

SÍNTESIS DE HETEROCICLOS COMO INHIBIDORES DE PROTEÍNA-QUINASA

Velazco-Cabral, Erik Ivan (1); Alcaraz-Contreras, Yolanda (2); Vázquez, Miguel Á (3).

1 [Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [eivanvelazco@gmail.com]

2 [Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [yolaalca@ugtomx]

3 [Departamento de Química, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [mvazquez@ugto.mx]

Resumen

Las bajas selectividades de los fármacos actuales contra las células malignas en los tratamientos antineoplásicos representan un grave problema al ser usados contra los diversos tipos de cáncer. Por lo que en el presente trabajo se pretendió realizar la síntesis de derivados sustituidos de pirrolo[2,3-d]pirimidina con potencial actividad de inhibidores de tirosina quinasas, fármacos considerados como terapia específica y dirigida contra las células neoplásicas causantes de cáncer y tumores. Los núcleos de Pirrolo[2,3-d]pirimidina han sido descritos como inhibidores selectivos de la quinasa de adhesión focal (FAK)[1]. Para lograr la síntesis de dichos núcleos se realizó una estrategia de funcionalización de pirroles, por lo que se llevaron a cabo reacciones de cicloadición dipolar (3+2) con (aquinil)(etoxi) carbenos de Fischer (Cr) como dipolarófilos y oxazolonas como dipolos para la síntesis de pirroles, logrando obtener materiales de partida para realizar reacciones de cicloadición, partiendo de reacciones de nitración y reducción a grupo amino para obtener la materia prima necesaria para la formación de una serie de compuestos de pirrolo[2,3-d]pirimidinas

Abstract

The low selectivity of current drugs against malignant cells in antineoplastic treatments represent a serious problem when used against various types of cancer. The aim of the present work was to synthesize substituted pyrrolo[2,3-d]pyrimidine derivatives with potential tyrosine kinase inhibitor activity, drugs considered as specific therapy and directed against neoplastic cells causing cancer and tumors. The pyrrolo[2,3-d]pyrimidine nuclei have been described as selective inhibitors of focal adhesion kinase (FAK) [1]. To achieve the synthesis of these nuclei, a strategy for the functionalization of pyrroles is sought, so that dipolar cycloaddition (3+2) reaction was carried out with Fischer (alkynyl) (ethoxy) carbenes of Cr as dipolarophiles and oxazolones as dipoles for the synthesis of pyrroles, obtaining starting materials to carry out cyclization reactions, starting from nitration and reduction reactions to amino group to obtain the necessary raw material for the formation of a series of pyrrolo [2,3-d] pyrimidines

Palabras clave:

Tirosina; Quinasas; Adhesión; Focal; Carbeno; Fischer; cicloadición; Pirrolo[2,3-d]pirimidinas; leucemia; pirrol; Oxazolona; aminoácido;

INTRODUCCIÓN

Neoplasia

“Un neoplasma es una masa anormal de tejido, cuyo crecimiento excede y está descoordinado con el de los tejidos normales, y que persiste en su anormalidad después de que haya cesado el estímulo que provocó el cambio”^[2]

Estos cambios pueden estar ocasionados como consecuencia de un daño directo al ADN, volviendo a la célula incapaz de controlar su propio crecimiento y división, ignorando todas las vías normales de señalización que tienen como objetivo causar la apoptosis o detener la división celular. Estas células tienen la capacidad de invadir órganos y tejidos, así como diseminarse por la sangre o linfa, originando tumores secundarios, fenómeno que se conoce como metástasis. Estas células, además, pierden su capacidad de diferenciación, por lo que la célula cancerosa es incapaz de realizar las funciones que una célula sana haría, ocupando su lugar y dando como consecuencia final la falla total del tejido afectado.

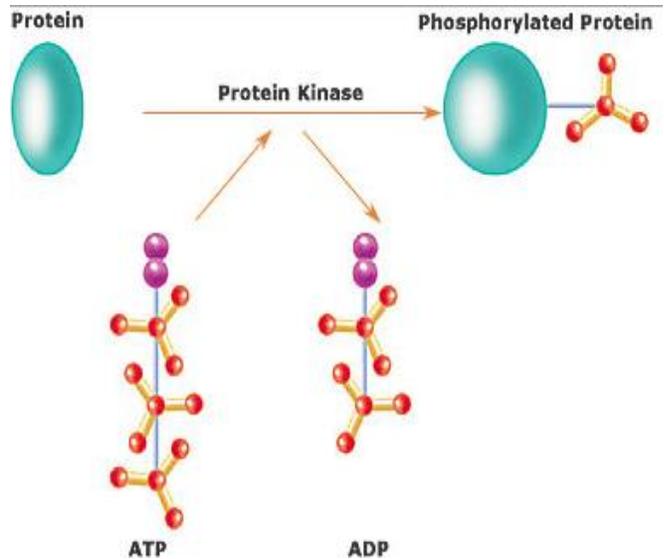
Proteína Quinasas

Las proteínas quinasas (o cinasas) son enzimas que regulan la fosforilación de proteínas intracelulares. Se han asociado con el desarrollo de enfermedades como: cáncer, inflamación y enfermedades inmunológicas, motivo por el cual han sido objeto de estudio como blancos terapéuticos para diferentes padecimientos.

Esquema 1

Tirosina Quinasas

Las Tirosina Quinasas son enzimas pertenecientes a la familia de las proteínas quinasas capaces de transferir un grupo fosfato a un residuo de tirosina de una proteína. Las hormonas que actúan sobre los receptores asociados a tirosina quinasas son generalmente factores de crecimiento que promueven la división celular. **Esquema 2**



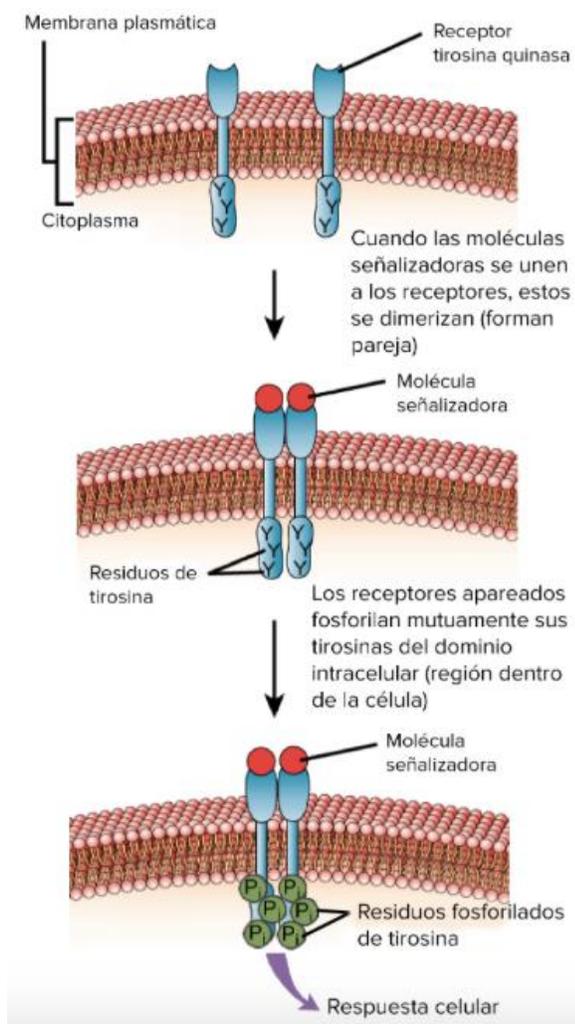
Esquema 1: Mecanismo general de fosforilación de proteínas mediante proteína quinasas

Los receptores tirosina quinasa son cruciales para muchos procesos de señalización en seres humanos. Por ejemplo, se unen a factores de crecimiento, moléculas señalizadoras que promueven la división y supervivencia celulares. Entre los factores de crecimiento se encuentran el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), que participa en la sanación de heridas, y el factor de crecimiento nervioso (NGF), cuya provisión regular es necesaria para mantener vivos a ciertos tipos de neuronas.

Debido a su función en la señalización por factor de crecimiento, los receptores tirosina quinasa son esenciales en el cuerpo, pero su actividad debe mantenerse en equilibrio: los receptores de factor de crecimiento demasiado activos se asocian con algunos tipos de cáncer, especialmente en algunos tipos de leucemia^[3]

Las Quinasa de Adhesión focal (FAK) son tirosinasas quinasas que se encuentran en la

membrana celular, mediante la adhesión focal regulan procesos como la proliferación y la migración celular, relacionados con el fenómeno de metástasis.^[2] Los FAK son altamente activos en melanoma, mieloma y células del linfoma. Núcleos de Pirrolo[2,3-*d*]pirimidina han sido descritos como inhibidores selectivos de la FAK^[4]. **Esquema 3**

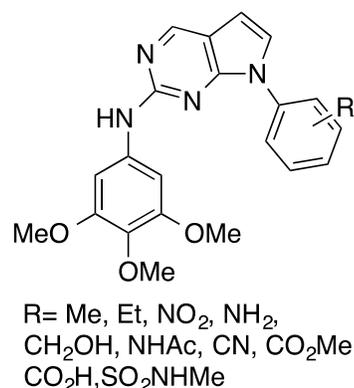


Esquema 2: Mecanismo general de fosforilación de proteínas mediante Tirosina Quinasas

El presente trabajo pretende realizar la síntesis de derivados sustituidos de pirrolo[2,3-*d*]pirimidinas con potencial actividad de inhibidores de Tirosina

Quinasas, fármacos considerados como terapia específica y dirigida contra células neoplásicas causantes de cáncer y tumores.

Para lograr la síntesis de dichos núcleos se pretende utilizar una estrategia de funcionalización de pirroles, llevando a cabo reacciones de cicloadición dipolar (3+2) con (alquilil)(etoxi) carbenos de Fischer (Cr) como dipolarófilos y oxazolonas como dipolos para la síntesis de pirroles, logrando obtener materiales de partida para realizar reacciones de ciclación, reacciones de nitración y reducción a grupo amino para obtener la materia prima necesaria para la formación de una serie de compuestos de pirrolo[2,3-*d*]pirimidinas. **Esquema 4**



Esquema 3: Derivados funcionalizados de Pirrolo[2,3-*d*]pirimidinas con actividad de Inhibidores de Tirosina quinasas

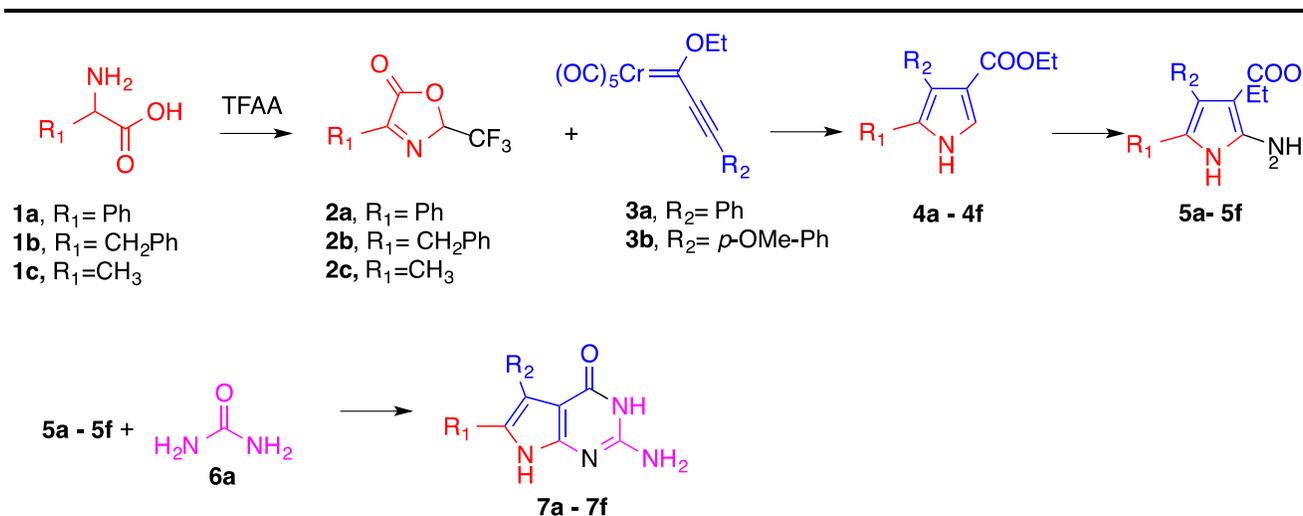
MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.2) Síntesis de 2-(trifluorometil)oxazol-5(2H)-onas (2a-d).

En un matríz balón provisto de un agitador magnético de 50 ml se adicionó 500 mg del aminoácido (1a-d) y 1.26 ml de anhídrido trifluoroacético y dejar bajo agitación a 40 grados

centígrados durante 4 horas en sistema de reflujo. Se eliminó el exceso de anhídrido a presión reducida. Se caracterizó por RMN ^1H 500 MHz,

siendo la señal característica de CH-CF_3 7.72 (c, 1H, $J=7.5$ Hz)



Esquema 4: Esquema general de reacción

3.2) Síntesis de (alquini)(etoxi) carbenos de Fischer (Cr) 3(a-b)

En un matraz de 100ml con agitador magnético, se purgo con N_2 , y adicionó 15 ml de THF anhidro, y el alquino correspondiente se enfrió a -78 °C. En una probeta tapada y purgada con N_2 , se adicionó 7 ml de $t\text{-BuLi}$. gota a gota, utilizando presión de N_2 y utilizando cánula, se transfirió al primer matraz. Se dejó reaccionando 1 hora a -40 °C. Por otro lado, en un matraz balón se pesó 2.0 gr de $\text{Cr}(\text{CO})_6$, y 15ml de THF anhidro, se transfirió la sal del alquini litio y se deja 2 h a ta. Terminado este tiempo, se adicionaron 2.6 gr de tetrafluoroborato de trietiloxonio, se dejó reaccionando a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se lavó con 20 ml y 3 veces con una solución saturada de NaHCO_3 , se secó utilizando una columna de

Na_2SO_4 y se purificó en columna utilizando hexano como eluyente. Se concentró en baño maría y a presión reducida.

3.3) Síntesis de Pirroles

En un matraz de 100 ml provisto de agitador magnético, se adicionaron 200mg de **2a-d**. Se purgo con nitrógeno y se adicionaron 15 ml de THF anhidro, posteriormente se adicionaron 0.12 ml de trietilamina. En otro matraz balón de 100 ml se adicionaron 300 mg de **3a-c**, se purgo con nitrógeno y se adicionaron 15 ml de THF anhidro. Se transfirió a reflujo durante 4 horas. Se purificó por cromatografía flash utilizando Hex:AcOEt como eluyente.

Se caracterizó utilizando RMN de ^1H 500MHz, las señales correspondientes a los protones presentes en el grupo etoxilo (señal H en 1.19 ppm, t, 3H, $J=7.0$ Hz y señal en 4.16 ppm, c, 2H, $J=7.0$ Hz) y

metoxilo (señal H-17, 3.81 ppm, s, 3H) y NH (señal 8.22 ppm, s, 1H)

3.4) Síntesis de 2-amino-1H-pirrol-3carboxilatos (5a-5h)

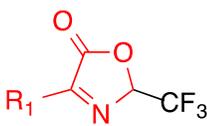
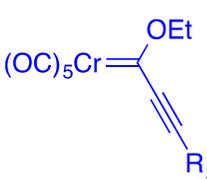
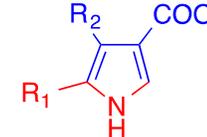
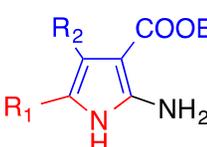
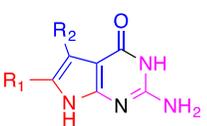
En un matr az balón de 100ml provisto de agitador magnético, se adicionó 200mg de **4a-l** y se adicionaron 5 ml de Ac₂O y se llevó a -10 grados centígrados, posteriormente se le adicionaron 0.6ml de HNO₃ al 6.5% disuelto en 5ml de Ac₂O, se dejó a -10  C durante 3 horas y 4 horas a temperatura ambiente. Se concentró y purificó por columna cromatográfica. Se disolvió el producto obtenido en EtOH y se adicionaron 100mg de Fe en polvo y 10ml de HCl concentrado. Se dejó reaccionando a temperatura ambiente durante 8 horas. Se caracterizó por RMN ¹H 500 MHz, siendo la señal caracter tica de NH₂ 10.25 (s, 1H), la integración a un protón puede explicarse por la formación de puente de hidrógeno con el Ester

3.5) Síntesis de Pirrolo[2,3-*d*]pirimidinas

En un matr az balón de 50ml provisto de agitador magnético se adicionaron 20ml de EtOH, 100mg de 5a, 40mg de urea, y 0.05ml de Et₃N, se dejó a temperatura de reflujo durante 8 horas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se logró la síntesis de las materias primas necesarias para la síntesis de los núcleos de pirrolo[2,3-*d*]pirimidinas **5a-f**, desde los (alquilil)(etoxi) carbenos de Fischer, pasando por las oxazolonas para la obtención de los sistemas 1-electr filicos-4-nucleofilicos **Esquema 5**.

| Molécula | | R2 | R1 | Rendimiento global |
|---|----|----------|--------------------|--------------------|
|  | 2a | - | Ph | 99% |
| | 2b | | CH ₂ Ph | 80% |
| | 2c | | CH ₃ | 85% |
|  | 3a | Ph | | 60% |
| | 3b | p-OMe-Ph | | |
|  | 5a | Ph | Ph | 60% |
| | 5b | | CH ₂ Ph | 55% |
| | 5c | | CH ₃ | 50% |
| | 5d | p-OMe-Ph | Ph | 85% |
| | 5e | | CH ₂ Ph | 75% |
| | 5f | | CH ₃ | 85% |
|  | 5a | Ph | Ph | 55% |
| | 5b | | CH ₂ Ph | 40% |
| | 5c | | CH ₃ | 40% |
| | 5d | p-OMe-Ph | Ph | 60% |
| | 5e | | CH ₂ Ph | 55% |
| | 5f | | CH ₃ | 50% |
|  | 7a | Ph | Ph | * |
| | 7b | | CH ₂ Ph | * |
| | 7c | | CH ₃ | * |
| | 7d | p-OMe-Ph | Ph | ** |
| | 7e | | CH ₂ Ph | ** |
| | 7f | | CH ₃ | ** |

*En proceso
**En caracterización

Esquema 5. Tabla general de resultado

CONCLUSIONES

La estrategia de síntesis para la formación de núcleos de pirrolo[2,3-*d*]pirimidinas utilizado en este trabajo utilizando oxazolonas y (alquinil)(carbenos) de Fischer han mostrado señales de ser una técnica que nos permitirá tener una gran variedad de sustituyentes en los núcleos antes mencionados, entre los que se encuentran núcleos de aminoácidos; que aumenta la posibilidad de tener interacción específica proteína-sustrato, sin embargo, aún se requiere más trabajo para poder concluir este proyecto

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos especiales al asesor de este proyecto, el Dr. Miguel Ángel Vázquez Guevara por todo su apoyo, al grupo de investigación de Síntesis Orgánica, a la Universidad de Guanajuato por permitir realizar la estancia de Verano de Investigación y a CONACYT por el apoyo económico.

REFERENCIAS

- [1] Willis R. A.: *The Spread of Tumors in the Human Body*. London, Butterworth & Co, **1952**
- [2] Schelssinger, J. y Ullrich, A. (1992). *Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases Neuron*, 383-391.
- [3] Roberts KG, et al. *Targetable Kinase-Activating Lesions in Ph-like Acute Lymphoblastic Leukemia*. N Engl J Med. **2014** Sep 11;371(11):1005-1015.
- [4] Laurens M. De Coen, Thomas S. A. Heugebaert, Daniel García, and Christian V. Stevens. *Synthetic Entries to and Biological Activity of Pyrrolopyrimidines Chemicals Review*. **2015**