



Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Farmacia y Bioquímica  
Departamento de Química Orgánica

# Diseño racional, síntesis y evaluación biológica de heterociclos nitrogenados con actividad antiparasitaria

**Farm. Juan José Casal**

Directora: Prof. Dra. Ana María Bruno  
Directora adjunta: Dra. Mariela Bollini

2015



# Capítulo I

---

## La enfermedad de Chagas

### Introducción

*"Ninguna persona es una isla;  
la muerte de cualquiera me afecta porque me encuentro unido a toda la humanidad;  
Por eso, nunca preguntes por quién doblan las campanas; doblan por ti."*

*John Donne*

## Enfermedad de Chagas. Generalidades

La enfermedad de Chagas es una de las parasitosis más importantes de Latinoamérica representando uno de los principales problemas económicos y sanitarios de la región. Se estima que existen actualmente 6 a 8 millones de personas infectadas y que otros 65 millones de personas viven en riesgo permanente de infección<sup>1</sup>. El agente etiológico de la enfermedad es el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*)<sup>2</sup>. Este parásito es digenético, es decir, posee dos hospedadores naturales: un insecto hematófago, que funciona como vector y un mamífero, en el cual se desarrolla la enfermedad. Los insectos hematófagos transmisores de *T. cruzi* pertenecen a tres géneros *Triatoma*, *Panstrongylus* y *Rhodnius*, todos ellos incluidos en la familia Reduviidae. Existen 114 especies de triatominos en América<sup>3</sup>. Sólo nueve han sido encontradas en territorio nacional, entre los que se pueden citar: *Panstrongylus megistus*, *Panstrongylus geniculatus*, *Triatoma guasayana*, *Triatoma delpontei*, *Triatoma sordida*, *Triatoma platensis*, *Triatoma garciabesi*, *Triatoma rubrovaria*, y el más importante *Triatoma infestans*, (Figura 1) llamados "Vinchuca" un vocablo derivado de la palabra quechua 'huychucuy' cuyo significado, 'tirarse o descolgarse', haría referencia a su hábito de dejarse caer durante la noche para alimentarse de la sangre de animales y humanos.



**Figura 1. *Triatoma infestans* (Vinchuca)**

La enfermedad de Chagas se encuentra principalmente en América Latina, pero en las últimas décadas se ha observado con mayor frecuencia en los Estados Unidos, Canadá,

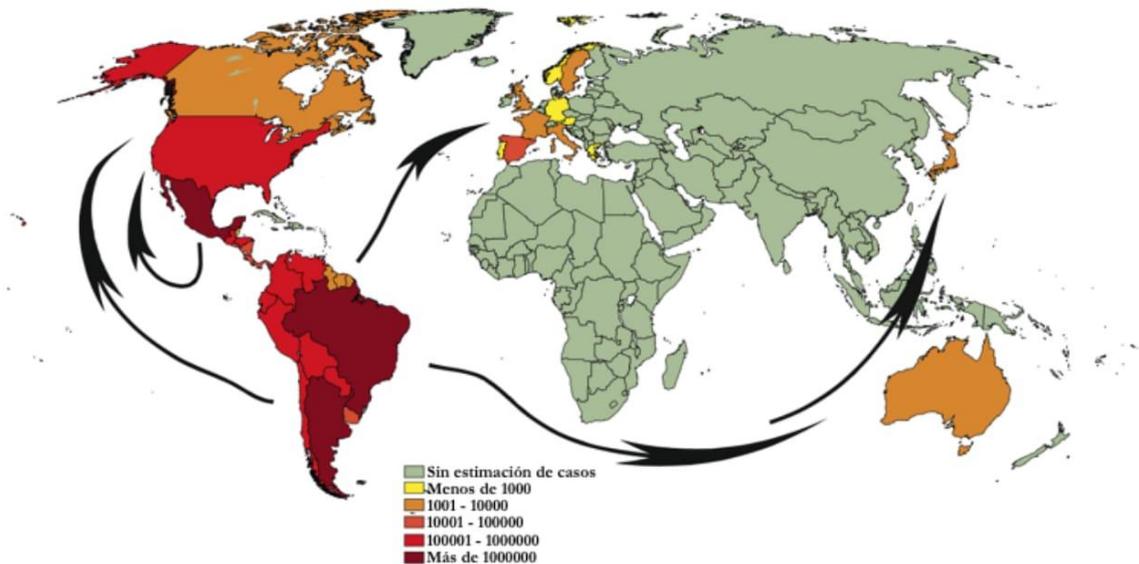
---

<sup>1</sup> World Health Organization <http://www.who.int/>

<sup>2</sup> El-Sayed, N. M. "The Genome Sequence of *Trypanosoma Cruzi*, Etiologic Agent of Chagas Disease." *Science* 309, no. 5733 (July 15, 2005): 409–15. doi:10.1126/science.1112631.

<sup>3</sup> Vazquez-Prokopec, Gonzalo M., Leonardo A. Ceballos, Uriel Kitron, and Ricardo E. Gürtler. "Active Dispersal of Natural Populations of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in Rural Northwestern Argentina." *Journal of Medical Entomology* 41, no. 4 (July 1, 2004): 614–21. doi:10.1603/0022-2585-41.4.614.

muchos países europeos y algunos países del Pacífico Occidental. Esto obedece sobre todo a la movilidad de la población entre América Latina y el resto del mundo (Figura 2).



**Figura 2. Distribución mundial de casos de enfermedad de Chagas y corrientes migratorias (flechas)**

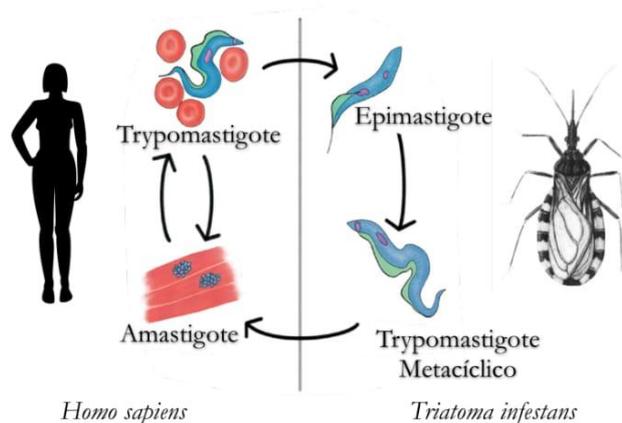
En zonas endémicas, la transmisión vectorial es la principal vía de contagio de la enfermedad. Con menor frecuencia la infección también se puede adquirir mediante transfusión de sangre, transmisión congénita (madre infectada a su hijo), en el trasplante de órganos donados por personas infectadas y los accidentes de laboratorio. Otras formas de contagio han tomado importancia; una de ellas es la transmisión por vía oral debido al consumo de alimentos contaminados con heces de triatomíneos, de carne o sangre de mamíferos infectados e ingeridos en forma parcialmente cruda y de secreción anal u orina de marsupiales infectados.

#### *Biología y ciclo de vida de T. cruzi.*

*T. cruzi* se caracteriza por la presencia de un flagelo y de una única mitocondria conteniendo múltiples copias de ADN circular concatenadas (kinetoplasto). Taxonómicamente se ubica dentro del Phylum Sarcomastigophora, clase Zoomastigophora, orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae, sección Estercoraria del género Trypanosoma. El parásito presenta cambios morfológicos y ultra-estructurales complejos que le permiten adaptarse a los distintos ambientes en los que alterna su ciclo de vida. Así, pueden identificarse tres estadios parasitarios (Figura 3):

- *Estadio epimastigote:* Presente en el tracto digestivo del insecto vector, replicativo y de morfología elongada (20-40  $\mu\text{m}$ ). No es infeccioso para el hospedador mamífero.

- *Estadio amastigote*: De localización intracelular en el hospedador mamífero; de menor tamaño que el epimastigote (2-4  $\mu\text{m}$ ), replicativo, esférico u ovalado y con flagelo inconspicuo.
- *Estadio tripomastigote*: Presente en fluidos extracelulares del mamífero hospedador (tripomastigotes sanguíneos) y en la ampolla rectal del vector (tripomastigotes metacíclicos). El tripomastigote es el único estadio no replicativo. Presenta morfología elongada y se caracteriza por un largo flagelo que emerge cercano al núcleo celular y permanece mayormente unido a la membrana plasmática.



**Figura 3. Estadios parasitarios del *Trypanosoma cruzi*. Modificado de Atwood (2005)<sup>4</sup>**

En el curso de las infecciones naturales, los tripomastigotes metacíclicos presentes en las deyecciones del insecto invaden al hospedador a través de la mucosa o de lesiones en la piel. Los tripomastigotes metacíclicos invaden rápidamente distintos tipos celulares del hospedador escapando del fagolisosoma en que penetran hacia el citoplasma<sup>5</sup>. Una vez en el interior de la célula se diferencian en amastigotes<sup>6</sup> los cuales, luego de varias rondas de replicación, pasan al estadio de tripomastigotes sanguíneos. Este estadio, incapaz de dividirse, es liberado al lisarse la célula invadida y llega, de esta manera, a la sangre donde circula por un período de tiempo variable antes de invadir otras células o ser ingerido por el insecto vector. Una vez en el intestino medio del insecto, las formas ingeridas se diferencian

<sup>4</sup> Atwood, J. A. "The *Trypanosoma Cruzii* Proteome." *Science* 309, no. 5733 (July 15, 2005): 473–76. doi:10.1126/science.1110289.

<sup>5</sup> Andrews, Norma W., Charles K. Abrams, Stephen L. Slatin, and Gareth Griffiths. "A *T. Cruzii*-Secreted Protein Immunologically Related to the Complement Component C9: Evidence for Membrane Pore-Forming Activity at Low pH." *Cell* 61, no. 7 (June 1990): 1277–87. doi:10.1016/0092-8674(90)90692-8.

<sup>6</sup> Fernandes, Maria Cecilia, and Norma W. Andrews. "Host Cell Invasion by *Trypanosoma Cruzii*: A Unique Strategy That Promotes Persistence." *FEMS Microbiology Reviews* 36, no. 3 (May 2012): 734–47. doi:10.1111/j.1574-6976.2012.00333.x.

al estadio epimastigote el cual se divide activamente por fisión binaria. Al migrar a la ampolla rectal del vector, los epimastigotes se adhieren al intestino como condición indispensable para diferenciarse al siguiente estadio llamado tripomastigote metacíclico, forma eliminada en las deyecciones del insecto continuando, de esta manera, el ciclo<sup>7</sup>.

### *Etapas de la enfermedad*

Una vez adquirida, la infección persiste durante toda la vida del individuo afectado. Los niveles de parasitemia permiten diferenciar dos etapas durante el curso de la enfermedad: la fase aguda y la fase crónica<sup>8</sup>. La fase aguda tiene lugar en las primeras semanas o los primeros meses de la infección. Generalmente pasa desapercibida porque no muestra síntomas o exhibe sólo signos y síntomas leves que no son exclusivos de la enfermedad de Chagas. Los síntomas que nota el paciente pueden incluir fiebre, fatiga, dolor en cuerpo, dolor de cabeza, sarpullido, pérdida de apetito, diarrea y vómito. Los signos detectados en la exploración física pueden incluir agrandamiento leve del hígado o el bazo, inflamación de los ganglios e inflamación local (un chagoma), en el lugar por donde el parásito entró en el cuerpo. El marcador más reconocido de la enfermedad de Chagas en su fase aguda se conoce como signo de Romaña (Figura 4 A-B), el cual incluye inflamación del párpado en el lado de la cara cerca de la herida dejada por la picadura o donde fueron depositadas las heces del insecto, las cuales pueden haber entrado al ojo por accidente si el paciente se restregó la cara<sup>9</sup>.

---

<sup>7</sup> Spina-França, A. "American Trypanosomiasis (Chagas Disease)." In *Encyclopedia of the Neurological Sciences*, 134–35. Elsevier, 2014. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123851574003900>.

<sup>8</sup> [http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/Nota\\_descriptiva\\_Nº340](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/Nota_descriptiva_Nº340). Marzo de 2014

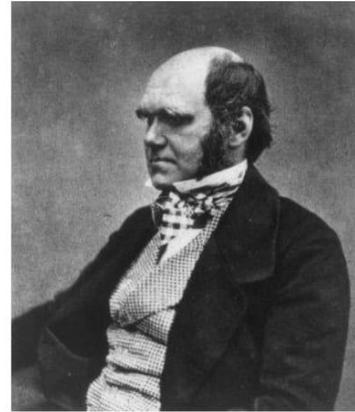
<sup>9</sup>Centers for Disease Control and Prevention. Centers for Disease Control and Prevention. Web. 27 Nov. 2014. <<http://www.cdc.gov/parasites/chagas/es/enfermedad.html>>.



A)



B)



C)

**Figura 4. A). Berenice, la primer paciente de Carlos Chagas; B. Niña de 14 años, primer caso reportado de la enfermedad en Bolivia; C. Charles Darwin describió a la Benchuca (vinchuca) y muchos autores sospechan que estaba infectado con el parásito.**

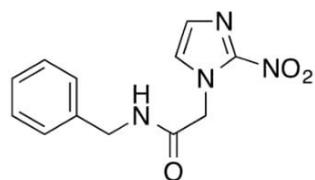
Aún si los síntomas aparecen durante la fase aguda, por lo general, desaparecen por sí solos, en unas cuantas semanas o meses. Durante la fase crónica, la infección puede permanecer asintomática durante décadas o incluso de por vida. Sin embargo, algunas personas presentan: complicaciones cardíacas, las cuales pueden incluir agrandamiento del corazón (miocardiopatía), insuficiencia cardíaca, alteración del ritmo o frecuencia cardíaca y paro cardíaco (muerte súbita); o complicaciones intestinales, que pueden incluir un agrandamiento del esófago (megaesófago) o del colon (megacolon) y pueden causar dificultades para comer o defecar. El riesgo promedio de presentar una o más de estas complicaciones en el transcurso de la vida es de aproximadamente 30%<sup>10</sup>.

#### *Perspectivas quimioterápicas en la enfermedad de Chagas*

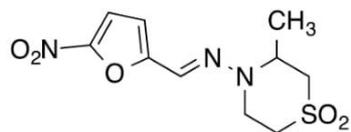
Habiendo pasado más de un siglo desde el descubrimiento de la enfermedad por Carlos Chagas, aún persisten desafíos importantes tales como la falta de inmunoprolifaxis junto con una terapia deficiente basada en nifurtimox (Bayer 2502) y benznidazol (RO 7-1051) (Figura 5).

---

<sup>10</sup> Centers for Disease Control and Prevention. Centers for Disease Control and Prevention. Web. 27 Nov. 2014. <<http://www.cdc.gov/parasites/chagas/es/informativa/detallada.html>>.



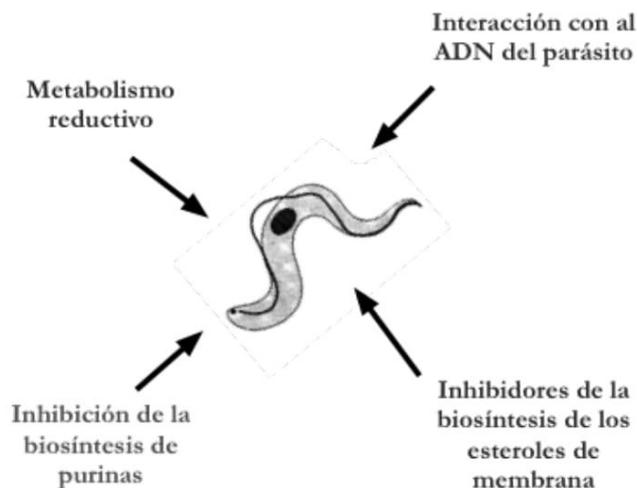
Benznidazol



Nifurtimox

**Figura 5. Estructuras de benznidazol y nifurtimox.**

Ambos compuestos fueron desarrollados a través de treinta años en forma empírica y presentan resultados variables dependiendo de la fase de la enfermedad de Chagas, la dosis y la duración del tratamiento, así como la región endémica y la edad del paciente, y a todo esto se suman los efectos adversos derivados del tratamiento. Además, existen diferencias en la susceptibilidad y resistencia natural de diferentes cepas de *T. cruzi*. Así, la limitación del tratamiento actual justifica la búsqueda de otras drogas que puedan reemplazar el nifurtimox y el benznidazol o ser usadas en caso de falla terapéutica con las mismas. Es necesario, por lo tanto, estudiar los diferentes blancos de acción de las drogas potenciales a diseñar (Figura 6).



**Figura 6. Blancos terapéuticos en el *Trypanosoma cruzi*.**

*Metabolismo reductivo*: compuestos que sufren bio-reducción "no selectiva" causando daño al ADN.

Las drogas comerciales que actúan mediante mecanismos *redox* son el nifurtimox y benznidazol. El nifurtimox, actúa por reducción intracelular catalizada por NADPH-citocromo P-450 reductasa que actúa sobre el grupo nitro generando un nitroanión radical intermediario ( $R-NO_2^-$ ). Este radical sufre un proceso cíclico *redox* con el oxígeno molecular,

que es parcialmente reducido regenerando a la droga. El anión superóxido por acción de la superóxido dismutasa, rinde oxígeno y peróxido de hidrógeno, que en presencia de  $Fe^{3+}$ , producen el radical hidroxilo ( $OH\cdot$ ). Estas especies reactivas del oxígeno se unen a lípidos, proteínas y ADN llevando a un daño irreversible para el parásito, produciendo la muerte del mismo.

Estudios realizados empleando técnicas de Electron Resonance Paramagnetic (EPR) sobre células infectadas con *T. cruzi* confirman que el benznidazol sufre la reducción de su grupo nitro para dar lugar a la formación de radicales libres del oxígeno. Sin embargo, estudios realizados sobre homogenatos de *T. cruzi* tratados con benznidazol, sugieren que el mecanismo de esta droga no depende de la generación de metabolitos de oxígeno reactivos. También se observó que el benznidazol lleva a un incremento de la fagocitosis por un aumento del TNF- $\gamma$ , llevando a la muerte del parásito. El *T. cruzi* posee un deficiente mecanismo de detoxificación respecto al sistema de defensa del huésped. Esto resulta en un importante blanco terapéutico selectivo para los tripanosomátidos. En la Tabla 1 se muestran las diferencias de los agentes detoxificantes no enzimáticos y enzimáticos del parásito respecto al huésped.

**Tabla 1. Agentes antioxidantes en mamíferos y *T. cruzi***

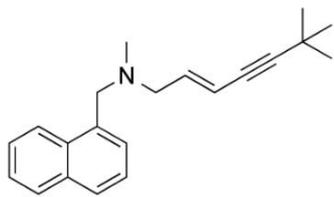
<b>Mamífero</b>		<b><i>T. cruzi</i></b>	
<b>Agentes no enzimáticos</b>	<b>Agentes enzimáticos</b>	<b>Agentes no enzimáticos</b>	<b>Agentes enzimáticos</b>
GSH (Glutación)	SOD (Superóxido dismutasa)	T[SH] <sub>2</sub> (Tripanotiona)	SOD- Fe
Tocoferol	Catalasa	---	Tripanotiona reductasa/oxidasa.
Ac. Ascórbico	Ascobato peroxidasa	---	---
Ubiquinona	Glutación peroxidasa/reductasa	---	---

#### *Drogas que inhiben el metabolismo de la biosíntesis de esteroides de membrana*

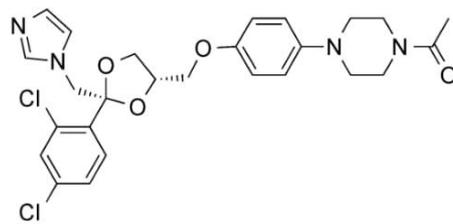
La ruta biosintética de esteroides de membrana es un blanco prometedor para nuevos agentes antiproliferativos contra eucariotas inferiores tales como hongos, levaduras y parásitos. Al igual que los hongos, el *T. cruzi* posee un estricto requerimiento de ergosterol y esteroides endógenos análogos para el crecimiento, la viabilidad y la proliferación celular,

sin la posibilidad de utilizar el abundante colesterol presente en los mamíferos que los hospedan<sup>11</sup>.

El ketoconazol (Figura 7.B) es capaz de erradicar al parásito de *T. cruzi* en animales de experimentación. También se desarrolló una nueva clase de agentes antimicóticos derivados de alilaminas, siendo el modelo principal el terbinafine (Figura 7.A), ésta droga actúa bloqueando la biosíntesis de esteroides de membrana, inhibiendo la óxido escualeno sintasa tanto *in vivo* como *in vitro*<sup>12a,b</sup>.



A) Terbinafine



B) Ketoconazol

**Figura 7. Inhibidores de la síntesis de esteroides de membrana.**

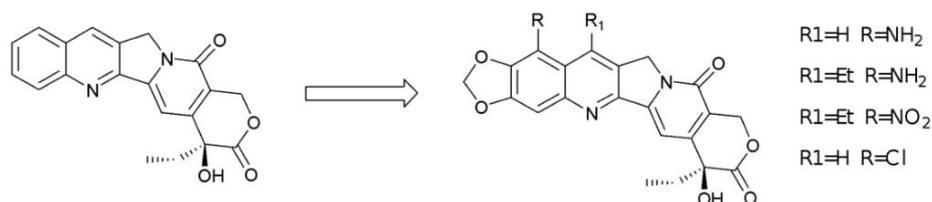
#### *Drogas que inhiben a las enzimas ADN topoisomerasas*

Las enzimas ADN topoisomerasas catalizan cambios en la topología del ADN durante los procesos de replicación, transcripción, recombinación y reparación del genoma, existiendo dos tipos de topoisomerasas I y II. Su identificación como dianas farmacológicas se basa en los resultados obtenidos en los ensayos clínicos llevados a cabo con los derivados de la camptotecina en la terapia antitumoral. Las importantes diferencias estructurales entre las ADN topoisomerasas de tipo I de tripanosomas con respecto a sus homólogos de mamífero

<sup>11</sup> Nee Bandyopadhyay, Sumi Mukhopadhyay, and Chitra Mandal. "Targeting Glycoproteins or Glycolipids and Their Metabolic Pathways for Antiparasite Therapy." In *Drug Targets in Kinetoplastid Parasites*, edited by Hemanta K. Majumder, 625:87–102. New York, NY: Springer New York, 2008. [http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-77570-8\\_8](http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-77570-8_8).

<sup>12</sup> (a) Urbina, J.A.; Vivas, J.; Visual, G.; Contreras, L.M. "Modification of the sterol composition of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* epimastigotes by  $\Delta$  24(25) -sterol methyl transferase inhibitors and their combinations with ketoconazole." *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1995, 73, 199. (b) Liendo, A.; Visual, G.; Piras, M.M.; Piras, R.; Urbina, J.A. "Sterol composition and biosynthesis in *Trypanosoma cruzi* amastigotes." *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1999, 104, 81.

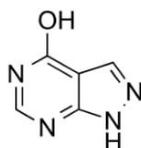
ha abierto un nuevo campo de investigación para poder diseñar nuevos fármacos dirigidos específicamente a su inhibición (Figura 8)<sup>13</sup>.



**Figura 8. Camptotecina y derivados como inhibidores de las topoisomerasas.**

### *Drogas que inhiben la biosíntesis de nucleótidos de purinas*

En humanos y en otros mamíferos, los nucleótidos de purina se obtienen por síntesis *de novo* (aminoácidos, CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>) y por vía de recaptación. El *T. cruzi* es incapaz de sintetizar *de novo* purinas por lo que son dependientes de la vía de captación de purinas exógenos para la síntesis de nucleótidos, constituyendo, de esta manera, un blanco atractivo para el desarrollo de agentes tripanomicidas<sup>14</sup>.



**Figura 9. Estructura del alopurinol**

El alopurinol (Figura 9) en humanos es empleado para el tratamiento de la gota. En los tripanosomátidos el alopurinol actúa como un análogo de purina y es incorporado por el parásito, que resulta en pasos posteriores fosforilado e incorporado dentro del ARN del parásito, causando la inhibición de síntesis proteica o la síntesis de proteínas no funcionales<sup>15</sup>.

<sup>13</sup> Das, Aditi, Arindam Dasgupta, Tanushri Sengupta, and Hemanta K Majumder. "Topoisomerases of Kinetoplastid Parasites as Potential Chemotherapeutic Targets." *Trends in Parasitology* 20, no. 8 (August 2004): 381–87. doi:10.1016/j.pt.2004.06.005.

<sup>14</sup> Berens, Randolph L., J. Joseph Marr, Stephen W. LaFon, and Donald J. Nelson. "Purine Metabolism in *Trypanosoma Cruzi*." *Molecular and Biochemical Parasitology* 3, no. 3 (July 1981): 187–96. doi:10.1016/0166-6851(81)90049-9.

<sup>15</sup> De Souza, E.M., P.B. da Silva, A.S.G. Nefertiti, M.A. Ismail, R.K. Arafa, B. Tao, C.K. Nixon-Smith, D.W. Boykin, and M.N.C. Soeiro. "Trypanocidal Activity and Selectivity in Vitro of Aromatic Amidine Compounds upon Bloodstream and Intracellular Forms of *Trypanosoma Cruzi*." *Experimental Parasitology* 127, no. 2 (February 2011): 429–35. doi:10.1016/j.exppara.2010.10.010.

## Resumen

Existen muchos métodos para seleccionar y/o identificar blancos de acción para drogas novedosas. Estos métodos incluyen la biología de sistemas complejos y análisis en redes neuronales, los cuales integran la bioquímica y la biología celular con la genética, así como con la bioinformática y la biología computacional para generar un modelo que considere la totalidad de la biología del parásito.

La elección de un buen blanco de acción otorga la oportunidad de desarrollar drogas que resulten más seguras y a menor costo. En la actualidad el proceso para predecir y validar los blancos de acción farmacológica es mucho más rápido que en el pasado. Todas estas ventajas se deben a los avances en la predicción informática de los blancos, combinado con la finalización del codificado del genoma de los patógenos tripanosomátidos. Esto ha incurrido en la existencia de potenciales blancos en los tripanosomátidos que ya han sido validados. Se puede agregar, además, que ya existen drogas capaces de inhibir muchas de estas enzimas las cuales pueden servir como esqueletos para el desarrollo y síntesis de agentes antiparasitarios más eficientes y potentes. Sin embargo, a pesar de estos avances, parece existir poco interés en desarrollar nuevas drogas para tratar las enfermedades abandonadas producidas por los parásitos tripanosomátidos. Resulta evidente que no puede atribuirse esto a la falta de conocimientos científicos sino que es más plausible que se atribuya a la poca ganancia potencial que tendrían las compañías farmacéuticas. Así, para combatir estas devastadoras enfermedades, es necesaria una investigación responsable, prometedora y de bajo costo que conlleve al interés por parte de los gobiernos de las regiones afectadas.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

1. Diseñar, sintetizar y evaluar compuestos con actividad anti-tripanosomiasis.
2. Diseñar, sintetizar y evaluar compuestos para tratamiento alternativo de la enfermedad de Chagas.

### Objetivos específicos

1. Establecer un modelo de inhibición enzimática de la Tripanotiona reductasa.
2. Estudiar la unión enzima-ligando con técnicas de acoplamiento molecular.
3. Aplicar las técnicas de acoplamiento molecular, cribado virtual y diseño *de novo* al desarrollo racional de fármacos.
4. Evaluar el modelo de inhibición de la Tripanotiona reductasa.
5. Desarrollar la aplicación del núcleo ftalazínico como tripanomicida.
6. Establecer un modelo de tratamiento sintomático de la enfermedad de Chagas.



# Capítulo II

---

## Diseño racional de fármacos

*MIRANDA.—¡Oh, maravilla! ¡Cuántos seres admirables hay aquí!  
¡Qué bella humanidad!  
¡Ah, gran mundo nuevo que tiene tales gentes!*  
*PRÓSPERO.—Es nuevo para ti.*

*Escena I. Acto V. La Tempestad.  
William Shakespeare*



## Diseño de fármacos asistido por computadoras

En la actualidad existen numerosos métodos experimentales para determinar la estructura molecular de una sustancia. Las espectroscopías ultravioleta (UV), de resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$  así como las técnicas de difracción de rayos X son las más comunes<sup>16</sup>. No obstante a ello, el desarrollo alcanzado por la quimiinformática ha propiciado la generación de sistemas que permiten calcular la geometría y la energía molecular. Estos sistemas son capaces de generar datos con una amplia aplicación en la investigación experimental, tanto para la interpretación de los resultados obtenidos y la planificación de futuros experimentos, así como para obtener información no asequible empíricamente. Existen diferentes tipos de métodos de cálculos teóricos, siendo los más comunes los métodos *ab initio*, los métodos semiempíricos y los métodos de mecánica molecular (MM). La elección de uno u otro método depende fundamentalmente del tamaño de la molécula y del tiempo requerido o disponible para hacer los cálculos<sup>17</sup>. En el caso de los métodos de MM se requiere de menos tiempo de cálculo con respecto a los mecánico-cuánticos, y reproducen los valores experimentales referentes a geometrías y energías con buena precisión. Su uso en la actualidad está destinado al campo de las macromoléculas, en las cuales los métodos de cálculos mecánico-cuánticos se tornan prohibitivos en gasto computacional<sup>18,19</sup>.

### *Búsqueda del farmacóforo*

El *farmacóforo* no es más que el conjunto de grupos químicos, unidos entre sí o no, que tienen en común todas las moléculas activas sobre un mismo receptor, y que son esenciales para el reconocimiento por el mismo<sup>20</sup>. En la actualidad existen dos formas fundamentales de obtener el farmacóforo:

1. Cuando no se conoce la estructura del receptor

---

<sup>16</sup> Bader, Richard F. W. "A Quantum Theory of Molecular Structure and Its Applications." *Chemical Reviews* 91, no. 5 (July 1991): 893–928. doi:10.1021/cr00005a013.

<sup>17</sup> Mezey, Paul G. "Computer Aided Drug Design: Some Fundamental Aspects." *Journal of Molecular Modeling* 6, no. 2 (February 28, 2000): 150–57. doi:10.1007/PL00010725.

<sup>18</sup> Finn, P. W., and L. E. Kavradi. "Computational Approaches to Drug Design." *Algorithmica* 25, no. 2–3 (June 1999): 347–71. doi:10.1007/PL00008282.

<sup>19</sup> Arora, Sanjeev, Carsten Lund, Rajeev Motwani, Madhu Sudan, and Mario Szegedy. "Proof Verification and the Hardness of Approximation Problems." *Journal of the ACM* 45, no. 3 (May 1, 1998): 501–55. doi:10.1145/278298.278306.

<sup>20</sup> Gupta, Nirzari, Nikum Sitwala, and Keyur Patel. "Pharmacophore Modelling, Validation, 3D Virtual Screening, Docking, Design and in Silico ADMET Simulation Study of Histone Deacetylase Class-1 Inhibitors." *Medicinal Chemistry Research* 23, no. 11 (November 2014): 4853–64. doi:10.1007/s00044-014-1057-2.

## 2. Cuando se conoce la estructura del receptor

### 1. Obtención del farmacóforo cuando no se conoce la estructura del receptor. Diseño basado en el ligando (Ligand Based Design, LBD)

En este caso el trabajo está destinado a la búsqueda de las estructuras químicas de múltiples ligandos que se unan a un mismo receptor de naturaleza desconocida. Para esto, se utilizan una serie de programas que permiten la visualización tridimensional (3D) de las estructuras y, por superposición de todas las moléculas se puedan reconocer aquellas regiones de las estructuras que son indispensables para la actividad, y aquellas pueden ser sustituidas sin afectar la actividad. Este tipo de estudio necesita de un análisis conformacional riguroso de cada una de las moléculas a analizar, pues puede ser que para un determinado fármaco, la conformación activa no sea la más estable termodinámicamente, debido a que la energía libre de asociación supera generalmente la energía necesaria para que el ligando sufra un cambio conformacional<sup>21</sup>. Las limitaciones fundamentales de este tipo de estudio estriban en que no se discriminan las posibles uniones alternativas que puedan ocurrir entre el ligando y el receptor, o incluso la unión en diferentes sitios del propio receptor (sitios alostéricos, ortostéricos, desplazamiento de cofactores o solvente, etc.). Además se ignoran las afinidades relativas perdiendo información sobre la magnitud de la interacción ligando-receptor.

### 2. Obtención del farmacóforo cuando se conoce la estructura del receptor. Diseño basado en la estructura (Structure Based Design, SBD)

El conocimiento de la estructura del receptor puede simplificar el estudio de identificación del farmacóforo. No obstante, la tarea de determinación de la estructura de una macromolécula involucra cierta dificultad. Los primeros en describir una estructura y una conformación detallada para una estructura celular fueron los famosos investigadores Rosalind Franklin, James Watson, Francis Crick y Maurice Wilkins en 1953, con sus trabajos sobre el ADN<sup>22</sup>. En la actualidad existen bancos de datos de coordenadas atómicas de macromoléculas obtenidas a partir de cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear (RMN). Se ha logrado además, la cristalización de la estructuras de receptores en su unión con el ligando, de esta forma, es posible conocer cuáles son los grupos funcionales

---

<sup>21</sup> Yang, Zheng, Keren Lasker, Dina Schneidman-Duhovny, Ben Webb, Conrad C. Huang, Eric F. Pettersen, Thomas D. Goddard, Elaine C. Meng, Andrej Sali, and Thomas E. Ferrin. "UCSF Chimera, MODELLER, and IMP: An Integrated Modeling System." *Journal of Structural Biology* 179, no. 3 (September 2012): 269–78. doi:10.1016/j.jsb.2011.09.006.

<sup>22</sup> Watson, J. D., and F. H. C. Crick. "Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid." *Nature* 171, no. 4356 (April 25, 1953): 737–38. doi:10.1038/171737a0.

y/o fragmentos del ligando que interactúan directamente con el receptor, y cuáles son sus contrapartes en la proteína<sup>23</sup>. Con estos resultados es posible conocer la naturaleza de la unión, la flexibilidad del receptor, y las interacciones que mantienen al ligando unido al mismo, pudiendo estimarse por lo tanto la energía de estabilización de este complejo, y además el aporte discriminado de cada una de las regiones estructurales del ligando. Esto permite, además, la inserción de estructuras diseñadas intencionalmente para su acoplamiento al receptor<sup>24</sup>.

El conocimiento de la estructura de los receptores farmacológicos genera la posibilidad de estudiar la naturaleza de otros receptores análogos a él y no conocidas -en su estructura tridimensional- hasta el momento. Esta técnica se conoce como **modelado de receptores por homología**<sup>25</sup>.

El costo económico alto, tanto de los experimentos de unión receptor-ligando como de los ensayos farmacológicos, ha conducido a la utilización de aproximaciones virtuales. La disponibilidad de estructuras 3D de proteínas combinado con quimiotecas de compuestos<sup>26,27</sup> permiten llevar a cabo ensayos virtuales alternativos a los ensayos *in vivo* e *in vitro*. A este tipo de ensayos se les conoce como ensayos *in silico*.

#### *Consideraciones en la elección del receptor*

La elección del blanco debe hacerse en función de consideraciones biológicas. Para llevar a cabo un SBD, el receptor ideal estará involucrado en la patogenia una enfermedad y deberá unirse a uno o más ligandos para cumplir su función biológica. Además deberá poseer un sitio de unión perfectamente definido. Si la enfermedad está causada por una disfunción de una proteína (receptores acoplados a proteína G, canales iónicos, enzimas, etc) la finalidad del diseño consistirá en el desarrollo de sustancias que modulen la función

---

<sup>23</sup> Dutta, Shuchismita, and Helen M. Berman. "Large Macromolecular Complexes in the Protein Data Bank: A Status Report." *Structure* 13, no. 3 (March 2005): 381–88. doi:10.1016/j.str.2005.01.008.

<sup>24</sup> Ballester, Pedro J., Paul W. Finn, and W. Graham Richards. "Ultrafast Shape Recognition: Evaluating a New Ligand-Based Virtual Screening Technology." *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 27, no. 7 (April 2009): 836–45. doi:10.1016/j.jm gm.2009.01.001.

<sup>25</sup> Unajak, Sasimanas, Orathai Sawatdichaikul, Napat Songtawee, Siriluk Rattanabunyong, Anchalee Tassnakajon, Nontawith Areechon, Ikuro Hirono, et al. "Homology Modeling and Virtual Screening for Antagonists of Protease from Yellow Head Virus." *Journal of Molecular Modeling* 20, no. 3 (March 2014). doi:10.1007/s00894-014-2116-9.

<sup>26</sup> Irwin, John J., and Brian K. Shoichet. "ZINC12: A Free Database of Commercially Available Compounds for Virtual Screening." *ChemInform* 36, no. 16 (April 19, 2005). doi:10.1002/chin.200516215.

<sup>27</sup> Wishart, David S. "In Silico Drug Exploration and Discovery Using DrugBank." In *Current Protocols in Bioinformatics*, edited by Andreas D. Baxevanis, Gregory A. Petsko, Lincoln D. Stein, and Gary D. Stormo. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2007. <http://doi.wiley.com/10.1002/0471250953.bi1404s18>.

de esa proteína ya sea como agonistas o antagonista, inhibidor o activador de la función biológica. Si la enfermedad está causada por un organismo patógeno, entonces el fármaco diseñado deberá provocar la inhibición total. La diana deberá ser esencial en algún punto del ciclo de vida del patógeno, de manera que su inhibición cause su muerte. Además, deberá ser única, lo que supone la inexistencia de otra ruta metabólica capaz de superar la presencia del inhibidor. Por último, la diana podrá ser inhibida mediante la unión de pequeñas moléculas. Una vez que se concluye con el estudio del receptor es necesario identificar y caracterizar el sitio de unión<sup>28</sup>.

### *El sitio de unión del ligando*

En el SBD la localización del sitio de unión de la diana constituye un factor primordial. Esta información topológica puede derivarse de estudios experimentales o de métodos teóricos. Una vez establecida la localización del sitio de unión, se puede recurrir a distintas técnicas computacionales, como el acoplamiento molecular, el diseño *de novo* o el cribado virtual con el fin de optimizar posibles candidatos a fármacos<sup>29</sup>. Estas aproximaciones racionales se basan en el concepto de llave-cerradura formulado por Emil Fischer hace más de un siglo (Figura 10). Según este modelo, el sitio de unión debe ser un bolsillo o hueco más o menos profundo con una serie de residuos funcionales capaces de establecer enlaces de hidrógeno, bien como dadores o aceptores, con ciertas propiedades hidrofóbicas y de un volumen apropiado para recibir y acomodar a los ligandos.



**Figura 10. Modelo de llave-cerradura que representa la función de una enzima con su sitio activo y el sustrato (adaptado de Wikimedia Commons).**

### *Interacción ligando-diana*

Con pocas excepciones, la mayoría de los fármacos actúan mediante su unión de forma específica a determinadas macromoléculas, fundamentalmente proteínas. Al igual que en el

<sup>28</sup> Morley, Andrew D., and et al. et al. "Structure-Based Design of Protein Tyrosine Phosphatase-1B Inhibitors." ChemInform 36, no. 39 (September 27, 2005): 101-105. doi:10.1002/chin.200539125.

<sup>29</sup> S. Badieyan, Zohreh. "Virtual Screening for Finding Novel COX-2 Inhibitors as Antitumor Agents." The Open Medicinal Chemistry Journal 6, no. 1 (September 20, 2012): 15-19. doi:10.2174/1874104501206010015.

caso del plegamiento de las proteínas, las principales fuerzas implicadas en la unión con los ligandos son las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas que incluyen los enlaces puente de hidrógeno. Las primeras, que no son direccionales, contribuyen fundamentalmente a la afinidad, mientras que los enlaces de hidrógeno, de naturaleza altamente direccional, contribuyen principalmente a la especificidad<sup>30</sup>.

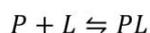
#### *El agua y su función en las proteínas*

El agua desempeña un papel importante en la estructura de las proteínas y en su unión con los ligandos, puesto que determina las preferencias conformacionales de ambos y modula las fuerzas de interacción. Las moléculas de agua situadas en la superficie del receptor y del ligando son desplazadas durante la formación del complejo (desolvatación), lo que supone una contribución entrópica favorable. La contribución es mayor si las moléculas de agua se encuentran situadas en las superficies apolares debido a la repulsión que sufre el agua<sup>31</sup>.

El estudio de los efectos de solvatación resulta fundamental para la comprensión de la interacción de los fármacos con sus dianas y para la predicción cuantitativa de las afinidades de unión. Las moléculas de agua se pueden encontrar en las cavidades de la proteína, en la interface entre ligando y proteína, y en la superficie de la proteína con la que se unen a través de uniones de puente de hidrógeno. A veces el papel que desempeñan ciertas moléculas de agua es difícil de determinar, pero generalmente su presencia resulta determinante para la función. Tal es el caso de aquellas presentes en el sitio catalítico de las enzimas. Al facilitar la ubicación de las partes hidrofílicas en interfaces hidrofóbicas, las moléculas de agua incrementan la promiscuidad de los sitios de unión<sup>32</sup>.

#### *Consideraciones termodinámicas en la interacción del ligando y el receptor*

En la forma más simple, la interacción entre un ligando (L) y un receptor (P) implica la formación de un complejo bimolecular (PL), en forma de ecuación se define como



---

<sup>30</sup> Engelborghs, Y. "The Role of Hydrogen Bonds in Biochemistry." In *Intermolecular Forces*, edited by Pierre L. Huyskens, Werner A. P. Luck, and Therese Zeegers-Huyskens, 439–49. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1991. [http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-3-642-76260-4\\_19](http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-3-642-76260-4_19).

<sup>31</sup> Pal, Samir Kumar, Jorge Peon, Biman Bagchi, and Ahmed H. Zewail. "Biological Water: Femtosecond Dynamics of Macromolecular Hydration." *The Journal of Physical Chemistry B* 106, no. 48 (December 2002): 12376–95. doi:10.1021/jp0213506.

<sup>32</sup> Klebe, Gerhard. "On the Validity of Popular Assumptions in Computational Drug Design." *Journal of Cheminformatics* 3, no. Suppl 1 (2011): O18. doi:10.1186/1758-2946-3-S1-O18.

Este esquema no representa todos los procesos que pueden estar involucrados en la unión con el receptor in vivo, tales como la migración del ligando hacia el sitio de unión, activación de un segundo mensajero que implique un mecanismo de transducción, así como la o las interacciones con el solvente, membranas u otras macromoléculas. La interacción receptor-ligando implica la variación de la energía libre  $\Delta G$  y se denomina comúnmente como energía libre de Gibbs:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Existen, por lo tanto, dos elementos que contribuyen a la variación de energía libre: un componente **entálpico** y un componente **entrópico** (Figura 11). El cambio en la entalpía  $\Delta H$  corresponde a las fuerzas moleculares involucradas en la interacción receptor-ligando, mientras que el cambio en la entropía  $T\Delta S$  se puede interpretar como:

- La energía dispersada que no puede emplearse para realizar trabajo termodinámico
- El cambio en los grados de libertad de un sistema molecular.

De la expresión termodinámica anterior se deduce que, en forma general, un incremento en la entalpía no favorece la formación del complejo receptor-ligando mientras que el incremento global de la entropía favorecería esta interacción. Para procesos reversibles, las interacciones son resultado del balance de los componentes entrópico y entálpico.

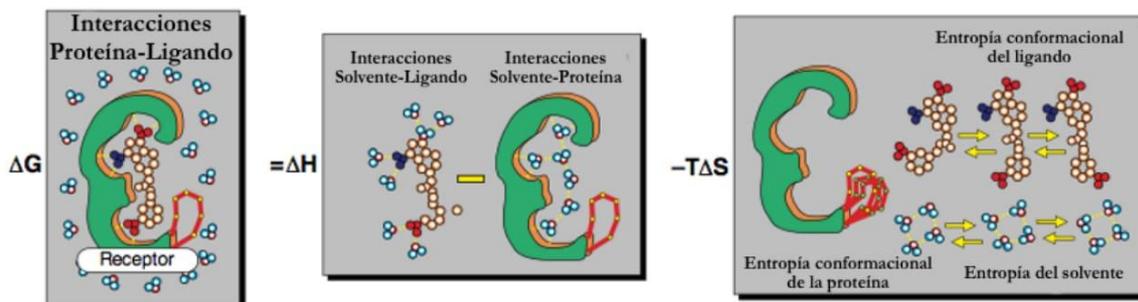


Figura 11. Interpretación de los descriptores termodinámicos en el proceso de formación del complejo ligando-proteína.

Se puede definir para el proceso de formación del complejo una constante de equilibrio,  $K_{bind}$ , expresada como:

$$K_{bind} = \frac{[PL]}{[P][L]}$$

En este trabajo llamaremos a la constante de equilibrio como constante de unión (*binding*). El cambio en la energía de Gibbs,  $\Delta G$  para el proceso bimolecular anterior queda expresado como:

$$\Delta G = \Delta G_{bind} + RT \cdot \ln \left( \frac{[PL]}{[P][L]} \right)$$

Donde  $\Delta G_{bind}$  representa la energía de Gibbs de unión en el estado estándar (298.15 K, 101.32 kPa), R es la constante de los gases ideales (8.31 J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>) y T es la temperatura absoluta (en K). En las condiciones de equilibrio se cumple que:

$$\Delta G = 0$$

$$\Delta G_{bind} = -RT \cdot \ln \left( \frac{[PL]}{[P][L]} \right) = -RT \cdot \ln K_{bind}$$

$$= -2.303 \cdot RT \cdot \log K_{bind}$$

$$\Delta G_{bind} = 2.303 \cdot RT \cdot pK_{bind}$$

De la ecuación anterior se deduce que un incremento en la constante de unión representará un cambio favorable de la variación de energía libre del proceso de unión, ya que el  $\Delta G_{bind}$  disminuye.

#### *Aproximaciones computacionales al cálculo de energía libre de unión*

Aunque es posible calcular  $\Delta G_{bind}$ , este proceso resulta extremadamente costoso en cuestiones informáticas y de tiempo. Usualmente la energía libre se estima a través de la determinación independiente de las contribuciones entálpicas y entrópicas en la estabilidad del complejo. Esto se hace al determinar la energía libre del complejo ( $G_{PL}$ ), el receptor ( $G_P$ ) y el ligando ( $G_L$ ) en forma separada, y tomando en cuenta la diferencia entre estos términos

$$\Delta G_{bind} = G_{PL} - (G_P + G_L)$$

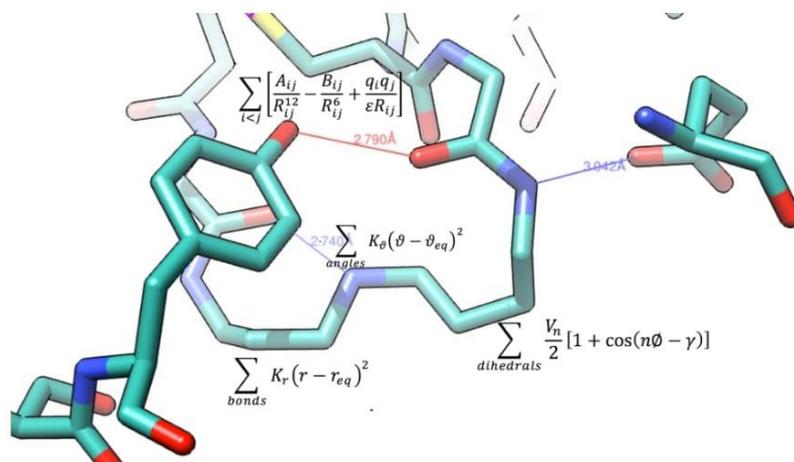
Actualmente, la forma más precisa para determinar la energía libre de unión es a través de la energía libre de perturbación (*free energy perturbation*, FEP) o integración termodinámica (*thermodynamic integration*, TI). En la mayoría de los FEP/TI la energía libre se calcula a partir de pequeñas mutaciones de un estado a otro del sistema, un proceso

conocido como "alquimia química". Esto se realiza tanto para el complejo como el ligando libre en solución<sup>33</sup>.

Desde hace más de una década el componente entálpico se estima a través de la aplicación de la metodologías de campos de fuerza y otros métodos que toman en cuenta el efecto del solvente en la contribución del factor entrópico. Estos métodos se basan en una ecuación general que sólo considera el estado inicial y final del sistema<sup>34</sup>, a diferencia de FEP/TI que toman varios estados intermedios sin relación con la realidad físicoquímica. Los campos de fuerza de mecánica molecular (MMFF) emplean la siguiente expresión general:

$$E_{MM} = \sum_{bonds} K_r (r - r_{eq})^2 + \sum_{angles} K_\theta (\vartheta - \vartheta_{eq})^2 + \sum_{dihedrals} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\varphi - \gamma)] + \sum_{i < j} \left[ \frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right]$$

Los primeros tres términos en la ecuación definen la energía interna del sistema, la cual estima la energía interna aplicando penalizaciones en condiciones en las cuales se producen desviaciones anormales de las longitudes de enlace, los ángulos de enlace y los ángulos diedros (Figura 12).



**Figura 12. Representación gráfica del significado simbólico de cada término en la ecuación de MMFF**

<sup>33</sup> Banavali, Nilesh K., Wonpil Im, and Benoît Roux. "Electrostatic Free Energy Calculations Using the Generalized Solvent Boundary Potential Method." *The Journal of Chemical Physics* 117, no. 15 (2002): 7381. doi:10.1063/1.1507108.

<sup>34</sup> Gohlke, Holger, and Gerhard Klebe. "ChemInform Abstract: Approaches to the Description and Prediction of the Binding Affinity of Small-Molecule Ligands to Macromolecular Receptors." *ChemInform* 33, no. 42 (May 19, 2010): no–no. doi:10.1002/chin.200242296.

La contribución entálpica a la energía libre se calcula a partir del potencial Lennard-Jones<sup>35</sup>, representado por el cuarto término, que estima las interacciones de van der Waals y la ecuación de Coulomb la cual determina la fuerza de las interacciones carga-carga<sup>36</sup>. La ecuación del cálculo de  $E_{MM}$  no contempla los efectos de polarización.

Los factores entrópicos debidos a la traslación y rotación de los solutos se calculan aplicando aproximaciones estadísticas, mientras que la entropía vibracional se calcula a través de análisis normal. La entropía configuracional se estima a través de termodinámica estadística que requiere considerar en el cálculo la superficie accesible al solvente para cada aminoácido antes y después de la formación del complejo<sup>37</sup>.

Los términos descriptos anteriormente describen la fuerza de la interacción entre el receptor y el ligando. Estas fuerzas llevan a una ecuación general

$$\Delta G_{bind} = E_{MM} - T \Delta S_{solute} + \Delta G_{solvent}$$

La energía libre del solvente,  $\Delta G_{solvent}$ , toma en cuenta los aportes entrópicos y entálpicos del solvente.

#### Empleo de Autodock Vina en acoplamiento molecular

Los programas de acoplamiento emplean una función denominada "función de puntaje" (*scoring function*), la cual se puede interpretar como un intento de aproximarse al valor del potencial químico de un sistema. Para Autodock Vina<sup>38</sup> (de ahora en más "Vina") la función de puntaje posee un factor dependiente de la conformación definida por la ecuación:

$$c = \sum_{i < j} f_{t_i t_j}(r_{ij}) = c_{inter} + c_{intra}$$

<sup>35</sup> Jones, J. E. "On the Determination of Molecular Fields. II. From the Equation of State of a Gas." Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences 106, no. 738 (October 1, 1924): 463–77. doi:10.1098/rspa.1924.0082.

<sup>36</sup> Kollman, Peter A., Irina Massova, Carolina Reyes, Bernd Kuhn, Shuanghong Huo, Lillian Chong, Matthew Lee, et al. "Calculating Structures and Free Energies of Complex Molecules: Combining Molecular Mechanics and Continuum Models." Accounts of Chemical Research 33, no. 12 (December 2000): 889–97. doi:10.1021/ar000033j.

<sup>37</sup> Zhou, Huan-Xiang, and Michael K. Gilson. "Theory of Free Energy and Entropy in Noncovalent Binding." Chemical Reviews 109, no. 9 (September 9, 2009): 4092–4107. doi:10.1021/cr800551w.

<sup>38</sup> Trott, Oleg, and Arthur J. Olson. "AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading." Journal of Computational Chemistry, 2009. doi:10.1002/jcc.21334.

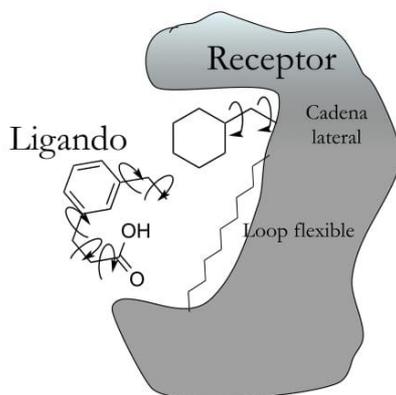
Cada átomo  $i$  se asigna como un tipo  $t_i$ , y se genera un grupo de funciones de interacción  $f_{titj}$  a una distancia interatómica  $r_{ij}$ . Normalmente se excluyen las interacciones 1-4, las cuales implican átomos separados mediante tres enlaces covalentes consecutivos.

El algoritmo de optimización, intenta encontrar un mínimo global de  $c$  y otras conformaciones con bajo puntaje para generar un orden según su valor. La energía libre de unión se calcula a partir de la conformación con menor scoring,  $s_1$ . La función  $g$  puede ser no lineal y está sujeta a modificaciones por parte del desarrollador o mismo por el usuario. Además existirán otras conformaciones pero se emplea  $c_{intra}$  para el mejor modo de unión, quedando el resto de las pose dependientes de  $c_1$ :

$$s_1 = g(c_1 - c_{intra1}) = g(c_{inter1}) = \Delta G_{bind_1}$$

$$s_i = g(c_i - c_{intra1}) = \Delta G_{bind_i}$$

La función  $g$  aplicada en el algoritmo de Vina 1.1.2 es dependiente del método Monte Carlo. El método Monte Carlo permite incrementar la velocidad de cálculo al aplicar variaciones conformacionales más grandes que los métodos FEP/TI<sup>39</sup>.



**Figura 13. Cambios aleatorios en los ángulos de enlace de ligando y receptor en el método Monte Carlo**

El barrido a través de las diferentes conformaciones implica cambios aleatorios de un ángulo de enlace determinado en forma también aleatoria (Figura 13). Por ejemplo, una conformación nueva sólo se acepta si posee un potencial energético menor que la conformación previa. Si la nueva posición resulta menos favorable energéticamente, la conformación se acepta o rechaza empleando una función probabilística basada en la

<sup>39</sup> Fernandez-Recio, Juan, Solernou, and Juan Fernandez-Recio. "Refinement of Rigid-Body Protein-protein Docking Using Backbone and Side-Chain Minimization with a Coarse-Grained Model." Open Access Bioinformatics, April 2010, 19. doi:10.2147/OAB.S7183.

distribución de Boltzmann. Vina aplica Monte Carlo al mismo tiempo que realiza una minimización local después de cada cálculo.

### *Implementación de Vina*

Vina es un software de acceso libre bajo una licencia Apache 2.0<sup>40</sup>. Puede ejecutarse en múltiples plataformas (Windows, GNU/Linux y OS X) tanto en sistemas de 32 bits como en 64 bits. Tiene la capacidad de emplear múltiples núcleos de procesamiento, haciendo su uso ideal para sistemas informáticos de *cluster*. El diseño de Vina se basa en la filosofía en la cual el usuario no necesita comprender a fondo los detalles técnicos que existen en relación a los cálculos o los parámetros que puedan manipular esos cálculos. El concepto que queda a partir de esta filosofía es la de una "caja negra" (*black box*). Por lo tanto, todo lo que se necesita son las estructuras de las moléculas sometidas al cálculo de acoplamiento, el centro del espacio de búsqueda y su tamaño. Además, Vina trabaja si es necesario empleando un receptor con residuos seleccionados como flexibles.

### *Protocolo general de trabajo con Vina y herramientas afines*

Para la entrada de datos y la representación de los cálculos realizados, Vina emplea el formato PDBQT usado también por su predecesor AutoDock 4<sup>41</sup>. Los archivos PDBQT se pueden generar a través de una interfaz gráfica o mediante scripts automatizados de Python o Bash. Su representación gráfica se realiza mediante la suite MGLTools 1.5.6rc1<sup>42</sup>. El PDBQT es un formato extendido del archivo PDB (Protein Data Bank). Ambos archivos PDBQT del ligando y el receptor, deben tener otros requerimientos adicionales para su uso con Vina:

- Cargas parciales Gasteiger<sup>43</sup>
- Uniformidad en la representación atómica: para cada átomo pesado no polar se le agrega la carga parcial del átomo de hidrógeno unido directamente y luego se elimina.

En Vina los ligandos se pueden tratar como flexibles, empleándose el concepto de un "árbol de torsión" (*torsion tree*) para representar los fragmentos rígidos y rotables. Siempre

---

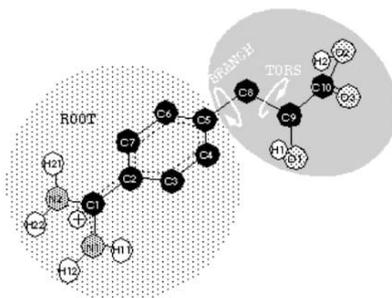
<sup>40</sup> "Apache License, Version 2.0." Accessed February 27, 2012. <http://www.apache.org/licenses/LICENSE-2.0>.

<sup>41</sup> Chang, Max W., Christian Ayeni, Sebastian Breuer, and Bruce E. Torbett. "Virtual Screening for HIV Protease Inhibitors: A Comparison of AutoDock 4 and Vina." Edited by Hendrik W. van Veen. PLoS ONE 5, no. 8 (August 4, 2010): e11955. doi:10.1371/journal.pone.0011955.

<sup>42</sup> "MGLTools 1.5.6 Release Candidate 1." 18 Aug. 2013. <<http://mgltools.scripps.edu/downloads/MGLTools-1.5.6/>>.

<sup>43</sup> Gasteiger, Johann, and Mario Marsili. "Iterative Partial Equalization of Orbital Electronegativity—a Rapid Access to Atomic Charges." Tetrahedron 36, no. 22 (January 1980): 3219–28. doi:10.1016/0040-4020(80)80168-2.

hay un átomo raíz (*root*) y ninguna o más ramas (*branches*) (Figura 14). Las ramas se pueden agrupar y cada rama define un enlace rotatable. El árbol de torsión está representado en el archivo PDBQT.



**Figura 14. Representación gráfica del árbol de torsión, el átomo raíz y las ramas.**

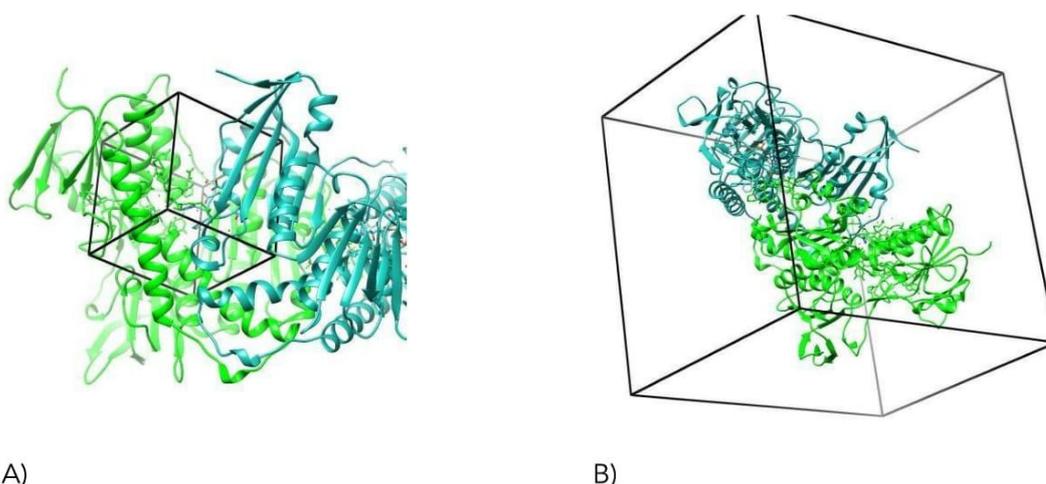
#### *Estados de protonación y cargas*

Tanto los ligandos como los receptores pueden ser susceptibles de sufrir procesos de ionización debido al entorno en el cual se encuentran disueltos. Así, la ionización dependerá del pH del entorno para sustancias que tengan características ácidas y/o básicas.

#### *Centro del sitio activo o de búsqueda*

Como se discutió en los capítulos anteriores, el conocimiento del sitio potencial de unión del ligando es esencial a fines de realizar predicciones significativas en el acoplamiento molecular. Esto no cambia con Vina por eso, recapitulando, el sitio activo se puede determinar:

- Conociendo el ligando natural
- Conociendo un ligando cristalizado
- Con información previa del sitio activo (modelado por homología o mapeo de los dominios del receptor)
  - En el caso extremo de no conocer el sitio de unión se puede realizar un acoplamiento ciego (*blind docking*) que puede tomar al receptor como una entidad completa (Figura 17).



**Figura 15. Definición del espacio de búsqueda para el A) acoplamiento y el B) acoplamiento ciego. Visualizado con Chimera 1.8 (PDB 1BZL)**

Si se conoce la ubicación de un ligando pre-cristalizado, el centro de espacio de búsqueda se obtiene a través de un examen visual de la posición del ligando. En forma más rigurosa el centro de la caja de búsqueda (coordenadas  $x$ ,  $y$ ,  $z$ ) se puede estimar a partir del centroide del ligando de referencia (L), sin tomar en cuenta el tamaño real de cada átomo, siendo:

$$Centro_{x_{PL}} = \frac{1}{N_{a_{x_{PL}}}} \sum_{i=1}^{N_{a_{x_{PL}}}} x_i \quad Centro_{y_{PL}} = \frac{1}{N_{a_{y_{PL}}}} \sum_{i=1}^{N_{a_{y_{PL}}}} y_i \quad Centro_{z_{PL}} = \frac{1}{N_{a_{z_{PL}}}} \sum_{i=1}^{N_{a_{z_{PL}}}} z_i$$

Coordenadas  $x$  del centro

Coordenadas  $y$  del centro

Coordenadas  $z$  del centro

Estas coordenadas sólo se aplican al archivo PDB que contiene el ligando original (PL). Si se alteran las coordenadas iniciales de la proteína, se deben calcular de nuevo las coordenadas del centro de la búsqueda.

#### *Variables de cálculo*

Vina presenta cierta capacidad de personalización en cuanto a los cálculos que puede realizar. Ésta personalización se limita a la elección de parámetros, por parte del operador, relacionados con el espacio de búsqueda de conformaciones y la intensidad o tiempo de procesamiento para realizar el cálculo. La variable para controlar la intensidad de cálculo se denomina "exhaustividad" y su parámetro de configuración es exhaustiveness que se pasa hacia el ejecutable de Vina.

## Análisis de los resultados

Vina genera la salida de resultados en dos formatos:

- Formato PDBQT; posee todas las conformaciones resultantes de los cálculos. Puede interpretarse con la interfaz gráfica de MGLTools 1.5.6rc1. De aquí se extrae la información del puntaje ó afinidad y la ubicación de cada conformación.
- Formato de texto; sólo puede albergar la información relacionada con el puntaje. No almacena ningún tipo de información estructural 3D.

## Validación de resultados

En el proceso de verificar que tanto los parámetros de búsqueda como de cálculo son correctos, se procede a realizar la validación del protocolo aplicando el algoritmo de acoplamiento a un complejo ligando-receptor de naturaleza conocida. Frecuentemente, estos complejos se encuentran almacenados en el Protein Data Bank por lo cual resulta sencillo descargar la proteína y el ligando. Posteriormente, el paso necesario es separar el ligando y el receptor, convertirlos en los formatos PDBQT y realizar el cálculo de acoplamiento con diferentes parámetros hasta encontrar la convergencia de resultados entre la posición del ligando en el archivo PDB original y el acoplamiento *in silico*.

La eficiencia del modelo se evalúa a través de la raíz de la desviación media cuadrática (*root-mean-square deviation*, RMSD) que promedia la diferencia de distancia entre dos átomos idénticos de moléculas idénticas superpuestas. Para dos estructuras *a* y *b*, idénticas:

$$RMSD_{ab} = \max(RMSD'_{ab}, RMSD'_{ba})$$

Donde para el tipo de átomo *i* en la estructura *a* y *b*.

$$RMSD'_{ab} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_i \min_j r_{ij}^2}$$

Como criterio de corte en cuanto a la eficiencia del cálculo se emplea un valor límite no superior a 2 Å<sup>44</sup>

---

<sup>44</sup> Bursulaya, Badry D., Maxim Totrov, Ruben Abagyan, and Charles L. Brooks III. "Comparative Study of Several Algorithms for Flexible Ligand Docking." *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 17, no. 11 (November 2003): 755–63. doi:10.1023/B:JCAM.0000017496.76572.6f.

## Cribado virtual

El término Cribado Virtual (*Virtual Screening*, VS) se emplea para describir el proceso de filtrado de grandes bases de datos de moléculas empleando diversos criterios los cuales pueden incluir determinadas propiedades y/o actividad biológica, todo ello realizado en un sistema informático (*in silico*). En la quimioinformática (*cheminformatics*), los métodos de VS se enfocan en moléculas pequeñas y puede combinarse con métodos de búsqueda por similitud (2D o 3D).

Estos cálculos generalmente comienzan con una serie de compuestos con actividad conocida que se emplean como “plantillas” (*templates*) en la búsqueda de estructuras similares en la base de datos, resultando lo más similares a los activos como candidatos para su evaluación experimental. Existe también una aproximación orientada a la actividad, en la cual se toma en cuenta ésta a pesar que las estructuras buscadas no posean tanta similitud. Esto se emplea con frecuencia ya que, generalmente, los compuestos activos conocidos presentan dificultades de síntesis y/o aislamiento, como son los productos naturales o las sustancias protegidas por patentes.

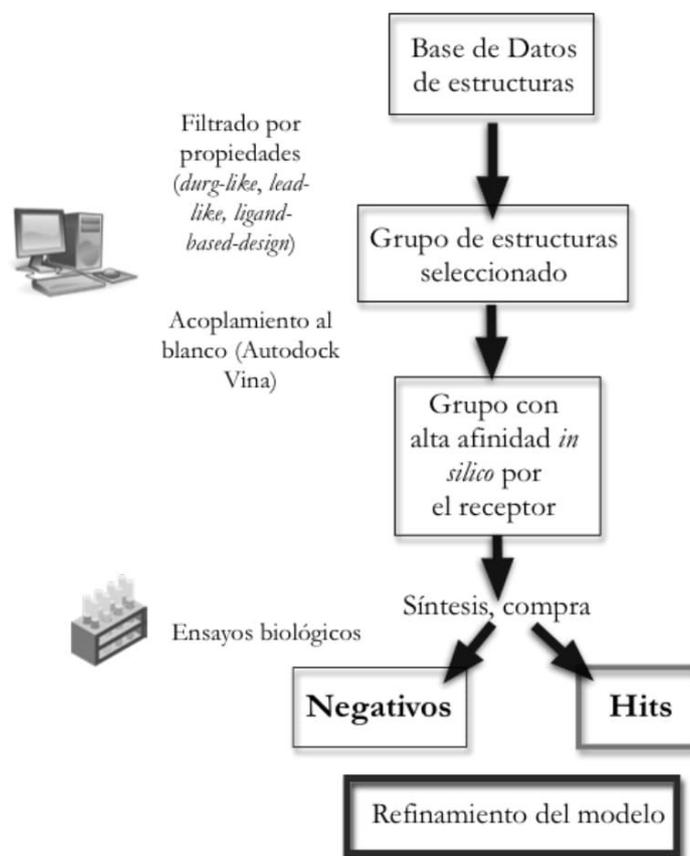
### *Metodología de cribado virtual*

VS puede, como se comentó anteriormente, usarse sólo en sí mismo como herramienta de búsqueda e identificación de candidatos. Sin embargo, no es la única estrategia aplicada. De hecho, el VS se puede emplear en conjunto con métodos experimentales ya bien establecidos como el Cribado de Alta Eficiencia (*high-throughput screening*, HTS)<sup>45</sup> y así establecer mecanismos de búsqueda repetitivos o secuenciales.

Simplificando el proceso, podemos decir que la base de datos original se reduce a través de una selección *in silico* hasta obtener un grupo de moléculas que se evalúan experimentalmente para identificar al menos algunos candidatos (*hits*) iniciales. Estos hits se emplean luego en un VS como punto de partida, enfocado en la selección de la actividad de un número reducido de compuestos provenientes de otras bases de datos y las moléculas se prueban experimentalmente. El proceso se repite iterativamente (Figura 16).

---

<sup>45</sup> “High-Throughput Screening (HTS).” In SpringerReference. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2011.  
[http://www.springerreference.com/index/doi/10.1007/SpringerReference\\_66881](http://www.springerreference.com/index/doi/10.1007/SpringerReference_66881).



**Figura 16. Protocolo general de trabajo en el cribado virtual.**

### Filtrado

Además de las búsquedas por similitud, las funciones de *filtrado* son una herramienta esencial en el VS. El filtrado generalmente intenta identificar compuestos con propiedades deseables y descartar otras. Se han empleado con diversas propiedades tales como reactividad química, toxicidad, ADME, etc. Se debe notar que las funciones de filtrado pueden tener diversos grados de complejidad.

Dos descriptores importantes son la superficie molecular polar (*polar molecular surface area*, PSA) y el coeficiente calculado de partición octanol/agua (CLogP) que pueden predecir con bastante precisión la capacidad de pasaje pasivo a través de las membranas celulares. Tanto la solubilidad de las moléculas como la absorción pasiva pertenecen al espectro de parámetros ADME que juegan un rol esencial en la determinación de la eficacia *in vivo* de los fármacos. Otros parámetros a considerar son el pasaje a través de la barrera hemato-encefálica, la estabilidad metabólica (frente a las diversas isoformas de la Citocromo P450), unión a proteínas en sangre o la biodisponibilidad oral. Para la predicción de la biodisponibilidad oral de drogas, se han formulado reglas basadas en la estadística de

propiedades moleculares de drogas ya comercializadas. La más aplicada de todas es la Regla de los Cinco, o Reglas de Lipinski (*Rule-of-five*, Ro5)<sup>46</sup>. De acuerdo con esta regla, una droga presenta probabilidades favorables de biodisponibilidad oral si no viola más de una de ellas:

- Peso molecular, MW < 500
- Coeficiente calculado de partición octanol/agua, CLogP < 5
- Donores de puente de hidrógeno, nHBD < 5
- Aceptores de puente de hidrógeno, nHBA < 10

Estas reglas resultan muy útiles en sí mismas para determinar los límites de una estructura con propiedades de fármaco (*drug-like*), pero aparecen falencias cuando se trata de desarrollar compuestos líderes considerando que es mucho más probable encontrar un *hit* con peso molecular elevado así como lipofilidad también elevada. Éste concepto se denomina propiedades de droga líder (*lead-like*). Ghose y col.<sup>47</sup> desarrollaron un conjunto de reglas que delimitaban las propiedades de un compuesto líder:

- $160 \leq MW \leq 480$
- $20 \leq \text{número de átomos} \leq 70$
- $-0.4 \leq \text{CLogP} \leq 5.6$
- $40 \leq \text{refractividad molar, MR} \leq 130$

Teague y col.<sup>48</sup> propusieron que los compuestos líderes deberían satisfacer las siguientes reglas:

- MW < 350
- CLogP < 3

Hann y Oprea<sup>49</sup> propusieron que las moléculas líderes deberían cumplir con las siguientes reglas:

- MW  $\leq 460$
- CLogP  $\leq 4.2$

---

<sup>46</sup> Lipinski, Christopher A. "Lead- and Drug-like Compounds: The Rule-of-Five Revolution." *Drug Discovery Today: Technologies* 1, no. 4 (December 2004): 337–41. doi:10.1016/j.ddtec.2004.11.007.

<sup>47</sup> Ghose, Arup K., Vellarkad N. Viswanadhan, and John J. Wendoloski. "A Knowledge-Based Approach in Designing Combinatorial or Medicinal Chemistry Libraries for Drug Discovery. 1. A Qualitative and Quantitative Characterization of Known Drug Databases." *Journal of Combinatorial Chemistry* 1, no. 1 (January 1999): 55–68. doi:10.1021/cc9800071.

<sup>48</sup> Teague, Simon J., Andrew M. Davis, Paul D. Leeson, and Tudor Oprea. "The Design of Leadlike Combinatorial Libraries." *Angewandte Chemie International Edition* 38, no. 24 (December 16, 1999): 3743–48. doi:10.1002/(SICI)1521-3773(19991216)38:24<3743::AID-ANIE3743>3.0.CO;2-U.

<sup>49</sup> Hann, Mike M, and Tudor I Oprea. "Pursuing the Leadlikeness Concept in Pharmaceutical Research." *Current Opinion in Chemical Biology* 8, no. 3 (June 2004): 255–63. doi:10.1016/j.cbpa.2004.04.003.

- Enlaces rotables  $\leq 10$
- Anillos  $\leq 4$
- Donores de puente de hidrógeno  $\leq 5$
- Aceptores de puente de hidrógeno  $\leq 9$

Por otro lado, Congreve y col.<sup>50</sup> propusieron algo similar a una “Regla de los 3” (*Rule-of-three, Ro3*):

- MW < 300
- CLogP < 3
- Donores de puente de hidrógeno < 3
- Enlaces rotables libres < 3

Al final, manteniendo en vista el objetivo de desarrollar un compuesto líder o una droga potencialmente comercializable, los investigadores deberán elegir los parámetros de filtrado adecuados tanto para cumplir con ello como con sus expectativas de desarrollo.

---

<sup>50</sup> Congreve, Miles, Gianni Chessari, Dominic Tisi, and Andrew J. Woodhead. “Recent Developments in Fragment-Based Drug Discovery.” *Journal of Medicinal Chemistry* 51, no. 13 (July 2008): 3661–80. doi:10.1021/jm8000373.

## Diseño de novo

El diseño *de novo* implica el diseño de nuevas estructuras basadas en la composición del sitio de unión con el cual deben interactuar. La estructura del sitio activo se puede identificar, como se mencionó en capítulos anteriores, a partir del estudio cristalográfico de la proteína blanco que contiene un ligando o un inhibidor. La posición del ligando revela dónde se encuentra el sitio de unión así como cualquier cambio conformacional producido por el fenómeno de formación del complejo. Una vez que se ha descargado el archivo de la estructura del complejo proteína-ligando, resulta posible identificar los aminoácido involucrados tanto en el sitio de acción como los responsables de la función proteica específica estudiada. Así, la potencial droga puede diseñarse para que posea el tamaño y las características estructurales necesarias tanto para ocupar el sitio de unión como para interactuar con el mismo. Existen ciertos puntos importantes a tener en cuenta en el diseño *de novo*:

- Normalmente, la estructura del sitio de unión se identifica a partir de la cristalografía por rayos-X de la proteína. La resolución de la estructura obtenida está relacionada con la precisión del modelo.
- Es posible que la molécula diseñada no se una a la proteína en la forma predicha. Si existe un ajuste demasiado exacto al sitio de unión, puede ocurrir que un ligero cambio en el mismo evite la unión en forma parcial o completa. Así, es preferible tener cierta libertad en cuanto a la capacidad de interacción con otros aminoácidos de la proteína.
- La estructura diseñada debe ser maleable en cuanto a las modificaciones posteriores necesarias para optimizar sus propiedades farmacocinéticas.
- Las moléculas flexibles resultan mejores que las rígidas, ya que las primeras pueden encontrar otras formas de unión y esto se puede corregir a través de variaciones estructurales. En el caso de moléculas rígidas los fallos no pueden corregirse fácilmente.
- No tiene sentido diseñar moléculas difíciles, costosas o imposibles de sintetizar.
- En forma similar, tampoco tiene sentido diseñar moléculas que adquieren conformaciones imposibles para lograr su unión<sup>51</sup>.

El verdadero potencial en el diseño *de novo* es que puede estimular nuevas ideas e identificar compuestos líderes, los cuales pueden optimizarse a través del diseño basado en la estructura.

---

<sup>51</sup> Yuan, Yaxia, Jianfeng Pei, and Luhua Lai. "LigBuilder 2: A Practical *de Novo* Drug Design Approach." *Journal of Chemical Information and Modeling*, May 3, 2011, 110503125659001. doi:10.1021/ci100350u.

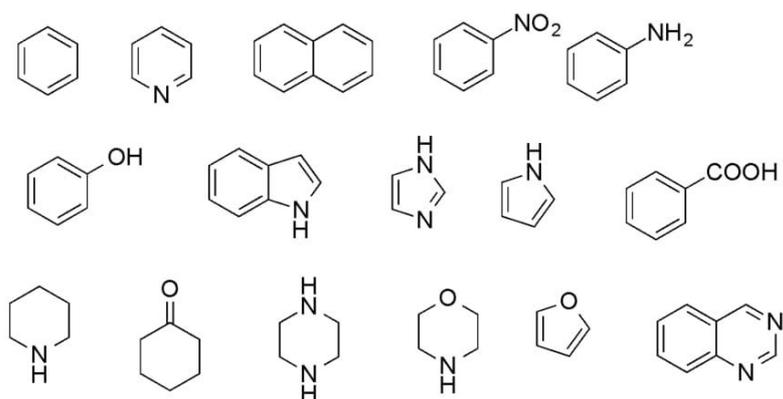
## Diseño de novo automatizado

### Paso 1. Identificación de los sitios de interacción:

Antes que nada, se analizan los átomos del sitio activo para así identificar los que pueden formar parte de interacciones puente de hidrógeno e interacciones de van der Waals. Los átomos de oxígeno y nitrógeno terciarios se pueden identificar como aceptores de puente de hidrógeno. Los donores serán aquellos átomos de hidrógeno unidos a oxígeno o nitrógeno. Los carbonos aromáticos o alifáticos son capaces de formar parte de interacciones de van der Waals. Así se pueden definir los sitios de unión de las potenciales estructuras.

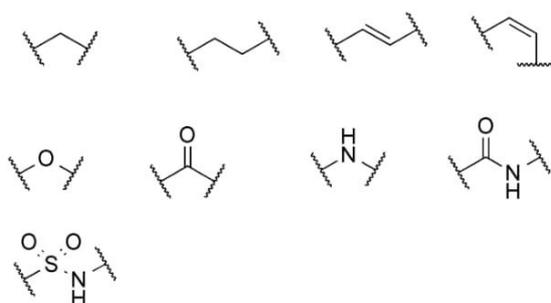
### Paso 2. Inclusión de fragmentos moleculares:

Aquí se emplea una librería preestablecida con muchos fragmentos pequeños (5-30 átomos) y típicamente son rígidos. Idealmente se fijan las interacciones con el sitio de unión tal que, por ejemplo, los fragmentos que involucran metilos interactúen con segmentos hidrofóbicos del receptor y los fragmentos que contienen sistemas aromáticos pueden intervenir en uniones  $\pi$ - $\pi$



### Paso 3. Unión de los fragmentos:

Una vez que se identificó y ubicó cada fragmento molecular en el sitio, el paso siguiente implica unirlos a través de puentes moleculares.



La metodología descrita anteriormente implica un uso intensivo de los sistemas informáticos y no siempre produce estructuras fácilmente sintetizables. Por esto, se emplean otros principios que ayudan a acelerar el proceso de generación de estructuras con potencial actividad farmacológica.

#### *Empleo de AutoGrow 3.0 en el diseño de novo*

AutoGrow 3.0 depende de varios paquetes de software libres, los cuales incluyen MGLTools, OpenBabel<sup>52</sup>, AutoDock Vina 1.1.2, y NumPy/SciPy<sup>53</sup>. AutoGrow 3.0 no involucra sólo un ligando, sino que trabaja con poblaciones de ellos. Estas poblaciones se dividen en "generaciones". Cada generación se someten a tres operadores: **mutación, cruzamiento y selección**<sup>54</sup>. Para llegar a formular una nueva estructura a través de mutaciones se emplean los principios de reacciones *click-chemistry* programadas con AutoClickChem<sup>55</sup>. Según este principio, se selecciona en forma aleatoria un fragmento que puede participar de esta reacción *in silico*.

El software AutoClickChem realiza dos tipos de reacciones virtuales:

- *Reacciones de modificación.* Implican, por ejemplo, el reemplazo de un haluro por una azida. Así un grupo poco reactivo se transforma en uno mucho más reactivo.
- *Reacciones de acoplamiento.* Involucran la combinación de dos modelos moleculares a través de reacciones simuladas de *click-chemistry*. Por ejemplo, una molécula conteniendo un grupo azida se puede unir a un grupo conteniendo un grupo alquino (*azide-alkyne Huisgen cycloaddition*, figura 17).

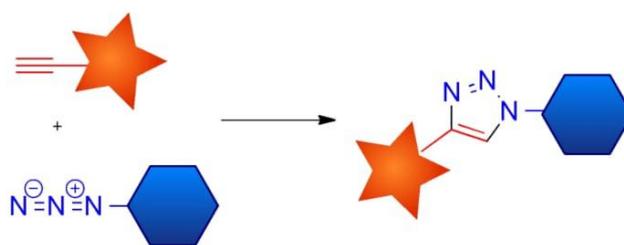
---

<sup>52</sup> O'Boyle, Noel M, Michael Banck, Craig A James, Chris Morley, Tim Vandermeersch, and Geoffrey R Hutchison. "Open Babel: An Open Chemical Toolbox." *Journal of Cheminformatics* 3, no. 1 (2011): 33. doi:10.1186/1758-2946-3-33.

<sup>53</sup> Oliphant, Travis E. "Python for Scientific Computing." *Computing in Science & Engineering* 9, no. 3 (2007): 10–20. doi:10.1109/MCSE.2007.58.

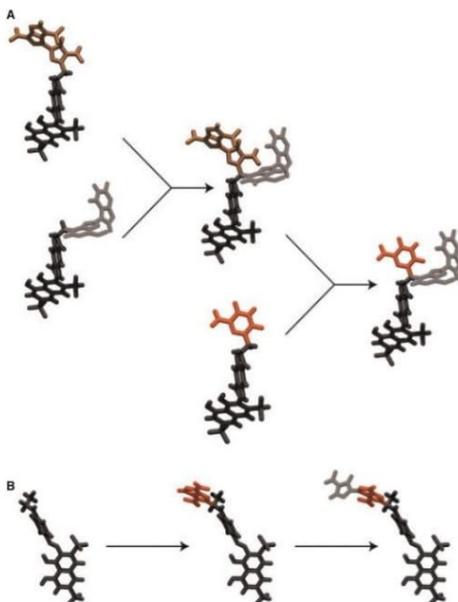
<sup>54</sup> Durrant, Jacob D., Steffen Lindert, and J. Andrew McCammon. "AutoGrow 3.0: An Improved Algorithm for Chemically Tractable, Semi-Automated Protein Inhibitor Design." *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 44 (July 2013): 104–12. doi:10.1016/j.jmglm.2013.05.006.

<sup>55</sup> Durrant, Jacob D., and J. Andrew McCammon. "AutoClickChem: Click Chemistry in Silico." Edited by Hilmar Lapp. *PLoS Computational Biology* 8, no. 3 (March 15, 2012): e1002397. doi:10.1371/journal.pcbi.1002397.



**Figura 17. Cicloadición Huisgen de azida-alkino**

AutoGrow 3.0 permite al usuario seleccionar si se generarán mutantes empleando las reacciones de sustitución o de acoplamiento. El operador de cruzamiento se encuentra basado en el algoritmo LigMerge<sup>56</sup>. Las primeras dos moléculas "padres" se alinean entre sí para encontrar una subestructura común a ambas. Luego, se generan los nuevos compuestos "hijos" que resultan topológicamente similares pero inherentemente diferentes a sus dos "padres" (Figura 18 A y B).



**Figura 18 A) un ligando "hijo" se forma a través de cruzamiento al crear un ligando híbrido mezclando en forma aleatoria las estructuras de ambos "padres", B) se forma un "mutante" al reemplazar un fragmento reactivo con otro fragmento molecular derivado de la librería configurada. La supervivencia de cada individuo depende de sus propiedades fisicoquímicas y su puntaje frente al blanco (Adaptado de Durrant y col.)<sup>57</sup>.**

<sup>56</sup> Lindert, Steffen, Jacob D. Durrant, and J. Andrew McCammon. "LigMerge: A Fast Algorithm to Generate Models of Novel Potential Ligands from Sets of Known Binders: A Fast Algorithm to Generate Models of Novel Potential Ligands." *Chemical Biology & Drug Design* 80, no. 3 (September 2012): 358–65. doi:10.1111/j.1747-0285.2012.01414.x.

<sup>57</sup> Jacob D. Durrant, Rommie E. Amaro and J. Andrew McCammon. "AutoGrow: A Novel Algorithm for Protein Inhibitor Design." *Chem Biol Drug Des* 2009; 73: 168–178. doi: 10.1111/j.1747-0285.2008.00761.x

Una vez que se creó una generación de compuestos empleando las mutaciones y cruzamiento, se procede a aplicar el operador de selección. Con esto se identifican los ligandos que resultan más "aptos". En este caso se pueden aplicar diversos criterios:

- Propiedades *drug-like*: se usa el software OpenBabel. Las propiedades a evaluar pueden pertenecer a las reglas de Lipinski o a las reglas descritas por Ghose y col. Aquellos compuestos que no cumplen con estas reglas son descartados.
- El usuario puede configurar en el software las características químicas deseables o no en los compuestos generados. Un ejemplo puede ser la inclusión de ciertos grupos funcionales previamente identificados como importantes para la actividad biológica.

Finalmente, aquellas estructuras que sobreviven al proceso de mutación y selección previo, se acoplan al receptor de interés mediante Vina 1.1.2. Los ligandos con mejor puntaje son seleccionados y pasan a la siguiente generación. La segunda generación se someterá de nuevo a todo el proceso anterior hasta que se llegue al límite de generaciones impuestas por el usuario o se sobrepasen los límites de las reglas preestablecidas sobre las características fisicoquímicas de los ligandos. El operador de mutaciones depende de la librería especificada por el usuario. Esta librería puede derivar de fuentes comerciales (Sigma-Aldrich, Fluka, Salor, etc.) o de los reactivos disponibles en el laboratorio.



# Capítulo III

---

## **Funciones e importancia de la enzima tripanotiona reductasa como blanco de diseño de fármacos**

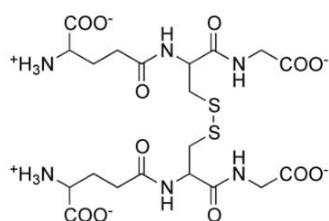
*“Biology is the study of complicated things that have  
the appearance of having been designed with a purpose”*

*Richard Dawkins*

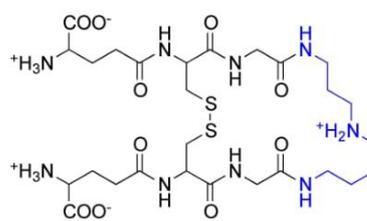


## Introducción

Las células de mamífero emplean dos clases de compuestos de bajo peso molecular que contienen grupos tioles (SH) y poliamidas en un rango amplio de funciones biológicas. Entre otros, las poliamidas están implicadas en la síntesis de proteínas, crecimiento y desarrollo celular, dentro de ellas el péptido denominado glutatión (L- $\gamma$ -glutamil-L-cisteínglicina) está involucrado en el mantenimiento del balance de óxido-reducción en varios aspectos del metabolismo<sup>58</sup>. La forma tiol del glutatión (GSH) funciona como agente protector, al mantener un ambiente intracelular reductor. El GSH se oxida a glutatión-disulfuro (GSSG) reaccionando, posteriormente, con agentes potencialmente dañinos como son los radicales y oxidantes. La enzima glutatión reductasa (GR) asegura que se mantengan altos niveles de grupos tioles al catalizar la reducción del puente disulfuro<sup>59</sup>. El sistema GR-GSSG ha sido estudiado extensamente a través de varias técnicas, incluyendo la cristalografía. En contraste, los tripanosomátidos usan aductos de poliamina-glutatión en vez de GSH (Figura 19) siendo la más estudiada la tripanotona.



Glutatión disulfuro, GSSG



Tripanotona disulfuro, T[S]<sub>2</sub> (en azul el fragmento de espermidina)

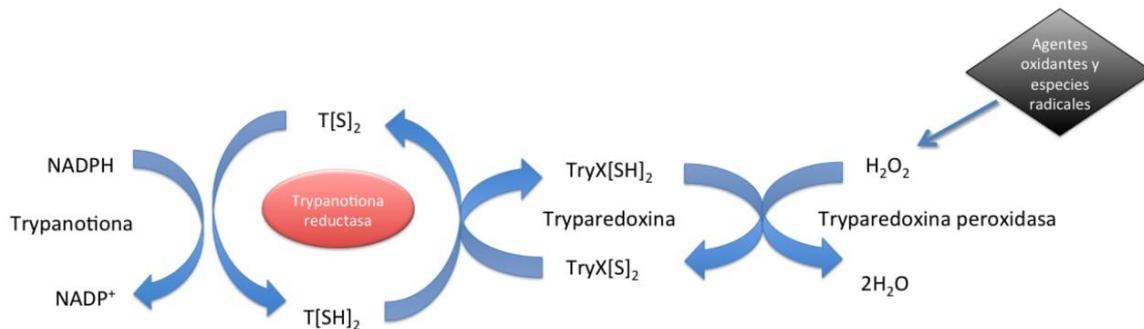
**Figura 19. Estructuras del glutatión disulfuro y tripanotona disulfuro.**

Las similitudes con el glutatión sugieren que estos metabolitos pueden tener una funcionalidad biológica similar en cuanto a la detoxificación de especies reactivas del oxígeno formadas por procesos metabólicos o, más importante, cuando los parásitos están sujetos al estrés oxidativo gracias a la respuesta inmune del huésped (Figura 20). Los aductos, además, regulan los niveles de poliamidas influenciando el crecimiento y desarrollo celular.

<sup>58</sup> "Glutathione Redox Cycle." In SpringerReference. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2011.

[http://www.springerreference.com/index/doi/10.1007/SpringerReference\\_32256](http://www.springerreference.com/index/doi/10.1007/SpringerReference_32256).

<sup>59</sup> Carlberg, Inger, and Bengt Mannervik. "[59] Glutathione Reductase." In *Methods in Enzymology*, 113:484–90. Elsevier, 1985. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687985130624>.



**Figura 20. Metabolismo de la T[S]<sub>2</sub> en el *Trypanosoma cruzi* y su relación con la detoxificación de especies oxidantes.**

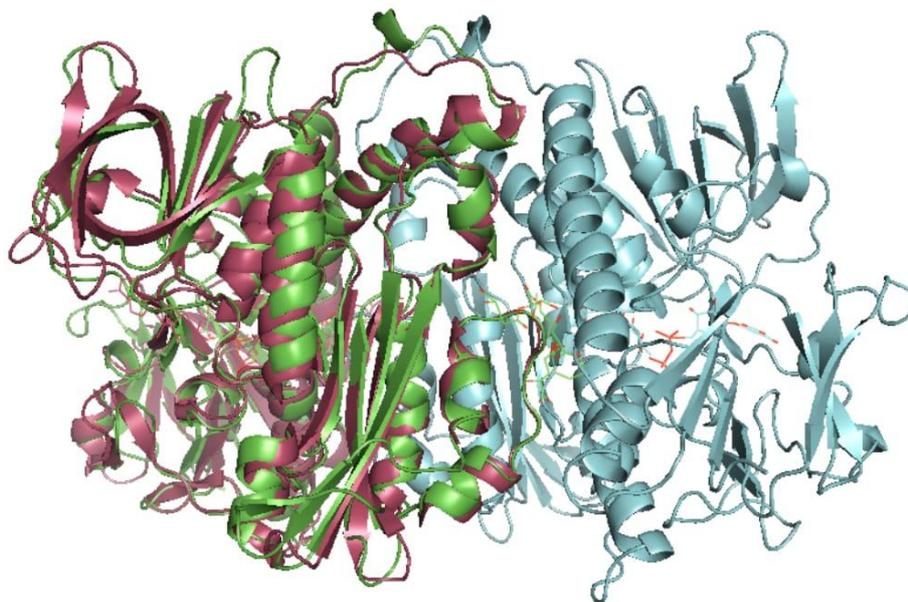
Los tripanosomátidos poseen bajos niveles de glutatión pero carecen de la GR. En cambio, existe la enzima tripanotona reductasa, TryR, que es responsable de la conversión de la tripanotona-disulfuro (T[S]<sub>2</sub>) a la forma ditiol, dihidrotriptanotona (T[SH]<sub>2</sub>). La GR humana y la TryR son dependientes de NADPH. La TryR funciona como homodímero de una subunidad molecular en un rango de 52-54 kDa y comparte cerca del 35.5% de similitud en la secuencia de aminoácidos de la GR, calculado con UCSF Chimera 1.8 empleando el algoritmo Needleman-Wunsch<sup>60</sup> (Figura 21 y 22).

<b>1BZL Cadena A</b>	1	11	21	31	41
<b>1GRA</b>	1	11	21	31	41
<b>1BZL Cadena A</b>	51	61	71	81	91
<b>1GRA</b>	50	60	70	80	90
<b>1BZL Cadena A</b>	101	111	121	131	141
<b>1GRA</b>	91	101	111	121	131
<b>1BZL Cadena A</b>	151	161	171	181	191
<b>1GRA</b>	138	148	158	168	178
<b>1BZL Cadena A</b>	201	211	221	231	241
<b>1GRA</b>	179	189	199	209	219
<b>1BZL Cadena A</b>	251	261	271	281	291
<b>1GRA</b>	226	236	246	256	266
<b>1BZL Cadena A</b>	301	311	321	331	341
<b>1GRA</b>	276	286	296	306	316
<b>1BZL Cadena A</b>	351	361	371	381	391
<b>1GRA</b>	326	336	346	356	366
<b>1BZL Cadena A</b>	401	411	421	431	441
<b>1GRA</b>	376	386	396	406	416
<b>1BZL Cadena A</b>	451	461	471	481	491
<b>1GRA</b>	426	436	446	456	466
<b>1BZL Cadena A</b>	501	511			
<b>1GRA</b>	476	486			

**Figura 21. Alineamiento de las secuencias de la GR humana (PDB 1GRA) con la secuencia de la cadena A de la TryR (PDB 1BZL). Calculado con UCSF Chimera 1.8**

<sup>60</sup> Rose, J., and F. Eisenmenger. "A Fast Unbiased Comparison of Protein Structures by Means of the Needleman-Wunsch Algorithm." *Journal of Molecular Evolution* 32, no. 4 (April 1991): 340-54. doi:10.1007/BF02102193.

Los residuos importantes involucrados en la catálisis se encuentran conservados en cada cadena, pero cada enzima es específica de su sustrato natural a pesar de las similitudes estructurales. Esto indica que sería posible inhibir la TryR del parásito sin afectar la GR. Sumado a esto, los estudios genéticos indican que la TryR es esencial para el crecimiento y supervivencia de los parásitos<sup>61</sup>.



**Figura 22. Superposición y alineamiento 3D de la única cadena de GR (rojo, PDB 1GRA) con la cadena A (verde) y la cadena B (celeste) de la TryR (PDB 1BZL). Generado con Chimera 1.8**

#### *Estructura de la TryR y localización del sitio activo*

Cada subunidad comprende un dominio de unión de FAD, un dominio de unión de NADPH y un dominio interface, siendo éste último responsable del ensamblaje del homodímero. El sitio de unión del sustrato es 15 Å en ancho y profundidad, y 20 Å en longitud (4500 Å<sup>3</sup>) (Figura 5). Está conformado por los residuos 15-22, 53-62, 103-114 y 335-343 de una subunidad (A) y 396'-399' y 461'-470' de la otra (donde ' indica un residuo de la subunidad adyacente, B). Los residuos involucrados en la catálisis (CYS53, CYS58 y HIS461') se encuentran cerca del co-factor FAD<sup>62</sup>.

<sup>61</sup> Carnieri, Eva G.S., Silvia N.J. Moreno, and Roberto Docampo. "Trypanothione-Dependent Peroxide Metabolism in Trypanosoma Cruzi Different Stages." *Molecular and Biochemical Parasitology* 61, no. 1 (September 1993): 79–86. doi:10.1016/0166-6851(93)90160-Y.

<sup>62</sup> Zhang, Yihong, Charles S. Bond, Susan Bailey, Mark L. Cunningham, Alan H. Fairlamb, and William N. Hunter. "The Crystal Structure of Trypanothione Reductase from the Human Pathogen Trypanosoma Cruzi at 2.3 Å Resolution." *Protein Science* 5, no. 1 (December 31, 2008): 52–61. doi:10.1002/pro.5560050107.



En la Tabla 2 se ven las interacciones puente de hidrógeno, las interacciones hidrofóbicas y la relación con el agua circundante.

**Tabla 2. Interacciones entre los átomos de la T[S]<sub>2</sub> y los residuos circundantes en un radio de 4 Å.**

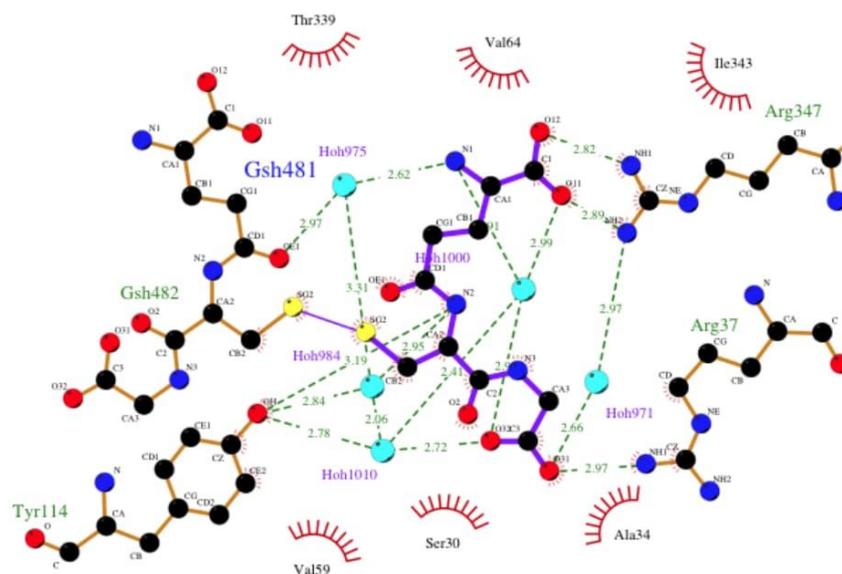
Átomo 1	Átomo 2	Distancia (Å)	Tipo de unión
A:603:GCG:O11	A:822:HOH:O	3.0	Puente de hidrógeno con el agua co- cristalizada
A:603:GCG:SG2	A:823:HOH:O	3.3	
A:603:GCG:N3	A:823:HOH:O	3.0	
A:603:GCG:O6	A:810:HOH:O	3.2	
A:603:GCG:O27	A:714:HOH:O	3.1	
A:603:GCG:N1	B:668:HOH:O	3.2	
A:603:GCG:N1	B:680:HOH:O	3.1	
A:603:GCG:O17	B:670:HOH:O	3.3	
B:680:HOH:O	B:459:GLY:N	2.9	
A:603:GCG:CA1	A:339:ILE:CD1	3.6	Interacciones hidrofóbicas
A:603:GCG:CD1	B:461:HIS:CE1	3.7	
A:603:GCG:C3	A:18:LEU:CB	3.8	
A:603:GCG:C2S	A:18:LEU:C	3.8	
A:603:GCG:C7S	A:111:TYR:CE1	3.7	
A:603:GCG:C8S	A:111:TYR:CE1	3.7	
A:603:GCG:CA5	A:107:ILE:CG2	3.8	
A:603:GCG:CB6	A:59:VAL:CG2	3.4	
A:603:GCG:CB6	B:461:HIS:CE1	3.3	
A:603:GCG:CD7	B:461:HIS:CE1	3.8	
A:603:GCG:C7	B:463:THR:C	3.9	
A:603:GCG:O3	A:111:TYR:OH	2.8	
A:603:GCG:N1S	A:19:GLU:OE1	3.0	
A:603:GCG:OD7	B:466:GLU:OE2	3.2	

CGC: código interno que representa a T[S]<sub>2</sub> en 1BZL

### *El complejo GR-GSSG humano*

Para desarrollar las diferencias entre TryR y GR y aprovecharlas en el diseño o descubrimiento de inhibidores es necesario entender las bases moleculares de la

especificidad exclusiva por el sustrato. Resulta, por lo tanto, necesario revisar lo que se conoce acerca de la estructura GR-GSSG (Figura 25).



**Figura 25.** Interacciones entre la GSH y los átomos circundantes en un radio de 4 Å. Generado con LigPlus.

En la Tabla 3 se describen las interacciones puente de hidrógeno, las interacciones hidrofóbicas y la relación con el agua circundante co-cristalizada.

**Tabla 3.** Interacciones entre los átomos de la GSH y los residuos circundantes en un radio de 4 Å

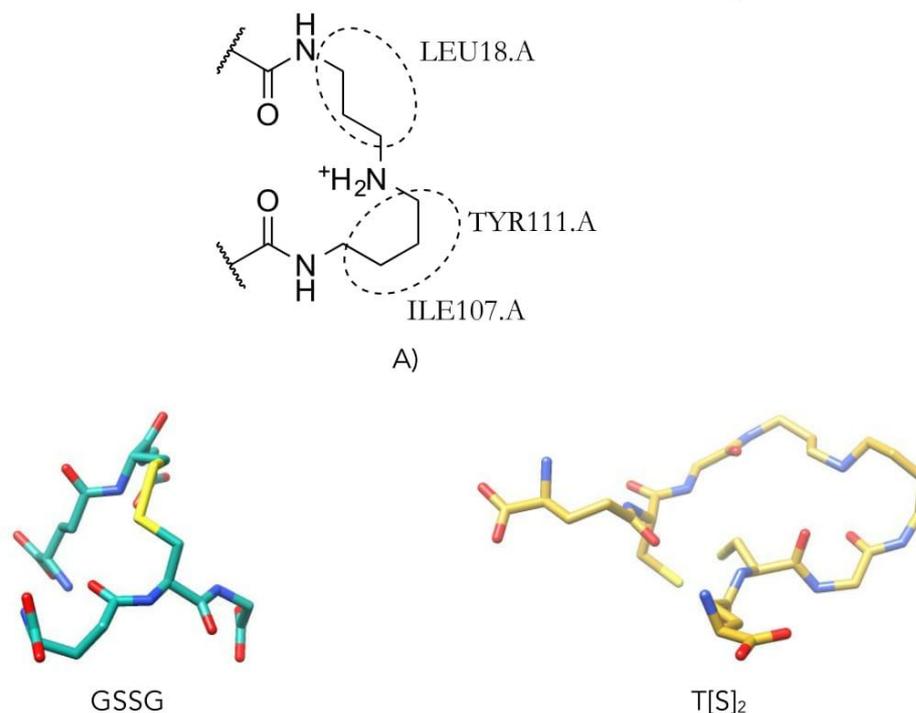
Átomo 1	Átomo 2	Distancia (Å)	Tipo de unión
A:481:GSH:N1	A:975:HOH:O	2.6	
A:481:GSH:N1	A:1000:HOH:O	2.9	
A:481:GSH:O11	A:972:HOH:O	2.8	
A:481:GSH:O11	A:1000:HOH:O	3.0	
A:481:GSH:N2	A:984:HOH:O	2.9	Puente de hidrógeno con el agua co-cristalizada
A:481:GSH:O31	A:971:HOH:O	2.7	
A:481:GSH:O32	A:971:HOH:O	3.2	
A:481:GSH:O32	A:1000:HOH:O	2.9	
A:481:GSH:O32	A:1010:HOH:O	2.7	
A:481:GSH:CB2	A:59:VAL:CG2	3.7	
A:481:GSH:CB2	A:114:TYR:CE2	3.7	Hidrofóbica
A:481:GSH:CB2	A:114:TYR:CZ	3.5	

Átomo 1	Átomo 2	Distancia (Å)	Tipo de unión
A:481:GSH:O11	A:347:ARG:NH2	2.9	
A:481:GSH:O12	A:347:ARG:NH1	2.8	Puente de hidrógeno
A:481:GSH:O31	A:37:ARG:NH1	3.0	

GSH: código interno que representa a GSSG en 1GRA

### Determinantes de la especificidad

La TryR y GR resultan mutuamente excluyentes en cuanto a la especificidad del sustrato debido a varios componentes de origen estéricos y electrostáticos. Los sustratos difieren en tamaño y carga, pero poseen en común el grupo  $\gamma$ -glutamilcisteinil. GSSG es la más pequeña de las dos, con una carga neta de -2 a pH citosólico (pH 7.0). La T[S]<sub>2</sub>, en cambio, posee una carga neta de +1 y un componente hidrofóbico de siete metilenos que interactúan con los residuos LEU18, TYR111 e ILE107 de la cadena A (Figura 26. A).



Área total de acceso al solvente = 850.184 Å<sup>2</sup>    Área total de acceso al solvente = 941.471 Å<sup>2</sup>  
 Volumen = 496.8 Å<sup>3</sup>, Área = 486.1 Å<sup>2</sup>                      Volumen = 631.9 Å<sup>3</sup>, área = 568.1 Å<sup>2</sup>

**Figura 26. A) Fragmento de espermidina de la T[S]<sub>2</sub> responsable de las interacciones hidrofóbicas específicas con TryR. B) Área y volumen estimados de la GSSG y T[S]<sub>2</sub> con UCSF Chimera 1.8 (partícula de prueba de 1.4 Å)**

Las comparaciones estructurales indican diferencias en la orientación de los dominios, los cuales están influenciados por el tamaño de los sitios activos de la GR y TryR. La GR humana posee un sitio de unión disulfuro más pequeño que la TryR. Como resultado, la T[S]<sub>2</sub> es demasiado grande para encajar en forma óptima en el sitio de la GR y el GSSG es demasiado pequeño para el sitio de la TryR (Figura 26. B).

En resumen, la presencia de tripanotiona reductasa en el *T. cruzi* posibilita el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. En primer lugar, la tripanotiona reductasa reacciona con moléculas como el nifurtimox y las *o*-naftoquinonas, que generan radicales libres del oxígeno. Esos radicales contribuyen a la toxicidad de sus generadores. En segundo lugar, la tripanotiona reductasa forma complejos inactivos con moléculas como la mepacrina<sup>63</sup>. Por último, el modelado molecular del centro activo de la tripanotiona reductasa ha permitido el diseño de inhibidores como las fenotiazinas<sup>64</sup>.

Dada las funciones de la tripanotiona en la desintoxicación de peróxidos generados por el metabolismo de fármacos en el *T. cruzi*, la inhibición de la TryR permitiría daño celular irreversible y por lo tanto es un objetivo racional importante para lograr fármacos específicos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

---

<sup>63</sup> Jacoby, Elke M., Ilme Schlichting, Christina B. Lantwin, Wolfgang Kabsch, and R. Luise Krauth-Siegel. "Crystal Structure of the Trypanosoma Cruzi Trypanothione Reductase-mepacrine Complex." *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 24, no. 1 (January 1996): 73–80. doi:10.1002/(SICI)1097-0134(199601)24:1<73::AID-PROT5>3.0.CO;2-P.

<sup>64</sup> Takeda, Gentilda K. F., Rubens Campos, Julio Kieffer, Antonio Augusto B. Moreira, Vicente Amato Neto, Vera Lúcia P. Castilho, Pedro Luiz S. Pinto, and Maria Irma Seixas Duarte. "Ação de Raios Gama Sobre Formas Sanguícolas de Trypanosoma Cruzi: Estudo Experimental Em Camundongos." *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 28, no. 1 (February 1986): 15–18. doi:10.1590/S0036-46651986000100004.



# Capítulo IV

---

## Diseño, síntesis y evaluación biológica de derivados del núcleo quinazolina

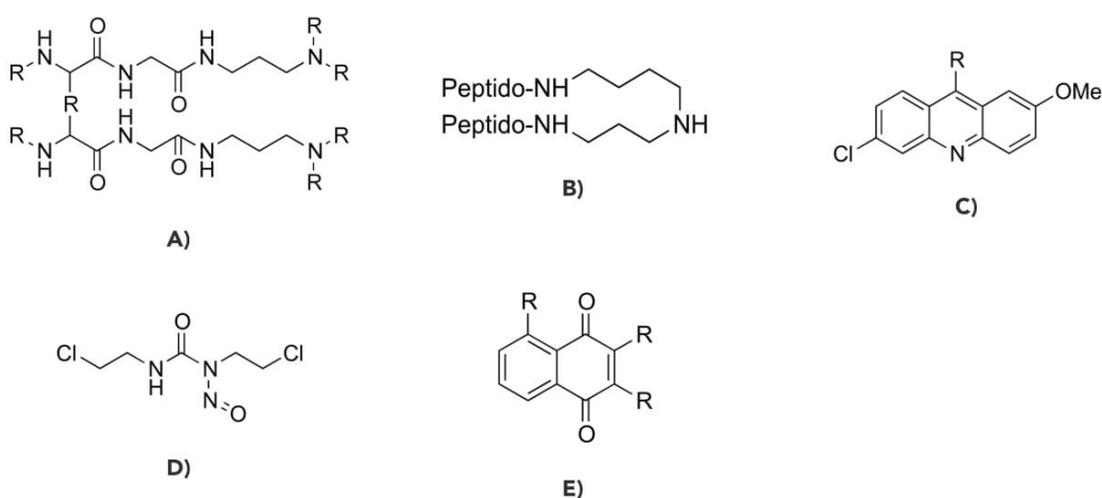
*“A scientist in his laboratory is not a mere technician:  
he is also a child confronting natural phenomena that impress  
him as though they were fairy tales.”*

*Marie Curie*



## Introducción

A partir de la identificación de la tripanotona reductasa (TryR) en 1985 y su potencial aplicación como blanco para una nueva aproximación quimioterápica hacia la tripanosomiasis y la leishmaniasis, se han encontrado un gran número de inhibidores de la misma. Los inhibidores de la TryR publicados se pueden clasificar en cinco grupos: análogos del sustrato, inhibidores poliaminas y péptidos, compuestos tricíclicos, inhibidores irreversibles y sustratos subversivos (Figura 27). Los estudios de especificidad de los sustratos de la TryR encontraron que el sitio activo tolera estructuras no relacionadas con el sustrato además de la ausencia del esqueleto disulfuro, tales como análogos cíclicos y acíclicos no reducibles<sup>65</sup>.

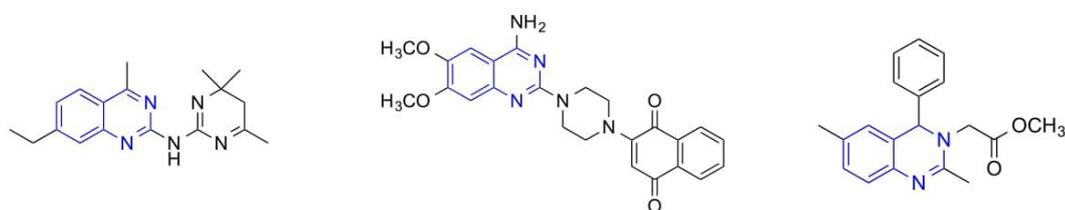


**Figura 27. Inhibidores de la TryR publicados: A) análogos del sustrato, B) inhibidores poliaminas y péptidos, C) compuestos tricíclicos, D) inhibidores irreversibles y E) sustratos subversivos**

La tendencia general en el caso de los inhibidores de TryR es tal que los más efectivos y selectivos son aminas que contienen grupos hidrofóbicos (Figura 9. B). Desafortunadamente, se ha encontrado poca correlación entre la actividad inhibitoria enzimática y su actividad antiparasitaria para diferentes estructuras empleando los descriptores moleculares más comunes (MW, MR, CLogP, PSA, etc.), además de la

<sup>65</sup> Augustyns, K., K. Amssoms, A. Yamani, P. Rajan, and A. Haemers. "Trypanothione as a Target in the Design of Antitrypanosomal and Antileishmanial Agents." *Current Pharmaceutical Design* 7, no. 12 (August 1, 2001): 1117–41. doi:10.2174/1381612013397564.

dificultad de predecir las propiedades de absorción de la misma en el parásito<sup>66</sup>. Nuestra hipótesis propuesta para explicar estos fenómenos implica considerar el gran tamaño del sitio activo (4500 Å<sup>3</sup>) permitiendo muchos y variados modos de unión. Sumándose la posibilidad de diferentes efectos de transporte en el parásito. Como blanco, la TryR puede resultar compleja si la inhibición de la misma puede revertirse por acumulación del sustrato endógeno. Existe, todavía, una gran necesidad de desarrollar y optimizar inhibidores de la TryR como drogas antiparasitarias. En la década anterior se detectaron, a través de HTS (High-Throughput Screening), una serie de candidatos con núcleo de quinazolina<sup>67</sup> (Figura 28)



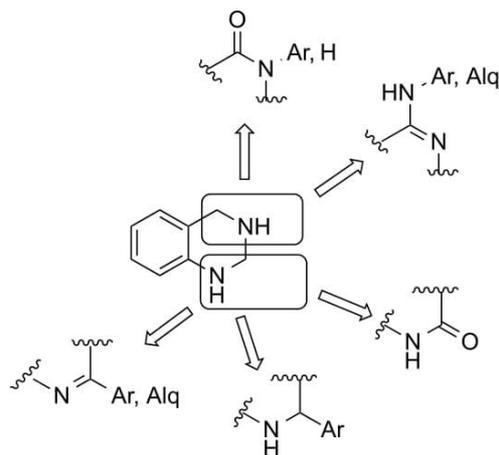
**Figura 28. Drogas derivadas de quinazolina con actividad como inhibidores de la TryR obtenidas por HTS (en azul se representa el núcleo común).**

Debido a los antecedentes descritos anteriormente se propuso al heterociclo de quinazolina como núcleo base para generar compuestos con potencial inhibición de la actividad de la TryR.

Para el diseño de dichos compuestos nos basamos en la capacidad de unión de este núcleo al sitio catalítico de la TryR empleando el método de acoplamiento *in silico*. Los compuestos que se proponen poseen sustituciones en las posiciones 2, 3 y 4 del núcleo base y la modificación funcional para generar quinazolinonas en posición 4 (Esquema 1). Las sustituciones implican restos hidrofóbicos con ciclos aromáticos y alifáticos combinados con donores de puente de hidrógeno, aceptores como nitrógenos  $sp^2/sp^3$ , grupos alcoxi ( $OCH_3$  y metilén dioxi) y grupos carbonilo. Estas modificaciones en el heterociclo de quinazolina nos permitirá obtener diversos derivados para ser evaluados frente a TryR.

<sup>66</sup> O'Sullivan, Mary C., and Qibing Zhou. "Novel Polyamine Derivatives as Potent Competitive Inhibitors of Trypanosoma Cruzi Trypanothione Reductase." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 5, no. 17 (September 1995): 1957–60. doi:10.1016/0960-894X(95)00331-M.

<sup>67</sup> Holloway, G. A., W. N. Charman, A. H. Fairlamb, R. Brun, M. Kaiser, E. Kostewicz, P. M. Novello, et al. "Trypanothione Reductase High-Throughput Screening Campaign Identifies Novel Classes of Inhibitors with Antiparasitic Activity." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53, no. 7 (July 1, 2009): 2824–33. doi:10.1128/AAC.01568-08.

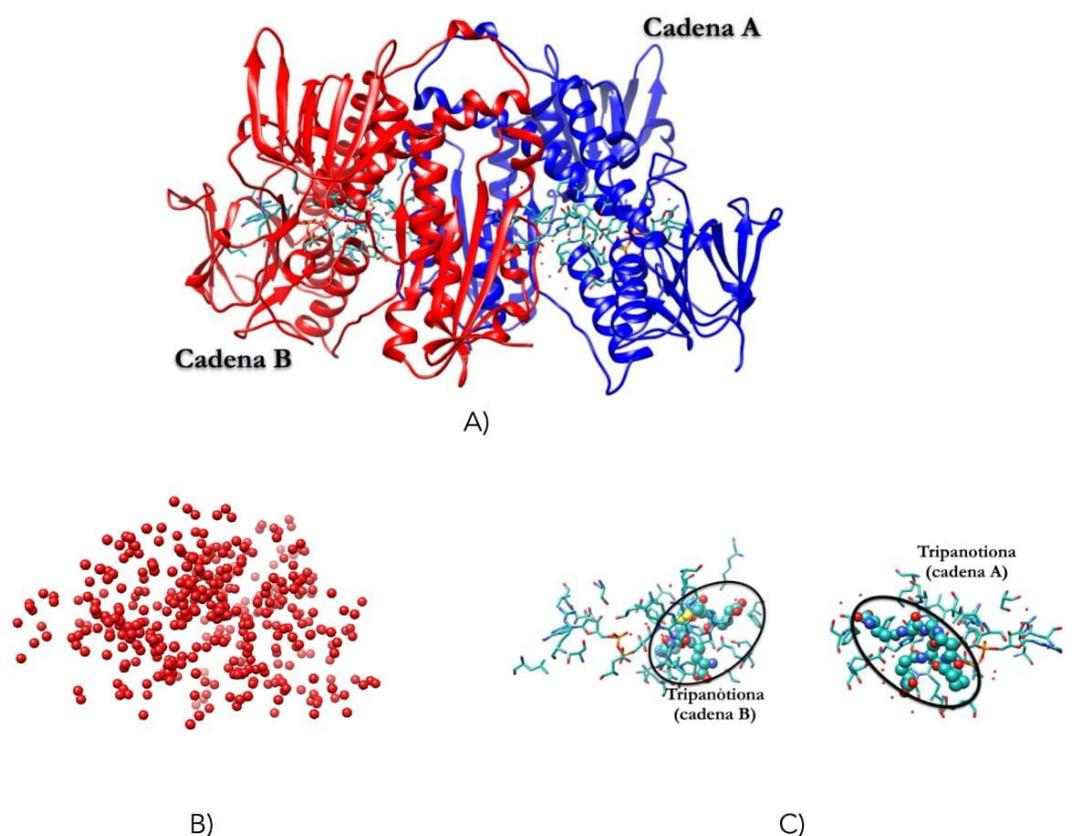


**Esquema 1. Propuestas de modificación del núcleo de quinazolina.**

### *Validación del protocolo de acoplamiento in silico*

Como se mencionó en el Capítulo III, en el desarrollo de un modelo de acoplamiento es importante validar dicho modelo a partir de uno o más ligandos que se encuentren unidos al sitio de acción. Para ello se procedió a descargar la versión cristalizada de la TryR del Protein Data Bank con el código 1BZL<sup>68</sup>. Esta representación tridimensional de la enzima se introdujo en la base de datos el 2 de noviembre de 1998. Pertenece a la cepa Brazilian Silvio Strain Clone X10-1, y se expresó en *Escherichia coli* recombinante. Su estructura se determinó a través de cristalografía de rayos-X con una resolución de 2.4 Å a pH 6.0. Tiene en su estructura tres tipos de moléculas no proteicas: 409 moléculas de agua de cristalización, 2 moléculas de tripanotona, T[S]<sub>2</sub> y 2 moléculas de FAD (Figura 29).

<sup>68</sup> <http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1BZL>



**Figura 29. A) Disposición de las moléculas orgánicas en la estructura 1BZL. B) Distribución de las moléculas de agua cristalizadas (sólo se graficó el átomo de oxígeno con el radio de van der Waals). C) Posición de las moléculas de FAD y CGC (T[S]<sub>2</sub>) en la cadena A y B**

#### Preparación de los ligandos

La estructura de la T[S]<sub>2</sub> (código interno PDB CGC) se extrajo del archivo PDB original empleando MGLTools 1.5.6rc1. Se eliminaron las moléculas no proteicas de 1BZL (agua, FAD y ambas T[S]<sub>2</sub>). La estructura de la TryR se salvó en formato PDB. Empleando OpenBabel se modificaron las cargas de los aminoácidos para adecuar el estado iónico de la proteína al pH citosólico del *Trypanosoma cruzi* (pH 7.0)<sup>69</sup>. El archivo resultante se transformó al formato PDBQT adecuado al receptor mediante la interfaz gráfica de MGLTools 1.5.6rc1. Se realizó el mismo procedimiento para obtener el archivo PDBQT de la T[S]<sub>2</sub> pero empleando el script propio del ligando.

El centro del espacio de búsqueda se obtuvo a través del cálculo del centroide (Capítulo II) de la CGC en el sitio activo interface entre la cadena A y B de la TryR (código interno

<sup>69</sup> Docampo, Roberto, and Anibal E. Vercesi. "Characteristics of Ca<sup>2+</sup> Transport by Trypanosoma Cruzi Mitochondria in Situ." Archives of Biochemistry and Biophysics 272, no. 1 (July 1989): 122–29. doi:10.1016/0003-9861(89)90202-6.

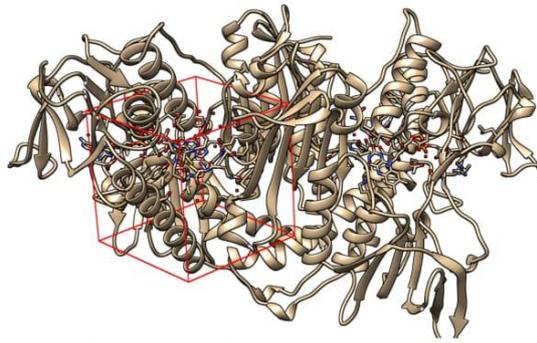
CGC.A.603) (Figura ). Este cálculo se realizó a partir de las coordenadas de los átomos diferentes a hidrógeno (C, N, O, S) con la planilla de cálculo LibreOffice Calc 4.2<sup>70</sup>.

				X	Y	Z			
HETATM	7516	CA1	GCG A 603	27.541	13.294	-5.098	1.00	69.26	C
HETATM	7517	O11	GCG A 603	27.418	15.224	-3.687	1.00	68.95	O
HETATM	7518	O21	GCG A 603	25.781	13.811	-3.570	1.00	68.37	O
HETATM	7519	CB1	GCG A 603	28.207	12.043	-4.460	1.00	66.58	C
HETATM	7520	N1	GCG A 603	28.580	14.167	-5.713	1.00	67.46	N
HETATM	7521	CG1	GCG A 603	27.249	10.876	-4.144	1.00	63.79	C
HETATM	7522	CD1	GCG A 603	26.464	10.451	-5.354	1.00	62.10	C
HETATM	7523	OD1	GCG A 603	27.038	10.108	-6.387	1.00	63.29	O
HETATM	7524	N2	GCG A 603	25.167	10.463	-5.232	1.00	65.01	N
HETATM	7525	CA2	GCG A 603	24.224	10.115	-6.286	1.00	70.04	C
HETATM	7526	C2	GCG A 603	23.170	11.216	-6.261	1.00	69.43	C
HETATM	7527	O2	GCG A 603	22.704	11.578	-5.177	1.00	74.26	O
HETATM	7528	CB2	GCG A 603	23.576	8.748	-6.005	1.00	71.34	C
HETATM	7529	SG2	GCG A 603	24.033	7.354	-7.128	1.00	84.43	S
HETATM	7530	N3	GCG A 603	22.804	11.737	-7.440	1.00	65.66	N
HETATM	7531	CA3	GCG A 603	21.826	12.811	-7.526	1.00	59.94	C
HETATM	7532	C3	GCG A 603	20.546	12.627	-6.731	1.00	59.26	C
HETATM	7533	O3	GCG A 603	20.042	11.509	-6.587	1.00	59.92	O
HETATM	7534	N1S	GCG A 603	20.010	13.748	-6.223	1.00	58.55	N
HETATM	7535	C2S	GCG A 603	18.781	13.802	-5.433	1.00	53.29	C
HETATM	7536	C3S	GCG A 603	18.976	14.018	-3.931	1.00	59.35	C
HETATM	7537	C4S	GCG A 603	18.910	12.707	-3.166	1.00	64.02	C
HETATM	7538	C5S	GCG A 603	20.116	11.760	-3.284	1.00	71.67	C
HETATM	7539	C7S	GCG A 603	18.589	9.916	-2.525	1.00	74.44	C
HETATM	7540	N6S	GCG A 603	19.740	10.341	-3.333	1.00	77.71	N
HETATM	7541	C8S	GCG A 603	18.285	8.410	-2.535	1.00	70.58	C
HETATM	7542	C9S	GCG A 603	19.269	7.643	-1.662	1.00	69.71	C
HETATM	7543	N11	GCG A 603	20.182	6.706	-2.314	1.00	73.99	N
HETATM	7544	C5	GCG A 603	21.227	7.067	-3.077	1.00	73.52	C
HETATM	7545	N5	GCG A 603	23.380	6.466	-3.962	1.00	72.50	N
HETATM	7546	CA5	GCG A 603	22.069	5.943	-3.645	1.00	72.79	C
HETATM	7547	O5	GCG A 603	21.506	8.246	-3.329	1.00	72.97	O
HETATM	7548	C6	GCG A 603	24.484	5.726	-3.875	1.00	74.55	C
HETATM	7549	N6	GCG A 603	26.713	6.534	-3.149	1.00	77.38	N
HETATM	7550	CA6	GCG A 603	25.762	6.454	-4.259	1.00	76.65	C
HETATM	7551	O6	GCG A 603	24.498	4.555	-3.484	1.00	72.63	O
HETATM	7552	CB6	GCG A 603	26.359	5.809	-5.501	1.00	81.83	C
HETATM	7553	SG6	GCG A 603	25.959	6.716	-7.064	1.00	78.26	S
HETATM	7554	CD7	GCG A 603	28.003	6.945	-3.160	1.00	76.67	C
HETATM	7555	C7	GCG A 603	31.470	4.309	-1.318	1.00	76.69	C
HETATM	7556	CA7	GCG A 603	30.088	4.953	-1.241	1.00	77.28	C
HETATM	7557	O17	GCG A 603	32.081	4.134	-0.251	1.00	77.09	O
HETATM	7558	O27	GCG A 603	31.916	3.955	-2.411	1.00	76.21	O
HETATM	7559	CB7	GCG A 603	30.089	6.314	-1.873	1.00	75.43	C

Figura 30. Coordenadas de los átomos pertenecientes al fragmento CGC.A.603 (T[S]<sub>2</sub>)

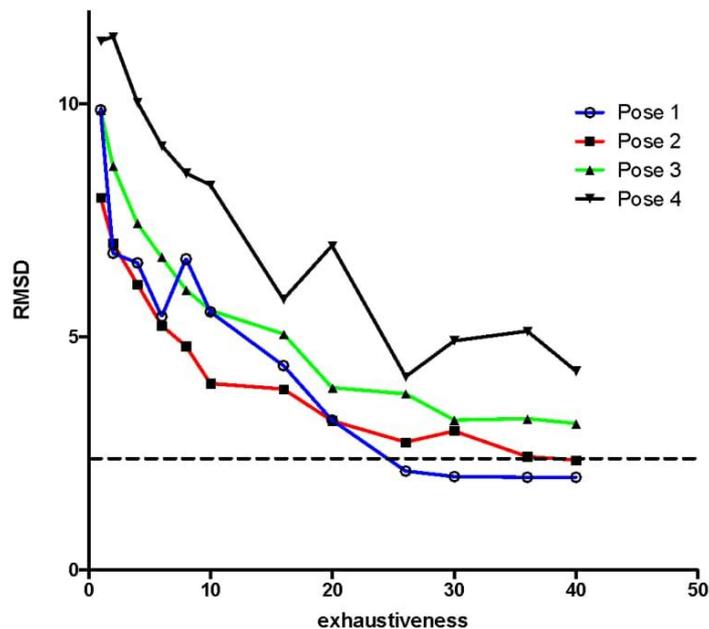
El promedio de cada una de las coordenadas X, Y, Z arrojó los siguientes resultados: X = 23.250; Y = 7.361; Z = -3.500. El espacio de búsqueda se definió a partir de estas coordenadas como un cubo de 26 Å de lado, con un volumen de 17576 Å<sup>3</sup> (Figura 31). Este espacio no sólo involucra los residuos del sitio activo y de unión, sino que incluye otros aminoácidos más alejados. Propusimos este valor para dar mayor libertad a los ligandos durante el cálculo de acoplamiento.

<sup>70</sup> Schoonmaker, S. Forging digital inclusion: The development of LibreOffice and the document foundation. The Second ISA Forum of Sociology (August 1-4, 2012).



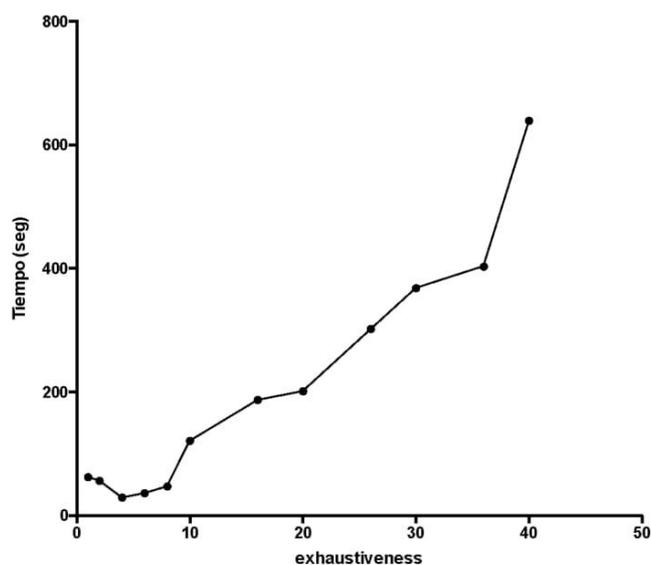
**Figura 31. Cubo que representa el espacio de búsqueda de acoplamiento en este trabajo. Generado con UCSF Chimera 1.8.**

Con estos valores ya establecidos se procedió a realizar un barrido del parámetro exhaustiveness para determinar el valor óptimo en los cálculos posteriores. exhaustiveness adquirió los valores: 1, 2, 4, 6, 8, 10, 16, 20, 26, 30, 36, 40. El número de conformaciones (*pose*) para cada cálculo se fijó en 10 como máximo. En la figura 15 se grafica la evolución del RMSD de las conformaciones 1, 2, 3 y 4 con respecto al CGC cristalizado a medida que cambia el factor de exhaustividad.



**Figura 32. Variación del ajuste del modelo (RMSD) con respecto al parámetro de exhaustividad (en línea punteada límite de 2 Å)**

La disminución del RMSD del modelo acoplado a medida que aumenta la exhaustividad se explica considerando que este parámetro se correlaciona con el aumento en el uso del núcleo del procesador. A la vez, se midió el tiempo de cálculo para cada valor de exhaustiveness (Figura 33)



**Figura 33. Variación del tiempo de cálculo en función de la exhaustividad.**

Se encontró buena correlación entre el tiempo de cálculo y el valor de exhaustividad (Pearson  $r = 0.9600$ ,  $P < 0.0001$ ) y se observa un mínimo en  $\text{exhaustiveness} = 4$ , esto coincide con el número de núcleos del hardware empleado en todos los cálculos. En base a estos valores se verificó que tanto el éxito de los cálculos como el tiempo en el cual se logra este resultado dependen del parámetro que define el uso del procesador, manteniendo los parámetros espaciales. Por lo tanto se conservaron estos valores de coordenadas de la caja, así como su dimensión y la exhaustividad, para trabajar con el modelo en etapas posteriores.

#### *Modelo de inhibición in silico de Trypanotona reductasa de T. cruzi.*

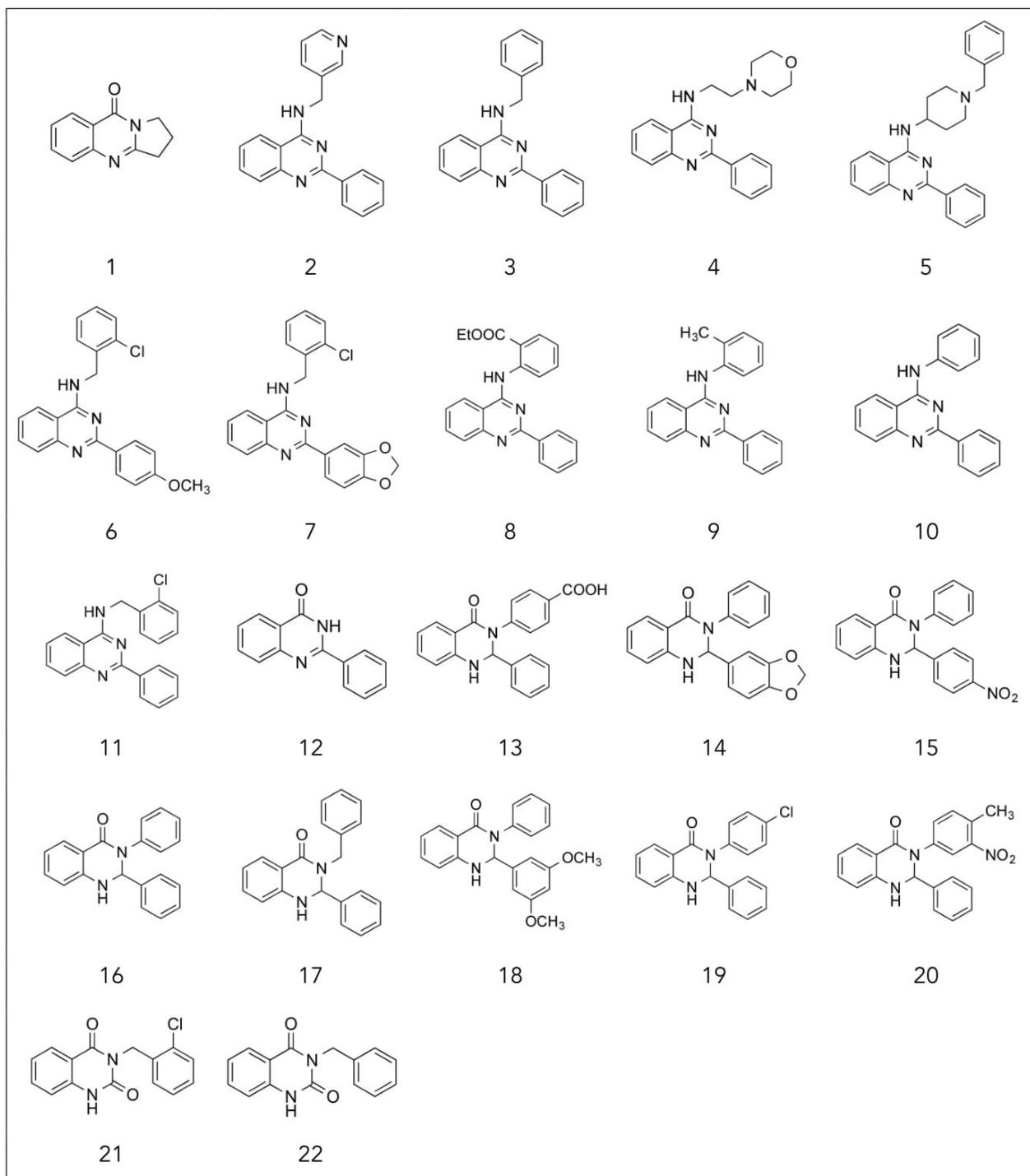
Veintidós ligandos (Tabla 4) fueron diseñados a partir de su representación en 2D con el software MarvinSketch v6.3.1 perteneciente a la Suite MarvinBeans de ChemAxon. Las estructuras se salvaron en formato Sybyl Mol2<sup>71</sup>. Se procedió a una minimización rápida con OpenBabel 2.3.1 aplicando Mecánica Molecular con el campo de fuerza MMF604 y un máximo de 9000 pasos (steps) al mismo tiempo que se agregaron los hidrógenos polares adecuados al pH citosólico del *Trypanosona cruzi* (pH 7.0). Un posterior cálculo en Gaussian 03<sup>72</sup> con el método Hartree-Fock con base 6-31G\* optimizó la geometría final de la

<sup>71</sup> Gross, Robert H. "Chime and RasMol for Molecular Visualization." Biotech Software & Internet Report 1, no. 5 (November 2000): 188–91. doi:10.1089/152791600750034703.

<sup>72</sup> Iyengar, Srinivasan S., H. Bernhard Schlegel, John M. Millam, Gregory A. Voth, Gustavo E. Scuseria, and Michael J. Frisch. "Ab Initio Molecular Dynamics: Propagating the Density Matrix with Gaussian Orbitals. II. Generalizations Based on Mass-Weighting, Idempotency, Energy Conservation and Choice of Initial Conditions." The Journal of Chemical Physics 115, no. 22 (2001): 1029-31. doi:10.1063/1.1416876.

molécula. Los archivos Mol2 de cada ligando diseñado fue transformado en el formato PDBQT propio de Autodock4 con el script de Python perteneciente a MGLTools 1.5.6rc1 empleando los parámetros por defecto.

**Tabla 4. Estructuras de los ligandos 1-22**



Para ampliar nuestro estudio en pos de la identificación de compuestos óptimos para su uso como drogas derivadas del núcleo de quinazolina, se calcularon descriptores moleculares con PaDEL-Descriptor 1.15<sup>73</sup> que representan propiedades tales como el coeficiente calculado de partición lipofílico/hidrofílico (CLogP), la refractividad molar (MR), el área de superficie polar (PSA), número de donores de hidrógeno (nHBD), número de aceptores de hidrógeno (nHBA), enlaces rotables (nRB) y peso molecular (MW). Se aplicaron las Reglas de Lipinski en todos los compuestos para determinar el potencial uso como droga in vivo, permitiendo la violación de una de ellas (Tabla 5).

**Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas calculadas para los compuestos 1-22, y benznidazol. Calculado con el software PaDEL-Descriptor 1.15.**

Compuesto	MR	CLogP	nHBD	nHBA	PSA	nRB	MW	Ro5 Fallos
<b>1</b>	57.64	1.83	0	2	32.67	0	186.08	0
<b>2</b>	98.99	5.42	1	1	50.7	4	312.14	1
<b>3</b>	100.95	5.43	1	1	37.81	4	311.14	1
<b>4</b>	112.51	6.09	1	3	47.04	5	375.11	1
<b>5</b>	125.55	5.89	1	2	41.05	5	394.22	1
<b>6</b>	103.69	3.9	1	3	50.28	5	334.18	0
<b>7</b>	114.15	6.31	1	4	56.27	4	389.09	1
<b>8</b>	116.89	6.64	1	3	64.11	6	369.15	1
<b>9</b>	101.81	6.58	1	1	37.81	3	311.14	1
<b>10</b>	97.91	6.50	1	1	37.81	3	297.13	1
<b>11</b>	105.96	6.08	1	2	37.81	4	345.10	1
<b>12</b>	70.38	2.37	1	2	41.46	1	222.08	0
<b>13</b>	101.70	3.78	2	5	69.64	3	344.12	1
<b>14</b>	103.36	4.84	1	5	50.8	2	344.12	1
<b>15</b>	103.69	4.38	1	4	75.48	3	345.11	1

<sup>73</sup> Yap, Chun Wei. "PaDEL-Descriptor: An Open Source Software to Calculate Molecular Descriptors and Fingerprints." *Journal of Computational Chemistry* 32, no. 7 (May 2011): 1466–74. doi:10.1002/jcc.21707.

Compuesto	MR	CLogP	nHBD	nHBA	PSA	nRB	MW	Ro5 Fallos
<b>16</b>	95.17	4.61	1	3	32.34	2	300.13	1
<b>17</b>	97.05	3.74	1	3	32.34	3	314.14	1
<b>18</b>	108.27	4.63	1	5	50.8	4	360.15	1
<b>19</b>	100.18	5.27	1	4	32.34	2	334.09	1
<b>20</b>	108.71	5.02	1	4	75.48	3	359.13	1
<b>21</b>	79.13	3.39	1	5	49.41	2	286.05	0
<b>22</b>	74.12	2.74	1	4	49.41	2	252.09	0
<b>Benznidazol</b>	72.40	4.30	0	16	114.4	3	273.27	1

En contraste con los tratamientos en las enfermedades no infecciosas, los cuales actúan en blancos extracelulares como son los receptores de membrana, la quimioterapia antiparasitaria requiere la incorporación de la droga por el patógeno y así llegar al blanco intracelular. Si el patógeno se encuentra alojado dentro de las células del huésped entonces la actividad biológica de la droga dependerá tanto de la eficiencia en la entrada en la célula como en la especificidad hacia el blanco. Para este escenario se estima que la entrada dependerá del fenómeno de difusión pasiva a través de la membrana o mediante mecanismos de transporte por proteínas. El primer fenómeno es clásico para moléculas lipofílicas, mientras que el segundo lo es para compuestos hidrofílicos. En general, todos los candidatos diseñados presentaron un adecuado perfil farmacológico. Para este estudio se toleró la violación del parámetro ClogP de la Regla de Lipinski.

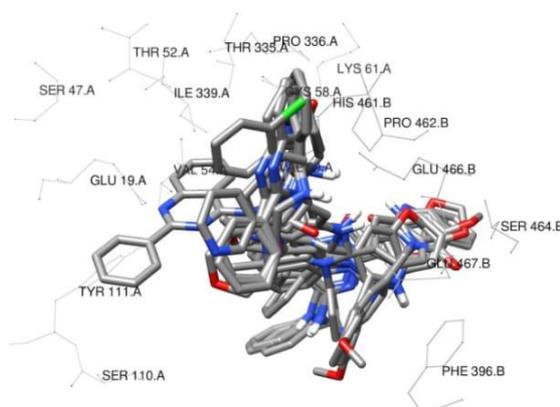
#### *Cálculos in silico*

La estructura tridimensional de la TryR del *Trypanosoma cruzi* (PDB: 1BZL) se descargó del Protein Data Bank. Se eliminaron todas las moléculas no proteicas (tripanotiona, FAD, agua). La TryR fue modificada agregando los hidrógenos polares a pH citosólico mediante OpenBabel, dejando los aminoácidos dentro del sitio de búsqueda como rígidos.

El espacio de búsqueda se configuró como un cubo de 26 Å de lado (17576 Å<sup>3</sup>), cuyo punto de origen es x=23.250, y=7.361, z=-3.500. De estos valores se deduce que moléculas pequeñas pueden presentar orientaciones diferentes e incluso existe la posibilidad que más de una molécula se encuentre en el sitio de unión, como ocurre con el complejo mepacrina-

TryR del *Trypanosoma cruzi*<sup>74</sup>. Para cada cálculo, se generaron siete conformaciones (num\_modes) del ligando ordenadas según energía de afinidad ( $\Delta G_{bind}$ , kcal/mol) dada por la función de puntaje de Vina. El parámetro exhaustiveness empleado fue de 30. Las estructuras fueron convertidas en formato PDB a través del script de Python propio de MGLTools 1.5.6rc1 con los parámetros por defecto.

La visualización de los resultados se realizó con el software UCSF Chimera 1.8, empleando la estructura de la proteína de TryR usada en el cálculo de acoplamiento. En la figura se puede observar la superposición de la conformación con menor energía para cada una de las 22 estructuras.



**Figura 34. Superposición estructuras 1-22 en el sitio de unión de T[S]<sub>2</sub> (no representada).**

Estos compuestos pueden resultar tripanomicidas al prevenir la reducción de T[S]<sub>2</sub> en el sitio catalítico lo cual conlleva a la disminución de tioles en el citoplasma, alterando el potencial redox del parásito. La variación en la distribución espacial de las estructuras en el sitio activo se correlaciona con la amplia superficie del segmento de unión del sustrato.

En la tabla 5 se muestran los valores de afinidad *in silico* y las interacciones puente de hidrógeno calculadas de los compuestos diseñados con los átomos circundantes de la TryR.

**Tabla 6. Valores de afinidad *in silico* e interacciones con los átomos circundantes de 1-22**

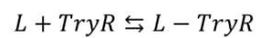
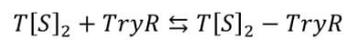
Comp.	$\Delta G_{bind}$ (kcal/mol)	Interacciones Puente de hidrógeno con la TryR		
		Donor	Aceptor	Distancia (Å)
1	-6.7	SER 470.B OG	N2	3.0

<sup>74</sup> Saravanamuthu, A., T. J. Vickers, C. S. Bond, M. R. Peterson, W. N. Hunter, and A. H. Fairlamb. "Two Interacting Binding Sites for Quinacrine Derivatives in the Active Site of Trypanothione Reductase: A TEMPLATE FOR DRUG DESIGN." *Journal of Biological Chemistry* 279, no. 28 (July 9, 2004): 29493–500. doi:10.1074/jbc.M403187200.

Comp.	$\Delta G_{\text{bind}}$ (kcal/mol)	Interacciones Puente de hidrógeno con la TryR		
		Donor	Aceptor	Distancia (Å)
<b>2</b>	-8.1	LEU 399.B N	O2	3.2
		SER 470.B OG	O1	2.8
<b>3</b>	-8.0	SER 470.B OG	N2	3.1
<b>4</b>	-8.3	SER 464.B OG	O1	2.8
<b>5</b>	-8.6	N3	SER 470.B OG	3.1
<b>6</b>	-7.4	N1	GLU 466.B OE2	3.2
		LEU 399.B N	O2	3.3
		SER 464.B OG	O3	3.0
<b>7</b>	-9.2	-	-	-
<b>8</b>	-7.9	N3	CYS 469.B O	3.3
		SER 470.B OG	N2	3.4
<b>9</b>	-7.8	-	-	-
<b>10</b>	-8.2	TYR 111.A OH	N1	3.1
<b>11</b>	-8.3	N3	CYS 469.B O	3.2
		SER 470.B OG	N2	3.3
<b>12</b>	-7.5	-	-	-
<b>13</b>	-7.5	-	-	-
<b>14</b>	-8.0	GLY 459.B N	O1	3.2
		SER 470.B OG	O2	3.1
<b>15</b>	-7.6	-	-	-
<b>16</b>	-7.8	-	-	-
<b>17</b>	-7.5	SER 464.B OG	O1	2.8
<b>18</b>	-7.4	SER 470.B OG	O1	3.2
<b>19</b>	-7.9	SER 464.B OG	O1	2.7
<b>20</b>	-8.3	-	-	-
<b>21</b>	-7.4	LYS 62.A NZ	O2	3.0
		SER 464.B OG	O1	2.7
<b>22</b>	-7.5	-	-	-

Comp.	$\Delta G_{\text{bind}}$ (kcal/mol)	Interacciones Puente de hidrógeno con la TryR		
		Donor	Aceptor	Distancia (Å)
T[S] <sub>2</sub>	-8.6	TYR 111.A OH	O3	2.8
		GLU 19.A OE	N1	3.0
		GLU 466.B OE	O7	3.2

El escenario más simple que se puede modelar es un fenómeno competitivo entre el ligando diseñado y la T[S]<sub>2</sub> por ocupar el sitio de acción de la TryR con su consecuente inhibición e inactivación para su función biológica. Por lo tanto, el fenómeno de competencia entre ligandos son dos reacciones bimoleculares:



Definiendo dos constantes de afinidad, una para la tripanotona,  $K_{\text{bindT}[S]_2}$ , y otra para el ligando,  $K_{\text{bindL}}$ :

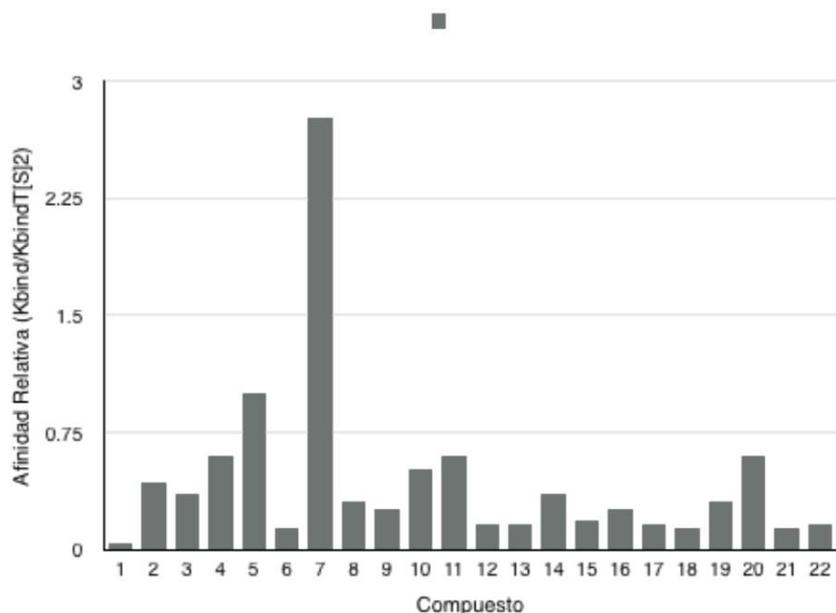
$$K_{\text{bindT}[S]_2} = 10^{\frac{\Delta G_{\text{bindT}[S]_2}}{2.303 \cdot RT}}$$

$$K_{\text{bindL}} = 10^{\frac{\Delta G_{\text{bindL}}}{2.303 \cdot RT}}$$

La relación de las constantes de unión quedan:

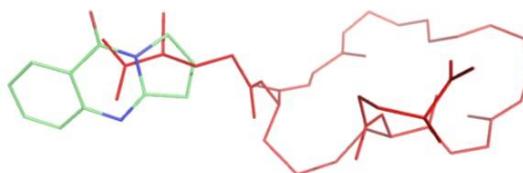
$$\frac{K_{\text{bindL}}}{K_{\text{bindT}[S]_2}} = 10^{\frac{\Delta G_{\text{bindT}[S]_2} - \Delta G_{\text{bindL}}}{2.303 \cdot RT}}$$

Siendo  $K_{\text{bindL}}/K_{\text{bindT}[S]_2}$  la Afinidad Relativa del ligando con el sustrato natural:



**Figura 35. Afinidad Relativa de los compuestos 1-22 respecto del complejo T[S]<sub>2</sub>-TryR.**

Como se observa en la tabla 6, los compuestos **1**, **2**, **3**, **5**, **8**, **11**, **14** y **18** interactúan mediante uniones puente de hidrógeno con la SER470 de la cadena B de TryR. El compuesto **10** interactúa con el residuo TYR111 de la cadena A, el cual forma parte de la unión específica con la T[S]<sub>2</sub> en el complejo natural. El compuesto **14** con GLY459 de la cadena B, la glicina en esta posición forma un puente de hidrógeno con una molécula de agua en el modelo cristalizado. El compuesto con menor afinidad resulta **1**, a pesar de encontrarse estabilizado por una unión puente de hidrógeno en su nitrógeno quinazolínico en posición 3 de la estructura. Además **1** presenta una ubicación diferente al resto de las estructuras, ya que se ubica en el extremo carboxílico de la T[S]<sub>2</sub>, sin ocupar mucho espacio en el sitio de unión del sustrato natural (Figura 36).

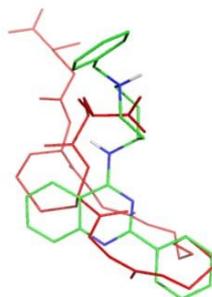


**Figura 36. Ubicación de 1 en el sitio activo respecto a T[S]<sub>2</sub> cristalizada (rojo)**

Los compuestos **7**, **9**, **12**, **13**, **15**, **16**, **20** y **22** no forman puentes de hidrógeno con los residuos circundantes sugiriendo que la estabilización del complejo se debe a los otros componentes moleculares energéticos como son las energías de solvatación, las interacciones electrostáticas de tipo Coulomb y las contribuciones energéticas de los ángulos de torsión de enlace (Capítulo III).

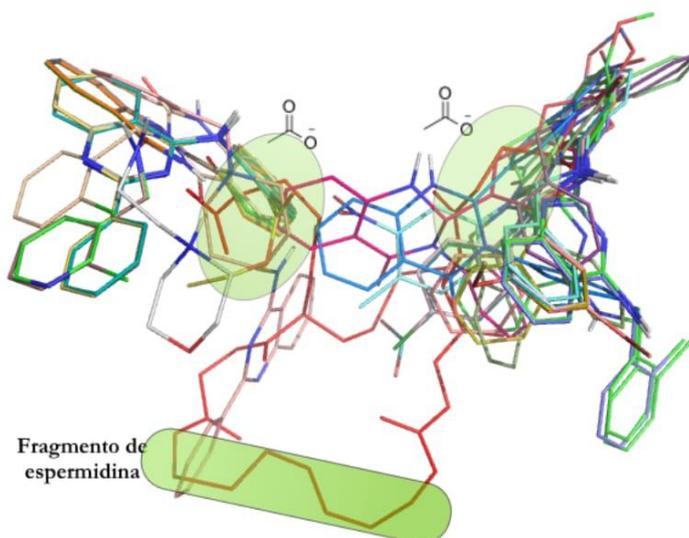
Los compuestos **4**, **6**, **17**, **19** y **21** forman puente de hidrógeno con el residuo SER464 de la cadena B a través de sus oxígenos que actúan como aceptores de hidrógeno.

La estructura **5** posee una orientación diferente al resto de las moléculas ya que se extiende hacia el extremo N de la T[S]<sub>2</sub> acercándose al fragmento de espermidina por su anillo 2-fenilo.



**Figura 37. Ubicación de 1 en el sitio activo respecto a T[S]<sub>2</sub> cristalizada**

Exceptuando a **1**, el resto de las estructuras mantienen una ubicación tal que el extremo más lipofílico se orienta hacia el extremo de espermidina de T[S]<sub>2</sub> y el extremo más polar y con capacidad de formar uniones puente de hidrógeno se orienta hacia el extremo carboxilato de alguna de las dos ramas de glutarimida de T[S]<sub>2</sub>. (Figura 38)

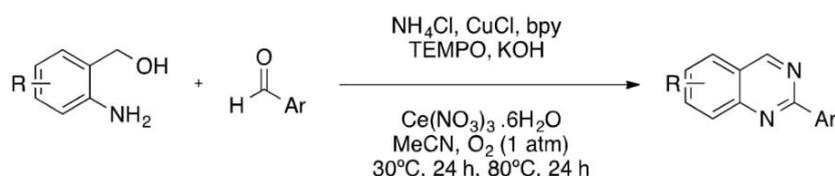


**Figura 38. Disposición espacial de 1-22 con respecto a la T[S]<sub>2</sub> cristalizada, indicando los extremos carboxilato**

De éste modelo se puede inducir que los ligandos diseñados ofrecerán cierta afinidad con el sitio de unión/catalítico del complejo T[S]<sub>2</sub>-TryR además de ocupar parte del espacio necesario para la ubicación correcta de la T[S]<sub>2</sub> en el proceso de reducción.

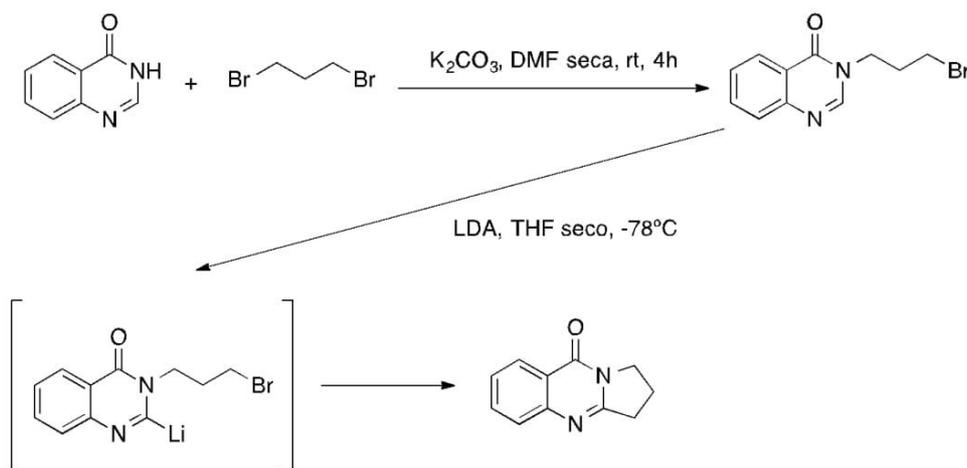
A partir de los resultados obtenidos se decidió llevar a cabo la síntesis de los derivados de quinazolina propuestos con el fin de validar u optimizar el modelo planteado.

Para la síntesis del núcleo base de quinazolina se han reportado reacciones de derivados del 2-aminofenilmetanol con aldehídos, empleando un catalizador de cobre además de la combinación de nitrato de cerio hexahidratado y cloruro de amonio, lo cual llevó a obtener un rango amplio de quinazolin-2-sustituidas con buenos rendimientos<sup>75</sup>. Éste método tolera varios grupos funcionales y representa una buena estrategia de síntesis de este núcleo sustituido en C-2 (Esquema 2).



**Esquema 2. Síntesis del núcleo quinazolin-2-sustituido (Chen y col.)<sup>75</sup>**

Dentro del núcleo base de quinazolinona se encuentra la deoxivasicinona (compuesto **1**)<sup>76</sup> cuya síntesis clásica implica múltiples pasos y rendimiento moderados (Esquema 3)<sup>77</sup>.



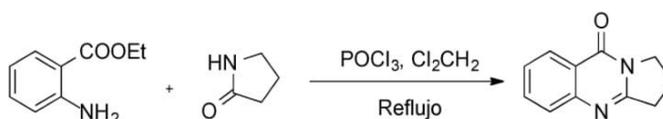
**Esquema 3. Síntesis de deoxivasicinona según Potewar (2008)<sup>77</sup>**

<sup>75</sup> Chen, Zhongyan, Jiuxi Chen, Miaochang Liu, Jinchang Ding, Wenxia Gao, Xiaobo Huang, and Huayue Wu. "Unexpected Copper-Catalyzed Cascade Synthesis of Quinazoline Derivatives." *The Journal of Organic Chemistry* 78, no. 22 (November 15, 2013): 11342–48. doi:10.1021/jo401908g.

<sup>76</sup> Azimova, Shakhnoza S., and Marat S. Yunusov, eds. "Deoxyvasicinone." In *Natural Compounds*, 561–561. New York, NY: Springer New York, 2013. [http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-1-4614-0560-3\\_1089](http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-1-4614-0560-3_1089).

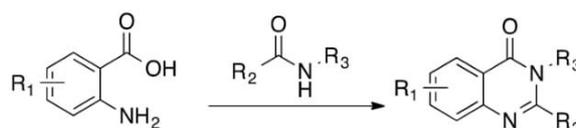
<sup>77</sup> Potewar, Taterao M. "Synthesis of Tryptanthrin and Deoxyvasicinone by a Regioselective Lithiation-Intramolecular Electrophilic Reaction Approach." *Arkivoc* 2008, no. 14 (August 29, 2008): 100-105. doi:10.3998/ark.5550190.0009.e11.

En nuestro laboratorio propusimos una síntesis más sencilla y rápida que implica la ciclocondensación de antranilato de etilo con 2-pirrolidona en presencia de  $\text{POCl}_3$  a  $60^\circ\text{C}$  (Esquema 4). Se obtuvieron mejores rendimientos que en la síntesis reportada según Potewar<sup>77</sup>.



**Esquema 4. Síntesis de 1 por ciclocondensación entre antranilato de etilo y 2-pirrolidona.**

El método sintético más común para formar quinazolin-4-ona 2,3-disustituidas es la reacción de Niementowski<sup>78</sup>, la cual es una ciclocondensación de ácido antranílico con amidas secundarias y requiere altas temperaturas ( $130\text{-}150$ )  $^\circ\text{C}$  y largos tiempos de reacción (6 horas o más).



**Esquema 5. Síntesis de quinazolinonas 2,3-disustituidas mediante la reacción de Niementowski.**

En nuestro laboratorio utilizamos diferentes amidas con la expectativa de lograr la síntesis de dichas quinazolinonas 2,3-disustituidas mediante la ciclocondensación de Niementowski. Se empleó tanto el calentamiento convencional como a través de microondas sin la obtención exitosa de los compuestos esperados debido a la ausencia de reacción.

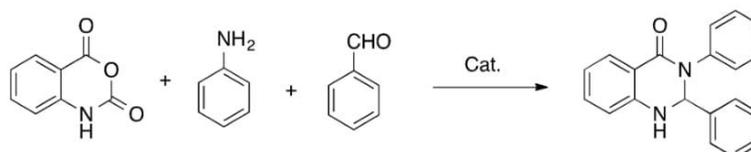
Para la síntesis del heterociclo **12** se usó la 4-cloro-2-fenilquinazolina adquirida comercialmente y se calentó en un medio alcalino acuoso.

La introducción de un átomo de cloro en la posición 4 del esqueleto de quinazolinona se describió en la literatura a través del uso de  $\text{PCl}_5/\text{POCl}_3$  o cloruro de tionilo. Las 4-cloroquinazolinonas son intermediarios sintéticos importantes ya que pueden ser derivatizados a través del ataque nucleofílico en la posición C-4. A partir de la reacción de derivados de 4-cloro-2-fenilquinazolina con aminas aromáticas y alifáticas diversas, se obtuvieron los compuestos **2-11**.

<sup>78</sup> Niementowski, St. "Zur Kenntniss der Anhydroverbindungen." *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 19, no. 1 (January 1886): 715–24. doi:10.1002/cber.188601901162.

La síntesis del núcleo 2,3-dihidroquinazolinona ha evolucionado en la última década para lograr un proceso que responda a los estándares de la química verde<sup>79</sup>. En este sentido, se desarrollaron reacciones orgánicas heterogéneas las cuales presentan muchas ventajas, tales como facilidad en la manipulación, separación, reciclado y eliminación de residuos. Apuntando a esto, en años recientes se ha enfocado la aplicación de nanopartículas como catalizadores heterogéneos. En contraste con las técnicas clásicas de síntesis de 2,3-dihidroquinazolin-4(1*H*)-ona que involucran varios pasos y tiempos largos de reacción, se llegó a establecer una serie de reacciones multicomponente de un paso en las cuales interviene el anhídrido isatoico, aminas y aldehídos<sup>80</sup>. Estas reacciones tienen ciertas ventajas sobre las técnicas clásicas tales como menor costo, menores tiempos de reacción, menor cantidad de productos secundarios a la vez que ofrece mejores prospectos ambientales. Dentro de los catalizadores ácidos más empleados se encuentran la montmorillonite K-10, Zn(II), alumbre de potasio  $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ , triflato de galio, Amberlyst-15 y sílica gel<sup>81</sup>.

Durante el desarrollo de este trabajo de tesis se probaron tres tipos de catalizadores heterogéneos diferentes: sílica gel, alumbre de potasio y Amberlyst-15. Además de los catalizadores, se variaron los solventes empleados en la reacción. Para la síntesis de 2,3-dihidroquinazolin-4(1*H*)-ona 2,3-disustituidas se empleó como modelo la reacción multicomponente al anhídrido isatoico, anilina y benzaldehído (proporción 1:1:1) para dar 2,3-difenil-2,3-dihidroquinazolin-4(1*H*)-ona.



**Esquema 6. Reacción modelo de síntesis de 2,3-difenil-2,3-dihidroquinazolin-4(1*H*)-ona mediante catálisis heterogénea.**

Tanto el uso de alumbre de potasio, sílica gel y Amberlyst-15 en ausencia de solvente no arrojaron resultados favorables para la síntesis de la quinazolina buscada. Esto nos llevó a plantear el uso de solventes empleando aquéllos compatibles con el paradigma de la

<sup>79</sup> Uozumi, Yasuhiro. "Green Chemistry - A New Paradigm of Organic Synthesis." *Synlett* 2010, no. 13 (August 2010): 1988–89. doi:10.1055/s-0030-1258542.

<sup>80</sup> Shaterian, Hamid Reza, Ali Reza Oveisi, and Moones Honarmand. "Synthesis of 2,3-Dihydroquinazolin-4(1 H)-Ones." *Synthetic Communications* 40, no. 8 (March 19, 2010): 1231–42. doi:10.1080/00397910903064831.

<sup>81</sup> Zhang, Zhan-Hui, Hong-Yan Lü, Shu-Hong Yang, and Jian-Wu Gao. "Synthesis of 2,3-Dihydroquinazolin-4(1 H)-Ones by Three-Component Coupling of Isatoic Anhydride, Amines, and Aldehydes Catalyzed by Magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles in Water." *Journal of Combinatorial Chemistry* 12, no. 5 (September 13, 2010): 643–46. doi:10.1021/cc100047j.

química verde, siendo los elegidos el etanol y el agua<sup>82</sup>. En este caso, el empleo de sílica y alumbre se descartó debido a la pérdida de capacidad catalítica en presencia de estos solventes.

**Tabla 7. Comparación de las condiciones de reacción para obtener 2,3-difenil-2,3-dihidroquinazolin-4(1H)-ona**

Catalizador	Solvente	Producto*
Sílica gel	-	-
Alumbre de potasio	-	-
Amberlyst-15	-	-
Amberlyst-15	EtOH	20 %
Amberlyst-15	H <sub>2</sub> O	15 %
Amberlyst-15	EtOH:H <sub>2</sub> O (9:1)	45 %
Amberlyst-15	EtOH:H <sub>2</sub> O (8:1)	49 %
Amberlyst-15	EtOH:H <sub>2</sub> O (7:1)	55 %
Amberlyst-15	EtOH:H <sub>2</sub> O (6:1)	46 %

\*Los rendimientos no fueron optimizados

Se encontró que la mejor combinación de catalizador y solvente en nuestros experimentos consistió en Amberlyst-15 en un medio de etanol:agua en proporción 7:1 mediante calentamiento convencional a reflujo. Con esta técnica se sintetizaron los compuestos **13-20**.

Los compuestos **21** y **22**, derivados de 3-bencilquinazolin-2,4-(1*H*,3*H*)-diona, se sintetizaron a partir del anhídrido isatoico y la bencilamina sustituida convenientemente mediante calentamiento a reflujo sin solvente.

#### *Actividad anti-Tripanosoma cruzi*

Todos los compuestos sintetizados se evaluaron in vitro frente a la forma no infectiva epimastigote de *T. cruzi* cepa Tulahuen (cepa 2). La capacidad de inhibir el crecimiento del parásito se evaluó en comparación con el control (sin agregado de droga). Se empleó benznidazol como droga tripanocida de referencia.

<sup>82</sup> Dunn, Peter. "Water as a Green Solvent for Pharmaceutical Applications." In Handbook of Green Chemistry, edited by Paul T. Anastas. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2010. <http://doi.wiley.com/10.1002/9783527628698.hgc058>.

Tabla 8. Resultados de actividad *in vitro* en cultivo de epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi*

Compuesto	IC <sub>50</sub> (Epi) (SD) (μM)	IC <sub>50</sub> (Tripo) (SD) (μM)
1	> 15	N.D.
2	7.43 (0.80)	>>100
3	2.75 (0.48)	50.64 (2.80)
4	> 15	>> 100
5	> 15	N.D.
6	14.04 (0.56)	22.88 (2.15)
7	3.04 (0.75)	111.00 (5.72)
8	> 15	N.D.
9	10.57 (0.67)	>> 100
10	6.38 (0.39)	>> 100
11	5.80 (0.27)	>>100
12	> 15	N.D.
13	17.95 (0.56)	N.D.
14	11.81 (0.23)	>> 100
15	> 15	N.D.
16	10.55 (0.21)	>> 100
17	> 15	N.D.
18	30.52 (0.94)	N.D.
19	> 15	N.D.
20	12.59 (0.48)	27.85 (5.60) <sup>A</sup>
21	11.25 (0.12)	N.D.
22	> 15	N.D.
<b>Benznidazol</b>	5.49 (0.89)	30.26 (2.85)

<sup>A</sup> A mayores concentraciones de droga sigue produciendo el 60% de lisis de tripomastigotes

SD: desvío estándar

N.D.: no determinado

El análisis SAR no resulta determinante en cuanto a la predicción de la actividad de estos derivados. Si tomamos como punto de partida la molécula más sencilla sintetizada la 2,3-dihidropirrol[2,1-*b*]quinazolin-9(1*H*)-ona (**1**) notamos que este núcleo es completamente inactivo *in vitro*. Puede decirse, someramente, que las sustituciones más relevantes en

cuanto a su impacto en la actividad resultan del agregado de sustituyentes en las posiciones **2** y **4**, así como la presencia de la aromaticidad en el núcleo quinazolínico. La inclusión en posición 2 de restos aromáticos fenílicos incrementan la actividad. La presencia de grupos alcoxi en los compuestos **6, 7** podrían funcionar como aceptores de puente de hidrógeno. La presencia en posición 4 de aminas derivadas de anilina en general presentan una buena actividad antiparasitaria (**9, 10**). Los derivados alifáticos de amina (**4, 5**) no demostraron poseer actividad. Sin embargo, los compuestos **2, 3, 6, 7** y **11** que presentan en posición 4 restos de bencilamina, son los derivados que presentan la mejor actividad de esta serie propuesta. En particular, los compuestos **3** y **7** presentaron una actividad tripanocida frente a la forma epimastigote 2 veces superior a la droga de referencia, benznidazol.

La excelente actividad frente a la forma epimastigote de *T. Cruzi* de los compuestos **2, 3, 6, 7, 10, 11, 14, 16 y 20** nos llevó a determinar la actividad de estos compuestos frente a la forma infectiva del parásito, tripomastigote, que se encuentra presente en los seres humanos.

Los compuestos **6** y **20** presentaron una actividad frente a la forma tripomastigote similar a la droga de referencia benznidazol. Sin embargo, los compuestos **3, 7, 9, 10** y **16** que presentaron una buena o moderada actividad frente a la forma epimastigote resultaron inactivas frente a la forma infectiva del parásito.

Con el objeto de corroborar el modelo propuesto para los derivados de quinazolina como potenciales inhibidores de la TryR, se evaluó el efecto *in vitro* del compuesto **11** sobre la actividad de esta enzima. Dicho compuesto se eligió como ejemplo por ser uno de los más activos de la serie. La actividad de la TryR se midió en función de NADPH, cofactor necesario para que pase de su forma oxidada a la forma reducida. El compuesto se ensayó a 50 y 100  $\mu\text{M}$  y a una concentración de la tripanotona de 25  $\mu\text{M}$ . Esta concentración de sustrato, no saturante para la enzima, nos asegura poder evidenciar el efecto de inhibidores competitivos, que a concentraciones saturantes de tripanotona no podría manifestarse. Como se observa en la tabla 9 el compuesto **11** manifiesta un efecto neto inhibitorio a una concentración de 50  $\mu\text{M}$  que se contrarresta en parte al aumentar la concentración.

**Tabla 9. Actividad inhibitoria de 11 en TryR.**

Compuesto	Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Actividad enzimática	
		UE/ml	Porcentaje
<b>11</b>	50	65.79 $\pm$ 5.29	53 $\pm$ 4
	100	86.16 $\pm$ 3.20	70 $\pm$ 3
<b>Control</b>	-	123,99 $\pm$ 3,45	100

Este resultado nos indicaría que uno de los probables mecanismos por el cual el compuesto **11** estaría ejerciendo su acción antiparasitaria, es mediante la inhibición de la TryR.

#### Análisis QSAR

Se realizó un análisis de correlación entre los valores de IC<sub>50</sub> determinados experimentalmente en epimastigotes de *T. cruzi* y las energías de unión obtenidas con Vina (Tabla 10). A partir de estos datos se desarrolló un modelo de predicción de actividad biológica para esta serie de compuestos y se obtuvo una correlación media negativa (Bravais-Pearson  $r = -0.728$ ).

Una correlación negativa con respecto al  $pK_{bind}$  del ligando se explica al tomar en cuenta que una aumento en la energía de unión ( $\Delta G_{bind}$  se hace más negativo) corresponde a un aumento de la  $K_{bind}$  del compuesto, si tomamos en cuenta un proceso competitivo entre el ligando y el sustrato natural por ocupar el sitio de unión el aumento en  $K_{bind}$  correspondería con la disminución de la actividad enzimática.

**Tabla 10. Correlación Bravais-Pearson entre los descriptores calculados y la actividad biológica *in vitro*.**

	<b>pIC<sub>50</sub>(Epi)</b>	<b>pK<sub>bind</sub></b>	<b>MR</b>	<b>CLogP</b>	<b>PSA</b>	<b>MW</b>
<b>pIC<sub>50</sub>(Epi)</b>		-0.728	0.103	0.591	-0.348	-0.044
<b>pK<sub>bind</sub></b>	-0.728		-0.529	-0.708	-0.057	-0.465
<b>MR</b>	0.103	-0.529		0.454	0.302	0.861
<b>CLogP</b>	0.591	-0.708	0.454		-0.383	0.122
<b>PSA</b>	-0.348	-0.057	0.302	-0.383		0.573
<b>MW</b>	-0.044	-0.465	0.861	0.122	0.573	

Se efectuó una regresión lineal entre los valores de pIC<sub>50</sub> y la afinidad como  $pK_{bind}$  para establecer un modelo cuantitativo de relación estructura-actividad:

$$-\log IC_{50}(Epi) = pIC_{50}(Epi) = (-0.5200 \pm 0.1518) \cdot pK_{bind} + (2.000 \pm 0.8911)$$

$$R^2 = 0.5398, F = 11.73, P = 0.0065, n = 12$$

La ecuación obtenida presenta un ajuste medio ( $R^2 = 0.5398$ ) sugiriendo cierta limitación en la capacidad de predicción de actividad a partir de estos modelos. Esta limitación en los estudios de acoplamiento es bien conocida ya que en la función de puntaje se toman en

cuenta sistemas enzimáticos sólo a través de parámetros como la solvatación, la entropía y las interacciones electrostáticas. A todo esto se deben sumar los procesos de absorción, distribución, excreción, metabolismo y otros mecanismos biológicos propios del parásito que limitan la predicción de la actividad biológica.

Los compuestos con una energía libre de unión,  $\Delta G_{bind} \leq -8.1$  kcal/mol (**2, 4, 5, 7, 10, 11** y **20**) presentan violaciones en una de las condiciones de las Ro5 (CLogP > 5). Dentro de los compuestos más activos en epimastigote según el ensayo *in vitro* (**2, 3, 7, 10** y **11** con  $IC_{50}(Epi) < 8.0$   $\mu$ M) también ocurre la misma violación al superar el valor límite recomendado en lipofilicidad. Se puede notar un fuerte aporte del componente lipofílico (CLogP) a la actividad en epimastigotes (Bravais-Pearson  $r = 0.591$ ), ofreciendo una contribución positiva en la misma.

El aporte lipofílico también presenta correlación con la afinidad y esto coincide con el hecho que el ClogP se calcula a partir del aporte de los fragmentos estructurales de la molécula y la energía de unión toma en un todo a la molécula.

En conclusión, se sintetizaron y evaluaron 22 compuestos derivados del núcleo de quinazolina con diferentes sustituyentes. El diseño de estas estructuras se basó en los principios de la química medicinal moderna, empleando un modelo de diseño racional de fármacos enfocado en un blanco específico del parásito *T. cruzi*. Se estudiaron, mediante acoplamiento molecular, las afinidades de cada estructura con el sitio de unión/catálisis de la TryR encontrándose estructuras que poseen afinidad moderada con respecto al sustrato natural T[S]<sub>2</sub>. Se validó este modelo usando el compuesto **11** frente a la regulación de la actividad catalítica de la enzima TryR encontrándose una inhibición moderada cercana al 60%. Los compuestos **1-22** ensayados en las formas epimastigote fueron activos frente a ésta manteniendo cierta correlación con el puntaje obtenido con el cálculo de acoplamiento. Sólo los compuestos **6** y **20** resultaron activos también en la forma tripomastigote.

# Capítulo V

---

## Cribado virtual de librerías comerciales para la búsqueda de potenciales tripanomicidas

*“Es absolutamente imposible demostrarlo todo.”*

*Aristóteles*

## Introducción

Los cientos de miles de compuestos que han sido sintetizados por las compañías farmacéuticas a lo largo de los años, son una fuente alternativa de compuestos líderes, drogas o pro-drogas. La mayor parte de estos compuestos no han alcanzado el mercado pero se hallan disponibles en librerías para su eventual evaluación biológica. Es necesario mencionar que muchos de estos compuestos no han sido sintetizados considerando estrictamente los principios de química medicinal moderna e, incluso, ni siquiera sean drogas finales *per se* sino intermediarios sintéticos o subproductos de otras reacciones.

Dentro de las bases de datos más usadas, la librería ZINC (ZINC Is Not Commercial)<sup>83</sup> es la más completa. Se encuentran incluidas en la misma, otras bases de datos denominadas *subsets* que consisten en 295 catálogos, de los cuales 205 son de librerías comerciales. Dentro de éstas librerías comerciales se encuentra la correspondiente a los compuestos en venta de Sigma-Aldrich Family. Ésta ofrece la librería DiscoveryCPR anteriormente conocida como Sigma-Aldrich Chemicals. DiscoveryCPR es una colección de estructuras resultado de investigación de laboratorios de todo el mundo<sup>84</sup>. Esta librería de compuestos resulta interesante en la búsqueda de nuevos fármacos y para realizar estudios de similitud. Esta base de datos presenta el inconveniente que si un compuesto sale de circulación, no se modifica su existencia en la misma.

### *Diseño experimental in silico*

Para comenzar nuestro estudio se buscó en la oferta de librerías comerciales de ZINC eligiendo la librería que compone la Sigma-Aldrich DiscoveryCPR. El archivo que alberga las estructuras disponibles se encuentra en formato SDF. Contiene 199492 estructuras catalogadas hasta enero de 2014. Se empleó un filtro de compuestos que cumplieran con las siguientes propiedades fisicoquímicas:  $MW \leq 300$ ,  $CLogP \leq 3$  y  $PSA \leq 60$ .

Estos valores límites de cada descriptor se eligieron para poder identificar sustancias que, luego del cribado por acoplamiento, puedan ser modificadas para optimizar las propiedades ADME y/o su especificidad de unión con la proteína. Después de este primer filtrado con OpenBabel quedaron seleccionadas 32514 estructuras que cumplen con esos criterios.

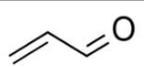
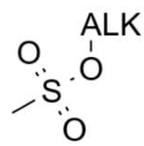
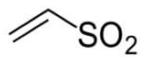
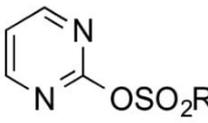
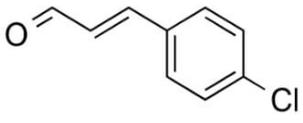
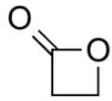
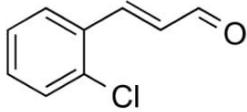
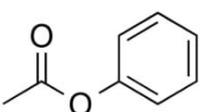
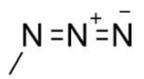
---

<sup>83</sup> Irwin, John J., Teague Sterling, Michael M. Mysinger, Erin S. Bolstad, and Ryan G. Coleman. "ZINC: A Free Tool to Discover Chemistry for Biology." *Journal of Chemical Information and Modeling* 52, no. 7 (July 23, 2012): 1757–68. doi:10.1021/ci3001277.

<sup>84</sup> "ZINC 12." ZINC Catalog Aldrich CPR. Web. 01 Jan. 2014. <http://zinc.docking.org/catalogs/sial>

De esta selección, se descartaron compuestos que poseen grupos funcionales reconocidos como extremadamente reactivos y, por lo tanto, potencialmente peligrosos para el huésped<sup>85</sup>. Para esto se empleó nuevamente OpenBabel usando como plantilla los códigos SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry System)<sup>86</sup> pertenecientes a cada grupo funcional (Tabla 11).

**Tabla 11. Ejemplos de grupos reactivos no deseados y su respectivo código SMILES.**

Grupo reactivo	SMILES	Grupo reactivo	SMILES
	<chem>CCBr, CCl, CCl</chem>		<chem>C=CC=O</chem>
	<chem>O=S(OC1=CC=CC=C1)(C)=O</chem>		<chem>C=C[S](=O)=O</chem>
	<chem>O=S(OC1=NC=CC=N1)([*])=O</chem>		<chem>ClC1=CC=C(/C=C/C=O)C=C1</chem>
	<chem>O=C1CCO1</chem>		<chem>ClC1=CC=CC=C1/C=C/C=O</chem>
	<chem>CC(OC1=CC=CC=C1)=O</chem>		<chem>[N-]=[N+]=N</chem>
	<chem>C1CO1</chem>		
	<chem>C1CN1</chem>		

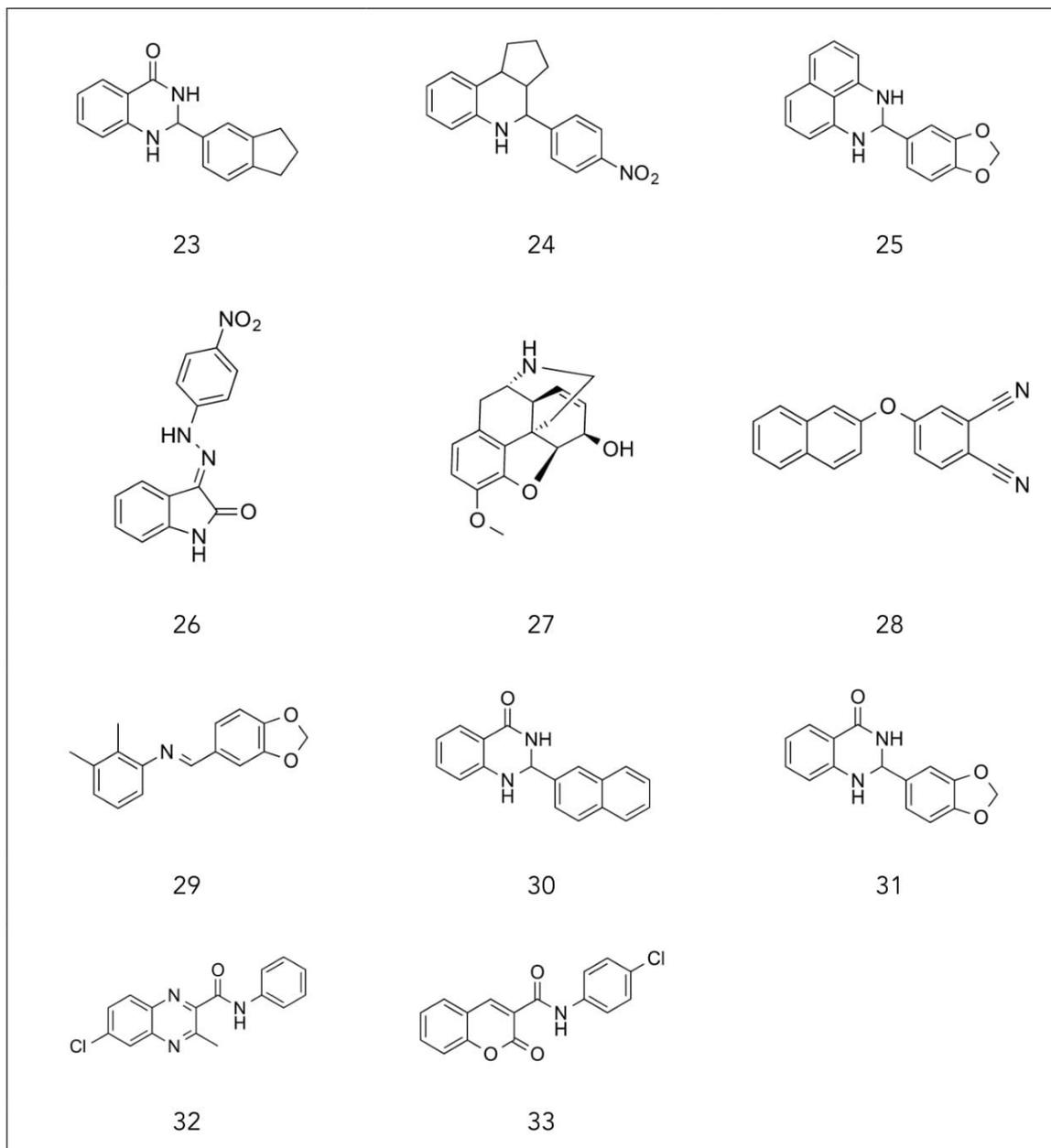
Posteriormente se realizó un acoplamiento empleando Autodock Vina 1.1.2. Como receptor se usó la TryR (PDB 1BZL) preparada empleando OpenBabel para adecuar los hidrógenos al pH de trabajo (pH 7.0) y los scripts propios de MGLTools 1.5.6rc1 para generar el receptor en formato PDBQT y los hidrógenos polares. En este paso se detectaron 327 moléculas con formato incorrecto o ilegible para su conversión.

<sup>85</sup> Utrecht, Jack. "Screening for the Potential of a Drug Candidate to Cause Idiosyncratic Drug Reactions." *Drug Discovery Today* 8, no. 18 (September 2003): 832–37. doi:10.1016/S1359-6446(03)02816-2.

<sup>86</sup> Toxicology, US EPA-National Center for Computational. "Computational Toxicology Research Program (CompTox)." Factsheets. Accessed February 1, 2014. <http://www.epa.gov/ncct/dsstox/MoreonSMILES.html>.

Los parámetros de búsqueda se calcularon en base al tamaño del sitio de unión e interacción del T[S]<sub>2</sub> en la TryR, asegurando la inclusión de los aminoácidos involucrados en la función catalítica (Capítulo IV). Del resultado se eligieron los compuestos con un  $\Delta G_{bind}$  menor o igual a -7.0 kcal/mol (Tabla 12 y tabla 13).

**Tabla 12. Estructuras 23 - 33 resultantes del cribado virtual.**



La variabilidad estructural de los potenciales ligandos es grande. Sin embargo, puede notarse que todos los compuestos resultantes del VS contienen nitrógeno, ya sea con hibridación  $sp^3$ ,  $sp^2$  o  $sp$  o formando parte de enlaces amida con otro ciclo. En uno de los

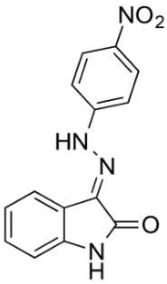
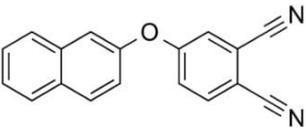
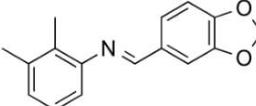
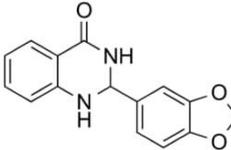
compuestos, existe la presencia del resto metilén dioxo (-OCH<sub>2</sub>O-), su inclusión resultó relevante en el aporte a la actividad antitripanosoma de uno de los derivados de quinazolina (**7**, **14**).

**Tabla 13. Energía de afinidad calculado e interacciones de puente de hidrógeno con los átomos circundantes a 4 Å.**

Comp.	$\Delta G_{\text{bind}}$ (kcal/mol)	Interacciones puente de hidrógeno con la enzima		
		Donor	Aceptor	Distancia (Å)
<b>23</b>	-7.6	-	-	-
<b>24</b>	-7.7	-	-	-
<b>25</b>	-7.8	LYS 62.A NZ	O	3.4
<b>26</b>	-7.8	LEU 399.B N	O	3.1
<b>27</b>	-7.0	LEU 399.B N	O	3.1
<b>28</b>	-7.9	GLY 459.B N	N	3.1
<b>29</b>	-8.1	SER 464.B OG	O	3.2
<b>30</b>	-7.3	-	-	-
<b>31</b>	-7.0	-	-	-
<b>32</b>	-7.4	-	-	-
<b>33</b>	-7.6	SER 470.B OG	N	3.4
<b>T[S]<sub>2</sub></b>	-8.6	TYR 111.A OH	O3	2.8
		GLU 19.A OE	N1	3.0
		GLU 466.B OE	O7	3.2

De estos 11 compuestos, se encuentran disponibles para la venta en el país los compuestos **26**, **28**, **29** y **31**. Estos fueron adquiridos a la empresa Sigma-Aldrich y tanto la estructura como los códigos de producto se visualizan en la tabla 14.

Tabla 14. Estructura y códigos de producto del catálogo Sigma-Aldrich disponibles.

 <p>(26) S408980</p>	 <p>(28) S141909</p>	 <p>(29) S620939</p>	 <p>(31) S551449</p>
---	---	--	---

Como se puede observar en la figura xxx, los compuestos **26**, **29**, y **31** se superponen en el extremo carboxilato ( $-\text{COO}^-$ ) en el brazo de glutarimida de la  $\text{T[S]}_2$ . Este grupo  $-\text{COO}^-$  se encuentra orientado hacia los residuos LYS62 de la cadena A, SER464 y LEU399 de la cadena B; éstos dos últimos aminoácidos forman uniones puente de hidrógeno con las estructuras **26** y **29**. Por otro lado, la estructura **28** ocupa completamente el espacio del otro brazo de glutarimida que, en su extremo  $-\text{COO}^-$ , se orienta hacia los residuos GLY459 y SER470 de la cadena B. Aquí también se produce la formación de una unión puente de hidrógeno entre el compuesto **28** (siendo el aceptor el Nsp) y la GLY459 de la cadena B.

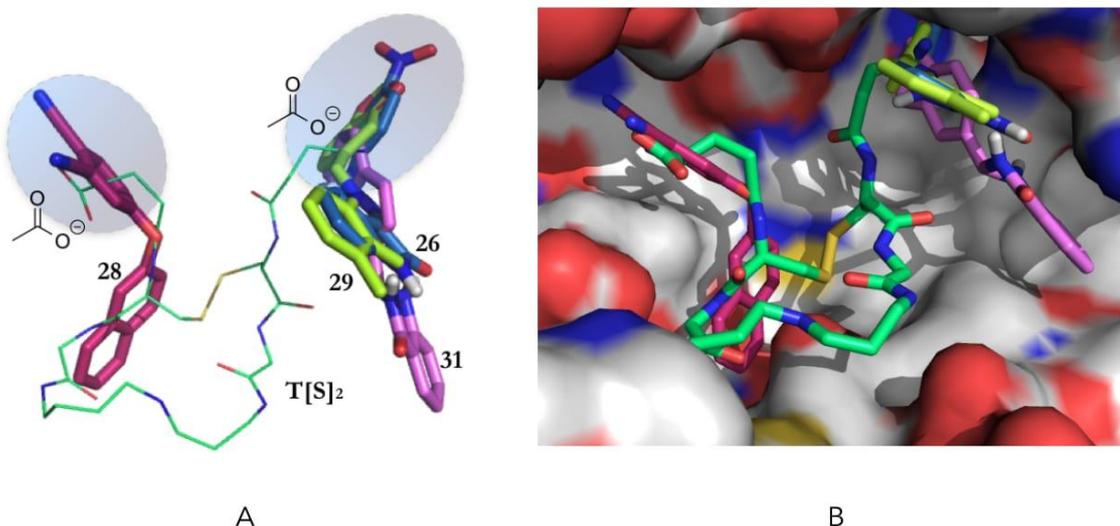


Figura 39. A) Orientación de los compuestos **26**, **28**, **29** y **31** respecto a la  $\text{T[S]}_2$ . B) Ubicación de las estructuras en el sitio catalítico de TryR (en verde  $\text{T[S]}_2$ )

Según este modelo de acoplamiento, se podría esperar la inhibición de la función catalítica de la enzima al presentarse la posibilidad de interferir en la unión y ubicación de la  $\text{T[S]}_2$  en su conformación activa en el sitio de acción de la TryR.

En cuanto a las afinidades relativas de los compuestos acoplados, todas ofrecen una afinidad menor que la T[S]<sub>2</sub> (Figura 40). Si se considerara el modelo de inhibición competitiva entre cada compuesto (**26**, **28**, **29** y **31**) y la T[S]<sub>2</sub> resultaría que ninguno de ellos podría superar la afinidad del sustrato natural. Sin embargo, esto no descarta la acción inhibitoria *per se* de las estructuras ya que el fenómeno de inhibición no covalente es un proceso de equilibrio dinámico como se comentó en el Capítulo III de esta tesis.

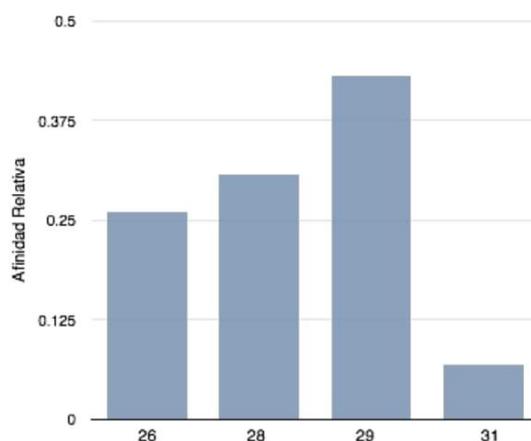


Figura 40. Afinidad relativa de los compuestos **26**, **28**, **29**, **31** respecto a T[S]<sub>2</sub>.

#### Actividad enzimática

Se evaluó la actividad de TryR de los compuestos **26** y **28**. Se probaron concentraciones 50 y 100 µM de estos compuestos y se empleó una concentración de tripanotona de 25 µM. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 15. Se observa según los compuestos ensayados una serie de comportamientos diferentes:

- El compuesto **26** aumenta el consumo de NADPH, lo que produce un aumento de actividad de 2,3 veces para una concentración de droga 50 µM. Este efecto activante disminuye al aumentar la concentración de **26** a 100 µM.
- El compuesto **28** manifiesta a concentración 50 µM un neto efecto inhibitorio, que al igual que el efecto activante de **26**, se contrarresta en parte al aumentar la concentración.

Tabla 15. Influencia en la actividad de TryR de 26 y 28

Droga	Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Actividad enzimática	
		UE/ml	Porcentaje
<b>26</b>	50	285,43 $\pm$ 15,89	230 $\pm$ 13
	100	194,18 $\pm$ 12,65	157 $\pm$ 10
<b>28</b>	50	83,40 $\pm$ 4,38	67 $\pm$ 4
	100	99,21 $\pm$ 6,75	80 $\pm$ 5
<b>Control</b>	-	123,99 $\pm$ 3,45	100

Se descartó que el efecto activante de **26** pudiera deberse a una probable reducción no enzimática dependiente sólo de NADPH. Para que el efecto activante se manifieste se requería del cofactor reducido, la enzima y concentraciones de tripanotona no menores a 25  $\mu\text{M}$ . Cuando el efecto de **26** se analizó a una concentración 15  $\mu\text{M}$  de tripanotona, este compuesto manifestó una capacidad inhibitoria proporcional a su concentración (Figura 41).

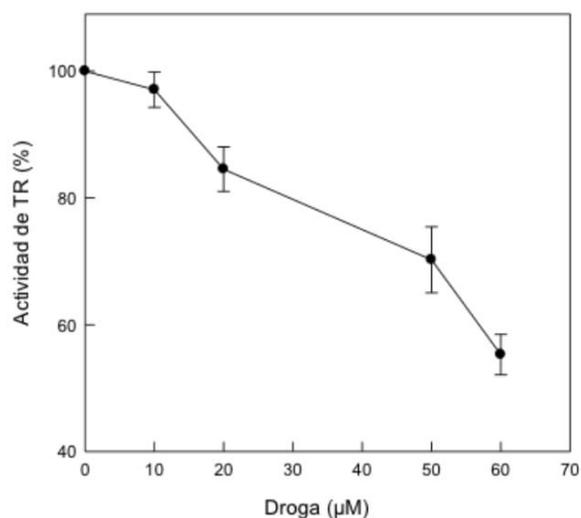


Figura 41 Efecto inhibitorio de 26 sobre la actividad de TryR.

Esta disparidad de comportamientos pondría de manifiesto no sólo la probabilidad de los distintos compuestos de interactuar sobre sitios diferentes en la estructura tridimensional de la proteína, sino además un comportamiento alostérico para esta enzima que ya fue

reportado<sup>87</sup>. Se requiere de estudios cinéticos adicionales para dilucidar el tipo de inhibición y mecanismo por el cual estos compuestos ejercen su acción.

#### *Actividad anti-Tripanosoma cruzi*

Todos los compuestos se evaluaron *in vitro* frente a *T. cruzi* cepa Tulahuen (cepa 2) bajo la forma no infectiva epimastigote. Se empleó benznidazol como droga tripanocida de referencia.

El compuesto **26** fue el único de los cuatro compuestos ensayados que posee un valor de IC<sub>50</sub> inferior al benznidazol. El compuesto **31**, en contraparte con su análogo estructural, compuesto **14** resultó ser inactivo. Este resultado podría ser atribuido a la falta de un resto fenilo en posición 3-del núcleo quinazolina.

**Tabla 16. Actividad *in vitro* frente a epimastigotes y tripomastigotes de 26, 28, 29 y 31.**

Compuesto	IC <sub>50</sub> (Epi) (SD) ( $\mu$ M)	IC <sub>50</sub> (Tripo) (SD) ( $\mu$ M)
<b>26</b>	4.52 (0.36)	>>100
<b>28</b>	>15	>>100
<b>29</b>	>15	N.D.
<b>31</b>	>15	N.D.
<b>Benznidazol</b>	5.49 (0.89)	30.26 (2.85)

SD: desvío estándar

El ensayo de actividad frente a la forma tripomastigote se evaluó en los compuestos **26** y **28**. En estos dos casos la actividad frente a la forma infectiva del tripanosoma fue nula (Tabla 16).

En conclusión, se llevó a cabo un cribado molecular con ~200000 compuestos de los cuales luego de un proceso de filtrado e inspección visual riguroso se seleccionaron once y se adquirieron y ensayaron cuatro de ellos. El compuesto **26** presentó actividad tripanocida en el orden bajo micromolar, similar a la droga de referencia. Además, dicho compuesto posee un efecto inhibitorio de la TryR en las distintas concentraciones evaluadas y una concentración de T[S]<sub>2</sub> de 15  $\mu$ M. Identificando al compuesto **26** como molécula líder. Los

<sup>87</sup> Dixon, Mark J., Richard I. Maurer, Cristina Biggi, Julen Oyarzabal, Jonathan W. Essex, and Mark Bradley. "Mechanism and Structure–activity Relationships of Norspermidine-Based Peptidic Inhibitors of Trypanothione Reductase." *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 13, no. 14 (July 2005): 4513–26. doi:10.1016/j.bmc.2005.04.039.

resultados obtenidos con esta técnica nos dirigirá al diseño de nuevos compuestos con actividad farmacológica que se presume será mayor a la de los líderes previos.

# Capítulo VI

---

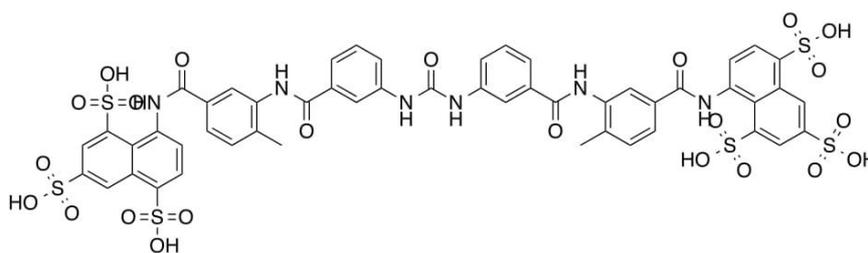
## Diseño *de novo* de inhibidores de la tripanotona reductasa

*“Ay hijo, sabes, sabes de dónde vienes?”*

*Los versos del Capitán  
Pablo Neruda*

## Introducción

Como se mencionó en el capítulo III, la T[S]<sub>2</sub> es una poliamida que se encarga de la detoxificación redox en el *T. cruzi* a través de su reducción a T[SH]<sub>2</sub> la cual media reacciones posteriores. Además del fragmento poliamida, la T[S]<sub>2</sub> posee en su estructura un fragmento de espermidina con características lipofílicas. En base a estas dos partes características de la tripanotiona se han desarrollado análogos que emulan ciertos segmentos de la misma. Existen en la bibliografía sustancias derivadas de amidas, poliamidas y poliaminas que actúan como inhibidores de la TryR siendo un ejemplo paradigmático de ellas la suramina, que se encuentra aprobada para el tratamiento de la infección por *Trypanosoma brucei* (Figura 42)<sup>88</sup>:



**Figura 42. Suramina, un inhibidor de TryR con estructura de poliamida.**

La suramina no responde a los requerimientos básicos de una droga para administración oral (MW: 1297, PSA: 534, nHBA: 23), además de presentar toxicidad *in vivo*<sup>89</sup>. Tanto la suramina como otras poliamidas presentan síntesis orgánicas de múltiples pasos, llevando a procedimientos costosos no sólo experimental sino monetariamente.

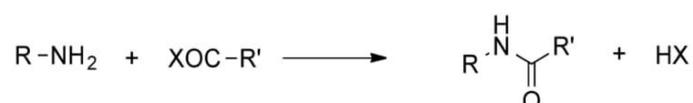
La hipótesis que propusimos es desarrollar, a través del diseño *de novo*, estructuras derivadas de amidas tanto alifáticas como aromáticas empleando un modelo computacional de inhibición de la TryR. Este diseño *de novo* se basó en el empleo del software Autogrow 3.0 configurado con parámetros adecuados a las expectativas de síntesis sencillas para producir estas amidas.

### *Diseño experimental in silico*

<sup>88</sup> Da Rocha Pita, Samuel Silva, José Jair Vianna Cirino, Ricardo Bicca de Alencastro, Helena Carla Castro, Carlos Rangel Rodrigues, and Magaly Girão Albuquerque. "Molecular Docking of a Series of Peptidomimetics in the Trypanothione Binding Site of *T. Cruzii* Trypanothione Reductase." *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 28, no. 4 (November 2009): 330–35. doi:10.1016/j.jmkgm.2009.08.011.

<sup>89</sup> Arlt, Wiebke, Martin Reincke, Lothar Siekmann, Werner Winkelmann, and Bruno Allolio. "Suramin in Adrenocortical Cancer: Limited Efficacy and Serious Toxicity." *Clinical Endocrinology* 41, no. 3 (September 1994): 299–307. doi:10.1111/j.1365-2265.1994.tb02549.x.

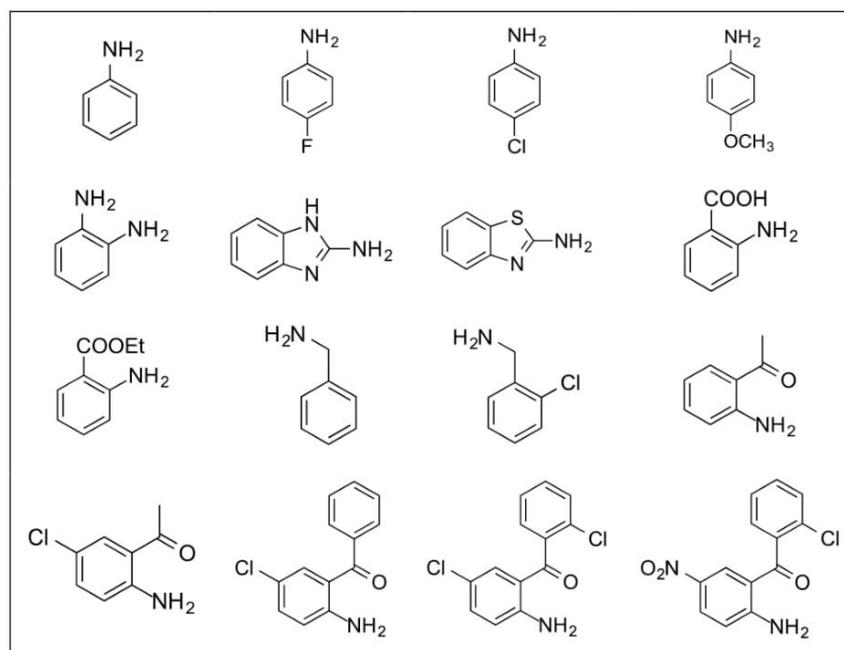
Se empleó Autogrow 3.0 para el diseño *de novo* de compuestos que actúen como potenciales inhibidores de la TryR del *T. cruzi*. Los compuestos *padres* consisten en aminas aromáticas y alifáticas con diferente complejidad. Estas aminas se eligieron ya que se encuentran disponibles en el laboratorio donde se desarrolló la síntesis de todos los compuestos de esta tesis (Tabla 17). La reacción de *click-chemistry* elegida es una de las más comunes y sencillas en cuanto a la aplicación en el laboratorio, es la denominada *amina-a-amida* y se realiza mediante la reacción de una amina con un halogenuro de ácido (Esquema 7)



**Esquema 7. Reacción de acilación de aminas primarias para obtener amidas**

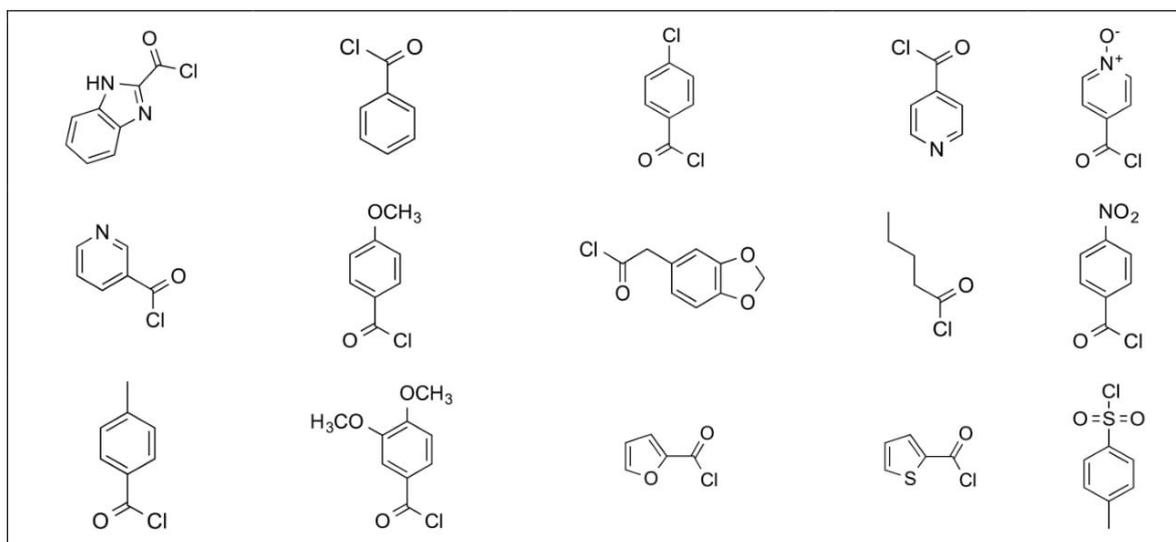
Los halogenuros de ácido incluidos en este estudio poseen por halógeno al átomo de cloro y se corresponden con los que se encuentran disponibles en nuestro laboratorio.

**Tabla 17. Aminas primarias disponibles en el laboratorio como reactivo *in silico*.**



Estos derivados de ácido son de naturaleza aromática como alifática, incluyendo sistemas heterocíclicos (Tabla 18). Tanto los derivados de ácidos y las aminas se filtraron previamente para evitar que contengan en su estructura otros centros reactivos. El número total de estructuras potencialmente sintetizables fue de 240 en la primer generación.

Tabla 18. Aminas primarias disponibles en el laboratorio como reactivo *in silico*



Los parámetros empleados en Autogrow 3.0 consistieron en:

- **Sin reacciones de sustitución:** no se reemplazaron los halógenos por restos amina y/o azida.
- **Cruzamiento:** se prohibieron las reacciones de cruzamiento para evitar generar estructuras más complejas, disminuyendo el tiempo de cálculo.
- **Reacciones de acoplamiento:** se eligió la reacción amina-a-amida.
- **Parámetros de filtrado:** Ro5 con tolerancia de una violación.
- **Límite de generaciones:** una generación.
- **Límite de compuestos generados:** tres estructuras sobrevivientes.

Durante el desarrollo del algoritmo de Autogrow 3.0 se salvaron las energías de unión de las 240 estructuras generadas. En la Figura 43 se puede ver la distribución en frecuencia de las energías de unión. Menos del 1.25% del total de estructuras generadas poseen  $\Delta G_{\text{bind}} \leq -8.0$  kcal/mol.

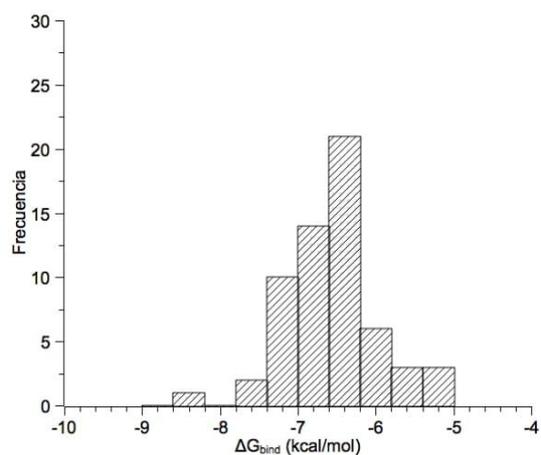


Figura 43. Distribución del puntaje para las estructuras generadas *in silico*.

Las tres estructuras supervivientes generadas resultaron ser benzamidas *N*-sustituidas y corresponden a los compuestos **34**, **35** y **36** (Figura 44).

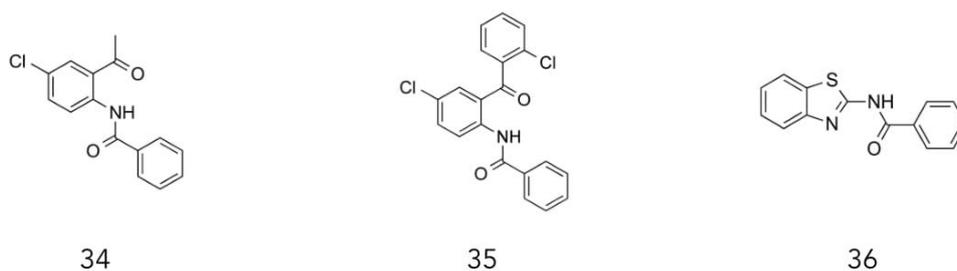


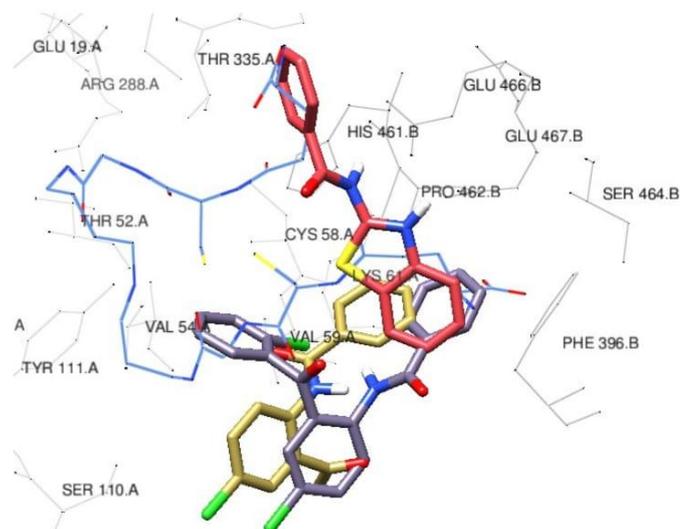
Figura 44. Estructuras resultantes de la primer generación *de novo* con Autogrow 3.0

Todos los compuestos diseñados (**34-36**) poseen adecuadas propiedades farmacológicas (*drug-like*) (Tabla 19)

Tabla 19. Descriptores fisicoquímicos comunes para 34-36.

Compuesto	CLogP	nHBA	nHBD	PSA	nRB	MW
<b>34</b>	3.28	3	1	46.17	3	273.718
<b>35</b>	5.10	3	1	46.17	4	370.234
<b>36</b>	3.61	3	1	70.23	2	254.312

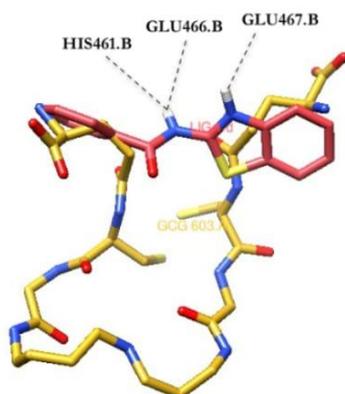
Según las predicciones mediante acoplamiento, las estructuras **34**, **35** y **36** se ubicarían en el espacio que ocupa el fragmento de glutarimida de T[S]<sub>2</sub> orientado hacia el residuo SER464 de la cadena B. (Figura 45)



**Figura 45.** Superposición de estructuras **34** (amarillo), **35** (gris) y **36** (rojo) en el sitio de unión de T[S]<sub>2</sub> (representación en varillas, azul) rodeados por los residuos de TryR a una distancia de 5 Å

Se pudo observar que las estructuras **34** y **35** no forman puentes de hidrógeno con los residuos de los aminoácidos circundantes.

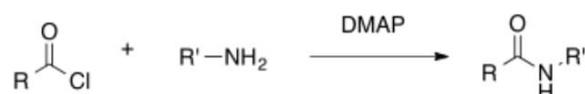
La estructura **36** forma puentes de hidrógeno con los residuos HIS461, GLU466 y GLU467 de la cadena B, esto provoca que se ubique en el extremo que ocupan ambos fragmentos terminales COO<sup>-</sup> de la T[S]<sub>2</sub> (Figura 46)



**Figura 46.** Superposición de la estructura **36** (rojo) en el sitio de acoplamiento con T[S]<sub>2</sub> (amarillo). En líneas punteadas se representan los enlaces puente de hidrógeno con los aminoácidos HIS461, GLU466 y GLU467 de la cadena B.

## Síntesis de los compuestos **34-36**

La reacción de un cloruro de acilo con una amina o con amoníaco para formar una amida, se realiza con una relación amina:cloruro de acilo 2:1. Para evitar el uso de exceso de amina reactiva se empleó 4-dimetilaminopiridina (DMAP)<sup>90</sup> como catalizador nucleofílico obteniendo rendimientos moderados en tiempos cortos.



**Esquema 8. Reacción de acilación de aminas con un derivado de ácido.**

### Actividad enzimática

Se determinó la actividad de TryR del compuesto **36**. Se probaron concentraciones 50 y 100  $\mu\text{M}$  de este compuesto y se empleó una concentración de tripanotona de 25  $\mu\text{M}$ . Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 20. Se observa que el compuesto **36** posee un poder inhibitorio que aumenta al aumentar la concentración de la droga. Siendo éste el mejor inhibidor de todos los compuestos evaluados en esta tesis.

**Tabla 20. Efecto de 36 sobre la actividad de TryR.**

Compuesto	Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Actividad enzimática	
		UE/ml	Porcentaje
<b>36</b>	50	90,19 $\pm$ 3,20	73 $\pm$ 3
	100	23,83 $\pm$ 4,40	19 $\pm$ 4
<b>Control</b>	-	123,99 $\pm$ 3,45	100

### Actividad anti-Tripanosoma cruzi

Todos los compuestos se evaluaron in vitro frente a *T. cruzi* cepa Tulahuen (cepa 2) bajo la forma no infectiva epimastigote y tripomastigote; se usó como droga de referencia el benznidazol.

<sup>90</sup> Scriven, Eric F. V. "4-Dialkylaminopyridines: Super Acylation and Alkylation Catalysts." Chemical Society Reviews 12, no. 2 (1983): 129. doi:10.1039/cs9831200129.

Tabla 21. Actividad biológica de 35-36 frente a epimastigote y tripomastigote.

Compuesto	IC <sub>50</sub> (Epi) (SD) (μM)	IC <sub>50</sub> (Tripo) (SD) (μM)
<b>34</b>	> 15	106.06 (5.22)
<b>35</b>	12.59 (0.50)	>> 100 <sup>A</sup>
<b>36</b>	> 15	107.18 (3.75)
<b>Benznidazol</b>	5.49 (0.89)	30.26 (2.85)

<sup>A</sup> Muy superior a 100 μM

SD: desvío estándar

De los tres compuestos propuestos y sintetizados, uno de ellos el compuesto **35**, resultó ser moderadamente activo frente a la forma epimastigote. En ninguno de los tres casos se obtiene un valor de IC<sub>50</sub> relevante frente a la forma tripomastigote del *T. Cruzi*.

El compuesto **35** es un excelente candidato para optimizar su potencia farmacológica, tanto por la actividad biológica demostrada como así también por la versatilidad química para generar numerosos derivados. Se espera generar compuestos que presenten una mayor actividad de la molécula que lo precedió.



# Capítulo VII

---

## Diseño, síntesis y evaluación biológica de derivados de ftalazinas como potenciales antiparasitarios

*“Souvent la chaleur d'un beau jour  
Fait rêver fillette à l'amour ”*

*Madame Bovary  
Gustave Flaubert*



## Introducción

*Trypanosoma cruzi* posee sistemas de defensa antioxidantes diferentes al de sus huéspedes mamíferos, dependientes del tripanotión, exclusivo de kinetoplastidos<sup>91</sup>. Uno de los sistemas de detoxificación de hidroperóxidos depende de la enzima Superóxido Dismutasa (SOD)<sup>92</sup>. La clase de SOD que se encuentra en tripanosomátidos es la Fe-SOD<sup>93</sup>.

La reacción entre el anión superóxido y el grupo prostético de la SOD ocurre en dos pasos:

1. Comienza con el  $O_2^{\bullet-}$  uniéndose a la forma oxidada de la enzima ( $Fe^{+3}$ ), y continúa con la protonación y liberación de oxígeno molecular.
2. La forma reducida ( $Fe^{+2}$ ) se une al anión superóxido y a un protón, liberando peróxido de hidrógeno, para luego retornar a su estado de oxidación anterior ( $Fe^{+3}$ ).

En los humanos, el grupo de metaloenzimas con funcionalidad similar a la SOD del parásito son las CuZn-SOD. Se han desarrollado derivados de cloro-benzo[g]ftalazinas que actúan inhibiendo la Fe-SOD sin alterar la funcionalidad de la CuZn-SOD humana (Figura 47)<sup>94</sup>. Por lo tanto, el desarrollo de compuestos con la habilidad de inhibir la acción protectora de la Fe-SOD podría resultar en drogas con actividad antichagásica selectiva.

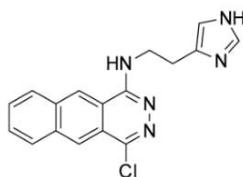
---

<sup>91</sup> Temperton, Nigel J., Shane R. Wilkinson, David J. Meyer, and John M. Kelly. "Overexpression of Superoxide Dismutase in *Trypanosoma Cruzi* Results in Increased Sensitivity to the Trypanocidal Agents Gentian Violet and Benznidazole." *Molecular and Biochemical Parasitology* 96, no. 1–2 (October 1998): 167–76. doi:10.1016/S0166-6851(98)00127-3.

<sup>92</sup> Sánchez-Delgado, Roberto A., Maribel Navarro, Keyla Lazardi, Reinaldo Atencio, Mario Capparelli, Franklin Vargas, Julio A. Urbina, André Bouillez, Alfred F. Noels, and Dante Masi. "Toward a Novel Metal Based Chemotherapy against Tropical Diseases 4. Synthesis and Characterization of New Metal-Clotrimazole Complexes and Evaluation of Their Activity against *Trypanosoma Cruzi*." *Inorganica Chimica Acta* 275–76 (July 1998): 528–40. doi:10.1016/S0020-1693(98)00114-5.

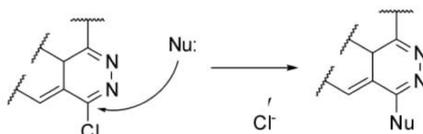
<sup>93</sup> Meshnick, Steven R., Karl R. Kitchener, and Nguyen Le Trang. "Trypanosomatid Iron-Superoxide Dismutase Inhibitors." *Biochemical Pharmacology* 34, no. 17 (September 1985): 3147–52. doi:10.1016/0006-2952(85)90161-3.

<sup>94</sup> Sánchez-Moreno, Manuel, Ana M. Sanz, Fernando Gómez-Contreras, Pilar Navarro, Clotilde Marín, Inmaculada Ramírez-Macias, María Jose Rosales, et al. "In Vivo Trypanosomicidal Activity of Imidazole- or Pyrazole-Based Benzo[ g ]phthalazine Derivatives against Acute and Chronic Phases of Chagas Disease." *Journal of Medicinal Chemistry* 54, no. 4 (February 24, 2011): 970–79. doi:10.1021/jm101198k.



**Figura 47.** Estructura de un inhibidor de la Fe-SOD de *T. cruzi* con estructura derivada del núcleo de ftalazina.

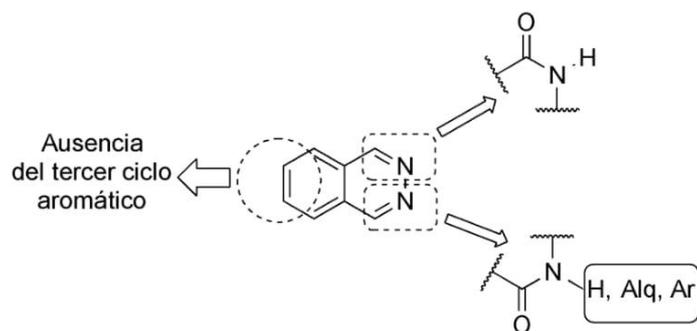
La presencia de un sustituyente Cl en el anillo ftalazinico promueve reacciones de sustitución nucleofílica aromática (Esquema 10); esta reactividad puede dar lugar a efectos secundarios no deseados en el medio biológico por la presencia de moléculas nucleofílicas (aminas, poliaminas, neurotransmisores, aminoácidos, etc). Sanchez-Moreno y col. han encontrado que los compuestos derivados de cloro-ftalazinas presentan toxicidad hepática en modelos de ratas infectadas con *T. cruzi*. A estos efectos adversos se suman los antecedentes en literatura sobre las propiedades que poseen estos sistemas tricíclicos como intercalantes del ADN<sup>95</sup>.



**Esquema 10.** Reacción de sustitución nucleofílica aromática del resto cloruro. Aquí el nucleófilo (Nu:) puede ser derivado de compuestos bioorgánicos con amina.

En virtud de estos potenciales generadores de efectos adversos en un modelo animal, propusimos cambios en la sustitución del núcleo de benzo[g]ftalazina con la inclusión de dos C=O y la eliminación del tercer anillo bencenoide, generando un núcleo ftalazin-1,4-diona con sustitución en uno de los NH con restos alquílicos y arílicos (Esquema 11). Además, no existen en la literatura derivados de ftalazin-1,4-dionas como agentes tripanomicidas, estimulándonos a la búsqueda y desarrollo de estructuras líderes con esta actividad.

<sup>95</sup> Gandolfi, Carmelo A., Gino Beggiolin, Ernesto Menta, Manlio Palumbo, Claudia Sissi, Silvano Spinelli, and Francis Johnson. "Chromophore-Modified Antitumor Anthracenediones: Synthesis, DNA Binding, and Cytotoxic Activity of 1,4-Bis[(aminoalkyl)amino]benzo[g]phthalazine-5,10-Diones." *Journal of Medicinal Chemistry* 38, no. 3 (February 1995): 526–36. doi:10.1021/jm00003a015.



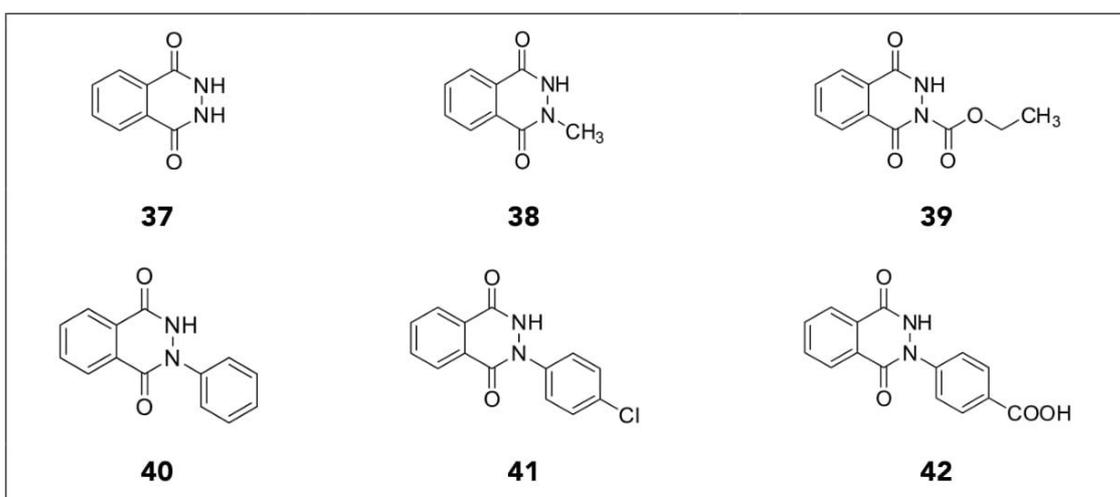
**Esquema 11. Modificaciones propuestas del núcleo de ftalazina**

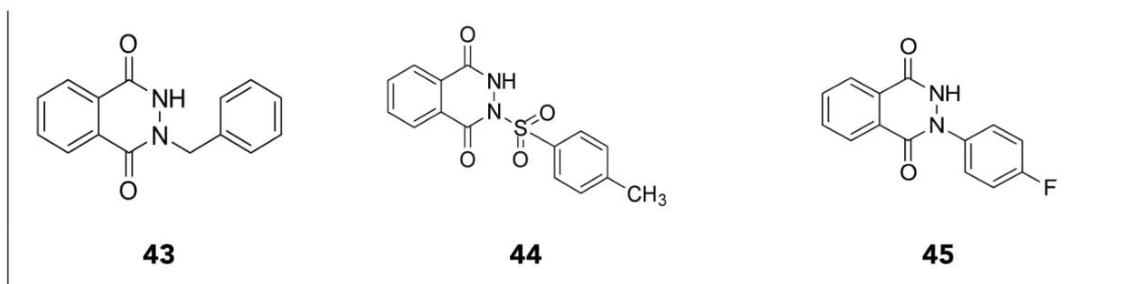
Se enfatizó en la producción de compuestos que cumplieran con las reglas preestablecidas de propiedades físicoquímicas deseables para la generación de estructuras líderes, que según los criterios *lead-like* de Oprea y col.

- $MW \leq 460$
- $CLogP \leq 4.2$
- Enlaces rotables libres  $\leq 10$
- Anillos  $\leq 4$
- Donores de puente de hidrógeno  $\leq 5$
- Aceptores de hidrógeno  $\leq 9$

También propusimos que las síntesis de esos compuestos fuera a partir de reactivos asequibles, con pocos pasos de aislamiento, fácil purificación y tiempos reducidos de reacción. Así, las estructuras diseñadas para sintetizar consistieron en 9 compuestos derivados de ftalazindiona (Tabla 22).

**Tabla 22. Estructuras de los compuestos 37-45**



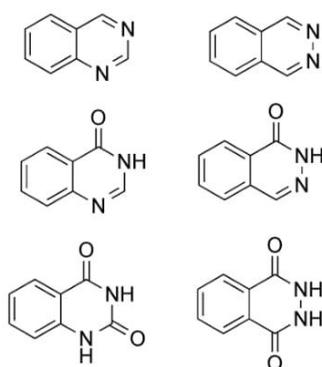


Se calcularon los descriptores más comunes para determinar su potencial uso como droga de administración oral, obteniéndose valores dentro de los aceptados como óptimos para ese uso (Tabla 23).

**Tabla 23. Descriptores fisicoquímicos de 37-45**

Comp.	CLogP	XLogP	CMR	AMR	PSA	nHBA	nHBD	MW
<b>37</b>	0.04	2.30	44.40	14.88	58.2	4	2	162.04
<b>38</b>	0.39	1.76	49.02	20.58	49.41	4	1	176.06
<b>39</b>	0.54	2.23	59.95	31.17	75.71	6	1	234.06
<b>40</b>	2.49	4.31	70.61	14.88	49.41	4	1	238.07
<b>41</b>	3.14	4.19	75.62	20.50	49.41	4	1	272.04
<b>42</b>	1.62	3.33	76.46	22.10	86.71	6	2	282.06
<b>43</b>	1.62	4.67	72.49	19.60	49.41	4	1	252.09
<b>44</b>	1.69	3.74	76.06	29.03	91.93	6	1	316.05
<b>45</b>	2.63	4.05	70.56	15.76	49.41	4	1	256.06

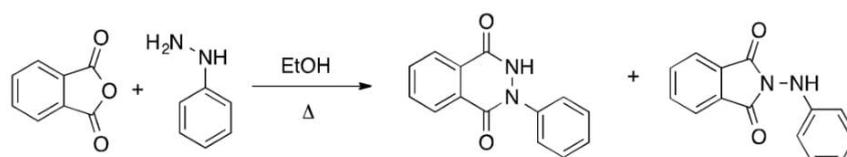
La ftalazina (benzo [d] piridazina) es un heterociclo que reúne un anillo bencénico fusionado con una piridazina. El término general "oxo-ftalazina" es usado para nombrar a compuestos que presenten átomos de oxígeno conectados directa o en forma extranuclear a su heterociclo base. En la literatura estos compuestos reciben diferentes nombres como ftalhidrazidas, ftalazina 1,4-diona, 1,4-dihidroftalazina, etc. La síntesis del anillo ftalazínico ha sido profusamente estudiada debido al efecto potenciador o inhibidor de quimioluminiscencia que presentan el luminol (5-amino-4-hidroxi-1-(2H)ftalazinona) y sus derivados. En nuestro caso, este anillo heterociclo constituye un isómero e isómero de posición del anillo quinazolina estudiado en esta tesis (Esquema 12).



**Esquema 12. Comparación entre los núcleos de quinazolina y ftalazina.**

En la literatura se registra la síntesis de estas ftalazinas por la reacción de ciclización con hidrazina, involucrando diversos intermediarios<sup>96</sup>. El grupo ftaloilo ha sido frecuentemente usado como un grupo protector de aminas en la síntesis de  $\alpha$ - aminoácidos y de péptidos. El paso final de la remoción del grupo ftaloilo se realiza por la reacción de hidrazina en condiciones moderadas. Calentando con una solución etanólica de hidrato de hidrazina por 2 hs o dejando por 1 o 2 días a temperatura ambiente, el grupo ftaloilo se hidroliza rindiendo la ftalazinona deseada, que se separa en la acidificación<sup>97</sup>.

Otra forma de sintetizar compuestos análogos con sustitución en el anillo benceno considera la condensación correspondiente del anhídrido ftálico, la ftalimida y/o el dimetilftalato por calentamiento a reflujo con hidrato de hidrazina tanto en solución alcohólica como acuosa con altos rendimientos (Esquema 13). Sin embargo, la condensación de fenilhidrazina con anhídrido ftálico rinde una pequeña cantidad del producto 2-fenilftalazinona, ya que se aísla de la reacción en mayor proporción la 2-anilino-ftalimida.

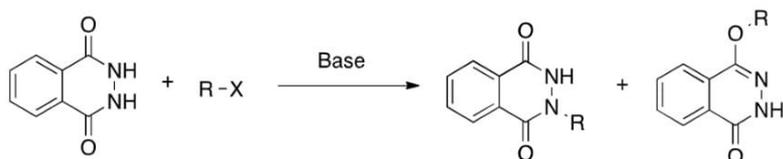


**Esquema 13. Ciclización de hidrazinas aromáticas con anhídrido ftálico en medio etanólico**

<sup>96</sup> Schaffner, C. P. "Condensed Pyridazine and Pyrazine Rings. Cinnolines, Phthalazines, and Quinoxalines. J. C. E. Simpson. Interscience, New York-London, 1953." *Science* 120, no. 3109 (July 30, 1954): 180–183. doi:10.1126/science.120.3109.180.

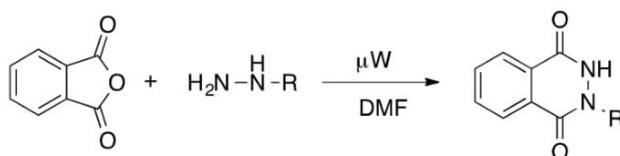
<sup>97</sup> Bunnett, Joseph F. "Advances in Organic Chemistry: Methods and Results. Volume 3 (Raphael, Ralph A.; Taylor, Edward C.; Wynberg, Hans; Ed.s)." *Journal of Chemical Education* 40, no. 8 (August 1963): 444-47. doi:10.1021/ed040p444.3.

Una forma alternativa de preparación de estos compuestos sería a través de la alquilación del núcleo ftalazinona que se puede llevar a cabo con un derivado halogenado tanto alquílico como arílico en medio alcalino para dar el compuesto 2-sustituido<sup>98</sup>. Sin embargo, la N-alquilación resulta dependiente del pH del medio de reacción obteniéndose producto 4-O alquilado o la mezcla de productos N- y O-alquilados (Esquema 14)<sup>99</sup>.



**Esquema 14. N- y O- alquilación de ftalazinas con halogenuros de alquilo.**

Nuestra estrategia de síntesis y con la experiencia en la utilización de radiación microondas nos condujo a la preparación de los compuestos pretendidos por la reacción entre anhídrido ftálico y las hidrazinas correspondientes utilizando este calentamiento con la obtención de estos compuestos con altos rendimientos y en un mínimo tiempo de reacción.



**Esquema 15. Síntesis de compuestos de esta tesis mediante calentamiento por microondas.**

En pos de verificar la eficiencia del empleo de la tecnología de microondas, se realizó la comparación entre este método de calentamiento y la técnica tradicional. Se llevó a cabo la reacción entre la hidracina correspondiente y el anhídrido ftálico para la obtención de los compuestos **37**, **39**, **41**.

<sup>98</sup> Domagalina, Eugenia, and Lech Przyborowski. "Über die Verwendbarkeit von 2-Amino-1,3,4-thiodiazol-5-thiol in der Analyse." *Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie* 207, no. 6 (1965): 411–14. doi:10.1007/BF00520203.

<sup>99</sup> Simpson, J. D. "Amiphenazole and Lichen Planus." *BMJ* 2, no. 5373 (December 28, 1963): 1655–1655. doi:10.1136/bmj.2.5373.1655.

**Tabla. Síntesis comparativa de compuestos 37, 39 y 41.**

Compuesto	Condiciones de reacción	Punto de fusión (°C)	Rendimiento (%)*
<b>37</b>	153°C, 30 min., DMF <sup>A</sup>	> 350	36
	170°C, 3 min, DMF <sup>B</sup>	> 350	37
<b>39</b>	153°C, 40 min, DMF <sup>A</sup>	166-168	50
	160°C, 2 min, DMF <sup>B</sup>	167-168	62
<b>41</b>	153°C, 60 min, DMF <sup>A</sup>	180-182	69
	180°C, 4 min, DMF <sup>B</sup>	182-184	74

\*Rendimiento no optimizado.

A. Calentamiento convencional

B. Calentamiento con microondas

Si bien el rendimiento no mejoró considerablemente entre el empleo de calentamiento convencional y por microondas, pudimos verificar un menor tiempo de reacción y la ventaja del uso de menor cantidad de solvente de reacción.

#### *Actividad biológica*

Se determinó la actividad tripanocida frente a la forma epimastigote del *T. cruzi* de los 9 compuestos sintetizados de esta serie y se comparó con la droga de referencia benznidazol.

**Tabla. Actividad biológica de los compuestos 37-45.**

Compuesto	IC <sub>50</sub> (Epi) (SD) (µM)	Compuesto	IC <sub>50</sub> (Epi) (SD) (µM)
<b>37</b>	34.29 (1.45)	<b>42</b>	17.30 (1.64)
<b>38</b>	13.15 (1.03)	<b>43</b>	11.79 (0.98)
<b>39</b>	> 15	<b>44</b>	12.15 (0.89)
<b>40</b>	> 15	<b>45</b>	> 15
<b>41</b>	15.40 (2.32)	<b>Benznidazol</b>	5.49 (0.89)

Nota: las drogas ensayadas no presentan citotoxicidad a las concentraciones ensayadas.

Los compuestos que resultaron ser moderadamente activos presentaron valores de IC<sub>50</sub> entre 11-15 µM frente a la forma epimastigote, aunque no resultaron ser citotóxicos. El análisis SAR no arroja conclusiones determinantes que permitan realmente predecir la actividad de derivados de estas estructuras. Una aproximación que puede realizarse es que la presencia de un resto sulfonilo o bencilo unido, al N ftalazinico incrementa la actividad

biológica respecto al heterociclo sin sustituir en esa posición. Cualquier sustitución en *N*-2 con un sistema aromático directamente unido, disminuye o anula la actividad frente a los epimastigotes.

Las diferencias en la actividad biológica de los compuestos sintetizados frente a la forma epimastigote del *T. cruzi* no tienen una correlación clara con las propiedades físico químicas características representadas en la Tabla 23. Debido a estos resultados se procedió a calcular otros descriptores 1D y 2D con el software PaDEL-Descriptor. Empleando los aproximadamente 1400 descriptores cuantificados por el software, se buscó el valor de correlación Breavais-Pearson más alto ( $r > |0.5|$ ), encontrándose la mayor correlación con dos índices de estado electrotopológico: minHBd y Hmin y mostrando ortogonalidad entre los mismos (Tabla 24).

Los índices de estado electrotopológico (E-state) son valores numéricos calculados para cada átomo en una molécula, y que codifican información acerca del entorno topológico de ese átomo sumado a las interacciones electrónicas debido a todos los otros átomos en la molécula. minHBd representa la sumatoria de del E-state de los donores de hidrógeno y Hmin representa la sumatoria del E-state de todos los hidrógenos presentes en la molécula<sup>100</sup>.

**Tabla 24. Descriptores con mejor correlación con la actividad en epimastigote**

	<b>pIC<sub>50</sub>(Epi)</b>	<b>minHBd</b>	<b>Hmin</b>
<b>pIC<sub>50</sub>(Epi)</b>		-0.6549	-0.5151
<b>minHBd</b>	-0.6549		0.3614
<b>Hmin</b>	-0.5151	0.3614	

Utilizando estos descriptores se realizó una regresión lineal múltiple, dando la ecuación

$$pIC_{50}(Epi) = (6.2784 \pm 1.3462) - (2.3697 \pm 0.7205) \cdot minHBd - (0.5961 \pm 0.2365) \cdot Hmin$$

$$R^2 = 0.5181, F = 3.2258, P = 0.11189, n = 9$$

El valor predictivo de esta ecuación se ve limitada por su moderado coeficiente de determinación ( $R^2 = 0.5181$ ) y el número de compuestos empleados para calcular la regresión ( $n = 9$ ). Sin embargo, la información que deriva de la misma sugiere que la

<sup>100</sup> Hall, L. Mark, Lowell H. Hall, and Lemont B. Kier. "Modeling Drug Albumin Binding Affinity with E-State Topological Structure Representation." *ChemInform* 35, no. 6 (February 10, 2004). doi:10.1002/chin.200406228.

actividad estaría relacionada con el entorno electrónico del grupo NH en posición 3 del núcleo de ftalazina.

En resumen, de los 9 compuestos sintetizados para esta serie, se destacan los derivados **43** y **44** por poseer una moderada actividad biológica. Estos resultados nos alientan a seguir realizando modificaciones estructurales en este heterociclo base para establecer un modelo de relación estructura-actividad coherente con los valores experimentales. Además, es necesario establecer el o los posibles mecanismos de acción y así optimizar el desarrollo de compuestos con actividad biológica y propiedades farmacocinéticas adecuadas.



# Capítulo VIII

---

## Perspectivas de tratamiento sintomático de la enfermedad de Chagas con antiinflamatorios no esteroideos

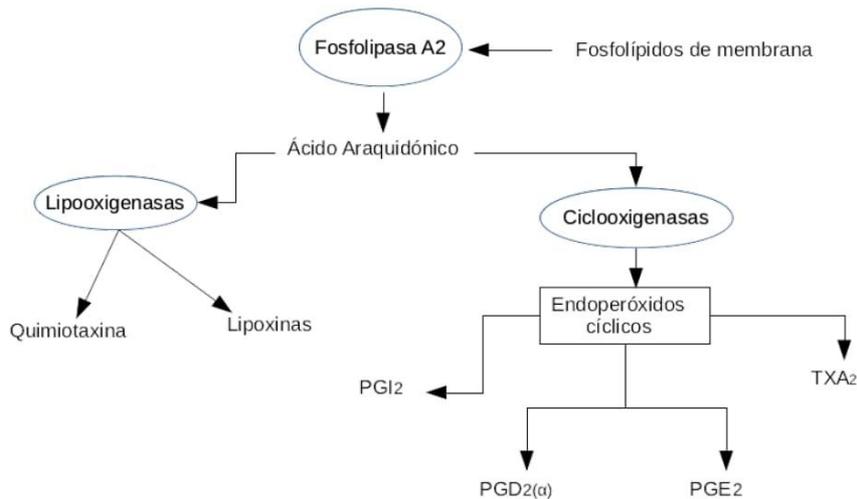
*“Oh quanto e` corto il dire e come fioco  
al mio concetto! e questo, a quel ch'i' vidi,  
e` tanto, che non basta a dicer 'poco'.”*

*Divina Commedia. Canto XXXIII.  
Dante Alighieri*



## Introducción. Mediadores inflamatorios en la enfermedad de Chagas

Los eicosanoides son una familia de mediadores lipídicos que participan en un amplio rango de actividades biológicas que incluyen la regulación del tono vascular, la inflamación, isquemia y homeostasis tisular. En los mamíferos, estos procesos están muy bien estudiados. Mediante la acción hidrolítica sobre los lípidos de membrana de la fosfolipasa A<sub>2</sub> se genera ácido araquidónico (AA)<sup>101</sup> que posteriormente es hidrolizado a través del sistema de enzimas ciclooxigenasa (COX) para dar PGH<sub>2</sub>. El PGH<sub>2</sub> es el principal sustrato para la síntesis de eicosanoides mediada por sintasas específicas del organismo, dando como resultado prostaglandinas y tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>)<sup>102</sup>(Figura 48). Las enzimas de la familia COX son estructuralmente similares pero poseen diferente rol fisiológico. La COX-1 es constitutiva y media la producción de mucosa gástrica, activación plaquetaria y el tono vascular, mientras que la COX-2 es inducible y actúa en procesos inflamatorios, cáncer y daño tisular<sup>103</sup>.



**Figura 48. Mediadores celulares del proceso inflamatorio (adaptado de Epstein y Luster)<sup>104</sup>**

<sup>101</sup> Fonteh, Alfred N. "Assessment of Arachidonic Acid Distribution into Phospholipids of Inflammatory Cells." In *Eicosanoid Protocols*, by Elias A Lianos, 77–89. New Jersey: Humana Press, 1999. <http://link.springer.com/10.1385/1-59259-263-5:77>.

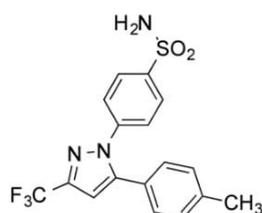
<sup>102</sup> Kulkarni, Prasad S. "Synthesis of Cyclooxygenase Products by Human Anterior Uvea from Cyclic Prostaglandin Endoperoxide (PGH<sub>2</sub>)." *Experimental Eye Research* 32, no. 2 (February 1981): 197–204. doi:10.1016/0014-4835(81)90008-7.

<sup>103</sup> Morita, Ikuo. "Distinct Functions of COX-1 and COX-2." *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 68–69 (August 2002): 165–75. doi:10.1016/S0090-6980(02)00029-1.

<sup>104</sup> Epstein, Franklin H., and Andrew D. Luster. "Chemokines — Chemotactic Cytokines That Mediate Inflammation." *New England Journal of Medicine* 338, no. 7 (February 12, 1998): 436–45.

El *Trypanosoma cruzi* también sintetiza TXA<sub>2</sub>, y los eicosanoides liberados por el mismo podrían contribuir a la diferenciación parasítica, la fagocitosis y la supervivencia del huésped, al actuar como inmunomoduladores para ayudar en la transición y mantenimiento de la fase crónica de la enfermedad<sup>105</sup>. Dada la importancia de estos mediadores se ha generado interés en el desarrollo de compuestos antiinflamatorios no esteroides (AINEs) para el tratamiento clínico de esta infección. Sin embargo, se ha reportado el incremento de la mortalidad en pacientes agudos tratados con AINEs<sup>106</sup>.

Mientras que la función de COX-2 en la infección por *T. cruzi* aún no se encuentra definida, se ha establecido que COX-1 y -2 aparentan tener diferentes roles durante la etapa aguda de la infección. La inhibición selectiva de COX-2 con celecoxib (Figura 49) previene la trombocitopenia y leucopenia asociadas con la infección aguda, a la vez que incrementa el conteo de reticulocitos en respuesta a la infección<sup>107</sup>.



**Figura 49. Estructura del celecoxib, un inhibidor selectivo de COX-2**

La inhibición de COX-1 y COX-2 regula la liberación de óxido nítrico (NO) de los macrófagos, lo cual se correlaciona con la aparición de resistencia inmune a la enfermedad. Concordante con este fenómeno, las prostaglandinas sintetizadas por la vía de COX-2 median la mayor parte de los efectos inmunosupresores en la fase inicial de la infección por *T. cruzi*. Esto puede ser consecuencia del metabolismo de PGI<sub>2</sub> y PGE<sub>2</sub> que depende de COX-2, mientras que la COX-1 es responsable de la síntesis de TXA<sub>2</sub><sup>108</sup>. En la fase crónica

<sup>105</sup> Docampo, Roberto, and Silvia N.J. Moreno. "Biochemistry of *Trypanosoma Cruzi*." In *American Trypanosomiasis*, 365–92. Elsevier, 2010. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123848765000150>.

<sup>106</sup> Celentano, Ana M., Gabriela Gorelik, María E. Solana, Leonor Sterin-Borda, Enri Borda, and Stella M. González Cappa. "PGE2 Involvement in Experimental Infection with *Trypanosoma Cruzi* Subpopulations." *Prostaglandins* 49, no. 3 (March 1995): 141–53. doi:10.1016/0090-6980(95)00002-R.

<sup>107</sup> Hideko Tatakihara, Vera L., Rubens Cecchini, Celso L. Borges, Aparecida D. Malvezi, Viviane K. Graça-de Souza, Sueli F. Yamada-Ogatta, Luiz V. Rizzo, and Phileno Pinge-Filho. "Effects of Cyclooxygenase Inhibitors on Parasite Burden, Anemia and Oxidative Stress in Murine *Trypanosoma Cruzi* Infection." *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 52, no. 1 (January 2008): 47–58. doi:10.1111/j.1574-695X.2007.00340.x.

<sup>108</sup> Michelin, M.A., J.S. Silva, and F.Q.C. Cunha. "Inducible Cyclooxygenase Released Prostaglandin Mediates Immunosuppression in Acute Phase of Experimental *Trypanosoma Cruzi* Infection." *Experimental Parasitology* 111, no. 2 (October 2005): 71–79. doi:10.1016/j.exppara.2005.05.001.

de la enfermedad, el incremento del nivel de TXA<sub>2</sub> promueve el daño tisular, especialmente en el músculo cardíaco con lo cual puede estimular la apoptosis miocítica con el progreso hacia una cardiomiopatía y/o falla cardíaca. En otros estudios se encontró que la inhibición de la síntesis y/o liberación de prostaglandinas disminuye la parasitemia y aumenta la sobrevivencia de roedores infectados con *T. cruzi*. Esto se asoció con la disminución de los niveles sistémicos de citoquinas inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-10)<sup>109</sup>. Se debe mencionar que es muy importante el tiempo en el cual se comienza el tratamiento ya que la administración de ácido acetil salicílico (AAS) a los cinco días post-infección incrementa la parasitemia. Esta observación sugiere que debe tenerse reparos en la administración de inhibidores de las COX para controlar la fiebre en el comienzo de la etapa aguda de la enfermedad de Chagas<sup>109</sup>. Por otro lado, el uso de AAS en la etapa crónica no tiene efecto en la mortalidad o la parasitemia pero sí mejora la función cardíaca, sugiriendo que los mismos productos enzimáticos de la COX-1 que median la respuesta inmune es muy probable que contribuyan a la aparición del daño cardíaco en fase crónica<sup>110</sup>.

Se encontró que todos los pacientes infectados con *T. cruzi*, incluso en la forma asintomática, muestran niveles plasmáticos elevados de TNF- $\alpha$  respecto de los individuos seronegativos. Además, en los pacientes con cardiopatías severas existen niveles plasmáticos de TNF- $\alpha$  aún más elevados. La liberación de citoquinas pro-inflamatorias puede resultar de la presencia de moléculas provenientes de los parásitos de *T. cruzi* que estimulan la respuesta inmune innata del huésped<sup>111</sup>.

Una de las drogas más conocidas como modulador de los niveles de TNF- $\alpha$  es la talidomida<sup>112</sup>, (R,S)-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)isoindolin-1,3-diona, que a principios de 1960 se empleó como paliativo de la neuritis en pacientes con eritema nodoso leproso (ENL)<sup>113</sup>.

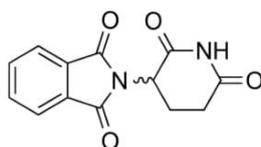
---

<sup>109</sup> Ferreira, Renata Cristina, Barbara M Ianni, Lucia CJ Abel, Paula Buck, Charles Mady, Jorge Kalil, and Edecio Cunha-Neto. "Increased Plasma Levels of Tumor Necrosis Factor-Alpha in Asymptomatic/'indeterminate' and Chagas Disease Cardiomyopathy Patients." *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 98, no. 3 (April 2003): 407–12. doi:10.1590/S0074-02762003000300021.

<sup>110</sup> Mukherjee, Shankar, Fabiana S. Machado, Huang Huang, Helieh S. Oz, Linda A. Jelicks, Cibele M. Prado, Wade Koba, et al. "Aspirin Treatment of Mice Infected with *Trypanosoma Cruzi* and Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease." Edited by Photini Sinnis. *PLoS ONE* 6, no. 2 (February 15, 2011): e16959. doi:10.1371/journal.pone.0016959.

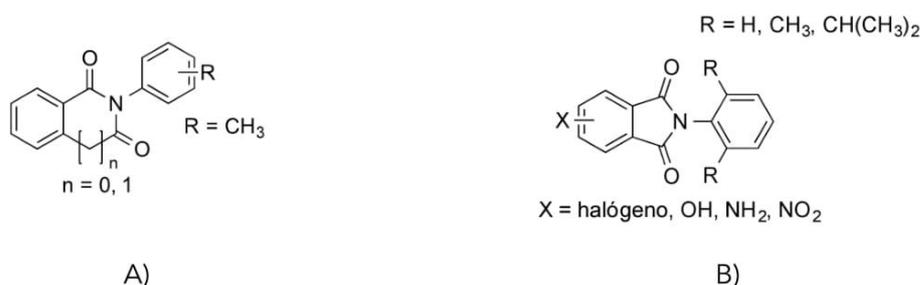
<sup>111</sup> Ropert, Catherine, Ludmila R.P. Ferreira, Marco A.S. Campos, Daniela O. Procópio, Luiz R. Travassos, Michael A.J. Ferguson, Luiz F.L. Reis, Mauro M. Teixeira, Igor C. Almeida, and Ricardo T. Gazzinelli. "Macrophage Signaling by Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Mucin-like Glycoproteins Derived from *Trypanosoma Cruzi* Trypomastigotes." *Microbes and Infection* 4, no. 9 (July 2002): 1015–25. doi:10.1016/S1286-4579(02)01609-X.

<sup>112</sup> Majumder, Syamantak, Sree Rama Chaitanya Sreedhara, Santanu Banerjee, and Suvro Chatterjee. "TNF  $\alpha$ ; Signaling Beholds Thalidomide Saga: A Review of Mechanistic Role of TNF- $\alpha$ ; Signaling Under Thalidomide." *Current Topics in Medicinal Chemistry* 12, no. 13 (July 1, 2012): 1456–67. doi:10.2174/156802612801784443.



**Figura 50 Estructura de la talidomida**

Para modular la sobre-producción de TNF- $\alpha$  asociada con diversos procesos patológicos, se emplearon diversas estrategias. En este contexto, se diseñaron análogos sintéticos de la talidomida. Hashimoto <sup>114</sup> propuso el desarrollo de derivados N-fenil-ftalimídicos, planificados a través de la modificación de la subunidad glutarimida. Los resultados obtenidos por este autor demostraron que el grupo glutarimida es irrelevante en la actividad anti-TNF- $\alpha$ . Miyachi y col. demostraron, además, que derivados N-fenil-ftalimídicos funcionalizados en el anillo benceno de la ftalimida contribuyen en un aumento de la producción de TNF- $\alpha$  (Figura 51)<sup>115</sup>.



**Figura 51. A) Estructura general de un inhibidor de la producción de TNF- $\alpha$  (Hashimoto) B) Estructura general de un estimulante de la producción de TNF- $\alpha$  (Miyachi y col.)**

En el presente capítulo, investigamos una nueva generación de análogos de la talidomida para examinar los efectos *in vitro* de los potenciales antiinflamatorios mediante la cuantificación de los mediadores clásicos del proceso de respuesta del huésped. Posteriormente investigamos el efecto antiinflamatorio en un modelo *in vivo*. Además se introduce en los ensayos el derivado ftalazínico **41** (Capítulo VII) con el objetivo de encontrar un compuesto líder con estructura similar pero características físico-químicas

<sup>113</sup> Crawford, C.L. "Treatment Of Erythema Nodosum Leprosum With Thalidomide." The Lancet 302, no. 7828 (September 1973): 567–68. doi:10.1016/S0140-6736(73)92391-X.

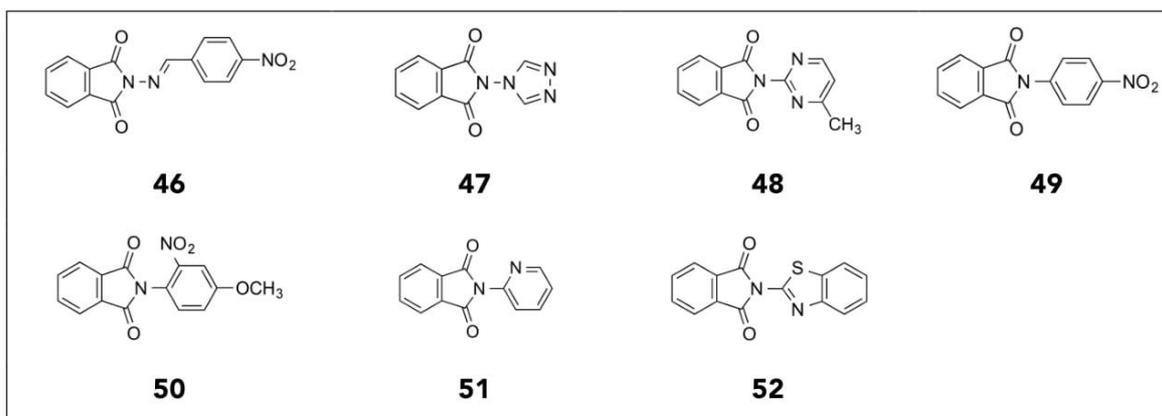
<sup>114</sup> Hashimoto, Yuichi. "Structural Development of Biological Response Modifiers Based on Thalidomide." Bioorganic & Medicinal Chemistry 10, no. 3 (March 2002): 461–79. doi:10.1016/S0968-0896(01)00308-X.

<sup>115</sup> Miyachi, H., A. Azuma, and Y. Hashimoto. "[Novel biological response modifiers: phthalimides with TNF-alpha production regulating activity]." Yakugaku Zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan 117, no. 2 (February 1997): 91–107.

diferentes a los anteriores derivados. Se hizo énfasis en lograr síntesis sencillas y con pocos pasos de aislamiento y fácil purificación.

El heterociclo isoindolin-1,3-diona forma parte de un grupo farmacóforo bastante difundido en la química medicinal y ha sido sintetizado por diversas rutas. Para nuestro modelo, se enfatizó en la producción de compuestos que cumplieran con las reglas preestablecidas de propiedades fisicoquímicas deseables para la generación de estructuras líderes, que según los criterios *lead-like* de Oprea y col. son: MW  $\leq$  460, CLogP  $\leq$  4.2, enlaces rotables libres  $\leq$  10, anillos  $\leq$  4, donores de puente de hidrógeno  $\leq$  5, aceptores de hidrógeno  $\leq$  9. Las estructuras **46-52** propuestas se ven en la tabla 25.

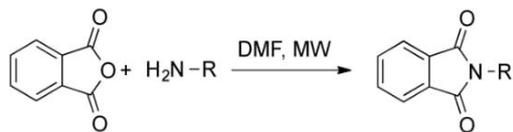
**Tabla 25. Estructura de los derivados ftalimídicos sintetizados.**



La síntesis de ftalimidas y ftalimidas *N*-sustituidas comúnmente se realiza mediante la *N*-alquilación directa de la ftalimidas con alcoholes en condiciones de Mitsunobo<sup>116</sup> o de la ftalimida de potasio con haluros de alquilo, lo que se conoce como síntesis de Gabriel. Más recientemente esta última síntesis se registra en literatura usando catalizadores básicos<sup>117</sup>. Sin embargo, cuando las aminas son asequibles, la síntesis se lleva a cabo por condensación de anhídrido ftálico a altas temperaturas con las aminas primarias. En nuestro caso se empleó este último método utilizando radiación microondas, lo que nos proveyó de los compuestos requeridos con buenos rendimientos y menor tiempo de calentamiento, sin uso de catalizadores en condiciones de química verde.

<sup>116</sup> Sen, Stephanie E., and Steven L. Roach. "A Convenient Two-Step Procedure for the Synthesis of Substituted Allylic Amines from Allylic Alcohols." *Synthesis* 1995, no. 07 (July 1995): 756–58. doi:10.1055/s-1995-4012.

<sup>117</sup> Le, Zhang-Gao, Zhen-Chu Chen, Yi Hu, and Qin-Guo Zheng. "Organic Reactions in Ionic Liquids: *N*-Alkylation of Phthalimide and Several Nitrogen Heterocycles." *Synthesis*, no. 2 (2004): 208–12. doi:10.1055/s-2003-44383.



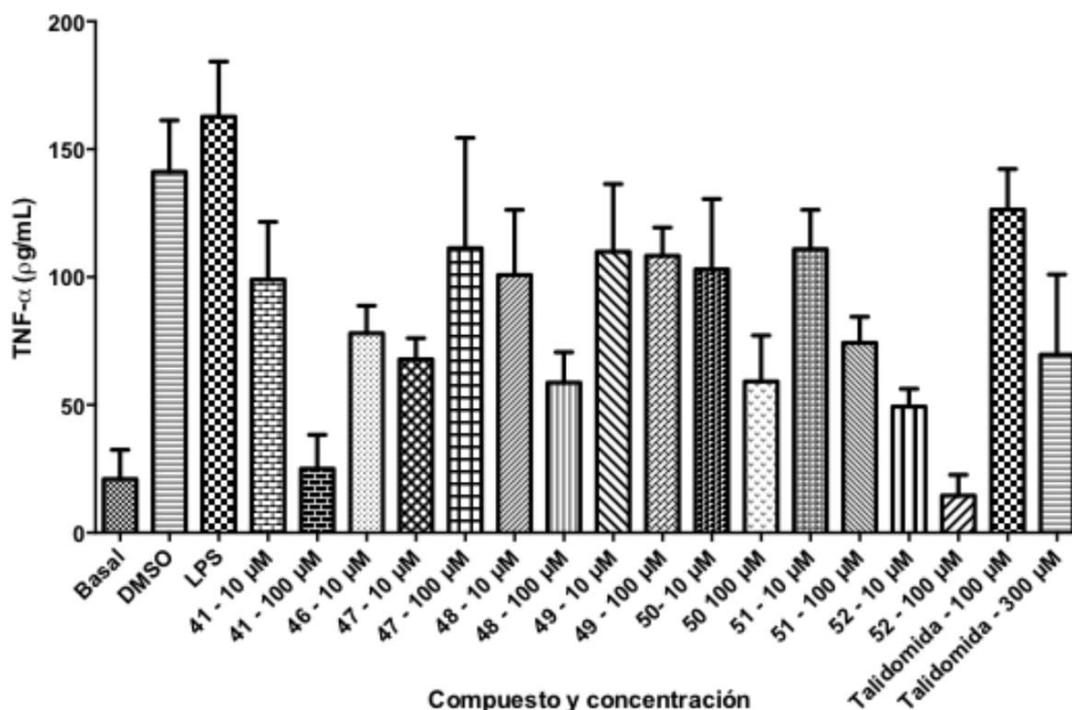
**Esquema 16.** Estrategia de síntesis de ftalimidas empleado en nuestro laboratorio

### Ensayos biológicos

#### Ensayo de TNF- $\alpha$

El TNF- $\alpha$  es una potente citoquina pro-inflamatoria que posee múltiples efectos, los cuales incluyen la activación de células inflamatorias, la inducción de varias proteínas inflamatorias, citotoxicidad, etc. A nivel pulmonar, el TNF- $\alpha$  favorece la migración de neutrófilos que juegan un papel importante en la patogénesis de la inflamación pulmonar.

Todos los compuestos ensayados presentan un mejor perfil de actividad que la talidomida, que debió ser evaluada a dos concentraciones muy superiores a las de los demás compuestos (100 y 300  $\mu$ M). El perfil de actividad *in vitro* para el compuesto **46** sólo pudo ser evaluado a 10  $\mu$ M debido a problemas de solubilidad en DMSO a concentraciones mayores (Figura 52).



**Figura 52.** Cuantificación de TNF- $\alpha$  para los compuestos 41, 46-52 y talidomida.

El compuesto **46** presenta una disminución en la expresión del mediador TNF- $\alpha$  pronunciado a 10  $\mu$ M consistente con lo descrito en literatura sobre el efecto de la

presencia de nitrocompuestos aromáticos que reemplazan el grupo glutarimida. El compuesto **49**, es un nitrocompuesto aromático que presenta un valor de inhibición de ~110 pg/mL en las dos concentraciones ensayadas.

El compuesto **50** ejerce un efecto inhibitorio, a 100  $\mu$ M, 2 veces superior al de la talidomida a la misma concentración. El compuesto **52**, presenta un excelente nivel de inhibición de TNF- $\alpha$  a las concentraciones estudiadas, resultando 12 veces más activo que la talidomida a 100  $\mu$ M .

El compuesto **41**, que es estructuralmente diferente del resto de los derivados ftalimídicos, presenta un perfil de inhibición de producción de TNF- $\alpha$  superior a la talidomida. Dentro de estos resultados es importante notar que el compuesto **47** no ofrece el mismo perfil de inhibición de producción de TNF- $\alpha$ , sino que a la concentración 100  $\mu$ M aumenta la producción de la misma.

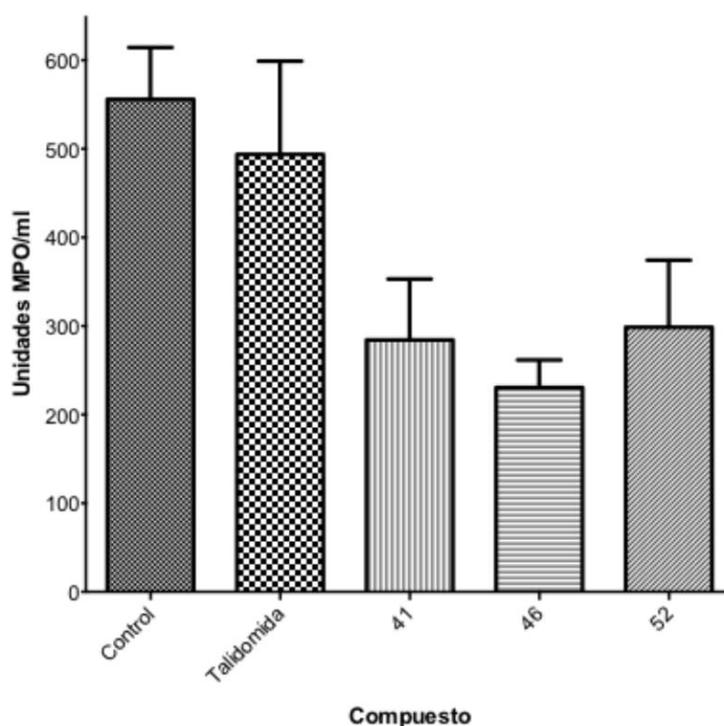
#### *Ensayo de MPO*

Una característica importante de la inflamación es la peroxidación concomitante de lípidos con la posterior formación de productos bioactivos derivados de los mismos. Este proceso se considera, normalmente, deletéreo para la célula debido a la peroxidación de los fosfolípidos de membrana con la consecuente ruptura de las biomembranas y pérdida de la función celular. La enzima mieloperoxidasa (MPO) funciona como una alternativa enzimática a las COX y las lipooxigenasas en la iniciación de la peroxidación lipídica in vivo. MPO es una enzima que se encuentra en neutrófilos en altas concentraciones, pero en menor cantidad en monocitos y macrófagos<sup>118</sup>. Es reconocido que el nivel de actividad de la MPO es directamente proporcional a la concentración de neutrófilos en el tejido inflamado, siendo así que la cuantificación de la actividad de esta enzima se considera un marcador sensible de quimiotaxis e infiltración de neutrófilos en el proceso inflamatorio. Como resultado, una droga activa disminuiría el daño tisular causado por enzimas hidrolíticas o especies oxidantes.

Se eligieron los compuestos **41**, **46** y **52** que mostraron el mejor perfil de inhibición de expresión de TNF- $\alpha$  para su evaluación en la capacidad de inhibir la enzima MPO (Figura 53).

---

<sup>118</sup> Eiserich, J. P. "Myeloperoxidase, a Leukocyte-Derived Vascular NO Oxidase." *Science* 296, no. 5577 (June 28, 2002): 2391–94. doi:10.1126/science.1106830



**Figura 53. Efecto de las drogas 41, 46, 52 y talidomida en el modelo de actividad de MPO.**

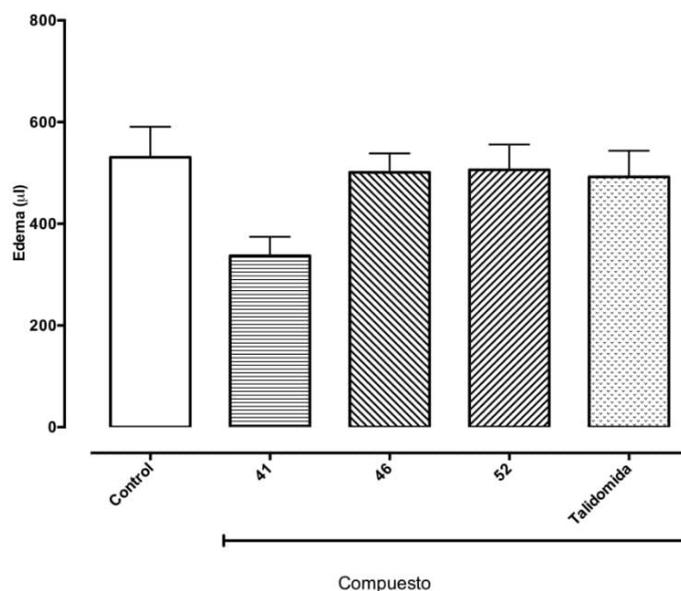
La talidomida ofrece un perfil de inhibición de la actividad de MPO sin diferencias significativas con respecto al control ( $P = 0.05$ ). Por otro lado **41, 46, 52** inhiben la actividad de MPO en niveles similares ( $P = 0.05$ ), coincidente con los resultados del ensayo de  $\text{TNF-}\alpha$  mostrando una mayor potencia comparado con la talidomida en la disminución de los mediadores pro-inflamatorios.

#### *Edema en pata de rata*

El edema inducido por carragenina se emplea en métodos de cribado para detectar los efectos de drogas antiinflamatorias. La inyección intraplantar de una solución de carragenina induce la respuesta inflamatoria del animal, incluyendo el incremento en la permeabilidad capilar, la infiltración leucocitaria, migración de neutrófilos y macrófagos, edema cutáneo y desarrollo de hiperalgesia. Se ha informado que la aplicación de carragenina genera la liberación de NO en etapas tardías de la inflamación, así como la liberación de  $\text{PGE}_2$  y  $\text{TNF-}\alpha$ <sup>119</sup>. Se emplearon ratas macho y se les aplicó una inyección de una solución de carragenina 1% en el talón. El volumen de la pata se midió mediante

<sup>119</sup> Morris, Christopher J. "Carrageenan-Induced Paw Edema in the Rat and Mouse." In *Inflammation Protocols*, by Paul G. Winyard and Derek A. Willoughby, 115–22. New Jersey: Humana Press, 2003. <http://link.springer.com/10.1385/1-59259-374-7:115>.

desplazamiento de agua en un pletismómetro antes y 3 horas después del tratamiento. Los animales recibieron una inyección intraperitoneal de 1 ml de la suspensión del compuesto a ensayar (**41**, **46**, **52** y talidomida en dosis de 10 mg/kg). El nivel de edema se expresó en  $\mu\text{l}$  como la diferencia entre los volúmenes de ambas patas antes y después del tratamiento (Figura 54).



**Figura 54. Medición del volumen de edema de pata de rata ( $\mu\text{l}$ ) posterior a la administración de las drogas 41, 46, 52 y talidomida.**

El compuesto **41** presentó el mayor nivel de disminución del volumen de edema con respecto al control y a la talidomida (aproximadamente 36 %), mientras que **46** y **52** muestran el mismo perfil de disminución de edema que la talidomida, sin mostrar diferencias significativas entre ellos y el control ( $P < 0.05$ ).

#### *Modelo de hiperalgesia en roedores*

Para estudiar los mecanismos de dolor, se desarrollaron modelos de hiperalgesia por inflamación que emula las condiciones clínicas de dolor en humanos<sup>120</sup>. Estos modelos se basan en la inyección de agentes pro-inflamatorios en el talón de rata o ratón. Posteriormente se mide cuánto tiempo se mantiene la extremidad en contacto con una placa caliente, esto se denomina *tiempo de latencia* y se puede usar para inferir los mecanismos de dolor e hiperalgesia en animales con inflamación. Los animales retiran su extremidad en un acto reflejo a un estímulo nocivo, pero además exhiben comportamientos aún más complejos tales como la humectación con la boca de la extremidad afectada. El modelo de hiperalgesia se basa en la medición del tiempo de retirada de la pata de un

<sup>120</sup> Hargreaves, K., R. Dubner, F. Brown, C. Flores, and J. Joris. "A New and Sensitive Method for Measuring Thermal Nociception in Cutaneous Hyperalgesia." *Pain* 32, no. 1 (January 1988): 77–88.

roedor en una placa caliente a una temperatura constante cercana a los 51 °C. El tiempo de retirada de la pata se mide contra el control de la otra extremidad del propio animal, arrojando el tiempo de latencia calculado en segundos.

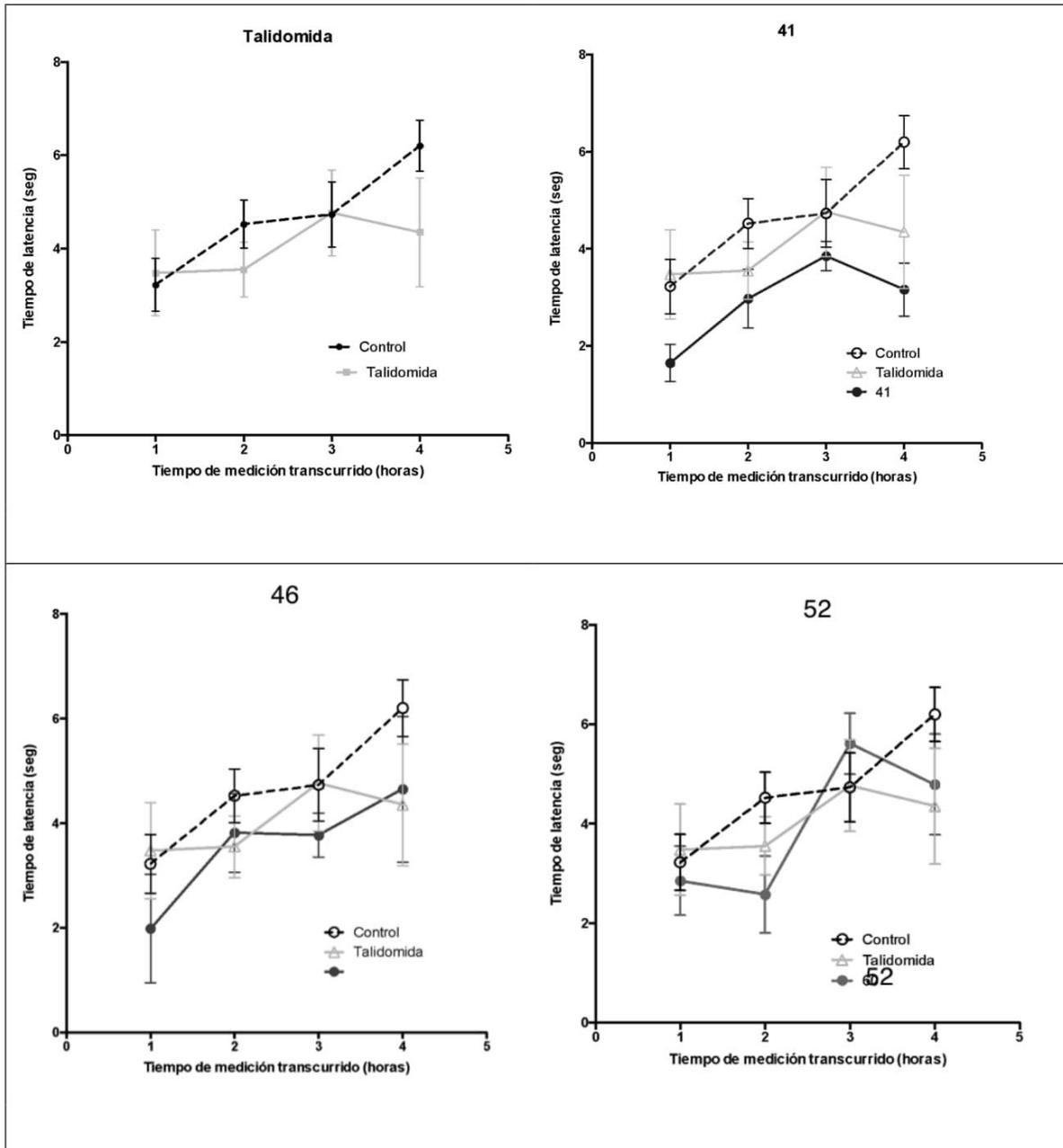


Figura 55. Evolución del tiempo de latencia al estímulo térmico luego de la administración de una dosis de 10mg/kg para 41, 46, 52 y talidomida respecto al control.

La talidomida presentó un perfil de evolución del tiempo de latencia sin diferencias significativas con el control. De las tres drogas sintetizadas y evaluadas, sólo **41** ofrece diferencias significativas comparando todos los perfiles de analgesia mediante un análisis

ANOVA de dos vías ( $\alpha = 0.05$ ). Estos resultados poseen directa relación con el mecanismo de sensibilización de los nociceptores debido al proceso inflamatorio.

En resumen y en vista de los resultados presentados, el compuesto **41** puede ser considerado como una nueva molécula prototipo con un excelente perfil anti-inflamatorio tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*. Estos resultados nos alientan a profundizar dicho estudio y evaluar la capacidad de **41** de disminuir la parasitemia en ratones infectados en la etapa aguda tardía así como prevenir, a través de la inmunomodulación del TNF- $\alpha$ , los efectos deletéreos de la respuesta inmune del huésped a la infección en la etapa crónica. Además, de administrar un tratamiento protector de la función cardíaca.



# Capítulo IX

---

**Parte Experimental**

**Materiales y métodos**

## Experimentos *in silico*

Los cálculos fueron realizados en los siguientes sistemas informáticos:

Procesador	Memoria	Sistema Operativo
Marca: AMD Modelo: 5150 Velocidad: 1.6 GHz Núcleos: 4	4 Gb RAM 512 Mb VRAM	Ubuntu 13.04-14.10, 64 bits
Marca: Intel Modelo: Core i7 Velocidad: 2.7 GHz Núcleos: 2 (Hyperthreading)	16 Gb RAM 512 Mb VRAM	OS X 10.8-10.10, 64 bits Ubuntu 14.04, 64 bits
Marca: Intel Modelo: Core i3 Velocidad: 2.7 GHz Núcleos: 2 (Hyperthreading)	16 Gb RAM 512 Mb VRAM	OS X 10.8-10.10, 64 bits Ubuntu 14.04, 64 bits

### Java

Java es un lenguaje orientado a objetos diseñado para ser multiplataforma y que pueda ser empleado el mismo software en diversos sistemas operativos. Esta característica junto con la posibilidad de emplearlo para crear applets e insertarlos en páginas HTML, o mediante servlets y páginas jsp generar código HTML dinámico. Todo ello con la capacidad de acceder a bases de datos. Constantemente están surgiendo nuevos apis, que proporcionan nuevas extensiones a las características del lenguaje.

<https://www.oracle.com/java/index.html>

### Python

Python es un lenguaje de programación que cuenta con estructuras de datos eficientes y de alto nivel y un enfoque simple pero efectivo a la programación orientada a objetos. Es un lenguaje de programación ideal para scripting y desarrollo rápido de aplicaciones en diversas áreas y multiplataforma. SciPy es un ecosistema de programación y herramientas empleadas en química, matemática, física, ingeniería y otras áreas.

<https://www.python.org/>, <http://www.scipy.org/>

### UCSF Chimera 1.8

UCSF Chimera es un programa altamente extensible para la visualización interactiva y análisis de estructuras moleculares, incluyendo mapas de densidad, ensamblados

supramoleculares, alineaciones de secuencia, análisis de trayectorias y visualización de resultados de acoplamiento. Puede generar animaciones e imágenes de alta calidad. Chimera incluye documentación completa y varios tutoriales y pueden descargarse de forma gratuita para usuarios académicos, gubernamentales, sin fines de lucro y también para uso personal. Está apoyado por National Institutes of Health (NIGMS P41-GM103311).  
<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>

### **Autodock Vina**

AutoDock Vina es un programa de código abierto para realizar cálculos de acoplamiento molecular. Fue diseñado e implementado por el Dr. Oleg Trott en el Molecular Graphics Lab at The Scripps Research Institute.  
<http://vina.scripps.edu/>

### **MGLTools**

AutoDockTools, o ADT, es la interfaz gráfica para AutoDock desarrollado por el mismo laboratorio que desarrolla Vina. Se puede utilizar para configurar, ejecutar y analizar los resultados de acoplamiento, así como calcular superficies moleculares, graficar proteínas, calcular interacciones electrostáticas y más. Su versión en suite incluye PMV.  
<http://mgltools.scripps.edu/>

### **OpenBabel**

OpenBabel es un conjunto de herramientas informáticas diseñadas para convertir diferentes lenguajes de datos químicos. Es un proyecto abierto y colaborativo, permitiendo que cualquiera pueda buscar, convertir, analizar o almacenar los datos de modelado molecular, química, bioquímica o áreas afines.  
<http://openbabel.org/>

### **Autogrow**

Autogrow 3.0 es un algoritmo evolucionario que optimiza ligandos candidatos para predecir la afinidad de unión y sus propiedades *druglike*. Autogrow diseña moléculas químicamente factibles introduciendo variaciones en el proceso de optimización automatizado.  
<http://autogrow.ucsd.edu/>

### **SciDAVis**

SciDAVis es una aplicación gratuita interactiva dirigida al análisis de datos y gráficos de alta calidad. Combina una curva de aprendizaje rápida y una interfaz gráfica de usuario intuitiva, fácil de usar con potentes prestaciones y extensibilidad. SciDAVis funciona en GNU/Linux, Windows y MacOS X.  
<http://scidavis.sourceforge.net/>

**StatCato**

Statcato es una aplicación de software libre de Java desarrollada para cálculos estadísticos elementales.

<http://www.statcato.org/statcato/>

**PaDEL-Descriptor**

PaDEL-Descriptor es un software para calcular huellas dactilares y descriptores moleculares. El software calcula 1875 descriptores (1444 descriptores 1D y 2D, y 431 3D) y 12 tipos de huellas dactilares. Los descriptores y las huellas dactilares se calculan utilizando el The Chemistry Development Kit con descriptores adicionales.

<http://padel.nus.edu.sg/software/padeldescriptor/>

**LigPlus**

LigPlus (LigPlot+) es una interfaz gráfica para los programas LIGPLOT y DIMPLOT. Los diagramas generados por estos programas pueden ser editados de forma interactiva en pantalla y luego escritos en un archivo PostScript para imprimir o convertir a diversos formatos de imagen.

<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LigPlus/>

## Síntesis orgánica

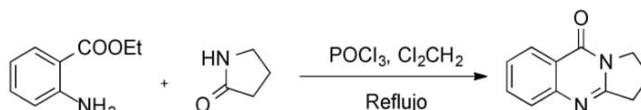
Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Electrothermal 9100-SERIES-Digital y se expresan sin corregir. Los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN se determinaron en un aparato Bruker (300 MHz) o Bruker Avance 500 a temperatura ambiente utilizando TMS como patrón interno. La FID de cada espectro se procesó con el software Mnova 9.0. Los desplazamientos químicos se expresan en partes por millón (ppm). Los valores de las constantes de acoplamiento ( $J$ ), están dados en Hertz (Hz). Los espectros de resonancia magnética nuclear fueron realizados en  $\text{CDCl}_3$  o  $\text{DMSO-d}_6$  según el caso. Los espectros de masa de alta resolución (HRMS) se realizaron en un espectrómetro de masa Bruker micrOTOF-Q II.

La síntesis mediante tecnología de microondas se realizó en un microondas Anton Paar Monowave 300 ®.

La cromatografía en capa delgada (TLC) se realizó en cromatofolios de aluminio y fase estacionaria silicagel Merck (espesor 0.25 mm). La cromatografía en columna se realizó silica gel Merk 60 (0.063-0.200 mm)

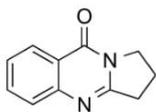
### Síntesis de compuestos **1-22**

#### Síntesis de **1**



*Procedimiento general:* A una solución de antranilato de etilo (14.0 mmol) y 2-pirrolidona (20.0 mmol) en 10 ml de  $\text{Cl}_2\text{CH}_2$  anhidro a  $0^\circ\text{C}$  se agregó 2.0 ml de  $\text{POCl}_3$  recién destilado. La mezcla se calentó a reflujo durante 3 horas. Se evaporó el  $\text{Cl}_2\text{CH}_2$  a presión reducida y se neutralizó, en baño de hielo el aceite remanente, con una solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  25% en agua. El producto obtenido se filtró y purificó por cromatografía en columna silica gel, fase móvil Eter:AcOEt (2:8) obteniéndose un sólido blanco.

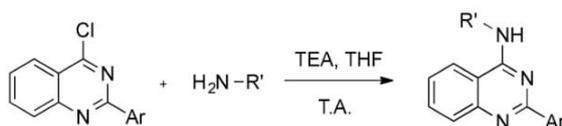
**1.** 2,3-dihidropirrolo[2,1-*b*]quinazolin-9(1*H*)-ona. Rend: 1.82 g (70%). Pf (98-100)°C, Pf Lit.<sup>121</sup> (104-106)°C



<sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.29 (d, J = 7.5 Hz, 1H, ArH), 7.55- 7.85 (m, 2H, ArH), 7.46 (dt, J = 12.6, 6.3 Hz, 1H, ArH), 4.22 (t, J = 6.3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>NCO), 3.19 (t, J = 6.3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CN), 2.30 (q, J = 6.7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>).

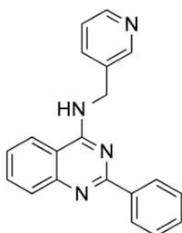
<sup>13</sup>C-RMN (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 160.7, 159.3, 149.0, 133.9, 126.6, 126.2, 120.3, 46.3, 32.3, 19.3.

## Síntesis de compuestos **2-11**



*Procedimiento general:* A una solución de la correspondiente 4-cloro-2-fenilquinazolina (2.1 mmol) en THF anhidro (4 ml), se agregó TEA (10 mmol) y la amina de interés (3.2 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, el THF se evaporó a presión reducida y el crudo obtenido se purificó por columna (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 100%→8:2).

**2.** 2-fenil-*N*-(piridin-3-ilmetil)quinazolin-4-amina. Rend. 0.37 g (58 %), Pf (131-133) °C



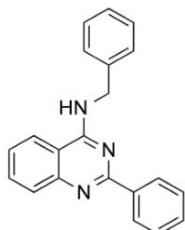
<sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.98 (d, J = 1.3 Hz, 1H, ArH), 8.73 (dd, J = 7.5, 1.3 Hz, 1H, ArH), 8.46-8.31 (m, 3H, ArH), 8.86 (dd, J = 7.5, 1.4 Hz, 1H, ArH), 7.79 (td, J = 7.5, 1.4 Hz, 1H, ArH), 7.54 – 7.47 (m, 3H, ArH), 7.37 (m, 3H, NH, ArH), 7.36 – 7.33 (m, 1H, ArH), 4.46 (d, J = 5.9 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 160.01, 159.59, 150.42, 149.54, 148.58, 148.19, 138.97, 135.76, 135.69, 133.35, 130.58, 128.72, 128.37, 128.33, 125.98, 124.00, 123.76, 123.15, 114.27, 42.10.

HR-MS (ESI): calcd, C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>, [M+H]<sup>+</sup>*m/z*: 313.1672, encontrado: 313.1673.

<sup>121</sup> Potewar, Taterao M. "Synthesis of Tryptanthrin and Deoxyvasicinone by a Regioselective Lithiation-Intramolecular Electrophilic Reaction Approach." *Arkivoc* 2008, no. 14 (August 29, 2008): 100. doi:10.3998/ark.5550190.0009.e11.

3. N-bencil-2-fenilquinazolin-4-amina. Rend. 0.52 g (81%) Pf (122-124)°C, Pf. Lit.<sup>122</sup> 122 °C

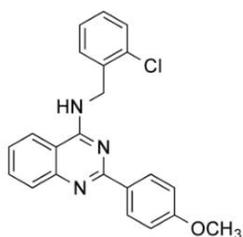


<sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.94 (t, J = 5.9 Hz, 1H, ArH), 8.49 – 8.43 (m, 2H, ArH), 8.33 (d, J = 8.2 Hz, 1H, ArH), 7.81 – 7.78 (m, 2H, ArH), 7.50 – 7.45 (m, 5H, ArH), 7.34 (m, 3H, NH, ArH), 7.24 (t, J = 7.4 Hz, 1H, ArH), 4.94 (d, J = 5.9 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 164.81, 157.32, 154.64, 139.82, 136.77, 131.59, 131.20, 130.52, 129.13, 128.83, 128.46, 127.57, 126.92, 125.49, 125.19, 111.86, 43.41.

HR-MS (ESI): Calcd. C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>, [M+H]<sup>+</sup>m/z: 312.2563, encontrado: 312.2560.

4. N-(2-clorobencil)-2-(4-metoxifenil)quinazolin-4-amina. 0.33 g (42 %). Pf (205-206)°C



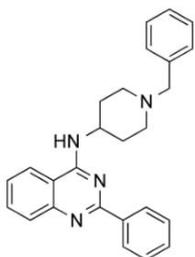
<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.37 – 8.29 (m, 1H, ArH), 7.57 (d, J = 6.3 Hz, 2H, ArH), 7.45 – 7.39 (m, 3H, ArH), 7.36 – 7.32 (m, 4H, ArH), 7.28 – 7.22 (m, 2H, NH, ArH), 7.00 (d, J = 9.0 Hz, 1H, ArH), 4.22 (d, J = 6.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.79 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 164.08, 163.00, 157.13, 154.06, 137.80, 134.01, 131.52, 131.52, 131.24, 130.57, 130.57, 130.14, 129.21, 127.98, 126.44, 125.99, 125.59, 113.91, 113.91, 111.87, 56.04, 42.43.

HR-MS (ESI): Calcd. C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>O, [M+H]<sup>+</sup>m/z: 376. 1669, encontrado: 376.1671

<sup>122</sup> Staderini, Matteo, Nieves Cabezas, Maria Laura Bolognesi, and J. Carlos Menéndez. "Solvent- and Chromatography-Free Amination of  $\Pi$ -Deficient Nitrogen Heterocycles under Microwave Irradiation. A Fast, Efficient and Green Route to 9-Aminoacridines, 4-Aminoquinolines and 4-Aminoquinazolines and Its Application to the Synthesis of the Drugs Amsacrine and Bistacrine." *Tetrahedron* 69, no. 3 (January 2013): 1024–30. doi:10.1016/j.tet.2012.11.083.

5. N-(1-bencilpiperidin-4-il)-2-fenilquinazolin-4-amina. Rend. 0.50 g (61 %). Pf. (158-159)°C

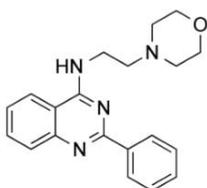


$^1\text{H}$ -RMN (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.11 (s, 1H, ArH), 7.94 (s, 1H, ArH), 7.78 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H, ArH), 7.71 – 7.64 (m, 2H, ArH), 7.55 (s, 1H, ArH), 7.50 – 7.40 (m, 2H, ArH), 7.38 (s, 1H, NH), 7.35 – 7.12 (m, 5H, ArH), 3.60 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.55 – 3.44 (m, 2H, AlifH), 3.38 (s, 1H, CH), 2.72 – 2.54 (m, 2H, AlifH), 2.40 – 2.22 (m, 2H, AlifH), 1.73 – 1.64 (m, 2H, AlifH).

$^{13}\text{C}$ -RMN (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  162.00, 159.10, 153.52, 137.93, 136.11, 131.81, 131.78, 130.99, 129.11, 128.81, 128.80, 128.12, 127.95, 127.10, 126.55, 126.08, 125.00, 111.17, 64.22, 51.20, 50.95, 50.00, 30.47.

HR-MS (ESI): Calcd.  $\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{N}_4$ ,  $[\text{M}+\text{H}]^+m/z$ : 395.8734, encontrado: 395.8731

6. N-(2-morfolinoetil)-2-fenilquinazolin-4-amina. Rend. 0.45 g (65 %). Pf. (138-140)°C.

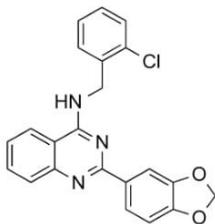


$^1\text{H}$ -RMN (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.59 (dd,  $J$  = 7.9, 1.4 Hz, 1H, ArH), 7.97 (dd,  $J$  = 7.5, 1.4 Hz, 1H, ArH), 7.79 (td,  $J$  = 7.5, 1.6 Hz, 1H, ArH), 7.69 (dd,  $J$  = 7.4, 1.3 Hz, 2H, ArH), 7.57 (td,  $J$  = 7.5, 1.4 Hz, 1H, ArH), 7.46 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 1H, ArH), 7.42 – 7.33 (m, 2H, ArH), 3.76 (t,  $J$  = 6.1 Hz, 4H,  $\text{OCH}_2$ ), 3.69 (s, 1H, NH), 3.25 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ), 2.70 (t,  $J$  = 6.1 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 2.54 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 2.48 (t,  $J$  = 6.1 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ).

$^{13}\text{C}$ -RMN (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  160.15, 159.69, 150.36, 139.17, 133.14, 130.50, 128.70, 128.32, 128.29, 125.74, 123.11, 114.32, 66.69, 57.41, 53.95, 38.32.

HR-MS (ESI): Calcd.  $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}$ ,  $[\text{M}+\text{H}]^+m/z$ : 335.1256, encontrado: 335.1260

**7.** 2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(2-clorobencil)quinazolin-4-amina Rend. 0.68 (84%). Pf. (215-217)°C

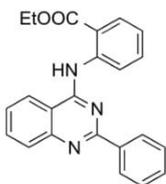


$^1\text{H-RMN}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  8.92 (t,  $J = 5.7$  Hz, 1H, ArH), 8.35 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H, ArH), 8.01 (dd,  $J = 8.2, 1.2$  Hz, 1H, ArH), 7.89 – 7.70 (m, 3H, ArH), 7.55 – 7.47 (m, 3H, NH, ArH), 7.28 (dd,  $J = 9.4, 4.7$  Hz, 2H, ArH), 6.98 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H, ArH), 6.08 (s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 4.97 (d,  $J = 5.6$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ).

$^{13}\text{C-RMN}$  (126 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  167.04, 159.89, 150.44, 147.86, 137.15, 136.37, 133.33, 132.57, 131.36, 130.12, 129.66, 129.43, 128.20, 127.66, 125.69, 123.21, 122.94, 114.10, 108.39, 108.13, 101.80, 42.08.

HR-MS (ESI): Calcd.  $\text{C}_{22}\text{H}_{16}\text{ClN}_3\text{O}_2$ ,  $[\text{M}+\text{H}]^+m/z$ : 390.0897, encontrado: 390.0898

**8.** 2-((2-fenilquinazolin-4-il)amino)benzoato de etilo. Rend. 0.55 g (72 %). Pf. (185-186)°C

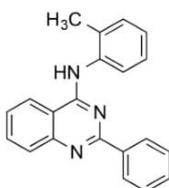


$^1\text{H-RMN}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  11.56 (s, 1H, NH), 8.31 – 8.12 (m, 3H, ArH), 8.10 (dd,  $J = 7.4, 1.5$  Hz, 1H, ArH), 7.92 – 7.79 (m, 2H, ArH), 7.69 – 7.48 (m, 3H, ArH), 7.22 – 7.11 (m, 1H, ArH), 7.07 (m, 1H, ArH), 6.99 (m, 1H, ArH), 6.30 (dd,  $J = 7.4, 2.1$  Hz, 1H, ArH), 4.01 (q,  $J = 7.0$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2$ ), 1.25 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

$^{13}\text{C-RMN}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  167.32, 162.64, 153.79, 148.41, 139.81, 136.31, 132.19, 131.71, 131.22, 130.68, 129.89, 128.66, 128.48, 127.29, 126.76, 125.07, 124.86, 122.27, 113.31, 64.11, 15.03.

HR-MS (ESI): Calcd.  $\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_2$ ,  $[\text{M}+\text{H}]^+m/z$ : 370.1152, encontrado: 370.1155

**9.** 2-fenil-N-(2-metilfenil)quinazolin-4-amina. Rend. 0.55 (80%) Pf (154-156) °C, Pf. Lit.<sup>79</sup> (155-156)°C

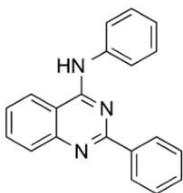


$^1\text{H-RMN}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  11.43 (s, 1H, NH), 8.27 – 8.13 (m, 3H, ArH), 8.09 (dd,  $J = 7.4, 1.5$  Hz, 1H, ArH), 7.88 – 7.76 (m, 2H, ArH), 7.63 – 7.46 (m, 3H, ArH), 7.19 – 7.08 (m, 1H, ArH), 7.00 (m, 1H, ArH), 6.88 (m, 1H, ArH), 6.26 (dd,  $J = 7.4, 2.1$  Hz, 1H, ArH), 2.31 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

$^{13}\text{C-RMN}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  162.60, 153.77, 148.35, 139.73, 136.29, 132.15, 131.68, 131.17, 130.63, 129.83, 128.62, 128.45, 127.25, 126.74, 125.01, 124.83, 122.24, 113.30, 17.78.

HR-MS (ESI): Calcd.  $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{N}_3$ ,  $[\text{M}+\text{H}]^+m/z$ : 312.1432, encontrado: 312.1433

**10.** N, fenil-2-fenilquinazolin-4-amina. Rend 0.25 g (41%) Pf (152-153) °C, Pf lit.<sup>123</sup> (151-152)

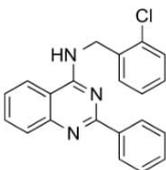


<sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 11.49 (s, 1H, NH), 8.90 (d, J = 8.3 Hz, 1H, ArH), 8.39–8.34 (m, 2H, ArH), 8.31 (d, J = 8.4 Hz, 1H, ArH), 8.07 (t, J = 7.3 Hz, 1H, ArH), 7.88–7.84 (m, 2H, ArH), 7.80 (t, J = 7.4 Hz, 1H, ArH), 7.68 (t, J = 7.3 Hz, 1H, ArH), 7.62 (t, J = 7.5 Hz, 2H, ArH), 7.56–7.50 (m, 2H, ArH), 7.34 (t, J = 7.4 Hz, 1H, ArH).

<sup>13</sup>C-RMN (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 159.10, 157.52, 137.23, 135.81, 133.18, 129.23, 129.08, 128.84, 128.07, 126.38, 124.60, 124.52, 112.96.

HR-MS (ESI): Calcd. C<sub>20</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>, [M+H]<sup>+</sup>m/z: 297.7212, encontrado: 297.7211

**11.** N-(2-clorobencil)-2-fenilquinazolin-4-amina. Rend 0.53 g (74%) Pf (159-161) °C



<sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.98 (m, 4H, ArH), 7.83 (m, 1H, ArH), 7.60 (m, 1H, ArH), 7.56 – 7.47 (m, 3H, ArH), 7.40 (m, 2H, ArH), 7.25 (m, 2H, ArH), 4.88 (s, 1H, NH), 4.65 (s, 2H, CH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 164.27, 158.28, 150.17, 137.52, 136.29, 135.03, 132.02, 131.68, 130.02, 129.80, 129.43, 128.62, 128.45, 128.30, 126.65, 126.60, 125.90, 113.00, 43.29.

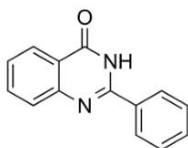
HR-MS (ESI): Calcd. C<sub>21</sub>H<sub>16</sub>ClN<sub>3</sub>, [M+H]<sup>+</sup>m/z: 346.5643, encontrado: 346.5640

## Síntesis de compuesto **12**

A una solución de la correspondiente 4-cloro-2-fenilquinazolina (2.0 mmol) en THF (5 mL), se agregó 5 ml de una solución acuosa Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 25%. La mezcla de reacción se sometió a calentamiento a reflujo por 30 min. El THF se evaporó a presión reducida, el crudo obtenido se filtró por succión y se recristalizó de EtOH 96°.

<sup>123</sup> Bhushan R. Dravyakar<sup>1</sup> and Pramod B. Khedekar. "Study of synthesis of novel N,2-diphenylquinazolin-4-amine derivatives as an anti-inflammatory and analgesic agent." Der Pharma Chemica 4 no. 2 (2012):699-706. ISSN 0975-413X. CODEN (USA): PCHHAX

**12.** 2-fenilquinazolin-4(3H)-ona. Rend. 0.39g (90%). Pf (240-242)°C, Pf Lit<sup>124</sup> (235-236)°C



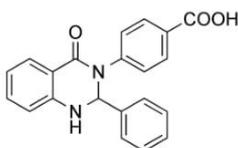
<sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 12.55 (s, 1H, NH), 8.18 (m, 3H, ArH), 7.59 (m, 4H, ArH), 7.84 (m, 1H, ArH), 7.75 (d, J = 7.25, 1H, ArH).

<sup>13</sup>C-RMN (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 164.7, 136.3, 134.8, 131.61, 128.9, 125.98, 123.42, 119.87.

### Síntesis de compuestos **13-20**

Se agregó a una solución de la amina correspondiente (2.0 mmol) en 8 mL de EtOH : H<sub>2</sub>O (7:1), anhídrido isoatoico (2.0 mmol, 0.326 g), aldehído adecuadamente sustituido (2.0 mmol) y 10 mg de resina Amberlyst-15. La mezcla de reacción se agitó y calentó a reflujo por dos horas. Luego la suspensión se filtró en caliente para recuperar la resina. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y el sólido obtenido se filtró y recristalizó de EtOH 96°.

**13.** Ácido 4-(4-oxo-2-fenil-1,4-dihidroquinazolin-3(2H)-il)benzoico. Rend. 0.21 g (30%). Pf.: (238-240)°C

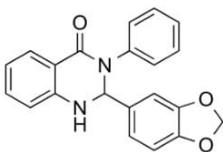


<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 12.94 (s, 1H, COOH), 7.90 (d, J = 8.5 Hz, 2H, ArH), 7.81 (m, 1H, ArH), 7.73 (d, 7.8 Hz, 1H, ArH), 7.43-7.23 (m, 8H, ArH), 6.80-6.70 (m, 2H, NH, ArH), 6.40 (s, 1H, NCHN).

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 167.22, 162.88, 147.03, 145.13, 140.81, 134.54, 130.23, 128.92, 128.82, 128.57, 128.12, 127.01, 125.71, 118.16, 115.70, 115.48, 72.37.

<sup>124</sup> Wang, Li-Xia, Jun-Feng Xiang, and Ya-Lin Tang. "Copper-Catalyzed Domino Reaction Involving C-C Bond Cleavage To Construct 2-Aryl Quinazolinones: Copper-Catalyzed Domino Reaction Involving C-C Bond Cleavage." *European Journal of Organic Chemistry* 2014, no. 13 (May 2014): 2682–85. doi:10.1002/ejoc.201400108.

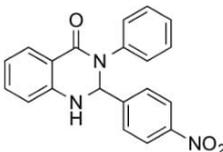
**14.** 2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-3-fenil-2,3-dihidroquinazolin-4(1H)-ona. Rend. 0.25g (37%). Pf (222-224)°C



$^1\text{H-RMN}$  (300MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  7.72 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H, ArH), 7.55 (m, 1H, ArH), 7.34 (t,  $J=8.0$  Hz, 2H, ArH), 7.30–7.25 (m, 3H, ArH), 7.20 (t,  $J=7.5$  Hz, 1H, ArH), 6.93 (d,  $J=7.5$  Hz, 2H, ArH), 6.81 (s, 1H, NH), 6.77–6.71 (m, 2H, ArH), 6.20 (s, 1H, NCHN), 5.97 (s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ).

$^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  162.73, 147.82, 147.66, 147.02, 141.2, 135.07, 134.23, 129.06, 128.40, 126.72, 126.28, 120.74, 118.00, 115.76, 115.26, 108.26, 107.30, 101.64, 72.85.

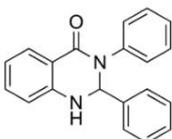
**15.** 2-(4-nitrofenil)-3-fenil-2,3-dihidroquinazolin-4(1H)-ona. Rend: 0.2 g (30%). Pf (191-194)°C



$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.15 (d, 1H,  $J = 7.9$  Hz, ArH), 7.88–7.91 (m, 2H, ArH), 7.34–7.36 (m, 2H, ArH), 7.24–7.31 (m, 6H, ArH), 6.89–6.91 (m, 1H, ArH), 6.58 (d, 1H,  $J = 7.9$  Hz, ArH), 6.22 (s, 1H, NH), 4.78 (s, 1H, NCHN).

$^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  163.44, 149.73, 145.57, 142.70, 136.63, 133.50, 129.40, 129.17, 128.22, 123.77, 123.32, 122.98, 121.45, 120.44, 116.00, 74.65.

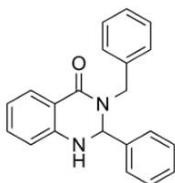
**16.** 2,3-difenil-2,3-dihidroquinazolin-4(1H)-ona. Rend. 0.33 g (55%). Pf (207-209) °C



$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  7.73 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, ArH), 7.66 (m, 2H, ArH), 7.38 (d,  $J = 7.2$  Hz, 2H, ArH), 7.39-7.23 (m, 7H, ArH), 7.19 (t,  $J = 7.2$  Hz, 1H, ArH), 6.77 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, ArH), 6.71 (s, 1H, NH), 6.29 (s, 1H, NCHN).

$^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  162.23, 146.52, 140.75, 133.78, 128.52, 128.37, 127.91, 126.53, 126.21, 125.93, 117.44, 115.36, 114.71, 72.67.

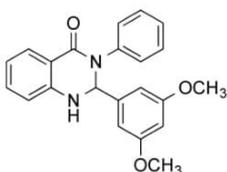
**17.** 3-bencil-2-fenil-2,3-dihidroquinazolin-4(1H)-ona. Rend. 0.15 g (40%). Pf (119-121) °C Pf Lit. <sup>125</sup> (125-127) °C



<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.87 (dd, J=7.8, 1.2 Hz, 1H, ArH), 7.62 – 7.53 (m, 2H, ArH), 7.52 – 7.45 (m, 2H, ArH), 7.38 – 7.19 (m, 5H, ArH), 7.17 – 7.11 (m, 2H, ArH), 6.94 (m, 3H, NH, ArH), 5.98 (s, 1H, NCHN), 4.32 (s, 2H, CH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 165.20, 145.59, 141.12, 136.76, 131.56, 129.26, 128.94, 128.61, 127.99, 127.59, 126.77, 125.09, 117.69, 115.34, 78.85, 53.69.

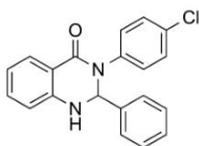
**18.** 2-(3,5-dimetoxifenil)-3-fenil-2,3-dihidroquinazolin-4(1H)-ona. Rend. 0.23 g (33%). Pf (225-227) °C



<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.69 – 7.51 (m, 2H, ArH), 7.46 – 7.26 (m, 5H, ArH), 7.22 – 7.12 (m, 2H, ArH), 6.95 (m, 1H, ArH), 6.86 (d, J = 2.9 Hz, 2H, ArH), 6.39 (s, 1H, NH), 5.68 (s, 1H, NCHN), 3.74 (s, 6H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 165.20, 161.91, 144.75, 141.12, 137.37, 131.56, 129.27, 127.59, 125.08, 124.75, 122.13, 117.69, 115.34, 111.04, 101.27, 78.85, 55.47.

**19.** 3-(4-clorofenil)-2-fenil-2,3-dihidroquinazolin-4(1H)-ona. Rend. 0.13 g (20%). Pf (217-220) °C, Pf Lit<sup>126</sup> (217-219) °C



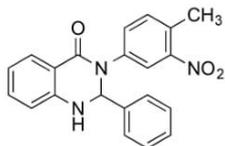
<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.12 (d, 1H, J = 7.8 Hz, ArH), 7.37–7.42 (m, 6H, ArH), 7.23–7.25 (m, 2H, ArH), 7.12–7.15 (m, 2H, ArH), 6.90–6.94 (m, 1H, ArH), 6.64 (d, 1H, J = 7.9 Hz, ArH), 6.08 (s, 1H, NH), 4.76 (s, 1H, NCHN).

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 165.20, 145.59, 144.75, 141.12, 131.56, 129.26, 129.20, 128.94, 127.59, 126.77, 125.41, 125.08, 117.69, 115.34, 78.85.

<sup>125</sup> Sharma, Moni, Shashi Pandey, Kuldeep Chauhan, Deepty Sharma, Brijesh Kumar, and Prem M. S. Chauhan. "Cyanuric Chloride Catalyzed Mild Protocol for Synthesis of Biologically Active Dihydro/Spiro Quinazolinones and Quinazolinone-Glycoconjugates." *The Journal of Organic Chemistry* 77, no. 2 (January 20, 2012): 929–37. doi:10.1021/jo2020856.

<sup>126</sup> Wang, Li-Min, Liang Hu, Jue-Hua Shao, Jianjun Yu, and Liang Zhang. "A Novel Catalyst zinc(II) Perfluorooctanoate [Zn(PFO)<sub>2</sub>]-Catalyzed Three-Component One-Pot Reaction: Synthesis of Quinazolinone Derivatives in Aqueous Micellar Media." *Journal of Fluorine Chemistry* 129, no. 12 (December 2008): 1139–45. doi:10.1016/j.jfluchem.2008.08.005.

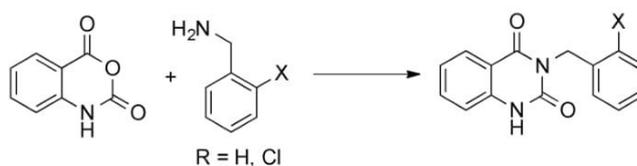
**20.** 3-(4-metil-3-nitrofenil)-2-fenil-2,3-dihidroquinazolin-4(1H)-ona 0.078g. Rend: 11%. Pf (175-178) °C.



$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  7.93 (s, 1H, ArH), 7.73 (m, 2H, ArH), 7.55 – 7.24 (m, 8H, ArH), 6.80-6.71 (m, 1H, ArH), 6.44 (s, 1H, NH), 5.76 (s, 1H, NCHN), 2.46 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

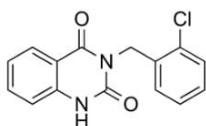
$^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  163.07, 148.95, 147.30, 140.40, 133.23, 131.44, 129.03, 128.94, 128.53, 127.21, 118.14, 115.37, 115.20, 72.67, 19.57.

Síntesis de compuestos **21-22**



*Procedimiento general:* Se mezclaron 2.0 mmol de anhídrido isatoico (0.32 g) con 4.0 mmol de la bencilamina adecuadamente sustituida. Se sometió a calentamiento a reflujo en baño de glicerina a 160 °C durante 30 minutos hasta completar la reacción (TLC fase móvil  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  : MeOH 8:2). Se dejó enfriar el sólido y se suspendió en EtOH. La suspensión se filtró por succión y se recristalizó de EtOH:H<sub>2</sub>O

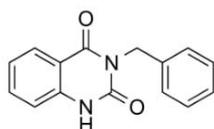
**21.** 3-(2-clorobencil)quinazolina-2,4(1H,3H)-diona. Rend: 0.8 g (70%). Pf (211-212) °C



$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10.43 (s, 1H, NH), 8.00 (dd,  $J = 7.4, 2.0$  Hz, 1H, ArH), 7.52-7.34 (m, 3H, ArH), 7.27 (td,  $J = 7.5, 2.0$  Hz, 1H, ArH), 7.19 – 7.00 (m, 3H, ArH), 6.01 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ).

$^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  161.63, 150.52, 139.19, 135.45, 135.05, 134.95, 130.33, 129.97, 129.80, 127.31, 126.97, 122.18, 115.09, 113.77, 45.01.

**22.** 3-bencilquinazolin-2,4(1H,3H)-diona. Rend: 0.30 g (60%). Pf (226-228)°C Pf Lit.<sup>127</sup> (233-234)°C



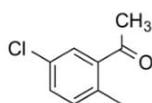
<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 10.23 (s, 1H, NH), 8.16 (d, J = 7.9 Hz, 1H, ArH), 7.65–7.51 (m, 3H, ArH), 7.35–7.20 (m, 4H, ArH), 7.03 (d, J = 8.1 Hz, 1H, ArH), 5.30 (s, 2H, CH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 162.3, 152.0, 138.5, 136.8, 135.1, 128.9, 128.5, 128.4, 127.7, 123.5, 115.0, 114.6.

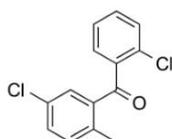
### Síntesis de los compuestos **34-36**



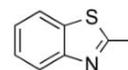
R =



34



35

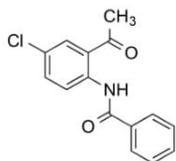


36

*Procedimiento general:* A una mezcla de 2 mmol de la correspondiente amina aromática y 0.066 g (0.5 mmol) de DMAP en 5 ml de Cl<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> anhidro en baño de hielo-NaCl se le agregó lentamente y con agitación vigorosa una solución de de cloruro de benzoilo (0.28 g, 2 mmol) en 5 ml de Cl<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> anhidro. La mezcla de reacción se dejó agitando por dos horas a temperatura ambiente durante 2 horas. La fase orgánica fue separada y se lavó con agua y luego con una solución acuosa de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> carbonato de potasio al 10 % (2x 20 mL). La fase orgánica se secó con MgSO<sub>4</sub> anh., se filtró y evaporó a presión reducida. El sólido resultante se recristalizó de una mezcla EtOH-agua.

<sup>127</sup> Wang, Shu-Liang, Ke Yang, Chang-Sheng Yao, and Xiang-Shan Wang. "Green Synthesis of Quinazolinone Derivatives Catalyzed by Iodine in Ionic Liquid." *Synthetic Communications* 42, no. 3 (February 2012): 341–49. doi:10.1080/00397911.2010.524340.

**34.** N-(2-acetil-4-clorofenil)benzamida. Rend. 0.372 g (69%). Pf. (140-141)°C Pf Lit.<sup>128</sup> (140-142)°C

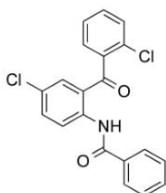


<sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 11.78 (s, 1H, CONH), 8.90 – 8.85 (m, 1H, ArH), 8.07 – 8.01 (m, 2H, ArH), 7.76 – 7.71 (m, 2H, ArH), 7.66 – 7.58 (m, 3H, ArH), 1.61 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 198.98, 165.69, 139.47, 137.92, 134.23, 132.99, 132.83, 132.14, 129.73, 128.78, 128.48, 127.28, 127.23, 124.31, 122.89.

HR-MS (ESI): Calcd. C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>ClNO<sub>2</sub>, [M+H]<sup>+</sup>m/z: 274.1345, encontrado: 274.1344.

**35.** N-(4-cloro-2-(2-clorobenzoil)fenil)benzamida. Rend. 0.376 (50%). Pf (174-176)°C.



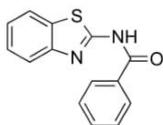
<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 11.42 (s, 1H, CONH), 8.25 (d, J=8.85, 1H, ArH), 7.84-7.79 (m, 3H, ArH), 7.62-7.54 (m, 6H, ArH), 7.51-7.39 (m, 2H, ArH).

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) 197.38, 151.67, 139.69, 134.16, 133.38, 132.58, 131.77, 130.89, 129.38, 128.97, 128.87, 128.35, 128.23, 128.21, 119.40, 117.44.

HR-MS (ESI): Calcd. C<sub>20</sub>H<sub>13</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>, [M+H]<sup>+</sup>m/z: 370.1358, encontrado: 370.1350.

<sup>128</sup> Mudry, C.A., and A.R. Frasca. "Photo-Oxidation of Indole Derivatives." Tetrahedron 29, no. 4 (January 1973): 603–13. doi:10.1016/0040-4020(73)85002-1.

**36.** N-(benzo[d]tiazol-2-il)benzamida. Rend. 0.382 g (75%). Pf (186-187)°C Pf Lit<sup>129</sup>(185-187)°C

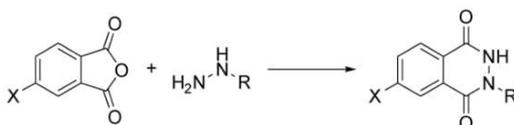


<sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 12.88 (s, 1H, CONH), 8.16 – 8.08 (m, 1H, ArH), 7.99 (d, J = 7.8 Hz, 1H, ArH), 7.76 (d, J = 8.0 Hz, 1H, ArH), 7.64 (t, J = 7.4 Hz, 1H, ArH), 7.54 (t, J = 7.6 Hz, 3H, ArH), 7.48 – 7.41 (m, 1H, ArH), 7.35 – 7.27 (m, 1H, ArH).

<sup>13</sup>C-RMN (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 166.31, 159.24, 133.18, 132.26, 131.78, 128.95, 128.64, 126.50, 124.00, 122.06, 120.62.

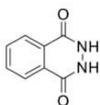
HR-MS (ESI): Calcd. C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>OS, [M+H]<sup>+</sup>m/z: 255.1069, encontrado: 255.1066.

Síntesis de los compuestos **37-45**



**Procedimiento general:** a una mezcla de anhídrido ftálico (2.5 mmol, 0.37 g) con la hidrazina correspondiente (2.5 mmol) y 1 ml de DMF se sometió a calentamiento mediante tecnología de microondas a la temperatura y tiempo adecuados. Después de completada la reacción (TLC, Cl<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>: MeOH 8:2), la mezcla se trituró en EtOH en frío y el sólido obtenido se filtró por succión. El producto se recrystalizó de EtOH-agua.

**37.** 2,3-dihidroftalazin-1,4-diona. Tiempo: 3:00 min. Temp.: 170°C. Rend: 0.14 g (37%). Pf >350 (desc.) Pf Lit.<sup>130</sup> (341-344)° C



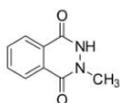
<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 11.22 (s, 2H, NH), 7.91 – 7.77 (d, 2H, ArH), 7.69-7.43 (d, 2H, ArH).

<sup>13</sup>C-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 164.30, 129.31, 128.93, 126.22.

<sup>129</sup> Fajkusova, Dagmar, and Pavel Pazdera. "Unexpected Formation of Benzothiazoles in the Synthesis of New Heterocycles: Benzo-1,2,4-Dithiazines." *Synthesis* 2008, no. 8 (April 2008): 1297–1305. doi:10.1055/s-2008-1067008.

<sup>130</sup> Drew, H. D. K., and H. H. Hatt. "4. Chemiluminescent Organic Compounds. Part I. Isomeric Simple and Complex Hydrazides of Phthalic Acid and Mode of Formation of Phthalazine and Isoindole Rings." *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 1937, 16. doi:10.1039/jr9370000016.

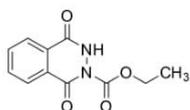
**38.** 2-metil-2,3-dihidroftalazin-1,4-diona. Tiempo: 3:00 min. Temp.: 170°C. Rend: 0.40 g (91%). Pf (240-242) °C Pf Lit<sup>131</sup> (240-243)°C



<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 11.20 (s, 1H, NH) 7.90 – 7.72 (m, 2H, ArH), 7.68 – 7.44 (m, 2H, ArH), 3.46 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 164.11, 163.01, 129.29, 128.90, 126.21, 37.61.

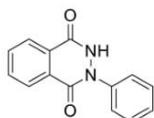
**39.** 1,4-dioxo-3,4-dihidroftalazin-2(1H)-etilcarboxilato. Tiempo: 2:00 min. Temp.: 160°C. Rend: 0.36 (62%). Pf (167-168) °C



<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 11.67 (s, 1H, NH), 8.05 (m, 1H), 7.85 – 7.76 (m, 1H, ArH), 7.65 – 7.59 (m, 2H, ArH), 4.18 (q, J = 7.1 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>), 1.31 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 164.13, 163.03, 150.83, 129.20, 128.89, 126.19, 65.61, 14.56.

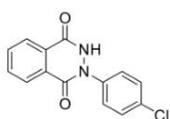
**40.** 2-fenil-2,3-dihidroftalazin-1,4-diona. Tiempo: 3:00 min. Temp.: 180°C. Rend: 0.29 g (51%). Pf (180-181) °C Pf Lit.<sup>132</sup> (177-180)°C



<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 11.65 (s, 1H, NH), 7.80 (m, 2H, ArH), 7.71 – 7.53 (m, 6H, ArH), 7.44 – 7.23 (m, 1H, ArH).

<sup>13</sup>C-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 164.22, 163.14, 139.43, 129.18, 128.93, 126.15, 124.87, 121.88.

**41.** 2-(4-clorofenil)-2,3-dihidroftalazin-1,4-diona. Tiempo: 4:00 min. Temp.: 180°C. Rend: 0.49 g (74%). Pf (182-184)°C



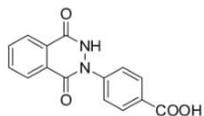
<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 11.78 (s, 1H, NH), 7.87 – 7.75 (m, 2H, ArH), 7.65 – 7.57 (m, 4H, ArH), 7.49 (m, 2H, ArH).

<sup>13</sup>C-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 164.78, 163.33, 139.41, 129.34, 129.18, 128.98, 127.78, 125.68.

<sup>131</sup> Habibi, Davood, and Omid Marvi. "Montmorillonite KSF Clay as an Efficient Catalyst for the Synthesis of 1,4-Dioxo-3,4-Dihydrophthalazine-2(1H)-Carboxamides and -Carbothioamides under Solvent-Free Conditions Using Microwave Irradiation." *Catalysis Communications* 8, no. 2 (February 2007): 127–30. doi:10.1016/j.catcom.2006.05.004.

<sup>132</sup> Prime, Michael E., Stephen M. Courtney, Frederick A. Brookfield, Richard W. Marston, Victoria Walker, Justin Warne, Andrew E. Boyd, et al. "Phthalazinone Pyrazoles as Potent, Selective, and Orally Bioavailable Inhibitors of Aurora-A Kinase." *Journal of Medicinal Chemistry* 54, no. 1 (January 13, 2011): 312–19. doi:10.1021/jm101346r.

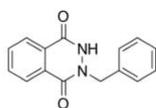
**42.** ácido 4-(1,4-dioxo-3,4-dihidroftalazin-2(1H)-il)benzoico. Tiempo: 4:00 min. Temp.: 180°C. Rend: 0.32 g (46%). Pf (286-288) °C



$^1\text{H-RMN}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12.41 (s, 1H, COOH), 11.72 (s, 1H, NH), 7.86 – 7.76 (m, 2H, ArH), 7.68 – 7.59 (m, 4H, ArH), 7.51 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, ArH).

$^{13}\text{C-RMN}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  193.39, 164.13, 163.03, 139.38, 133.97, 129.20, 128.89, 127.84, 126.19, 122.85.

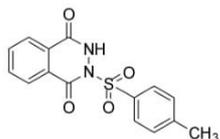
**43.** 2-bencil-2,3-dihidroftalazin-1,4-diona. Tiempo: 3:00 min. Temp.: 170°C. Rend: 0.36 g (58%). Pf (193-195) °C Pf Lit. <sup>133</sup> (192-195)°C



$^1\text{H-RMN}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  11.63 (s, 1H, NH), 7.85 – 7.74 (m, 2H, ArH), 7.66 – 7.58 (m, 2H, ArH), 7.39 – 7.15 (m, 5H, ArH), 4.83 (s, 2H, CH<sub>2</sub>).

$^{13}\text{C-RMN}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  164.13, 163.03, 134.99, 129.21, 128.94, 128.81, 128.61, 127.77, 126.19, 51.88.

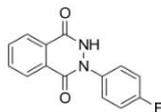
**44.** 2-tosil-2,3-dihidroftalazin-1,4-diona. Tiempo: 4:00 min. Temp.: 190°C. Rend: 0.58 g (70%). Pf coincidente con literature Pf Lit. <sup>134</sup>(225-227) °C



$^1\text{H-RMN}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  11.89 (s, 1H, NH), 8.02 (m, 1H, ArH), 7.88 – 7.76 (m, 1H, ArH), 7.68 – 7.57 (m, 4H, ArH), 7.33 (d,  $J = 7.9$  Hz, 2H, ArH), 2.33 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C-RMN}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  167.29, 163.03, 144.28, 135.40, 129.71, 129.20, 128.89, 127.45, 126.19, 21.26.

**45.** 2-(4-fluorofenil)-2,3-dihidroftalazin-1,4-diona. Tiempo: 3:00 min. Temp.: 170°C. Rend: 0.16 g (26%). Pf (191-194) °C.



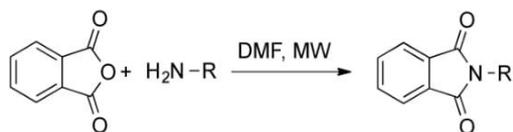
$^1\text{H-RMN}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  11.82 (s, 1H, NH), 7.85 – 7.74 (m, 4H, ArH), 7.62 (dd,  $J = 7.3, 1.8$  Hz, 2H, ArH), 7.06 (dd,  $J = 8.5, 5.6$  Hz, 2H, ArH).

$^{13}\text{C-RMN}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  164.13, 163.03, 160.49, 139.38, 129.20, 128.89, 126.19, 117.31, 115.89.

<sup>133</sup> Wegler, Richard. "Chemiluminescenz cyclischer Hydrazide." Journal für Praktische Chemie 148, no. 4–6 (March 23, 1937): 135–60. doi:10.1002/prac.19371480408.

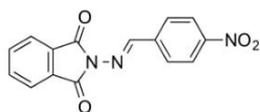
<sup>134</sup> Nematollahi, Davood, Saied Saeed Hosseiny Davarani, Pari Mirahmadpour, and Fahimeh Varmaghani. "A Facile Electrochemical Method for the Synthesis of New Sulfonamide Derivatives of Potential Biological Significance." Chinese Chemical Letters 25, no. 4 (April 2014): 593–95. doi:10.1016/j.ccllet.2014.01.005.

Síntesis de los compuestos **46-52**



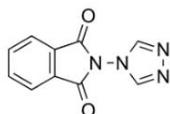
*Procedimiento general:* a una mezcla de anhídrido ftálico (2.5 mmol, 0.37 g), 2.5 mmol de la amina correspondiente y DMF (0.2 ml) se sometió a radiación de microondas a la temperatura y tiempo adecuadas para cada síntesis. Después de completada la reacción (TLC,  $\text{Cl}_2\text{CH}_2:\text{MeOH}$  8:2), la mezcla se trituró en EtOH 96° frío y se filtró por succión. El producto se recristalizó de EtOH-agua.

**46.** (*E*)-2-((4-nitrobenziliden)amino)isoindolin-1,3-diona. Temp: 170 °C, Tiempo: 2:00 min. Pf (260-264)°C. Rend: 0.45 g (62%)<sup>135</sup>.



<sup>1</sup>H-RMN (DMSO- $d_6$ ) 8.73 (s, 1H, HC=N), 8.18 (d, 2H,  $J=8.2$  Hz, ArH), 7.76 -7.84 (m, 4H, ArH), 7.50 (dd, 2H,  $J=7.8$  1.6 Hz, ArH)  
<sup>13</sup>C-RMN (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ 168.23, 159.52, 147.61, 146.62, 140.36, 134.82, 129.01, 128.40, 123.52.

**47.** 2-(4*H*-1,2,4-triazol-4-il)isoindoline-1,3-diona. Temp: 170 °C, Tiempo: 4:00 min. Pf (266-269)°C. Pf Lit.<sup>136</sup> (269.7–270.4)°C. Rend: 0.52 g (87%)

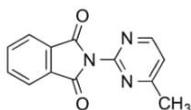


<sup>1</sup>H-RMN (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.44 (s, 2H,  $H-3'$ ,  $H-5'$ ), 7.84 (d,  $J = 7.5$  Hz, 2H, ArH), 7.74 (d,  $J = 7.5$  Hz, 2H, ArH).  
<sup>13</sup>C-RMN (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ 169.37, 149.34, 134.81, 129.08, 123.41.

<sup>135</sup> Hearn, Michael J., and Elena R. Lucero. "Reactions of N -Aminophthalimide with Electrophiles. II. Preparation and Properties of Araldehyde Hydrazones." *Journal of Heterocyclic Chemistry* 19, no. 6 (November 1982): 1537–39. doi:10.1002/jhet.5570190658.

<sup>136</sup> Sena, Vera L.M, Rajendra M Srivastava, Ricardo O Silva, and Vera L.M Lima. "Synthesis and Hypolipidemic Activity of N-Substituted Phthalimides. Part V." *Il Farmaco* 58, no. 12 (December 2003): 1283–88. doi:10.1016/S0014-827X(03)00185-X.

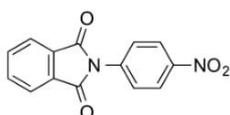
**48.** 2-(4-metilpirimidin-2-il)isoindolin-1,3-diona. Temp: 160 °C, Tiempo: 4:00 min. Pf (178-180)°C. Rend: 0.13 g (22%)



$^1\text{H-RMN}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.40 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H,  $H-6'$ ) 7.85-7.77 (m, 4H,  $ArH$ ), 7.02 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H,  $H-5'$ ), 2.59 (s, 3H,  $CH_3$ ).

$^{13}\text{C-RMN}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  172.10, 164.41, 160.33, 157.12, 147.31, 134.31, 131.78, 123.50, 112.40, 24.18.

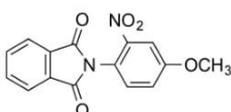
**49.** 2-(4-nitrofenil)isoindolin-1,3-diona. Temp: 170 °C, Tiempo: 4:00 min. Pf (273-275)°C Pf. Lit<sup>137</sup> (265) °C. Rend: 0.54 g (82%).



$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.38 (d,  $J = 7.6$ , 2H,  $ArH$ ), 8.01-8.10 (m, 2H,  $ArH$ ), 7.86 (d,  $J = 7.6$ , 2H,  $ArH$ ), 7.75-7.79 (m, 2H,  $ArH$ ).

$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  166.4, 146.4, 137.5, 135.0, 131.3, 126.3, 124.4, 124.1.

**50.** 2-(4-metoxi-2-nitrofenil)isoindolin-1,3-diona Temp: 160 °C, Tiempo: 4:00 min. Pf: (132-134)°C Pf Lit. <sup>138</sup> (148-153) °C. Rend.: 0.65 g (88%)



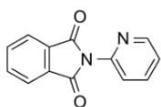
$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.94–7.96 (m, 2H,  $ArH$ ), 7.80–7.82 (m, 2H,  $ArH$ ), 7.70 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H,  $ArH-3'$ ), 7.40 (dd,  $J = 8.5, 2.6$  Hz, 1H,  $ArH-5'$ ), 7.26–7.29 (m, 1H,  $ArH$ ), 3.93 (s, 3H,  $OCH_3$ ).

$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  166.7, 160.1, 146.2, 134.6, 131.93, 131.88, 124.0, 120.1, 117.9, 110.8, 56.2.

<sup>137</sup> Aliabadi, Alireza, Babak Gholamine, and Tahereh Karimi. "Synthesis and Antiseizure Evaluation of Isoindoline-1,3-Dione Derivatives in Mice." *Medicinal Chemistry Research* 23, no. 6 (June 2014): 2736–43. doi:10.1007/s00044-013-0870-3.

<sup>138</sup> Davood, Asghar, Mohsen Amini, Leila Azimidoost, Somaieh Rahmatpour, Ali Nikbakht, Maryam Iman, Hamed Shafaroodi, and Abdollah Ansari. "Docking, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of Isoindoline Derivatives as Anticonvulsant Agents." *Medicinal Chemistry Research* 22, no. 7 (July 2013): 3177–84. doi:10.1007/s00044-012-0256-y.

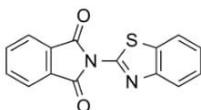
**51.** 2-(piridin-2-il)isoindolin-1,3-diona. Temp: 170 °C, Tiempo: 4:00 min. Rend: 0.49 g (88%).  
Pf (227-230) °C Pf Lit.<sup>139</sup> (225-225) °C



<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.73 (dd, *J* = 4.9, *J* = 1.5, 1H, ArH), 8.09-7.97 (m, 5H, ArH), 7.61-7.52 (m, 2H, ArH).

<sup>13</sup>C-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 166.5, 149.4, 145.8, 138.7, 135.0, 131.4, 124.1, 123.7, 123.1

**52.** 2-(benzo[d]thiazol-2-yl)isoindolin-1,3-diona. Temp: 170 °C, Tiempo: 4:00 min. Pf (147-148)°C. Rend: 0.64 g (92%)<sup>140</sup>



<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 8.14 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, ArH), 8.05 (m, 2H, ArH), 7.88-7.93 (m, 3H, ArH), 7.53 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, ArH), 7.43 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H, ArH).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 165.4, 152.2, 150.1, 136.3, 133.5, 131.8, 127.4, 126.1, 125.0, 123.2, 122.8.

---

<sup>139</sup> Guirado, Antonio, Andrés Zapata, and M. Carmen Ramírez de Arellano. "The Reaction of Phthalidylidene Dichloride with Primary Amines. Synthesis and X-Ray Molecular Structure of N-Substituted Phthalisoimides." *Tetrahedron* 53, no. 14 (April 1997): 5305–24. doi:10.1016/S0040-4020(97)00194-4.

<sup>140</sup> Ali, Ruhi, and Nadeem Siddiqui. "Preliminary Anticonvulsant and Toxicity Screening of Substituted Benzylidenehydrazinyl- N -(6-Substituted Benzo [d] Thiazol-2-Yl)propanamides." *The Scientific World Journal* 2014 (2014): 1–10. doi:10.1155/2014/194652.

## Ensayos biológicos

### *Actividad antiproliferativa*

Se determinó la IC<sub>50</sub> sobre la forma epimastigote y tripomastigote (cepa Tulahuen). Los epimastigotes utilizados se cultivaron a 28 °C en un medio líquido que contiene extracto de levadura 0.3%, 0.9% de triptosa, 0.4% de dextrosa, 1% de fosfato disódico 2-hidrato, cloruro de sodio 0.36%, cloruro de potasio 0.04%, 0.15 % hígado de ternera en polvo, 0.5% de infusión de corazón cerebro, y de 0.5 a 1.0 mg/ml de hemina. Los tripomastigotes se obtuvieron a partir de ratones infectados CF1 por punción cardiaca en el pico de parasitemia en el día 15 después de la infección. Los tripomastigotes se mantuvieron de forma rutinaria mediante la infección de ratones CF1 de 21 días de edad.

Para evaluar la inhibición del crecimiento de epimastigotes, se cultivaron  $1,5 \times 10^6$  parásitos/ml con diferentes concentraciones de los compuestos a ensayar por triplicado y el compuesto de referencia (benznidazol o nifurtimox) en distintas concentraciones durante 3 días y comparados con el control sin agregado de compuesto o referencia. El crecimiento celular se evaluó contando el número de células por ml de cultivo utilizando una cámara de Neubauer y se expresó como densidad celular (CD). El porcentaje de inhibición (% I) se calculó como:

$$\%I = \frac{CD_{3t} - CD_0}{CD_{3c} - CD_0} \cdot 100$$

donde las diferentes CD<sub>3t</sub>, CD<sub>0</sub> y CD<sub>3c</sub> representan la densidad celular medida en el día 3 luego del tratamiento con la droga, la densidad celular a tiempo cero y la densidad celular de parásitos no tratados en el día 3 respectivamente.

### *Ensayo de citotoxicidad*

El ensayo de citotoxicidad se realizó en células de mamífero (Vero o HeLa) con diluciones de los compuestos a ensayar en un rango desde 5 a 350 μM y después de 48 h de incubación, la viabilidad de las mismas fue medida mediante la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl) 2,5-difeniltetrazolium (MTT) según el método de Denizot y Lang<sup>141</sup>.

---

<sup>141</sup> Denizot, François, and Rita Lang. "Rapid Colorimetric Assay for Cell Growth and Survival." *Journal of Immunological Methods* 89, no. 2 (May 1986): 271–77. doi:10.1016/0022-1759(86)90368-6.

### *Actividad inhibitoria de tripanotiona reductasa*

Se partió de un sobrenadante libre de células (S) obtenido de la siguiente manera: se cosechan, lavan y resuspenden las células en buffer fosfato de sodio 0.05 M pH 7.4. La suspensión se sonicó y centrifugó a 5000 g durante 5 minutos, se descarta el pellet y se conserva el S sobre el cual se determinará la actividad. La actividad inhibitoria de los compuestos se determinó a 25°C siguiendo la oxidación de NADPH a 340 nm.

La reacción se inicia por la adición de los compuestos al sobrenadante (S) y, la disminución de absorbancia a 340 nm resulta entonces, una medida de la actividad de la enzima. Esta actividad se expresa como unidad enzimática (UE) por mL (UE/ mL) usando un coeficiente de extinción molar de  $6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Una UE se define como la cantidad de enzima capaz de formar 1 nmol de producto por minuto bajo las condiciones estándar de incubación. Se usaron dos concentraciones diferentes de compuestos a evaluar: 50  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$ <sup>142</sup>.

### **Ensayos biológicos sobre propiedades antiinflamatorias**

Los ensayos fueron realizados en el *Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas*, (LASSBio®), de la Facultad de Farmacia de la Universidad Federal del Río de Janeiro, en el marco del proyecto PROSUL (# 490.600/07-7) con una beca otorgada por el *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq; Brasil)

#### *Cuantificación de TNF- $\alpha$*

En este estudio se emplearon ratones machos BALB/c con un peso de 25-30 g (UFF, RJ, BR). Los animales se mantuvieron en una sala con temperatura controlada y recibieron agua y alimentos *ad libitum*. Durante todos los experimentos los ratones fueron tratados de acuerdo a los estándares de uso de animales en laboratorio. Los ratones fueron pre-tratados en forma intraperitoneal con solución salina (vehículo) 45 minutos antes de la inhalación del lipopolisacárido (LPS). Este procedimiento de inhalación fue descrito previamente<sup>143</sup>. Después de diferentes intervalos de tiempo, los espacios aéreos se lavaron con solución salina y así se obtuvieron 4 ml de fluido lavado broncoalveolar (BALF). Se usaron las alícuotas para el ensayo de TNF- $\alpha$  con incubación de las drogas a dos

---

<sup>142</sup> Ariyanayagam, M. "Ovothiol and Trypanothione as Antioxidants in Trypanosomatids." *Molecular and Biochemical Parasitology* 115, no. 2 (July 2001): 189–98. doi:10.1016/S0166-6851(01)00285-7.

<sup>143</sup> Corti, Angelo, Claudio Poesi, Silvia Merli, and Giovanni Cassani. "Tumor Necrosis Factor (TNF) A Quantification by ELISA and Bioassay: Effects of TNF $\alpha$ -Soluble TNF Receptor (p55) Complex Dissociation during Assay Incubations." *Journal of Immunological Methods* 177, no. 1–2 (December 1994): 191–98. doi:10.1016/0022-1759(94)90156-2.

concentraciones (10  $\mu$ M y 100  $\mu$ M). Los niveles de TNF- $\alpha$  se cuantificaron mediante ELISA altamente específico con un límite de detección de 250 pg/ml. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  SEM de cinco animales<sup>144</sup>.

#### *Actividad de MPO*

La metodología empleada fue adaptada de Posadas y col. (2004)<sup>145</sup>. En este ensayo, las patas inflamadas de dos ratas son seccionadas 6 hs después de la administración intraplantar de carragenina 1%. El material retirado se pesó, fraccionó en tamaños menores y homogeneiza en 1 ml de solución de hexadecil-trimetilamonio 0.5% por cada 50 mg de tejido retirado. Después de esta homogeneización con Turrax ® a 13000 RPM por 3 minutos, una alícuota del sobrenadante se retiró y fue centrifugada durante 120 segundos a 13000 RPM. A 100  $\mu$ l del sobrenadante se agregó 100  $\mu$ l de una solución reveladora se agitaron durante 15 min para una posterior medición de las absorbancias a 450 nm en una lectora de microplacas TPReader. El resultado se expresó en Unidades de MPO/ml, siendo 1 unidad de actividad aquella capaz de convertir 1  $\mu$ mol de peróxido de hidrógeno en agua (25 °C).

#### *Edema de pata de rata*

Los experimentos se hicieron de acuerdo al procedimiento modificado descrito originalmente por Cordeiro y col. (1985)<sup>146</sup>. Se emplearon ratas macho Sprague-Dawley (peso 250 $\pm$ 10 g) con libre acceso a agua y alimentos durante 16 hs previas al experimento.

El edema se generó mediante una inyección de 0.2 ml de una solución de carragenina 1% en el talón. El volumen de la pata se midió mediante desplazamiento de agua en un pletismómetro (UGO BASILE) antes y 3 horas después del tratamiento. Los animales recibieron una inyección intraperitoneal de 1 ml de la suspensión del compuesto a ensayar

---

<sup>144</sup> Petyovka, Natalia, Lyudmila Lyach, and Nikolai N. Voitenok. "Homologous ELISA for Detection of Oligomeric Human TNF: Properties of the Assay." *Journal of Immunological Methods* 186, no. 2 (October 1995): 161–70. doi:10.1016/0022-1759(95)00183-B.

<sup>145</sup> Posadas, Inmaculada, Mariarosaria Bucci, Fiorentina Roviezzo, Antonietta Rossi, Luca Parente, Lidia Sautebin, and Giuseppe Cirino. "Carrageenan-Induced Mouse Paw Oedema Is Biphasic, Age-Weight Dependent and Displays Differential Nitric Oxide Cyclooxygenase-2 Expression." *British Journal of Pharmacology* 142, no. 2 (May 2004): 331–38. doi:10.1038/sj.bjp.0705650.

<sup>146</sup> Cordeiro, R., P. Silva, M. Martins, and M. Henriques. "Effect of Potential Antagonists on the Rat Paw Oedema Induced by PAF-Acether." *Prostaglandins* 30, no. 4 (October 1985): 729. doi:10.1016/0090-6980(85)90073-5.

(10 mg/kg) en el vehículo (0.5% metilcelulosa). El nivel de edema se expresa en  $\mu\text{l}$  como la diferencia entre los volúmenes de ambas patas antes y después del tratamiento.

### *Modelo de hiperalgesia*

Los tiempos de latencia (tiempos de reacción) se midieron mediante el experimento modificado de placa caliente ( $51 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ )<sup>147</sup>. Cada rata macho Sprague-Dawley (peso 250 g) con libre acceso a agua y alimentos durante 16 hs previas al experimento se lo sometió a dos pruebas en la placa caliente, cada una separada por un intervalo de 30 min. La primer prueba fue para familiarizar al animal con el experimento en sí, y el segundo como control. Las ratas con tiempos de reacción mayores a 10 s no se usaron. La rata control se trató con vehículo (10 ml/kg). Se empleó talidomida en vía oral como control positivo (10 mg/kg) y las sustancias a ensayar se administraron por vía oral (10 mg/kg). El tiempo de latencia se determinó en la placa caliente en intervalos de 1 h después de la administración de la droga durante un total de 4 hs. Para evitar daños en el animal se estableció un corte de seguridad de 40 s de reacción. La latencia de la respuesta se registró manualmente con un cronómetro. Los experimentos se realizaron en un ambiente calmo y con temperatura controlada (20-22°C). La hiperalgesia al calor se definió como la latencia de retirada ( $\Delta\text{Latencia}$ ) de la extremidad calculada en segundos.

$$\Delta\text{Latencia} = (\text{tiempo de retirada pata derecha}) - (\text{tiempo de retirada pata izquierda})$$

---

<sup>147</sup> Bannon, Anthony W. "Models of Pain: Hot-Plate and Formalin Test in Rodents." In Current Protocols in Pharmacology, edited by S.J. Enna, Michael Williams, John W. Ferkany, Terry Kenakin, Roger D. Porsolt, and James P. Sullivan. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2001. <http://doi.wiley.com/10.1002/0471141755.ph0507s00>.

## Conclusiones Generales

- En este trabajo de tesis se han diseñado y sintetizado un total de 22 compuestos derivados de quinazolinas.

El diseño de estos compuestos se basó en el estudio de la estructura y función de la enzima tripanotona reductasa (TryR) de *Trypanosoma cruzi* como blanco de acción de los mismos. Se emplearon herramientas computacionales de acoplamiento molecular para predecir la afinidad y conformaciones de los compuestos en el sitio activo de la enzima.

Todos los derivados de quinazolina se sintetizaron mediante rutas conocidas, con materiales de partida asequibles y de bajo costo obteniéndose así una colección de derivados de estructura química sencilla.

- Empleando librerías virtuales de compuestos comerciales se realizó un procedimiento de cribado virtual seguido de acoplamiento molecular y posterior evaluación biológica de cuatro compuestos. De ellos, el compuesto **26** presentó una actividad antiparasitaria mayor que la droga de referencia, benznidazol, considerándolo un compuesto líder para el diseño y desarrollo de nuevas moléculas con igual actividad farmacológica frente a TryR.

- Se realizó una síntesis *de novo* mediante métodos computacionales de derivados de amidas aromáticas. Los ensayos biológicos revelaron una actividad antiparasitaria moderada del compuesto **35**.

- Se determinó que los compuestos seleccionados inhiben la enzima TryR, confirmando el objetivo del diseño racional de fármacos con ese blanco específico.

- Se diseñaron 9 compuestos derivados de ftalazinas y se evaluó su actividad frente a *T. cruzi*, obteniéndose actividades moderadas para los compuestos **43** y **44**. Estos compuestos se consideran como líderes para el diseño de derivados con mejores propiedades farmacológicas.

- Se sintetizaron 7 derivados de ftalimidias y se evaluaron, junto con el compuesto **41** como potenciales antiinflamatorios e inmunomoduladores. Los compuestos **41**, **46** y **52** presentaron actividad inmunomoduladora de mediadores celulares pro-inflamatorios *in vitro*. Se determinó, para los mismos compuestos, su actividad *in vivo* en modelos de hiperalgesia y edema. De estos ensayos se encontró que **41** ofreció mejor perfil antiinflamatorio con perspectivas de su empleo en la etapa crónica de la enfermedad.

## Perspectivas a futuro

Esta tesis doctoral nos permite proyectar nuevas tareas de investigación de modo de seguir diseñando y sintetizando nuevos compuestos en función de los resultados obtenidos hasta el momento.

El modelo de inhibición específica de la tripanotona reductasa deberá ser refinado para conseguir valores cuantitativamente relevantes en cuanto a la predicción de la afinidad de los ligandos a diseñar. En base a estos resultados se mejorará la predicción de la actividad biológica y su aplicación en modelos infectivos *in vitro* e *in vivo*.

Se sintetizarán derivados de los compuestos **43** y **44** para aumentar su actividad biológica contra *T. cruzi*. Se realizarán estudios de relación estructura-actividad para elucidar el mecanismo de acción de los compuestos derivados de ftalazin-1,4-diona.

Teniendo en cuenta los resultados en la evaluación de **41** como antiinflamatorio *in vitro* e *in vivo*, se evaluará su aplicación en la quimioterapia de la enfermedad de Chagas en su fase crónica. En base a estos resultados se optimizará la estructura de **41** obteniendo derivados con mayor potencia.