



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**Síntesis, actividad citotóxica e inhibición de cinasas dependientes de ciclinas de  
derivados de 3-(4-pirimidil)imidazo[1,2-*a*]piridina**

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. Miguel Angel Vilchis Reyes



TUTOR: Dr. Eduardo Díaz Torres

AÑO: 2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **Agradecimientos**

El siguiente trabajo de tesis fue realizado en el laboratorio 1-5 y en el laboratorio de pruebas biológicas del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, en el laboratorio 206 conjunto F de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, en la Unidad de Bioquímica Molecular “Guillermo Oberón” del INCMNSZ y en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradecemos a todo el personal de los departamentos de espectroscopia y espectrometría del Instituto de Química de la UNAM por la determinación de los espectros. Al Dr. Alejandro Zentella, Dr. José Alfredo Vázquez, Dr. Marco Antonio Cerbón y al Dr. Ángel Guzmán por la asesoría brindada para la realización de esta tesis. A Omar Vargas, María Teresa Ramírez Apan, José Luis Ventura Gallegos, José D. Solano Becerra y Noemí Baranda por el apoyo en la realización de las diferentes técnicas de biología molecular y cultivo celular utilizadas.

Un reconocimiento especial para el CONACyT y al SNI por el apoyo económico brindado.

## Tabla de contenido

Índice de Esquemas, Figuras y Tablas. ....	iii
Abreviaturas .....	v
Resumen .....	1
1. Introducción .....	3
2. Antecedentes.....	5
2.1. Cáncer.....	5
2.2. Terapia del cáncer .....	10
2.3. Cinasas.....	14
2.3.1. Cinasas y cáncer .....	15
2.3.1.1. Regulación del ciclo celular y cinasas dependientes de ciclinas (CDKs).....	18
2.3.1.2. Función de las CDKs en otros procesos celulares .....	20
2.3.2. Inhibición farmacológica de cinasas .....	21
2.3.2.1. Inhibidores de CDKs .....	26
2.3.2.2. Imidazo[1,2- <i>a</i> ]piridina.....	31
2.3.2.3. Pirimidinas.....	34
2.4. Reacciones de <i>N</i> -arilación catalizadas con paladio.....	36
3. Hipótesis y objetivos.....	38
3.1. Hipótesis .....	38
3.2. Objetivos.....	39
4. Resultados .....	41
4.1. Parte Química .....	41
4.2. Parte Biológica.....	42
5. Análisis de resultados.....	52
6. Conclusiones.....	66
7. Perspectivas.....	66
Apéndice 1. Parte química.....	67
A.1.1. Método general de síntesis de los compuestos <b>13</b> y <b>14</b> . ....	67
A.1.1.1. 2-metilimidazo[1,2- <i>a</i> ]piridina ( <b>13</b> ).....	68
A.1.1.2. 2-(trifluorometil)imidazo[1,2- <i>a</i> ]piridina ( <b>14</b> ).....	68
A.1.2. Método general para la obtención de los compuestos <b>15</b> y <b>16</b> .....	68

A.1.2.1. 2-metilimidazo[1,2- <i>a</i> ]piridina-3-carboxaldehído ( <b>15</b> ) .....	69
A.1.2.2. 2-(trifluorometil)imidazo[1,2- <i>a</i> ]piridina-3-carboxaldehído ( <b>16</b> ). .....	69
A.1.3. Método general de síntesis de los compuestos <b>4, 7, 10 y 27</b> .....	70
A.1.3.1. 3-(2-aminopirimidin-4-il)-2-(trifluorometil)imidazo[1,2- <i>a</i> ]piridina ( <b>4</b> ).....	71
A.1.3.2. 4-(2-aminopirimidin-4-il)quinolina ( <b>7</b> ) .....	71
A.1.3.3. 3-(2-aminopirimidin-4-il)quinolina ( <b>10</b> ) .....	72
A.1.3.4. 3-(2-aminopirimidin-4-il)-2-metilimidazo[1,2- <i>a</i> ]piridina ( <b>27</b> ).....	72
A.1.4. Procedimiento general para sintetizar los compuestos <b>1-3, 5, 6, 8, 9, 11 y 12</b> .....	72
A.1.4.1. 2-metil-3-(2-( <i>p</i> -tolilamino)pirimidin-4-il)imidazo[1,2- <i>a</i> ]piridina ( <b>1</b> ).....	73
A.1.4.2. 2-metil-3-(2-(4-(trifluorometil)fenilamino)pirimidin-4-il)imidazo[1,2- <i>a</i> ]piridina ( <b>2</b> ) .....	73
A.1.4.3. 5-(4-(2-metilimidazo[1,2- <i>a</i> ]piridin-3-il)pirimidin-2-ilamino)tiofeno-2-carbaldehído ( <b>3</b> ) .....	73
A.1.4.4. 3-(2-( <i>p</i> -tolilamino)pirimidin-4-il)-2-(trifluorometil)imidazo[1,2- <i>a</i> ]piridina ( <b>5</b> ).....	74
A.1.4.5. 2-(trifluorometil)-3-(2-(4-(trifluorometil)fenilamino)pirimidin-4-il)imidazo[1,2- <i>a</i> ] piridina ( <b>6</b> ).....	74
A.1.4.6. 4-(2-( <i>p</i> -tolilamino)pirimidin-4-il)quinolina ( <b>8</b> ) .....	74
A.1.4.7. 4-(2-(4-(trifluorometil)fenilamino)pirimidin-4-il)quinolina ( <b>9</b> ). .....	75
A.1.4.8. 3-(2-( <i>p</i> -tolilamino)pirimidin-4-il)quinolina ( <b>11</b> ) .....	75
A.1.4.9. 3-(2-(4-(trifluorometil)fenilamino)pirimidin-4-il)quinolina ( <b>12</b> ) .....	76
Apéndice 2. Parte biológica.....	76
A.2.1. Cultivo celular y ensayo de actividad citotóxica.....	76
A.2.2. Analisis del ciclo celular (citometría de flujo).....	77
A.2.3. Ensayo de apoptosis con Anexina V-FITC.....	78
A.2.4. TUNEL .....	79
A.2.5. Inhibición de la actividad de CDK1/CycB y CDK2/CycA .....	80
A.2.6. Determinación de la CI <sub>50</sub> en CDK1/CycB y CDK2/CycA.....	80
Apéndice 3. Espectroscopia.....	82
Glosario .....	93
Bibliografía.....	96
Publicación .....	102

## Índice de Esquemas, Figuras y Tablas.

<b>Esquema 2.1.</b> Estructura, numeración y algunos métodos de síntesis del anillo imidazo[1,2- <i>a</i> ] piridina.....	32
<b>Esquema 2.2.</b> Diferentes tipos de síntesis de pirimidinas.....	34
<b>Esquema 2.3.</b> Síntesis de 2-aminopirimidinas.....	35
<b>Esquema 2.4.</b> Mecanismo propuesto para el acoplamiento C-N catalizado por paladio.....	37
<b>Esquema 4.1.</b> Síntesis de los compuestos <b>1-12</b> .....	41
<b>Esquema 4.2.</b> Síntesis de los intermediarios <b>15</b> y <b>16</b> .....	41
<b>Esquema 5.1.</b> Propuesta sintética original del intermediario <b>27</b> .....	53
<b>Esquema 5.2.</b> Análisis retrosintético para obtener el compuesto <b>23</b> .....	53
<b>Esquema 5.3.</b> Comparación entre la reacción de <b>29</b> y <b>23</b> con guanidina para formar el compuesto <b>27</b> .....	54
<b>Esquema 5.4.</b> Inestabilidad de los alcoholes propargílicos sustituidos en C-1 con 4-pirimidinilo	57
<b>Esquema 5.5.</b> Obtención del compuesto <b>7</b> .....	57
<b>Figura 2.1.</b> Índice de mortalidad del cáncer contra enfermedades cardíacas con respecto al tiempo.....	6
<b>Figura 2.2.</b> Características de las células tumorales.....	9
<b>Figura 2.3.</b> Mecanismo de acción de algunos de los fármacos utilizados en la terapia del cáncer.....	12
<b>Figura 2.4.</b> Dos modelos por los cuales se genera heterogeneidad clonal.....	15
<b>Figura 2.5.</b> Reacción de fosforilación-defosforilación.....	16
<b>Figura 2.6.</b> Cinasas dependientes de ciclinas (CDKs).....	19
<b>Figura 2.7.</b> Inhibidores diversos de cinasas .....	24
<b>Figura 2.8.</b> El sitio de unión a ATP de la cinasa AKT1 acompañado con ATP.....	25
<b>Figura 2.9.</b> Compuestos inhibidores de CDKs.....	27
<b>Figura 2.10.</b> Derivados de imidazo[1,2- <i>a</i> ]piridina con actividad farmacológica.....	33
<b>Figura 2.11.</b> Medicamentos que contienen anillos de pirimidina en su estructura.....	34
<b>Figura 3.1.</b> Estructuras de los compuestos <b>1-12</b> .....	40
<b>Figura 4.1.</b> Efecto sobre las fases del ciclo celular en células SK-LU-1 y MCF7 por parte de los compuestos <b>1</b> , <b>3</b> , y <b>8</b> después de 24 h de tratamiento.....	45
<b>Figura 4.2.</b> Porcentaje de inducción de apoptosis en la línea celular SK-LU-1.....	47

<b>Figura 4.3.</b> Detección de la muerte celular por apoptosis causada por los compuestos <b>3, 5 y 8</b> en células SK-LU-1 mediante la técnica de TUNEL.....	49
<b>Figura 4.4.</b> Perfil de inhibición de en las enzimas CDK1/CycB y CDK2/CycA por parte de los compuestos <b>1, 3 y 8</b> y valor de $CI_{50}$ en estas enzimas.....	51
<b>Figura 4.5.</b> Tecnología Z-LYTE® .....	51
<b>Figura 5.1.</b> Espectro de RMN de $^1H$ de los compuestos <b>13 y 28</b> .....	53
<b>Figura 5.2.</b> Estructura de las diferentes fosfinas utilizadas.....	55
<b>Figura 5.3.</b> Análisis conformacional del compuesto <b>27</b> .....	59
<b>Figura 5.4.</b> Análisis conformacional del compuesto <b>8</b> .....	60
<b>Tabla 4.1.</b> Susceptibilidad <i>in vitro</i> por parte de las líneas celulares SK-LU-1 y MCF7 hacia los compuestos sintetizados <b>1-12</b> .....	43
<b>Tabla 4.2.</b> Inhibición del crecimiento de líneas celulares humanas por parte de los compuestos <b>1-12</b> .....	45
<b>Tabla 4.3.</b> Análisis del ciclo celular en las líneas celulares SK-LU-1 y MCF7 después del tratamiento con los compuestos <b>1, 3 y 8</b> durante 24 h.....	46
<b>Tabla 4.4.</b> Porcentaje de inhibición de cinasas dependientes de ciclinas recombinantes humanas por parte de los compuestos <b>1, 2, 3, 8 y 11</b> .....	50

## Abreviaturas

<b>AcOEt</b>	Acetato de etilo.
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico.
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico.
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina.
<b>BINAP</b>	2,2 -Bis(difenilfosfino)-1,1 -binaftaleno
<b>CCF</b>	Cromatografía en capa fina.
<b>CDKs</b>	Cinasas dependientes de ciclinas.
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentración inhibidora cincuenta.
<b>CLL</b>	Leucemia linfocítica crónica.
<b>CSC</b>	Células madre tumorales.
<b>Cyc</b>	Ciclina.
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido.
<b>DTT</b>	Ditiotreitol.
<b>EGTA</b>	Ácido glicol-bis(2-aminoetiléter)- <i>N,N,N',N'</i> - tetraacético.
<b>EM</b>	Espectrometría de masas.
<b>FDA</b>	<i>Food and drug administration.</i>
<b>FGF</b>	Factor de crecimiento de fibroblastos.
<b>FITC</b>	5-Isotiocianato de fluoresceína.
<b>FRET</b>	Transferencia de energía de resonancia de Förster.
<b>GABA</b>	Ácido gamma-aminobutírico.
<b>GDP</b>	Difosfato de guanosina.
<b>GTP</b>	Trifosfato de guanosina.
<b>HEPES</b>	Ácido <i>N</i> -2-hidroxiethylpiperacin- <i>N'</i> -2'-etanosulfónico.
<b>IE</b>	Impacto electrónico.
<b>IR</b>	Infrarrojo.
<b>K<sub>m app</sub></b>	Constante aparente de Michaelis-Menten.
<b>NSCLC</b>	Cáncer de pulmón no microcítico.
<b>PBS</b>	Solución salina isotónica amortiguadora de fosfatos.
<b>PIP2</b>	Fosfatidil inositol-4,5-bisfosfato.
<b>PIP3</b>	fosfatidil inositol-3,4,5 trifosfato.
<b>RMN</b>	Resonancia magnética nuclear.
<b>SRB</b>	Sulforrodamina B.
<b>THF</b>	Tetrahidrofurano.
<b>TMS</b>	Tetrametilsilano.
<b>Tris-HCl</b>	Clorhidrato de tris(hidroximetil)aminometano.
<b>TUNEL</b>	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling.</i>
<b>VIH</b>	Virus de inmunodeficiencia humana.
<b>Xantphos</b>	4,5-Bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilxanteno.

## Resumen

En este trabajo de tesis se sintetizaron doce compuestos derivados de 2-metilimidazo[1,2-*a*]piridina y quinolina unidos a un anillo de 2-aminopirimidina en la posición 4. Se determinó la actividad citotóxica de los mismos en líneas celulares humanas y su capacidad de inhibir a las cinasas CDK1/CycA y CDK2/CycB.

Evaluamos el reemplazo de los grupos metilo en 2-metil-3-(2-(*p*-tolilamino)pirimidin-4-il)imidazo[1,2-*a*]piridina (compuesto **1**, Figura 3.1) por grupos trifluorometilo y la sustitución del anillo de 2-metilimidazo[1,2-*a*]piridin-3-il por grupos 4-quinolinil y 3-quinolinil. Los compuestos sintetizados que poseen un anillo de imidazo[1,2-*a*]piridina (compuestos **1-6**) poseen buena actividad citotóxica e inhiben a las enzimas CDK1/CycA y CDK2/CycB. El reemplazo de los átomos de hidrogeno por flúor no afecta de manera notable la actividad citotóxica de esta serie. Los compuestos sustituidos con un grupo 4-quinilonil (compuestos **7-9**) presentan actividad citotóxica moderada e inhiben a las enzimas CDK1/CycA y CDK2/CycB. Por otro lado, los compuestos con un grupo 3-quinilonil (compuestos **10-12**) no presentaron actividad citotóxica pero sí inhibieron a las enzimas CDK1/CycA y CDK2/CycB.

## Abstract

In this work twelve 2-methylimidazo[1,2-*a*]pyridine and quinoline derivatives linked to a 2-aminopyrimidin-4-yl moiety were synthesized. Also, their cytotoxic activity in human cell lines and their ability to inhibit the kinases CDK1/CycA and CDK2/CycB were tested.

We evaluated the bioisosteric replacement of methyl groups in 2-methyl-3-(2-(*p*-tolylamino)pyrimidin-4-yl)imidazo[1,2-*a*]pyridine (compound **1**) with trifluoromethyl groups and the bioisosteric replacement of 2-methylimidazo[1,2-*a*]pyridine with 4-quinolinyl and 3-quinolinyl moieties. Synthesized compounds possessing an imidazo[1,2-*a*]pyridine scaffold (compounds **1-6**) have good cytotoxic activity and inhibit CDK1/CycA and CDK2/CycB enzymes. The replacement of the hydrogen atoms with fluorine does not affect significantly the cytotoxic activity of this series. Compounds with a 4-quinilonyl group (compound **7-9**) presented modest cytotoxic activity and inhibited CDK1/CycA and CDK2/CycB kinases. On the other hand, compounds with a 3-quinilonyl scaffold (compound **10-12**) did not show cytotoxic activity but they inhibited to CDK1/CycA and CDK2/CycB enzymes.

## 1. Introducción

El cáncer es responsable de una de cada ocho muertes en todo el mundo, con más de doce millones de casos nuevos diagnosticados anualmente. Un gran porcentaje de los pacientes mueren después de desarrollar cáncer, debido a su diseminación o metástasis, a pesar de recibir un tratamiento agresivo, lo cual indica una necesidad para desarrollar nuevos enfoques para la terapia del cáncer.

Estudios actuales sobre la causa molecular de varias enfermedades han revelado que la pérdida en la regulación de las reacciones que determinan el estado de fosforilación de residuos de serina, treonina o tirosina de proteínas, proceso catalizado por enzimas llamadas cinasas, está asociada con muchas enfermedades, entre ellas el cáncer. De esta manera, modulando farmacológicamente la actividad de las cinasas en células cancerosas podría dar por resultado terapias efectivas y con efectos adversos menores a los fármacos citotóxicos tradicionales. Un número cada vez mayor de cinasas se estudian como blancos potenciales para la terapia del cáncer.

El desarrollo y la aplicación del compuesto conocido como Gleevec representó un nuevo paradigma e inició una nueva clase de fármacos contra el cáncer, llamados moléculas pequeñas o de bajo peso molecular (*small molecules*, en inglés). Este medicamento tiene una alta afinidad sobre algunas cinasas oncogénicas como la cinasa híbrida BCR-Abl o el PDGFR. Gleevec se emplea con éxito para tratar un limitado grupo de enfermedades malignas con efectos adversos reducido como algunas leucemias o sarcomas asociados al tracto digestivo. Aunque se han descubierto varios mecanismos de resistencia contra este fármaco, la experiencia adquirida al usar este compuesto indica que el cáncer puede ser erradicado, en casos particulares, inhibiendo a alguna enzima la cual sea trascendental para que la célula tumoral pueda proliferar y sobrevivir.

Las cinasas que regulan el ciclo celular, que incluyen a las CDKs (quinasas dependientes de ciclinas), aurora cinasas (quinasas esenciales para la regulación de la separación mitótica de los cromosomas) y la cinasas Chk1, han sido objeto de muchos estudios para la búsqueda de nuevos agentes antitumorales, en parte porque estas cinasas se producen de manera excesiva en células cancerosas.

Las modificaciones posteriores del núcleo de 2-aminopirimidina presente en Gleevec, permitieron descubrir que la sustitución en la posición cuatro del anillo de pirimidina por un anillo de 2-metilimidazo[1,2-*a*]piridin-4-ilo generó compuestos con actividad inhibitoria selectiva de la CDK2.

Una herramienta útil en la generación de nuevas moléculas con actividad biológica es el reemplazo bioisotérico, en el cual se parte de un compuesto con una actividad biológica y reemplazando unos grupos funcionales por otros, que pueden poseer entre ellos características electrónicas y estéricas similares, se generan nuevas sustancias con propiedades biológicas equivalentes a la del compuesto original y en ciertos casos con mejores propiedades biofarmacéuticas. No obstante, el reemplazo bioisotérico que funciona para una proteína, en otro blanco molecular diferente puede disminuir o abolir totalmente la actividad biológica del nuevo compuesto.

El propósito de este trabajo de tesis fue sintetizar una serie de 2-arilaminopirimidinas sustituidas en posición cuatro con 2-metilimidazo[1,2-*a*]piridina o con quinolina. Entre nuestros objetivos también se propuso conocer si el reemplazo bioisotérico en el compuesto **1** (Figura 3.1) de los átomos de hidrógeno del grupo metilo por átomos de flúor, tiene alguna influencia potencial en la actividad biológica. Adicionalmente, se sabe que un grupo bioisotérico del anillo de 2-metilamino[1,2-*a*]piridina es el anillo de quinolina; por esta razón, nos enfocamos a la preparación de los compuestos **7-12** (Figura 3.1) pues es interesante conocer si esta sustitución afectará la actividad sobre las CDKs y la actividad citotóxica.

## 2. Antecedentes

Después de la segunda guerra mundial, con el uso clínico de los antibióticos, la longevidad del hombre aumentó debido principalmente a la disminución de la mortalidad por infecciones bacterianas como la neumonía. La implementación de medidas efectivas contra las enfermedades infecciosas provocó un cambio en las causas de muerte siendo las enfermedades crónico-degenerativas las que ahora destacan. De esta manera, los fallecimientos por cáncer y enfermedades cardiovasculares se incrementaron y ocupan ahora los primeros lugares en mortalidad (Figura 2.1)<sup>[1]</sup>.

En las últimas décadas la incidencia de cáncer no ha disminuido, a diferencia de lo que ha ocurrido con las enfermedades cardíacas. Se calcula que para el año 2020 el número de enfermos que padecerán esta enfermedad se incrementará a 15 millones de nuevos casos<sup>[2]</sup>, lo que representa un incremento del 50%; de estos casos el 60% se presentará en países en desarrollo<sup>[3]</sup>.

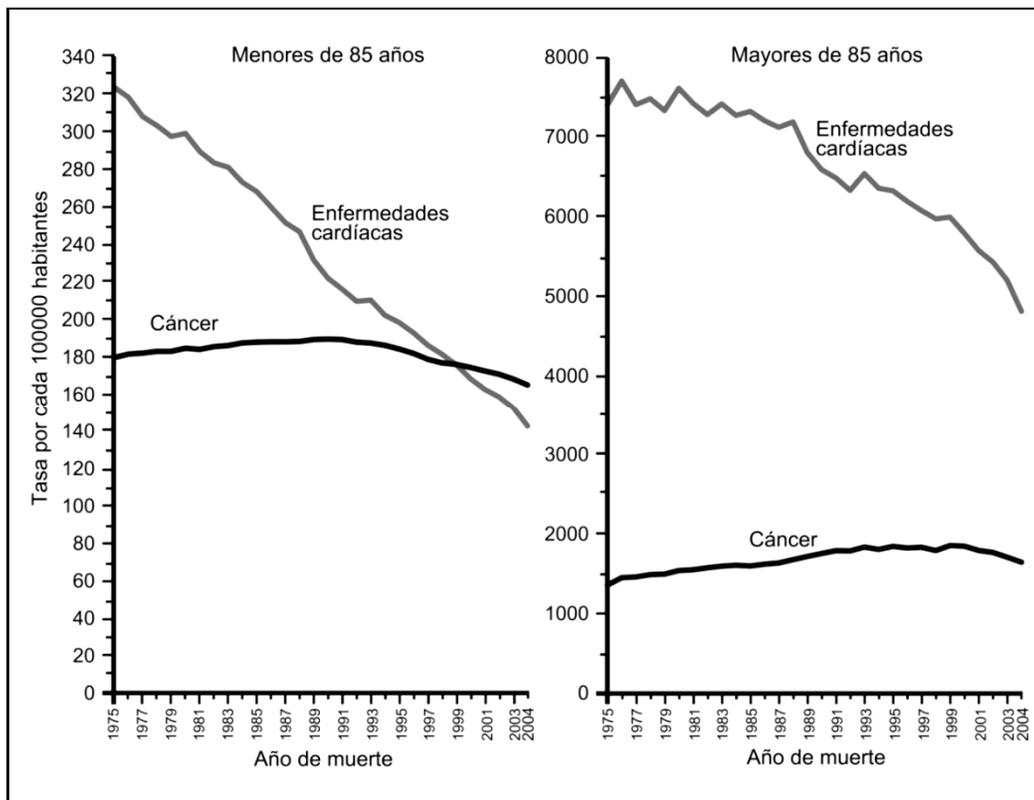
Algunas de las principales funciones de las células de un organismo son el crecimiento, división y muerte celular. Estas funciones se encuentran bajo un estricto sistema de regulación biológica. La pérdida de esta regulación produce diversas enfermedades, entre ellas el cáncer.

### 2.1. Cáncer

Hipócrates fue el primero en utilizar el término cáncer (460-370 a.C.) debido a que los tumores sólidos forman un cuerpo central y extensiones que parecen un cangrejo (*carcinoma* en griego); también fue el primero en proponer que el origen de la enfermedad es de tipo orgánico.<sup>[4]</sup>

Durante la historia de la humanidad se han propuesto diferentes teorías sobre la etiología del cáncer. Paracelso fue el primero en describir la asociación entre las enfermedades ocupacionales y el cáncer; hecho confirmado hasta 1776 cuando se correlacionó el cáncer de escroto, que padecían en mayor número los limpiadores de chimeneas, con la exposición de la piel al hollín. En 1811 se observó que el cáncer puede

ser también de origen hereditario. El primer caso documentado de cáncer inducido por radiación se reportó en 1902. En los 50s se establecieron cuales eran los compuestos carcinógenos del hollín y otras mezclas carcinógenas. En 1960 se encontró que la translocación entre los cromosomas 9 y 22, el llamado cromosoma Filadelfia, era predominante en pacientes con leucemia mielogénica crónica. A partir de este último descubrimiento se estableció el cáncer como una enfermedad donde es importante el papel que juega la modificación del material genético.<sup>[4]</sup>



**Figura 2.1. Índice de mortalidad del cáncer contra enfermedades cardíacas con respecto al tiempo.** Mientras que la mortalidad causada por las enfermedades cardíacas ha mostrado una disminución significativa, la mortalidad por cáncer se ha mantenido casi constante en las últimas décadas.

El cáncer básicamente es una enfermedad genética y propia de las células que tienen capacidad de multiplicarse, ya que los genes necesarios para este proceso se expresan exclusivamente en células en división.<sup>[5]</sup> Debido a la gran cantidad de órganos que cumplen cabalmente con la condición anterior, el término cáncer se refiere a alrededor de cien formas diferentes de la enfermedad<sup>[6]</sup>, y aunque comparte características comunes su formación es un proceso complejo, pues para un mismo

órgano hay diferentes clases de cáncer. Este padecimiento por lo tanto es de origen multifactorial y en su etiología pueden participar agentes físicos, químicos y biológicos.<sup>[6-7]</sup>

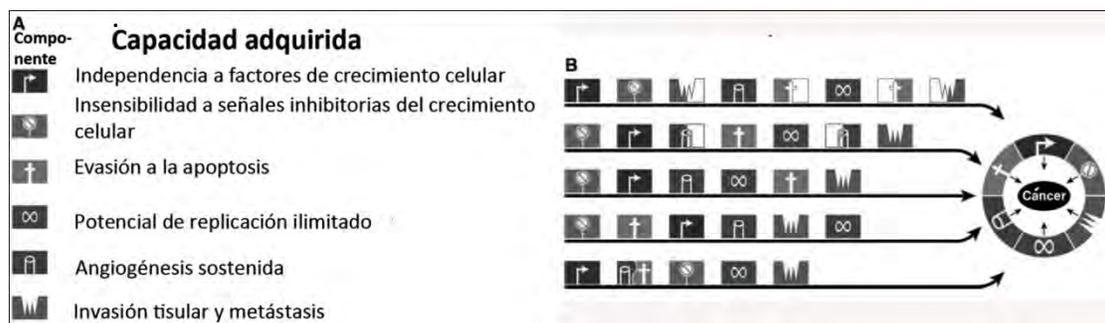
El paso inicial para que una célula normal pueda estar predispuesta al cáncer es la alteración de un gen ya sea por sustitución de bases, inserciones, deleciones, rearrreglos cromosomales o por un aumento o disminución en el número de copias del gen.<sup>[8]</sup> Aunque se sabe que la adquisición de una mutación es un evento iniciador importante no es suficiente para generar la enfermedad, pues ésta es un proceso molecular y celular que es dependiente de tiempo y de otras mutaciones, por lo que pueden pasar varios años antes de que las células expresen modificaciones fenotípicas (modelo estocástico)<sup>[9]</sup>, excepto para el caso del cáncer causado por virus altamente oncogénicos.<sup>[10]</sup> Se ha establecido que se requieren al menos tres mutaciones de genes importantes para la carcinogénesis para generar un tumor sólido maligno en adultos<sup>[11]</sup> y dos mutaciones para desarrollar un tumor líquido maligno.<sup>[12]</sup> Los tres tipos principales de genes responsables de la carcinogénesis son: los oncogenes, los genes supresores tumorales y los genes de estabilidad. Los oncogenes promueven el ciclo celular y deben mutarse de tal manera que se encuentren constitutivamente activos, son por tanto mutaciones con ganancia de función. Los genes supresores tumorales evitan que la célula lleve a cabo el ciclo celular y su actividad en la carcinogénesis debe estar reducida. En este tipo de genes se deben perder ambos alelos para observar un efecto celular, se trata por tanto de mutaciones con pérdida de función. Los genes de estabilidad previenen al mínimo cambios en el ADN, por lo que su pérdida genera mutaciones a un nivel elevado.<sup>[5]</sup> Al menos 291 genes se han encontrado cuya mutación está implicada con el proceso de carcinogénesis. De estos genes el 90% presenta mutaciones somáticas y el 20% son de origen germinal. Así mismo el 90% de las mutaciones son consideradas dominantes a nivel celular. De los genes involucrados en el desarrollo del cáncer el mayor número son proteína cinasas, seguido por las proteínas necesarias en el proceso de regulación transcripcional y también de proteínas encargadas de la reparación y mantenimiento del ADN.<sup>[8]</sup> Sin embargo, aunque la cantidad de genes que pueden producir cáncer parece elevada, sólo un número

pequeño de vías metabólicas está implicado en la generación de diferentes tipos de esta enfermedad.<sup>[5]</sup>

La inestabilidad genética está muy bien documentada y se ha demostrado que las células tumorales presentan cientos de mutaciones a lo largo del genoma, las cuales se presentan de forma aleatoria y al parecer la presencia del fenotipo “mutador” debe ser un evento inicial en el proceso de carcinogénesis.<sup>[13]</sup> En este proceso también se presentan cambios a nivel cromosómico. Las mutaciones somáticas más importantes son las translocaciones de cromosomas, que generan proteínas quiméricas, y la aposición de un gene con la unidad reguladora de otro.<sup>[8]</sup> Otros genes implicados en la carcinogénesis no se encuentran mutados, sino que se expresan en menor o mayor cantidad que en las células normales y esta alteración se debe a cambios epigenéticos, los cuales son cambios covalentes en el ADN por metilación. A diferencia de las mutaciones, los cambios epigenéticos se presentan en algún momento del desarrollo normal del organismo.<sup>[5]</sup>

Un tumor puede ser visto como un órgano aberrante que se inicia a partir de una célula alterada, que se expande clonalmente como un resultado de mutación somática.<sup>[5, 7]</sup> Durante el proceso de transformación de esta célula, las clonas que se generan pueden tener menor o mayor disposición que otras, por lo que dentro del tumor se genera una selección de las células más aptas. Al aumentar el número de células, el tumor empieza a incrementar su volumen encontrando restricciones para su desarrollo, tales como limitación por el tejido adyacente y reducción de la cantidad de nutrientes, oxígeno y factores de crecimiento.<sup>[13]</sup> Aquí es necesario mencionar que para que el tumor pueda continuar su crecimiento debe desarrollar la capacidad de formar vasos sanguíneos nuevos, proceso conocido como angiogénesis. Muchos tumores poseen una expresión más elevada de factores que promueven la angiogénesis, e. g. VEGF y/o FGF, que sus contrapartes compuestas de tejido normal.<sup>[14]</sup> El proceso por el cual un tumor desarrolla la capacidad de generar angiogénesis es prácticamente desconocido, pero todas las vías de los oncogenes y de los genes supresores tumorales han sido implicadas en este fenómeno.<sup>[5]</sup>

La diseminación de las células tumorales de su sitio de origen a otro u otros sitios del organismo y su establecimiento se denomina metástasis. Para que una célula tumoral pueda vivir en un ambiente diferente a su órgano de origen debe perder la dependencia a la unión con células similares, romper la membrana basal del tejido por medio de metaloproteinasas, tales como el activador del plasminógeno. En muchos tipos de cáncer las células tumorales no expresan metaloproteinasas, esto lo realizan las células inflamatorias que infiltran al tumor; lo que aprovechan las células tumorales para introducirse en la circulación sanguínea.<sup>[15]</sup> Al penetrar la membrana basal de los tejidos, a través de los vasos sanguíneos y las células endoteliales vasculares, las células malignas se encuentran ahora en el torrente sanguíneo, por medio del cual se transportan a otros órganos. Al ser transportadas las células deben adherirse a las células endoteliales, penetrar hasta el mesénquima del tejido y reproducirse.<sup>[16]</sup> Afortunadamente, de todas las células que se liberan sólo unas pocas forman focos metastásicos, pues la colonización de las células en nuevos sitios anatómicos requiere adaptación, que sólo puede ser alcanzada cambiando la expresión de proteínas de adhesión en la célula tumoral (moléculas de adhesión celular, integrinas y cadherinas) por aquéllas que favorezcan la unión en epitelio normal.<sup>[17]</sup>



**Figura 2.2. Características de las células tumorales.** A; Las características de una célula tumoral para desarrollar un fenotipo maligno son por lo menos seis, siendo la metástasis la propiedad que pone en riesgo la vida de las personas que padecen esta enfermedad, el mecanismo molecular implicado en la adquisición de estas características es muy variado. B; La progresión tumoral del fenotipo benigno al maligno no es un proceso lineal, las características se presentan cronológicamente de manera muy variable; en ocasiones sólo una mutación es necesaria para que se presenten dos o más características; por otro lado, también puede presentarse el caso donde más de una mutación sea necesaria para generar una de las características mencionadas en A. Adaptado de la referencia [18].

La metástasis en un 90 % de los casos es lo que finalmente lleva al organismo a la muerte.<sup>[13, 19]</sup> Se han establecido seis características de las células tumorales que dictaminan la capacidad de éstas para desarrollarse hasta un fenotipo maligno (Figura 2.2), estas son: capacidad de dividirse en ausencia de señales de crecimiento celular, insensibilidad a las señales que inhiben el crecimiento celular, evasión a la muerte celular programada, potencial de replicación ilimitado, angiogénesis sostenida y por último, invasión tisular y metástasis. El orden en que estas características se adquieren es muy variable entre los diferentes tipos y subtipos de cáncer.<sup>[18]</sup>

## **2.2. Terapia del cáncer**

El cáncer y su tratamiento se inició desde hace miles de años. La descripción más antigua documentada del cáncer de mama fue encontrada en papiros egipcios (3000-1500 a.C.), los cuales fueron nombrados como “Edwin Smith” y “George Ebers”.<sup>[20]</sup> El cáncer actualmente puede ser combatido con radioterapia, cirugía y quimioterapia. Los primeros dos están fuera del alcance de esta revisión.

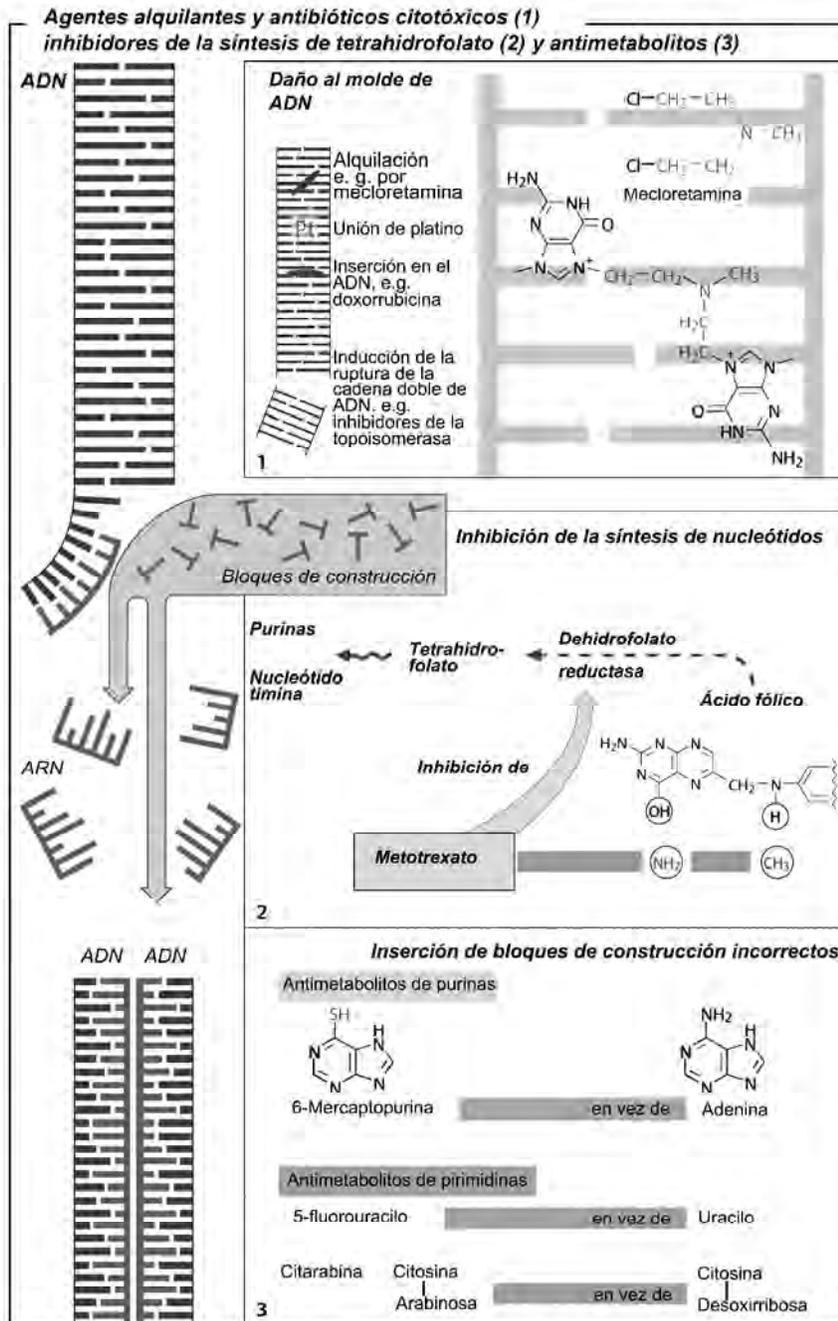
El primer tratamiento efectivo de quimioterapia para curar la leucemia fue utilizado por Lissauer en 1865, usando solución de Fowler (solución hidroalcohólica de arsenito de potasio al 1%) que se utilizó hasta los años 1930s. En esa misma década (1931) se reportó la regresión de tumores cutáneos inducidos químicamente en ratones, utilizando mostazas de azufre y su uso efectivo en 12 pacientes por vía tópica e intratumoral; sin embargo, este trabajo no causó un impacto significativo.<sup>[20]</sup>

A finales de la segunda guerra mundial se demostró que pacientes con tumores del sistema linfático lograron un alto porcentaje de remisión de la enfermedad después de ser tratados con agentes alquilantes. Estos resultados fueron publicados por Gilman y Phillips después de la guerra.<sup>[21]</sup> Posterior a la introducción de las mostazas nitrogenadas a las pruebas clínicas, otros agentes alquilantes (cloroambucil, melfalan, busulfan y ciclofosfamida) fueron sintetizados. Algunos años después se descubrió el efecto de los antimetabolitos (antifolato) en leucemia.<sup>[10, 22]</sup> Durante la década de los sesentas fueron desarrollados los antibióticos antitumorales, los compuestos de platino y algunos alcaloides, muchos de los cuales siguen aún en uso clínico.<sup>[23]</sup> Estos descubrimientos

marcaron el inicio de la quimioterapia moderna del cáncer.<sup>[23]</sup> Los agentes quimioterapéuticos antitumorales se clasifican de la siguiente manera:<sup>[10]</sup>

- i. Agentes alquilantes: Este tipo de compuestos actúan reaccionando covalentemente con nucleófilos celulares, de especial interés son las bases nitrogenadas. En esta categoría se encuentran las mostazas ( $\beta$ -cloroaminas o tioéteres), ciclofosfamidias, mitomicina C, alquilsulfonatos, nitrosoureas y derivados de hidrazina y triazina (Figura 2.3).
- ii. Cisplatino y análogos: Forman aductos mono o bifuncionales preferencialmente con el N-7 de guanina y adenina en el ADN; de esta forma no se permite la replicación del material genético (Figura 2.3).
- iii. Antimetabolitos: Intervienen en el catabolismo del material genético. Esta categoría se encuentran los antifolatos (metotrexato, tomudex), 5-fluorouracilo, 6-mercaptopurina y citarabina (Figura 2.3).
- iv. Agentes que interaccionan con la topoisomerasa: Agentes planos que se intercalan en la cadena doble de ADN y al interaccionar con la topoisomerasa estabilizan el complejo fármaco-enzima-ADN, lo que ocasiona ruptura del ADN. En este rubro se encuentran las epipodofilotoxinas, camptotecina, antraciclinas, mitoxantrona y losoxantrona (Figura 2.3).
- v. Agentes que afectan la estabilidad de los microtúbulos: Estos fármacos inhiben (alcaloides de la Vinca) o estabilizan (taxanos, eptilonas) la polimerización de la tubulina. Los microtúbulos forman el huso mitótico que separa los cromosomas durante la mitosis.
- vi. Misceláneos: Aquí se incluyen fármacos con diferentes mecanismos de acción. Algunos de los fármacos de este grupo son la bleomicina, L-asparaginasa, homoharringtonina, geldanomicina y amifostina.

Los fármacos de estas seis categorías no poseen especificidad entre células tumorales y células normales, y no todos los tipos de cáncer responden a estos compuestos. Una de las desventajas observadas fue que a la mayoría de los fármacos



**Figura 2.3. Mecanismo de acción de algunos de los fármacos utilizados en la terapia del cáncer.** Los fármacos citotóxicos clásicos esencialmente interfieren directamente con el metabolismo del ADN. Los agentes alquilantes, compuestos de platino, antibióticos citotóxicos e inhibidores de la topoisomerasa interfieren con la replicación del ADN por intercalación en la doble hebra de ADN o reaccionando con las bases nitrogenadas. El metotrexato es un inhibidor de la dehidrofolato reductasa, necesaria para la síntesis de purinas. También se utilizan bases púricas y pirimídicas estructuralmente parecidas a las bases normales, generando moldes de ADN incorrectos o inhibiendo enzimas importantes para la síntesis de material genético. Del lado izquierdo se muestra el proceso normal de replicación y transcripción. Adaptado de [24].

actuales les falta selectividad y causan usualmente toxicidad severa.<sup>[23-24]</sup> La resistencia a los fármacos dentro de un tumor se puede generar aún antes de la exposición a él; este hecho fue observado por Gilman al notar la variabilidad en la respuesta a las mostazas nitrogenadas, inclusive en algunos casos observó una eficiencia nula, por lo que concluyó que un solo compuesto no puede inhibir el crecimiento de todas las células tumorales presentes entre individuos.<sup>[25]</sup> Para aumentar la efectividad se utilizan combinaciones de los diferentes grupos de fármacos, esta estrategia es más efectiva en contra de cáncer metastásico y en pacientes con alta posibilidad de recaída.<sup>[23]</sup> Durante los últimos años se han desarrollado proteínas y moléculas de bajo peso molecular que no solamente se dediquen a alterar el metabolismo del ADN o ARN. Estas sustancias pueden interferir con los procesos de la carcinogénesis, modular la respuesta inmune hacia el tumor o bien simplemente dar soporte para aminorar los efectos de la quimioterapia.<sup>[24, 26]</sup> Entre los más sobresalientes están el interferón I y II, moduladores del receptor a estrógenos (tamoxifen), inhibidores de la aromatasas (aminoglutetimida), análogos hormonales, agentes que modulan la diferenciación celular (retinoides, inhibidores de la histona deacetilasa, vitamina D y citocinas), agente antiangiogénicos, moléculas inhibidoras de cinasas de bajo peso molecular y anticuerpos que interfieren en la señalización celular<sup>[26]</sup> (Estos anticuerpos están dirigidos contra proteínas de membrana, generalmente de leucocitos, e.g. Gemtuzumab y Rituximab, y contra cinasas de residuos de tirosina). Una clase importante de compuestos son los conocidos como inhibidores de la histona deacetilasa y de la metiltransferasa. Este tipo de compuestos pretenden revertir los cambios epigenéticos ocurridos en las células tumorales, permitiendo la expresión de genes que habían sido previamente silenciados. Entre los agentes inhibidores de la metiltransferasa se encuentra la 5-azacitidina y 2-desoxi-5-azacitidina. Podemos también mencionar a algunos inhibidores de la histona deacetilasa como son el ácido valpróico y los derivados del ácido hidroxámico.<sup>[26]</sup>

Los mecanismos por los que las células tumorales no presentan respuesta a la quimioterapia son muy variados. Entre estos mecanismos destaca la sobreexpresión de las proteínas a las que va dirigido el medicamento, mutación de las proteínas que las

convierte en insensibles al fármaco, mecanismos de reflujo favorecidos por proteínas ABC (ATP-binding-cassette), como la glicoproteína P, alteración de la biodisponibilidad dentro del nicho tumoral, etc.<sup>[24, 26-27]</sup>

Durante las últimas décadas se ha establecido como medida de eficiencia para un compuesto citotóxico su capacidad de disminuir el volumen de un tumor;<sup>[26]</sup> sin embargo este indicador no refleja que en el paciente se logre un incremento en la supervivencia.<sup>[28]</sup> El poco éxito en la remisión de la enfermedad se ha justificado por la presencia de células madre o troncales cancerosas dentro del tumor. Por definición, una célula madre es aquella que tiene la capacidad de regenerarse a ella misma y durante este proceso crear otro tipo de células más especializadas, lo cual en los tumores, resultaría en toda la variedad de células que lo constituyen (Figura 2.4).<sup>[9, 28b, 29]</sup> Se ha encontrado que las células madre normales son resistentes a la inducción de apoptosis<sup>[30]</sup> y poseen mecanismos de exclusión de fármacos.<sup>[31]</sup> Estas células son más propensas a acumular mutaciones que aquellas observadas en una célula con capacidad de división limitada.<sup>[29]</sup> Las células madre cancerosas, si no son erradicadas en su totalidad por la terapia utilizada, pueden regenerar nuevamente el tumor, por lo que es preciso contar con fármacos que eliminen con efectividad este tipo de células para lograr curar la enfermedad totalmente.<sup>[9, 28b, 29]</sup>

Algunos expertos médicos proponen que el cáncer debe ser considerado como una enfermedad crónica y por lo tanto debe ser tratado como tal.<sup>[32]</sup> En vez de erradicar el tumor, es preferible controlar el crecimiento del mismo mediante una terapia citotóxica normal seguida por dosis de mantenimiento o mediante alguna alternativa citostática.<sup>[33]</sup> Este último esquema de dosificación se conoce como quimioterapia metronómica, la cual se ha aplicado con éxito utilizando agentes antiangiogénicos, combinada con vinblastina para mantener controlado el crecimiento tumoral.<sup>[34]</sup>

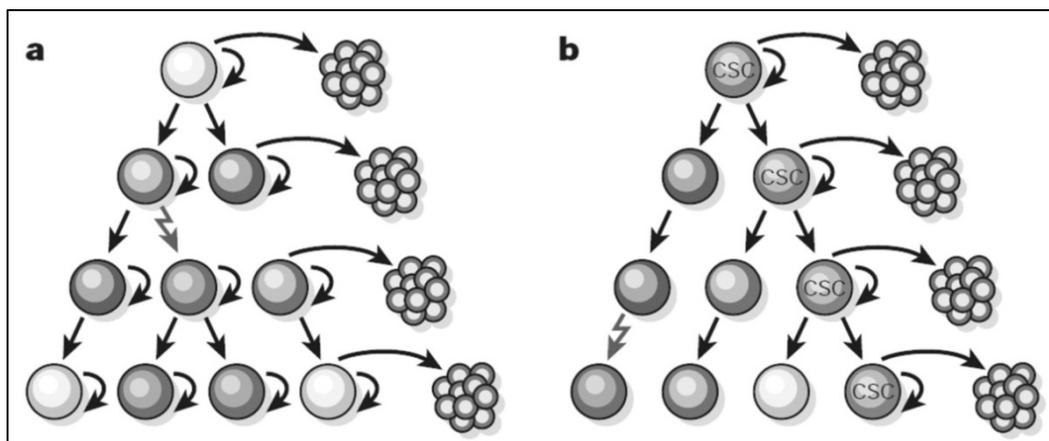
### **2.3. Cinasas**

La modificación covalente de una proteína representa una manera eficiente de regular su función. La estrategia más utilizada para modificar la actividad de una proteína de manera post-traduccional es la transferencia de grupos fosfato del ATP a grupos hidroxilo

presentes en la serina, treonina y/o tirosina de proteínas específicas mediante enzimas conocidas como cinasas (Figura 2.5).<sup>[35]</sup> El proceso de fosforilación-defosforilación puede alterar la actividad, estabilidad, movilidad entre compartimentos celulares de una proteína, o bien modificar la afinidad por otras proteínas. Se estima que el 30% de las proteínas codificadas por el genoma humano contienen un grupo fosfato unido covalentemente.<sup>[35b]</sup>

Los primeros indicios sobre la importancia de la fosforilación en el control de procesos celulares fueron en el estudio de la glucogenólisis en los 1950s. Con el paso de los años se ha establecido su importancia en casi todos los eventos fisiológicos.<sup>[35b]</sup>

Recientemente, la aplicación de nuevas técnicas utilizadas en la fosfoproteómica han ayudado a incrementar el entendimiento de las vías de señalización celular.<sup>[36]</sup>

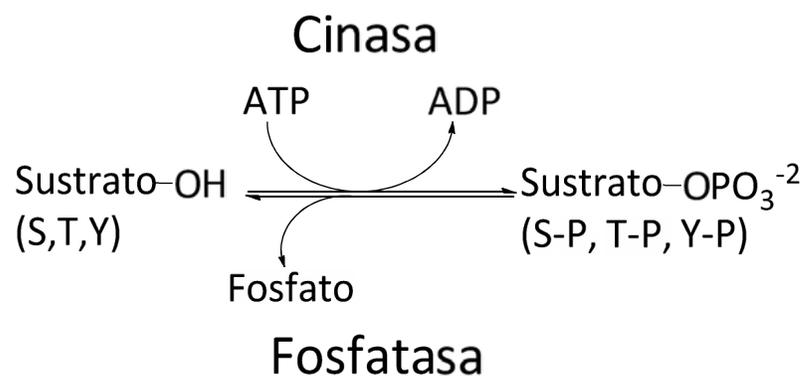


**Figura 2.4. Dos modelos por los cuales se genera heterogeneidad clonal.** En el modelo **a** las células son heterogéneas y la mayoría de las células tienen la capacidad de replicarse a sí mismas y de generar clonas diferentes; por lo tanto la mayoría de las células generan tumores. En **b** el tumor es heterogéneo pero sólo las células madre tumorales (CSC) pueden replicarse activamente generando nuevas clonas, las demás células tienen capacidad de replicación limitada. Los modelos utilizados para desarrollar la terapia contra el cáncer se basa en el modelo **a**, pero el fracaso mostrado hasta ahora con estas terapias puede indicar que el modelo **b** es más preciso. Tomado de la referencia [29].

### 2.3.1. Cinasas y cáncer

El virus del sarcoma de Rous es un retrovirus que causa cáncer de músculo o tejido conjuntivo en pollos; dentro de su genoma se encuentra un gen que codifica para una proteína llamada v-Src, y que es la responsable de la formación del tumor (este tipo de genes fueron llamados oncogenes). El descubrimiento de que el factor transformante del

virus de sarcoma de Rous es una proteína cinasa fue uno de los avances más importante en la biología molecular del cáncer.<sup>[37]</sup> Posteriormente se encontró que en tejido muscular de pollo, que no se encuentra infectado, se expresa una proteína altamente relacionada a la proteína v-Src, que fue llamada c-Src.<sup>[38]</sup> Este tipo de proteínas fueron llamadas protooncogenes. Tanto v-Src como c-Src fosforilan residuos de tirosina de diferentes proteínas,<sup>[39]</sup> por lo que fueron denominadas como cinasas de residuos de tirosina. Las enzimas que catalizan la reacción contraria se denominaron como fosfatasa. En general las cinasas se clasifican como cinasas de residuos de tirosina (PTK) y en cinasas de residuos de serina/treonina en función de los aminoácidos a los que les transfieren grupos fosfato (Figura 2.5). Las fosfatasa, enzimas que eliminan fosfato de proteínas fosforiladas (Figura 2.5), también se clasifican como fosfatasa de residuos de serina/treonina y tirosina y su papel tiene igual importancia en el contexto celular que las cinasas.



**Figura 2.5. Reacción de fosforilación-defosforilación.** La fosforilación de proteínas en residuos de serina (S), treonina (T) o tirosina (Y) se cataliza mediante las enzimas llamadas cinasas o quinasas (este último es anglicismo), la reacción contraria se cataliza utilizando enzimas llamadas fosfatasa. Ambas enzimas regulan la actividad de proteínas.

El genoma humano codifica para cerca de 518 cinasas,<sup>[40]</sup> de las cuales sólo 90 son cinasas de residuos de tirosina.<sup>[41]</sup> Este tipo de enzimas son las que se encuentran más frecuentemente mutadas en células cancerosas. La mayoría de las mutaciones de estas enzimas causan incremento en su actividad y son dominantes a nivel celular.<sup>[8]</sup>

Las cinasas de residuos de tirosina son principalmente receptores a factores de crecimiento; de esta manera, dirigen las señales del medio ambiente celular hacia el núcleo, donde genes específicos son activados para el crecimiento, diferenciación y

división celular. La vía de señalización de las diferentes cinasas de residuos de tirosina converge en la cinasa RAS, una GTPasa, cuya actividad promueve la carcinogénesis. La proteína RAS se encuentra conservada en la evolución de diferentes organismos como ratón, *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y humanos.<sup>[42]</sup>

La unión del sustrato al receptor de factor de crecimiento ocasiona que se dimericen dos receptores unidos al ligando. Estos se fosforilan mutuamente causando la activación de una serie de proteínas llamadas factores de intercambio de nucleótido de guanina (GEF), que incluye varias proteínas como GRB2, SOS1 y SOS2. El GEF promueve el intercambio de GDP por GTP en RAS. Este último evento activa a RAS que fosforila a RAF, una cinasa de residuos de serina/treonina, que a su vez activa a una serie de proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK).<sup>[42]</sup> La activación en cascada de esta serie de factores y cinasas tiene dos consecuencias importantes: la primera es la regulación de cada paso de la vía de señalización y la otra es la amplificación de la señal en el interior de la célula.<sup>[35a]</sup> La serie de eventos que ocasionan la activación de RAS no explican la gama de eventos que regula ni la heterogeneidad de respuestas que tiene la mutación de esta proteína dependiendo del tipo celular y de las mutaciones encontradas, aún en células del mismo origen.<sup>[5]</sup> En un 25% de los tumores las proteínas RAS mutadas generan flujos mitogénicos dentro de la célula.<sup>[18]</sup>

Otra vía de señalización activada por cinasas de residuos de tirosina es la del fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) y la cinasa AKT. La unión del ligando a receptores perteneciente a cinasas de residuos de tirosina provoca la activación de la PI3K tipo 1A que sintetiza al segundo mensajero fosfatidilinositol-3,4,6-trifosfato (PIP3) a partir de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato. (PIP2). Este fosfolípido se une a una cinasa dependiente de PIP3 (PDK1) promoviendo su activación. PDK1 y una cinasa que aún se desconoce activan a la cinasa de residuos de serina/treonina AKT. El aumento en la actividad de AKT tiene como consecuencia un aumento en la división celular, inhibición de la apoptosis y aumento en el crecimiento celular.<sup>[43]</sup> AKT fosforila a la cinasa de residuos de serina/treonina mTOR que se encarga de regular la síntesis de proteínas en base al

contenido energético, por lo que participa directamente en el aumento de volumen de la célula.<sup>[43]</sup>

Las cinasas de residuos de tirosina JAK o Janus son activadas después de la unión de citocinas o interferones a su receptor. Las cinasas JAK fosforilan a sus sustratos conocidos como STATs los cuales median directamente la transcripción de genes.<sup>[5, 35b]</sup> La cinasa JAK es de la clase de las cinasa de residuos de tirosina citoplasmáticas, que a diferencia de las receptoras no se sabe mucho de la forma en que se activan. Las cinasas de residuos de tirosina celulares están divididas en nueve familias que incluyen a las proteínas Src, Tec, JAK, Abl, Fes/Fer, FAK, Csk, Ack y Syk/Zap70.<sup>[44]</sup>

Las vías de señalización anteriores regulan una amplia gama de respuestas celulares importantes y han sido objeto de modificación farmacológica. De ahí la importancia de su estudio. Su activación constitutiva estimula señales oncogénicas dentro de la célula lo cual favorece la división celular.

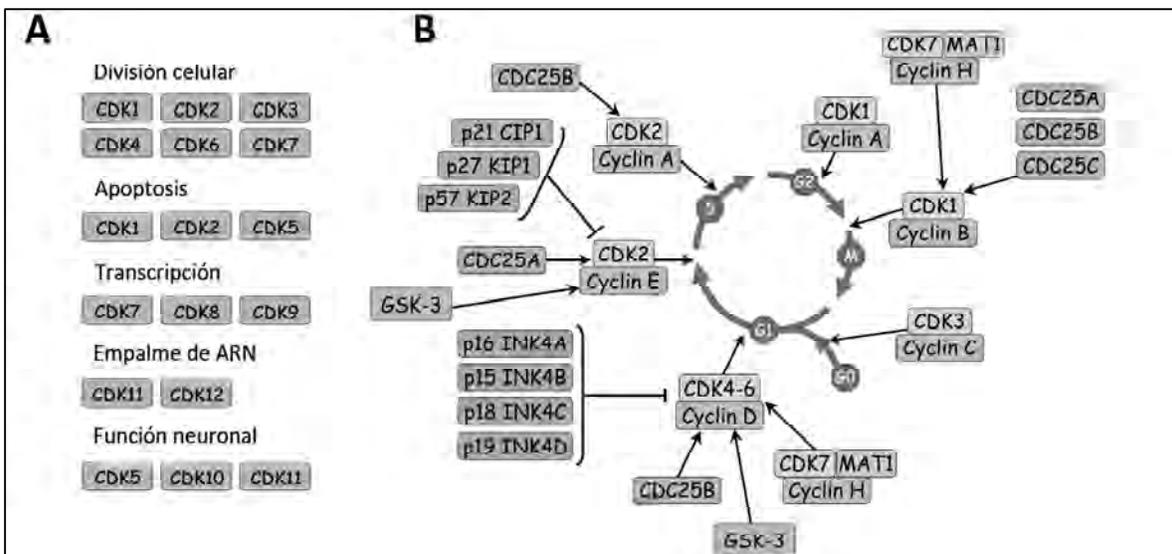
### **2.3.1.1. Regulación del ciclo celular y cinasas dependientes de ciclinas (CDKs)**

El ciclo celular se ha dividido en dos fases, la interfase y la mitosis. A su vez la interfase se divide en la fase G1 (gap 1), S (síntesis) y G2 (gap 2). La mitosis se divide en profase, metafase, anafase, telofase y citocinesis. En organismos eucariontes superiores, el ciclo celular se controla por una combinación compleja de proteínas que integran señales extra e intracelulares, que se encargan de la coordinación de los eventos del ciclo celular<sup>[45]</sup> (Figura 2.6).

Los reguladores intracelulares son las cinasas dependientes de ciclinas (CDKs); los inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (CKI) que pertenecen a la familia Cip/Kip e INK y la proteína Rb. Las CDKs son herramientas biológicas que conducen los eventos del ciclo y funcionan como reguladores temporales que coordinan estos procesos. Las CDKs se expresan de manera constitutiva, pero para que esta enzima sea activa requiere de la presencia de ciclinas, las cuales se degradan y sintetizan de manera controlada a lo largo del ciclo celular<sup>[45-46]</sup> (Figura 2.6).

Las CDKs son cinasas de residuos de serina/treonina clásicas con pesos moleculares de 30 a 40 KDa y funcionan como la parte catalítica de los complejos CDK/ciclina, donde la

ciclina actúa como unidad reguladora. Las CDKs forman una gran familia de proteínas con alta versatilidad y diversidad. La estructura común de las CDKs consiste de un pequeño lóbulo N-terminal que contiene principalmente laminas beta plegadas y un lóbulo grande C-terminal que contiene principalmente laminas alfa, y entre los dos lóbulos se encuentra el sitio de unión a ATP.<sup>[45]</sup> Todas las CDKs comparten un motivo PSTAIRE característico que se encuentra altamente conservado en el sitio de unión de la ciclina.<sup>[47]</sup> De acuerdo a la última versión del genoma humano y de ratón hay 11 genes que codifican para CDKs y nueve para proteínas tipo CDK.<sup>[48]</sup>



**Figura 2.6. Cinasas dependientes de ciclinas (CDKs).** Diferentes CDKs están implicadas en varios procesos fisiológicos (A), incluyendo el ciclo celular, el cual se divide en las fases G1, G2, S y M (B). Muchos de estos reguladores se encuentran alterados en el cáncer.

Al estimular la célula con factores que activen las vías de señalización de RAS o de IP3K se promueve la síntesis de la ciclina D, la cual se ensambla con las CDK4 y 6.<sup>[49]</sup> El complejo CDK4/CycD y CDK6/CycD aún no son activos, para esto se requiere la fosforilación por parte de la cinasa activadora de CDKs (CAK) con el objeto de aumentar la actividad de los complejos aproximadamente unas 100 veces.<sup>[50]</sup> Una vez activos CDK4/CycD y CDK6/CycD son transportados al núcleo donde fosforilan a proteínas de la familia Rb (p107, p130 y Rb) inactivando su función represora de la transcripción. La hiperfosforilación de Rb hace que esta proteína libere al factor de transcripción E2F, el

cual reprime uniéndose a él, ocasionando la expresión de genes necesarios para la síntesis de ADN y a la ciclina A y E.<sup>[46, 51]</sup>

La ciclina E se une a la CDK2 y junto con los complejos CDK4/CycD y CDK6/CycD disminuyen la actividad de los CIK de la familia Cip/Kip, promoviendo el ciclo celular mientras haya estímulos mitogénicos. Se ha observado que en ausencia de estos estímulos la ciclina D se vuelve inestable y se degrada rápidamente, lo que hace que aumente la actividad de los CIK y el ciclo se detenga.<sup>[51b]</sup> La función conjunta de CDK4/CycD, CDK6/CycD y CDK2/CycE para fosforilar a Rb e inactivar los CIK reduce la dependencia de la célula a estímulos de crecimiento. Al incrementar la cantidad de ciclinas A y E, que no son dependientes de señales mitogénicas, se llega a un punto donde la célula ya no tiene más opción que completar el ciclo celular; esto se ha llamado punto de restricción o R.<sup>[46, 49]</sup>

De esta manera en la interfase G1/S la actividad de la CDK2/ciclina E es máxima y disminuye al avanzar la fase S. La CDK2 es subsecuentemente activada por la ciclina A2 para llevar a cabo la síntesis de ADN y preparar a la célula para la mitosis durante la fase G2.<sup>[46]</sup>

Finalmente, la CDK mitótica (CDK1) se une a la ciclina A en la interfase G2/M para facilitar la entrada a la mitosis. Al romperse la membrana nuclear se promueve la degradación de la ciclina A y de esta forma se facilita la unión de CDK1 con ciclina B, complejo que regula la progresión de la célula durante la mitosis.<sup>[48]</sup>

### **2.3.1.2. Función de las CDKs en otros procesos celulares**

Las CDKs no sólo se encuentran implicadas en el control del ciclo celular, también han sido asociadas a otros procesos celulares (Figura 2.6):

- i. *Transcripción:* Se han relacionado a tres CDKs principalmente en la regulación de la transcripción en humanos, CDK7 (unido a ciclina H), CDK8 (unido a ciclina C) y CDK9 (unido a ciclina T). También ha sido reportado que estas enzimas regulan la fosforilación del dominio C-terminal de la RNA polimerasa II y de la cinasa asociada a Tat.<sup>[52]</sup>

- ii. *Apoptosis:* Se ha descrito la intervención de las CDKs en la apoptosis. El complejo CDK1/CycB1 ha sido asociado con la apoptosis inducida por el VIH y la apoptosis neuronal en enfermedades neurodegenerativas.<sup>[53]</sup> La activación prematura de CDK1 puede desencadenar en catástrofe mitótico ya sea por tratamiento con radiación o bien por daño químico sobre ADN inducido químicamente.<sup>[53]</sup> La CDK2 ha sido implicada en la regulación de la apoptosis de timócitos.<sup>[54]</sup> También se conoce que tejidos normales y tumorales tienen requerimientos específicos por CDKs de interface para poder crecer con normalidad.<sup>[48]</sup>
- iii. *Función neuronal:* La CDK5 está implicada en procesos neurodegenerativos y juega un papel importante en el desarrollo de migración neuronal, vías de señalización de la dopamina y regulación de la fosforilación de moléculas del citoesqueleto.<sup>[55]</sup>
- iv. *Señalización de estímulos nociceptivos:* Las proteínas CDK5 y p35 en el sistema nervioso periférico actúan en la regulación de los procesos nociceptivos. Los ratones p35-/- poseen respuestas retrasadas a los estímulos térmicos y cuando su actividad es elevada los ratones son hipersensibles al dolor.<sup>[56]</sup> Este complejo enzimático se activa durante la inflamación aguda y participa en la tolerancia a opiáceos.<sup>[56]</sup>

### **2.3.2. Inhibición farmacológica de cinasas**

La inhibición farmacológica de cinasas para tratar el cáncer, que en contraste con la quimioterapia tradicional, promete ser más eficiente y con menos efectos tóxicos.<sup>[57]</sup> Los anticuerpos monoclonales se destacan por inhibir las vías oncogénicas de receptores celulares. Las proteínas más importantes para inhibir cinasas son la Herceptina (inhibidor del factor de crecimiento epidermal). La Avastina (inhibidor del factor de crecimiento del endotelio vascular) y el Trastuzumab (inhibidor del receptor de HER2, importante en el cáncer de mama).<sup>[32b, 57]</sup> Otros anticuerpos usados y que no inhiben cinasas son el Rituximab (se une a CD20, útil en linfoma) y Tositumomab (se une a CD20). Este último

tiene la característica de poseer iodo radiactivo, el cual selectivamente elimina células B del sistema inmune ya sean sanas o cancerosas.<sup>[32b]</sup>

Los anticuerpos monoclonales también se han utilizado para inhibir la actividad de cinasas relacionadas con el cáncer, sin embargo de acuerdo a la experiencia terapéutica, siempre es preferible el uso de moléculas pequeñas para tratar la enfermedad.

Los primeros compuestos reportados como inhibidores de cinasas, no relacionados estructuralmente con el ATP, fueron descubiertos al modificar antagonistas de la calmodulina, pertenecientes al grupo de las naftalenosulfonamidas, por medio del reemplazo del núcleo naftaleno por una isoquinolina.<sup>[58]</sup> Los compuestos así obtenidos fueron inhibidores de cinasas dependientes de nucleótidos cíclicos y de la proteína cinasa C, los cuales mostraron permeabilidad celular adecuada, afectando el crecimiento celular y la relajación vascular.<sup>[58]</sup> Un derivado de estos compuestos conocido como Fasudil o AT-877 (Figura 2.7), fue aprobado en Japón para el tratamiento del vasoespasma cerebral y estudios clínicos demostraron que es confiable, seguro de usar y efectivo.<sup>[59]</sup>

Otros compuestos con actividad inhibitoria de cinasas han sido descritos. Sin embargo, debido a que la mayoría mostraron actividad inhibitoria promiscua con diversos tipos de cinasas, llevó a pensar que era poco factible sintetizar inhibidores selectivos que sirvan únicamente contra una enzima cinasa específica, ya que la mayoría actúa en el sitio de unión al ATP, el cual se encuentra altamente conservado en la evolución. Un evento importante fue la identificación de los blancos moleculares de la ciclosporina y de FK506 los cuales son fármacos inmunosupresores. La unión de los fármacos a calcineurina o a FKBP causa la inactivación de la calmodulina, lo cual tiene como consecuencia la inhibición de factores de transcripción en las células T. La Rapamicina, que fue el primer agente citostático en ser identificado, también se une a la proteína FKBP. Sin embargo, esta unión no tiene como consecuencia la inactivación de la calmodulina, sino de la proteína cinasa mTor. De esta manera la rapamicina fue el primer fármaco en ser aprobado para su uso clínico que al parecer inhibe exclusivamente a una sola cinasa.<sup>[60]</sup>

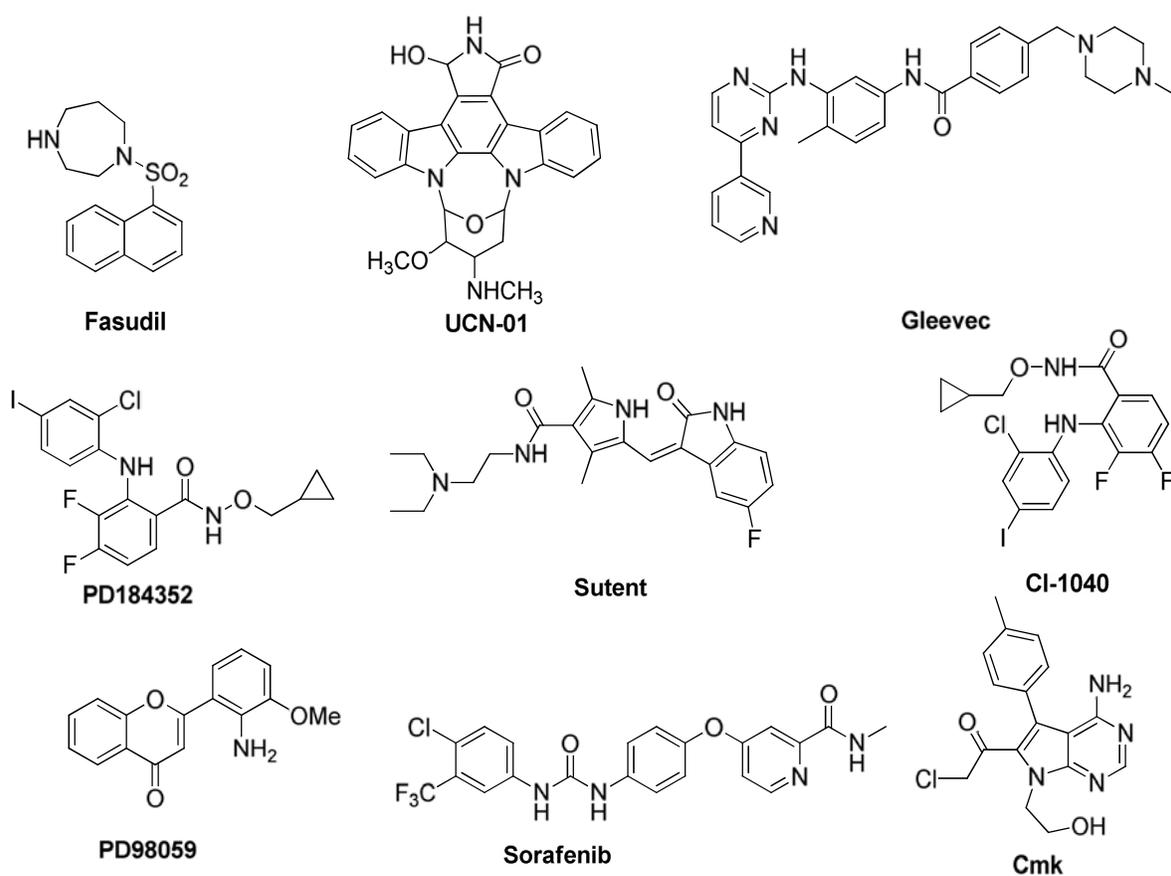
Por medio de un ensayo aleatorio, se encontró que derivados de 2-fenilaminopirimidina se comportaban como inhibidores de la proteína cinasa C. Este

arreglo estructural por ser geoméricamente plano ocupa el lugar de unión del ATP en la proteína, previniendo la transferencia de fosfato al sustrato de la enzima. Los estudios sintéticos de derivados de 2-fenilaminopirimidina condujeron a la obtención del fármaco Gleevec<sup>[41, 61]</sup> (Figura 2.7), el cual resultó ser un inhibidor de la cinasa de residuos de tirosina ABL, que se encuentra sobreexpresada en la leucemia mieloide crónica. Este fármaco fue tan prometedor en sus fases clínicas que fue aprobado por la FDA en un tiempo muy corto. Gleevec también inhibe a las cinasas c-kit y PDFR, lo cual lo hace muy eficiente para ciertos tipos de cáncer sólidos (tumor estromal gastrointestinal, dermatofibrosarcoma) y otras leucemias (leucemia mielomonocítica crónica). El éxito obtenido con Gleevec demuestra que ciertos tipos de cáncer son muy dependientes de la activación de una sola cinasa de manera que pueden ser atacados selectivamente.<sup>[41]</sup>

Al fenómeno de dependencia de un tumor por la actividad de cinasas se ha llamado “adicción a cinasas o dependencia a cinasas”. Otras cinasas conocidas como generadoras de tumores cuando se encuentran mutadas son B-Raf en melanomas; el receptor de Flt3 en leucemias, PI3K en distintos tumores, RET en cáncer de tiroides y mutaciones de los genes de la angiogénesis KDR<sup>[41]</sup>, las cuales pueden ser explotadas para tratar estas enfermedades.

De acuerdo a su modo de unión a la cinasa los inhibidores de cinasas de bajo peso molecular se clasifican en cuatro tipos<sup>[40]</sup> (Figura 2.7):

- i. Inhibidores de tipo I. Estos constituyen la mayor parte de los inhibidores competitivos del ATP y reconocen la conformación activa de la cinasa.
- ii. Inhibidores de tipo II. Reconocen la conformación inactiva de la cinasa.
- iii. Inhibidores alostéricos. Se unen en otros sitios de la cinasa diferentes al sitio de unión del ATP, modulando la actividad de estas enzimas. Los inhibidores de esta categoría exhiben los más altos grados de selectividad.
- iv. Inhibidores covalentes. Se unen covalentemente al sitio activo de las cinasas por medio de un residuo de cisteína nucleofílico. Se ha descrito que hay aproximadamente 200 cinasas con un residuo de cisteína cerca de la unión del ATP.



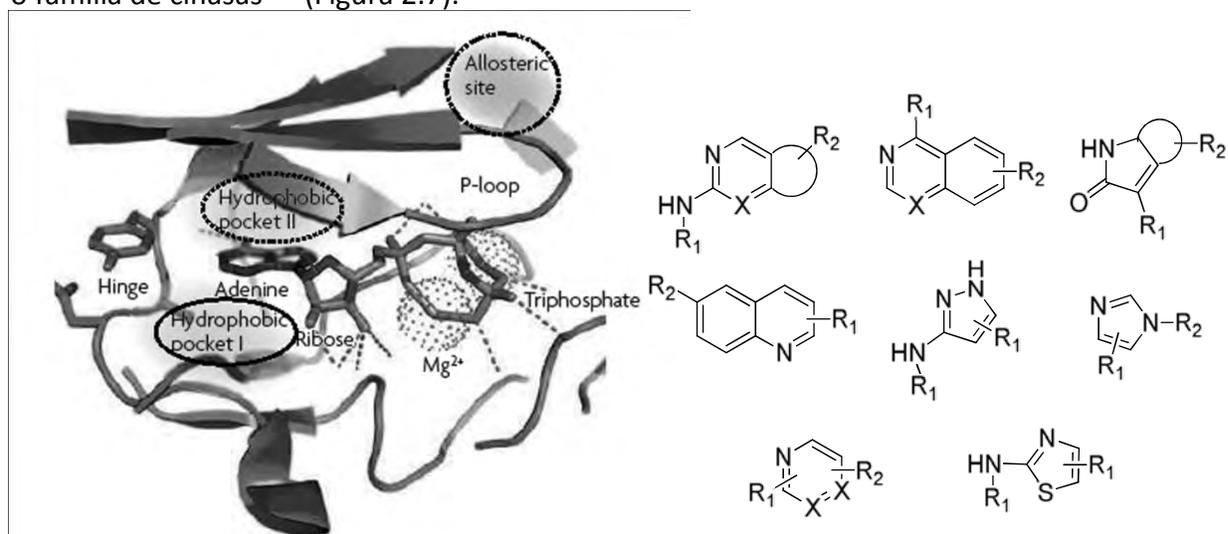
**Figura 2.7. Inhibidores diversos de cinasas.** Fasudil es inhibidor de la proteína cinasa C; UCN-01 es inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas y modulador de la actividad de otras cinasas; Gleevec inhibe a ABL, c-Kit y PDFR; PD184352 y PD98059 inhibe a la MAPK cinasa 1; Sutent inhibe a KIT, PDGFR y VEGFR. Los compuestos anteriores son inhibidores de cinasas de tipo I. Sorafenib inhibe a KIT, PDGFR, BRAF y VEGFR2 estabilizando sus formas inactivas (Inhibidor de tipo II). CI-1040 es un inhibidor alostérico de MEK1 (Inhibidor tipo III). Cmk se une covalentemente a RSK1, RSK2 y RSK3 en el sitio de unión a ATP (inhibidor tipo IV).

Los inhibidores del tipo I consisten principalmente de anillos heterocíclicos, que reconocen al sitio de unión de la purina del ATP, que sirven como anclaje para las cadenas laterales que ocupan las regiones hidrofóbicas I y II (Figura 2.8).<sup>[40]</sup>

Tradicionalmente, el objetivo principal de los estudios de fase I en oncología es determinar la dosis máxima tolerada, suponiendo que a dosis más altas es probable obtener una mejor actividad antitumoral. Dado que el objetivo de los inhibidores de cinasas es inhibir una vía metabólica o de señalización, es probable que la dosis necesaria para inhibir eficientemente a la enzima se encuentre por debajo de los valores de la dosis máxima tolerada.

Es importante considerar que dentro de la toxicidad generada por estos compuestos será necesario distinguir de aquella ocasionada por la inhibición de la cinasa objetivo (*on-target*) de aquella ocasionada por la inhibición de cinasas no objetivo (*off-target*). Como estos compuestos están diseñados para unirse al sitio de unión del ATP, es probable que al aumentar la concentración de fármaco en sangre el compuesto se una a una o más cinasas no objetivo. Obviamente, entre menor sea la especificidad de un inhibidor será más difícil predecir cuál enzima es la causante de los efectos tóxicos y complicará la selección de la dosis óptima a la cual se llevará a cabo la inhibición máxima de la vía metabólica o de señalización deseada.

Estudios de selectividad de varios compuestos efectuados en un panel amplio de cinasas, han mostrado que se ha logrado sintetizar compuestos activos contra una cinasa o familia de cinasas<sup>[62]</sup> (Figura 2.7).



**Figura 2.8.** El sitio de unión a ATP de la cinasa AKT1 acompañado con ATP (Protein Data Bank ID 106L). Se muestran las regiones de unión clave entre la cinasa y el ATP, los puentes de hidrogeno se indican utilizando líneas punteadas. A la derecha se muestran algunos de los heterociclos más comunes en los inhibidores de cinasas (X = C, N). Modificado de la referencia [40].

Los inhibidores de cinasas no sólo pueden ser utilizados como agentes farmacológicos. Por ejemplo, el compuesto PD98059 (Figura 2.7), que es un inhibidor alostérico de la MAPK cinasa 1, previene la activación de esta enzima por parte de RAF y revierte el fenotipo causado por RAS mutado en líneas celulares.<sup>[63]</sup> Un derivado del PD98059, es el PD184352 (Figura 2.7), el cual inhibió el crecimiento de células de cáncer de colon humano en ratones y aún después de varios meses de tratamiento no

presentaron efectos tóxicos severos.<sup>[64]</sup> Este resultado ha sorprendido a la comunidad científica pues la vía de las MAP cinasas ha sido involucrada en muchos procesos celulares importantes y no se han encontrado formas mutantes con pérdida de función de estas enzimas. Para explicar la falta de toxicidad de PD184352 se ha formulado la hipótesis en la cual el papel central de la cascada de las MAP cinasas en la diferenciación y proliferación celular es necesario solamente durante la embriogénesis y que en animales adultos su participación es de menor importancia de lo que se suponía hace algunos años;<sup>[60]</sup> lo que hace a estos compuestos herramientas útiles en la investigación bioquímica.

### **2.3.2.1. Inhibidores de CDKs**

Las CDKs, como se menciona en la sección 2.3.1.1, tienen participaciones esenciales en la regulación del ciclo celular, lo cual ha incrementado el interés en desarrollar métodos sintéticos que lleven a la obtención de compuestos que actúen como inhibidores de estas enzimas y que permitan detener el crecimiento celular. Es importante comprender que la actividad de las CDKs en enfermedades proliferativas se encuentra incrementada y sus inhibidores se encuentran inactivados.<sup>[65]</sup>

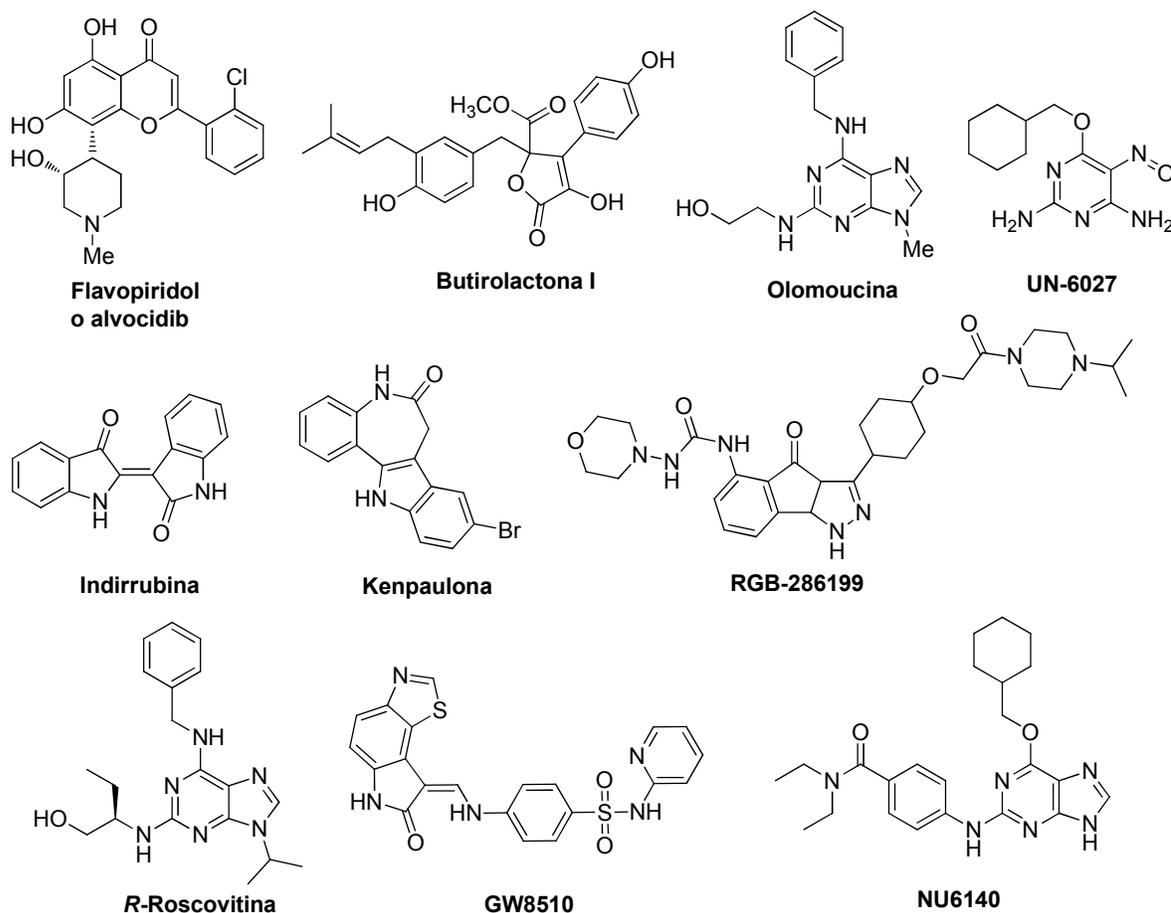
Se han caracterizado diferentes clases de inhibidores de CDKs que incluyen compuestos basados en el anillo de purina, alcaloides, derivados de butirolactona, flavonoides, derivados de urea y paullonas<sup>[66]</sup> (Figura 2.9). Estos compuestos son variados con respecto a su estructura química (Figura 2.9), sin embargo comparten las siguientes características:

- i. Poseen peso molecular bajo (<600)
- ii. Su estructura incluye heterociclos planos e hidrofóbicos
- iii. Compiten con el ATP por el sitio de unión de ATP en la CDK
- iv. Se unen con las cinasas principalmente por puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas.

Estas características han sido confirmadas por varios estudios.<sup>[67]</sup>

En los últimos años ha habido una búsqueda intensiva de moléculas de bajo peso molecular que actúen como inhibidoras de CDKs, y a la fecha, ningún fármaco con este mecanismo de acción ha sido todavía aprobado para su uso clínico. No obstante, al buscar

agentes antineoplásicos aislados de plantas utilizadas en la medicina tradicional China, se encontró que el compuesto Indirrubina (Figura 2.9), presente en una mezcla de 11 hierbas utilizada en casos de leucemia, demostró que su mecanismo de acción está basada en la unión al sitio del ATP de la CDK2, y se asume que los inhibidores de CDKs están en uso desde hace bastantes años.<sup>[68]</sup>



**Figura 2.9. Compuestos inhibidores de CDKs.**

Los compuestos de primera generación, tales como Flavopiridol, Olomoucina y R-Roscovitina (Figura 2.9), no cumplieron con las expectativas necesarias para convertirse en fármacos útiles, ya que al llegar a las fases preclínicas, exhiben baja efectividad y efectos secundarios adversos.<sup>[69]</sup> Este fracaso se puede explicar por problemas de farmacocinética, posología o bien por la unión a blancos moleculares no identificados en los estudios iniciales.<sup>[69c, 69d, 70]</sup> Sin embargo, el Flavopiridol ha sido utilizado exitosamente para tratar la leucemia linfocítica crónica refractaria utilizando un esquema de

administración adecuado. El Flavopiridol se une de manera diferente a las proteínas séricas humanas que a las bovinas, lo que ocasiona un aumento de la  $CI_{50}$  obtenida después de 24 horas de tratamiento de 120 a 470 nM en células CLL. Con la dosis administrada corregida y empleando una posología apropiada el 45 % de los pacientes obtuvieron un tiempo de respuesta medio mayor a 12 meses.<sup>[71]</sup>

Por otro lado, los inhibidores de CDKs incrementan la actividad para producir apoptosis provocada por otros compuestos citotóxicos y por la radiación ionizante.<sup>[72]</sup> Estudios clínicos de fase I en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) establecieron un intervalo de concentraciones seguras de flavopiridol que al ser combinadas con Taxol y carboplatino lograron una respuesta parcial y en algunos pacientes la enfermedad se estabilizó.<sup>[73]</sup>

El aumento del efecto de fármacos citotóxicos tradicionales después del tratamiento con inhibidores de CDKs está relacionado con la inhibición de proteínas antiapoptóticas. El inhibidor de CDKs análogo de purinas NU6140 (Figura 2.9), incrementó la citotoxicidad causada por el Taxol en células HeLa de carcinoma cervical y en células OAW42/e. El aumento de la toxicidad se correlacionó con la inactivación de la proteína survivina, tanto en su expresión como en su activación por fosforilación. Las células OAW42/Surv, que expresan ectópicamente survivina en gran cantidad, son resistentes al tratamiento combinado con NU6140 y Taxol.<sup>[72c]</sup> Un inhibidor relativamente selectivo de la CDK2, GW8510 (Figura 2.9), suprimió el crecimiento *in vitro* de seis líneas celulares derivadas de cáncer de pulmón NSCLC y sin embargo fue inocuo en fibroblastos humanos normales. El compuesto GW8510 causó la regulación a la baja de la proteína antiapoptótica XIAP a nivel transcripcional, sin afectar los niveles de expresión de Bax, Bak o Bcl2.<sup>[74]</sup>

Numerosos inhibidores de CDKs causan un bloqueo del ciclo celular y la inducción de apoptosis en líneas celulares. El mecanismo por el cual inducen la muerte celular ha sido motivo de controversia, pues sólo se espera un efecto citostático. Una explicación de este fenómeno, es la supresión de la expresión de proteínas antiapoptóticas, y/o de la proteína Mcl-1 vía inhibición de la CDK7 y/o CDK9. Una propuesta es que las células transformadas pueden ser particularmente sensibles a la interrupción en la síntesis y recambio de

proteínas antiapoptóticas.<sup>[75]</sup> Por otro lado, la citotoxicidad de flavopiridol y *R*-roscovitina se ha atribuido a la disminución de los niveles tanto de XIAP y Mcl-1, debido a la inhibición de CDKs necesarias para la transcripción.<sup>[76]</sup> El tratamiento por 24 horas con inhibidores de la CDK2 o de las CDK7 ó 9, inhibiendo previamente de manera farmacológica la apoptosis, eliminó permanentemente la capacidad de proliferación de las células, aun cuando se retire el fármaco del medio de cultivo. El tratamiento dado a las células con el inhibidor de CDK2 redujo los niveles de XIAP y Mcl-1; sin embargo, inhibir sólo la síntesis de estas proteínas en las células usadas en este estudio mediante RNA de interferencia no fue suficiente para causar apoptosis. Estos datos indican que el mecanismo que causa la muerte celular puede ser modelo dependiente.<sup>[77]</sup>

Los compuestos inhibidores de CDKs de segunda generación son en general más selectivos hacia una CDK mostrando mejores propiedades farmacocinéticas. Pueden ser divididos en tres clases diferentes:<sup>[78]</sup>

- i. Compuestos inhibidores de una amplia variedad de CDKs.
- ii. Compuestos con actividad preferencial sobre CDK4, CDK6 ó CDK2.
- iii. Compuestos con actividad tanto en CDKs como con otras cinasas útiles para tratar el cáncer.

Estudios genéticos han suministrado evidencia que las CDKs de interfase son complementarias entre ellas, de manera que si alguna falta, las demás pueden compensar la actividad de la ausente y el ciclo celular se lleva a cabo a pesar de la carencia de estos reguladores. Los ratones *knockout* para CDK2, CDK4 o CDK6 son viables y presentan pocas anomalías de tejidos específicos. Aún los ratones que les falta CDK6 y CDK2, CDK4 y CDK6 ó CDK4 y CDK2 son viables desarrollándose hasta etapas avanzadas de la embriogénesis y mueren por causa de anomalías muy específicas.<sup>[79]</sup> Por otro lado, cada CDK tiene un papel concreto en células especializadas que no puede ser compensado por las otras.<sup>[79]</sup> Esta información sugiere que alguna toxicidad se esperará de estos compuestos.

Numerosos reportes indican que las CDKs no sólo regulan el ciclo celular en las células cancerosas, sino que en algunos casos son vitales para su desarrollo y supervivencia. Los

ratones a los que les falta la ciclina D1 son resistentes a la formación de tumores de mama causados por el oncogén ErbB-2. La cruce de animales CDK4<sup>-/-</sup> con ratones MMTV-ErbB-2 y MMTV-Hras (propensos al cáncer de mama) protegió a las crías contra este cáncer.<sup>[80]</sup> Cabe aclarar, que los ratones CDK4<sup>-/-</sup> desarrollan mamas normales, indicando que la CDK4 sólo es indispensable para el proceso de tumorigénesis pero no para el desarrollo.<sup>[80b]</sup> Por otro lado, la CDK2 no es necesaria para el crecimiento de tumores de colón y algunos tumores de otro tipo.<sup>[81]</sup> La inhibición de CDK4 y 6 en líneas celulares positivas para Rb tiene gran repercusión en su crecimiento.<sup>[81]</sup> Las células de melanoma requieren a la CDK2 para proliferar, ya que si se inhibe la síntesis de esta cinasa con RNA de interferencia la capacidad de proliferación se pierde.<sup>[82]</sup> El uso de péptidos que inhiben la unión de CDK2/CycA y CDK2/CycE con sus sustratos tiene como consecuencia la apoptosis de células tumorales, pero no afecta a sus contrapartes no tumorales.<sup>[83]</sup>

La pérdida de la función de CDK1, que es mitótica, no es compatible con la vida, hecho comprobado en ratones *knockout*. Por lo tanto la inhibición de CDK1 podría tener como consecuencia una alta toxicidad. Sin embargo, la inhibición de CDK1 tiene actividad terapéutica relevante en células transformadas por MYC, pero no por otros oncogenes.<sup>[84]</sup> De estos resultados se observa que el uso de los inhibidores de CDKs dependerá en gran medida del contexto genético y anatómico del cáncer a tratar, así como de las vías de señalización activas en este.

El uso de los inhibidores de CDK no sólo estaría circunscrito al tratamiento del cáncer. Por ejemplo, la administración de *R*-Roscovitina impide la aparición de glomerulonefritis, enfermedad autoinmune que se caracteriza por proliferación celular incontrolada de células mesangiales, en ratones genéticamente susceptibles a esta enfermedad.<sup>[85]</sup> La *R*-Roscovitina también promueve la resolución de la inflamación en ratones con pleuritis inducida con carragenano, daño en pulmón inducido con bleomicina y en artritis inducida; los inhibidores de CDKs causan apoptosis en las células inflamatorias por disminución de los niveles de Mcl-1, por lo que podrían ser usados también como antiinflamatorios potenciales.<sup>[86]</sup> La CDK5 está implicada también en la regulación del dolor, indicando que la modulación farmacéutica de esta enzima podría tener ventajas

analgésicas.<sup>[56, 87]</sup> La CDK5 también está implicada en la muerte neuronal por apoptosis que se presenta en enfermedades neurodegenerativas, tal como Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica e infarto. Algunos inhibidores de CDKs han presentado resultados prometedores como agentes neuroprotectores.<sup>[88]</sup> Por ejemplo, la administración de inhibidores pan-CDK atenuó la pérdida de neuronas dopaminérgicas en ratones predispuestos a la enfermedad de Parkinson.<sup>[89]</sup> También se ha propuesto su uso para tratar enfermedades virales causadas por VIH, citomegalovirus, virus varicela-zoster, virus del papiloma humano y otros.<sup>[90]</sup> Hasta ahora no se ha podido aislar una cepa de VIH resistente a inhibidores de CDKs y el bloqueo en la replicación viral está relacionado con la inhibición de la CDK9.<sup>[90]</sup>

El flavopiridol interfiere con los procesos celulares clave de la replicación viral sin afectar la activación de células T.<sup>[91]</sup>

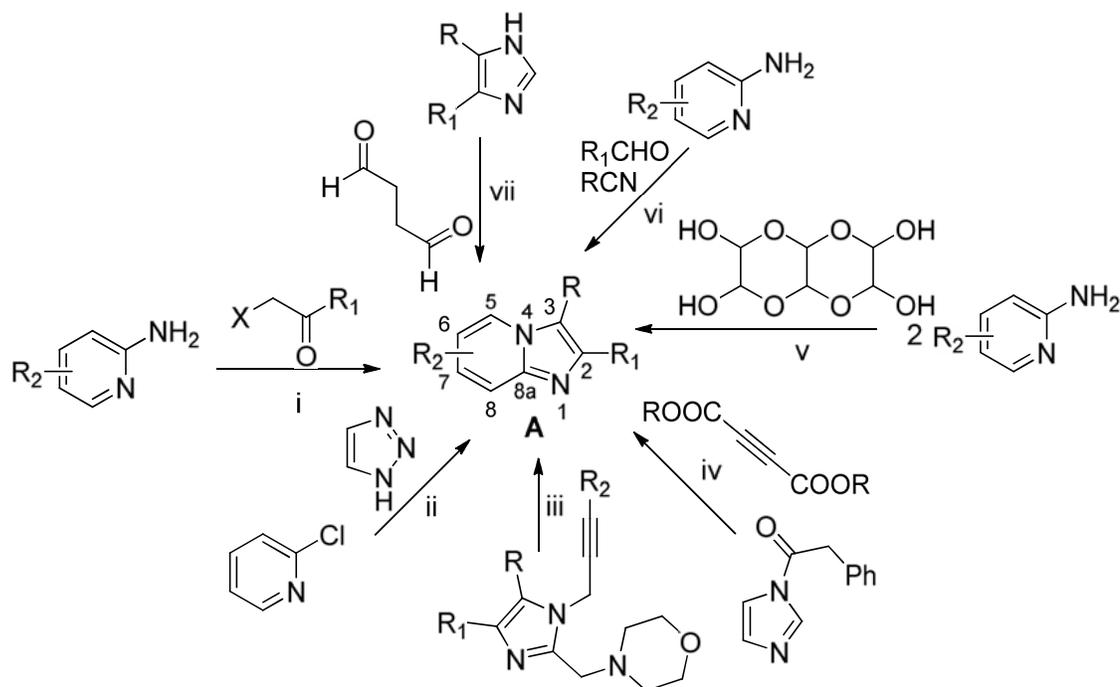
### **2.3.2.2. Imidazo[1,2-a]piridina**

La estructura química de imidazo[1,2-*a*]piridina consiste en un sistema bicíclico con un átomo de nitrógeno como cabeza de puente (Esquema 2.1) y el interés por compuestos de este tipo ha aumentado debido a la gran diversidad de propiedades farmacológicas asociadas a este sistema. Actividades relevantes tales como: hipnótico<sup>[92]</sup>, antiviral<sup>[93]</sup>, antiparasitario<sup>[94]</sup> e inhibidor de la bomba de protones<sup>[95]</sup>. También otros derivados con este tipo de estructura han mostrado ser inhibidores de algunas cinasas; por ejemplo, IRK-4<sup>[96]</sup>, GSK<sup>[97]</sup> y MAPK/ERK<sup>[98]</sup> (Figura 2.10). De lo anteriormente descrito podemos señalar que las imidazo[1,2-*a*]piridinas poseen un amplio espectro de actividades biológicas, las cuales dependen del patrón de sustitución de la molécula, por lo que se le puede considerar como una estructura versátil y privilegiada en el campo de la química medicinal.

Los métodos de síntesis de esta molécula por lo general parten de la 2-aminopiridina, sin embargo, otros métodos diversos también han sido utilizados<sup>[99]</sup> (Esquema 2.1).

El compuesto conocido como Gleevec es un fármaco obtenido a partir de la optimización farmacéutica del anillo de 2-fenilaminopirimidina. Modificaciones

posteriores de este núcleo permitieron descubrir que la sustitución en la posición cuatro del anillo de pirimidina con un anillo de 2-metilimidazo[1,2-*a*]piridin-3-ilo genera compuestos con actividad inhibitoria selectiva de la CDK2.<sup>[100]</sup> Como inhibidores de CDKs se han descrito preferentemente dos núcleos de imidazo[1,2-*a*]piridina: los derivados de 2-aminoimidazo[1,2-*a*]piridinas y de 3-(2-aminopirimidin-4-il)imidazo[1,2-*a*]piridinas (F, I Figura 2. 10).

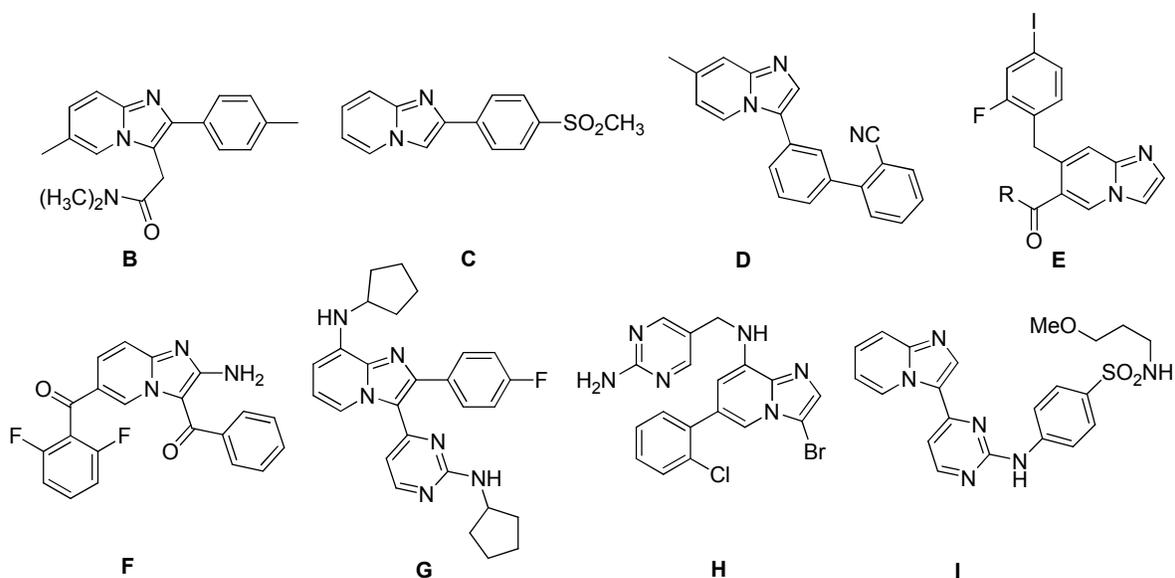


**Esquema 2.1. Estructura, numeración y algunos métodos de síntesis del anillo de imidazo[1,2-*a*]piridina (A).** Los métodos de síntesis del anillo de imidazo[1,2-*a*]piridina incluyen i) la condensación de 2-aminopiridina con compuestos  $\alpha$ -halocarbonilos; ii) por reacción de 2-cloropiridina con triazoles; iii) ciclación de 1-(2-alquil)2-aminometilimidazoles; iv) reacción de (arilacetil)imidazoles con ésteres acetilendicarboxílicos; v) condensación de 2-aminopiridinas con trimeros dihidratados de glicoxal; vi) condensación de aldehídos o isonitrilos con 2-aminopiridinas y vii) condensación de imidazoles con compuestos 1,4-dicarbonílicos. Modificado de la referencia [101].

Los derivados de 3-(2-aminopirimidin-4-il)-2-metilimidazo[1,2-*a*]piridina interactúan con la CDK2 formando puentes de hidrógeno entre el N1 de la pirimidina y el NH del residuo Leu83. También participa el grupo 2-amino de la pirimidina con el carbonilo de Leu83. Por otro lado, el N1 del anillo de imidazo[1,2-*a*]piridina también forma puentes de hidrógeno con el NH de un residuo de Lys33.<sup>[100a]</sup> La remoción del grupo metilo en posición dos causó un aumento en la actividad sobre la CDK2. Entre los datos más relevantes colectados de la relación estructura actividad, se puede destacar que el

requisito más importante para inhibir a la CDK2 es la presencia del motivo hidrofóbico fenilamino localizado en el anillo de pirimidina.<sup>[100b]</sup>

El compuesto AZ703 (I, Figura 2.10) induce apoptosis en células MCF7 de cáncer de mama. Cuando se realiza un tratamiento previo con el antiestrógeno ICI-182780, para reducir la capacidad de proliferación de MCF7, tiene como consecuencia un aumento de la  $Cl_{50}$  de AZ703 en esta línea celular, indicando que estos compuestos son más activos en células proliferativas. Los efectos en el ciclo celular dependen del estado de las células. En células asincrónicas AZ703 causa un arresto en la fase G2/M. En células sincrónicas el arresto ocurre en la fase G1/G0.<sup>[102]</sup> La apoptosis causada por AZ703 se asoció a la presencia de actividad del factor de transcripción E2F-1 durante la fase S del ciclo celular, el cual normalmente debe estar inactivo durante esta fase, debido a la inactivación de la CDK9.<sup>[103]</sup>



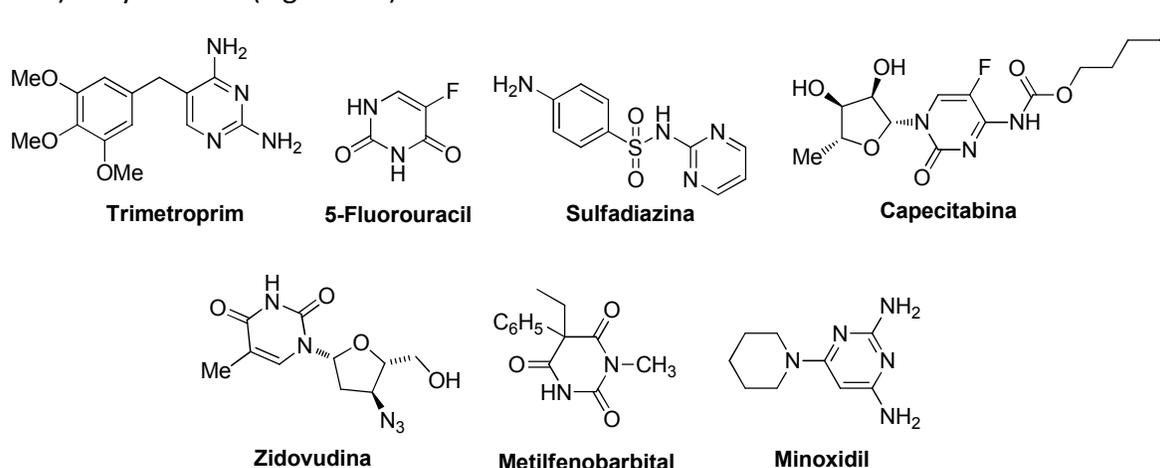
**Figura 2.10. Derivados de imidazo[1,2-a]piridina con actividad farmacológica. B,** Zolpidem, un ansiolítico; **C,** Zolimidin inhibe a la bomba de protones; **D,** ligando del receptor GABA<sub>A</sub>; **E,** inhibidor de MAPK/ERK cinasa; **F,** inhibidor de CDKs; **G,** antiviral contra el virus de herpes simple 1; **H,** Inhibidor de la CDK2; **I,** AZ703 inhibidor de CDK1, CDK2, CDK7 y CDK9.

La investigación de grupos bioisostéricos del anillo de imidazo[1,2-a]piridina ha sido escasa. Uno de los posibles bioisómeros de este anillo es el anillo de quinolina. La sustitución bioisostérica del anillo de 2-metilamino[1,2-a]piridina por un anillo de

quinolina se llevó a cabo satisfactoriamente en la síntesis de antagonistas dirigidos al receptor de bradicinina B<sub>2</sub>.<sup>[104]</sup>

### 2.3.2.3. Pirimidinas

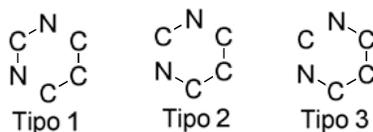
Los azaheterociclos, especialmente las pirimidinas, constituyen una clase de compuestos que se encuentran presentes en una gran variedad de productos naturales.<sup>[105]</sup> Algunos ejemplos de sus usos farmacéuticos engloban actividades como antivirales, antibióticos, antitumorales, antiepilépticos e hipotensores. Las pirimidinas han brindado una cantidad considerable de medicamentos, incluyendo moléculas importantes como Trimetropim, 5-Fluorouracil, Sulfadiazina, Capecitabina, Zidovudina, Metilfenobarbital, Minoxidil (Figura 2.11)<sup>[106]</sup> y Gleevec (Figura 2.7).<sup>[61]</sup>



**Figura 2.11. Medicamentos que contienen anillos de pirimidina en su estructura.** Trimetropim, un antibiótico; 5-Fluorouracil, un antitumoral; Sulfadiazina, un antibiótico; Capecitabina, un profármaco del 5-Fluorouracil; Zidovudina, antiviral útil en el tratamiento del VIH; Metilfenobarbital, un antiepiléptico; Minoxidil, un hipotensor.

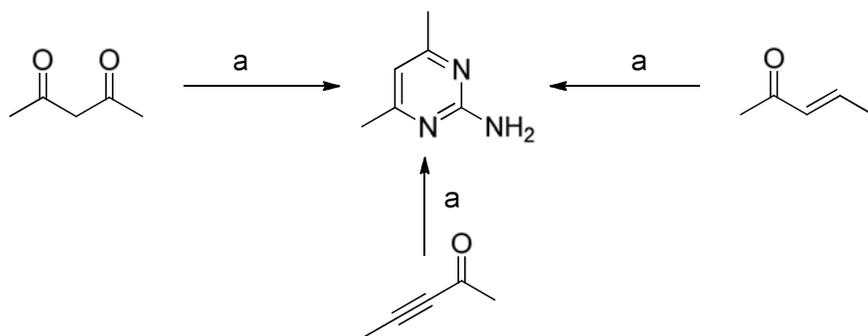
La gran variedad de actividades farmacológicas de éste núcleo han propiciado el desarrollo de un gran número de estrategias sintéticas que han sido revisadas extensivamente.<sup>[107]</sup>

En general, son tres los métodos generales de síntesis de éste anillo (Esquema 2.2).



**Esquema 2.2. Diferentes tipos de síntesis de pirimidinas.**

La mayoría de las metodologías sintéticas utilizan fragmentos N-C-N; generalmente derivados de la urea y amidinas, que se condensan con compuestos 1,3-dicarbonílicos (Tipo I). Los nitrilos han sido utilizados como fuentes de C-N, un derivado importante en la síntesis de pirimidinas es la cianamida (fragmento N-C-N). La ciclación generalmente envuelve una condensación doble con eliminación de agua, alcohol, amins o haluro de hidrogeno entre grupos amino y grupos carbonilo, ácidos carboxílicos, ésteres, cloruros de ácido, éteres de enol o enaminonas. La reacción puede ocurrir también por la adición de amino a grupos nitrilo o a enlaces dobles polarizados sin que haya una eliminación. Las 2-aminopirimidinas se sintetizan utilizando guanidina o 2 equivalentes de cianamida (Esquema 2.3.).<sup>[105, 107]</sup>



**Esquema 2.3. Síntesis de 2-aminopirimidinas.** La reacción procede con compuestos 1,3-dicarbonílicos o mediante dobles o triples enlaces polarizados. a. guanidina ( $\text{NH}_2(\text{C}=\text{NH})\text{NH}_2$ ) o 2 moles de cianamida ( $\text{H}_2\text{N-CN}$ ).

En el método sintético del tipo 2 se utilizan aminometilidenos como fragmento C-N y en el método tipo 3 se emplean 1,3-diaminas que pueden ser ciclocondensadas con carbonato de dietilo, fosgeno o aldehídos.<sup>[107]</sup> Comúnmente, todos los métodos sintéticos actuales son variantes de estos tres métodos.

Los anillos de diazina (pirimidinas, piridazinas, piridazinonas, pirazinas, quinazolininas, quinoxalininas) son elementos estructurales ampliamente utilizados como parte estructural de inhibidores de CDKs. De las patentes relacionadas con inhibidores de CDKs hasta el 2009, el 13.5% incluyen éstos tipos de estructuras.<sup>[108]</sup>

## 2.4. Reacciones de *N*-arilación catalizadas con paladio.

Las reacciones de sustitución nucleofílica aromática para la síntesis de derivados *N*-arilados es de muy corto alcance y sólo aplicable en el caso de anillos aromáticos con grupos electroattractores. El acoplamiento de un compuesto que contiene un grupo N-H con haluros de arilo mediado por cobre o catalizados por cobre ha permitido esta transformación<sup>[109]</sup>. Sin embargo, el uso de altas temperaturas y el requerimiento de un exceso del haluro de arilo son incompatibles con muchos sustratos, limitando notablemente la versatilidad de la reacción.

El acoplamiento catalizado por paladio para la formación de enlaces C-N es una metodología atractiva para formar enlaces entre aminas y haluros o ésteres de ácido sulfónico aromáticos. Un aspecto importante de esta metodología es la formación de enlaces C-N utilizando aminas, amidas, urea, carbamatos, sulfoximas, guanidinas, etc.<sup>[110]</sup>

La reacción de *N*-arilación catalizada por paladio (reacción de Buchwald-Hartwig) requiere un sistema de cuatro componentes para formar de manera eficiente el enlace C-N. Un precursor de paladio se estabiliza en un disolvente adecuado utilizando un ligando apropiado que aumenta la densidad electrónica en el metal para facilitar la adición oxidativa y provee suficiente impedimento estérico para acelerar la eliminación reductiva. También se requiere una base para desprotonar la amina utilizada antes o después de la coordinación con el paladio. Debido a la naturaleza usualmente heterogénea de la reacción, debido a la solubilidad de la base o de los sustratos, el solvente juega un papel importantísimo en la *N*-arilación, más que en otras reacciones de acoplamiento.<sup>[110]</sup>

Una de las áreas de mayor avance de esta reacción es el desarrollo de ligantes con mayor reactividad y selectividad. Muchos de los ligantes más exitosos para la *N*-arilación son los derivados de fosfinas monodentadas sustituidas con anillos bifenílicos. Estos ligantes aumentan notablemente el alcance de la reacción permitiendo usar cloruros de arilo y haluros de arilo inactivados, aún en condiciones suaves de reacción<sup>[111]</sup>

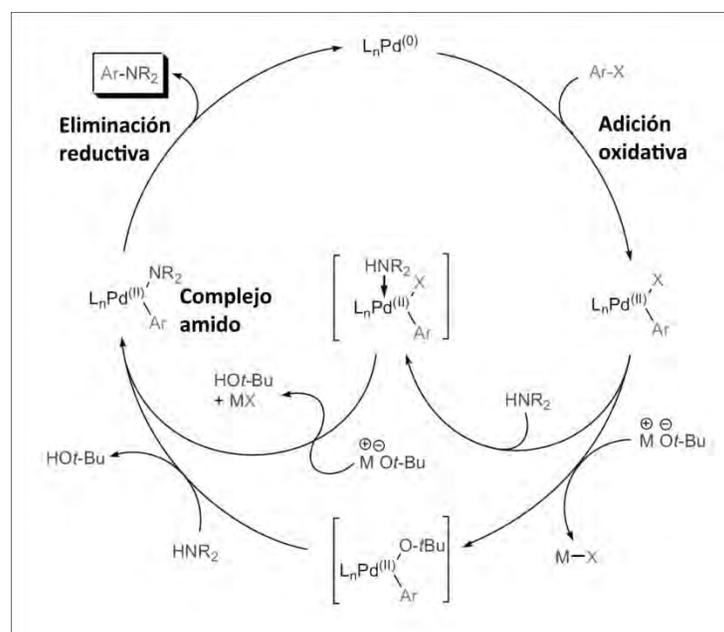
Usualmente como fuente de paladio se utilizan precursores de Pd(0) o Pd(II). El Pd(II) debe ser reducido *in situ* al estado elemental para que pueda ejercer su función

catalítica; generalmente esto se logra agregando una fosfina, hidruros metálicos, CO, alquenos o compuestos organometálicos.<sup>[112]</sup>

La base utilizada para el acoplamiento debe ser elegida con cuidado, ya que la mayoría de las reacciones secundarias se deben a ésta.

La mayoría de las reacciones reportadas se han realizado utilizando tolueno como disolvente.<sup>[110-111, 113]</sup> Los solventes generalmente tienen que secarse y desgasificarse para que la reacción se lleve a cabo; pero esto depende en gran medida de la sensibilidad al aire del sistema catalítico utilizado. En casos especiales, cuando la fosfina utilizada como ligante es ligeramente sensible al aire, la reacción puede realizarse en presencia de oxígeno.<sup>[114]</sup>

Esta reacción ha mostrado gran versatilidad y ha sido utilizada en la síntesis total de productos naturales y análogos de éstos, aminas aromáticas, heterociclos, de nuevos ligantes e inclusive en la síntesis de polímeros, confirmándose como un método robusto y confiable; que ha sido utilizado también a escala industrial.<sup>[113]</sup> El mecanismo de la reacción de Buchwald-Hartwig se muestra en el Esquema 2.4.

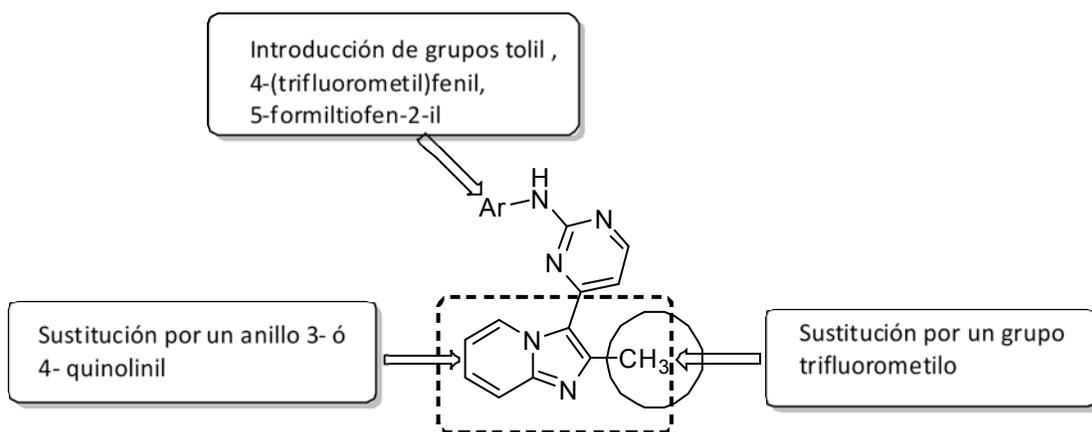


**Esquema 2.4. Mecanismo propuesto para el acoplamiento C-N catalizado por paladio.** En general se admite que no hay un mecanismo de reacción universal para esta reacción, sino que hay múltiples vías que dependen de la fosfina y de los sustratos utilizados. El mecanismo generalmente aceptado consiste de dos vías posibles, dependiendo si la base utilizada se coordina o no con el metal. Las tres partes principales del ciclo catalítico son: adición oxidativa, formación del complejo amido y eliminación reductiva. Esquema modificado de la referencia [115].

### 3. Hipótesis y objetivos

#### 3.1. Hipótesis

Los derivados de 2-metilimidazo[1,2-*a*]piridina sustituidos en posición 3 con un anillo de 2-aminopirimidin-4-ilo han demostrado ser inhibidores de las CDKs.<sup>[100a]</sup> Por otro lado, se sabe que el reemplazo de átomos de hidrogeno por flúor no siempre afecta la actividad de varios compuestos con actividad farmacéutica definida. Por otro lado, se ha descrito que un bioisótero del anillo de 2-metilimidazo[1,2-*a*]piridina es el anillo de quinolina, como ocurre cuando se sintetizaron compuestos antagonistas no peptídicos para el receptor de bradicinina.<sup>[104]</sup> El remplazo bioisostérico es dependiente del blanco proteínico sobre el que se aplique y en algunos casos no funciona. Por lo tanto, basándose en los argumentos anteriores se propusieron las siguientes modificaciones:



Tomando en cuenta lo anterior, se plantea la siguiente hipótesis:

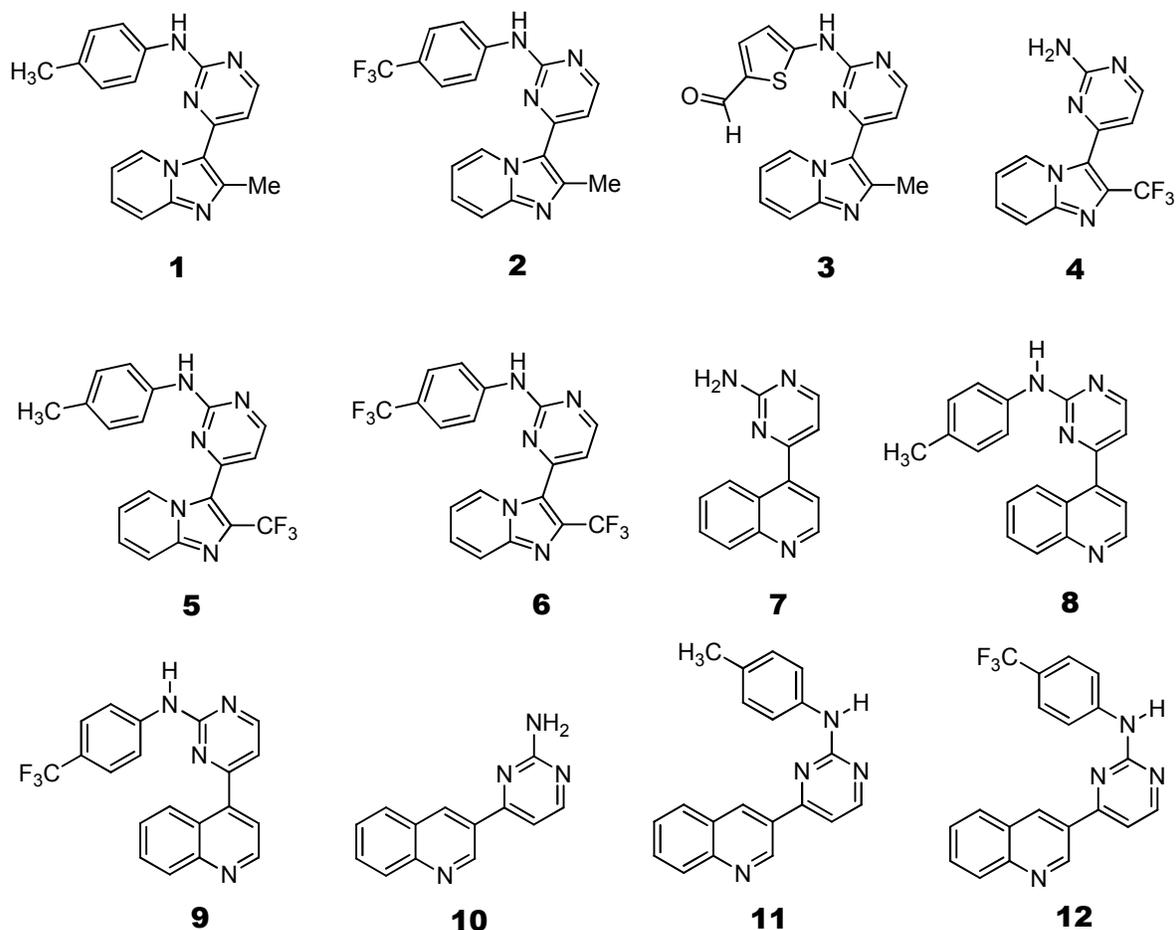
*Si se utiliza la estrategia de la modificación bioisostérica en 2-arilamino-4-(imidazo[1,2-*a*]piridin-3-il)pirimidina, reemplazando átomos de hidrógeno por flúor, fenilo por tiofenilo y el anillo de imidazo[1,2-*a*]piridina por quinolina, dará como resultado moléculas con actividad citotóxica e inhibitoria de CDK1/CycB y CDK2/CycA.*

### 3.2. Objetivos

Sintetizar una serie de derivados de 3-(4-pirimidinil)-2-metilimidazo[1,2-*a*]piridina (**1-12**) y posteriormente determinar su citotoxicidad así como su actividad inhibitoria de cinasas dependientes de ciclinas.

*Objetivos particulares.*

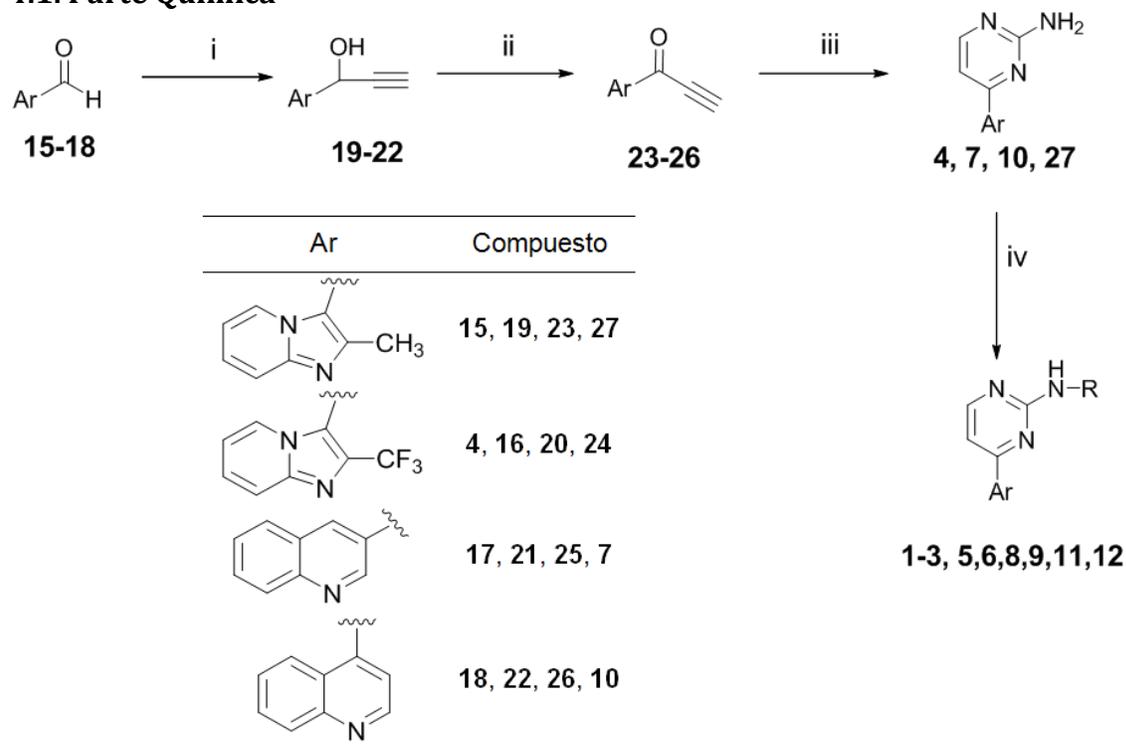
- Sintetizar los derivados de 3-(4-pirimidinil)-2-metilimidazo[1,2-*a*]piridina y 3(4)-(4-pirimidinil)quinolina presentados en la Figura 3.1.
- Evaluar la citotoxicidad *in vitro* de los compuestos sintetizados en líneas celulares tumorales.
- Evaluar el efecto de algunos compuestos sobre el ciclo celular de líneas celulares humanas y determinar el tipo de muerte celular involucrada de compuestos seleccionados.
- Determinar la inhibición de CDK1/CycB y CDK2/CycA por parte de algunos de los compuestos sintetizados.



**Figura 3.1.** Estructuras de los compuestos **1-12**. **1**, 2-metil-3-(2-(*p*-tolilamino)pirimidin-4-il)imidazo[1,2-*a*]piridina; **2**, 2-metil-3-(2-(4-(trifluorometil)fenilamino)pirimidin-4-il)imidazo[1,2-*a*]piridina; **3**, 5-(4-(2-metilimidazo[1,2-*a*]piridin-3-il)pirimidin-2-ilamino)tiofeno-2-carbaldehído; **4**, 3-(2-aminopirimidin-4-il)-2-(trifluorometil)imidazo[1,2-*a*]piridina; **5**, 3-(2-(*p*-tolilamino)pirimidin-4-il)-2-(trifluorometil)imidazo[1,2-*a*]piridina; **6**, 2-(trifluorometil)-3-(2-(4-(trifluorometil)fenilamino)pirimidin-4-il)imidazo[1,2-*a*]piridina; **7**, 4-(2-aminopirimidin-4-il)quinolina; **8**, 4-(2-(*p*-tolilamino)pirimidin-4-il)quinolina; **9**, 4-(2-(4-(trifluorometil)fenilamino)pirimidin-4-il)quinolina; **10**, 3-(2-aminopirimidin-4-il)quinolina; **11**, 3-(2-(*p*-tolilamino)pirimidin-4-il)quinolina; **12**, 3-(2-(4-(trifluorometil)fenilamino)pirimidin-4-il)quinolina.

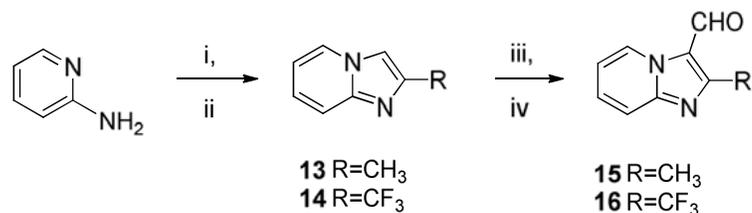
## 4. Resultados

### 4.1. Parte Química



**Esquema 4.1.** Reactivos: i) bromuro de etinilmagnesio 0.5 M; ii)  $\text{MnO}_2$ , para el compuesto **20**  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , agua, bromuro de tetrabutilamonio, iii) sulfato de guanidina,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , *n*-butanol (etanol-agua 85:15 para **24**) iv) Xantphos (3 %),  $\text{Pd}(\text{dba})_2$  (3 %),  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (3 equivalentes), haluro de arilo (1.1 equivalentes, 4-metil-1-yodobenceno, 4-(trifluorometil)-1-yodobenceno o 5-bromotiofeno-2-carboxaldehído). Las estructuras de **1-12** se muestran en la Figura 3.1 y Tabla 4.1.

Para lograr la síntesis de los compuestos **1-12** se utilizó el aldehído correspondiente (Esquema 4.1). 3- y 4-quinolinacarboxaldehído los cuales se encuentran disponibles comercialmente; 2-metilimidazo[1,2-*a*]piridina-3-carboxaldehído (**15**) y 2-(trifluorometil)imidazo[1,2-*a*]piridina-3-carboxaldehído (**16**) que se prepararon a través de la ruta sintética mostrada en el Esquema 4.2.



**Esquema 4.2.** Reactivos: i) Bromoacetona o 3-bromo-1,1,1-trifluoroacetona; ii) Trietilamina iii)  $\text{POCl}_3$ , DMF; iv)  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (acuoso, solución saturada).

Bromoacetona ó 3-bromo-1,1,1-trifluoroacetona se hicieron reaccionar con 2-aminopiridina a temperatura ambiente hasta la formación de una sal; posteriormente se agregó trietilamina a la mezcla de reacción y se calentó para obtener los compuestos **13** y **14** (Esquema 4.2). La reacción de Vilsmeier–Haack de estos productos con cloruro de clorometiliminio en DMF formó los compuestos **15** y **16** (Esquema 4.2).

La adición nucleofílica de bromuro de etinil magnesio 0.5 M en THF a los aldehídos aromáticos **15-18** proporcionó los derivados de alcohol propargílico **19-22** (Esquema 4.1). Estos a su vez fueron oxidados con MnO<sub>2</sub> para obtener las alquínilcetonas **23**, **25** y **26**. Desafortunadamente, la oxidación de **20** con MnO<sub>2</sub> dio resultados poco satisfactorios. Para llevar a cabo la oxidación requerida se utilizó hipoclorito de calcio en condiciones de transferencia de fase, dando por resultado el compuesto **24**. La ciclocondensación de **23-26** con sulfato de guanidina dio por resultado las 2-aminopirimidinas sustituidas con 2-metilimidazo[1,2-*a*]piridinilo (**27**, **4**) y las 2-aminopirimidinas sustituidas con 4-quinolinilo (**7**) y con 3-quinolinilo (**10**) (Esquema 4.1). Los productos deseados **1-3**, **5**, **6**, **8**, **9**, **11** y **12** fueron obtenidos con rendimientos de buenos a excelentes después del acoplamiento entre los compuestos **27**, **4**, **7** y **10** y un bromuro o yoduro aromático utilizando condiciones modificadas de la reacción de Buchwald-Hartwig<sup>[116]</sup> (Esquema 4.1). Todos los compuestos sintetizados fueron caracterizados mediante RMN de <sup>1</sup>H, RMN de <sup>13</sup>C y espectrometría de masas.

## 4.2. Parte Biológica

La actividad citotóxica de todos los compuestos fue evaluada en las líneas celulares humanas U251 (glioma), PC-3 (próstata), K562 (leucemia), HCT-15 (colon), MCF7 (mama) y SK-LU-1 (pulmón).

Un ensayo inicial a una concentración fija de 50 µM, la cual consideramos teóricamente como la concentración máxima para que un compuesto presente citotoxicidad moderada, demostró que los compuestos ensayados poseen actividad citotóxica relevante en las seis líneas celulares investigadas (Tabla 4.2.). Como un control positivo de citotoxicidad, se utilizó 5-fluorouracilo a la misma concentración.

**Tabla 4.1.**

Susceptibilidad in vitro por parte de las líneas celulares SK-LU-1 y MCF7 hacia los compuestos sintetizados 1-12.

Compuesto	Ar	R	CI <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	
			SK-LU-1	MCF7
1			0.0197±0.0087	0.059±0.007
2			0.034±0.016	0.066±0.002
3			1.54±0.14	4.27±0.36
4		H	56.51±1.4	53.68±21.62
5			0.175±0.005	0.044±0.02
6			0.745±0.18	0.29±0.24
7		H	>50	40.25±0.25
8			1.4±0.15	0.6±0.04
9			1.72±0.13	1.65±0.06
10		H	>50	>50
11			ND	~50
12			ND	>50

ND: No determinado

<sup>a</sup> Los resultados muestran la concentración que produce una inhibición del crecimiento celular del 50 %, este parámetro se midió usando la técnica de sulforrodamina B. Los datos representan la media±DS de tres experimentos independientes.

Adicionalmente, se decidió determinar los valores de concentración inhibitoria del 50% del crecimiento celular ( $CI_{50}$ ) únicamente seleccionando las líneas celulares más sensibles (MCF7 y SK-LU-1). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.1.

La citotoxicidad se midió utilizando la técnica de la sulforrodamina, la cual se detalla en el Apéndice A.2.1. La técnica de la sulforrodamina B se utiliza para determinar la densidad de la población de células, midiendo el contenido de proteína celular <sup>[117]</sup>.

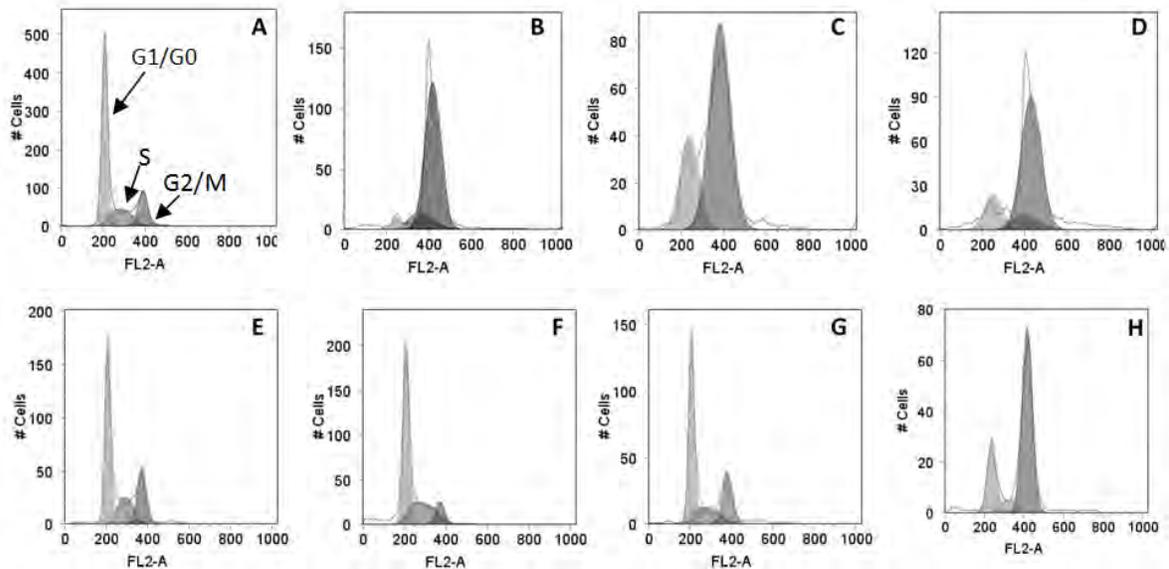
Cómo paso siguiente, se evaluaron los efectos en el ciclo celular de los compuestos **1**, **3** y **8** sobre el crecimiento y división de células SK-LU-1 y MCF7 asincrónicas. Para este fin utilizamos la técnica de Citometría de Flujo, la cual mide el contenido de ADN celular después de 24h de tratamiento con los compuestos antes mencionados, utilizando yoduro de propidio como colorante fluorescente (Tabla 4.3., Figura 4.1.). Como control positivo utilizamos el compuesto Olomoucina, el cual es inhibidor de la cinasa CDK1 y CDK2, y como control negativo células tratadas con DMSO a la concentración máxima utilizada durante los experimentos. Los resultados muestran el porcentaje de células que emiten fluorescencia de manera proporcional a su contenido de ADN (Tabla 4.3.).

El ciclo celular es el intervalo entre dos mitosis consecutivas en células que se están dividiendo continuamente. Después de la mitosis, la célula se mueve a la fase G0/G1. Estas dos fases están consideradas juntas en citometría de flujo en virtud de que ellas no pueden ser diferenciadas cuando se mide el contenido de ADN. En condiciones normales la proporción de células es mayor al 95% con una cantidad de ADN igual a 2N. La fase de síntesis o fase S representa a las células que están duplicando sus cromosomas y por lo tanto están sintetizando activamente ADN; estas células tienen un incremento de su contenido de ADN que pasa de 2N a 4N. Posteriormente la célula entra a la fase G2 que es la última fase antes de la mitosis. Sin embargo, la fase G2 suele agruparse con la fase de mitosis como fase G2/M, ya que presentan el mismo contenido de ADN. Estas células se consideran con mayor cantidad de ADN y que corresponde a 4N. La fase G0 o de arresto celular puede ser la última por un periodo que puede durar meses o años. Finalmente la fase SubG0 representa a las células que se encuentran en apoptosis. En las células apoptóticas hay degradación de la cromatina, por lo que presentan un contenido de ADN

**Tabla 4.2.**Inhibición del crecimiento de líneas celulares humanas por parte de los compuestos **1-12**<sup>a</sup>

Compuesto	% de inhibición del crecimiento					
	U251	PC-3	K562	HCT-15	MCF7	SK-LU-1
<b>1</b>	100.0	94.2	89.4	95.2	88.5	100.0
<b>2</b>	85.6	64.5	84.8	88.6	83.4	100.0
<b>3</b>	57.8	49.5	88.1	85.4	75.9	100.0
<b>4</b>	92.2	74.0	56.3	24.0	100.0	71.0
<b>5</b>	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
<b>6</b>	100.0	92.0	94.2	94.4	100.0	95.0
<b>7</b>	100.0	77.38	9.4	NA	100.0	78.2
<b>8</b>	100.0	100.0	50.9	100.0	100.0	100.0
<b>9</b>	91.8	87.3	NA	100.0	100.0	100.0
<b>10</b>	38.5	31.9	NA	NA	100.0	59.3
<b>11</b>	87.7	59.5	NA	30.3	100.0	46.3
<b>12</b>	49.8	22.9	NA	24.0	80.9	35.4
<b>5-fluorouracil</b>	64.2	45.4	73.7	71.3	65.1	70.5

<sup>a</sup> 50  $\mu$ M; media de tres experimentos. NA= sin actividad. Determinado mediante la técnica de sulforrodamina B



**Figura 4.1.** Efecto sobre las fases del ciclo celular en células SK-LU-1 y MCF7 por parte de los compuestos **1**, **3**, y **8** después de 24h de tratamiento. DMSO fue utilizado como control de disolvente. (A, SK-LU-1; E, MCF7). Olomoucina fue utilizada como control positivo (no mostrado). Tratamiento a una concentración de 0.04  $\mu$ M del compuesto **1** (B), 8.4  $\mu$ M del compuesto **3** (C), 1  $\mu$ M del compuesto **8** (D), y 70  $\mu$ M de Olomoucina se utilizaron en la línea celular SK-LU-1. Tratamiento a una concentración de 0.118  $\mu$ M del compuesto **1** (F), 8.4  $\mu$ M del compuesto **3** (G), 1  $\mu$ M del compuesto **10** (H), y 60  $\mu$ M de Olomoucina se utilizó en la línea celular MCF7. Se presenta un experimento representativo de tres ensayos independientes.

menor a 2N permitiendo ser cuantificadas por la aparición de un pico por debajo de la región G0/G1, llamado pico SubG0 (menor a 200 en el eje FL2-A, Figura 4.1).

Los compuestos **1**, **3** y **8** causaron una disminución de la fase G1/G0 y un aumento en la fase G2/M del ciclo celular de la línea SK-LU-1, a la concentración utilizada en este experimento (Tabla 4.3, Figura 4.1), la fase S del ciclo celular no sufrió diferencias significativas en esta línea celular. La línea MCF7 muestra un histograma después del tratamiento con los compuestos **1** y **3**, que poseen un anillo de 2-metilimidazo[1,2-*a*]piridina, afín a las células control. Sin embargo, las diferencias no son estadísticamente significativas. En contraste, el compuesto **8** causó un fuerte arresto en la fase G2/M (Figura 4.1, Tabla 4.3) después de 24h de tratamiento comparadas con las células control (Figura 4.1, Tabla 4.3) y una disminución notable en la fase G1/G0 del ciclo celular de la línea MCF7. La fase S no presenta diferencias significativas comparando con las células control. La Olomoucina no tiene efecto en el ciclo celular de las células MCF7 a la concentración utilizada en este experimento (Tabla 4.3). El aumento en el volumen celular característico de un arresto en la fase G2/M del ciclo celular fue evidente para todos los compuestos en la línea SK-LU-1, así como para el compuesto **8** en MCF7. Este parámetro también fue medido por citometría de flujo (no se muestra). El aumento del volumen celular, después del tratamiento con los compuestos, se observó también mediante microscopia de fluorescencia (Figura 4.3).

**Tabla 4.3.**

Análisis del ciclo celular en las líneas celulares SK-LU-1 y MCF7 después del tratamiento con los compuestos **1**, **3** y **8** durante 24h. DMSO se utilizó como control de disolvente y Olomoucina como control positivo.

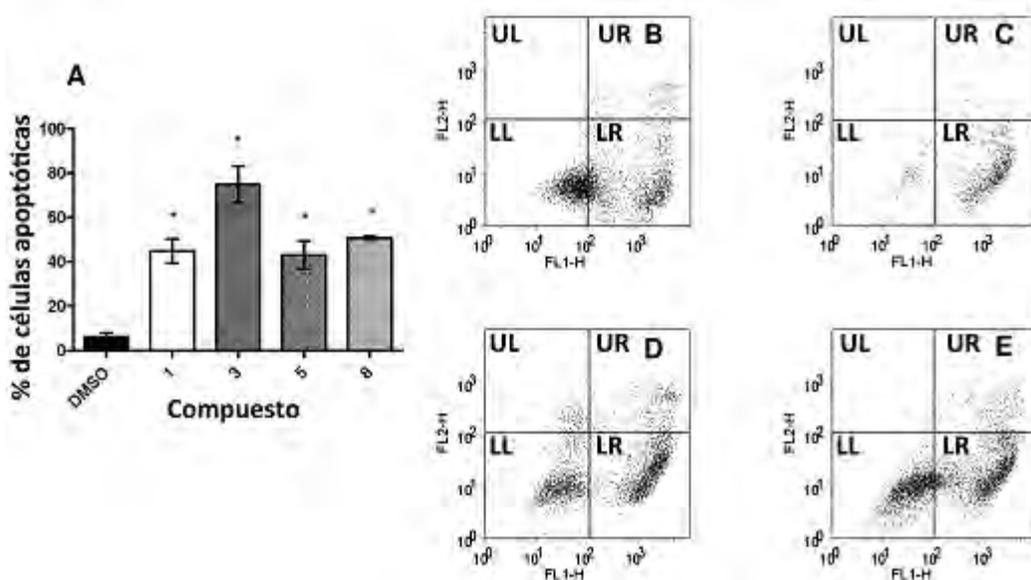
Compuesto	Fase del ciclo celular (%) <sup>a</sup>					
	SK-LU-1			MCF7		
	G1	S	G2/M	G1	S	G2/M
<b>1</b>	4.7±0.4 *	20.9±10.7	77.5±5.6 *	60.8±1.8	25.3±4.3	14.7±7.0
<b>3</b>	42.5±0.4*	13.9±4.2	48.0±8.5 *	54.5±6.3	15.7±4.6	22.2±1.6
<b>8</b>	8.1±9.6 *	22.0±19.3	74.0±11.4*	18.7±5.6*	15.1±6.7	64.7±1.4*
<b>DMSO</b>	61.7±2.9	18.2±1.5	16.1±0.9	57.0±3.7	17.0±1.2	23.2±0.4
<b>Olomoucina</b>	44.2±2.9	19.7±8.6*	31.8±3.7*	60.6±3.1	15.1±2.3	23.2±0.4

Los resultados son expresados como la media±DS de tres experimentos independientes.

\**P*<0.05 comparando con el control de disolvente (DMSO).

La resistencia a la apoptosis es uno de los mecanismos implicados en la falta de eficacia de la quimioterapia. Para determinar cuando el arresto en la fase G2/M es

seguido de muerte apoptótica o necrótica, células SK-LU-1 creciendo en forma asincrónica fueron expuestas a los compuestos **1**, **3**, **5** y **8** por 24 y 48h. La muerte celular fue monitoreada por citometría de flujo, usando como indicador de apoptosis la unión de anexina V marcada con isocianato de fluoresceína (anexina V-FITC) a fosfatidilserina (lípidos que se externalizan durante la muerte por apoptosis). Adicionalmente, con yoduro de propidio, el cual tiñe al ADN. Las células apoptóticas muestran fluorescencia positiva para Anexina V-FITC. Subsecuentemente, se observa un aumento en el canal FL-1H, que mide fluorescencia verde, y que indica muerte celular por apoptosis. En el histograma de eventos (Figura 4.2), la esquina superior izquierda del cuadrante (UL) representa detrito celular, el cuadrante inferior izquierdo (LL) son células vivas, el cuadrante superior derecho (UR) son células apoptóticas tardías o células necróticas y por último el cuadrante inferior derecho (LR) son células apoptóticas.



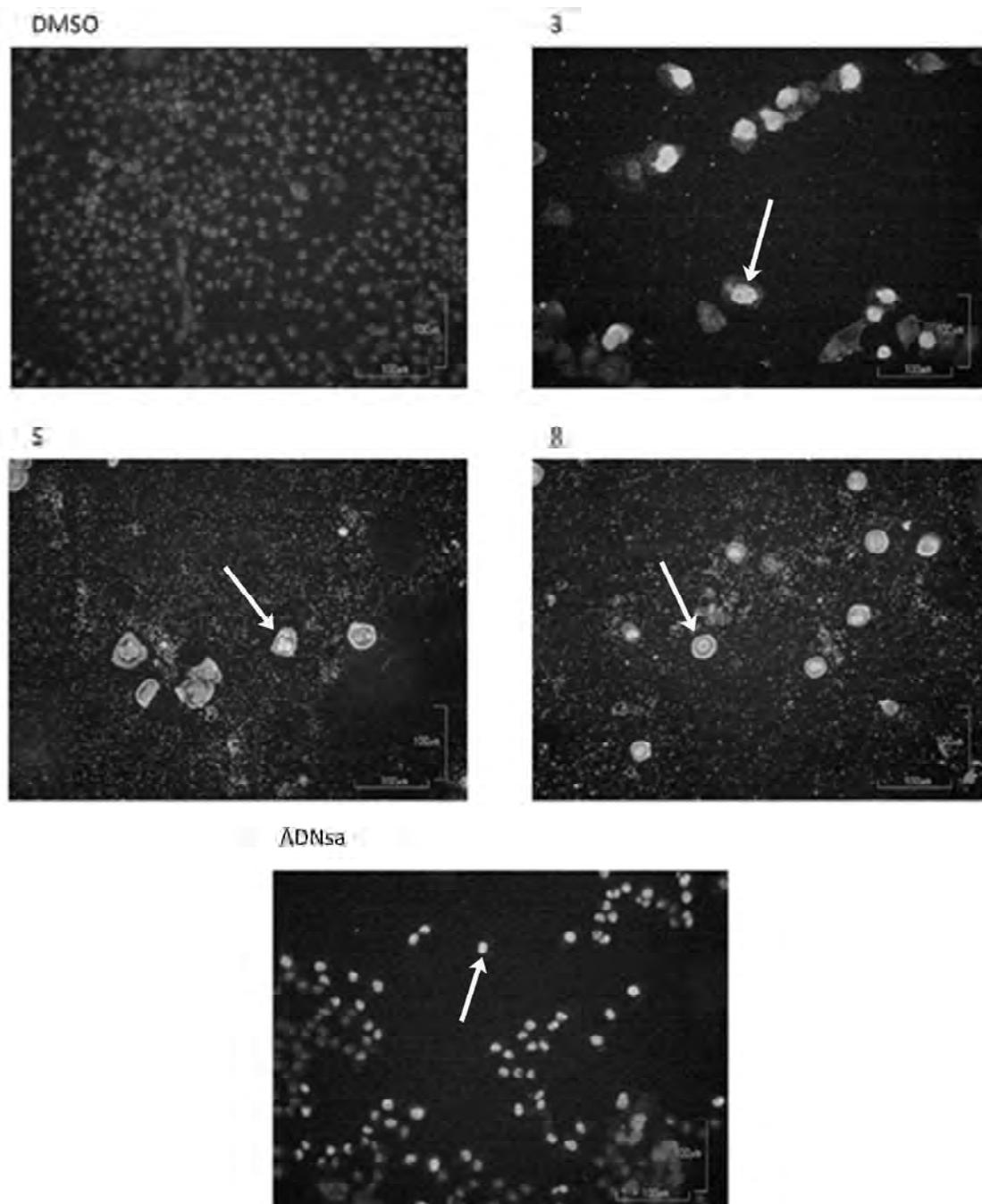
**Figura 4.2.** Porcentaje de inducción de apoptosis en la línea celular SK-LU-1 después del tratamiento a una concentración de: 0.04  $\mu\text{M}$  del compuesto **1**, 8.4  $\mu\text{M}$  del compuesto **3**, 0.4  $\mu\text{M}$  del compuesto **5** y 1  $\mu\text{M}$  del compuesto **8** durante 48h, DMSO se utilizó como control de disolvente (A). Detección de apoptosis mediante tinción con anexina V-FITC y yoduro de propidio después del tratamiento con los compuestos **1** (B), **3** (C), **5** (D), y **8** (E) en las células SK-LU-1. Se muestra un experimento representativo de tres. Los eventos en el cuadrante LR corresponden a las células en apoptosis.

Después de un periodo de incubación de 24h con los compuestos aquí estudiados no se detectó apoptosis estadísticamente significativa superior a las células control, las cuales fueron incubadas sólo con DMSO (no se muestra). Sin embargo, a las 48h de

tratamiento (Figura 4.2) los compuestos **1**, **3**, **5** y **8** son inductores efectivos de apoptosis, mostrando un aumento significativo de células apoptóticas comparado para lo observado en el control. Además, no se encontraron evidencias que sugirieran un mayor número de células necróticas con respecto al control (Figura 4.2 B, C, D y E). La muerte celular por apoptosis se confirmó mediante la técnica de TUNEL (Figura 4.3).

Por último, también analizamos la actividad de los compuestos **1-3**, **8** y **11** sobre las enzimas recombinantes humanas CDK2/CycA y CDK1/CycB. Como control positivo se utilizó Olomoucina.

Se ha reportado que la  $CI_{50}$  la Olomoucina es de 7  $\mu$ M para la enzima CDK2/CycA y CDK1/CycB;<sup>[118]</sup> por esta razón decidimos probar todos los compuestos usando esta única concentración. En general, todos los compuestos probados demostraron ser mejores que Olomoucina sobre ambas enzimas, CDK2/CycA y CDK1/CycB (Tabla 4.4). Los compuestos **1**, **2** y **3** también inhiben la actividad de CDK1/CycB en una proporción similar. Fue interesante detectar que los compuestos con un anillo de quinolina presentan mayor potencia para inhibir a la CDK1/CycB. En la CDK2/CycA los compuestos más activos fueron **2** y **3**. Aunque el compuesto **3** no exhibe mayor actividad citotóxica que el compuesto **1** sí presentó una actividad inhibitoria de CDKs. Es importante notar que el compuesto **11** no presenta actividad citotóxica aún a una concentración de 50  $\mu$ M (Tabla 4.1). No obstante, pudimos detectar que sí inhibe a las enzimas CDK2/CycA y CDK1/CycB de forma similar que el compuesto **8** (Tabla 4.4).



**Figura 4.3. Detección de la muerte celular por apoptosis causada por los compuestos 3, 5 y 8 en células SK-LU-1 después de 48 horas de tratamiento mediante la técnica de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling).** DMSO fue utilizado como control negativo. Células incubadas en condiciones estándar tratadas con ADNsA I se utilizaron como control positivo. Tratamiento a una concentración de 8.4  $\mu\text{M}$  del compuesto **3**, 0.4  $\mu\text{M}$  del compuesto **5** y 1  $\mu\text{M}$  del compuesto **8** se utilizó para detectar la apoptosis. Las células positivas para la reacción TUNEL se observan como células con material genético fluorescente. Se señala un ejemplo de células con material genético fragmentado, signo de muerte celular por apoptosis, en las imágenes donde se presenta este fenómeno mediante una flecha. Las células tratadas con los compuestos **3**, **5** y **8**, además de presentar material genético fragmentado, presentan un volumen celular aumentado, característico de un arresto en la fase G2/M del ciclo celular, con respecto a las células control (DMSO, ADNsA).

**Tabla 4.4.**

Porcentaje de inhibición de cinasas dependientes de ciclinas recombinantes humanas por parte de los compuestos **1**, **2**, **3**, **8** y **11** \*.

CDK/Cyc	Compuesto					
	Olomoucina	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>8</b>	<b>11</b>
CDK1/CycB	48	59	60	52	75	73
CDK2/CycA	43	58	69	76	45	49

\* 7  $\mu$ M; media de dos experimentos independientes.

La determinación de la  $CI_{50}$  de los compuestos **1**, **3** y **8** en las enzimas CDK1/CycB y CDK2/CycA (Figura 4.4D) se realizó utilizando el servicio SelectScreen® Biochemical Kinase Profiling Service de InVitrogen (Madison, WI, USA) mediante la tecnología Z'-LYTE®. De acuerdo al proveedor del servicio, el ensayo utiliza un péptido que contiene dos fluoróforos, uno en cada extremo del péptido, los cuales hacen un par FRET (donador, cumarina; aceptor, fluoresceína). El ensayo se basa en la diferencia de sensibilidad del péptido fosforilado y no fosforilado a la hidrólisis por parte de una proteasa (Figura 4.5).

En la primera parte de la reacción, la cinasa transfiere un grupo fosfato al péptido FRET. En la segunda parte, una proteasa reconoce un sitio específico e hidroliza los péptidos FRET no fosforilados. La fosforilación del péptido FRET suprime el rompimiento del péptido. De esta manera, al hidrolizarse el péptido se elimina la transferencia de energía y consecuentemente no se presenta el fenómeno FRET, mientras que los péptidos fosforilados lo mantienen. Se calcula la relación de fluorescencia donador/aceptor para cada celda, y si el péptido es fosforilado la relación da por resultado un valor pequeño, si el péptido no es fosforilado la relación aumenta su valor. La magnitud de la fosforilación correlaciona con la relación fluorescencia donador/aceptor, así se determina la actividad de la cinasa y de esta manera se puede medir la actividad inhibitoria de compuestos que se sospecha que inhiben cinasa (Figura 4.5).

Los perfiles de inhibición de las enzimas por parte de los compuestos sintetizados (Figura 4.4 A, B y C) muestran que los productos probados son más activos en CDK2/CycA que en CDK1/CycB. El compuesto **8** también presentó mayor actividad en CDK2/CycA, a diferencia del ensayo a un solo punto. El compuesto **3**, que presenta en su estructura un

anillo tiazólico y un aldehído presenta la mayor potencia en la inhibición de la enzima anteriormente mencionada.

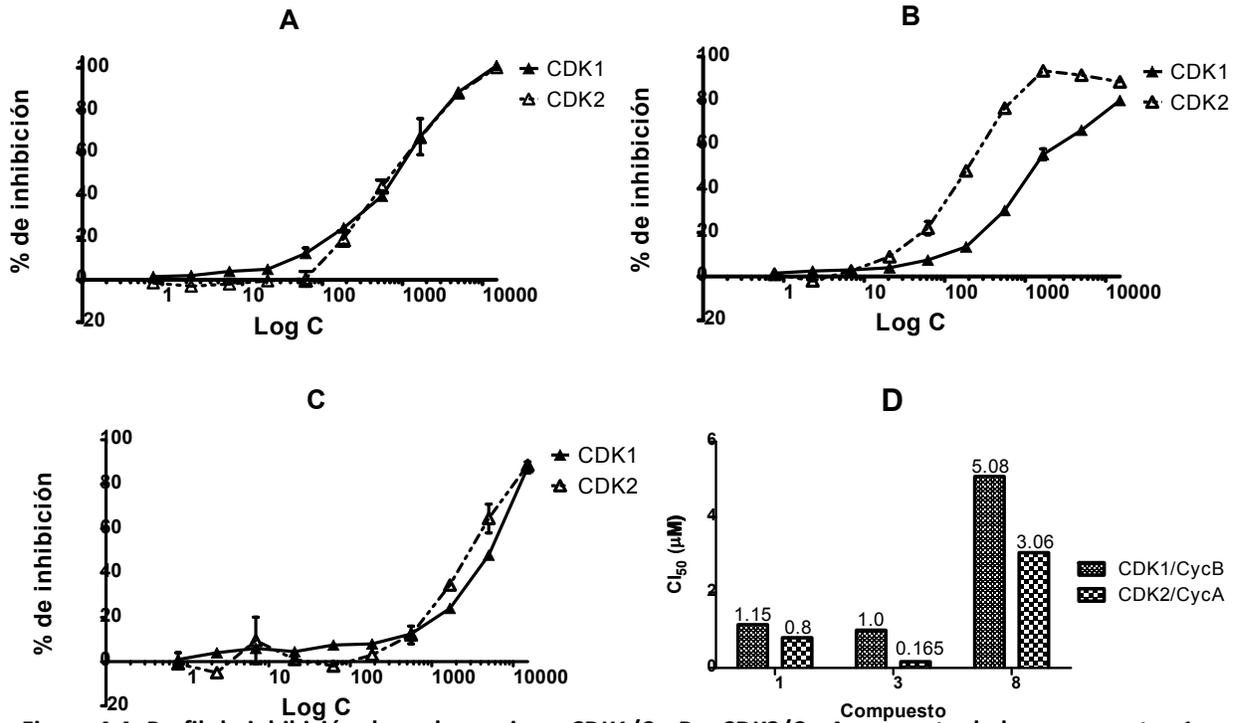


Figura 4.4. Perfil de inhibición de en las enzimas CDK1/CycB y CDK2/CycA por parte de los compuestos 1 (A), 3 (B) y 8 (C) y valor de  $IC_{50}$  en estas enzimas (D). La inhibición de la actividad de las CDK1/CycB y CDK2/CycA se determinó utilizando el ensayo Z-LYTE®

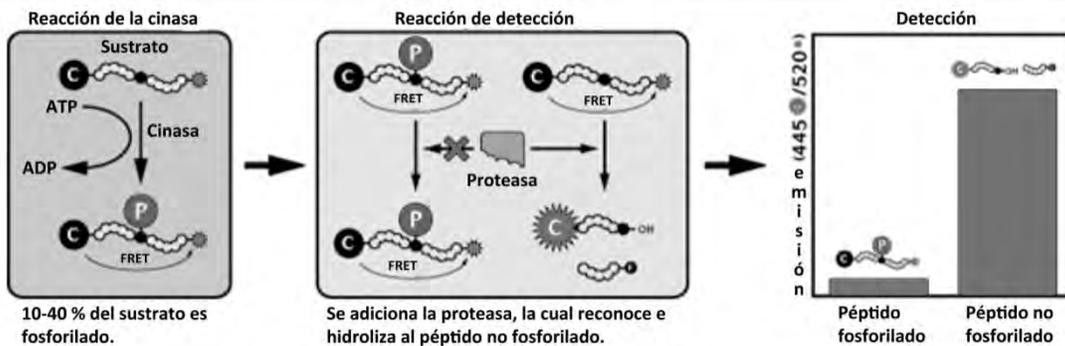


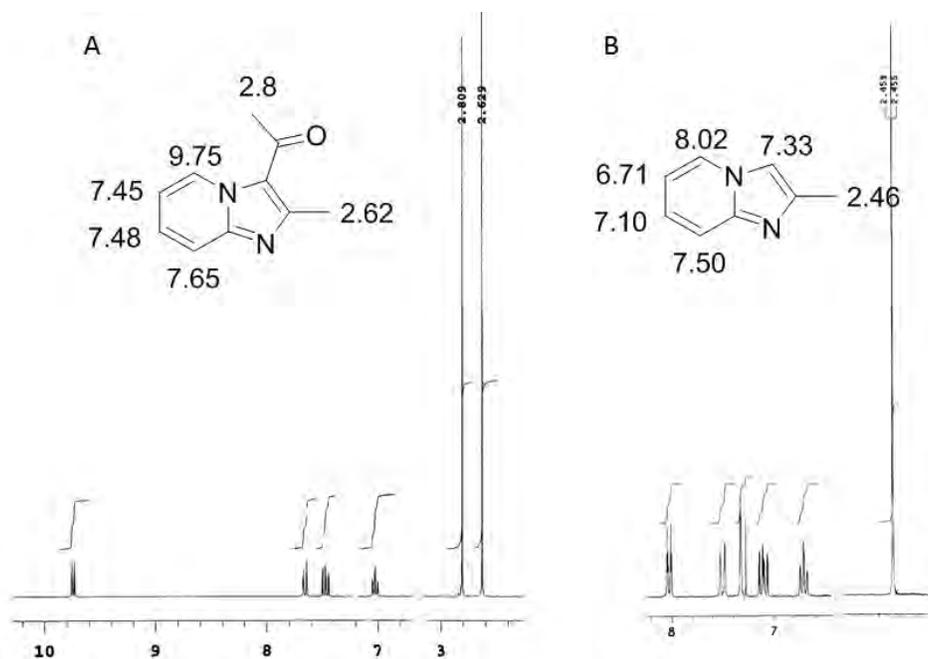
Figura 4.5. Tecnología Z-LYTE®. El péptido utilizado en el ensayo posee dos fluoróforos, uno en cada extremo (cumarina y fluoresceína), que forman un par FRET (de las siglas en inglés de transferencia de energía de resonancia de Förster). El fenómeno FRET es dependiente de la distancia presente entre los dos fluoróforos, la molécula donadora emite típicamente a longitudes de onda más corta que se traslapan con el espectro de absorción del emisor. La transferencia de energía ocurre sin la aparición de un fotón y es el resultado de interacciones dipolo-dipolo de largo alcance entre el donador y el aceptor<sup>[119]</sup>, por lo que para que se presente el fenómeno el péptido debe permanecer íntegro. El péptido contiene una secuencia reconocible por la cinasa estudiada, por lo que al incubar en presencia de la enzima esta transferirá un grupo fosfato al péptido. Al finalizar la reacción se adiciona una proteasa que reconoce sólo al péptido no fosforilado. Si el péptido no es fosforilado por la cinasa, por ejemplo por la adición de un inhibidor, el fenómeno FRET se elimina al hidrolizarse el péptido, lo cual se puede detectar midiendo la emisión de la cumarina y la fluoresceína y calculando su relación.

## 5. Análisis de resultados.

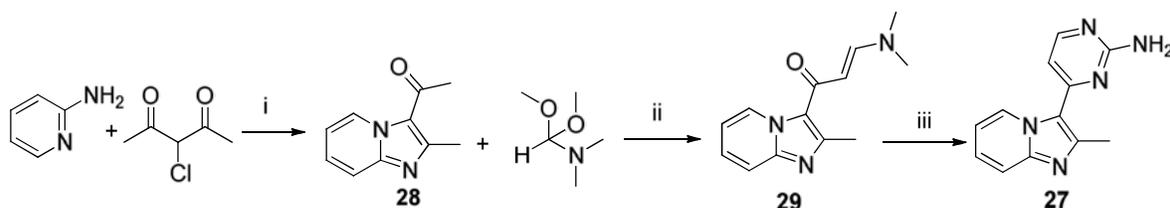
En el trabajo descrito en esta tesis se evaluó 1) el reemplazo bioisostérico en el compuesto **1** (Figura 3.1, Tabla 4.1), el cual fue nuestro compuesto base. Así mismo la sustitución de los átomos de hidrogeno del metilo del anillo de 2-metilimidazo[1,2-*a*]piridina por flúor (compuestos **4**, **5** y **6**; Figura 3.1, Tabla 4.1). La inclusión del grupo trifluorometilo en lugar del metilo del grupo *p*-tolilo (compuestos **2**, **6**, **9** y **12**; Figura 3.1, Tabla 4.1). En las síntesis efectuadas se eligió un grupo toliilo por la facilidad de manipulación de este grupo, así como el fácil acceso de las materias primas. 2) El reemplazo bioisostérico del anillo 2-metilimidazo[1,2-*a*]piridina por los anillos isoeléctricos 4-quinolinil (compuestos **7**, **8**, y **9** Figura 3.1, Tabla 4.1)) y 3). La preparación del regioisómero 3-quinolinil (compuestos **10**, **11** y **12**; Figura 3.1, Tabla 4.1). En el compuesto **3** (Figura 3.1, Tabla 4.1) el grupo toliilo fue reemplazado por un anillo de tiazol que es un bioisóstero del anillo bencénico.

En un inicio, la síntesis del compuesto **1** se intentó llevar a cabo mediante una ruta sintética previamente establecida (Esquema 5.1)<sup>[100a]</sup>, a partir de 2-aminopiridina y 3-bromo-2,4-pentanodiona formándose la correspondiente metilcetona **28**, la cual posteriormente se hace reaccionar con el dimetilacetal de la dimetilformamida (DMFDMA) para formar la enamina **29**. La síntesis de **29** también se llevó a cabo utilizando una mezcla de DMFDMA-xilenos 1:1. Para favorecer la reacción se calentó a reflujo hasta que se consumiera totalmente la materia prima, el tiempo necesario para completar la reacción fue de 14 días. Después de purificar se obtuvo **29** con un rendimiento del 85%. Posteriormente se procedió a formar el anillo de 2-aminopirimidina usando para esto el sulfato de guanidina, como base  $K_2CO_3$  en *n*-butanol, para así obtener el compuesto **27** (Esquema 5.1) con un 40 % de rendimiento. Bajo estas condiciones el producto mayoritario fue la correspondiente metilcetona **28** formada por una reacción retroaldólica del compuesto **29**.

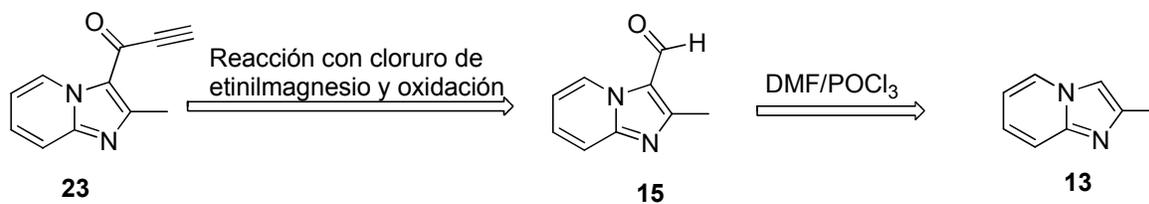
La poca reactividad de **28** puede ser explicada por la formación de un puente de hidrógeno intramolecular entre el protón del carbono 5 del anillo de imidazo[1,2-*a*]piridina y el carbonilo de la metil cetona (Figura 5.1). Esta consideración está basada en



**Figura 5.1.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) del compuesto **28** (A) y **13** (B).



**Esquema 5.1.** Propuesta sintética original para obtener el compuesto **27**. Condiciones: i) THF,  $\text{Et}_3\text{N}$ , reflujo, 12h; ii) Xilenos, reflujo, 14 días, iii)  $n\text{-BuOH}$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , reflujo, 16 h.



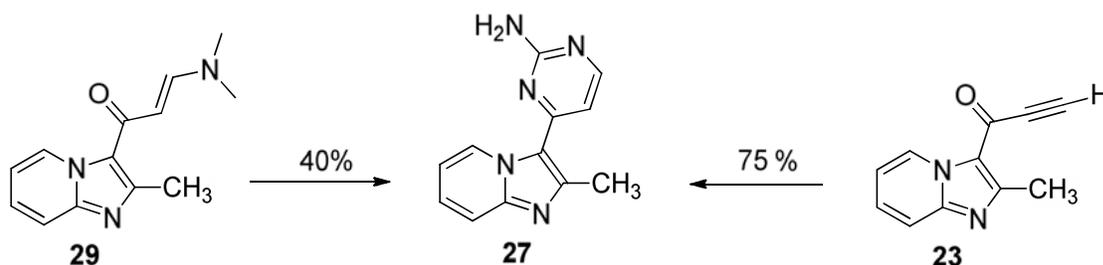
**Esquema 5.2.** Análisis retrosintético para obtener la alquilcetona **23**.

el comportamiento del protón H-5 en la RMN de  $^1\text{H}$ . Cuando el grupo carbonilo no está presente, el protón en C-5 presenta un desplazamiento químico en 8.02 ppm, mientras que en presencia del carbonilo este mismo protón se desplaza paramagnéticamente hasta 9.75 ppm, debido a la formación del puente de hidrógeno antes mencionado (Figura 5.1). La poca facilidad de enolización de una metilcetona que se presenta por la formación de puente de hidrógeno, ha sido también observada durante la bromación de acetofenonas

utilizando dibromuro de dioxano y *o*-hidroxiacetofenona<sup>[120]</sup>. Esta propiedad explica también el tiempo de reacción tan prolongado para obtener la enamionona **12**.

Debido a la poca utilidad práctica en el proceso para formar el compuesto **12** se pensó en utilizar una ruta alterna. En la literatura se encontró que la síntesis de anillos de pirimidina utilizando alquinilcetonas produce rendimientos elevados<sup>[121]</sup>. Por otro lado se sabe que el anillo de imidazo[1,2-*a*]piridina sufre sustitución electrofílica en la posición 3 del anillo; de tal forma que la nitración de 2-metilimidazo[1,2-*a*]piridina ocurre sólo en esta posición<sup>[122]</sup>. Se pensó entonces realizar la formilación de Vilsmeier-Haack en el anillo de 2-metilimidazo[1,2-*a*]pirimidina (**13**) para formar 3-(2-metilimidazo[1,2-*a*]pirimidinil)carboxaldehído (**15**) (Esquema 4.2, Esquema 5.2). Al obtener **15** se hizo reaccionar con cloruro de etinilmagnesio para obtener el alcohol propargílico **19**, el cual se oxidó para obtener la alquinil cetona **20** (Esquema 4.1, Esquema 5.2).

La obtención del compuesto **4** a partir de la alquinilcetona **23**, presentó mayores ventajas sintéticas que el uso de la enamionona **29**, ya que en las mismas condiciones de reacción el usar **23** como materia prima resultó en un mayor rendimiento del compuesto esperado **4** (75% vs 40%). (Esquema 5.3).

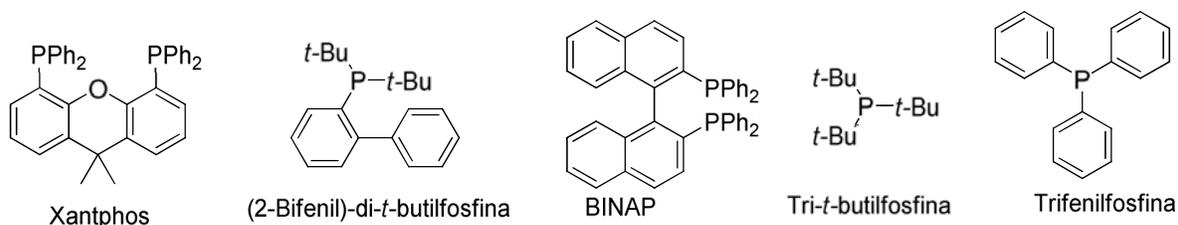


**Esquema 5.3.** Reacción de los compuestos **29** y **23** con guanidina para formar el compuesto **27**. En ambos casos se utilizó *n*-butanol como disolvente, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> como base y se calentó a reflujo

La ruta sintética mostrada en el Esquema 5.2 también es aplicable para la obtención de los respectivos compuestos **4**, **7** y **10**.

Después, se pensó realizar una *N*-arilación catalítica (Reacción de Buchwald-Hartwig) del compuesto **27** con 4-yodo-tolueno (Esquema 4.1). En primera instancia, se intentó realizar este acoplamiento utilizando Pd(AcO)<sub>2</sub> o Pd(dba)<sub>2</sub>. Como ligante cualquiera de las cinco fosfinas descritas a continuación (2-bifenil)-di-*t*-

butilfosfina, tri-*t*-butilfosfina, trifenilfosfina, BINAP o Xantphos (Figura 5.2), y finalmente como base alguna de las siguientes: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, *t*-BuOK, Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> o Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Los resultados con las tres primeras fosfinas no fueron satisfactorios. La reacción procedió moderadamente con BINAP y de manera excelente con la fosfina Xantphos (Figura 5.2). Las condiciones donde se logró la *N*-arilación de 3-(2-aminopirimidin-4-il)-2-metilimidazo[1,2-*a*]piridina (**27**) en mayor rendimiento fueron utilizando como ligante 4,5-bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilxanteno (Xantphos) al 3%, bis(dibencilidena)paladio (0) (Pd(dba)<sub>2</sub>) al 3% y 3 equivalentes de Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, obteniéndose el compuesto **1** con un 80 % de rendimiento (Esquema 4.1). Para preparar el compuesto **2** la *N*-arilación se realizó con 4-(trifluorometil)-1-yodobenceno sobre el compuesto **27** formando finalmente el derivado **2** con un rendimiento casi cuantitativo (Esquema 4.1). La influencia del grupo trifluorometilo fue suficiente para aumentar el rendimiento, por lo que se puede establecer que la presencia de grupos electroattractores en el haluro de arilo favorece la reacción. Con respecto al producto **3** el rendimiento es menor, como era esperado, debido a que el enlace C-Br es más resistente a la adición oxidativa que el enlace C-I.



**Figura 5.2.** Estructura de las diferentes fosfinas utilizadas. Xantphos, 4,5-bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilxanteno; BINAP, 2,2'-Bis(difenilfosfino)-1,1'-binaftaleno.

Es interesante notar que sólo con el ligante Xantphos se llevó a cabo la *N*-arilación.

Se ha descrito que para que esta reacción se efectúe es necesario contar con ligantes electrodonadores, los cuales favorecen la adición oxidativa, y que además posean impedimento estérico alto, para favorecer la eliminación reductiva.

Al parecer en esta reacción no sólo el tamaño de la fosfina es importante, sino también las propiedades electrónicas.

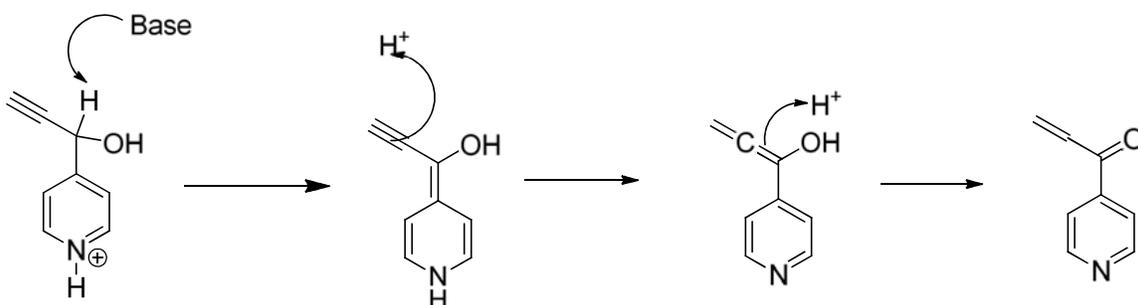
Se ha observado, por ejemplo, que Xantphos puede también servir como agente quelante *trans* cuando se une a Pd<sup>2+</sup>[123]. El ángulo de enlace de Xantphos cuando se acompleja con diferentes metales de transición es de 153°, dando como resultado una

gran eficacia para la adición oxidativa y la eliminación reductiva que se llevan a cabo durante la catálisis de la reacción, aumentando la velocidad de la reacción y facilitando notablemente la *N*-arilación <sup>[123]</sup>.

La síntesis del compuesto **4** se realizó mediante la formación del derivado del alcohol propargílico **16** (Esquema 4.1), el cual no se pudo oxidar satisfactoriamente con MnO<sub>2</sub>, ya que al dejar reaccionar por un tiempo prolongado se observó la descomposición de la materia prima así como de la alquinilcetona. Probablemente trazas de hidróxido de sodio presentes en el reactivo reaccionan con el anillo de imidazo[1,2-*a*]piridina en la posición 2 mediante una reacción tipo Michael. Esta reacción se llevó a cabo de manera más apropiada con hipoclorito de calcio, en un sistema bifásico de diclorometano-agua. Al obtener la alquinil cetona **24**, ésta se condensó con guanidina para formar el compuesto **4** (Esquema 4.1). El uso de este reactivo llevó a la formación de un solo producto detectable por CCF el cual sin mayor purificación se hizo reaccionar con sulfato de guanidina y carbonato de potasio, utilizando como disolvente etanol-agua (85:15), lo cual llevo a la formación del compuesto **4** con sólo un 29 % de rendimiento.

Los compuestos con sustituyentes 4-quinolinilo se sintetizaron a partir de 4-quinolinacarboxaldehído, el cual se hizo reaccionar con bromuro de etinilmagnesio, para obtener el derivado de alcohol propargílico **22** (Esquema 4.1). Este alcohol, al intentar purificarlo por cromatografía en columna, sufrió degradación obteniéndose un bajo rendimiento del compuesto **22**; por lo que se decidió oxidar directamente el crudo de la reacción con MnO<sub>2</sub>. La falta de estabilidad de **22** se puede explicar mediante las observaciones realizadas por Erenler y colaboradores <sup>[124]</sup>, donde obtuvo enonas a partir del alcohol propargílico de piridinas por tratamiento con ácido o base y se describe la inestabilidad de estos compuestos (Esquema 5.4).

Después de formar **22**, este se hizo reaccionar con guanidina, carbonato de potasio en *n*-butanol para formar el correspondiente compuesto **10** (Esquema 4.1). Desafortunadamente, el rendimiento de esta reacción fue solamente del 5 %; formándose en su mayoría productos de polaridad alta, probablemente resinas.

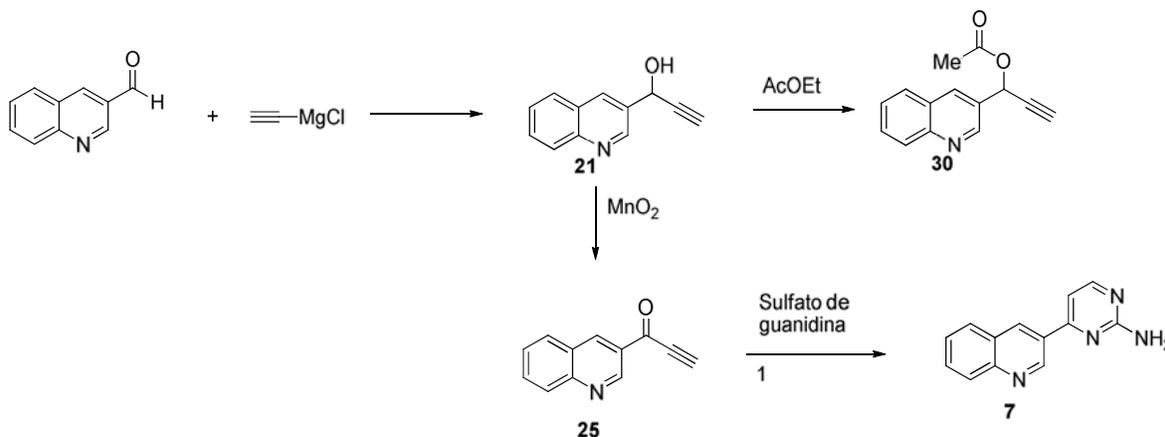


**Esquema 5.4.** Los derivados de piridina sustituidos en posición 4 con un alcohol propargílico son inestables tanto en medio ácido como básico<sup>[124]</sup>.

La obtención del producto **7** empezó con quinolin-3-carboxaldehído el cual se hizo reaccionar con dos equivalentes de cloruro de etilmagnesio para formar el derivado de alcohol propargílico **21** (Esquema 4.1). Este compuesto se acetila fácilmente con acetato de etilo para formar el compuesto **30**, por lo que no se recomienda trabajar **21** con este disolvente (Esquema 5.5). La oxidación de **21** con  $\text{MnO}_2$  en acetona produce al compuesto **25** que se condensa con sulfato de guanidina para formar el compuesto **7** con un 20 % de rendimiento (Esquema 4.1, Esquema 5.5).

Los compuestos **1-3**, **5**, **6**, **8**, **9**, **11** y **12** se prepararon utilizando las condiciones de Buchwald-Hartwig mencionadas anteriormente, y en todos los casos los resultados fueron buenos (Esquema 4.1).

Las señales obtenidas en los espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , RMN de  $^{13}\text{C}$  y EM, corresponden a las esperadas para los compuestos **1-12** y se reportan en el Apéndice 1.

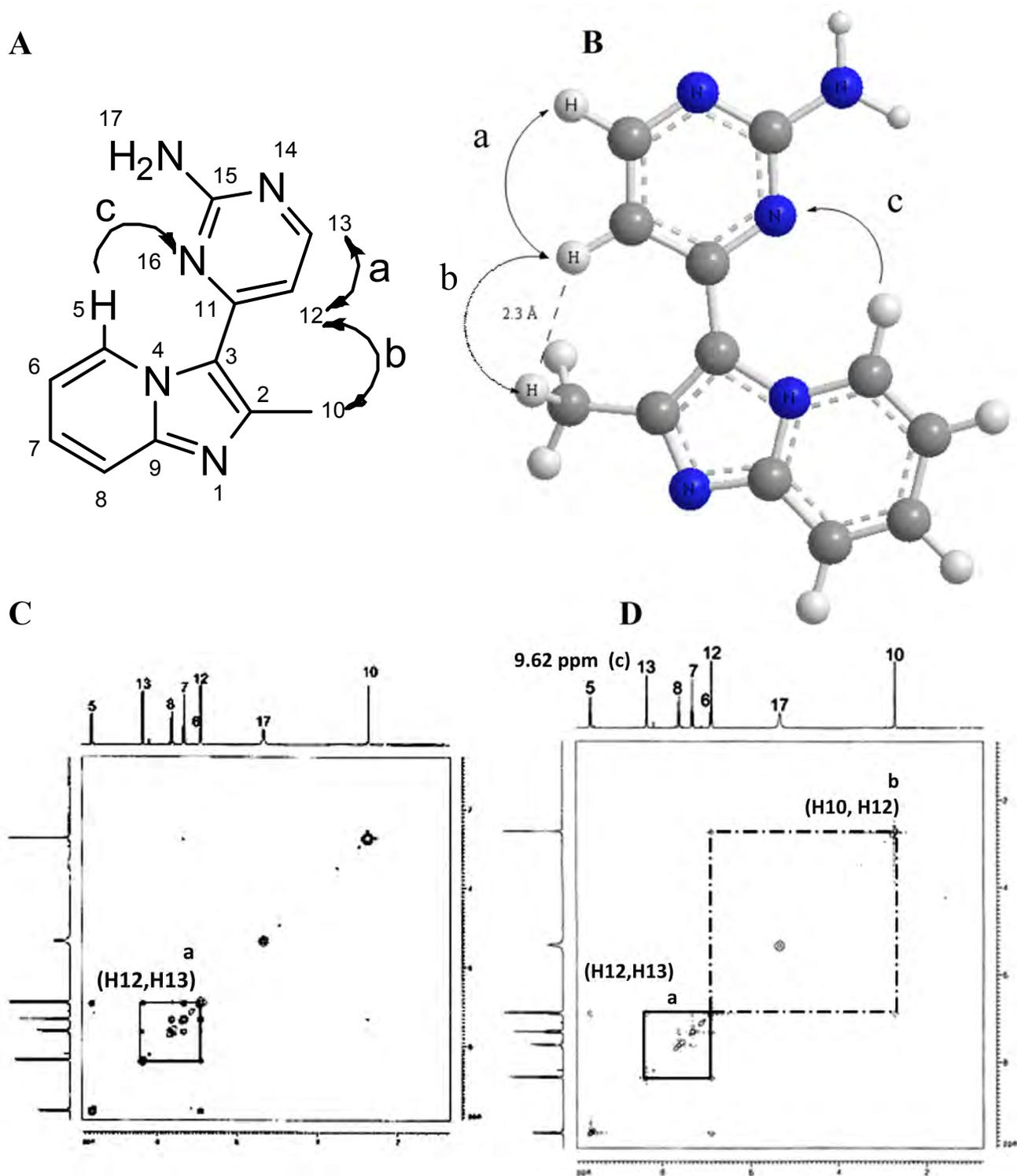


**Esquema 5.5.** Obtención del compuesto **7**. El alcohol propargílico **17** se esterifica rápidamente en presencia de acetato de etilo a temperatura ambiente.

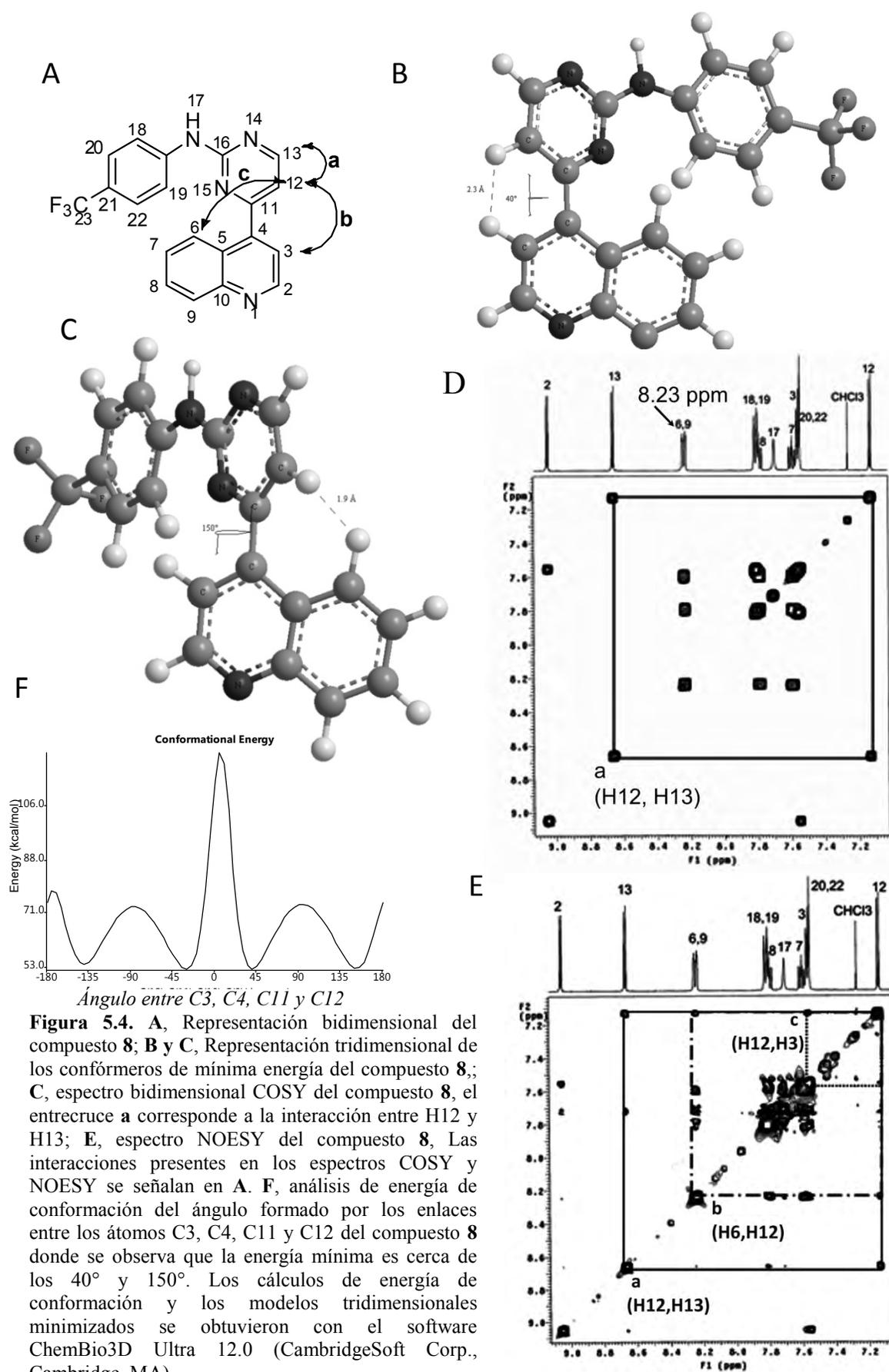
Los espectros bidimensionales de RMN reflejan la presencia de conformaciones diferentes para los compuestos que poseen anillos de 2-metilimidazo[1,2-*a*]piridina (compuestos **1-6**) y los que poseen anillos de quinolina (compuestos **7-12**).

Los compuestos con anillos de 2-metilimidazo[1,2-*a*]piridina poseen una conformación con un ángulo de aproximadamente cero grados entre los dos anillos unidos por el enlace pivote. Esto tiene como consecuencia la detección de interacciones dipolares observadas en el espectro NOESY entre los protones marcados como 10 y 12 (Figura 5.3 D). Adicionalmente, al igual que sucede para el compuesto **28** (Figura 5.1), se presenta un desplazamiento químico no usual del protón 5 del anillo de imidazo[1,2-*a*]piridina en 9.62 ppm (Figura 5.3 A, D). El desplazamiento químico del protón 5 de 2-metilimidazo[1,2-*a*]piridina es de 8.02 ppm (Figura 5.1), de manera que el desplazamiento químico a campo tan bajo de este protón 5 en el compuesto **27** puede deberse a la formación de un puente de hidrógeno entre el protón antes mencionado y el nitrógeno 16 de esta molécula (Figura 5.3 A, B). La estabilización mediante este puente de hidrógeno hace que los anillos unidos por el enlace bifenílico (C3-C11 Figura 5.3 A) se encuentren paralelos uno del otro adoptando la conformación mostrada en la Figura 5.4 B.

Por el contrario en los compuestos **10-12**, que poseen un anillo de quinolina, los anillos unidos por un enlace bifenílico se encuentran casi perpendiculares. Las evidencias encontradas para establecer esta configuración son la presencia de interacciones dipolares entre el protón 12 con ambos protones 6 y 3. Como ejemplo de esta conformación se muestra la molécula **8** (Figura 5.4 A, B, C). La minimización de la estructura mediante el método de cálculos energéticos MM2 da por resultado una conformación donde el ángulo formado por los átomos C3-C4-C11 y C12 se encuentra entre 40° y 150° (Figura 5.4 B, C, F). El protón 6 del compuesto **8**, que sería el equivalente del protón 5 de la molécula **27** (Figura 5.3 A), presenta un desplazamiento químico de 8.23 ppm (Figura 5.4 D y E) indicando con esto que el puente de hidrógeno formado en **27** está ausente en esta molécula.



**Figura 5.3.** **A**, Representación bidimensional del compuesto **27**; **B**, Representación tridimensional del compuesto **27**; **C**, COSY del compuesto **27** donde se muestra la interacción entre H12 y H13 (entrecruce **a**); **D**, NOESY del compuesto **27**, se muestran las interacciones NOESY entre los protones H10 y H12 (entrecruce **b**). Las interacciones presentes en los espectros COSY, NOESY y la interacción del protón 5 y el N 16 (**c**) se indican en **A** y **B**, esta última interacción se observa mediante el desplazamiento químico inusual del protón 5 (9.62 ppm).



**Figura 5.4.** A, Representación bidimensional del compuesto **8**; B y C, Representación tridimensional de los conformeros de mínima energía del compuesto **8**; D, espectro bidimensional COSY del compuesto **8**, el entrecruce **a** corresponde a la interacción entre H12 y H13; E, espectro NOESY del compuesto **8**, Las interacciones presentes en los espectros COSY y NOESY se señalan en A. F, análisis de energía de conformación del ángulo formado por los enlaces entre los átomos C3, C4, C11 y C12 del compuesto **8** donde se observa que la energía mínima es cerca de los 40° y 150°. Los cálculos de energía de conformación y los modelos tridimensionales minimizados se obtuvieron con el software ChemBio3D Ultra 12.0 (CambridgeSoft Corp., Cambridge, MA).

Después de completar la síntesis de los compuestos mencionados anteriormente y establecer su estructura inequívocamente, se procedió a la determinación de la citotoxicidad de los mismos en un panel de líneas celulares humanas. La primera aproximación de la actividad citotóxica se realizó a una concentración de 50  $\mu$ M (Tabla 4.2). Aunque las líneas celulares utilizadas difieren en su perfil genético y origen, se pueden observar algunas regularidades. Los compuestos **1-9** muestran mayor efectividad que el 5-fluorouracilo. En contraste, los compuestos **10-12** muestran una potencia menor que se traduce en una falta de actividad citotóxica. Las líneas celulares más sensibles son MCF7 y SK-LU-1. En la línea celular MCF7 la mayoría de los compuestos causaron un 100 por ciento de inhibición a la concentración utilizada. Por lo tanto, decidimos adicionalmente determinar los valores de concentración inhibitoria del 50% del crecimiento celular ( $CI_{50}$ ) aplicada únicamente en las líneas celulares más sensibles (MCF7 y SK-LU-1). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.1.

De las observaciones obtenidas en el presente trabajo podemos deducir que los compuestos más potentes son **1** y **2** en ambas líneas celulares. El cambio del grupo tolilo por un grupo tiazolilo reduce la actividad biológica del compuesto **3** comparado con el compuesto **1** (Tabla 4.1); sin embargo, no se puede descartar que esta disminución sea debida al grupo aldehído.

También es relevante mencionar que el reemplazo bioisostérico de los átomos de hidrógeno en el grupo metilo del *p*-tolilo, no afecta significativamente la actividad biológica de los compuestos **2** y **9** en comparación con el comportamiento de los compuestos **1** y **8** respectivamente. La sustitución de los átomos de hidrógeno del grupo metilo del grupo 2-metilimidazo[1,2-*a*]piridina por flúor (compuesto **5**) disminuyó la potencia 9 veces en SK-LU-1 y 0.74 veces en MCF7 al ser comparado con el compuesto **1**. El reemplazo por flúor en ambos grupos metilo, tolilo y 2-metilimidazo[1,2-*a*]piridina (compuesto **6**) produce solamente una disminución ligera en la potencia contra la línea MCF7 y un decremento moderado en las células SK-LU-1 (Tabla 4.1). Este reemplazo causa un incremento en la lipofilicidad debido a un efecto electroatractor que afecta las propiedades biológicas de la molécula. Por otro lado, tener un grupo trifluorometilo en la

molécula en lugar de un metilo incrementa la estabilidad metabólica del compuesto, lo cual puede ser una ventaja importante durante la realización de los estudios *in vivo*.

Con respecto a los compuestos que poseen un anillo 4-quinolinilo (**8** y **9**), tienen actividad citotóxica modesta en ambas líneas celulares, SK-LU-1 y MCF7. Comparando, el compuesto **1** es 71 veces más potente en la línea celular SK-LU-1 y diez veces más potente en MCF7 que el compuesto **8** (Tabla 4.1). Por otro lado, el compuesto **2** es 50 veces más potente en SK-LU-1 y 25 veces más potente en la línea celular MCF7 que el compuesto **9**. La citotoxicidad mostrada por los compuestos **11** y **12** no es significativa, indicando que el grupo 4-quinolinilo proporciona mayor actividad que el grupo 3-quinolinilo cuando sustituye al anillo de 2-metilimidazo[1,2-*a*]piridina. Los compuestos **4**, **7** muestran una potencia pobre al ser comparados con los compuestos *N*-arilo sustituidos; p. ej. **5** y **8** (Tabla 4.1).

Para empezar a elucidar el mecanismo de acción de los compuestos sintetizados en primer lugar se evaluó el efecto sobre el ciclo celular de las líneas SK-LU-1 y MCF7 por parte de los compuestos **1**, **3** y **8**. Los resultados obtenidos se observan en la Figura 4.1 y en la Tabla 4.3.

En la línea celular SK-LU-1 todos los compuestos causaron un aumento de la fase del ciclo celular G2/M y una disminución de la fase G1/G0 después de 24h de tratamiento con los compuestos probados y no se observa apoptosis celular sugerida a través de la presencia de un pico subG0. En la línea celular MCF7, sólo el compuesto **8** causó este efecto. La Olomoucina, el cual es un inhibidor de CDKs ampliamente estudiado, no causó diferencias significativas en el ciclo celular de la línea celular antes mencionada, a la concentración usada en el experimento. Aunque las diferencias observadas entre ambas líneas celulares podrían deberse a las diferencias en sus perfiles genéticos, no se puede descartar que el compuesto **8** posea actividad inhibitoria de otras proteínas diferentes a las que actúan los compuestos **1** y **3**, y que sean responsables del arresto celular observado en MCF7 (Figura 4.1, Tabla 4.3).

Si recurrimos a la microscopia de fluorescencia se puede observar que las células SK-LU-1 tratadas durante 48h con los compuestos **3**, **5** y **8** poseen un volumen celular

mayor al de las células cultivadas en condiciones estándar. Aparte del aumento en tamaño, se observa que las células han perdido su morfología normal y se presentan como células redondas (Figura 4.3). Este aumento de volumen es característico de células arrestadas en la fase G2/M. Durante la fase S del ciclo celular la célula ha completado la síntesis de una copia de su material genético y durante la fase G2 aumenta su volumen para formar dos células hijas. En la fase M se lleva a cabo la segregación de cada una de las copias del material genético a polos opuestos de la célula y después se divide en el ecuador en dos. Si el arresto por parte de los compuestos es en G2 o en M el efecto observado en el volumen celular es el mismo.

Como se observa en la Figura 4.1, a las 24h de tratamiento no se presenta un pico subG0 significativo. Para averiguar si los compuestos sintetizados causan apoptosis se utilizó un ensayo más específico para detectar este fenómeno, basado en el uso de anexina V-FITC, una proteína que se une a fosfatidilserina cuando hay calcio en el medio, y el colorante yoduro de propidio que tiñe el ADN.

Las células SK-LU-1 se trataron durante 24 y 48h con los compuestos **1**, **3**, **5** y **8**. Después del tratamiento se determinó la intensidad de fluorescencia verde y roja mediante citometría de flujo. A las 24h no se observó apoptosis significativa de las células tratadas con los compuestos bajo estudio con respecto al control. A las 48h la cantidad de células apoptóticas en los cultivos tratados con los compuestos antes mencionados aumento de manera significativa con respecto al cultivo control, y esta apoptosis es reciente ya que la mayoría de las células son positivas sólo para fluorescencia verde (Figura 4.2). Para confirmar la muerte celular por apoptosis se utilizó la técnica de TUNEL (Figura 4.3) tratando células SK-LU-1 durante 48h con los compuestos **3**, **5** y **8**. Esta técnica detecta fragmentación de ADN. En caso de que el ADN no se fragmente no se observará fluorescencia. En las células tratadas con los compuestos antes mencionados se observa tanto material genético fragmentado y condensado tanto en el núcleo (donde se distingue de dos a tres porciones de ADN fragmentado) como en la periferia interior de la membrana plasmática (Figura 4.3, marcado con una flecha).

De esta manera, se puede inferir que los compuestos causan primero un arresto en la fase G2/M en células SK-LU-1 que crecen de manera asincrónica y posteriormente las células mueren por apoptosis después de más de 24 horas de tratamiento.

Para demostrar que en el arresto en el ciclo celular está implicada la inhibición de las CDKs se midió la actividad de las CDK1/CycB y CDK2/CycA en ausencia y en presencia de los compuestos **1**, **2**, **3**, **8** y **11**. Este estudio se realizó a una concentración de 7  $\mu$ M, que corresponde a la  $CI_{50}$  sobre estas CDKs por parte de nuestro control positivo (Olomoucina).<sup>[118]</sup> El ensayo se hizo sólo a esta concentración y se observa que el compuesto **3** es el más activo de los compuestos estudiados (Tabla 4.4). En el ensayo de citotoxicidad este compuesto presenta un valor de  $CI_{50}$  más alto, comparado con el valor mostrado por **1** y **2**. Se sabe que los aldehídos se oxidan biológicamente a ácidos carboxílicos por medio de enzimas oxidantes, algunas de ellas son solubles como la aldehído deshidrogenasa.<sup>[125]</sup> Al pH celular (7.4) los ácidos carboxílicos se presentan como carboxilatos; los cuales al poseer carga negativa impiden el paso del compuesto a la célula donde va a actuar, y de esta manera aunque el compuesto sea mejor para inhibir la cinasa en un estudio enzimático su potencia es menor al exponerlo a las células integra.

Otro hecho interesante que se observa en este estudio es la actividad inhibitoria de CDKs por parte del compuesto **11** que es muy similar a la del compuesto **8** (ambos son isómeros de posición, Tabla 4.1). Sin embargo, el compuesto **11** nunca presentó actividad citotóxica considerable. La razón por la cual el compuesto **11** se comporta de esta manera no es evidente, pero vale la pena considerar que sí inhibe las CDKs estudiadas. Una causa probable de este comportamiento puede ser debida a las diferencias en el metabolismo de ambas moléculas. Las quinolinas se metabolizan para desecharse del organismo mediante la formación de un diol en la posición 5 y 6.<sup>[126]</sup> En el caso del compuesto **8** este metabolismo podría verse atenuado pues en la posición 4 se encuentra un anillo de pirimidina y que debido a impedimento estérico esta biotransformación no se lleva a cabo. En cambio en el compuesto **11** el anillo de pirimidina se encuentra en la posición 3 lo cual deja la posición 5 más susceptible a la oxidación. En resumen, se propone que las diferencias observadas entre la actividad citotóxica y la actividad inhibitoria de CDKs

pueden deberse a variaciones en la permeabilidad celular, distribución intracelular y/o al metabolismo de las moléculas.

Es relevante el hecho de que el compuesto **8** aunque no posee la misma conformación que los compuestos con anillo de imidazo[1,2-*a*]piridina se comporte como inhibidor de CDKs, lo cual sugiere que probablemente se une a la cinasa de manera diferente al compuesto **1**.

El valor de la  $CI_{50}$  sobre las cinasas CDK1/CycB y CDK2/CycA se determinó solamente para los compuestos **1**, **3** y **8**. Al igual que en el ensayo a una sola concentración el compuesto **3** posee mayor actividad inhibitoria sobre las CDK1 y CDK2, seguido por el compuesto **1** y siendo el último el compuesto **8** (Figura 4.4). En el caso de este último compuesto, en el ensayo a una concentración de 7  $\mu$ M se detectó mayor actividad inhibitoria sobre la CDK1 que sobre la CDK2. Por el contrario, los valores de  $CI_{50}$  indican que el compuesto **8** es moderadamente más potente para inhibir CDK2. Estos agentes actúan como sustancias que compiten con el ATP, por lo tanto los valores de inhibición obtenidos dependerán directamente de la concentración de ATP presente en el ensayo de manera que no pueden ser comparados entre ellos. En el caso del ensayo a una concentración de 7  $\mu$ M, se utilizó una técnica radiométrica y la concentración de ATP utilizada fue de 400  $\mu$ M más el  $ATP\gamma^{32}$  necesario para alcanzar un nivel de radioactividad de 4  $\mu$ Ci. Para determinar la  $CI_{50}$  se usó una técnica fluorométrica y una concentración de ATP de 34  $\mu$ M y 31  $\mu$ M para CDK1 y CDK2 respectivamente, correspondiente al valor de  $K_m$  app de estas enzimas. Sin embargo, ambos ensayos muestran que los compuestos inhiben a las CDK1 y 2, siendo el más activo el compuesto **3**. El compuesto **8** puede inhibir a otras enzimas que participen en el ciclo celular no identificadas en este ensayo, pues este compuesto inhibió el ciclo celular de MCF7, cosa que no provocaron los compuestos **1** y **3** ni la Olomoucina.

## 6. Conclusiones.

- Entre los compuestos que contienen un anillo de 2-metilimidazo[1,2-*a*]piridina, el remplazo de los átomos de hidrogeno por flúor no afecta notablemente la actividad citotóxica de estos compuestos.
- Los compuestos son ligeramente más potentes y selectivos contra CDK2/CycB que contra CDK1/CycA al determinar su  $CI_{50}$  en estas enzimas.
- Los compuestos **11-12** son inhibidores de cinasas pero no poseen actividad citotóxica hasta una concentración de 50  $\mu$ M.
- Los compuestos sustituidos con un anillo de 4-quinolinilo constituyen una nueva familia de compuestos con actividad citotóxica e inhibitoria de CDKs, de los cuales pueden ser diseñados compuestos más activos y selectivos.

## 7. Perspectivas

El compuesto **3** posee mayor actividad contra CDKs pero una menor actividad citotóxica, que nos lleva a pensar en la preparación de derivados en los cuales se reemplace el grupo aldehído por cetonas para determinar la importancia del grupo carbonilo. Este motivo también se incluirá en derivados del compuesto **8** para iniciar estudios de optimización.

Como los inhibidores de CDKs poseen otros efectos biológicos; tales como, actividad antiinflamatoria, evitan la muerte neuronal en ratones propensos al Alzheimer, actividad analgésica y potencian los efectos de otros fármacos citotóxicos se piensa realizar estudios adicionales sobre estos temas.

Por otro lado, aún queda pendiente elucidar la especificidad del compuesto **8** sobre otras cinasas.

## Apéndice 1. Parte química

Los puntos de fusión fueron determinados en capilares utilizando un aparato MEL-TEMP®, y no están corregidos. Los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$  fueron registrados en instrumentos Varian Gemini 200 MHz, Varian Unity 300 MHz, y Varian Inova 500 ( $^1\text{H}$  500 MHz y  $^{13}\text{C}$  125 MHz). Los desplazamientos químicos están expresados en unidades  $\delta$  como valores relativos al TMS, el cual se utilizó como estándar interno; los valores de  $J$  están reportados en Hz; los espectros fueron registrados en solución de  $\text{CDCl}_3$ , o en una mezcla de  $\text{CDCl}_3$  y  $\text{DMSO}-d_6$  cuando se presentaron problemas de solubilidad (compuestos **2**, **3**, **7**, **10** y **12**). La espectrometría de masas se realizó en un equipo JEOL JEM-SX 10217 utilizando la técnica de impacto electrónico (IE). Todos los reactivos utilizados en la síntesis fueron adquiridos de Sigma-Aldrich a menos que se indique otro proveedor en el texto. Los disolventes fueron destilados antes de ser utilizados. El tetrahidrofurano (THF) y el tolueno fueron secados con sodio usando benzofenona como indicador. La bromoacetona fue obtenida de bromo y acetona<sup>[127]</sup> y se destiló a presión reducida antes de usarse. La gel de sílice (malla 230-400) utilizada en los procesos cromatográficos fue adquirida de Merck. Las estructuras de los compuestos se muestran en la Figura 3.1 y en el Esquema 4.1.

### A.1.1. Método general de síntesis de los compuestos **13** y **14**.

En un matraz bola con dos bocas, adaptado con agitación magnética, refrigerante en posición de reflujo y septum, se disolvió un equivalente de 2-aminopiridina en una mezcla de etanol-dioxano 3:1, la mezcla se enfrió en baño de hielo. Posteriormente, utilizando una jeringa se adicionaron lentamente y con agitación constante 1.1 equivalentes de la bromoacetona apropiada. Al terminar la adición, se retiró el baño de hielo y la mezcla de reacción se dejó agitando vigorosamente durante dos horas a temperatura ambiente. Después de este tiempo se forma un sólido que permanece en suspensión. Posteriormente se adiciona a la mezcla tres equivalentes de trietilamina y se calienta a reflujo durante la noche. Los compuestos volátiles se eliminan en el rotavapor y se

adiciona agua para remover las sales formadas. La purificación particular de cada compuesto se detalla a continuación.

#### **A.1.1.1. 2-metilimidazo[1,2-*a*]piridina (**13**)**

Al adicionar agua se forma una suspensión que se extrae con acetato de etilo. La fase orgánica se seca con sulfato de sodio anhidro y se evapora en el rotavapor para obtener un residuo aceitoso de color café. El residuo aceitoso se destiló a presión reducida para dar el compuesto **13** como un líquido amarillento que solidifica y es estable a 4°C, a temperatura ambiente el líquido se torna color café y presenta signos de descomposición por CCF. Rendimiento 50%. p. e. 108-110 °C/ 6 mmHg. RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ: 2.46 (d, 3H, *J*=0.8 Hz), 6.71 (td, 1H, *J*=1.2, 6.6 Hz), 7.10 (ddd, 1H, *J*=1.2, 5.6, 9.0 Hz), 7.33 (s, 1H), 7.50 (dd, *J*=0.8, 9.0 Hz), 8.02 (dt, 1H, *J*=1.2, 6.8 Hz). C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub> P. M. calculado: 132.16. EM [IE+] *m/z*: 132 [M]<sup>+</sup> (100), 131 [M-H]<sup>+</sup> (80).

#### **A.1.1.2. 2-(trifluorometil)imidazo[1,2-*a*]piridina (**14**)**

Al adicionar agua se forma un sólido que es separado por filtración al vacío. El sólido obtenido se secó a presión reducida y se purificó por cromatografía en columna utilizando una mezcla de AcOEt-Hexano 1:1 como eluyente. Después de recristalizar de hexano, se obtuvo el compuesto **14**, como un sólido blanco, con un 75% de rendimiento. p. f. 91-92 °C. RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ: 6.92 (td, 1H, *J*=1.2, 6.9 Hz), 7.31 (ddd, 1H, *J*=1.2, 6.9, 9.3 Hz), 7.89 (s, 1H), 8.15 (td, 1H, *J*=1.2, 6.9 Hz). RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz), δ: 111.5, 114.0, 118.7, 122.0 (q, *J*=267.5 Hz), 126.2, 126.5, 136.0 (q, *J*=38 Hz), 145.4. C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub> P. M. calculado: 186.13 EM [IE+] *m/z*: 186 [M]<sup>+</sup> (100), 167 [M-F]<sup>+</sup> (15).

#### **A.1.2. Método general para la obtención de los compuestos **15** y **16**.**

En un matraz con tres bocas, adaptado con agitación magnética, septo y trampa de humedad, se colocó un exceso de DMF anhidra y se enfrió a 0°C mediante un baño de hielo-agua. Posteriormente se adicionaron 2.5 equivalentes de POCl<sub>3</sub>, cuidando que la temperatura no rebasara los 10°C, y la mezcla se agitó durante 15 minutos, durante el cual se desarrolló un color rosáceo muy ligero. Inmediatamente después se adicionó un

equivalente del compuesto **13** ó **14** en una sola porción y la mezcla se agitó vigorosamente durante una hora. Al finalizar este tiempo, la mezcla de reacción se calentó a 60°C durante 24 horas o hasta que no se detectó materia prima por CCF. Cuidadosamente se adicionó hielo picado a la reacción y se neutralizó con hidróxido de amonio. La purificación de cada compuesto se detalla a continuación.

#### **A.1.2.1. 2-metilimidazo[1,2-*a*]piridina-3-carboxaldehído (**15**)**

Se formaron dos fases, se separó la fase superior, que correspondía a la orgánica, y se extrajo la fase acuosa con diclorometano. Se juntaron las fases orgánicas, se secaron con sulfato de sodio anhidro y el diclorometano se evaporó en el rotavapor. Se obtuvo un compuesto oleoso que se disolvió en hexano caliente, al enfriar se formó un sólido. El sólido se purificó por recristalización, utilizando hexano, para obtener un sólido blanco. Rendimiento 44%. p. f. 119-120 °C. RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ: 2.73 (s, 3H), 7.07 (td, 1H, *J*=1.2, 6.8 Hz), 7.52 (ddd, 1H, *J*=1.2, 6.8, 9.0 Hz), 7.68 (td, 1H, *J*=1.2, 9.0 Hz), 10.01 (s, 1H). RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz) δ: 114.4, 114.8, 116.6, 121.2, 128.3, 130.0, 147.6, 157.1, 176.9. C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O P. M. calculado: 160.17 EM [IE+] *m/z*: 160 [M]<sup>+</sup> (100), 159 [M-H]<sup>+</sup> (98), 131 [M-CHO]<sup>+</sup> (25).

#### **A.1.2.2. 2-(trifluorometil)imidazo[1,2-*a*]piridina-3-carboxaldehído (**16**).**

Se formó un sólido que se separó por filtración al vacío, se lavó con agua fría y se secó al aire. El producto se purificó por columna utilizando AcOEt-Hexano 9:1 como fase móvil. El sólido obtenido se recristalizó de hexano para obtener el compuesto **16** como hojuelas blancas. Rendimiento 52%. p. f. 116-118 °C. RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) 7.28 (td, 1H, *J*=1.2, 7.0 Hz), 7.68 (ddd, 1H, *J*=1.2, 6.8, 9.0 Hz), 7.90 (dt, 1H, *J*=1.2, 9.0 Hz), 9.65 (dt, 1H, *J*=1.2, 7 Hz), 10.22 (s, 1H). RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz) δ: 114.5, 114.8, 116.6, 122.0 (q, *J*=267.5 Hz), 128.3, 130.0, 147.6, 157.1, 177.0. C<sub>9</sub>H<sub>5</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O P. M. calculado: 214.14 EM [IE+] *m/z*: 214 [M]<sup>+</sup> (100), 195 [M-F]<sup>+</sup> (75), 185 [M-CHO]<sup>+</sup> (20).

### A.1.3. Método general de síntesis de los compuestos **4, 7, 10 y 27**.

En un matraz bola con tres bocas, adaptado con agitación magnética, termómetro para temperaturas bajas, atmósfera inerte y septum, se colocó un equivalente de uno de los aldehídos correspondientes **15, 16, 17** ó **18** y se disolvieron en THF anhidro. La disolución se enfrió a  $-70^{\circ}\text{C}$  en un baño de acetona-hielo seco. Se adicionaron lentamente 2 equivalentes de bromuro de etil magnesio 0.5 M disuelto en THF. La mezcla se agitó por 30 minutos y se permitió que la reacción alcanzara la temperatura ambiente. Se adicionó solución de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  saturada y se agitó. Se separó la fase orgánica y la fase acuosa se lavó con THF. Se reunieron las fracciones orgánicas, se secaron con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se evaporaron los compuestos volátiles con el rotavapor. La reacción es cuantitativa, una pequeña porción de los productos se cristalizaron por par de disolventes AcOEt hexano, excepto el compuesto **22** que es inestable. De esta manera se obtienen los compuestos **19-22**.

Los derivados de alcohol propargílico **19, 21 y 22** se oxidaron con 35 equivalentes de  $\text{MnO}_2$  pH=7 (un oxidante básico altera notablemente la reacción, sobre todo con el compuesto **21**) en acetona libre de agentes reductores (acetona destilada de  $\text{KMnO}_4$ ) por 30 minutos o hasta que desapareció la materia prima por CCF, utilizando agitación magnética. Después de que finalizó la reacción, se separó el  $\text{MnO}_2$  que no reaccionó por filtración al vacío y lavó con acetona. Se evaporó la acetona en un rotavapor obteniéndose los compuestos **23, 25** ó **26**, los cuales se obtienen con la pureza suficiente para la siguiente reacción; una muestra analítica se obtiene recristalizando el producto de hexano o por par de disolventes hexano-acetato de etilo. El compuestos **20** se oxidó utilizando 5 equivalentes de  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$  en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -agua 85:15, utilizando 7% de sulfato monoácido de tetrabutilamonio como catalizador de transferencia de fase. La mezcla se agitó vigorosamente y se calentó a reflujo por una hora. Al cabo de este tiempo, se diluyó la mezcla de reacción con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se lavo con salmuera. La fase orgánica se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se evaporó en un rotavapor para obtener un sólido que corresponde al compuesto **24**, el cual se utilizó en la siguiente reacción sin mayor purificación.

En un matraz bola con una boca, adaptado con agitación magnética, refrigerante en posición de reflujo y atmósfera inerte, se disolvieron los compuestos **23-26** en *n*-butanol, para el compuesto **24** se utilizó etanol-agua 85:15, y se hicieron reaccionar con 2 equivalente de sulfato de guanidina en presencia de 3 equivalentes de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, la mezcla de reacción se calentó en baño de aceite durante doce horas o hasta que desapareció la materia prima. Al finalizar la reacción, todos los volátiles se eliminaron a presión reducida y el sólido obtenido se colocó en un vaso de precipitados con acetona y se agitó utilizando agitación magnética. Los sólidos suspendidos se eliminaron por filtración y se desecharon. El disolvente se eliminó en el rotavapor y el sólido obtenido se purificó para obtener el compuesto deseado. La purificación particular de cada compuesto se describe a continuación.

#### **A.1.3.1.** 3-(2-aminopirimidin-4-il)-2-(trifluorometil)imidazo[1,2-*a*]piridina (**4**)

Se purificó por cromatografía en columna con AcOEt como eluyente para obtener el 29% de un polvo amarillo. p.f. 230-231 °C; RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ: 7.00 (d, 1H, *J*=5.4 Hz), 7.02 (dd, 1H, *J*=1.2, 9.2 Hz), 7.44 (td, 1H, *J*=1.4, 9.2 Hz), 7.78 (dd, 1H, *J*=1.2, 9.2 Hz), 8.40 (d, 1H, *J*=5.4 Hz), 9.20 (dd, 1H, *J*=1.2, 7.2 Hz). C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>F<sub>3</sub>N<sub>5</sub> P. M. calculado: 279.22 EM [IE+] *m/z*: 279 [M]<sup>+</sup> (100), 278 [M-H]<sup>+</sup> (55), 258 [M-H<sub>2</sub>F]<sup>+</sup> (20).

#### **A.1.3.2.** 4-(2-aminopirimidin-4-il)quinolina (**7**)

Purificado por cromatografía en columna utilizando AcOEt-Hexano 9:1 para obtener 10% del compuesto deseado como un sólido amarillo. p.f. 228-229°C (desc.) RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>+DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) δ: 6.30 (s, 2H); 6.78 (d, 1H, *J*= 5.0 Hz); 7.45 (d, 1H, *J*= 4.5 Hz); 7.50 (ddd, 1H, *J*= 1.5, 6.5, 8.5 Hz), 7.68 (ddd, 1H, *J*= 1.4, 6.8 Hz, 8.6 Hz); 8.04 (dd, 1H, *J*= 0.5 Hz, 8.0 Hz); 8.16 (dd, 1H, *J*=1.0, 8.5 Hz); 8.35 (d, 1H, *J*=5.0 Hz), 8.90 (d, 1H, *J*=4.5 Hz). RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>+DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125.7 MHz) δ: 110.3, 120.2, 124.6, 125.2, 126.4, 128.9, 129.1, 143.9, 148.0, 149.4, 158.4, 163.1, 164.1. C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub> P. M. calculado: 222.25 EM [IE+] *m/z*: 222 [M]<sup>+</sup> (70), 221 [M-H]<sup>+</sup> (100).

#### A.1.3.3. 3-(2-aminopirimidin-4-il)quinolina (**10**)

El compuesto **10** fue purificado por cromatografía en columna utilizando AcOEt-Hexano para obtener el 20% de un sólido amarillo. p.f. 252-253°C (desc.), RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$  +  $\text{DMSO}-d_6$ , 200 MHz)  $\delta$ : 5.64 (sa, 2H), 7.21 (d, 1H,  $J=5.2$  Hz), 7.62 (td, 1H,  $J=1.2, 7.0$  Hz), 7.79 (td, 1H,  $J=1.2, 6.8$  Hz), 7.97 (dd, 1H,  $J=0.6, 8.2$  Hz), 8.14 (d, 1H,  $J=8.4$  Hz), 8.43 (d, 1H,  $J=5.2$  Hz, H-8), 8.81 (d, 1H,  $J=1.8$  Hz), 9.52 (d, 1H,  $J=2.4$  Hz).  $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{N}_4$  P. M. calculado: 222.25 EM [IE+] m/z: 222 [M] $^{+}$  (85), 221 [M-H] $^{+}$  (100).

#### A.1.3.4. 3-(2-aminopirimidin-4-il)-2-metilimidazo[1,2-*a*]piridina (**27**)

Purificado por cromatografía en columna utilizando EtOAc-acetona 1:1 para obtener 75% de rendimiento de un sólido amarillo. p. f. 167°C, RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$ : 3.10 (s, 3H), 6.87 (d, 1H,  $J=5.4$  Hz), 6.88 (td, 1H,  $J=1.2, 6.9$  Hz), 7.30 (ddd, 1H,  $J=1.2, 6.6, 9.0$  Hz), 7.61 (dt, 1H,  $J=1.2, 9.0$  Hz), 9.62 (dt, 1H,  $J=1.2, 9.0$  Hz). RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75.5 MHz)  $\delta$ : 16.8, 10.0, 112.6, 116.6, 126.3, 127.8, 128.6, 146.2, 147.1, 158.0, 158.2, 162.6.  $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{N}_5$  P. M. calculado: 225.25 EM [IE+] m/z: 225 [M] $^{+}$  (85), 224 [M-H] $^{+}$  (100).

#### A.1.4. Procedimiento general para sintetizar los compuestos **1-3, 5, 6, 8, 9, 11 y 12**

El éxito de esta reacción depende de las buenas prácticas de laboratorio que se utilicen para manejar reacciones en atmosfera inerte, una guía adecuada y con las recomendaciones necesarias se encuentra en la referencia [128]. Brevemente, en un matraz Schlenk se adicionó un equivalente de compuesto a agregar un *N*-arilo (**4, 7, 10** ó **27**), 1.1 equivalentes del haluro de arilo adecuado, 3-5% de Xantphos, 3-5%  $\text{Pd}(\text{dba})_2$  y 3 equivalentes de  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ . El matraz se saturó con nitrógeno y purgó al vacío por lo menos tres veces. Se adicionó tolueno anhidro y saturado con nitrógeno hasta cubrir todos los sólidos. Se saturó la atmosfera del matraz y purgó al vacío por lo menos dos veces. La mezcla de reacción se calentó a 80°C en un baño de aceite hasta que la materia prima se consumió o la reacción no procedía más (4-12 h). Después, la reacción se dejó reposar a temperatura ambiente y los sólidos se removieron por filtración al vacío y enjuagaron con

suficiente AcOEt. Todos los compuestos fueron purificados por cromatografía en columna como se describe a continuación.

**A.1.4.1. 2-metil-3-(2-(*p*-tolilamino)pirimidin-4-il)imidazo[1,2-*a*]piridina (1)**

Se utilizó acetato de etilo como fase móvil para obtener el 80% de un sólido verde pálido. p.f. 190°C (desc.); RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz)  $\delta$ : 2.36 (s, 3H), 2.74 (s, 3H), 6.78 (td, 1H,  $J=1.4, 7.0$  Hz), 6.95 (d, 1H,  $J=5.4$  Hz), 7.17 (d, 2H,  $J=8.2$  Hz), 7.29 (ddd, 1H,  $J=1.2, 6.8, 9.0$  Hz), 7.49 (d, 2H,  $J=8.4$  Hz), 7.61 (dt, 1H,  $J=1.2, 9.0$  Hz), 8.44 (d, 1H,  $J=5.6$  Hz), 9.59 (dt, 1H,  $J=1.2, 7.0$  Hz); RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75.5 MHz)  $\delta$ : 17.1, 20.8, 109.3, 112.5, 116.7, 120.9, 126.4, 128.3, 129.4, 132.8, 136.6, 146.3, 147.3, 157.6, 157.9, 160.1;  $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_5$  P. M. calculado: 315.37 EM [IE+]  $m/z$ : 315 [M] $^{+}$  (95), 314 [M-H] $^{+}$  (100).

**A.1.4.2. 2-metil-3-(2-(4-(trifluorometil)fenilamino)pirimidin-4-il)imidazo[1,2-*a*]piridina (2)**

Se utilizó AcOEt como eluyente para obtener el 95 % del compuesto deseado como un polvo amarillo. p.f. 201-202°C (desc.); RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz)  $\delta$ : 2.76 (s, 3H), 6.87 (td, 1H,  $J=1.2, 6.8$  Hz), 7.06 (d, 1H,  $J=5.4$  Hz), 7.35 (ddd, 1H,  $J=1.4, 7.0, 9$  Hz), 7.38 (señal ancha, 1H), 7.59 (d, 2H,  $J=8.2$  Hz), 7.65 (dt, 1H,  $J=1.2, 9.0$  Hz), 7.79 (d, 2H,  $J=8.4$  Hz), 8.52 (d, 1H,  $J=5.4$  Hz), 9.55 (dt, 1H,  $J=1.2, 7.0$  Hz), RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3+\text{DMSO}-d_6$ , 75.5 MHz)  $\delta$ : 16.4, 109.6, 112.2, 116.0, 118.4, 119.8 (q,  $J=265.76$  Hz), 125.3 (q,  $J=4.53$  Hz), 126.1, 127.7, 143.0, 145.7, 146.7, 156.9, 157.3, 159.3.  $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{N}_5$  P. M. calculado: 369.34 EM [IE+]  $m/z$ : 369 [M] $^{+}$  (100), 368 [M-H] $^{+}$  (92).

**A.1.4.3. 5-(4-(2-metilimidazo[1,2-*a*]piridin-3-il)pirimidin-2-ilamino)tiofeno-2-carbaldehído (3)**

Se eluyó con AcOEt-Hexano 6:4 para obtener 65 % de hojuelas verdes oscuras. p.f. 235°C (desc.); RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3+\text{DMSO}-d_6$ , 200 MHz)  $\delta$ : 2.68 (s, 3H), 6.83 (d, 1H,  $J=4.2$  Hz), 6.92 (td, 1H,  $J=1.2, 6.8$  Hz), 7.02 (d, 1H,  $J=5.4$  Hz), 7.33 (ddd, 1H,  $J=1.0$  Hz,  $J=6.8$  Hz,  $J=8.8$  Hz),

7.55 (d, 1H,  $J=4.2$  Hz), 7.57 (d, 1H,  $J=8.8$  Hz), 8.53 (d, 1H,  $J=5.4$  Hz), 9.65 (s, 1H), 9.67 (d, 1H,  $J=8.6$  Hz), 11.05 (s, 1H); RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3+\text{DMSO}-d_6$ , 75.5 MHz)  $\delta$ : 16.2, 110.2, 110.9, 112.5, 115.8, 117.6, 126.6, 128.0, 131.7, 136.6, 145.5, 146.5, 152.0, 156.7, 156.9, 181.9.  $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{OS}$  P. M. calculado: 335.38 EM [IE+]  $m/z$ : 335 [M] $^{+\bullet}$  (100), 209 [M-C $_5\text{H}_4\text{ONS}$ ] $^{+\bullet}$  (18).

**A.1.4.4.** 3-(2-(*p*-tolilamino)pirimidin-4-il)-2-(trifluorometil)imidazo[1,2-*a*]piridina (5)

Se utilizó AcOEt como fase móvil para obtener el 83% de un sólido amarillo. p.f. 133-134 °C; RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz)  $\delta$ : 2.34 (s, 3H), 6.94 (td, 1H,  $J=7.0$ , 1.4 Hz) 7.11 (dq, 1H,  $J=5.2$ , 1.0 Hz), 7.15 (d, 2H,  $J=8.4$  Hz), 7.08 (d, 1H), 7.42 (ddd, 1H,  $J=1.4$ , 6.4, 8.2 Hz), 7.49 (d, 2H,  $J=8.4$  Hz), 7.78 (ddd, 1H,  $J=1.0$ , 6.2, 8.2 Hz), 8.54 (d, 1H,  $J=5.2$  Hz), 9.21 (dd, 1H,  $J=1.2$ , 7.2 Hz).  $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{N}_5$  P. M. calculado: 369.34 EM [IE+]  $m/z$ : 329 [M] $^{+\bullet}$  (75), 328 [M-H] $^{+\bullet}$  (100)

**A.1.4.5.** 2-(trifluorometil)-3-(2-(4-(trifluorometil)fenilamino)pirimidin-4-il)imidazo[1,2-*a*]piridina (6)

Se utilizó AcOEt-Hexano 9:1 como fase móvil para obtener 92% del compuesto propuesto como un sólido blanco. p.f. 217-218 °C; RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$ : 6.98 (td, 1H,  $J=1.5$ , 7.0 Hz), 7.22 (dd, 1H,  $J=1.0$ , 5.0 Hz), 7.46 (ddd, 1H,  $J=1.2$ , 6.5, 9.0 Hz), 7.48 (señal ancha, 1H), 7.58 (d, 2H,  $J=8.5$ ), 7.77 (d, 2H,  $J=8.5$  Hz), 7.81 (dt, 1H,  $J=1.0$ , 9 Hz), 8.63 (d, 1H,  $J=5.5$  Hz), 9.14 (dt, 1H,  $J=1.5$ , 7.5 Hz); RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125.7 MHz)  $\delta$ : 113.6, 114.6, 118.6, 118.8, 118.9, 126.3, 126.9, 127.9, 142.2, 145.6, 155.4, 159.3, 159.4.  $\text{C}_{19}\text{H}_{11}\text{F}_6\text{N}_5$  P. M. calculado: 423.31 EM [IE+]  $m/z$ : 423 [M] $^{+\bullet}$  (85), 422 [M-H] $^{+\bullet}$  (100).

**A.1.4.6.** 4-(2-(*p*-tolilamino)pirimidin-4-il)quinolina (8)

Se eluyó con AcOEt-Hexano 1:1 y se recristalizó de acetonitrilo para dar un rendimiento del 75% de un sólido amarillento. p.f. 205-207 °C (desc.) RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz)  $\delta$ : 2.32 (s, 3H), 7.00 (d, 1H,  $J=5.1$  Hz); 7.13 (d, 1H,  $J=8.4$  Hz), 7.36 (sa, 1H), 7.53 (d, 1H,  $J=4.2$

Hz), 7.54 (d, 2H,  $J=8.4$  Hz), 7.58 (ddd, 1H,  $J=1.2, 6.8, 8.4$  Hz); 7.78 (ddd, 1H,  $J=1.4, 6.8, 8.4$  Hz); 7.8 (d, 2H,  $J=8.0$  Hz), 8.23 (dd, 1H,  $J=0.8, 8.6$  Hz); 8.24 (dd, 1H,  $J=1.0, 8.4$  Hz); 8.58 (d, 1H,  $J=5.0$  Hz); 9.02 (d, 1H,  $J=4.4$  Hz). RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz)  $\delta$ : 20.8, 112.7, 119.7, 120.9, 125.4, 127.2, 129.5, 129.7, 130.1, 132.6, 136.5, 144.2, 148.9, 150.0, 158.7, 160.3, 165.0.  $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_4$  P. M. calculado: 312.37 EM [IE+]  $m/z$ : 312  $[\text{M}]^{+\bullet}$  (95), 311  $[\text{M-H}]^{+\bullet}$  (100).

#### A.1.4.7. 4-(2-(4-(trifluorometil)fenilamino)pirimidin-4-il)quinolina (**9**).

Eluido con AcOEt-Hexano 1:1 para obtener el compuesto mencionado como un sólido blanco con un rendimiento del 96%. p.f. 187-188°C, RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$ : 7.13 (d, 1 H,  $J=5.5$  Hz), 7.55 (d, 1H,  $J=4$  Hz), 7.56 (d, 2H,  $J=9.0$  Hz), 7.59 (ddd, 1H,  $J=1.2, 6.5, 8.5$  Hz), 7.70 (sa, 1H), 7.79 (ddd, 1H,  $J=1.2, 7.0, 8.5$  Hz), 7.81 (d, 2H,  $J=8.5$  Hz), 8.23 (dd, 1H,  $J=1.0, 7.5$  Hz), 8.24 (dd, 1H,  $J=1.0, 8.0$  Hz), 8.66 (d, 1H,  $J=5.0$  Hz), 9.05 (d, 1H,  $J=4.5$  Hz); RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125.7 MHz)  $\delta$ : 113.8, 118.4, 120.9, 124.3 (q,  $J=33.18$ ), 124.3 (q,  $J=270.6$  Hz), 126.2 (q,  $J=3.8$  Hz), 127.4, 129.8, 130.2, 142.4, 143.8, 148.9, 158.8, 159.7, 165.2.  $\text{C}_{20}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{N}_4$  P. M. calculado: 366.34 EM [IE+]  $m/z$ : 366  $[\text{M}]^{+\bullet}$  (80), 365  $[\text{M-H}]^{+\bullet}$  (100).

#### A.1.4.8. 3-(2-(*p*-tolilamino)pirimidin-4-il)quinolina (**11**)

Se utilizó AcOEt-Hexano 1:1 como eluyente y recristalizó de acetonitrilo para obtener el 83% de un sólido amarillo. P. f. 209-210°C; RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz)  $\delta$ : 2.36 (s, 3H), 7.29 (d, 2H,  $J=8.4$  Hz), 7.28 (d, 1H,  $J=5.0$  Hz), 7.33 (sa, 1H), 7.60 (d, 2H,  $J=8.6$  Hz), 7.62 (td, 1H,  $J=1.2, 8.0$  Hz), 7.79 (ddd, 1H,  $J=1.4, 7.0, 8.4$  Hz), 7.95 (dd, 1H,  $J=1.2, 8.2$  Hz), 8.17 (d, 1H,  $J=8.2$ ), 8.53 (d, 1H,  $J=5.2$  Hz), 8.81 (d, 1H,  $J=1.8$  Hz), 9.61 (d, 1H,  $J=2.2$  Hz); RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75.5 MHz)  $\delta$ : 20.8, 108.1, 119.8, 127.3, 127.5, 128.7, 129.0, 129.4, 129.5, 129.7, 130.8, 132.5, 134.7, 136.7, 149.0, 159.0, 160.5, 162.5;  $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_4$  P. M. calculado: 312.37 EM [IE+]  $m/z$ : 312  $[\text{M}]^{+\bullet}$  (85), 311  $[\text{M-H}]^{+\bullet}$  (100).

#### A.1.4.9. 3-(2-(4-(trifluorometil)fenilamino)pirimidin-4-il)quinolina (**12**)

Se usó AcOEt-Hexano 1:1 como fase móvil para obtener el 91% de un sólido blanco. p.f. 258°C (desc.) RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3+\text{DMSO}-d_6$ , 200 MHz)  $\delta$ : 7.44 (d, 1H, J=5.4 Hz), 7.59 (d, 2H, J=8.6 Hz), 7.66 (ddd, 1H, J=1.2, 6.8, 8.0 Hz), 7.83 (ddd, 1H, J=1.4, 6.8, 8.4 Hz), 8.02 (d, 2H, J=8.6 Hz), 8.02 (d, 1H, J=8.4 Hz), 8.16 (d, 1H, J=8.6 Hz), 8.62 (d, 1H, J=5.2 Hz), 8.87 (d, 1H, J=2.2 Hz), 9.31 (señal ancha, 1H), 9.64 (d, 1H, J=2.2 Hz).  $\text{C}_{20}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{N}_4$  P. M. calculated: 366.34 EM [IE+] m/z: 366 [M]+• (5), 365 [M-H]+• (10), 263 [M-C $7\text{H}_5\text{N}$ ]+•(100)

## Apéndice 2. Parte biológica

### A.2.1. Cultivo celular y ensayo de actividad citotóxica

La actividad citotóxica de los compuestos **1-12** se determinó mediante el ensayo de la sulforrodamina B (SRB). Las líneas celulares humanas U251 (glioma), PC-3 (próstata), K562 (leucemia), HCT-15 (colon), MCF7 (mama) y SK-LU-1 (pulmón) fueron cultivadas en medio RPMI-1640, suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2 mM L-glutamina, 100 UI  $\text{mL}^{-1}$  de penicilina G, 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de sulfato de estreptomicina y 0.25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de amfotericina B. Las líneas celulares se incubaron en una atmósfera al 5% de  $\text{CO}_2$ , 95% de humedad y a una temperatura de 37°C. Las células en fase logarítmica de crecimiento se desprendieron y disgregaron por triptinización y contaron mediante una cámara de Neubauer. En placas de 96 pozos se inocularon 5-10 $\times 10^3$  células por pozo e incubaron durante 24 horas. Después de la incubación, se cambió el medio de cultivo y se agregó medio fresco el cual contenía uno de los presuntos compuestos citotóxicos, los cultivos se incubaron durante 48 horas más. Las sustancias **1-12** fueron disueltas en DMSO para tener una solución stock, fluorouracilo se utilizó como control positivo de citotoxicidad. Se preparó un control negativo utilizando DMSO a la concentración más alta utilizada durante el ensayo de citotoxicidad y no se observaron efectos sobre el crecimiento celular.

Al finalizar la incubación en presencia de los compuestos probados, el medio de cultivo se eliminó y las células adheridas a la placa se fijaron *in situ* mediante la adición de

50  $\mu$ L de ácido tricloroacético 50 % (wt/vol) a 4°C y se incubaron a esa misma temperatura durante 1 hora. El sobrenadante se descartó, las placas se lavaron con agua y se secaron al aire. Las células fijadas se tiñeron con 100  $\mu$ L de solución al 0.4% de SRB. Las proteínas unidas al colorante se solubilizaron con Tris 10 mM y la densidad óptica se leyó en un lector de microplacas (Elx 808; Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) a una longitud de onda de 515 nm. Se realizó un tamizaje preliminar a una concentración de 50  $\mu$ M para todos los compuestos en todas las líneas celulares y la  $CI_{50}$  se obtuvo solamente para las líneas celulares más sensibles a los compuestos sintetizados. Para obtener la  $CI_{50}$  se realizó una curva dosis-respuesta para cada compuesto, y el valor de  $CI_{50}$  se estimó utilizando regresión no lineal mediante el software JMP (version 3.2.1.; SAS Institute Inc. Cary, NC, USA).

#### **A.2.2. Análisis del ciclo celular (citometría de flujo)**

Las líneas celulares MCF7 y SK-LU-1 se subcultivaron a una densidad de  $1 \times 10^6$  en cajas Petri de cultivo de 100X20 mm. Después de un periodo de 24 horas de cultivo celular en condiciones normales, el medio de cultivo se cambió por medio con compuesto a evaluar y los cultivos celulares se incubaron durante 24 horas. Las concentraciones utilizadas fueron 0.04  $\mu$ M de compuesto **1**, 8.4  $\mu$ M de compuesto **2** y 1  $\mu$ M de compuesto **8** en la línea celular SK-LU-1 y 0.118  $\mu$ M de compuesto **1**, 8.4  $\mu$ M de compuesto **3** and 1  $\mu$ M de compuesto **10** en la línea celular MCF7. Concluido el tratamiento, las células suspendidas se descartaron y las células adheridas se cosecharon por triptinización y se centrifugaron a 3,000 rpm. El paquete celular se resuspendió en PBS (pH=7.4) y centrifugó nuevamente durante 5 minutos a 3000 rpm. El PBS se descartó, los tubos se colocaron boca abajo en papel absorbente durante 5 minutos. Las células se suspendieron en el PBS remanente en el tubo de centrifuga y fijaron en etanol al 70% a 4°C por al menos durante 12 horas. El etanol se eliminó por centrifugación y el paquete celular se lavó con PBS. El ADN fue teñido con una solución de ioduro de propidio 5  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> en PBS. El análisis del ciclo celular se realizó utilizando un citómetro FACScan (BD Biosciences, San Jose, CA) y el software CELLQuest (BD Biosciences). El perfil del ciclo celular y análisis de sus

subpoblaciones se obtuvo analizando 10,000 eventos utilizando el software FlowJo versión 7.2.5 (Tree Star Inc, Ashland OR, USA).

### **A.2.3. Ensayo de apoptosis con Anexina V-FITC**

El producto comercial Annexin V-FITC Apoptosis Detection kit (Sigma-Aldrich) se utilizó para medir la apoptosis celular después del tratamiento con los compuestos **1**, **3**, **5** y **8**. El juego de reactivos contiene annexina V, marcada con un fluoróforo que puede identificar células apoptóticas, mediante su unión a fosfatidilserina expuesta en la superficie exoplasmática de la membrana celular de células apoptóticas. Adicionalmente, el juego de reactivos incluye un colorante de fluorescencia roja (ioduro de propidio) que tiñe los ácidos nucleicos de células muertas. Los procedimientos se realizaron de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Brevemente,  $2.5 \times 10^5$  células SK-LU-1 en 2-mL de medio fueron inoculadas en cada pozo de una placa de seis pozos (Nunc, Roskilde, Dinamarca) e incubadas en condiciones estándar. Después de 24h, el medio de cultivo se eliminó por succión y se cambió por medio con compuesto a evaluar. Las células fueron tratadas con  $0.04 \mu\text{M}$  de compuesto **1**,  $8.4 \mu\text{M}$  de compuesto **3**,  $0.4 \mu\text{M}$  de compuesto **5** ó  $1 \mu\text{M}$  de compuesto **8** durante 48h. Al concluir el tratamiento, las células adherentes y en suspensión se recolectaron y lavaron dos veces con PBS centrifugando a 3000 rpm. El paquete celular se resuspendió con 0.5 mL de buffer de unión a annexina. Las células se incubaron en la oscuridad con 5  $\mu\text{l}$  de annexina V y 10  $\mu\text{l}$  de la solución de ioduro de propidio durante 10 minutos a temperatura ambiente. Finalizado el tiempo de incubación, las muestras se analizaron con un citómetro de flujo FACScan (BD Biosciences, San Jose, CA) utilizando el software CellQuest (BD Biosciences). El porcentaje de células apoptóticas en las muestras se obtuvo analizando 10,000 eventos mediante el uso del software FlowJo versión 7.2.5 (Tree Star Inc, Ashland OR, USA).

#### A.2.4. TUNEL

La apoptosis causada por los compuestos **3**, **5** y **8** se detectó utilizando el kit comercial *In Situ Cell Death Kit*, Fluorescein (Roche, Mannheim, Alemania) siguiendo las instrucciones establecidas por el fabricante. Se colocaron 3 cubreobjetos de 18 mm (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Alemania) por pozo en placas de cultivo celular de 6 pozos (Nunc, Roskilde, Dinamarca) y se inocularon  $2.5 \times 10^5$  células SK-LU-1 suspendidas en 2-mL de medio en cada pozo. Las células se incubaron en condiciones estándar de cultivo celular y después de 24h se eliminó el medio de cultivo y se agregó medio que contenía uno de los compuestos a probar (8.4  $\mu$ M compuesto **3**, 0.4  $\mu$ M compuesto **5** ó 1  $\mu$ M del compuesto **8**), DMSO a la concentración más alta utilizada o medio sin aditivos. Las células se incubaron durante 48h; al finalizar este tiempo, las células adheridas a los cubreobjetos se retiraron de las placas de cultivo, lavaron dos veces con PBS, secaron al aire y se fijaron durante una hora con solución fijadora (4% de formaldehído en PBS pH 7.4 preparado recientemente) a temperatura ambiente. Las células adheridas al cubreobjeto se lavaron abundantemente con PBS e incubaron con solución de permeabilización (0.1 % de triton-X-100 en solución de citrato de sodio al 0.1 %) durante 2 minutos en hielo. Las células que no recibieron tratamiento, con compuestos o DMSO, se incubaron en 50  $\mu$ L de solución marcadora (Label Solution, provista en el kit) y se utilizaron como control negativo. Por otro lado, células sin tratamiento se incubaron con ADNsa I recombinante (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) por 10 minutos a temperatura ambiente, La ADNsa se eliminó y se continuó con la reacción de marcado.

Las células se enjuagaron con PBS dos veces y se secaron suavemente, utilizando papel absorbente, alrededor del área donde se llevó a cabo la reacción. Se adicionaron 50  $\mu$ L de mezcla de reacción TUNEL (excepto el control negativo) y se incubaron a 37 °C durante 1 h en atmosfera húmeda y en la oscuridad. Al finalizar la incubación, se lavaron los cubreobjetos con abundante PBS por triplicado, las muestras se montaron en portaobjetos con medio de montaje para fluorescencia DAKO mounting medium (Dako, USA).

Las muestras se analizaron utilizando un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E600 (Nikon, Japón).

#### **A.2.5. Inhibición de la actividad de CDK1/CycB y CDK2/CycA**

La actividad de las CDK/Ciclinas se midió mediante un ensayo de proteína cinasa utilizando histona H1.2 como sustrato. 220 ng de CDK1/CycB recombinante (Biaffin, Kassel, Germany) o 135 ng de CDK2/CycA recombinante (Biaffin, Kassel, Germany) en 20  $\mu$ L buffer de reacción para cinasas pH=7.4 (Tris-HCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, NaF 50 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 500  $\mu$ M,  $\beta$ -glicerofosfato 8 mM, DTT 1 mM, ATP 400  $\mu$ M y ATP $\gamma$ <sup>32</sup> 4  $\mu$ Ci. (Perkin-Elmer, Wellesley, MA, USA) se mezclaron con 0.5  $\mu$ L de histona recombinante H1.2 10 mg/mL (Calbiochem, San Diego, CA) e incubaron 30 minutos a 30°C. Los complejos CDK/ciclina se incubaron en presencia de uno de los compuestos (**1**, **2**, **3**, **8**, y **11**) a una concentración de 7  $\mu$ M. Olomoucina 7  $\mu$ M se utilizó como control positivo, un control de disolvente se realizó con DMSO a una concentración de 2.5 % o menor y se utilizó como control negativo.

Se adicionaron 5  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol a las muestras para detener la reacción. Las muestras se hirvieron durante 3 minutos en un tubo de microcentrifuga con tapón de rosca para reducir el riesgo de vaporizar el radioisótopo <sup>32</sup>P. Las proteínas se separaron en un gel de poliacrilamida al 10 % y la cantidad de radiación incorporada a la histona H.1 se midió usando una densitometría de una película expuesta a la radiación obtenida con un aparato Typhoon 9400 (Amersham Biosciences, Inc.) usando el software Kodak MI (Carestream Health, Rochester, N.Y., USA).

#### **A.2.6. Determinación de la CI<sub>50</sub> en CDK1/CycB y CDK2/CycA**

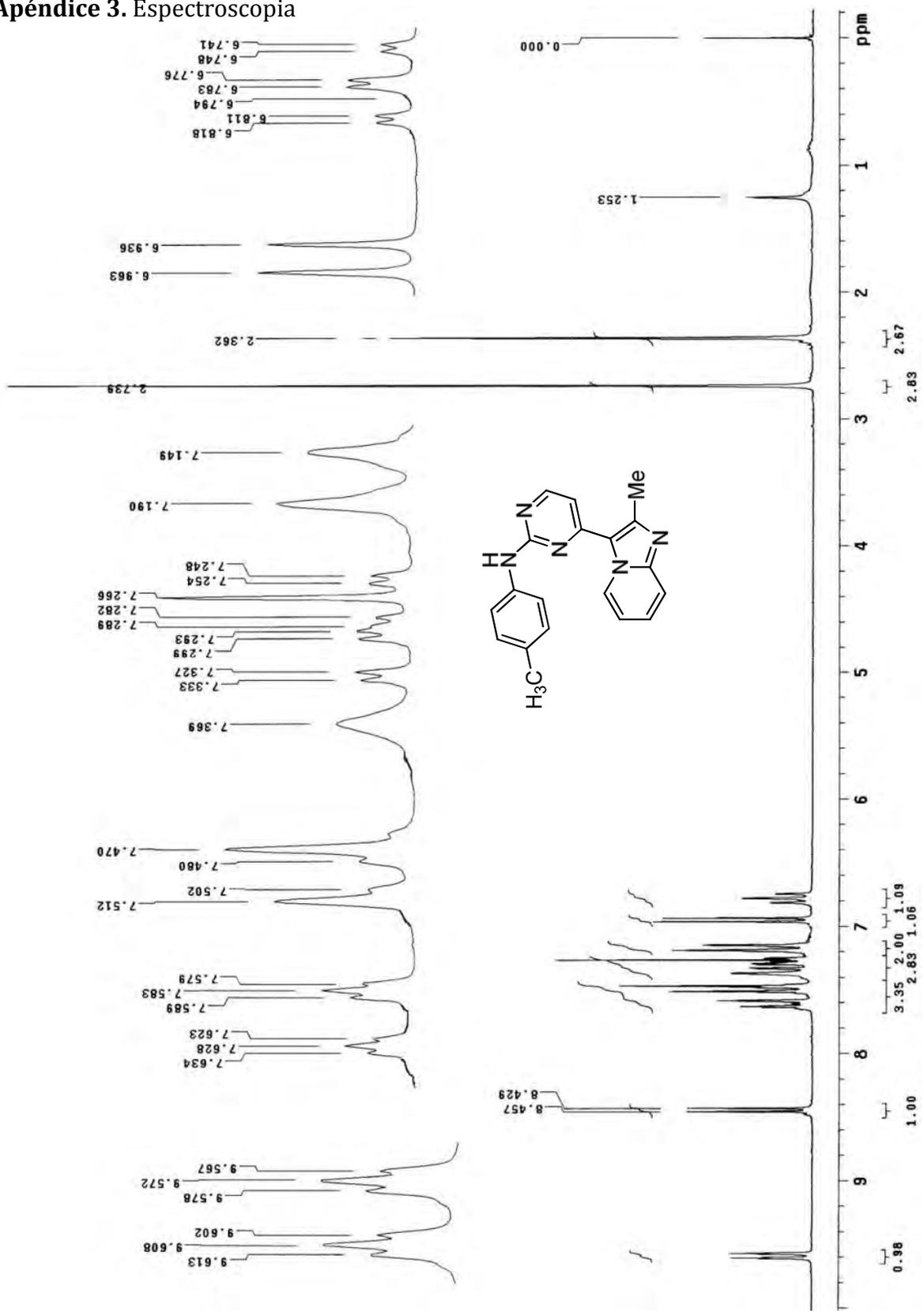
La determinación de la CI<sub>50</sub> de los compuestos **1**, **3** y **8** en las enzimas CDK1/CycB y CDK2/CycA (Figura 4.4D) se realizó utilizando el servicio SelectScreen® Biochemical Kinase Profiling Service de InVitrogen (Madison, WI, USA) mediante la tecnología Z'-LYTE®.

Los compuestos se disolvieron en DMSO con una pureza del 100% a una concentración de 1.5 mM, y se diluyeron diez veces para iniciar el análisis. A partir de una

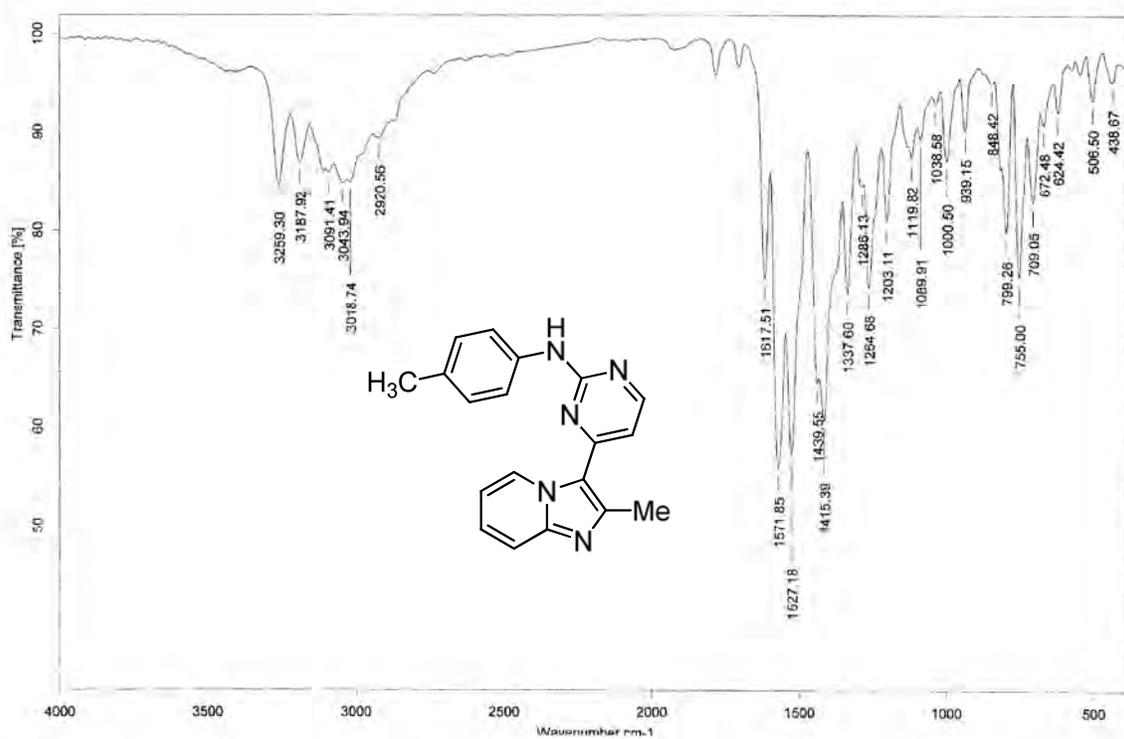
concentración 15  $\mu\text{M}$  se diluyeron los compuestos en diluciones seriadas (1:3) diez veces para obtener concentraciones finales de 15, 5, 1.67, 0.556, 0.185, 0.062, 0.0207, 0.0069, 0.0023 y 0.00077  $\mu\text{M}$ .

2.5  $\mu\text{L}$  del compuesto 4X, 2.4  $\mu\text{L}$  del buffer de cinasa, 5  $\mu\text{L}$  de la mezcla cinasa/péptido (los 10  $\mu\text{L}$  de reacción final consisten de 4.38 - 35.9 ng CDK1/ciclina B y 2  $\mu\text{M}$  Ser/Thr 18 o de 2.98 - 27 ng CDK2/ciclina A y 2  $\mu\text{M}$  Ser/Thr 12 en 50 mM HEPES pH 7.5, 0.01% BRIJ-35, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM EGTA) y 2.5  $\mu\text{L}$  de ATP 4X diluida en buffer de cinasas (50 mM HEPES pH 7.5, 0.01% BRIJ-35, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM EGTA; para CDK1 la concentración final fue de 34  $\mu\text{M}$  y para CDK2 de 31  $\mu\text{M}$ , correspondientes a la  $K_m$  app de las enzimas) se mezcla y agita durante 30 segundos y se deja reaccionar la mezcla durante 1 hora a temperatura ambiente. Al finalizar la incubación, se adicionan 5  $\mu\text{L}$  de proteasa y se deja incubar durante otra hora a temperatura ambiente y se determina la fluorescencia a 445 y 520 nm en un lector de placas de fluorescencia. Se realizó un control de 0% de fosforilación (no se adicionó ATP), de 100% de fosforilación (péptido fosforilado sintéticamente), de 0% de inhibición (sin inhibidor) y con un inhibidor conocido (estaurosporina 10.3 y 5.88  $\mu\text{M}$  para CDK1 y 2 respectivamente). La  $\text{CI}_{50}$  se calcula utilizando el software *XLfit 5* (IDBS, Guildford, UK).

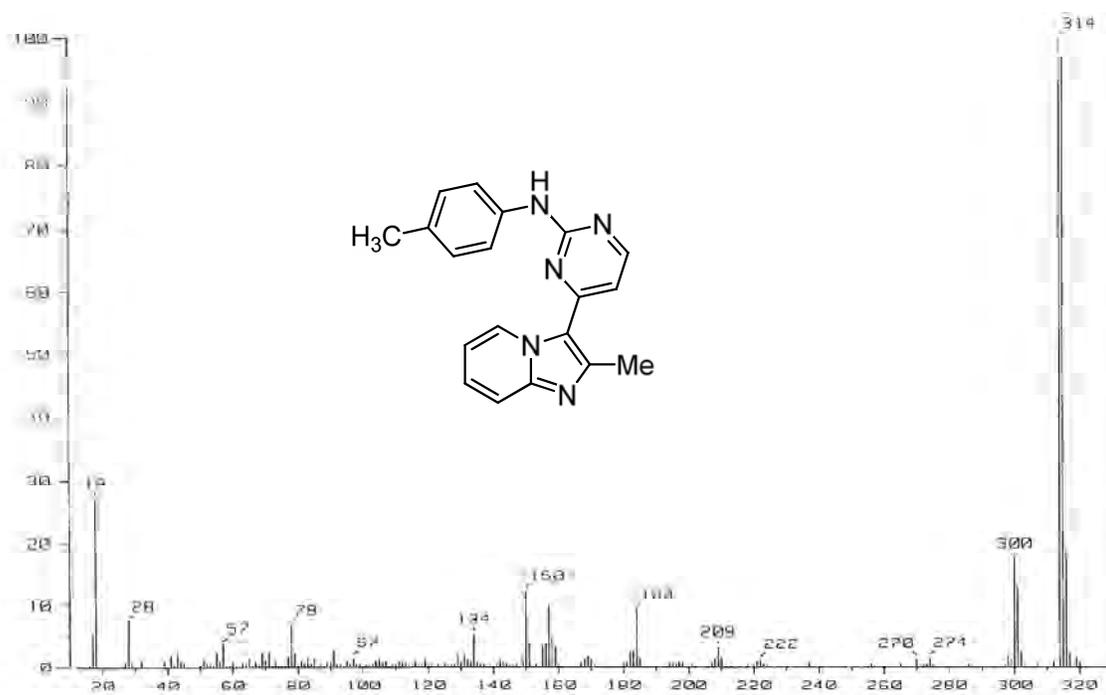
### Apéndice 3. Espectroscopia



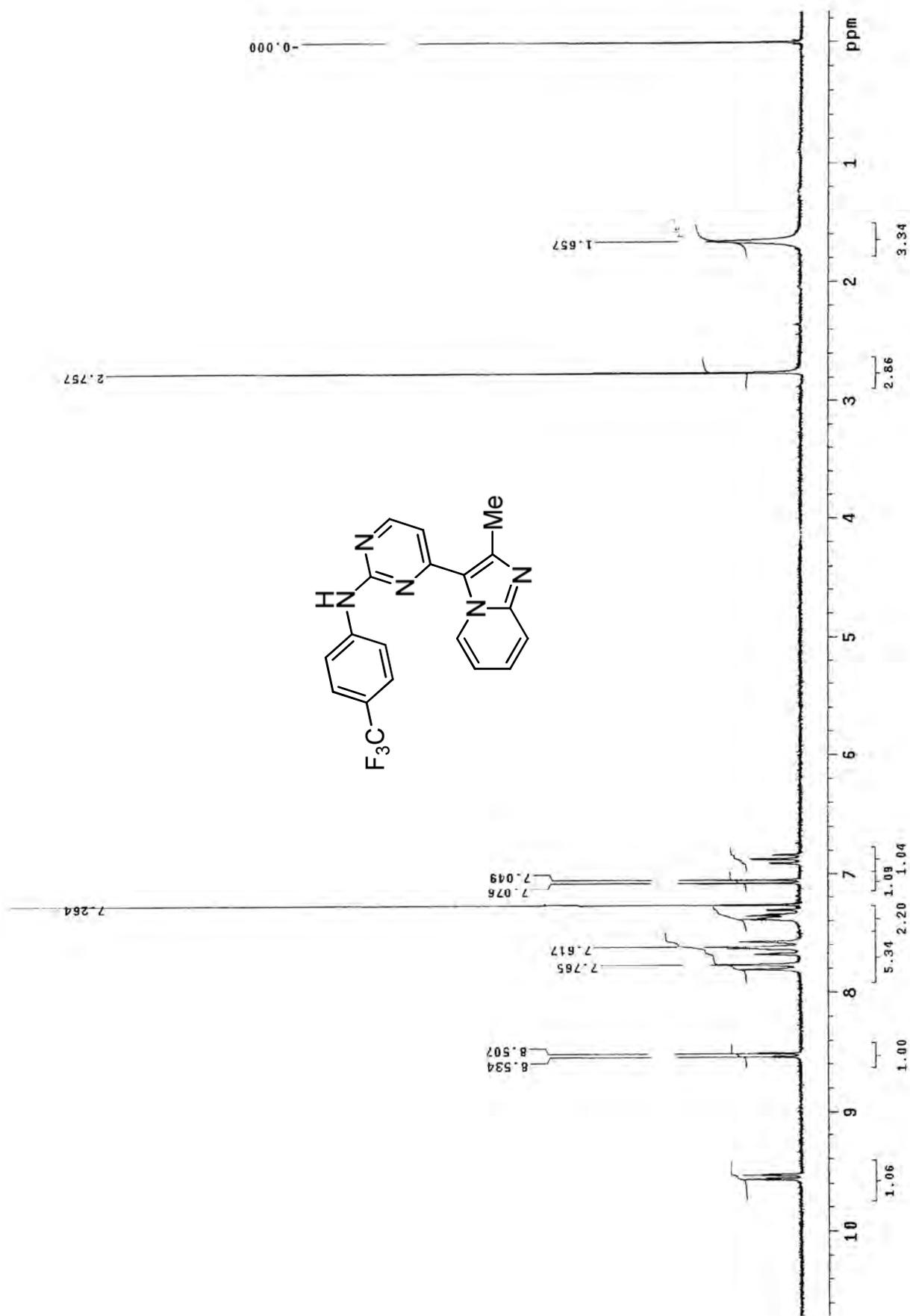
A.3.1. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H del compuesto 1



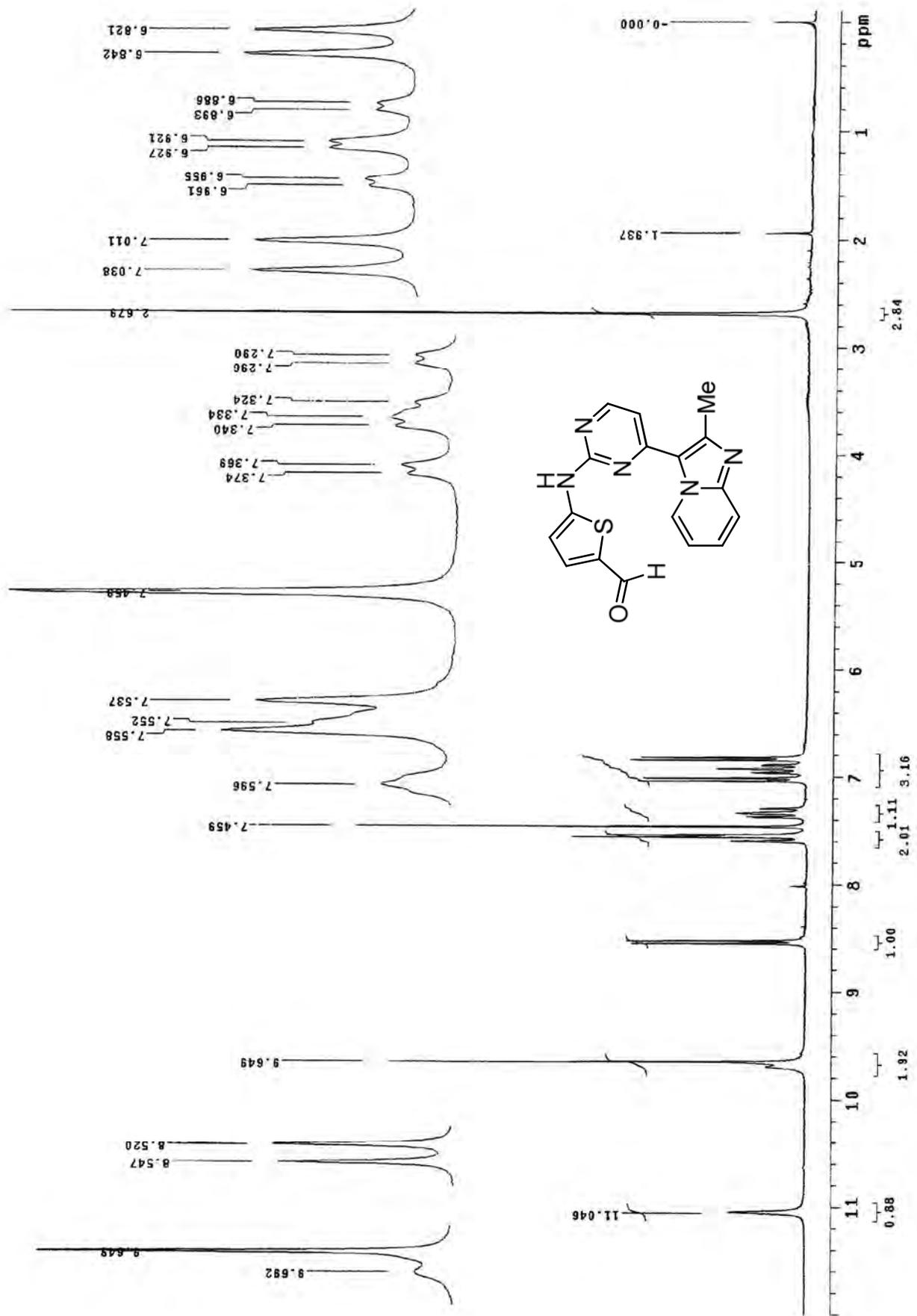
A.3.2. Espectro de IR del compuesto 1



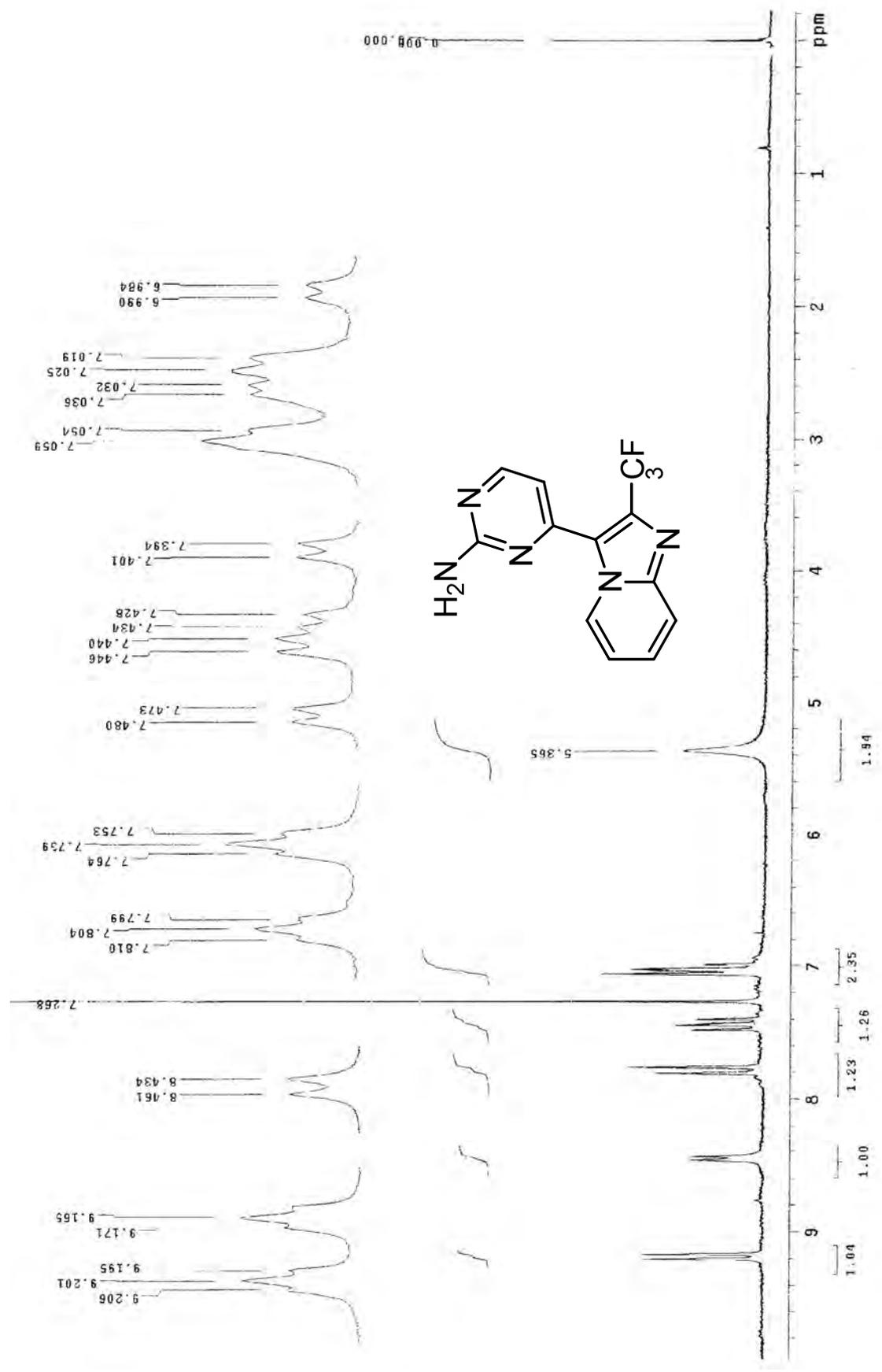
A.3.3. Espectro de EM del compuesto 1



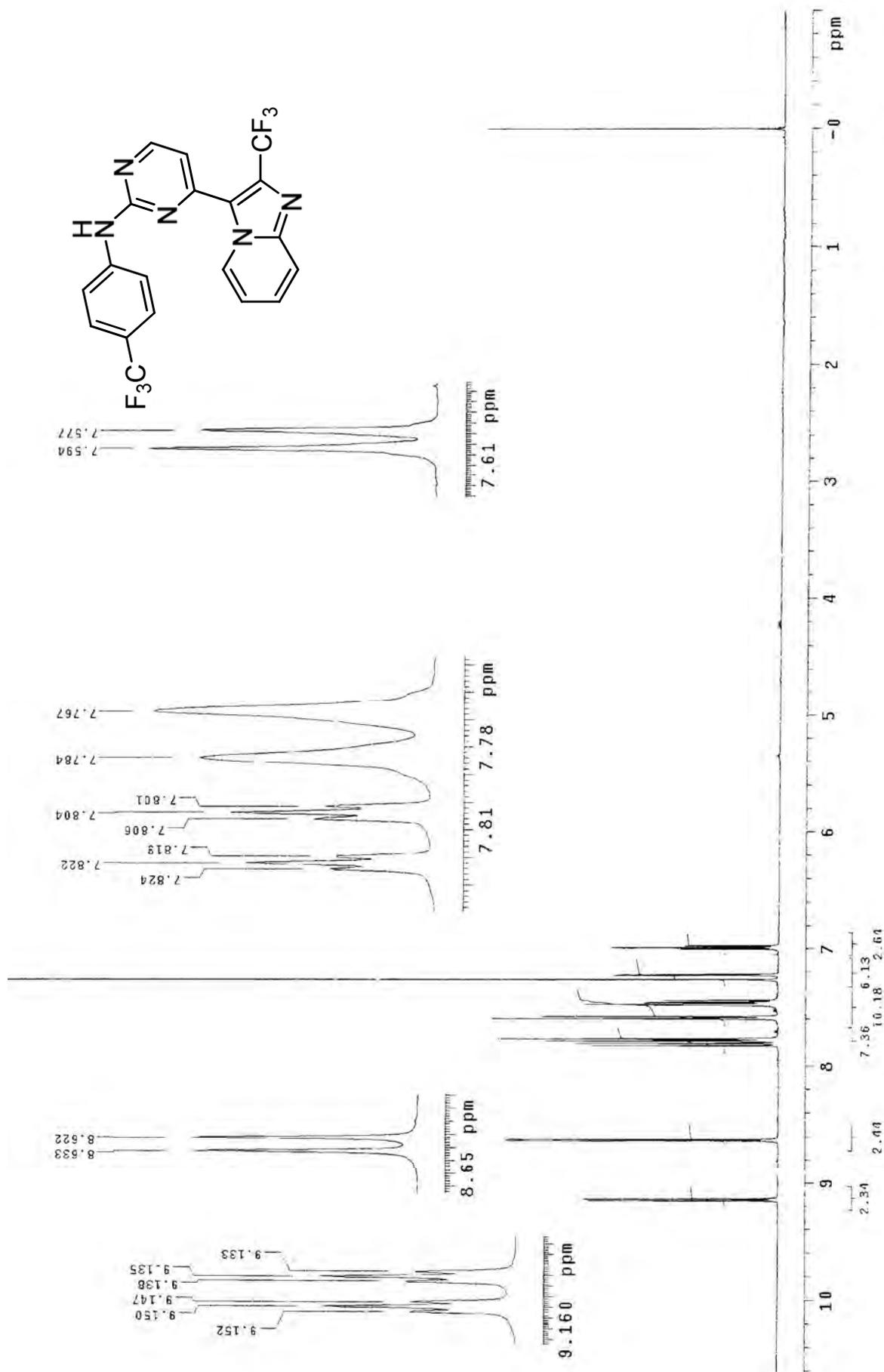
A.3.4. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H del compuesto 2



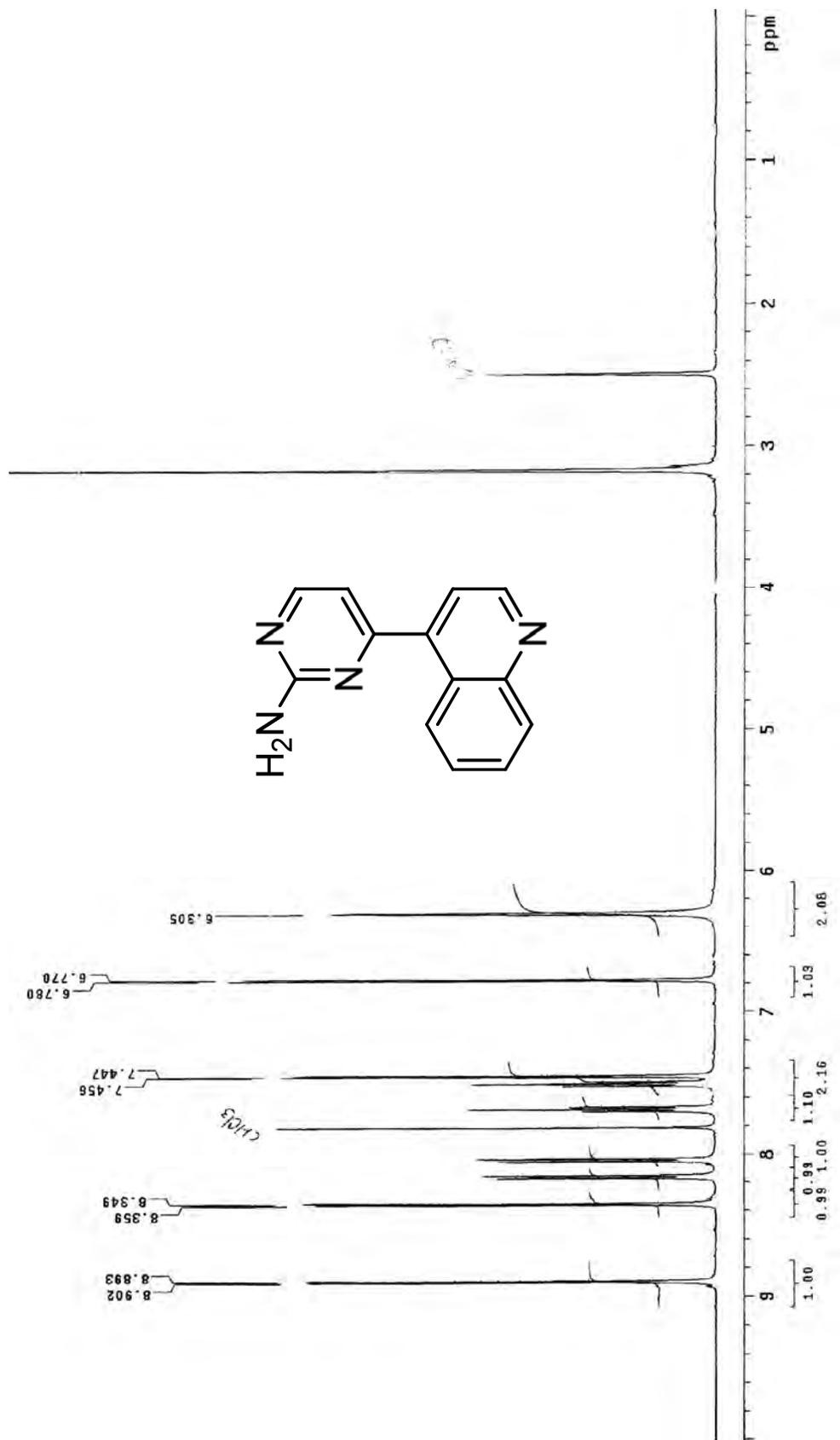
A.3.5. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H del compuesto 3



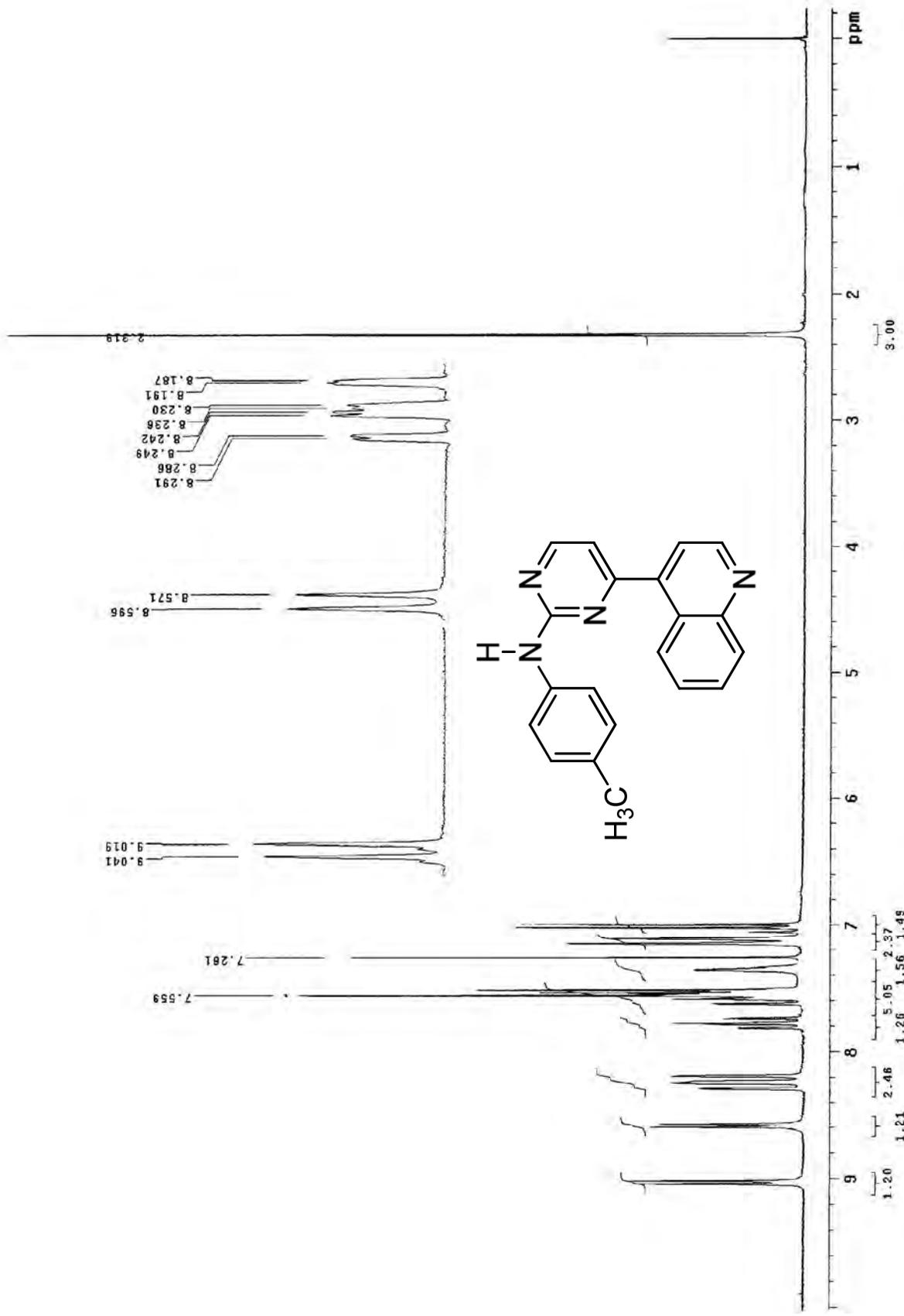
A.3.6. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H del compuesto 4



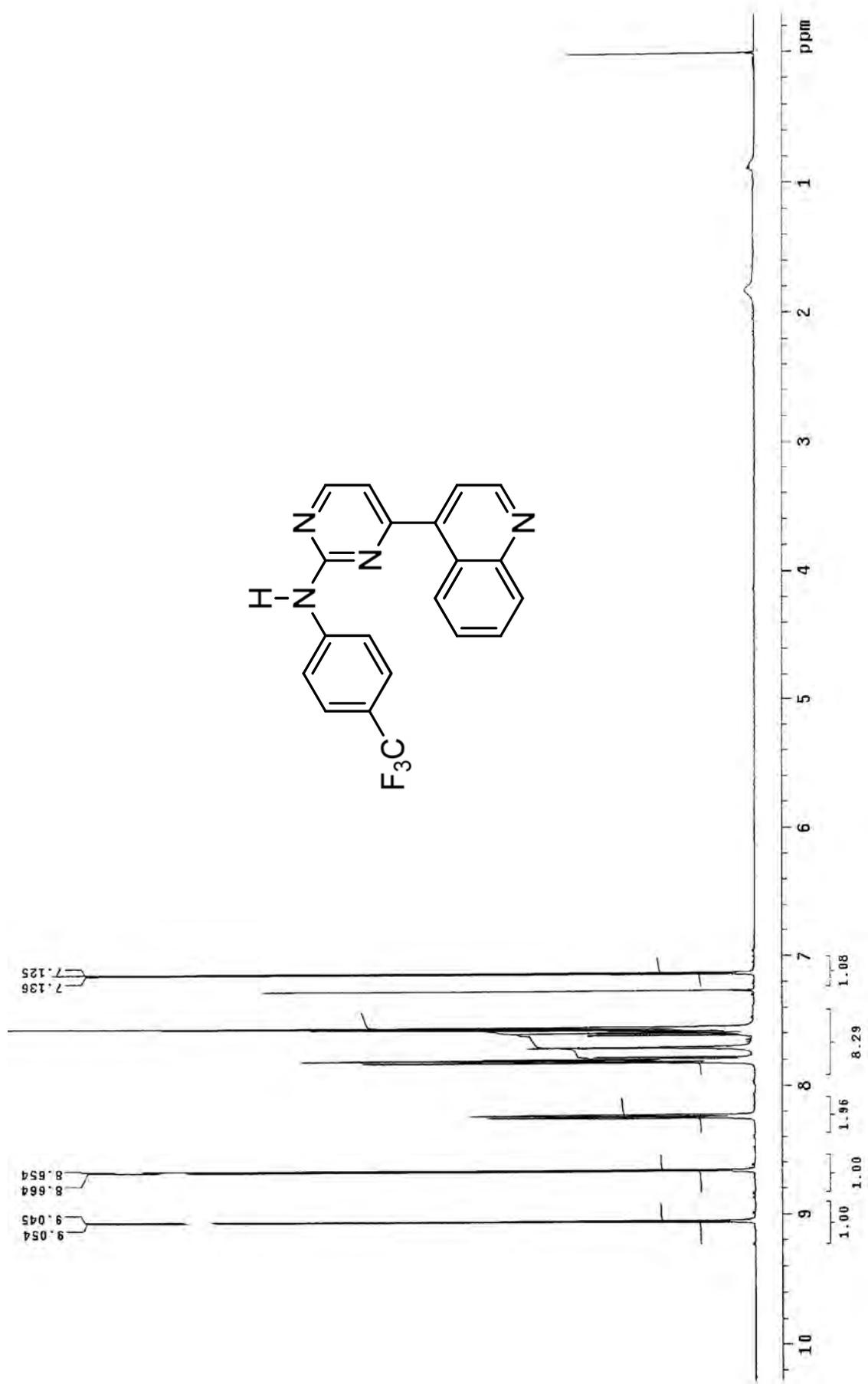
A.3.7. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H del compuesto 6



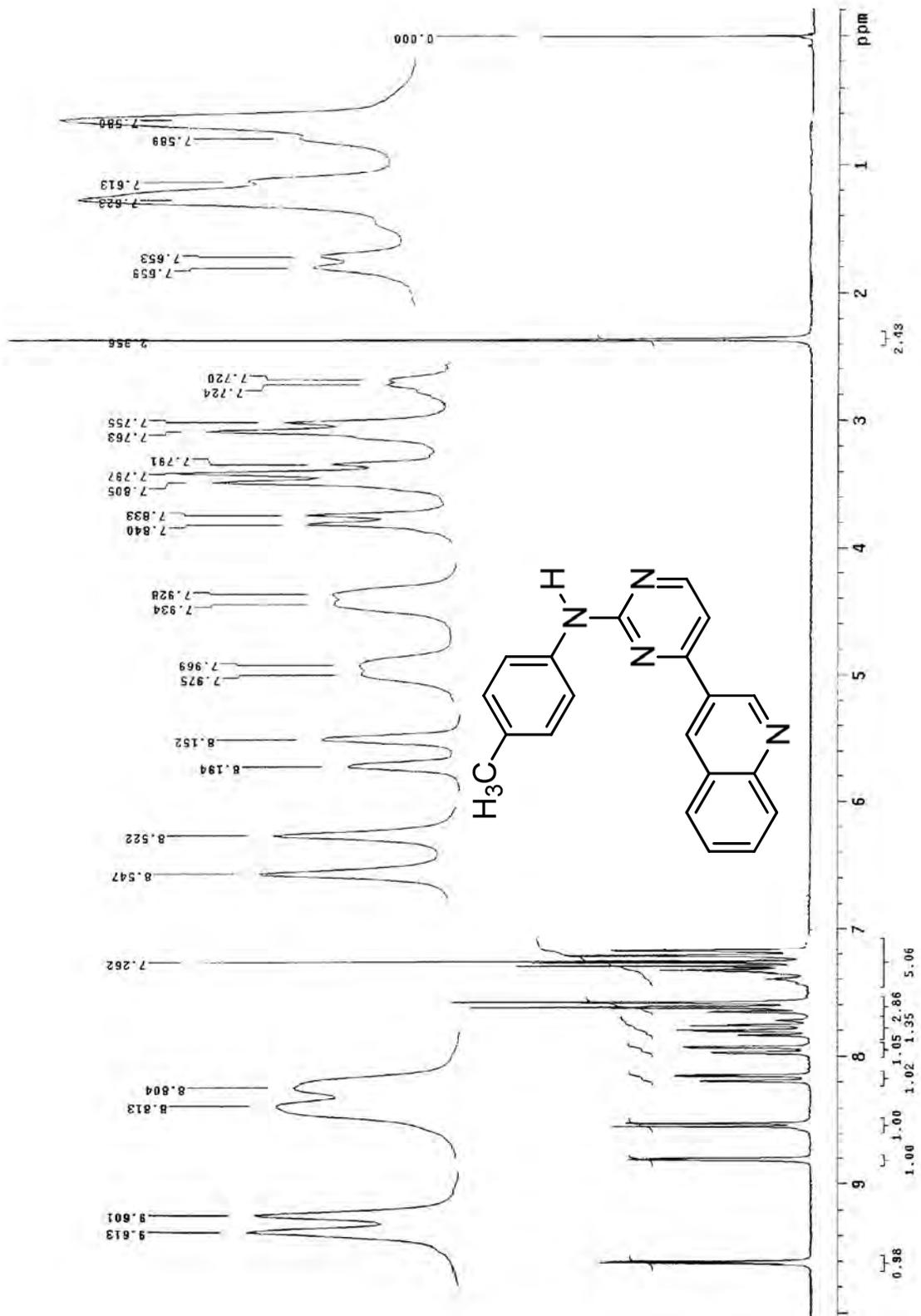
A.3.8. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H del compuesto 7



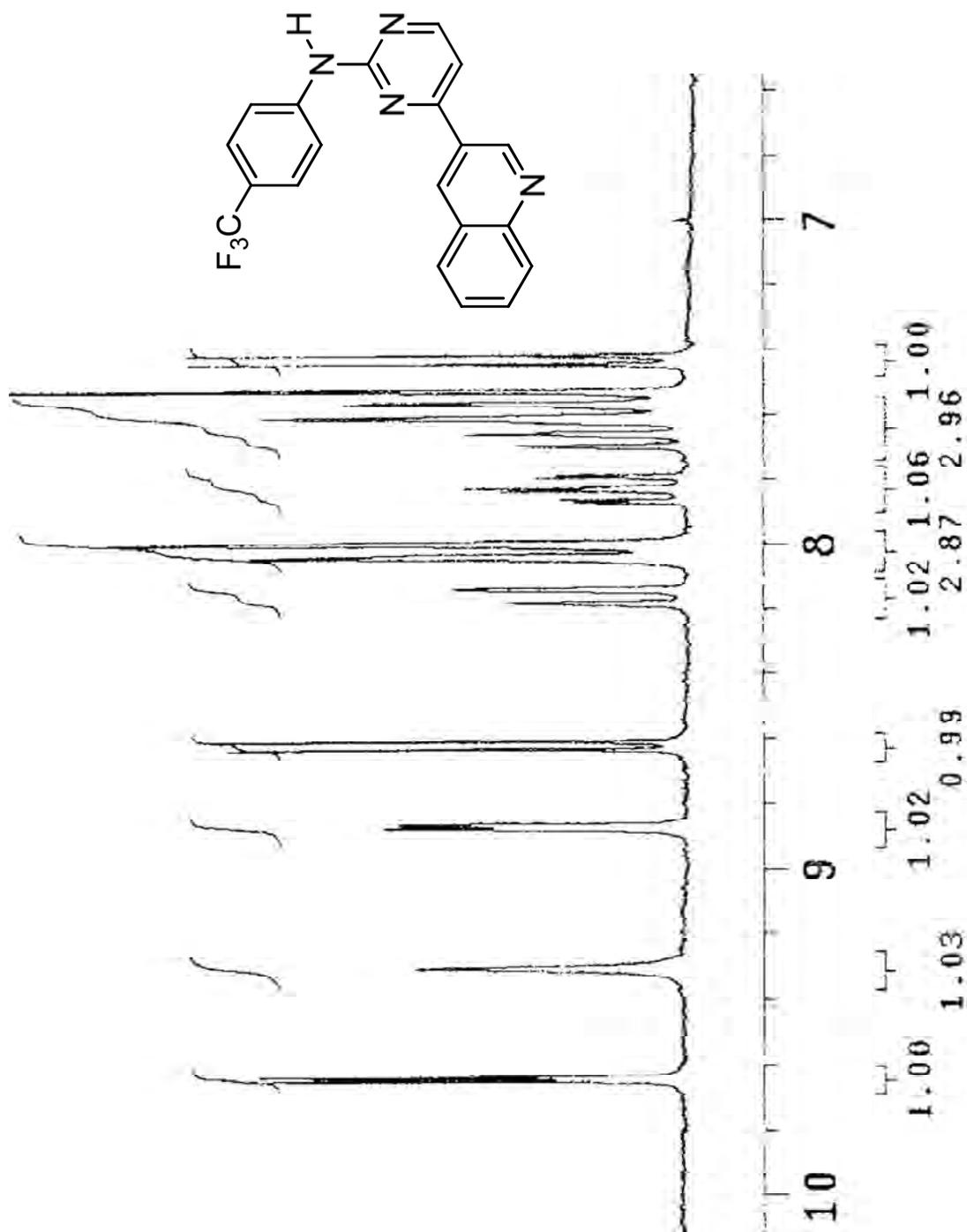
A.3.9. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H del compuesto 8



A.3.10. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H del compuesto 9



A.3.11. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H del compuesto 11



A.3.12. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H del compuesto 12

## Glosario

<b>-/-</b>	Precedido del nombre de una proteína, indica que ambos alelos del gen mencionado fueron eliminados o producen proteínas no funcionales.
<b>ABC</b>	Proteínas del tipo "ATP binding cassette". Se encargan de transportar compuestos exógenos del interior de las células hacia el exterior.
<b>Abl</b>	La proteína Abl funciona como una cinasa de residuos de tirosina citoplasmática con múltiples funciones biológicas.
<b>Ack</b>	Proteína cinasa de residuos de tirosina citoplasmática que participa en la organización de microtúbulos.
<b>AKT</b>	Las cinasas AKT son proteínas claves en el proceso de supervivencia y proliferación celular.
<b>Bak</b>	Es una proteína pro-apoptótica perteneciente a la familia Bcl-2.
<b>Bax</b>	Es una proteína pro-apoptótica perteneciente a la familia Bcl-2.
<b>Bcl-2</b>	<p>Bcl-2 denota una familia de genes y las proteínas presentes en los mamíferos que controlan el cambio de permeabilidad externo de la membrana de mitocondrias, y que participan en la regulación de la apoptosis.</p> <p>La proteína Bcl-2 suprime la apoptosis de dos maneras; por acción directa sobre las mitocondrias para impedir el aumento de la permeabilidad y con efectos mediados por interacciones con otras proteínas.</p>
<b>B-Raf</b>	Es un protooncogene perteneciente a las cinasas de residuos de serina/treonina que está relacionado con la señalización y crecimiento celular.
<b>BRIJ-35</b>	Detergente no iónico útil para extraer complejos de membranas biológicas.
<b>CAK</b>	Complejo activador de cinasas dependientes de ciclinas, está constituido por la cinasa dependiente de ciclina 7 (CDK7), la ciclina H y la proteína MAT1.
<b>Calcineurina</b>	Interviene en la síntesis de varias citocinas, como la interleucina 2, que desempeñan un papel fundamental en la proliferación y activación de los linfocitos T.
<b>Calmodulina</b>	La calmodulina se activa uniendo calcio y regula la actividad de un gran número de proteínas, de esta manera su actividad depende de la concentración de $Ca^{2+}$ en la célula.
<b>CD20</b>	Proteína de la superficie de los linfocitos B normales y la mayoría de los linfomas de linfocitos B.
<b>Cip/Kip</b>	Inhibidores de amplio espectro que afectan las actividades de las cinasas que dependen de las ciclinas D, E y A. Esta familia incluye a los inhibidores p21 (CIP1), p27 (KIP1), y p57 (KIP2), todos ellos capaces de fijarse no solo a las CDKs, sino también a las diferentes ciclinas.
<b>CKI</b>	Inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas.
<b>c-Kit</b>	Un factor de crecimiento con actividad de cinasa de residuos de tirosina. Se encuentra mutado o sobreexpresado en mastocitomas y tumores estromales

	gastrointestinales (GIST).
<b>Csk</b>	Cinasa de la porción carboxilo terminal de Src, inactiva a las cinasas de la familia SRC.
<b>c-Src</b>	Variante normal de la cinasa de residuos de tirosina del Sarcoma de Rous.
<b>E2F-1</b>	La familia de proteínas E2F tienen papeles importantes en el control del ciclo celular y funcionan como supresoras de tumores. Es el factor 2 de la elongación de la transcripción, que se regula por unión a Rb.
<b>FAK</b>	Cinasa de adhesión focal implicada en procesos celulares de la adherencia y la separación celular.
<b>Fes/Fer</b>	Cinasa de residuos de tirosina citoplasmática que regula la adhesión celular y reorganización del citoesqueleto.
<b>FKBP</b>	Proteína que une a FK, ya que tacrolimús fue llamado inicialmente FK506, tienen función de chaperona en proteínas que contienen residuos de prolina.
<b>FL-1</b>	Canal que mide la fluorescencia verde (540 nm) en citometría de flujo.
<b>FL-2</b>	Canal que mide la fluorescencia naranja (585/42 nm) en citometría de flujo.
<b>Flt3</b>	Cinasa de residuos de tirosina que activa y mantiene la supervivencia, proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas progenitoras.
<b>G1</b>	La fase G1 del ciclo celular es el periodo del ciclo celular que abarca desde que termina la fase M hasta el inicio de la fase S.
<b>G2</b>	La fase G2 del ciclo celular es el periodo del ciclo celular que abarca desde que termina la fase S hasta el inicio de la fase M.
<b>GEF</b>	Factor intercambiador de nucleótido de guanina.
<b>GRB2</b>	Proteína receptora del factor de crecimiento 2.
<b>GSK</b>	Cinasa 3 $\beta$ de la glucógeno sintasa.
<b>INK</b>	Inhibidores de CDK4, llamados así por su estricta especificidad de acción sobre las subunidades catalíticas CDK4 y CDK6.
<b>IRK-4</b>	Es una proteína cinasa que participa en la señalización de respuestas inmunes innatas en linfocitos T (interleukin-1 receptor-associated kinase 4).
<b>JAK</b>	Cinasas de Janus. Familia de proteínas pertenecientes a las enzimas asociadas a receptores de citocinas.
<b>KDR</b>	Es el receptor para VEGF o VEGFC.
<b>Knockout</b>	Desactivación dirigida de un gen determinado en un modelo animal.
<b>MAPK</b>	Cinasas activadas por mitógenos.
<b>MAPK/ERK</b>	Cinasa que participa en la vía de las MAPK.
<b>Mcl-1</b>	Proteína de la familia BCL-2 que previene la muerte celular por apoptosis.
<b>mTOR</b>	Proteína que actúa como blanco de la rapamicina en células de mamífero y ayuda a controlar varias funciones celulares, incluso la multiplicación y la supervivencia de las células; además de unir rapamicina une a otros medicamentos como el

	everolimus.
<b>MYC</b>	El factor de transcripción codificado por este gen es multifactorial, es una fosfoproteína nuclear que juega un papel importante en la progresión del ciclo celular, apoptosis y transformación celular.
<b>p35</b>	Es un activador específico de CDK5 en las neuronas.
<b>PDFR</b>	Receptor del factor derivado de plaquetas. El factor derivado de plaquetas (PDGF) desempeña un rol en el desarrollo embriogénico, proliferación celular, migración celular y angiogénesis.
<b>PDK1</b>	Cinasa 1 dependiente de fosfatidil inositol.
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol-3-cinasa.
<b>Profármaco</b>	Es una sustancia farmacológicamente inerte que al ser biotransformada se vuelve activa.
<b>PSTAIRE</b>	Secuencia de aminoácidos Prolina-Serina-Treonina-Alanina-Isoleucina-Arginina-Ácido glutámico.
<b>PTK</b>	Proteínas cinasas de residuos de tirosina.
<b>RAF</b>	Cinasa de residuos de serina/treonina, activada por Ras.
<b>Ras</b>	Los genes ras codifican proteínas conservadas que pertenecen a una familia extensa de GTPasas.
<b>Rb</b>	Proteína del retinoblastoma, impide que una célula se divida en ausencia de los estímulos necesarios al unir a las proteínas E2F.
<b>RET</b>	Las señales de transducción de RET son clave en el desarrollo de los riñones y el sistema nervioso central, puede dar origen a cáncer hereditario, si se activa constitutivamente, conocido como neoplasia endocrina múltiple tipo 2.
<b>S</b>	Fase del ciclo celular donde se replica el ADN.
<b>SOS1 y 2</b>	Proteína acopladora entre Grb y Ras hijo de sevenless 1 y 2, es un factor intercambiador que actúa sobre ras-GDP para facilitar la sustitución de GDP por GTP.
<b>STATS</b>	Las proteínas STAT modulan la expresión de genes relacionados con la diferenciación, la supervivencia celular y la inflamación.
<b>Syk/Zap70</b>	Cinasas de residuos de tirosina citoplasmática y se encargan de transmitir señales extracelulares de varios receptores.
<b>Tec</b>	Una de las tres clases de la proteína cinasas de residuos de tirosina que son necesarias para la activación de las células hematopoyéticas.
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento endotelial vascular.
<b>v-Src</b>	Variante oncogénica de la cinasa de residuos de tirosina del Sarcoma de Rous.
<b>XIAP</b>	Inhibidor X-ligado de la proteína de apoptosis, es un miembro de la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP).

## Bibliografía

- [1] Linet, M. S., *Epidemiol. Rev.* **2000**, *22*, 35-56.
- [2] WHO, <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2003/pr27/en/> **2003**,  
Accesado el 5 de junio de 2009.
- [3] WHO, <http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/facts/cancer/en/> **2003**,  
Accesado el 29 de mayo de 2009.
- [4] Hajdu, S. I., *Cancer* **2006**, *106*, 1643-1649.
- [5] Vogelstein, B.; Kinzler, K. W., *Nature Med.* **2004**, *10*, 789-799.
- [6] Weinberg, R. A., *Sci. Am.* **1996**, *275*, 62-70.
- [7] Fearon, E. R.; Hamilton, S. R.; Vogelstein, B., *Science* **1987**, *238*, 193-197.
- [8] Futreal, P. A.; Coin, L.; Marshall, M.; Down, T.; Hubbard, T.; Wooster, R.; Rahman, N.; Stratton, M. R., *Nature Rev. Cancer* **2004**, *4*, 177-183.
- [9] Wicha, M. S.; Liu, S.; Dontu, G., *Cancer Res.* **2006**, *66*, 1883-1890.
- [10] DeVita, V. T.; Hellman, S.; Rosenberg, S. A., *Cancer, principles & practice of oncology*, 7a ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, **2005**.
- [11] Komarova, N. L.; Sengupta, A.; Nowak, M. A., *J. Theor. Biol.* **2003**, *223*, 433-450.
- [12] Nowell, P. C., *Semin. Cancer Biol.* **2002**, *12*, 261-266.
- [13] Loeb, K. R.; Loeb, L. A., *Carcinogenesis* **2000**, *21*, 379-385.
- [14] Volpert, O. V.; Dameron, K. M.; Bouck, N., *Oncogene* **1997**, *14*, 1495-1502.
- [15] Werb, Z., *Cell* **1997**, *91*, 439-442.
- [16] Ruoslahti, E., *Sci. Am.* **1996**, *275*, 72-77.
- [17] Varner, J. A.; Cheresch, D. A., *Curr. Opin. Cell. Biol.* **1996**, *8*, 724-730.
- [18] Hanahan, D.; Weinberg, R. A., *Cell* **2000**, *100*, 57-70.
- [19] Sporn, M. B., *Lancet* **1996**, *347*, 1377-1381.
- [20] Papac, R. J., *Yale J. Biol. Med.* **2001**, *74*, 391-398.
- [21] Gilman, A.; Philips, F. S., *Science* **1946**, *103*, 409-436.
- [22] Farber, S.; Diamond, L. K., *N. Engl. J. Med.* **1948**, *238*, 787-793.
- [23] Chabner, B. A.; Roberts, T. G., *Nature Rev. Cancer* **2005**, *5*, 65-72.
- [24] Lüllmann, H., *Color atlas of pharmacology*, 3a ed., Thieme, New York, **2005**.
- [25] Gilman, A., *Am. J. Surg.* **1963**, *105*, 574-578.
- [26] DeVita, V. T.; Hellman, S.; Rosenberg, S. A., *Cancer, principles & practice of oncology*, 8a ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, **2008**.
- [27] Savage, P.; Stebbing, J.; Bower, M.; Crook, T., *Nature Clin. Pract. Oncol.* **2009**, *6*, 43-52.
- [28] a) Dhani, N.; Tu, D.; Sargent, D. J.; Seymour, L.; Moore, M. J., *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 1873-1882; b) Wang, J. C., *Cell Stem Cell* **2007**, *1*, 497-501.
- [29] Reya, T.; Morrison, S. J.; Clarke, M. F.; Weissman, I. L., *Nature* **2001**, *414*, 105-111.
- [30] Harrison, D. E.; Lerner, C. P., *Blood* **1991**, *78*, 1237-1240.
- [31] Zhou, S.; Schuetz, J. D.; Bunting, K. D.; Colapietro, A. M.; Sampath, J.; Morris, J. J.; Lagutina, I.; Grosveld, G. C.; Osawa, M.; Nakauchi, H.; Sorrentino, B. P., *Nature Med.* **2001**, *7*, 1028-1034.
- [32] a) Fidler, I. J.; Ellis, L. M., *Nature Med.* **2000**, *6*, 500-502; b) Geddes, L., *New Sci.* **2008**, *200*, 26-33.

- [33] a)Gatenby, R. A., *Nature* **2009**, *459*, 508-509; b)Kohn, E. C.; Liotta, L. A., *Cancer Res.* **1995**, *55*, 1856-1862.
- [34] Klement, G.; Baruchel, S.; Rak, J.; Man, S.; Clark, K.; Hicklin, D. J.; Bohlen, P.; Kerbel, R. S., *J. Clin. Invest.* **2000**, *105*, R15-24.
- [35] a)Mathews, C. K.; Van Holde, K. E., *Biochemistry*, 2a ed., Benjamin/Cummings Pub. Co., Inc., Menlo Park, , **1996**; b)Cohen, P., *Nature Cell. Biol.* **2002**, *4*, E127-130.
- [36] Huang, P. H.; White, F. M., *Mol. Cell.* **2008**, *31*, 777-781.
- [37] Collett, M. S.; Erikson, R. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1978**, *75*, 2021-2024.
- [38] Oppermann, H.; Levinson, A. D.; Varmus, H. E.; Levintow, L.; Bishop, J. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1979**, *76*, 1804-1808.
- [39] Hunter, T.; Sefton, B. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1980**, *77*, 1311-1315.
- [40] Zhang, J.; Yang, P. L.; Gray, N. S., *Nature Rev. Cancer* **2009**, *9*, 28-39.
- [41] Baselga, J.; Arribas, J., *Nature Med.* **2004**, *10*, 786-787.
- [42] Malumbres, M.; Barbacid, M., *Nature Rev. Cancer* **2003**, *3*, 459-465.
- [43] Vivanco, I.; Sawyers, C. L., *Nature Rev. Cancer* **2002**, *2*, 489-501.
- [44] Neet, K.; Hunter, T., *Genes Cells* **1996**, *1*, 147-169.
- [45] Morgan, D. O., *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **1997**, *13*, 261-291.
- [46] Sherr, C. J.; Roberts, J. M., *Genes Dev.* **2004**, *18*, 2699-2711.
- [47] Meyerson, M.; Enders, G. H.; Wu, C. L.; Su, L. K.; Gorka, C.; Nelson, C.; Harlow, E.; Tsai, L. H., *EMBO J.* **1992**, *11*, 2909-2917.
- [48] Malumbres, M.; Barbacid, M., *Trends Biochem. Sci.* **2005**, *30*, 630-641.
- [49] Sherr, C. J.; Roberts, J. M., *Genes Dev.* **1999**, *13*, 1501-1512.
- [50] Russo, A. A.; Jeffrey, P. D.; Pavletich, N. P., *Nature Struct. Biol.* **1996**, *3*, 696-700.
- [51] a)Trimarchi, J. M.; Lees, J. A., *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, *3*, 11-20; b)Matsushima, H.; Quelle, D. E.; Shurtleff, S. A.; Shibuya, M.; Sherr, C. J.; Kato, J. Y., *Mol. Cell. Biol.* **1994**, *14*, 2066-2076.
- [52] Mancebo, H. S. Y.; Lee, G.; Flygare, J.; Tomassini, J.; Luu, P.; Zhu, Y. R.; Peno, J. M.; Blau, C.; Hazuda, D.; Price, D.; Flores, O., *Genes Dev.* **1997**, *11*, 2633-2644.
- [53] Castedo, M.; Perfettini, J. L.; Roumier, T.; Kroemer, G., *Cell Death Differ.* **2002**, *9*, 1287-1293.
- [54] Williams, O.; Gil-Gomez, G.; Norton, T.; Kioussis, D.; Brady, H. J., *Eur. J. Immunol.* **2000**, *30*, 709-713.
- [55] Ohshima, T.; Ward, J. M.; Huh, C. G.; Longenecker, G.; Veeranna; Pant, H. C.; Brady, R. O.; Martin, L. J.; Kulkarni, A. B., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 11173-11178.
- [56] Pareek, T. K.; Kulkarni, A. B., *Cell Cycle* **2006**, *5*, 585-588.
- [57] Li, J. J., *Laughing gas, Viagra, and Lipitor: the human stories behind the drugs we use*, Oxford University Press, New York, **2006**.
- [58] Hidaka, H.; Inagaki, M.; Kawamoto, S.; Sasaki, Y., *Biochemistry* **1984**, *23*, 5036-5041.
- [59] Toshio, A.; Ichiro, I.; Shin-ichi, S.; Minoru, S.; Yasuharu, S., *Cardiovasc. Drug Rev.* **1998**, 76-87.
- [60] Cohen, P., *Nature Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 309-315.
- [61] Capdeville, R.; Buchdunger, E.; Zimmermann, J.; Matter, A., *Nature Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 493-502.

- [62] a)Davies, S. P.; Reddy, H.; Caivano, M.; Cohen, P., *Biochem. J.* **2000**, *351*, 95-105; b)Karaman, M. W.; Herrgard, S.; Treiber, D. K.; Gallant, P.; Atteridge, C. E.; Campbell, B. T.; Chan, K. W.; Ciceri, P.; Davis, M. I.; Edeen, P. T.; Faraoni, R.; Floyd, M.; Hunt, J. P.; Lockhart, D. J.; Milanov, Z. V.; Morrison, M. J.; Pallares, G.; Patel, H. K.; Pritchard, S.; Wodicka, L. M.; Zarrinkar, P. P., *Nature Biotechnol.* **2008**, *26*, 127-132; c)Sridhar, J.; Akula, N.; Pattabiraman, N., *AAPS J.* **2006**, *8*, E204-221.
- [63] Dudley, D. T.; Pang, L.; Decker, S. J.; Bridges, A. J.; Saltiel, A. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 7686-7689.
- [64] Sebolt-Leopold, J. S.; Dudley, D. T.; Herrera, R.; Becelaere, K. V.; Wiland, A.; Gowan, R. C.; Teclé, H.; Barrett, S. D.; Bridges, A.; Przybranowski, S.; Leopold, W. R.; Saltiel, A. R., *Nature Med.* **1999**, *5*, 810-816.
- [65] a)Kamb, A., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **1998**, *227*, 139-148; b)Malumbres, M.; Barbacid, M., *Nature Rev. Cancer* **2001**, *1*, 222-231.
- [66] a)Hardcastle, I. R.; Golding, B. T.; Griffin, R. J., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2002**, *42*, 325-348; b)Roy, K. K.; Sausville, E. A., *Curr. Pharm. Des.* **2001**, *7*, 1669-1687.
- [67] Canduri, F.; Uchoa, H. B.; de Azevedo, W. F., Jr., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *324*, 661-666.
- [68] Hoessel, R.; Leclerc, S.; Endicott, J. A.; Nobel, M. E.; Lawrie, A.; Tunnah, P.; Leost, M.; Damiens, E.; Marie, D.; Marko, D.; Niederberger, E.; Tang, W.; Eisenbrand, G.; Meijer, L., *Nature Cell. Biol.* **1999**, *1*, 60-67.
- [69] a)McInnes, C., *Drug Discov. Today* **2008**, *13*, 875-881; b)Shapiro, G. I., *J. Clin. Oncol.* **2006**, *24*, 1770-1783; c)Senderowicz, A. M., *Cancer Biol. Ther.* **2003**, *2*, S84-95; d)Castoldi, R. E.; Pennella, G.; Saturno, G. S.; Grossi, P.; Brughera, M.; Venturi, M., *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **2007**, *10*, 53-57; e)Senderowicz, A. M.; Sausville, E. A., *J. Natl. Cancer Inst.* **2000**, *92*, 376-387.
- [70] Senderowicz, A. M., *Oncologist* **2002**, *7 Suppl 3*, 12-19.
- [71] Byrd, J. C.; Lin, T. S.; Dalton, J. T.; Wu, D.; Phelps, M. A.; Fischer, B.; Moran, M.; Blum, K. A.; Rovin, B.; Brooker-McEldowney, M.; Broering, S.; Schaaf, L. J.; Johnson, A. J.; Lucas, D. M.; Heerema, N. A.; Lozanski, G.; Young, D. C.; Suarez, J. R.; Colevas, A. D.; Grever, M. R., *Blood* **2007**, *109*, 399-404.
- [72] a)Jung, C.; Motwani, M.; Kortmansky, J.; Sirotiak, F. M.; She, Y.; Gonen, M.; Haimovitz-Friedman, A.; Schwartz, G. K., *Clin. Cancer Res.* **2003**, *9*, 6052-6061; b)Motwani, M.; Delohery, T. M.; Schwartz, G. K., *Clin. Cancer Res.* **1999**, *5*, 1876-1883; c)Pennati, M.; Campbell, A. J.; Curto, M.; Binda, M.; Cheng, Y.; Wang, L. Z.; Curtin, N.; Golding, B. T.; Griffin, R. J.; Hardcastle, I. R.; Henderson, A.; Zaffaroni, N.; Newell, D. R., *Mol. Cancer Ther.* **2005**, *4*, 1328-1337; d)Schwartz, G. K.; Farsi, K.; Maslak, P.; Kelsen, D. P.; Spriggs, D., *Clin. Cancer Res.* **1997**, *3*, 1467-1472; e)Shah, M. A.; Schwartz, G. K., *Drug Resist. Updat.* **2000**, *3*, 335-356.
- [73] George, S.; Kasimis, B. S.; Cogswell, J.; Schwarzenberger, P.; Shapiro, G. I.; Fidas, P.; Bukowski, R. M., *Clin. Lung Cancer* **2008**, *9*, 160-165.
- [74] Dong, F.; Guo, W.; Zhang, L.; Wu, S.; Teraishi, F.; Davis, J. J.; Fang, B., *Cancer Biol. Ther.* **2006**, *5*, 165-170.
- [75] Koumenis, C.; Giaccia, A., *Mol. Cell. Biol.* **1997**, *17*, 7306-7316.
- [76] a)Chao, S. H.; Price, D. H., *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 31793-31799; b)Chen, R.; Keating, M. J.; Gandhi, V.; Plunkett, W., *Blood* **2005**, *106*, 2513-2519; c)Gojo, I.;

- Zhang, B.; Fenton, R. G., *Clin. Cancer Res.* **2002**, *8*, 3527-3538; d)MacCallum, D. E.; Melville, J.; Frame, S.; Watt, K.; Anderson, S.; Gianella-Borradori, A.; Lane, D. P.; Green, S. R., *Cancer Res.* **2005**, *65*, 5399-5407; e)Mohapatra, S.; Chu, B.; Zhao, X.; Pledger, W. J., *Cancer Res.* **2005**, *65*, 7717-7723.
- [77] Scrace, S. F.; Kierstan, P.; Borgognoni, J.; Wang, L. Z.; Denny, S.; Wayne, J.; Bentley, C.; Cansfield, A. D.; Jackson, P. S.; Lockie, A. M.; Curtin, N. J.; Newell, D. R.; Williamson, D. S.; Moore, J. D., *Cell Cycle* **2008**, *7*, 3898-3907.
- [78] Malumbres, M.; Pevarello, P.; Barbacid, M.; Bischoff, J. R., *Trends Pharmacol. Sci.* **2008**, *29*, 16-21.
- [79] Hochegger, H.; Takeda, S.; Hunt, T., *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* **2008**, *9*, 910-916.
- [80] a)Reddy, H. K.; Mettus, R. V.; Rane, S. G.; Grana, X.; Litvin, J.; Reddy, E. P., *Cancer Res.* **2005**, *65*, 10174-10178; b)Yu, Q.; Sicinska, E.; Geng, Y.; Ahnstrom, M.; Zagodzoon, A.; Kong, Y.; Gardner, H.; Kiyokawa, H.; Harris, L. N.; Stal, O.; Sicinski, P., *Cancer Cell* **2006**, *9*, 23-32.
- [81] Tetsu, O.; McCormick, F., *Cancer Cell* **2003**, *3*, 233-245.
- [82] Du, J.; Widlund, H. R.; Horstmann, M. A.; Ramaswamy, S.; Ross, K.; Huber, W. E.; Nishimura, E. K.; Golub, T. R.; Fisher, D. E., *Cancer Cell* **2004**, *6*, 565-576.
- [83] Chen, Y. N.; Sharma, S. K.; Ramsey, T. M.; Jiang, L.; Martin, M. S.; Baker, K.; Adams, P. D.; Bair, K. W.; Kaelin, W. G., Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 4325-4329.
- [84] Goga, A.; Yang, D.; Tward, A. D.; Morgan, D. O.; Bishop, J. M., *Nature Med.* **2007**, *13*, 820-827.
- [85] Pippin, J. W.; Qu, Q.; Meijer, L.; Shankland, S. J., *J. Clin. Invest.* **1997**, *100*, 2512-2520.
- [86] Rossi, A. G.; Sawatzky, D. A.; Walker, A.; Ward, C.; Sheldrake, T. A.; Riley, N. A.; Caldicott, A.; Martinez-Losa, M.; Walker, T. R.; Duffin, R.; Gray, M.; Crescenzi, E.; Martin, M. C.; Brady, H. J.; Savill, J. S.; Dransfield, I.; Haslett, C., *Nature Med.* **2006**, *12*, 1056-1064.
- [87] Pareek, T. K.; Keller, J.; Kesavapany, S.; Pant, H. C.; Iadarola, M. J.; Brady, R. O.; Kulkarni, A. B., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 791-796.
- [88] Monaco, E. A., 3rd; Vallano, M. L., *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 367-379.
- [89] Smith, P. D.; Crocker, S. J.; Jackson-Lewis, V.; Jordan-Sciutto, K. L.; Hayley, S.; Mount, M. P.; O'Hare, M. J.; Callaghan, S.; Slack, R. S.; Przedborski, S.; Anisman, H.; Park, D. S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 13650-13655.
- [90] Schang, L. M.; St Vincent, M. R.; Lacasse, J. J., *Antivir. Chem. Chemother.* **2006**, *17*, 293-320.
- [91] Salerno, D.; Hasham, M. G.; Marshall, R.; Garriga, J.; Tsygankov, A. Y.; Grana, X., *Gene* **2007**, *405*, 65-78.
- [92] Swainston Harrison, T.; Keating, G. M., *CNS Drugs* **2005**, *19*, 65-89.
- [93] a)Gudmundsson, K. S.; Johns, B. A., *Org. Lett.* **2003**, *5*, 1369-1372; b)Gudmundsson, K. S.; Williams, J. D.; Drach, J. C.; Townsend, L. B., *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 1449-1455.
- [94] a)Bochis, R. J.; Dybas, R. A.; Eskola, P.; Kulsa, P.; Linn, B. O.; Lusi, A.; Meitzner, E. P.; Milkowski, J.; Mrozik, H.; Olen, L. E.; Peterson, L. H.; Tolman, R. L.; Wagner, A. F.; Wakszynski, F. S.; Egerton, J. R.; Ostlind, D. A., *J. Med. Chem.* **1978**, *21*, 235-237; b)Feng, D.; Fisher, M.; Liang, G. B.; Qian, X.; Brown, C.; Gurnett, A.; Leavitt, P. S.; Liberator, P. A.; Mathew, J.; Misura, A.; Samaras, S.;

- Tamas, T.; Schmatz, D. M.; Wyvratt, M.; Biftu, T., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5978-5981.
- [95] Kaminski, J. J.; Perkins, D. G.; Frantz, J. D.; Solomon, D. M.; Elliott, A. J.; Chiu, P. J. S.; Long, J. F., *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 2047-2051.
- [96] a) Buckley, G. M.; Ceska, T. A.; Fraser, J. L.; Gowers, L.; Groom, C. R.; Higuieruelo, A. P.; Jenkins, K.; Mack, S. R.; Morgan, T.; Parry, D. M.; Pitt, W. R.; Rausch, O.; Richard, M. D.; Sabin, V., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 3291-3295; b) Buckley, G. M.; Fosbeary, R.; Fraser, J. L.; Gowers, L.; Higuieruelo, A. P.; James, L. A.; Jenkins, K.; Mack, S. R.; Morgan, T.; Parry, D. M.; Pitt, W. R.; Rausch, O.; Richard, M. D.; Sabin, V., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 3656-3660; c) Buckley, G. M.; Gowers, L.; Higuieruelo, A. P.; Jenkins, K.; Mack, S. R.; Morgan, T.; Parry, D. M.; Pitt, W. R.; Rausch, O.; Richard, M. D.; Sabin, V.; Fraser, J. L., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 3211-3214.
- [97] Engler, T. A.; Henry, J. R.; Malhotra, S.; Cunningham, B.; Furness, K.; Brozinick, J.; Burkholder, T. P.; Clay, M. P.; Clayton, J.; Diefenbacher, C.; Hawkins, E.; Iversen, P. W.; Li, Y.; Lindstrom, T. D.; Marquart, A. L.; McLean, J.; Mendel, D.; Misener, E.; Briere, D.; O'Toole, J. C.; Porter, W. J.; Queener, S.; Reel, J. K.; Owens, R. A.; Brier, R. A.; Eessalu, T. E.; Wagner, J. R.; Campbell, R. M.; Vaughn, R., *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 3934-3937.
- [98] Kaufman, M. D.; Plummer, M. S.; Rewcastle, G. W., *U.S. Patent* **2005**, *0 049 276*.
- [99] Katritzky, A. R.; Xu, Y. J.; Tu, H., *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 4935-4937.
- [100] a) Anderson, M.; Beattie, J. F.; Breault, G. A.; Breed, J.; Byth, K. F.; Culshaw, J. D.; Ellston, R. P.; Green, S.; Minshull, C. A.; Norman, R. A.; Pauptit, R. A.; Stanway, J.; Thomas, A. P.; Jewsbury, P. J., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3021-3026; b) Byth, K. F.; Culshaw, J. D.; Green, S.; Oakes, S. E.; Thomas, A. P., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 2245-2248.
- [101] Katritzky, A. R.; Xu, Y. J.; Tu, H., *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 4935-4937.
- [102] Byth, K. F.; Geh, C.; Forder, C. L.; Oakes, S. E.; Thomas, A. P., *Mol. Cancer Ther.* **2006**, *5*, 655-664.
- [103] Cai, D.; Byth, K. F.; Shapiro, G. I., *Cancer Res.* **2006**, *66*, 435-444.
- [104] Abe, Y.; Kayakiri, H.; Satoh, S.; Inoue, T.; Sawada, Y.; Inamura, N.; Asano, M.; Aramori, I.; Hatori, C.; Sawai, H.; Oku, T.; Tanaka, H., *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 4062-4079.
- [105] Lagoja, Irene M., *Chem. Biodiv.* **2005**, *2*, 1-50.
- [106] Goodman, L. S.; Gilman, A.; Brunton, L. L.; Lazo, J. S.; Parker, K. L., *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*, 11a ed., McGraw-Hill, New York, **2006**.
- [107] Brown, D. J., *The pyrimidines*, Wiley, New York, **1994**.
- [108] Bioportafolio, <http://www.bioportfolio.com/cgi-bin/acatalog/Sample%20IP%20overview%20CDKinhibitors%20Bioportofolio.pdf> **2010**, *accesado enero 2010*.
- [109] a) Harbert, C. A.; Plattner, J. J.; Welch, W. M.; Weissman, A.; Koe, B. K., *J. Med. Chem.* **1980**, *23*, 635-643; b) Lindley, J., *Tetrahedron* **1984**, *40*, 1433-1456.
- [110] Prim, D.; Campagne, J.-M.; Joseph, D.; Andrioletti, B., *Tetrahedron* **2002**, *58*, 2041-2075.

- [111] a)Wolfe, J. P.; Tomori, H.; Sadighi, J. P.; Yin, J.; Buchwald, S. L., *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 1158-1174; b)Wolfe, J. P.; Buchwald, S. L., *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2413-2416.
- [112] Tsuji, J., *Palladium reagents and catalysts innovations in organic synthesis*, Wiley & Sons, New York, **1995**.
- [113] Astruc, D., *Modern arene chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, **2002**.
- [114] Viciu, M. S.; Kissling, R. M.; Stevens, E. D.; Nolan, S. P., *Org. Lett.* **2002**, *4*, 2229-2231.
- [115] Kürti, L.; Czakó, B., *Strategic applications of named reactions in organic synthesis : background and detailed mechanisms*, Elsevier Academic, Burlington, MA, **2005**.
- [116] Charles, M. D.; Schultz, P.; Buchwald, S. L., *Org. Lett.* **2005**, *7*, 3965-3968.
- [117] Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R., *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, *82*, 1107-1112.
- [118] Meijer, L.; Borgne, A.; Mulner, O.; Chong, J. P. J.; Blow, J. J.; Inagaki, N.; Inagaki, M.; Delcros, J.-G.; Moulinoux, J.-P., *Eur. J. Biochem.* **1997**, *243*, 527-536.
- [119] Lakowicz, J. R., *Principles of fluorescence spectroscopy*, 3a ed., Springer, New York, **2006**.
- [120] Pasaribu, S. J.; Williams, L. R., *Aust. J. Chem.* **1973**, *26*, 1327-1331.
- [121] a)Adlington, R. M.; Baldwin, J. E.; Catterick, D.; Pritchard, G. J., *Chem. Commun.* **1997**, 1757-1758; b)Adlington, R. M.; Baldwin, J. E.; Catterick, D.; Pritchard, G. J., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1999**, 855-866.
- [122] Chaouni-Benabdallah, A.; Galtier, C.; Allouchi, H.; Kherbeche, A.; Chavignon, O.; Teulade, J. C.; Witvrouw, M.; Pannecouque, C.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Fauvelle, F.; Enguehard, C.; Gueiffier, A., *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, *49*, 1631-1635.
- [123] Yin, J.; Buchwald, S. L., *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6043-6048.
- [124] Erenler, R.; Biellmann, J.-F., *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 5683-5685.
- [125] Vasiliou, V.; Pappa, A.; Estey, T., *Drug Metab. Rev.* **2004**, *36*, 279 - 299.
- [126] Reign, G.; McMahon, H.; Ishizaki, M.; Ohara, T.; Shimane, K.; Esumi, Y.; Green, C.; Tyson, C.; Ninomiya, S.-i., *Carcinogenesis* **1996**, *17*, 1989-1996.
- [127] Levene, P. A., *Org. Synth., Coll. Vol.* **1943**, *2*, 88-89.
- [128] Altman, R. A.; Fors, B. P.; Buchwald, S. L., *Nature Protoc.* **2007**, *2*, 2881-2887.



## Short communication

Synthesis and cytotoxic activity of 2-methylimidazo[1,2-*a*]pyridine- and quinoline-substituted 2-aminopyrimidine derivativesMiguel Angel Vilchis-Reyes<sup>a,\*</sup>, Alejandro Zentella<sup>b</sup>, Miguel Angel Martínez-Urbina<sup>a</sup>, Ángel Guzmán<sup>a</sup>, Omar Vargas<sup>b</sup>, María Teresa Ramírez Apan<sup>a</sup>, José Luis Ventura Gallegos<sup>b</sup>, Eduardo Díaz<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México 04510, D. F., México<sup>b</sup> Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México 04510, D. F., México

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 9 March 2009

Received in revised form

28 September 2009

Accepted 1 October 2009

Available online 13 October 2009

## Keywords:

Imidazo[1,2-*a*]pyridine

Quinoline

Biososteric replacement

CDK

Apoptosis

## ABSTRACT

A series of 2-methylimidazo[1,2-*a*]pyridine- and quinoline-substituted 2-aminopyrimidines derivatives were synthesized using a convenient synthetic route. We evaluate the isosteric replacement of methyl groups in 4-(2-methylimidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)-*N*-*p*-tolylpyrimidin-2-amine (compound **1**) by trifluoromethyl groups and the isosteric substitution of the 2-methylimidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl scaffold by quinolin-4-yl or quinolin-3-yl moieties. The replacement of hydrogen by fluorine does not affect notably the cytotoxic activity and CDK inhibitor activity in this series. Quinolin-4-yl-substituted compound, **8**, presents cytotoxic activity and is most effective and selective against CDK1/CycA than against CDK2/CycB. Compound **11**, which has a quinolin-3-yl moiety is CDK inhibitor but presents null cytotoxic activity. Quinolin-4-yl-substituted compounds constitute a new lead of cytotoxic and CDK inhibitor compounds from which more compelling and selective inhibitors can be designed.

© 2009 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

## 1. Introduction

Cancer is a leading cause of death. Approximately, one in four persons dies of cancer in the United States [1] and cancer is the third most common cause of death worldwide [2]. The incidence of cancer has not dropped over the last decades; the most complicated cases are present in developing countries and it is expected that in the following years its incidence will be bigger than the incidence of cardiovascular diseases [2].

Regardless of the use of surgical treatment and irradiation, chemotherapy still remains an important option for the treatment of solid cancers. Despite extensive research efforts, the therapeutic treatment of tumor patients is still not satisfying. Chemotherapeutic drugs should preferentially target tumor cells without harming normal cells or tissues. Unfortunately, in most cases, chemotherapy remains a treatment modality with harsh side effects due to the toxicity of the drugs. Toxic effects on rapidly proliferating cells such as intestinal cells and bone marrow can cause life-threatening infections and other side effects, which seriously affect the quality of life of the patient. The indiscriminate

nature of current cancer chemotherapy and drug resistance has initiated a search for more selective approaches.

Imidazo[1,2-*a*]pyridine scaffold has been extensively studied for their pharmacological properties, such as hypnotic [3], antiviral [4], antiparasitic [5] and proton pump inhibitor [6]. This moiety has revealed inhibitory properties on several kinases. Some examples are IRK-4 [7], GSK3 [8] and MAPK/ERK kinase [9]. Recently, 2-aminopyrimidines substituted with 2-methylimidazo[1,2-*a*]pyridine have showed excellent cytotoxic and inhibitory activity against cyclin-dependent kinase 2 (CDK2) [10,11]. Meridianines, indole-substituted 2-aminopyrimidines, are kinase inhibitors [12], showing that the replacement of the imidazo[1,2-*a*]pyridine is possible. As a part of our search for new antitumor compounds, a new series of imidazo[1,2-*a*]pyridine- and quinoline-substituted 2-aminopyrimidines were synthesized as potential antitumoral compounds. At the same time and with the same objective we explore the biososteric replacement in compound **1** (Table 1) of the hydrogen atoms in the methyl group of 2-methylimidazo[1,2-*a*]pyridine and in the tolyl part of the molecule by fluorine. In addition, since it is known that the biososteric substitution of the 2-methylimidazo[1,2-*a*]pyridine by a quinoline ring gave good antagonist compounds when applied to bradykinin B<sub>2</sub> receptor [13], we prepared compounds **7–12**. The synthesized compounds (Table 1) were tested against the following tumor human cell lines: U251 (glioma), PC-3 (prostate), K562 (Leukemia), HCT-15 (colon),

\* Corresponding authors. Tel.: +52 55 56 22 44 21; fax: +52 55 56 16 22 17.

E-mail addresses: [vilchis90@yahoo.com](mailto:vilchis90@yahoo.com) (M.A. Vilchis-Reyes), [maudiaz@servidor.unam.mx](mailto:maudiaz@servidor.unam.mx) (E. Díaz).

**Table 1**  
In vitro susceptibility of SK-LU-1 and MCF7 cell lines of synthesized imidazo[1,2-*a*]pyridine and quinoline-substituted 2-aminopyrimidines.

Compound	Ar	R	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	
			SK-LU-1	MCF7
1			0.0197 ± 0.009	0.059 ± 0.007
2			0.034 ± 0.016	0.066 ± 0.002
3			1.540 ± 0.14	4.270 ± 0.36
4		H	56.510 ± 1.40	53.680 ± 21.62
5			0.175 ± 0.005	0.044 ± 0.02
6			0.745 ± 0.18	0.290 ± 0.24
7		H	>50	40.25 ± 0.25
8			1.400 ± 0.15	0.600 ± 0.04
9			1.720 ± 0.13	1.650 ± 0.06
10		H	>50.0	>50.0
11			NT	~50.0

**Table 1** (continued)

Compound	Ar	R	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	
			SK-LU-1	MCF7
12			NT	>50.0

NT = Not tested.

<sup>a</sup> The results show the concentration producing 50% of growth inhibition. Data are presented as mean ± SD of three independent experiments.

MCF7 (breast) and SK-LU-1 (lung). The effect on the cell cycle, cell death and inhibition of CDK2/CycA and CDK1/CycB of selected compounds was analyzed.

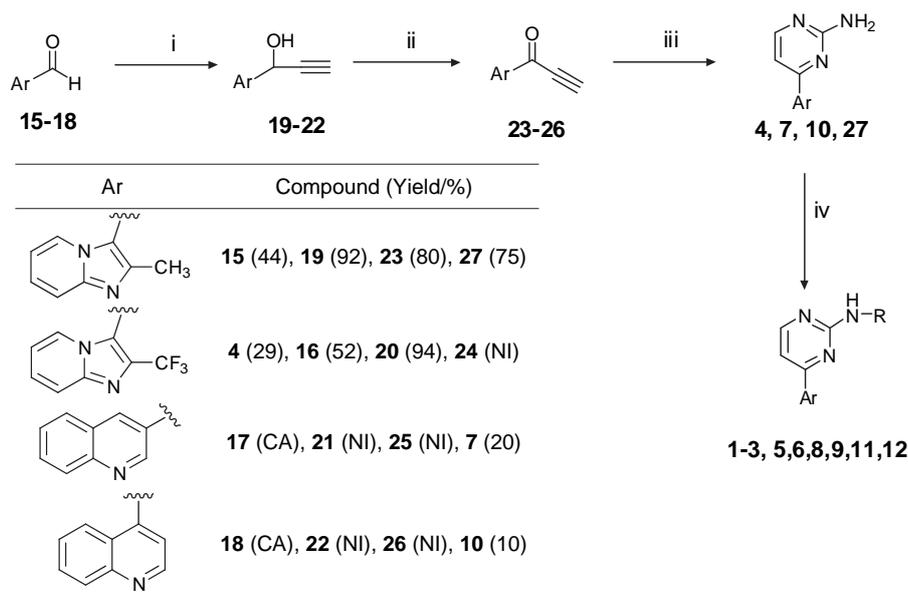
## 2. Chemistry

Synthesis of compounds **1–12** was achieved starting with the corresponding aldehyde (Scheme 1). 3- and 4-quinolinecarboxaldehyde are commercially available, 2-methylimidazo[1,2-*a*]pyridine-3-carboxaldehyde (**15**) and 2-(trifluoromethyl)imidazo[1,2-*a*]pyridine-3-carboxaldehyde (**16**) were prepared through reaction of 2-aminopyridine with bromoacetone or 1,1,1-trifluoro-3-bromoacetone in ethanol-dioxane solution to afford compounds **13** and **14** (Scheme 2). Vilsmeier–Haack reaction of these with chloromethyliminium chloride yielded compounds **15** and **16** (Scheme 2).

Addition of ethynyl magnesium bromide 0.5 M in THF to the aromatic aldehydes **15**, **16**, **17** and **18** gave the propargylic alcohol derivatives **19**, **20**, **21** and **22**. These were oxidized with MnO<sub>2</sub> to afford the corresponding alkynyl ketone **23**, **25** and **26**. Oxidation of **20** with MnO<sub>2</sub> produce unsatisfactory results, but the use of calcium hypochlorite under phase-transfer catalyst condition produced **24**. Cyclocondensation of **23**, **24**, **25** and **26** with guanidine sulfate afforded imidazo[1,2-*a*]pyridines-substituted 2-aminopyrimidines **27** and **4** and quinoline-substituted 2-aminopyrimidines **7** and **10**. Then the desired products **1**, **2**, **3**, **5**, **6**, **8**, **9**, **11**, and **12** were obtained in excellent yields after the coupling between **27**, **4**, **7** and **10** and an aryl bromide or iodide under modified Buchwald–Hartig conditions [14]. All synthesized compounds were characterized by <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR and mass spectroscopy.

## 3. Biological results and discussion

In this study we evaluated (1) the bioisosteric replacement in compound **1** of the methyl hydrogen atoms of 2-methylimidazo[1,2-*a*]pyridine by fluorine in compounds **4**, **5** and **6**, the substitution of methyl hydrogen atoms of the tolyl groups by fluorine in compound **2**, **6**, **9** and **12**. Fluorine presents the advantage of having a van der Waals radius comparable to that of hydrogen [15]. (2) The bioisosteric substitution of the complete 2-methylimidazo[1,2-*a*]pyridine scaffold by the isoelectronic quinoline-4-yl (compounds **7**, **8**, and **9**) and (3) the regioisomer quinoline-3-yl (compounds **10**, **11** and **12**). In compound **3** the entire toluene group was replaced with a thiazol ring. All compounds were evaluated for their cytotoxic activity in vitro against the tumor human cell lines U251 (glioma), PC-3 (prostate), K562 (leukemia), HCT-15 (colon), MCF7 (breast) and SK-LU-1 (lung). A primary screening at a fixed concentration of 50 μM showed cytotoxicity against the six human tumor cell lines (Table 2) as a positive control we used 5-fluorouracil at the same concentration. Although the type of cell lines tested differs among them in origin and genetic background some regularity could be observed. Compounds **1–9** showed better activity than 5-fluorouracil. In contrast, less activity or no activity was found for the



**Scheme 1.** Reagents: (i) Ethynyl magnesium bromide 0.5 M; (ii)  $\text{MnO}_2$ ; for compound **20**  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , water, tetrabutylammonium bromide (catalytic); (iii) Guanidine sulfate,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , (iv) Xantphos (3%),  $\text{Pd}(\text{dba})_2$  (3%),  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ , toluene, aryl halide (1-iodo-4-methylbenzene, 1-iodo-4-(trifluoromethyl)benzene or 5-bromothiophene-2-carboxaldehyde). CA, commercially available; NI, not isolated.

compounds with the quinoline-3-yl substituent **10**, **11** and **12**. The most sensitive tumor human cell lines are MCF7 and SK-LU-1. In MCF7 cell line most of the synthesized compounds showed a 100 percent inhibition of cellular growth at 50  $\mu\text{M}$ . We decided to determine the  $\text{IC}_{50}$  value of compounds **1–12** in the most sensitive cell lines MCF7 and SK-LU-1. Results are depicted in Table 1. The most potent compounds are **1** and **2** in both cell lines. The change of the tolyl group for a thiazolyl group reduces the biological activity of compound **3**. The bioisosteric replacement of the hydrogen atoms in the methyl group of the tolyl moiety do not affect significantly the biological activity of the compounds **2** and **9** comparing with **1** and **8** respectively. The substitution of the hydrogen atoms of the methyl group in position 2 of the imidazo[1,2-*a*]pyridine by fluorine, compound **5**, produces a nine fold decrement of potency in SK-LU-1 cells and a 0.74 fold decrement of potency in MCF7 cells than compound **1**. The replacement by fluorine in both methyl groups, tolyl and 2-methylimidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl moieties, produces a slight decrement in activity in MCF7 cell lines, and a moderate decrement in SK-LU-1 cells, this replacements cause an increase in the lipophilicity and an electron withdrawing effect which alter the biological properties of a molecule. Having a trifluoromethyl group in the molecule instead of methyl group increments the metabolic stability of the molecule. This could represent an advantage during in vivo studies.

Compounds **7** and **8** which enclose a quinolin-4-yl group instead of the imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl scaffold, have modest cytotoxic activity in both SK-LU-1 and MCF7 cell lines. Comparing, compound **1** is 71 times more active in SK-LU-1 cell line and 10 times more active in MCF7 cell line than compound **8**; on the other hand,

compound **2** is 50 times more active in SK-LU-1 cell line and 25 times more active than compound **9**. The cytotoxic activity exhibited by compounds **11** and **12** was not significant compared with compounds **8** and **9**. This last result indicates that quinolin-4-yl group is better than quinolin-3-yl group to replace the 2-methyl imidazo[1,2-*a*]pyridine-3-yl scaffold. Compounds **4** and **5** showed poor activity than compounds with and *N*-aryl moiety, e.g. **5** and **8**.

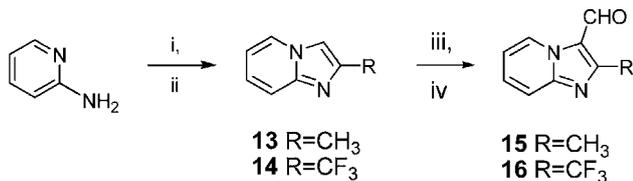
Next, in order to evaluate the effect of the selected compound (**1**, **3**, and **8**) on the growth and division of asynchronous SK-LU-1 and MCF-7 cell lines (Table 3, Fig. 1) we used flow cytometry, measuring the DNA content of each cell line after a 24 h treatment. As a positive control we used the CDK2 inhibitor Olomoucine and as a negative control DMSO alone at the highest quantity used in the experiments. All compounds were used at a concentration of approximately twice  $\text{IC}_{50}$  value in each cell line; except for compound **8** in SK-LU-1 cell line. The results show the proportion of cells emitting fluorescence proportional to the DNA content. In SK-LU-1 cells compound **1**, **3** and **8** significantly arrest cells in the G2/M phase of the cell cycle (Fig. 1) with a significant decrease in the proportion of cells in the G0/G1 phase in comparison with control

**Table 2**  
Inhibition of human tumor cells lines by compounds **1–12**.<sup>a</sup>

Compound	% of growth inhibition					
	U251	PC-3	K562	HCT-15	MCF7	SK-LU-1
<b>1</b>	100.0	94.2	89.4	95.2	88.5	100.0
<b>2</b>	85.6	64.5	84.8	88.6	83.4	100.0
<b>3</b>	57.8	49.5	88.1	85.4	75.9	100.0
<b>4</b>	92.2	74.0	56.3	274.0	100.0	71.0
<b>5</b>	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
<b>6</b>	100.0	92.0	94.2	94.4	100.0	95.0
<b>7</b>	100.0	77.4	9.4	NA	100.0	78.2
<b>8</b>	100.0	100.0	50.9	100.0	100.0	100.0
<b>9</b>	91.8	87.3	NA	100.0	100.0	100.0
<b>10</b>	38.5	31.9	NA	NA	100.0	59.3
<b>11</b>	87.7	59.5	NA	30.3	100.0	46.3
<b>12</b>	49.8	22.9	NA	24.0	80.9	35.4
5-fluorouracil	64.2	45.4	73.7	71.3	65.1	70.5

NA = Not active.

<sup>a</sup> 50  $\mu\text{M}$ ; mean of three experiments with three replicates each one.



**Scheme 2.** Reagents: (i) Bromoacetone or 3-bromo-1,1,1-trifluoroacetone (ii) triethylamine; (iii)  $\text{POCl}_3$ , DMF; (iv) water.

**Table 3**  
Cell cycle analysis of SK-LU-1 and MCF7 cell lines after treatment with **1**, **3**, and **8**. DMSO was used as vehicle control and Olomoucine, a CDK-2 inhibitor, as a positive control.

Compound	Cell cycle phase (%) <sup>a</sup>					
	SK-LU-1			MCF7		
	G1	S	G2/M	G1	S	G2/M
<b>1</b>	4.7 ± 0.4 <sup>b</sup>	20.9 ± 10.7	77.5 ± 5.6 <sup>b</sup>	60.8 ± 1.8	25.3 ± 4.3	14.7 ± 7.0
<b>3</b>	42.5 ± 0.4 <sup>b</sup>	13.9 ± 4.2	48.0 ± 8.5 <sup>b</sup>	54.5 ± 6.3	15.7 ± 4.6	22.2 ± 1.6
<b>8</b>	8.1 ± 9.6 <sup>b</sup>	22.0 ± 19.3	74.0 ± 11.4 <sup>b</sup>	18.7 ± 5.6 <sup>b</sup>	15.1 ± 6.7	64.7 ± 1.4 <sup>b</sup>
DMSO	61.7 ± 2.9	18.2 ± 1.5	16.1 ± 0.9	57.0 ± 3.7	17.0 ± 1.2	23.2 ± 0.4
Olomoucine	44.2 ± 2.9	19.7 ± 8.6 <sup>b</sup>	31.8 ± 3.7 <sup>b</sup>	60.6 ± 3.1	15.1 ± 2.3	23.2 ± 0.4

<sup>a</sup> Results are expressed as means ± SD of three independent experiments. Cells were incubated with the compounds for 24 h.

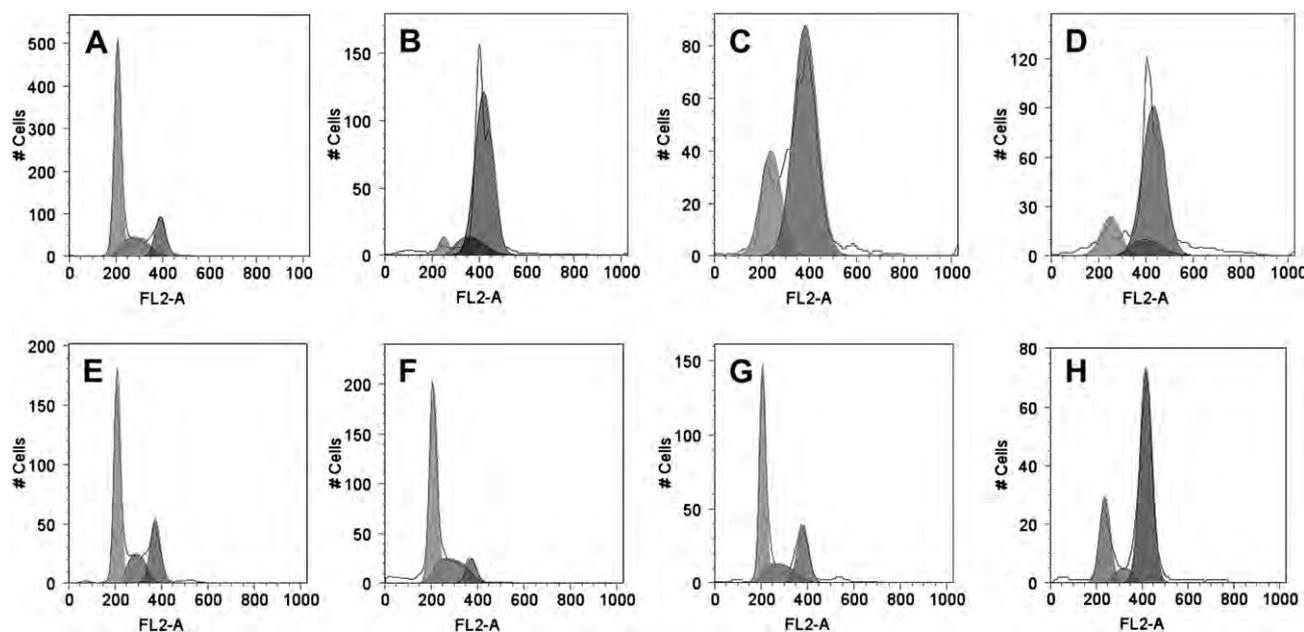
<sup>b</sup>  $P < 0.05$  as compared with solvent (DMSO) on 24 h treatment.

cells (DMSO, Fig. 1), S phase presents no difference with respect to control. Olomoucine has significant effect on S and G2/M phase of cell cycle of SK-LU-1 at the concentration used in these experiments (Table 3). MCF7 cell line shows a cell cycle pattern after treatment with compound **1** and **3** which possess a 2-methylimidazo[1,2-*a*]pyridine scaffold, similar to control cells, differences are statistically not significant. In contrast, compound **8** shows a strong arrest in G2/M phase of the cell cycle after a 24 h treatment in comparison with control cells (Table 3, Fig. 1) and a diminution in the G1/G0 phase of the cell cycle; S phase not presents significant differences in comparison with control cells. Olomoucine has no effect on cell cycle of MCF7 cells at the concentration used in these experiments (Table 3). The cell enlargement characteristic of a G2/M arrest was also evident as an enhancement in the FSC vs. SSC dot plots generated by all the tested compounds in SK-LU-1 cells and by compound **8** in MCF7.

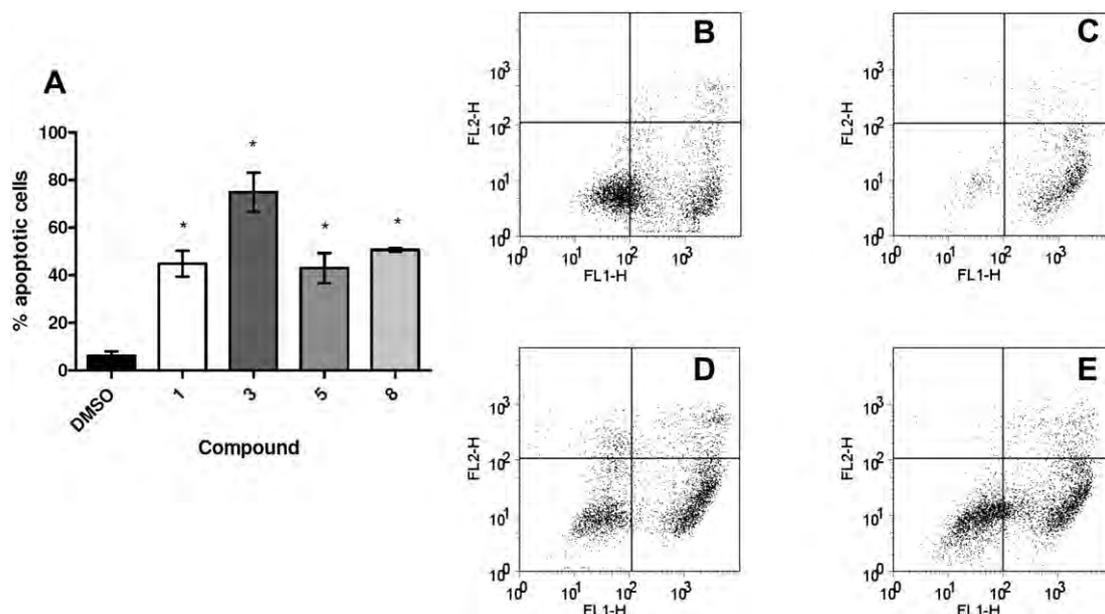
Resistance to cell apoptosis is one of the mechanisms that is important in cancer drug resistance. To determine whether G2/M arrest was followed by induction of apoptosis, asynchronously growing SK-LU-1 cell line was exposed to compounds **1**, **3**, **5** and **8** for 24 and 48 h. Cell death was monitored by flow cytometry, using the binding of fluorescein isothiocyanate-labeled annexin V to phosphatidylserine (Annexin V-FITC). Apoptotic cells show positive fluorescence for annexin V-FITC; subsequently, an augment in the green fluorescence in the FLH-1 channel indicates an increase in

apoptotic cell death. The upper left corner of the quadrant represents debris, lower left are live cells, upper right are late apoptotic or necrotic cells and lower right are apoptotic cells. After an incubation period of 24 h with the mentioned compounds, apoptosis was not significantly superior to control experiment. However, our data shows that compounds **1**, **3**, **5** and **8** are effective apoptotic inducers on SK-LU-1 cell line after a 48 h treatment (Fig. 2), showing a significant increase in apoptotic death cells comparing with DMSO treated cells. Not significant necrotic cells were found in cells treated with molecules **1**, **3**, **5** and **8**. If a molecule induces death via an apoptotic pathway, then this molecule will cause fewer toxic side reactions in vivo than if it induces death via necrosis.

It has been reported that substituted 2-aminopyrimidines are kinase inhibitors, especially of CDK2 [10–12]. We next analyzed the activity of compounds **1**, **2**, **3**, **8**, and **11** on recombinant CDK2/CycA and CDK1/CycB (Table 4). We used as positive control Olomoucine, it has been reported that the IC<sub>50</sub> on CDK2/CycA of this compound is 7 μM [16]; for this reason we tested all compounds at the same concentration. In general all compounds tested are better than Olomoucine in both CDK2/CycA and CDK1/CycB. Compound **1**, **2** and **3** inhibit CDK1/CycB at the same extend at 7 μM. Interestingly, compound with a quinolinyl moiety present better inhibitory potency against CDK1/CycB, this observation could explain the G2/M arrest induced in MCF7 cell line when compounds **1** and **3** failed to exhibit this phenomena on this cell line (Fig. 1, Table 3). On CDK2/



**Fig. 1.** Cell cycle phase effect of compound **1**, **3**, and **8** on SK-LU-1 and MCF7 cell lines. DMSO was used as solvent control (A, SK-LU-1; E, MCF7). Olomoucine was used as a positive control (not shown). Treatment with 0.04 μM compound **1** (B), 8.4 μM compound **3** (C), 1 μM compound **8** (D), and 70 μM Olomoucine were utilized on SK-LU-1 cells. 0.118 μM compound **1** (F), 8.4 μM compound **3** (G), 1 μM compound **8** (H), and 60 μM Olomoucine were used on MCF7 cells. Representative experiment out of three is shown.



**Fig. 2.** Induction of apoptosis on SK-LU-1 after treatment with 0.04  $\mu\text{M}$  compound **1**, 8.4  $\mu\text{M}$  compound **3**, 0.4  $\mu\text{M}$  compound **5** and 1  $\mu\text{M}$  compound **8** for 48 h, DMSO was used as a negative control (A). Detection of apoptosis through annexin V and PI staining after treatment with **1** (B), **3** (C), **5** (D), and **8** (E) on SK-LU-1 cells. Representative experiment out of three is shown.

CycA most active compounds are **2** and **3**, albeit compound **3** does not exhibit the highest cytotoxic value compared with **1** and **2**. It is important to note that compound **11** was never significantly cytotoxic; however it shows inhibition on CDKs similar to **8** in both CDK1/CycB and CDK2/CycA (Table 1, Table 4). These differences in cytotoxic and CDKs inhibitory activity may be reflecting variations in cellular permeability, in intracellular distribution, and in metabolism.

In conclusion we have synthesized a series of 2-methylimidazo[1,2-*a*]pyridine- and quinoline-substituted 2-aminopyrimidines which inhibit CDK1/CycB and CDK2/CycA. Among the compounds containing a 2-methylimidazo[1,2-*a*]pyridine, hydrogen replacement by fluorine does not affect notably the cytotoxic activity. Quinoline-substituted compound, **8** and **11**, are most potent and selective against CDK1/CycB than against CDK2/CycA. Quinolin-4-yl-substituted compounds constitute a new family of cytotoxic and CDK inhibitor compounds from which more potent and selective inhibitors can be designed. The compounds synthesized broaden the knowledge of the activity of these kinds of derivatives.

#### 4. Experimental protocols

Melting points were determined on a MEL-TEMP<sup>®</sup> capillary melting point apparatus and are uncorrected. <sup>1</sup>H NMR spectra were recorded on a Varian Gemini 200 MHz, Varian Unity 300 MHz, and Varian Inova 500 MHz (<sup>1</sup>H NMR and 125 MHz <sup>13</sup>C NMR). Chemical shifts are expressed as  $\delta$  values relative to TMS as internal standard, *J* values are given in Hz; spectra were recorded in CDCl<sub>3</sub>, or a mixture of CDCl<sub>3</sub> and DMSO-*d*<sub>6</sub> when problems of solubility were presented (compounds **2**, **3**, **7**, **10** and **12**). Mass spectra were recorded on a JEOL JMS-SX 10217 spectrometer by electron impact (EI). All reagents were acquired from Sigma-Aldrich unless otherwise stated. The solvents were distilled before being used. Tetrahydrofuran (THF) and toluene were dried with sodium using benzophenone as indicator. Bromoacetone was obtained from bromide and acetone and distilled under vacuum prior to use [17]. Silica gel (mesh 230–400) was purchased from Merck.

#### 4.1. Chemistry

##### 4.1.1. General method of synthesis of compounds **13** and **14**

2-Aminopyridine is dissolved in a 3:1 mixture of ethanol-dioxane and 1.1 equivalents of the appropriated bromoacetone are added slowly. The reaction mixture is vigorously mixed during 2 h, a solid is formed. Then three equivalents of triethylamine are added and the mixture is refluxed overnight. The volatiles are removed under vacuum and water is added to dissolve the formed salts.

**4.1.1.1. 2-Methylimidazo[1,2-*a*]pyridine (**13**).** The aqueous suspension is extracted with AcOEt. The organic phase is dried with anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the solvent is evaporated in a Rotavapor evaporator. The oily residue is distilled under vacuum to give the title compound as yellow pale oil which solidifies and is stable at 4 °C. Yield 50%. B. p. 108–110 °C/6 mmHg. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)  $\delta$ : 2.46 (d, 3H, *J* = 0.8 Hz), 6.71 (td, 1H, *J* = 1.2, 6.6 Hz), 7.10 (ddd, 1H, *J* = 1.2, 5.6, 9.0 Hz), 7.33 (s, 1H), 7.50 (dd, *J* = 0.8, 9.0 Hz), 8.02 (dt, 1H, *J* = 1.2, 6.8 Hz). C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub> calculated m. w.: 132.16. MS [EI+] *m/z*: 132 [M]<sup>+</sup> (100), 131 [M – H]<sup>+</sup> (80).

**4.1.1.2. 2-(Trifluoromethyl)imidazo[1,2-*a*]pyridine (**14**).** A solid is formed after adding water which is separated by suction. The solid is purified by column chromatography with EtOAc–Hexane 1:1. Recrystallization from hexane yields 75% of a white solid. M. p. 91–92 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$ : 6.92 (td, 1H, *J* = 1.2, 6.9 Hz), 7.31 (ddd, 1H, *J* = 1.2, 6.9, 9.3 Hz), 7.89 (s, 1H), 8.15 (td, 1H, *J* = 1.2, 6.9 Hz). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz),  $\delta$ : 111.46, 113.96, 118.70,

**Table 4**  
Percent of inhibition of human CDK/Cyc enzymes by compounds **1**, **2**, **3**, **8** and **11**.<sup>a</sup>

CDK/Cyc	Compound					
	Olomoucine	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>8</b>	<b>11</b>
CDK1/CycB	48	59	60	52	75	73
CDK2/CycA	43	58	69	76	45	49

<sup>a</sup> 7  $\mu\text{M}$ ; mean of two independent experiments.

122.00 (q,  $J = 267.5$  Hz), 126.25, 126.52, 135.96 (q,  $J = 38$  Hz), 145.4.  $C_8H_5F_3N_2$  calculated m. w.: 186.13 MS [EI+]  $m/z$ : 186 [M]<sup>+</sup> (100), 167 [M – F]<sup>+</sup> (15).

#### 4.1.2. General method of synthesis of compounds **15** and **16**

Over excess of anhydrous DMF at 0 °C are added slowly 2.5 equivalents of POCl<sub>3</sub> and the mixture is mixed during 15 min. Posterior, one equivalent of compound **13** or **14** is added and the reaction mixture is stirred vigorously by 1 h. Then the reaction is warmed at 60 °C by 24 h or until no starting material is detected by TLC. Chopped ice was added and the mixture is neutralized with ammonium hydroxide.

**4.1.2.1. 2-Methylimidazo[1,2-*a*]pyridine-3-carbaldehyde (15).** Oil was obtained which was solubilized in hot hexane, after cooling a solid was formed. Recrystallized from hexane to obtain a white solid. Yield 44% m. p. 119–120 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$ : 2.73 (s, 3H), 7.07 (td, 1H,  $J = 1.2$ , 6.8 Hz), 7.52 (ddd, 1H,  $J = 1.2$ , 6.8, 9.0 Hz), 7.68 (td, 1H,  $J = 1.2$ , 9.0 Hz), 10.01 (s, 1H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz)  $\delta$ : 114.46, 114.83, 116.63, 121.19, 128.31, 130.01, 147.65, 157.08, 176.96.  $C_9H_8N_2O$  calculated m. w.: 160.17 MS [EI+]  $m/z$ : 160 [M]<sup>+</sup> (100), 159 [M – H]<sup>+</sup> (98), 131 [M – CHO]<sup>+</sup> (25).

**4.1.2.2. 2-(Trifluoromethyl)imidazo[1,2-*a*]pyridine-3-carbaldehyde (16).** Purified by column chromatography (EtOAc–Hexane 1:9) and recrystallized from hexane to obtain 52% yield of white plaques. M. p. 116–118 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)  $\delta$ : 7.28 (td, 1H,  $J = 1.2$ , 7.0 Hz), 7.68 (ddd, 1H,  $J = 1.2$ , 6.8, 9.0 Hz), 7.90 (dt, 1H,  $J = 1.2$ , 9.0 Hz), 9.65 (dt, 1H,  $J = 1.2$ , 7 Hz), 10.22 (s, 1H). <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz)  $\delta$ : 114.46, 114.83, 116.63, 122.00 (q,  $J = 267.5$  Hz), 128.31, 130.01, 147.65, 157.08, 176.96.  $C_9H_5F_3N_2O$  calculated m. w.: 214.14 MS [EI+]  $m/z$ : 214 [M]<sup>+</sup> (100), 195 [M – F]<sup>+</sup> (75), 185 [M – CHO]<sup>+</sup> (20).

#### 4.1.3. General method of synthesis of compounds **4**, **7**, **10** and **27**

The corresponding aldehyde **15**, **16**, **17** or **18** was reacted with 2 equivalents of ethynyl magnesium bromide 0.5 M in anhydrous THF at –70 °C under nitrogen atmosphere. The mixture was stirred by 30 min and allowed to reach room temperature. A saturated NH<sub>4</sub>Cl solution was added and the aqueous layer was separated and extracted with THF; this reaction is quantitative.

The propargylic alcohol derivatives obtained **19**, **21** and **22** were oxidized with 35 equivalents of MnO<sub>2</sub> in reducing agents free acetone mixing for 30 min. After the completion of reaction, the MnO<sub>2</sub> was separated by suction filtration and washed with acetone. Concentration of solvent in a Rotavapor evaporator yielded compounds **23**, **25** or **26**. Compound **20** was oxidized employing 5 equivalents of Ca(ClO)<sub>2</sub> in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–water and using 7% of tetrabutylammonium hydrogen sulfate as phase-transfer catalyst, the mixture was stirred vigorously and heated to reflux for one hour, the reaction mixture is diluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and extracted with brine. Concentration of the organic layer under vacuum afforded compound **24**. The alkynyl ketones **23–26** were used in the following reaction without further purification.

Compounds **23–26** were reacted with 2 equivalents of guanidine sulfate in presence of 3 equivalents of K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in *n*-butanol, reactions were heated in an oil bath to reflux overnight or until the reaction was over by TLC. All volatiles were removed under vacuum and the solid form was extracted with acetone. The suspended solid was removed by filtration and discarded. The solvent was removed under vacuum, and the resulting solid was purified. Following this procedure the following compounds were obtained.

**4.1.3.1. 4-(2-(Trifluoromethyl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)pyrimidin-2-amine (4).** Purified by column chromatography with EtOAc. Yield 29% of a yellow solid. M. p. 230–231 °C; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)

$\delta$ : 7.00 (d, 1H,  $J = 5.4$  Hz), 7.02 (dd, 1H,  $J = 1.2$ , 9.2 Hz), 7.44 (td, 1H,  $J = 1.4$ , 9.2 Hz), 7.78 (dd, 1H,  $J = 1.2$ , 9.2 Hz), 8.40 (d, 1H,  $J = 5.4$  Hz), 9.20 (dd, 1H,  $J = 1.2$ , 7.2 Hz).  $C_{12}H_8F_3N_5$  calculated m. w.: 279.22 MS [EI+]  $m/z$ : 279 [M]<sup>+</sup> (100), 278 [M – H]<sup>+</sup> (55), 258 [M – H<sub>2</sub>F]<sup>+</sup> (20).

**4.1.3.2. 4-(Quinolin-4-yl)pyrimidin-2-amine (7).** Purified by column chromatography with EtOAc–Hexane 9:1 to obtain 10% of the title compound. Yellow solid, m. p. 228–229 °C (desc.). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub> + DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz)  $\delta$ : 6.30 (s, 2H); 6.78 (d, 1H,  $J = 5.0$  Hz); 7.45 (d, 1H,  $J = 4.5$  Hz); 7.50 (ddd, 1H,  $J = 1.5$ , 6.5, 8.5 Hz), 7.68 (ddd, 1H,  $J = 1.4$ , 6.8 Hz, 8.6 Hz); 8.04 (dd, 1H,  $J = 0.5$  Hz, 8.0 Hz); 8.16 (dd, 1H,  $J = 1.0$ , 8.5 Hz); 8.35 (d, 1H,  $J = 5.0$  Hz), 8.90 (d, 1H,  $J = 4.5$  Hz). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub> + DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125.7 MHz)  $\delta$ : 110.35, 120.22, 124.64, 125.17, 126.45, 128.92, 129.14, 143.91, 148.05, 149.37, 158.45, 163.15, 164.06.  $C_{13}H_{10}N_4$  calculated m. w.: 222.25 MS [EI+]  $m/z$ : 222 [M]<sup>+</sup> (70), 221 [M – H]<sup>+</sup> (100).

**4.1.3.3. 4-(Quinolin-3-yl)pyrimidin-2-amine (10).** Title compound was purified by column chromatography using EtOAc–Hexane 8:2 to yield 20% of a yellow solid, M. p. 252–253 °C (desc.). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub> + DMSO-*d*<sub>6</sub>, 200 MHz)  $\delta$ : 5.64 (ws, 2H), 7.21 (d, 1H,  $J = 5.2$  Hz), 7.62 (td, 1H,  $J = 1.2$ , 7.0 Hz), 7.79 (td, 1H,  $J = 1.2$ , 6.8 Hz), 7.97 (dd, 1H,  $J = 0.6$ , 8.2 Hz), 8.14 (d, 1H,  $J = 8.4$  Hz), 8.43 (d, 1H,  $J = 5.2$  Hz, H-8), 8.81 (d, 1H,  $J = 1.8$  Hz), 9.52 (d, 1H,  $J = 2.4$  Hz).  $C_{13}H_{10}N_4$  calculated m. w.: 222.25 MS [EI+]  $m/z$ : 222 [M]<sup>+</sup> (85), 221 [M – H]<sup>+</sup> (100).

**4.1.3.4. 4-(2-Methylimidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)pyrimidin-2-amine (27).** Purified by column chromatography using EtOAc–acetone 1:1 to yield 75% of the yellow solid. M. p. 167 °C, <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$ : 3.10 (s, 3H), 6.87 (d, 1H,  $J = 5.4$  Hz), 6.88 (td, 1H,  $J = 1.2$ , 6.9 Hz), 7.30 (ddd, 1H,  $J = 1.2$ , 6.6, 9.0 Hz), 7.61 (dt, 1H,  $J = 1.2$ , 9.0 Hz), 9.62 (dt, 1H,  $J = 1.2$ , 9.0 Hz). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz)  $\delta$ : 16.76, 108.95, 112.58, 116.64, 126.26, 127.85, 128.62, 146.22, 147.07, 158.01, 158.21, 162.62.  $C_{12}H_{11}N_5$  calculated m. w.: 225.25 MS [EI+]  $m/z$ : 225 [M]<sup>+</sup> (85), 224 [M – H]<sup>+</sup> (100).

#### 4.1.4. General procedure to synthesize compounds **1**, **2**, **3**, **5**, **6**, **8**, **9**, **11**, and **12**

In an well oven-dried Schlenk flask were added 1 equivalent of **4**, **7**, **10** or **27**, 1.1 equivalents of the proper aryl halide, 3–5% Xantphos, 3–5% Pd(dba)<sub>2</sub> and 3 equivalents of anhydrous Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. The flask was evacuated/backfilled with nitrogen at least three times and anhydrous toluene was added into the flask, the flask was evacuated/backfilled for others two times. The reaction mixture was warmed at 80 °C until the starting materials were completely consumed or the reaction did not proceed anymore (4–12 h). Then, the reaction was allowed to get room temperature and the solids were removed by vacuum filtration and rinsed plenty with EtOAc. All compounds were purified by column chromatography.

**4.1.4.1. 4-(2-Methylimidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)-*N*-*p*-tolylpyrimidin-2-amine (1).** Eluted with EtOAc to obtain 80% of a pale green solid. M. p. 190 °C (desc.); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)  $\delta$ : 2.36 (s, 3H), 2.74 (s, 3H), 6.78 (td, 1H,  $J = 1.4$ , 7.0 Hz), 6.95 (d, 1H,  $J = 5.4$  Hz), 7.17 (d, 2H,  $J = 8.2$  Hz), 7.29 (ddd, 1H,  $J = 1.2$ , 6.8, 9.0 Hz), 7.49 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 7.61 (dt, 1H,  $J = 1.2$ , 9.0 Hz), 8.44 (d, 1H,  $J = 5.6$  Hz), 9.59 (dt, 1H,  $J = 1.2$ , 7.0 Hz); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz)  $\delta$ : 17.07, 20.85, 109.30, 112.55, 116.66, 120.92, 126.38, 128.28, 129.44, 132.85, 136.64, 146.26, 147.34, 157.62, 157.91, 160.08;  $C_{19}H_{17}N_5$  calculated m. w.: 315.37 MS [EI+]  $m/z$ : 315 [M]<sup>+</sup> (95), 314 [M – H]<sup>+</sup> (100).

**4.1.4.2. 4-(2-Methylimidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)-*N*-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-pyrimidin-2-amine (2).** Eluted with EtOAc to obtain 95% of the title compound as a yellow powder. M. p. 201–202 °C (desc.); <sup>1</sup>H

NMR (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)  $\delta$ : 2.76 (s, 3H), 6.87 (td, 1H,  $J = 1.2, 6.8$  Hz), 7.06 (d, 1H,  $J = 5.4$  Hz), 7.35 (ddd, 1H,  $J = 1.4, 7.0, 9$  Hz), 7.38 (ws, 1H), 7.59 (d, 2H,  $J = 8.2$  Hz), 7.65 (dt, 1H,  $J = 1.2, 9.0$  Hz), 7.79 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 8.52 (d, 1H,  $J = 5.4$  Hz), 9.55 (dt, 1H,  $J = 1.2, 7.0$  Hz), <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub> + DMSO-*d*<sub>6</sub>, 75.5 MHz)  $\delta$ : 16.43, 109.64, 112.23, 116.05, 118.37, 119.85 (q,  $J = 265.76$  Hz), 125.31 (q,  $J = 4.53$  Hz), 126.09, 127.72, 143.03, 145.70, 146.73, 156.94, 157.28, 159.27. C<sub>19</sub>H<sub>14</sub>F<sub>3</sub>N<sub>5</sub> calculated m. w.: 369.34 MS [EI<sup>+</sup>]  $m/z$ : 369 [M]<sup>+</sup> (100), 368 [M – H]<sup>+</sup> (92).

4.1.4.3. 5-(4-(2-Methylimidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl-amino)thiophene-2-carbaldehyde (**3**). Eluted with EtOAc–Hexane 6:4 obtaining 65% of dark green flakes. M. p. 235 °C (desc.); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub> + DMSO-*d*<sub>6</sub>, 200 MHz)  $\delta$ : 2.68 (s, 3H), 6.83 (d, 1H,  $J = 4.2$  Hz), 6.92 (td, 1H,  $J = 1.2, 6.8$  Hz), 7.02 (d, 1H,  $J = 5.4$  Hz), 7.33 (ddd, 1H,  $J = 1.0$  Hz,  $J = 6.8$  Hz,  $J = 8.8$  Hz), 7.55 (d, 1H,  $J = 4.2$  Hz), 7.57 (d, 1H,  $J = 8.8$  Hz), 8.53 (d, 1H,  $J = 5.4$  Hz), 9.65 (s, 1H), 9.67 (d, 1H,  $J = 8.6$  Hz), 11.05 (s, 1H); <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub> + DMSO-*d*<sub>6</sub>, 75.5 MHz)  $\delta$ : 16.18, 110.22, 110.93, 112.48, 115.80, 117.62, 126.62, 127.97, 131.70, 136.61, 145.51, 146.54, 152.01, 156.74, 156.86, 181.89. C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub> calculated m. w.: 335.38 MS [EI<sup>+</sup>]  $m/z$ : 335 [M]<sup>+</sup> (100), 209 [M – C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>ONS]<sup>+</sup> (18).

4.1.4.4. *N*-*p*-Tolyl-4-(2-(trifluoromethyl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)-pyrimidin-2-amine (**5**). Eluted with EtOAc to yield 83% of a yellow solid. M. p. 133–134 °C; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)  $\delta$ : 2.34 (s, 3H), 6.94 (td, 1H,  $J = 7.0, 1.4$  Hz) 7.11 (dq, 1H,  $J = 5.2, 1.0$  Hz), 7.15 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 7.08 (d, 1H), 7.42 (ddd, 1H,  $J = 1.4, 6.4, 8.2$  Hz), 7.49 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 7.78 (ddd, 1H,  $J = 1.0, 6.2, 8.2$  Hz), 8.54 (d, 1H,  $J = 5.2$  Hz), 9.21 (dd, 1H,  $J = 1.2, 7.2$  Hz). C<sub>19</sub>H<sub>14</sub>F<sub>3</sub>N<sub>5</sub> calculated m. w.: 369.34 MS [EI<sup>+</sup>]  $m/z$ : 329 [M]<sup>+</sup> (75), 328 [M – H]<sup>+</sup> (100).

4.1.4.5. 4-(2-(Trifluoromethyl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)-*N*-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-pyrimidin-2-amine (**6**). Eluted with EtOAc–Hexane 9:1 to obtain 92% of a white solid. M. p. 217–218 °C; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)  $\delta$ : 6.98 (td, 1H,  $J = 1.5, 7.0$  Hz), 7.22 (dd, 1H,  $J = 1.0, 5.0$  Hz), 7.46 (ddd, 1H,  $J = 1.2, 6.5, 9.0$  Hz), 7.48 (ws, 1H), 7.58 (d, 2H,  $J = 8.5$ ), 7.77 (d, 2H,  $J = 8.5$  Hz), 7.81 (dt, 1H,  $J = 1.0, 9$  Hz), 8.63 (d, 1H,  $J = 5.5$  Hz), 9.14 (dt, 1H,  $J = 1.5, 7.5$  Hz); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125.7 MHz)  $\delta$ : 113.63, 114.62, 118.64, 118.78, 118.89, 126.32, 126.94, 127.91, 142.19, 145.56, 155.40, 159.28, 159.37. C<sub>19</sub>H<sub>11</sub>F<sub>6</sub>N<sub>5</sub> calculated m. w.: 423.31 MS [EI<sup>+</sup>]  $m/z$ : 423 [M]<sup>+</sup> (85), 422 [M – H]<sup>+</sup> (100).

4.1.4.6. 4-(Quinolin-4-yl)-*N*-*p*-tolylpyrimidin-2-amine (**8**). Eluted with EtOAc–Hexane 1:1 and recrystallized from acetonitrile to obtain 75% of a pale yellow solid. M. p. 205–207 °C (desc.) <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)  $\delta$ : 2.32 (s, 3H), 7.00 (d, 1H,  $J = 5.1$  Hz); 7.13 (d, 1H,  $J = 8.4$  Hz), 7.36 (ws, 1H), 7.53 (d, 1H,  $J = 4.2$  Hz), 7.54 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 7.58 (ddd, 1H,  $J = 1.2, 6.8, 8.4$  Hz); 7.78 (ddd, 1H,  $J = 1.4, 6.8, 8.4$  Hz); 7.8 (d, 2H,  $J = 8.0$  Hz), 8.23 (dd, 1H,  $J = 0.8, 8.6$  Hz); 8.24 (dd, 1H,  $J = 1.0, 8.4$  Hz); 8.58 (d, 1H,  $J = 5.0$  Hz); 9.02 (d, 1H,  $J = 4.4$  Hz). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)  $\delta$ : 20.79, 112.67, 119.66, 120.89, 125.35, 127.25, 129.49, 129.66, 130.06, 132.56, 136.51, 144.17, 148.86, 149.99, 158.73, 160.28, 164.97. C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub> calculated m. w.: 312.37 MS [EI<sup>+</sup>]  $m/z$ : 312 [M]<sup>+</sup> (95), 311 [M – H]<sup>+</sup> (100).

4.1.4.7. 4-(Quinolin-4-yl)-*N*-(4-(trifluoromethyl)phenyl)pyrimidin-2-amine (**9**). Eluted with EtOAc–Hexane 1:1 to obtain the title compound (96%) as a white solid. M. p. 187–188 °C, <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)  $\delta$ : 7.13 (d, 1 H,  $J = 5.5$  Hz), 7.55 (d, 1H,  $J = 4$  Hz), 7.56 (d, 2H,  $J = 9.0$  Hz), 7.59 (ddd, 1H,  $J = 1.2, 6.5, 8.5$  Hz), 7.70 (ws, 1H), 7.79 (ddd, 1H,  $J = 1.2, 7.0, 8.5$  Hz), 7.81 (d, 2H,  $J = 8.5$  Hz), 8.23 (dd, 1H,  $J = 1.0, 7.5$  Hz), 8.24 (dd, 1H,  $J = 1.0, 8.0$  Hz), 8.66 (d, 1H,  $J = 5.0$  Hz), 9.05 (d, 1H,  $J = 4.5$  Hz); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125.7 MHz)  $\delta$ : 113.83, 118.41, 120.92, 124.27 (q,  $J = 33.18$ ), 124.33 (q,  $J = 270.6$  Hz), 126.24

(q,  $J = 3.8$  Hz), 127.40, 129.77, 130.21, 142.40, 143.78, 148.95, 158.78, 159.71, 165.21. C<sub>20</sub>H<sub>13</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub> calculated m. w.: 366.34 MS [EI<sup>+</sup>]  $m/z$ : 366 [M]<sup>+</sup> (80), 365 [M – H]<sup>+</sup> (100).

4.1.4.8. 4-(Quinolin-3-yl)-*N*-*p*-tolylpyrimidin-2-amine (**11**). Eluted with EtOAc–Hexane 1:1 and recrystallized from acetonitrile to obtain 83% of a yellow solid. M.p. 209–210 °C; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)  $\delta$ : 2.36 (s, 3H), 7.29 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 7.28 (d, 1H,  $J = 5.0$  Hz), 7.33 (ws, 1H), 7.60 (d, 2H,  $J = 8.6$  Hz), 7.62 (td, 1H,  $J = 1.2, 8.0$  Hz), 7.79 (ddd, 1H,  $J = 1.4, 7.0, 8.4$  Hz), 7.95 (dd, 1H,  $J = 1.2, 8.2$  Hz), 8.17 (d, 1H,  $J = 8.2$ ), 8.53 (d, 1H,  $J = 5.2$  Hz), 8.81 (d, 1H,  $J = 1.8$  Hz), 9.61 (d, 1H,  $J = 2.2$  Hz); <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz)  $\delta$ : 20.83, 108.15, 119.82, 127.26, 127.48, 128.74, 128.99, 129.37, 129.49, 129.74, 130.76, 132.48, 134.73, 136.68, 149.04, 159.02, 160.52, 162.50; C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub> calculated m. w.: 312.37 MS [EI<sup>+</sup>]  $m/z$ : 312 [M]<sup>+</sup> (85), 311 [M – H]<sup>+</sup> (100).

4.1.4.9. 4-(Quinolin-3-yl)-*N*-(4-(trifluoromethyl)phenyl)pyrimidin-2-amine (**12**). Eluted with EtOAc–Hexane 1:1 to obtain 91% of a white solid. M. p. 258 °C (desc.) <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub> + DMSO-*d*<sub>6</sub>, 200 MHz)  $\delta$ : 7.44 (d, 1H,  $J = 5.4$  Hz), 7.59 (d, 2H,  $J = 8.6$  Hz), 7.66 (ddd, 1H,  $J = 1.2, 6.8, 8.0$  Hz), 7.83 (ddd, 1H,  $J = 1.4, 6.8, 8.4$  Hz), 8.02 (d, 2H,  $J = 8.6$  Hz), 8.02 (d, 1H,  $J = 8.4$  Hz), 8.16 (d, 1H,  $J = 8.6$  Hz), 8.62 (d, 1H,  $J = 5.2$  Hz), 8.87 (d, 1H,  $J = 2.2$  Hz), 9.31 (ws, 1H), 9.64 (d, 1H,  $J = 2.2$  Hz). C<sub>20</sub>H<sub>13</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub> calculated m. w.: 366.34 MS [EI<sup>+</sup>]  $m/z$ : 366 [M]<sup>+</sup> (5), 365 [M – H]<sup>+</sup> (10), 263 [M – C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>N]<sup>+</sup> (100).

## 4.2. Biology

### 4.2.1. Cell culture and assay for cytotoxic activity

The cytotoxic activity of **1–12** was assayed by the protein-binding method of sulphorhodamine B (SRB). Cell lines were cultured in RPMI-1640 medium, supplemented with 10% FCS, 2 mM *l*-glutamine, 100 IU mL<sup>−1</sup> penicillin G, 100  $\mu$ g mL<sup>−1</sup> streptomycin sulfate, and 0.25  $\mu$ g mL<sup>−1</sup> amphotericin B. The cell line cultures were maintained in a 5% CO<sub>2</sub>, 95% humidity atmosphere at 37 °C. In a 96-well plate were seeded 5–10  $\times 10^3$  cells/well and incubated for 24 h. Then the cultured cell lines were grown in the presence of the putative cytotoxic compound for an additional 48 h. Test substances were dissolved in DMSO to create a stock solution, fluorouracil was used as a positive control. DMSO was added to control wells at the highest concentration used and no effect in cell grown was observed.

After the incubation with test compounds was over, adherent cell cultures were fixed in situ by adding 50  $\mu$ L of cold 50% (wt/vol) trichloroacetic acid and incubated at 4 °C for 1 h. The supernatant was discarded and the plates were washed with water and left dry to the air. The fixed cells were stained with 100  $\mu$ L of 0.4% SRB solution. Protein-bonded dye was solubilized with 10 mM unbuffered Tris base and the optical density was read on a microplate reader (Elx 808; Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) with a test wavelength of 515 nm. A preliminary screening was made at 50  $\mu$ M and the IC<sub>50</sub> was determined in the most sensible cell lines. A dose-response curve was plotted for each compound, and the IC<sub>50</sub> was estimated from non-linear regression using JMP software (version 3.2.1.; SAS Institute Inc. Cary, NC, USA).

### 4.2.2. Cell cycle analysis (Flow cytometry)

MCF7 and SK-LU-1 cells were subcultured to a final density of 1  $\times 10^6$  cells in 100  $\times$  20 mm culture Petri dishes. After a 24 h period of regular culture conditions, cell were cultured in the presence of compounds at approximately 2 times the IC<sub>50</sub> (0.04  $\mu$ M compound **1**, 8.4  $\mu$ M compound **2** and 1  $\mu$ M compound **8** were utilized for SK-LU-1 cells and 0.118  $\mu$ M compound **1**, 8.4  $\mu$ M compound **3** and 1  $\mu$ M compound **10** were used with MCF7 cells)

for 24 h. After these treatment periods, cells were harvested and centrifuged for five minutes at 3000 rpm. The pellet was resuspended in PBS (pH = 7.4) and centrifuged again for five minutes at 3000 rpm. Cells were fixed with 70% ethanol at 4 °C for at least 12 h. Ethanol was eliminated by centrifugation and the pellet was washed with PBS. DNA was labeled with 5 µg mL<sup>-1</sup> propidium iodide (PI) solution. Cell cycle analysis was made using a FACScan cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA) and CELLQuest software (BD Biosciences). The cell cycle profile was obtained by analyzing 10,000 events using the FlowJo software Version 7.2.5 (Tree Star Inc, Ashland OR, USA).

#### 4.2.3. Annexin V-FITC apoptosis assay

Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Sigma-Aldrich) was used to measure apoptosis. The kit contains annexin V labeled with a fluorophore that can identify apoptotic cells by binding phosphatidylserine exposed on the cytoplasmic surface of the cell membrane of apoptotic cells. In addition, the kit includes a red fluorescent propidium iodide (PI) nucleic acid binding dye that stains dead cells. Briefly,  $2.5 \times 10^5$  SK-LU-1 cells in 2 mL medium were plated to each well of the six-well plate. After 24 h, cells were treated with either DMSO alone at the highest concentration used as control or with 0.04 µM compound **1**, 8.4 µM compound **3**, 0.4 µM compound **5** and 1 µM compound **8** for 48 h. At the end of the treatment, adherent and nonadherent cells were harvested and washed twice with PBS and then resuspended with 0.5 mL  $1 \times$  annexin-binding buffer. Cells were incubated in the dark with 5 µL of annexin V and 10 µL of the PI solution for 10 minutes at room temperature. After incubation, the samples were analyzed with FACScan flow cytometry (BD Biosciences, San Jose, CA) using CellQuest Software (BD Biosciences). The percentage of apoptotic cells in the cell samples was obtained by analyzing 10,000 events using the FlowJo software Version 7.2.5 (Tree Star Inc, Ashland OR, USA).

#### 4.2.4. CDK inhibition measurement

CDK/Cyclin activity was assayed by a protein kinase test using histone H1.2 as substrate. 220 ng of recombinant CDK1/CycB (Biaffin, Kassel, Germany) or 135 ng of recombinant Cdk2/CycA (Biaffin, Kassel, Germany) in 20 µL of kinase reaction buffer (pH = 7.4) Tris-HCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, NaF 50 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 500 µM, β-glicerofosfate 8 mM, DTT 1 mM, ATP 400 µM and ATP<sup>γ</sup>32 4 µCi. (Perkin-Elmer, Wellesley, MA) is mixed with 0.5 µL 10 mg/ml recombinant Histone H1.2. (Calbiochem, San Diego, CA) and incubated 30 minutes at 30 °C. The CDK/Cyclin complexes were inhibited at 7 µM by compound **1**, **2**, **3**, **8**, and **11**. 7 µM Olomoucine was used as a positive control, vehicle solvent (DMSO) was used as a negative control at a 2.5% concentration or less.

5 µL of β-mercaptoethanol were added to the samples to stop the reaction. Samples were boiled 3 min in a screw-cap microcentrifuge tube to reduce the risk of vaporizing radioisotope. The samples were run on a 10% polyacrylamide gel. The amount of incorporated label was measured using a densitometry of the exposed film obtained with a Typhoon 9400 apparatus (Amersham Biosciences, Inc.) by using Kodak MI software (Carestream Health, Rochester, N.Y.).

#### Acknowledgements

We thank CONACyT for a doctoral grant to M. A. Vilchis-Reyes, and we gratefully acknowledge the helpful assistance of the spectroscopic staff of Instituto de Química (UNAM). The authors acknowledge Prof. José Solano Becerra, M. Sc. Carlos Villarreal and M. Sc. Noemi Baranda for the revision of the original manuscript.

#### References

- [1] A. Jemel, R. Siegel, E. Ward, T. Murray, J. Xu, M.J. Thun, *CA Cancer J. Clin.* 58 (2008) 71–96.
- [2] WHO, *The Global Burden of Disease, 2004 Update*. WHO, Geneva, 2008.
- [3] H.T. Swainston, G.M. Keating, *CNS Drugs* 19 (2005) 65–89.
- [4] K.S. Gudmundsson, J.D. Williams, J.C. Drachs, L.B. Townsend, *J. Med. Chem.* 46 (2003) 1449–1455.
- [5] D. Feng, M. Fischer, G.B. Liang, X. Qian, C. Brown, A. Gurnett, P.S. Leavitt, P.A. Liberator, J. Mathew, A. Misura, S. Samaras, T. Tamas, D.M. Schmatz, M. Wyvratt, T. Bifu, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16 (2006) 5978–5981.
- [6] J.J. Kaminsky, D.G. Perkins, J.D. Frantz, D.M. Solomon, A.J. Elliot, P.J. Chiu, J.F. Long, *J. Med. Chem.* 30 (1987) 2047–2051.
- [7] G.M. Buckley, R. Fosbeary, J.L. Fraser, L. Gowers, A.P. Higuero, L.A. James, K. Jenkins, S.R. Mack, T. Morgan, D.M. Parry, W.R. Pitt, O. Rausch, M.D. Richard, V. Sabin, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18 (2008) 3656–3660.
- [8] T.A. Engler, J.R. Henry, S. Malhotra, B. Cunningham, K. Furness, J. Brozinick, T.P. Burkholder, M.P. Clay, J. Clayton, C. Diefenbacher, E. Hawkins, P.W. Iversen, Y. Li, T.D. Lindstrom, A.L. Marquart, J. McLean, D. Mendel, E. Misener, D. Briere, J.C. O'Toole, W.J. Porter, S. Queener, J.K. Reel, R.A. Owens, R.A. Brier, T.E. Eessalu, J.R. Wagner, R.M. Campbell, R. Vaughn, *J. Med. Chem.* 47 (2004) 3934–3937.
- [9] M.D. Kaufman, M.S. Plummer, G.W. Rewcastle, U.S. Patent 0 049 276, 2005.
- [10] M. Anderson, J.F. Beattie, G.A. Breault, J. Breed, K.F. Byth, J.D. Culshaw, R.P. Ellston, S. Green, C.A. Minshull, R.A. Norman, R.A. Pauptit, J. Stanway, A.P. Thomas, P.J. Jewsbury, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13 (2003) 3021–3026.
- [11] K.F. Byth, J.D. Culshaw, S. Green, S.E. Oakes, A.P. Thomas, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14 (2004) 2245–2248.
- [12] M. Gompel, M. Leost, E.B. De Kier Joffe, L. Puricelli, L.H. Franco, J. Palermo, L. Meijer, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14 (2004) 1703–1707.
- [13] Y. Abe, H. Kayakiri, S. Satoh, T. Inoue, Y. Sawada, N. Inamura, M. Asano, I. Aramori, C. Hatori, H. Sawai, T. Oku, H. Tanaka, *J. Med. Chem.* 41 (1998) 4062–4079.
- [14] J.P. Wolfe, H. Tomori, J.P. Sadighi, J. Yin, S.L. Buchwald, *J. Org. Chem.* 65 (2000) 1158–1174.
- [15] P. Goldman, *Science* 164 (1969) 1123–1130.
- [16] L. Meijer, A. Borgne, O. Mulner, J.P. Chong, J.J. Blow, N. Inagaki, M. Inagaki, J.G. Delcros, J.P. Moulinoux, *Eur. J. Biochem.* 243 (1997) 527–536.
- [17] P.A. Levene, *Org. Synth., Coll.* 2 (1943) 88–89.