclación intramolecular, sea conducido hasta el sistema aromático generando un sistema altamente conjugado muy estable (ver esq. 3.4).

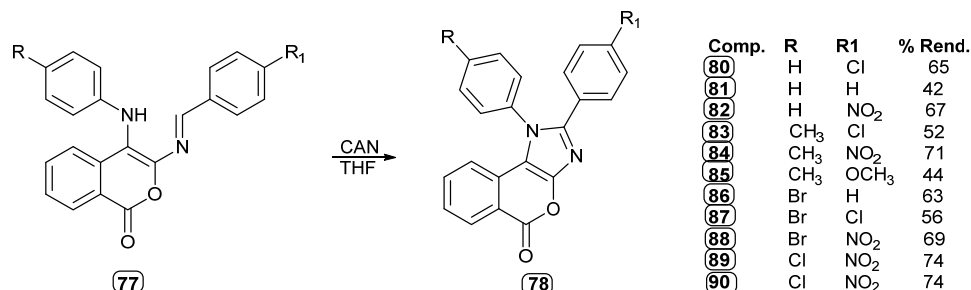
Adicionalmente se ha evidenciado que su uso como catalizador en reacciones que involucran cumarinas no genera la apertura del ciclo, lo cual fue beneficioso a la hora de generar el sistema híbrido<sup>180</sup>, ya que el uso de otras especies podría generar la hidrólisis de la lactona.



Esquema 3.4 Síntesis de sistemas híbridos isocumarina-imidazol.

Una particularidad a resaltar en este tipo de reacción es la influencia que tienen los sustituyentes del sistema aromático proveniente en la imina. Donde es notable que los grupos -NO<sub>2</sub> al ser fuertemente

desactivantes, hacen más electrodeficiente al carbono imínico, convirtiéndolo en un mejor electrófilo, lo cual se ve reflejado en que los mayores rendimientos se obtienen a partir de las iminas que cuentan con el grupo NO<sub>2</sub> en ese sistema aromático (ver esq. 3.5).



Esquema 3.5 Metodología sintética para la obtención de híbridos isocumarina-imidazol.

De esa forma se reportó la síntesis de 10 iminas intermedias y 10 sistemas híbridos del tipo isocumarina-imidazol.

### 3.2. Sistemas híbridos Isocumarina-Triazol

El sistema híbrido del tipo isocumarina-triazol **75** presenta un comportamiento similar al **74**, siendo principalmente relevantes las interacciones hidrofóbicas con todas las dianas moleculares. Además, al ser una estructura de menor tamaño, se incorpora mejor dentro del sitio de unión de cada diana molecular, especialmente frente a SphK1. En este caso, no se presentan interacciones polares, pero la estructura adopta una conformación en la cual todo el sistema puede generar interacciones apolares, sin dejar zonas expuestas al solvente que puedan remover la estructura del sitio activo.

En los resultados de dinámica molecular, se destaca el papel crucial del triazol en la estabilidad de los complejos, aportando interacciones duraderas tipo  $\pi$  stacking o enlace de hidrógeno con los residuos de aminoácidos del sitio de unión.

Frente a VEGFR-2, SphK1 y DHFR, no se evidencian grandes variaciones en los valores de RMSD una vez iniciadas las trayectorias. Esto indica que las estructuras no experimentaron cambios conformacionales o traslacionales significativos en esas dianas moleculares durante el periodo de simulación.

A nivel individual, en VEGFR-2, CYS 917 emerge como un elemento clave en la estabilidad del complejo, al establecer enlaces de hidrógeno con uno de los nitrógenos del triazol, una interacción que se mantiene prácticamente constante a lo largo de toda la trayectoria (90%). Esta interacción se ve reforzada por interacciones hidrofóbicas proporcionadas por VAL 846, LEU 1033 y PHE 1045 (fig. 3.6).

En la proteína BRAF, se identifican interacciones específicas dentro de la cavidad, correspondientes a los residuos CYS 532 y PHE 583. La estabilidad se debe en gran medida a los enlaces de hidrógeno formados sobre el oxígeno carbonílico de la isocumarina en el caso de CYS 532 (43%), mientras que PHE 583

establece interacciones  $\pi$ - $\pi$  stacking principalmente con el anillo lactámico y en menor medida con el núcleo del triazol (22%) (ver fig. 3.7).

El análisis del RMSD sugiere una estabilidad notoria en la trayectoria evaluada para el complejo con SphK1 (ver fig. 3.8). En este contexto, la interacción  $\pi$ - $\pi$  stacking del triazol con PHE 259 se presenta de manera predominante (69%) durante la simulación. Adicionalmente, se observa un enlace de hidrógeno con THR 282 y el oxígeno carbonílico de la isocumarina (61%), así como una interacción  $\pi$ - $\pi$  stacking entre el anillo lactámico y PHE 389, aunque en menor medida.

Finalmente, en DHFR, aunque el anillo de triazol no establece interacciones específicas duraderas durante la mayor parte de la trayectoria evaluada (17%), la formación de un enlace de hidrógeno entre ALA 9 y el oxígeno carbonílico, junto con la interacción  $\pi$ - $\pi$  stacking entre TYR 22 y el fenilo sustituyente del triazol, proveen la estabilidad necesaria para mantener el sistema híbrido en el sitio de unión (ver fig. 3.9).

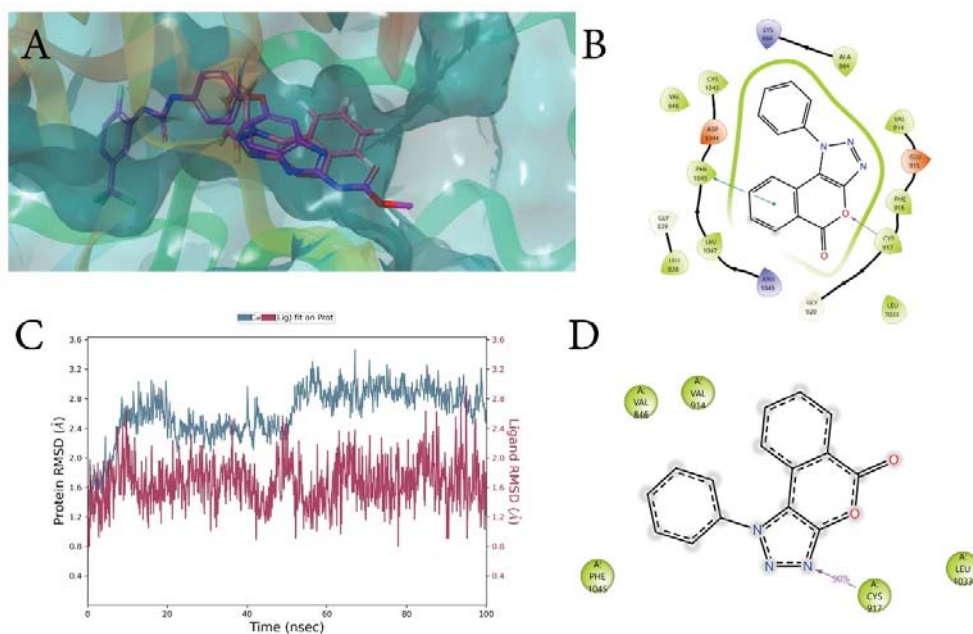


Figura 3.6 (A y B) Docking  $\Delta G_{unión} = -8.597$  kcal/mol. (violeta: ligando cocrystalizado, rosado: sistema híbrido), (C) RMSD, (D) principales contactos ligando-proteína con mayor permanencia del sistema híbrido isocumarina-triazol sobre VEGFR-2.

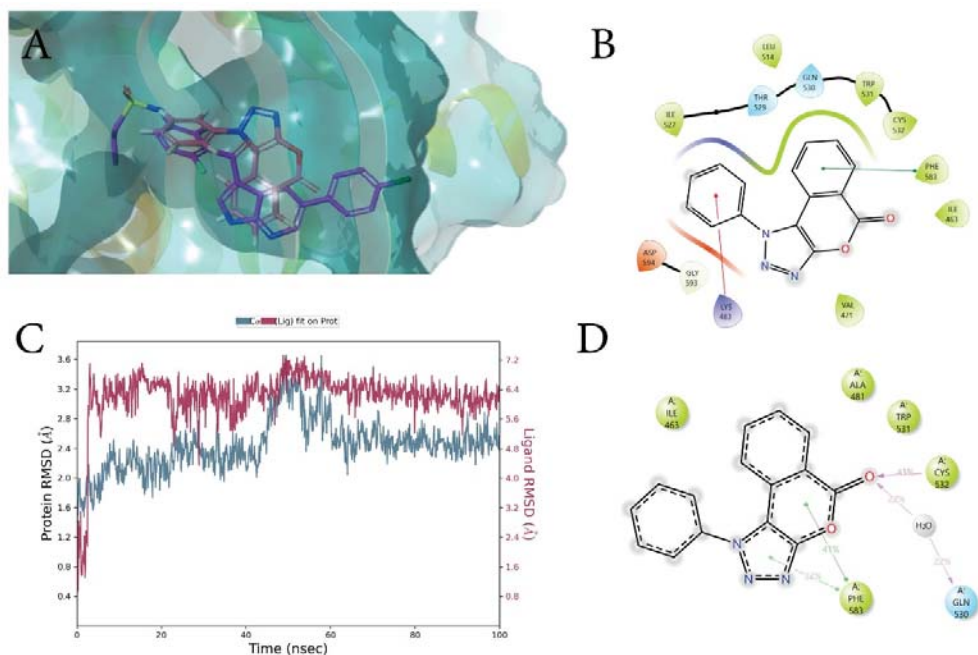


Figura 3.7 (A y B) Docking  $\Delta G_{unión} = -9.758$  kcal/mol. (violeta: ligando cocristalizado, rosado: sistema híbrido), (C) RMSD, (D) principales contactos ligando-proteína con mayor permanencia del sistema híbrido isocumarina-triazol sobre BRAF.

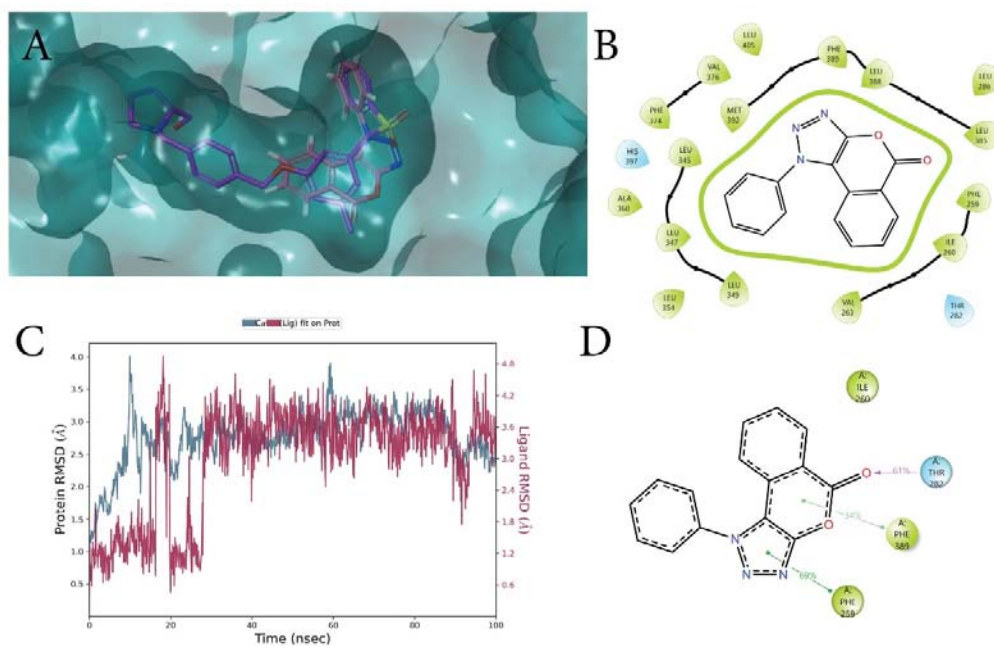


Figura 3.8 (A y B) Docking  $\Delta G_{unión} = -9.234$  kcal/mol. (violeta: ligando cocristalizado, rosado: sistema híbrido), (C) RMSD, (D) principales contactos ligando-proteína con mayor permanencia del sistema híbrido isocumarina-triazol sobre SphK1.

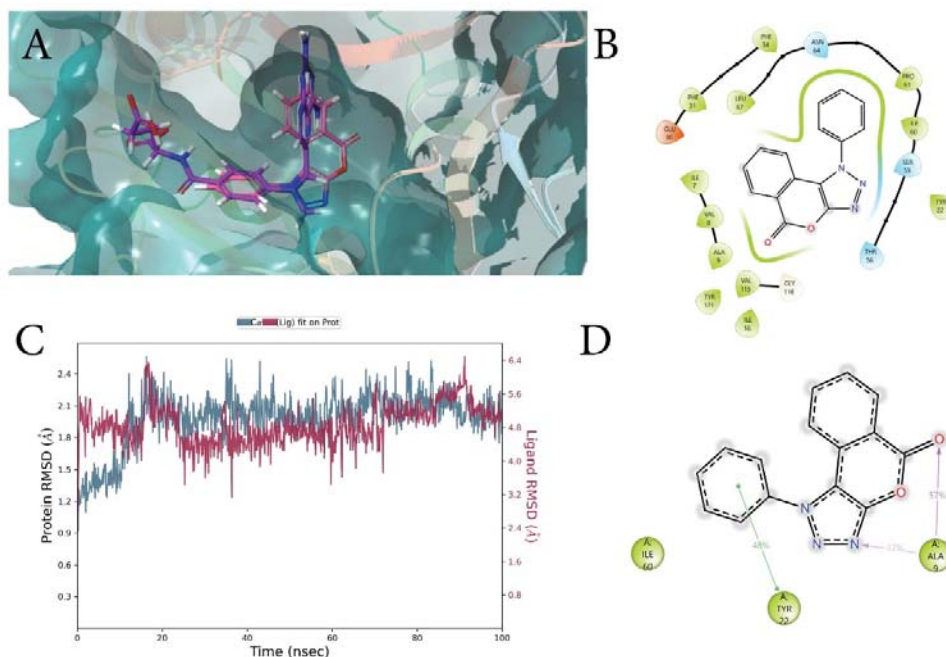


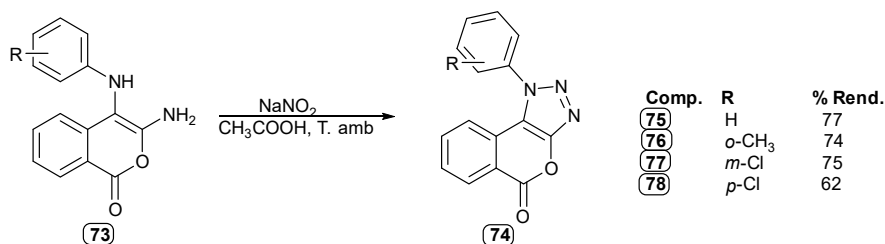
Figura 3.9 (A y B) Docking  $\Delta G_{unión} = -9.767$  kcal/mol. (violeta: ligando cocrystalizado, rosado: sistema híbrido), (C) RMSD, (D) principales contactos ligando-proteína con mayor permanencia del sistema híbrido isocumarina-triazol sobre DHFR.

En conjunto, estos resultados destacan la relevancia de contar tanto con la isocumarina como el triazol en una sola estructura, ya que en la mayoría de los casos la estructura se mantiene ocupando la ubicación del ligando cocrystalizado, donde que ambos fragmentos (isocumarina y triazol) pueden interactuar simultáneamente con los restos de los aminoácidos en el sitio de unión de las dianas moleculares seleccionadas, contribuyendo de manera sinérgica a la estabilidad de los complejos evaluados.

De esa manera, y a partir de las isocumarinas precursoras se diseñó la síntesis de los sistemas híbridos siguiendo la metodología tradicionalmente utilizada a partir de nitrito de sodio, evitando el uso de ácido clorhídrico, con el fin de no causar la hidrólisis de la lactona, reemplazándolo con un ácido acético, el cual al ser más débil puede generar menos reacciones adversas (ver esq. 3.6).

Para la correcta identificación de los productos, se llevaron a cabo análisis espectrométricos y espectroscópicos.

Los cambios más notables en el espectro infrarrojo, que evidencian la transformación, se observan en la desaparición de las bandas asociadas a las vibraciones asimétricas y simétricas del grupo  $-NH_2$ . En la isocumarina de partida, estas bandas aparecen como bandas anchas de mediana intensidad a  $3457$  y  $3319$   $cm^{-1}$ , respectivamente (ver figura 3.12). Es importante señalar que la banda asociada a la vibración simétrica del  $-NH_2$  ( $3319$   $cm^{-1}$ ) es más ancha e intensa debido a la contribución del grupo  $-NH$ .



Esquema 3.6 Metodología sintética para la obtención de híbridos isocumarina-triazol.

Las demás bandas si bien presentan un corrimiento frente a las obtenidas en el espectro del reactivo de partida, están asociadas a los mismos grupos funcionales presentes en las ambas estructuras.

Asimismo, en la resonancia magnética nuclear (RMN), es crucial destacar el espectro de <sup>1</sup>H-RMN, donde todas las señales se ubican en la región aromática. La integración total indica la presencia de los 8 hidrógenos en el sistema fusionado, evidenciando la desaparición de los dos singletes a 4.47 y 4.85 ppm correspondientes a los hidrógenos de las aminas en el sistema isocumarínico de partida. Esto sugiere la ausencia de aminas primarias y secundarias, posiblemente debido a reacciones en esas posiciones (ver fig. 3.13).

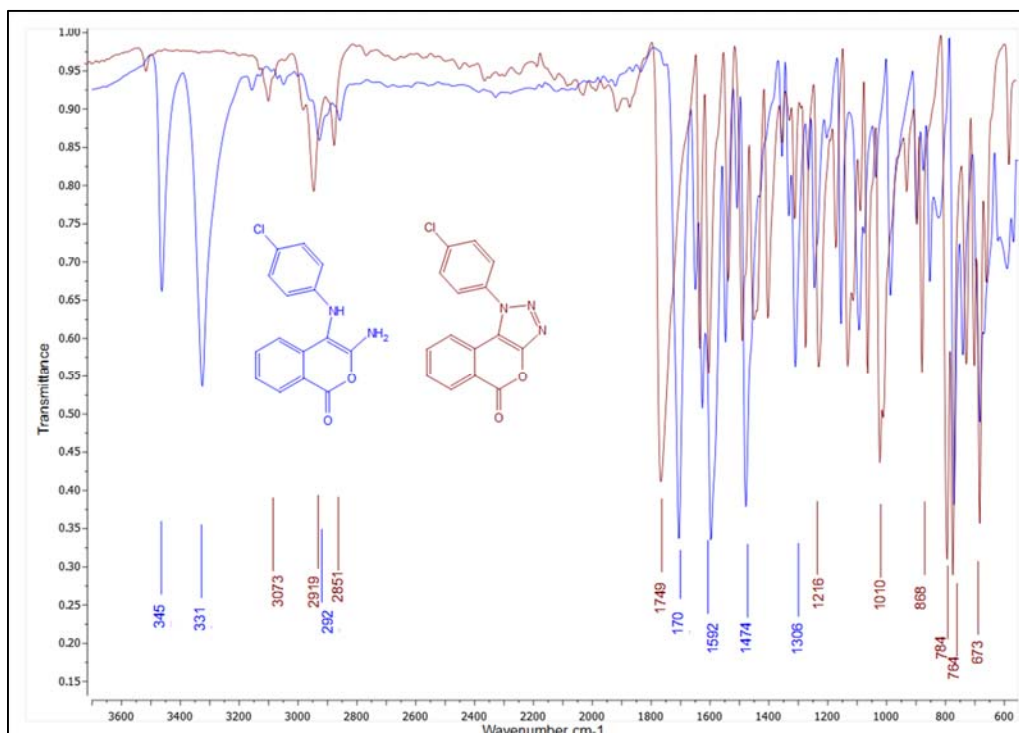


Figura 3.10 Superposición de los espectros infrarrojo (ATR) de las estructuras 77 y su isocumarina de partida.

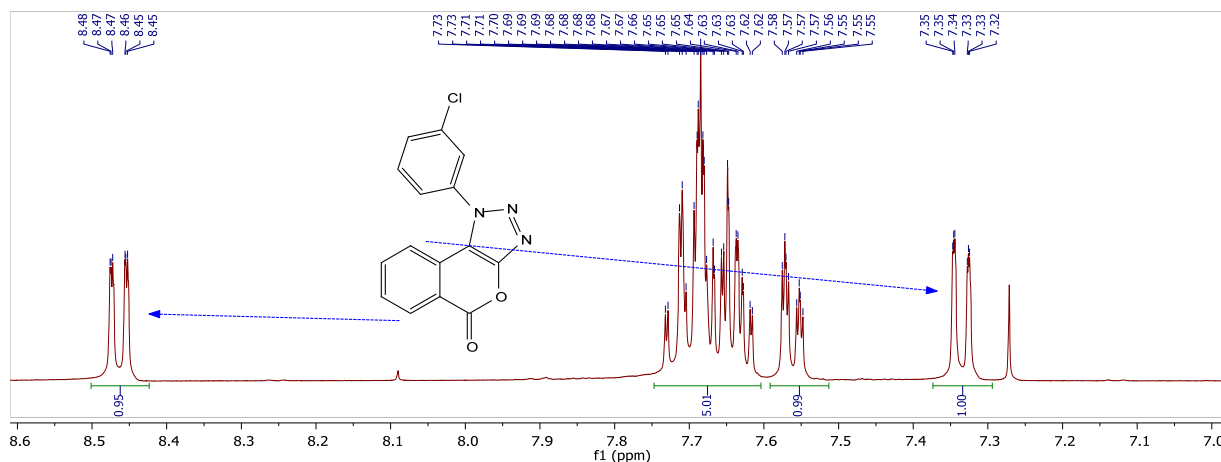


Figura 3.11 Espectro  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto **77**

El espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN se correlaciona con la estructura esperada en cuanto al número de señales y a los desplazamientos de estas, encontrándose 15 señales, de las cuales 8 corresponden a los carbonos -CH y 7 a carbonos no hidrogenados entre los que se incluye el carbono carbonílico en 159.9 ppm (ver fig. 3.14).

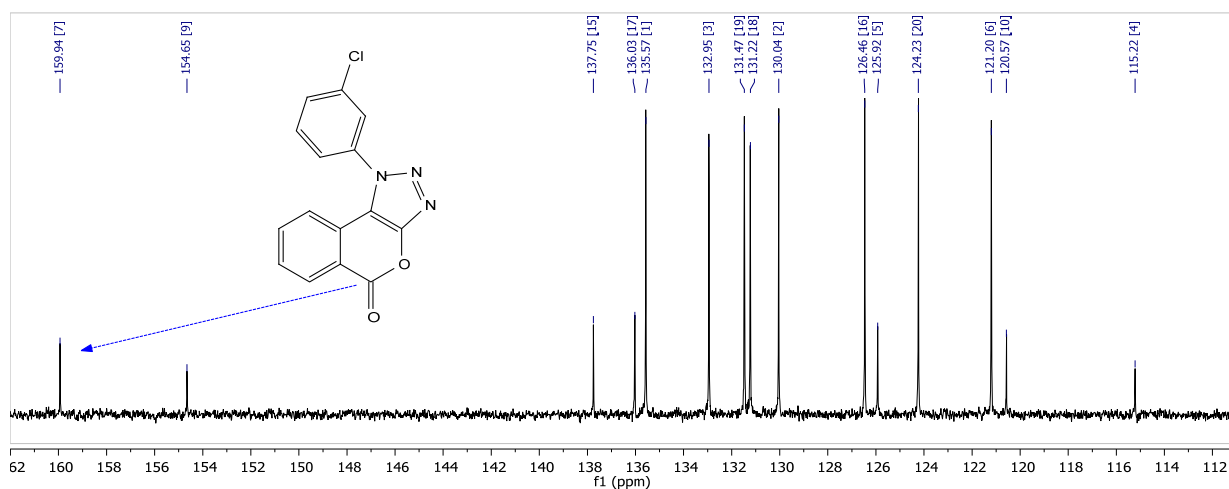


Figura 3.12 Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN del compuesto **77**

En la espectroscopía de baja resolución, se observa el ion molecular a 296.9 m/z y el pico principal a 212.9 m/z, correspondiente a la pérdida de dos unidades de CO y una unidad de  $\text{N}_2$ . Por otro lado, en la espectrometría de masas de alta resolución, se obtuvo un valor de 298.0380 m/z para  $\text{C}_{15}\text{H}_8^{35}\text{ClN}_3\text{O}_2$ , con un valor esperado de  $[\text{M} + \text{H}]^+$  de 298.0380.

Las constituciones de los compuestos **75-78** fueron completamente establecidas mediante una combinación de espectrometría de masas de alta resolución (HRMS), espectroscopía infrarroja (IR) y espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protones ( $^1\text{H}$ ) y de carbono-13 ( $^{13}\text{C}$ ). estas

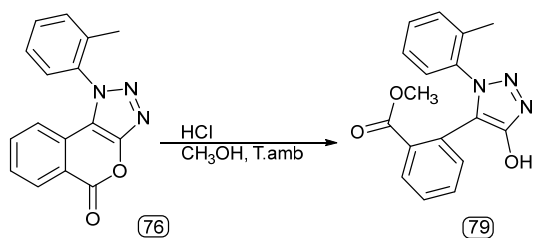
observaciones, tomadas en conjunto, confirman la conversión de los precursores diamino-isocumarinas en los productos tipo triazol, además de ser confirmadas por la determinación de sus estructuras mediante difracción de rayos X.

El análisis estructural de rayos X mostró que las conformaciones de los compuestos **75-78** son bastante similares, estando el ensamblaje supramolecular en los compuestos dominado por contactos de los tipos C—H···N, C—H···O y C—H···π(areno).

También se evidenció que pequeñas variaciones en el sustituyente en el anillo arilo pendiente en los compuestos (I)-(IV) están asociadas con cambios significativos en el patrón de ensamblaje supramolecular. Mientras que para el compuesto sin sustituyentes (I), las moléculas están unidas en láminas por una combinación de enlaces de hidrógeno C—H···N y C—H···O, la formación de láminas en el derivado con cloro en la posición 4 (IV) se basa en una combinación de enlaces de hidrógeno C—H···O y C—H···π(areno). En cada uno de los compuestos metilo (II) y cloro en la posición 3 (III), un solo enlace de hidrógeno, del tipo C—H···O y C—H···N, respectivamente, une las moléculas en cadenas simples.

Con el fin de evidenciar los efectos de la presencia de un ácido fuerte sobre la estructura del sistema híbrido, se disolvió el compuesto **2** en metanol y dejó en agitación a temperatura ambiente en presencia de ácido clorhídrico en cantidades catalíticas.

Como resultado se observó que efectivamente el anillo isocumarínico se abre, generando en este caso una transesterificación con el metanol del medio (ver esq. 3.7).



Esquema 3.7 Reacción de apertura del anillo isocumarínico.

Lo anterior se puede corroborar mediante todos los análisis realizados, particularmente mediante <sup>1</sup>H-RMN donde se observa la aparición de dos nuevas señales correspondientes al H del hidroxilo en 10.48 ppm y a los hidrógenos del metoxilo producto de la transesterificación en 3.67 ppm. De la misma forma, la observación más relevante en <sup>13</sup>C-RMN es la aparición del metoxilo como resultado de la transesterificación en 52.12 ppm.

La estructura fue completamente confirmada por espectrometría de masas, infrarrojo y difracción de rayos X (ver fig.3.13).

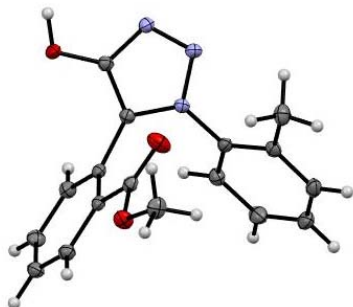


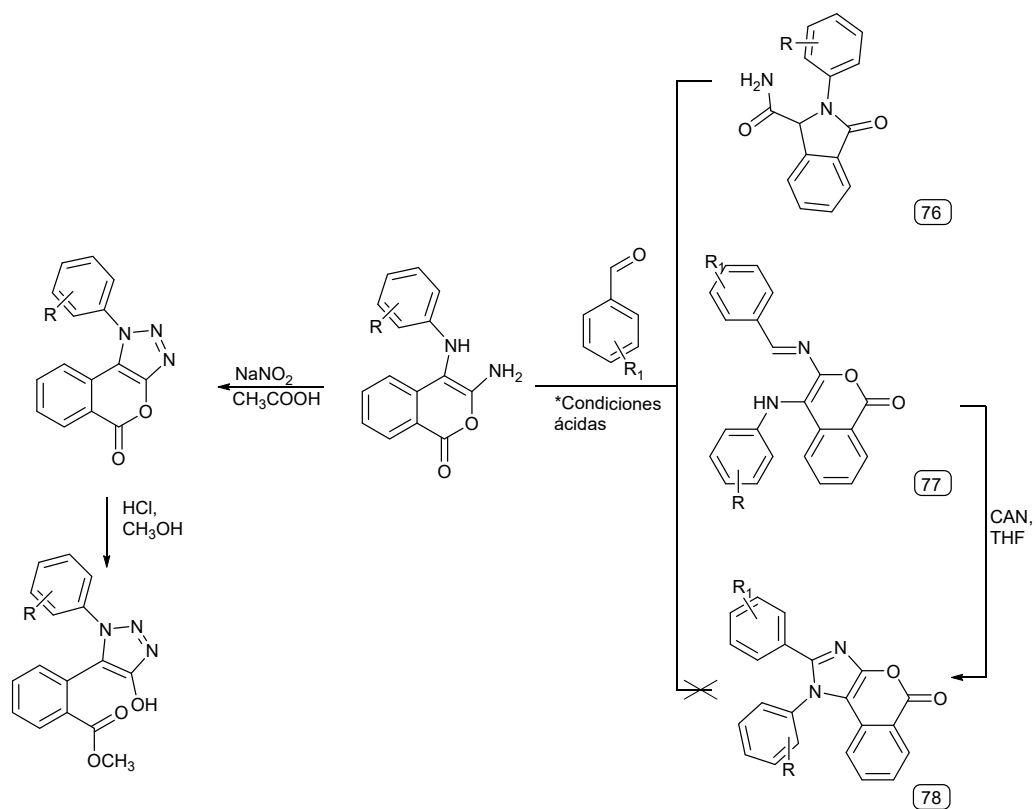
Figura 3.13 Producto de la apertura de la isocumarina en medio ácido fuerte.

Si bien, en este tipo de estructuras no se conserva el sistema isocumarínico, sí se da origen a estructuras novedosas, con mayor riqueza conformacional al ser menos rígidas que los sistemas híbridos, y también provee un espacio hacia la generación de nuevas estructuras, las cuales pueden variar según el tipo de amina que se emplee para la generación de la isocumarina de partida, por modificaciones sobre el OH del triazol que ahora actúa como espaciador entre los dos grupos fenilo, así como también nuevas estructuras obtenidas al modificar el grupo éster.

### **3.3. Resumen de artículos publicados de sistemas híbridos tipo isocumarina-azol**

En el artículo "Synthesis of new 1,2-diaryl[2]benzopyrano[3,4-*d*]imidazol-5(1*H*)-one derivatives mediated by ceric ammonium nitrate", se describe una ruta para la síntesis de sistemas híbridos isocumarina-imidazol, iniciando con la obtención de derivados de 3,4-diaminoisocumarina mediante una estrategia reportada en la bibliografía. Estos derivados se emplearon para establecer las condiciones de reacción con aldehídos aromáticos, buscando la ciclación que conduzca a los imidazoles deseados. Las condiciones iniciales llevaron a mezclas complejas, apertura de la isocumarina o formación de bases de Schiff. Debido a la inestabilidad de las diaminoisocumarinas, se optó por una secuencia de dos pasos: aislamiento de la base de Schiff y luego ciclización, destacando que el uso de CAN como promotor de la reacción ofreció los mejores resultados. Se logró sintetizar 10 nuevos derivados, demostrando la versatilidad del procedimiento.

En la publicación "Conversion of 3-amino-4-arylamino-1*H*-isochromen-1-ones to 1-arylisochromeno[3,4-*d*][1,2,3]triazol-5(1*H*)-ones: synthesis, spectroscopic characterization and the structures of four products and one ring-opened derivative", se presenta una síntesis eficiente de 1-arilisocromeno[3,4-*d*][1,2,3]triazol-5(1*H*)-onas mediante diazotización en solución débilmente ácida a partir de 3,4-diaminoisocumarinas. Se informan las caracterizaciones espectroscópicas y las estructuras cristalinas de cuatro de estos sistemas híbridos. Se observa que las moléculas se organizan en láminas a través de enlaces de hidrógeno en 1-fenilisocromeno[3,4-*d*][1,2,3]triazol-5(1*H*)-ona, mientras que 1-(2-metilfenil)isocromeno[3,4-*d*][1,2,3]triazol-5(1*H*)ona y 1-(3-clorofenil)isocromeno[3,4-*d*][1,2,3]triazol-5(1*H*)-ona forman cadenas. En 1-(4-clorofenil)isocromeno[3,4-*d*][1,2,3]triazol-5(1*H*)-ona, una combinación de enlaces de hidrógeno enlaza las moléculas en láminas. Además, se evidencia la conversión de 1-(2-metilfenil)isocromeno[3,4-*d*][1,2,3]triazol-5(1*H*)ona a un producto de transesterificación mediante tratamiento con ácido fuerte en metanol, generando la apertura del anillo isocumarínico y corroborando la labilidad de ese sistema.



Solvente	Catalizador	Producto
AcOH <sup>a</sup>	AcOH	77
AcOEt <sup>b</sup>	I <sub>2</sub>	76
THF <sup>b</sup>	PTSA	76 - 77
AcOEt <sup>a</sup>	PTSA	76 - 77
ClCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> Cl <sup>b</sup>	BF <sub>3</sub> •OEt <sub>2</sub>	Mezcla compleja
AcOEt <sup>b</sup>	BF <sub>3</sub> •OEt <sub>2</sub>	Mezcla compleja

<sup>a</sup> 50°C, <sup>b</sup> Temperatura ambiente

Esquema 3.8 Esquema general de resultados publicados referentes a los híbridos isocumarina-azol.

*Aquí irían*

*Artículo 4*

*Artículo 5*



# CONCLUSIONES



## Conclusiones

- A partir del reactivo comercial 2-amino-4,6-dimetoxipirimidina, se generaron 6 sistemas que permiten su diversificación hacia nuevas moléculas que incluyan heterociclos nitrogenados en su estructura. La obtención de estos precursores se llevó a cabo mediante reacciones de nitrosación, aminólisis con o-fenildiamina y posteriores adiciones nucleofílicas y reducciones.
- Se desarrolló la síntesis de los sistemas híbridos pirimido-imidazol a partir de los correspondientes precursores mediante estrategias sintéticas que incluyeron ciclaciones con aldehídos y CAN como agente oxidante, así como ciclaciones que involucraron procesos de oxido-reducción intramolecular utilizando TFA como catalizador.
- Los sistemas híbridos mencionados en el ítem anterior son susceptibles de posteriores modificaciones, lo que permitió establecer dos metodologías que conducen a la debencilación (uso de  $I_2$  y CAN), generando así grupos amino libres y abriendo la puerta a una variedad de modificaciones. En este caso, se ejemplificaron dos tipos de reacción sobre los sistemas debencilados: condensación con aldehídos y formación de amidas.
- Por medio de herramientas teórico-computacionales, se estudió la capacidad de los sistemas híbridos isocumarina-azol para actuar como posibles ligandos frente a dianas moleculares relacionadas con la proliferación celular. Se encontró que los núcleos de azol e isocumarina pueden proporcionar interacciones o contactos duraderos que mantienen al ligando en el sitio de unión, generando complejos estables durante la trayectoria evaluada.
- Basados en los resultados computacionales, se diseñó una ruta sintética para la generación de sistemas híbridos de tipo isocumarina-imidazol e isocumarina-triazol. La ruta involucró la generación de isocumarinas que posteriormente fueron cicladas por medio de metodologías suaves que no promueven la apertura de la lactona, conduciendo la reacción hacia la formación de los correspondientes azoles.
- Todos los compuestos fueron completamente elucidados estructuralmente mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas, corroborando la estructura propuesta para cada uno de ellos. Algunos compuestos fueron cristalizados y difractados, permitiendo una confirmación inequívoca de su estructura.
- De los compuestos sintetizados, cinco fueron seleccionados por el NCI para estudios de actividad biológica sobre líneas celulares cancerígenas; sin embargo, ninguno cumplió con los estándares mínimos requeridos que permiten continuar con su evaluación.



# BIBLIOGRAFÍA



## Bibliografía