



# Universidad de Navarra

FACULTAD DE FARMACIA

**DISEÑO, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE  
NUEVOS DERIVADOS DE PIRIDO[2,3-*d*]PIRIMIDINA Y QUINAZOLINA  
CON ACTIVIDAD ANTITUMORAL. VALORACIÓN DE SU CAPACIDAD  
ANTIMETASTÁTICA**

**ESTHER MORENO AMATRIA**





Universidad de Navarra

FACULTAD DE FARMACIA

DISEÑO, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE NUEVOS DERIVADOS DE  
PIRIDO[2,3-*d*]PIRIMIDINA Y QUINAZOLINA CON ACTIVIDAD  
ANTITUMORAL. VALORACIÓN DE SU CAPACIDAD ANTIMETASTÁTICA

Memoria presentada por D./Dña. Esther Moreno Amatria para aspirar al grado de Doctor por la Universidad de Navarra.

El presente trabajo ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica y autorizo su presentación ante el Tribunal que lo ha de juzgar.

Pamplona, 20 de Junio de 2011

Dr. Juan Antonio Palop Cubillo

Dra. Carmen Sanmartín Grijalba



Lo que sabemos es una gota de agua; lo que ignoramos es el océano.

*ISAAC NEWTON - Matemático y físico británico.*

Felicidad no es hacer lo que uno quiere sino querer lo que uno hace.

*JEAN PAUL SARTRE - Filósofo y escritor francés.*

Lo mismo es nuestra vida que una comedia; no se atiende a si es larga, sino a si la has representado bien. Concluye donde quieras, con tal de que pongas un buen final.

*LUCIO ANNEO SÉNECA - Filósofo latino.*



## AGRADECIMIENTOS / ACKNOWLEDGEMENTS

La realización de esta Tesis Doctoral no hubiera sido posible sin la ayuda y el apoyo de muchas personas implicadas. Ellas han hecho que durante estos años no sólo me haya formado académicamente sino también como persona. Por ello, quisiera aprovechar estas líneas para mostrarles mi más sincero agradecimiento.

A la Universidad de Navarra y a las Facultades de Farmacia y Ciencias, por su formación y por haberme permitido vivir momentos inolvidables.

Al Departamento de Educación del Gobierno de Navarra, por la financiación recibida durante estos años.

A mis directores de tesis, el Dr. Juan Antonio Palop Cubillo y la Dra. Carmen Sanmartín Grijalba, por haber confiado en mí y por su ayuda y disponibilidad en todo momento. Gracias por concederme vivir esta fascinante experiencia.

Al Dr. Ignacio Encío, por haberme dado la oportunidad de introducirme en el campo de la biología, por los consejos y enseñanzas recibidas y por tratarme siempre como a una de sus doctorandos.

I would like to express my gratitude to Dr. Margaret Frame for giving me the chance to work in her research group at the Edinburgh Cancer Research UK Centre, belonging to The University of Edinburgh. Thank you very much for your help, for the unforgettable time in your lab and for providing me with the opportunity to meet lovely people during my stay there.

A la Dra. María Font, por su ayuda con los estudios de modelización molecular y por mostrarme siempre su apoyo.

Al Dr. Alfonso Calvo y Celia Prior, por su colaboración en este proyecto y por realizar los ensayos en PC-3.

A Rosa Jiménez, por ayudarme con los ensayos de espectrometría de masas y microondas. Por los buenos ratos vividos y por algún sustillo que otro delante del microondas.

A Carmen Elizalde, por estar siempre ahí cuando lo he necesitado y por los sabios consejos que me has dado. Por tu ayuda incondicional y por no negarte nunca a nada. Siempre estarán en mi recuerdo los momentos que hemos vivido juntas.

Gracias al grupo caspasas, tanto a los veteranos (Mariajo, Dani, Elena, Ylenia, Iranzu, Enrique y losu), como a las nuevas incorporaciones (Bea R., Marta, Pilar, Xandra). Un agradecimiento especial a Dani, por haberme introducido en el mundo de la síntesis química y por tu ayuda; a Ylenia, Iranzu y Elena, por vuestra amistad y apoyo en los momentos difíciles y por los buenos ratos vividos fuera y dentro del laboratorio, sois las mejores.

A mis compañeros de laboratorio (Elsa, Torres, Carlos, Álvaro, Raquel, Asún, Bea S., Nerea, Gali, Saioa, Adela, Guillermo, Mikel N., Ceras, Luis, Nuria, Roberto, Mikel L., Gurbindo) y a todos los alumnos internos, en especial a Irene. Gracias a todos por haber compartido conmigo tantas horas de trabajo y por haberme ayudado siempre que lo he necesitado.

A mis compañeros de Ciencias de la Salud (Idoia, Mirjia, María, Irantzu, Jon e Iván) por vuestra ayuda y momentos vividos en la sala de cultivo.

For my colleagues at the Edinburgh Cancer Research UK Centre (Marta, Alan, Dalhia, Jenny, Lucy, Arek, Kate, Kenny, Bryan). I would like to thank Marta and Alan specially. Thank you for all your helpful discussions, for your patience and for helping me when I have had doubts. Thanks to Jenny for helping me with my English. I would like to thank Dahlia for teaching me so much about proteins and antibodies. All that I have learnt in the lab is thanks for you.

A mis amigos/as de Azagra y de Pamplona por haberme apoyado siempre y por vuestra amistad incondicional.

A Raúl, por apoyarme siempre en todas las decisiones que tomo. Por comprenderme y saber esperarme durante mi estancia en Edimburgo y por creer en mí. Esta tesis te pertenece a ti también. Gracias.

A mi familia, en especial a mis padres, Claudio y Montserrat, porque me habéis dado una buena educación queriendo siempre lo mejor para mí y apoyándome en todos los momentos decisivos de mi vida. Sois un ejemplo a seguir y los mejores padres que nunca hubiese soñado tener.



A mis padres.



## ABREVIATURAS

**AH:** Aceptor de puentes de hidrógeno.

**AKT:** Proteín quinasa B.

**AMS:** Ácido metilselenínico.

**Apaf-1:** Factor activante 1 de proteasa apoptótica.

**APS:** Persulfato amónico.

**AR:** Receptor de andrógenos.

**BM:** Membrana basal.

**BPH:** Hiperplasia benigna de próstata.

**BSA:** Seroalbúmina bovina.

**CC:** Cromatografía en columna.

**CCF:** Cromatografía en capa fina.

**CDK:** Quinasa dependiente de ciclinas.

**DH:** Dador de puentes de hidrogeno.

**DHRF:** Dihidrofolato reductasa.

**DIP:** Inserción directa con sonda.

**DMEM:** Medio Dubelcco modificado Eagle.

**DMSO:** Dimetilsulfóxido.

**DMSO- $d_6$ :** Dimetilsulfóxido deuterado.

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico.

**DPDS:** Difenildiseleniuro.

**DTP:** Programa de terapias experimentales del NCI.

**dUTP:** Desoxiuridina trifosfato.

**ECM:** Membrana extracelular.

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetracético.

**EGF:** Factor del crecimiento epidérmico.

**EGFR:** Receptor para el factor de crecimiento epidérmico.

**EM:** Espectrometría de masas.

**EMEM:** Medio mínimo esencial Eagle.

**ErbB2:** Receptor 2 del factor de crecimiento.

**ERK:** Quinasa regulada por señales extracelulares.

**FAK:** Quinasa de adhesión focal.

**FBS:** Suero bovino fetal.

**FGFR1:** Receptor 1 del factor de crecimiento fibroblástico.

**FITC:** Isotiocianato de fluoresceína.

**GI<sub>50</sub>:** Concentración de una sustancia que inhibe el crecimiento celular en un 50 %.

**GPx:** Glutatió peroxidasa.

**GSH:** Glutatió.

**GSK-3:** Glucógeno sintasa quinasa 3.

**HDAC:** Histona desacetilasa.

**IC<sub>50</sub>:** Concentración de una sustancia que inhibe el crecimiento celular en un 50 %.

**ID:** Yodotirosina de yodinasas.

**IGFR1:** Receptor del factor de crecimiento insulínico 1.

**IP:** Ioduro de yodinasas.

**IR:** Espectroscopia de infrarrojo.

**JNK:** Jun quinasa N-terminal.

**JNK2:** Jun quinasa N-terminal 2.

**KDR:** Receptor que contiene insertado el dominio quinasa.

**LD<sub>50</sub>:** Dosis letal 50.

**MAPKs:** Proteínas quinasa activadas por mitógenos.

**MCH:** Hormona concentradora de melanina.

**MCH-1R:** Receptor 1 de la hormona concentradora de melanina.

**MCH-2R:** Receptor 2 de la hormona concentradora de melanina.

**Me-Hg:** Mercurio metilado.

**MeSeCys:** Metilselenocisteína.

**MSA:** Ácido metilselenínico.

**MTT:** Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio.

**MW:** Microondas.

**NADPH:** Nicotinamida adenina dinucleótido.

**NCI:** Instituto nacional del cáncer de Estados Unidos.

**NF-kappa-B:** Factor nuclear Kappa-B.

**NHI:** Instituto nacional de la salud de Estados Unidos.

**Nrf2:** Factor nuclear 2 de la respuesta antioxidante.

**PARP:** Poli-(ADP-ribosa)polimerasa.

**PBS:** Solución buffer de fosfato.

**PDGFR:** Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas.

**PK-1:** Quinasa 1 de la piruvato deshidrogenasa.

**Pf:** Punto de fusión.

**PI3K:** Fosfoinositol 3-quinasa.

**PKC:** Proteína quinasa C.

**PMSF:** Fluoruro de metilfenilsulfonilo.

**ppm:** Partes por millón.

**PSA:** Antígeno específico de próstata.

**r.p.m:** Revoluciones por minuto.

**RIPA:** Ensayo de radioinmunoprecipitación.

**RMN 2D:** Resonancia magnética nuclear bidimensional.

**RMN 2D-COSY:** Resonancia magnética nuclear bidimensional de correlación protón-protón.

**RMN 2D-HMBC:** Resonancia magnética nuclear bidimensional de correlación heteronuclear a varios enlaces carbono-protón.

**RMN 2D-HMQC:** Resonancia magnética nuclear bidimensional de correlación heteronuclear múltiple cuántica carbono-protón.

**RMN:** Resonancia magnética nuclear.

**RMN-<sup>13</sup>C:** Resonancia magnética nuclear de carbono 13.

**RMN-<sup>1</sup>H:** Resonancia magnética nuclear de protón.

**RNA:** Ácido ribonucleico.

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno.

**RSK:** Quinasa ribosómica.

**SAPK:** Proteín quinasa activada por estrés.

**SAR:** Relación estructura-actividad.

**SD:** Desviación estándar.

**SDS:** Dodecilsulfato sódico.

**SEA:** Sustitución electrófila aromática.

**SeC:** Selenocistina.

**SeCys:** Selenocisteína.

**SeIH:** Selenoproteína H.

**SeIN:** Selenoproteína N.

**SeIR:** Selenoproteína R.

**SeIS:** Selenoproteína S.

**SeIW:** Selenoproteína W.

**SEM:** Error típico de la media.

**SeMet:** Selenometionina.

**SeMSC:** Selenometilselenocisteína.

**SEOM:** Sociedad española de oncología médica.

**SeP:** Selenoproteína P.

**SNA:** Sustitución nucleófila aromática.

**SNC:** Sistema nervioso central.

**TBS:** Tampón Tris salino.

**TBST:** Tampón Tris salino con Tween 20.

**TdT:** Desoxinucleotidil transferasa terminal.

**TEMED:** *N,N,N',N'*-tetrametiletilendiamina.

**TGI:** Concentración de una sustancia que inhibe totalmente el crecimiento.

**TK:** Tirosín quinasa.

**TKR:** Receptor tirosín quinasa.

**TNF:** Factor de necrosis tumoral.

**TNF-R1:** Receptor 1 del factor de necrosis tumoral.

**TPT:** Topotecán.

**tRNA:** Ácido ribonucleico transferente.

**Trx-R:** Tiorredoxina reductasa.

**TSC-2:** Complejo 2 de esclerosis tuberosa.

**TUNEL:** Marcado del extremo libre dUTP por TDT.

**VEGFR-2:** Receptor 2 del factor de crecimiento del endotelio vascular.

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>I. EL CÁNCER</b>	<b>3</b>
1. EL CÁNCER	5
1.1 DEFINICIÓN TÉCNICA DE CÁNCER	5
1.2 LA DIVISIÓN CELULAR	5
1.3 ORIGEN DE LA ENFERMEDAD	5
1.4 LOS PROCESOS DE INVASIÓN CELULAR Y METÁSTASIS	6
1.5 INCIDENCIA MUNDIAL	7
1.6 INCIDENCIA EN ESPAÑA	8
1.7 TIPOS DE TRATAMIENTOS	9
1.8 PRINCIPALES AGENTES ANTINEOPLÁSICOS	10
1.8.1 Antineoplásicos que actúan sobre el DNA	10
1.8.2 Antineoplásicos que actúan sobre la mitosis celular sin afectar al DNA	16
1.8.3 Antineoplásicos que actúan sobre factores extracelulares de división celular	18
1.8.4 Antineoplásicos que actúan sobre el sistema inmunitario	19
2. LA MUERTE CELULAR	19
2.1 PRINCIPALES ALTERACIONES MORFOLÓGICAS Y ESTRUCTURALES ENCONTRADAS EN EL PROCESO APOPTÓTICO	20
2.2 LAS CASPASAS Y SU FUNCIÓN EN LA APOPTÓTICIS	21
2.3 VÍAS DE INDUCCIÓN DE APOPTOSIS	21
2.3.1 Vía intrínseca	21
2.3.2 Vía extrínseca	22
2.4 VÍAS DE SUPERVIVENCIA CELULAR	23
3. EL CICLO CELULAR	24
3.1 FASES DEL CICLO CELULAR	24
3.2 REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR	25
4. LAS QUINASAS	26
5. LAS INTEGRINAS	28
5.1 DEFINICIÓN Y PRINCIPALES FUNCIONES	28
5.2 FAK, SRC Y SU RELACIÓN CON LAS INTEGRINAS	30
6. SELENIO Y CÁNCER	33
6.1 EL SELENIO, UN ELEMENTO TRAZA NECESARIO PARA EL ORGANISMO	33
6.2 EL SELENIO Y SU METABOLISMO	35
6.3 LAS SELENOPROTEÍNAS	36
6.4 EL EFECTO QUIMIOPREVENTIVO DE LOS DERIVADOS DE SELENIO	38
6.4.1 Efectos sobre la apoptosis y el ciclo celular	38
6.4.2 Daño celular y reparación del DNA	41
6.4.3 Función antioxidante	42
6.4.4 Actividad antiandrogénica	43
<b>II. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN</b>	<b>45</b>

1. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL NÚCLEO PIRIDO [2,3- <i>d</i> ]PIRIMIDINA	47
1.1 ACTIVIDAD ANALGÉSICA, ANTIINFLAMATORIA, ANTICONVULSIVA Y DEPRESORA DEL SNC	47
1.2 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA	48
1.3 ACTIVIDAD ANTIHISTAMÍNICA	48
1.4 ACTIVIDAD DIURÉTICA, ANTIHIPERTENSIVA Y AGREGANTE PLAQUETARIA	48
1.5 ACTIVIDAD ANTITUMORAL	48
1.5.1 Intermediarios de la síntesis del ácido fólico	49
1.5.2 Inhibidores de quinasas	49
1.6 DERIVADOS DE PIRIDO[2,3- <i>d</i> ]PIRIMIDINA SINTETIZADOS POR NUESTRO GRUPO INVESTIGADOR	50
2. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL NÚCLEO QUINAZOLINA	51
2.1 ACTIVIDAD ANTIOBESIDAD	51
2.2 ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA	52
2.3 ACTIVIDAD FRENTE A LA DISFUNCIÓN ERÉCTIL	52
2.4 ACTIVIDAD SEDATIVA-HIPNÓTICA, ANTICONVULSIVA Y DEPRESORA DEL SNC	53
2.5 ACTIVIDAD ANTIDEPRESIVA	53
2.6 ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA	53
2.7 ACTIVIDAD ANTITUMORAL	54
2.7.1 Actividad quinasa	54
2.7.2 Inhibidores de angiogénesis y de la enzima dihidrofolato reductasa	55
2.7.3 Inductores de apoptosis	56
2.8 DERIVADOS DE QUINAZOLINA SINTETIZADOS POR NUESTRO GRUPO INVESTIGADOR	56
3. DERIVADOS SELENADOS COMO AGENTES ANTITUMORALES	57
3.1 AMINOÁCIDOS DE SELENIO	58
3.2 DERIVADOS HETEROCÍCLICOS DE SELENIO	59
3.3 DERIVADOS CON EL GRUPO FUNCIONAL SELENOCIANURO	60
3.4 DERIVADOS CON EL GRUPO FUNCIONAL DISELENIURO	60
3.5 OTROS DERIVADOS DE SELENIO	61
3.6 DERIVADOS DE SELENIO SINTETIZADOS POR NUESTRO GRUPO INVESTIGADOR	62
III. OBJETIVOS	65
IV. PLAN DE TRABAJO	73
1. DISEÑO Y SÍNTESIS QUÍMICA DE LOS COMPUESTOS	75
1.1 OBTENCIÓN DE LOS COMPUESTOS DE LA SERIE I	75
1.2 OBTENCIÓN DE LOS COMPUESTOS DE LA SERIE II	75
1.3 OBTENCIÓN DE LOS COMPUESTOS DE LA SERIE III	76
1.4 OBTENCIÓN DE LOS COMPUESTOS DE LA SERIE IV	76



2. EVALUACIÓN DE LAS ACTIVIDADES CITOTÓXICA Y ANTIPROLIFERATIVA	77
3. ESTUDIO DE LA RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD	77
4. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE INDUCCIÓN DE MUERTE CELULAR	78
5. EVALUACIÓN DE LA ALTERACIÓN DEL CICLO CELULAR	78
6. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE MIGRACIÓN CELULAR	78
7. PROFUNDIZACIÓN EN LOS POSIBLES MECANISMOS DE ACCIÓN	78
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>79</b>
<hr/>	
I. SÍNTESIS QUÍMICA	81
1. ESQUEMAS GENERALES DE SÍNTESIS	83
1.1 ESQUEMA GENERAL DE SÍNTESIS DE DERIVADOS DE PIRIDO[2,3- <i>d</i> ]PIRIMIDINA DE LA SERIE I	83
1.1.1 Esquema general de síntesis de derivados 4-alquilamino-2-metiltio de pirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidina (I.1-4)	83
1.1.2 Esquema general de síntesis de derivados 2-alquiltio-4-amino de pirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidina (I.5-7) y 2,4-dialquiltio de pirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidina (I.8-10)	84
1.2 ESQUEMA GENERAL DE SÍNTESIS DE DERIVADOS DE PIRIDO[2,3- <i>d</i> ]PIRIMIDINA DE LA SERIE II	85
1.2.1 Esquema de síntesis de 4-bencilamino-2-hidroselenopirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidina (II.1-2)	85
1.2.2 Esquema general de síntesis de derivados 2-alquilseleno-4-amino de pirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidina (II.3-5) y 2,4-dialquilseleno de pirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidina (II.6-8)	86
1.3 ESQUEMA GENERAL DE SÍNTESIS DE DERIVADOS DE QUINAZOLINA DE LA SERIE III	87
1.3.1 Esquema general de síntesis de derivados 4-alquilamino-2-mercapto de quinazolina (III.1-2) y 4-alquil/amilamino-2-alquiltio de quinazolina (III.3-16)	87
1.3.2 Esquema de síntesis de 2-cloro-4-(4-metilselenobencil)aminoquinazolina (III.17)	88
1.3.3 Esquema general de síntesis de derivados 2-alquiltio-4-amino de quinazolina (III.18-20) y 2,4-dialquiltio de quinazolina (III.21-23)	89
1.4 ESQUEMA GENERAL DE SÍNTESIS DE DERIVADOS DE QUINAZOLINA DE LA SERIE IV	90
1.4.1 Esquema general de síntesis de derivados 4-alquilamino-2-alquilseleno de quinazolina (IV.1-10)	90
1.4.2 Esquema general de síntesis de derivados 2-alquilseleno-4-amino de quinazolina (IV.11-13) y 2,4-dialquilseleno de quinazolina (IV.14-16)	91
2. MÉTODOS DE SÍNTESIS	92
2.1 DERIVADOS DE PIRIDO[2,3- <i>d</i> ]PIRIMIDINA DE LA SERIE I	92
2.1.1 Derivados 4-alquilamino-2-metiltio de pirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidina I.1-4 (SERIE I)	92
2.1.1.1 Síntesis del cloruro de 2-cloronicotinoilo (I.a)	92
2.1.1.2 Síntesis de S-metilpseudotiourea (I.b)	93

2.1.1.3 Síntesis de 1-(2-cloro-3-piridincarbonil)-S-metilpseudotiourea (I.c)	93
2.1.1.4 Síntesis de 2-metiltiopirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidin-4(3 <i>H</i> )-ona (I.d)	94
2.1.1.5 Síntesis de 4-cloro-2-metiltiopirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidina (I.e)	94
2.1.1.6 Síntesis de derivados 4-alkilamino-2-metiltio de pirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidina (I.1-4)	95
2.1.2 Derivados 2-alkiltio-4-amino de pirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidina I.5-7 (SERIE I)	96
2.1.2.1 Síntesis de pirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidin-2,4(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> )-diona (I.f)	96
2.1.2.2 Síntesis de 2,4-dicloropirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidina (I.g)	97
2.1.2.3 Síntesis de 4-amino-2-cloropirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidina (I.h)	97
2.1.2.4 Síntesis de 4-amino-2-mercaptopirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidina (I.5)	97
2.1.2.5 Síntesis de derivados 2-alkiltio-4-amino de pirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidina (I.6-7)	98
2.1.3 Derivados 2,4-dialkiltio de pirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidina I.8-10 (SERIE I)	98
2.1.3.1 Síntesis de 2,4-dimercaptopirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidina (I.8)	99
2.1.3.2 Síntesis de derivados 2,4-dialkiltio de pirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidina (I.9-10)	99
2.2 DERIVADOS DE PIRIDO[2,3- <i>d</i> ]PIRIMIDINA DE LA SERIE II	100
2.2.1 Intentos de síntesis para la obtención de derivados de 4-alkilamino-2-alkilseleno de pirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidina	100
2.2.2 Síntesis de 4-bencilamino-2-hidroselenopirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidina II.1-2 (SERIE II)	101
2.2.2.1 Síntesis de bencilisoselenocianato (II.1)	101
2.2.2.2 Síntesis de 4-bencilamino-2-hidroselenopirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidina (II.2)	101
2.2.3 Derivados 2-alkilseleno-4-amino de pirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidina II.3-5 (SERIE II)	102
2.2.3.1 Síntesis de 4-amino-2-hidroselenopirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidina (II.3)	103
2.2.3.2 Síntesis de derivados 2-alkilseleno-4-amino de pirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidina (II.4-5)	103
2.2.3.3 Nuevos intentos para la síntesis de derivados 4-alkilamino-2-alkilseleno de pirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidina	103
2.2.4 Derivados 2,4-dialkilseleno de pirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidina II.6-8 (SERIE II)	104
2.2.4.1 Síntesis de 2,4-dihidroselenopirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidina (II.6)	105
2.2.4.2 Síntesis de derivados 2,4-dialkilseleno de pirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidina (II.7-8)	105
2.3 DERIVADOS DE QUINAZOLINA DE LA SERIE III	106
2.3.1 Derivados 4-alkilamino-2-mercapto de quinazolina III.1-2 (SERIE III)	106
2.3.1.1 Síntesis de 4-cloro-2-mercaptoquinazolina (III.a)	106
2.3.1.2 Síntesis de derivados 4-alkilamino-2-mercapto de quinazolina (III.1-2)	106
2.3.2 Derivados 4-alkil/amilamino-2-alkiltio de quinazolina III.3-16 (SERIE III)	107
2.3.2.1 Síntesis de derivados 2-alkiltio-4-hidroxi de quinazolina (III.3-4)	107
2.3.2.2 Síntesis de los derivados 2-alkiltio-4-cloro de quinazolina (III.b-c)	108
2.3.2.3 Síntesis de derivados 4-alkil/amilamino-2-alkiltio de quinazolina (III.5-14)	108

2.3.2.4 Síntesis de selenitos de <i>N</i> -alquil-2-metiltioquinazolin-4-amonio (III.15-16)	109
2.3.3 Síntesis del derivado 2-cloro-4-(4-metilselenobencil)aminoquinazolina (SERIE III)	110
2.3.3.1 Síntesis del derivado 2,4-dicloroquinazolina (III.g)	110
2.3.3.2 Síntesis del derivado 2-cloro-4-(4-metilselenobencil)aminoquinazolina (III.17)	110
2.3.4 Derivados 2-alquiltio-4-amino de quinazolina III.18-20 (SERIE III)	110
2.3.5 Derivados 2,4-dialquiltio de quinazolina III.21-23 (SERIE III)	111
2.4 DERIVADOS SELENADOS DE QUINAZOLINA DE LA SERIE IV	111
2.4.1 Derivados 4-alquilamino-2-alquilseleno de quinazolina IV.1-10 (SERIE IV)	111
2.4.1.1 Síntesis de los derivados <i>p</i> -sustituído de bencilamida (IV.a-b)	111
2.4.2 Derivados 2-alquilseleno-4-amino de quinazolina IV.11-13 (SERIE IV)	112
2.4.3 Derivados 2,4-dialquilseleno de quinazolina III.14-16 (SERIE III)	113
3. TÉCNICAS ANALÍTICAS INSTRUMENTALES UTILIZADAS PARA LA CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS COMPUESTOS SINTETIZADOS	113
<b>II. EVALUACIÓN BIOLÓGICA</b>	<b>115</b>
1. EL CULTIVO CELULAR	117
1.1 LÍNEAS CELULARES EMPLEADAS EN LOS ENSAYOS	117
1.2 SUBCULTIVO DE CÉLULAS Y FUNDAMENTOS DE LA TRIPSINIZACIÓN	117
2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL <i>IN VITRO</i>	118
2.1 PREPARACIÓN DE LOS COMPUESTOS A ENSAYAR	118
2.2 ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD	119
3. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LOS COMPUESTOS PARA INDUCIR MUERTE CELULAR	121
4. DETERMINACIÓN DEL CICLO CELULAR	123
5. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE MIGRACIÓN CELULAR	123
5.1 ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR	125
6. PROFUNDIZACIÓN EN LOS POSIBLES MECANISMOS DE ACCIÓN	126
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	131
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>133</b>
<hr/>	
I. DESCRIPCIÓN DE LOS COMPUESTOS	135
1. DERIVADOS OBTENIDOS PARA LA SERIE I	137
2. DERIVADOS OBTENIDOS PARA LA SERIE II	155
3. DERIVADOS OBTENIDOS PARA LA SERIE III	163
4. DERIVADOS OBTENIDOS PARA LA SERIE IV	194
II. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL INSTRUMENTAL	213
1. ANÁLISIS INSTRUMENTAL DE LAS SERIES I Y II	215
1.1 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO (IR)	215

1.2 ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	216
1.3 ESPECTROMETRÍA DE MASAS	223
2. ANÁLISIS INSTRUMENTAL DE LAS SERIES III Y IV	225
2.1 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO (IR)	226
2.2 ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	226
2.3 ESPECTROMETRÍA DE MASAS	232
III. ACTIVIDAD BIOLÓGICA	233
1. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD EN PC-3	235
2. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD EN CCRF-CEM, HTB-54, HT-29, MCF-7, 184B5 Y BEAS-2B	237
2.1 RESULTADOS DE CITOTOXICIDAD OBTENIDOS PARA LAS DISTINTAS SERIES EN CCRF-CEM, HTB-54, HT-29, MCF-7, 184B5 Y BEAS-2B	238
2.2 CURVAS DOSIS-RESPUESTA	246
3. ESTUDIOS DE RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD (SAR)	265
4. DETERMINACIÓN DE MUERTE CELULAR	268
4.1 ESTUDIOS DE MUERTE CELULAR A DISTINTOS TIEMPOS	268
4.2 ESTUDIOS DE MUERTE CELULAR A DISTINTAS CONCENTRACIONES	270
4.3 ESTUDIOS DE MUERTE CELULAR EN PRESENCIA DE Z-VAD-FMK	271
5. ALTERACIÓN DEL CICLO CELULAR	273
6. EVALUACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS COMPUESTOS EN LA MUERTE CELULAR	275
6.1 REGULACIÓN DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE PI3K/AKT Y MAPK DE LAS CÉLULAS EN CONDICIONES NORMALES	275
6.2 AFECTACIÓN DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN PI3K/AKT, SAPK/JNK Y MAPK EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7 TRAS UN TRATAMIENTO CON LOS COMPUESTOS	277
6.3 ANÁLISIS DE LA MODIFICACIÓN DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7 POR EL DERIVADO IV.14	277
7. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE MIGRACIÓN CELULAR	281
7.1 ALTERACIÓN EN LA MIGRACIÓN CELULAR OBSERVADA PARA LAS CÉLULAS MDA-MB-231 TRATADAS CON EL DERIVADO I.3	283
7.2 ALTERACIÓN EN LA MIGRACIÓN CELULAR OBSERVADA PARA LAS CÉLULAS MDA-MB-231 TRATADAS CON EL DERIVADO IV.7	284
7.3 ALTERACIÓN EN LA MIGRACIÓN CELULAR OBSERVADA PARA LAS CÉLULAS MDA-MB-231 TRATADAS CON EL DERIVADO IV.14	286
7.4 TEST DE VIABILIDAD/TOXICIDAD CELULAR	287
8. EVALUACIÓN DEL POSIBLE MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS COMPUESTOS EN LA MIGRACIÓN CELULAR	289
8.1 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE FAK Y SRC EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7 TRAS UN TRATAMIENTO CON LOS COMPUESTOS	289

8.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE FAK Y SRC EN LA LÍNEA CELULAR MDA-MB-231 TRAS UN TRATAMIENTO CON LOS COMPUESTOS	290
8.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE AKT y S6 RIBOSOMAL EN LA LÍNEA CELULAR MDA-MB-231 TRAS UN TRATAMIENTO CON EL DERIVADO IV.14	291
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>295</b>
<hr/>	
<b>CONCLUSIONS</b>	<b>299</b>
<hr/>	
<b>ANEXOS</b>	<b>303</b>
<hr/>	
1. RELACIÓN DE PRODUCTOS SINTETIZADOS	305
1.1 DERIVADOS DE PIRIDO[2,3- <i>d</i> ]PIRIMIDINA DE LA SERIE I	305
1.2 DERIVADOS DE PIRIDO[2,3- <i>d</i> ]PIRIMIDINA DE LA SERIE II	306
1.3 DERIVADOS DE QUINAZOLINA DE LA SERIE III	307
1.4 DERIVADOS DE QUINAZOLINA DE LA SERIE IV	310
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>313</b>
<hr/>	



# INTRODUCCIÓN





# I. El Cáncer



## **1. EL CÁNCER**

### **1.1 DEFINICIÓN TÉCNICA DE CÁNCER**

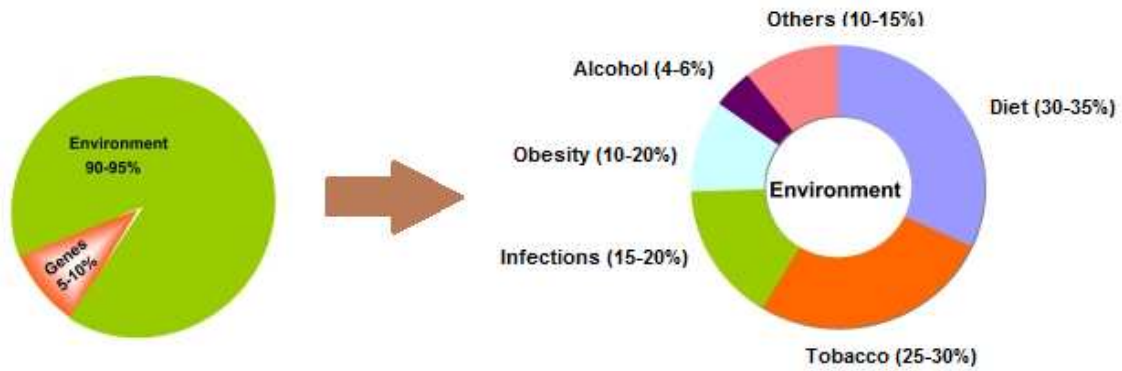
Este término es usado para identificar una afección clínica de carácter maligno que afecta a un paciente y, cuyas características son la alteración morfológica y funcional seguida de la proliferación descontrolada, no siempre acelerada, de las células de un tejido que invaden, desplazan y destruyen, localmente y a distancia, otros tejidos sanos del organismo.

### **1.2 LA DIVISIÓN CELULAR**

El proceso de división de las células está regulado por una serie de mecanismos de control que indican a la célula cuando comenzar a dividirse y cuando permanecer estática. Cuando estos mecanismos de control se alteran en una célula, ésta y sus descendientes inician una división incontrolada que, con el tiempo, dará lugar a un *tumor* o *nódulo*. Cuando las células que constituyen dicho tumor no poseen la capacidad de invadir y destruir otros órganos, hablamos de *tumores benignos*, si estas células crecen sin control, sufren nuevas alteraciones y adquieren la facultad de invadir tejidos y órganos de alrededor (infiltración), y de trasladarse y proliferar en otras partes del organismo (metástasis), hablamos de *tumores malignos*, que es a lo que denominamos *cáncer*.

### **1.3 ORIGEN DE LA ENFERMEDAD**

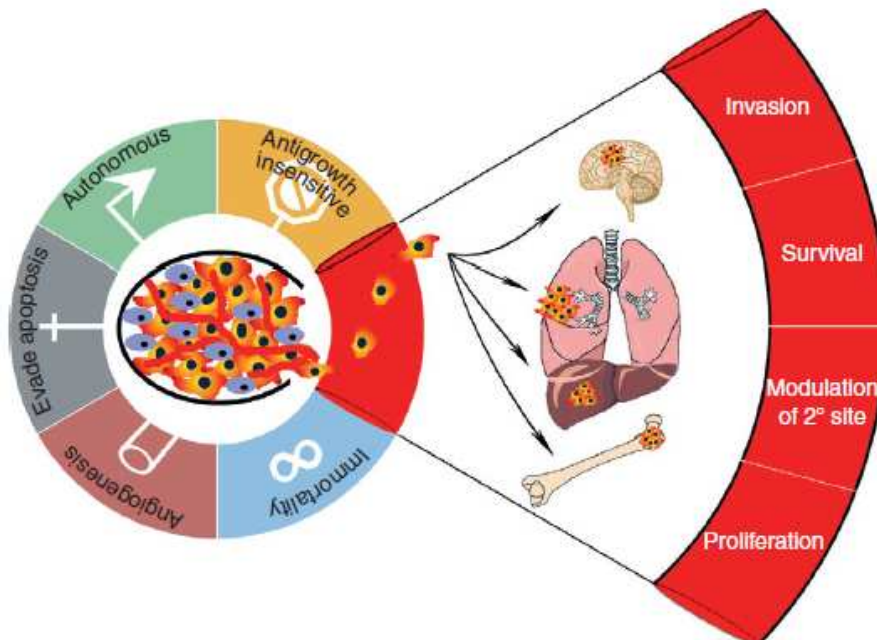
El cáncer se origina cuando las células normales se transforman en cancerígenas, es decir, adquieren la capacidad de multiplicarse descontroladamente e invadir tejidos y otros órganos. Este proceso se denomina *carcinogénesis* y puede durar años pasando por diferentes fases. En el desarrollo del cáncer van a estar implicados factores ambientales y factores genéticos, aunque el porcentaje de éstos últimos es mucho menor. Entre los factores ambientales destacan: la alimentación, el tabaco, las infecciones, la obesidad y el alcohol (AECC; Irigaray, P., 2007). También hay implicados factores genéticos, ya que hay evidencias de que determinados genes están involucrados en el desarrollo de algunos tipos de cánceres, aunque generalmente, debe darse una combinación entre factores genéticos y ambientales para el desarrollo de la enfermedad.



**Figura 1:** Factores implicados en el desarrollo del cáncer. Imagen adaptada de: Irigaray, P., Newby, J.A., Clapp, R., Hardell, L., Howard, V., Montagnier, L., Epstein, S., Belpomme, D. Lifestyle-related factors and environmental agents causing cancer: An overview. *Biomedicine & Pharmacotherapy*; 61: 640-658, 2007.

#### 1.4 LOS PROCESOS DE INVASIÓN CELULAR Y METÁSTASIS

Los cánceres son capaces de propagarse por el cuerpo principalmente mediante dos vías: la *invasión* y la *metástasis*. La *invasión* es la migración y la penetración directa por parte de las células cancerígenas en los tejidos vecinos, mientras que en la *metástasis* las células abandonan el tumor primario para diseminarse por el organismo (Brooks, S.A., 2010) y formar un segundo tumor en un lugar anatómicamente distante.



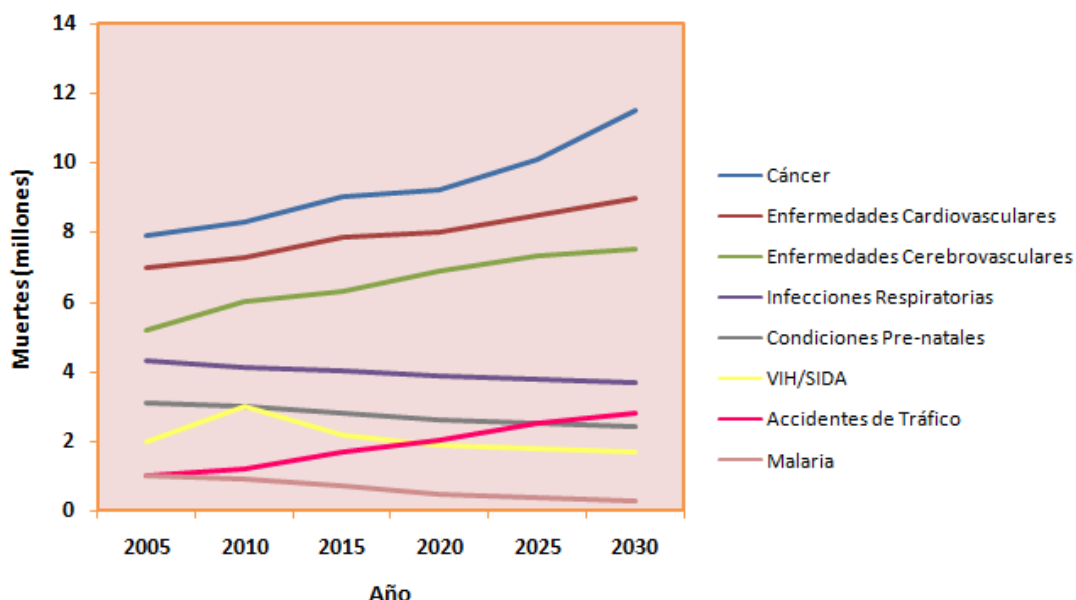
**Figura 2:** Principales características del proceso metastático. Imagen tomada de: Hurst, D.R., Welch, D.R. Metastasis suppressor genes: At the interface between the environment and tumor cell growth. *International Review of Cell & Molecular Biology*; 3: 107-180, 2011.

La metástasis ocurre generalmente por vía sanguínea o linfática (Bacac, M., 2008) y, debido a ello, las células cancerígenas van a penetrar en los vasos sanguíneos y linfáticos, circulando a través de la sangre y creando un nuevo foco (metástasis) en tejidos normales de otra parte del cuerpo. Para que la metástasis se produzca se necesita el desarrollo de una nueva red de vasos sanguíneos. Este proceso de formar nuevos vasos sanguíneos recibe el nombre de *angiogénesis*. La angiogénesis es un proceso fisiológico que ocurre de manera normal: durante la cicatrización de una herida, en el embarazo (Reynolds, L.P., 2001), durante la menstruación femenina... (Fraser, H.M., 2000).

La pérdida del equilibrio entre los factores que regulan la angiogénesis puede dar lugar a múltiples enfermedades entre las que se encuentra el cáncer (Folkman, J., 1995; 2006). Los cánceres que más metastatizan son los cánceres más frecuentes como el cáncer de mama, el cáncer de pulmón y el cáncer colorrectal. La causa principal de muerte de un paciente con cáncer son las metástasis y el 98 % de las muertes por cánceres no detectados, son debidas a la metastatización de éste y su dispersión por tejidos sanos.

### 1.5 INCIDENCIA MUNDIAL

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es la *primera causa de mortalidad* a nivel mundial y se ha definido como la enfermedad del siglo XXI. En la figura 3 se puede apreciar que el cáncer es la primera causa de muerte desde 2005 y cómo se estima su evolución hasta 2030.



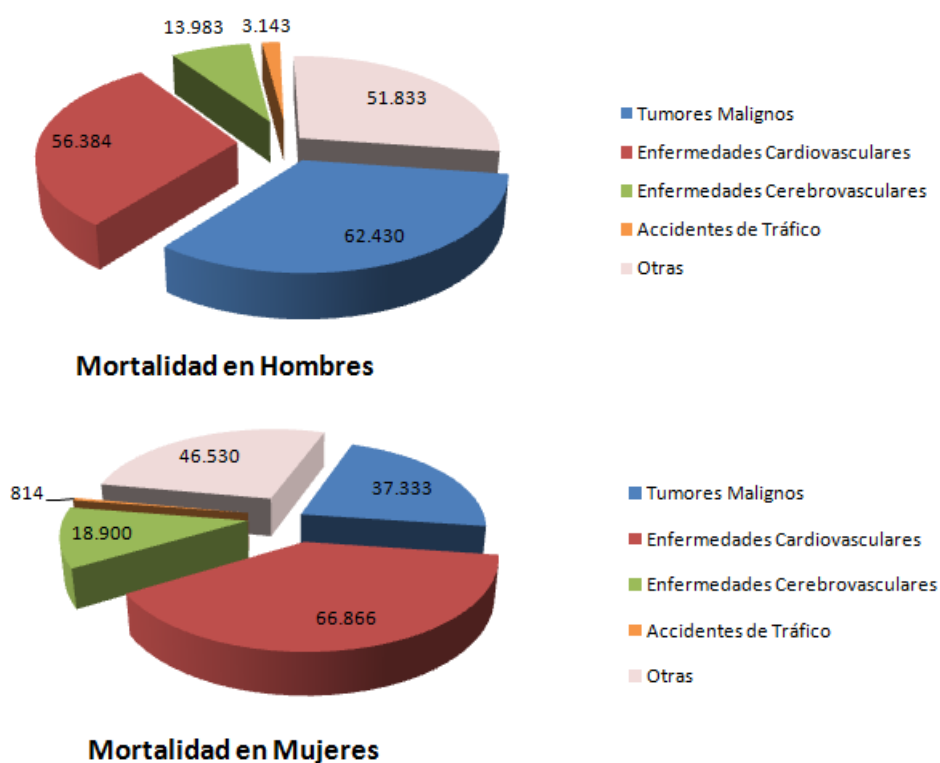
**Figura 3:** Evolución en el tiempo de enfermedades crónicas, no transmisibles y traumatismos. Datos tomados de: Informe 2009 de la OMS (Global Health Risks 2009: Mortality and Burden Disease attributable to selected major risks).

Según la OMS en 2009, murieron debida a esta enfermedad 8,1 millones de personas, lo que supone aproximadamente el 14 % de las defunciones mundiales. Se prevé un aumento de las

muerres por cáncer, hasta aproximadamente 9,0 millones de personas en 2015 y 11,4 millones en 2030, según la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer.

### 1.6 INCIDENCIA EN ESPAÑA

En España, el cáncer es la *primera causa de mortalidad en hombres* y la *segunda causa de mortalidad en mujeres* (figura 4), por debajo de las enfermedades cardiovasculares.



**Figura 4:** Principales causas de mortalidad en España en 2007. Datos tomados de: Informe realizado por el Centro Nacional de Epidemiología, perteneciente al Instituto Carlos III, a partir de los datos de mortalidad por cáncer en España en el año 2007.

Según un estudio de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) publicado en 2008, uno de cada tres varones y una de cada cuatro mujeres serán diagnosticados de cáncer a lo largo de su vida. En el año 2015 el cáncer con un mayor número de incidencia será el colorrectal, por delante, en términos generales, del cáncer de pulmón y el de mama (SEOM). Un informe del Centro Nacional de Epidemiología publicado en 2010, ha revelado que el 26 % de todas las defunciones que se produjeron en nuestro país en al año 2008 fueron a consecuencia del cáncer, lo que supone que una de cada cuatro personas fallece debido a una enfermedad tumoral.

Cada año, la incidencia de esta enfermedad aumenta en España, pero también disminuye su mortalidad, lo cual refleja los avances en el diagnóstico precoz y el tratamiento. El envejecimiento de la población y la supervivencia cada vez mayor de los enfermos de cáncer

han supuesto un aumento significativo del número de pacientes que tienen o han tenido cáncer.

### **1.7 TIPOS DE TRATAMIENTOS**

Los avances científicos y tecnológicos de los últimos años han proporcionado nuevos conocimientos sobre la aparición, desarrollo y crecimiento del cáncer, lo que se traduce en una mejora de los diagnósticos, de los tratamientos de la enfermedad y una disminución de los efectos secundarios derivados de ellos (Rosenthal, S.A., 2009). Las principales modalidades de tratamiento son: cirugía, radioterapia y quimioterapia. Aunque, también puede administrarse otro tipo de terapias específicas para algunos tumores como la hormonoterapia, la inmunoterapia, el tratamiento con láser, la crioterapia, la terapia génica... A continuación, se explican brevemente los principales tratamientos que se utilizan en la actualidad para paliar el cáncer:

- La *cirugía* se emplea tanto en estadios pre-cancerosos, eliminando lesiones que con el tiempo pueden convertirse en malignas (carcinomas cutáneos asociados con quemaduras, úlceras crónicas en la piel...), como en la diagnosis y tratamiento del cáncer. Además, la cirugía es muy importante en los cuidados paliativos de pacientes con estadios avanzados.

- La *radioterapia* se emplea en algo más del 50 % de los pacientes con cáncer, aunque los porcentajes varían mucho según el tipo de cáncer (entre el 70-80 % en pacientes con cáncer de mama frente al 1 % en pacientes con cáncer de colon). La radioterapia se aplica con diferentes intensidades dependiendo del estadio de la enfermedad, así, se usa en pequeñas dosis y baja intensidad en pacientes con estadios avanzados o metástasis (radioterapia paliativa) y en dosis altas y elevadas intensidades en estadios iniciales o después de la cirugía (radioterapia post-operativa).

- La *quimioterapia* utiliza *agentes quimioterápicos* para el tratamiento del cáncer. Los agentes quimioterápicos son una gran variedad de fármacos (agentes químicos citotóxicos) capaces de destruir las células cancerígenas que componen el tumor con el fin de reducir y/o eliminar la enfermedad y pueden utilizarse separadamente como monoterapia o bien en combinación (Klimes, D., 2009). Actualmente, se utilizan entre 20 y 30 compuestos quimioterápicos en el tratamiento del cáncer y muchos de ellos poseen efectos secundarios. Este tratamiento se administra en forma de ciclos y, dependiendo del tipo de cáncer y de los fármacos que se vayan a emplear, la quimioterapia puede administrarse por vía oral o intravenosa (Bellmunt, J., 2009).

A continuación, se profundiza en los tipos de compuestos quimioterápicos y su situación en la actualidad, al ser el objetivo de esta Memoria el desarrollo de nuevos compuestos con potenciales efectos antitumorales.

## **1.8 PRINCIPALES AGENTES ANTINEOPLÁSICOS**

Los fármacos quimioterápicos que se usan actualmente en el tratamiento de procesos malignos se pueden clasificar de diversas maneras. Esta clasificación atiende al punto de acción del antineoplásico:

- Antineoplásicos que actúan sobre el DNA.
- Antineoplásicos que actúan sobre la mitosis sin afectar al DNA.
- Antineoplásicos que actúan sobre factores extracelulares de división celular.
- Antineoplásicos que actúan sobre el sistema inmunitario.

### **1.8.1 Antineoplásicos que actúan sobre el DNA**

La proliferación celular se produce como consecuencia de divisiones sucesivas de la célula. El núcleo debe dividirse y, para ello, se necesita una duplicación del material genético, por lo que se requiere la síntesis de DNA. Estos compuestos van a inhibir la síntesis de DNA y van a impedir el desarrollo tumoral.

#### **A) Agentes alquilantes**

La actividad de los agentes alquilantes se basa en su alta reactividad química para formar enlaces covalentes con macromoléculas que tienen centros nucleófilos, como los ácidos nucleicos (bases púricas y pirimidínicas). La posibilidad de unirse simultáneamente a las dos cadenas de la doble hélice de DNA impidiendo la separación previa a la división celular es la que les confiere su actividad anticancerosa.

Las *mostazas nitrogenadas* tienen en común el grupo biscloroetilo y actúan alquilando preferiblemente el N<sup>7</sup> de la guanina. Entre ellas destacan: *ciclofosfamida*, *mecloratamina*, *melfalán*, *clorambucil*, *metocloretamina* e *ifosfamida*. Actualmente, se están realizando estudios que indican que derivados del melfalán, como el mefalanil-L-*p*-fluorofenilalanil-etil-éster, pueden ser activados por aminopeptidasas confiriendo a estos derivados una citotoxicidad mayor que el melfalán (Wickström, M., 2010). También se han sintetizado conjugados de carbonato y carbamato de fenil-*N*-mostaza-9-anilinaacridinas, que poseen actividad citotóxica en varias líneas celulares y son capaces de alquilar el DNA (Kapuriya, N., 2009).

Las *etilaminas* actúan alquilando preferiblemente el N<sup>7</sup> de la guanina. Entre ellas destacan: *trietilnmelamina*, *trimelamol*, *trietilentiofosforamida* y *hexametilmelamina*.

Los *alquilsulfonatos* actúan alquilando preferiblemente el N<sup>7</sup> de la guanina. Los más importantes son: *busulfán* y *clomesona*. Estudios recientes han comprobado que la



combinación de busulfán con diversos fármacos, como la 5-aza-2'-desoxicitidina, mejoran su efecto en pacientes con leucemia mieloide (Valdez, B.C., 2010, 2011).

Las *triazinas*, como *temozolomida*, *procarbazona* y *dacarbacina*, actúan alquilando el N<sup>7</sup> y el O<sup>6</sup> de la guanina. Tienen unas excelentes propiedades farmacocinéticas y una toxicidad baja, de ahí su importancia (Marchesi, F., 2007). Se ha demostrado que la dacarbazona en combinación con un adenovirus mediado por la interleuquina 24 produce actividad antitumoral frente a células de melanoma por inducción de apoptosis (Jiang, G., 2010).

Las *nitrosoureas*, como *carmustina*, *lomustina*, *semustina* y *clorozotocin*, actúan alquilando el N<sup>7</sup> de la guanina. Estudios han comprobado que la combinación de carmustina y selenito tiene un efecto sinérgico en el tratamiento del cáncer de próstata (Thamilselvan, V., 2010).

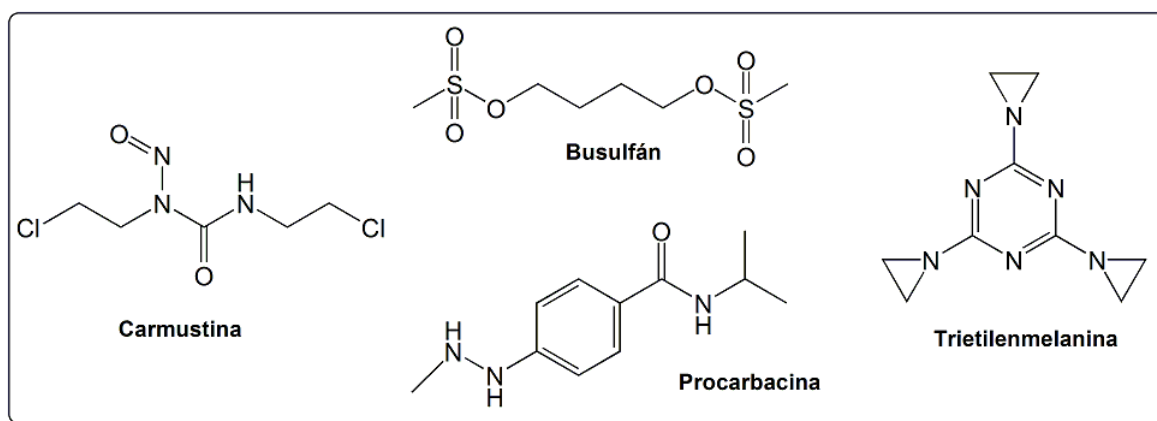


Figura 5: Principales agentes alquilantes del DNA.

Los *complejos de platino* se han utilizado en el tratamiento del cáncer desde décadas. El primer complejo que se introdujo como agente quimioterápico fue el *cisplatino*. Sin embargo, debido a su alta toxicidad, a los efectos secundarios y a la aparición de resistencias, se han desarrollado otros complejos de platino. Entre ellos se encuentran *carboplatino*, *lobaplatino*, *nedaplatino* y *oxaliplatino* (Gielen, M., 2005; Pasetto, L.M., 2006). Estudios recientes han demostrado que el transporte de oxaliplatino mediante nanopartículas de ligandos polisacáridos aumenta la eficacia del tratamiento y disminuye su toxicidad en pacientes con cáncer colorrectal (Mpharm, A.J., 2010).

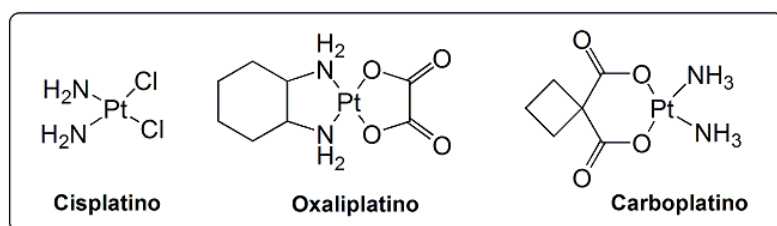
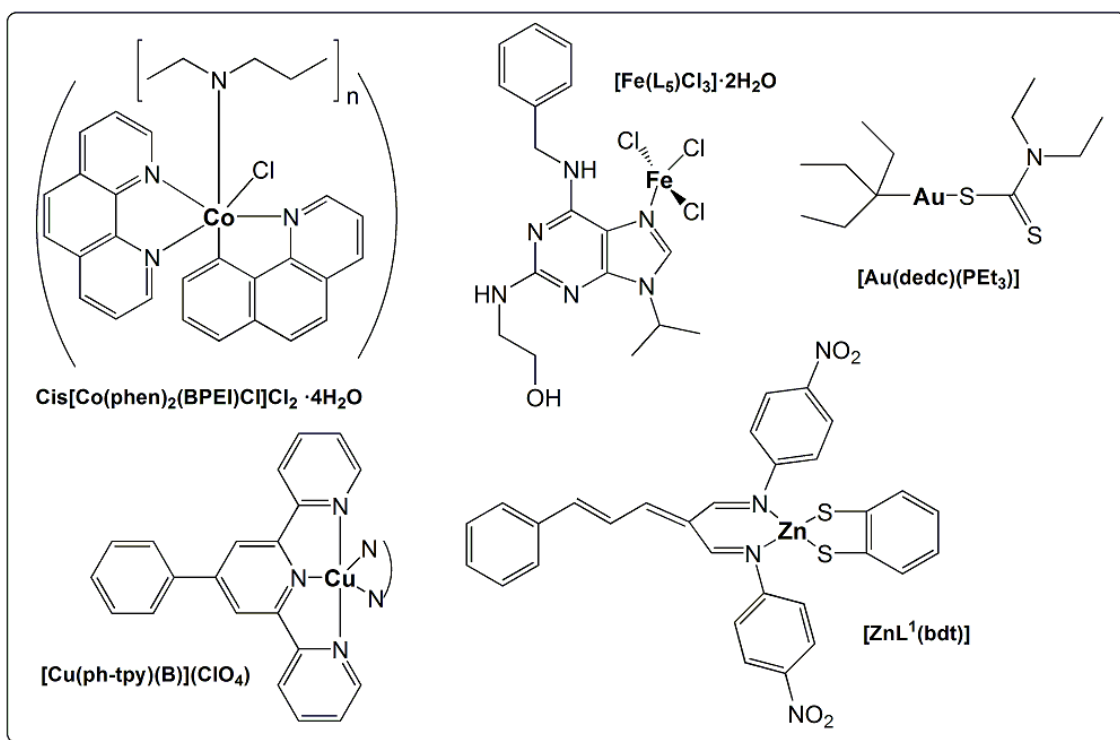


Figura 6: Principales complejos de platino utilizados en el tratamiento del cáncer.

Además, se ha comprobado que la aplicación de dos o más fármacos en combinación minimiza el riesgo de células resistentes y su toxicidad (Daub, H., 2004; Sawyer, C.L., 2007). Por ello, el uso de cisplatino combinado con compuestos con ligandos cuádruples inhiben sinérgicamente el crecimiento de células tumorales en estudios *in vitro* e *in vivo* (Gunaratnam, M., 2009).

En el tratamiento del cáncer han aparecido en los últimos años gran cantidad de complejos de metales de transición enfocados a paliar la enfermedad, como los *complejos de oro*, los *complejos de cobalto*, los *complejos de rutenio*, los *complejos de hierro*, los *complejos de estaño* y los *complejos de zinc*. Dentro de los complejos de oro, cabe destacar la *auranofina*, ya que es el primer complejo de oro que ha mostrado actividad citotóxica en varias líneas celulares tumorales y se ha utilizado durante décadas en el tratamiento de la artritis reumatoide (Gordon, D.A., 1989). Actualmente, se investigan nuevos complejos de oro para el tratamiento del cáncer (Malacic, V., 2009; Sun, R.W.Y., 2009; Lum, T.C., 2010; Siciliano, T.J., 2011). El derivado de oro [Au(dedc)(PEt<sub>3</sub>)] induce muerte celular en células tumorales produciendo apoptosis por inhibición de la enzima tioredoxina reductasa (Gandin, V., 2010)



**Figura 7:** Principales complejos de metales de transición utilizados en el tratamiento del cáncer.

Determinados complejos de cobalto (III) unidos a polímeros, como por ejemplo cis[Co(phen)<sub>2</sub>(BPEI)Cl]Cl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, se ha comprobado que producen apoptosis en células tumorales de la epidermis (HEp-2) (Kumar, R.S., 2008). También, complejos de cobre (II) como [Cu(ph-tpy)(B)](ClO<sub>4</sub>) han mostrado actividad antitumoral con unas IC<sub>50</sub> en torno a 10 μM (Roy, S., 2010).

Algunos complejos de hierro (III), entre los que se encuentra  $[\text{Fe}(\text{L}_5)\text{Cl}_3]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , actúan como inhibidores de ciclinas dependientes de quinasas y han mostrado actividad citotóxica en células de distintas líneas celulares tumorales: G-361, MCF-7, HOS y K-562 (Trávnicek, Z., 2008, 2010). Otros derivados de hierro, producen alteraciones en la expresión de moléculas que intervienen en el control del ciclo celular y en la supresión de la metástasis, formando complejos redox activos (Richardson, D.R., 2009). Los complejos de zinc (II) han mostrado cierta toxicidad en las líneas celulares tumorales de cáncer de mama (MCF-7), carcinoma epitelial (HeLa) y carcinoma de hígado (HepG-2) (Raman, N., 2010).

## **B) Antimetabolitos**

Debido a su analogía con algunas sustancias naturales del organismo, van a actuar en la fase S del ciclo celular como interferentes en el proceso de síntesis del DNA y del RNA. De forma general, van a interactuar con las enzimas sustituyendo al metabolito que se incorpora a la molécula diana, compitiendo con ese metabolito por la unión al sitio catalítico o compitiendo con otro metabolito que actúa en un receptor o en una zona reguladora importante para la enzima.

Entre los *análogos de la pirimidina* se encuentran: *5-fluorouracilo*, *fludarabina*, *citarabina* y *gemcitabina*. Estudios apuntan que el tratamiento con inhibidores de histonas desacetilasas (HDACs) combinado con 5-fluorouracilo, produce una sinergia en pacientes con cáncer de colon reduciendo la dosis citotóxica (Flis, S., 2010). La citarabina se usa predominantemente en el tratamiento de leucemias mieloide y linfoblástica, aunque su naturaleza polar dificulta el paso a través de la membrana celular y, por lo tanto, su disponibilidad en el organismo va a ser baja. Para paliar este problema, las nuevas investigaciones van encaminadas a sintetizar derivados de citarabina con ésteres grasos acetilados que faciliten la penetración de la membrana celular y aumenten su disponibilidad (Chhikara, B.S., 2010).

Los *análogos de la purina*, entre los que destacan: *mercaptopurina*, *tioguanina*, *pentostatina* y *fosfato de fludarabina*, se emplean en el tratamiento del cáncer. Derivados de la mercaptopurina, como S-alquiltio-6-mercaptopurina, han mostrado actividad antiproliferativa e inducción de apoptosis en distintas líneas celulares tumorales (Miron, T., 2009).

Los *análogos del ácido fólico* intervienen en la síntesis de bases púricas y pirimidínicas, altamente dependientes del ácido fólico. Entre dichos análogos están *metotrexato*, que inhibe a la dihidrofolato reductasa, *ralitrexed*, que es un inhibidor de la timidilato sintasa, *pemetrexed* e *hidroxiurea*, que inhibe a la ribonucleótido reductasa. Un derivado del metotrexato, *Pro-MTX*, se ha visto que mejora la actividad de éste en células resistentes de cáncer de mama (MDA-MB-231) (Wu, Z., 2010).

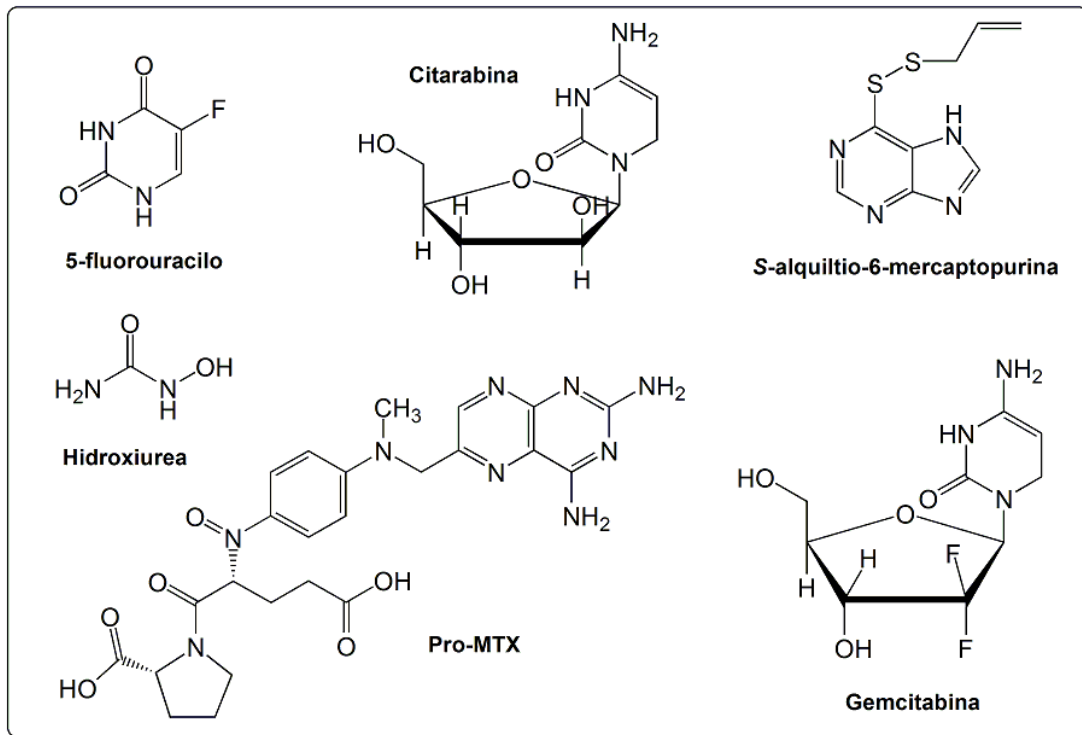


Figura 8: Principales antimetabolitos utilizados en el tratamiento del cáncer.

### C) Antitumorales microbianos

Se obtienen en su mayoría a partir de cultivos de bacterias, especialmente de *Streptomyces*. La obtención de estos productos es complicada y su empleo es escaso.

Dentro de la familia de las *antraciclinas* se encuentran: *doxorubicina*, *danorrubicina*, *epirubicina* y *bleomicina*. Se ha visto que el uso de doxorubicina produce muerte celular y apoptosis en células de cáncer de colon (Hct-116) y que los resultados obtenidos dependen del tiempo de exposición al fármaco y de la concentración a la que se emplee (Lüpertz, R., 2010).

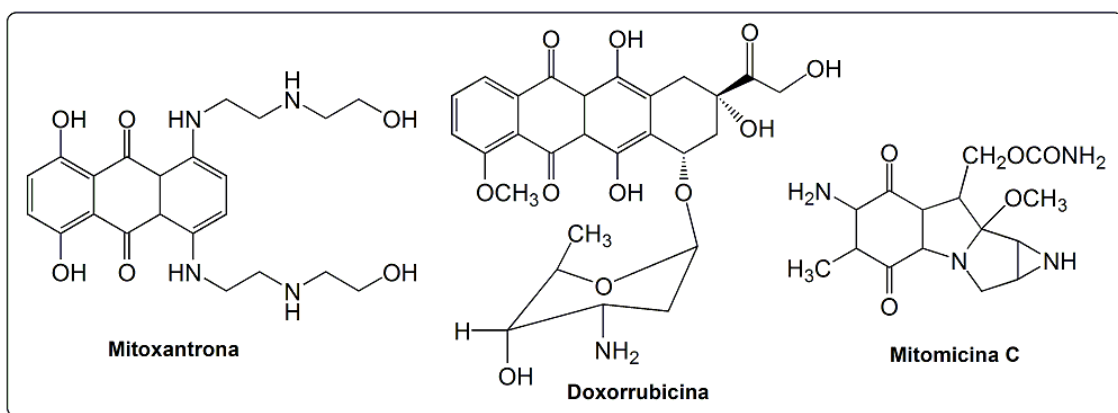


Figura 9: Principales antitumorales microbianos utilizados en el tratamiento del cáncer.

Los derivados de *antracenodionas* más destacados son: *mitoxantrona*, *actinomicina D* y *mitomicina C*. Estudios recientes han comprobado que el uso de micelios surfactantes, como el dodecilsulfato sódico, pueden servir de transportadores de fármacos (*mitoxantrona*), así como ayudar a comprender las interacciones entre fármacos y membranas biológicas (Enache, M., 2010).

#### D) Inhibidores de topoisomerasas

Entre los compuestos *inhibidores de la topoisomerasa I* se encuentra la *camptotecina* y sus derivados (*topotecan*, *CPT-11*...). Además, han aparecido una gran cantidad de compuestos, como *ARC-111* y sus derivados etilendiamino (Feng, W., 2009), así como derivados 12-sustituídos de 2,3-dimetoxi-8,9-metilendioxi-benzo[*l*]fenantridina (Feng, W., 2009), derivados de *N*-metilmaleimidaindolocarbazoles (Li, Z., 2009), derivados de 2,6-ditienil-4-furilpiridinas (Basnet, A., 2010) y 2,4-difenil-6-arilpiridinas (Karki, R., 2010).

Los compuestos *inhibidores de la topoisomerasa II* más importantes son las *antraciclinas*, como *doxorubicina* y *daunomicina*; las *amsacrinas*, como *m-AMSA*, donde el núcleo de acridina es crítico para su actividad biológica (Chilin, A., 2009), así como la *acrilamida*, ya que se ha visto que actúa como inhibidor de la topoisomerasa II en células de V79 (Sciandrello, G., 2010). Las *podofilotoxinas*, como *etopósido* y *tenipósido*; *mitoxantrona* y su derivado *pixantrona*; derivados de furo[3,4-*b*]carbazoles (Hajbi, Y., 2010); y *voreloxin* (*SNS-595*), que presenta actividad antiproliferativa en una amplia variedad de modelos *in vitro* e *in vivo* de cánceres humanos (Hosch, U., 2009).

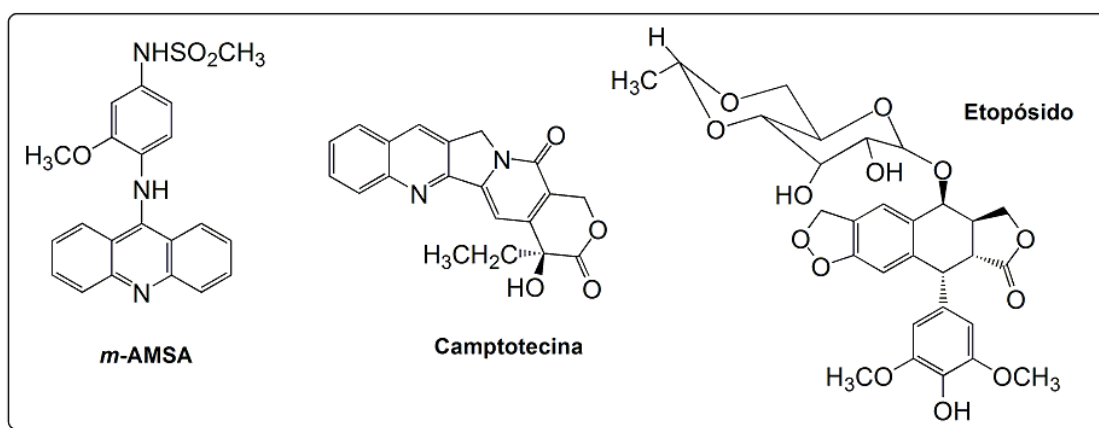
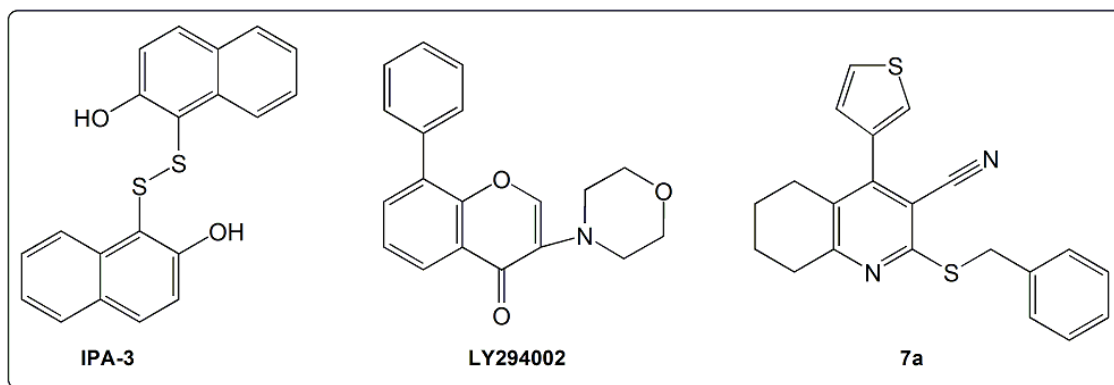


Figura 10: Principales inhibidores de topoisomerasas utilizados en el tratamiento del cáncer.

#### E) Inhibidores de quinasas

Dentro de los inhibidores de quinasas cabe destacar los *bisindolocarbazoles*, que han mostrado una elevada inhibición de CDK2 y CDK4 (Zhu, G., 2003) y algunos derivados del *diadamantano* (Wang, J.J., 2003). Aunque recientemente se están desarrollando nuevos

compuestos inhibidores de quinasas entre los que destacan *lapatinib*, que inhibe los dominios tirosina quinasa de Her1 y Her2 (Scaltriti, M., 2009); *estaurosporina*, K252a, CEP-1347 y IPA-3, que inhiben la quinasa p21 (Yi, C., 2010); LY294002, ZSTK474, GDC-0941 y NVP-BEZ235, que inhiben la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) (Kong, D., 2010) o los derivados 7a-f y 13a-j, que inhiben RET (Brandt, W., 2010).



**Figura 11:** Inhibidores de quinasas utilizados en el tratamiento del cáncer.

## F) Enzimas

Los fármacos de este tipo están aún en estudio, pero un ejemplo de ellos es la *L-asparaginasa* que se emplea en tratamientos de leucemia linfoblástica aguda en niños (Ali, R., 2009).

### 1.8.2 Antineoplásicos que actúan sobre la mitosis celular sin afectar al DNA

Son específicos de cada fase con escasa acción sobre células que no están en proceso de división. Estos fármacos van a actuar sobre los microtúbulos que forman el entramado celular y que se encargan de formar el huso cromático durante la mitosis, rompiendo el equilibrio que debe existir de polimerización y despolimerización entre el microtúbulo y su constituyente tubulina.

#### A) Alcaloides de la vinca

Mediante su empleo, la mitosis se va a detener en la metafase y los cromosomas se van a dispersar por el citoplasma, teniendo la propiedad de ligarse a la tubulina e impedir la polimerización para formar microtúbulos. Además, van a prevenir la división celular y promueven la muerte celular en células divididas (Voss, M.E., 2009). Algunos ejemplos de alcaloides de la vinca son: *vinblastina*, *vincristina*, *vinorelbina*, *vinflunina* y *vindesina*.

Estudios han relevado que la combinación de vinblastina con 5-aza-2'-desoxicitidina, mejora significativamente la acción de la Jun quinasa N-terminal (JNK) en células tumorales de carcinoma renal Caki-1 (Takano, Y., 2010).

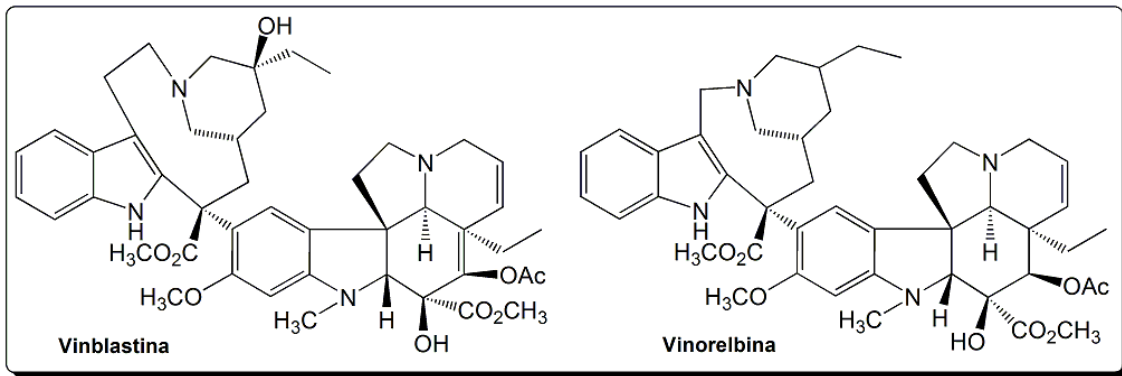


Figura 12: Alcaloides de la vinca utilizados en el tratamiento del cáncer.

Por otro lado, el tratamiento combinado de vinorelbina y gemcitabina con radioterapia se encuentra en fase II en pacientes con cáncer de pulmón avanzado (Leong, S.S., 2010).

## B) Taxanos

Promueven la formación de microtúbulos al unirse a la  $\beta$ -tubulina. Debido a ello se forman estructuras microtubulares anómalas o excesivamente estables que no pueden participar en la mitosis. Dentro de los *taxanos* destacan *paclitaxel* (*taxol*), *docetaxel* (análogo del taxol) y las *epitilonas*. Se ha observado que la enzima farnesildifosfatasa bloquea la apoptosis inducida por paclitaxel en células de glioblastoma U87MG (Woo, I.S., 2010), mientras que la combinación de paclitaxel con ácido suberoilanihidroxámico potencia la apoptosis en líneas celulares de cáncer de ovario (Dietrich, C.S., 2010).

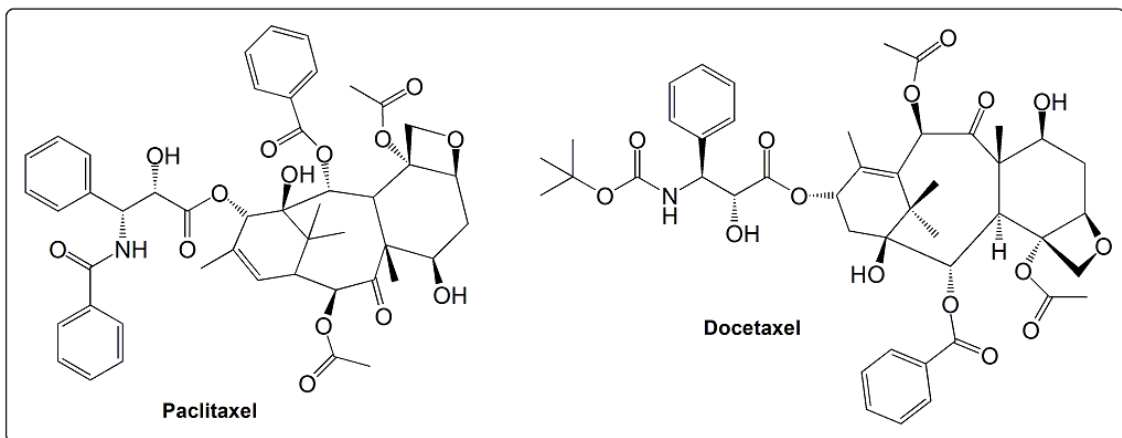


Figura 13: Taxanos utilizados en el tratamiento del cáncer.

Las *epitilonas* (Lee, F.Y.F., 2008) provocan una parada en la división celular del tumor y un incremento de la apoptosis, donde el derivado más interesante es *ixabepilona*, que ha mostrado interesantes características preclínicas (Lee, J.J., 2009; Borzilleri, R.M., 2009).

### 1.8.3 Antineoplásicos que actúan sobre factores extracelulares de división celular

Estos fármacos sólo tienen efecto en tejidos cuyo crecimiento depende de un estímulo hormonal. Se incluyen los implicados en procesos dependientes de hormonas sexuales, sobre todo mama y próstata. Otros factores hormonales se usan en procesos específicos, como los corticoides, que se emplean en leucemias y son inhibidores de la división de linfocitos. Debido a ello, a estos fármacos se les conoce también como *antineoplásicos hormonales*.

Los *derivados antiestrogénicos* actúan bloqueando los receptores y son fármacos no esteroideos. Ejemplos de ellos son el *tamoxifeno*, *raloxifeno* y el *toremifeno*, muy utilizados en cáncer de mama. El tamoxifeno se ha visto que modula epigenéticamente la quimoquina CXCL12 en células tumorales de mama MCF-7 (Pietkiewicz, P.P., 2010) y combinado con *gefitinib* produce efectos antiproliferativos en células de cáncer de pulmón (Shen, H., 2010).

Dentro de los *compuestos inhibidores de la aromatasa* hay que destacar *aminoglutetimida* y *formestano*.

Los *análogos de la hormona liberadora de gonadotropinas (LH-RH)* producen en una primera fase un aumento de la secreción de gonadotropinas pero, un tratamiento continuado, se traduce en un descenso de los niveles de determinadas hormonas glucoproteínicas. Algunos de los fármacos son *buserelina*, *goserelina*, *leuprorelina* y *triptorelina*, ampliamente utilizados en el tratamiento de cáncer de mama (Kim, H.J., 2009; Rai, Y., 2010).

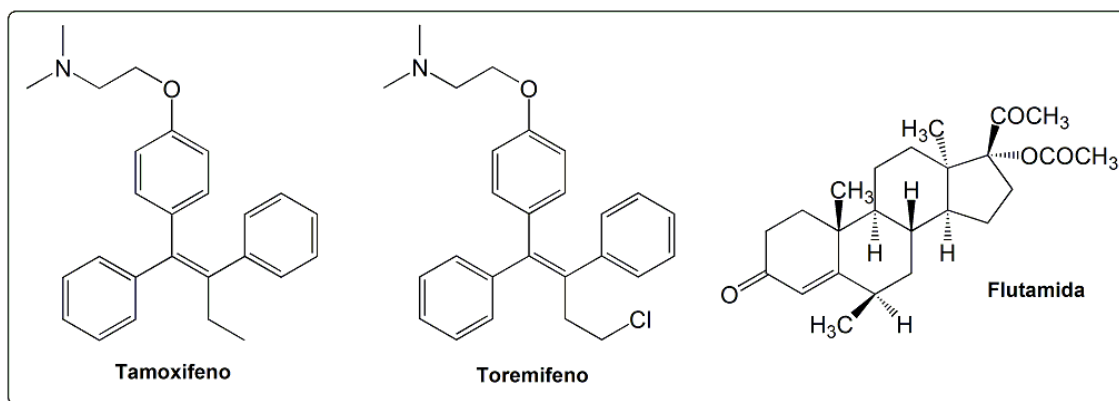


Figura 14: Antineoplásicos hormonales utilizados en el tratamiento del cáncer.

Entre los *derivados antiandrogénicos* destacan los estrógenos, como *fosfestrol*, y los bloqueantes de receptores, como *flutamida*, *bicalitamida* y *ciproterona*. Estudios recientes han comprobado que preparando una disolución en monofase de flutamida, o bien utilizando adyuvantes como las ciclodextrinas, se puede mejorar la solubilidad de la flutamida y mejorar su biodisponibilidad (Elgindy, N., 2010).



Los *derivados progestágenos* actúan disminuyendo los niveles de progesterona. Entre ellos se encuentran *gestonorona*, *caproato*, *medroxiprogesterona* y *megestrol*.

#### **1.8.4 Antineoplásicos que actúan sobre el sistema inmunitario**

Los medicamentos que se incluyen en este grupo potencian las defensas del organismo que pueden reconocer y eliminar las células cancerosas.

Las *interleuquinas* promueven la proliferación de linfocitos T citotóxicos, linfocitos B y timocitos. Un ejemplo es *aldesleuquina*.

Los *interferones* reaccionan con la membrana celular para producir acciones en el núcleo. Actúan induciendo la expresión de determinados genes y la represión de otros. Algunos de ellos, como el *interferón  $\alpha$ -2a* y el *interferón  $\alpha$ -2b*, intensifican la función de las células inmunológicas.

Los *anticuerpos monoclonales* como *alentuzumab*, *declizumab* y *rituximab*, se utilizan ampliamente en el tratamiento de linfomas (Machover, D., 2010; Abulayha, A.M., 2010; Sousou, T., 2010; Saini, K.S., 2011).

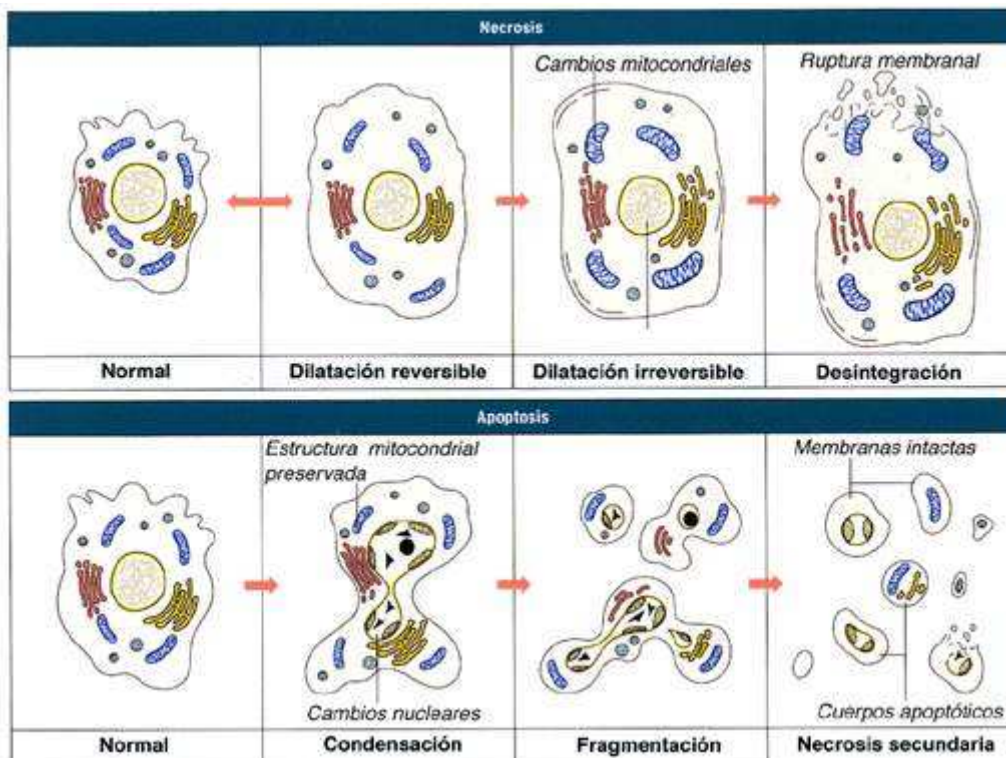
## **2. LA MUERTE CELULAR**

La muerte celular puede llevarse a cabo por distintos mecanismos. Dependiendo de las características morfológicas se pueden diferenciar principalmente cuatro tipos distintos: *apoptosis*, *necrosis (u oncosis)*, *autofagia* y *catástrofe mitótica* (Galluzzi, L., 2007). De estos mecanismos, los más frecuentes son la apoptosis y la necrosis.

La *necrosis* es un proceso patológico y los agentes desencadenantes de la misma son siempre factores o condiciones tóxicas para la célula, mientras que la *apoptosis* es una muerte programada necesaria para la fisiología normal de los organismos, cuyos agentes desencadenantes pueden estar en el interior de la célula o bien proceder del espacio extracelular y sólo la alteración de sus mecanismos reguladores la convierten en un proceso patológico (Benachour, N., 2009). Dado que la muerte celular por apoptosis es la más común, a continuación se comentan sus principales características.

**2.1 PRINCIPALES ALTERACIONES MORFOLÓGICAS Y ESTRUCTURALES ENCONTRADAS EN EL PROCESO APOPTÓTICO**

Durante el proceso de *apoptosis* la célula se condensa. La membrana plasmática no sufre daños importantes hasta el final del proceso apoptótico, aunque desde estadios tempranos se pueden observar algunos cambios estructurales. El mejor caracterizado es el movimiento de la fosfatidilserina desde la cara interna de la membrana a la cara externa, lo que *in vivo* permite a los macrófagos reconocer específicamente las células apoptóticas en los tejidos y retirarlas. En el núcleo, la cromatina se condensa fuertemente y se produce su marginación, adoptando, en muchos casos, forma de media luna. El DNA es digerido por una endonucleasa capaz de cortarlo específicamente en las regiones internucleosómicas, con lo que se producen fragmentos de DNA que son múltiplos de 180-200 pares de bases. Finalmente, el proceso acaba con un desgajamiento de la célula en fragmentos discretos rodeados de membrana, que reciben el nombre de *cuerpos apoptóticos*. Estos son de tamaño variable y en su interior podemos encontrar orgánulos intactos y muy empaquetados que pueden estar acompañados o no por fragmentos de núcleo (Wyllie, A.H., 1981,1997). Si el proceso se da en tejidos *in vivo*, estas células son retiradas de manera eficiente por los macrófagos, por lo que no se producen fenómenos de inflamación. Si la apoptosis ocurre *in vitro*, las células continúan el proceso que termina en lo que se ha denominado *necrosis secundaria*.



**Figura 15:** Principales características morfológicas de la muerte celular por necrosis y apoptosis. Imagen tomada de: Fernández, E. Temario on-line. Tema 40: Configuración de los seres vivos. Departamento de Histología. Ciencias Experimentales. Universidad Miguel Hernández, 2009.

## 2.2 LAS CASPASAS Y SU FUNCIÓN EN LA APOPTOSIS

Las *caspasas* son una familia de enzimas proteolíticas que van a llevar a cabo el proceso de apoptosis (Debatin, K.M., 2006). Pertenecen al grupo de las *cisteín-proteasas* y cortan sus proteínas sustrato en secuencias específicas que contienen un residuo de aspartato. Estas proteasas se encuentran normalmente en la célula en forma de pro-enzima inactiva. Las caspasas contienen tres dominios: un dominio N-terminal de longitud variable, una subunidad larga (p20) y una subunidad pequeña (p10) en el C-terminal. El dominio y la subunidad larga están separados por un lugar de corte con aspartato y la subunidad larga está separada de la pequeña por uno o dos motivos de este tipo (Debatin, K.M., 2006). La presencia de aspartato en los motivos de corte, permite a las caspasas autoactivarse o ser activadas por otras caspasas formando una cascada de amplificación. Debido a ello, se diferencian dos tipos de caspasas inductoras de apoptosis: *iniciadoras*, donde se encuentran las caspasas 2, 8, 9 y 10, y *efectoras*, donde se encuentran las caspasas 3, 6 y 7. Las caspasas efectoras tienen como sustrato a proteínas que se sitúan en la superficie interna de la membrana nuclear (Lazebnik, Y.A., 1995; Sahara, S., 1999). Su ruptura va a traer consigo condensación de la cromatina (Lui, X.S., 1998), fragmentación nuclear, fragmentación del DNA cromosómico (Sakahira, H., 1998) y formación de cuerpos apoptóticos (Kothakota, S., 1997). En resumen, las caspasas efectoras se activan proteolíticamente por otras caspasas, mientras que las caspasas iniciadoras son activadas por interacciones proteína-proteína desempeñando su función en la apoptosis (Rossi, M., 2009), proceso crucial tanto en el control de la homeostasis como en el desarrollo de organismos multicelulares y en procesos de supervivencia celular (Siegel, R.M., 2006).

## 2.3 VÍAS DE INDUCCIÓN DE APOPTOSIS

### 2.3.1 Vía intrínseca

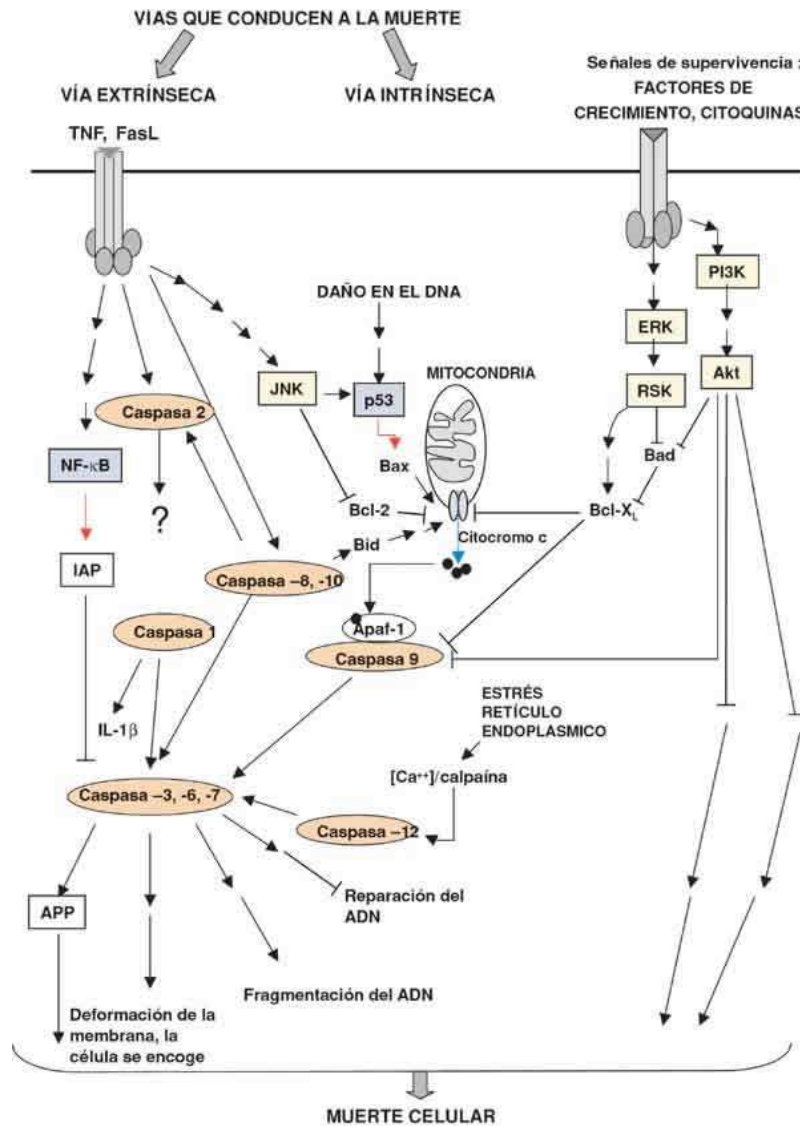
Esta vía recibe el nombre también de *vía mitocondrial* y se activa por estrés y por otras señales que provocan la salida del citocromo c desde la mitocondria (Desagher S., 2000). En el citosol, el citocromo c se une al factor activador de la proteasa (Apaf-1) y una vez unido recluta y activa a la caspasa 9, la cual puede a su vez activar otras caspasas (Kroemer, G., 1998). La familia de proteínas Bcl-2 (proto-oncogen del linfoma de los linfocitos B) controla la permeabilidad mitocondrial y la liberación de citocromo c (Hengartner, M.O., 2000) y, por lo tanto, puede dañar o proteger la mitocondria (Borner, C., 2003). Los miembros de la familia Bcl-2 pueden realizar sus funciones en conjunto o bien independientemente (Huppertz, B., 2006) y algunos miembros, como el propio Bcl-2 y Bcl-XL, inhiben la liberación de citocromo c, siendo por lo tanto antiapoptóticos. Esto produce el bloqueo de la proteína pro-apoptótica Bax y la inhibición de la liberación de citocromo c desde la mitocondria. Otros miembros de la familia Bcl-2, como Bcl-XS, Bax y Bid actúan promoviendo la liberación de citocromo c desde la mitocondria (Shi, Y., 2004). La apoptosis también puede producirse por estrés del retículo endoplasmático. Se ha

demostrado que el estrés del retículo, producido por alteración en la homeostasis del calcio o la acumulación de proteínas conduce a la activación de la caspasa 12 (Nakagawa, T., 2000), de ahí la importancia que tiene la concentración de calcio ( $[Ca^{+2}]$ ) en la regulación de la apoptosis (Ahmed, K., 2007).

Otra proteína que tiene un papel importante en la apoptosis es p53. La proteína p53 es un factor de transcripción que activa un número de genes cuya función en la célula responde a la estimulación tanto de factores pro-apoptóticos (Bax) como de miembros de la familia de Bcl-2 (Roos, W.P., 2006). Además, p53 estimula una amplia gama de señales que inducen la apoptosis de la célula a través de las dos vías posibles: la intrínseca y la extrínseca (Hofseth, L.J., 2004).

### **2.3.2 Vía extrínseca**

La vía extrínseca de apoptosis comienza cuando el TNF (factor de necrosis tumoral) y otros miembros similares como FasL, se unen a su receptor produciendo una trimerización del receptor y el reclutamiento de un complejo que contiene proteínas adaptadoras. Estas proteínas adaptadoras permiten la unión de la caspasa 8 favoreciendo su autoactivación. Una vez activa, la caspasa 8 puede activar a otras caspasas posteriores, iniciando de esta manera una cascada de caspasas que conduce a la muerte celular (Hengartner, M., 2000). Además, la caspasa 8 puede también activar a Bid e inducir apoptosis (Li, H., 1998) por activación de la caspasa 9, amplificando aún más la cascada de caspasas que se inició por la activación directa de la caspasa 8 mediante los receptores implicados en la muerte celular. TNF-R1 puede, aparte de conducir a la apoptosis, activar la vía de señalización dependiente del factor nuclear kappa-B (NF-kappa-B), que conduce a la supervivencia de la célula. EL NF-kappa-B es un factor que en situación normal se encuentra en el citoplasma de las células en estado inactivo debido a su unión con la proteína inhibidora Ikappa-B. La activación del receptor de TNF produce la fosforilación y degradación de Ikappa-B liberándose el NF-kappa-B que se transloca al núcleo activando distintos genes entre los que se incluyen inhibidores de caspasas. Por lo tanto, el factor nuclear kappa-B aumenta el proceso cancerígeno mediante la disminución de la apoptosis mediada por TNF (Azuma, M., 2003). La Jun quinasa N-terminal (JNK) juega un importante papel en la vía extrínseca de la apoptosis (Widmann, C., 1999; Weston, C.R., 2007). Su activación se requiere para la inducción de la apoptosis (Kyriakis, J.M., 1996; Osborn, M.T., 1996) y esta activación es necesaria para la degradación de Bid, para el estrés inducido en la mitocondria por el citocromo c y para la apoptosis mediada por el camino mitocondrial de la caspasa 9 (Lauricella, M., 2006).



**Figura 16:** Principales vías de señalización que conducen a la muerte o supervivencia celular. Imagen tomada de: García, M., Vecino, E. Vías de señalización intracelular que conducen a la apoptosis de las células de la retina. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*; 78:7, 2003.

## 2.4 VÍAS DE SUPERVIVENCIA CELULAR

Una de las principales vías de señalización intracelular que promueve la supervivencia de la célula comienza en la enzima fosfoinositido-3-quinasa (PI3K) que se activa por factores de crecimiento. Otra cascada de señalización que conduce a la supervivencia celular es la vía de MAPK (proteín quinasa activadas por mitógenos). El mecanismo mediante el cual esta vía inhibe la apoptosis implica la fosforilación y activación por la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK) de la proteín quinasa denominada quinasa ribosómica (RSK). Tanto RSK como PI3K activan directamente AKT (Janjetovic, K., 2011) que puede bloquear directamente la activación de las caspasas mediante la fosforilación de la caspasa 9.

Investigaciones recientes apuntan a una gran cantidad de derivados orgánicos implicados en procesos de muerte y/o supervivencia celular (Feng, Y., 2009; Shi, Y., 2010; Zhang, Y., 2010; Hueso-Falcón, I., 2010; Li, J., 2010; Fenton, T.R., 2011).

### **3. EL CICLO CELULAR**

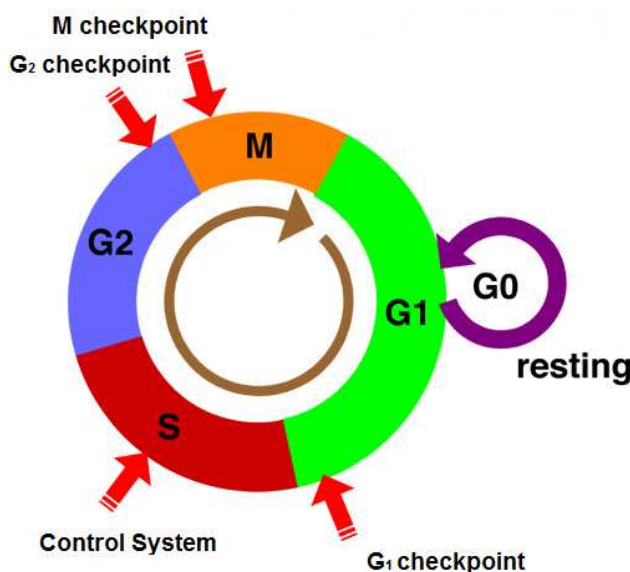
El ciclo celular es un conjunto ordenado y repetitivo de eventos que conducen al crecimiento de la célula y a la división en dos células hijas.

#### **3.1 FASES DEL CICLO CELULAR**

Se pueden diferenciar dos estados: estado de *no división o interfase*, en el cual la célula realiza sus funciones específicas y, si está destinada a avanzar a la división celular, comienza por realizar la duplicación de su DNA; y estado de *división*, llamado *fase M*. La interfase, es el período comprendido entre divisiones celulares. Es la fase más larga del ciclo celular, ocupando casi el 95 % del ciclo, transcurre entre dos mitosis y comprende tres etapas:

- *Fase G<sub>1</sub>*: es la primera fase del ciclo celular, en la que existe crecimiento celular con síntesis de proteínas y de RNA. Es el período que transcurre entre el fin de una mitosis y el inicio de la síntesis de DNA. Tiene una duración de entre 6 y 12 horas y, durante este tiempo, la célula dobla su tamaño y masa debido a la continua síntesis de todos sus componentes como resultado de la expresión de los genes que codifican las proteínas responsables de su fenotipo particular. Existe un punto de control llamado "*punto de restricción R*".
- *Fase S*: es la segunda fase del ciclo celular, en la que se produce la replicación o síntesis del DNA. Como resultado cada cromosoma se duplica y se forman dos cromátidas idénticas. Con la duplicación del DNA, el núcleo contiene el doble de proteínas nucleares y de DNA que al principio. Tiene una duración de unas 6-8 horas.
- *Fase G<sub>2</sub>*: es la tercera fase del ciclo celular, en la que la célula se prepara para la mitosis. Al final de este período se observan al microscopio cambios en la estructura celular que indican el principio de la división celular. Tiene una duración de entre 3 y 4 horas y termina cuando los cromosomas empiezan a condensarse al inicio de la mitosis. Existe un punto de control llamado "*punto de control G<sub>2</sub>-M*".

Durante la *fase M* se produce la división del núcleo e incluye 4 subfases distintas: *profase*, *metafase*, *anafase* y *telofase*. La mitosis culmina en la *citocinesis*, es decir, la división del citoplasma llevando a la formación de dos células nuevas. En esta fase se encuentra el *punto de control M*, que comprueba la correcta alineación de todos los cromosomas. Tiene una duración de 1 hora.



**Figura 17:** Fases del ciclo celular y puntos de control en cada fase. Imagen tomada de: Nugochi, E. The cell cycle and checkpoint controls: toward understanding of genome maintenance mechanisms. *Department of Biochemistry & Molecular Biology*. Drexel University College of Medicine, 2008.

Además de estas 4 fases típicas de las células en proliferación, existe una quinta fase denominada  $G_0$  en la que se encuentran las células en quiescencia, células no proliferativas que han abandonado el ciclo celular activo (Vermeulen, K., 2003; Stein, G.S., 2004). En esta fase, la célula mantiene una actividad basal de síntesis de RNA y proteínas necesaria para el adecuado recambio molecular.

La muerte celular puede iniciarse en el tercio final de  $G_1$  para impedir que una célula dañada ingrese a la fase de síntesis de manera que las mutaciones no se reproduzcan durante la replicación del DNA y en la fase  $G_2$  para impedir que las células que no hayan llegado a la madurez entren en mitosis (Mathews, C.K., 2003).

### 3.2 REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR

El ciclo celular va a estar regulado por dos familias de proteínas: las *ciclinas* y las *quinasas dependientes de ciclinas (CDKs)* (Vermeulen, K., 2003; Stein, G.S., 2004). Las etapas del ciclo celular están reguladas mediante cascadas cíclicas de fosforilaciones y desfosforilaciones de proteínas clave. Las proteínas encargadas de llevar a cabo el correcto grado de fosforilación van a ser las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs), aunque, para ello, necesitan estar controladas por otras proteínas, las ciclinas (Shah, M.A., 2006). Las CDKs, como su nombre indica, son dependientes de ciclinas para su actividad y, a menos que estén fuertemente unidos a una ciclina, no tienen actividad proteín quinasas. Hay 4 tipos de ciclinas que se unen a las CDKs y actúan en fases específicas del ciclo celular: las *ciclinas D* (D1, D2, D3), que actúan en la fase  $G_1$  del ciclo; las *ciclinas E* (E1, E2), que actúan al final de la fase  $G_1$  y en la intersección de  $G_1/S$ ; las *ciclinas A* (A1, A2), que actúan en la fase S y principio de la fase  $G_2$ ; y

las *ciclinas B* (B1, B2), que actúan en la fase G<sub>2</sub>. Cada una de estas ciclinas se une preferentemente a una o dos CDKs concretas. Así, las ciclinas D se unen a las CDKs 4 y 6, las ciclinas E se unen a CDK2, las ciclinas A se unen a CDK2 y a CDK1 y las ciclinas B se unen a CDK1.

Estudios recientes están viendo en la inhibición de los mecanismos de CDKs una posible diana en la lucha contra el cáncer (Sharma, P.S., 2008; Díaz-Padilla, I., 2009; Brasca, M.G., 2010; Caridha, D., 2010; Yenogunda, V.M., 2011), ya que determinadas células tumorales pueden sufrir un proceso endocíclico para escapar de la presión o de la resistencia a fármacos al salir de la fase mitótica del ciclo celular (Puig, P.E., 2008).

#### **4. LAS QUINASAS**

Las proteínas quinasas son una familia de más de 518 proteínas que codifican el genoma humano (Torkamani, A., 2009) y se pueden dividir en unos 20 grupos diferentes en base a sus características estructurales. Las proteínas quinasas están implicadas en multitud de procesos: en los mecanismos de señalización intracelular que regulan el crecimiento, en el desarrollo celular, en la homeostasis celular, en la migración celular... aunque pueden ser desreguladas por multitud de mecanismos contribuyendo a la iniciación del cáncer (Ruzzene, M., 2010; Roos, F.C., 2011).

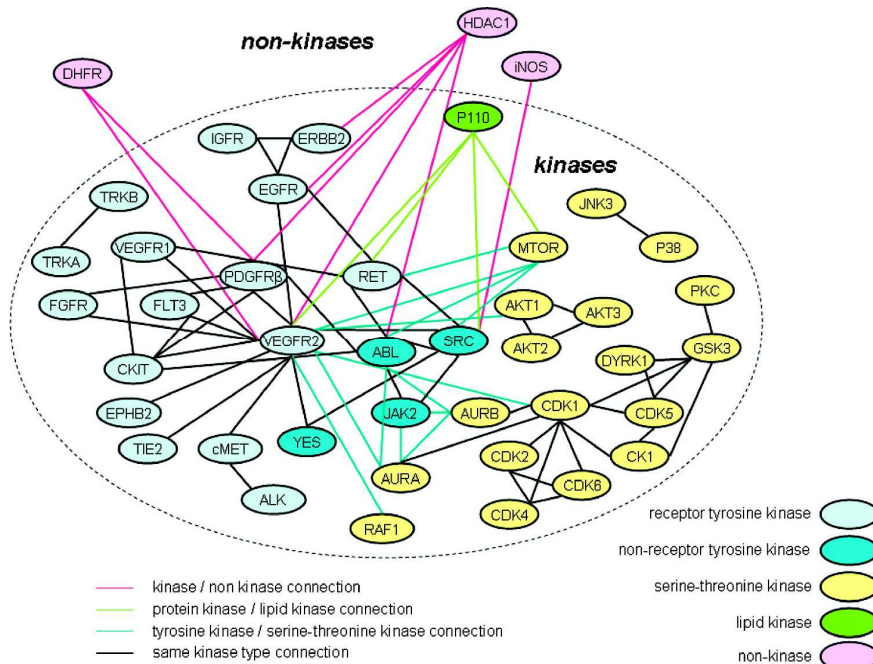
En la actualidad, la investigación de inhibidores de proteínas quinasas en el tratamiento del cáncer es una interesante vía de acción y, en la industria farmacéutica la identificación de la multiactividad específica de estos inhibidores, así como sus combinaciones y conexiones, es un campo de gran interés para conocer hasta qué punto actúan en la modulación del cáncer (Morphy, R., 2010; Sanmartín, C., 2011).

Una de las quinasas más importantes en el desarrollo y crecimiento tumoral son las *quinasas Aurora*. Son una familia de serín/treonín quinasas compuesta por 3 miembros: *auroras A, B y C* (Coumar, M.S., 2008). Las auroras A y B son vitales para el mecanismo mitótico, ya que aseguran la correcta unión cromosómica, la formación del huso y la citocinesis. La función de aurora C está menos estudiada. La sobreexpresión en auroras A y B se ha observado en varios tipos de tumores (Qi, G., 2010; Lei, Y., 2010; Lassus, H., 2010).

La *quinasa AKT*, también llamada *proteína quinasa B*, tiene un papel principal en el cáncer, ya que pertenece a un mecanismo de señalización implicado en la tumorigénesis, en el cual se encuentran cascadas de quinasas muy importantes como la *fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K)*. Además, es mediadora en un gran número de funciones celulares: desde el control de la



proliferación celular hasta la angiogénesis (Sartelet, H., 2008; Memmott, R.M., 2009; Bertoni, E., 2009; Liu, P., 2009; Huynh, N., 2010; Qi, X., 2010).



**Figura 18:** Multiactividad de los distintos tipos de quinasas. Imagen tomada de: Morphy, R. Selectively nonselective kinase inhibition: Striking the right balance. *Journal of Medicinal Chemistry*; 53: 1413-1437, 2010.

La cascada de las *proteín quinasas activadas por mitógenos (MAPK)* se clasifican dentro de la familia de serín/treonín quinasas y son proteínas clave en los mecanismos de señalización intracelular que regulan varias funciones celulares como la proliferación celular, la regulación del ciclo celular, la angiogénesis, la supervivencia y la migración celular (Cuevas, B.D., 2007; Boutros, T., 2008; Friday, B.B., 2008; Mebratu, Y., 2009). Esta cascada se caracteriza como un mecanismo de señalización lineal iniciado por los receptores tirosín quinasas en la superficie celular y completado con la regulación de la transcripción génica en el núcleo dirigida por la *quinasa regulada por señal la extracelular (ERK)*. Dentro de esta familia de *MAPK* se localiza también la *Jun quinasa N-terminal 2 (JNK2)*, implicada en la oncogénesis como mediadora pro-tumoral (Waetzig, V., 2009) y la *quinasa p38 MAPK*, implicada en vías de señalización pro-apoptóticas mediante la regulación de Bax (Chang, C.W., 2009).

La familia de *proteín quinasas C (PKC)* son una familia de serín/treonín quinasas (Ali, A.S., 2009) formadas por al menos 12 isoenzimas. Tienen un papel fundamental en la proliferación celular, en la diferenciación (Di Giacomo, V., 2010), en la angiogénesis y en la apoptosis (Lee, H.G., 2010; Chen, C.J., 2010).

La familia *Abl de tirosín quinasas no receptores* está formada por dos proteínas, *c-Abl* y *Arg*. Ambas se localizan en la membrana plasmática y el citoplasma y, *c-Abl*, también se localiza en el núcleo (Sirvent, A., 2008). La activación de *c-Abl* en el núcleo induce apoptosis, mientras que

su activación en el citoplasma y/o membrana plasmática promueve la proliferación y migración celular (Sirvent, A., 2008). Las quinasas Abl están implicadas fundamentalmente en leucemia (Kim, H.P., 2009; Traulsen, A., 2010) y en algunos casos de cáncer de mama (Srinivassan, D., 2006, 2008). Además, el modo de activación de Abl en ambos tipos tumorales es distinto, ya que en mama c-Abl y Arg son activadas por otras quinasas (EGFR, ErbB2/Her2, IGF-1R y SRC), mientras en leucemia son activadas por translocación cromosómica (Srinivassan, D., 2008).

Otra familia de quinasas implicada en el desarrollo y progresión de muchos procesos cancerígenos es la formada por los *receptores de tirosín quinasa ErbB* (Sahin, O., 2009). En ella se incluyen cuatro receptores: *Her1 (ErbB-1)* o *receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR)*, *Her2 (ErbB-2)*, *Her3 (ErbB-3)* y *Her4 (ErbB-4)*. Estos receptores, constan de 13 ligandos polipeptídicos compartiendo un dominio común EGF (Citri, A., 2006). Se localizan en la membrana plasmática, están compuestos de un dominio extracelular de unión al ligando, un segmento lipofílico transmembrana y un dominio intracelular con actividad tirosín quinasa (TK). Los receptores de la familia ErbB se pueden activar por homo- o heterodimerización. La activación del dominio TK del receptor es el suceso clave que inicia la cascada de señales de transducción intracelular, tales como Ras/Raf/MAPK o PI3K/AKT. Las quinasas ErbB van a regular la proliferación, la diferenciación y la supervivencia celular, así como la angiogénesis (Park, D., 2010).

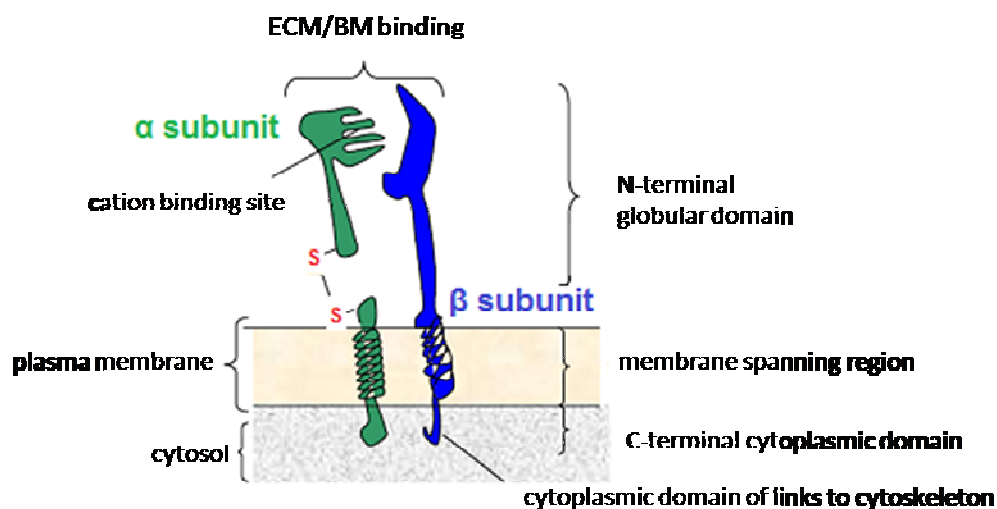
Además de estas quinasas hay una gran cantidad de quinasas implicadas en diferentes tipos de cáncer. Entre estas quinasas implicadas en procesos cancerígenos destacan: las *caseín quinasas* (Ahmad, K.A., 2007; Hanif, I.M., 2009, 2010; Ruzzene, M., 2010), las *proteín quinasas Raf* (Beshir, A.B., 2010), dentro de las cuales se encuentra la *quinasa CRAF* (Heidorn, S.J., 2010), el *receptor 1 del factor de crecimiento fibroblástico (FGFR1)* (Knights, V., 2010), el *receptor del factor de crecimiento insulínico 1 (IGF1R)* (Blume, S.W., 2010; Schayeck, H., 2010; Singh, S.K., 2010), el *receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR)* (Gehmert, S., 2010; Huh, W.K., 2010), la *glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3)* (Ban, J.O., 2010; Deming, D., 2010) y el *receptor que contiene insertado el dominio de quinasa (KDR)* (Seto, T., 2006).

## **5. LAS INTEGRINAS**

### **5.1 DEFINICIÓN Y PRINCIPALES FUNCIONES**

Las integrinas son una gran familia de receptores heterodiméricos formados por una subunidad  $\alpha$  y una subunidad  $\beta$ . En mamíferos, se han encontrado hasta 24 receptores distintos con 8 subunidades  $\beta$  y 18 subunidades  $\alpha$  diferentes (Prowse, A.B.J., 2011). Cada subunidad se

compone de un gran dominio extracelular N-terminal y un corto fragmento citoplasmático C-terminal (Hynes, R.O., 2002).

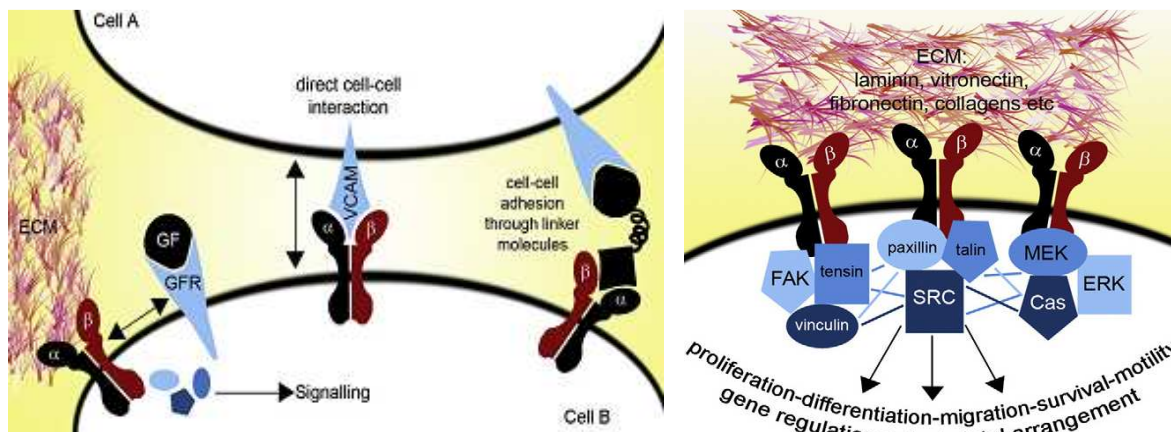


**Figura 19:** Estructura de las integrinas. Imagen tomada de: Brooks, S.A., Lomax-Browne, H.J., Carter, T.M., Kinch, C.E., Hall, D.M.S. Molecular interactions in cancer cell metastasis. *Acta Histochemica*; 112: 3-25, 2010.

La subunidad  $\beta$  está unida intracelularmente al citoesqueleto y está implicada en la transducción de las señales intracelulares. La dimerización de las señales de las integrinas es catión-dependiente y requiere la presencia de las 2 subunidades para que se pueda llevar a cabo (Brooks, S.A., 2010).

Las integrinas se unen a la *membrana basal* (BM) y a la *membrana extracelular* (ECM) a través de interacciones con una gran variedad de componentes como colágeno, laminina, fibronectina, vitronectina... También se asocian con receptores de la superficie de otras células mediante interacciones directas con las proteínas de la superficie, dando lugar a interacciones directas célula-célula (Humphries, J.D., 2006; Docheva, D., 2007; Bennett, J.S., 2009).

Las rutas de señalización de las integrinas afectan al destino de la célula. Las integrinas están implicadas en múltiples rutas de señalización así como en el control de un gran número de funciones celulares (Berrier, A.L., 2007). Los receptores de integrinas, a través de uniones con la matriz extracelular, generan grupos de integrinas heterodiméricas llamados *sitios de adhesión focal*. El agrupamiento de integrinas ocurre después de su unión a la membrana extracelular promoviendo asociaciones laterales con otros receptores de la superficie celular incrementando en el citoplasma la concentración de determinadas proteínas que intervienen en la señalización celular, como MEK, ERK, FAK, SRC... (Li, J., 2007; Pera, M.F., 2010).

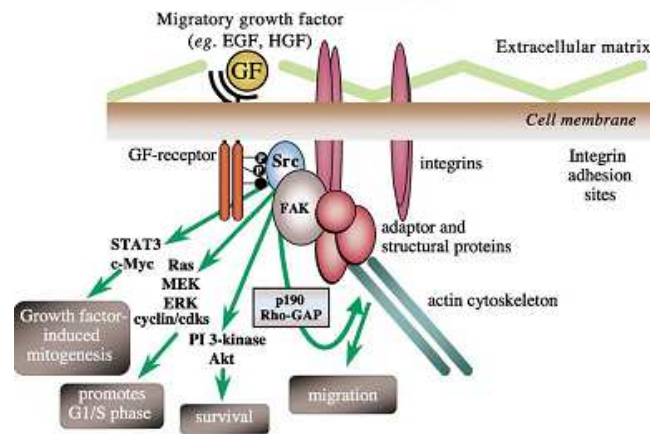


**Figura 20:** Principales interacciones y funciones de las integrinas. Imágenes tomadas de: Prowse, A.B.J., Chong, F., Gray, P.P., Munro, T.P. Stem cell integrins: implications for ex-vivo culture and cellular therapies. *Stem Cell Research*; 6: 1-12, 2011.

Muchas proteínas tienen un papel fundamental en la activación de determinadas integrinas y la expresión de las integrinas tiene un alto impacto en un gran número de respuestas celulares. Están implicadas, por ejemplo, en la supervivencia celular, en la diferenciación, en la adhesión y movilidad celular, en la proliferación y en procesos de migración e invasión celular, siendo en muchos casos responsables del comportamiento metastático de las células (Prowse, A.B.J., 2011). Diversos estudios apuntan a que una parada en algunas de sus vías de señalización puede producir parada del ciclo celular y apoptosis (Gilmore, A.P., 2005); y la expresión alterada de las integrinas es una característica común en muchos tipos de cáncer como el de mama (David, M., 2011), próstata (Losada-Barragán, M., 2010), hueso (Schneider, J.G., 2011), colon y melanomas (Katz, B.Z., 2010).

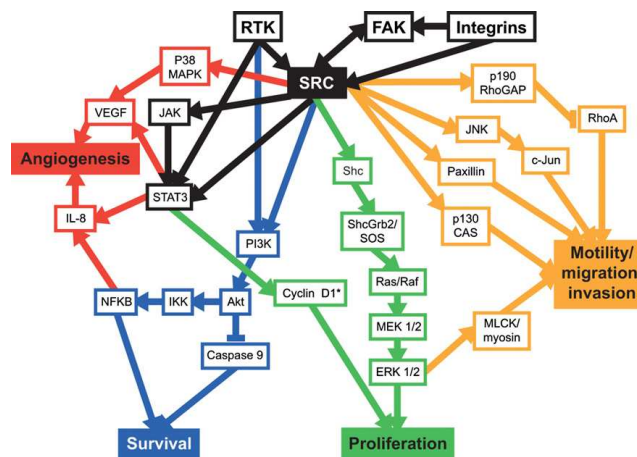
## 5.2 FAK, SRC Y SU RELACIÓN CON LAS INTEGRINAS

La metástasis en células tumorales requiere que se produzcan una serie de pasos: proliferación, migración, invasión... Todos estos procesos están fuertemente controlados por proteínas con actividad tirosin quinasa. Dentro de esta familia de proteínas tirosin quinasa se encuentran FAK (Focal Adhesion Kinase) y SRC (De Heer, P., 2008). FAK y SRC se localizan en los sitios de adhesión focal que poseen las integrinas y van a actuar como intermediarios en numerosas vías de señalización regulando la movilidad celular (Webb, D.J., 2002), así como el comportamiento, el crecimiento, la supervivencia y la migración celular (Frame, M.C., 2002). Estas vías incluyen factores de crecimiento, estímulos externos y señalizaciones bioquímicas a través de interacciones entre integrinas y proteínas de la matriz extracelular (Mittra, S.K., 2005).



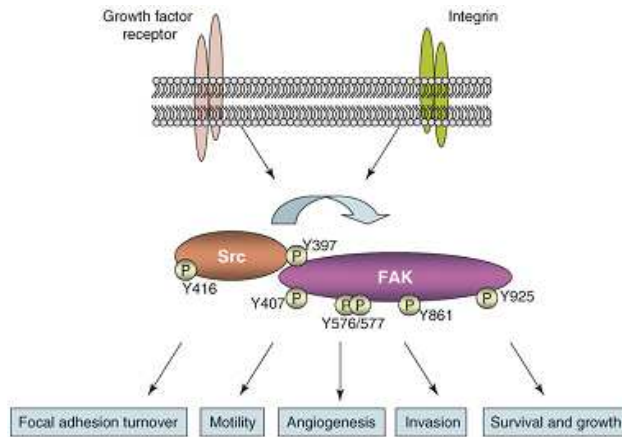
**Figura 21:** Principales funciones en las que están implicadas FAK y SRC. Imagen tomada de: Frame, M.C. SRC in cancer: deregulation and consequences for cell behavior. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1602: 114-130, 2002.

Las integrinas y los receptores del factor de crecimiento localizados en la membrana celular van a iniciar las vías de señalización a través de FAK y SRC, activando multitud de quinasas distintas implicadas en vías de señalización diferentes.



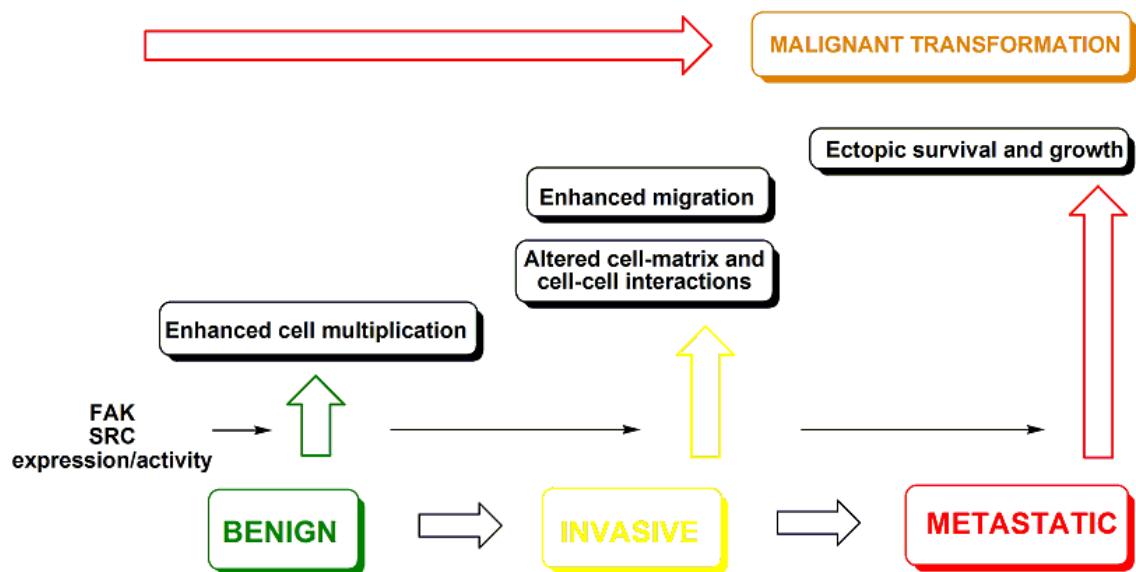
**Figura 22:** Contribución de FAK y SRC en la señalización de la progresión tumoral. Imagen tomada de: Ahluwalia, M.S., de Groot, J., Liu, W.M., Gladson, C.D. Targeting SRC in glioblastoma tumors and brain metastases: rationale and preclinical studies. *Cancer Letters*; 298: 139-149, 2010.

FAK contiene un dominio N-terminal y regiones ricas en prolina mientras que SRC posee dos dominios SH2 y SH3. Todos estos dominios van a facilitar las interacciones proteína-proteína activando las vías de señalización. SRC se activa por autofosforilación del residuo de tirosina 416 (Y416), mientras que FAK se activa por autofosforilación en su residuo de tirosina 397 (Y397). Cuando FAK está fosforilada en Y397, este residuo tiene una gran afinidad por el dominio SH2 de SRC y se une a él fuertemente (figura 23). La unión entre Y397 y SH2 trae consigo que SRC pueda fosforilar un gran número de residuos de tirosina en FAK (Y407, Y577, Y861, Y925...). Todos estos residuos fosforilados van a actuar como lugares de unión de determinados intermediarios en las rutas de señalización (Brunton, V.G., 2008).



**Figura 23:** Activación de FAK y SRC. Imagen tomada de: Brunton, V.G., Frame, M.C. SRC and focal adhesion kinase as therapeutic targets in cancer. *Current Opinion in Pharmacology*; 8: 427-432, 2008.

Una actividad alterada en las quinasas FAK y SRC puede traer consigo perturbaciones en la actividad celular y en consecuencia cáncer, afectando a la supervivencia, a la migración y a la invasión celular (Frame, M.C., 2002; Summy, J.M., 2003; Siesser, P.M., 2006; Brunton, V.G., 2008; De Heer, P., 2008; Saad, F., 2010; Ahluwalia, M.S., 2010).



**Figura 24:** Posibles consecuencias fenotípicas de la elevada expresión de FAK y SRC en la actividad celular durante las distintas etapas de la progresión de un tumor. Imagen tomada de: Frame, M.C. Src in cancer: deregulation and consequences for cell behavior. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1602: 114-130, 2002.

Para que las células tumorales puedan llegar a producir metástasis en tejidos sanos, tienen que producirse una serie de cambios en su fenotipo, incluyendo cambios en la matriz celular, en las adhesiones célula-célula y en la capacidad de migración e invasión. Hay evidencias claras de que la actividad de FAK y SRC está muy ligada a estos procesos y un aumento en la expresión de estas quinasas se asocia con fenotipos más invasivos y agresivos (Serrels, A., 2006; Jallal, H., 2007; Brunton, V.G., 2008).

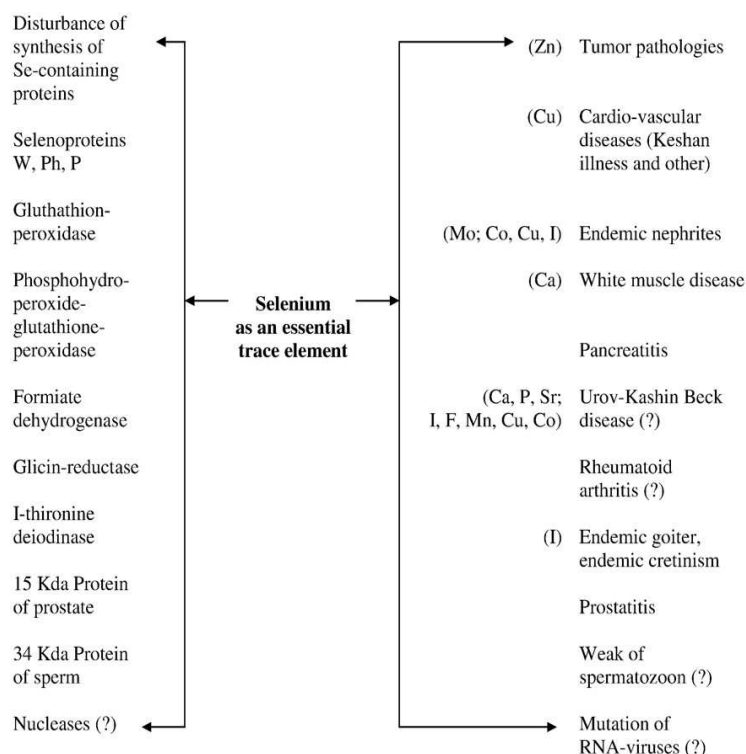
## **6. SELENIO Y CÁNCER**

### **6.1 EL SELENIO, UN ELEMENTO TRAZA NECESARIO PARA EL ORGANISMO**

El interés en el uso de compuestos orgánicos de selenio en bioquímica comenzó con el hecho de que dichos compuestos son mucho menos tóxicos que las especies inorgánicas. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha clasificado 19 elementos traza, entre los que se encuentra el selenio. Son micronutrientes esenciales para la vida, pues son catalizadores y reguladores de procesos vitales, pero su acción favorable sobre mecanismos vitales para la supervivencia sólo se da en concentraciones definidas: bajos niveles pueden ser causa de diversas patologías mientras que una cantidad excesiva puede provocar efectos tóxicos. El selenio está dentro de los elementos que se precisan en cantidades inferiores a 1 mg diario. Las cantidades recomendadas en la dieta están entre 35-70 µg/día, según el National Institute of Health, NIH. Como sucede con otros elementos de gran potencia, el selenio es tóxico a dosis supranutricionales y la principal vía por la que podemos suministrar selenio al organismo es a través de la dieta (SmrKolja, P., 2010) o mediante suplementos nutricionales (Pyrzynska, K., 2009).

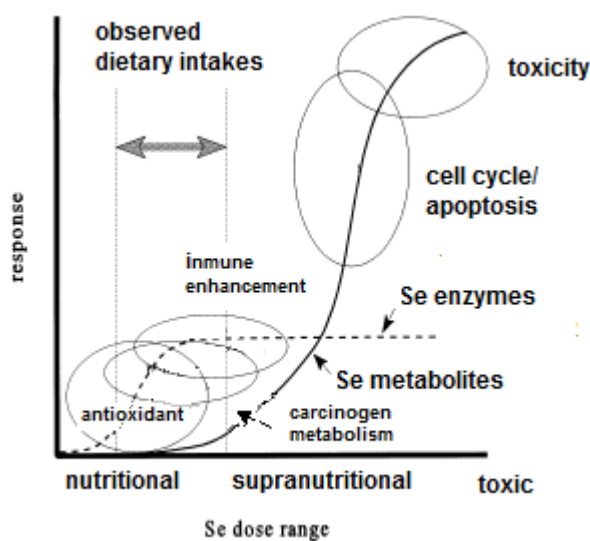
En teoría, la deficiencia de selenio no debería ser un problema, ya que lo encontramos en alimentos tan usuales como cereales, cebolla, ajos, huevos, tomates carne, marisco..., pero la sobreexplotación de los campos impide que las tierras contengan los minerales en la cantidad adecuada y que éstos pasen a formar parte de la dieta (May, T.W., 2000; Yadav, S., 2007; Pedrero, Z., 2009).

Son numerosos los problemas asociados a la deficiencia de este elemento: enfermedades cardiovasculares, hipertensión arterial, problemas en las articulaciones y en los músculos, patologías tumorales... (figura 25) (Ermakov, V., 2010), aunque buenos niveles de selenio favorecen la formación de anticuerpos mejorando el sistema inmune (Rayman, M.P., 2000), actúan como antioxidante protegiendo el material genético contra los radicales libres (Tapiero, H., 2003; Dodig, S., 2004; Wojewoda, M., 2010), ayudan a controlar las arritmias cardíacas (Pedrero, Z., 2009; Lubos, E., 2010), limitan la carga corporal de metales tóxicos como mercurio y plomo, mejoran el estado de ánimo, la ansiedad y los ataques epilépticos (Cao, S., 2004) y poseen propiedades quimiopreventivas en multitud de tipos de cáncer (Shamberger, R.J., 1969; Spallholz, E., 1994; El-Bayoumi, K., 2001; Rayman, M.P., 2000, 2005; Shen, S., 2006; Zeng, H., 2008; Nasar, A., 2010; Steevens, J., 2010).



**Figura 25:** Consecuencias en el organismo derivadas de la deficiencia de selenio (los elementos químicos relacionados con el metabolismo del selenio aparecen entre paréntesis). Imagen tomada de: Ermakov, V., Jovanović, L. Selenium deficiency as a consequence of human activity and its correction. *Journal of Geochemical Exploration*; 117: 200-205, 2010.

Este elemento pasó hace aproximadamente 40 años de considerarse un oligoelemento altamente tóxico a clasificarlo de esencial al comprobar en estudios geográficos que las zonas con menor incidencia de cáncer correspondían a regiones con altos niveles de selenio en el suelo (Shamberger, R.J., 1969; Schrauzer, G.N., 1971).



**Figura 26:** Efectos del selenio en el organismo dependiendo de la dosis. Imagen tomada de: Combs, G.F., Gray, W.P. Chemopreventive agents: selenium. *Pharmacology & Therapeutics*; 79: 179-192, 1998.

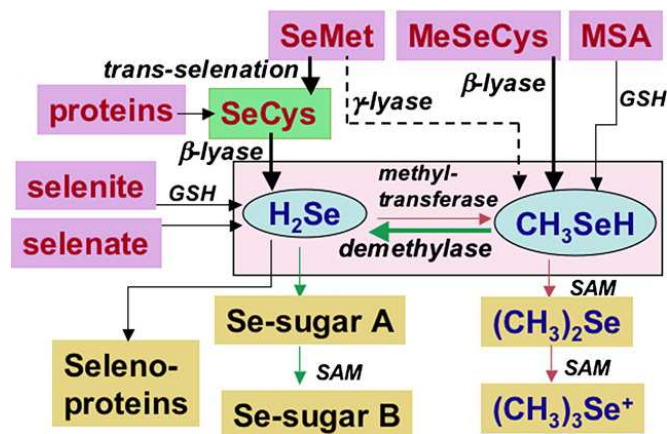


Desde entonces, un gran número de evidencias indican que el selenio juega un papel muy importante en la prevención del cáncer (Whanger, P.D., 2004; Combs, G.F., 2005; Chen, T., 2008; Tabassum, A., 2010). Diversos estudios epidemiológicos apuntan a una relación entre los factores potenciales de riesgo de cáncer y algunos elementos traza y, el selenio, ha recibido una especial atención, ya que existe una relación clara entre un bajo nivel de selenio en sangre y cáncer (Siddiqui, M.K.J., 2006; Lu, H., 2006; Appleton, J.D., 2006; Peters, U., 2007; Chen, Y., 2007; Amaral, A.F.S., 2010).

La efectividad de los compuestos orgánicos de selenio como agentes quimiopreventivos parece que está relacionada con el poder antioxidante de la enzima dependiente de selenio glutatión peroxidasa (Rayman, M.P., 2005; Jackson, M.I., 2008) y con el papel que juegan en la regulación del ciclo celular, ya que estimulan la apoptosis (Sanmartín, C., 2005, 2008; Zhou, Y., 2009), inhiben la migración de células tumorales evitando que invadan otros tejidos sanos (Zeng, H., 2008) e inhiben la angiogénesis (Rayman, M.P., 2005; Davis, C.D., 2010).

## 6.2 EL SELENIO Y SU METABOLISMO

Debido a que el selenio lleva a cabo distintos efectos dependiendo de la concentración y de la forma química en la que se encuentre, es importante conocer el mecanismo bioquímico de transformación del selenio en el ser humano (Letavayová, L., 2006; Suzuki, K.T., 2007, 2008; Zeng, H., 2008).



**Figura 27:** Metabolismo del selenio. Imagen tomada de: Suzuki, K.T., Kurasaki, K., Suzuki, N. Selenocysteine β-lyase and methylselenol demethylase in the metabolism of Se-methylated selenocompounds into selenide. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1770: 1053-1061, 2007.

El selenio se puede clasificar en dos formas químicas: selenio orgánico y selenio inorgánico (Cemell, E., 2006). Se ha comprobado que estas formas químicas tienen diferente biodisponibilidad, distintos mecanismos de acción quimiopreventiva y diferentes efectos tóxicos. Tanto las formas orgánicas, en las que el selenio se encuentra en un estado reducido (seleniuro: Se<sup>2-</sup>), como las inorgánicas, en las que el selenio se encuentra en forma oxidada

(selenito:  $\text{Se}^{4+}$ ; selenato:  $\text{Se}^{6+}$ ), se van a distribuir a lo largo de todo el cuerpo dando lugar a distintas rutas metabólicas (Abdulah, R., 2005; Gammelgaard, B., 2008). Las formas inorgánicas van a ser reducidas por el *glutati6n* (*GSH*) dando lugar a la generaci6n de *seleniuro de hidr6geno* ( $\text{H}_2\text{Se}$  o  $\text{HSe}^-$ ) y entrando directamente en la ruta metab6lica, a trav6s de la reducci6n llevada a cabo por tioles y reductasas NADPH-dependientes, v6a selenodigluti6n ( $\text{GSSeSG}$ ) (Letavayov6, L., 2006; Suzuki, K.T., 2008). El seleniuro de hidr6geno juega un papel principal en el metabolismo del selenio, ya que es un intermediario importante en la bios6ntesis de las *selenoprote6nas*, incorpor6ndose a ellas como *selenociste6na* (*SeCys*). Adem6s, puede sufrir procesos de metilaci6n para, posteriormente, excretarse bien como iones trimetilselenonio o selenoaz6cares en la orina, o como dimetilseleniuro en la respiraci6n (Meuillet, E., 2004). La *selenometionina* (*SeMet*) procedente de la ruptura de los cuerpos proteicos puede transformarse en selenociste6na (*SeCys*) mediante una trans-sulfuraci6n, dando lugar a la formaci6n de seleniuro de hidr6geno y continuando la ruta metab6lica. A su vez puede generar *metilselenol* ( $\text{CH}_3\text{SeH}$ ) mediante una reacci6n enzim6tica llevada a cabo por la enzima metionina- $\gamma$ -liasa (Suzuki, K.T., 2008; Brozmanov6, J., 2010). El metilselenol es un compuesto de gran importancia ya que parece que es necesario para la expresi6n de la actividad quimiopreventiva del selenio (Suzuki K.T., 2007; Brozmanov6, J., 2010). Es altamente reactivo y dif6cil de conseguir y hay que llegar a 6l a partir de precursores estables como pueden ser la *metilselenociste6na* (*MeSeCys*), anticarcinog6nica y antioxidante (Yamanoshita, O., 2007), el *6cido metilselen6nico* (*AMS*) o la selenometionina (*SeMet*), que mediante mecanismos end6genos dan lugar al metilselenol. El equilibrio entre el seleniuro de hidr6geno y el metilselenol depende de la actividad metilaci6n-desmetilaci6n y, por lo tanto, de ello depender6 la s6ntesis de selenoprote6nas o de selenoaz6cares, que posteriormente se excretar6n (Sanmartin, C., 2008).

De todos los metabolitos del selenio, se ha demostrado la actividad quimiopreventiva de cuatro de ellos:

- las selenoprote6nas
- el seleniuro de hidr6geno ( $\text{H}_2\text{Se}$  o  $\text{HSe}^-$ )
- el metilselenol ( $\text{CH}_3\text{SeH}$ )
- los compuestos inorg6nicos de selenito

### **6.3 LAS SELENOPROTE6NAS**

Las selenoprote6nas son todas aquellas prote6nas que incluyen en su estructura un residuo de selenociste6na (*SeCys*), el amino6cido n6mero 21, un an6logo de la ciste6na (*Cys*) que contiene un grupo selenol ( $\text{SeH}$ ) en lugar del grupo tiol ( $\text{SH}$ ). Se han identificado 25 selenoprote6nas de las m6s de 50 que pueden existir y se van a encontrar en las principales formas de vida: eucariotas, bacterias... La ruta general de s6ntesis de las selenoprote6nas se divide en 4 pasos

y en ellos están implicados 4 genes: selA, selB, selC y selD. En el primer paso el tRNA (selC) se hace cargo de la serina. SelA convierte esta serina en selenocisteína en el paso 2. Luego selD cede una molécula de selenio donador y el factor de translocación selB reconoce la selenocisteí-tRNA y lo libera a UGA (codón “stop” que codifica el aminoácido selenocisteína, SeCys) ya en el ribosoma (Burk, R.F., 1991; Böck, A., 1991; Müller, C., 2003; Fixsen, S.M., 2010).

Varias selenoproteínas tienen propiedades antioxidantes pero la función de muchas de ellas no se conoce bien todavía (Arthur, J.R., 2000; Beckett, G.J., 2005; Burk, R.F., 2005). Esta capacidad antioxidante es la responsable de la acción del selenio (Steinbrenner, H., 2009). El nivel de plasma y el polimorfismo genético de algunas de las selenoproteínas se ha asociado con el riesgo de padecer cáncer (Diwadkar-Navsariwala, V., 2004), debido a que pueden sufrir mutaciones en determinados genes. Además, están implicadas en el transporte de selenio en el organismo y éste puede formar quelatos con metales pesados (Amaral, A.F.S., 2010). Las selenoproteínas tienen un papel muy importante como agentes quimiopreventivos, especialmente en ciertos cánceres como: próstata, colon, hígado, pulmón (Ganther, H.E., 1999; El-Bayoumy, K., 2004; Brigelius-Flohé, R., 2008; Hatfield, D.L., 2009).

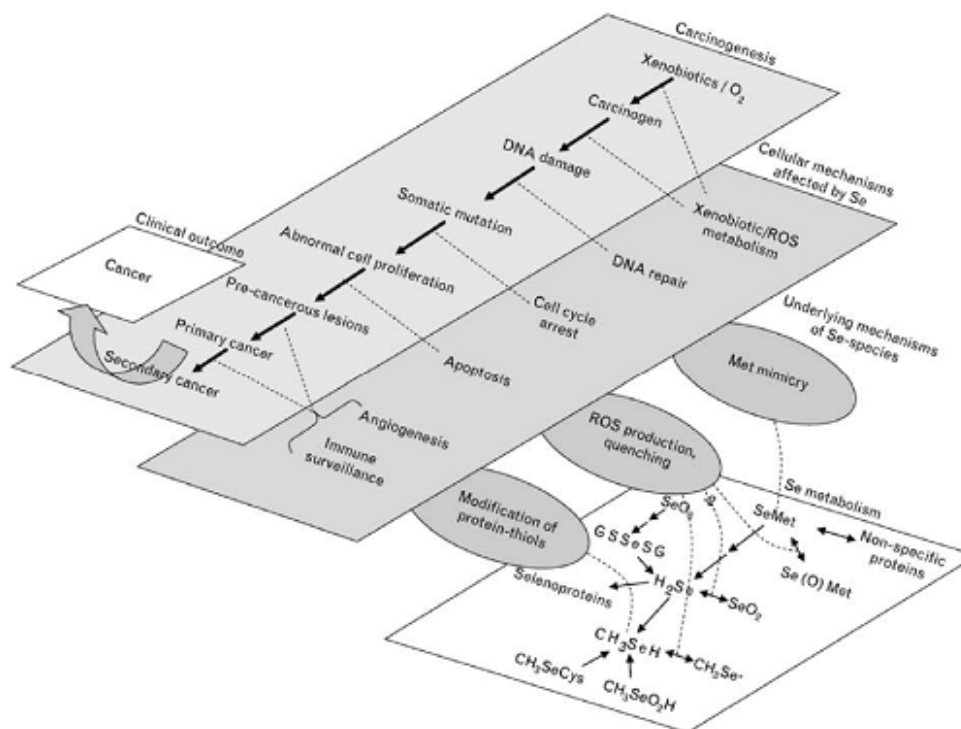
Pueden clasificarse en distintos grupos basándose en la localización de la selenocisteína en los polipéptidos de las selenoproteínas: en las *glutación peroxidasas (GPx)* la selenocisteína se localiza en la porción de N-terminal (Tapiero, H., 2003). La función fisiológica principal de las glutación peroxidasas es mantener unos niveles de peróxidos de hidrógeno apropiados en las células para que pueda disminuir la proporción de radicales libres. La *selenoproteína P (Se-P)* es la que posee un mayor contenido de selenio de todas las selenoproteínas identificadas hasta la fecha, ya que contiene 10 residuos de selenocisteína. Es la principal selenoproteína del plasma y aparece expresada en varios tejidos (células del endotelio arterial, células del endotelio hepático sinusoidal) actuando como antioxidante y transportadora de selenio (Burk, R.F., 2003). Las *tioredoxina reductasas (Trx-R)* se caracterizan por la presencia de una cisteína en uno de los C-terminales. Catalizan la reducción de proteínas disulfuro dando lugar a tioles y están implicadas en varios procesos vitales, como la síntesis de DNA y la regulación de la apoptosis (Tapiero, H., 2003; Schweizer, U., 2005). Esta familia de tioredoxina reductasas (Trx-R) es clave para la reducción del selenito, ya que en concentraciones altas puede resultar tóxico (Lu, J., 2009). La familia de las *yodotirosina deydinasas (ID)* se encargan de catalizar la eliminación de diferentes grupos yodo de las hormonas tiroideas, haciéndolas que se activen o inactiven (St Germain, D.L., 2009).

Hay también otras selenoproteínas que van a tener interés biológico: la *selenoproteína W (SelW)*, la *selenoproteína H (SelH)* posee genes implicados en la respuesta antioxidante (Panee, J., 2007) y se ha visto que determinados metales pesados pueden regular su potencial

de oxidación (Stoytcheva, Z.R., 2010), la *selenoproteína R (SeIR)*, la *selenoproteína N (SeIN)* y la *selenoproteína S (SeIS)*, también conocida como *VIMP*).

### 6.4 EL EFECTO QUIMIOPREVENTIVO DE LOS DERIVADOS DE SELENIO

Los diferentes metabolitos de selenio van a actuar en las distintas etapas del proceso carcinogénico, como se muestra en la figura 28.



**Figura 28:** Mecanismos celulares y moleculares de la carcinogénesis afectados por los metabolitos de selenio. Imagen tomada de: Jackson, M.I., Combs, G.F.J. Selenium and anticarcinogenesis: underlying mechanisms. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*; 11-718-756, 2008.

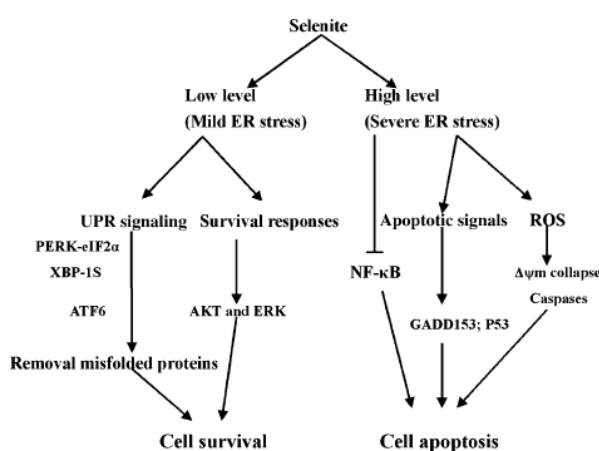
#### 6.4.1 Efectos sobre la apoptosis y el ciclo celular

##### A) Apoptosis y modulación de las caspasas

Algunos derivados de selenio, como por ejemplo 2-(4-metilfenil)-1,3-selenazol-4-ona, inhiben la proliferación e inducen apoptosis en la línea celular de cáncer de ovario SKOV3 y en la línea celular de leucemia mieloide aguda HL-60 mediante la activación de la caspasa-3 en la última línea celular (Anh, H.J., 2006). Estos resultados hacen pensar que el mecanismo de inducción apoptótica para las dos líneas celulares es diferente. El ácido metilselenínico (AMS) mejora la inducción de la apoptosis en la línea celular DU145, ya que este ácido y algunas quinasas amplifican la activación de la cascada de la caspasa-8 (Hu, H., 2005). Por otro lado, la selenometionina, en combinación con la metioninasa, induce la activación de las caspasas con pérdida de la adherencia en células de melanoma alterando su integridad (Kim, A., 2007) y,

precursores del metilselenol, como el metilselenocianato y la metilselenocisteína, inducen apoptosis en células tumorales endoteliales de mama. Esta apoptosis inducida por dichos precursores es dependiente de caspasas, mientras que la muerte celular inducida por el selenito es independiente de caspasas en células de cáncer de próstata y leucemia. El grupo metilselenol conduce a la parada en la etapa G<sub>1</sub> del ciclo celular y se sabe que tiene efectos inhibidores en las quinasas dependientes de ciclina y en la proteína quinasa C (Zhu, Z., 2002).

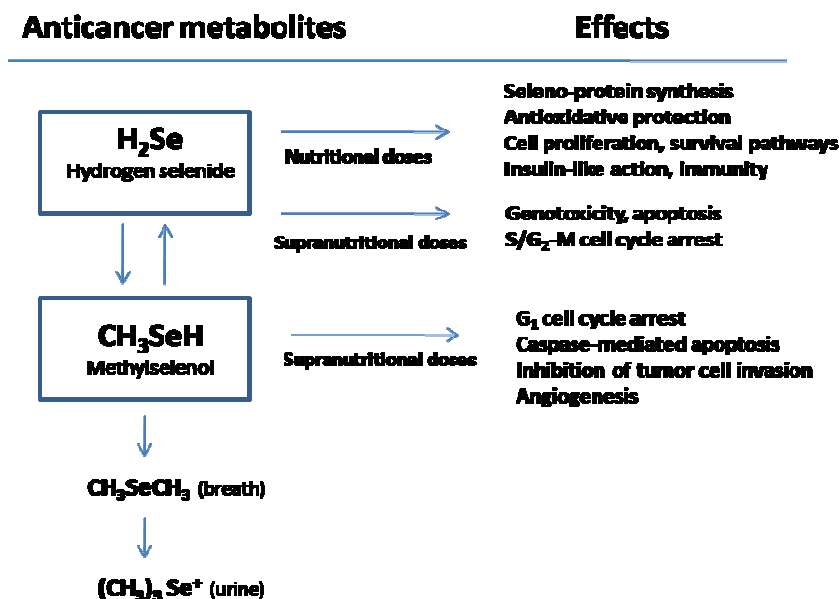
El selenito y el selenato inducen rápidamente la ruptura de las cadenas simples de DNA y actúan en las fases S y G<sub>2</sub> del ciclo celular conduciendo a la muerte celular por apoptosis (Jiang, C., 2002; Lü, J., 2005). Además, el selenito potencia el efecto de determinados agentes quimioterápicos como la doxorubicina, potenciando la apoptosis.



**Figura 29:** Efecto del selenito dependiendo de la concentración. Imagen tomada de: Guan, L., Han, B., Li, J., Li, Z., Huang, F., Yang, Y., Xu, C. Exposure of human leukemia NB4 cells to increasing concentrations of selenite switches the signaling from pro-survival to pro-apoptosis. *Annals of Hematology*; 88: 733-742, 2009.

Se ha comprobado que su toxicidad radica en que produce un estrés oxidativo en las células (Holmgren, A., 2006). Bajas concentraciones de selenito tienen un efecto quimiopreventivo en la línea celular de leucemia NB4. Por el contrario, concentraciones elevadas producen un efecto antitumoral directo (Guan, L., 2009), dando lugar a apoptosis mediada por caspasas.

Cuando los niveles de selenio en el organismo están dentro de los límites nutricionales, la acción del selenio en la proliferación celular se lleva a cabo a través del seleniuro de hidrógeno. Si el nivel de selenio es superior a la necesidad nutricional, el efecto se realiza mediante la reserva del seleniuro de hidrógeno y/o del metilselenol, lo que conlleva efectos diferentes sobre el ciclo celular y la apoptosis.



**Figura 30:** Efectos principales asociados al seleniuro de hidrógeno y al metilselenol a dosis nutricionales y supranutricionales. Imagen tomada de: Zeng, H., Combs, G.F. Selenium as an anticancer nutrient: roles in cell proliferation and tumor cell invasion. *The Journal of Nutritional Biochemistry*; 19: 1-7, 2008.

## B) Apoptosis y mitocondria

El dióxido de selenio y el selenito sódico han demostrado que modulan la apoptosis en células orales humanas (HSC-3) (Takahashi, M., 2005). Estos compuestos no producen ROS pero interfieren en el equilibrio redox de la mitocondria. Además, el selenito sódico promueve la formación de aniones superóxido que reducen los grupos tioles libres y, en células humanas de glioma inducen muerte celular, pérdida del potencial de membrana, degradación de proteínas y conducen a altos niveles de aniones superóxido produciendo daños en la mitocondria y mitofagia (Hu, H., 2006; Kim, E.H., 2007). Estudios han demostrado cómo determinadas proteínas pro-apoptóticas, como Bax (Strasser, A., 2005), son activadas y translocadas a la mitocondria por el selenito (Huang, F., 2009).

## C) Apoptosis y regulación de p53

La *proteína supresora de tumores, p53*, está frecuentemente asociada a la oncogénesis y es la encargada de asegurar la estabilidad genética (Olovnikov, I.A., 2009). La importancia de p53 radica en que su actividad se pierde en la gran mayoría de cánceres humanos (Royds, J.A., 2006). Los derivados de selenio también actúan a nivel de p53 (Goel, A., 2006). Derivados del selenofeno han demostrado que producen apoptosis a través de la activación de p53 dependiente del tiempo (Shiah, H.S., 2007), encontrándose una translocación de p53 del citosol a la mitocondria para un tratamiento con estos fármacos superior a 12 horas. Aunque una suplementación con selenito sódico o selenometionina protege a las células de la

citotoxicidad, restaura su nivel antioxidante y reduce la expresión de p53, lo que hace pensar que se produce un estrés oxidativo en la células (Erkekoglu, P., 2010).

La apoptosis tiene un papel fundamental en el mecanismo de supresión de tumores y la desregulación de este mecanismo de muerte celular puede conducir al desarrollo del cáncer (Hu, H., 2006; Li, G.X., 2007; Sanmartín, C., 2008). De hecho, la inducción de apoptosis en células tumorales es la base de muchas terapias contra el cáncer (Meiler, J., 2006) y derivados de selenio han demostrado que actúan regulando los mecanismos de apoptosis (Plano, D., 2007).

#### **6.4.2 Daño celular y reparación del DNA**

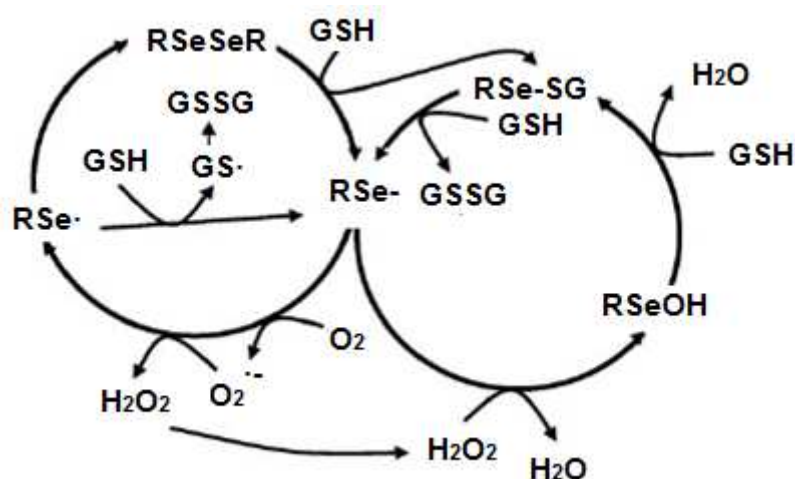
Es de sobra conocido que algunos selenocompuestos tienen el potencial de inducir daño en el DNA (Juang, S.H., 2007) y en la mayoría de los experimentos en los que aparece daño en el DNA se ha encontrado selenito sódico como principal fuente de selenio. La toxicidad de este compuesto está altamente influenciada por su metabolismo y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Un alto nivel de selenito induce daño en el DNA, en ROS, p53 y apoptosis dependiente e independiente de caspasas, mientras que un precursor del metilselenol, el ácido metilselenínico, induce apoptosis mediada por caspasas independientemente del estado de p53. Por otro lado, un precursor del selenito, el superóxido, induce daño en el DNA y la activación de p53 (Li, G.X., 2007). La célula tiene capacidad para reparar el DNA y la mayoría de las veces lo repara sin problema. El proceso de envejecimiento trae consigo daños celulares, aunque los elementos traza (entre ellos el selenio), como parte de una dieta equilibrada, tienen la capacidad de disminuir el daño celular debido a su poder antioxidante y a la capacidad de reparación del DNA (Méplan, C., 2010).

Varios compuestos han demostrado que previenen el daño del DNA. Estos compuestos son los llamados oxocompuestos y entre ellos destacan los selenatos, que pueden interaccionar con carcinógenos alquilados para así proteger el DNA de la alquilación (Hamilton, E.E., 2006). La exposición a arsénico inorgánico está asociada con el estrés oxidativo. Sin embargo, este estrés se puede prevenir con una concentración alta de selenio, ya que tiene efectos antioxidantes y reduce la toxicidad del arsénico formando un metabolito que contiene arsénico y selenio, el ión arseniuro de seleno-bis-(S-glutationil), previniendo también el daño en el DNA (Xue, W., 2010). Estudios realizados recientemente en organismos acuáticos, han demostrado que un tratamiento con selenio previene el estrés oxidativo y reduce el daño en el DNA acusado por una exposición alta con derivados de cobre (Trevisan, R., 2011).

### 6.4.3 Función antioxidante

Los derivados selenados están también implicados en la formación de ROS (Li, G.X., 2007). Se piensa que el estrés oxidativo mutagénico es un factor muy importante en la iniciación de la carcinogénesis humana, ya que las bases de DNA, ricas en electrones, son susceptibles al ataque electrófilo por ROS (Pelicano, H., 2004) produciendo daños genéticos, oncogenes mutantes y cambios epigenéticos que alteran su expresión y la expresión de fenotipos malignos. Algunas selenoproteínas ofrecen un mecanismo de protección antioxidante frente a la iniciación y propagación de la carcinogénesis por peróxidos o especies reactivas de oxígeno (Lü, J., 2005; Drake, E.N., 2006; El Heni, J., 2009).

En el ciclo redox, la forma activa es el selenol y se encarga de reducir los peróxidos de hidrógeno y los peróxidos orgánicos (Sharma, B.K., 2005). El selenol ( $RSe^-$ ) es oxidado hasta ácido metilselenínico ( $RSeOH$ ), el cual reacciona con el glutatión reducido (GSH) para formar el aducto sulfuro selenílico ( $RSe-SG$ ). Una segunda molécula de glutatión regenera la forma activa metilselenol ( $RSe^-$ ) al atacar el aducto  $RSe-SG$  formando el glutatión oxidado (GSSG). Por otro lado,  $RSe^-$  puede generar radicales libres  $O_2^{\bullet -}$  por oxidación de GSH (figura 31). Aunque  $O_2^{\bullet -}$  tiene una reactividad y una toxicidad baja, da lugar a la generación de productos secundarios con capacidad para oxidar. Una de las especies que genera es el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), que aunque no es tóxico, reacciona reduciendo iones metálicos y formando a su vez el radical hidroxilo ( $\bullet OH$ ). Estas especies sí que dañan directamente el DNA y son considerados las especies más importantes relacionadas con el daño del DNA (Letavayová, L., 2006). Esta vía de reducción está altamente conectada con la producción de especies reactivas de oxígeno, compuestos con un potencial anticarcinogénico elevado e inductores de muerte celular (Lu, J., 2009).



**Figura 31:** Ciclo redox llevado a cabo por las especies de selenio. Imagen tomada de: Letavayová, L., Vlcková, V., Brozmanová, J. Selenium cancer prevention to DNA damage. *Toxicology*; 227: 1-14, 2006.



Estudios recientes han demostrado que la selenometionina (SeMet) es capaz de suprimir los efectos negativos del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) incrementando la actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GPx) (Miranda, G.S., 2011) y reduciendo el daño oxidativo.

#### **6.4.4 Actividad antiandrogénica**

Numerosos artículos apuntan a una posible actividad antiandrogénica del selenio (Lee, S.O., 2006; Chun, J.Y., 2006; Plano, D., 2007) y se ha demostrado que derivados de selenio, como el selenito sódico y el ácido metilselenínico, pueden modular el receptor andrógeno (AR). Las células humanas de cáncer de próstata LNCaP, expuestas al selenito sódico en presencia de interleuquina-6 (IL-6), muestran una disminución en su crecimiento con una inhibición significativa de las proteínas que expresan el antígeno específico de próstata (PSA). Además, el selenito sódico induce apoptosis e inhibe el crecimiento de células tumorales de cáncer de próstata dependientes del andrógeno LAPC-4 (Husbeck, B., 2005, 2006; Bhattacharyya, R.S., 2008).



## **II. Antecedentes y Justificación**

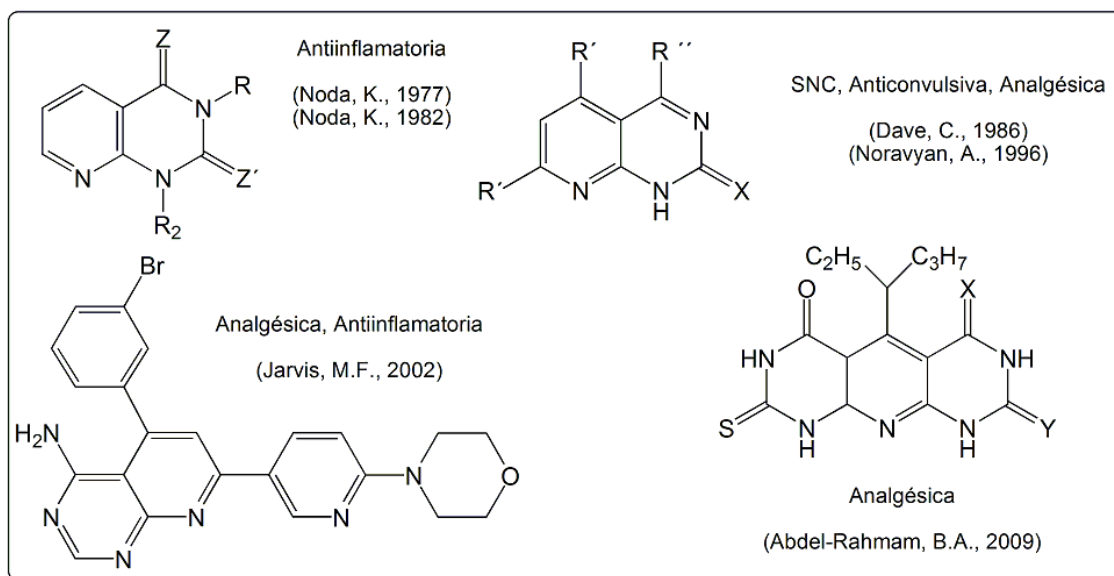


Debido a la experiencia previa de nuestro grupo investigador con estructuras orgánicas como las pirido[2,3-*d*]pirimidinas y quinazolininas, se decide continuar con la síntesis de estas moléculas en un intento de encontrar nuevos derivados con actividad antitumoral. La introducción del átomo de selenio en las estructuras objeto de síntesis es un enfoque terapéutico de gran novedad. Se realiza una amplia revisión bibliográfica y se observa la probada actividad de estos núcleos orgánicos como antitumorales, así como un gran número de compuestos organoselénicos empleados en el área de la oncología.

## 1. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL NÚCLEO PIRIDO [2,3-*d*]PIRIMIDINA

Actualmente es incuestionable la importancia del sistema pirido[2,3-*d*]pirimidina por sus múltiples aplicaciones biológicas. Presenta actividad analgésica, antiinflamatoria, anticonvulsiva, depresora del sistema nervioso central (SNC), antibacteriana, antihistamínica, diurética, antihipertensiva, antiagregante plaquetaria y antitumoral entre otras.

### 1.1 ACTIVIDAD ANALGÉSICA, ANTIINFLAMATORIA, ANTI CONVULSIVA Y DEPRESORA DEL SNC



**Figura 32:** Derivados de pirido[2,3-*d*]pirimidina con actividad analgésica, antiinflamatoria, anticonvulsiva y depresora del SNC.

## 1.2 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

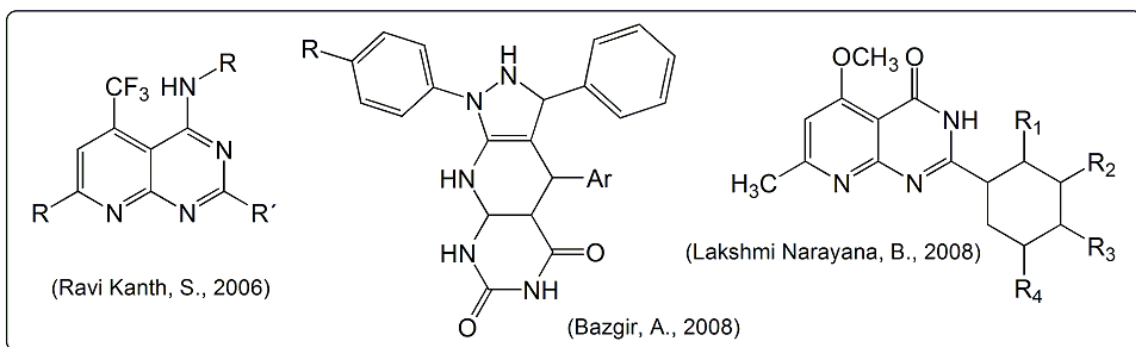


Figura 33: Derivados de pirido[2,3-*d*]pirimidina con actividad antibacteriana.

## 1.3 ACTIVIDAD ANTIHISTAMÍNICA

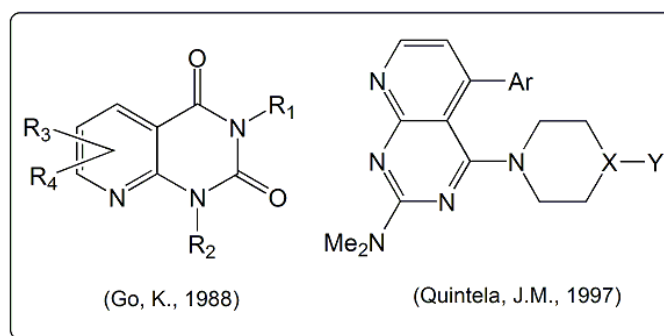


Figura 34: Derivados de pirido[2,3-*d*]pirimidina con actividad antihistamínica.

## 1.4 ACTIVIDAD DIURÉTICA, ANTIHIPERTENSIVA Y AGREGANTE PLAQUETARIA

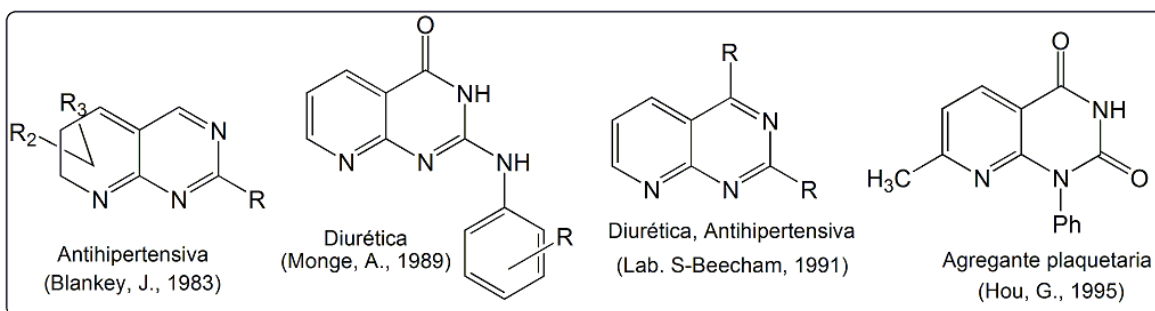


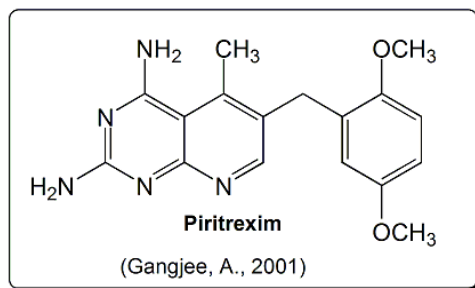
Figura 35: Derivados de pirido[2,3-*d*]pirimidina con actividad diurética, antihipertensiva y agregante plaquetaria.

## 1.5 ACTIVIDAD ANTITUMORAL

Se han descrito muchos derivados de pirido[2,3-*d*]pirimidina con actividad antitumoral, que se han utilizado con prometedores resultados (Lippa, B., 2007).

### 1.5.1 Intermediarios de la síntesis del ácido fólico

El ácido fólico está implicado en una gran cantidad de funciones en el organismo. Esta coenzima es imprescindible para el buen funcionamiento del sistema nervioso, así como para la formación de proteínas y hemoglobina. Además, el ácido fólico es esencial en la síntesis, metilación y reparación del DNA. Una concentración de ácido fólico baja puede contribuir al proceso de carcinogénesis por alteración de la expresión genética y el incremento del daño producido al DNA (Omar, R.M., 2009).



**Figura 36:** Derivado de pirido[2,3-*d*]pirimidina con actividad antitumoral.

Los intermediarios de la síntesis del ácido fólico se han utilizado como agentes antipsoriasis, como fármacos frente a infecciones de *Pneumocitis carinii* y *Toxoplasma gondii* (Kuyper, L., 1996; Gangjee, A., 1999) y como antitumorales. Uno de los más usados es *Piritrexim*.

### 1.5.2 Inhibidores de quinasas

El ciclo de la célula se compone de una serie de eventos complicados y muy bien integrados que le permiten a la célula crecer y proliferar. Una parte crítica de este ciclo es la maquinaria dependiente de quinasas que regula el desarrollo y el crecimiento celular (Shah, M.A., 2006). Muchas quinasas han mostrado incrementos en su expresión o su actividad en un gran porcentaje de tumores, así como un aumento en la fosforilación de la tirosina asociada a una progresión de la enfermedad y a un mal pronóstico (Levitzki, A., 2002; Krause, D.S., 2005).

Determinados derivados de pirido[2,3-*d*]pirimidina han mostrado, en estudios realizados en ratones afectados con melanoma, una inhibición significativa del crecimiento del tumor, así como una disminución de la angiogénesis y la metástasis (Gangjee, A., 2010). Estos derivados van a actuar como inhibidores del *receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular* (VEGFR-2) o como *inhibidores de los receptores de tirosín quinasas* (TKR). Algunos de los derivados que actúan como inhibidores de quinasas con actividad antitumoral se muestran en la figura 37, así como las quinasas que inhiben.

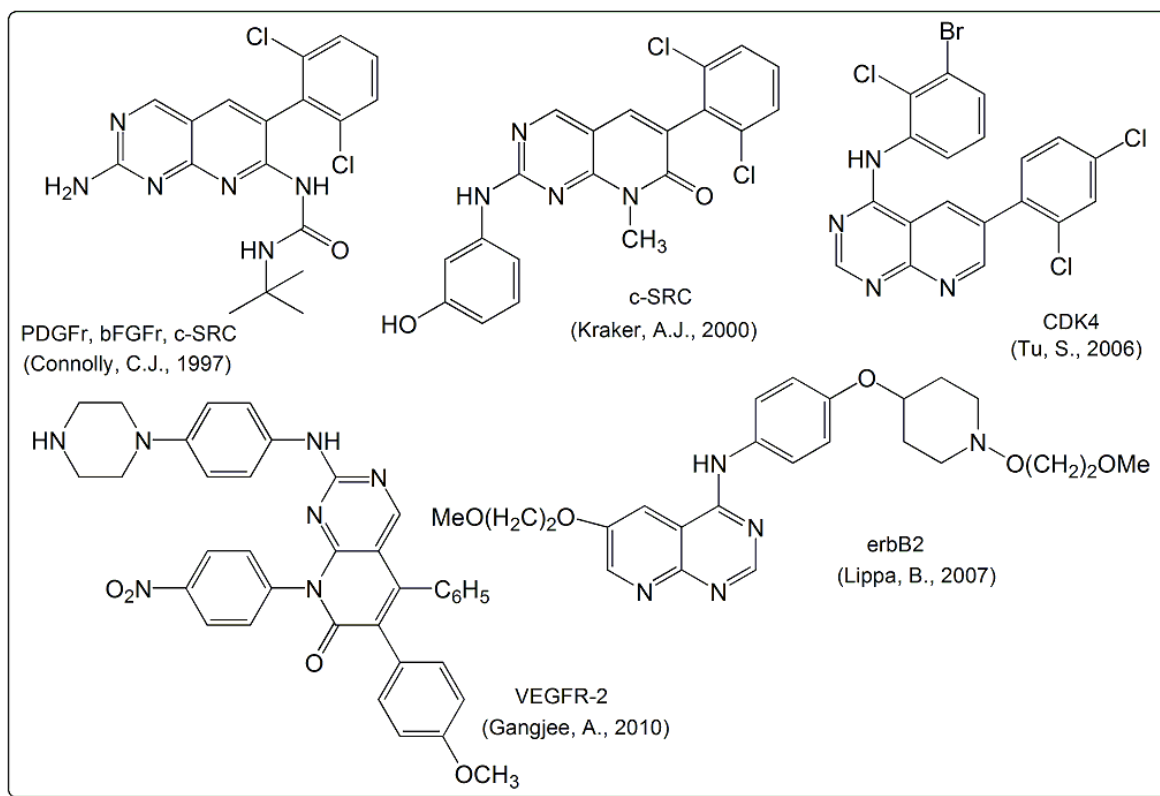


Figura 37: Derivados de pirido[2,3-*d*]pirimidina inhibidores de quinasas con actividad antitumoral.

## 1.6 DERIVADOS DE PIRIDO[2,3-*d*]PIRIMIDINA SINTETIZADOS POR NUESTRO GRUPO INVESTIGADOR

Se ha observado que la simetría está presente en muchos compuestos con reconocida acción citotóxica (Sanmartín, C., 2006). Así, la simetría entendida de un modo amplio, es la característica estructural principal de los compuestos con actividad citotóxica y apoptótica de la quimioteca del grupo de investigación.

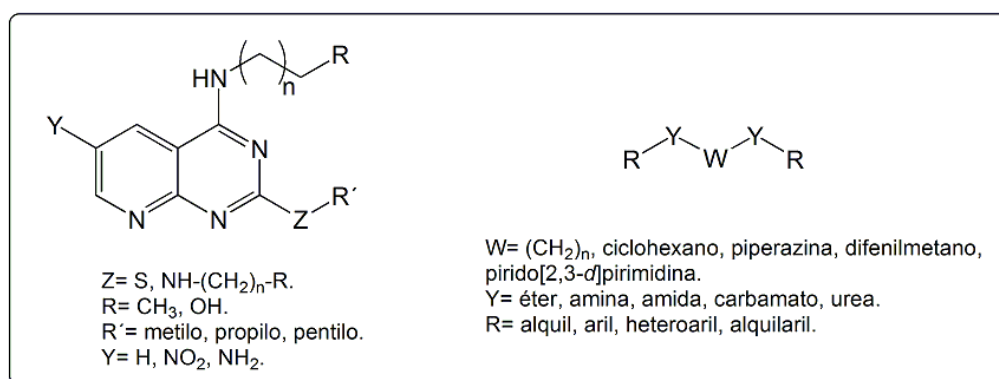


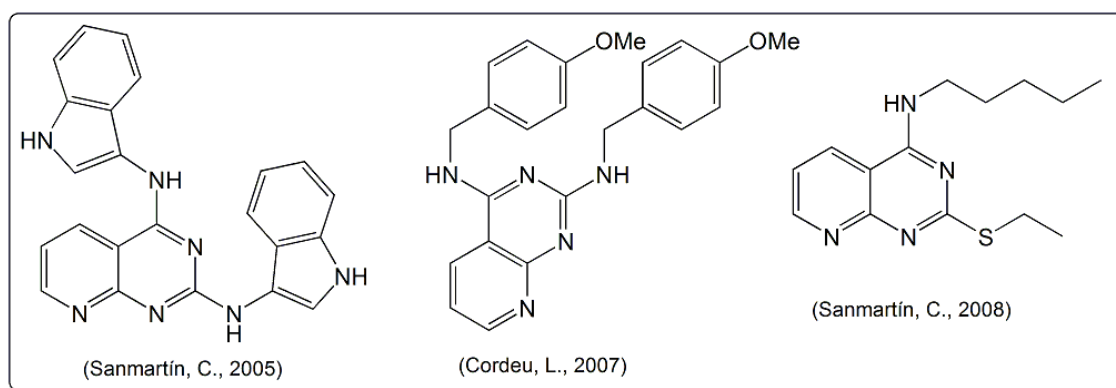
Figura 38: Fórmulas generales de los derivados de pirido[2,3-*d*]pirimidina sintetizados por nuestro grupo.

Dentro de los derivados de pirido[2,3-*d*]pirimidina destacan los *derivados 2,4,6-sustituídos de pirido[2,3-*d*]pirimidina* (Sanmartín, C., 2005; Cordeu, L., 2007; Sanmartín, C., 2008) y los



derivados simétricos de éter, urea, amina, amida y carbamato (Sanmartín, C., 2005; Echeverría, M., 2006; Font, M., 2006).

Estudios realizados por nuestro grupo investigador demuestran que derivados de pirido[2,3-d]pirimidina producen citotoxicidad en distintas líneas celulares tumorales de mama (MD-MBA-231), colon (HT-29) y vejiga (T-24) al mismo tiempo que actúan como agentes inductores de apoptosis activando la caspasa-3 (Sanmartín, C., 2005, 2008; Cordeu, L., 2007).



**Figura 39:** Derivados de pirido[2,3-d]pirimidina con actividad inductora de apoptosis sintetizados por nuestro grupo.

## 2. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL NÚCLEO QUINAZOLINA

En la actualidad se investiga con derivados de quinazolina en muy diversas líneas y es incuestionable su importancia biológica. Algunas de las actividades más relevantes se detallan a continuación:

### 2.1 ACTIVIDAD ANTIPOBESIDAD

La *hormona concentradora de melanina (MCH)* se produce predominantemente por neuronas en el lateral del hipotálamo y sus efectos se miden por medio de dos receptores: MCH-1R y MCH-2R. Se ha comprobado que estos receptores influyen en el peso corporal y en la ingesta alimentaria (Carpenter, A., 2002; Collins, C.A., 2003; Hervieu, G., 2003; Kowalski, T.J., 2004; Arienzo, R., 2007), apoyando así la hipótesis de que los antagonistas de MCH-1R pueden significar un campo por explorar en el tratamiento de la obesidad. El compuesto que se muestra en la figura 40 ha demostrado ser un antagonista de MCH-1R.

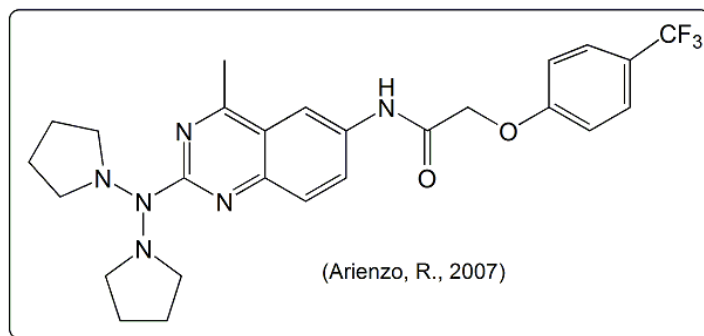


Figura 40: Derivado de quinazolina con actividad antiobesidad.

## 2.2 ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA

Algunas quinazolininas actúan como inhibidores de la *dihidrofolato reductasa (DHFR)* en enfermedades como el mal de Crohn (inflamación crónica de los intestinos grueso y delgado) y la colitis ulcerosa (inflamación crónica del colon).

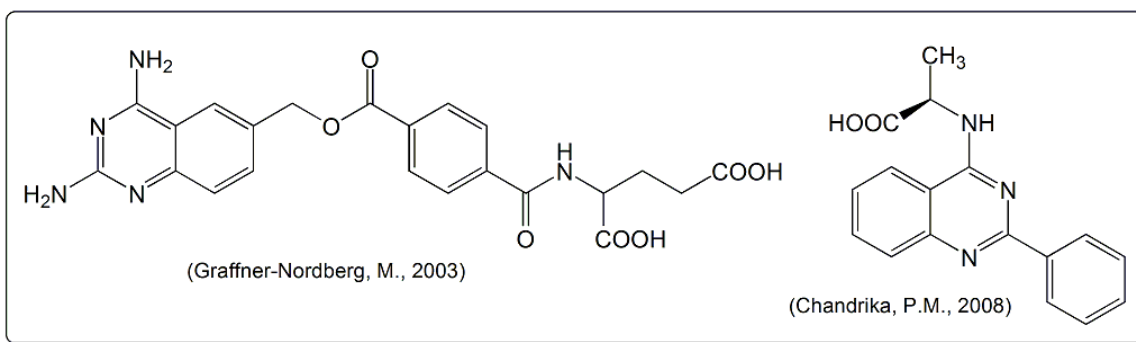


Figura 41: Derivados de quinazolina con actividad antiinflamatoria.

## 2.3 ACTIVIDAD FRENTE A LA DISFUNCIÓN ERÉCTIL

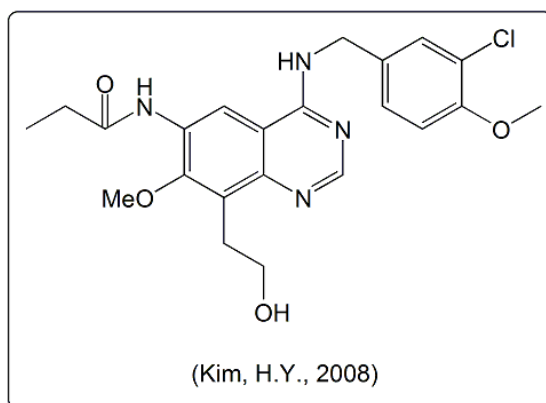


Figura 42: Derivado de quinazolina con actividad frente a la disfunción eréctil.

## 2.4 ACTIVIDAD SEDATIVA-HIPNÓTICA, ANTICONVULSIVA Y DEPRESORA DEL SNC

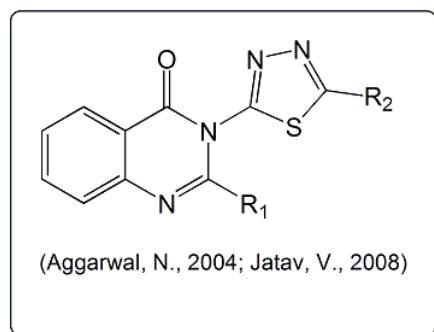


Figura 43: Derivados de quinazolona con actividad sedativa-hipnótica, anticonvulsiva y depresora del SNC.

## 2.5 ACTIVIDAD ANTIDEPRESIVA

El transportador-P es el encargado de acumular aminas en las vesículas acidificadas de las neuronas peptidérgicas (Al-Damluji, S., 1996, 1997). Las propiedades de este transportador no están descritas pero no se conocen otros transportadores con iguales características. El especial interés de este transportador radica en que puede jugar un papel principal en el desarrollo de nuevos antidepresivos (Al-Damluji, S., 2004). Un ejemplo de ello es *Prazosin*, un ligando  $\alpha_1$  adrenérgico que se acumula de manera no lineal en las neuronas peptidérgicas que poseen transportador-P, aunque también existen análogos del Prazosin con actividad antidepresiva (Mendes da Silva, J.F., 2008).

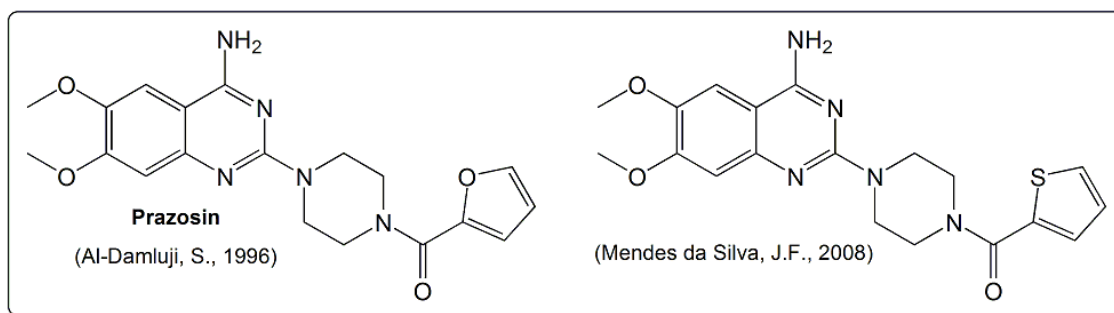


Figura 44: Derivados de quinazolona con actividad antidepresiva.

## 2.6 ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA

Derivados de las quinazolinas se utilizan también como fármacos controladores de la presión arterial, actuando como antagonistas del adrenoceptor  $\alpha_1$ . Se ha comprobado que estos fármacos son activos contra el tratamiento de la hiperplasia benigna de próstata (BPH) (Jain, K.S., 2008). Dentro de estos fármacos se encuentran el ya citado *Prazosin*, *Terazosin* (Saunders, E., 1991; Hernández, R., 1996), *Doxazosina* (Timmermans, P., 1980), *Tiodazosin* (Bond, R.F., 1984), *Bunazosin*, *Alfuzosin* (Cavero I., 1984), *Trimazosin* (Timmermans, P., 1980) y otros que aparecen en la figura 45.

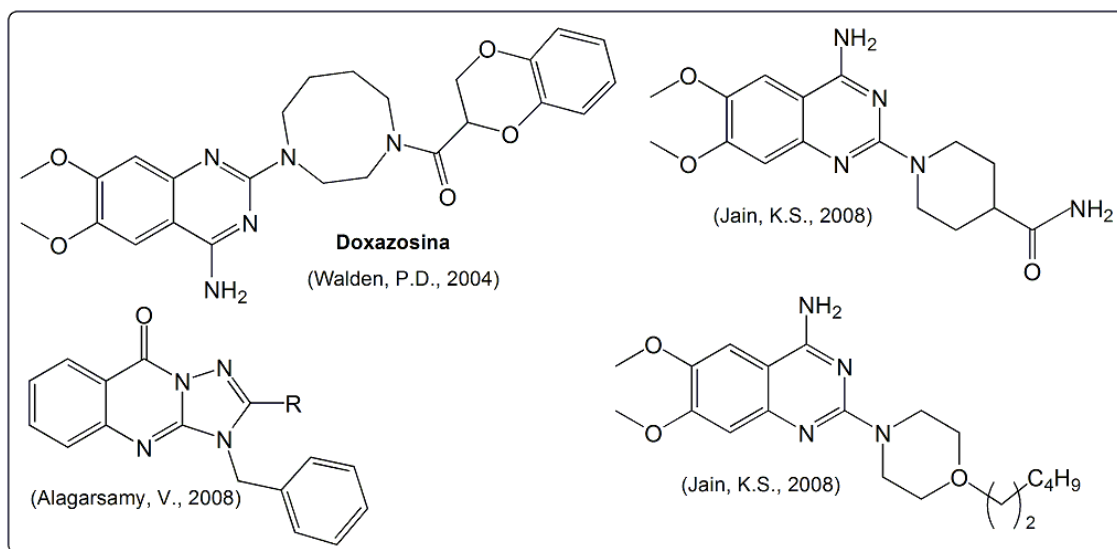


Figura 45: Derivados de quinazolina con actividad antihipertensiva.

## 2.7 ACTIVIDAD ANTITUMORAL

### 2.7.1 Actividad quinasa

Una de las actividades más estudiadas de las quinazolininas es su acción como inhibidores de la actividad quinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (Dhillon, S., 2007; Kopper, L., 2008). El EGFR pertenece a la familia de los receptores de tirosin quinasa ErbB, que están envueltos en la proliferación de células normales y enfermas y, a menudo, aparece sobreexpresado en numerosas células tumorales (Garofalo, S., 2008). Por ello, el EGFR es una atractiva diana para el diseño y desarrollo de potentes fármacos anticancerígenos (Laskin, J.J., 2004). La mayoría de estos fármacos son derivados de *Gefitinib* (Rocha da, A.B., 2002) o *Erlotinib* (Akita, R.W., 2003).

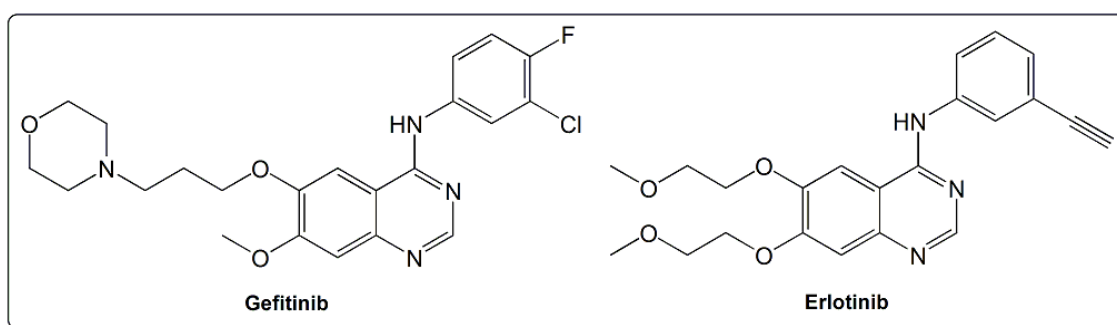


Figura 46: Derivados de quinazolina con actividad antitumoral.

Se ha demostrado que Gefitinib y Erlotinib son efectivos sólo para un porcentaje de pacientes pequeño en los que EGFR tiene mutaciones activadas en la quinasa dominante (Takano, T., 2005), pero la respuesta de estos inhibidores disminuye cuando se producen mutaciones

secundarias en el EGFR (Pao, W., 2005), de ahí la importancia de buscar nuevas dianas terapéuticas. Algunos derivados aparecen en la figura 47.

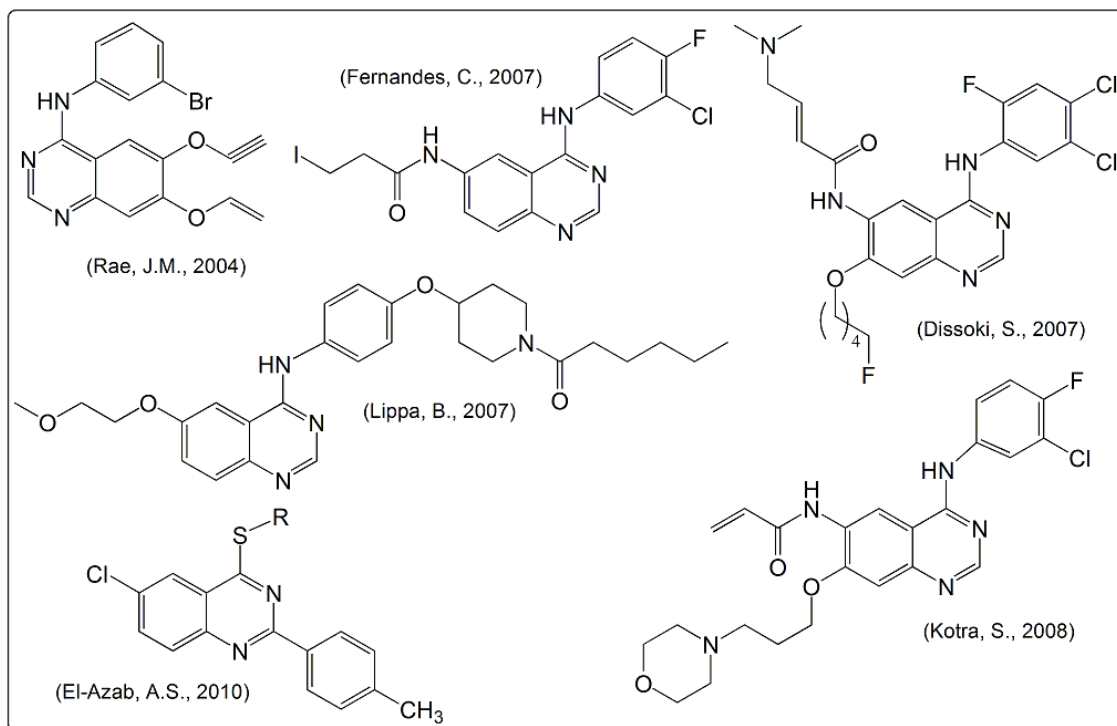


Figura 47: Derivados de quinazolina con actividad antitumoral.

### 2.7.2 Inhibidores de angiogénesis y de la enzima dihidrofolato reductasa

La angiogénesis juega un papel fundamental en la supervivencia, proliferación y potencial metastático de una gran cantidad de tumores (Aragon-Ching, J.B., 2009). Se ha observado en enfermedades tumorales una sobreexpresión de la enzima cicloxigenasa-2 (COX-2). Diversos estudios han comprobado una evidencia creciente entre COX-2 y su implicación en la angiogénesis (Chandrika, P.M., 2008) y algunas quinazolininas han resultado activas frente a la línea celular de leucemia U937 (figura 48). Por otro lado, inhibidores de la dihidrofolato reductasa se utilizan como agentes citotóxicos en el tratamiento del cáncer, como *Trimetrexato* (Gangjee, A., 2009).

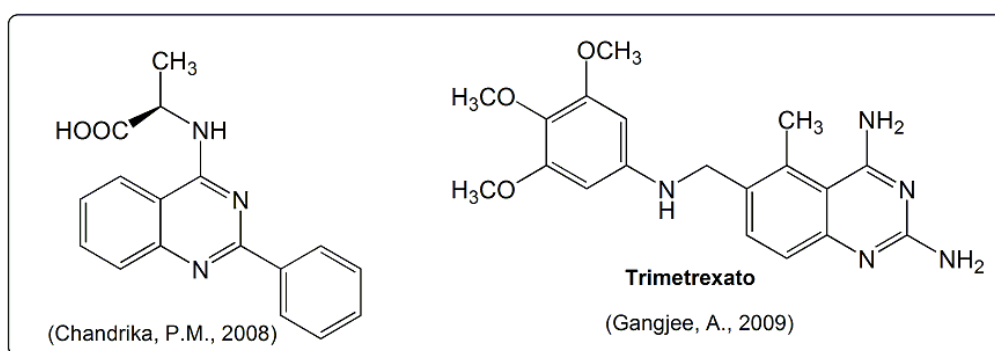


Figura 48: Derivado de quinazolina con actividad antitumoral.

Otros compuestos derivados de quinazolina han sido activos frente a las líneas celulares tumorales de leucemia (CCRF-CEM) y cáncer de mama (MCF-7 y T-47D) (Al-Obaid, A.M., 2008).

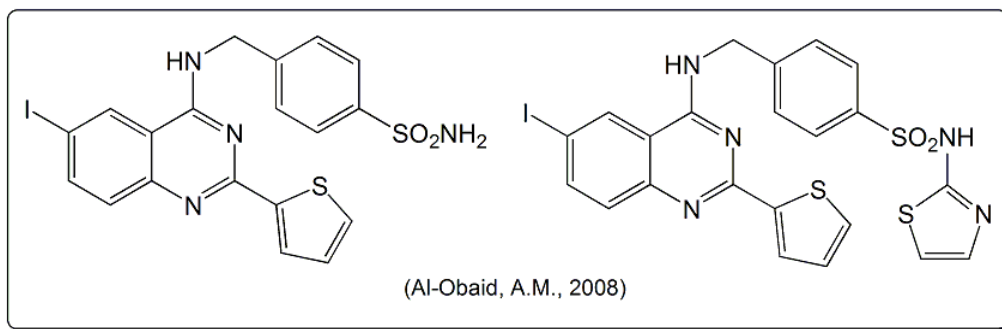


Figura 49: Derivados de quinazolina con actividad antitumoral.

### 2.7.3 Inductores de apoptosis

Derivados de quinazolina han sido identificados como inductores de apoptosis, activadores de la caspasa-3, inhibidores de la polimerización de la tubulina y eficaces contra células tumorales de cáncer de próstata (PC-3), pulmón (H1299), mama (MX-1,T47D) (Sirisoma, N., 2008, 2010) y distintas líneas celulares de leucemia (Jurkat y PBMC) (Sagiv-Barfi, I., 2010).

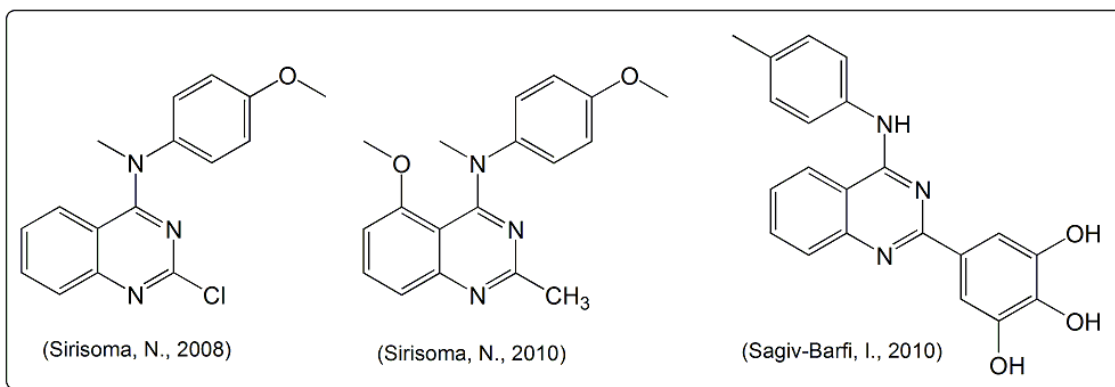


Figura 50: Derivados de quinazolina con actividad antitumoral.

## 2.8 DERIVADOS DE QUINAZOLINA SINTETIZADOS POR NUESTRO GRUPO INVESTIGADOR

Teniendo en cuenta la simetría, en un sentido amplio, nuestro grupo investigador ha sintetizado *derivados de 2,4,6-sustituídos de quinazolina* (Cubedo, E., 2006) y *derivados de éter, amina, amida, carbamato y urea* referentes a la fórmulas generales de la figura 51.

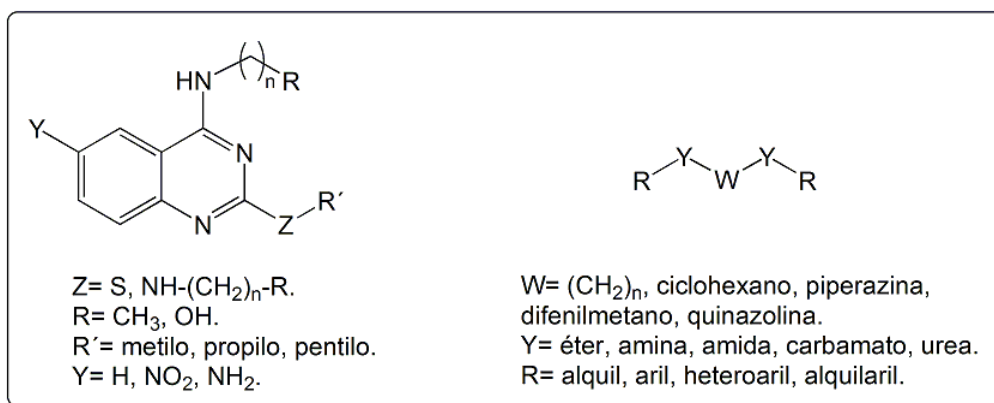


Figura 51: Fórmulas generales de los derivados de quinazolina sintetizados por nuestro grupo investigador.

Nuestro grupo investigador ha comprobado que derivados de quinazolina inducen apoptosis en las líneas celulares de adenocarcinoma de colon (HT-29), carcinoma de vejiga (T-24) y adenocarcinoma de mama (MDA-MB-231) entre otras (Cubedo, E., 2006).

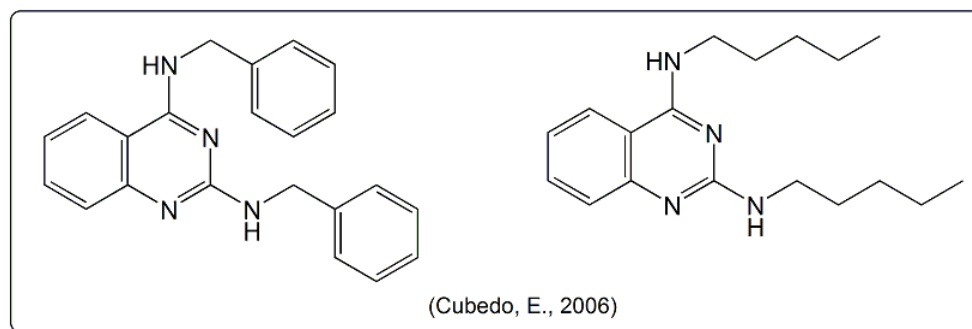


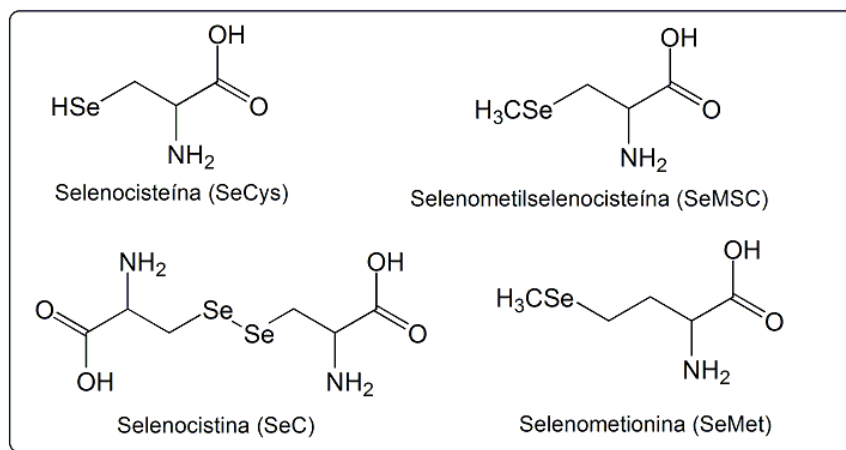
Figura 52: Derivados de quinazolina con actividad antitumoral sintetizados por nuestro grupo investigador.

### 3. DERIVADOS SELENADOS COMO AGENTES ANTITUMORALES

En las últimas décadas, el interés por los compuestos orgánicos de selenio ha aumentado considerablemente, sobre todo en el área oncológica. La síntesis de nuevos derivados organoselénicos ha experimentado un gran auge debido a que los compuestos orgánicos de selenio son mucho menos tóxicos que sus derivados inorgánicos. Como ya se ha comentado en el apartado de introducción, la actividad biológica del selenio es muy amplia, ya que numerosos estudios han demostrado la eficacia del selenio como potencial agente citotóxico (Chen, T., 2008; Ibáñez, E., 2011) y su influencia en la apoptosis, estrés oxidativo, daño y reparación del DNA celular, regulación de p53 y acción frente a proteínas quinásas (Sanmartín, C., 2008). La eficacia quimiopreventiva del selenio depende en gran medida de la forma química en la que es administrado y su metabolismo es requisito indispensable para su actividad.

### 3.1 AMINOÁCIDOS DE SELENIO

El aminoácido de selenio más abundante es la *selenocisteína* (SeCys) que es el aminoácido que se incorpora a las selenoproteínas. Otros aminoácidos de selenio que también participan en el metabolismo son la *selenometilselenocisteína* (SeMSC), que puede ser convertida en el grupo metilselenol ( $\text{CH}_3\text{SeH}$ ), la *selenometionina* (SeMet), que puede sufrir un proceso de trans-sulfuración, convirtiéndose en selenocisteína (SeCys) y la *selenocistina* (SeC).



**Figura 53:** Aminoácidos derivados de selenio.

Varios estudios han demostrado que la selenometionina (SeMet) aumenta la muerte celular en células tumorales de cáncer de pulmón HTB-54, mientras que en células normales este efecto no se ha apreciado (Shin, S.H., 2007). Además, hay evidencias de que una pre-incubación con selenometionina (SeMet) incrementa el contenido de selenio en las células y previene contra el incremento de Me-Hg inducido en la generación de ROS (Kaur, P., 2009). Se ha podido averiguar, en estudios celulares y animales, que la selenometilselenocisteína (SeMSC) es la forma de selenio más efectiva como quimiopreventivo (Ip, C., 1991, 1998, 2000) y que tiene una toxicidad igual o inferior que las demás fuentes de selenio utilizadas tradicionalmente como suplementos (Medina, D., 2001). Su mecanismo de acción contra el cáncer en células humanas de próstata no se conoce en profundidad, aunque todo parece indicar que el suplemento con selenometilselenocisteína (SeMSC) puede modular la expresión de los principales genes que codifican distintos tipos de colágeno y proteínas en células humanas de próstata. (Hurst, R., 2008).

La selenocistina (SeC), es un diseleniuro que se forma debido a la oxidación de la selenocisteína (SeCys). Estudios han comprobado que la selenocistina (SeC) reduce los derivados de nitrosaminas que inducen cáncer de pulmón en ratones A/J (Li, W.Y., 2007) y mejora la actividad quimiopreventiva de las enzimas hepáticas (El-Sayed, W.M., 2006) en ratones CF-1, además de conferir protección frente a la toxicidad en las líneas celulares CHO y PC-12 (Aykin-Burns, N., 2006). Se ha visto que las ROS juegan un papel importante en la ruta



de señalización de la selenocistina (SeC) produciendo daño en el DNA en células susceptibles de cáncer (Chen, T., 2009).

### 3.2 DERIVADOS HETEROCÍCLICOS DE SELENIO

Dentro de los derivados heterocíclicos de selenio se encuentran los *derivados de selenazolidinas*, que poseen actividad quimiopreventiva actuando contra determinados agentes mutagénicos y carcinogénicos (El-Sayed, W.M., 2006, 2007; Franklin, M.R., 2007). El *derivado D-501036* (2,5-bis(5-hidroximetil-2-selenienil)-3-hidroximetil-*N*-metilpirrol) posee un alto potencial citotóxico inhibiendo el crecimiento celular en las líneas celulares KB y HepG<sub>2</sub> y produciendo apoptosis en la ruta mitocondrial asociada a p53 (Shiah, H.S., 2007; Juang, S.H., 2007).

Otro derivado heterocíclico es el *Ebselen* (2-fenil-1,2-benzoisoselenazol-3[2*H*]ona) que posee gran cantidad de actividades entre las que destacan: antioxidante, antiinflamatoria (Fang, J., 2005; Sharma, B.K., 2005, 2008; Bhabak, K.P., 2007; Tewari, R., 2009) y anticancerosa (Sharma, V., 2008). Se ha comprobado que el Ebselen atenúa la generación de ROS producidos por el cisplatino debido a que activa la ruta de señalización de Nrf2 (Kim, S.J., 2009).

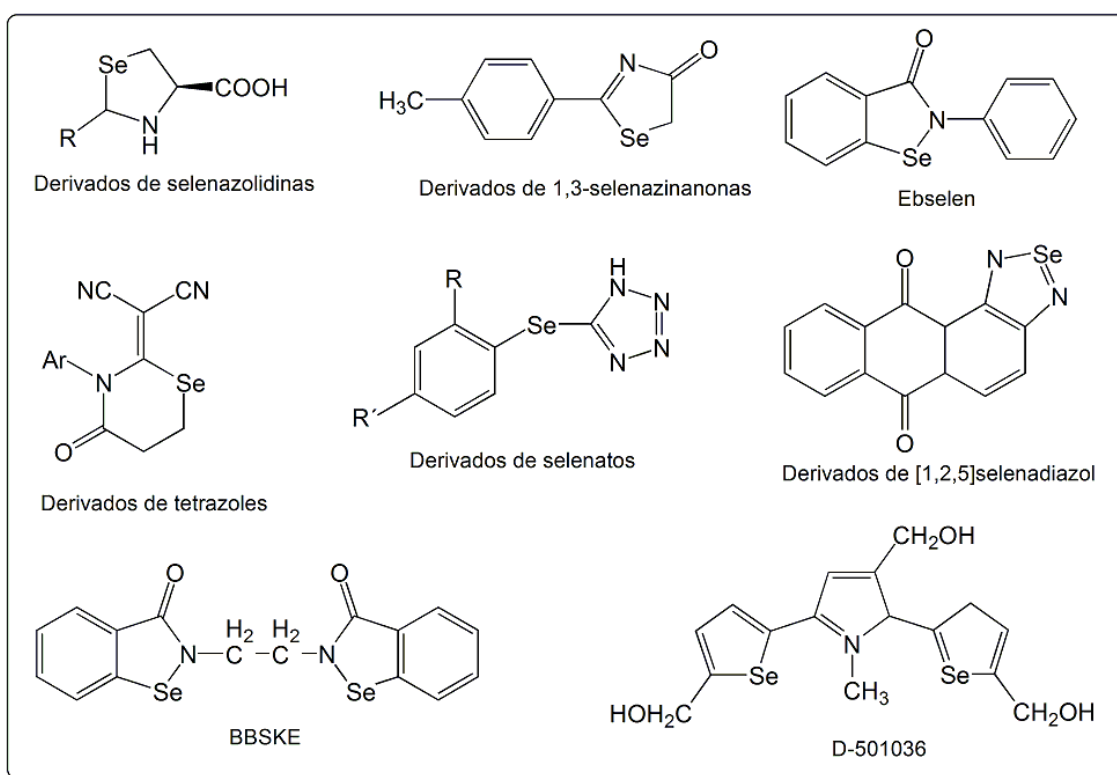


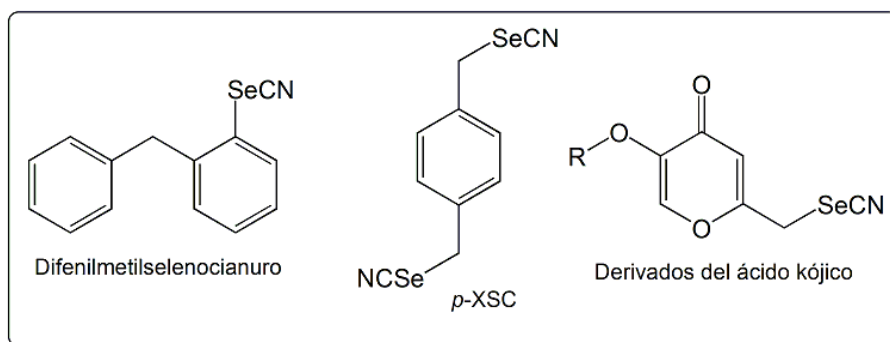
Figura 54: Derivados heterocíclicos de selenio.

Los *derivados de [1,2,5]selenadiazol* inducen muerte celular apoptótica dependiente de p53 en la línea celular tumoral de carcinoma de mama MCF-7, ya que se ha demostrado una acumulación de la población celular en la fase del ciclo celular subG<sub>1</sub>, fragmentación del DNA, condensación celular y activación de ciertas caspasas (Chen, T., 2009).

El *derivado BBSKE* (1,2-[bis(1,2-benzoisosenazolona-3(2*H*)-cetona)]etano) juega un papel importante como anticarcinogénico debido a que inhibe a la enzima tioredoxin reductasa (TrxR) produciendo apoptosis dependiente de la caspasa-3 (Lan, L.X., 2007; Peng, Z.F., 2008; Xing, F.X., 2008; Liu, M., 2010). También se ha observado que *derivados de tetrazoles* inhiben la proliferación celular en líneas de leucemia (L1210) y mama (SK-BR-3), disminuyendo la velocidad de síntesis del DNA en células L1210 y del marcador Ki-67, proteína implicada en la proliferación celular (Bruey, J.M., 2010) y en células SK-BR-3 (Gundugola, S.A., 2010).

### 3.3 DERIVADOS CON EL GRUPO FUNCIONAL SELENOCIANURO

Dentro de los derivados organoselénicos, uno de los más estudiados es el *derivado p-XSC* (1,4-fenilenbis(metilen)selenocianuro), ya que tiene capacidad quimiopreventiva y produce apoptosis en diversas líneas celulares: orales (Guttenplan, J., 2007; Chen, K.M., 2009), de pulmón (El-Bayoumy, K., 2006; Phoerschke, R.L., 2008; Das, A., 2009), de mama... (El-Bayoumi, K., 2004).



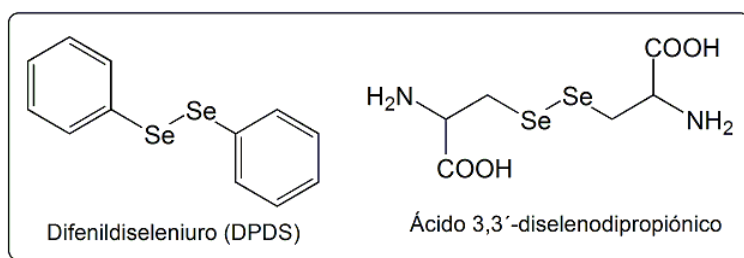
**Figura 55:** Derivados con el grupo funcional selenocianuro.

Además, diversos estudios evidencian que *p-XSC* altera el nivel de ciertas quinasas sensibles a los cambios redox, como la quinasa 6-difosfatenucleósido (Sinha, R., 2008). Investigaciones llevadas a cabo han comprobado que el *ácido kójico* y sus derivados poseen propiedades radioprotectoras frente a determinados metabolitos con capacidad oxidante que pueden afectar al organismo, como son las especies reactivas de oxígeno (Emami, S., 2007).

### 3.4 DERIVADOS CON EL GRUPO FUNCIONAL DISELENIURO

Los *derivados diseleniuro* se caracterizan por sus propiedades antioxidantes protegiendo a las células frente al daño oxidativo. El derivado más estudiado es el *difenildiseleniuro* (DPDS).

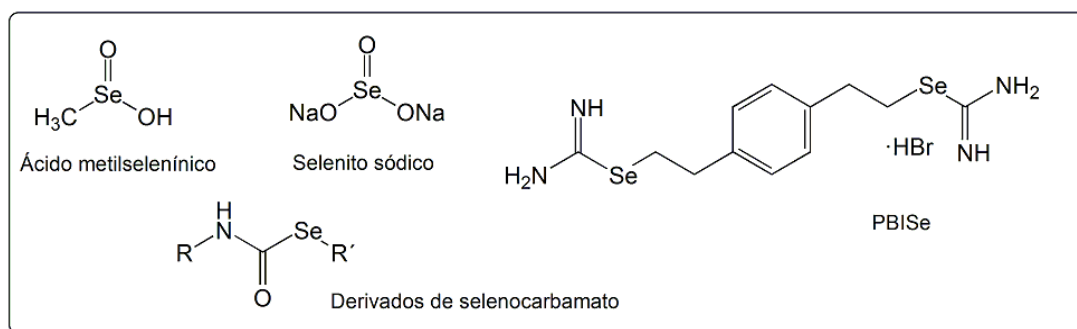
Aunque a dosis altas se ha observado que tiene efectos genotóxicos y pro-oxidantes dañando el DNA de diversos tejidos (cerebro, pulmón, riñón, hígado) (Rosa, R.M., 2007; Santos, B.D., 2009), a concentraciones inferiores se ha visto que tiene efectos terapéuticos contra la hiperglucemia (Barbosa, N.B.D., 2006), la hiperoxidación lipídica (Luchese, C., 2007), la ansiedad, la inflamación (Savegnago, L., 2007a, 2007b), la depresión (Ghisleni, A., 2008; Savegnago, L., 2007c, 2008) y protege al organismo de determinadas sustancias tóxicas debido a su acción antioxidante (Barbosa, N.B.D., 2008; Borges, L.P., 2008; Posser, T., 2008; De Freitas, A.S., 2009; Luchese, C., 2009).



**Figura 56:** Derivados con el grupo funcional diseleniuro.

### 3.5 OTROS DERIVADOS DE SELENIO

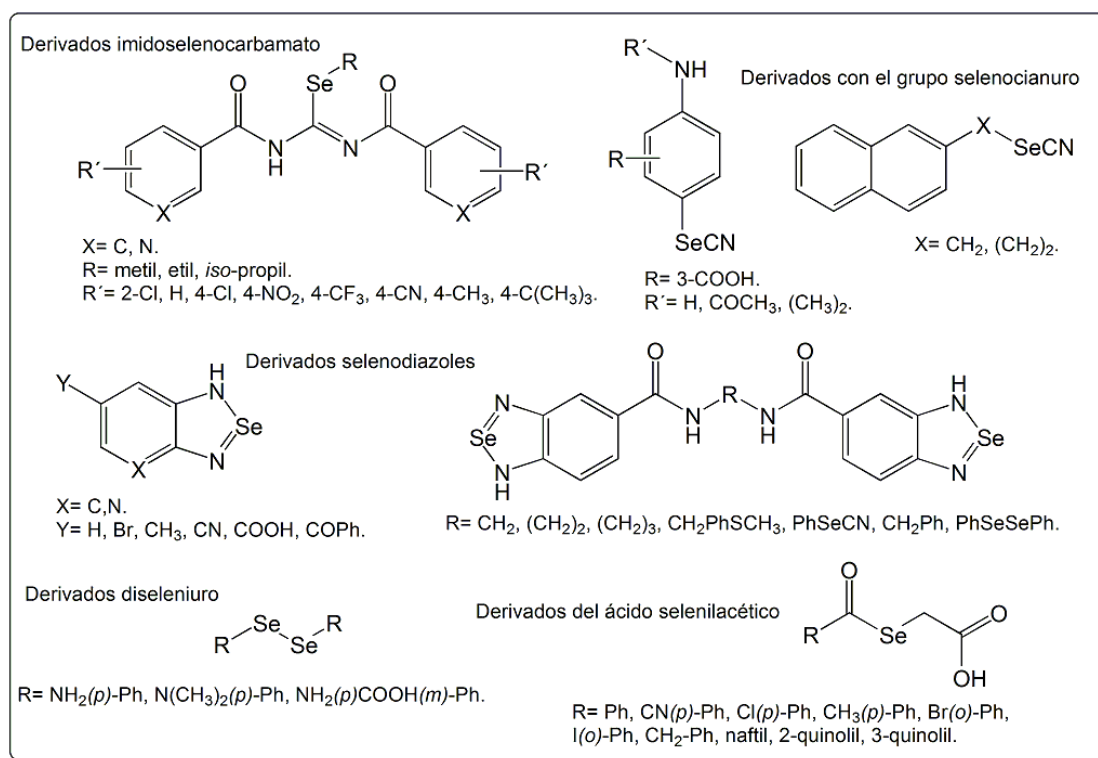
Derivados de selenio como el *ácido metilselenínico*, el *selenito sódico*, *derivados de selenocarbamato* y el *derivado PBiSe* (*S,S'*-1,4-fenilenbis(1,2-etanedil)bis-isoselenourea), se ha demostrado que poseen efectos antitumorales. El ácido metilselenínico y el selenito sódico son dos de los compuestos derivados de selenio más estudiados en el cáncer de próstata y se cree que actúan modulando el receptor andrógeno (AR) (Sanmartín, C., 2008). Mientras que los derivados de selenocarbamato actúan como agentes neutralizadores del anión superóxido (Takahaski, H., 2005). El derivado PBiSe (Madhunapantula, S.V., 2008) posee actividad citotóxica frente a células de melanoma, ya que estudios han comprobado que produce una disminución de la proliferación celular y un aumento en la apoptosis. Este derivado ha mostrado también una inhibición en la ruta de AKT.



**Figura 57:** Otros derivados de selenio.

### 3.6 DERIVADOS DE SELENIO SINTETIZADOS POR NUESTRO GRUPO INVESTIGADOR

La quimioteca de nuestro grupo investigador está formada por diversos derivados orgánicos en los que se ha introducido el átomo de selenio, obteniéndose buenos resultados en el campo de la química médica, ya que han mostrado actividad citotóxica y apoptótica (Plano, D., 2007, 2010; Sanmartín, C., 2009; Ibáñez, E., 2011). Algunos de los derivados orgánicos sintetizados por el grupo son: *derivados imidoselenocarbamato*, *derivados con el grupo selenocianuro*, *derivados diseleniuro*, *derivados selenodiazoles* y *derivados del ácido selenilacético*. Estudios llevados a cabo por nuestro grupo investigador han comprobado que derivados de imidocarbamato con selenio en su estructura son más activos que sus análogos con azufre, lo que refuerza la hipótesis de que el átomo de selenio es crítico para mantener la actividad antiproliferativa de dichos derivados.



**Figura 58:** Derivados de selenio sintetizados por nuestro grupo investigador.

Los derivados imidoselenocarbamato sintetizados han mostrado actividad frente a la línea celular tumoral de carcinoma de próstata PC-3, mostrando alguno de ellos mayor efecto citotóxico que determinados fármacos utilizados en clínica para el tratamiento del cáncer de próstata, como el etopósido (Plano, D., 2007). Además, varios derivados de imidoselenocarbamato se han mostrado como potenciales antitumorales en las líneas celulares tumorales de carcinoma de colon (HT-29) y mama (MCF-7), con valores de GI<sub>50</sub> en el rango nanomolar (nM) (Ibáñez, E., 2011). Derivados del ácido selenilacético han mostrado ser activos en las líneas celulares tumorales de próstata (PC-3) y de mama (MCF-7) y, uno de los derivados más activos estudiados, el ácido benzoilselenilacético, no provoca apoptosis ni

perturba el ciclo celular en MCF-7 (Sanmartín, C., 2009). Por otro lado, estudios recientes han demostrado que determinados derivados de selenodiazoles muestran propiedades anticancerosas, encontrándose la mayor actividad en la línea tumoral de mama MCF-7 (Plano, D., 2010).



## **III. Objetivos**





El trabajo que se presenta en esta Memoria se enmarca en un amplio proceso de modulación de ciertas estructuras heterocíclicas base con la pretensión de establecer los requerimientos estructurales responsables de las actividades citotóxica, antiproliferativa y pro-apoptótica pretendidas por nuestro grupo de investigación.

La idea primigenia consiste en la adopción de un modelo estructural al que se llega con criterios de eficacia en la búsqueda de compuestos antitumorales como son la presencia de determinados elementos químicos y ciertos grupos funcionales, así como la adopción de cierto nivel de simetría molecular:



**Figura 59:** Esquema general propuesto para las moléculas de nueva síntesis.

Con esta investigación se ha pretendido aportar un modesto avance hacia la necesaria quimioterapia a aplicar en esta patología.

Así, se ha incidido en la inclusión de elementos clave como heteroátomos de N, S, Se y en funciones como amina, sulfuro o seleniuro. El parámetro simetría molecular, buscado por la presencia frecuente de esta característica en muchas moléculas con actividad antitumoral, se ha aplicado en este trabajo en un concepto amplio y con la idea de comprobación de si, en las estructuras que aquí se manejan, presenta la importancia encontrada en otras moléculas con actividad anticancerosa descritas en la bibliografía o preparadas anteriormente por nuestro grupo. Simetría, en este contexto, ha de entenderse no sólo en un sentido estricto de sistemas obtenidos por dimerización sino también cuando exista algún elemento de simetría e incluso cuando un grupo químico sirva de nexo central (núcleo) entre dos fragmentos iguales (terminaciones activas) unidos a él. Además, se prescinde de consideraciones configuracionales y conformacionales.

La evolución de la modulación de estructuras bicíclicas nitrogenadas, objetivo de nuestra investigación, ha seguido el siguiente curso:

Se parte de un diseño preliminar de farmacóforo que se pretende modular en cuanto a funcionalización, distancias y geometría:

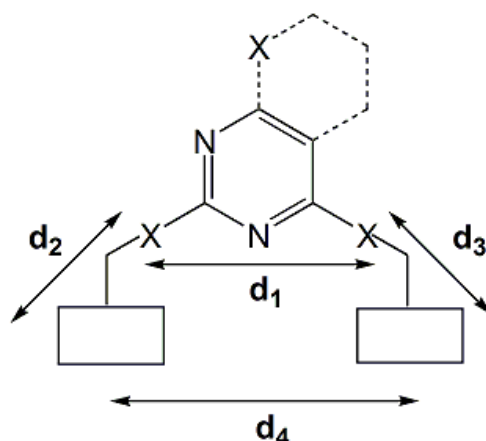


Figura 60: Farmacóforo preliminar.

Según observaciones extraídas de la bibliografía y con variantes razonables habituales en Química Médica.

En cuanto a modificaciones estructurales en el núcleo central, se ha procedido:

**A)** De quinazolina a piridopirimidina: obteniéndose disminución de AlogP, modificación del número de N presentes en el anillo central implicados en red de puentes de hidrógeno, aumento de selectividad y eficacia pro-apoptótica.

**B)** De quinazolina a pirimidina: obteniéndose disminución de tamaño en el anillo central, disminución de selectividad y disminución de actividad apoptótica. En moléculas de referencia se ha obtenido modificación de perfil a inhibidores de dihidrofolato reductasa.

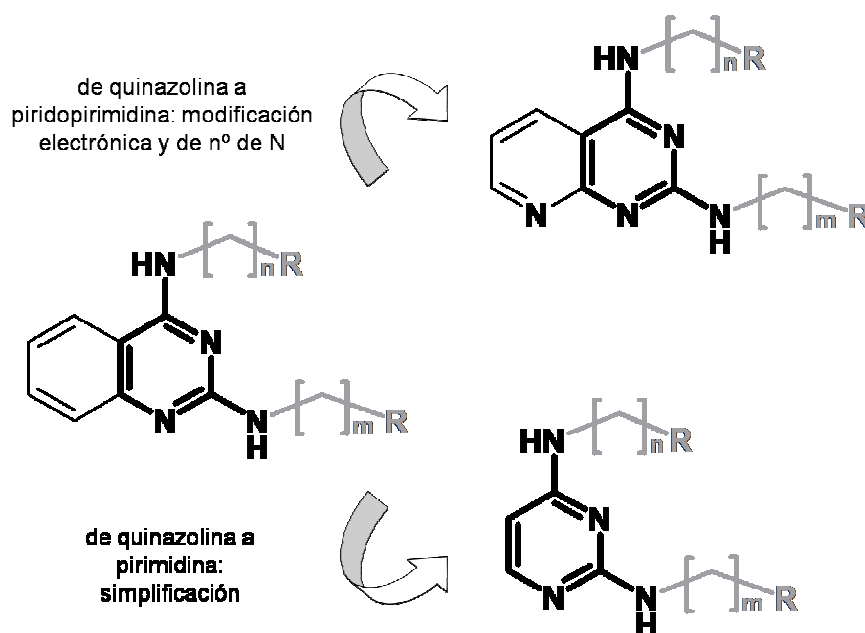
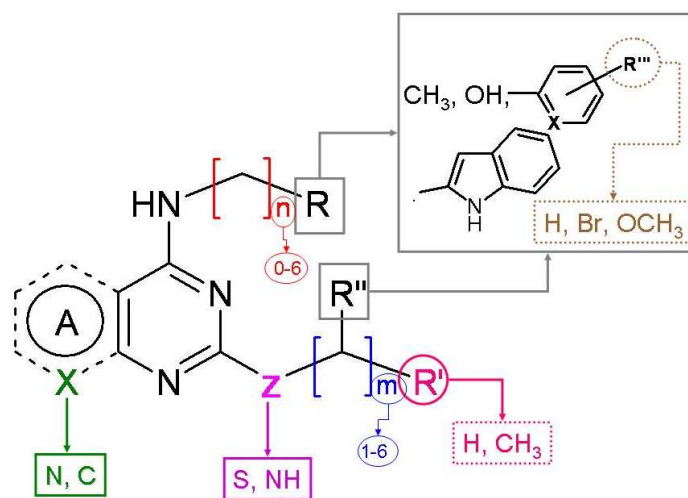


Figura 61: Modificaciones estructurales realizadas en el núcleo central.

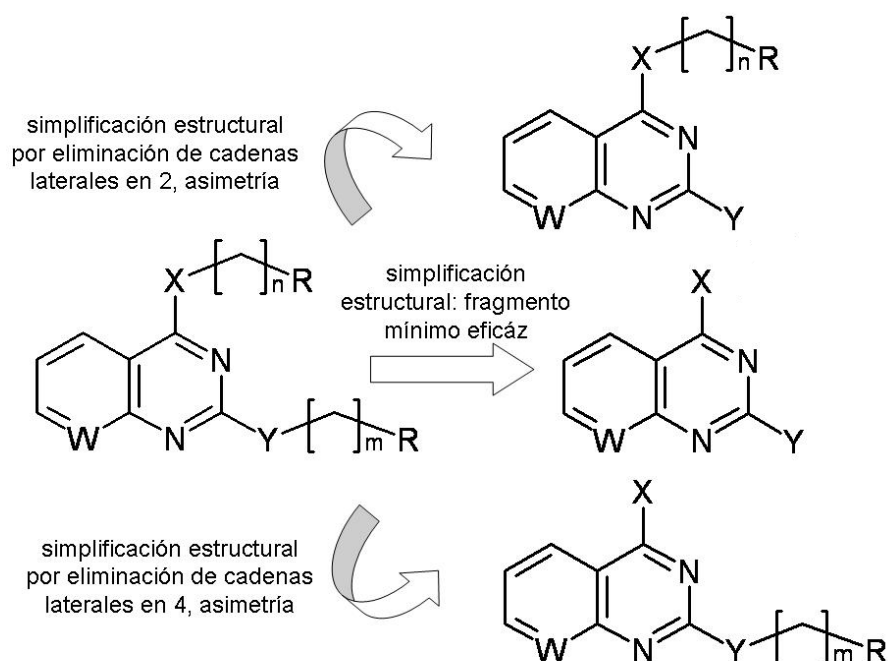
Respecto a las variaciones estructurales realizadas en síntesis y estudiadas en su actividad biológica, se incluye un esquema-resumen en la siguiente figura:



**Figura 62:** Variaciones estructurales estudiadas en las series precedentes.

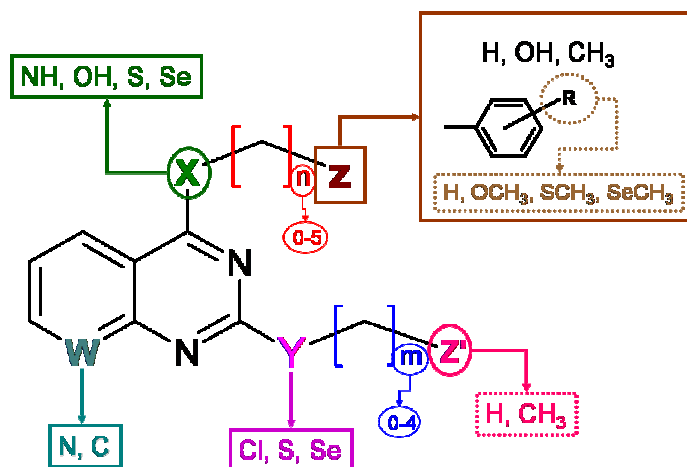
Elementos estructurales relacionados con la actividad biológica objetivo: X = N; Z = NH; n = m = 1-2; R=R''= C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>; R' = H; R''' = H, OCH<sub>3</sub>

En referencia a la simplificación de estructuras por actuación/eliminación de cadenas laterales, búsqueda del fragmento mínimo eficaz y valoración de la simetría estructural, se ha procedido de la siguiente forma:



**Figura 63:** Simplificación de estructuras por actuación/eliminación de cadenas laterales, búsqueda del fragmento mínimo eficaz y valoración de la simetría estructural.

En el presente trabajo y como una continuación y profundización en el proceso de modulación y estudio de la relación estructura-actividad de estas estructuras, se ha trabajado por síntesis en las variaciones estructurales que se esquematizan en la siguiente figura:



**Figura 64:** Variaciones estructurales llevadas a cabo.

Las posiciones de actuación en esta labor han sido:

1. Diseñar estructuras teniendo en cuenta la aproximación fragmental, reuniendo en una única entidad molecular fragmentos con un porcentaje de frecuencia muy alto en compuestos con la actividad biológica objetivo (Vieth, M., 2004, 2006; Sutherland, J.J., 2008).
2. Realizar el estudio de la posible influencia que el número de N presentes en la molécula, incluidos en el núcleo central, pueda tener en la actividad objetivo (Park, H.J., 2004).
3. Evaluar/modificar el perfil lipófilo de los compuestos (Zink, M., 2004) y evaluar/modificar la simetría molecular (Sanmartín, C., 2006).
4. Tomar como referencia los datos recopilados en anteriores publicaciones del grupo (Font, M., 2011).
5. Establecer una relación entre la longitud de las cadenas y la actividad (Takahaski, N., 2006). Así como de la presencia de ciertos heteroátomos en la molécula.
6. Hacer referencia a los anillos/sustituciones que están presentes en moléculas de referencia y valorar la distinta ubicación de los sustituyentes sobre el sistema anular central.

En conclusión, se pretende en este trabajo:

1. La síntesis de nuevos compuestos derivados de pirido[2,3-*d*]pirimidina y quinazolina con actividad antitumoral *in vitro* frente a diferentes líneas celulares tumorales seleccionadas, siguiendo los parámetros de diseño que se han expuesto.
2. De los compuestos sintetizados, proceder a su caracterización analítica, realización de estudios físico-químicos y purificación acorde con la realización de ensayos biológicos.
3. Realizar la evaluación citotóxica y antiproliferativa *in vitro* de todos los nuevos compuestos en varias líneas celulares tumorales. Así mismo, valorar la selectividad de la actividad citotóxica evaluando comportamientos frente a líneas celulares no tumorales.
4. Establecer las correspondientes relaciones estructura-actividad que supongan una retroalimentación útil en el diseño de nuevas estructuras activas.
5. De los compuestos que resulten de mayor actividad, profundizar su estudio biológico en cuanto a vía de inducción de muerte celular, afectación del ciclo celular, actuación en procesos de migración celular y aproximación a los posibles mecanismos de acción.



## **IV. Plan de Trabajo**





## 1. DISEÑO Y SÍNTESIS QUÍMICA DE LOS COMPUESTOS

### 1.1 OBTENCIÓN DE LOS COMPUESTOS DE LA SERIE I

La estructura general de los derivados de pirido[2,3-*d*]pirimidina de la SERIE I se indica a continuación:

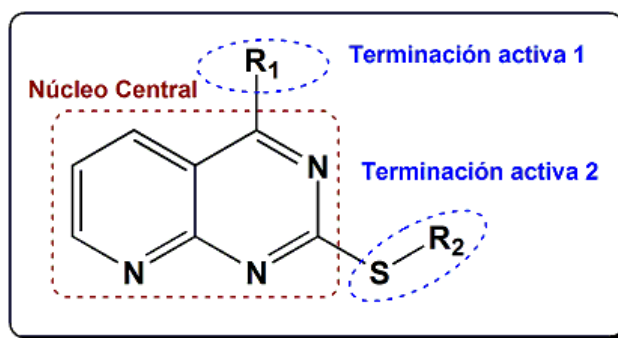


Figura 65: Estructura general para los derivados de la serie I.

Las modificaciones estructurales en estos derivados se llevan a cabo en las posiciones 2 y 4 del núcleo de pirido[2,3-*d*]pirimidina. En la posición 2 se introducen los grupos mercapto, metiltilio y pentiltio y en la posición 4 se introducen los grupos mercapto, metiltilio y pentiltio, el grupo amino o aminas de distinta naturaleza. Se pretende con ello evaluar la flexibilidad de la molécula y el efecto estérico y electrónico al introducir distintos sustituyentes en el anillo aromático.

### 1.2 OBTENCIÓN DE LOS COMPUESTOS DE LA SERIE II

La estructura general de los derivados de pirido[2,3-*d*]pirimidina de la SERIE II se refleja en la siguiente figura:

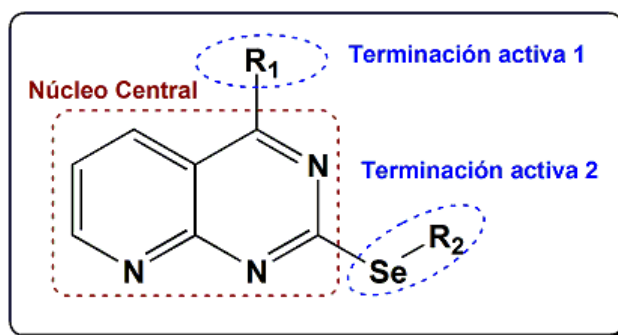


Figura 66: Estructura general para los derivados de la serie II.

Las modificaciones estructurales en estos derivados se llevan a cabo en las posiciones 2 y 4 del núcleo de pirido[2,3-*d*]pirimidina. En la posición 2 se introducen los grupos hidroseleno,

metilseleno y pentilseleno y en la posición 4 se introducen los grupos hidroseleno, metilseleno y pentilseleno, el grupo amino o aminos con una cadena alifática y distintos sustituyentes en el anillo aromático. Con ello, se pretende evaluar la flexibilidad de la molécula y el efecto de factores estéricos y electrónicos.

### 1.3 OBTENCIÓN DE LOS COMPUESTOS DE LA SERIE III

La estructura general de los derivados de quinazolina de la SERIE III aparece a continuación:

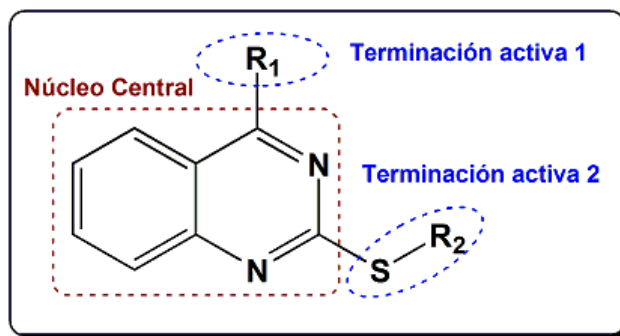


Figura 67: Estructura general para los derivados de la serie III.

Las modificaciones estructurales en estos derivados se llevan a cabo en las posiciones 2 y 4 del núcleo de quinazolina. En la posición 2 se introducen los grupos mercapto, metiltio y pentiltio y en la posición 4 se introducen los grupos mercapto, metiltio y pentiltio, el grupo hidroxilo, el grupo amino o diferentes aminos con una cadena alifática variable. Se pretende con ello evaluar la longitud de la cadena, la flexibilidad de la molécula y el efecto estérico y electrónico al introducir distintos sustituyentes en el anillo aromático.

### 1.4 OBTENCIÓN DE LOS COMPUESTOS DE LA SERIE IV

La estructura general de los derivados de quinazolina de la SERIE IV se muestra a continuación:

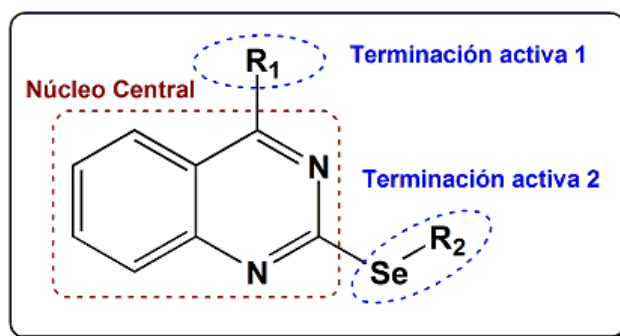


Figura 68: Estructura general para los derivados de la serie IV.

Las modificaciones estructurales en estos derivados se llevan a cabo en las posiciones 2 y 4 del núcleo de quinazolina. En la posición 2 se introducen los grupos hidroseleno, metilseleno y pentilseleno y la posición 4 se sustituye por los grupos hidroseleno, metilseleno y pentilseleno, el grupo amino o diferentes aminas con una cadena alifática y distintos sustituyentes en el anillo aromático para evaluar factores estéricos y electrónicos.

Una vez sintetizados y purificados los compuestos se procede a su identificación mediante Espectroscopia de Infrarrojo (IR), Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Espectrometría de Masas (EM) y Análisis Elemental (C, H, N).

## **2. EVALUACIÓN DE LAS ACTIVIDADES CITOTÓXICA Y ANTIPROLIFERATIVA**

Los compuestos presentados en esta Memoria se evalúan *in vitro* en la línea celular PC-3 de carcinoma de próstata en el Laboratorio de Oncología del CIMA (Centro de Investigación Médica Aplicada), empleando la técnica colorimétrica del MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio), por Dña. Celia Prior, del grupo de investigación dirigido por el Dr. Alfonso Calvo.

Se evalúa también la actividad citotóxica de los compuestos *in vitro* en las líneas celulares tumorales: CCRF-CEM (leucemia linfoblástica aguda), HTB-54 (adenocarcinoma de pulmón), HT-29 (adenocarcinoma de colon) y MCF-7 (adenocarcinoma de mama) y en dos líneas celulares no tumorales: derivada de epitelio de mama (184B5) y derivada de epitelio bronquial (BEAS-2B). Se ha empleado la técnica colorimétrica del MTT siguiendo la metodología desarrollada por el NCI. Los compuestos han sido evaluados en el Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Pública de Navarra (UPNA), bajo la supervisión del Dr. Ignacio Encío.

## **3. ESTUDIO DE LA RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD**

Una vez evaluados todos los compuestos y conociendo su citotoxicidad se realiza un estudio de la relación estructura-actividad para poder mejorar la actividad citotóxica de los compuestos que se sintetizen posteriormente por el grupo y poder evaluar las variaciones estructurales realizadas. Los estudios se han llevado a cabo en la Sección de Modelización Molecular del Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Universidad de Navarra y han sido realizados por la Dra. María Font.

#### **4. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE INDUCCIÓN DE MUERTE CELULAR**

Se seleccionan tres compuestos líderes con los que se realizan estudios para determinar la capacidad de inducción de muerte celular de los derivados seleccionados en la línea celular tumoral MCF-7 (adenocarcinoma de mama), usándose la técnica de citometría de flujo. Los compuestos han sido evaluados en el Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Pública de Navarra (UPNA), bajo la supervisión del Dr. Ignacio Encío.

#### **5. EVALUACIÓN DE LA ALTERACIÓN DEL CICLO CELULAR**

Con los compuestos líderes se realizan estudios para determinar si afectan a las distintas etapas del ciclo celular en la línea celular tumoral MCF-7 (adenocarcinoma de mama), usándose la técnica de citometría de flujo. Los compuestos han sido evaluados en el Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Pública de Navarra (UPNA), bajo la supervisión del Dr. Ignacio Encío.

#### **6. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE MIGRACIÓN CELULAR**

En una estancia en el *Edinburgh Cancer Research UK Centre* de la Universidad de Edimburgo, bajo la supervisión de la Dra. Margaret Frame, se realizan estudios para evaluar la capacidad de los compuestos líderes de inhibir la migración celular. Estos experimentos se llevan a cabo en las líneas celulares tumorales de mama MCF-7 (adenocarcinoma de mama dependiente de estrógenos) y MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama independiente de estrógenos), utilizando la técnica de Wound Healing.

#### **7. PROFUNDIZACIÓN EN LOS POSIBLES MECANISMOS DE ACCIÓN**

Se realizan estudios para profundizar en los posibles mecanismos de acción de los compuestos líderes. Estos experimentos se llevan a cabo en las líneas celulares tumorales de mama MCF-7 (adenocarcinoma de mama dependiente de estrógenos) y MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama independiente de estrógenos), utilizando la técnica de Western Blot. Los compuestos han sido evaluados en el *Edinburgh Cancer Research UK Centre* de la Universidad de Edimburgo, bajo la supervisión de la Dra. Margaret Frame.

# **MATERIAL Y MÉTODOS**



# I. Síntesis Química

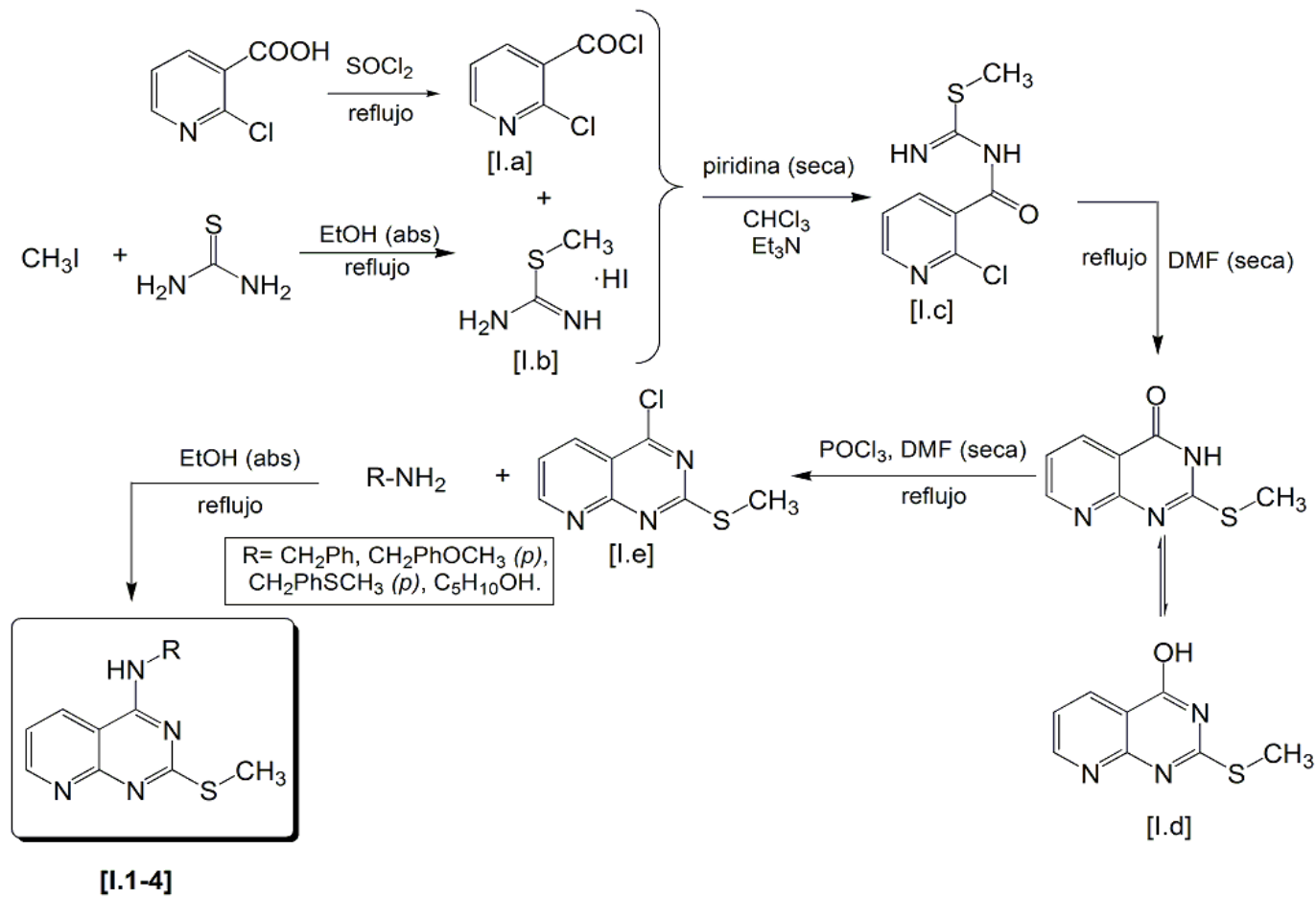




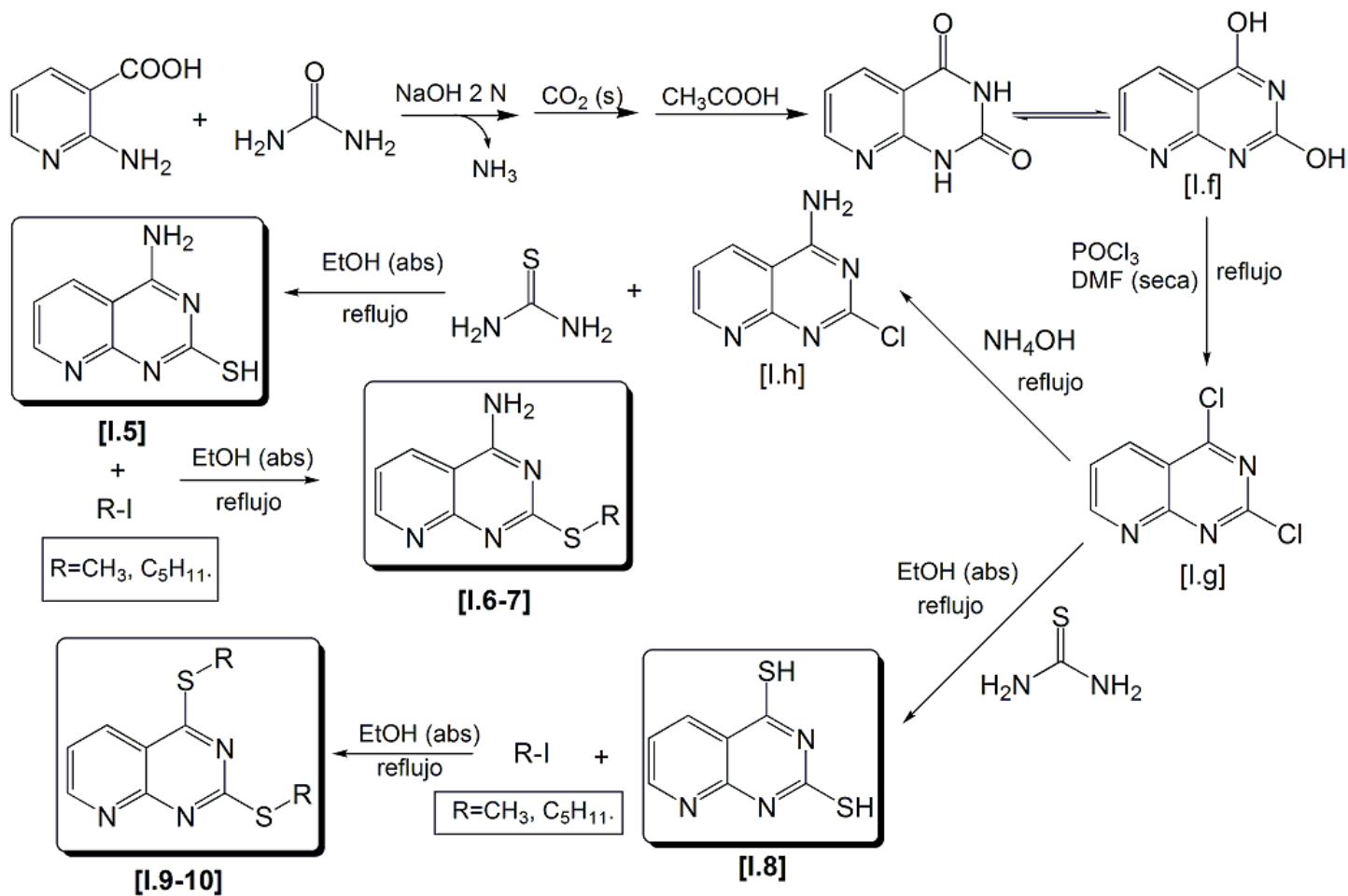
## 1. ESQUEMAS GENERALES DE SÍNTESIS

### 1.1 ESQUEMA GENERAL DE SÍNTESIS DE DERIVADOS DE PIRIDO[2,3-*d*]PIRIMIDINA DE LA SERIE I

#### 1.1.1 Esquema general de síntesis de derivados 4-alkilamino-2-metilio de pirido[2,3-*d*]pirimidina (I.1-4)

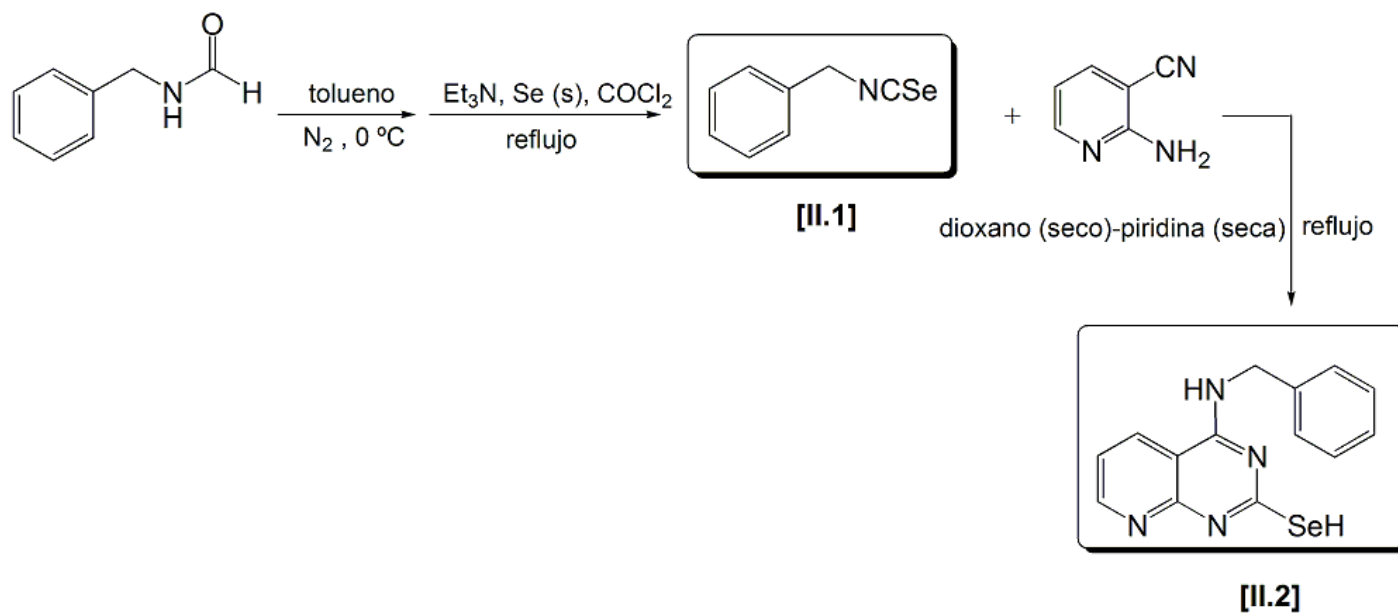


1.1.2 Esquema general de síntesis de derivados 2-alciltio-4-amino de pirido[2,3-*d*]pirimidina (I.5-7) y 2,4-dialciltio de pirido[2,3-*d*]pirimidina (I.8-10)

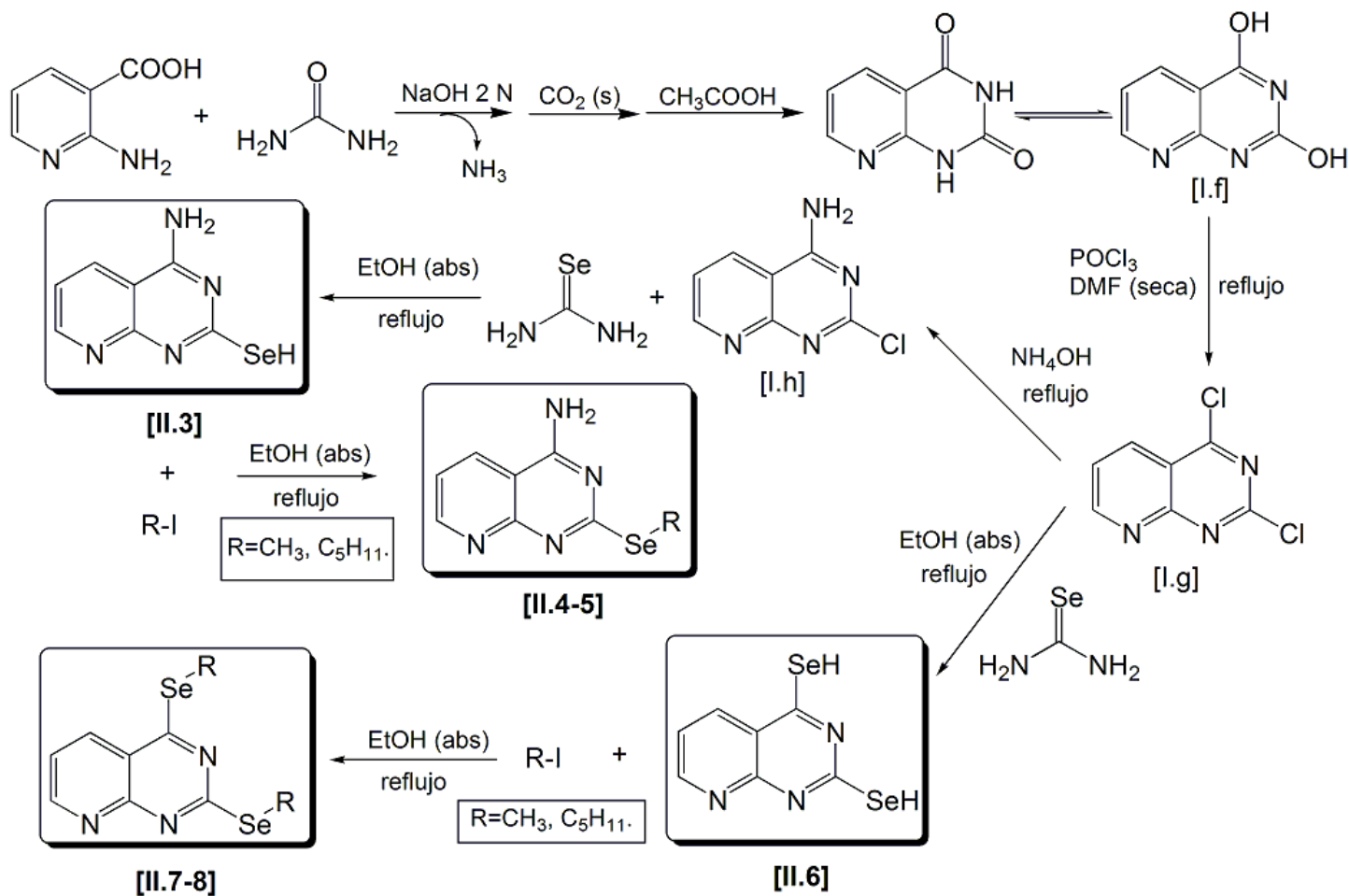


1.2 ESQUEMA GENERAL DE SÍNTESIS DE DERIVADOS DE PIRIDO[2,3-*d*]PIRIMIDINA DE LA SERIE II

1.2.1 Esquema de síntesis de 4-bencilamino-2-hidroselenopirido[2,3-*d*]pirimidina (II.1-2)

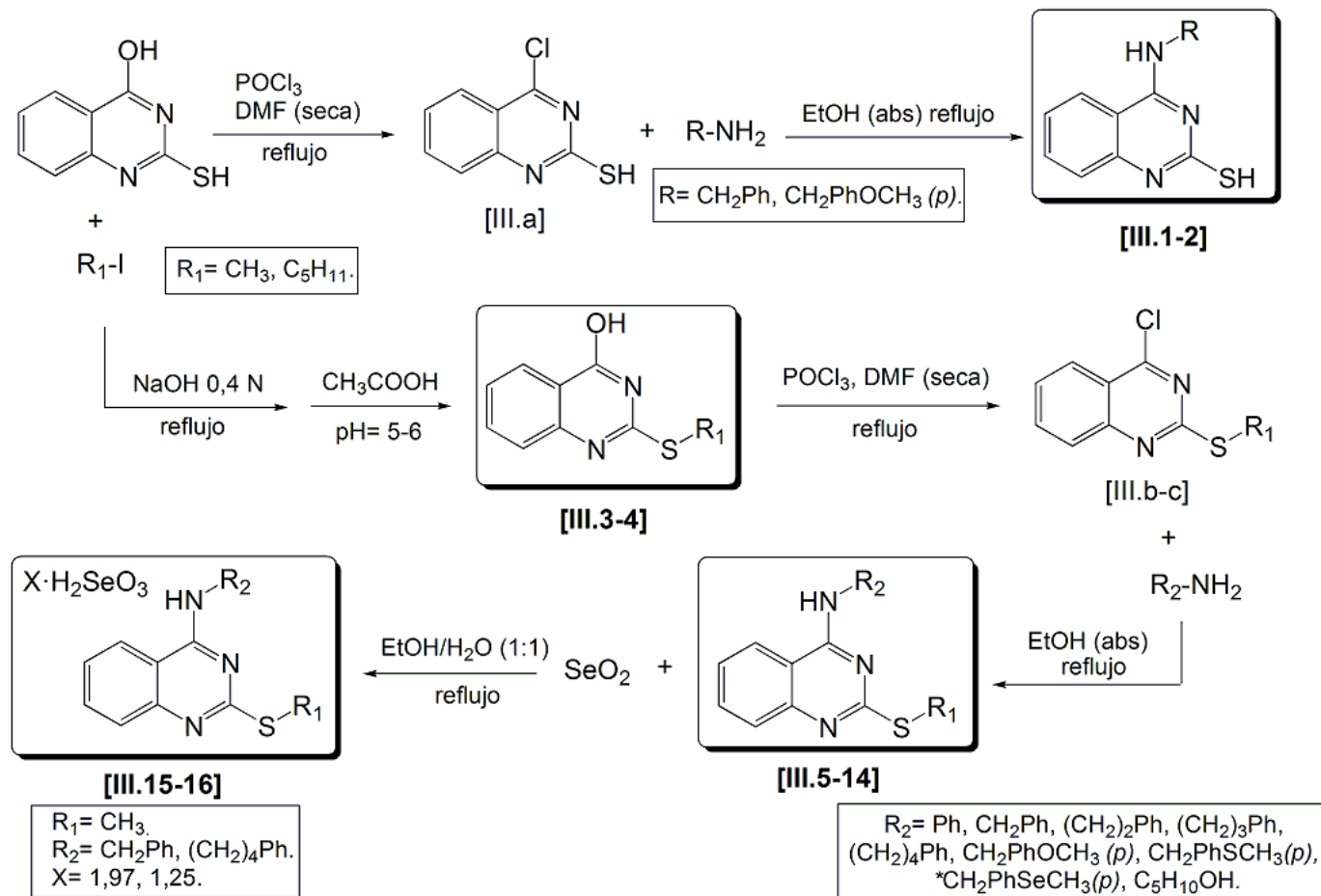


1.2.2 Esquema general de síntesis de derivados 2-alkilseleno-4-amino de pirido[2,3-*d*]pirimidina (II.3-5) y 2,4-dialkilseleno de pirido[2,3-*d*]pirimidina (II.6-8)

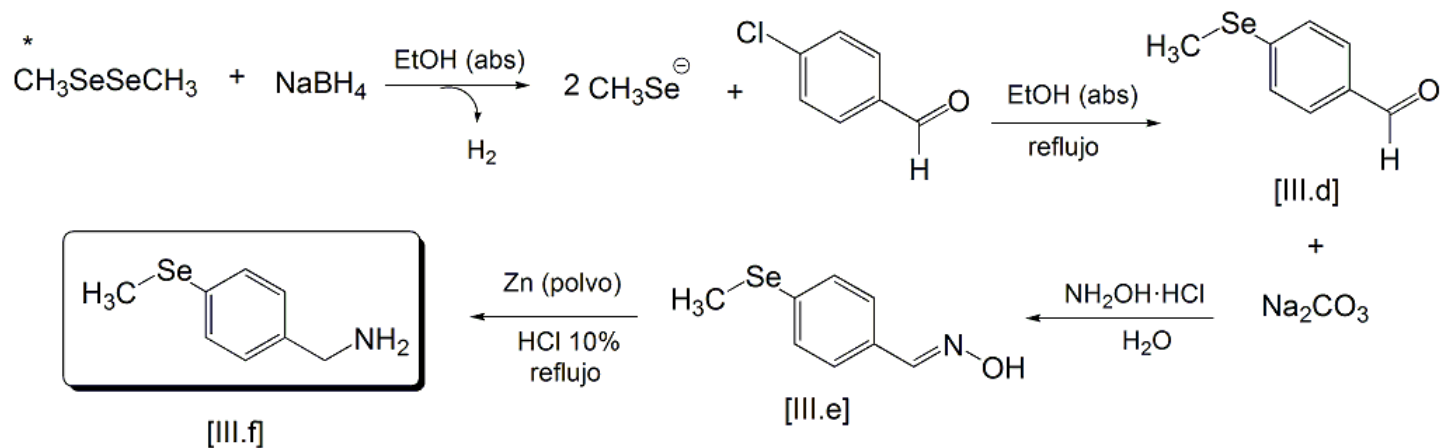


### 1.3 ESQUEMA GENERAL DE SÍNTESIS DE DERIVADOS DE QUINAZOLINA DE LA SERIE III

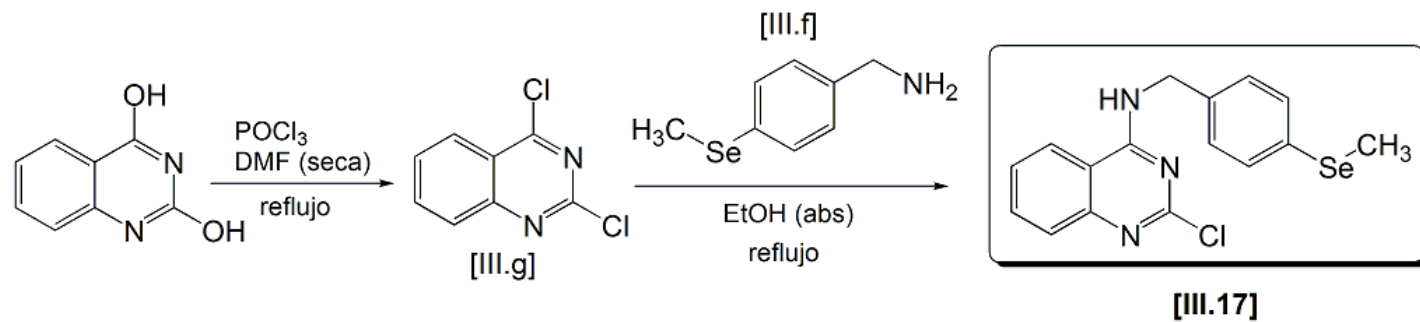
#### 1.3.1 Esquema general de síntesis de derivados 4-alkilamino-2-mercapto de quinazolina (III.1-2) y 4-alkil/arilamino-2-alkiltio de quinazolina (III.3-16)



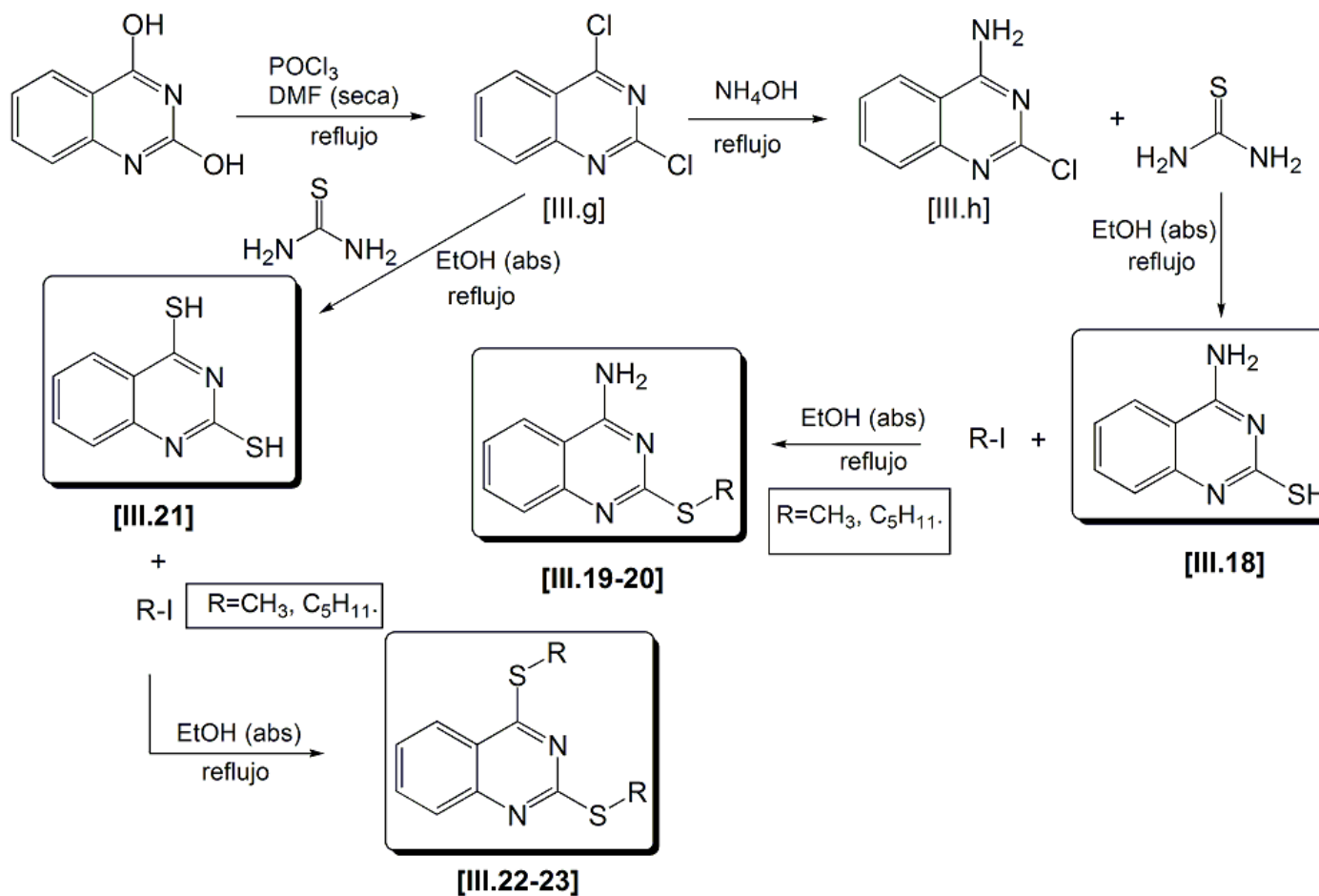
\* Síntesis de *p*-metilselenobencilamina (no comercial).



### 1.3.2 Esquema de síntesis de 2-cloro-4-(4-metilselenobencil)aminoquinazolina (III.17)

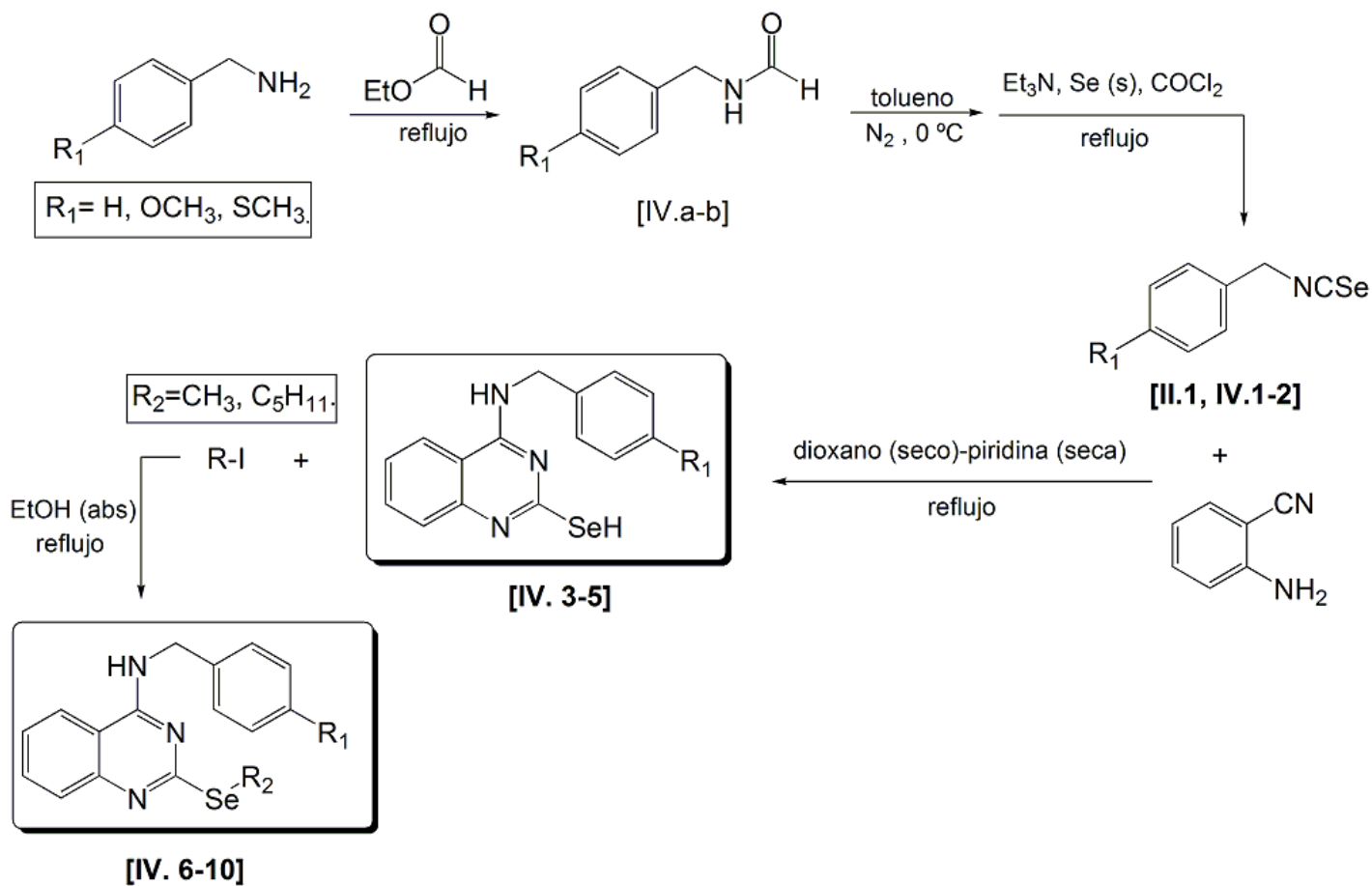


1.3.3 Esquema general de síntesis de derivados 2-alquiltio-4-amino de quinazolina (III.18-20) y 2,4-dialquiltio de quinazolina (III.21-23)



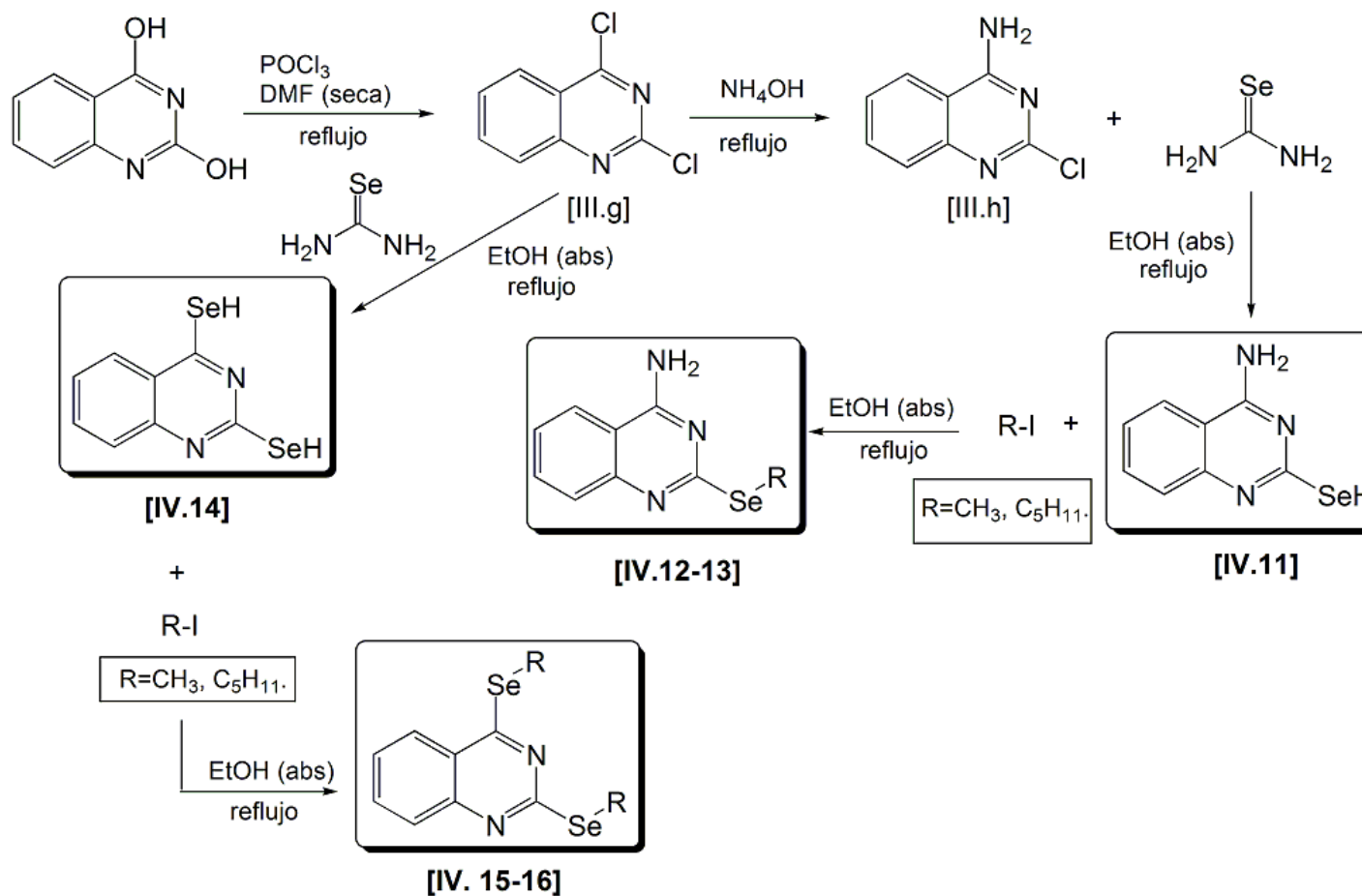
### 1.4 ESQUEMA GENERAL DE SÍNTESIS DE DERIVADOS DE QUINAZOLINA DE LA SERIE IV

#### 1.4.1 Esquema general de síntesis de derivados 4-alkilamino-2-alkilseleno de quinazolina (IV.1-10)





1.4.2 Esquema general de síntesis de derivados 2-alkilseleno-4-amino de quinazolina (IV.11-13) y 2,4-dialkilseleno de quinazolina (IV.14-16)



## 2. MÉTODOS DE SÍNTESIS

### 2.1 DERIVADOS DE PIRIDO[2,3-*d*]PIRIMIDINA DE LA SERIE I

#### 2.1.1 Derivados 4-alkilamino-2-metiltio de pirido[2,3-*d*]pirimidina I.1-4 (SERIE I)

Las etapas que se han llevado a cabo para la síntesis de los derivados 4-alkilamino-2-metiltio de pirido[2,3-*d*]pirimidina I.1-4 aparecen a continuación:

1. Síntesis de 1-(2-cloro-3-piridincarbonil)-*S*-metilpseudotiourea, por reacción del cloruro de 2-cloronicotinoilo con *S*-metilpseudotiourea (hidrioduro).
2. Síntesis de 2-metiltio-3,4-dihidro-4-oxopirido[2,3-*d*]pirimidina por ciclación intramolecular de *S*-metilpseudotiourea.
3. Funcionalización de la posición 4 del anillo de pirido[2,3-*d*]pirimidina por diferentes aminas aromáticas ó alifáticas con distintos sustituyentes para provocar modificaciones en la densidad electrónica de la molécula y comprobar factores estéricos.

##### 2.1.1.1 Síntesis del cloruro de 2-cloronicotinoilo (I.a)

Se obtiene con rendimiento prácticamente cuantitativo por tratamiento del ácido 2-cloro-3-piridincarboxílico con cloruro de tionilo a reflujo durante 2 horas. El ión cloruro es muy buen saliente y confiere una gran reactividad al carbonilo ante compuestos nucleófilos.

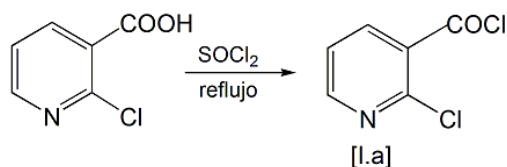


Figura 69: Síntesis de cloruro de 2-cloronicotinoilo.

El mecanismo de reacción propuesto (figura 70) pasa por un ataque nucleófilo el oxígeno sobre el azufre y formación de un intermedio tetraédrico. Posteriormente, tiene lugar la regeneración del grupo sulfonilo y la salida de un ión cloruro, con formación del grupo carbonilo y desprendimiento de gases.

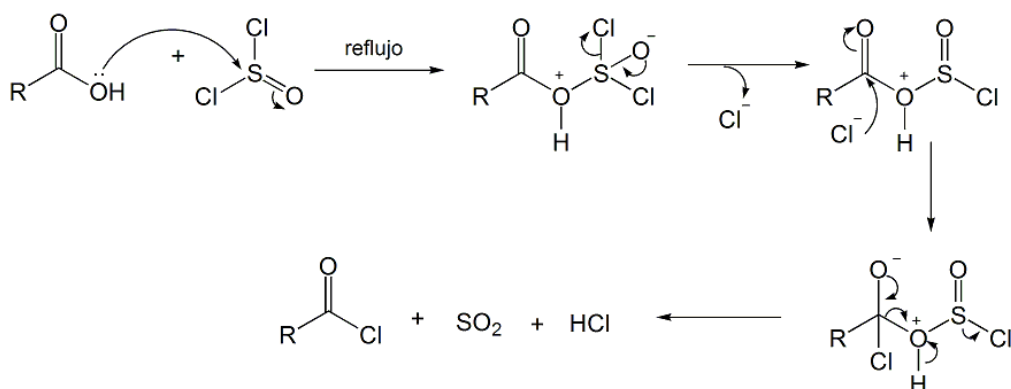


Figura 70: Mecanismo de reacción propuesto para la síntesis de 2-cloronicotinoilo.

### 2.1.1.2 Síntesis de S-metilpseudotiourea (I.b)

La síntesis de S-metilpseudotiourea se lleva a cabo con ligeras modificaciones sobre el método convencional (Brand, E., 1955). Por reacción de tiourea con ioduro de metilo en etanol absoluto a reflujo durante 1,5 horas se llega al derivado deseado con rendimiento del 90 %. El mecanismo de reacción propuesto se trata de una sustitución nucleófila de orden 2 ( $S_N2$ ) apreciándose la mayor nucleofilia del azufre frente al nitrógeno en este tipo de reacciones (figura 71).

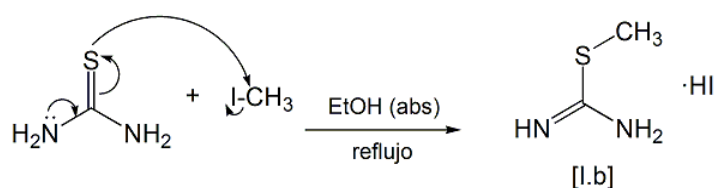


Figura 71: Mecanismo de reacción propuesto para la metilación de tiourea.

### 2.1.1. 3 Síntesis de 1-(2-cloro-3-piridincarbonil)-S-metilpseudotiourea (I.c)

La síntesis del intermedio ureídico, necesario para acceder al núcleo piridopirimidínico, se lleva a cabo por reacción de cloruro de 2-cloronicotinoilo con S-metilpseudotiourea y trietilamina en proporción molar 1:1:2, respectivamente, utilizando como disolvente cloroformo seco y una catálisis básica de piridina y trietilamina a temperatura ambiente durante 48 horas. El mecanismo de reacción propuesto para la formación de 1-(2-cloro-3-piridincarbonil)-S-metilpseudotiourea se muestra en la figura 72. El hecho de utilizar catálisis de trietilamina parte de la experiencia de nuestro grupo investigador (Sanmartín, C., 1988), ya que al utilizar S-metilpseudotiourea (hidroioduro) con cloruro de 2-cloronicotinoilo utilizando como disolvente una mezcla de cloroformo/piridina a temperatura ambiente, rinde el derivado 1,3-bis(2-cloro-3-piridincarbonil)-S-metilpseudotiourea sin que se pueda aislar el ureído precursor.

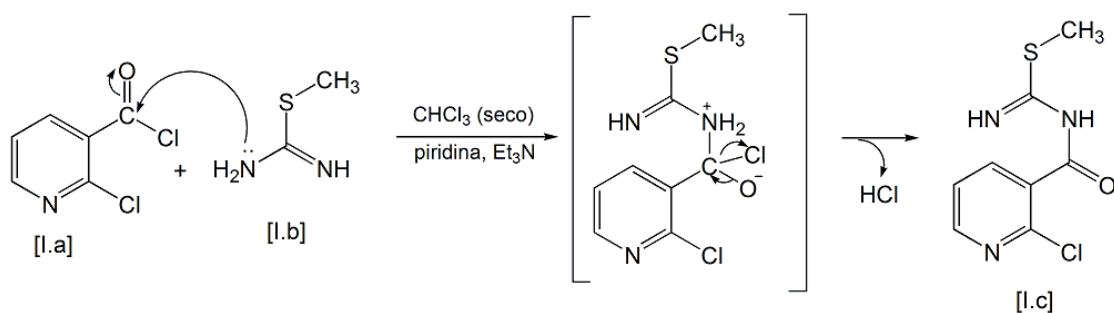


Figura 72: Mecanismo de reacción propuesto para la formación del derivado ureídico.

#### 2.1.1.4 Síntesis de 2-metiltiopirido[2,3-*d*]pirimidin-4(3*H*)-ona (I.d)

La síntesis de **I.d** a partir del derivado pseutioureido **I.c** tiene lugar mediante calefacción, produciéndose de esta manera la ciclación. Esta síntesis se ha llevado a cabo en diferentes medios, eligiéndose *N,N*-dimetilformamida como el mejor de ellos, debido a su alto punto de ebullición y a que es un disolvente polar y aprótico. Permite la obtención del derivado **I.d** en un tiempo de reacción corto (apenas 3 minutos) y con rendimientos entre un 60-70 %. La termociclación debe llevarse a cabo en condiciones anhidras, ya que el derivado **I.d** se hidroliza con facilidad y, además, esta hidrólisis está catalizada por el propio ácido clorhídrico desprendido en la reacción.

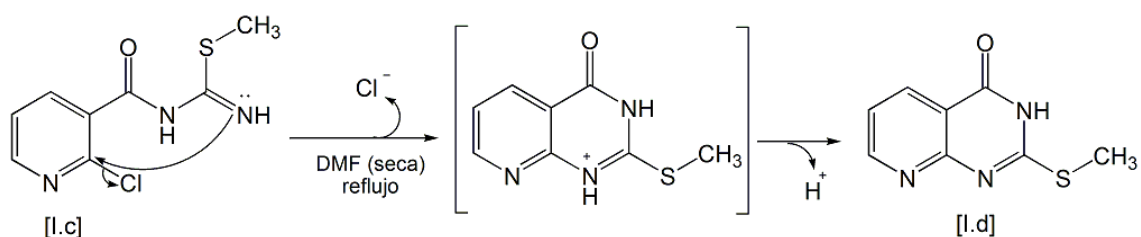


Figura 73: Mecanismo de reacción propuesto para la síntesis de 2-metiltiopirido[2,3-*d*]pirimidin-4(3*H*)-ona.

#### 2.1.1.5 Síntesis de 4-cloro-2-metiltiopirido[2,3-*d*]pirimidina (I.e)

A partir del derivado **I.d**, por tratamiento con cloruro de fosforilo a reflujo durante 2 horas y unas gotas de *N,N*-dimetilformamida como catalizador, se llega al intermedio **I.e**, lográndose la cloración en la posición 4. El mecanismo de reacción propuesto (figura 74) es una sustitución nucleófila de orden 2, iniciada por el ataque del doble enlace del grupo carbonilo sobre el átomo de fósforo y salida de un anión cloruro del grupo cloruro de fosforilo. A continuación, se produce el ataque de este anión cloruro y posterior salida del grupo  $\text{PCl}_2\text{O}_2^-$ , que es un grupo muy buen saliente. Estos compuestos son relativamente inestables por su alta capacidad de hidrólisis.

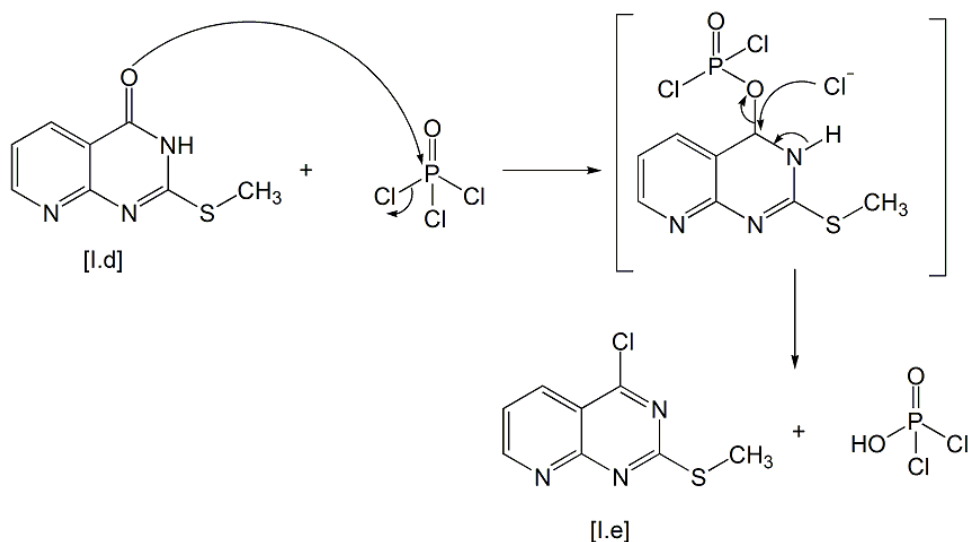


Figura 74: Mecanismo de reacción propuesto para la obtención de 4-cloro-2-metiltiopirido[2,3-*d*]pirimidina.

### 2.1.1.6 Síntesis de derivados 4-alkilamino-2-metilthio de pirido[2,3-*d*]pirimidina (I.1-4)

La síntesis hasta llegar a los productos finales de la serie I se basa en la reacción del cloroderivado **I.e** con la amina correspondiente en proporción molar 1:1,5, respectivamente, en etanol absoluto a reflujo durante 5 horas, obteniéndose los compuestos con rendimientos entre 4-95 %. El mecanismo de acción propuesto se corresponde con una sustitución nucleófila aromática en la que el par de electrones libres del nitrógeno de la amina ataca al carbono unido directamente al cloro formándose un intermedio tetraédrico y perdiendo la aromaticidad, ya que el nitrógeno queda con carga negativa. Posteriormente, sale el cloro al medio como cloruro restaurando la aromaticidad en la molécula y se elimina un protón (figura 75).

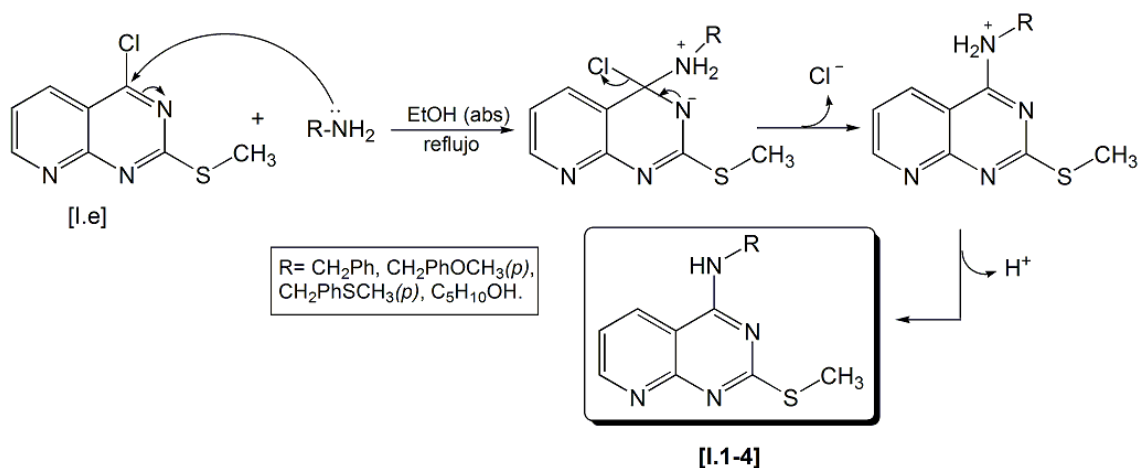


Figura 75: Mecanismo de reacción propuesto para la síntesis de los derivados I.1-4.

### 2.1.2 Derivados 2-alcilto-4-amino de pirido[2,3-*d*]pirimidina I.5-7 (SERIE I)

Las etapas que se han llevado a cabo para la síntesis de los derivados 2-alcilto-4-amino de pirido[2,3-*d*]pirimidina I. 5-7 se indican a continuación:

1. Síntesis de pirido[2,3-*d*]pirimidin-2,4(1*H*,3*H*)-diona por reacción del ácido 2-aminonicotínico con urea.
2. Síntesis de 2,4-dicloropirido[2,3-*d*]pirimidina por reacción de pirido[2,3-*d*]pirimidin-2,4(1*H*,3*H*)-diona con cloruro de fosforilo.
3. Síntesis de 4-amino-2-cloropirido[2,3-*d*]pirimidina por reacción de 2,4-dicloropirido[2,3-*d*]pirimidina con hidróxido amónico.
4. Síntesis de 4-amino-2-mercaptopirido[2,3-*d*]pirimidina por reacción de 4-amino-2-cloropirido[2,3-*d*]pirimidina con tiourea.
5. Funcionalización de la posición 2 del anillo de pirido[2,3-*d*]pirimidina por diferentes ioduros de alquilo para comprobar el efecto volumen en esta sustitución.

#### 2.1.2.1 Síntesis de pirido[2,3-*d*]pirimidin-2,4(1*H*,3*H*)-diona (I.f)

La pirido[2,3-*d*]pirimidin-2,4(1*H*,3*H*)-diona (I.f) se obtiene por condensación del ácido 2-aminonicotínico con urea a 210 °C, produciéndose de esta manera una fusión en estado sólido con desprendimiento de vapores de NH<sub>3</sub>. Posteriormente, el residuo se trata con hidróxido sódico 2 N, nieve carbónica y ácido acético glacial, rindiendo la pirido[2,3-*d*]pirimidina deseada con rendimientos en torno al 80 %. Esta ruta sintética es una de las más utilizadas para llegar al derivado de pirido[2,3-*d*]pirimidina (Robins, R.K., 1955). El mecanismo propuesto para esta reacción es una sustitución en el acilo seguida de una adición nucleófila a carbonilo intramolecular. El par de electrones libres del nitrógeno de urea atacan al carbonilo de ácido y, después de una reorganización electrónica, protonación del hidroxilo y eliminación de agua, el par de electrones libres del nitrógeno de la amina del ácido 2-aminonicotínico vuelven a atacar al carbonilo de urea liberándose amoniaco. El mecanismo queda reflejado en la figura 76.

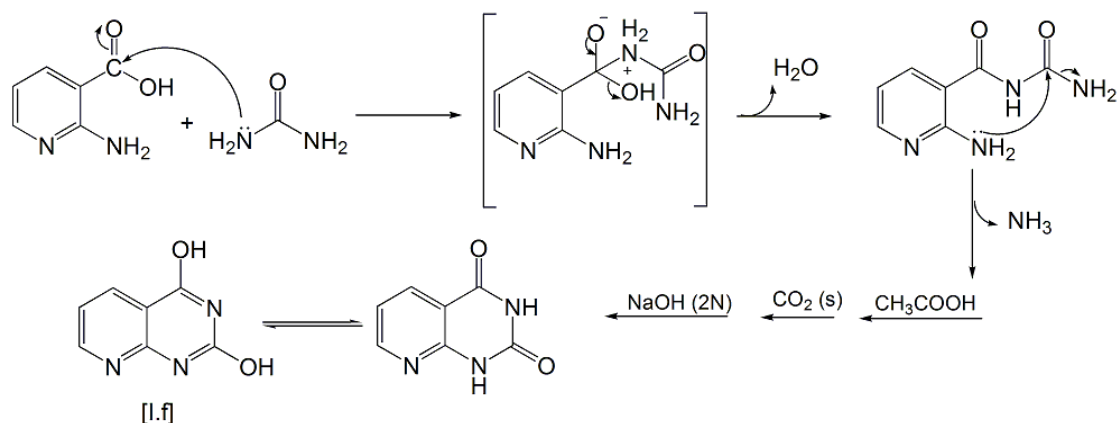


Figura 76: Mecanismo de reacción propuesto para la formación de pirido[2,3-*d*]pirimidin-2,4(1*H*,3*H*)-diona.

### 2.1.2.2 Síntesis de 2,4-dicloropirido[2,3-*d*]pirimidina (I.g)

El derivado **I.f** permite llegar al intermedio diclorado **I.g** por tratamiento con cloruro de fosforilo y *N,N*-dimetilformamida a reflujo durante 24 horas. El mecanismo propuesto es similar al propuesto en la figura 74 para la obtención del intermedio **I.e**.

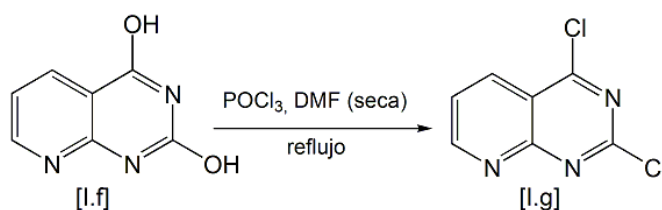


Figura 77: Síntesis de 2,4-dicloropirido[2,3-*d*]pirimidina.

### 2.1.2.3 Síntesis de 4-amino-2-cloropirido[2,3-*d*]pirimidina (I.h)

Una vez obtenido el derivado diclorado (**I.g**) se procede a sintetizar la 4-amino-2-cloropirido[2,3-*d*]pirimidina (**I.h**) por tratamiento de éste con una disolución acuosa de hidróxido amónico al 25 % durante 1,5 horas a reflujo. El mecanismo propuesto pasa por una sustitución nucleófila aromática (SNA).

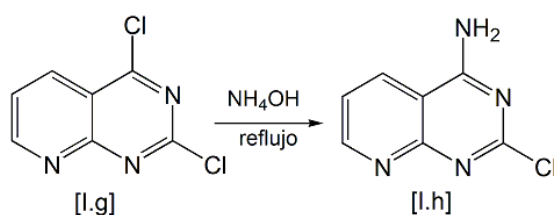


Figura 78: Síntesis de 4-amino-2-cloropirido[2,3-*d*]pirimidina.

### 2.1.2.4 Síntesis de 4-amino-2-mercaptopirido[2,3-*d*]pirimidina (I.5)

La 4-amino-2-cloropirido[2,3-*d*]pirimidina (**I.h**) por reacción con tiourea en etanol absoluto a reflujo durante 5 horas, rinde el derivado 4-amino-2-mercaptopirido[2,3-*d*]pirimidina (**I.5**). El mecanismo de reacción cursa vía sustitución nucleófila aromática (SNA) en la que se produce un ataque del par de electrones libres del azufre al carbono 2 de pirido[2,3-*d*]pirimidina unido directamente a cloro. Este ataque está justificado porque este carbono tiene una densidad de carga positiva grande al estar unido a un cloro y a un nitrógeno. El heterociclo va a perder así la aromaticidad y, posteriormente, recupera esta aromaticidad saliendo al medio el átomo de cloro. El par de electrones libres del oxígeno del etanol (disolvente de la reacción) atacan al carbono de la tiourea de partida produciéndose la ruptura del enlace C-S y obteniéndose así el intermedio requerido (figura 79).

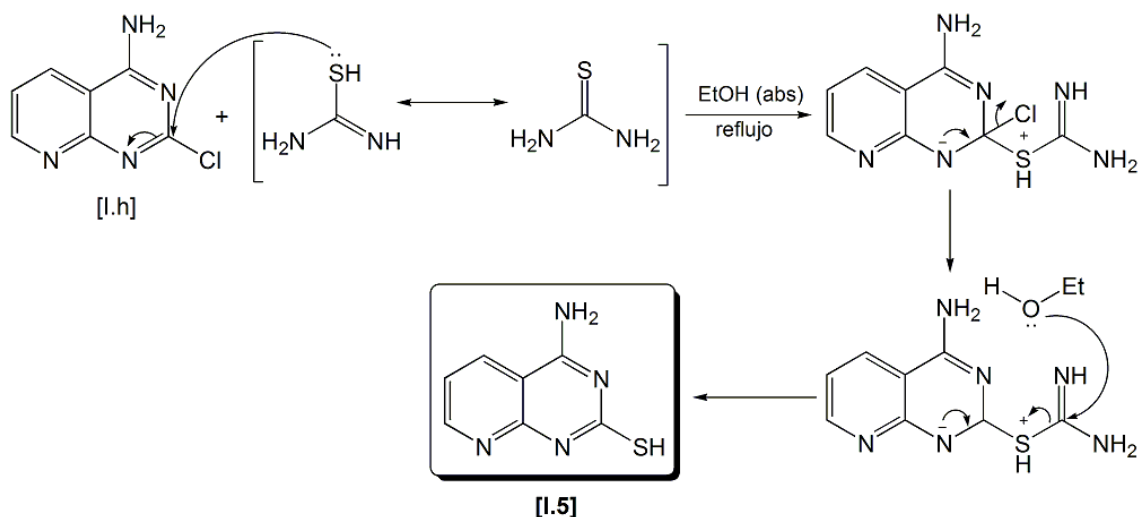


Figura 79: Mecanismo de reacción para la síntesis del derivado 4-amino-2-mercaptopyrido[2,3-*d*]pirimidina.

### 2.1.2.5 Síntesis de derivados 2-alciltio-4-amino de pirido[2,3-*d*]pirimidina (I.6-7)

El derivado 4-amino-2-mercaptopyrido[2,3-*d*]pirimidina (I.5) por tratamiento con los correspondientes ioduros de alquilo en etanol absoluto, a reflujo durante 1,5 horas, rinde los productos finales I.6-7 con rendimientos entre 25-45 %. El mecanismo de reacción por el que transcurre la reacción es una sustitución nucleófila de orden 2 en la que el par de electrones libres del azufre va a atacar al resto alquilo liberando al medio ioduro y, posteriormente, para neutralizar la carga de la molécula saldrá el protón al medio de reacción. El mecanismo queda reflejado en la figura 80.

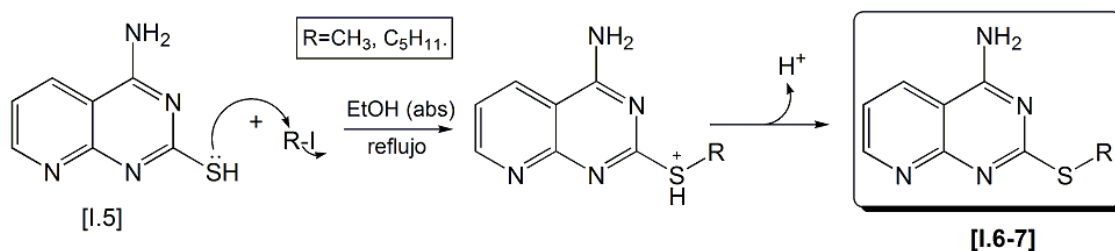


Figura 80: Mecanismo de reacción para la síntesis de derivados 2-alciltio-4-amino de pirido[2,3-*d*]pirimidina.

### 2.1.3 Derivados 2,4-dialquiltio de pirido[2,3-*d*]pirimidina I.8-10 (SERIE I)

Las etapas que se han llevado a cabo para la síntesis de los derivados 2,4-dialquiltio de pirido[2,3-*d*]pirimidina I.8-10 se enumeran a continuación:

1. Síntesis de pirido[2,3-*d*]pirimidin-2,4(1*H*,3*H*)-diona por reacción del ácido 2-aminonicotínico con urea.
2. Síntesis de 2,4-dicloropirido[2,3-*d*]pirimidina por reacción de pirido[2,3-*d*]pirimidin-2,4(1*H*,3*H*)-diona con cloruro de fosforilo.



3. Síntesis de 2,4-dimercaptopirido[2,3-*d*]pirimidina por reacción de 2,4-dicloropirido[2,3-*d*]pirimidina con tiourea.
4. Funcionalización de las posiciones 2 y 4 del anillo de pirido[2,3-*d*]pirimidina por diferentes ioduros de alquilo para comprobar la influencia de factores estéricos.

### 2.1.3.1 Síntesis de 2,4-dimercaptopirido[2,3-*d*]pirimidina (I.8)

La 2,4-dicloropirido[2,3-*d*]pirimidina (**I.g**), cuya síntesis se ha expuesto con anterioridad (apartado 2.1.2.2), por tratamiento con tiourea en proporción molar 1:2, respectivamente, en etanol absoluto a reflujo durante 5 horas, da lugar al intermedio 2,4-dimercaptopirido[2,3-*d*]pirimidina (**I.8**), tal y como aparece en la figura 81. El mecanismo por el que transcurre la reacción es una sustitución nucleófila aromática y es similar al propuesto con anterioridad en la figura 79 aunque, en este caso, el azufre como nucleófilo se sustituye en las posiciones 2 y 4 propiciado por la cualidad de buen saliente de los cloros sustituidos.

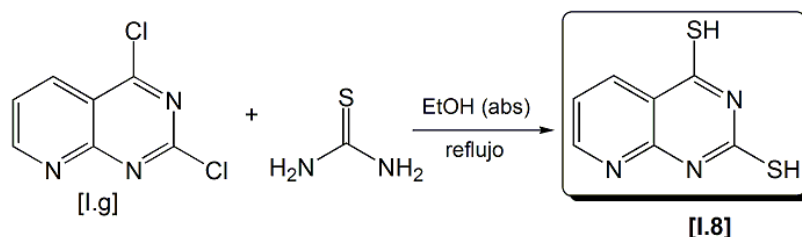


Figura 81: Síntesis del intermedio 2,4-dimercaptopirido[2,3-*d*]pirimidina.

### 2.1.3.2 Síntesis de derivados 2,4-dialquiltio de pirido[2,3-*d*]pirimidina (I.9-10)

El derivado 2,4-dimercaptopirido[2,3-*d*]pirimidina (**I.8**) por tratamiento con los correspondientes ioduros de alquilo en etanol absoluto y a reflujo durante 1,5 horas, rinde los productos finales **I.9-10** con rendimientos entre 15-20 % (figura 82). El mecanismo de reacción cursa igual que el explicado en la figura 80 y se trata de una  $S_N2$ .

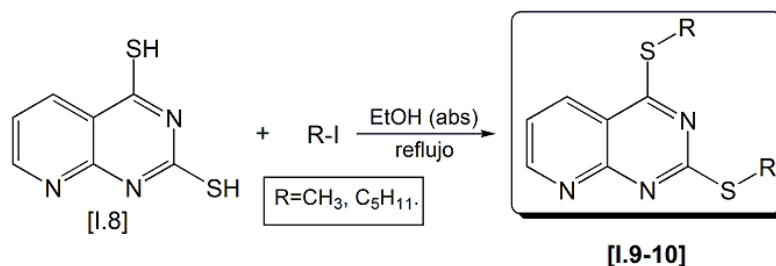


Figura 82: Formación de derivados 2,4-dialquiltio de pirido[2,3-*d*]pirimidina.

## **2.2 DERIVADOS DE PIRIDO[2,3-*d*]PIRIMIDINA DE LA SERIE II**

### **2.2.1 Intentos de síntesis para la obtención de derivados de 4-alquilamino-2-alquilseleno de pirido[2,3-*d*]pirimidina**

Los principales problemas encontrados en la síntesis de los compuestos que se presentan en esta Memoria han correspondido a derivados 4-alquilamino-2-alquilseleno de pirido[2,3-*d*]pirimidina (serie II). A continuación, se detallan las vías de síntesis que no han rendido los compuestos esperados:

**A)** Por reacción del ácido 2-aminonicotínico con urea se obtiene el compuesto pirido[2,3-*d*]pirimidin-2,4(1*H*,3*H*)-diona (**I.f**). Posteriormente, este derivado se trata con cloruro de fosforilo y *N,N*-dimetilformamida rindiendo el derivado diclorado (**I.g**), como se ha explicado con anterioridad (apartados 2.1.2.1 y 2.1.2.2). El derivado diclorado **I.g** es muy inestable y se hidroliza fácilmente por lo que, sin más purificación, es tratado con la amina correspondiente en proporción molar 1:1,5, respectivamente, obteniéndose los derivados 4-alquilamino-2-cloro de pirido[2,3-*d*]pirimidina. Posteriormente, estos derivados se tratan con selenourea en proporción molar 1:1,1, respectivamente, en etanol absoluto a reflujo durante 5 horas (Mautner, H., 1956) con el fin de introducir el grupo hidroseleno en posición 2, pero mediante esta vía de síntesis no se logran los derivados deseados.

**B)** Por reacción de borohidruro sódico y selenio metal (polvo) en proporción molar 2:1, respectivamente, en agua a temperatura ambiente, se genera el agente nucleófilo seleniuro de hidrógeno sódico (NaHSe) (Klayman, D.L., 1973). La reacción es exotérmica y produce tetraborato sódico, hidrógeno y el producto deseado. Posteriormente, se añade el seleniuro de hidrógeno sódico a los derivados 4-alquilamino-2-cloro de pirido[2,3-*d*]pirimidina, sintetizados con anterioridad, en proporción molar 1,1:1, respectivamente. La reacción se prolonga a reflujo en etanol absoluto y se sigue por CCF (cromatografía en capa fina). Por esta vía de síntesis no se logran ninguno de los derivados 4-alquilamino-2-hidroseleno de pirido[2,3-*d*]pirimidina.

**C)** Se realiza una modificación del método por el cual se han sintetizado los derivados 4-alquilamino-2-metilto de pirido[2,3-*d*]pirimidina de la serie I. Dicha modificación consiste en el uso de selenourea en vez de tiourea manteniendo las condiciones de reacción. Por reacción del cloruro de 2-cloronicotinoilo con Se-metilpseudoselenourea en proporción molar 1:1,5, respectivamente, en cloroformo, piridina seca y trietilamina a temperatura ambiente durante 48 horas, no se ha obtenido el derivado 1-(2-cloro-3-piridincarbonil)-Se-metilpseudoselenourea.

**D)** Se realiza una modificación del método seguido para la obtención del derivado pirido[2,3-*d*]pirimidin-2,4(1*H*,3*H*)-diona (serie I). Si dicho derivado se obtiene a partir de la reacción del ácido 2-aminonicotínico con urea (Robins, R.K., 1955), se pretende llegar al derivado 2-

hidroseleno-4-hidroxipirido[2,3-*d*]pirimidina por reacción del ácido 2-aminonicotínico con selenourea, manteniendo las condiciones de reacción y las proporciones. Después de los intentos, mediante esta vía de síntesis análoga no se consigue el derivado 2-hidroseleno-4-hidroxipirido[2,3-*d*]pirimidina ya que, como la reacción transcurre vía fusión en estado sólido y tiene lugar a 210 °C, la selenourea se descompone antes de fundir.

### 2.2.2 Síntesis de 4-bencilamino-2-hidroselenopirido[2,3-*d*]pirimidina II.1-2 (SERIE II)

Las etapas que se han llevado a cabo para la síntesis de 4-bencilamino-2-hidroselenopirido[2,3-*d*]pirimidina II.1-2 se enumeran a continuación:

1. Síntesis de bencilisosenocianato a partir de bencilamida
2. Síntesis de 4-bencilamino-2-hidroselenopirido[2,3-*d*]pirimidina por reacción de bencilisosenocianato con 2-amino-3-cianopiridina.

#### 2.2.2.1 Síntesis de bencilisosenocianato (II.1)

*N*-bencilformamida comercial se hace reaccionar en tolueno seco con trietilamina, selenio en polvo y fosgeno en proporción molar 1:4:1,5:1,5, respectivamente, en baño de hielo y bajo atmósfera de nitrógeno. Posteriormente, se mantiene la reacción a reflujo durante 24 horas (Attanassov, P.K., 2004; Sharma, A.K., 2008). Tras purificar el residuo por cromatografía en columna, se obtiene el bencilisosenocianato con rendimiento bajo.

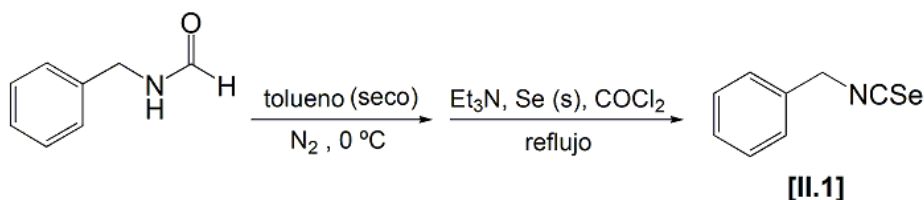
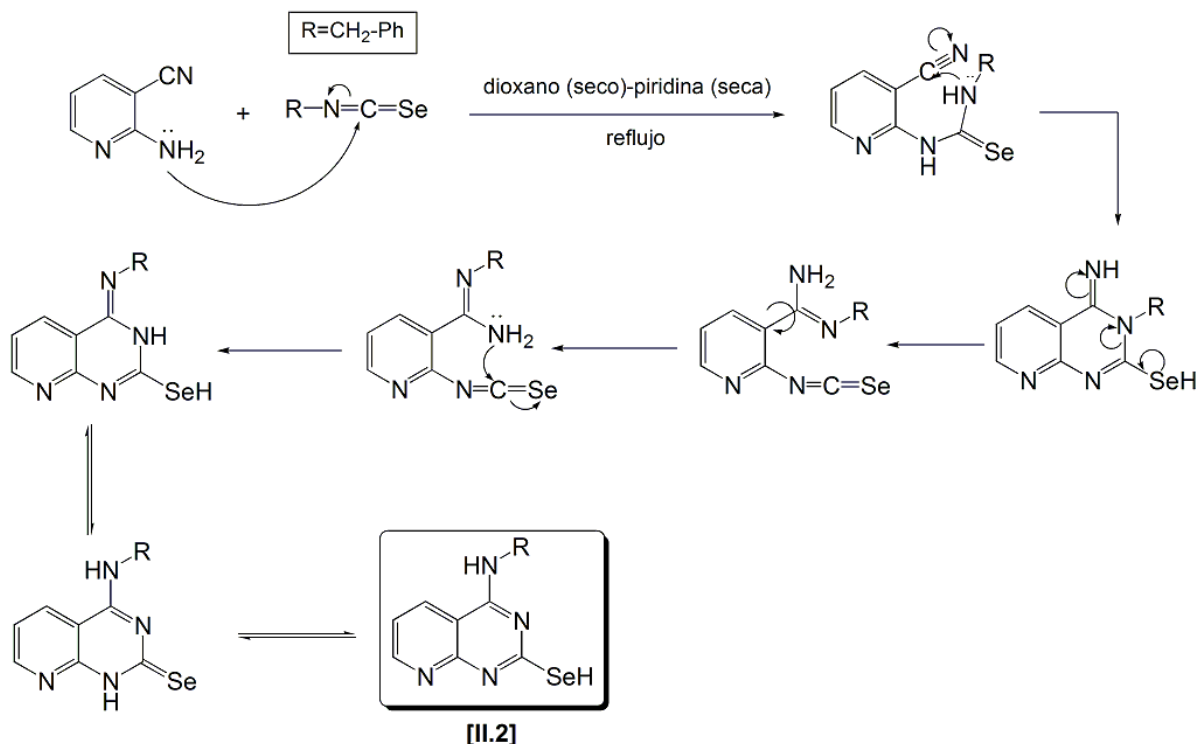


Figura 83: Síntesis de bencilisosenocianato.

#### 2.2.2.2 Síntesis de 4-bencilamino-2-hidroselenopirido[2,3-*d*]pirimidina (II.2)

El bencilisosenocianato formado se hace reaccionar con 2-amino-3-cianopiridina (en proporción molar 1:1,2) a reflujo durante 24 horas utilizando como disolvente una mezcla de dioxano (seco) y piridina (seca) en proporción 7,5:1 en volumen, respectivamente (Verma, S.S., 1987), rindiendo la 4-bencilamino-2-hidroselenopirido[2,3-*d*]piridina con un 7 % de rendimiento. El mecanismo de reacción por el que transcurre la reacción se debe a la adición del grupo amino de la 2-amino-3-cianopiridina al bencilisosenocianato para rendir el derivado de selenourea, el cual, tras una reorganización electrónica, cicla hasta llegar al derivado de pirido[2,3-*d*]pirimidina. Posteriormente, por vía isomerización, el anillo se abre y tras una nueva

reorganización se cierra definitivamente llegando al producto deseado y a todos sus tautómeros (Atanassov, P.K., 2004). La figura 84 muestra el mecanismo propuesto.



**Figura 84:** Mecanismo de reacción propuesto para la síntesis de 4-bencilamino-2-hidroselenopirido[2,3-*d*]pirimidina.

El método de síntesis para la obtención de los derivados 4-alkilamino-2-alkilseleno de pirido[2,3-*d*]pirimidina a partir de los isoselenocianatos correspondientes, sólo se ha logrado con éxito para el compuesto 4-bencilamino-2-hidroselenopirido[2,3-*d*]pirimidina (II.2), con unos rendimientos muy bajos (7 %). En los demás casos los isoselenocianatos no han reaccionado con la 2-amino-3-cianopiridina.

### 2.2.3 Derivados 2-alkilseleno-4-amino de pirido[2,3-*d*]pirimidina II.3-5 (SERIE II)

Las etapas que se han llevado a cabo para la síntesis de los derivados 2-alkilseleno-4-amino de pirido[2,3-*d*]pirimidina II.3-5 se exponen a continuación:

1. Síntesis de pirido[2,3-*d*]pirimidin-2,4(1*H*,3*H*)-diona por reacción del ácido 2-aminonicotínico con urea.
2. Síntesis de 2,4-dicloropirido[2,3-*d*]pirimidina por reacción de pirido[2,3-*d*]pirimidin-2,4(1*H*,3*H*)diona con cloruro de fosforilo.
3. Síntesis de 4-amino-2-cloropirido[2,3-*d*]pirimidina por reacción de 2,4-dicloropirido[2,3-*d*]pirimidina con hidróxido amónico.
4. Síntesis de 4-amino-2-hidroselenopirido[2,3-*d*]pirimidina por reacción de 4-amino-2-cloropirido[2,3-*d*]pirimidina con selenourea.

5. Funcionalización de la posición 2 del anillo de pirido[2,3-*d*]pirimidina por diferentes ioduros de alquilo para comprobar el efecto volumen en esta sustitución.

### 2.2.3.1 Síntesis de 4-amino-2-hidroselenopirido[2,3-*d*]pirimidina (II.3)

El derivado 4-amino-2-cloropirido[2,3-*d*]pirimidina (**I.h**) (cuya síntesis se indica en el apartado 2.1.2) por reacción con selenourea en etanol absoluto a reflujo durante 5 horas, rinde el derivado 4-amino-2-hidroselenopirido[2,3-*d*]pirimidina (**II.3**) con un rendimiento entre 60-70 %. El mecanismo de reacción pasa por una sustitución nucleófila aromática (SNA) paralelo al expresado en la figura 79.

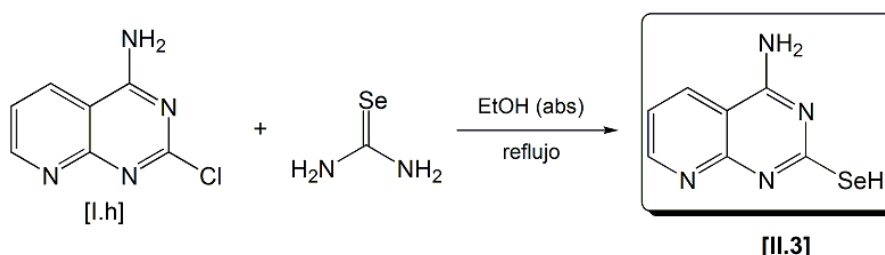


Figura 85: Síntesis de 4-amino-2-hidroselenopirido[2,3-*d*]pirimidina.

### 2.2.3.2 Síntesis de derivados 2-alkilseleno-4-amino de pirido[2,3-*d*]pirimidina (II.4-5)

El derivado 4-amino-2-hidroselenopirido[2,3-*d*]pirimidina (**II.3**) por tratamiento con los correspondientes ioduros de alquilo en etanol absoluto, a reflujo durante 1,5 horas, rinde los productos finales **II.4-5** con rendimientos entre 50-75 %. El mecanismo de reacción por el que transcurre la reacción es similar al que aparece en la figura 80.

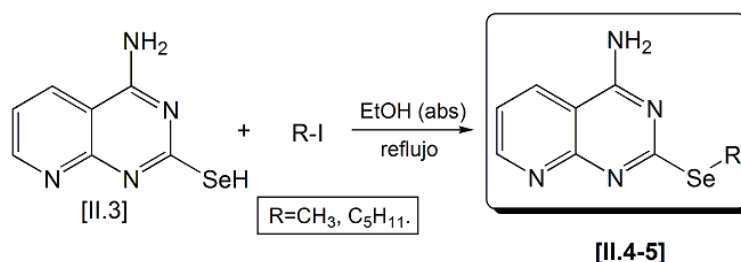


Figura 86: Síntesis de derivados 2-alkilseleno-4-amino de pirido[2,3-*d*]pirimidina.

### 2.2.3.3 Nuevos intentos para la síntesis de derivados 4-alkilamino-2-alkilseleno de pirido[2,3-*d*]pirimidina

La obtención del derivado 4-amino-2-hidroselenopirido[2,3-*d*]pirimidina (**II.3**) abre nuevas vías sintéticas encaminadas a la obtención de derivados 4-alkilamino-2-alkilseleno de pirido[2,3-*d*]pirimidina. Las rutas de síntesis seguidas se detallan a continuación:

**A)** Por reacción del derivado 4-amino-2-hidroselenopirido[2,3-*d*]pirimidina (**II.3**), cuya síntesis se especifica en el apartado 2.2.3.1) con el bromuro de alquilo correspondiente en etanol absoluto a reflujo y siguiendo la reacción por CCF (cromatografía en capa fina) no se logran los derivados deseados 4-alquilamino-2-hidroseleno de pirido[2,3-*d*]pirimidina. Tampoco se obtienen cuando la reacción transcurre en *N,N*-dimetilformamida seca, aumentando con ello la temperatura de reflujo. Tras adicionar 2 equivalentes de carbonato potásico a la reacción, con el fin de asegurarnos un medio básico y, manteniendo las condiciones de reacción, se observa que tampoco se llega a las moléculas objetivo. Posteriormente, se prueba con un equipo de microondas (MW) programándolo a distintas temperaturas de reacción (100, 120 y 150 °C) y diferentes tiempos (5, 10, 20, 30 y 40 minutos) y variando la potencia, hasta llegar a una potencia máxima de 400 W. Mediante esta última modificación no se llega tampoco a los derivados requeridos.

El mecanismo propuesto por el que transcurriría la reacción sería una sustitución nucleófila de orden 2, en la que el par de electrones libres del nitrógeno de la amina aromática ataca al carbono contiguo al bromo del bromuro de alquilo correspondiente liberándose al medio bromuro. Sin embargo, este ataque no se produce. La razón por la que no se lleva a cabo la reacción se debe a la naturaleza de la amina, ya que es una amina aromática y, por lo tanto, su nucleofilia es menor que la de una amina alifática, el par de electrones libres del nitrógeno está muy comprometido con el sistema  $\pi$  del heterociclo, por lo que la nucleofilia es prácticamente inexistente y no se lleva a cabo el ataque.

**B)** Por reacción del derivado 4-amino-2-hidroselenopirido[2,3-*d*]pirimidina (**II.3**) con el correspondiente aldehído en éter etílico a temperatura ambiente y posterior reducción del doble enlace formado, no se logran los derivados 4-alquilamino-2-hidroseleno de pirido[2,3-*d*]pirimidina. Al variar las condiciones de reacción utilizando diferentes mezclas de disolventes (tetrahidrofurano/acetronitrilo (1:1, en volumen), diclorometano/metanol (1:1, en volumen) o *N,N*-dimetilformamida seca) y distintas temperaturas, la reacción no tiene lugar. Las razones por las que no se lleva a cabo la reacción se deben a la baja nucleofilia del par de electrones libres del nitrógeno de la amina aromática.

#### **2.2.4 Derivados 2,4-dialquil-seleno de pirido[2,3-*d*]pirimidina II.6-8 (SERIE II)**

Las etapas que se han llevado a cabo para la síntesis de los derivados 2,4-dialquil-seleno de pirido[2,3-*d*]pirimidina **II.6-8** se indican a continuación:

1. Síntesis de pirido[2,3-*d*]pirimidin-2,4(1*H*,3*H*)diona por reacción del ácido 2-aminonicotínico con urea.
2. Síntesis de 2,4-dicloropirido[2,3-*d*]pirimidina por reacción de pirido[2,3-*d*]pirimidin-2,4(1*H*,3*H*)diona con cloruro de fosforilo.

3. Síntesis de 2,4-dihidroselenopirido[2,3-*d*]pirimidina por reacción de 2,4-dicloropirido[2,3-*d*]pirimidina con selenourea.
4. Funcionalización de las posiciones 2 y 4 del anillo de pirido[2,3-*d*]pirimidina por diferentes ioduros de alquilo para comprobar el efecto de los factores estéricos.

#### 2.2.4.1 Síntesis de 2,4-dihidroselenopirido[2,3-*d*]pirimidina (II.6)

El derivado 2,4-dicloropirido[2,3-*d*]pirimidina (**I.g**), cuya síntesis se ha descrito con anterioridad (apartado 2.1.2.2), por tratamiento con selenourea en proporción molar 1:2, respectivamente, en etanol absoluto a reflujo durante 5 horas, da lugar al intermedio 2,4-dihidroselenopirido[2,3-*d*]pirimidina (**II.6**), tal y como se muestra en la figura 87. El mecanismo por el que transcurre la reacción es una sustitución nucleófila aromática similar al propuesto con anterioridad en la figura 79.

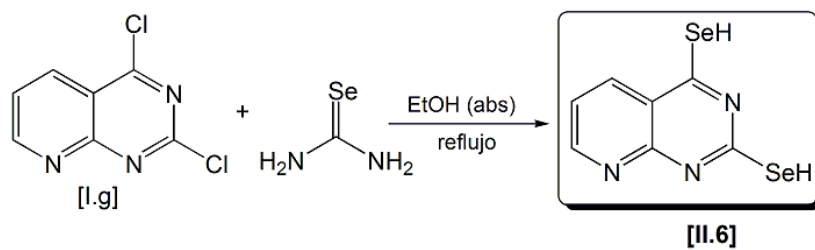


Figura 87: Síntesis de 2,4-dihidroselenopirido[2,3-*d*]pirimidina.

#### 2.2.4.2 Síntesis de derivados 2,4-dialquilseleno de pirido[2,3-*d*]pirimidina (II.7-8)

El derivado 2,4-dihidroselenopirido[2,3-*d*]pirimidina (**II.6**) por tratamiento con los correspondientes ioduros de alquilo en etanol absoluto a reflujo durante 1,5 horas, rinde los productos finales **II.7-8** con rendimientos en torno al 20 % (figura 88). El mecanismo de reacción cursa igual que el propuesto en la figura 80.

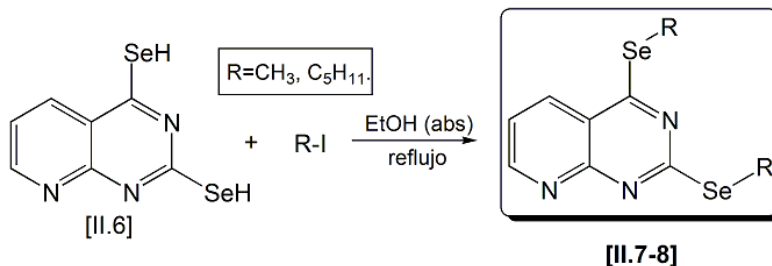


Figura 88: Síntesis de derivados 2,4-dialquilseleno de pirido[2,3-*d*]pirimidina.

## 2.3 DERIVADOS DE QUINAZOLINA DE LA SERIE III

### 2.3.1 Derivados 4-alkilamino-2-mercapto de quinazolina III.1-2 (SERIE III)

Las etapas seguidas para la síntesis de los derivados 4-alkilamino-2-mercapto de quinazolina III.1-2 se enumeran a continuación:

1. Síntesis de 4-cloro-2-mercaptoquinazolina, por reacción de 4-hidroxi-2-mercaptoquinazolina con cloruro de fosforilo.
2. Síntesis de los derivados 4-alkilamino-2-mercapto de quinazolina por reacción de 4-cloro-2-mercaptoquinazolina con distintas aminas aromáticas.

#### 2.3.1.1 Síntesis de 4-cloro-2-mercaptoquinazolina (III.a)

En esta ruta de síntesis hacia la búsqueda de los derivados deseados, se parte del reactivo comercial 4-hidroxi-2-mercaptoquinazolina que, por tratamiento con cloruro de fosforilo y *N,N*-dimetilformamida a reflujo durante 2 horas, rinde el derivado clorado III.a con rendimientos entre 60-70 %. La reacción cursa por el mismo mecanismo que el señalado en la figura 74.

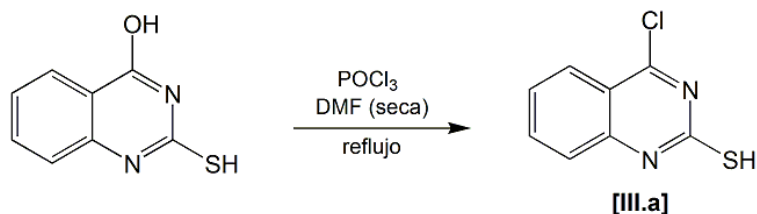


Figura 89: Síntesis de 4-cloro-2-mercaptoquinazolina.

#### 2.3.1.2 Síntesis de derivados 4-alkilamino-2-mercapto de quinazolina (III.1-2)

Por reacción de 4-cloro-2-mercaptoquinazolina (III.a) con distintas aminas en etanol absoluto a reflujo durante 18 horas se sintetizan los derivados 4-alkilamino-2-mercapto de quinazolina III.1-2 con rendimientos entre 5-15 %. El mecanismo de reacción es una sustitución aromática paralelo al propuesto para la síntesis de los derivados I.1-4.

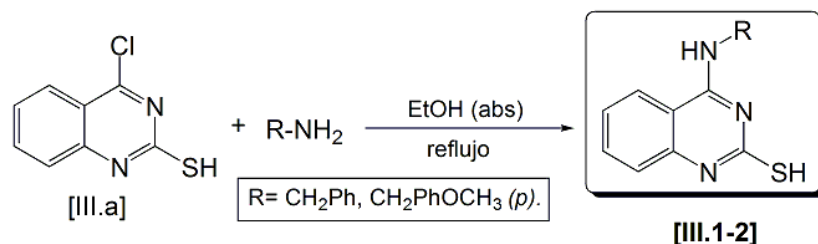


Figura 90: Síntesis de derivados 4-alkilamino-2-mercapto de quinazolina.



### **2.3.2 Derivados 4-alkil/arilamino-2-alkiltio de quinazolina III.3-16 (SERIE III)**

Las etapas que se han llevado a cabo para la obtención de derivados 4-alkil/arilamino-2-alkiltio de quinazolina **III.3-16** se enumeran a continuación:

1. Síntesis de derivados 2-alkiltio-4-hidroxiquinazolina, por reacción de 4-hidroxi-2-mercaptoquinazolina con el yoduro de alquilo correspondiente.
2. Síntesis de 2-alkiltio-4-cloro de quinazolina, por reacción de los derivados 2-alkiltio-4-hidroxiquinazolina con cloruro de fosforilo y *N,N*-dimetilformamida.
3. Síntesis de derivados 4-alkil/arilamino-2-alkiltio de quinazolina, por reacción de derivados 2-alkiltio-4-cloro de quinazolina con distintas aminas aromáticas y alifáticas para comprobar el efecto ejercido por factores electrónicos y estéricos.
4. Formación de las correspondientes sales de selenito en alguno de los derivados sintetizados con anterioridad.

#### **2.3.2.1 Síntesis de derivados 2-alkiltio-4-hidroxi de quinazolina (III.3-4)**

Para la obtención de derivados de quinazolina sustituidos en la posición 2 del anillo de quinazolina por el grupo alkiltio, se hace reaccionar 4-hidroxi-2-mercaptoquinazolina, reactivo comercial, con el correspondiente yoduro de alquilo en una disolución de hidróxido sódico 0,4 N a reflujo durante 18 horas. Pasado este tiempo, se deja enfriar la reacción y se añade ácido acético glacial hasta pH entre 5-6, obteniéndose los derivados deseados con rendimientos entre 70-85 %. El mecanismo por el que cursa la reacción se trata de una sustitución nucleófila de orden 2, en el que el medio básico de la reacción secuestra los protones de los grupos hidroxilo y tiol del núcleo de quinazolina. De esta manera, el azufre queda cargado negativamente y su nucleofilia aumenta considerablemente, por lo que atacará al carbono electrófilo unido al yoduro, saliendo éste al medio de reacción. La mayor nucleofilia del azufre hace quimioselectiva la reacción sin que se produzca la O-sustitución. Al añadir ácido acético se protona el fenóxido. El mecanismo se muestra en la figura 91.

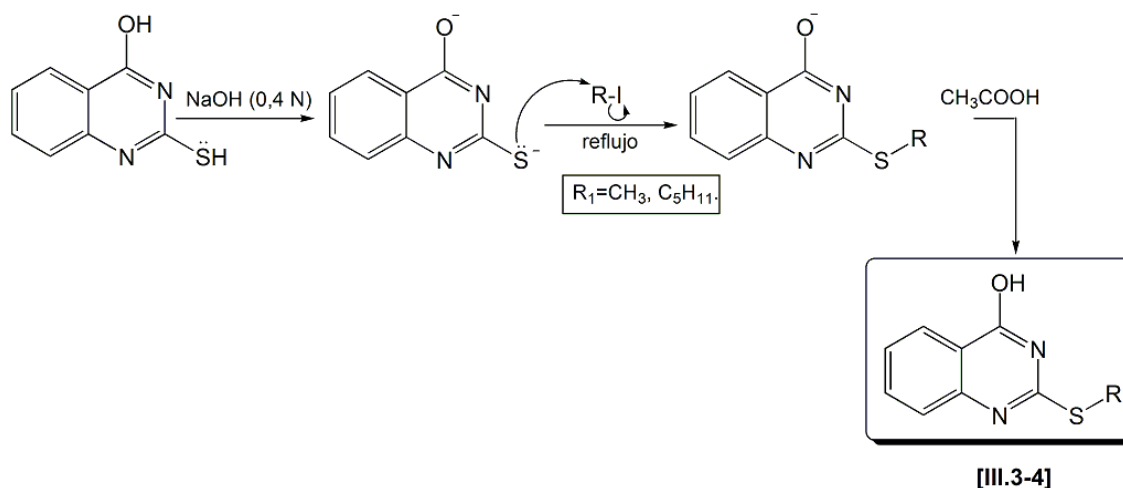


Figura 91: Síntesis y mecanismo de reacción propuesto para los derivados 2-alcilthio-4-hidroxi de quinazolina.

### 2.3.2.2 Síntesis de los derivados 2-alcilthio-4-cloro de quinazolina (III.b-c)

El procedimiento sintético y el mecanismo de reacción para la síntesis de los derivados **III.b-c**, es similar al que se recoge en el apartado 2.1.1.5 para la obtención del derivado **I.e**.

### 2.3.2.3 Síntesis de derivados 4-alcil/arilamino-2-alcilthio de quinazolina (III.5-14)

El procedimiento sintético y el mecanismo de reacción para la síntesis de los derivados **III.5-14**, es similar al que aparece explicado en el apartado 2.1.1.6 para la obtención de los derivados **I.1-4**. Los rendimientos que se han obtenido son variables.

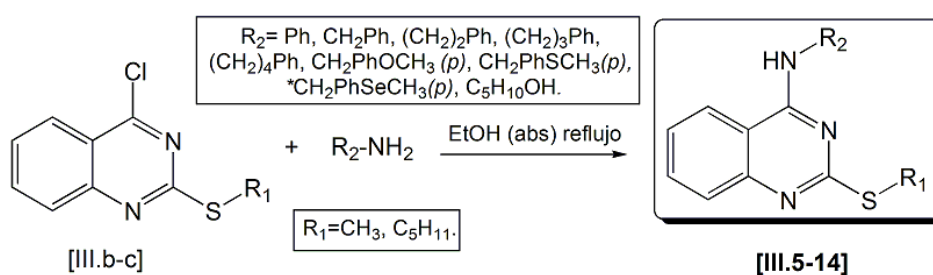


Figura 92: Síntesis de derivados 4-alcil/arilamino-2-alcilthio de quinazolina.

\*Al no ser la *p*-metilselenobencilamina comercial, se ha sintetizado partiendo del derivado selenado dimetildiseleniuro que por tratamiento con borohidruro sódico en proporción molar 1:2, respectivamente, en etanol absoluto durante 2 horas a reflujo, rinde el metilselenol. Al reaccionar este derivado con 4-clorobenzaldehído, en proporción molar 1:2, respectivamente, tiene lugar una sustitución nucleófila aromática (SNA) en la que los electrones libres del selenio atacan al carbono electrófilo unido a cloro y, tras formar un intermedio tetraédrico, la molécula recupera la aromaticidad eliminando un cloruro y dando lugar al intermedio *p*-metilselenobenzaldehído (**III.d**) con rendimiento del 95 %. Posteriormente, el *p*-metilselenobenzaldehído reacciona con carbonato sódico y hidrócloruro de hidroxilamina en

proporción molar 1:1,5:1,5, respectivamente, en etanol a temperatura ambiente durante 24 horas dando lugar a (*E*)-4-metilselenobenzaldehído oxima (**III.e**) con un rendimiento del 80 %. El mecanismo por el que tiene lugar la reacción pasa por una adición a carbonilo y posterior deshidratación. El paso hasta llegar a la amina deseada consiste en una reducción de Clemensen, en la cual la oxima se reduce hasta amina utilizando zinc en polvo en proporción molar 1:13, respectivamente, en una disolución de ácido clorhídrico 10 % y a reflujo durante 12 horas (figura 93). La *p*-metilselenobencilamina (**III.f**) se obtiene con un rendimiento del 50 % (Lu, X., 2003).

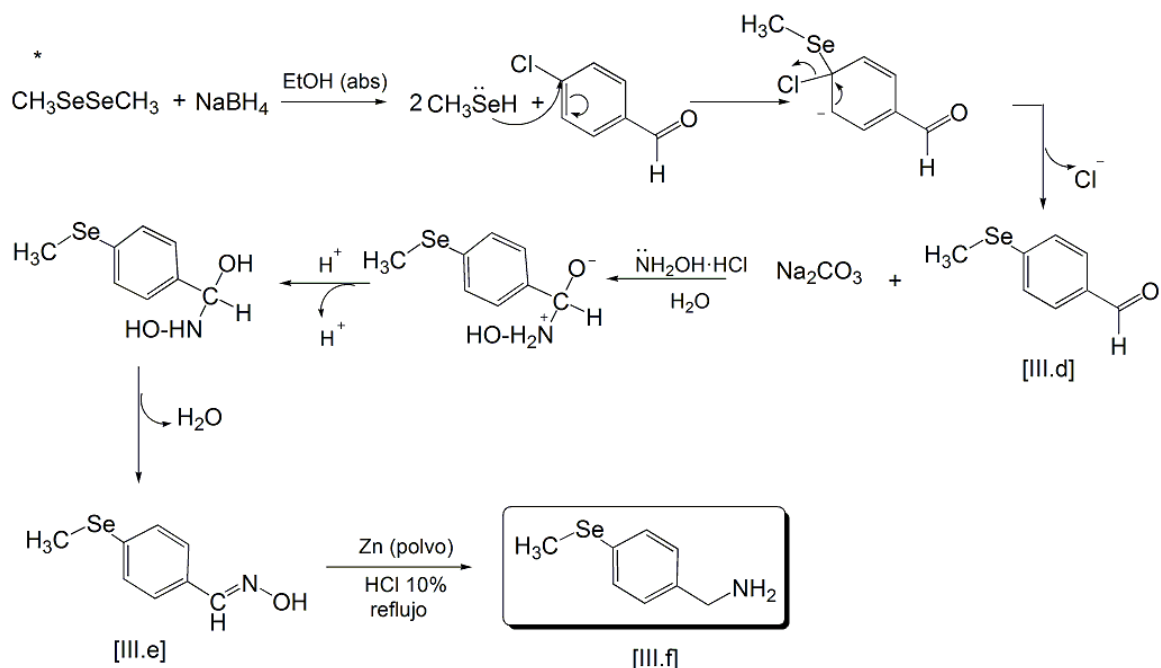


Figura 93: Síntesis, con indicación del mecanismo de reacción, de *p*-metilselenobencilamina.

### 2.3.2.4 Síntesis de selenitos de *N*-alquil-2-metiltioquinazolin-4-amonio (III.15-16)

Para conseguir las sales de selenito se parte de dos de los derivados sintetizados con anterioridad en el apartado 2.3.2.3., los cuales al ser tratados con óxido de selenio en proporción molar 1:1,5, respectivamente, en etanol/agua (1:1 en volumen) y a reflujo durante 12 horas rinden los selenitos de *N*-alquil-2-metiltioquinazolin-4-amonio.

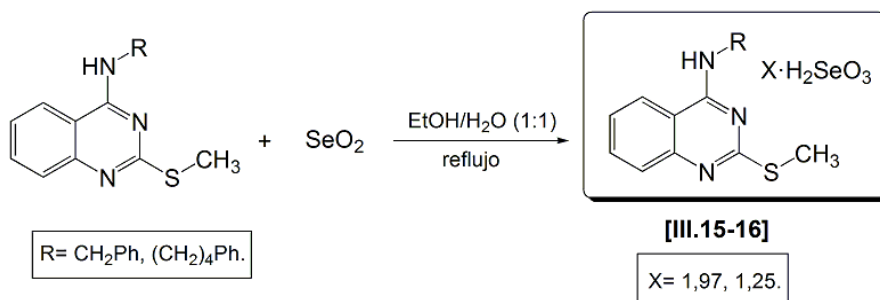


Figura 94: Síntesis de selenitos de *N*-alquil-2-metiltioquinazolin-4-amonio.

### **2.3.3 Síntesis del derivado 2-cloro-4-(4-metilselenobencil)aminoquinazolina III.17 (SERIE III)**

Las etapas empleadas en la síntesis del derivado 2-cloro-4-(4-metilselenobencil)aminoquinazolina **III.17** se muestran a continuación:

1. Síntesis de 2,4-dicloroquinazolina por reacción de 1*H*,3*H*-quinazolin-2,4-diona con cloruro de fosforilo y *N,N*-dimetilformamida.
2. Síntesis de 2-cloro-4-(4-metilselenobencil)aminoquinazolina, por reacción de 2,4-dicloroquinazolina con *p*-metilselenobencilamina.

#### **2.3.3.1 Síntesis del derivado 2,4-dicloroquinazolina (III.g)**

El procedimiento sintético y mecanismo de reacción de la 2,4-dicloroquinazolina es similar al del derivado 2,4-dicloropirido[2,3-*d*]pirimidina (**I.g**) (apartado 2.1.2.2).

#### **2.3.3.2 Síntesis del derivado 2-cloro-4-(4-metilselenobencil)aminoquinazolina (III.17)**

La síntesis y mecanismo de reacción del derivado 2-cloro-4-(4-metilselenobencil)aminoquinazolina es similar a la llevada a cabo para la obtención de los derivados de pirido[2,3-*d*]pirimidina del apartado 2.1.1.6. Se produce la sustitución de cloro por amina en la posición 4 del heterociclo que resulta más reactiva.

### **2.3.4 Derivados 2-alciltio-4-amino de quinazolina III.18-20 (SERIE III)**

Las etapas seguidas para la obtención de los derivados 2-alciltio-4-amino de quinazolina **III.18-20** se indican a continuación:

1. Síntesis de 2,4-dicloroquinazolina por reacción de 1*H*,3*H*-quinazolin-2,4-diona con cloruro de fosforilo y *N,N*-dimetilformamida.
2. Síntesis de 4-amino-2-cloroquinazolina por reacción de 2,4-dicloroquinazolina con hidróxido amónico.
3. Síntesis de 4-amino-2-mercaptoquinazolina por reacción de 4-amino-2-cloroquinazolina con tiourea.
4. Funcionalización de la posición 2 del anillo de quinazolina por diferentes ioduros de alquilo para comprobar el efecto de los factores estéricos.

Los procedimientos sintéticos llevados a cabo para llegar a los derivados de quinazolina **III.18-20**, así como sus mecanismos de reacción, son análogos a los seguidos para la obtención de los derivados de pirido[2,3-*d*]pirimidina **I.5-7**, del apartado 2.1.2.

### 2.3.5 Derivados 2,4-dialquiltio de quinazolina III.21-23 (SERIE III)

Las etapas que se han llevado a cabo para la síntesis de los derivados 2,4-dialquiltio de quinazolina III.21-23 se enumeran a continuación:

1. Síntesis de 2,4-dicloroquinazolina por reacción de 1*H*,3*H*-quinazolin-2,4-diona con cloruro de fosforilo y *N,N*-dimetilformamida.
2. Síntesis de 2,4-dimercaptoquinazolina por reacción de 2,4-dicloroquinazolina con tiourea.
3. Funcionalización de las posiciones 2 y 4 del anillo de quinazolina por diferentes ioduros de alquilo para comprobar el efecto ejercido por factores estéricos.

Los procedimientos sintéticos llevados a cabo para llegar a los derivados de quinazolina III.21-23, así como sus mecanismos de reacción, son análogos a los seguidos para la obtención de los derivados de pirido[2,3-*d*]pirimidina I.8-10, propuestos en el apartado 2.1.3.

## 2.4 DERIVADOS SELENADOS DE QUINAZOLINA DE LA SERIE IV

### 2.4.1 Derivados 4-alquilamino-2-alquilseleno de quinazolina IV.1-10 (SERIE IV)

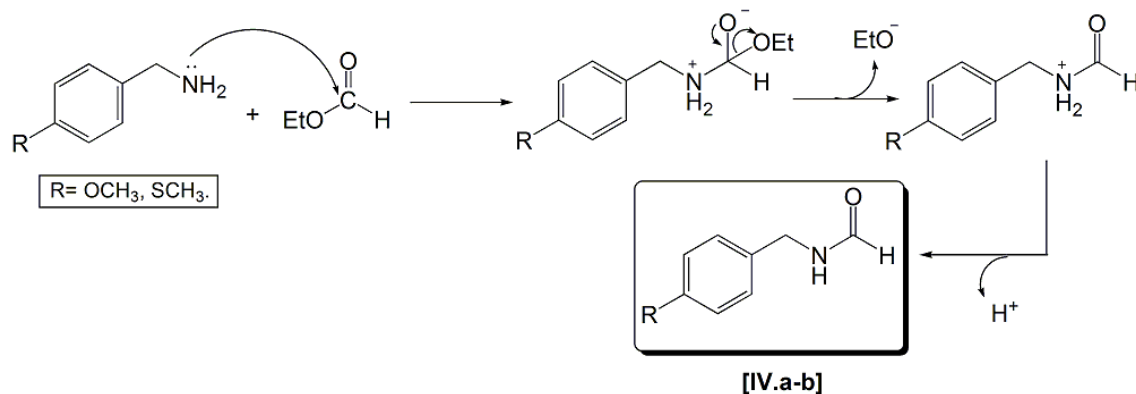
Las etapas que se han llevado a cabo para la síntesis de los derivados 4-alquilamino-2-alquilseleno de quinazolina IV.1-10 se muestran a continuación:

1. Síntesis de las amidas correspondientes (excepto de *N*-bencilformamida que es comercial) por reacción de las respectivas aminas con formiato de etilo.
2. Síntesis de isoselenocianatos derivados a partir de las amidas sintetizadas con anterioridad.
3. Síntesis de derivados 4-alquilamino-2-hidroseleno de quinazolina por reacción de los isoselenocianatos correspondientes con el derivado 2-aminobenzonitrilo.
4. Funcionalización de la posición 2 del anillo de quinazolina por diferentes ioduros de alquilo para comprobar el efecto ejercido por factores estéricos

#### 2.4.1.1 Síntesis de los derivados *p*-sustituído de bencilamida (IV.a-b)

Para la obtención de las distintas amidas, se hacen reaccionar las aminas de partida con formiato de etilo a reflujo durante 12 horas en ausencia de disolvente (Barton, D.H.R., 1994). Las amidas se obtienen prácticamente con un rendimiento del 100 %. El mecanismo de

reacción propuesto pasa por un ataque nucleófilo del par de electrones libres del nitrógeno al carbono carbonílico del formiato de etilo generándose un intermedio tetraédrico que, tras una reorganización electrónica en la que se produce la salida al medio de etóxido y un protón, da lugar a las amidas buscadas. El mecanismo de reacción puede verse en la figura 95.



**Figura 95:** Mecanismo de reacción propuesto para la formación de las correspondientes amidas.

En las etapas 2 y 3 de este apartado, para la obtención de los derivados **IV.1-5**, tanto el procedimiento sintético como los mecanismos de reacción son análogos a los comentados anteriormente para los derivados de pirido[2,3-*d*]pirimidina **II.1-2**, indicados con detalle en el apartado 2.2.2.

En la etapa 4 de este apartado, correspondiente a la alquilación de la posición 2 del anillo de quinazolina, el procedimiento sintético y el mecanismo de reacción es análogo al ya expuesto con anterioridad en el punto 2.1.2.5. Mediante esta reacción se obtienen los derivados de quinazolina **IV.6-10**.

#### **2.4.2 Derivados 2-alkilseleno-4-amino de quinazolina IV.11-13 (SERIE IV)**

Las etapas seguidas para la síntesis de los derivados 2-alkilseleno-4-amino de quinazolina **IV.11-13** se indican a continuación:

1. Síntesis de 2,4-dicloroquinazolina por reacción de 1*H*,3*H*-quinazolin-2,4-diona con cloruro de fosforilo y *N,N*-dimetilformamida.
2. Síntesis de 4-amino-2-cloroquinazolina por reacción de 2,4-dicloroquinazolina con hidróxido amónico.
3. Síntesis de 4-amino-2-hidroselenuquinazolina por reacción de 4-amino-2-cloroquinazolina con selenourea.
4. Funcionalización de la posición 2 del anillo de quinazolina por diferentes ioduros de alquilo para comprobar el efecto de factores estéricos.

Los procedimientos sintéticos llevados a cabo para llegar a los derivados de quinazolina **IV.11-13**, así como sus mecanismos de reacción, son análogos a los seguidos para la obtención de los derivados selenados de pirido[2,3-*d*]pirimidina **II.3-5**, del apartado 2.2.3.

### **2.4.3 Derivados 2,4-dialquilseleño de quinazolina III.14-16 (SERIE III)**

Las etapas que se han llevado a cabo para la síntesis de los derivados 2,4-dialquilseleño de quinazolina **IV.14-16** aparecen a continuación:

1. Síntesis de 2,4-dicloroquinazolina por reacción de 1*H*,3*H*-quinazolin-2,4-diona con cloruro de fosforilo y *N,N*-dimetilformamida.
2. Síntesis de 2,4-dihidroselenoquinazolina por reacción de 2,4-dicloroquinazolina con selenourea.
3. Funcionalización de las posiciones 2 y 4 del anillo de quinazolina por diferentes ioduros de alquilo para comprobar el efecto ejercido por factores estéricos.

Los procedimientos sintéticos llevados a cabo para llegar a los derivados de quinazolina **IV.14-16**, así como sus mecanismos de reacción, son análogos a los seguidos para la obtención de los derivados de pirido[2,3-*d*]pirimidina **II.6-8**, propuestos en el apartado 2.2.4.

## **3. TÉCNICAS ANALÍTICAS INSTRUMENTALES UTILIZADAS PARA LA CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS COMPUESTOS SINTETIZADOS**

Los experimentos de *Espectroscopia de Infrarrojo (IR)* han sido registrados en un equipo Thermo Nicolet FT-IR Nexus Euro con una estación de trabajo OMNIC 6.0. Se han utilizado pastillas prensadas de bromuro potásico para muestras sólidas y de cloruro sódico para aceites y líquidos.

Los números de onda ( $\nu$ ) se expresan en  $\text{cm}^{-1}$  y la intensidad de las bandas se detalla según la clave siguiente: d (débil); m (media); f (fuerte); mf (muy fuerte).

Los espectros de *Resonancia Magnética Nuclear de protón ( $\text{RMN}^{-1}\text{H}$ )* han sido obtenidos en un aparato Brüker 400 Ultrashield<sup>TM</sup> (400 MHz), utilizándose como referencia interna tetrametilsilano. El disolvente deuterado empleado en la preparación de muestras ha sido dimetilsulfóxido ( $\text{DMSO-}d_6$ ) a una concentración aproximada de 10 mg/mL. Para la detección de protones lábiles se emplean unas gotas de agua deuterada. La multiplicidad de las señales se indica mediante las siguientes abreviaturas: s (singlete); d (doblete); t (triplete); c

(cuadruplete); q (quintuplete); m (multiplete); dd (doble doblete); tt (triple triplete); dt (doble triplete); ddd (doble doble doblete); s.a. (señal ancha). Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresan en partes por millón (ppm). Las constantes de acoplamiento ( $J$ ) se expresan en hercios (Hz).

En algunos derivados sintetizados se ha completado su caracterización instrumental con experimentos de *Resonancia Magnética Nuclear de carbono 13 (RMN-<sup>13</sup>C)* y *Resonancia Magnética Nuclear en 2D (COSY, HMBC y HMQC)*, utilizándose el mismo equipo y el mismo disolvente que en RMN-<sup>1</sup>H.

Los estudios de *Espectrometría de Masas (EM)* han sido realizados en un espectrómetro de masas Hewlett-Packard MSD 5973N de ionización por impacto electrónico a 70 eV acoplado a un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 6890 Plus. Las muestras se introducen por inserción directa con sonda (DIP). En los espectros se indica el ión molecular ( $M^{+}$ ), cuando éste es apreciable, y los fragmentos más representativos. La abundancia de cada pico se expresa en porcentaje respecto al fragmento más abundante, al que se asigna el valor de 100.

Los *Análisis Elementales (C, H, N)* han sido realizados en un microanalizador LECO CHN-900 a partir de muestras previamente secadas con pentóxido de fósforo a presión reducida. El intervalo de error admitido para cada producto es de  $\pm 0,4$  % para cada tipo de átomo determinado.

Los *Puntos de Fusión (Pf)* de los compuestos descritos han sido determinados en un equipo Mettler FP82 + FP80 (con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min) o en un equipo Perkin- Elmer DSC Diamond. La temperatura de fusión se expresa en grados centígrados.

La *Cromatografía en columna (CC)* se ha desarrollado usando columnas de vidrio (AFORA) y sílica gel 60 (0,0040-0,063 mm, MERK) como fase estacionaria. Las fases móviles han sido varias dependiendo de la naturaleza de la mezcla a separar y se especifican en la descripción de cada compuesto.

La *Cromatografía en capa fina (CCF)* se ha desarrollado sobre cromatofolios de gel de sílice (60-200UV254) de 0,2 mm de espesor (Alugram SIL G/UV254-818133. Macherey-Nagel GmbH & Co. KG. Postfach 101352, D-52313 Düren, Germany), utilizando como fase móvil mezclas de diferentes disolventes en distintas proporciones. Las placas se observan bajo luz ultravioleta a unas longitudes de onda de 254 y 365 nm. En algún caso con dificultad en la visualización de las manchas, ha sido necesaria revelarlas con yodo.



## **II. Evaluación Biológica**



## **1. EL CULTIVO CELULAR**

### **1.1 LÍNEAS CELULARES EMPLEADAS EN LOS ENSAYOS**

Las líneas celulares que se han empleado para el estudio de la actividad biológica de los compuestos sintetizados en esta Memoria son las siguientes:

- PC-3: carcinoma de próstata.
- CCRF-CEM: leucemia aguda T-linfoblástica.
- HT-29: adenocarcinoma de colon.
- HTB-54: carcinoma epidermoidal de pulmón.
- MCF-7: adenocarcinoma de mama (dependiente de estrógenos).
- MDA-MB-231: adenocarcinoma de mama (independiente de estrógenos).
- 184B5: células no tumorales de epitelio de mama.
- BEAS-2B: células no tumorales de epitelio bronquial.

### **1.2 SUBCULTIVO DE CÉLULAS Y FUNDAMENTOS DE LA TRIPSINIZACIÓN**

Todas las líneas celulares se han obtenido de la American Type Culture Collection (ATCC), han sido cultivadas en frascos de 75 cm<sup>3</sup> (Nunc) y se han incubado en estufa a 37 °C con un 5 % de CO<sub>2</sub> y un 96 % de humedad relativa.

Las líneas celulares CCRF-CEM, HT-29, HTB-54 y PC-3 se han cultivado en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con un 10 % de suero bovino fetal de ternera (FBS) (Gibco), L-glutamina (2 mM) y gentamicina (0,1 mg/mL) (Gibco). La línea celular MCF-7 se ha cultivado en medio EMEM (Clonetics) suplementado con un 10 % de suero bovino fetal de ternera (FBS), L-glutamina (2 mM) y gentamicina (0,1 mg/mL). La línea celular MDA-MB-231 se ha cultivado en medio DMEM (Gibco) suplementado con un 10 % de suero bovino fetal de ternera (FBS) y L-glutamina (2 mM). La línea celular 184B5 se ha cultivado en medio Hams F-12/DMEM (Clonetics) (50:50) suplementado según el procedimiento de Li y col. (Li, Y., 2007). La línea celular BEAS-2B se ha cultivado en medio Hams F-12/DMEM (Clonetics) (50:50) suplementado con un 10 % de suero bovino fetal de ternera (FBS), L-glutamina (2 mM) y gentamicina (0,1 mg/mL).

El cultivo de las células que crecen en suspensión (CCRF-CEM) se ha realizado por centrifugación y posterior resuspensión en medio suplementado. Las células se mantienen en crecimiento exponencial mediante la realización de subcultivos dos veces por semana. El cultivo de células en monocapa se lleva a cabo en aquellas células que son adherentes (PC-3, HT-29, HTB-54, MCF-7, MDA-MB-231, 184B5 y BEAS-2B). Cuando en el microscopio invertido se observa que hay poco espacio disponible para que las células se desarrollen (estado de

subconfluencia) se procede a realizar la tripsinización. Este procedimiento consiste en despegar las células de la base del frasco de cultivo y sembrarlas en un nuevo frasco con medio de cultivo nuevo. El nombre de tripsinización deriva de la enzima proteolítica utilizada para romper las uniones intercelulares, la *tripsina*.

Para llevar a cabo la tripsinización se realiza el siguiente procedimiento:

1. Se retira el medio de cultivo del frasco.
2. Se lavan las células con 10 mL de PBS (solución fosfato a pH 7,4) (Gibco). Se espera 30-45 segundos y se retira el PBS por aspiración.
3. Se añaden 3 mL de tripsina-EDTA (Invitrogen) y se incuban las células durante 2 minutos en el caso de las líneas celulares HT-29 y HTB-54 o 7 minutos para las líneas celulares PC-3, MCF-7, MDA-MB-231, 184B5 y BEAS-2B a 37 °C con un 5 % de CO<sub>2</sub> y un 96 % de humedad relativa.
4. Se despegan las células del frasco de cultivo, dando pequeños golpes con la palma de la mano.
5. Se neutraliza el efecto de la tripsina añadiendo 7 mL de medio de cultivo suplementado. Se centrifugan las células a 1.500 r.p.m durante 5 minutos, eliminándose el sobrenadante por decantación.
6. Se resuspende el precipitado en un pequeño volumen de medio suplementado y se procede al recuento de células en un hemocitómetro de Neubauer en el microscopio invertido.

## **2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL *IN VITRO***

### **2.1 PREPARACIÓN DE LOS COMPUESTOS A ENSAYAR**

El efecto citotóxico de cada producto se ha ensayado a cinco dosis diferentes entre 10<sup>-4</sup> y 10<sup>-8</sup> M. Para ello, cada producto se ha disuelto inicialmente en dimetilsulfóxido (DMSO) (Aldrich) a una concentración 0,1 M o 0,01 M, dependiendo de la solubilidad de cada compuesto. Las disoluciones madres obtenidas se filtran con un filtro de 0,22 micras (Millipore) para asegurarnos la esterilidad y, posteriormente, se realizan diluciones seriadas con medio de cultivo (RPMI 1640 sin suplementar para las líneas celulares: CCRF-CEM, HT-29, HTB-54, MCF-7 y PC-3; y Hams F-12/DMEM (50:50) sin suplementar para las líneas celulares 184B5 y BEAS-2B) hasta obtener soluciones de la concentración deseada. Estas alícuotas se guardan hasta la realización de cada experimento a -20 °C y se descongelan a temperatura ambiente cada vez que se lleva a cabo un experimento.

Estudios preliminares han demostrado claramente que las pequeñas cantidades de DMSO añadidas junto con cada producto a los cultivos celulares no tienen efecto alguno sobre el crecimiento de las células.

## **2.2 ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD**

La actividad citotóxica de los compuestos sintetizados se ha evaluado *in vitro* a través de un microensayo colorimétrico de citotoxicidad basado en la reducción de una sal de tetrazolio: bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Mossmann, T., 1983). En este ensayo las células vivas y metabólicamente activas son capaces de reducir el MTT, de color amarillo en solución, a una sal de formazán, compuesto insoluble que precipita en forma de cristales de color azul oscuro. La cantidad de formazán formada depende del porcentaje de células vivas, ya que en las células vivas se encuentra la enzima responsable de catalizar esta reacción, la succinato deshidrogenasa mitocondrial. Esta sal de formazán se puede cuantificar espectrofotométricamente y la absorbancia medida es directamente proporcional al número de células viables y activas presentes en los cultivos realizados en presencia de los productos cuyo efecto se quiere estudiar.

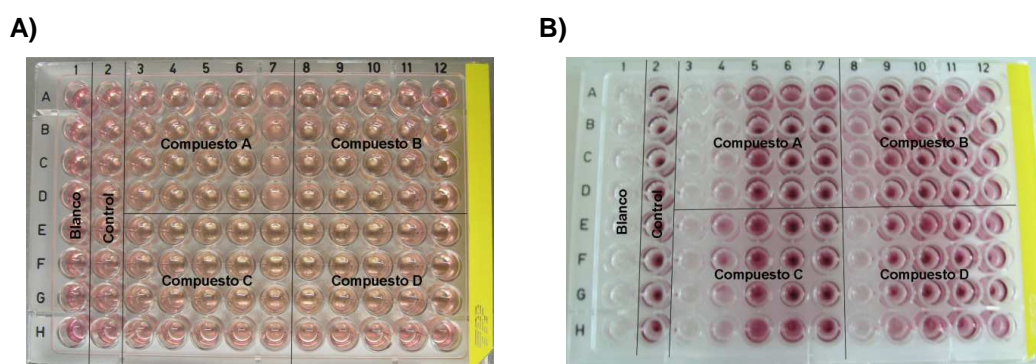
Se han utilizado dos metodologías diferentes:

- Para la línea celular PC-3, se ha comparado el crecimiento de las células tras el tratamiento con los compuestos a 72 horas con respecto a las células control, a las que sólo se ha añadido dimetilsulfóxido (DMSO). Se ha realizado un experimento por compuesto, donde cada concentración se ha repetido seis veces. Los datos obtenidos se expresan como IC<sub>50</sub>, concentración de compuesto que inhibe el 50 % del crecimiento celular, ya que no se toman valores a t<sub>0</sub>.
- En el caso de las líneas celulares CCRF-CEM, HT-29, HTB-54, MCF-7, 184B5 y BEAS-2B, se ha comparado el crecimiento de las células tratadas y control a las 72 horas con respecto a las células sembradas inicialmente, que han sido determinadas espectrofotométricamente. Los datos obtenidos se expresan como LD<sub>50</sub> -concentración de compuesto que provoca la muerte del 50 % de las células-, TGI -concentración de compuesto que inhibe totalmente el crecimiento de las células- y GI<sub>50</sub> -concentración de compuesto que provoca la inhibición del 50 % del crecimiento celular-. Los datos se obtienen por extrapolación en las curvas dosis-respuesta de los porcentajes de supervivencia: -50 (LD<sub>50</sub>), 0 (TGI) y 50 (GI<sub>50</sub>). Los datos se obtienen de al menos tres experimentos independientes con cada concentración repetida por cuadruplicado en cada uno de ellos.

Los ensayos de citotoxicidad se realizan en placas de 96 pocillos de fondo redondo (TPP) para las células en suspensión (CCRF-CEM) y de fondo plano (TPP) para las células adherentes (PC-3, HT-29, HTB-54, MCF-7,184B5 y BEAS-2B).

Estos ensayos se realizan de acuerdo al siguiente procedimiento:

1. Se añaden 20  $\mu\text{L}$  de las distintas disoluciones preparadas previamente (entre  $10^{-4}$  y  $10^{-8}$  M) de los productos a testar (4 compuestos por placa) a todos los pocillos de la columna 3 a la 12 (figura 96). En las columnas 3 y 8 se añaden 20  $\mu\text{L}$  de la disolución  $10^{-4}$  M, en las columnas 4 y 9 se añaden 20  $\mu\text{L}$  de la disolución  $10^{-5}$  M y así, sucesivamente, hasta la disolución  $10^{-8}$  M.



**Figura 96:** Ejemplo de un experimento de citotoxicidad. En la imagen **A** se muestra la placa de 96 pocillos de fondo plano tras el periodo de incubación de 72 horas. En la imagen **B** se muestra la misma placa tras la retirada del medio de cultivo y la adición de 150  $\mu\text{L}$  de DMSO antes de proceder a su lectura.

2. Se añaden 80  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo suplementado a los pocillos que tienen compuesto, 100  $\mu\text{L}$  del mismo medio a los pocillos control y 200  $\mu\text{L}$  a los pocillos del blanco.
3. Se añaden 100  $\mu\text{L}$  de una suspensión de células en medio suplementado, de forma que tengamos un número inicial de 10.000 células para el caso de los cultivos adherentes y de 40.000 células para el cultivo en suspensión, excepto a los pocillos del blanco. Este número de células iniciales resulta de estudiar la relación entre éstas y la absorbancia medida, para así comprobar en qué rango esta relación es lineal. El número de células escogido en cada caso se encuentra dentro de este rango, siendo lo más elevado posible para aumentar de esta manera la sensibilidad del método.
4. De esta manera, el volumen total en todos los pocillos será de 200  $\mu\text{L}$ . Las placas se incuban en la estufa a 37  $^{\circ}\text{C}$  y 5 % de  $\text{CO}_2$  durante el tiempo necesario (72 horas para los experimentos con compuesto y para la placa  $t_0$  se pasa al apartado 5).
5. Se añaden 50  $\mu\text{L}$  de una disolución de MTT (Aldrich) (2 mg/mL en PBS: solución fosfato a pH 7,4) y se incuban durante 4 horas en la estufa a 37  $^{\circ}\text{C}$  y 5 % de  $\text{CO}_2$  permitiendo a las células metabolizar el MTT.

6. Se aspira el contenido de cada pocillo mediante un aparato lavador de placas, en el caso de las placas de fondo redondo se requiere una centrifugación previa a la aspiración (1.200 r.p.m durante 2 minutos).
7. Se añaden 150  $\mu$ L de DMSO para disolver los cristales de formazán que se han formado.
8. Se agitan mecánicamente las placas durante unos segundos para facilitar la disolución del formazán y obtener una coloración homogénea.
9. Se procede a la lectura de la absorbancia en un lector de placas ELISA Bio Kinetics Reader (BIO-TEK) a una longitud de onda de 550 nm, sustrayendo el valor obtenido a 630 nm para retirar ruido de fondo.

Los datos obtenidos se expresan como porcentaje celular medio para cada concentración  $\pm$  SEM (error típico de la media). Estos datos de crecimiento se calculan a partir de los datos de absorbancia obtenidos utilizándose las siguientes fórmulas:

$[(A-A_0)/(A_c-A_0)] \times 100$  cuando  $A > A_0$  y  $[(A-A_0)/A_0] \times 100$  cuando  $A < A_0$ , donde A=absorbancia del compuesto;  $A_0$ =absorbancia a tiempo cero;  $A_c$ =absorbancia del control.

Los datos de  $GI_{50}$ , TGI y  $LD_{50}$  se han obtenido por extrapolación en las curvas dosis-respuesta y se han expresado en valores micromolar ( $\mu$ M).

### **3. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LOS COMPUESTOS PARA INDUCIR MUERTE CELULAR**

La determinación del nivel de muerte celular se ha llevado a cabo en la línea celular MCF-7, ya que los compuestos evaluados han mostrado una mayor sensibilidad en esta línea celular. Se ha utilizado el kit *Apo-Direct<sup>TM</sup>* (Pharmingen), basado en la técnica TUNEL o "end labeling". Uno de los pasos tardíos en la apoptosis es la fragmentación del DNA y, esta fragmentación, es el resultado de la actividad de las endonucleasas durante el proceso de apoptosis. Mediante este método se detectan fragmentos de DNA utilizando una reacción catalizada por la enzima TdT (desoxinucleotidil transferasa terminal).

El procedimiento seguido se explica a continuación:

1. Se siembran  $10^6$  de células en frascos de cultivo de 25  $cm^2$  (Nunc) y se dejan durante 24 horas fijándose a dicho frasco. Transcurrido este tiempo, se retira el medio por aspiración y se añaden 5 mL de medio suplementado y DMSO o compuesto, según se trate del experimento control o del tratamiento. Se han añadido distintas concentraciones de DMSO a las células control, una concentración fija de camptotecina

- (25  $\mu$ M) al control positivo y diferentes concentraciones de compuesto para comprobar el efecto dosis-respuesta.
2. Se incuban las células en estufa a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> durante el tiempo deseado (4, 12, 24 o 48 horas).
  3. Finalizado dicho tiempo, se procede a fijar las células. Para ello, se recoge el medio de cultivo y se centrifuga a 1.500 r.p.m durante 5 minutos. Se elimina el sobrenadante y el precipitado se mantiene en hielo. Se tripsinizan las células (según el procedimiento descrito en el apartado 1.2) y se añaden al resto de precipitado. Se centrifuga el total de células a 1.500 r.p.m durante 5 minutos y se incuban durante 1 hora a 4 °C en paraformaldehído (Sigma) al 1 % (p/v) en PBS a pH 7,4 (Gibco). Para la incubación se añade una cantidad de esta solución suficiente como para que las células queden a una concentración final entre 1 y 2 x 10<sup>6</sup> células/mL.
  4. Tras la incubación se recogen las células por centrifugación a 1.500 r.p.m y se lavan 2 veces con PBS. Finalmente las células se resuspenden en etanol al 70 % a una concentración final entre 1 y 2 x 10<sup>6</sup> células/mL, se incuban durante 30 minutos a 4 °C y se almacenan a -20 °C.

Para llevar a cabo el marcaje se ha realizado el siguiente procedimiento:

1. Se incuban 10<sup>6</sup> células durante 1 hora a 37 °C con una solución que contiene la enzima TdT (desoxinucleotidil transferasa terminal), dUTPs unidos al fluorocromo FITC, tampón de reacción y agua.
2. Tras la incubación se retira la solución de marcado y las células se lavan 2 veces con PBS.
3. A continuación, las células se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente con la solución de marcaje IP/RNasa y se analizan en un citómetro de flujo Coulter Epics XL 4-CLR (Beckman Coulter. Miami, Florida, USA). Las células han sido excitadas con un láser de argón a emitiendo luz a 448 nm y detectándose el yoduro de propidio a 620 nm.



**Figura 97:** Citómetro de flujo Coulter Epics XL 4-CLR utilizado en los estudios de muerte celular.



En los ensayos para la determinación de muerte celular en presencia de un inhibidor general de caspasas, el inhibidor utilizado ha sido Z-VAD-FMK (BD Pharmingen™). Se ha añadido a las muestras a determinar 1 hora antes de añadir los compuestos a una concentración 25  $\mu$ M. El procedimiento seguido ha sido similar al explicado con anterioridad.

Los resultados se expresan como porcentaje de muerte celular  $\pm$  SD (desviación estándar) a distintos tiempos y diferentes concentraciones, realizándose para cada compuesto al menos tres experimentos independientes, en los cuales cada compuesto se determina por duplicado.

#### **4. DETERMINACIÓN DEL CICLO CELULAR**

El estudio del ciclo celular en la línea celular MCF-7 se ha realizado siguiendo la misma metodología empleada para la determinación de muerte celular por el método *Apo-Direct*™. Las muestras se han analizado en un citómetro de flujo Coulter Epics XL 4-CLR, determinándose la distribución del ciclo celular mediante el programa de software EXPO 32 ADC. Los resultados se han obtenido registrando la fluorescencia del IP en escala lineal y se expresan como porcentaje de células en las distintas fases del ciclo  $\pm$  SD a distintos tiempos. Para cada compuesto se realizan al menos tres experimentos independientes, en los cuales cada compuesto se determina por duplicado.

#### **5. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE MIGRACIÓN CELULAR**

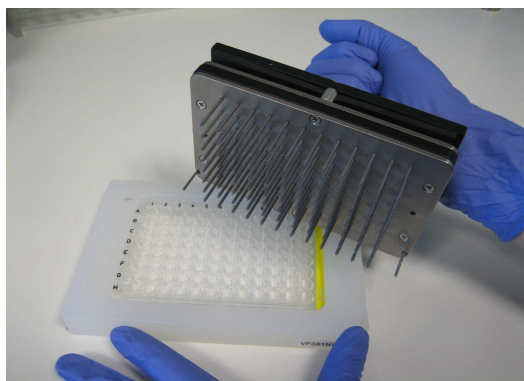
La capacidad de migración celular se ha llevado a cabo en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231 utilizándose la técnica de Wound Healing (cicatrización de la herida).

El procedimiento que se ha seguido se explica a continuación:

1. Se preparan distintas concentraciones de células/mL en medio de cultivo suplementado.
2. Se siembran 100  $\mu$ L de las diferentes concentraciones celulares preparadas en placas de 96 pocillos de fondo plano (TPP) y se determina qué concentración es la mejor para alcanzar el estado de subconfluencia celular (80-90 %) pasadas 24 horas.
3. Una vez escogida esta concentración, se añaden 100  $\mu$ L por pocillo y se dejan las células durante 24 horas fijándose a dicha placa.
4. Transcurrido este tiempo, se elimina el medio por aspiración y se añade a cada pocillo 100  $\mu$ L del medio suplementado o 100  $\mu$ L de medio suplementado más compuesto, según se trate del experimento control o del tratamiento.

5. Se realiza un pre-tratamiento incubando las células en estufa a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> durante 4 horas.
6. Posteriormente, se procede a realizar una herida (figura 98) en el centro de cada pocillo con una herramienta con 96 puntas estériles (Pin tool, V&P Scientific).
7. Se lava cada pocillo 2 veces con 100 µL PBS (Gibco) para eliminar restos celulares.

**A)**



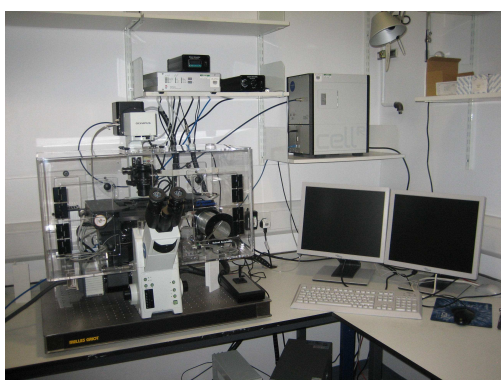
**B)**



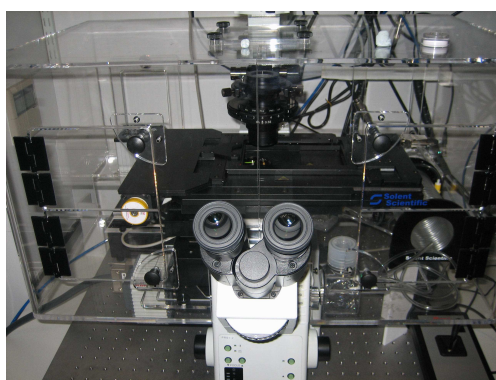
**Figura 98:** Herramienta utilizada para la realización de la herida en los pocillos (A) y realización de la herida (B).

8. Se añade a cada pocillo 100 µL del medio suplementado o 100 µL de medio suplementado más compuesto, según se trate del experimento control o del tratamiento.
9. Se coloca la placa de 96 pocillos en un microscopio invertido Olympus SacnR/CellR a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> durante 20 horas y se monitoriza la cicatrización de la herida. Las imágenes han sido capturadas usando un objetivo 10x cada 30 minutos durante 20 horas.

**A)**



**B)**



**Figura 99:** Microscopio Olympus SacnR/CellR (A y B) utilizado en los estudios de migración celular.

10. El cierre de la herida se ha calculado utilizando los programas de software Image J 1.44 y TScratch 1.4.

Los resultados se expresan como porcentaje de cicatrización de la herida a las 20 horas  $\pm$  SD a las diferentes concentraciones de compuestos testadas. Para cada compuesto se realizan al menos dos experimentos independientes, por cuadruplicado.

### **5.1 ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR**

Se ha realizado el test de viabilidad/citotoxicidad *LIVE/DEAD*<sup>®</sup> assay (Invitrogen) para determinar el porcentaje de células vivas y muertas en los ensayos realizados. Este test determina mediante 2 colorantes diferentes, la calceína-AM y el etidio 1-homodímero, la integridad de la membrana plasmática y la actividad esterasa. Las células vivas se caracterizan por poseer una membrana plasmática intacta y una actividad esterasa intracelular. La calceína-AM va a penetrar en las células vivas indicando una actividad esterasa intracelular. Por el contrario, el etidio 1-homodímero, incapaz de permeabilizar la membrana celular, únicamente actuará en células muertas indicando pérdida en la integridad de la membrana plasmática. La cuantificación celular se realiza utilizando un microscopio de fluorescencia, ya que la calceína-AM y el etidio 1-homodímero son altamente sensibles a la luz fluorescente. La calceína-AM es excitada con luz UV a 495 nm y detectada a 515 nm, emitiendo luz fluorescente verde. El etidio 1-homodímero es excitado con luz UV a 528 nm y detectado a 617 nm, emitiendo luz fluorescente roja.

El procedimiento seguido se explica a continuación:

1. Se siembra una concentración de  $5 \times 10^5$  células/mL (60 % de confluencia) en placas de 6 pocillos de fondo plano (TPP) y se dejan durante 24 horas fijándose a dicha placa.
2. Transcurrido este tiempo, se elimina el medio por aspiración y se añade a cada pocillo 1 mL del medio suplementado o 1 mL de medio suplementado más compuesto, según se trate del experimento control o del tratamiento.
3. Se incuban las células en estufa a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> durante 24 horas.
4. Posteriormente, se añade a cada pocillo 1 mL de medio suplementado al que se le ha añadido una solución de calceína-AM hasta una concentración final de 2 µg/mL y una solución de etidio 1-homodímero hasta una concentración final de 2 µg/mL.
5. Se incuban las células en estufa a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> durante 30 minutos.
6. A continuación, se capturan las fotos en un microscopio de fluorescencia Leica con un objetivo 10x.

Los resultados se expresan como porcentaje de células vivas y muertas  $\pm$  SD respecto a las células totales después de un tratamiento de 24 horas con los compuestos. Para cada compuesto se realizan al menos dos experimentos independientes, por cuadruplicado.

## **6. PROFUNDIZACIÓN EN LOS POSIBLES MECANISMOS DE ACCIÓN**

Se han realizado estudios para comprobar la expresión de diferentes proteínas mediante la técnica de Western Blot. Los tampones utilizados y su procedimiento de preparación aparecen a continuación:

- *Obtención del extracto proteico y elución:*

Tampón RIPA (*radioimmuno-precipitation assay*)

- 25 mL Tris Base 1M (Melford), pH 7,4
- 75 mL NaCl 150 mM (Fischer Scientific)
- 5 mL Triton X-100 1 % (Sigma-Aldrich)
- 2,5 g Desoxicolato sódico 1 % (Sigma)
- 0,5 g Dodecilsulfato sódico (SDS) 0,1 % (Sigma)
- enrasar a 500 mL con agua destilada

Tampón RIPA+ inhibidores de fosfatasas y proteasas

- 1 mL Tampón RIPA
- 1  $\mu$ L  $\alpha$ -vanadato sódico 100  $\mu$ M (Sigma-Aldrich)
- 1  $\mu$ L Aprotinina 10  $\mu$ g/mL (Sigma-Aldrich)
- 1  $\mu$ L Fluoruro sódico 100 mM (Sigma)
- 2  $\mu$ L Fluoruro de sulfonilfenilmetano (PMSF) 1mM (Sigma)

- *Western Blotting:*

Tampón del gel, pH 8,8

- 90,82 g Tris Base
- 2 g Dodecilsulfato sódico (SDS)
- enrasar a 500 mL con agua destilada añadiendo HCl 1M hasta alcanzar pH 8,8

Tampón de empaquetamiento, pH 6,8

- 250 mL Tris Base 1M, pH 7,4
- 2 g Dodecilsulfato sódico (SDS)
- enrasar a 500 mL con agua destilada añadiendo HCl 1M hasta alcanzar pH 6,8

Tampón de la muestra- 2x

- 800  $\mu$ l 2-mercaptoetanol (Fluka)
- 1,3 ml Tris Base 1M, pH 6,8
- 2 ml Glicerol (Invitrogen)
- 5 ml Dodecilsulfato sódico (SDS) 10%

1,3 ml Agua destilada  
Azul de bromofenol (Sigma) para colorear

Tampón de electroforesis- 5x

62,97 g Tris Base  
39 g Glicina (Sigma)  
10 g Dodecilsulfato sódico (SDS)  
enrasar a 2 L con agua destilada

Tampón de transferencia- 10x

116,25 g Tris Base  
58,54 g Glicina  
7,4 g Dodecilsulfato sódico (SDS)  
enrasar a 2 L con agua destilada

Disolución Tampón Tris Base (TBS), pH 7,4 - 10x

545 g Tris Base  
275 g Ácido bórico (Sigma-Aldrich)  
465 g EDTA (Sigma)  
enrasar a 10 L con agua destilada

Tampón DDB- 1x

9,2 g Dodecilsulfato sódico (SDS)  
145,2 g Tris Base  
75 g Glicina  
4 L Metanol (Sigma)  
enrasar a 20 L con agua destilada

Tampón Tris Salino-Tween (TBST)

100 mL Disolución Tampón Tris Base (TBS- 10x)  
900 mL Agua destilada  
1 mL Tween 20 (Sigma-Aldrich)

Gel de acrilamida- 7 %

4 mL Tampón del gel, pH 8,8  
1,7 mL Acrilamida 30 % (Severn Biotech Ltd)  
8,3 mL Agua destilada  
150 µl Persulfato amónico (APS) (Sigma)  
10 µl *N,N,N',N'*-tetrametiletildiamina (TEMED) (Sigma)

Gel de acrilamida- 10 %

- 4 mL Tampón del gel, pH 8,8
- 5,3 mL Acrilamida 30 %
- 6,7 mL Agua destilada
- 150 µl Persulfato amónico (APS)
- 10 µl *N,N,N',N'*-tetrametiletilendiamina (TEMED)

Gel de empaquetamiento

- 2,3 mL Tampón de empaquetamiento, pH 6,8
- 1,2 mL Acrilamida 30 %
- 5,5 mL Agua destilada
- 100 µl Persulfato amónico (APS)
- 7,5 µl *N,N,N',N'*-tetrametiletilendiamina (TEMED)

En los casos en los que se ha necesitado una mejor separación de las bandas de proteínas, se han utilizado geles en gradiente (*Smart Gel<sup>TM</sup>*, LI-COR Bioscience) permitiendo la determinación de proteínas de alto peso molecular y bajo peso molecular en el mismo gel sin necesidad de un gel de empaquetamiento.

*Smart Gel*- 7,5 %

- 10 mL *Smart Gel Solution* 7,5 % (LI-COR Bioscience)
- 60 µl Persulfato amónico (APS)
- 6 µl *N,N,N',N'*-tetrametiletilendiamina (TEMED)

*Smart Gel*- 10 %

- 10 mL *Smart Gel Solution* 10 % (LI-COR Bioscience)
- 60 µl Persulfato amónico (APS)
- 6 µl *N,N,N',N'*-tetrametiletilendiamina (TEMED)

*Smart Gel Running Buffer*- 1x

- 380 mL Agua destilada
- 20 mL *Smart Gel Running Buffer*- 20x

- Marcadores de proteínas:

*Precision Plus Protein Dual Color Standards* (BIO-RAD)

- Anticuerpos primarios:

**Tabla 1:** Anticuerpos primarios utilizados en los ensayos.

ANTICUERPO	CASA COMERCIAL	REF.	FUENTE	DILUCIÓN
<i>Anti-phospho-AKT S473</i>	Cell Signaling	4051	Mouse	1:1.000
<i>Anti-AKT</i>	Cell Signaling	9272	Rabbit	1:1.000
<i>Anti-phospho-ERK T202/Y204</i>	Cell Signaling	9101	Rabbit	1:1.000
<i>Anti-ERK</i>	Cell Signaling	9107	Mouse	1:2.000
<i>Anti-phospho-S6 ribosomal S235/236</i>	Cell Signaling	2211	Rabbit	1:1.000
<i>Anti-S6 ribosomal</i>	Cell Signaling	2317	Mouse	1:1.000
<i>Anti-phospho-SAPK/JNK T183/Y185</i>	Cell Signaling	9255	Mouse	1:1.000
<i>Anti-SAPK/JNK</i>	Cell Signaling	9252	Rabbit	1:1.000
<i>Anti-phospho-p38 MAPK T180/Y182</i>	Cell Signaling	9211	Rabbit	1:1.000
<i>Anti-p38 MAPK</i>	Cell Signaling	9212	Rabbit	1:1.000
<i>Anti-PARP cleavage</i>	Cell Signaling	9542	Rabbit	1:1.000
<i>Anti-phospho-GSK-3<math>\beta</math> S9</i>	Cell Signaling	9336	Rabbit	1:1.000
<i>Anti-GSK-3<math>\beta</math></i>	Cell Signaling	9832	Mouse	1:1.000
<i>Anti-phospho-PDK1 S241</i>	Cell Signaling	3061	Rabbit	1:1.000
<i>Anti-phospho-Tuberin/TSC-2 T1462</i>	Cell Signaling	3611	Rabbit	1:1.000
<i>Anti-phospho-FAK Y397</i>	Invitrogen	44624G	Rabbit	1:1.000
<i>Anti-phospho-FAK Y861</i>	Invitrogen	44626G	Rabbit	1:1.000
<i>Anti-FAK</i>	BD Biosciences	610088	Mouse	1:1.000
<i>Anti-phospho-SRC Y416</i>	Cell Signaling	2101S	Rabbit	1:1.000
<i>Anti-SRC</i>	Cell Signaling	2109	Rabbit	1:1.000
<i>Anti-<math>\beta</math>-Actin</i>	Sigma	A4700	Mouse	1:2.000
<i>Anti-<math>\gamma</math>-Tubulin</i>	Sigma	T3559	Rabbit	1:5.000

- Anticuerpos secundarios:

**Tabla 2:** Anticuerpos secundarios utilizados en los ensayos.

ANTICUERPO	CASA COMERCIAL	REF.	DILUCIÓN
<i>Goat Anti-Mouse 680 nm</i>	LI-COR Bioscience	926-31064	1:20.000
<i>Goat Anti-Mouse 800 nm</i>	LI-COR Bioscience	926-31062	1:15.000
<i>Goat Anti-Rabbit 680 nm</i>	LI-COR Bioscience	926-31062	1:20.000
<i>Goat Anti-Rabbit 800 nm</i>	LI-COR Bioscience	926-31064	1:15.000

Para la reutilización de las membranas de nitrocelulosa se ha utilizado una disolución (1:10) de *Re-Blot Plus Strong Solution- 10x* (Millipore) en agua destilada para limpiar las señales previamente obtenidas.

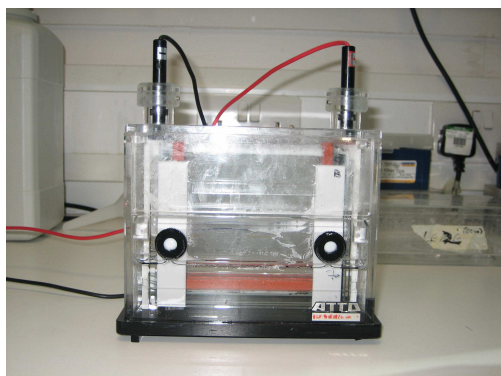
El procedimiento que se ha seguido para la obtención de los niveles de expresión de las proteínas aparece descrito a continuación:

1. Se siembra una concentración entre  $7 \times 10^5$  y  $10^6$  células/mL (70-90 % de confluencia) en placas de 6 pocillos de fondo plano (TPP), dependiendo de la línea celular utilizada, y se dejan durante 24 horas fijándose a dicha placa.
2. Transcurrido este tiempo, se elimina el medio por aspiración y se añade a cada pocillo 1 mL de medio suplementado o 1 mL de medio suplementado más compuesto, según se trate del experimento control o del tratamiento.
3. Se incuban las células en estufa a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> durante el tiempo deseado.
4. Posteriormente, se retira el medio y los pocillos se lavan 2 veces con PBS (Gibco) muy frío.
5. Se añade a cada pocillo 100 µl de tampón RIPA + inhibidores para lisar las células y se deja actuar durante 10 minutos.
6. El lisado se clarifica centrifugándolo a 13.000 r.p.m durante 15 minutos a 4 °C.
7. La concentración de proteína en las muestras se determina utilizando el kit Micro BCA™ (Perbio), de acuerdo con el manual, por extrapolación en la recta patrón. La absorbancia de las muestras se mide en un espectrofotómetro Beckman DU 650 (Beckman Coulter) a 562 nm.
8. Un total de 20 µg de proteína de cada muestra y 20 µg de marcadores de alto peso molecular (GE Healthcare) se cargan en un gel de acrilamida (del 7 %, 10 % o *Smart Gel*, según la naturaleza de las proteínas a determinar) y se procede a correr las muestras en un aparato Atto para electroforesis de proteínas (Genetic Research Instrumentation) durante 80 minutos a 180 V (200 mA) utilizando tampón de electroforesis- 1x o durante 130 minutos a 150 V (220 mA) utilizando *Smart Gel Running Buffer*- 1x si los geles son *Smart Gel*.
9. A continuación, las muestras se transfieren a una membrana de nitrocelulosa (Protran BA 85. Schleicher & Schuell) durante 70-90 minutos a 50 W (400 mA) utilizando tampón DDB- 1x. Para realizar la transferencia se utiliza un aparato Wet Blotting (Jencons).
10. Las membranas se bloquean en 10 mL de tampón TBST, 3 % (p/v) de seroalbúmina bovina (BSA) (Sigma) y 0,5 % (p/v) de leche en polvo y se dejan con el medio de bloqueo durante 45-60 minutos a temperatura ambiente.
11. Posteriormente, se tratan estas membranas con los anticuerpos primarios apropiados diluídos, según las especificaciones (tabla 1), en 10 mL de tampón TBST, 3 % (p/v) de seroalbúmina bovina (BSA), 0,5 % (p/v) de leche en polvo y 100 µL de azida sódica 2,5 % (Sigma) y se incuban durante toda la noche a 4 °C.
12. Se lavan las membranas 4 veces con 10 mL de tampón TBST durante 5 minutos.
13. Para la detección de las proteínas, se tratan las membranas con los anticuerpos secundarios apropiados diluídos, según las especificaciones (tabla 2), en 10 mL de

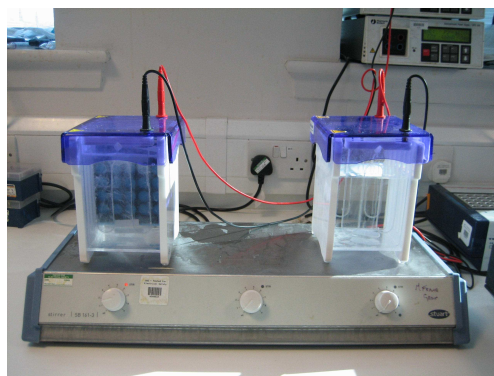


TBST, 3 % (p/v) de seroalbúmina bovina (BSA), 0,5 % (p/v) de leche en polvo y 20  $\mu$ l de SDS 10 %.

**A)**



**B)**



**Figura 100:** Equipo utilizado para la electroforesis de proteínas (A) y tanque de transferencia de proteínas del gel de acrilamida a la membrana de nitrocelulosa (B).

14. Se lavan las membranas 4 veces con 10 mL de tampón TBST durante 5 minutos.
15. Posteriormente, se guardan entre papel de filtro 3 mm (Whatman) en la oscuridad hasta total sequedad.
16. La visualización de las membranas para la detección de las señales se ha llevado a cabo mediante fluorescencia utilizando un equipo Odyssey (LI-COR Bioscience).



**Figura 101:** Equipo Odyssey utilizado para la detección de las señales obtenidas.

## **7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos obtenidos se han analizado mediante el programa estadístico SPSS 16.0 para Windows para el estudio de las diferencias en el nivel de muerte celular, distribución del ciclo celular y cicatrización de la herida entre las muestras tratadas y control. La distribución de las muestras se analizó mediante las pruebas de normalidad de Shapiro-Wilks y Kolmogorov-Smirnov, que resultaron significativas en algunos de los grupos por lo que se realizó un test de U de Mann-Whitney para muestras no paramétricas. El límite de significación de los test se

estableció en 0,05 para muestras significativamente diferentes y en 0,01 para muestras significativamente muy diferentes.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN



# **I. Descripción de los compuestos**



En la descripción de cada compuesto se indican los siguientes datos: nombre químico, fórmula molecular, peso molecular, punto de fusión, apariencia, referencia, procedimiento experimental, y datos analíticos referentes a espectroscopia infrarroja, resonancia magnética nuclear, análisis elemental y espectrometría de masas.

## 1. DERIVADOS OBTENIDOS PARA LA SERIE I

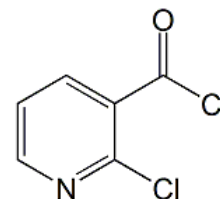
### Cloruro de 2-cloronicotinoilo

**Fórmula molecular:** C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>NCl<sub>2</sub>O

**Peso molecular:** 176 g/mol

**Apariencia:** Sólido marrón

**Referencia:** I.a



**Procedimiento experimental:**

Sobre 6,4 g (36,0 mmoles) de ácido 2-cloronicotínico se adicionan 15 mL de cloruro de tionilo. La mezcla se mantiene a reflujo durante 2 horas. La disolución final se evapora a presión reducida adicionando 3 veces tolueno (3 × 25 mL) con el fin de eliminar totalmente el exceso de cloruro de tionilo. El derivado halogenado se aísla de forma prácticamente cuantitativa y se utiliza sin más purificación.

## S-metilpseudotiourea (Hidroioduro)

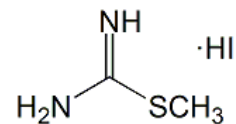
**Fórmula molecular:** C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>S·HI

**Peso molecular:** 217,9 g/mol

**Punto de fusión:** 60-61 °C

**Apariencia:** Sólido amarillo

**Referencia:** l.b



### Procedimiento experimental:

Sobre 10,0 g (131,0 mmoles) de tiourea disueltos en 25 mL de etanol absoluto, se adicionan (en baño de hielo y con agitación) 28,0 g (197,0 mmoles) de ioduro de metilo. A continuación, se prolonga la agitación a reflujo durante 1,5 horas. Posteriormente, se evapora el disolvente a presión reducida rindiendo un aceite anaranjado que se recristaliza de *n*-hexano y etanol. Así se obtienen 25,6 g (89,7 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3311-3102 (m, N-H); 1638 (f, C=O).

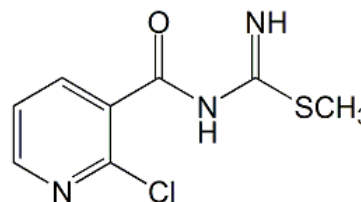
**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 2,57 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>); 8,97 (s.a., 3H, NH+NH<sub>2</sub>).

**Análisis elemental:** C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>S·HI

Calculado (%): **C:** 15,52; **H:** 3,88; **N:** 12,07

Hallado (%): **C:** 15,65; **H:** 3,86; **N:** 12,05



**1-(2-cloro-3-piridincarbonil)-S-metilpseudotiourea****Fórmula molecular:** C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>N<sub>3</sub>ClOS**Peso molecular:** 229,5 g/mol**Punto de fusión:** 144-146 °C**Apariencia:** Sólido amarillo**Referencia:** l.c**Procedimiento experimental:**

Sobre una disolución formada por 10 mL de cloroformo, 5 mL de piridina, 7,7 g de trietilamina (76,4 mmoles) y 8,3 g de S-metilpseudotiourea (hidroioduro) (38,2 mmoles) se adicionan con agitación 7,3 g (42,0 mmoles) de cloruro de 2-cloronicotinoilo disueltos en 15 mL de cloroformo. A continuación, se prolonga la agitación a temperatura ambiente durante 48 horas y se evapora el disolvente a presión reducida adicionando 3 porciones de tolueno (3 × 25 mL) para eliminar totalmente el exceso de piridina, rindiendo un aceite anaranjado. Se adicionan 50 mL de agua y el sólido resultante se filtra, se lava con éter etílico (3 × 15 mL) y se recristaliza de *n*-hexano y metanol.

Así se obtienen 7,2 g (82,7 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3310-3150 (m, N-H); 2940 (m, C-H alifáticos); 1650 (f, C=O); 1610 (f, C=N).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 2,35 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>); 7,35 (c, 1H, H<sub>5</sub>); 8,01 (dd, 1H, H<sub>4</sub>); 8,25 (dd, 1H, H<sub>6</sub>), 9,05 (s.a., 2H, NH<sub>2</sub>).

**Análisis elemental:** C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>N<sub>3</sub>ClOSCalculado (%): **C:** 41,84; **H:** 3,49; **N:** 18,30Hallado (%): **C:** 41,75; **H:** 3,52; **N:** 18,28

## 2-metiltiopirido[2,3-d]pirimidin-4(3H)-ona (Hidrocloruro)

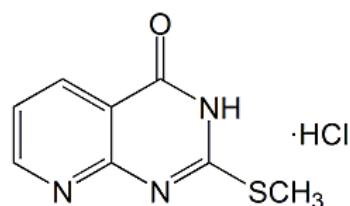
**Fórmula molecular:** C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>N<sub>3</sub>OS·HCl

**Peso molecular:** 229,5 g/mol

**Punto de fusión:** > 250 °C

**Apariencia:** Sólido amarillo

**Referencia:** l.d



### Procedimiento experimental:

En 5 mL de *N,N*-dimetilformamida anhidra se disuelven 3,0 g de 1-(2-cloro-3-piridincarbonil)-*S*-metilpseudotiourea (hidroioduro) (13,7 mmol) y se mantiene la disolución a reflujo durante 3 minutos. A continuación, se deja enfriar y aparece un precipitado. El sólido resultante se filtra a vacío lavándose con éter etílico (3 × 15 mL) y se recristaliza de *n*-hexano y metanol.

Así se obtienen 1,9 g (63,0 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3100 (m, N-H); 1690 (f, C=N); 1680 (f, C=O).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 2,60 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>); 5,00 (s.a., 1H, NH); 7,45 (c, 1H, H<sub>6</sub>); 8,51 (dd, 1H, H<sub>5</sub>); 8,70 (dd, 1H, H<sub>7</sub>).

**Análisis elemental:** C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>N<sub>3</sub>OS·HCl

Calculado (%): **C:** 41,84; **H:** 3,49; **N:** 18,30

Hallado (%): **C:** 41,83; **H:** 3,51; **N:** 18,28

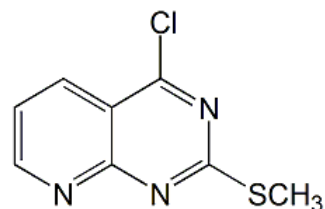
#### 4-cloro-2-metilpirido[2,3-*d*]pirimidina

**Fórmula molecular:** C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>N<sub>3</sub>ClS

**Peso molecular:** 211,5 g/mol

**Apariencia:** Sólido marrón

**Referencia:** l.e



**Procedimiento experimental:**

Sobre 1,0 g (4,51 mmoles) de 2-metilpirido[2,3-*d*]pirimidin-4(3*H*)-ona (hidrocloruro) se adicionan 5 mL de cloruro de fosforilo y 0,5 mL de *N,N*-dimetilformamida, manteniendo la mezcla a reflujo durante 2 horas. La disolución final se evapora a presión reducida. A continuación, se añaden 25 g de hielo y 25 mL de cloroformo y se extrae la fase orgánica 3 veces (3 × 25 mL). Se lava la fase orgánica con agua (3 × 25 mL) y, posteriormente, se seca con sulfato sódico anhidro, se filtra a gravedad para eliminar el sulfato sódico y se evapora el disolvente a presión reducida, aislándose prácticamente de forma cuantitativa el derivado halogenado que se utiliza sin más purificación.

#### 4-bencilamino-2-metilpirido[2,3-d]pirimidina

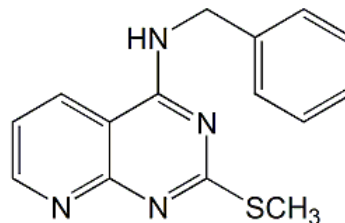
**Fórmula molecular:** C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>S

**Peso molecular:** 282 g/mol

**Punto de fusión:** 194-195 °C

**Apariencia:** Sólido amarillo

**Referencia:** I.1



#### Procedimiento experimental:

Sobre 0,55 g (2,60 mmoles) de 4-cloro-2-metilpirido[2,3-d]pirimidina disueltos en 25 mL de etanol absoluto se adicionan (en baño de hielo y con agitación) 0,46 mL (4,20 mmoles) de bencilamina. A continuación, se prolonga la agitación a reflujo durante 5 horas y se evapora el disolvente a presión reducida quedando un aceite anaranjado. Se adicionan 50 mL de agua y el sólido resultante se filtra, se lava con éter etílico (3 × 15 mL) y se recristaliza de *n*-hexano y metanol.

Así se obtienen 0,69 g (94,5 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3289 (m, N-H); 2922 (m, C-H alifáticos); 1568 (f, C=N).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 2,46 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>); 4,76 (d, 2H, CH<sub>2</sub>-NH, J<sub>CH<sub>2</sub>-NH</sub>=5,1 Hz); 7,25-7,39 (m, 5H, Ph); 7,43 (dd, 1H, H<sub>6</sub>, J<sub>6-5</sub>=8,2 Hz, J<sub>6-7</sub>=4,4 Hz); 8,66 (dd, 1H, H<sub>5</sub>, J<sub>5-7</sub>=1,8 Hz); 8,88 (dd, 1H, H<sub>7</sub>); 9,21 (t, 1H, NH-CH<sub>2</sub>).

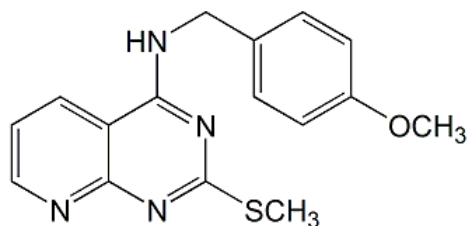
**RMN-<sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 14,5 (SCH<sub>3</sub>); 44,5 (CH<sub>2</sub>); 108,5 (C<sub>10</sub>); 114,4 (C<sub>3</sub>+C<sub>5</sub>); 121,1 (C<sub>6</sub>); 129,5 (C<sub>2</sub>+C<sub>6</sub>); 131,5 (C<sub>1</sub>); 133,6 (C<sub>5</sub>); 156,3 (C<sub>7</sub>); 159,3 (C<sub>4</sub>+C<sub>9</sub>); 160,2 (C<sub>4</sub>); 172,0 (C<sub>2</sub>).

**Análisis elemental:** C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>S

Calculado (%): **C:** 63,83; **H:** 4,96; **N:** 19,86

Hallado (%): **C:** 63,52; **H:** 5,15; **N:** 19,68

**EM-DIP (70 eV) (m/z):** 282 (M<sup>+</sup>; 39 %); 235 (11 %); 191 (40 %); 145 (19 %); 103 (68 %); 91 (100 %); 77 (36 %).

**2-metiltio-4-(4-metoxibencil)aminopirido[2,3-d]pirimidina****Fórmula molecular:** C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>OS**Peso molecular:** 312 g/mol**Punto de fusión:** 169,2-170 °C**Apariencia:** Sólido amarillo**Referencia:** 1.2**Procedimiento experimental:**

Sobre 1,62 g (7,60 mmoles) de 4-cloro-2-metiltiopirido[2,3-d]pirimidina disueltos en 25 mL de etanol absoluto se adicionan (gota a gota, en baño de hielo y con agitación) 1,04 mL (8,00 mmoles) de 4-metoxibencilamina. A continuación, se prolonga la agitación a reflujo durante 5 horas y se evapora el disolvente a presión reducida obteniendo un aceite anaranjado. Se adicionan 50 mL de agua y el sólido resultante se filtra, se lava con éter etílico (3 × 15 mL) y se recristaliza de *n*-hexano y metanol.

Así se obtienen 0,72 g (30,4 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3284 (m, N-H); 2929 (C-H alifáticos); 1575 (f, C=N).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 2,50 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>); 3,72 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 4,67 (d, 2H, CH<sub>2</sub>-NH, J<sub>CH<sub>2</sub>-NH</sub>=5,7 Hz); 6,90 (d, 2H, H<sub>3</sub>+H<sub>5</sub>, J<sub>3'-2</sub>=J<sub>5'-6</sub>=8,7 Hz); 7,31 (d, 2H, H<sub>2</sub>+H<sub>6</sub>); 7,41 (dd, 1H, H<sub>6</sub>, J<sub>6-5</sub>=8,2 Hz, J<sub>6-7</sub>=4,4 Hz); 8,65 (dd, 1H, H<sub>5</sub>, J<sub>5-7</sub>=1,9 Hz); 8,85 (dd, 1H, H<sub>7</sub>); 9,11 (t, 1H, NH-CH<sub>2</sub>).

**RMN-<sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 14,4 (SCH<sub>3</sub>); 44,3 (CH<sub>2</sub>); 55,9 (OCH<sub>3</sub>); 108,5 (C<sub>10</sub>); 114,6 (C<sub>3</sub>+C<sub>5</sub>); 120,9 (C<sub>6</sub>); 129,7 (C<sub>2</sub>+C<sub>6</sub>); 131,5 (C<sub>1</sub>); 133,5 (C<sub>5</sub>); 156,3 (C<sub>7</sub>); 159,2 (C<sub>4</sub>+C<sub>9</sub>); 160,3 (C<sub>4</sub>); 172,0 (C<sub>2</sub>).

**Análisis elemental:** C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>OSCalculado (%): **C:** 61,54; **H:** 5,13; **N:** 17,94Hallado (%): **C:** 61,31; **H:** 5,43; **N:** 18,35

**EM-DIP (70 eV) (m/z):** 312 (M<sup>+</sup>; 13 %); 191 (21 %); 136 (22 %); 121 (100 %); 103 (58 %); 91 (31 %); 77 (36 %).

## 2-metiltio-4-(4-metiltiobencil)aminopirido[2,3-d]pirimidina (Hidrocloruro)

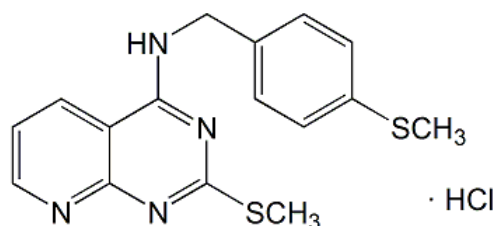
**Fórmula molecular:** C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>S<sub>2</sub>·0,45 HCl

**Peso molecular:** 344,42 g/mol

**Punto de fusión:** 157-158 °C

**Apariencia:** Sólido marrón

**Referencia:** l.3



### Procedimiento experimental:

Sobre 0,47 g (2,20 mmoles) de 4-cloro-2-metilpiropirido[2,3-d]pirimidina disueltos en 25 mL de etanol absoluto se adicionan (gota a gota, en baño de hielo y con agitación) 0,37 g (2,4 mmoles) de 4-metiltiobencilamina. A continuación, se prolonga la agitación a reflujo durante 5 horas y se evapora el disolvente a presión reducida quedando un aceite anaranjado. Se adicionan 15 mL de *n*-hexano y se rascan las paredes del matraz. Se deja 2 horas el matraz con *n*-hexano y precipita un sólido. Este sólido se filtra y se recristaliza de metanol.

Así se obtienen 32 mg (4,3 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3229 (m, N-H); 2921 (m, C-H alifáticos); 1579 (f, C=N).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 2,44 (s, 3H, Ph-SCH<sub>3</sub>); 2,48 (s, 3H, het-SCH<sub>3</sub>); 4,71 (d, 2H, CH<sub>2</sub>-NH, J<sub>CH<sub>2</sub>-NH</sub>=5,4 Hz); 7,18 (d, 2H, H<sub>3</sub>+H<sub>5</sub>, J<sub>3'-2'</sub>=J<sub>5'-6'</sub>=8,6 Hz); 7,33 (d, 2H, H<sub>2</sub>+H<sub>6</sub>); 7,46 (dd, 1H, H<sub>6</sub>, J<sub>6-5</sub>=4,4 Hz, J<sub>6-7</sub>=8,3 Hz); 8,68 (dd, 1H, H<sub>5</sub>, J<sub>5-7</sub>=1,8 Hz); 8,78 (dd, 1H, H<sub>7</sub>); 9,25 (t, 1H, NH-CH<sub>2</sub>).

**Análisis elemental:** C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>S<sub>2</sub>·0,45 HCl

Calculado (%): **C:** 55,74; **H:** 4,64; **N:** 16,26

Hallado (%): **C:** 55,45; **H:** 4,99; **N:** 16,54

**EM-DIP (70 eV) (m/z):** 326 (M<sup>+</sup>; 39 %); 282 (26 %); 191 (49 %); 137 (64 %); 121 (89 %); 103 (100 %); 91 (86 %); 77 (54 %).

#### 4-(5-hidroxi-pentil)amino-2-metilpirido[2,3-*d*]pirimidina

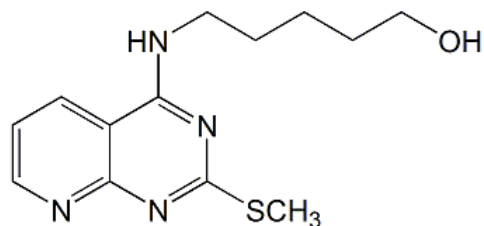
**Fórmula molecular:** C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>OS

**Peso molecular:** 278 g/mol

**Punto de fusión:** 135,5-136,3 °C

**Apariencia:** Sólido naranja

**Referencia:** 1.4



#### **Procedimiento experimental:**

Sobre 0,50 g (2,30 mmoles) de 4-cloro-2-metilpirido[2,3-*d*]pirimidina disueltos en 25 mL de etanol absoluto se adicionan (gota a gota, en baño de hielo y con agitación) 0,41 mL (3,80 mmoles) de 5-amino-1-pentanol. A continuación, se prolonga la agitación a reflujo durante 5 horas y se evapora el disolvente a presión reducida obteniendo un aceite anaranjado. Se extrae el producto resultante 3 veces con cloroformo (3 × 20 mL), se lava la fase orgánica con agua 3 veces (3 × 30 mL) y se le añade sulfato sódico anhidro para eliminar restos de humedad. Posteriormente, se filtra la disolución para retirar el sulfato sódico y se evapora el disolvente a presión reducida. Se adicionan 50 mL de agua y el sólido resultante se filtra, se lava con éter etílico (2 × 15 mL) y se recristaliza de *n*-hexano y metanol (9:1, en volumen). Así se obtienen 90 mg (13,8 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3302 (m, N-H); 2933 (m, C-H alifáticos); 1600-1577 (f, C=N).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>) ppm:** 1,36-1,38 (m, 2H, NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 1,41-1,49 (m, 2H, NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 1,60-1,68 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH); 2,51 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>); 3,38-3,42 (m, 2H, NH-CH<sub>2</sub>); 3,49-3,56 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OH); 4,36 (t, 1H, CH<sub>2</sub>-NH, J<sub>CH<sub>2</sub>NH</sub>=5,1 Hz); 7,39 (dd, 1H, H<sub>6</sub>, J<sub>6-5</sub>=8,2 Hz, J<sub>6-7</sub>=4,4 Hz); 8,57 (t, 1H, CH<sub>2</sub>OH, J<sub>CH<sub>2</sub>-OH</sub>=5,3 Hz); 8,61 (dd, 1H, H<sub>5</sub>, J<sub>5-7</sub>=1,9 Hz); 8,85 (dd, 1H, H<sub>7</sub>).

**Análisis elemental:** C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>OS

Calculado (%): **C:** 56,11; **H:** 6,47; **N:** 20,14

Hallado (%): **C:** 56,56; **H:** 6,63; **N:** 20,03

**EM-DIP (70 eV) (m/z):** 281 (M<sup>+</sup>; 51 %); 191 (31 %); 160 (30 %); 103 (50 %); 91 (100 %); 77 (44 %).

## Pirido[2,3-*d*]pirimidin-2,4(1*H*,3*H*)-diona

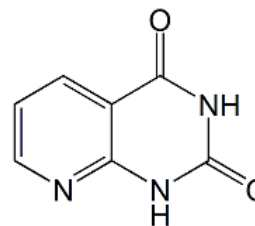
**Fórmula molecular:** C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>

**Peso molecular:** 163 g/mol

**Punto de fusión:** 297-298 °C

**Apariencia:** Sólido blanco

**Referencia:** l.f



### Procedimiento experimental:

Se trituran y mezclan 5,00 g de ácido 2-aminonicotínico (3,20 mmol) con 9,00 g de urea (150,00 mmol). Se calienta la mezcla a 210 °C en baño de arena hasta que funde (se desprenden vapores de amoníaco) y se deja enfriar a temperatura ambiente. A continuación, se añaden 50 mL de hidróxido sódico 2 N, se calienta el residuo hasta completa disolución y se añade sobre nieve carbónica. El precipitado se filtra y lava con agua fría (2 × 10 mL). El sólido se suspende en ácido acético glacial y se calienta a ebullición hasta disolución total. Al enfriarse la disolución, aparece un precipitado que se filtra y se lava con éter etílico (3 × 30 mL) filtrándolo hasta sequedad.

Así se obtienen 3,68 g (62,3 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3406, 3176 (m, O-H); 3100-3000 (C-H aromáticos); 2860 (m, C-H alifáticos); 1720, 1671 (f, C=O).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>) ppm:** 6,76 (dd, 1H, H<sub>6</sub>, J<sub>6-5</sub>=8,0 Hz, J<sub>6-7</sub>=5,0 Hz); 7,99 (d, 1H, H<sub>5</sub>); 8,35 (d, 1H, H<sub>7</sub>); 11,80 (s.a., 2H, OH).

**Análisis elemental:** C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>

Calculado (%): **C:** 51,55; **H:** 3,06; **N:** 25,75

Hallado (%): **C:** 51,55; **H:** 3,07; **N:** 25,72



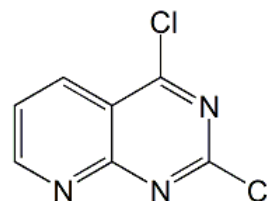
## 2,4-dicloropirido[2,3-*d*]pirimidina

**Fórmula molecular:** C<sub>7</sub>H<sub>3</sub>N<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub>

**Peso molecular:** 200 g/mol

**Apariencia:** Sólido marrón

**Referencia:** l.g



### **Procedimiento experimental:**

Se suspenden 0,60 g de pirido[2,3-*d*]pirimidina-2,4(1*H*,3*H*)diona (3,70 mmol) en 40 mL de cloruro de fosforilo, se añaden 10 gotas de *N,N*-dimetilformamida y se prolonga la agitación a reflujo durante 24 horas. A continuación, se elimina el disolvente a presión reducida y al residuo se le añaden 50 g de hielo. Se extrae la fase orgánica 3 veces con cloroformo (3 × 25 mL), se lava la fase orgánica con agua (3 × 20 mL) y, posteriormente, se seca con sulfato sódico anhidro. Se filtra la disolución para eliminar el sulfato sódico y se evapora el disolvente a presión reducida. El residuo que resulta se pone a reaccionar inmediatamente sin más purificación.

Así se obtienen 0,70 g (98,0 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3071 (m, C-H aromáticos); 1607 (m, C=N).

#### 4-amino-2-cloropirido[2,3-*d*]pirimidina

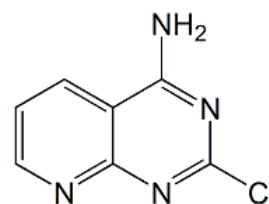
**Fórmula molecular:** C<sub>7</sub>H<sub>3</sub>N<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub>

**Peso molecular:** 180,5 g/mol

**Punto de fusión:** > 300 °C

**Apariencia:** Sólido amarillo

**Referencia:** l.h



**Procedimiento experimental:**

Se suspende 1,0 g de 2,4-dicloropirido[2,3-*d*]pirimidina (5,0 mmol) en 30 mL de una disolución acuosa de hidróxido amónico al 25 % y se prolonga la reacción a reflujo durante 1,5 horas. Aparece un precipitado amarillo que se filtra a vacío. Se lava 3 veces con agua, se filtra y se deja que seque bien. Se utiliza posteriormente sin más purificación.

Así se obtienen 0,75 g (82,0 %).

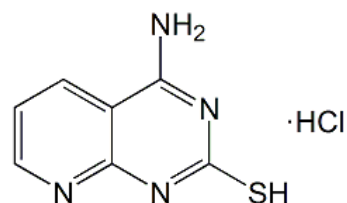
**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3074 (m, N-H); 1682 (f, C=N).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>) ppm:** 7,56 (dd, 1H, H<sub>6</sub>, J<sub>6-5</sub>=8,0 Hz, J<sub>6-7</sub>=4,2 Hz); 8,61 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 8,69 (dd, 1H, H<sub>5</sub>, J<sub>5-7</sub>=1,6 Hz); 8,98 (dd, 1H, H<sub>7</sub>).

**Análisis elemental:** C<sub>7</sub>H<sub>3</sub>N<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub>

Calculado (%): **C:** 46,54; **H:** 2,77; **N:** 31,02

Hallado (%): **C:** 46,29; **H:** 2,69; **N:** 30,71

**4-amino-2-mercaptopirido[2,3-*d*]pirimidina (Hidrocloruro)****Fórmula molecular:** C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>N<sub>4</sub>S·0,3 HCl**Peso molecular:** 189,25 g/mol**Punto de fusión:** > 300 °C**Apariencia:** Sólido amarillo**Referencia:** I.5**Procedimiento experimental:**

Sobre un matraz se disuelven 0,60 g de 4-amino-2-cloropirido[2,3-*d*]pirimidina (3,32 mmol) en 50 mL de etanol absoluto. Se añaden 0,60 g (7,89 mmol) de tiourea, poco a poco y con agitación. A continuación, se prolonga la agitación a reflujo durante 15 horas. Pasado este tiempo, aparece un precipitado amarillo que se lava con agua y se filtra a vacío hasta sequedad. El sólido obtenido se recristaliza de etanol.

Así se obtienen 0,15 g (25,0 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3387 (m, N-H); 1610 (f, C=N).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>) ppm:** 7,32 (s, 1H, H<sub>6</sub>); 8,47-8,66 (m, 4H, NH<sub>2</sub>+H<sub>5</sub>+H<sub>7</sub>); 12,67 (s, 1H, SH).

**RMN-<sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>) ppm:** 108,2 (C<sub>10</sub>); 121,2 (C<sub>6</sub>); 132,8 (C<sub>5</sub>); 156,7 (C<sub>7</sub>); 159,0 (C<sub>4</sub>+C<sub>9</sub>); 171,8 (C<sub>2</sub>).

**Análisis elemental:** C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>N<sub>4</sub>S·0,3 HCl

Calculado (%): **C:** 44,38; **H:** 3,17; **N:** 29,59

Hallado (%): **C:** 44,36; **H:** 3,48; **N:** 29,50

**EM-DIP (70 eV) (m/z):** 191 (M<sup>+</sup>; 100 %); 175 (64 %); 163 (53 %); 135 (26 %); 91 (20 %); 69 (27 %); 57 (54 %).

#### 4-amino-2-metilpirido[2,3-*d*]pirimidina (Hidroioduro)

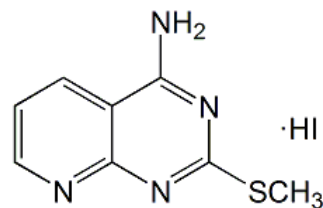
**Fórmula molecular:** C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>S·0,5 HI

**Peso molecular:** 256 g/mol

**Punto de fusión:** 273-274 °C

**Apariencia:** Sólido marrón

**Referencia:** I.6



#### **Procedimiento experimental:**

En un matraz se disuelven 0,50 g de 4-amino-2-mercaptopirido[2,3-*d*]pirimidina (2,81 mmol) en 50 mL de etanol absoluto y 0,1 mL de *N,N*-dimetilformamida. A continuación, se añaden 0,26 mL de yoduro de metilo (4,21 mmol) y se prolonga la agitación a reflujo durante 1,5 horas. Posteriormente, se evapora el disolvente a presión reducida, se añaden 25 mL de agua y precipita un sólido marrón que se filtra a vacío y se lava con éter hasta llegar a sequedad. El sólido resultante se recrystaliza de etanol.

Así se obtienen 0,32 g (44,5 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3382 (m, N-H); 3137 (m, C-H aromáticos); 2919 (m, C-H alifáticos); 1649 (f, C=N).

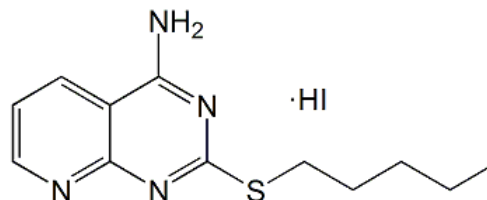
**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>) ppm:** 2,57 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>); 7,55 (dd, 1H, H<sub>6</sub>, J<sub>6-5</sub>=7,6 Hz, J<sub>6-7</sub>=4,2 Hz); 8,72 (dd, 1H, H<sub>5</sub>, J<sub>5-7</sub>=1,0 Hz); 8,78 (s.a., 2H, NH<sub>2</sub>); 8,91 (dd, 1H, H<sub>7</sub>).

**Análisis elemental:** C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>S·0,5 HI

Calculado (%): **C:** 37,50; **H:** 3,12; **N:** 21,87

Hallado (%): **C:** 37,32; **H:** 3,51; **N:** 21,77

**EM-DIP (70 eV) (m/z):** 191 (M<sup>+</sup>; 100 %); 146 (39 %); 130 (15 %); 121 (26 %); 103 (26 %); 91 (24 %).

**4-amino-2-pentiltiopirido[2,3-d]pirimidina (Hidrioduro)****Fórmula molecular:** C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>S·0,1 HI**Peso molecular:** 260,8 g/mol**Punto de fusión:** 219-220 °C**Apariencia:** Sólido marrón**Referencia:** 1.7**Procedimiento experimental:**

En un matraz se disuelven 0,50 g de 4-amino-2-mercaptopirido[2,3-d]pirimidina (2,81 mmol) en 50 mL de etanol absoluto y unas gotas de *N,N*-dimetilformamida. A continuación, se añaden 0,55 mL de ioduro de pentilo (4,21 mmol) y se prolonga la agitación a reflujo durante 1,5 horas. Posteriormente, se evapora el disolvente a presión reducida, se añaden 20 mL de agua y precipita un sólido marrón que se filtra a vacío y se lava con éter hasta llegar a sequedad. El sólido resultante se recrystaliza de etanol.

Así se obtienen 0,18 g (24,6 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3356-3318 (m, N-H); 3150 (m, C-H aromáticos); 2958-285 (m, C-H alifáticos); 1650 (f, C=N).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 0,88 (t, 3H, (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CH<sub>3</sub>); 1,37 (m, 4H, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>); 1,68 (q, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>); 3,12 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>); 7,38 (dd, 1H, H<sub>6</sub>, J<sub>6-5</sub>=8,1 Hz, J<sub>6-7</sub>=4,0 Hz); 8,10 (s.a., 2H, NH<sub>2</sub>); 8,56 (dd, 1H, H<sub>5</sub>, J<sub>5-7</sub>=1,2 Hz); 8,86 (dd, 1H, H<sub>7</sub>).

**RMN-<sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 14,6 (S-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CH<sub>3</sub>); 22,4 (S-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>); 25,5 (S-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>); 31,4 (S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>); 32,6 (S-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>); 107,9 (C<sub>10</sub>); 121,1 (C<sub>6</sub>); 134,3 (C<sub>5</sub>); 157,1 (C<sub>7</sub>); 161,3 (C<sub>4</sub>+C<sub>9</sub>); 167,5 (C<sub>2</sub>).

**Análisis elemental:** C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>S·0,1 HICalculado (%): **C:** 55,21; **H:** 6,52; **N:** 21,47Hallado (%): **C:** 55,40; **H:** 6,32; **N:** 21,73

**EM-DIP (70 eV) (m/z):** 248 (M<sup>+</sup>; 16 %); 201 (37 %); 191 (52 %); 178 (100 %); 146 (37 %); 121 (48 %); 103 (29 %).

## 2,4-dimercaptopirido[2,3-d]pirimidina

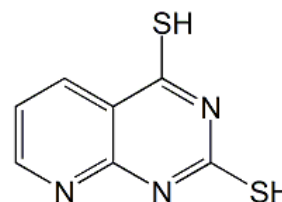
**Fórmula molecular:** C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>N<sub>3</sub>S<sub>2</sub>

**Peso molecular:** 195 g/mol

**Punto de fusión:** > 300 °C

**Apariencia:** Sólido marrón

**Referencia:** 1.8



### Procedimiento experimental:

En un matraz se disuelven 0,75 g de 2,4-dicloropirido[2,3-d]pirimidina (3,75 mmol) en 50 mL de etanol absoluto. A continuación, se añaden 0,75 g de tiourea (9,85 mmol) y se prolonga la agitación a reflujo durante 5 horas. Pasado este tiempo, se filtra el precipitado formado a vacío y se lava con agua 3 veces. Se deja secar bien. El sólido resultante se recristaliza de etanol. Así se obtienen 0,62 g (84,9 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3101 (m, C-H aromáticos); 1586 (f, C=N).

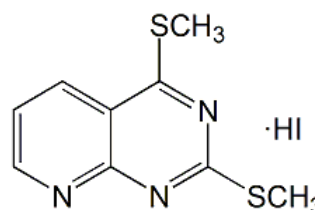
**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 7,37 (dd, 1H, H<sub>6</sub>, J<sub>6-5</sub>=8,0 Hz, J<sub>6-7</sub>=4,8 Hz); 8,56 (dd, 1H, H<sub>5</sub>, J<sub>5-7</sub>=3,3 Hz); 8,72 (dd, 1H, H<sub>7</sub>); 13,54 (s, 1H, SH<sub>(4)</sub>); 13,81 (s, 1H, SH<sub>(2)</sub>).

**Análisis elemental:** C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>N<sub>3</sub>S<sub>2</sub>

Calculado (%): **C:** 43,10; **H:** 2,56; **N:** 21,54

Hallado (%): **C:** 42,88; **H:** 2,42; **N:** 21,52

**EM-DIP (70 eV) (m/z):** 195 (M<sup>+</sup>; 100 %); 179 (37 %); 162 (58 %); 137 (24 %); 103 (34 %); 91 (25 %); 58 (47 %).

**2,4-dimetiltiopirido[2,3-*d*]pirimidina****Fórmula molecular:** C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>S<sub>2</sub>·0,08 HI**Peso molecular:** 233,24 g/mol**Punto de fusión:** 298-299 °C**Apariencia:** Sólido marrón**Referencia:** 1.9**Procedimiento experimental:**

En un matraz se disuelven 0,45 g de 2,4-dimercaptopirido[2,3-*d*]pirimidina (2,31 mmol) en 40 mL de hidróxido sódico 0,4 N. A continuación, se añaden 0,32 mL de yoduro de metilo (5,07 mmol) y se prolonga la agitación a reflujo durante 24 horas. Pasado este tiempo, se deja enfriar la disolución y se añade ácido acético glacial hasta pH=5-6. Se filtra el precipitado formado desechándolo y las aguas madres se extraen 3 veces con diclorometano (3 × 25 mL). Se lava la fase orgánica con agua (3 × 20 mL) y se seca con sulfato sódico anhidro. Se elimina el sulfato sódico por filtrado a gravedad y el disolvente se evapora a presión reducida. El aceite obtenido se precipita con éter y el sólido resultante se filtra a vacío hasta sequedad. El derivado se recrystaliza de etanol.

Así se obtienen 0,11 g (20,4 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3006 (m, C-H aromáticos); 1666 (f, C=N).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>) ppm:** 2,51 (s, 3H, SCH<sub>3(4)</sub>); 2,59 (s, 3H, SCH<sub>3(2)</sub>); 7,43 (dd, 1H, H<sub>6</sub>, J<sub>6-7</sub>=4,6 Hz, J<sub>6-5</sub>=7,8 Hz); 8,40 (dd, 1H, H<sub>5</sub>, J<sub>5-7</sub>=2,0 Hz); 8,84 (dd, 1H, H<sub>7</sub>).

**Análisis elemental:** C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>S<sub>2</sub>·0,08 HI

Calculado (%): **C:** 46,30; **H:** 4,21; **N:** 18,00

Hallado (%): **C:** 46,19; **H:** 3,82; **N:** 18,35

**EM-DIP (70 eV) (m/z):** 223 (M<sup>+</sup>; 16 %); 191 (100 %); 146 (20 %); 119 (82 %); 91 (75 %); 76 (26 %); 64 (87 %); 51 (35 %).

## 2,4-dipentiltiopirido[2,3-d]pirimidina

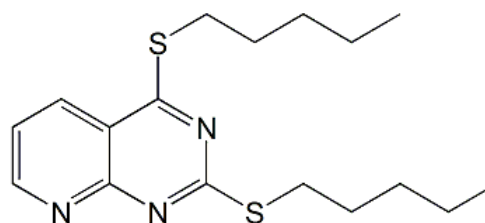
**Fórmula molecular:** C<sub>17</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>S<sub>2</sub>

**Peso molecular:** 335 g/mol

**Punto de fusión:** -

**Apariencia:** Aceite marrón

**Referencia:** I.10



### Procedimiento experimental:

En un matraz se disuelven 0,49 g de 2,4-dimercaptopirido[2,3-d]pirimidina (2,51 mmol) en 40 mL de hidróxido sódico 0,4 N. A continuación, se añaden 0,72 mL de yoduro de pentilo (5,53 mmol) y se prolonga la agitación a reflujo durante 24 horas. Pasado este tiempo, se deja enfriar la disolución y se añade ácido acético glacial hasta pH=5-6. Se filtra el precipitado formado desechándolo y las aguas madres se extraen 3 veces con diclorometano (3 × 25 mL). Se lava la fase orgánica 3 veces con agua (3 × 20 mL) y se seca con sulfato sódico anhidro. Se elimina el sulfato sódico por filtrado a gravedad y el disolvente se evapora a presión reducida. El aceite obtenido se purifica por cromatografía en columna utilizando como fase móvil tolueno/dioxano (9:1, en volumen).

Así se obtienen 0,12 g (14,3 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 2926 (m, C-H alifáticos); 1588 (f, C=N).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 0,88 (t, 6H, (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CH<sub>3(2y4)</sub>); 1,37 (m, 8H, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>3(2y4)</sub>); 1,72 (q, 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>3(2y4)</sub>); 3,22 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CH<sub>3(4)</sub>); 3,33 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CH<sub>3(2)</sub>); 7,55 (dd, 1H, H<sub>6</sub>, J<sub>6-5</sub>=8,2 Hz, J<sub>6-7</sub>=4,2 Hz); 8,44 (dd, 1H, H<sub>5</sub>, J<sub>5-7</sub>=1,7 Hz); 9,17 (dd, 1H, H<sub>7</sub>).

**Análisis elemental:** C<sub>17</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>S<sub>2</sub>

Calculado (%): **C:** 60,89; **H:** 7,46; **N:** 12,54

Hallado (%): **C:** 60,51; **H:** 7,41; **N:** 12,89

**EM-DIP (70 eV) (m/z):** 336 (M<sup>+</sup>; 45 %); 195 (100 %); 179 (37 %); 162 (58 %); 137 (24 %); 103 (34 %); 91 (25 %); 58 (47 %).



## 2. DERIVADOS OBTENIDOS PARA LA SERIE II

### Bencilisoselenocianato

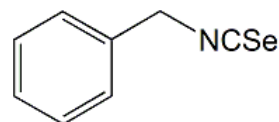
**Fórmula molecular:** C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>NSe

**Peso molecular:** 196 g/mol

**Punto de fusión:** -

**Apariencia:** Aceite marrón

**Referencia:** II.1



#### **Procedimiento experimental:**

En un matraz de 3 bocas se añaden 1,35 g (10,0 mmoles) de *N*-bencilformamida disueltos en 50 mL de tolueno seco. Posteriormente, se adicionan (en baño de hielo, atmósfera de nitrógeno y con agitación) 5,56 mL (40,0 mmoles) de trietilamina. A continuación, se añaden 1,18 g (15,0 mmoles) de selenio metal y, una vez añadido el selenio, se cargan en una ampolla de adición 1,57 mL (15,0 mmoles) de fosgeno en una solución de tolueno al 25 %. Se va añadiendo fosgeno al matraz de reacción durante 30 minutos manteniendo la atmósfera de nitrógeno y el baño de hielo, ya que en el proceso tiene lugar una reacción exotérmica. Se prolonga la agitación a reflujo durante 24 horas, siguiendo la reacción por CCF. Se filtra el precipitado y las aguas madres se tratan evaporando el disolvente a presión reducida y lavando 3 veces con tolueno (3 × 20 mL). El residuo obtenido se cromatografía en columna utilizando como fase móvil *n*-hexano. El isoselenocianato deseado se obtiene prácticamente puro.

Así se obtienen 0,23 g (11,8 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 2142 (f, N=C=Se).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 5,08 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph); 7,34 (m, 3H, H<sub>3</sub>+H<sub>4</sub>+H<sub>5</sub>); 7,43 (d, 2H, H<sub>2</sub>+H<sub>6</sub>, J<sub>2-3</sub>=J<sub>6-5</sub>=6,8 Hz).

**Análisis elemental:** C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>NSe

Calculado (%): **C:** 48,98; **H:** 3,57; **N:** 7,14

Hallado (%): **C:** 49,33; **H:** 3,86; **N:** 7,00

#### 4-bencilamino-2-hidroselenopirido[2,3-d]pirimidina

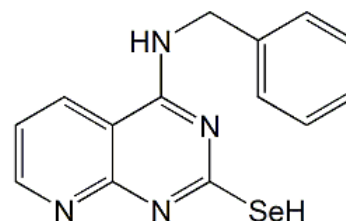
**Fórmula molecular:** C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>Se

**Peso molecular:** 315 g/mol

**Punto de fusión:** 225,7-226,2 °C

**Apariencia:** Sólido marrón

**Referencia:** II.2



#### **Procedimiento experimental:**

En un matraz se suspenden 0,49 g (4,13 mmoles) de 2-amino-3-cianopiridina disueltos en 30 mL de dioxano y 4 mL de piridina seca. Se adicionan (gota a gota y con agitación) 0,81 g (4,13 mmoles) de bencilisoselenocianato y se prolonga la agitación a reflujo durante 24 horas. Posteriormente, se filtra la disolución a gravedad para eliminar restos de selenio y se añaden 20 g de hielo. Se extrae la fase orgánica 3 veces con diclorometano (3 x 25 mL), se lava con agua (3 x 20 mL) y se seca bien con sulfato sódico anhidro. Se elimina el sulfato sódico filtrándolo a gravedad y el disolvente se evapora a presión reducida, lavando el residuo 3 veces con tolueno (3 x 25 mL). Una vez eliminado el tolueno a vacío, se obtiene un sólido marrón que se lava durante 1 hora con éter etílico y se filtra hasta sequedad. El sólido se recrystaliza de etanol.

Así se obtienen 90,0 mg (6,92 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3339 (m, N-H); 3080-3012 (m, C-H aromáticos); 2940 (m, C-H alifáticos); 1637 (f, C=N).

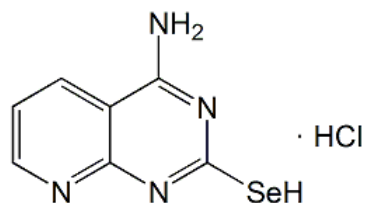
**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 6,00 (s.a, 2H, CH<sub>2</sub>-NH); 7,20-7,38 (m, 6H, H<sub>6</sub>+Ph); 8,53 (d, 1H, H<sub>5</sub>); 8,58 (d, 1H, H<sub>7</sub>); 9,90 (s, 1H, NH-CH<sub>2</sub>); 13,10 (s, 1H, SeH).

**Análisis elemental:** C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>Se

Calculado (%): **C:** 53,23; **H:** 3,81; **N:** 17,71

Hallado (%): **C:** 52,91; **H:** 4,02; **N:** 17,54

**EM-DIP (70 eV) (m/z):** 327 (M<sup>+</sup>; 9 %); 236 (27 %); 137 (23 %); 103 (31 %); 91 (100 %); 77 (30 %).

**4-amino-2-hidroselenopirido[2,3-d]pirimidina (Hidrocloruro)****Fórmula molecular:** C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>N<sub>4</sub>Se·0,25 HCl**Peso molecular:** 234,37 g/mol**Punto de fusión:** > 300 °C**Apariencia:** Sólido naranja**Referencia:** II.3**Procedimiento experimental:**

En un matraz se disuelven 0,90 g de 4-amino-2-cloropirido[2,3-d]pirimidina (5,00 mmol) en 50 mL de etanol absoluto. A continuación, se añaden 0,64 g de selenourea (5,23 mmol) y se prolonga la reacción a reflujo durante 4 horas con agitación. Posteriormente, se deja enfriar y aparece un precipitado naranja que se filtra a vacío, se lava 2 veces con agua y se deja que seque bien. El sólido resultante se recristaliza de etanol.

Así se obtienen 0,80 g (68,4 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3337, 3278 (m, N-H); 3152 (m, C-H aromáticos); 1647 (f, C=N).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 7,40 (m, 1H, H<sub>6</sub>); 8,51 (d, 1H, H<sub>5</sub>); 8,73 (m, 3H, H<sub>7</sub>+NH<sub>2</sub>); 13,17 (s, 1H, SeH).

**Análisis elemental:** C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>N<sub>4</sub>Se·0,25 HClCalculado (%): **C:** 35,84; **H:** 2,56; **N:** 23,91Hallado (%): **C:** 35,80; **H:** 2,96; **N:** 24,15

**EM-DIP (70 eV) (m/z):** 235 (M<sup>+</sup>; 14 %); 191 (27 %); 137 (88 %); 121 (77 %); 103 (38 %); 91 (100 %); 77 (54 %); 65 (43 %); 55 (59 %).

#### 4-amino-2-metilselenopirido[2,3-*d*]pirimidina (Hidroioduro)

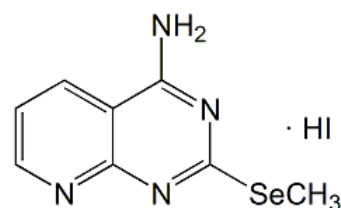
**Fórmula molecular:** C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>Se·0,1 HI

**Peso molecular:** 251,7 g/mol

**Punto de fusión:** 279-280 °C

**Apariencia:** Sólido marrón

**Referencia:** II.4



#### **Procedimiento experimental:**

En un matraz se disuelven 0,60 g de 4-amino-2-hidroselenopirido[2,3-*d*]pirimidina (2,56 mmol) en 50 mL de etanol absoluto. A continuación, se añaden 0,24 mL de ioduro de metilo (3,84 mmol) y se calienta la reacción. Se añaden 0,1 mL de *N,N*-dimetilformamida para favorecer la disolución de los reactivos y, una vez disueltos, la reacción permanece a reflujo durante 1,5 horas. Posteriormente, se evapora el disolvente a presión reducida y el producto resultante se lava con agua 2 veces y se filtra a vacío. A continuación, se lava el producto 3 veces con éter y se deja que seque bien a vacío. El sólido resultante se recristaliza de etanol. Así se obtienen 0,30 g (47,0 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3347, 3304 (m, N-H); 3120 (m, C-H aromáticos); 2928 (m, C-H alifáticos); 1647 (f, C=N).

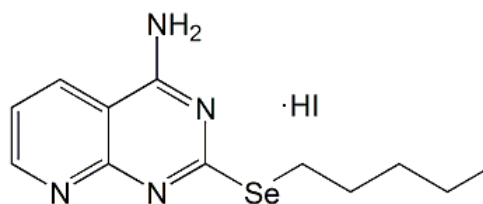
**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>) ppm:** 2,49 (s, 3H, SeCH<sub>3</sub>); 7,58 (dd, 1H, H<sub>6</sub>, J<sub>6-5</sub>=8,0 Hz, J<sub>6-7</sub>=4,5 Hz); 8,71 (dd, 1H, H<sub>5</sub>, J<sub>5-7</sub>=1,5 Hz); 8,90 (s.a., 2H, NH<sub>2</sub>); 8,92 (dd, 1H, H<sub>7</sub>).

**Análisis elemental:** C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>Se·0,1 HI

Calculado (%): **C:** 38,14; **H:** 3,18; **N:** 22,25

Hallado (%): **C:** 38,33; **H:** 3,27; **N:** 22,40

**EM-DIP (70 eV) (m/z):** 253 (M<sup>+</sup>; 6 %); 240 (45 %); 191 (24 %); 160 (100 %); 145 (42 %); 137 (29 %); 121 (49 %); 103 (60 %); 91 (64 %); 76 (53 %); 64 (29 %); 55 (42 %).

**4-amino-2-pentilselenopirido[2,3-d]pirimidina (Hidroioduro)****Fórmula molecular:** C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>Se·0,25 HI**Peso molecular:** 327 g/mol**Punto de fusión:** 183-184 °C**Apariencia:** Sólido amarillo**Referencia:** II.5**Procedimiento experimental:**

Sobre un matraz se disuelven 0,57 g de 4-amino-2-hidroselenopirido[2,3-d]pirimidina (2,43 mmol) en 50 mL de etanol absoluto y 10 gotas de *N,N*-dimetilformamida. Se añaden 0,48 mL (3,65 mmol) de ioduro de pentilo, poco a poco y con agitación, y se prolonga la agitación a reflujo durante 1,5 horas. Posteriormente, se filtra la disolución para retirar restos de precipitado negro (selenio metal) y se evapora el disolvente a presión reducida obteniéndose un aceite marrón. Se añaden 20 mL de agua y precipita un sólido amarillo que se filtra a vacío hasta sequedad. El sólido obtenido se recristaliza de etanol.

Así se obtienen 0,58 g (73,5 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 2946-2917 (m, C-H alifáticos); 1610 (f, C=N).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 0,87 (t, 3H, (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CH<sub>3</sub>); 1,35 (m, 4H, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>); 1,77 (q, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>); 3,16 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>); 7,75 (dd, 1H, H<sub>6</sub>, J<sub>6-5</sub>=8,0 Hz, J<sub>6-7</sub>=4,2 Hz); 8,23 (s.a., 2H, NH<sub>2</sub>); 8,60 (dd, 1H, H<sub>5</sub>, J<sub>5-7</sub>=1,2 Hz); 8,87 (dd, 1H, H<sub>7</sub>).

**RMN-<sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 14,7 (Se-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CH<sub>3</sub>); 22,6 (Se-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>); 25,7 (Se-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>); 31,8 (Se-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>); 32,9 (Se-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>); 108,3 (C<sub>10</sub>); 121,2 (C<sub>6</sub>); 134,9 (C<sub>5</sub>); 157,3 (C<sub>7</sub>); 161,4 (C<sub>4</sub>+C<sub>9</sub>); 167,9 (C<sub>2</sub>).

**Análisis elemental:** C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>Se·0,25 HICalculado (%): **C:** 44,04; **H:** 4,89; **N:** 17,12Hallado (%): **C:** 44,39; **H:** 5,09; **N:** 16,85

**EM-DIP (70 eV) (m/z):** 296 (M<sup>+</sup>; 26 %); 226 (100 %); 215 (48 %); 146 (49 %); 121 (79 %); 103 (47 %).

## 2,4-dihidroselenopirido[2,3-d]pirimidina (Hidrocloruro)

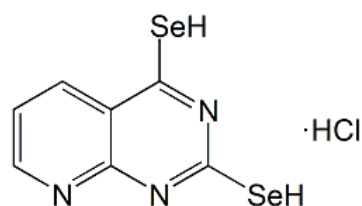
**Fórmula molecular:** C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>N<sub>3</sub>Se<sub>2</sub>·1,35 HCl

**Peso molecular:** 338,75 g/mol

**Punto de fusión:** > 300 °C

**Apariencia:** Sólido marrón

**Referencia:** II.6



### Procedimiento experimental:

En un matraz se disuelven 0,70 g de 2,4-dicloropirido[2,3-d]pirimidina (3,50 mmol) en 50 mL de etanol absoluto. A continuación, se añaden 0,91 g de selenourea (7,35 mmol) y se prolonga la agitación a reflujo durante 5 horas. Pasado este tiempo, se filtra el precipitado formado a vacío y se lava con agua 3 veces (3 × 20 mL). Se deja secar bien y el sólido resultante se recristaliza de etanol.

Así se obtienen 0,54 g (45,8 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3044 (m, C-H aromáticos); 1545 (f, C=N).

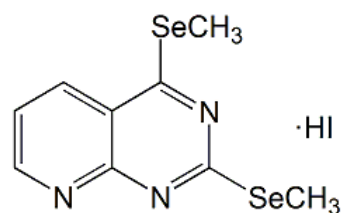
**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 7,39 (ddd, 1H, H<sub>6</sub>, J<sub>6-5</sub>=8,0 Hz, J<sub>6-7</sub>=4,7 Hz, J<sub>6-SeH(4)</sub>=0,5 Hz); 8,55 (ddd, 1H, H<sub>5</sub>, J<sub>5-7</sub>=1,9 Hz, J<sub>5-SeH(4)</sub>=0,6 Hz); 8,83 (ddd, 1H, H<sub>7</sub>, J<sub>7-SeH(4)</sub>=0,6 Hz); 14,18 (s, 1H, SeH<sub>(4)</sub>); 14,69 (s, 1H, SeH<sub>(2)</sub>).

**Análisis elemental:** C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>N<sub>3</sub>Se<sub>2</sub>·1,35 HCl

Calculado (%): **C:** 24,79; **H:** 1,87; **N:** 12,39

Hallado (%): **C:** 24,42; **H:** 1,59; **N:** 12,38

**EM-DIP (70 eV) (m/z):** 290 (M<sup>+</sup>; 24 %); 210 (26 %); 160 (48 %); 130 (52 %); 103 (100 %); 91 (33 %); 77 (67 %); 59 (37 %); 50 (32 %).

**2,4-dimetilselenopirido[2,3-*d*]pirimidina (Hidroioduro)****Fórmula molecular:** C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>Se<sub>2</sub>·0,05 HI**Peso molecular:** 323 g/mol**Punto de fusión:** 298-299 °C**Apariencia:** Sólido rojo**Referencia:** II.7**Procedimiento experimental:**

En un matraz se disuelven 0,50 g de 2,4-dihidroselenopirido[2,3-*d*]pirimidina (1,48 mmol) en 40 mL de hidróxido sódico 0,4 N. A continuación, se añaden 0,14 mL de yoduro de metilo (2,21 mmol) y se prolonga la agitación a reflujo durante 24 horas. Pasado este tiempo, se deja enfriar la disolución y se añade ácido acético glacial hasta pH=5-6. Se filtra el precipitado formado desechándolo y las aguas madres se extraen 3 veces con diclorometano (3 × 25 mL). Se lava la fase orgánica 3 veces con agua (3 × 20 mL) y se seca con sulfato sódico anhidro. Se filtra la solución a gravedad para eliminar el sulfato sódico y el disolvente se evapora a presión reducida. El aceite obtenido se precipita con éter y se filtra a vacío hasta sequedad. El sólido resultante se recristaliza de etanol.

Así se obtienen 0,11 g (22,9 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 1592 (f, C=N).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>) ppm:** 2,55 (s, 3H, SeCH<sub>3(4)</sub>); 2,59 (s, 3H, SCH<sub>3(2)</sub>); 7,61 (dd, 1H, H<sub>6</sub>, J<sub>6-5</sub>=8,2 Hz, J<sub>6-7</sub>=4,4 Hz); 8,44 (dd, 1H, H<sub>5</sub>); 9,11 (dd, 1H, H<sub>7</sub>).

**Análisis elemental:** C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>Se<sub>2</sub>·0,05 HI

Calculado (%): **C:** 33,39; **H:** 2,80; **N:** 12,99

Hallado (%): **C:** 33,08; **H:** 2,74; **N:** 13,05

**EM-DIP (70 eV) (m/z):** 324 (M<sup>+</sup>; 16 %); 254 (50 %); 179 (30 %); 156 (32 %); 140 (100 %); 127 (51 %); 116 (75 %); 76 (44 %); 50 (23 %).

## 2,4-dipentilselenopirido[2,3-d]pirimidina

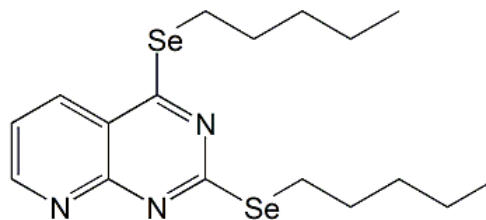
**Fórmula molecular:** C<sub>17</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>Se<sub>2</sub>

**Peso molecular:** 429 g/mol

**Punto de fusión:** -

**Apariencia:** Aceite marrón

**Referencia:** II.8



### Procedimiento experimental:

En un matraz se disuelven 0,54 g de 2,4-dihidroselenopirido[2,3-d]pirimidina (1,87 mmol) en 40 mL de hidróxido sódico 0,4 N. A continuación, se añaden 0,73 mL de yoduro de pentilo (5,60 mmol) y se prolonga la agitación a reflujo durante 24 horas. Pasado este tiempo, se deja enfriar y se añade ácido acético glacial hasta pH=5-6. Se filtra el precipitado formado desechándolo y las aguas madres se extraen 3 veces con diclorometano (3 × 25 mL). Se lava la fase orgánica 3 veces con agua (2 × 20 mL) y se seca con sulfato sódico anhidro. Se filtra la solución a gravedad para eliminar el sulfato sódico anhidro y el disolvente se evapora a presión reducida. El aceite obtenido se purifica por cromatografía en columna utilizando como fase móvil tolueno/dioxano (9:1, en volumen).

Así se obtienen 0,15 g (18,7 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 1594 (m, C=N).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 0,86 (t, 6H, (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CH<sub>3(2y4)</sub>); 1,35 (m, 8H, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>3(2y4)</sub>); 1,70 (q, 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>3(2y4)</sub>); 3,19 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CH<sub>3(4)</sub>); 3,38 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CH<sub>3(2)</sub>); 6,57 (dd, 1H, H<sub>6</sub>, J<sub>6-5</sub>=8,2 Hz, J<sub>6-7</sub>=4,2 Hz); 7,76 (dd, 1H, H<sub>5</sub>, J<sub>5-7</sub>=1,7 Hz); 8,40 (dd, 1H, H<sub>7</sub>).

**Análisis elemental:** C<sub>17</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>Se<sub>2</sub>

Calculado (%): **C:** 47,55; **H:** 5,83; **N:** 9,79

Hallado (%): **C:** 47,62; **H:** 5,62; **N:** 9,85

**EM-DIP (70 eV) (m/z):** 430 (M<sup>+</sup>; 34 %); 287 (100 %); 179 (45 %); 156 (32 %); 103 (23 %); 77 (31 %).



### 3. DERIVADOS OBTENIDOS PARA LA SERIE III

#### 4-cloro-2-mercaptoquinazolina

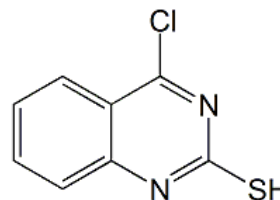
**Fórmula molecular:** C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>N<sub>2</sub>ClS

**Peso molecular:** 196,5 g/mol

**Punto de fusión:** -

**Apariencia:** Aceite marrón

**Referencia:** III.a



**Procedimiento experimental:**

Sobre 2,0 g (11,23 mmoles) de 4-hidroxi-2-mercaptoquinazolina se adicionan con agitación 20 mL de cloruro de fosforilo y 0,1 mL de *N,N*-dimetilformamida y se prolonga la agitación a reflujo durante 2 horas. Posteriormente, se evapora el disolvente a presión reducida obteniéndose un aceite marrón al que se le añaden 20 g de hielo. El residuo se extrae 3 veces con cloroformo (3 × 20 mL), se lava la fase orgánica 3 veces con agua (3 × 20 mL) y se seca con sulfato sódico anhidro. Se elimina el sulfato sódico filtrándolo por gravedad y se elimina el disolvente a presión reducida. Se utiliza sin posterior purificación.

Así se obtienen 1,45 g (65,6 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3038 (m, C-H aromáticos); 2925 (m, C-H alifáticos ); 1615 (f, C=N).

## 4-bencilamino-2-mercaptoquinazolina

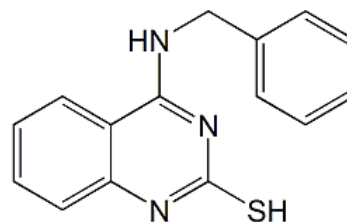
**Fórmula molecular:** C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>S

**Peso molecular:** 267 g/mol

**Punto de fusión:** 208-209 °C

**Apariencia:** Sólido marrón

**Referencia:** III.1



### Procedimiento experimental:

En un matraz se disuelven 0,76 g de 4-cloro-2-mercaptoquinazolina (3,87 mmol) en 50 mL de etanol absoluto. A continuación, se añaden 0,46 mL de bencilamina (4,25 mmol) y se prolonga la agitación a reflujo durante 16 horas. Posteriormente, se evapora el disolvente a presión reducida y el aceite resultante se precipita con agua y se filtra a vacío hasta sequedad. El sólido resultante se recrystaliza de etanol.

Así se obtienen 60 mg (6,0 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3204 (m, N-H); 3096 (m, C-H aromáticos); 2921 (m, C-H alifáticos); 1615 (m, C=N).

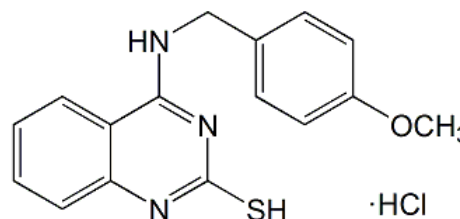
**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 4,56 (d, 2H, CH<sub>2</sub>-NH; J<sub>CH<sub>2</sub>-NH</sub>=5,6 Hz); 6,68 (t, 1H, NH-CH<sub>2</sub>); 7,10 (dt, 1H, H<sub>7</sub>, J<sub>7-8</sub>=7,9 Hz, J<sub>7-6</sub>=7,2 Hz, J<sub>7-5</sub>=1,1 Hz); 7,26 (m, 2H, H<sub>2</sub>+H<sub>6</sub>); 7,36 (m, 4H, H<sub>8</sub>+H<sub>3</sub>+H<sub>4</sub>+H<sub>5</sub>); 7,56 (dt, 1H, H<sub>6</sub>, J<sub>6-5</sub>=8,0 Hz, J<sub>6-8</sub>=1,6 Hz); 7,89 (dd, 1H, H<sub>5</sub>); 10,92 (s, 1H, SH).

**Análisis elemental:** C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>S

Calculado (%): **C:** 67,41; **H:** 4,87; **N:** 15,73

Hallado (%): **C:** 67,78; **H:** 4,97; **N:** 15,34

**EM-DIP (70 eV) (m/z):** 267 (M<sup>+</sup>; 11 %); 251 (100 %); 234 (11 %); 178 (29 %); 121 (18 %); 106 (42 %); 91 (46 %).

**2-mercapto-4-(4-metoxibencil)aminoquinazolina (Hidrocloruro)****Fórmula molecular:** C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>OS·0,3 HCl**Peso molecular:** 307,95 g/mol**Punto de fusión:** 222-223 °C**Apariencia:** Sólido blanco**Referencia:** III.2**Procedimiento experimental:**

En un matraz se disuelven 1,88 g de 4-cloro-2-mercaptoquinazolina (9,57 mmol) en 50 mL de etanol absoluto. A continuación, se añaden 1,36 mL de 4-metoxibencilamina (10,00 mmol) y la reacción permanece a reflujo con agitación durante 16 horas. Aparece un precipitado blanco que se filtra a vacío hasta sequedad. El sólido resultante se recrystaliza de etanol.

Así se obtienen 0,38 g (12,9 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3220 (m, N-H); 3124 (m, C-H aromáticos); 2962-2833 (m, C-H alifáticos); 1604 (m, C=N).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 3,75 (m, 4H, H<sub>2</sub>O+NH+OCH<sub>3</sub>); 4,67 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-NH); 6,85 (d, 2H, H<sub>3</sub>+H<sub>5</sub>, J<sub>H3-H2</sub>=J<sub>H5-H6</sub>=7,5 Hz); 7,27 (d, 2H, H<sub>2</sub>+H<sub>6</sub>); 7,68 (m, 1H, H<sub>7</sub>); 7,96 (m, 2H, H<sub>8</sub>+H<sub>6</sub>); 8,54 (d, 1H, H<sub>5</sub>, J<sub>5-6</sub>=8,4 Hz); 10,36 (s, 1H, SH).

**Análisis elemental:** C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>OS·0,3 HClCalculado (%): **C:** 62,34; **H:** 4,87; **N:** 13,64Hallado (%): **C:** 62,07; **H:** 4,82; **N:** 13,35

**EM-DIP (70 eV) (m/z):** 296 (M<sup>+</sup>; 38 %); 191 (76 %); 175 (57 %); 163 (37 %); 136 (38 %); 121 (100 %); 91 (21 %); 77 (18 %).

## 4-hidroxi-2-metiltioquinazolina

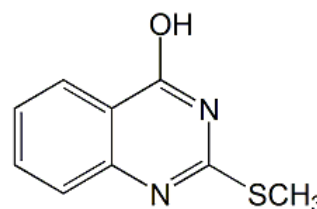
**Fórmula molecular:** C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>OS

**Peso molecular:** 192 g/mol

**Punto de fusión:** 195-196 °C

**Apariencia:** Sólido blanco

**Referencia:** III.3



### Procedimiento experimental:

Sobre 2,0 g (11,2 mmoles) de 4-hidroxi-2-mercaptoquinazolina disueltos en 50 mL de hidróxido sódico 0,4 N se adicionan (con agitación) 0,84 mL (13,4 mmoles) de yoduro de metilo. A continuación, se prolonga la agitación a reflujo durante 18 horas. Posteriormente, se deja enfriar y se añade ácido acético glacial hasta pH=5-6. Se introduce la disolución en el congelador y a las 5 horas aparece un precipitado de color blanco que se filtra a vacío hasta sequedad. Se utiliza sin más purificación.

Así se obtienen 1,90 g (88,4 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3163-3053 (m, C-H aromáticos); 3050-2845 (m, C-H alifáticos); 1700 (f, C=O); 1618 (f, C=N).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 2,55 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>); 3,38 (s.a., 1H, H<sub>2</sub>O+OH); 7,41 (dd, 1H, H<sub>7</sub>, J<sub>7-8</sub>=8,0 Hz, J<sub>7-6</sub>=6,9 Hz); 7,53 (d, 1H, H<sub>8</sub>); 7,75 (dd, 1H, H<sub>6</sub>, J<sub>6-5</sub>=8,3 Hz); 8,03 (d, 1H, H<sub>5</sub>).

**Análisis elemental:** C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>OS

Calculado (%): **C:** 56,25; **H:** 4,16; **N:** 16,66

Hallado (%): **C:** 56,14; **H:** 4,10; **N:** 16,81

**EM-DIP (70 eV) (m/z):** 192 (M<sup>+</sup>; 100 %); 146 (25 %); 121 (43 %); 91 (38 %).

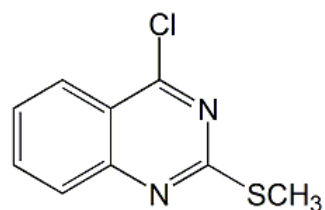
## 4-cloro-2-metiltioquinazolina

**Fórmula molecular:** C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>N<sub>2</sub>ClS

**Peso molecular:** 210,5 g/mol

**Apariencia:** Sólido marrón

**Referencia:** III.b



### **Procedimiento experimental:**

Sobre 1,80 g (9,37 mmoles) de 4-hidroxi-2-metiltioquinazolina se adicionan con agitación 20 mL de cloruro de fosforilo y 0,1 mL de *N,N*-dimetilformamida seca. A continuación, se prolonga la agitación a reflujo durante 2 horas. Posteriormente, se evapora el disolvente a presión reducida obteniéndose un aceite marrón al que se le añaden 15 g de hielo y se extrae 3 veces con cloroformo (3 × 20 mL). Se lava la fase orgánica 3 veces con agua (3 × 20 mL) y se seca con sulfato sódico anhidro. Se filtra la disolución para eliminar el sulfato sódico y se evapora el disolvente a presión reducida. Se utiliza sin ulterior purificación.

Así se obtienen 1,45 g (73,6 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3043 (m, C-H aromáticos); 2920 (m, C-H alifáticos); 1610 (f, C=N).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 2,36 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>); 7,73 (ddd, 1H, H<sub>7</sub>, J<sub>7-6</sub>=7,0 Hz, J<sub>7-8</sub>=8,1 Hz, J<sub>7-5</sub>=1,1 Hz); 7,90 (ddd, 1H, H<sub>8</sub>, J<sub>8-6</sub>=1,2 Hz, J<sub>8-5</sub>=0,6 Hz); 8,05 (ddd, 1H, H<sub>6</sub>, J<sub>6-5</sub>=8,4 Hz); 8,18 (ddd, 1H, H<sub>5</sub>).

## 4-hidroxi-2-pentiltioquinazolina

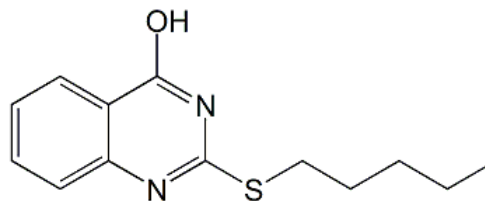
**Fórmula molecular:** C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>OS

**Peso molecular:** 248 g/mol

**Punto de fusión:** 161-162 °C

**Apariencia:** Sólido blanco

**Referencia:** III.4



### Procedimiento experimental:

En un matraz se disuelven 1,52 g de 4-hidroxi-2-mercaptoquinazolina (8,42 mmol) en 50 mL de una disolución de hidróxido sódico 0,4 N. A continuación, se añaden 1,32 mL de yoduro de pentilo (10,10 mmol) y la reacción permanece a reflujo y con agitación durante 18 horas. Posteriormente, se deja que la disolución se enfríe y se añade ácido acético glacial hasta pH=5-6. Aparece un precipitado blanco que se filtra a vacío hasta sequedad. El sólido resultante se recristaliza de etanol.

Así se obtienen 1,85 g (89,0 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3159 (m, C-H aromáticos); 2954-2862 (m, C-H alifáticos); 1675 (m, C=O); 1549 (m, C=N).

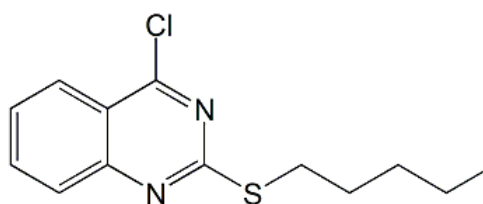
**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 0,87 (t, 3H, (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CH<sub>3</sub>); 1,35 (m, 4H, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>); 1,69 (q, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>); 3,20 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>); 7,41 (t, 1H, H<sub>7</sub>); 7,50 (d, 1H, H<sub>8</sub>); 7,74 (t, 1H, H<sub>6</sub>); 8,01 (d, 1H, H<sub>5</sub>); 12,53 (s, 1H, OH).

**Análisis elemental:** C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>OS

Calculado (%): **C:** 62,90; **H:** 6,45; **N:** 11,29

Hallado (%): **C:** 62,58; **H:** 6,33; **N:** 11,21

**EM-DIP (70 eV) (m/z):** 248 (M<sup>+</sup>; 21 %); 215 (20 %); 201 (49 %); 191 (33 %); 178 (100 %); 162 (33 %); 145 (20 %); 121 (44 %); 91 (26 %).

**4-cloro-2-pentiltioquinazolina****Fórmula molecular:** C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>ClS**Peso molecular:** 266,5 g/mol**Punto de fusión:** -**Apariencia:** Aceite marrón**Referencia:** III.c**Procedimiento experimental:**

Sobre un matraz se disuelve 1,0 g de 4-hidroxi-2-pentiltioquinazolina (4,0 mmol) en 20 mL de cloruro de fosforilo y 0,1 mL de *N,N*-dimetilformamida seca. A continuación, se prolonga la agitación a reflujo durante 2 horas. Posteriormente, se evapora el disolvente a presión reducida obteniéndose un aceite marrón al que se le añaden 15 g de hielo y se extrae 3 veces con cloroformo (3 × 20 mL). Se lava la fase orgánica 3 veces con agua (3 × 20 mL) y se seca con sulfato sódico anhidro. Se filtra la disolución para eliminar el sulfato sódico y se evapora el disolvente a presión reducida. Se utiliza sin posterior purificación.

Así se obtienen 0,73 g (62,8 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 2946-2917 (m, C-H alifáticos ); 1610 (f, C=N).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 0,87 (t, 3H, (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CH<sub>3</sub>); 1,34 (m, 4H, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>); 1,70 (q, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>); 3,22 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>); 7,50 (t, 1H, H<sub>7</sub>); 7,71 (d, 1H, H<sub>8</sub>); 8,02 (t, 1H, H<sub>6</sub>); 8,32 (d, 1H, H<sub>5</sub>).

## 4-fenilamino-2-metiltioquinazolina (Hidrocloruro)

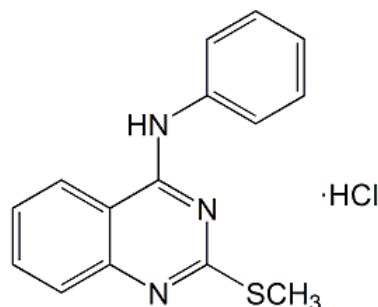
**Fórmula molecular:** C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>S·1,6 HCl

**Peso molecular:** 325,40 g/mol

**Punto de fusión:** 79-80 °C

**Apariencia:** Sólido marrón

**Referencia:** III.5



### Procedimiento experimental:

Sobre 1,09 g (5,18 mmoles) de 4-cloro-2-metiltioquinazolina disueltos en 25 mL de etanol absoluto se adicionan (gota a gota, en baño de hielo y con agitación) 0,52 mL (5,69 mmoles) de anilina y se prolonga la agitación a reflujo durante 6 horas. Pasado este tiempo, se evapora el disolvente a presión reducida obteniendo un aceite. Se adicionan 30 mL de agua y el sólido resultante se filtra a vacío, se lava con éter etílico, filtrándolo hasta sequedad, y se recristaliza de etanol.

Así se obtienen 1,22 g (72,6 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3329 (m, N-H); 2931 (m, C-H alifáticos); 1563 (f, C=N).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 2,52 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>); 7,22 (t, 1H, H<sub>4</sub>); 7,44 (t, 2H, H<sub>3</sub>+H<sub>5</sub>); 7,58 (t, 1H, H<sub>7</sub>, J<sub>7-8</sub>=J<sub>7-6</sub>=8,0 Hz); 7,68 (d, 1H, H<sub>8</sub>); 7,81 (d, 2H, H<sub>2</sub>+H<sub>6</sub>); 7,87 (t, 1H, H<sub>6</sub>, J<sub>6-5</sub>=8,0 Hz); 8,62 (d, 1H, H<sub>5</sub>); 10,51 (s.a., 1H, NH-Ph).

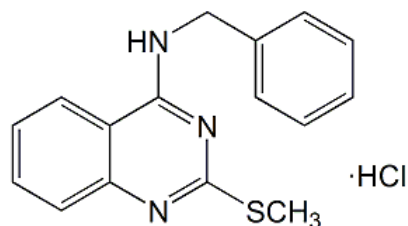
**Análisis elemental:** C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>S·1,6 HCl

Calculado (%): **C:** 54,70; **H:** 4,49; **N:** 12,91

Hallado (%): **C:** 54,91; **H:** 4,62; **N:** 12,63

**EM-DIP (70 eV) (m/z):** 267 (M<sup>+</sup>; 100 %); 220 (74 %); 129 (9 %); 77 (12 %).



**4-bencilamino-2-metilthioquinazolina (Hidrocloruro)****Fórmula molecular:** C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>S·0,45 HCl**Peso molecular:** 297,42 g/mol**Punto de fusión:** 139,2-140 °C**Apariencia:** Sólido blanco**Referencia:** III.6**Procedimiento experimental:**

Sobre 0,86 g (4,12 mmoles) de 4-cloro-2-metilthioquinazolina disueltos en 25 mL de etanol absoluto se adicionan (gota a gota, en baño de hielo y con agitación) 0,49 mL (4,53 mmoles) de bencilamina. A continuación, se prolonga la agitación a reflujo durante 6 horas y se evapora el disolvente a presión reducida obteniéndose un aceite marrón. Se adicionan 50 mL de agua y el sólido resultante se filtra, se lava con éter etílico (3 × 15 mL), filtrándolo hasta sequedad, y se recrystaliza de *n*-hexano y metanol (9:1, en volumen).

Así se obtienen 0,56 g (46,2 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3210 (m, N-H); 3059 (m, C-H aromáticos); 2973 (m, C-H alifáticos); 1615-1567 (f, C=N).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 2,49 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>); 4,79 (d, 2H, CH<sub>2</sub>-NH, J<sub>CH<sub>2</sub>-NH</sub>=5,8 Hz); 7,25 (t, 1H, H<sub>4</sub>, J<sub>4-3</sub>=J<sub>4-5</sub>=7,2 Hz); 7,33 (t, 2H, H<sub>3</sub>+H<sub>5</sub>, J<sub>3-2</sub>=J<sub>5-6</sub>=7,6 Hz); 7,39 (d, 2H, H<sub>2</sub>+H<sub>6</sub>); 7,46 (dd, 1H, H<sub>7</sub>, J<sub>7-8</sub>=8,0 Hz, J<sub>7-6</sub>=7,1 Hz); 7,57 (d, 1H, H<sub>8</sub>); 7,76 (dd, 1H, H<sub>6</sub>, J<sub>6-5</sub>=8,4 Hz); 8,31 (d, 1H, H<sub>5</sub>); 9,42 (s.a., 1H, NH-CH<sub>2</sub>).

**Análisis elemental:** C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>S·0,45 HClCalculado (%): **C:** 64,55; **H:** 5,04; **N:** 14,12Hallado (%): **C:** 64,47; **H:** 5,35; **N:** 13,91

**EM-DIP (70 eV) (m/z):** 281 (M<sup>+</sup>; 100 %); 235 (18 %); 191 (38 %); 106 (20 %); 91 (29 %); 77 (10 %).

#### 4-(2-feniletil)amino-2-metilquinazolina (Hidrocloruro)

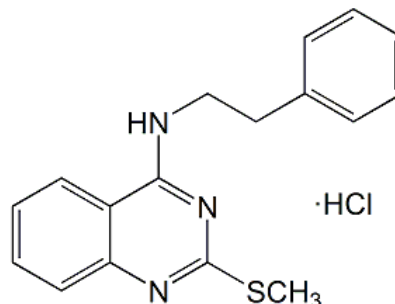
**Fórmula molecular:** C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>S·0,8 HCl

**Peso molecular:** 324,2 g/mol

**Punto de fusión:** 60-61 °C

**Apariencia:** Sólido marrón

**Referencia:** III.7



#### **Procedimiento experimental:**

Sobre 1,28 g (6,08 mmoles) de 4-cloro-2-metilquinazolina disueltos en 25 mL de etanol absoluto se adicionan (gota a gota, en baño de hielo y con agitación) 0,87 mL (6,69 mmoles) de 2-fenetilamina y se prolonga la agitación a reflujo durante 6 horas. Pasado ese tiempo, se evapora el disolvente a presión reducida obteniéndose un aceite marrón. Se adicionan 30 mL de agua y el sólido resultante se filtra a vacío, se lava con éter etílico, filtrándolo hasta sequedad, y se recristaliza de etanol.

Así se obtienen 0,84 g (42,6 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3248 (m, N-H); 3063-3024 (m, C-H aromáticos); 2925 (m, C-H alifáticos); 1563 (f, C=N).

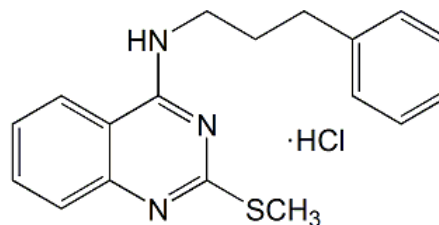
**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 2,59 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>); 2,99 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Ph); 3,79 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Ph); 7,26 (m, 5H, Ph); 7,46 (t, 1H, H<sub>7</sub>, J<sub>7-8</sub>=J<sub>7-6</sub>=8,0 Hz); 7,57 (d, 1H, H<sub>8</sub>); 7,77 (t, 1H, H<sub>6</sub>, J<sub>6-5</sub>=8,0 Hz); 8,27 (d, 1H, H<sub>5</sub>); 9,21 (s.a., 1H, NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Ph).

**Análisis elemental:** C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>S·0,8 HCl

Calculado (%): **C:** 62,89; **H:** 5,83; **N:** 12,80

Hallado (%): **C:** 62,92; **H:** 5,59; **N:** 12,95

**EM-DIP (70 eV) (m/z):** 295 (M<sup>+</sup>; 37 %); 204 (45 %); 191 (100 %); 175 (27 %); 160 (18 %); 145 (27 %); 129 (14 %); 91 (17 %).

**4-(3-fenilpropil)amino-2-metiltioquinazolina (Hidrocloruro)****Fórmula molecular:** C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>S·0,1 HCl**Peso molecular:** 312,65 g/mol**Punto de fusión:** 117-118 °C**Apariencia:** Sólido beige**Referencia:** III.8**Procedimiento experimental:**

Sobre 1,10 g (5,22 mmoles) de 4-cloro-2-metiltioquinazolina disueltos en 25 mL de etanol absoluto se adicionan (gota a gota, en baño de hielo y con agitación) 0,82 mL (5,75 mmoles) de 3-fenilpropilamina y se prolonga la agitación a reflujo durante 6 horas. Pasado ese tiempo, se evapora el disolvente a presión reducida obteniéndose un aceite naranja. Se adicionan 30 mL de agua y el sólido resultante se filtra a vacío, se lava con éter etílico, filtrándolo hasta sequedad, y se recristaliza de etanol.

Así se obtienen 1,19 g (73,1 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3234 (m, N-H); 3054 (m, C-H aromáticos); 2928 (m, C-H alifáticos); 1568 (f, C=N).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 1,96 (m, 2H, NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Ph); 2,47 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>); 2,68 (m, 2H, NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Ph); 3,53 (m, 2H, NH-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-Ph); 7,23 (m, 5H, Ph); 7,38 (t, 1H, H<sub>7</sub>, J<sub>7-8</sub>=J<sub>7-6</sub>=7,7 Hz); 7,52 (d, 1H, H<sub>8</sub>); 7,69 (t, 1H, H<sub>6</sub>, J<sub>6-5</sub>=7,7 Hz); 8,18 (d, 1H, H<sub>5</sub>); 8,43 (s.a., 1H, NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-Ph).

**Análisis elemental:** C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>S·0,1 HClCalculado (%): **C:** 69,08; **H:** 6,12; **N:** 13,43Hallado (%): **C:** 68,93; **H:** 6,48; **N:** 13,15

**EM-DIP (70 eV) (m/z):** 309 (M<sup>+</sup>; 43 %); 218 (20 %); 205 (100 %); 191 (21 %); 159 (26 %); 91 (25 %).

#### 4-(4-fenilbutil)amino-2-metiltioquinazolina (Hidrocloruro)

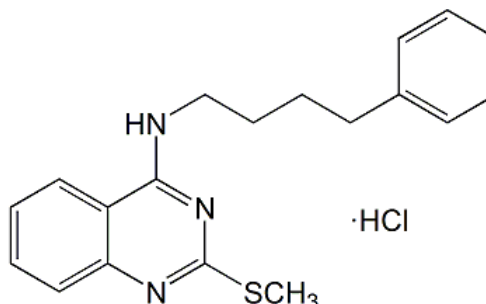
**Fórmula molecular:** C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>S·1,65 HCl

**Peso molecular:** 383,22 g/mol

**Punto de fusión:** 80,0-80,6 °C

**Apariencia:** Sólido marrón

**Referencia:** III.9



#### Procedimiento experimental:

Sobre 1,0 g (4,75 mmoles) de 4-cloro-2-metiltioquinazolina disuelto en 25 mL de etanol absoluto se adicionan (gota a gota, en baño de hielo y con agitación) 0,81 mL (5,22 mmoles) de 3-fenilbutilamina y se prolonga la agitación a reflujo durante 6 horas. Pasado ese tiempo, se evapora el disolvente a presión reducida obteniéndose un aceite naranja. Se adicionan 30 mL de agua destilada y el sólido resultante se filtra a vacío, se lava con éter etílico, filtrándolo hasta sequedad, y se recristaliza de etanol.

Así se obtienen 1,09 g (59,9 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3206 (m, N-H); 3080 (m, C-H aromáticos); 2929 (m, C-H alifáticos); 1569 (f, C=N).

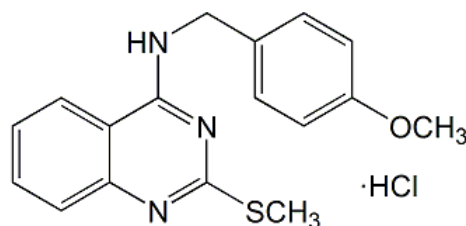
**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 1,70 (m, 4H, NH-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Ph); 2,49 (m, 2H, NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-Ph); 2,65 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>); 3,73 (m, 2H, NH-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-Ph); 7,21 (m, 5H, Ph); 7,60 (t, 1H, H<sub>7</sub>, J<sub>7-8</sub>=J<sub>7-6</sub>=8,0 Hz); 7,71 (d, 1H, H<sub>8</sub>); 7,91 (t, 1H, H<sub>6</sub>, J<sub>6-5</sub>=8,0 Hz); 8,53 (d, 1H, H<sub>5</sub>); 10,39 (s.a., 1H, NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-Ph).

**Análisis elemental:** C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>S·1,65 HCl

Calculado (%): **C:** 59,49; **H:** 5,91; **N:** 10,95

Hallado (%): **C:** 59,40; **H:** 6,30; **N:** 10,60

**EM-DIP (70 eV) (m/z):** 323 (M<sup>+</sup>; 100 %); 276 (30 %); 218 (91 %); 205 (32 %); 191 (41 %); 175 (23 %); 145 (29 %); 91 (38 %).

**2-metilto-4-(4-metoxibencil)aminoquinazolina (Hidrocloruro)****Fórmula molecular:** C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>OS·0,35 HCl**Peso molecular:** 323,77 g/mol**Punto de fusión:** 109-110 °C**Apariencia:** Sólido blanco**Referencia:** III.10**Procedimiento experimental:**

Sobre 0,85 g (4,00 mmoles) de 4-cloro-2-metiltoquinazolina disueltos en 25 mL de etanol absoluto se adicionan (gota a gota, en baño de hielo y con agitación) 0,58 mL (4,40 mmoles) de 4-metoxibencilamina. A continuación, se prolonga la agitación a reflujo durante 6 horas y se evapora el disolvente a presión reducida obteniéndose un aceite marrón. Se adicionan 50 mL de agua y el sólido resultante se filtra, se lava con éter etílico, filtrándolo hasta sequedad, y se recristaliza de *n*-hexano y metanol.

Así se obtienen 0,12 g (7,3 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3283 (m, N-H); 2929 (m, C-H alifáticos); 1612 (f, C=N).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 2,53 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>); 3,72 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 4,71 (d, 2H, CH<sub>2</sub>-NH, J<sub>CH<sub>2</sub>-NH</sub>=5,8 Hz); 6,89 (d, 2H, H<sub>3</sub>+H<sub>5</sub>, J<sub>3'-2</sub>=J<sub>5'-6</sub>=8,6 Hz); 7,32 (d, 2H, H<sub>2</sub>+H<sub>6</sub>); 7,43 (dd, 1H, H<sub>7</sub>, J<sub>7-8</sub>=7,9 Hz, J<sub>7-6</sub>=7,0 Hz); 7,55 (d, 1H, H<sub>8</sub>); 7,74 (dd, 1H, H<sub>6</sub>, J<sub>6-5</sub>=8,4 Hz); 8,26 (d, 1H, H<sub>5</sub>); 9,24 (s.a., 1H, NH-CH<sub>2</sub>).

**Análisis elemental:** C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>OS·0,35 HCl

Calculado (%): **C:** 63,00; **H:** 5,25; **N:** 12,97

Hallado (%): **C:** 63,09; **H:** 5,37; **N:** 12,88

**EM-DIP (70 eV) (m/z):** 311 (M<sup>+</sup>; 26 %); 191 (18 %); 136 (24 %); 121 (100 %); 91 (28 %); 77 (44 %).

## 2-metiltio4-(4-metiltiobencil)aminoquinazolina (Hidrocloruro)

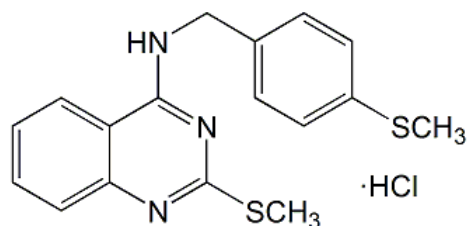
**Fórmula molecular:** C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>S<sub>2</sub>·0,85 HCl

**Peso molecular:** 358 g/mol

**Punto de fusión:** 119,5-120 °C

**Apariencia:** Sólido amarillo

**Referencia:** III.11



### Procedimiento experimental:

Sobre 0,48 g (2,32 mmoles) de 4-cloro-2-metiltioquinazolina disueltos en 25 mL de etanol absoluto se adicionan (gota a gota, en baño de hielo y con agitación) 0,38 g (2,51 mmoles) de 4-metiltiobencilamina. A continuación, se prolonga la agitación a reflujo durante 6 horas y se evapora el disolvente a presión reducida obteniéndose un aceite marrón. Se adicionan 50 mL de agua y el precipitado resultante se filtra, se lava con éter etílico, filtrándolo a sequedad, y se recrystaliza de *n*-hexano y metanol (9:1, en volumen).

Así se obtienen 0,31 g (38,0 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3226-2922 (m, N-H); 1625-1573 (f, C=N).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 2,44 (s, 3H, Ph-SCH<sub>3</sub>); 2,54 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>); 4,78 (d, 2H, CH<sub>2</sub>-NH, J<sub>CH<sub>2</sub>-NH</sub>=5,8 Hz); 7,23 (d, 2H, H<sub>3</sub>+H<sub>5</sub>, J<sub>H<sub>3</sub>-H<sub>2</sub></sub>=J<sub>H<sub>5</sub>-H<sub>6</sub></sub>=8,4 Hz); 7,35 (d, 2H, H<sub>2</sub>+H<sub>6</sub>); 7,50 (dd, 1H, H<sub>7</sub>, J<sub>7-8</sub>=8,2 Hz, J<sub>7-6</sub>=6,7 Hz); 7,62 (d, 1H, H<sub>8</sub>); 7,82 (dd, 1H, H<sub>6</sub>, J<sub>6-5</sub>=8,2 Hz); 8,44 (d, 1H, H<sub>5</sub>); 10,02 (s.a., 1H, NH-CH<sub>2</sub>).

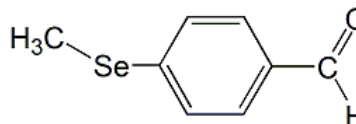
**RMN-<sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 14,3 (het-SCH<sub>3</sub>); 15,7 (Ph-CH<sub>3</sub>); 44,7 (CH<sub>2</sub>); 112,9 (C<sub>9</sub>); 123,0 (C<sub>8</sub>); 124,7 (C<sub>5</sub>); 126,4 (C<sub>7</sub>); 126,9 (C<sub>3</sub>+C<sub>5</sub>); 129,1 (C<sub>2</sub>+C<sub>6</sub>); 135,2 (C<sub>6</sub>); 136,0 (C<sub>1</sub>); 137,5 (C<sub>4</sub>); 146,5 (C<sub>10</sub>); 159,2 (C<sub>4</sub>); 166,9 (C<sub>2</sub>).

**Análisis elemental:** C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>S<sub>2</sub>·0,85 HCl

Calculado (%): **C:** 56,98; **H:** 4,77; **N:** 11,73

Hallado (%): **C:** 56,81; **H:** 5,14; **N:** 11,71

**EM-DIP (70 eV) (m/z):** 327 (M<sup>+</sup>; 51 %); 190 (34 %); 175 (15 %); 152 (24 %); 137 (100 %); 121 (46 %); 103 (24 %); 91 (16 %); 77 (16 %).

**4-metilselenobenzaldehído****Fórmula molecular:** C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>OSe**Peso molecular:** 199 g/mol**Punto de fusión:** -**Apariencia:** Aceite amarillo**Referencia:** III.d**Procedimiento experimental:**

En un matraz se disuelve 1,00 mL de dimetildiseleniuro (10,60 mmol) en 30 mL de etanol absoluto. A continuación, se añaden (poco a poco y bajo atmósfera de N<sub>2</sub>) 0,85 g de borohidruro sódico (22,20 mmol) disueltos en etanol absoluto y se prolonga la agitación a temperatura ambiente durante 20 minutos. Pasado este tiempo, se añaden 2,97 g de 4-clorobenzaldehído (20,14 mmoles) y se deja la disolución a reflujo durante 2 horas bajo atmósfera de N<sub>2</sub>. Posteriormente, se elimina el disolvente a presión reducida y la fase orgánica se extrae 3 veces con diclorometano (3 × 25 mL). Se lava la fase orgánica 3 veces con agua (3 × 20 mL) y se seca con sulfato sódico anhidro. Se filtra la fase orgánica a gravedad para retirar el sulfato sódico y se elimina el disolvente a presión reducida. El aceite resultante se utiliza sin posterior purificación.

Así se obtienen 2,84 g (95,3 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3052 (m, C-H aromáticos); 1694 (f, C=O).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 2,45 (s, 3H, SeCH<sub>3</sub>); 7,51 (d, 2H, H<sub>3</sub>+H<sub>5</sub>, J<sub>H3-H2</sub>=J<sub>H5-H6</sub>=8,3 Hz); 7,76 (dd, 2H, H<sub>2</sub>+H<sub>6</sub>, J<sub>H2-COH</sub>=J<sub>H6-COH</sub>=0,4 Hz); 9,96 (s, 1H, COH).

**Análisis elemental:** C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>OSeCalculado (%): **C:** 48,24; **H:** 4,02; **N:** 0,00Hallado (%): **C:** 48,12; **H:** 3,89; **N:** 0,00

## (E)-4-metilselenobenzaldehído oxima

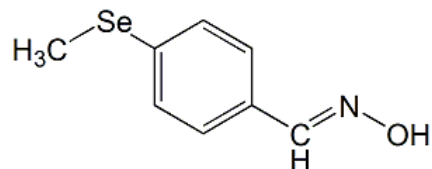
**Fórmula molecular:** C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>NOSe

**Peso molecular:** 214 g/mol

**Punto de fusión:** 185-186 °C

**Apariencia:** Sólido blanco

**Referencia:** III.e



### Procedimiento experimental:

En un matraz se disuelven 2,84 g de 4-metilselenobenzaldehído (14,27 mmol) en 30 mL de etanol. A continuación, se añaden 1,74 g de carbonato sódico (4,16 mmol) disueltos en 10 mL de agua. Posteriormente, se adicionan durante 30 minutos 1,50 g de clorhidrato de hidroxilamina (2,14 mmol) disueltos en 20 mL de agua y se prolonga la agitación a temperatura ambiente durante 24 horas. Pasado este tiempo, se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo obtenido se lava con agua. El precipitado obtenido se filtra a vacío y se deja que seque bien. El producto resultante se recristaliza de etanol.

Así se obtienen 2,56 g (83,2 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3285 (f, O-H); 2972-2929 (m, C-H aromáticos); 1590 (f, C=N).

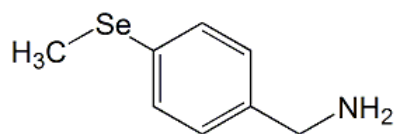
**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 2,37 (s, 3H, SeCH<sub>3</sub>); 7,41 (dd, 2H, H<sub>3</sub>+H<sub>5</sub>, J<sub>H<sub>3</sub>-H<sub>2</sub></sub>=J<sub>H<sub>5</sub>-H<sub>6</sub></sub>=6,8 Hz; J<sub>H<sub>3</sub>-SeCH<sub>3</sub></sub>=J<sub>H<sub>5</sub>-SeCH<sub>3</sub></sub>=1,7 Hz); 7,49 (dd, 2H, H<sub>2</sub>+H<sub>6</sub>, J<sub>H<sub>2</sub>-CHN</sub>=J<sub>H<sub>6</sub>-CHN</sub>=1,4 Hz); 8,09 (s, 1H, CH=N); 11,25 (s, 1H, OH).

**Análisis elemental:** C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>NOSe

Calculado (%): **C:** 44,86; **H:** 4,20; **N:** 6,54

Hallado (%): **C:** 44,65; **H:** 4,24; **N:** 6,42



**4-metilselenobencilamina****Fórmula molecular:** C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>NSe**Peso molecular:** 200 g/mol**Punto de fusión:** -**Apariencia:** Aceite amarillo**Referencia:** III.f**Procedimiento experimental:**

En un matraz se disuelven 0,52 g de (*E*)-4-metilselenobenzaldehído oxima (2,43 mmol) en 50 mL de etanol. A continuación, se añaden 1,75 g de zinc en polvo (27,00 mmol) disueltos en 10 mL de agua. La mezcla se pone a reflujo y se adicionan, poco a poco durante 2 horas, 10 mL de ácido clorhídrico al 10 %. Posteriormente, se prolonga la agitación a reflujo durante 12 horas. Pasado este tiempo, se añaden a la disolución 10 mL de hidróxido sódico al 20 % y la fase orgánica se extrae 3 veces con diclorometano (3 × 25 mL). Se lava la fase orgánica 3 veces con agua (3 × 20 mL) y se seca con sulfato sódico anhidro. Se filtra la disolución a gravedad para retirar el sulfato sódico y se elimina el disolvente a presión reducida obteniéndose un aceite amarillo de alta pureza, por lo que se utiliza sin posterior purificación. Así se obtienen 0,24 g (49,0 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3272 (m, N-H); 3003 (m, C-H aromáticos); 2923 (m, C-H alifáticos); 1589 (f, C=N).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 2,32 (s, 3H, SeCH<sub>3</sub>); 3,44 (s.a., 2H, H<sub>2</sub>O+NH<sub>2</sub>); 3,68 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>); 7,25 (d, 2H, H<sub>3</sub>+H<sub>5</sub>, J<sub>H3-H2</sub>=J<sub>H5-H6</sub>=8,0 Hz); 7,35 (d, 2H, H<sub>2</sub>+H<sub>6</sub>).

**Análisis elemental:** C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>NSeCalculado (%): **C:** 48,00; **H:** 5,50; **N:** 7,00Hallado (%): **C:** 48,25; **H:** 5,34; **N:** 6,79

#### 4-(4-metilselenobencil)amino-2-metiltioquinazolina

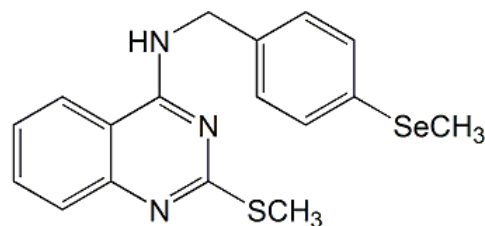
**Fórmula molecular:** C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>SSe

**Peso molecular:** 374 g/mol

**Punto de fusión:** 110-112 °C

**Apariencia:** Sólido beige

**Referencia:** III.12



#### Procedimiento experimental:

En un matraz se disuelven 0,76 g de 4-cloro-2-metiltioquinazolina (3,64 mmol) en 50 mL de etanol absoluto. A continuación, se añaden (poco a poco y con agitación) 0,80 g de 4-metilselenobencilamina (4,00 mmol). La reacción permanece a reflujo durante 24 horas y se sigue por CCF. Posteriormente, se evapora el disolvente a presión reducida y la fase orgánica se extrae 3 veces con cloroformo (3 × 25 mL), se lava 3 veces con agua (3 × 20 mL) y, posteriormente, se seca con sulfato sódico anhidro. Tras filtración del sulfato sódico, se evapora el disolvente a presión reducida y el aceite resultante se precipita con *n*-hexano. El sólido se filtra hasta sequedad y se recristaliza de etanol.

Así se obtienen 0,35 g (25,7 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3204 (m, N-H); 3096 (m, C-H aromáticos); 2921 (m, C-H alifáticos); 1615 (m, C=N).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 2,31 (s, 3H, SeCH<sub>3</sub>); 2,46 (d, 3H, SCH<sub>3</sub>, J<sub>SCH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub></sub>=5,7 Hz); 4,71 (dd, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph, J<sub>CH<sub>2</sub>-NH</sub>=12,0 Hz); 7,29 (dt, 1H, H<sub>7</sub>); 7,40 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-Ph); 7,53 (dd, 1H, H<sub>8</sub>); 7,70 (dt, 1H, H<sub>6</sub>); 8,22 (dd, 1H, H<sub>5</sub>); 8,94 (m, 1H, NH-CH<sub>2</sub>).

**Análisis elemental:** C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>SSe

Calculado (%): **C:** 54,64; **H:** 4,54; **N:** 11,23

Hallado (%): **C:** 55,00; **H:** 4,51; **N:** 10,91

**EM-DIP (70 eV) (m/z):** 375 (M<sup>+</sup>; 34 %); 220 (34 %); 200 (35 %); 185 (100 %); 176 (46 %); 162 (43 %); 146 (34 %); 129 (20 %); 121 (96 %); 91 (64 %); 77 (26 %).

## 4-(4-metilselenobencil)amino-2-pentiltioquinazolina (Hidroioduro)

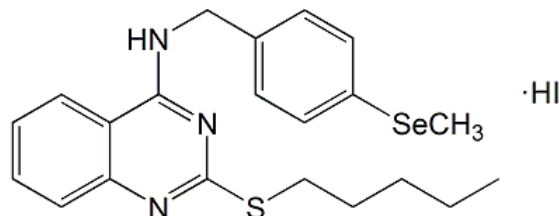
**Fórmula molecular:** C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>SSe·0,3 HI

**Peso molecular:** 468,4 g/mol

**Punto de fusión:** 178-179 °C

**Apariencia:** Sólido amarillo

**Referencia:** III.13

**Procedimiento experimental:**

En un matraz se disuelven 1,42 g (5,32 mmol) de 4-cloro-2-pentiltioquinazolina en 50 mL de etanol absoluto. A continuación, se añaden (poco a poco y con agitación) 0,60 g de 4-metilselenobencilamina (3,00 mmol) y se prolonga a agitación a reflujo durante 20 horas. La reacción se sigue por CCF. Posteriormente, se evapora el disolvente a presión reducida y el producto resultante se lava 3 veces con éter (3 × 20 mL) y se filtra a vacío hasta que seque bien. El sólido resultante se recrystaliza de etanol.

Así se obtienen 0,42 g (16,9 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3287 (m, N-H); 3111 (m, C-H aromáticos); 2967-2899 (m, C-H alifáticos); 1595 (f, C=N).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 0,82 (t, 3H, (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CH<sub>3</sub>); 1,22 (m, 4H, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>); 1,56 (q, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>); 2,32 (s, 3H, SeCH<sub>3</sub>); 3,11 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>); 4,82 (s.a., 2H, CH<sub>2</sub>-Ph); 7,28 (d, 2H, H<sub>3</sub>+H<sub>5</sub>, J<sub>H3-H2</sub>=J<sub>H5-H6</sub>=8,1 Hz); 7,37 (d, 2H, H<sub>2</sub>+H<sub>6</sub>); 7,54 (t, 1H, H<sub>7</sub>, J<sub>7-8</sub>=J<sub>7-6</sub>=7,9 Hz); 7,62 (d, 1H, H<sub>8</sub>); 7,84 (t, 1H, H<sub>6</sub>, J<sub>6-5</sub>=7,9 Hz); 8,46 (d, 1H, H<sub>5</sub>); 10,11 (s, 1H, NH-CH<sub>2</sub>).

**Análisis elemental:** C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>SSe·0,3 HI

Calculado (%): **C:** 53,80; **H:** 5,34; **N:** 8,60

Hallado (%): **C:** 53,78; **H:** 5,73; **N:** 8,20

**EM-DIP (70 eV) (m/z):** 430 (M<sup>+</sup>; 100 %); 384 (26 %); 361 (57 %); 200 (11 %); 185 (76 %); 170 (31 %); 91 (12 %).

#### 4-(5-hidroxipentil)amino-2-metiltioquinazolina (Hidrocloruro)

**Fórmula molecular:** C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>OS·0,1 HCl

**Peso molecular:** 280,65 g/mol

**Punto de fusión:** 140,5-141,3 °C

**Apariencia:** Sólido blanco

**Referencia:** III.14



#### Procedimiento experimental:

Sobre 0,62 g (2,90 mmoles) de 4-cloro-2-metiltioquinazolina disueltos en 25 mL de etanol absoluto se adicionan (gota a gota, en baño de hielo y con agitación) 0,34 mL (3,20 mmoles) de 5-amino-1-pentanol. A continuación, se prolonga la agitación a reflujo durante 6 horas y se evapora el disolvente a presión reducida obteniéndose un aceite marrón. Se adicionan 50 mL de agua y el sólido resultante se filtra, se lava con éter etílico (3 × 15 mL), filtrándolo hasta sequedad, y se recristaliza de *n*-hexano y metanol (8:2, en volumen).

Así se obtienen 0,27 g (33,0 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3348 (m, O-H); 2979-2929 (m, C-H alifáticos); 1625-1579 (f, C=N).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 1,37-1,41 (m, 2H, NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 1,44-1,49 (m, 2H, NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 1,61-1,66 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH); 2,50 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>); 3,38-3,42 (m, 2H, NH-CH<sub>2</sub>, J<sub>NH-CH<sub>2</sub></sub>=5,8 Hz); 3,48-3,52 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OH); 4,38 (t, 1H, CH<sub>2</sub>OH); 7,37 (t, 1H, H<sub>7</sub>); 7,51 (d, 1H, H<sub>8</sub>); 7,68 (t, 1H, H<sub>6</sub>); 8,16 (d, 1H, H<sub>5</sub>); 8,31 (t, 1H, NH-CH<sub>2</sub>).

**Análisis elemental:** C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>OS·0,1 HCl

Calculado (%): **C:** 59,86; **H:** 6,70; **N:** 14,96

Hallado (%): **C:** 59,78; **H:** 6,60; **N:** 14,84

**EM-DIP (70 eV) (m/z):** 277 (M<sup>+</sup>; 66 %); 244 (29 %); 218 (79 %); 205 (81 %); 191 (100 %); 175 (56 %); 160 (64 %), 145 (68 %); 129 (37 %); 103 (40 %); 91 (18 %); 77 (10 %).

Selenito de *N*-bencil-2-metiltioquinazolin-4-amonio

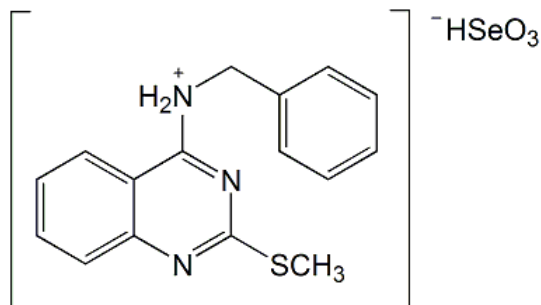
**Fórmula molecular:** C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>S·1,97 H<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>

**Peso molecular:** 532,55 g/mol

**Punto de fusión:** 106-107 °C

**Apariencia:** Sólido beige

**Referencia:** III.15

**Procedimiento experimental:**

En un matraz se disuelven 0,30 g de 4-bencilamino-2-metiltioquinazolina (1,05 mmol) en 50 mL de una mezcla de etanol/agua (1:1, en volumen). A continuación, se añaden 0,19 g de dióxido de selenio (1,72 mmol) y se prolonga la agitación a reflujo durante 12 horas. Pasado este tiempo, se evapora el disolvente a presión reducida y el precipitado resultante se lava con éter. Se filtra el sólido a vacío hasta sequedad y el sólido resultante se recristaliza de etanol. Así se obtienen 0,28 g (50,0 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3228 (m, N-H); 2926 (m, C-H alifáticos); 1608 (f, C=N).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 2,45 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>); 4,75 (d, 2H, CH<sub>2</sub>-NH, J<sub>CH<sub>2</sub>-NH</sub>=5,8 Hz); 5,55 (s, 1H, HSeO<sub>3</sub><sup>-</sup>); 7,24 (dd, 1H, H<sub>7</sub>, J<sub>7-8</sub>=8,3 Hz, J<sub>7-6</sub>=7,1 Hz); 7,36 (m, 5H, Ph); 7,54 (d, 1H, H<sub>6</sub>); 7,71 (dd, 1H, H<sub>6</sub>, J<sub>6-5</sub>=8,2 Hz); 8,22 (d, 1H, H<sub>5</sub>); 8,93 (t, 1H, NH-CH<sub>2</sub>).

**Análisis elemental:** C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>S·1,97 H<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>

Calculado (%): **C:** 35,97; **H:** 3,60; **N:** 7,70

Hallado (%): **C:** 35,87; **H:** 3,54; **N:** 7,85

**EM-DIP (70 eV) (m/z):** 281 (M<sup>+</sup>; 100 %); 235 (22 %); 191 (43 %); 106 (20 %); 91 (24 %).

### Selenito de *N*-(4-fenilbutil)-2-metiltioquinazolin-4-amonio

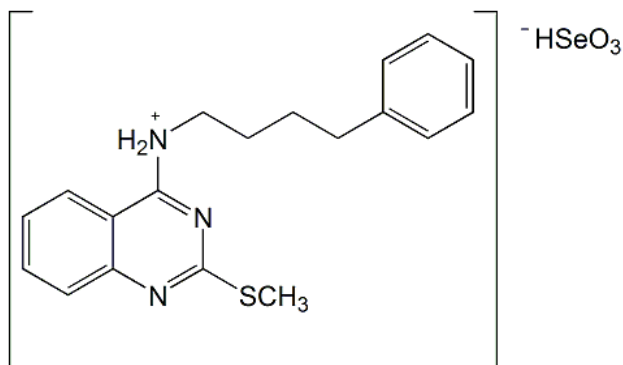
**Fórmula molecular:** C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>S·1,25 H<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>

**Peso molecular:** 484,25 g/mol

**Punto de fusión:** 166-167 °C

**Apariencia:** Sólido marrón

**Referencia:** III.16



#### Procedimiento experimental:

Se ponen en un matraz 0,22 g (0,68 mmoles) de 4-(4-fenilbutil)amino-2-metiltioquinazolina disueltos en una mezcla de etanol/agua (1:1, en volumen). A continuación, se añaden 0,12 g de dióxido de selenio (1,09 mmol) y se prolonga la agitación a reflujo durante 12 horas. Pasado este tiempo, se evapora el disolvente a presión reducida y el precipitado resultante se lava con éter y se filtra a vacío hasta sequedad. El sólido resultante se recristaliza de etanol.

Así se obtienen 0,16 g (48,5 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3207 (m, N-H); 3078-3002 (m, C-H aromáticos); 2928 (m, C-H alifáticos); 1604 (f, C=N).

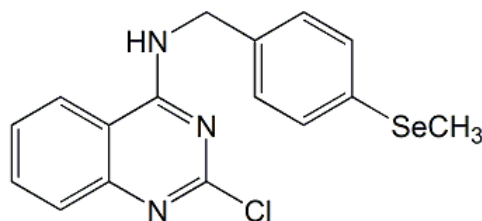
**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 1,68 (m, 4H, NH-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Ph); 2,57 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>); 2,63 (m, 2H, NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-Ph); 3,63 (m, 2H, NH-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-Ph); 7,20 (m, 5H, Ph); 7,49 (t, 1H, H<sub>7</sub>, J<sub>7-8</sub>=J<sub>7-6</sub>=7,8 Hz); 7,60 (d, 1H, H<sub>8</sub>); 7,80 (t, 1H, H<sub>6</sub>, J<sub>6-5</sub>=7,8 Hz); 8,35 (d, 1H, H<sub>5</sub>); 9,45 (s.a., 1H, NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-Ph).

**Análisis elemental:** C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>S·1,25 H<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>

Calculado (%): **C:** 47,01; **H:** 4,61; **N:** 8,67

Hallado (%): **C:** 46,69; **H:** 5,01; **N:** 8,32

**EM-DIP (70 eV) (m/z):** 323 (M<sup>+</sup>; 100 %); 276 (29 %); 232 (47 %); 218 (94 %); 191 (43 %); 175 (24 %); 145 (29 %); 91 (45 %).

**2-cloro-4-(4-metilselenobencil)aminoquinazolina****Fórmula molecular:** C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>ClSe**Peso molecular:** 362,5 g/mol**Punto de fusión:** 156-157 °C**Apariencia:** Sólido blanco**Referencia:** III.17**Procedimiento experimental:**

En un matraz se disuelven 0,50 g de 2,4-dicloroquinazolina (2,45 mmol) en 50 mL de etanol absoluto. A continuación, se añade (poco a poco y con agitación) 1,00 g de 4-metilselenobencilamina (5,00 mmol) y se calienta la reacción. Se añaden 10 gotas de *N,N*-dimetilformamida para favorecer la disolución de los reactivos. La reacción permanece a reflujo durante 24 horas y se sigue por CCF. Posteriormente, se evapora el disolvente a presión reducida y el producto resultante se lava con éter, se filtra a vacío y se deja que seque bien.

El sólido resultante se recrystaliza de etanol.

Así se obtienen 0,14 g (36,8 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3321 (m, N-H); 3131 (m, C-H aromáticos); 2958-2892 (m, C-H alifáticos); 1589 (f, C=N).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 2,31 (s, 3H, SeCH<sub>3</sub>); 4,72 (dd, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph, J<sub>CH<sub>2</sub>-NH</sub>=12,0 Hz); 7,28 (dt, 1H, H<sub>7</sub>); 7,40 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-Ph); 7,55 (dd, 1H, H<sub>8</sub>); 7,72 (dt, 1H, H<sub>6</sub>); 8,24 (dd, 1H, H<sub>5</sub>); 8,97 (m, 1H, NH-CH<sub>2</sub>).

**Análisis elemental:** C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>ClSeCalculado (%): **C:** 52,96; **H:** 3,86; **N:** 11,58Hallado (%): **C:** 53,21; **H:** 4,10; **N:** 11,20

**EM-DIP (70 eV) (m/z):** 363 (M<sup>+</sup>; 17 %); 200 (32 %); 185 (100 %); 170 (36 %); 125 (34 %); 91 (53 %).

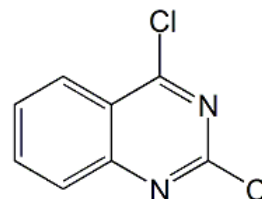
## 2,4-dicloroquinazolina

**Fórmula molecular:** C<sub>8</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

**Peso molecular:** 199 g/mol

**Apariencia:** Sólido marrón

**Referencia:** III.g



### **Procedimiento experimental:**

Se disuelve 1,00 g de 1*H*,3*H*-quinazolin-2,4-diona (6,17 mmol) en 15 mL de cloruro de fosforilo. Se añaden 0,73 mL de *N,N*-dimetilaniлина (5,38 mmol) y se prolonga a agitación a reflujo durante 24 horas. El producto de la reacción se añade sobre 200 g de hielo y precipita un sólido marrón que se filtra a vacío. Se lava con agua y se deja que seque bien. Se utiliza, posteriormente, sin más purificación.

Así se obtienen 0,98 g (80,0 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3067 (m, C-H aromáticos); 1611 (m, C=N).



## 4-amino-2-cloroquinazolina

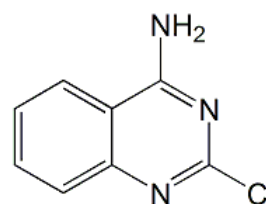
**Fórmula molecular:** C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>N<sub>3</sub>Cl

**Peso molecular:** 179,5 g/mol

**Punto de fusión:** 232,0-232,6 °C

**Apariencia:** Sólido amarillo

**Referencia:** III.h



### **Procedimiento experimental:**

Se disuelve 1,0 g de 2,4-dicloroquinazolina (5,0 mmol) en 30 mL de una disolución acuosa de hidróxido amónico al 25 % y se calienta la disolución a reflujo durante 1,5 horas. Aparece un precipitado amarillo que se filtra a vacío. Se lava repetidas veces con agua y se deja que seque bien. Se utiliza posteriormente sin más purificación.

Así se obtienen 0,75 g (83,0 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3386-3316 (m, N-H); 3133 (m, C-H aromáticos); 1650 (f, C=N).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 7,51 (t, 1H, H<sub>7</sub>); 7,62 (d, 1H, H<sub>8</sub>); 7,80 (t, 1H, H<sub>6</sub>); 8,23 (d, 1H, H<sub>5</sub>); 8,33 (s.a., 2H, NH<sub>2</sub>).

**Análisis elemental:** C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>N<sub>3</sub>Cl

Calculado (%): **C:** 53,48; **H:** 3,34; **N:** 23,40

Hallado (%): **C:** 53,75; **H:** 3,34; **N:** 23,10

### 4-amino-2-mercaptoquinazolina (Hidrocloruro)

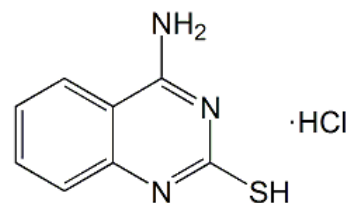
**Fórmula molecular:** C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>N<sub>3</sub>S·HCl

**Peso molecular:** 213,5 g/mol

**Punto de fusión:** 266-267 °C

**Apariencia:** Sólido amarillo

**Referencia:** III.18



#### **Procedimiento experimental:**

En un matraz se disuelven 0,50 g de 4-amino-2-cloroquinazolina (3,02 mmol) en 30 mL de etanol absoluto. A continuación, se añaden 0,25 g de tiourea (3,32 mmol) y se prolonga la agitación a reflujo durante 2 horas. Pasado este tiempo, precipita un sólido amarillo que se filtra a vacío y se lava con éter. Se deja que seque bien. El sólido resultante se recrystaliza de etanol. Así se obtienen 0,35 g (64,8 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3315 (m, N-H); 3133 (m, C-H aromáticos); 1651 (f, C=N).

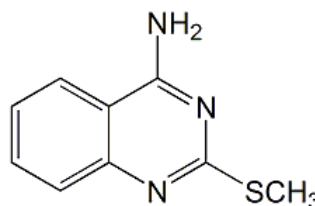
**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 7,52 (ddd, 1H, H<sub>7</sub>, J<sub>7-8</sub>=8,4 Hz, J<sub>7-6</sub>=7,1 Hz, J<sub>7-5</sub>=1,2 Hz); 7,60 (dd, 1H, H<sub>8</sub>, J<sub>8-6</sub>=0,9 Hz); 7,80 (ddd, 1H, H<sub>6</sub>, J<sub>6-5</sub>=8,1 Hz); 7,90 (s.a., 1H, SH); 8,22 (dd, 1H, H<sub>5</sub>); 8,33 (s.a., 2H, NH<sub>2</sub>).

**Análisis elemental:** C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>N<sub>3</sub>S·HCl

Calculado (%): **C:** 44,96; **H:** 3,74; **N:** 19,67

Hallado (%): **C:** 44,79; **H:** 3,35; **N:** 19,44

**EM-DIP (70 eV) (m/z):** 209 (M<sup>+</sup>; 11 %); 179 (92 %); 144 (100 %); 117 (27 %); 103 (15 %); 91 (22 %).

**4-amino-2-metiltioquinazolina****Fórmula molecular:** C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>S**Peso molecular:** 191 g/mol**Punto de fusión:** 228-229 °C**Apariencia:** Sólido beige**Referencia:** III.19**Procedimiento experimental:**

En un matraz se disuelve 1,00 g de 4-amino-2-mercaptoquinazolina (5,65 mmol) en 30 mL de etanol absoluto. A continuación, se añaden 0,53 mL de yoduro de metilo (8,47 mmol) y se prolonga la agitación a reflujo durante 2 horas. Pasado este tiempo, precipita un sólido blanco que se filtra a vacío, se lava con éter y se deja que seque bien. El sólido resultante se recrystaliza de etanol.

Así se obtienen 0,82 g (90,1 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3382-3304 (m, N-H); 3119 (m, C-H aromáticos); 2927 (m, C-H alifáticos); 1646 (f, C=N).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 2,49 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>); 7,36 (ddd, 1H, H<sub>7</sub>, J<sub>7-8</sub>=8,2 Hz, J<sub>7-6</sub>=7,4 Hz, J<sub>7-5</sub>=1,0 Hz); 7,52 (dd, 1H, H<sub>8</sub>, J<sub>8-6</sub>=0,8 Hz); 7,70 (ddd, 1H, H<sub>6</sub>, J<sub>6-5</sub>=8,1 Hz); 7,82 (s.a., 2H, NH<sub>2</sub>); 8,13 (dd, 1H, H<sub>5</sub>).

**Análisis elemental:** C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>SCalculado (%): **C:** 56,54; **H:** 4,71; **N:** 21,99Hallado (%): **C:** 56,42; **H:** 4,70; **N:** 21,59

**EM-DIP (70 eV) (m/z):** 191 (M<sup>+</sup>; 100 %); 145 (91 %); 129 (41 %); 118 (36 %); 103 (13 %); 91 (17 %).

## 4-amino-2-pentiltioquinazolina

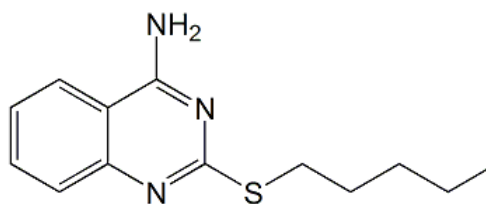
**Fórmula molecular:** C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>S

**Peso molecular:** 247 g/mol

**Punto de fusión:** 110-111 °C

**Apariencia:** Sólido amarillo

**Referencia:** III.20



### Procedimiento experimental:

En un matraz se disuelve 1,00 g de 4-amino-2-mercaptoquinazolina (5,65 mmol) en 30 mL de etanol absoluto. A continuación, se añaden 1,11 mL de yoduro de pentilo (8,47 mmol) y se prolonga la agitación a reflujo durante 2 horas. Pasado este tiempo, se elimina el disolvente a presión reducida y la fase orgánica se extrae 3 veces con diclorometano (3 × 25 mL). Se lava la fase orgánica 3 veces con agua (3 × 20 mL) y se seca con sulfato sódico anhidro. La disolución se filtra por gravedad para retirar el sulfato sódico y el disolvente se elimina a presión reducida. El aceite obtenido se precipita con *n*-hexano. El sólido resultante se recristaliza de etanol. Así se obtienen 0,29 g (31,5 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3373-3308 (m, N-H); 3169 (m, C-H aromáticos); 2956-2856 (m, C-H alifáticos); 1641 (f, C=N).

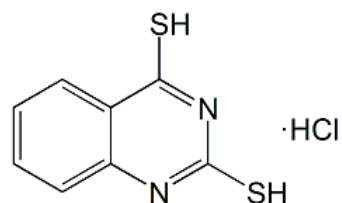
**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 0,89 (t, 3H, (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CH<sub>3</sub>); 1,38 (m, 4H, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>); 1,67 (q, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>); 3,11 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>); 7,35 (ddd, 1H, H<sub>7</sub>, J<sub>7-8</sub>=8,2 Hz, J<sub>7-6</sub>=7,0 Hz, J<sub>7-5</sub>=1,1 Hz); 7,49 (dd, 1H, H<sub>8</sub>, J<sub>8-6</sub>=1,2 Hz); 7,69 (ddd, 1H, H<sub>6</sub>, J<sub>6-5</sub>=8,3 Hz); 7,80 (s.a., 2H, NH<sub>2</sub>); 8,12 (dd, 1H, H<sub>5</sub>).

**Análisis elemental:** C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>S

Calculado (%): **C:** 63,15; **H:** 6,88; **N:** 17,00

Hallado (%): **C:** 62,99; **H:** 7,25; **N:** 16,75

**EM-DIP (70 eV) (m/z):** 247 (M<sup>+</sup>; 28 %); 215 (39 %); 204 (34 %); 191 (52 %); 177 (100 %); 145 (56 %); 121 (44 %); 91 (18 %).

**2,4-dimercaptoquinazolina (Hidrocloruro)****Fórmula molecular:** C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>S<sub>2</sub>·1,3 HCl**Peso molecular:** 241,45 g/mol**Punto de fusión:** > 300 °C**Apariencia:** Sólido amarillo**Referencia:** III.21**Procedimiento experimental:**

En un matraz se disuelven 0,75 g de 2,4-dicloroquinazolina (3,75 mmol) en 50 mL de etanol absoluto. A continuación, se añaden 0,75 g de tiourea (9,85 mmol) y se prolonga la agitación a reflujo durante 5 horas. Pasado este tiempo, se filtra el precipitado formado y se lava con agua. Se deja secar bien. El sólido resultante se recristaliza de etanol.

Así se obtienen 0,70 g (78,6 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3119 (m, C-H aromáticos); 1618 (f, C=N).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 7,33 (m, 2H, H<sub>7</sub>+H<sub>8</sub>); 7,76 (ddd, 1H, H<sub>6</sub>, J<sub>6-5</sub>=8,3 Hz, J<sub>6-7</sub>=7,2 Hz, J<sub>6-8</sub>=1,5 Hz); 8,30 (dd, 1H, H<sub>5</sub>, J<sub>5-7</sub>=1,4 Hz); 13,12 (s, 1H, SH<sub>(4)</sub>); 13,68 (s, 1H, SH<sub>(2)</sub>).

**Análisis elemental:** C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>S<sub>2</sub>·1,3 HClCalculado (%): **C:** 40,37; **H:** 3,02; **N:** 11,77Hallado (%): **C:** 40,33; **H:** 2,62; **N:** 11,58

**EM-DIP (70 eV) (m/z):** 194 (M<sup>+</sup>; 100 %); 161 (53 %); 136 (38 %); 108 (18 %).

## 2,4-dimetiltioquinazolina (Hidrioduro)

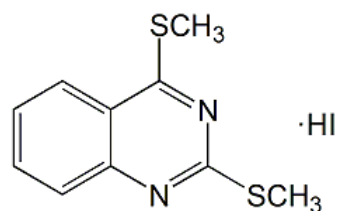
**Fórmula molecular:** C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>S<sub>2</sub>·0,33 HI

**Peso molecular:** 264,24 g/mol

**Punto de fusión:** 76-77 °C

**Apariencia:** Sólido blanco

**Referencia:** III.22



### Procedimiento experimental:

En un matraz se disuelven 0,75 g de 2,4-dimercaptoquinazolina (3,92 mmol) en 20 mL de hidróxido sódico 0,4 N. A continuación, se añaden 0,73 mL de yoduro de metilo (11,00 mmol) y se prolonga la agitación a reflujo durante 3 horas. Pasado este tiempo, se deja enfriar y se añade ácido acético glacial hasta pH=5-6. Se filtra el precipitado formado y se lava con agua. Se deja secar bien y el sólido resultante se recristaliza de etanol.

Así se obtienen 0,72 g (69,6 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 2993-2920 (m, C-H alifáticos); 1611 (f, C=N).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 2,62 (s, 3H, SCH<sub>3(4)</sub>); 2,66 (s, 3H, SCH<sub>3(2)</sub>); 7,57 (t, 1H, H<sub>7</sub>, J<sub>7-8</sub>=J<sub>7-6</sub>=8,0 Hz); 7,63 (d, 1H, H<sub>8</sub>); 7,90 (t, 1H, H<sub>6</sub>, J<sub>6-5</sub>=8,0 Hz); 8,01 (d, 1H, H<sub>5</sub>).

**Análisis elemental:** C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>S<sub>2</sub>·0,33 HI

Calculado (%): **C:** 45,41; **H:** 4,16; **N:** 10,59

Hallado (%): **C:** 45,41; **H:** 3,84; **N:** 10,33

**EM-DIP (70 eV) (m/z):** 222 (M<sup>+</sup>; 100 %); 207 (72 %); 191 (49 %); 175 (49 %); 161 (56 %); 145 (39 %); 129 (60 %); 108 (56 %); 91 (26 %); 75 (32 %); 57 (37 %).

## 2,4-dipentiltioquinazolina

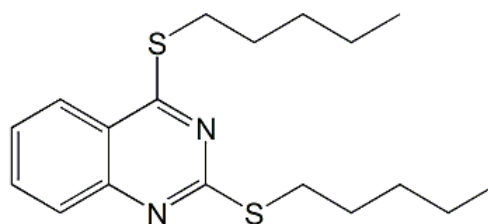
**Fórmula molecular:** C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>S<sub>2</sub>

**Peso molecular:** 334 g/mol

**Punto de fusión:** -

**Apariencia:** Aceite amarillo

**Referencia:** III.23



### Procedimiento experimental:

En un matraz se disuelven 0,75 g de 2,4-dimercaptoquinazolina (3,92 mmol) en 40 mL de hidróxido sódico 0,4 N. A continuación, se añaden 1,57 mL de yoduro de pentilo (12,00 mmol) y se prolonga la agitación a reflujo durante 3 horas. Pasado este tiempo, se deja enfriar y se adiciona ácido acético glacial hasta pH=5-6. El residuo se trata con una disolución de metóxido sódico/metanol 0,01 M y se calienta hasta 50-60 °C durante 3 horas, para eliminar el exceso de yoduro de metilo. Se evapora el disolvente a presión reducida y el aceite resultante se extrae 3 veces con diclorometano (3 × 25 mL). Se lava la fase orgánica 3 veces con agua (3 × 30 mL) y se seca con sulfato sódico anhidro. Se filtra por gravedad para retirar el sulfato sódico anhidro y se evapora el disolvente a presión reducida. El aceite resultante se recristaliza de isopropanol/acetato de etilo (2:1, en volumen).

Así se obtienen 0,42 g (31,8 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3126 (m, C-H aromáticos); 2952 (m, C-H alifáticos); 1618 (f, C=N).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 0,88 (t, 6H, (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CH<sub>3(2y4)</sub>); 1,37 (m, 8H, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>3(2y4)</sub>); 1,71 (q, 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>3(2y4)</sub>); 3,20 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CH<sub>3(4)</sub>); 3,31 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CH<sub>3(2)</sub>); 7,55 (ddd, 1H, H<sub>7</sub>, J<sub>7-8</sub>=8,3 Hz, J<sub>7-6</sub>=7,0 Hz, J<sub>7-5</sub>=1,2 Hz); 7,72 (dd, 1H, H<sub>8</sub>, J<sub>8-6</sub>=1,1 Hz); 7,89 (ddd, 1H, H<sub>6</sub>, J<sub>6-5</sub>=8,3 Hz); 7,99 (dd, 1H, H<sub>5</sub>).

**Análisis elemental:** C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>S<sub>2</sub>

Calculado (%): **C:** 64,37; **H:** 7,78; **N:** 8,38

Hallado (%): **C:** 64,37; **H:** 7,87; **N:** 8,20

**EM-DIP (70 eV) (m/z):** 334 (M<sup>+</sup>; 36 %); 287 (74 %); 278 (35 %); 263 (69 %); 231 (35 %); 215 (85 %); 194 (65 %); 178 (40 %); 161 (100 %); 129 (31 %); 103 (27 %); 71 (30 %).

#### 4. DERIVADOS OBTENIDOS PARA LA SERIE IV

##### **N-(4-metoxibencil)formamida**

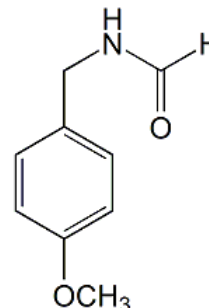
**Fórmula molecular:** C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>

**Peso molecular:** 165 g/mol

**Punto de fusión:** 79,7-80,3 °C

**Apariencia:** Sólido blanco

**Referencia:** IV.a



##### **Procedimiento experimental:**

A un matraz se añaden 3,93 mL (30,00 mmoles) de 4-metoxibencilamina y se adicionan (gota a gota y con agitación) 2,45 mL (24,20 mmoles) de formiato de etilo. Se prolonga la agitación a reflujo durante 12 horas. A continuación, se deja que la reacción enfríe y aparece un precipitado que se filtra a vacío y se lava con éter. Se deja que seque bien y se obtiene el derivado deseado prácticamente puro.

Así se obtienen 4,4 g (88,0 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3286 (f, N-H); 3012 (m, C-H aromáticos); 2943-2834 (m, C-H alifáticos); 1645 (f, C=O).

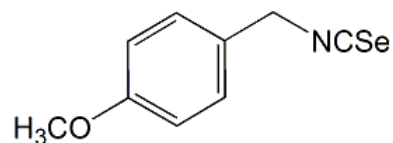
**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 3,73 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 4,22 (d, 2H, CH<sub>2</sub>-NH); 6,89 (d, 2H, H<sub>3</sub>+H<sub>5</sub>, J<sub>3-2</sub>=J<sub>5-6</sub>=8,5 Hz); 7,19 (d, 2H, H<sub>2</sub>+H<sub>6</sub>); 8,11 (s, 1H, H-C=O); 8,43 (s, 1H, CH<sub>2</sub>-NH).

**Análisis elemental:** C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>

Calculado (%): **C:** 65,45; **H:** 6,66; **N:** 8,48

Hallado (%): **C:** 65,07; **H:** 6,37; **N:** 8,29



**4-metoxibencilisoselenocianato****Fórmula molecular:** C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>NOSe**Peso molecular:** 226 g/mol**Punto de fusión:** -**Apariencia:** Aceite naranja**Referencia:** IV.1**Procedimiento experimental:**

A un matraz de 3 bocas se añaden 4,40 g (26,00 mmoles) de *N*-(4-metoxibencil)formamida disueltos en 50 mL de tolueno seco. Se adicionan (gota a gota, en baño de hielo, atmósfera de nitrógeno y agitación) 14,84 mL (104,00 mmoles) de trietilamina. A continuación, se añaden 3,16 g (40,00 mmoles) de selenio metal y una vez añadido el selenio, se carga una ampolla de adición con 4,20 mL (42,00 mmoles) de fosgeno en una solución de tolueno al 25 %. Se va añadiendo el fosgeno al matraz durante media hora manteniendo la atmósfera de nitrógeno y el baño de hielo, ya que en el proceso tiene lugar una reacción exotérmica. Se prolonga la agitación a reflujo durante 24 horas y se sigue la reacción por CCF. Se filtra el precipitado y las aguas madres se tratan evaporando el disolvente a presión reducida y lavándolo 3 veces con tolueno (3 × 20 mL). El residuo obtenido se cromatografía en columna utilizando como fase móvil *n*-hexano/acetato de etilo (95:5, en volumen) hasta conseguir el isoselenocianato deseado que aparece prácticamente puro.

Así se obtienen 0,85 g (14,5 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 2927 (m, C-H alifáticos); 2139 (f, N=C=Se).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 3,73 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3,88 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph); 6,88 (d, 2H, H<sub>3</sub>+H<sub>5</sub>, J<sub>3-2</sub>=J<sub>5-6</sub>=8,7 Hz); 7,17 (d, 2H, H<sub>2</sub>+H<sub>6</sub>).

**Análisis elemental:** C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>NOSe

Calculado (%): **C:** 47,79; **H:** 3,98; **N:** 6,19

Hallado (%): **C:** 47,51; **H:** 4,22; **N:** 6,09

## **N-(4-metiltiobencil)formamida**

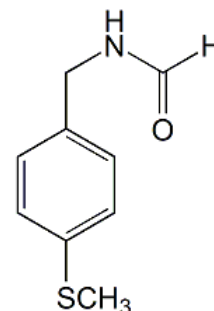
**Fórmula molecular:** C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NOS

**Peso molecular:** 181 g/mol

**Punto de fusión:** 87,8-88,5 °C

**Apariencia:** Sólido blanco

**Referencia:** IV.b



### **Procedimiento experimental:**

A un matraz se añaden 4,23 g (27,60 mmoles) de 4-metiltiobencilamina. A continuación, se adicionan (gota a gota y con agitación) 2,15 mL (29,00 mmoles) de formiato de etilo y se prolonga la agitación a reflujo durante 12 horas. Se deja que la reacción enfríe y aparece un precipitado que se filtra a vacío y se lava con éter. Se deja que seque bien y el derivado deseado se obtiene prácticamente puro.

Así se obtienen 4,46 g (85,2 %).

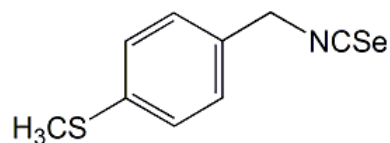
**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3282 (f, N-H); 3068 (m, C-H aromáticos); 2918-2884 (m, C-H alifáticos); 1652 (f, C=O).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 2,45 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>); 4,25 (d, 2H, CH<sub>2</sub>-NH); 7,25 (m, 4H, H<sub>2</sub>+H<sub>3</sub>+H<sub>5</sub>+H<sub>6</sub>); 8,12 (s, 1H, H-C=O); 8,49 (s, 1H, CH<sub>2</sub>-NH).

**Análisis elemental:** C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NOS

Calculado (%): **C:** 59,71; **H:** 6,08; **N:** 7,73

Hallado (%): **C:** 59,83; **H:** 5,81; **N:** 7,61

**4-metiltiobencilisoselenocianato****Fórmula molecular:** C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>NSSe**Peso molecular:** 242 g/mol**Punto de fusión:** -**Apariencia:** Aceite naranja**Referencia:** IV.2**Procedimiento experimental:**

En un matraz de 3 bocas se disuelven 4,25 g (23,50 mmoles) de *N*-(4-metiltiobencil)formamida en 50 mL de tolueno seco. A continuación, se adicionan (gota a gota, en baño de hielo, atmósfera de nitrógeno y agitación) 13,01 mL (94,00 mmoles) de trietilamina. Posteriormente, se añaden 2,78 g (35,00 mmoles) de selenio metal y, una vez añadido el selenio, se carga una ampolla de adición con 3,70 mL (35,00 mmoles) de fosgeno en una solución de tolueno al 25 % y se va añadiendo el fosgeno al matraz durante media hora manteniendo la atmósfera de nitrógeno y el baño de hielo, ya que en el proceso tiene lugar una reacción exotérmica. Se prolonga la agitación a reflujo durante 24 horas y se sigue la reacción por CCF. Se filtra el precipitado y las aguas madres se tratan evaporando el disolvente a presión reducida y lavando el residuo 3 veces con tolueno (3 × 20 mL). El residuo obtenido se cromatografía en columna utilizando como fase móvil *n*-hexano/acetato de etilo (95:5, en volumen) hasta conseguir el isoselenocianato deseado que aparece prácticamente puro.

Así se obtienen 1,05 g (18,4 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3022 (m, C-H aromáticos); 2918 (m C-H alifáticos); 2118 (f, N=C=Se).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 2,48 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>); 5,02 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph); 7,32 (m, 4H, H<sub>2</sub>+H<sub>3</sub>+H<sub>5</sub>+H<sub>6</sub>).

**Análisis elemental:** C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>NSSeCalculado (%): **C:** 44,63; **H:** 3,72; **N:** 5,78Hallado (%): **C:** 45,00; **H:** 3,53; **N:** 5,47

#### 4-bencilamino-2-hidroselenoquinazolina

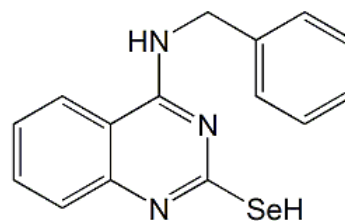
**Fórmula molecular:** C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>Se

**Peso molecular:** 314 g/mol

**Punto de fusión:** 193,4-193,8 °C

**Apariencia:** Sólido amarillo

**Referencia:** IV.3



#### **Procedimiento experimental:**

En un matraz se disuelven 0,28 g (2,40 mmoles) de 2-aminobenzonitrilo disueltos en 30 mL de piridina pura. Se adicionan (gota a gota y con agitación) 0,46 g (2,30 mmoles) de bencilisoselenocianato. A continuación, se prolonga la agitación a reflujo durante 2,5 horas. Pasado este tiempo, se filtra el residuo para eliminar restos de selenio y el disolvente se evapora a presión reducida lavando 3 veces con tolueno (3 × 20 mL). Se obtiene un sólido amarillo que se lava durante 1 hora con metanol y se filtra hasta sequedad.

Así se obtienen 0,23 g (31,1 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3259 (m, N-H); 3172-3120 (m, C-H aromáticos); 2934 (m, C-H alifáticos); 1615 (f, C=N).

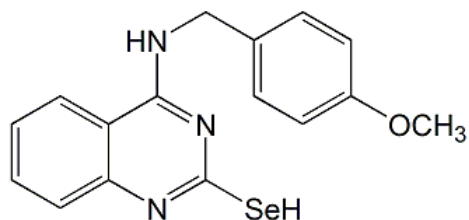
**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 5,98 (s.a., 2H, CH<sub>2</sub>-NH); 7,21 (t, 1H, H<sub>7</sub>); 7,29 (m, 5H, Ph); 7,40 (d, 1H, H<sub>8</sub>); 7,60 (t, 1H, H<sub>6</sub>); 8,09 (d, 1H, H<sub>5</sub>); 9,62 (s, 1H, NH-CH<sub>2</sub>); 12,68 (s.a., 1H, SeH).

**Análisis elemental:** C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>Se

Calculado (%): **C:** 57,22; **H:** 4,14; **N:** 13,27

Hallado (%): **C:** 56,88; **H:** 4,15; **N:** 12,96

**EM-DIP (70 eV) (m/z):** 315 (M<sup>+</sup>; 13 %); 235 (30 %); 145 (25 %); 129 (34 %); 117 (23 %); 103 (36 %); 91 (100 %); 77 (29 %); 65 (34 %); 51 (24 %).

**2-hidroseleno-4-(4-metoxibencil)aminoquinazolina****Fórmula molecular:** C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>OSe**Peso molecular:** 344 g/mol**Punto de fusión:** 197,3-197,7 °C**Apariencia:** Sólido amarillo**Referencia:** IV.4**Procedimiento experimental:**

En un matraz se disuelven 0,32 g (2,74 mmoles) de 2-aminobenzonitrilo en 30 mL de dioxano y 4 mL de piridina seca. Se adicionan (gota a gota y con agitación) 0,62 g (2,74 mmoles) de 4-metoxibencilisoselenocianato y se prolonga la agitación a reflujo durante 72 horas. Se filtra el residuo para eliminar restos de selenio y se añaden 30 g de hielo. Se extrae la fase orgánica 3 veces con diclorometano (3 × 25 mL). Se lava la fase orgánica 3 veces con agua (3 × 20 mL) y se seca bien con sulfato sódico anhidro. Se filtra para eliminar el sulfato sódico anhidro y el disolvente se evapora a presión reducida lavando 3 veces con tolueno (3 × 20 mL) el residuo resultante. Se obtiene un sólido amarillo que se lava durante 1 hora con éter etílico y se filtra hasta sequedad. El sólido se recristaliza de etanol.

Así se obtienen 75,0 mg (8,2 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3263 (m, N-H); 3172-3128 (m, C-H aromáticos); 2924 (m, C-H alifáticos); 1605 (f, C=N).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 3,70 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 5,93 (s.a., 2H, CH<sub>2</sub>-NH); 6,84 (d, 2H, H<sub>3</sub>+H<sub>5</sub>, J<sub>3-2</sub>=J<sub>5-6</sub>=8,4 Hz); 7,29 (t, 2H, H<sub>7</sub>, J<sub>7-8</sub>=J<sub>7-6</sub>=8,0 Hz); 7,33 (d, 2H, H<sub>2</sub>+H<sub>6</sub>); 7,38 (d, 1H, H<sub>8</sub>); 7,58 (t, 1H, H<sub>6</sub>, J<sub>6-5</sub>=8,0 Hz); 8,08 (d, 1H, H<sub>5</sub>); 9,63 (s, 1H, NH-CH<sub>2</sub>); 12,66 (s, 1H, SeH).

**Análisis elemental:** C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>OSeCalculado (%): **C:** 55,81; **H:** 4,36; **N:** 12,21Hallado (%): **C:** 55,67; **H:** 4,36; **N:** 12,32**EM-DIP (70 eV) (m/z):** 345 (M<sup>+</sup>; 7 %); 264 (14 %); 121 (100 %); 91 (26 %); 77 (24 %).

## 2-hidroseleno-4-(4-metiltiobencil)aminoquinazolina

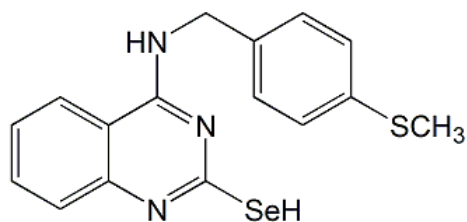
**Fórmula molecular:** C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>SSe

**Peso molecular:** 360 g/mol

**Punto de fusión:** 170,8-171,5 °C

**Apariencia:** Sólido naranja

**Referencia:** IV.5



### Procedimiento experimental:

En un matraz se añaden 0,39 g (3,30 mmoles) de 2-aminobenzonitrilo disueltos en 30 mL de dioxano y 4 mL de piridina seca. Se adicionan (gota a gota y con agitación) 0,80 g (3,30 mmoles) de 4-metiltiobencilisoselenocianato y se prolonga la agitación a reflujo durante 48 horas. Se filtra la disolución a gravedad para eliminar restos de selenio que han precipitado y se añaden 30 g de hielo. Aparece un precipitado naranja que se filtra a vacío, se lava con bicarbonato sódico al 10 % y, posteriormente, con agua. Se deja que seque bien y el sólido se recristaliza de etanol.

Así se obtienen 0,42 g (63,0 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3250 (m, N-H); 3016 (m, C-H aromáticos); 2963 (m, C-H alifáticos); 1617 (f, C=N).

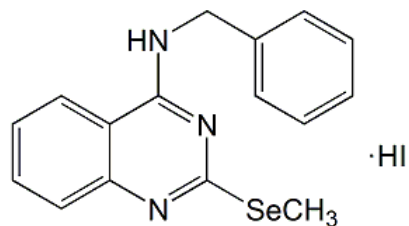
**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 2,48 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>); 5,90 (s.a., 2H, CH<sub>2</sub>-NH); 7,19 (d, 2H, H<sub>3</sub>+H<sub>5</sub>); 7,30 (m, 3H, H<sub>7</sub>+H<sub>2</sub>+H<sub>6</sub>); 7,40 (d, 1H, H<sub>8</sub>, J<sub>8-7</sub>=8,1 Hz); 7,60 (t, 1H, H<sub>6</sub>, J<sub>6-7</sub>=J<sub>6-5</sub>=7,8 Hz); 8,14 (d, 1H, H<sub>5</sub>); 9,63 (s, 1H, NH-CH<sub>2</sub>); 12,65 (s, 1H, SeH).

**Análisis elemental:** C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>SSe

Calculado (%): **C:** 53,33; **H:** 4,16; **N:** 11,66

Hallado (%): **C:** 53,73; **H:** 4,30; **N:** 11,52

**EM-DIP (70 eV) (m/z):** 360 (M<sup>+</sup>; 4 %); 281 (59 %); 235 (17 %); 191 (39 %); 175 (21 %); 161 (24 %); 137 (47 %); 106 (48 %); 121 (100 %); 91 (81 %); 77 (38 %).

**4-bencilamino-2-metilselenoquinazolina (Hidroioduro)****Fórmula molecular:** C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>Se·HI**Peso molecular:** 456 g/mol**Punto de fusión:** 195,5-195,9 °C**Apariencia:** Sólido amarillo**Referencia:** IV.6**Procedimiento experimental:**

En un matraz se añaden 0,40 g (1,27 mmoles) de 4-bencilamino-2-hidroselenoquinazolina y 0,10 mL (1,34 mmoles) de yoduro de metilo disueltos en 30 mL de etanol absoluto. Se adicionan 4 mL de *N,N*-dimetilformamida, ya que el reactivo de partida no se disuelve, y se prolonga la agitación a reflujo durante 1,5 horas. Se filtra el residuo para eliminar restos de selenio y se evapora el disolvente a presión reducida. Se obtiene un precipitado aceitoso que se lava con agua hasta que toma consistencia sólida. Se filtra por gravedad y se deja que seque bien.

Así se obtienen 0,23 g (31,1 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3309 (m, N-H); 3186-3038 (m, C-H aromáticos); 1651 (m, C=N).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 2,57 (s, 3H, SeCH<sub>3</sub>); 5,58 (s.a., 2H, CH<sub>2</sub>-NH); 7,35 (m, 5H, Ph); 7,74 (t, 1H, H<sub>7</sub>); 7,79 (d, 1H, H<sub>8</sub>); 8,06 (t, 1H, H<sub>6</sub>); 8,53 (d, 1H, H<sub>5</sub>); 10,06 (s, 1H, NH-CH<sub>2</sub>).

**Análisis elemental:** C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>Se·HI

Calculado (%): **C:** 42,10; **H:** 3,29; **N:** 9,21

Hallado (%): **C:** 42,20; **H:** 3,56; **N:** 9,20

**EM-DIP (70 eV) (m/z):** 327 (M<sup>+</sup>; 25 %); 314 (23 %); 234 (27 %); 207 (21 %); 191 (20 %); 137 (53 %); 121 (24 %); 103 (44 %); 91 (100 %); 77 (37 %).

### 4-bencilamino-2-pentilselenoquinazolina (Hidroioduro)

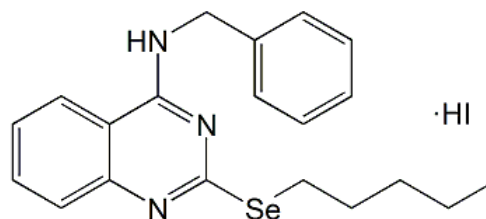
**Fórmula molecular:** C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>Se·HI

**Peso molecular:** 512 g/mol

**Punto de fusión:** 177-179 °C

**Apariencia:** Sólido amarillo

**Referencia:** IV.7



#### Procedimiento experimental:

En un matraz se disuelven 0,66 g de 4-bencilamino-2-hidroselenoquinazolina (2,10 mmol) en 50 mL de etanol absoluto. A continuación, se añaden 0,41 mL de ioduro de pentilo (3,15 mmol) y 10 gotas de *N,N*-dimetilformamida para favorecer la disolución de los reactivos y se prolonga la reacción a reflujo durante 1,5 horas. Posteriormente, se evapora el disolvente a presión reducida y el producto resultante se lava con éter dejando que seque bien. El sólido resultante se recristaliza de etanol.

Así se obtienen 0,68 g (63,5 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3334, 3306 (m, N-H); 3131 (m, C-H aromáticos); 2938 (m, C-H alifáticos); 1645 (f, C=N).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 0,86 (t, 3H, (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CH<sub>3</sub>); 1,33 (m, 4H, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>); 1,75 (q, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>); 3,32 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>); 5,71 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph); 7,35 (m, 5H, CH<sub>2</sub>-Ph); 7,77 (m, 2H, H<sub>7</sub>+H<sub>8</sub>); 8,06 (t, 1H, H<sub>6</sub>); 8,53 (d, 1H, H<sub>5</sub>); 10,12 (s.a., 1H, NH-CH<sub>2</sub>).

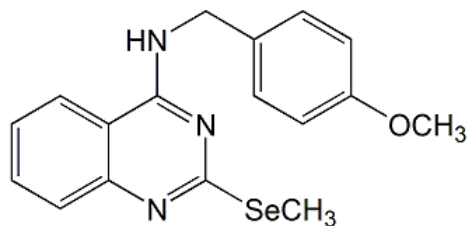
**Análisis elemental:** C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>Se·HI

Calculado (%): **C:** 46,87; **H:** 4,49; **N:** 8,20

Hallado (%): **C:** 47,15; **H:** 4,49; **N:** 8,63

**EM-DIP (70 eV) (m/z):** 385 (M<sup>+</sup>; 10 %); 314 (100 %); 234 (64 %); 207 (55 %); 129 (24 %); 106 (22 %); 91 (68 %).



**2-metilseleno-4-(4-metoxibencil)aminoquinazolina****Fórmula molecular:** C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>OSe**Peso molecular:** 358 g/mol**Punto de fusión:** 190,5-191,2 °C**Apariencia:** Sólido amarillo**Referencia:** IV.8**Procedimiento experimental:**

En un matraz se añaden 0,44 g (1,27 mmoles) de 2-hidroseleno-4-(4-metoxibencil)aminoquinazolina y 0,10 mL (1,34 mmoles) de yoduro de metilo disueltos en 30 mL de etanol absoluto. Se adicionan 4 mL de *N,N*-dimetilformamida hasta disolución completa de los reactivos y se prolonga la agitación a reflujo durante 1,5 horas. Se filtra la disolución para eliminar restos de selenio y se evapora el disolvente a presión reducida. Se obtiene un precipitado aceitoso que se lava con agua hasta que toma consistencia sólida. Se filtra a vacío y se deja que seque bien. El producto se recristaliza de etanol.

Así se obtienen 0,23 g (31,1 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3329 (m, N-H); 3175-3058 (m, C-H aromáticos); 1658 (m, C=N).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 2,58 (s, 3H, SeCH<sub>3</sub>); 3,72 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 5,94 (s.a., 2H, CH<sub>2</sub>-NH); 6,80 (d, 2H, H<sub>3</sub>+H<sub>5</sub>, J<sub>3-2</sub>=J<sub>5-6</sub>=8,4 Hz); 7,23 (t, 2H, H<sub>7</sub>, J<sub>7-8</sub>=J<sub>7-6</sub>=8,0 Hz); 7,31 (d, 2H, H<sub>2</sub>+H<sub>6</sub>); 7,42 (d, 1H, H<sub>8</sub>); 7,61 (t, 1H, H<sub>6</sub>, J<sub>6-5</sub>=8,0 Hz); 8,18 (d, 1H, H<sub>5</sub>); 9,68 (s, 1H, NH-CH<sub>2</sub>); 12,60 (s, 1H, SeH).

**Análisis elemental:** C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>OSeCalculado (%): **C:** 56,98; **H:** 4,75; **N:** 11,73Hallado (%): **C:** 56,82; **H:** 4,87; **N:** 11,52

**EM-DIP (70 eV) (m/z):** 359 (M<sup>+</sup>; 45 %); 191 (20 %); 91 (100 %); 77 (47 %).

## 2-metilseleno-4-(4-metiltiobencil)aminoquinazolina (Hidroioduro)

**Fórmula molecular:** C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>SSe·0,8 HI

**Peso molecular:** 476,2 g/mol

**Punto de fusión:** 160,1-160,4 °C

**Apariencia:** Sólido amarillo

**Referencia:** IV.9



### Procedimiento experimental:

En un matraz se disuelven 0,42 g (1,16 mmoles) de 2-hidroseleno-4-(4-metiltiobencil)aminoquinazolina en 30 mL de etanol absoluto y 0,1 mL de *N,N*-dimetilformamida. Se adicionan (gota a gota y con agitación) 0,11 mL (1,75 mmoles) de yoduro de metilo y se prolonga la agitación a reflujo durante 1,5 horas. Posteriormente, se filtra la disolución para eliminar restos de selenio y se evapora el disolvente a presión reducida. Se lava el residuo resultante con agua y aparece un precipitado amarillo que se filtra a vacío. Se lava con agua y se deja secar bien.

Así se obtienen 0,27 g (50,0 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3245 (m, N-H); 3045 (C-H aromáticos); 2960 (m, C-H alifáticos); 1634 (f, C=N).

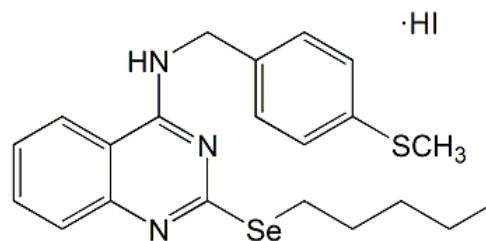
**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 2,45 (s, 3H, SeCH<sub>3</sub>); 2,52 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>); 5,46 (s.a., 2H, CH<sub>2</sub>-NH); 7,24 (m, 4H, Ph); 7,60 (t, 1H, H<sub>7</sub>, J<sub>7-8</sub>=J<sub>7-6</sub>=7,8 Hz); 7,62 (d, 1H, H<sub>8</sub>); 7,86 (t, 1H, H<sub>6</sub>, J<sub>6-5</sub>=8,0 Hz); 8,37 (d, 1H, H<sub>5</sub>); 9,69 (s, 1H, NH-CH<sub>2</sub>).

**Análisis elemental:** C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>SSe·0,8 HI

Calculado (%): **C:** 42,84; **H:** 3,68; **N:** 8,82

Hallado (%): **C:** 42,62; **H:** 3,95; **N:** 9,09

**EM-DIP (70 eV) (m/z):** 375 (M<sup>+</sup>; 5 %); 281 (13 %); 159 (18 %); 137 (100 %); 121 (46 %); 91 (39 %); 77 (23 %).

**4-(4-metiltiobencil)amino-2-pentilselenoquinazolina (Hidrioduro)****Fórmula molecular:** C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>SSe·0,9 HI**Peso molecular:** 545,2 g/mol**Punto de fusión:** 169-170 °C**Apariencia:** Sólido amarillo**Referencia:** IV.10**Procedimiento experimental:**

En un matraz se disuelven 0,25 g de 2-hidroseleno-4-(4-metiltiobencil)aminoquinazolina (0,70 mmol) en 50 mL de etanol absoluto. A continuación, se añaden (poco a poco y con agitación) 0,11 mL de yoduro de pentilo (0,83 mmol) y 0,15 mL de *N,N*-dimetilformamida, prolongándose la agitación a reflujo durante 1,5 horas. Posteriormente, se evapora el disolvente a presión reducida y el producto resultante se lava con éter y se deja que seque bien. El sólido resultante se recristaliza de etanol.

Así se obtienen 0,14 g (36,8 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3321 (m, N-H); 3131 (m, C-H aromáticos); 2958-2892 (m, C-H alifáticos); 1589 (f, C=N).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 0,86 (t, 3H, (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CH<sub>3</sub>); 1,34 (m, 4H, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>); 1,78 (q, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>); 2,50 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>); 3,31 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>); 5,53 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-NH); 7,25 (m, 4H, Ph); 7,76 (m, 2H, H<sub>7</sub>+H<sub>8</sub>); 8,07 (t, 1H, H<sub>6</sub>); 8,53 (d, 1H, H<sub>5</sub>); 10,32 (s, 1H, NH-CH<sub>2</sub>).

**Análisis elemental:** C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>SSe·0,9 HICalculado (%): **C:** 46,22; **H:** 4,58; **N:** 7,70Hallado (%): **C:** 45,91; **H:** 4,60; **N:** 7,74

**EM-DIP (70 eV) (m/z):** 431 (M<sup>+</sup>; 9 %); 360 (43 %); 253 (28 %); 137 (100 %); 121 (11 %); 91 (9 %).

## 4-amino-2-hidroselenoquinazolina

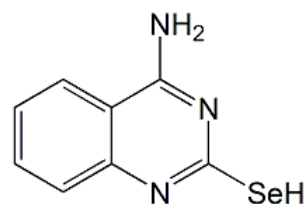
**Fórmula molecular:** C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>N<sub>3</sub>Se

**Peso molecular:** 224 g/mol

**Punto de fusión:** 280-281 °C

**Apariencia:** Sólido marrón

**Referencia:** IV.11



### Procedimiento experimental:

En un matraz se disuelven 1,39 g de 4-amino-2-cloroquinazolina (7,70 mmol) en 50 mL de etanol absoluto. A continuación, se añade 1,00 g de selenourea (8,13 mmol) y se prolonga la reacción a reflujo durante 4 horas en constante agitación. Posteriormente, se deja enfriar la disolución y aparece un precipitado marrón que se filtra a vacío. Se lava con agua y se deja que seque bien. El sólido resultante se recristaliza de etanol.

Así se obtienen 0,28 g (16,3 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3345 (m, N-H); 3141 (m, C-H aromáticos); 1669 (f, C=N).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 7,69 (ddd, 1H, H<sub>7</sub>); 8,00 (m, 2H, H<sub>8</sub>+H<sub>6</sub>); 8,44 (d, 1H, H<sub>5</sub>); 9,28 (s, 1H, NH<sub>2</sub>); 9,48 (s, 1H, SeH).

**Análisis elemental:** C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>N<sub>3</sub>Se

Calculado (%): **C:** 42,86; **H:** 3,12; **N:** 18,75

Hallado (%): **C:** 43,02; **H:** 3,42; **N:** 18,94

**EM-DIP (70 eV) (m/z):** 225 (M<sup>+</sup>; 15 %); 191 (24 %); 137 (79 %); 121 (83 %); 103 (34 %); 91 (100 %); 77 (53 %); 69 (58 %); 57 (84 %).

## 4-amino-2-metilselenoquinazolina

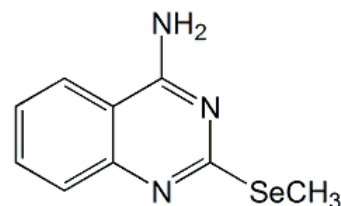
**Fórmula molecular:** C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>Se

**Peso molecular:** 238 g/mol

**Punto de fusión:** 213-214 °C

**Apariencia:** Sólido amarillo

**Referencia:** IV.12



### Procedimiento experimental:

En un matraz se disuelven 0,90 g de 4-amino-2-hidroselenoquinazolina (4,02 mmol) en 50 mL de etanol absoluto y 0,15 mL de *N,N*-dimetilformamida. A continuación, se añaden (poco a poco y con agitación) 0,37 mL de yoduro de metilo (6,00 mmol) y se prolonga la agitación a reflujo durante 1,5 horas. Posteriormente, se evapora el disolvente a presión reducida, se añaden 20 mL de agua y se extrae la fase orgánica 3 veces con diclorometano (3 × 15 mL). Se lava la fase orgánica 3 veces con agua (3 × 20 mL) y se seca con sulfato sódico anhidro. A continuación, se filtra la disolución para eliminar el sulfato sódico y se evapora el disolvente a presión reducida, dando lugar a un sólido amarillo. El sólido resultante se recrystaliza de etanol. Así se obtienen 36,0 mg (3,8 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3386-3306 (m, N-H); 3125 (m, C-H aromáticos); 2927 (m, C-H alifáticos); 1646 (f, C=N).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 2,40 (s, 3H, SeCH<sub>3</sub>); 7,40 (ddd, 1H, H<sub>7</sub>, J<sub>7-8</sub>=8,2 Hz, J<sub>7-6</sub>=7,0 Hz, J<sub>7-5</sub>=1,3 Hz); 7,52 (dd, 1H, H<sub>8</sub>, J<sub>8-6</sub>=1,2 Hz); 7,71 (ddd, 1H, H<sub>6</sub>, J<sub>6-5</sub>=8,2 Hz); 7,89 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 8,14 (dd, 1H, H<sub>5</sub>).

**Análisis elemental:** C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>Se

Calculado (%): **C:** 45,38; **H:** 3,78; **N:** 17,65

Hallado (%): **C:** 45,60; **H:** 3,78; **N:** 17,39

**EM-DIP (70 eV) (m/z):** 239 (M<sup>+</sup>; 64 %); 159 (100 %); 145 (64 %); 129 (30 %); 117 (36 %); 91 (31 %).

## 4-amino-2-pentilselenoquinazolina

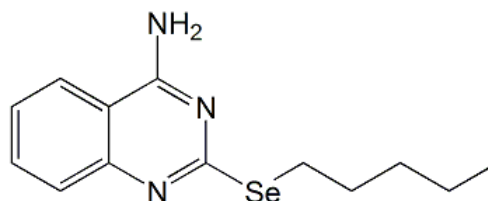
**Fórmula molecular:** C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>Se

**Peso molecular:** 294 g/mol

**Punto de fusión:** 92,5-93,5 °C

**Apariencia:** Sólido amarillo

**Referencia:** IV.13



### Procedimiento experimental:

En un matraz se disuelven 0,45 g de 4-amino-2-hidroselenoquinazolina (2,00 mmol) en 50 mL de etanol absoluto y 0,15 mL de *N,N*-dimetilformamida. A continuación, se añaden (poco a poco y con agitación) 0,38 mL de yoduro de metilo (2,88 mmol) y se prolonga la agitación a reflujo durante 1,5 horas. Posteriormente, se evapora el disolvente a presión reducida, se añaden 30 mL de agua al residuo resultante y se deja agitando hasta que aparece un precipitado. Se filtra el precipitado a vacío hasta llegar a sequedad y se recoge sin más purificación.

Así se obtienen 0,15 g (3,8 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3312 (m, N-H); 3135 (m, C-H aromáticos); 2949-2862 (m, C-H alifáticos); 1646 (f, C=N).

**RMN-<sup>1</sup>H(DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 0,88 (t, 3H, (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CH<sub>3</sub>); 1,36 (m, 4H, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>); 1,76 (q, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>); 3,13 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>); 7,38 (ddd, 1H, H<sub>7</sub>, J<sub>7-8</sub>=8,2 Hz, J<sub>7-6</sub>=7,0 Hz, J<sub>7-5</sub>=0,8 Hz); 7,49 (dd, 1H, H<sub>8</sub>, J<sub>8-6</sub>=1,0 Hz); 7,70 (ddd, 1H, H<sub>6</sub>, J<sub>6-5</sub>=8,0 Hz); 7,83 (s.a., 2H, NH<sub>2</sub>); 8,12 (dd, 1H, H<sub>5</sub>).

**Análisis elemental:** C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>Se

Calculado (%): **C:** 53,07; **H:** 5,78; **N:** 14,28

Hallado (%): **C:** 53,47; **H:** 5,71; **N:** 13,88

**EM-DIP (70 eV) (m/z):** 295 (M<sup>+</sup>; 27 %); 252 (24 %); 239 (44 %); 225 (90 %); 214 (49 %); 159 (58 %); 145 (100 %); 129 (28 %); 121 (81 %); 103 (24 %); 91 (37 %).

## 2,4-dihidroselenoquinazolina

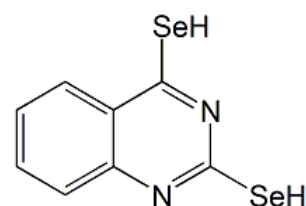
**Fórmula molecular:** C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>Se<sub>2</sub>

**Peso molecular:** 288 g/mol

**Punto de fusión:** > 300 °C

**Apariencia:** Sólido marrón

**Referencia:** IV.14



### Procedimiento experimental:

En un matraz se disuelven 0,75 g de 2,4-dicloroquinazolina (3,75 mmol) en 50 mL de etanol absoluto. A continuación, se añaden 0,75 g de selenourea (9,85 mmol) y se prolonga la agitación a reflujo durante 5 horas. Pasado este tiempo, se filtra el precipitado formado, se lava con agua y se deja secar bien. El sólido resultante se recristaliza de etanol.

Así se obtienen 0,81 g (75,0 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3104 (m, C-H aromáticos); 2941 (m, C-H alifáticos); 1611 (f, C=N).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 7,35-7,42 (m, 2H, H<sub>7</sub>+H<sub>8</sub>); 7,80 (t, 1H, H<sub>6</sub>, J<sub>6-7</sub>=J<sub>6-5</sub>=7,9 Hz); 8,31 (t, 1H, H<sub>5</sub>); 13,75 (s, 1H, SeH<sub>(4)</sub>); 14,55 (s, 1H, SeH<sub>(2)</sub>).

**Análisis elemental:** C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>Se<sub>2</sub>

Calculado (%): **C:** 33,33; **H:** 2,08; **N:** 9,72

Hallado (%): **C:** 33,15; **H:** 2,13; **N:** 9,87

**EM-DIP (70 eV) (m/z):** 289 (M<sup>+</sup>; 48 %); 209 (47 %); 160 (52 %); 129 (100 %); 103 (38 %); 80 (32 %).

## 2,4-dimetilselenoquinazolina

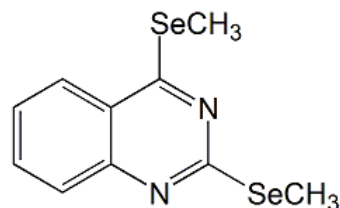
**Fórmula molecular:** C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>Se<sub>2</sub>

**Peso molecular:** 316 g/mol

**Punto de fusión:** 61,4-61,7 °C

**Apariencia:** Sólido amarillo

**Referencia:** IV.15



### Procedimiento experimental:

En un matraz se disuelven 0,80 g de 2,4-dihidroselenoquinazolina (2,80 mmol) en 40 mL de hidróxido sódico 0,4 N. A continuación, se añaden 0,59 mL de yoduro de metilo (6,11 mmol) y se prolonga la agitación a reflujo durante 24 horas. Pasado este tiempo, se deja enfriar la disolución y se añade ácido acético glacial hasta pH=5-6. Precipita un sólido amarillo que se filtra a vacío y se deja que seque bien. El sólido resultante se recristaliza de isopropanol/acetato de etilo (3:1, en volumen).

Así se obtienen 0,54 g (61,4 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3160 (m, C-H aromáticos); 2982-2858 (m, C-H alifáticos); 1608 (f, C=N).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 2,53 (s, 3H, SeCH<sub>3(4)</sub>); 2,56 (s, 3H, SeCH<sub>3(2)</sub>); 7,61 (ddd, 1H, H<sub>7</sub>, J<sub>8-7</sub>=8,2 Hz, J<sub>7-6</sub>=7,0 Hz, J<sub>7-5</sub>=1,2 Hz); 7,77 (dd, 1H, H<sub>8</sub>, J<sub>8-6</sub>=1,2 Hz); 7,93 (ddd, 1H, H<sub>6</sub>, J<sub>6-5</sub>=7,9 Hz); 7,95 (dd, 1H, H<sub>5</sub>).

**RMN-<sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 6,7 (CH<sub>3(4)</sub>); 7,6 (CH<sub>3(2)</sub>); 124,2 (C<sub>9</sub>); 126,1 (C<sub>8</sub>); 127,9 (C<sub>5</sub>); 129,4 (C<sub>7</sub>); 135,7 (C<sub>6</sub>); 148,7 (C<sub>10</sub>); 164,6 (C<sub>4</sub>); 171,8 (C<sub>2</sub>).

**Análisis elemental:** C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>Se<sub>2</sub>

Calculado (%): **C:** 37,97; **H:** 3,16; **N:** 8,86

Hallado (%): **C:** 37,86; **H:** 3,03; **N:** 8,72

**EM-DIP (70 eV) (m/z):** 318 (M<sup>+</sup>; 100 %); 303 (32 %); 238 (36 %); 223 (79 %); 208 (44 %); 143 (67 %); 129 (58 %); 121 (21 %); 103 (47 %); 95 (36 %); 77 (20 %).



## 2,4-dipentilselenoquinazolina

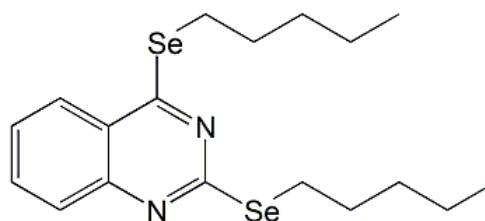
**Fórmula molecular:** C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>Se<sub>2</sub>

**Peso molecular:** 428 g/mol

**Punto de fusión:** -

**Apariencia:** Aceite amarillo

**Referencia:** IV.16



### Procedimiento experimental:

En un matraz se disuelven 0,80 g de 2,4-dihidroselenoquinazolina (2,80 mmol) en 40 mL de hidróxido sódico 0,4 N. A continuación, se añaden 0,80 mL de yoduro de pentilo (6,11 mmol) y se prolonga la agitación a reflujo durante 24 horas. Pasado este tiempo, se deja enfriar la disolución y se añade ácido acético glacial hasta pH=5-6. Se evapora el disolvente a presión reducida y el aceite resultante se extrae 3 veces con diclorometano (3 × 20 mL). Se lava la fase orgánica 3 veces con agua (3 × 20 mL) y se seca con sulfato sódico anhidro. Se filtra a gravedad para retirar el sulfato sódico y se evapora el disolvente a presión reducida. El aceite resultante se recristaliza de isopropanol/acetato de etilo (3:1, en volumen).

Así se obtienen 0,54 g (45,4 %).

**IR (KBr) cm<sup>-1</sup>:** 3156 (m, C-H aromáticos); 2987-2862 (m, C-H alifáticos); 1638 (f, C=N).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) ppm:** 0,88 (t, 6H, (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CH<sub>3(2y4)</sub>); 1,38 (m, 8H, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>3(2y4)</sub>); 1,79 (q, 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>3(2y4)</sub>); 3,24 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CH<sub>3(4)</sub>); 3,34 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CH<sub>3(2)</sub>); 7,60 (ddd, 1H, H<sub>7</sub>, J<sub>7-8</sub>=8,1 Hz, J<sub>7-6</sub>=7,0 Hz, J<sub>7-5</sub>=1,2 Hz); 7,74 (dd, 1H, H<sub>8</sub>, J<sub>8-6</sub>=1,2 Hz); 7,89-7,93 (m, 2H, H<sub>6</sub>+H<sub>5</sub>).

**Análisis elemental:** C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>Se<sub>2</sub>

Calculado (%): **C:** 50,47; **H:** 6,07; **N:** 6,54

Hallado (%): **C:** 50,42; **H:** 6,28; **N:** 6,19

**EM-DIP (70 eV) (m/z):** 429 (M<sup>+</sup>; 16 %); 360 (26 %); 290 (33 %); 209 (61 %); 145 (25 %); 129 (100 %); 103 (36 %); 69 (39 %); 55 (28 %).



## **II. Caracterización**

### **Estructural**

### **Instrumental**



## 1. ANÁLISIS INSTRUMENTAL DE LAS SERIES I Y II

Dentro de cada serie de compuestos se observan valores similares para los fragmentos estructurales comunes por lo que, para abreviar, se comentan a modo de ejemplo, algunos compuestos representativos de cada serie. Como ejemplo de los compuestos de las series I y II, que poseen átomos de azufre o selenio en la posición 2 del anillo de pirido[2,3-*d*]pirimidina, se ha elegido el derivado I.2 (2-metiltio-4-(4-metoxibencil)aminopirido[2,3-*d*]pirimidina).

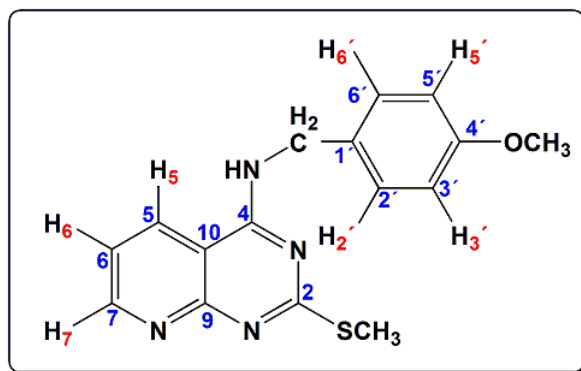


Figura 102: Estructura química del derivado I.2.

### 1.1 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO (IR)

La técnica de espectroscopia de infrarrojo (IR) informa acerca de la funcionalización presente en la molécula. Los compuestos sintetizados en las series I y II (pirido[2,3-*d*]pirimidinas con azufre o selenio en posición 2) han sido caracterizados por espectroscopia infrarroja (IR) y presentan todos ellos bandas compatibles con sus estructuras y semejantes entre sí. Las más representativas han sido las correspondientes a los números de onda propios de la tensión de enlace N-H ( $3387\text{-}3229\text{ cm}^{-1}$ ), de la tensión de enlace C-H alifáticos ( $2958\text{-}2917\text{ cm}^{-1}$ ) y de la tensión del esqueleto aromático en conjunto ( $1545\text{-}1666\text{ cm}^{-1}$ ).

Como una muestra de la identificación espectroscópica realizada se incluye, a continuación, el estudio del derivado I.2:

En el espectro correspondiente al derivado I.2 (figura 103) aparecen señaladas las bandas más representativas. Estas bandas son:  $3280\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al número de onda propio de la tensión de enlace N-H,  $2926\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al número de onda característico de la tensión de enlace C-H alifáticos y  $1576\text{ cm}^{-1}$  para la tensión de enlace del esqueleto aromático. A continuación, se muestra el espectro correspondiente al derivado I.2:

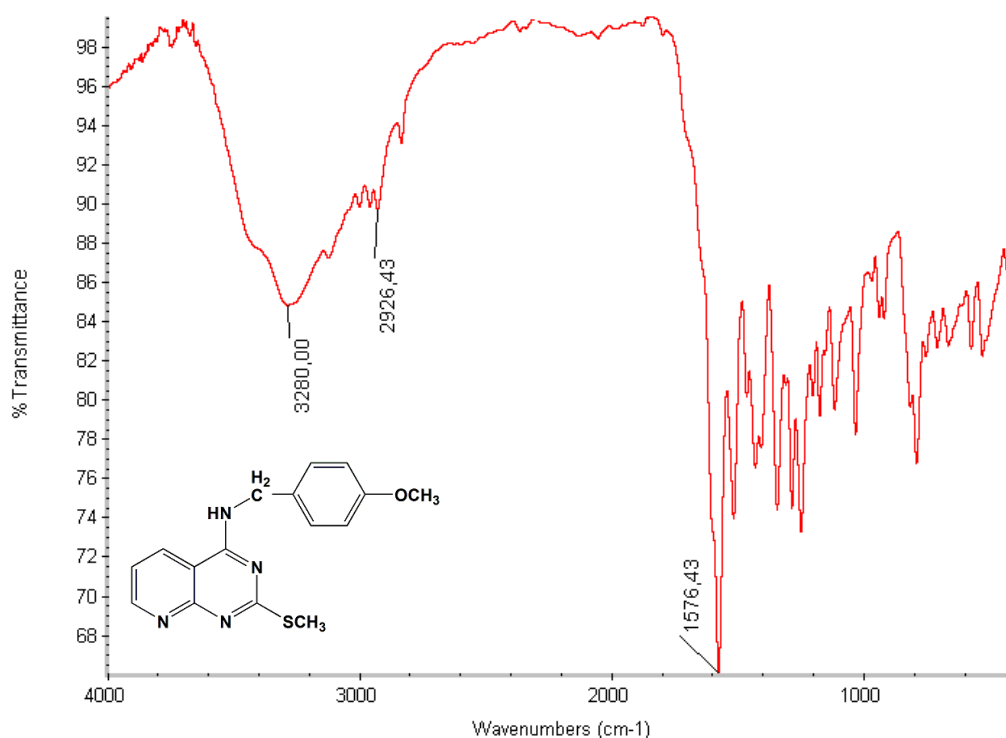


Figura 103: Espectro de IR correspondiente al compuesto 1.2.

## 1.2 ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

La técnica instrumental de resonancia magnética nuclear (RMN) permite la cuantificación de los protones presentes en cada compuesto, la caracterización del tipo de protones y el entorno químico de cada uno de ellos. Dicha información es de máxima importancia en la elucidación estructural de los compuestos. Además, también permite caracterizar los distintos tipos de átomos de carbono según su entorno molecular en la estructura.

La elucidación estructural por resonancia magnética nuclear de protón (RMN- $^1\text{H}$ ) se ha realizado a los compuestos de una misma serie y los espectros se han obtenido en una disolución de dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- $d_6$ ). Los derivados presentan señales características para cada serie sintetizada debido a que los entornos magnéticos son similares en todos los productos sintetizados. Posteriormente, se han realizado espectros de resonancia magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  (RMN- $^{13}\text{C}$ ) y espectros en dos dimensiones: RMN 2D-COSY, RMN 2D-HMQC y RMN 2D-HMBC para corroborar dicha asignación. El experimento RMN 2D-COSY (COrrrelation Spectroscopy) genera un espectro de RMN en dos dimensiones (2D) de correlación homonuclear y muestra los acoplamientos hidrógeno-hidrógeno existentes en la molécula. El experimento de RMN 2D-HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) permite observar los acoplamientos a un enlace de distancia entre un protón y un carbono (u otro heteroátomo) unido directamente a él. Por otro lado, el experimento de RMN 2D-HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) es el que más información aporta acerca de la conectividad de la molécula, debido a que se pueden observar acoplamientos entre los

hidrógenos y los carbonos a larga distancia (acoplamiento a dos, tres y cuatro enlaces de distancia). Puede ocurrir, en estos experimentos, que los acoplamiento a tres enlaces sean de mayor magnitud que los correspondientes a dos enlaces de distancia.

En la figura 104 se muestra el espectro de resonancia magnética nuclear de protón (RMN-<sup>1</sup>H) obtenido para el compuesto 1.2 (2-metil-4-(4-metoxibencil)aminopirido[2,3-d]pirimidina).

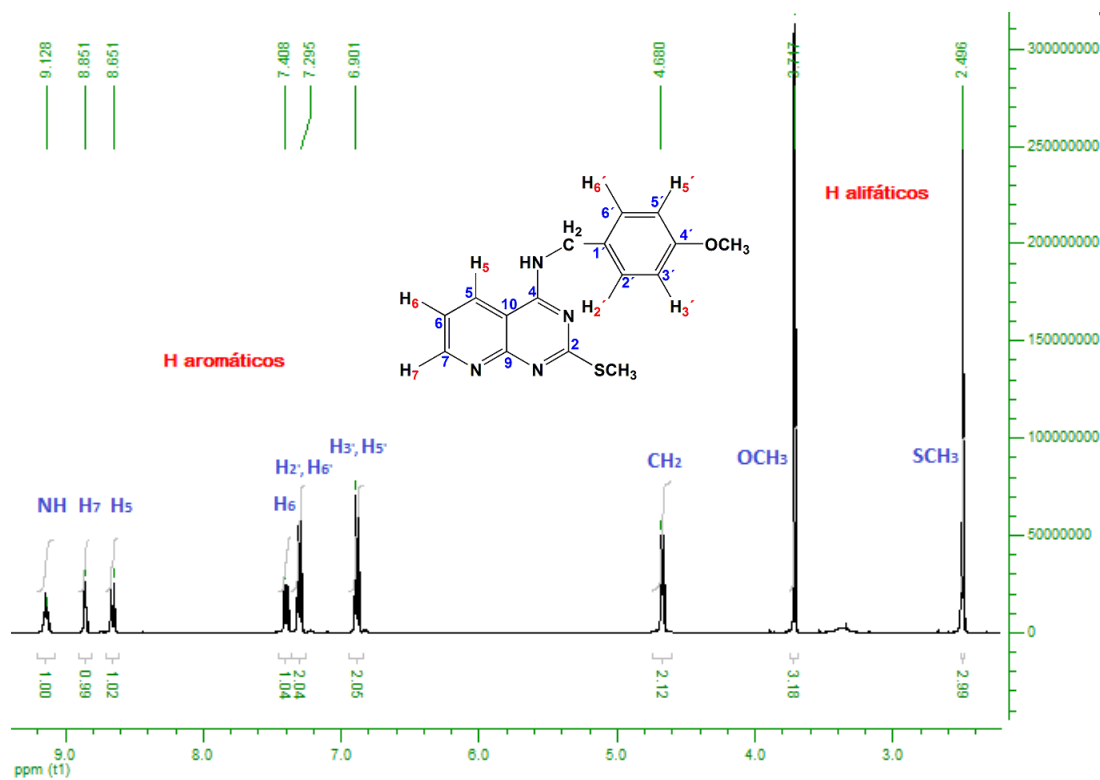


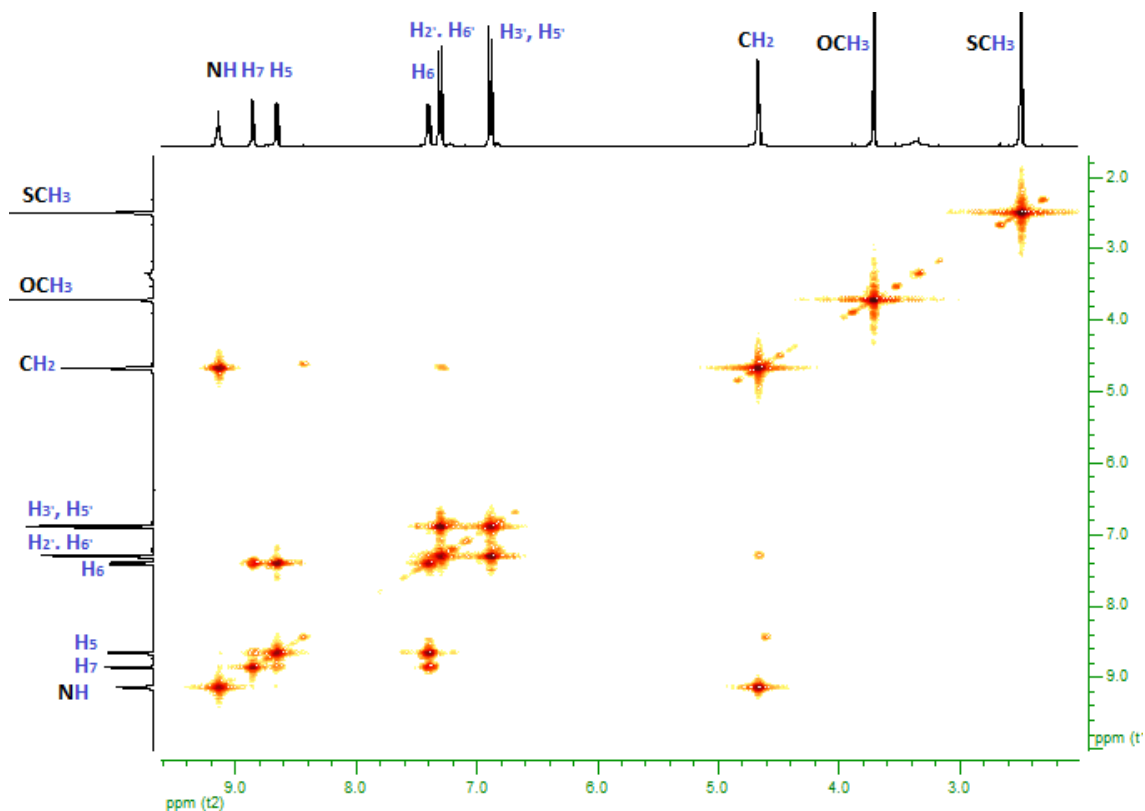
Figura 104: Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto 1.2.

En el espectro (figura 104) se observan tres señales en la zona alifática correspondientes a los hidrógenos del grupo SCH<sub>3</sub> (2,50 ppm) que salen como singlete, a los hidrógenos del OCH<sub>3</sub> (3,72 ppm) que aparecen como singlete y a los hidrógenos del grupo CH<sub>2</sub> (4,68 ppm). Esta señal aparece como doblete, lo que indica que los hidrógenos del CH<sub>2</sub> están acoplados con el hidrógeno vecinal del grupo NH (9,13 ppm), este hidrógeno aparece como triplete.

En la zona aromática se observan dos señales correspondientes a los hidrógenos del anillo de fenilo. Una señal corresponde a los hidrógenos H<sub>3'</sub> y H<sub>5'</sub> (6,90 ppm) y otra señal a mayor desplazamiento correspondiente a los hidrógenos H<sub>2'</sub> y H<sub>6'</sub> (7,29 ppm). Ambas señales aparecen como doblete porque dichos hidrógenos están acoplados entre sí. El hidrógeno H<sub>6</sub> (7,41 ppm), el más apantallado del anillo de pirido[2,3-d]pirimidina, aparece como un doblete, lo que indica que posee hidrógenos vecinales con los que se acopla con distinta intensidad mostrando diferentes valores para *J*. El acoplamiento con un hidrógeno vecinal (acoplamiento fuerte) da lugar a un doblete, que se desdobra de nuevo ante la presencia de un segundo hidrógeno vecinal (acoplamiento distinto del anterior y más débil). Lo mismo ocurre, a

desplazamientos mayores, con los hidrógenos H<sub>5</sub> (8,65 ppm) y H<sub>7</sub> (8,85 ppm) que aparecen como dobles dobletes debido a la presencia del hidrógeno contiguo a ambos (H<sub>6</sub>) con el que se acoplan con mayor intensidad que entre ellos. Se puede observar que de todos los protones, el que sale más desapantallado es el H<sub>7</sub> del anillo de pirido[2,3-*d*]pirimidina, ya que está contiguo a un átomo de nitrógeno, que al ser más electronegativo que un átomo de carbono, retira carga de dicho carbono.

La figura 105 muestra el experimento de RMN 2D-COSY para el derivado I.2.



**Figura 105:** Espectro de RMN 2D-COSY obtenido para el derivado I.2.

En él se observa cómo los acoplamientos más destacados aparecen en la zona aromática. Se ha efectuado una ampliación de la zona a estudiar y los acoplamientos se han representado con diferentes colores en el siguiente espectro (figura 106):



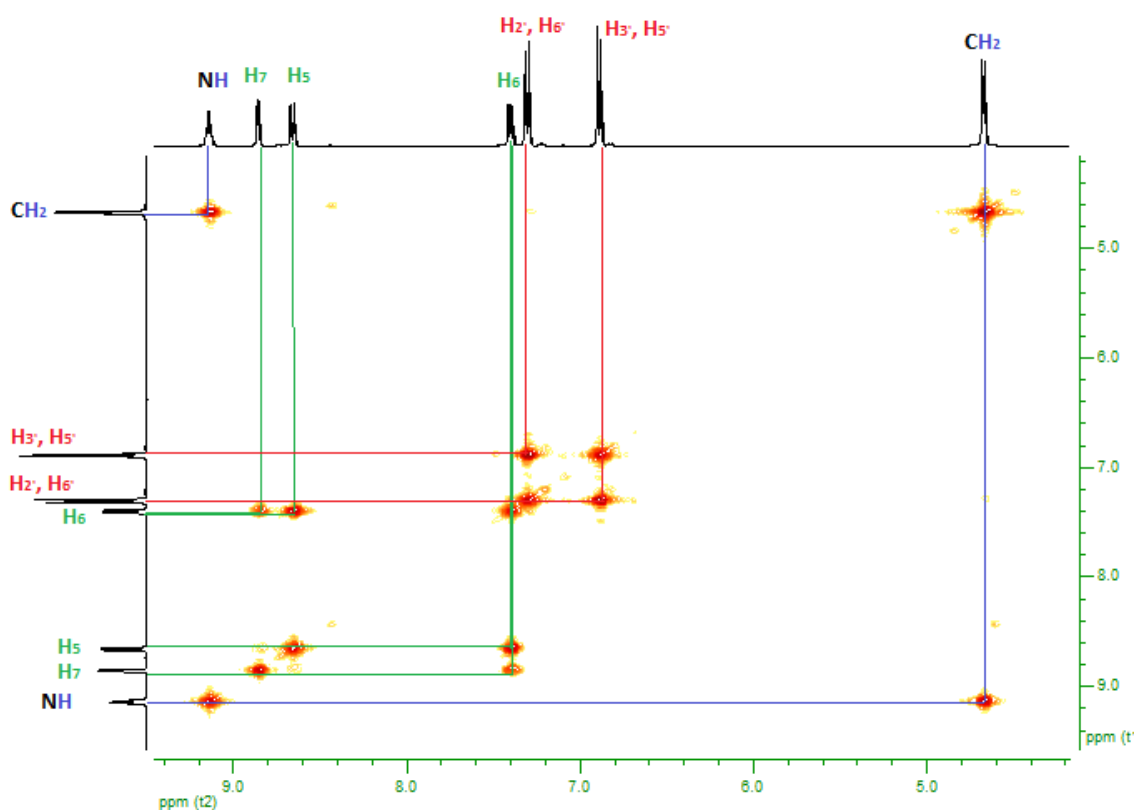


Figura 106: Espectro ampliado de RMN 2D-COSY obtenido para el derivado I.2.

El acoplamiento de los hidrógenos CH<sub>2</sub> con el hidrógeno NH queda corroborado en este espectro (*línea azul*). A su vez se observan acoplamientos entre hidrógenos aromáticos correspondientes al anillo de fenilo (*líneas rojas*) y acoplamientos que corresponden a hidrógenos del núcleo de pirido[2,3-*d*]pirimidina (*líneas verdes*).

El espectro de RMN-<sup>13</sup>C muestra las señales correspondientes a los diferentes tipos de carbonos de la molécula objetivo (figura 107). En este espectro también se diferencian dos zonas: una aromática y otra alifática. La correcta asignación de dichas señales sólo ha sido posible tras la realización de experimentos de resonancia magnética nuclear en dos dimensiones como RMN 2D-HMQC y RMN 2D-HMBC.

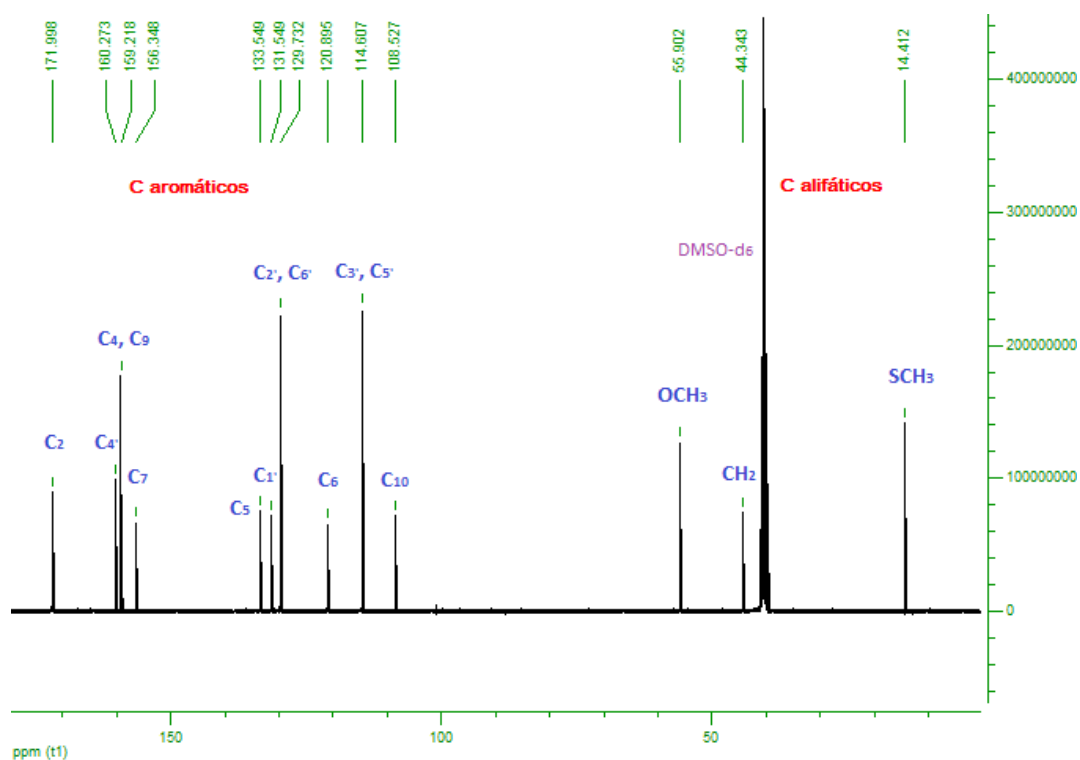


Figura 107: Espectro de RMN-<sup>13</sup>C obtenido para el compuesto I.2.

En la figura 108, correspondiente al espectro RMN 2D-HMQC del derivado I.2, se observan los acoplamientos de los hidrógenos de la molécula (eje X) con sus correspondientes carbonos (eje Y), acoplamientos a un enlace de distancia.

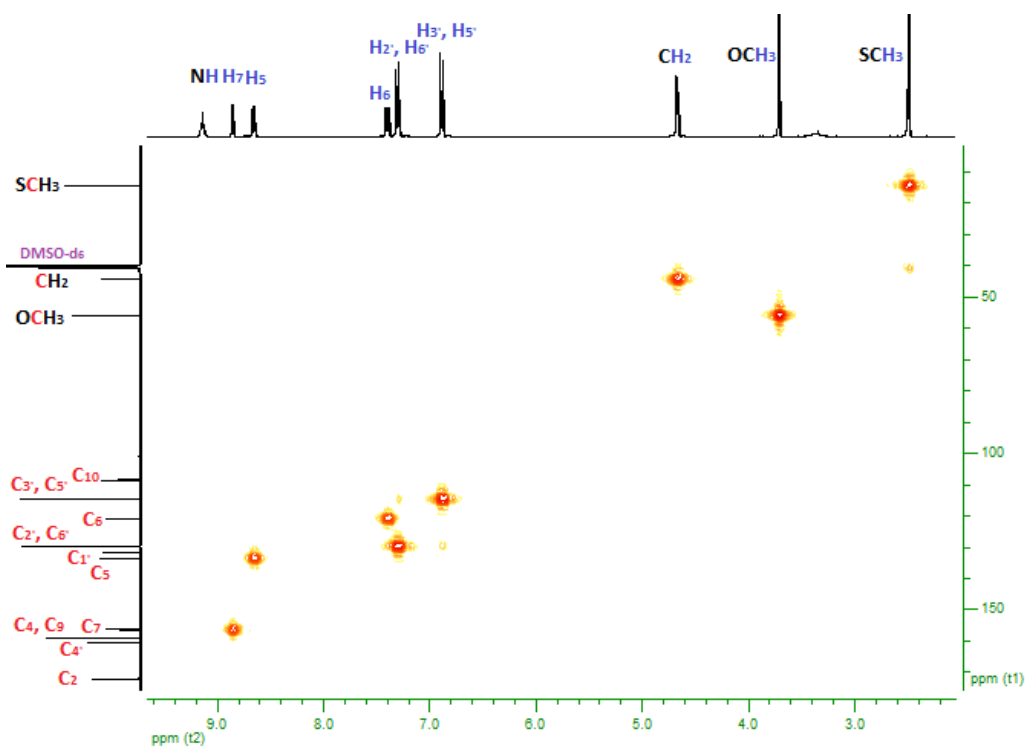


Figura 108: Espectro de RMN 2D-HMQC obtenido para el compuesto I.2.

A continuación se muestra el experimento de RMN 2D-HMBC obtenido para el derivado I.2:

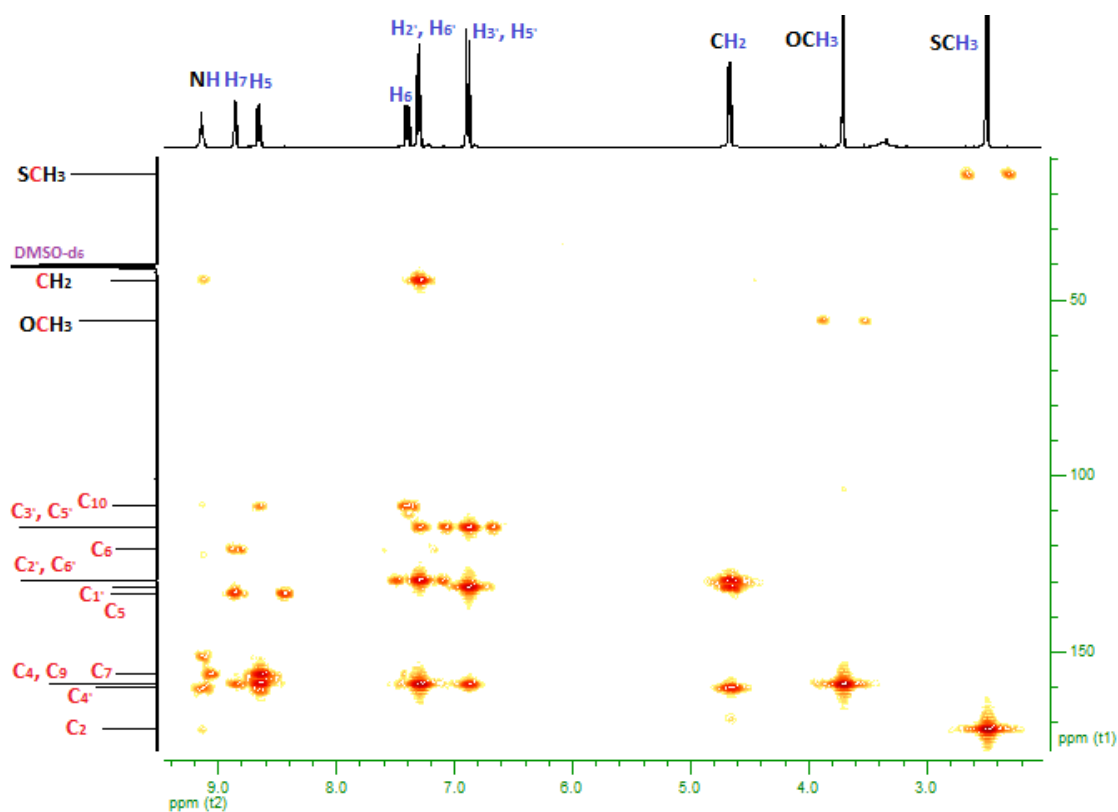


Figura 109: Espectro de RMN 2D-HMBC obtenido para el compuesto I.2.

Mediante la realización del experimento de RMN 2D-HMBC queda corroborada la asignación de los protones y carbonos de la molécula que se ha mostrado como ejemplo (derivado I.2).

Se ha realizado una ampliación de la zona alifática del experimento de RMN 2D-HMBC en la que se han reflejado los diferentes acoplamientos encontrados en la molécula (a un enlace y tres enlaces de distancia). Se observa como los acoplamientos más intensos son los correspondientes a tres enlaces de distancia (figura 110).

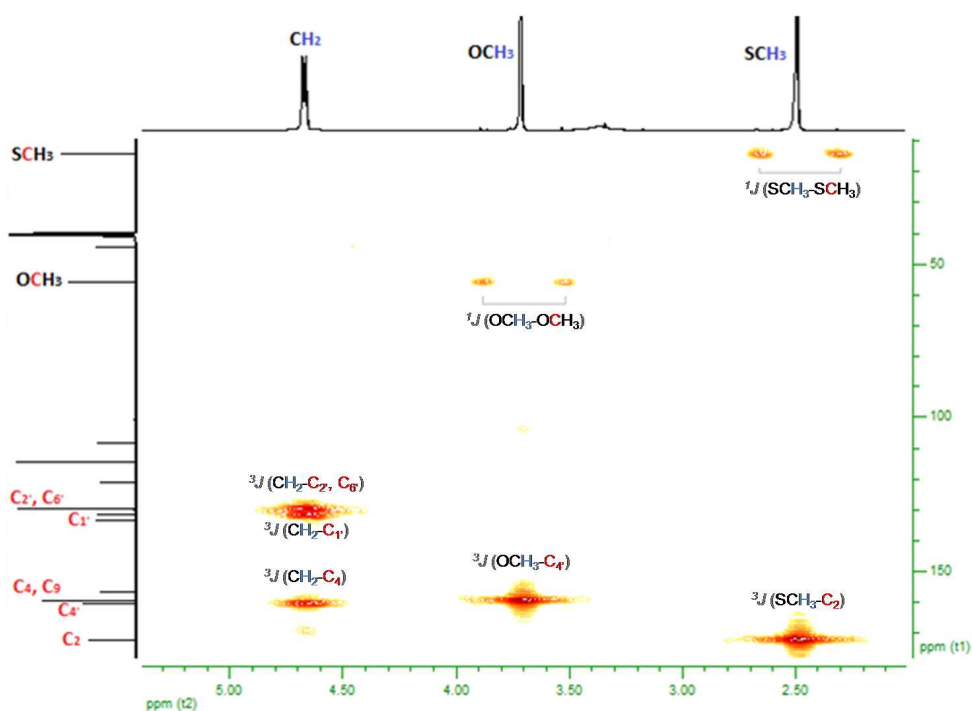


Figura 110: Ampliación de la zona alifática del espectro de RMN 2D-HMQC obtenido para el compuesto I.2.

En la figura 111, que se muestra a continuación, aparece la ampliación de la zona aromática del espectro de RMN 2D-HMBC. Aparecen señales correspondientes a los acoplamientos a uno, dos y tres enlaces de distancia.

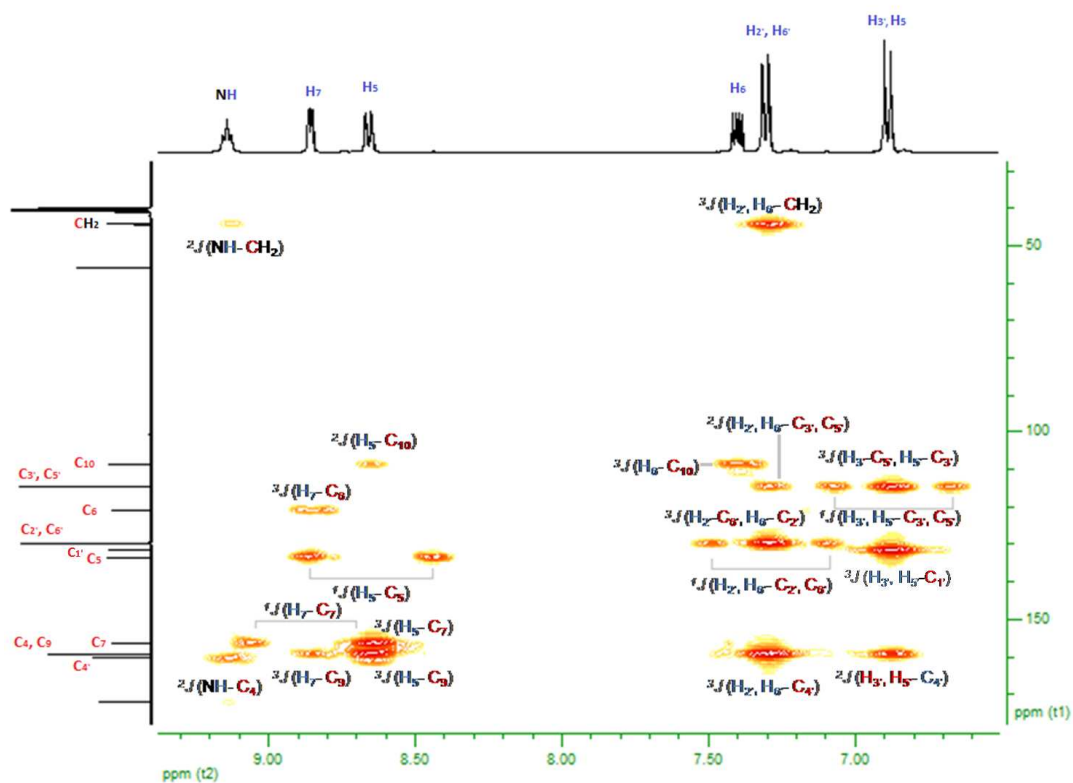


Figura 111: Ampliación de la zona aromática del espectro de RMN 2D-HMBC obtenido para el compuesto I.2.

### 1.3 ESPECTROMETRÍA DE MASAS

El estudio por espectrometría de masas de los compuestos sintetizados ha permitido identificar unos patrones de fragmentación comunes para los derivados de una misma serie.

Se presenta, a continuación, un esquema de fragmentación representativo de los compuestos sintetizados en las series I y II. Se ha comprobado que los parámetros de fragmentación de la molécula son similares aunque los compuestos pertenezcan a series diferentes.

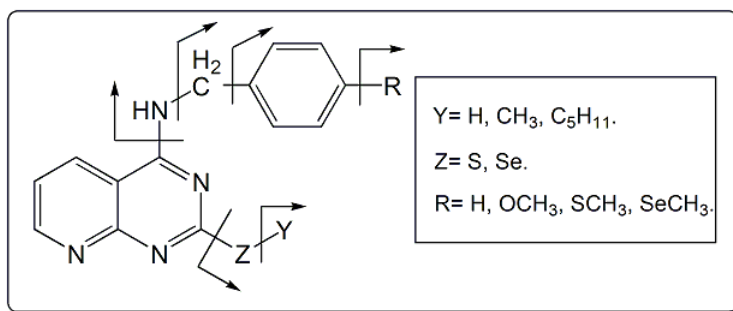


Figura 112: Esquema con las fragmentaciones más representativas encontradas en las series I y II.

En la figura 113 aparece reflejado, a modo de ejemplo, el espectro de masas obtenido para el derivado I.2 en el que aparecen señalados el ión molecular y el pico base.

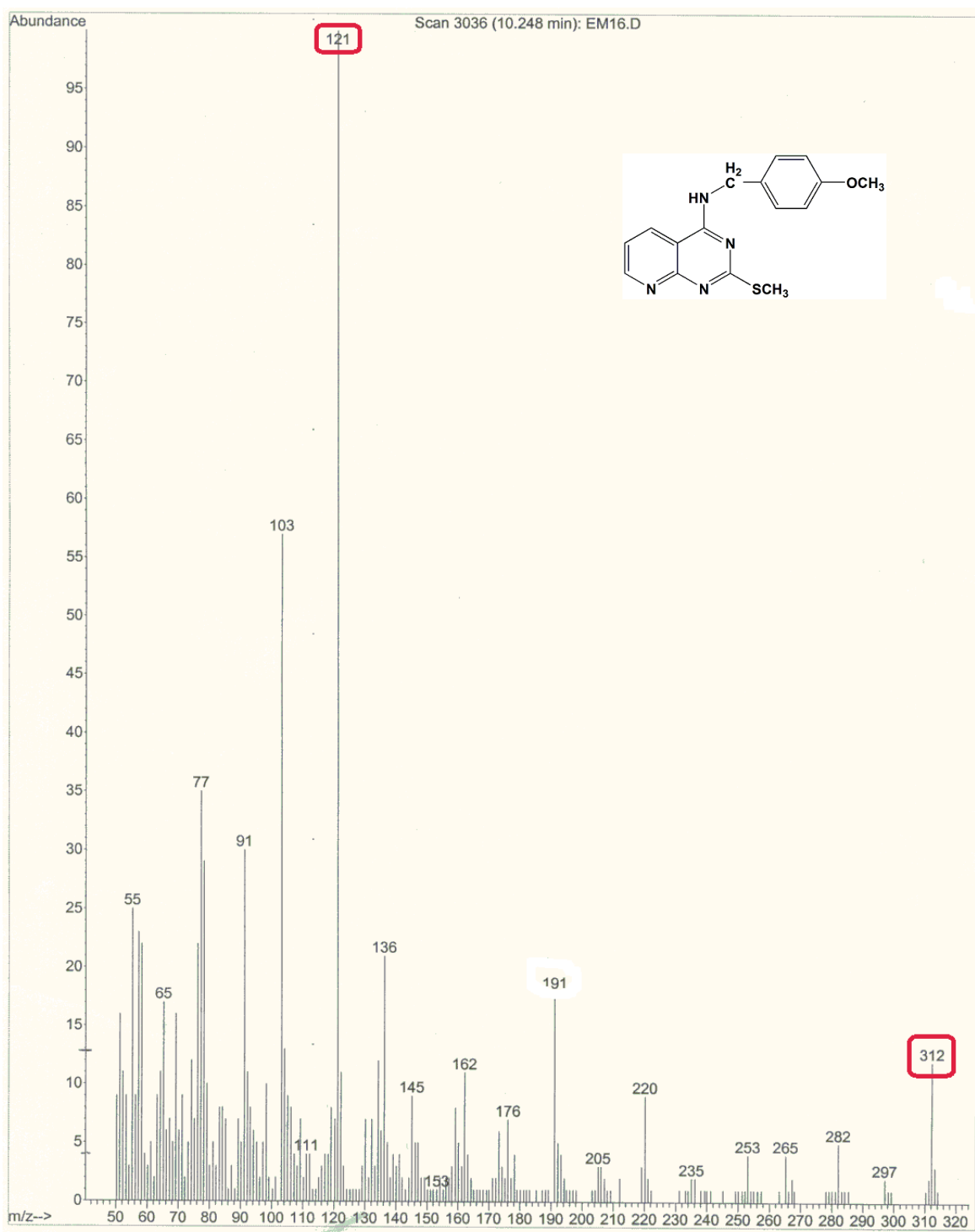


Figura 113: Espectro de masas obtenido para el derivado I.2.

Como ejemplo de espectrometría de masas aparecen las fragmentaciones encontradas para el derivado I.2 (figura 114).

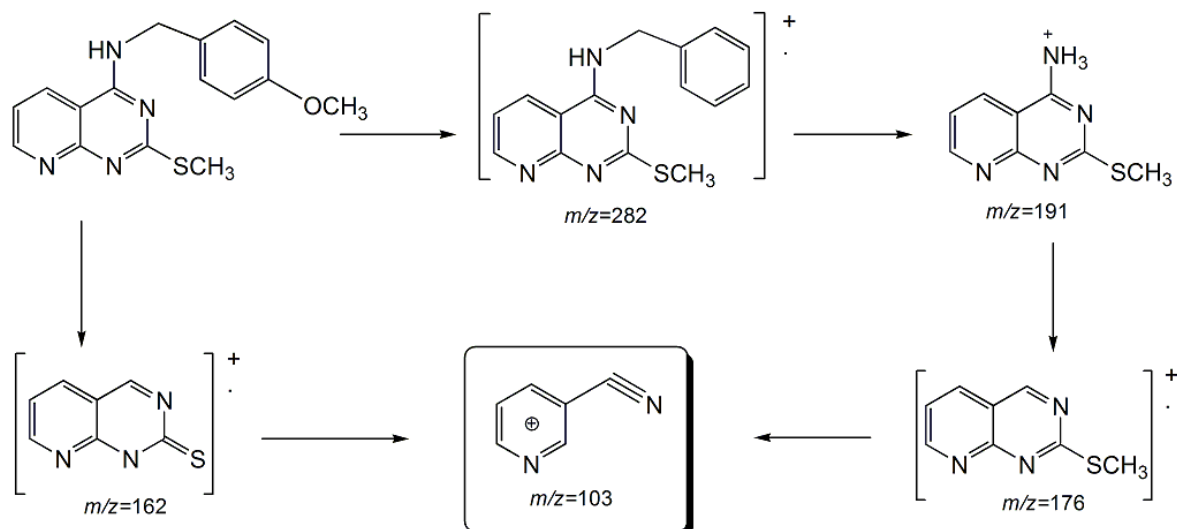


Figura 114: Fragmentaciones encontradas en el experimento de espectrometría de masas para el derivado I.2.

Los fragmentos de mayor abundancia corresponden a los iones de relación  $m/z = 77$ ,  $m/z = 91$  (ión tropilio),  $m/z = 103$  y  $m/z = 121$  (pico base).

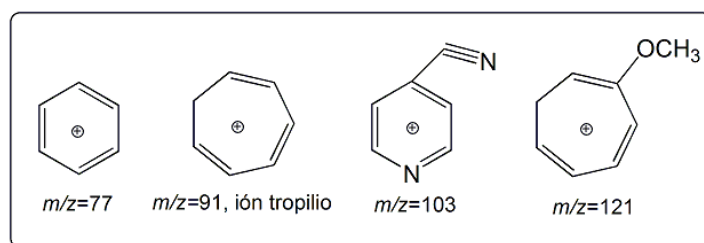


Figura 115: Fragmentos más representativos en la fragmentación del derivado I.2.

## 2. ANÁLISIS INSTRUMENTAL DE LAS SERIES III Y IV

Como ejemplo de los compuestos de las series III y IV, que poseen átomos de azufre o selenio en la posición 2 del anillo de quinazolina, se muestra el derivado III.11 (2-metiltio-4-(4-metilfenil)aminoquinazolina).

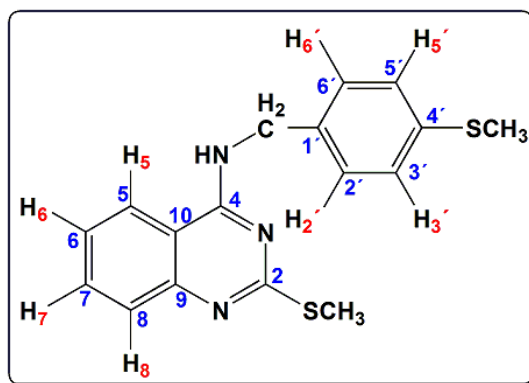


Figura 116: Estructura química del derivado III.11.

## 2.1 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO (IR)

Los compuestos sintetizados de las series III y IV (quinazolinas con azufre o selenio en posición 2) han sido caracterizados por espectroscopia infrarroja (IR) y presentan todos ellos bandas compatibles con sus estructuras y semejantes entre sí. Las más representativas han sido las correspondientes a los números de onda característicos de la tensión de enlace N-H ( $3386\text{-}3204\text{ cm}^{-1}$ ), a los números de onda propios de la tensión de enlace C-H alifáticos ( $2993\text{-}2833\text{ cm}^{-1}$ ) y de la tensión de enlace del esqueleto aromático en conjunto ( $1669\text{-}1549\text{ cm}^{-1}$ ).

En el espectro correspondiente al derivado III.11 (figura 117) aparecen señaladas las bandas más representativas. Estas bandas son:  $3228\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al número de onda propio de la tensión de enlace N-H,  $2926\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al número de onda característico de la tensión de enlace C-H alifáticos y las señales correspondientes al esqueleto aromático en conjunto ( $1602$  y  $1576\text{ cm}^{-1}$ ).

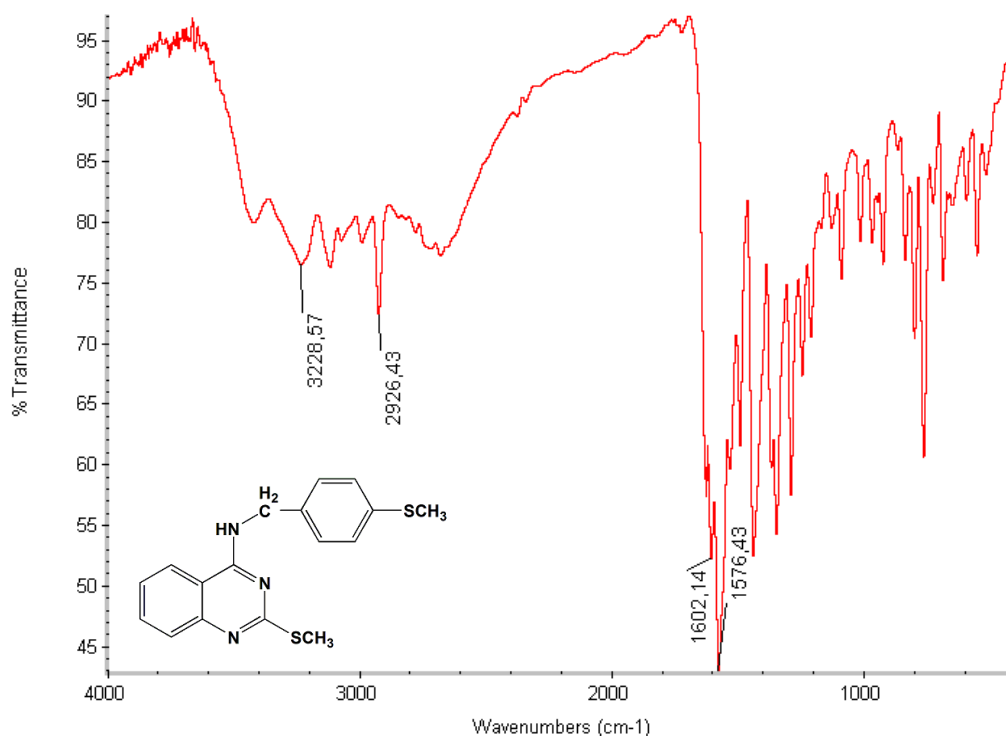


Figura 117: Espectro de IR del derivado III.11.

## 2.2 ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

La elucidación estructural por resonancia magnética nuclear de protón (RMN-<sup>1</sup>H) se ha realizado en una disolución de dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d*<sub>6</sub>). Los derivados presentan señales características para cada serie sintetizada debido a que los entornos magnéticos son comparables para cada compuesto. Además del espectro de resonancia magnética de protón, se han realizado espectros de resonancia magnética nuclear de <sup>13</sup>C (RMN-<sup>13</sup>C) y espectros en



dos dimensiones (RMN 2D-COSY, RMN 2D-HMQC y RMN 2D-HMBC) para corroborar dicha asignación.

A continuación, como ejemplo, se muestra el espectro de resonancia magnética nuclear de protón (RMN-<sup>1</sup>H) obtenido para el compuesto III.11 (2-metiltio-4-(4-metilfencil)aminoquinazolina).

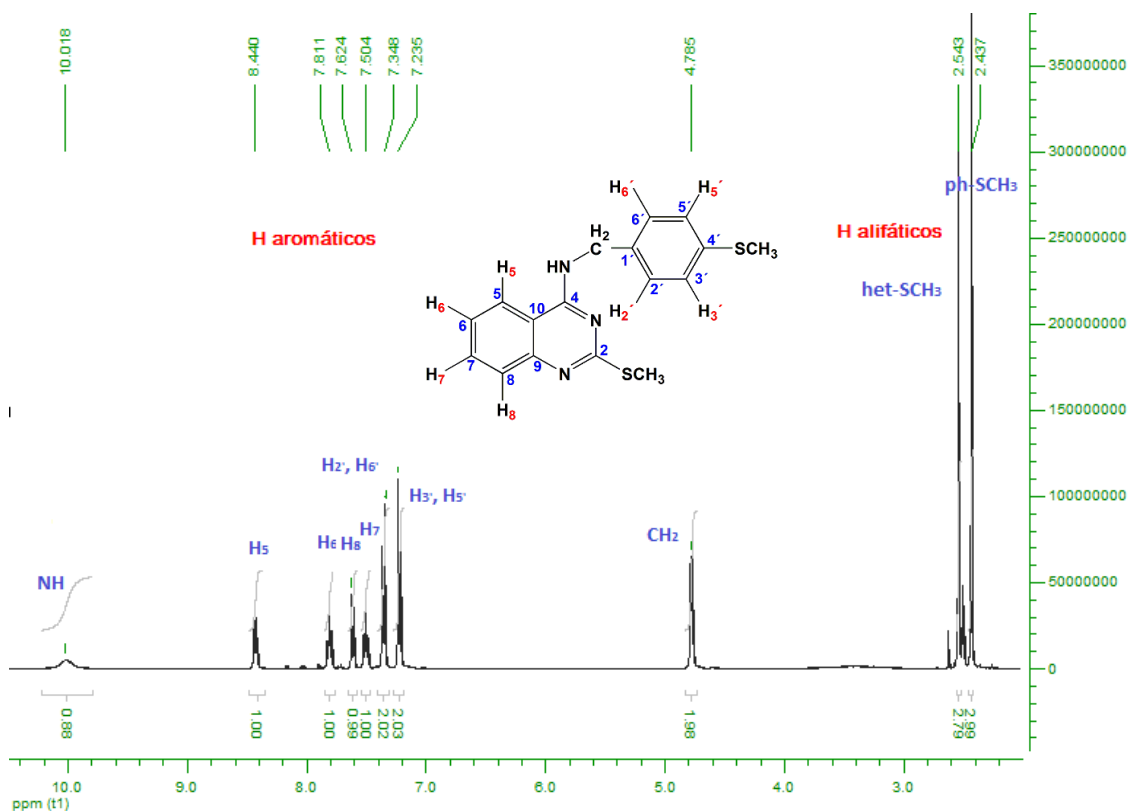


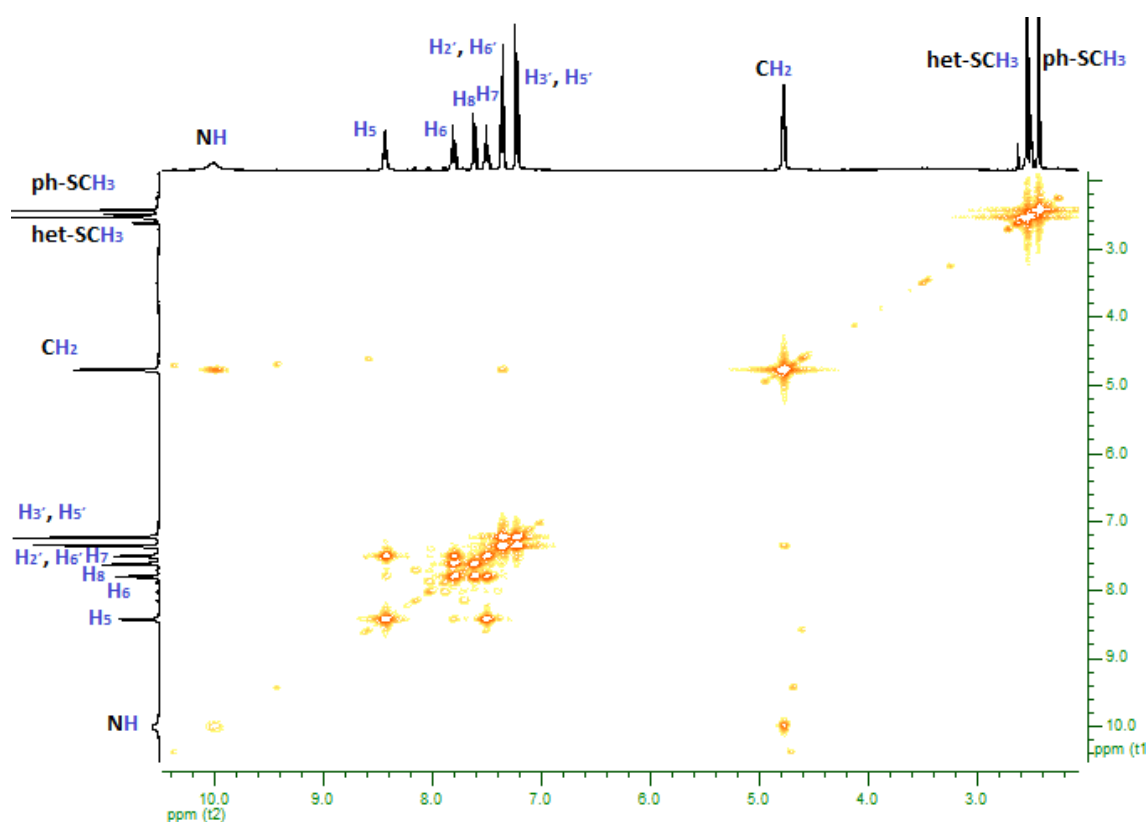
Figura 118: Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto III.11.

En el espectro (figura 118) se observan tres señales en la zona alifática correspondientes a los hidrógenos del grupo Ph-SCH<sub>3</sub> (2,44 ppm) que aparecen como singlete, a los hidrógenos del het-SCH<sub>3</sub> (2,54 ppm) que aparecen como singlete y a los hidrógenos del grupo CH<sub>2</sub> (4,78 ppm). Esta señal aparece como doblete, lo que indica que los hidrógenos del CH<sub>2</sub> se acoplan con el hidrógeno vecinal del grupo NH (10,02 ppm), ya que este hidrógeno aparece como triplete.

En la zona aromática se observan dos señales correspondientes a los hidrógenos del anillo de fenilo. Una señal corresponde a los hidrógenos H<sub>3'</sub> y H<sub>5'</sub> (7,23 ppm) y otra señal a mayor desplazamiento correspondiente a los hidrógenos H<sub>2'</sub> y H<sub>6'</sub> (7,35 ppm). Ambas señales aparecen como doblete porque dichos hidrógenos están acoplados entre sí. El hidrógeno H<sub>7</sub> (7,50 ppm), correspondiente al núcleo de quinazolina, aparece como un doblete, lo que indica que posee hidrógenos vecinales (H<sub>6</sub> y H<sub>8</sub>) con los que se acopla con distinta intensidad (diferentes *J*). El acoplamiento con un hidrógeno vecinal da lugar a un doblete, que se desdobra de nuevo ante la presencia de un segundo hidrógeno vecinal (acoplamiento distinto del

anterior). Lo mismo ocurre, a desplazamientos mayores, con el hidrógeno H<sub>6</sub> (7,81 ppm) que aparece como doblete debido a la presencia de hidrógenos contiguos (H<sub>5</sub> y H<sub>7</sub>). El hidrógeno H<sub>8</sub> (7,62 ppm) aparece como doblete, al igual que el hidrógeno H<sub>5</sub> (8,44 ppm) debido al acoplamiento de ambos con los hidrógenos contiguos. La principal diferencia encontrada en las RMN-<sup>1</sup>H para los derivados de pirido[2,3-*d*]pirimidina (series I y II) con los derivados de quinazolina (series III y IV) ha sido el desplazamiento que sufre el protón H<sub>7</sub>, debido a que su entorno es muy distinto. En un caso está contiguo a un carbono y mientras que en el otro caso se encuentra al lado de un nitrógeno. Esto hace que en los derivados de quinazolina (series III y IV) esta señal parezca en torno a una unidad ppm por debajo. Así, este protón está más apantallado y aparece a campos más altos.

A continuación se muestra el experimento de RMN 2D-COSY en el que quedan reflejados los acoplamientos H-H que se producen en la molécula (figura 119).



**Figura 119:** Espectro de RMN 2D-COSY del compuesto III.11.

Se ha realizado una ampliación de la zona aromática debido a que los principales acoplamientos encontrados aparecen en esta zona (figura 120). Con este experimento queda corroborada la asignación de los protones.

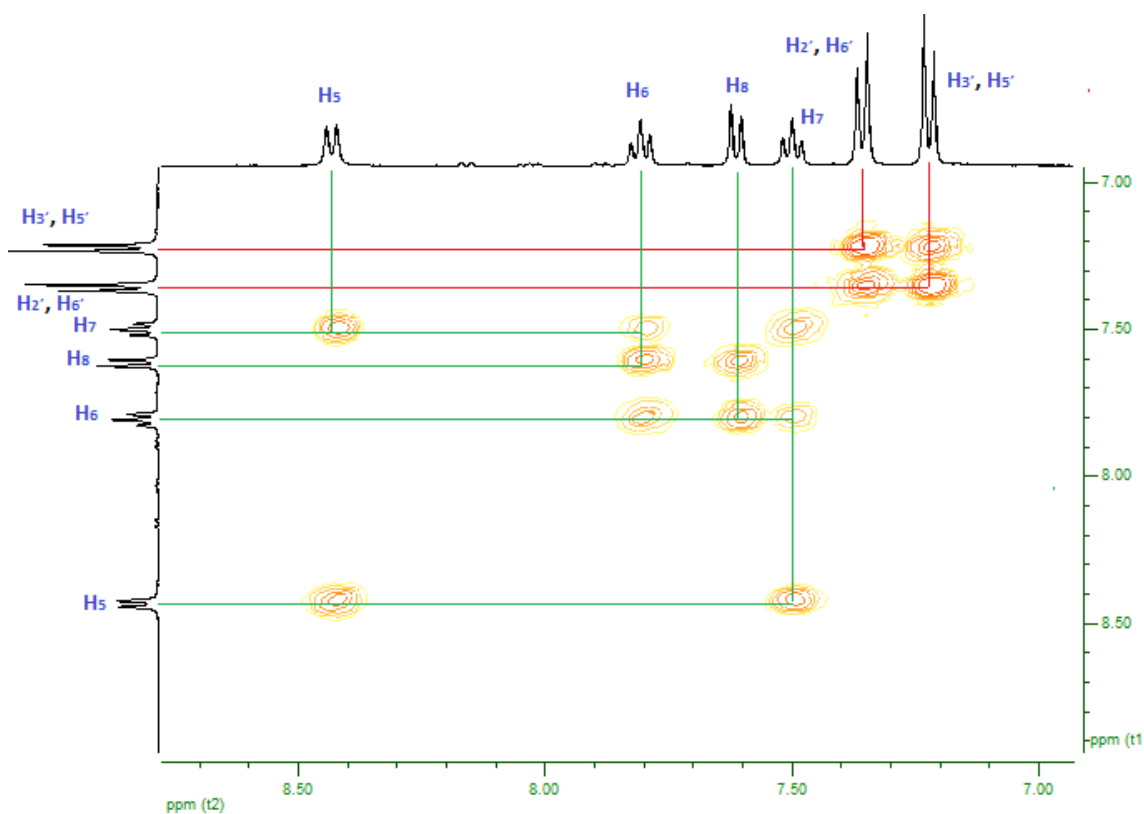


Figura 120: Espectro de RMN 2D-COSY del compuesto III.11 ampliado en la zona aromática.

Los acoplamientos entre hidrógenos del anillo de fenilo (*líneas rojas*) y entre hidrógenos del núcleo de quinazolina (*líneas verdes*) aparecen reflejados en esta ampliación y muestran la correcta asignación de los protones de la molécula.

El espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  muestra las señales correspondientes a los diferentes tipos de carbonos de la molécula (figura 121). En este espectro también se diferencian dos zonas: una aromática y otra alifática. La correcta asignación de dichas señales ha sido posible tras la realización de experimentos de resonancia magnética nuclear en dos dimensiones: RMN 2D-HMQC y RMN 2D-HMBC.

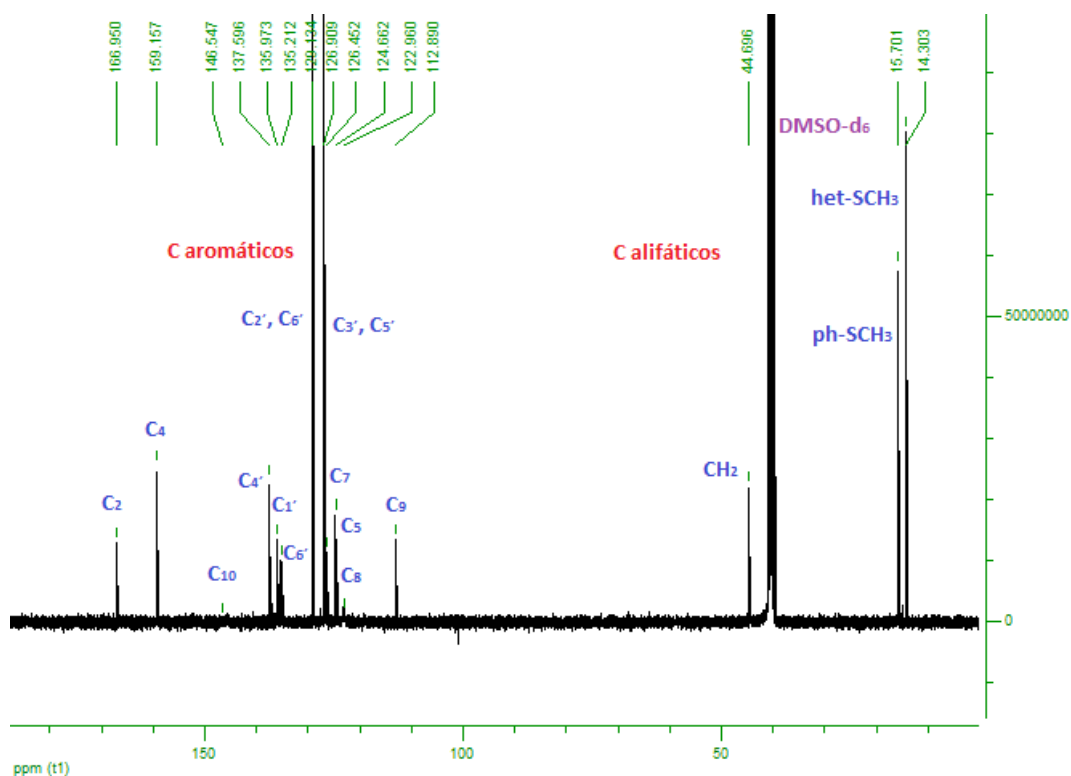


Figura 121: Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto III.11.

El espectro de RMN 2D-HMQC muestra los acoplamientos C-H a un enlace de distancia. Con este espectro (figura 122) se corrobora la asignación correcta de protones.

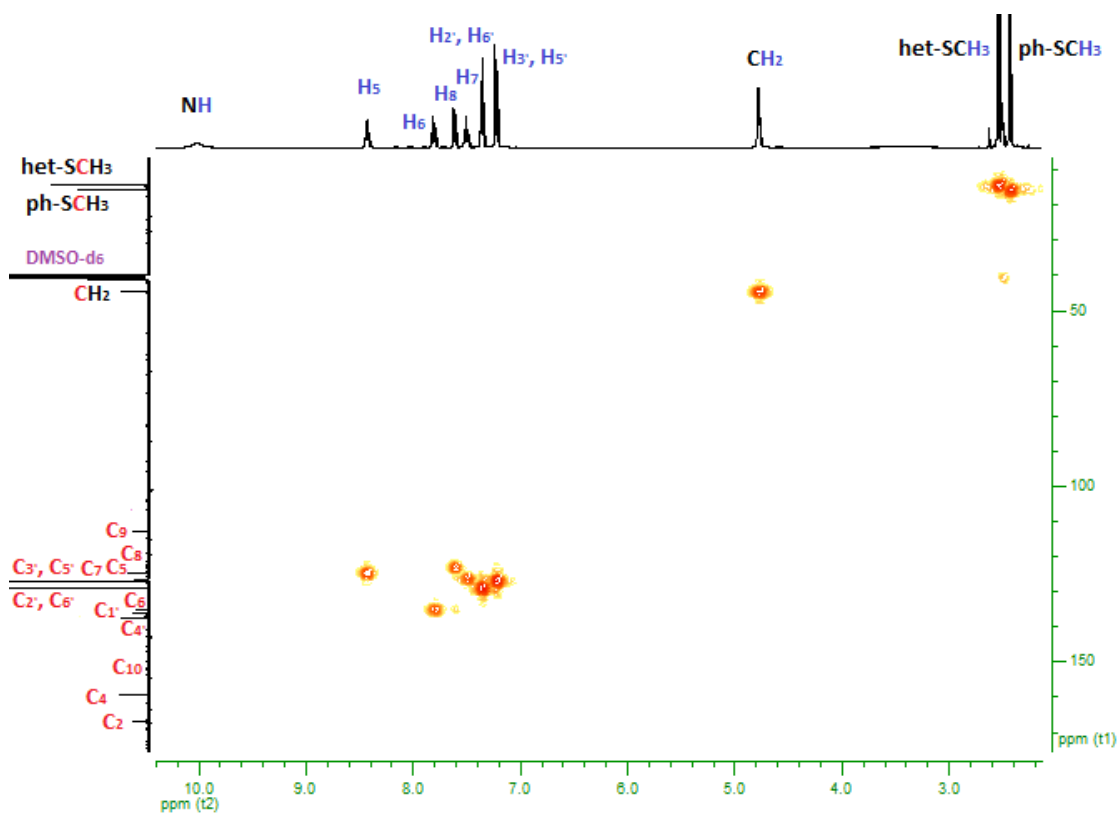


Figura 122: Espectro de RMN 2D-HMQC del compuesto III.11.

A continuación se muestra el espectro de RMN 2D-HMBC para el derivado III.11:

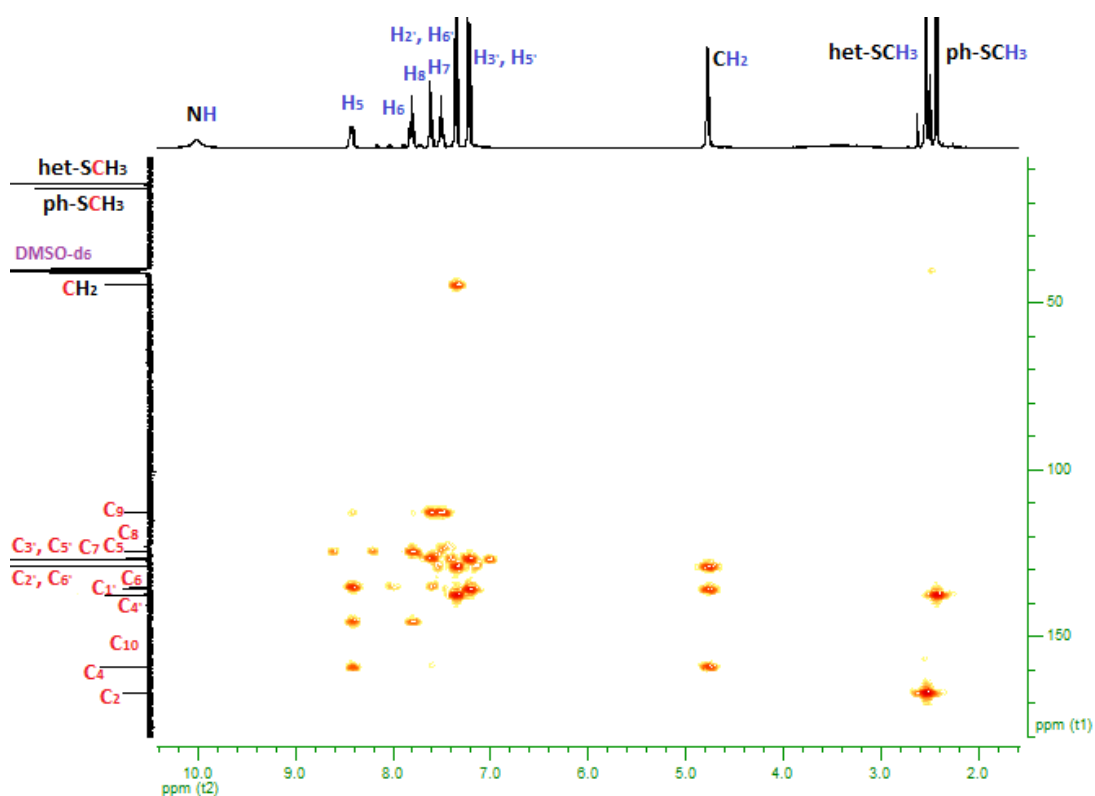


Figura 123: Espectro de RMN 2D-HMBC del compuesto III.11.

Haciendo una ampliación de la zona alifática (figura 124) se observan las señales correspondientes a los acoplamientos entre los C-H (a 2 y 3 enlaces de distancia).

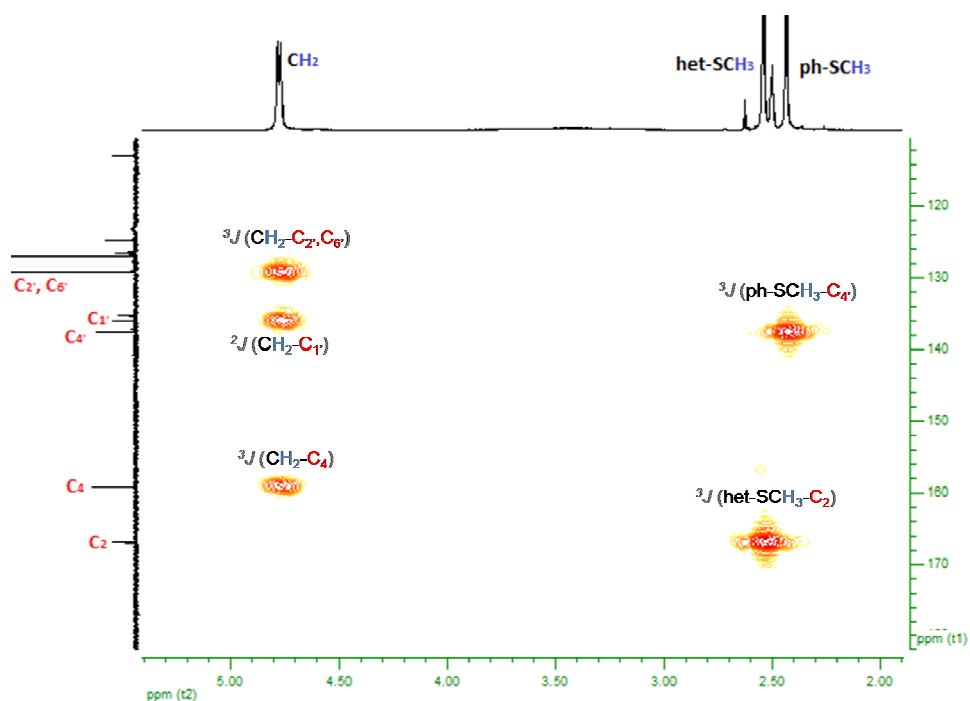


Figura 124: Espectro de RMN 2D-HMBC del compuesto III.11 ampliado en la zona alifática.

En la figura 125 se observa el espectro de RMN 2D-HMBC para la zona aromática con los principales acoplamientos.

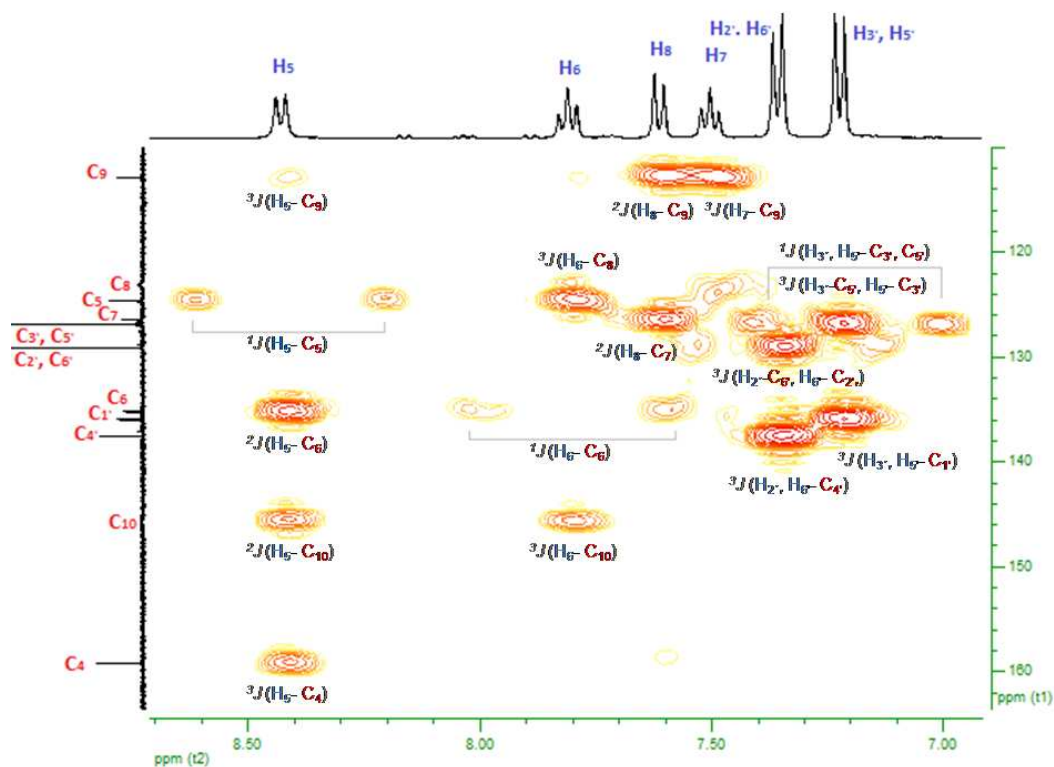


Figura 125: Espectro de RMN 2D-HMBC del compuesto III.11 ampliado en la zona aromática.

### 2.3 ESPECTROMETRÍA DE MASAS

El estudio por espectrometría de masas de los compuestos sintetizados ha permitido identificar unos patrones de fragmentación comunes para los derivados de las series III y IV. Se ha observado que este modo de fragmentación de las moléculas es similar al obtenido para las series I y II, por ello, no se incluye un ejemplo de estos espectros en la Memoria.

# **III. Actividad Biológica**

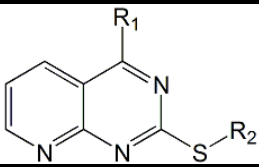




## 1. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD EN PC-3

Los ensayos de citotoxicidad se han llevado a cabo *in vitro* en la línea celular PC-3 (carcinoma de próstata) utilizando la técnica colorimétrica del MTT. Los 57 compuestos de nueva síntesis se han evaluado a diferentes concentraciones (2, 5, 7 y 10  $\mu\text{M}$ ) durante 72 horas determinándose la  $\text{IC}_{50}$  por extrapolación en las curvas dosis-respuesta. A continuación se muestran los resultados obtenidos para los compuestos en las diferentes series.

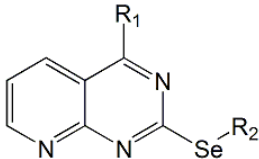
**Tabla 3:** Valores de  $\text{IC}_{50}$  para los compuestos de la serie I en la línea celular PC-3 a 72 horas. (N.C. indica que no tiene efecto citotóxico; a. (Dong, Y., 2003); b. (Li, Q., 2009); c. indica valor determinado experimentalmente en el laboratorio).

			
SERIE I			
PC-3			
COMPUESTO	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	COMPUESTO	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
I.1	N.C.	I.6	>10
I.2	>10	I.7	>10
I.3	<b>3,5</b>	I.8	>10
I.4	N.C.	I.9	>10
I.5	>10	I.10	>10
<b>Etopósido</b>	14 <sup>a</sup>	<b>TPT</b>	<b>4,0<sup>b</sup></b>
<b>MSA</b>	<b>8,4<sup>c</sup></b>		

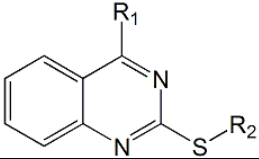
En la tabla 3 se recogen los valores obtenidos de  $\text{IC}_{50}$  en la línea tumoral PC-3 para los derivados de la serie I. De los 10 productos evaluados, el compuesto I.3 presenta mayor efecto citotóxico que los compuestos de referencia utilizados en el tratamiento de cáncer de próstata, siendo cuatro veces más activo que el etopósido, dos veces más activo que el ácido metilselenínico (MSA) y con un efecto citotóxico superior al topotecan (TPT).

En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos para los derivados de la serie II. Se puede observar que de los 8 productos evaluados los compuestos II.6 y II.7 presentan mayor efecto citotóxico que el etopósido, siendo estos derivados tres y cinco veces, respectivamente, más activos. Además, estos compuestos presentan un efecto citotóxico mayor que el ácido metilselenínico (MSA), siendo el derivado II.7 tres veces más activo. En estos ensayos el derivado II.7 ha mostrado mayor actividad *in vitro* que el topotecan (TPT).

**Tabla 4:** Valores de  $IC_{50}$  para los compuestos de la serie II en la línea celular PC-3 a 72 horas. (N.C. indica que no tiene efecto citotóxico; a. (Dong, Y., 2003); b. (Li, Q., 2009); c. indica valor determinado experimentalmente en el laboratorio).

 <p style="text-align: right;"><b>SERIE II</b></p>			
<b>PC-3</b>			
COMPUESTO	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )	COMPUESTO	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )
II.1	N.C.	II.5	>10
II.2	>10	II.6	<b>5,0</b>
II.3	>10	II.7	<b>2,5</b>
II.4	N.C.	II.8	>10
<b>Etopósido</b>	14 <sup>a</sup>	<b>TPT</b>	<b>4,0<sup>b</sup></b>
<b>MSA</b>	<b>8,4<sup>c</sup></b>		

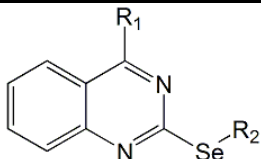
**Tabla 5:** Valores de  $IC_{50}$  para los compuestos de la serie III en la línea celular PC-3 a 72 horas. (N.C. indica que no tiene efecto citotóxico; a. (Dong, Y., 2003); b. (Li, Q., 2009); c. indica valor determinado experimentalmente en el laboratorio).

 <p style="text-align: right;"><b>SERIE III</b></p>					
<b>PC-3</b>					
COMPUESTO	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )	COMPUESTO	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )	COMPUESTO	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )
III.1	<b>10</b>	III.9	>10	III.17	N.C.
III.2	>10	III.10	N.C.	III.18	>10
III.3	>10	III.11	>10	III.19	N.C.
III.4	N.C.	III.12	>10	III.20	N.C.
III.5	>10	III.13	N.C.	III.21	N.C.
III.6	N.C.	III.14	N.C.	III.22	N.C.
III.7	>10	III.15	<b>3,4</b>	III.23	N.C.
III.8	>10	III.16	<b>3,8</b>		
<b>Etopósido</b>	14 <sup>a</sup>	<b>MSA</b>	<b>8,4<sup>c</sup></b>	<b>TPT</b>	<b>4,0<sup>b</sup></b>

En la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos para los derivados de la serie III. Se observa que los derivados más activos en PC-3 son III.1, III.15 y III.16. Los valores de actividad han sido mejores que los del etopósido y, además, III.15 y III.16 han resultado ser más activos que el ácido metilselenínico (MSA) y con una actividad parecida al topotecan (TPT).

En la tabla 6 aparecen reflejados los valores de  $IC_{50}$  obtenidos para los compuestos de la serie IV. Se puede observar que el derivado IV.2 ha resultado más activo que el etopósido, mientras que el derivado IV.14 es el más activo de todos los derivados evaluados con valores de  $IC_{50}$  inferiores a los de los fármacos de referencia, siendo diez veces más potente que el etopósido, seis veces más activo que el ácido metilselenínico (MSA) y tres veces más activo que el topotecan (TPT).

**Tabla 6:** Valores de  $IC_{50}$  para los compuestos de la serie IV en la línea celular PC-3 a 72 horas. (N.C. indica que no tiene efecto citotóxico; n.d. indica que no se tienen datos; a. (Dong, Y., 2003); b. (Li, Q., 2009); c. indica valor determinado experimentalmente en el laboratorio).

			
SERIE IV			
PC-3			
COMPUESTO	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )	COMPUESTO	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )
IV.1	N.C.	IV.9	N.C.
IV.2	9,5	IV.10	N.C.
IV.3	N.C.	IV.11	>10
IV.4	N.C.	IV.12	N.C.
IV.5	>10	IV.13	N.C.
IV.6	N.C.	IV.14	1,3
IV.7	>10	IV.15	n.d.
IV.8	N.C.	IV.16	N.C.
Etopósido	14 <sup>a</sup>	TPT	4,0 <sup>b</sup>
MSA	8,4 <sup>c</sup>		

## 2. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD EN CCRF-CEM, HTB-54, HT-29, MCF-7, 184B5 Y BEAS-2B

Los compuestos de nueva síntesis se han evaluado *in vitro* en las líneas celulares tumorales: CCRF-CEM (leucemia linfoblástica aguda), HTB-54 (adenocarcinoma de pulmón), HT-29 (adenocarcinoma de colon) y MCF-7 (adenocarcinoma de mama). También se han evaluado en dos líneas celulares no tumorales: una derivada de epitelio de mama (184B5) y otra derivada de epitelio bronquial (BEAS-2B). Se ha empleado la técnica colorimétrica del MTT siguiendo la metodología desarrollada por el NCI. La lectura se ha realizado a las 72 horas posteriores a la adición del compuesto en las células. Los datos de  $GI_{50}$ , TGI y  $LD_{50}$  se calculan por extrapolación en las curvas dosis-respuesta obtenidas para cada compuesto.

2.1 RESULTADOS DE CITOTOXICIDAD OBTENIDOS PARA LAS DISTINTAS SERIES EN CCRF-CEM, HTB-54, HT-29, MCF-7, 184B5 Y BEAS-2B

A continuación, se muestran los datos de citotoxicidad obtenidos en las distintas líneas celulares para los compuestos de la serie I.

Tabla 7: Parámetros citotóxicos para los compuestos de la serie I en diferentes líneas celulares a 72 horas. (n.d. indica que no se tienen datos). Los valores de los diferentes fármacos quimioterápicos se extraen del programa DTP del NCI.

SERIE I							
COMPUESTO	PÁRAMETROS CITOTÓXICOS	LÍNEAS CELULARES					
		CCRF-CEM	HTB-54	HT-29	MCF-7	184B5	BEAS-2B
I.1	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	56	5,1	87	39	49	26
	<i>TGI</i> (μM)	98	52	>100	>100	>100	62
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	>100	>100	>100	>100	>100	97
I.2	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	>100	>100	>100	48	34	58
	<i>TGI</i> (μM)	>100	>100	>100	>100	70	>100
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	>100	>100	>100	>100	>100	>100
I.3	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	5,3	3,3	4,3	0,05	0,2	0,6
	<i>TGI</i> (μM)	17	15	7,0	4,4	1,1	3,8
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	59	64	9,7	9,1	5,6	8,5
I.4	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	>100	>100	64	49	>100	>100
	<i>TGI</i> (μM)	>100	>100	>100	>100	>100	>100
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	>100	>100	>100	>100	>100	>100
I.5	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	99	15	25	53	48	19
	<i>TGI</i> (μM)	>100	54	81	>100	>100	60
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	>100	93	>100	>100	>100	>100
I.6	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	84	>100	>100	75	68	42
	<i>TGI</i> (μM)	98	>100	>100	>100	>100	>100
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	>100	>100	>100	>100	>100	>100
I.7	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	99	54	56	76	54	6,7
	<i>TGI</i> (μM)	>100	>100	>100	>100	>100	>100
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	>100	>100	>100	>100	>100	>100
I.8	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	>100	>100	n.d.	89	71	n.d.
	<i>TGI</i> (μM)	>100	>100	n.d.	>100	>100	n.d.
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	>100	>100	n.d.	>100	>100	n.d.
I.9	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	>100	23	>100	80	>100	70
	<i>TGI</i> (μM)	>100	>100	>100	>100	>100	>100
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	>100	>100	>100	>100	>100	>100
I.10	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	>100	>100	>100	76	>100	>100
	<i>TGI</i> (μM)	>100	>100	>100	>100	>100	>100
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Doxorrubicina	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	0,03	n.d.	0,2	0,01	n.d.	n.d.
	<i>TGI</i> (μM)	1,6	n.d.	6,3	5,0	n.d.	n.d.
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	20	n.d.	>25	20	n.d.	n.d.
Camptotecina	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	0,01	n.d.	0,05	0,01	n.d.	n.d.
	<i>TGI</i> (μM)	0,02	n.d.	0,8	0,2	n.d.	n.d.
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	63	n.d.	32	>100	n.d.	n.d.
Etopósido	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	12	n.d.	32	20	n.d.	n.d.
	<i>TGI</i> (μM)	50	n.d.	>100	>100	n.d.	n.d.
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	>100	n.d.	>100	>100	n.d.	n.d.

**Tabla 7 continuación:** Parámetros citotóxicos para los compuestos de la serie I en diferentes líneas celulares a 72 horas. (n.d. indica que no se tienen datos). Los valores de los diferentes fármacos quimioterápicos se extraen del programa DTP del NCI.

SERIE I							
COMPUESTO	PÁRAMETROS CITOTÓXICOS	LÍNEAS CELULARES					
		CCRF-CEM	HTB-54	HT-29	MCF-7	184B5	BEAS-2B
Taxol	$GI_{50}$ ( $\mu M$ )	0,003	n.d.	0,002	0,003	n.d.	n.d.
	$TGI$ ( $\mu M$ )	20	n.d.	0,2	16	n.d.	n.d.
	$LD_{50}$ ( $\mu M$ )	>100	n.d.	79	>100	n.d.	n.d.
Cis-platino	$GI_{50}$ ( $\mu M$ )	1,0	n.d.	7,9	3,2	n.d.	n.d.
	$TGI$ ( $\mu M$ )	79	n.d.	>100	>100	n.d.	n.d.
	$LD_{50}$ ( $\mu M$ )	>100	n.d.	>100	>100	n.d.	n.d.
Metotrexato	$GI_{50}$ ( $\mu M$ )	0,03	n.d.	0,04	0,06	n.d.	n.d.
	$TGI$ ( $\mu M$ )	>100	n.d.	>100	>100	n.d.	n.d.
	$LD_{50}$ ( $\mu M$ )	>100	n.d.	>100	>100	n.d.	n.d.

De los 10 compuestos evaluados en la serie I, el derivado I.1 muestra un valor de  $GI_{50} < 10 \mu M$  en HTB-54. El cociente entre los parámetros citotóxicos observados en BEAS-2B y los obtenidos en HTB-54 pueden considerarse como una medida de la selectividad del compuesto (*índice terapéutico*). Valores entre 3 y 6 se consideran como selectividad moderada, mientras que valores por encima de 6 son altamente selectivos (Acton, E.M., 1994). El compuesto I.1 muestra, por lo tanto, una selectividad moderada ( $GI_{50 \text{ BEAS-2B}}/GI_{50 \text{ HTB-54}}=5,1$ ). El derivado I.3 es el más activo de todos los compuestos de la serie I evaluados, con una  $GI_{50} < 5,5 \mu M$  en todas las líneas celulares ensayadas. En la línea celular CCRF-CEM este derivado tiene unos parámetros de  $GI_{50}$ ,  $TGI$  y  $LD_{50}$  mejores que el etopósido. Además, tiene unos valores de  $TGI$  y  $LD_{50}$  más activos que los fármacos de referencia taxol, cis-platino y metotrexato. En HT-29 y MCF-7 muestra valores de  $GI_{50}$ ,  $TGI$  y  $LD_{50} < 10 \mu M$  siendo más activo que el taxol y el etopósido, aunque su selectividad es baja.

Los datos de citotoxicidad obtenidos para los derivados de la serie II aparecen reflejados en la tabla 8. Se puede observar que los derivados más activos han sido los compuestos II.1, II.2, II.5 y II.6. Tres de estos derivados (II.1, II.5 y II.6) tienen valores de  $GI_{50} < 10 \mu M$  en HTB-54. Además, el compuesto II.6 presenta un valor de  $TGI < 10 \mu M$  en HTB-54. Los compuestos II.2 y II.5 muestran valores de citotoxicidad en HT-29 mejores que el etopósido y el cis-platino, siendo 5 veces más activos que el etopósido. En la línea celular MCF-7 los derivados II.2 y II.6 se muestran más activos que el etopósido, con una  $GI_{50}$  600 veces menor en el caso del derivado II.2. Se ha observado que este derivado muestra mejor actividad en MCF-7 que taxol, cis-platino y metotrexato, teniendo el cis-platino una  $GI_{50}$  entorno a 100 veces superior al derivado II.2. Además, el derivado II.6 muestra toxicidad en HTB-54, con valores de  $GI_{50}$  y  $TGI$  por debajo de  $10 \mu M$  y una  $LD_{50}$  de  $68 \mu M$ .

**Tabla 8:** Parámetros citotóxicos para los compuestos de la serie II en diferentes líneas celulares a 72 horas. (n.d. indica que no se tienen datos). Los valores de los diferentes fármacos quimioterápicos se extraen del programa DTP del NCI.

SERIE II							
COMPUESTO	PARÁMETROS CITOTÓXICOS	LÍNEAS CELULARES					
		CCRF-CEM	HTB-54	HT-29	MCF-7	184B5	BEAS-2B
II.1	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	29	<b>6,0</b>	21	28	<b>15</b>	4,1
	<i>TGI</i> (μM)	58	33	44	62	<b>45</b>	<b>33</b>
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	87	66	68	95	<b>75</b>	<b>70</b>
II.2	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	30	69	<b>6,3</b>	<b>0,03</b>	3,7	8,4
	<i>TGI</i> (μM)	69	>100	33	>100	9,1	<b>&gt;100</b>
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	>100	>100	>100	>100	<b>&gt;100</b>	<b>&gt;100</b>
II.3	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	31	44	36	37	5,2	5,9
	<i>TGI</i> (μM)	61	96	89	>100	<b>31</b>	<b>88</b>
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	92	>100	>100	>100	<b>75</b>	<b>&gt;100</b>
II.4	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	68	78	44	43	<b>45</b>	<b>40</b>
	<i>TGI</i> (μM)	>100	>100	77	>100	<b>87</b>	<b>91</b>
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	>100	>100	>100	>100	<b>&gt;100</b>	<b>&gt;100</b>
II.5	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	14	<b>8,8</b>	<b>5,9</b>	23	<b>10</b>	<b>16</b>
	<i>TGI</i> (μM)	43	51	20	54	<b>40</b>	<b>45</b>
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	73	98	62	85	<b>70</b>	<b>73</b>
II.6	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	n.d.	<b>4,0</b>	n.d.	<b>9,8</b>	0,7	n.d.
	<i>TGI</i> (μM)	n.d.	<b>7,9</b>	n.d.	46	8,3	n.d.
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	n.d.	68	n.d.	83	<b>67</b>	n.d.
II.7	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	<i>TGI</i> (μM)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
II.8	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	>100	15	>100	41	<b>53</b>	<b>&gt;100</b>
	<i>TGI</i> (μM)	>100	60	>100	68	<b>&gt;100</b>	<b>&gt;100</b>
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	>100	>100	>100	95	<b>&gt;100</b>	<b>&gt;100</b>
Doxorrubicina	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	<b>0,03</b>	n.d.	<b>0,2</b>	<b>0,01</b>	n.d.	n.d.
	<i>TGI</i> (μM)	<b>1,6</b>	n.d.	<b>6,3</b>	<b>5,0</b>	n.d.	n.d.
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	20	n.d.	>25	20	n.d.	n.d.
Camptotecina	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	<b>0,01</b>	n.d.	<b>0,05</b>	<b>0,01</b>	n.d.	n.d.
	<i>TGI</i> (μM)	<b>0,02</b>	n.d.	<b>0,8</b>	<b>0,2</b>	n.d.	n.d.
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	63	n.d.	32	>100	n.d.	n.d.
Etopósido	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	12	n.d.	32	20	n.d.	n.d.
	<i>TGI</i> (μM)	50	n.d.	>100	>100	n.d.	n.d.
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	>100	n.d.	>100	>100	n.d.	n.d.
Taxol	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	<b>0,003</b>	n.d.	<b>0,002</b>	<b>0,003</b>	n.d.	n.d.
	<i>TGI</i> (μM)	20	n.d.	<b>0,2</b>	16	n.d.	n.d.
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	>100	n.d.	79	>100	n.d.	n.d.
Cis-platino	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	<b>1,0</b>	n.d.	<b>7,9</b>	<b>3,2</b>	n.d.	n.d.
	<i>TGI</i> (μM)	79	n.d.	>100	>100	n.d.	n.d.
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	>100	n.d.	>100	>100	n.d.	n.d.
Metotrexato	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	<b>0,03</b>	n.d.	<b>0,04</b>	<b>0,06</b>	n.d.	n.d.
	<i>TGI</i> (μM)	>100	n.d.	>100	>100	n.d.	n.d.
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	>100	n.d.	>100	>100	n.d.	n.d.

En la tabla 9 se muestran los valores de citotoxicidad obtenidos en las distintas líneas celulares para los derivados de la serie III.

Tabla 9: Parámetros citotóxicos para los compuestos de la serie III en diferentes líneas celulares a 72 horas. (n.d. indica que no se tienen datos). Los valores de los diferentes fármacos quimioterápicos se extraen del programa DTP del NCI.

SERIE III							
COMPUESTO	PARÁMETROS CITOTÓXICOS	LÍNEAS CELULARES					
		CCRF-CEM	HTB-54	HT-29	MCF-7	184B5	BEAS-2B
III.1	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	82	15	10	27	49	66
	<i>TGI</i> (μM)	>100	60	63	>100	>100	>100
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	>100	>100	>100	>100	>100	>100
III.2	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	10	13	6,5	7,1	7,8	6,1
	<i>TGI</i> (μM)	41	45	28	36	36	32
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	72	77	64	78	69	70
III.3	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	n.d.	>100	n.d.	54	>100	n.d.
	<i>TGI</i> (μM)	n.d.	>100	n.d.	>100	>100	n.d.
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	n.d.	>100	n.d.	>100	>100	n.d.
III.4	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	52	30	74	7,8	98	51
	<i>TGI</i> (μM)	86	>100	>100	81	>100	>100
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	>100	>100	>100	>100	>100	>100
III.5	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	75	56	66	78	>100	55
	<i>TGI</i> (μM)	>100	>100	>100	>100	>100	>100
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	>100	>100	>100	>100	>100	>100
III.6	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	88	38	36	41	29	39
	<i>TGI</i> (μM)	>100	>100	>100	>100	>100	88
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	>100	>100	>100	>100	>100	>100
III.7	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	33	50	29	80	8,3	42
	<i>TGI</i> (μM)	73	91	87	>100	47	95
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	>100	>100	>100	>100	88	>100
III.8	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	39	51	20	78	6,7	73
	<i>TGI</i> (μM)	88	>100	89	>100	>100	>100
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	>100	>100	>100	>100	>100	>100
III.9	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	47	>100	>100	32	28	6,8
	<i>TGI</i> (μM)	>100	>100	>100	64	53	>100
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	>100	>100	>100	96	79	>100
III.10	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	94	51	70	31	86	22
	<i>TGI</i> (μM)	>100	>100	>100	85	>100	96
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	>100	>100	>100	96	>100	>100
III.11	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	>100	7,2	35	47	22	23
	<i>TGI</i> (μM)	>100	44	>100	>100	>100	59
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	>100	89	>100	>100	>100	95
III.12	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	63	57	>100	36	70	73
	<i>TGI</i> (μM)	>100	>100	>100	>100	>100	>100
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	>100	>100	>100	>100	>100	>100
III.13	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	>100	20	39	13	73	46
	<i>TGI</i> (μM)	>100	50	>100	75	>100	>100
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	>100	80	>100	>100	>100	>100
III.14	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	>100	31	>100	62	50	40
	<i>TGI</i> (μM)	>100	71	>100	>100	>100	99
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	>100	>100	>100	>100	>100	>100
III.15	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	1,3	4,8	3,8	83	1,7	4,0
	<i>TGI</i> (μM)	7,9	23	7,6	>100	45	9,0
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	61	>100	96	>100	>100	55

**Tabla 9 continuación:** Parámetros citotóxicos para los compuestos de la serie III en diferentes líneas celulares a 72 horas. (n.d. indica que no se tienen datos). Los valores de los diferentes fármacos quimioterápicos se extraen del programa DTP del NCI.

SERIE III							
COMPUESTO	PÁRAMETROS CITOTÓXICOS	LÍNEAS CELULARES					
		CCRF-CEM	HTB-54	HT-29	MCF-7	184B5	BEAS-2B
III.16	<i>GI<sub>50</sub></i> ( $\mu$ M)	<b>8,6</b>	<b>9,2</b>	15	31	8,7	8,0
	<i>TGI</i> ( $\mu$ M)	42	46	47	62	<b>39</b>	<b>38</b>
	<i>LD<sub>50</sub></i> ( $\mu$ M)	78	85	80	89	<b>72</b>	<b>73</b>
III.17	<i>GI<sub>50</sub></i> ( $\mu$ M)	46	<b>7,9</b>	28	<b>5,9</b>	<b>27</b>	5,8
	<i>TGI</i> ( $\mu$ M)	74	60	83	76	<b>53</b>	<b>46</b>
	<i>LD<sub>50</sub></i> ( $\mu$ M)	>100	>100	>100	>100	<b>80</b>	<b>&gt;100</b>
III.18	<i>GI<sub>50</sub></i> ( $\mu$ M)	72	<b>4,6</b>	46	<b>0,9</b>	<b>21</b>	4,0
	<i>TGI</i> ( $\mu$ M)	>100	44	>100	25	<b>&gt;100</b>	<b>55</b>
	<i>LD<sub>50</sub></i> ( $\mu$ M)	>100	>100	>100	>100	<b>&gt;100</b>	<b>&gt;100</b>
III.19	<i>GI<sub>50</sub></i> ( $\mu$ M)	>100	96	60	74	<b>49</b>	<b>65</b>
	<i>TGI</i> ( $\mu$ M)	>100	>100	>100	>100	<b>&gt;100</b>	<b>&gt;100</b>
	<i>LD<sub>50</sub></i> ( $\mu$ M)	>100	>100	>100	>100	<b>&gt;100</b>	<b>&gt;100</b>
III.20	<i>GI<sub>50</sub></i> ( $\mu$ M)	48	>100	86	15	<b>79</b>	<b>10</b>
	<i>TGI</i> ( $\mu$ M)	86	>100	>100	65	<b>&gt;100</b>	<b>&gt;100</b>
	<i>LD<sub>50</sub></i> ( $\mu$ M)	>100	>100	>100	>100	<b>&gt;100</b>	<b>&gt;100</b>
III.21	<i>GI<sub>50</sub></i> ( $\mu$ M)	73	26	20	31	<b>63</b>	<b>29</b>
	<i>TGI</i> ( $\mu$ M)	>100	>100	>100	70	<b>&gt;100</b>	<b>&gt;100</b>
	<i>LD<sub>50</sub></i> ( $\mu$ M)	>100	>100	>100	>100	<b>&gt;100</b>	<b>&gt;100</b>
III.22	<i>GI<sub>50</sub></i> ( $\mu$ M)	92	19	56	19	<b>65</b>	<b>58</b>
	<i>TGI</i> ( $\mu$ M)	>100	>100	>100	64	<b>&gt;100</b>	<b>&gt;100</b>
	<i>LD<sub>50</sub></i> ( $\mu$ M)	>100	>100	>100	>100	<b>&gt;100</b>	<b>&gt;100</b>
III.23	<i>GI<sub>50</sub></i> ( $\mu$ M)	55	>100	>100	49	<b>&gt;100</b>	<b>&gt;100</b>
	<i>TGI</i> ( $\mu$ M)	>100	>100	>100	92	<b>&gt;100</b>	<b>&gt;100</b>
	<i>LD<sub>50</sub></i> ( $\mu$ M)	>100	>100	>100	>100	<b>&gt;100</b>	<b>&gt;100</b>
Doxorrubicina	<i>GI<sub>50</sub></i> ( $\mu$ M)	<b>0,03</b>	n.d.	<b>0,2</b>	<b>0,01</b>	n.d.	n.d.
	<i>TGI</i> ( $\mu$ M)	<b>1,6</b>	n.d.	<b>6,3</b>	<b>5,0</b>	n.d.	n.d.
	<i>LD<sub>50</sub></i> ( $\mu$ M)	20	n.d.	>25	20	n.d.	n.d.
Camptotecina	<i>GI<sub>50</sub></i> ( $\mu$ M)	<b>0,01</b>	n.d.	<b>0,05</b>	<b>0,01</b>	n.d.	n.d.
	<i>TGI</i> ( $\mu$ M)	<b>0,02</b>	n.d.	<b>0,8</b>	<b>0,2</b>	n.d.	n.d.
	<i>LD<sub>50</sub></i> ( $\mu$ M)	63	n.d.	32	>100	n.d.	n.d.
Etopósido	<i>GI<sub>50</sub></i> ( $\mu$ M)	12	n.d.	32	20	n.d.	n.d.
	<i>TGI</i> ( $\mu$ M)	50	n.d.	>100	>100	n.d.	n.d.
	<i>LD<sub>50</sub></i> ( $\mu$ M)	>100	n.d.	>100	>100	n.d.	n.d.
Taxol	<i>GI<sub>50</sub></i> ( $\mu$ M)	<b>0,003</b>	n.d.	<b>0,002</b>	<b>0,003</b>	n.d.	n.d.
	<i>TGI</i> ( $\mu$ M)	20	n.d.	<b>0,2</b>	16	n.d.	n.d.
	<i>LD<sub>50</sub></i> ( $\mu$ M)	>100	n.d.	79	>100	n.d.	n.d.
Cis-platino	<i>GI<sub>50</sub></i> ( $\mu$ M)	<b>1,0</b>	n.d.	<b>7,9</b>	<b>3,2</b>	n.d.	n.d.
	<i>TGI</i> ( $\mu$ M)	79	n.d.	>100	>100	n.d.	n.d.
	<i>LD<sub>50</sub></i> ( $\mu$ M)	>100	n.d.	>100	>100	n.d.	n.d.
Metotrexato	<i>GI<sub>50</sub></i> ( $\mu$ M)	<b>0,03</b>	n.d.	<b>0,04</b>	<b>0,06</b>	n.d.	n.d.
	<i>TGI</i> ( $\mu$ M)	>100	n.d.	>100	>100	n.d.	n.d.
	<i>LD<sub>50</sub></i> ( $\mu$ M)	>100	n.d.	>100	>100	n.d.	n.d.



Se observa que los compuestos más activos en CCRF-CEM son III.15 y III.16 con valores de  $GI_{50}$ , TGI y  $LD_{50}$  más activos que los del etopósido (el derivado III.15 posee una  $GI_{50}$  10 veces inferior). El compuesto III.15 ha mostrado actividad citostática en HTB-54 y MCF-7. La línea celular más sensible a esta serie ha sido HTB-54. De los 23 compuestos evaluados, los derivados III.11, III.15, III.16, III.17 y III.18 muestran valores de  $GI_{50} < 10 \mu M$  en HTB-54. La línea celular MCF-7 se ha mostrado sensible a los derivados III.2, III.4, III.17 y III.18, con valores de  $GI_{50} < 10 \mu M$  para todos ellos. Además, los compuestos III.2, III.4 y III.17 poseen parámetros citotóxicos mejores que el etopósido y el derivado III.18 posee valores de  $GI_{50}$  3 y 22 veces más bajas que el cis-platino y el etopósido, respectivamente. Como se puede observar en la tabla 9, los derivados III.4 y III.18 muestran una alta selectividad por la línea tumoral de mama MCF-7 frente a la no tumoral 184B5 ( $GI_{50 \text{ 184B5}}/GI_{50 \text{ MCF-7}}=12,5$  para III.4 y  $GI_{50 \text{ 184B5}}/GI_{50 \text{ MCF-7}}=23,1$  para III.18), con índices terapéuticos por encima de 6, por lo que se consideran muy selectivos.

La actividad biológica mostrada por los derivados III.15 y III.16 (sales de selenito) puede ser debida no exclusivamente a la estructura química de las moléculas sino a la presencia del propio selenito que, intracelularmente, puede transformarse en selenol mostrando, por sí mismo, actividad citotóxica.

En la tabla 10 se muestran los valores de citotoxicidad obtenidos en las distintas líneas celulares para los derivados de la serie VI. De los 16 compuestos evaluados, el más activo ha resultado ser el compuesto IV.14, que ha mostrado actividad citotóxica en todas las líneas celulares ensayadas. Este compuesto es más activo en la línea celular CCRF-CEM que en el resto de líneas ensayadas, con valores de  $GI_{50}$ , TGI y  $LD_{50} < 10 \mu M$  en todos los casos. Además, posee una  $GI_{50}$  inferior a la mostrada por los fármacos de referencia doxorrubicina y camptotecina y unos valores de TGI y  $LD_{50}$  inferiores al etopósido, taxol, cis-platino y metotrexato. En HTB-54, los derivados IV.2, IV.4, IV.11 y IV.14 presentan valores de  $GI_{50} < 10 \mu M$ . Además, IV.2 y IV.11 poseen una  $TGI < 10 \mu M$  y  $LD_{50} > 75 \mu M$ , por lo que pueden considerarse antiproliferativos. El derivado IV.4 ha sido el más selectivo en la línea celular HTB-54 frente a la línea celular no tumoral BEAS-2B ( $GI_{50 \text{ BEAS-2B}}/GI_{50 \text{ HTB-54}}=5,3$ ). De los derivados evaluados en HT-29, los que han mostrado un mayor efecto citotóxico han sido IV.14 y IV.15 con valores de  $GI_{50} < 10 \mu M$ . Ambos han mostrado valores de  $GI_{50}$ , TGI y  $LD_{50}$  inferiores al etopósido y valores de TGI y  $LD_{50}$  inferiores al cis-platino y metotrexato. La línea celular MCF-7 ha resultado la más sensible, con valores de  $GI_{50} < 6 \mu M$  para los derivados IV.1, IV.2, IV.7, IV.11, IV.14 y IV.15. Además, estos derivados muestran valores inferiores al etopósido para los tres parámetros citotóxicos. El derivado IV.11 muestra mejor actividad que el metotrexato (con una  $GI_{50}$  21 veces inferior) y que el etopósido (con una  $GI_{50}$  unas 130 veces inferior). Los derivados IV.1, IV.7 y IV.15 se han mostrado muy selectivos en las líneas de mama, siendo el derivado IV.7 el más selectivo de todos ellos ( $GI_{50 \text{ 184B5}}/GI_{50 \text{ MCF-7}}=1.418$ ).

**Tabla 10:** Parámetros citotóxicos para los compuestos de la serie IV en diferentes líneas celulares a 72 horas. (n.d. indica que no se tienen datos). Los valores de los diferentes fármacos quimioterápicos se extraen del programa DTP del NCI.

SERIE IV							
COMPUESTO	PARÁMETROS CITOTÓXICOS	LÍNEAS CELULARES					
		CCRF-CEM	HTB-54	HT-29	MCF-7	184B5	BEAS-2B
IV.1	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	39	37	57	<b>0,6</b>	<b>36</b>	<b>11</b>
	<i>TGI</i> (μM)	61	>100	>100	<b>7,5</b>	<b>63</b>	<b>45</b>
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	82	>100	>100	81	<b>91</b>	<b>79</b>
IV.2	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	25	<b>5,3</b>	49	<b>5,8</b>	5,8	7,8
	<i>TGI</i> (μM)	54	<b>9,9</b>	>100	59	<b>34</b>	<b>42</b>
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	82	76	>100	>100	<b>67</b>	<b>76</b>
IV.3	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	>100	31	62	>100	<b>21</b>	3,5
	<i>TGI</i> (μM)	>100	>100	>100	>100	<b>64</b>	>100
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	>100	>100	>100	>100	>100	>100
IV.4	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	>100	<b>7,1</b>	72	43	<b>71</b>	<b>37</b>
	<i>TGI</i> (μM)	>100	61	>100	94	>100	>100
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	>100	>100	>100	>100	>100	>100
IV.5	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	72	45	43	48	6,8	0,4
	<i>TGI</i> (μM)	>100	>100	>100	>100	<b>86</b>	<b>58</b>
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	>100	>100	>100	>100	>100	>100
IV.6	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	40	74	43	16	3,7	0,6
	<i>TGI</i> (μM)	62	>100	81	67	<b>12</b>	<b>37</b>
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	83	>100	>100	>100	<b>74</b>	<b>78</b>
IV.7	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	34	38	73	<b>0,05</b>	<b>71</b>	<b>44</b>
	<i>TGI</i> (μM)	72	81	>100	47	>100	>100
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	>100	>100	>100	99	>100	>100
IV.8	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	>100	33	72	43	<b>76</b>	<b>56</b>
	<i>TGI</i> (μM)	>100	>100	>100	94	>100	>100
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	>100	>100	>100	>100	>100	>100
IV.9	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	49	38	73	54	<b>37</b>	<b>36</b>
	<i>TGI</i> (μM)	87	72	>100	>100	>100	<b>78</b>
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	>100	>100	>100	>100	>100	>100
IV.10	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	35	40	83	35	<b>57</b>	<b>35</b>
	<i>TGI</i> (μM)	84	81	>100	65	>100	<b>88</b>
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	>100	>100	>100	95	>100	>100
IV.11	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	26	<b>0,04</b>	52	<b>0,1</b>	0,7	0,1
	<i>TGI</i> (μM)	52	<b>3,6</b>	>100	>100	<b>36</b>	>100
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	79	>100	>100	>100	<b>80</b>	>100
IV.12	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	65	18	28	46	<b>24</b>	<b>24</b>
	<i>TGI</i> (μM)	>100	89	75	>100	<b>59</b>	<b>55</b>
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	>100	>100	>100	>100	<b>94</b>	<b>85</b>
IV.13	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	35	35	40	28	<b>15</b>	<b>52</b>
	<i>TGI</i> (μM)	68	84	>100	59	<b>44</b>	>100
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	>100	>100	>100	90	<b>72</b>	>100
IV.14	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	<b>3,0</b>	<b>6,0</b>	<b>9,0</b>	<b>2,9</b>	0,5	n.d.
	<i>TGI</i> (μM)	<b>6,0</b>	66	45	23	2,5	n.d.
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	<b>9,0</b>	>100	88	>100	6,6	n.d.
IV.15	<i>GI<sub>50</sub></i> (μM)	31	26	<b>7,5</b>	<b>6,0</b>	<b>71</b>	n.d.
	<i>TGI</i> (μM)	55	84	34	51	>100	n.d.
	<i>LD<sub>50</sub></i> (μM)	78	>100	77	>100	>100	n.d.

Tabla 10 continuación: Parámetros citotóxicos para los compuestos de la serie IV en diferentes líneas celulares a 72 horas. (n.d. indica que no se tienen datos). Los valores de los diferentes fármacos quimioterápicos se extraen del programa DTP del NCI.

SERIE IV							
COMPUESTO	PARÁMETROS CITOTÓXICOS	LÍNEAS CELULARES					
		CCRF-CEM	HTB-54	HT-29	MCF-7	184B5	BEAS-2B
IV.16	<i>GI<sub>50</sub></i> ( $\mu$ M)	66	>100	>100	38	71	>100
	<i>TGI</i> ( $\mu$ M)	>100	>100	>100	95	>100	>100
	<i>LD<sub>50</sub></i> ( $\mu$ M)	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Doxorrubicina	<i>GI<sub>50</sub></i> ( $\mu$ M)	0,03	n.d.	0,2	0,01	n.d.	n.d.
	<i>TGI</i> ( $\mu$ M)	1,6	n.d.	6,3	5,0	n.d.	n.d.
	<i>LD<sub>50</sub></i> ( $\mu$ M)	20	n.d.	>25	20	n.d.	n.d.
Camptotecina	<i>GI<sub>50</sub></i> ( $\mu$ M)	0,01	n.d.	0,05	0,01	n.d.	n.d.
	<i>TGI</i> ( $\mu$ M)	0,02	n.d.	0,8	0,2	n.d.	n.d.
	<i>LD<sub>50</sub></i> ( $\mu$ M)	63	n.d.	32	>100	n.d.	n.d.
Etopósido	<i>GI<sub>50</sub></i> ( $\mu$ M)	12	n.d.	32	20	n.d.	n.d.
	<i>TGI</i> ( $\mu$ M)	50	n.d.	>100	>100	n.d.	n.d.
	<i>LD<sub>50</sub></i> ( $\mu$ M)	>100	n.d.	>100	>100	n.d.	n.d.
Taxol	<i>GI<sub>50</sub></i> ( $\mu$ M)	0,003	n.d.	0,002	0,003	n.d.	n.d.
	<i>TGI</i> ( $\mu$ M)	20	n.d.	0,2	16	n.d.	n.d.
	<i>LD<sub>50</sub></i> ( $\mu$ M)	>100	n.d.	79	>100	n.d.	n.d.
Cis-platino	<i>GI<sub>50</sub></i> ( $\mu$ M)	1,0	n.d.	7,9	3,2	n.d.	n.d.
	<i>TGI</i> ( $\mu$ M)	79	n.d.	>100	>100	n.d.	n.d.
	<i>LD<sub>50</sub></i> ( $\mu$ M)	>100	n.d.	>100	>100	n.d.	n.d.
Metotrexato	<i>GI<sub>50</sub></i> ( $\mu$ M)	0,03	n.d.	0,04	0,06	n.d.	n.d.
	<i>TGI</i> ( $\mu$ M)	>100	n.d.	>100	>100	n.d.	n.d.
	<i>LD<sub>50</sub></i> ( $\mu$ M)	>100	n.d.	>100	>100	n.d.	n.d.

Con todos los datos de actividad citotóxica obtenidos, se han elegido 3 derivados para profundizar en sus posibles mecanismos de acción: I.3 y IV.14 por su potente actividad en todas las líneas celulares testadas y IV.7 por su alta selectividad en la línea celular tumoral de mama MCF-7 frente a la no tumoral 184B5.

## 2.2 CURVAS DOSIS-RESPUESTA

A continuación se muestran las curvas dosis-respuesta obtenidas en las diferentes líneas celulares para los derivados de la serie I (figuras desde 126 hasta 135).

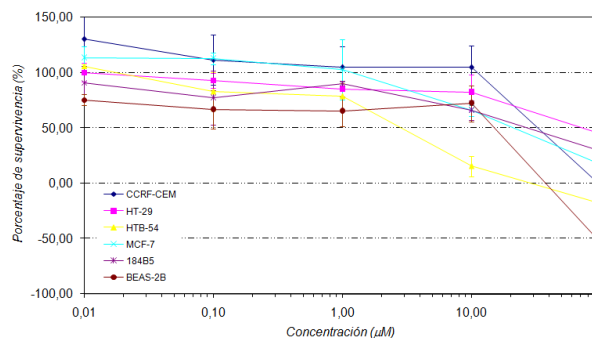
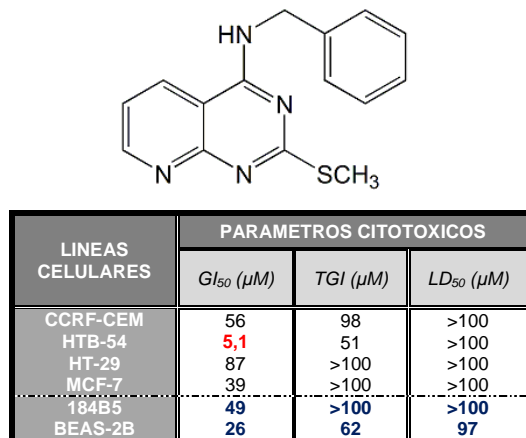


Figura 126: Curvas dosis-respuesta para el compuesto I.1.

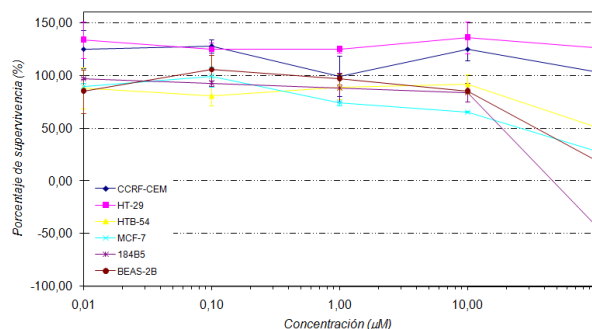
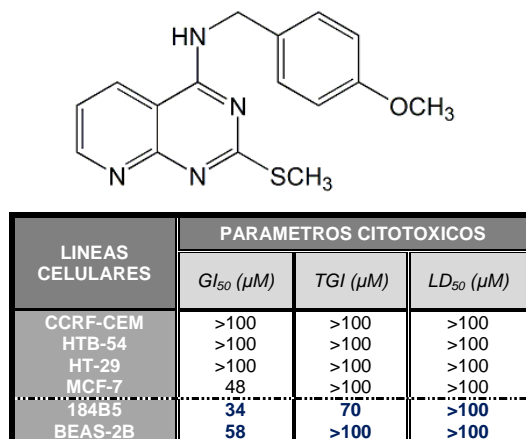


Figura 127: Curvas dosis-respuesta para el compuesto I.2.

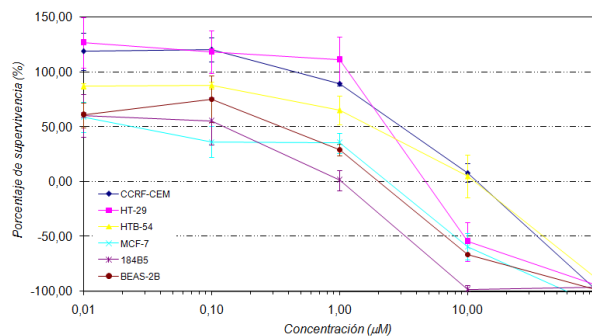
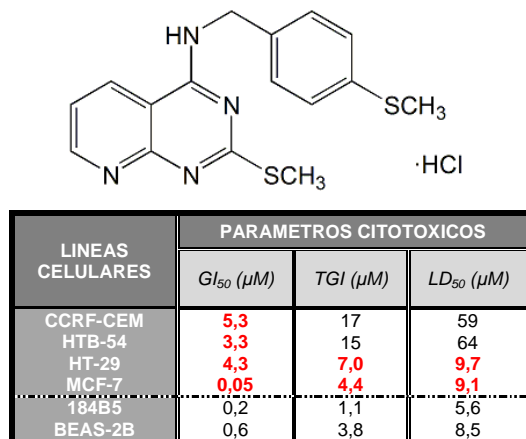
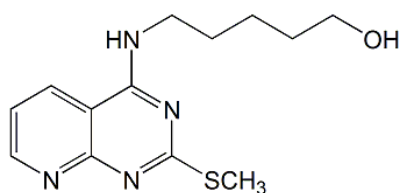


Figura 128: Curvas dosis-respuesta para el compuesto I.3.



LINEAS CELULARES	PARAMETROS CITOTOXICOS		
	$GI_{50}$ ( $\mu M$ )	$TGI$ ( $\mu M$ )	$LD_{50}$ ( $\mu M$ )
CCRF-CEM	>100	>100	>100
HTB-54	>100	>100	>100
HT-29	64	>100	>100
MCF-7	49	>100	>100
184B5	>100	>100	>100
BEAS-2B	>100	>100	>100

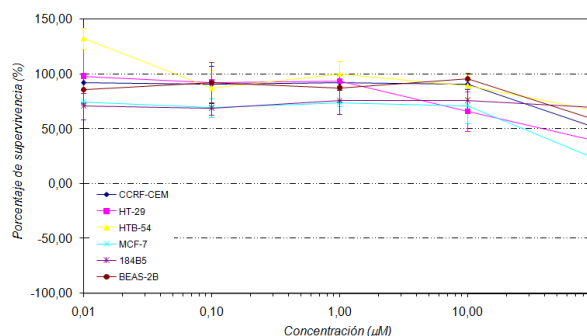
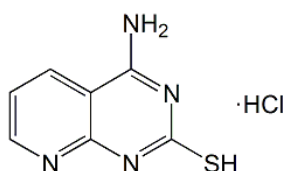


Figura 129: Curvas dosis-respuesta para el compuesto 1.4.



LINEAS CELULARES	PARAMETROS CITOTOXICOS		
	$GI_{50}$ ( $\mu M$ )	$TGI$ ( $\mu M$ )	$LD_{50}$ ( $\mu M$ )
CCRF-CEM	99	>100	>100
HTB-54	15	54	93
HT-29	25	81	>100
MCF-7	53	>100	>100
184B5	48	>100	>100
BEAS-2B	19	60	>100

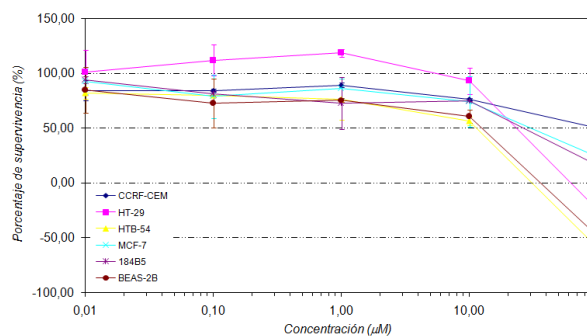
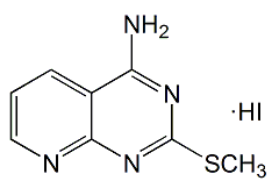


Figura 130: Curvas dosis-respuesta para el compuesto 1.5.



LINEAS CELULARES	PARAMETROS CITOTOXICOS		
	$GI_{50}$ ( $\mu M$ )	$TGI$ ( $\mu M$ )	$LD_{50}$ ( $\mu M$ )
CCRF-CEM	84	98	>100
HTB-54	>100	>100	>100
HT-29	>100	>100	>100
MCF-7	75	>100	>100
184B5	68	>100	>100
BEAS-2B	42	>100	>100

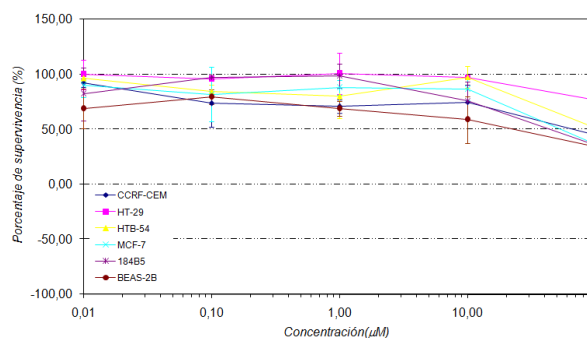


Figura 131: Curvas dosis-respuesta para el compuesto 1.6.

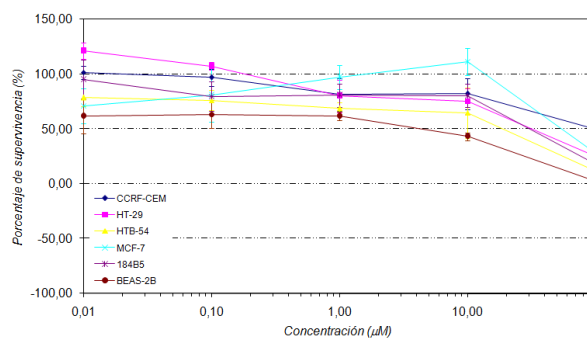
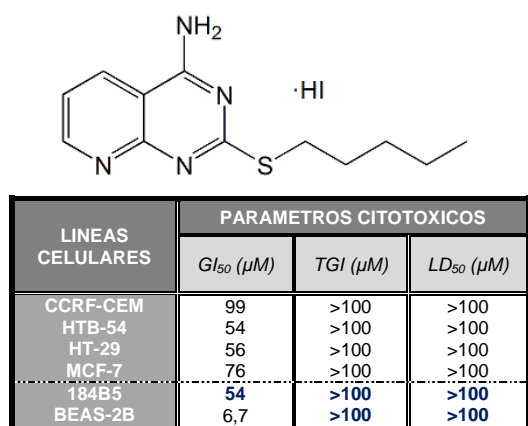


Figura 132: Curvas dosis-respuesta para el compuesto I.7.

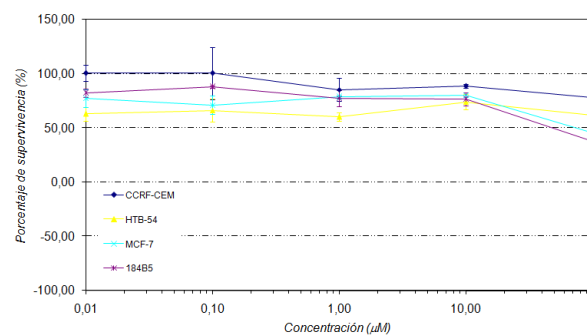
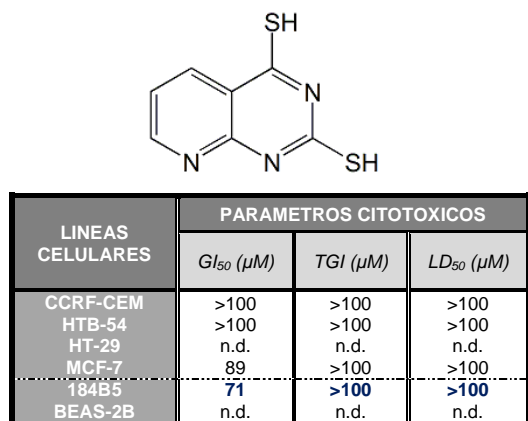


Figura 133: Curvas dosis-respuesta para el compuesto I.8.

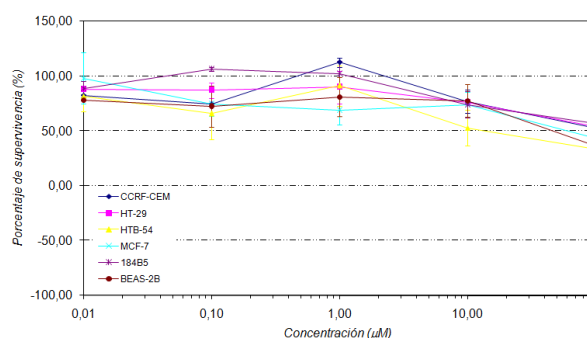
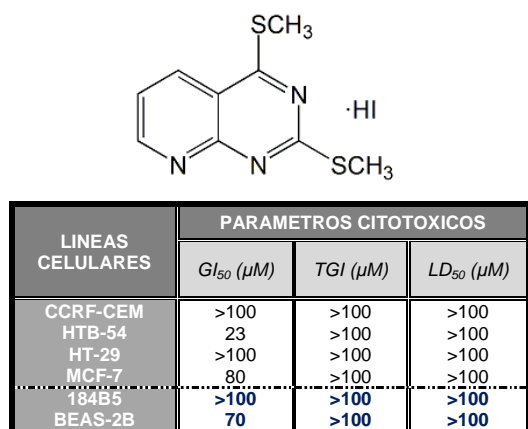
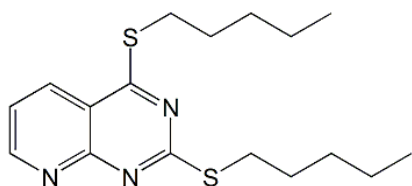


Figura 134: Curvas dosis-respuesta para el compuesto I.9.



LINEAS CELULARES	PARAMETROS CITOTOXICOS		
	$GI_{50}$ ( $\mu M$ )	$TGI$ ( $\mu M$ )	$LD_{50}$ ( $\mu M$ )
CCRF-CEM	>100	>100	>100
HTB-54	>100	>100	>100
HT-29	>100	>100	>100
MCF-7	76	>100	>100
184B5	>100	>100	>100
BEAS-2B	>100	>100	>100

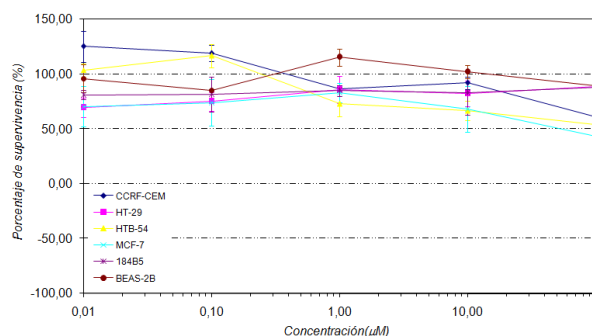
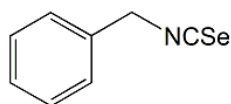


Figura 135: Curvas dosis-respuesta para el compuesto I.10.

A continuación se muestran las curvas dosis-respuesta obtenidas en las diferentes líneas celulares para los derivados de la serie II (figuras desde 136 hasta 143).



LINEAS CELULARES	PARAMETROS CITOTOXICOS		
	$GI_{50}$ ( $\mu M$ )	$TGI$ ( $\mu M$ )	$LD_{50}$ ( $\mu M$ )
CCRF-CEM	29	58	87
HTB-54	6,0	33	66
HT-29	21	44	68
MCF-7	28	62	95
184B5	15	45	75
BEAS-2B	4,1	33	70

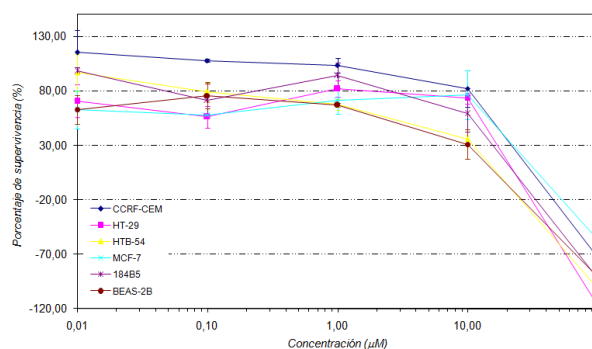
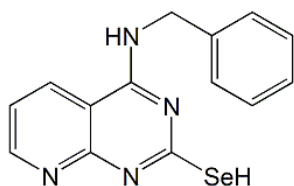


Figura 136: Curvas dosis-respuesta para el compuesto II.1.



LINEAS CELULARES	PARAMETROS CITOTOXICOS		
	$GI_{50}$ ( $\mu M$ )	$TGI$ ( $\mu M$ )	$LD_{50}$ ( $\mu M$ )
CCRF-CEM	30	69	>100
HTB-54	69	>100	>100
HT-29	6,3	33	>100
MCF-7	0,03	>100	>100
184B5	3,7	9,1	>100
BEAS-2B	8,4	>100	>100

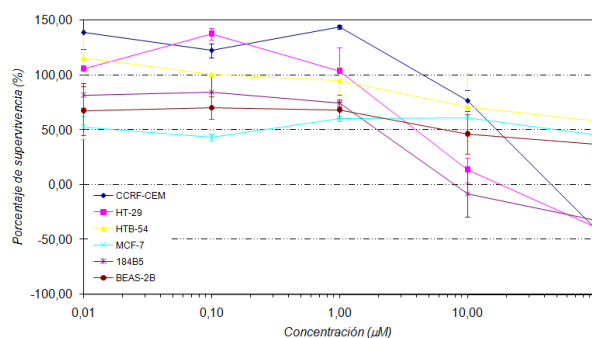


Figura 137: Curvas dosis-respuesta para el compuesto II.2.

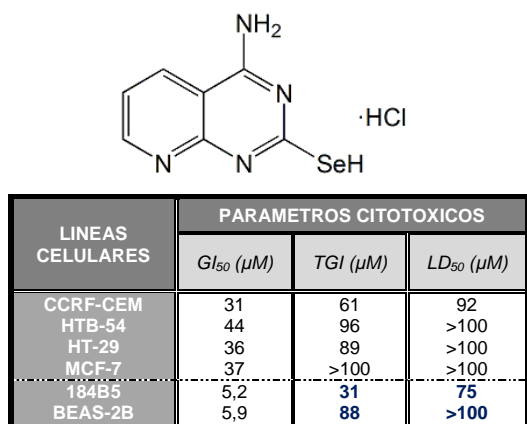


Figura 138: Curvas dosis-respuesta para el compuesto II.3.

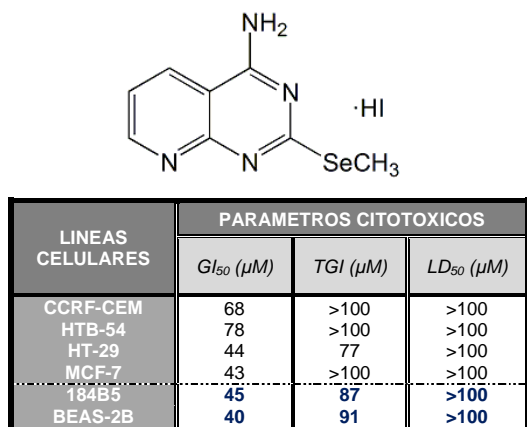
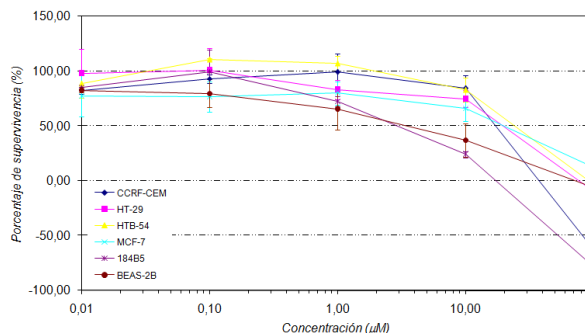


Figura 139: Curvas dosis-respuesta para el compuesto II.4.

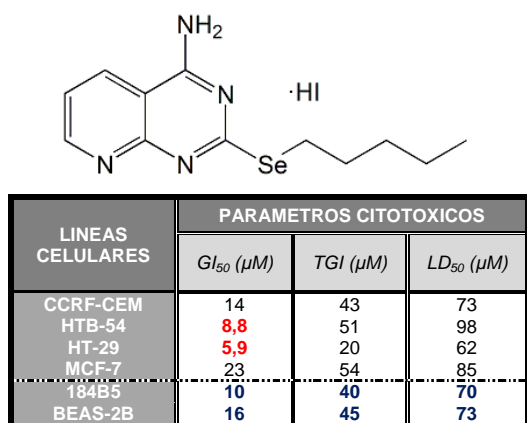
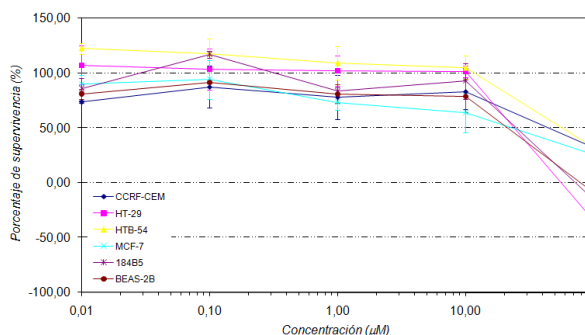
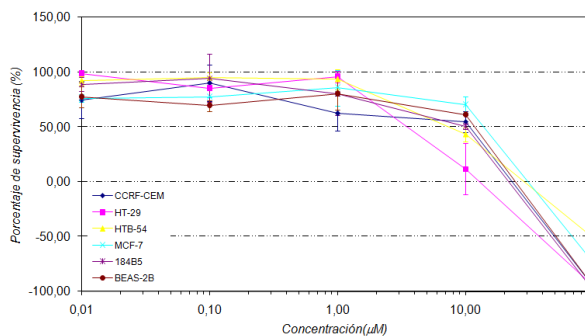


Figura 140: Curvas dosis-respuesta para el compuesto II.5.





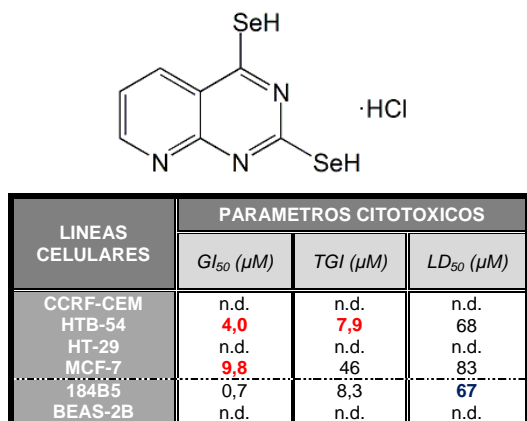
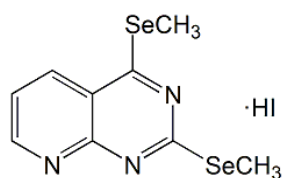
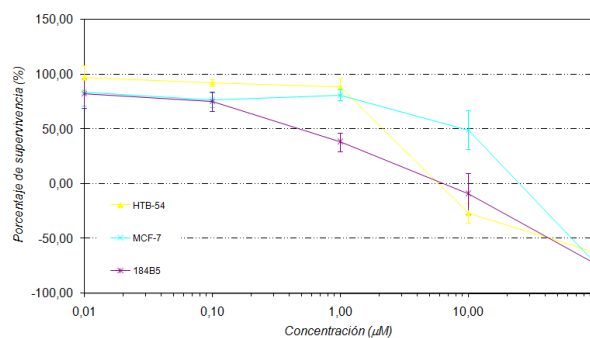


Figura 141: Curvas dosis-respuesta para el compuesto II.6.



No ha sido evaluado

Figura 142: Compuesto II.7.

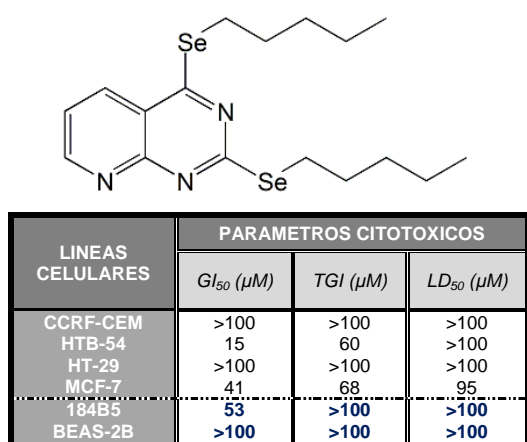
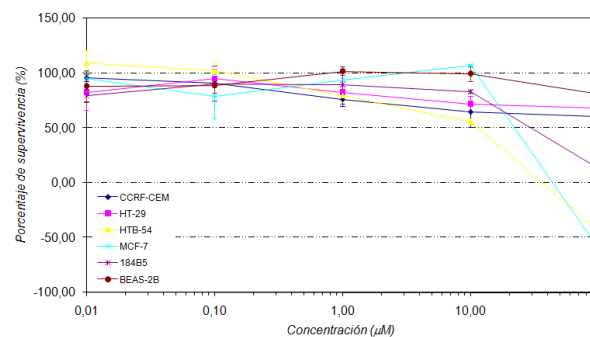


Figura 143: Curvas dosis-respuesta para el compuesto II.8.



A continuación se muestran las curvas dosis-respuesta obtenidas en las diferentes líneas celulares para los derivados de la serie III (figuras desde 144 hasta 166).

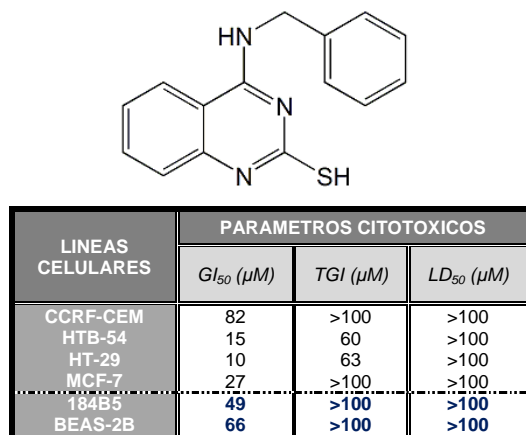


Figura 144: Curvas dosis-respuesta para el compuesto III.1.

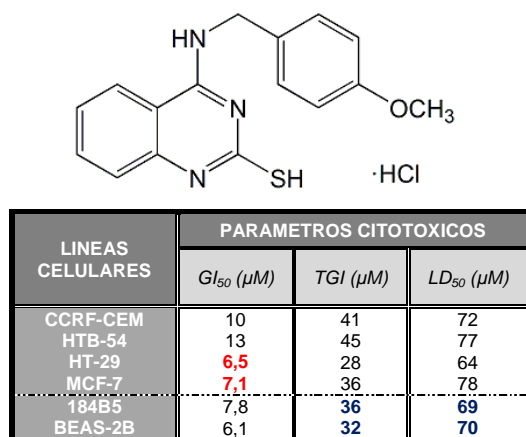
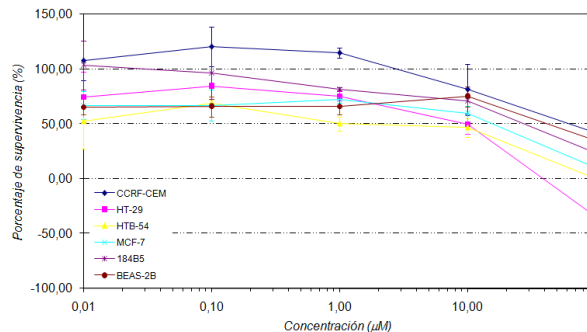


Figura 145: Curvas dosis-respuesta para el compuesto III.2.

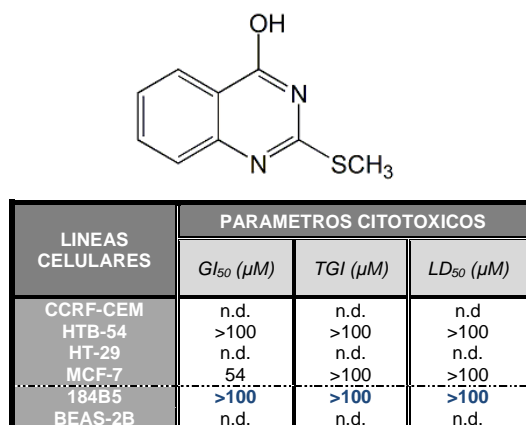
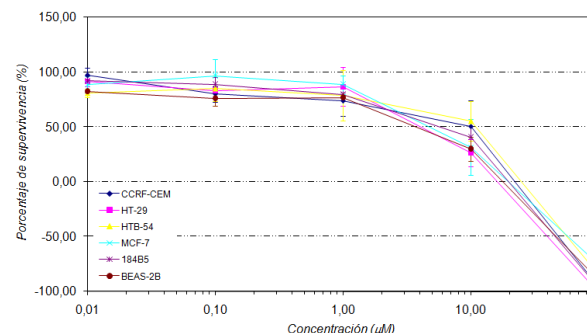
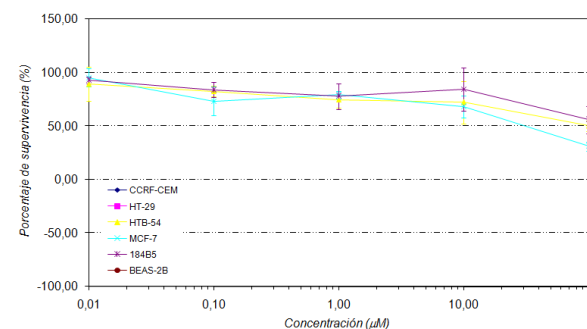
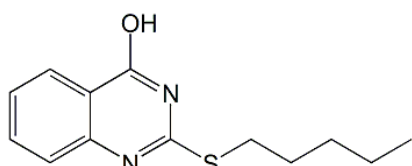


Figura 146: Curvas dosis-respuesta para el compuesto III.3.





LINEAS CELULARES	PARAMETROS CITOTOXICOS		
	$GI_{50}$ ( $\mu M$ )	$TGI$ ( $\mu M$ )	$LD_{50}$ ( $\mu M$ )
CCRF-CEM	52	86	>100
HTB-54	30	>100	>100
HT-29	74	>100	>100
MCF-7	7,8	81	>100
184B5	98	>100	>100
BEAS-2B	51	>100	>100

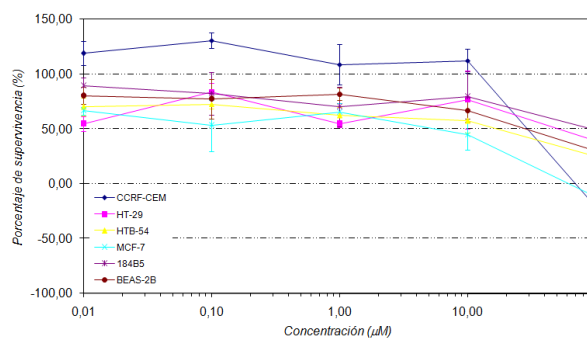
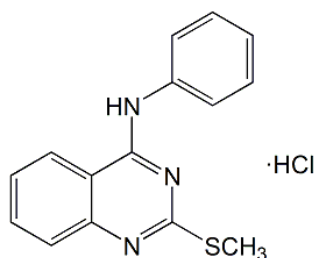


Figura 147: Curvas dosis-respuesta para el compuesto III.4.



LINEAS CELULARES	PARAMETROS CITOTOXICOS		
	$GI_{50}$ ( $\mu M$ )	$TGI$ ( $\mu M$ )	$LD_{50}$ ( $\mu M$ )
CCRF-CEM	75	>100	>100
HTB-54	56	>100	>100
HT-29	66	>100	>100
MCF-7	78	>100	>100
184B5	>100	>100	>100
BEAS-2B	55	>100	>100

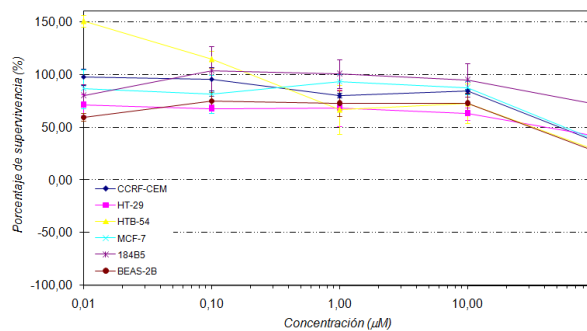
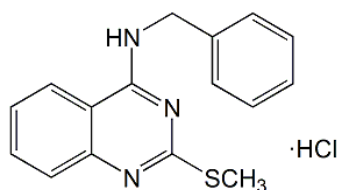


Figura 148: Curvas dosis-respuesta para el compuesto III.5.



LINEAS CELULARES	PARAMETROS CITOTOXICOS		
	$GI_{50}$ ( $\mu M$ )	$TGI$ ( $\mu M$ )	$LD_{50}$ ( $\mu M$ )
CCRF-CEM	88	>100	>100
HTB-54	38	>100	>100
HT-29	36	>100	>100
MCF-7	41	>100	>100
184B5	29	>100	>100
BEAS-2B	39	88	>100

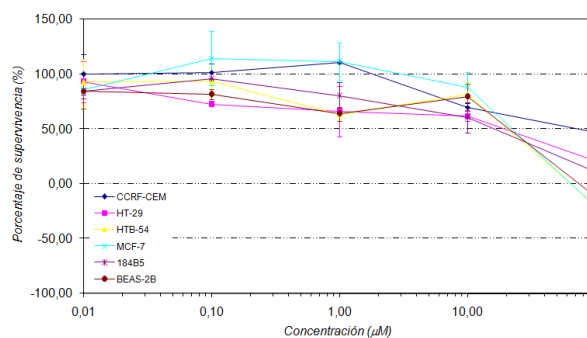


Figura 149: Curvas dosis-respuesta para el compuesto III.6.

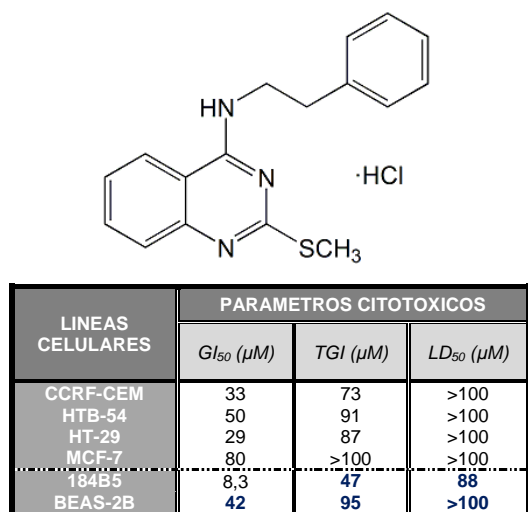


Figura 150: Curvas dosis-respuesta para el compuesto III.7.

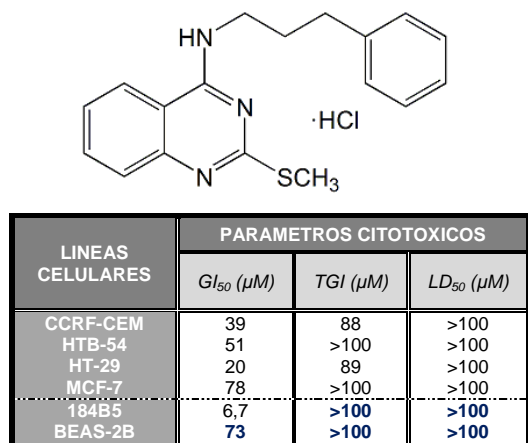
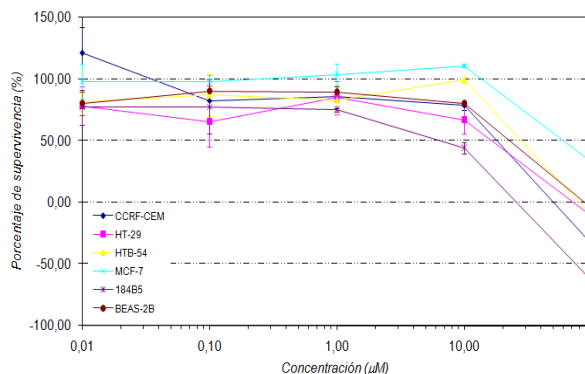


Figura 151: Curvas dosis-respuesta para el compuesto III.8.

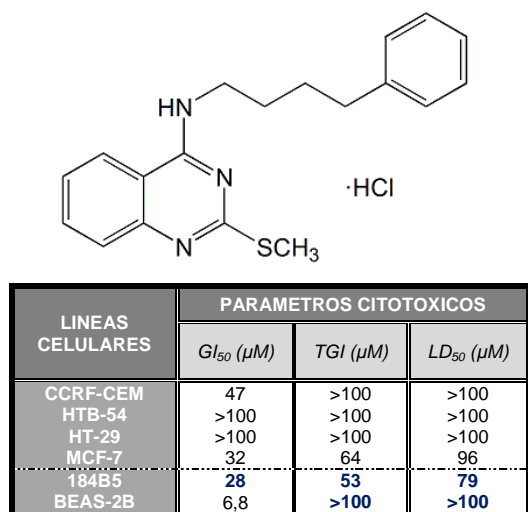
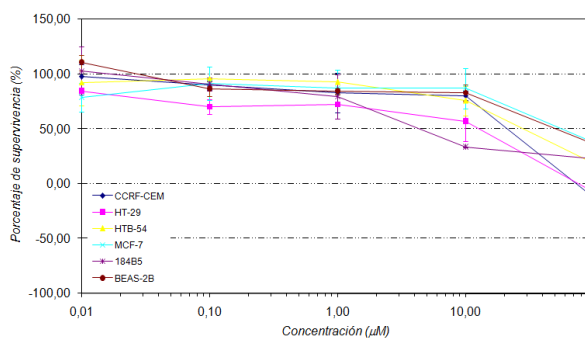
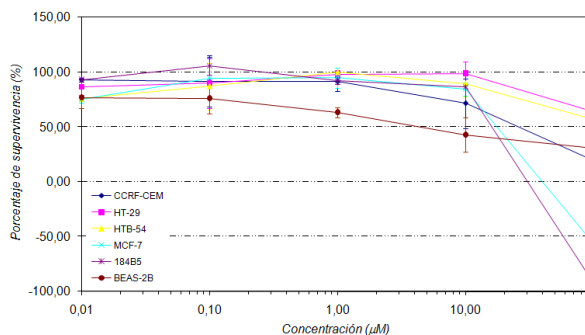


Figura 152: Curvas dosis-respuesta para el compuesto III.9.



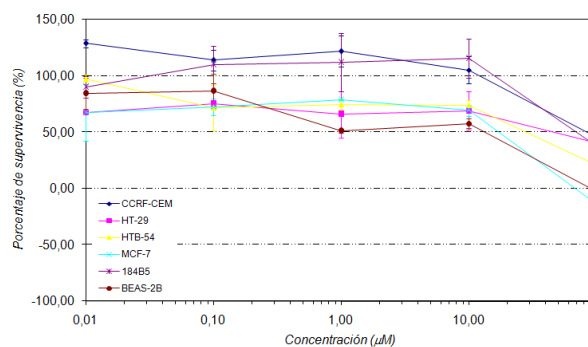
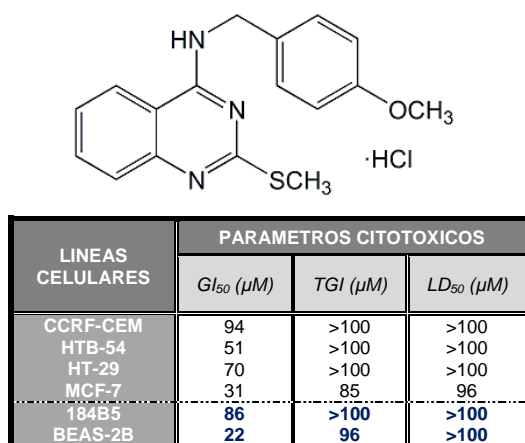


Figura 153: Curvas dosis-respuesta para el compuesto III.10.

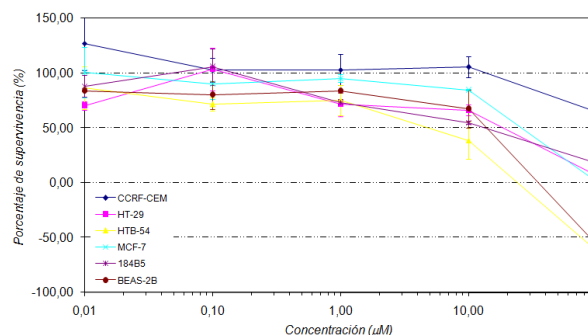
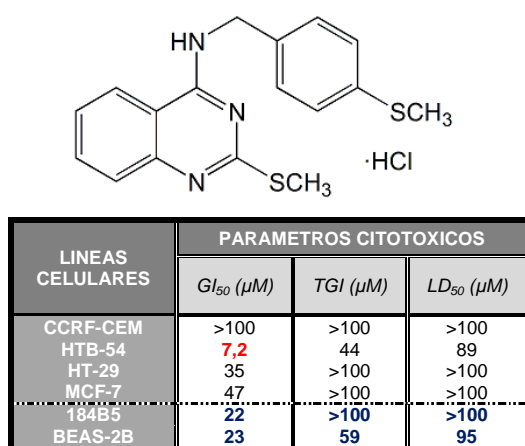


Figura 154: Curvas dosis-respuesta para el compuesto III.11.

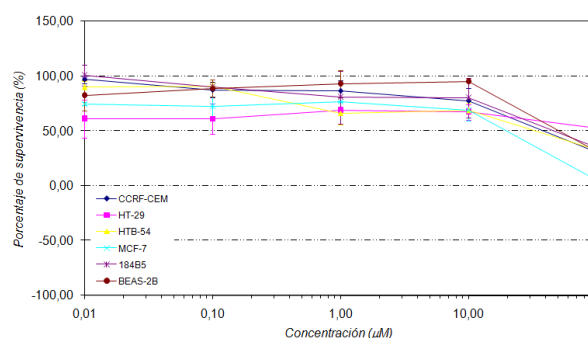
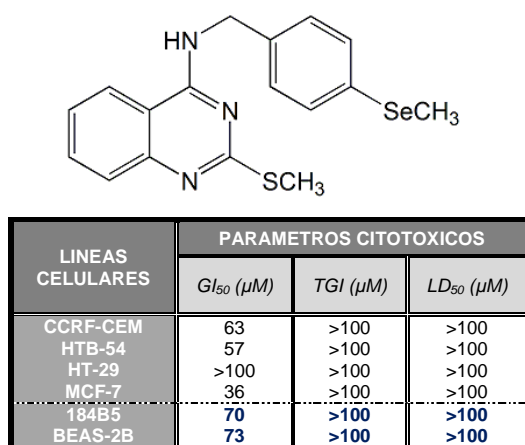


Figura 155: Curvas dosis-respuesta para el compuesto III.12.

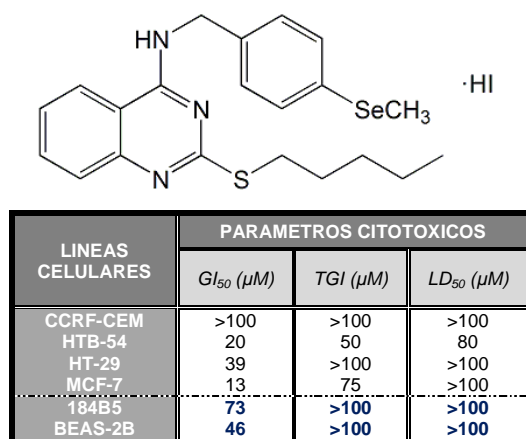


Figura 156: Curvas dosis-respuesta para el compuesto III.13.

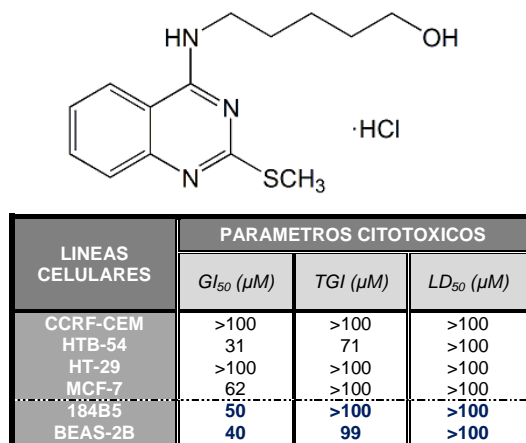
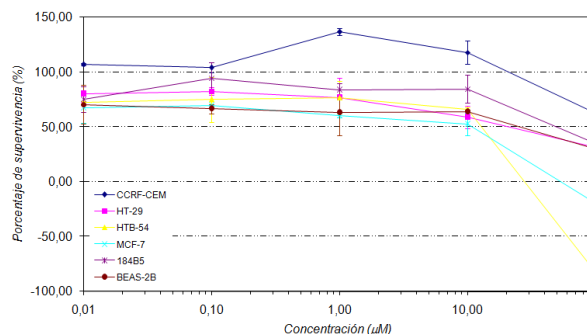


Figura 157: Curvas dosis-respuesta para el compuesto III.14.

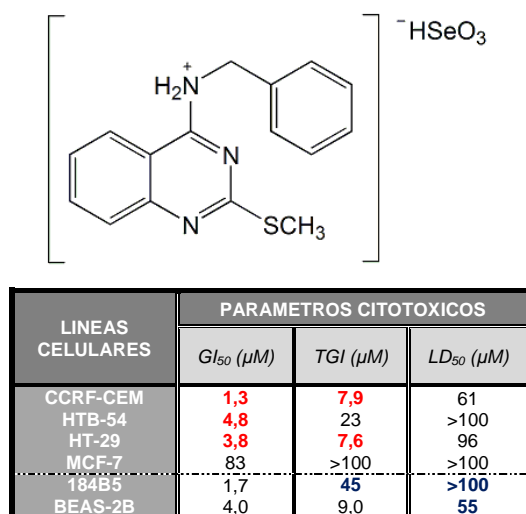
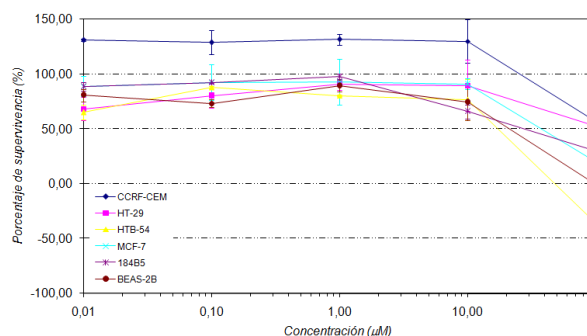
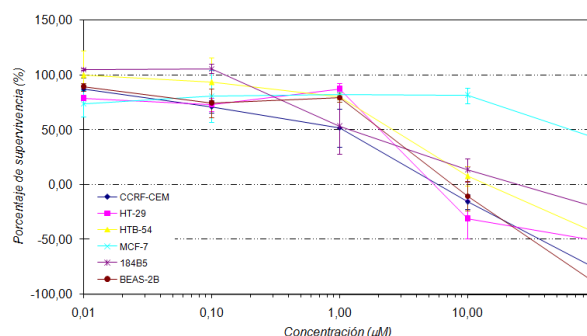
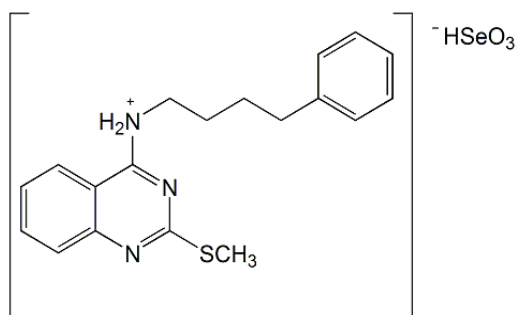


Figura 158: Curvas dosis-respuesta para el compuesto III.15.





LINEAS CELULARES	PARAMETROS CITOTOXICOS		
	$GI_{50}$ ( $\mu M$ )	$TGI$ ( $\mu M$ )	$LD_{50}$ ( $\mu M$ )
CCRF-CEM	<b>8,6</b>	42	78
HTB-54	<b>9,2</b>	46	85
HT-29	15	47	80
MCF-7	31	62	89
184B5	8,7	<b>39</b>	<b>72</b>
BEAS-2B	8,0	<b>38</b>	<b>73</b>

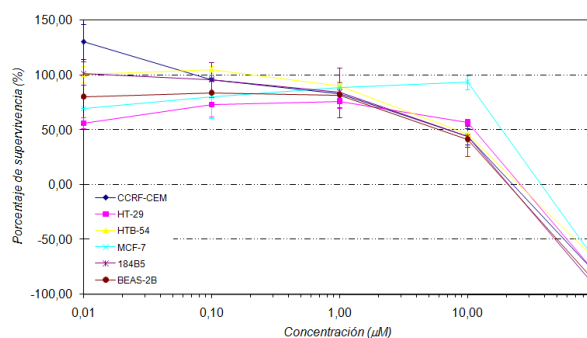
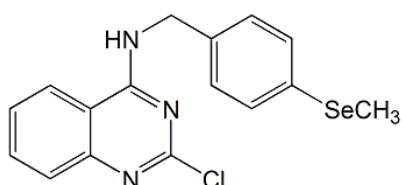


Figura 159: Curvas dosis-respuesta para el compuesto III.16.



LINEAS CELULARES	PARAMETROS CITOTOXICOS		
	$GI_{50}$ ( $\mu M$ )	$TGI$ ( $\mu M$ )	$LD_{50}$ ( $\mu M$ )
CCRF-CEM	46	74	>100
HTB-54	<b>7,9</b>	60	>100
HT-29	28	83	>100
MCF-7	<b>5,9</b>	76	>100
184B5	<b>27</b>	<b>53</b>	<b>80</b>
BEAS-2B	5,8	<b>46</b>	>100

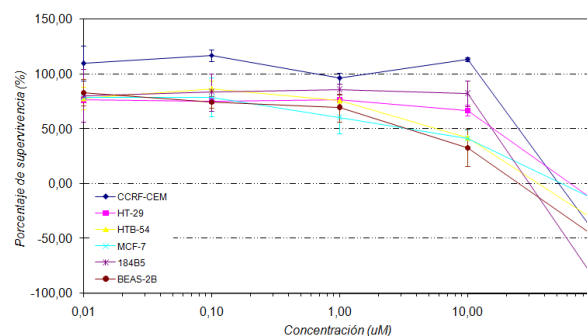
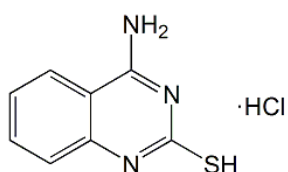


Figura 160: Curvas dosis-respuesta para el compuesto III.17.



LINEAS CELULARES	PARAMETROS CITOTOXICOS		
	$GI_{50}$ ( $\mu M$ )	$TGI$ ( $\mu M$ )	$LD_{50}$ ( $\mu M$ )
CCRF-CEM	72	>100	>100
HTB-54	<b>4,6</b>	44	>100
HT-29	46	>100	>100
MCF-7	<b>0,9</b>	25	>100
184B5	<b>21</b>	>100	>100
BEAS-2B	4,0	<b>55</b>	>100

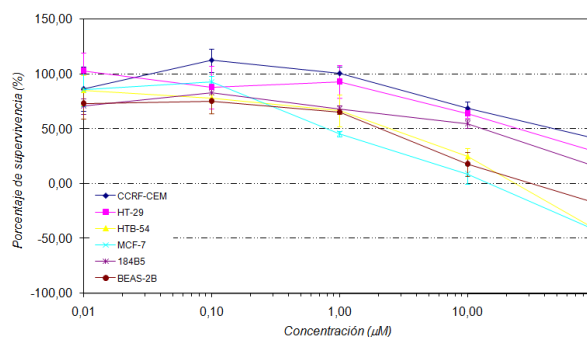
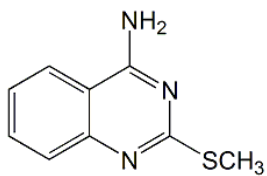


Figura 161: Curvas dosis-respuesta para el compuesto III.18.



LINEAS CELULARES	PARAMETROS CITOTOXICOS		
	$GI_{50}$ ( $\mu M$ )	$TGI$ ( $\mu M$ )	$LD_{50}$ ( $\mu M$ )
CCRF-CEM	>100	>100	>100
HTB-54	96	>100	>100
HT-29	60	>100	>100
MCF-7	74	>100	>100
184B5	49	>100	>100
BEAS-2B	65	>100	>100

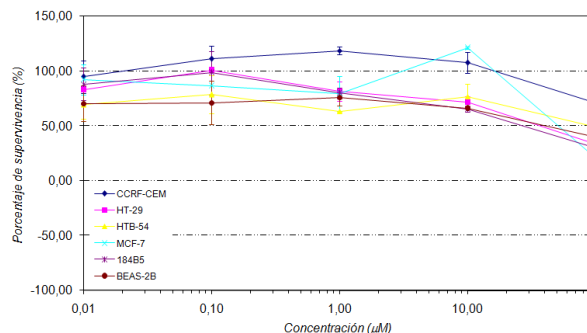
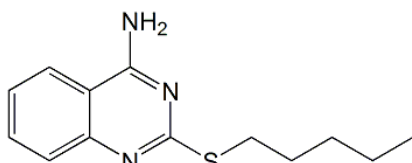


Figura 162: Curvas dosis-respuesta para el compuesto III.19.



LINEAS CELULARES	PARAMETROS CITOTOXICOS		
	$GI_{50}$ ( $\mu M$ )	$TGI$ ( $\mu M$ )	$LD_{50}$ ( $\mu M$ )
CCRF-CEM	48	86	>100
HTB-54	>100	>100	>100
HT-29	86	>100	>100
MCF-7	15	65	>100
184B5	79	>100	>100
BEAS-2B	10	>100	>100

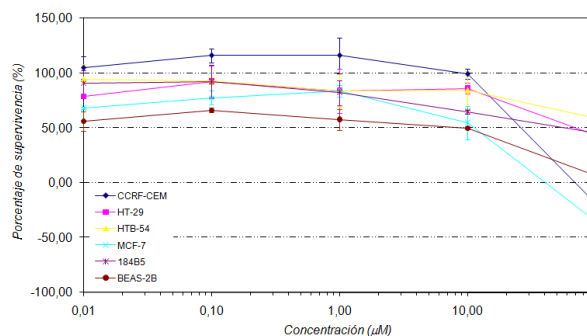
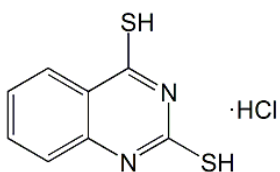


Figura 163: Curvas dosis-respuesta para el compuesto III.20.



LINEAS CELULARES	PARAMETROS CITOTOXICOS		
	$GI_{50}$ ( $\mu M$ )	$TGI$ ( $\mu M$ )	$LD_{50}$ ( $\mu M$ )
CCRF-CEM	73	>100	>100
HTB-54	26	>100	>100
HT-29	20	>100	>100
MCF-7	31	70	>100
184B5	63	>100	>100
BEAS-2B	29	>100	>100

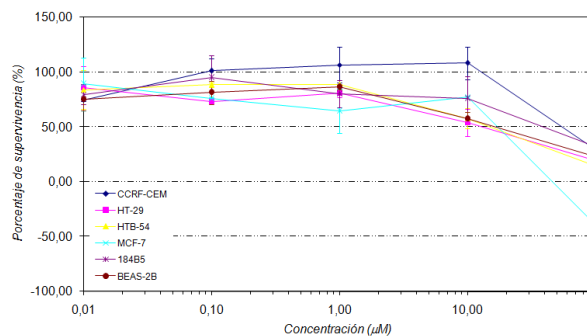
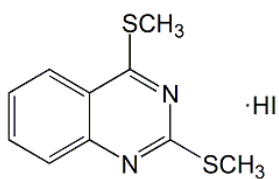


Figura 164: Curvas dosis-respuesta para el compuesto III.21.





LINEAS CELULARES	PARAMETROS CITOTOXICOS		
	$GI_{50}$ ( $\mu M$ )	$TGI$ ( $\mu M$ )	$LD_{50}$ ( $\mu M$ )
CCRF-CEM	92	>100	>100
HTB-54	19	>100	>100
HT-29	56	>100	>100
MCF-7	19	64	>100
184B5	65	>100	>100
BEAS-2B	58	>100	>100

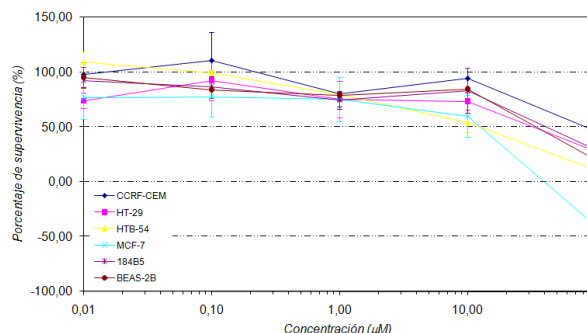
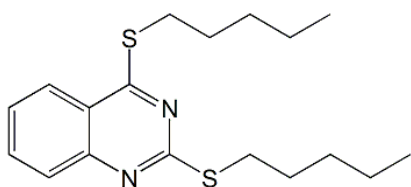


Figura 165: Curvas dosis-respuesta para el compuesto III.22.



LINEAS CELULARES	PARAMETROS CITOTOXICOS		
	$GI_{50}$ ( $\mu M$ )	$TGI$ ( $\mu M$ )	$LD_{50}$ ( $\mu M$ )
CCRF-CEM	55	>100	>100
HTB-54	>100	>100	>100
HT-29	>100	>100	>100
MCF-7	49	92	>100
184B5	>100	>100	>100
BEAS-2B	>100	>100	>100

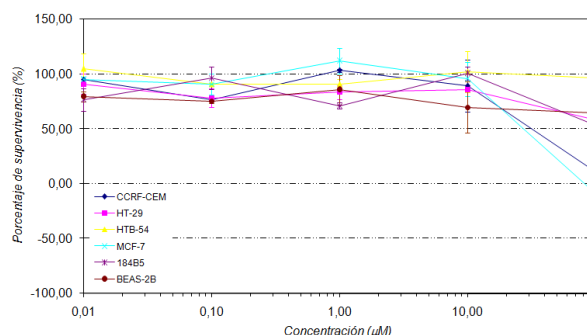
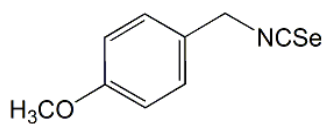


Figura 166: Curvas dosis-respuesta para el compuesto III.23.

A continuación se muestran las curvas dosis-respuesta obtenidas en las diferentes líneas celulares para los derivados de la serie IV (figuras desde 167 hasta 182).



LINEAS CELULARES	PARAMETROS CITOTOXICOS		
	$GI_{50}$ ( $\mu M$ )	$TGI$ ( $\mu M$ )	$LD_{50}$ ( $\mu M$ )
CCRF-CEM	39	61	82
HTB-54	37	>100	>100
HT-29	57	>100	>100
MCF-7	0,6	7,5	81
184B5	36	63	91
BEAS-2B	11	45	79

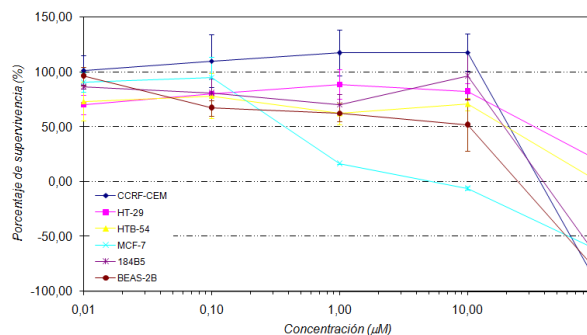


Figura 167: Curvas dosis-respuesta para el compuesto IV.1.

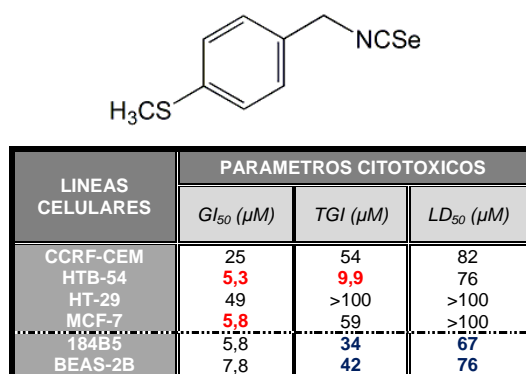


Figura 168: Curvas dosis-respuesta para el compuesto IV.2.

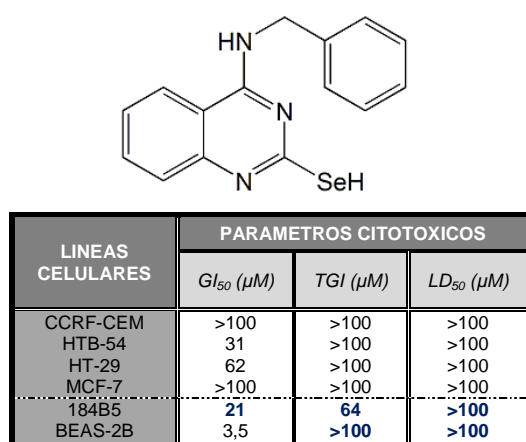
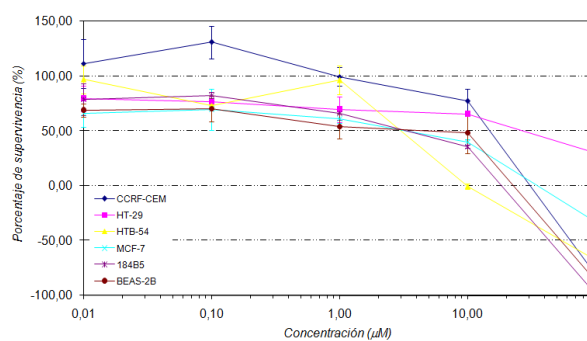


Figura 169: Curvas dosis-respuesta para el compuesto IV.3.

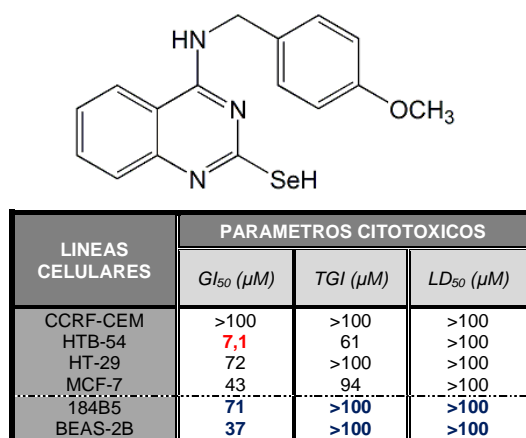
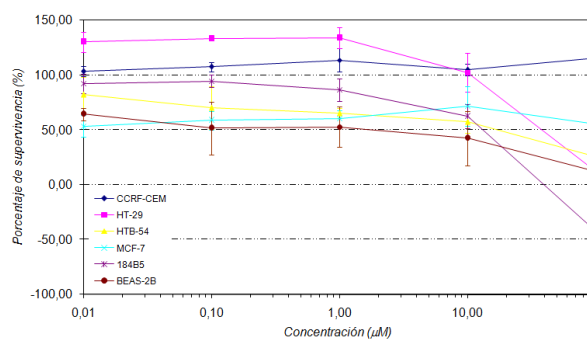
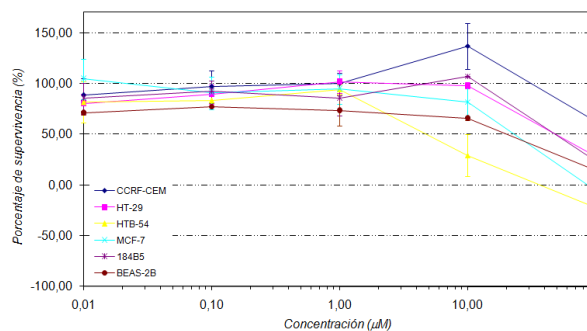
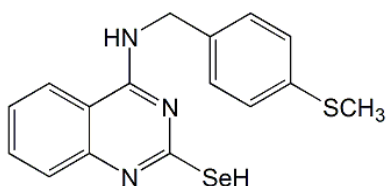


Figura 170: Curvas dosis-respuesta para el compuesto IV.4.





LINEAS CELULARES	PARAMETROS CITOTOXICOS		
	$GI_{50}$ ( $\mu M$ )	$TGI$ ( $\mu M$ )	$LD_{50}$ ( $\mu M$ )
CCRF-CEM	72	>100	>100
HTB-54	45	>100	>100
HT-29	43	>100	>100
MCF-7	48	>100	>100
184B5	6,8	<b>86</b>	>100
BEAS-2B	0,4	<b>58</b>	>100

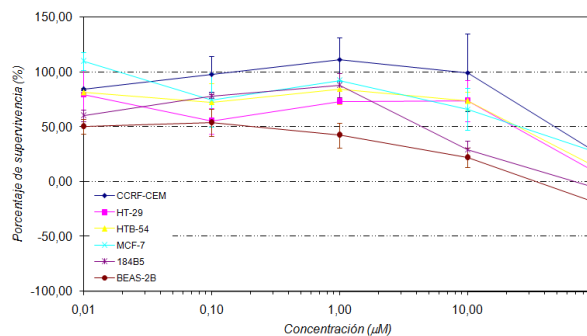
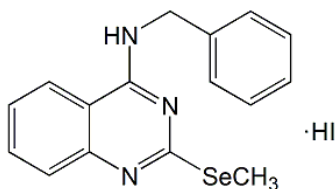


Figura 171: Curvas dosis-respuesta para el compuesto IV.5.



LINEAS CELULARES	PARAMETROS CITOTOXICOS		
	$GI_{50}$ ( $\mu M$ )	$TGI$ ( $\mu M$ )	$LD_{50}$ ( $\mu M$ )
CCRF-CEM	40	62	83
HTB-54	74	>100	>100
HT-29	43	81	>100
MCF-7	16	67	>100
184B5	3,7	<b>12</b>	<b>74</b>
BEAS-2B	0,6	<b>37</b>	<b>78</b>

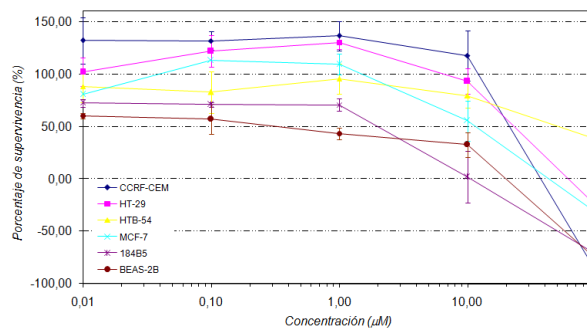
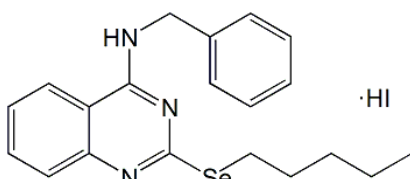


Figura 172: Curvas dosis-respuesta para el compuesto IV.6.



LINEAS CELULARES	PARAMETROS CITOTOXICOS		
	$GI_{50}$ ( $\mu M$ )	$TGI$ ( $\mu M$ )	$LD_{50}$ ( $\mu M$ )
CCRF-CEM	34	72	>100
HTB-54	38	81	>100
HT-29	73	>100	>100
MCF-7	<b>0,05</b>	47	99
184B5	<b>71</b>	>100	>100
BEAS-2B	<b>44</b>	>100	>100

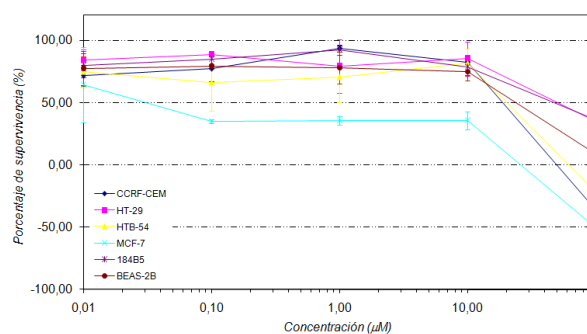


Figura 173: Curvas dosis-respuesta para el compuesto IV.7.

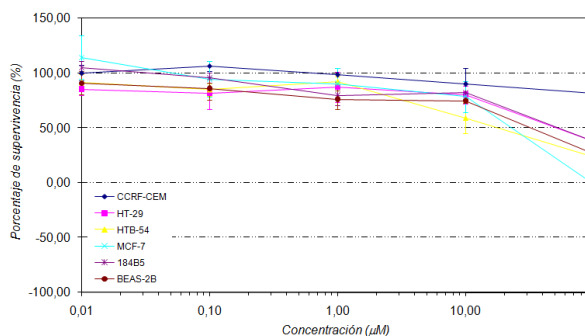
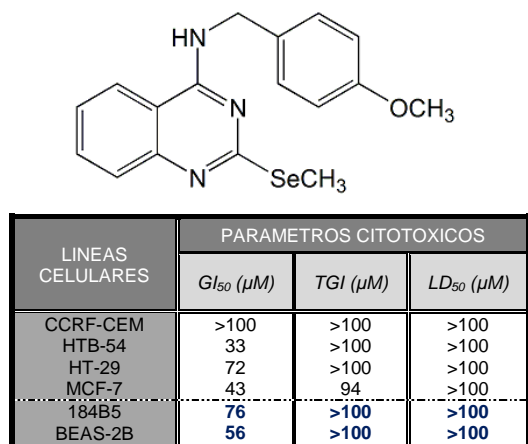


Figura 174: Curvas dosis-respuesta para el compuesto IV.8.

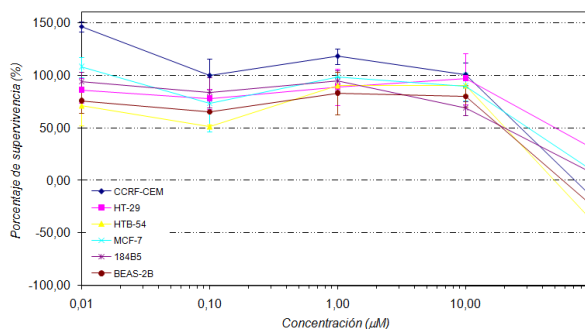
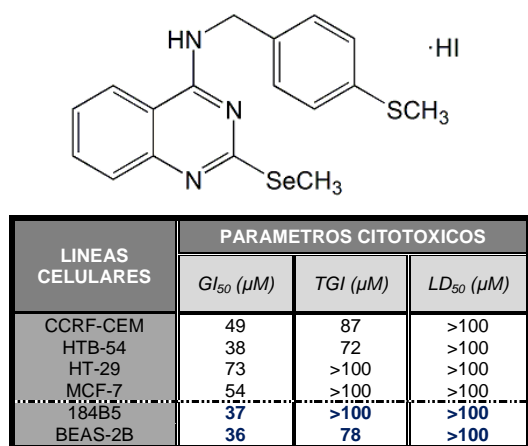


Figura 175: Curvas dosis-respuesta para el compuesto IV.9.

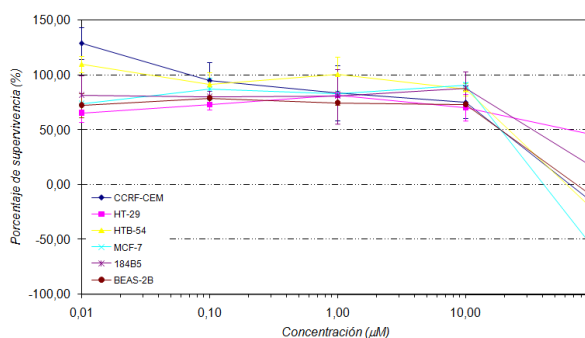
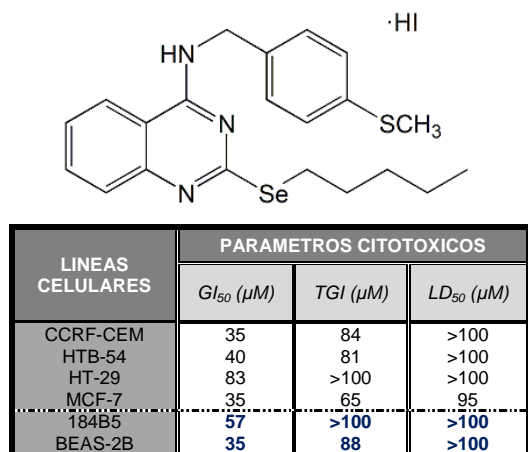
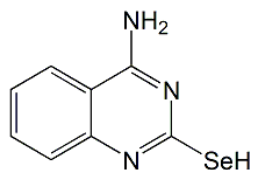


Figura 176: Curvas dosis-respuesta para el compuesto IV.10.



LINEAS CELULARES	PARAMETROS CITOTOXICOS		
	$GI_{50}$ ( $\mu M$ )	$TGI$ ( $\mu M$ )	$LD_{50}$ ( $\mu M$ )
CCRF-CEM	26	52	79
HTB-54	<b>0,04</b>	<b>3,6</b>	>100
HT-29	52	>100	>100
MCF-7	<b>0,1</b>	>100	>100
184B5	0,7	<b>36</b>	<b>80</b>
BEAS-2B	0,1	>100	>100

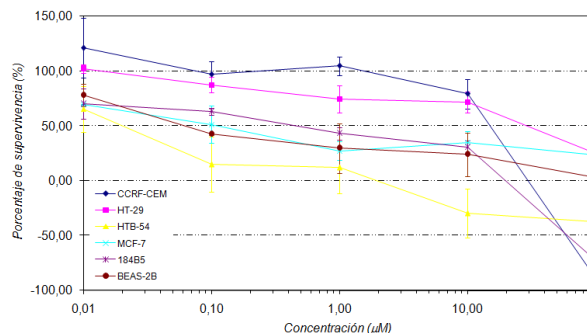
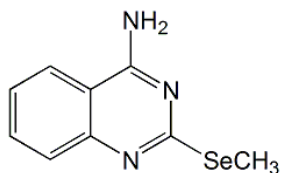


Figura 177: Curvas dosis-respuesta para el compuesto IV.11.



LINEAS CELULARES	PARAMETROS CITOTOXICOS		
	$GI_{50}$ ( $\mu M$ )	$TGI$ ( $\mu M$ )	$LD_{50}$ ( $\mu M$ )
CCRF-CEM	65	>100	>100
HTB-54	18	89	>100
HT-29	28	75	>100
MCF-7	46	>100	>100
184B5	<b>24</b>	<b>59</b>	<b>94</b>
BEAS-2B	<b>24</b>	<b>54</b>	<b>85</b>

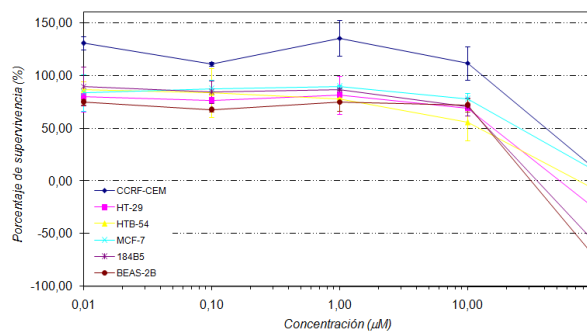
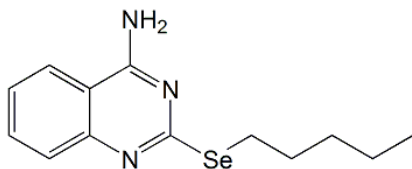


Figura 178: Curvas dosis-respuesta para el compuesto IV.12.



LINEAS CELULARES	PARAMETROS CITOTOXICOS		
	$GI_{50}$ ( $\mu M$ )	$TGI$ ( $\mu M$ )	$LD_{50}$ ( $\mu M$ )
CCRF-CEM	35	68	>100
HTB-54	35	84	>100
HT-29	40	>100	>100
MCF-7	28	59	90
184B5	<b>15</b>	<b>44</b>	<b>72</b>
BEAS-2B	<b>52</b>	>100	>100

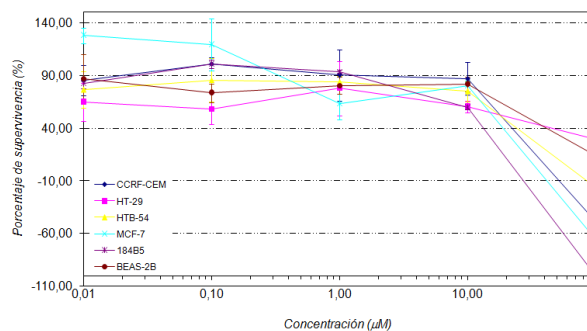
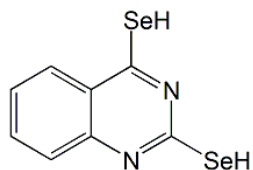


Figura 179: Curvas dosis-respuesta para el compuesto IV.13.



LINEAS CELULARES	PARAMETROS CITOTOXICOS		
	$GI_{50}$ ( $\mu M$ )	$TGI$ ( $\mu M$ )	$LD_{50}$ ( $\mu M$ )
CCRF-CEM	3,0	6,0	9,0
HTB-54	6,0	66	>100
HT-29	9,0	45	88
MCF-7	2,9	23	>100
184B5	0,5	2,5	6,6
BEAS-2B	n.d.	n.d.	n.d.

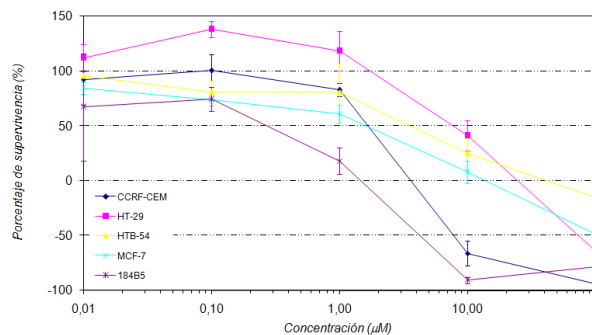
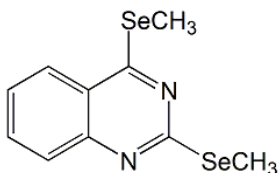


Figura 180: Curvas dosis-respuesta para el compuesto IV.14.



LINEAS CELULARES	PARAMETROS CITOTOXICOS		
	$GI_{50}$ ( $\mu M$ )	$TGI$ ( $\mu M$ )	$LD_{50}$ ( $\mu M$ )
CCRF-CEM	31	55	78
HTB-54	26	84	>100
HT-29	7,5	34	77
MCF-7	6,0	51	>100
184B5	71	>100	>100
BEAS-2B	n.d.	n.d.	n.d.

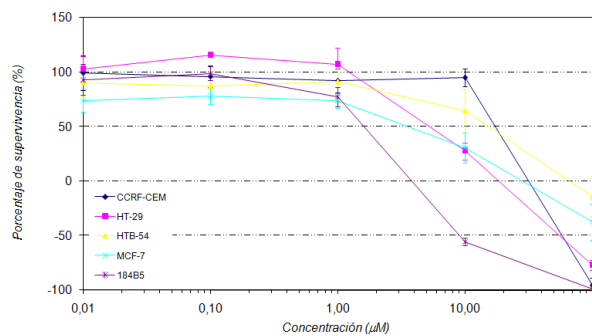
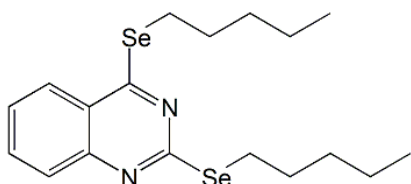


Figura 181: Curvas dosis-respuesta para el compuesto IV.15.



LINEAS CELULARES	PARAMETROS CITOTOXICOS		
	$GI_{50}$ ( $\mu M$ )	$TGI$ ( $\mu M$ )	$LD_{50}$ ( $\mu M$ )
CCRF-CEM	66	>100	>100
HTB-54	>100	>100	>100
HT-29	>100	>100	>100
MCF-7	38	95	>100
184B5	71	>100	>100
BEAS-2B	>100	>100	>100

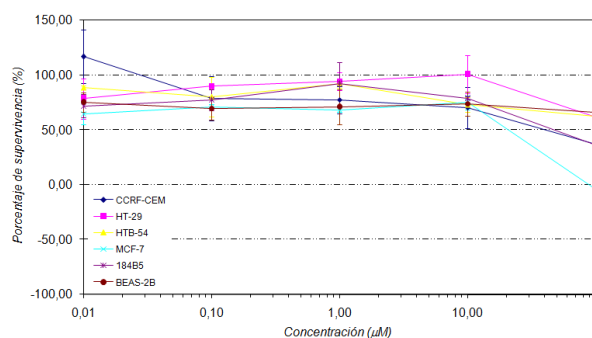
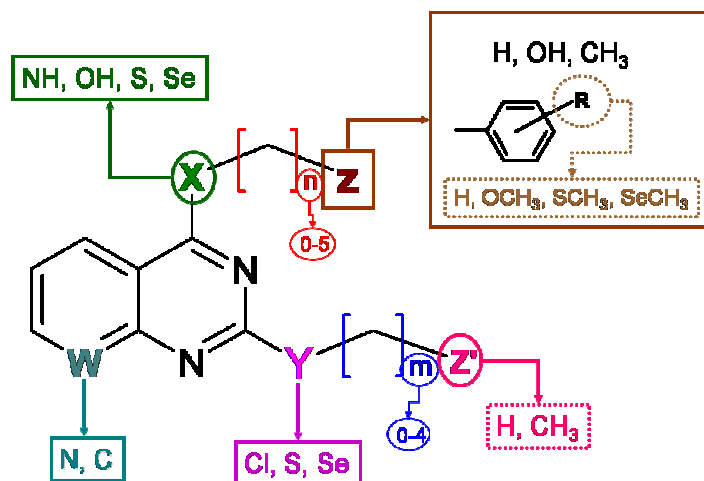


Figura 182: Curvas dosis-respuesta para el compuesto IV.16.

### 3. ESTUDIOS DE RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD (SAR)

Haciendo referencia a los objetivos planteados con anterioridad, se ha trabajado por síntesis en las variaciones estructurales que se esquematizan en la figura 183. Los resultados obtenidos previamente por el grupo y los expuestos en este trabajo permiten establecer algunas relaciones estructura-actividad para diseñar nuevos compuestos con una actividad biológica previsiblemente más potente:



**Figura 183:** Variaciones estructurales llevadas a cabo en el trabajo que se describe en esta Memoria.

Estudios anteriores realizados por nuestro grupo de investigación han concluido que, en general, los derivados de quinazolina muestran una actividad citotóxica más elevada que sus análogos de pirido[2,3-*d*]pirimidina (Cubedo, E., 2006; Cordeu, L., 2007; Font, M., 2011). Por ello, se ha decidido explorar la posibilidad de modular la estructura de los derivados de quinazolina con las siguientes variaciones estructurales:

1. Dado que sólo se dispone de datos sobre derivados de quinazolina sustituidos por alquilaminas y arilalquilaminas en posiciones 2 y 4 y resultados con las series análogas de pirido[2,3-*d*]pirimidinas en las que se tolera la presencia de restos alquiltio en posición 2, se realiza una exploración sobre la influencia de la presencia en dicha posición 2 de un heteroátomo de S o Se, con efecto aceptor de puentes de hidrógeno (AH), mientras en posición 4 se mantienen los restos de alquil y/o arilalquilamina. Mediante el diseño expuesto se produce una pérdida de la simetría molecular, siempre entendiendo la simetría en un concepto amplio (como se comentó en los objetivos). Con estos cambios estructurales se pretende, en cierta manera, provocar una modificación en la solubilidad de las moléculas, a través de la modificación de su momento dipolar total. A pesar de tener un AlogP más alto, como el momento dipolar está muy influenciado por la asimetría y la colocación de elementos estructurales claves, se modifica en teoría la solubilidad haciéndolos más polares (Zink, M., 2004; Sanmartín, C., 2006).

Nuestro grupo investigador ha observado, en estudios anteriores, que las actividades más altas se obtienen cuando en posición 2 y 4 se introducen grupos bencilamina, por lo que el tamaño de la cadena alifática de la amina influye en la actividad mostrada. Debido a ello, se introduce en posición 4 del núcleo de quinazolina el grupo bencilamina.

Paralelamente, se ha trabajado sobre la posición 2 sustituyéndola por restos alquiltio o alquilselenu y dejando en posición 4, preferentemente, el grupo NH<sub>2</sub>, apto como dador de puentes de hidrógeno (DH). La sustitución de alquilaminas y arilalquilaminas por NH<sub>2</sub> se ha hecho en base a la búsqueda del fragmento mínimo eficaz y se han sintetizado estos derivados para corroborar si, efectivamente, las observaciones hechas sobre otras series del grupo se cumplen aquí. Los resultados obtenidos muestran que la sustitución en posición 4 de aminas sustituidas mejora la actividad con respecto al grupo NH<sub>2</sub>.

2. Dado que en las pirido[2,3-*d*]pirimidinas de referencia (figura 39), los sustituyentes electrodonantes parecen mejorar la actividad de los compuestos (Cordeu, L., 2007) y, pese a que en las series de quinazolina de referencia (figura 52) los fenilos sin sustituir son de elección (Cubedo, E., 2006), se eligen restos de fenilo con sustituyentes electrodonantes y con heteroátomos capaces de actuar como AH (OCH<sub>3</sub>, SCH<sub>3</sub>, SeCH<sub>3</sub>). Los datos reflejan la tendencia hacia un decrecimiento en la actividad biológica a medida que el carácter electrodonante y la capacidad de actuar como AH disminuye (fenilos con SeCH<sub>3</sub> en posición 4 actividad inferior a SCH<sub>3</sub> o OCH<sub>3</sub>).

En relación a los derivados de pirido[2,3-*d*]pirimidina, estudios realizados con anterioridad por el grupo de investigación han concluido que:

1. Si se mantiene W=N mientras que X es NH (dador de puentes de hidrógeno), Y es S (aceptor de puentes de hidrógeno) y estudiando la longitud de la cadena alifática en posición 2 y 4, se concluye que la cadena mejor es la de pentilo. Los datos reflejan que se tolera la presencia de S con cadenas de distinta longitud en posición 2 siempre que en 4 haya un NH, por lo que la presencia de un dador en posición 4 es indispensable para una buena actividad. Esto permite valorar la conveniencia de introducir también en posición 2 un DH, obteniendo los derivados dialquilamino, en los que se ratifica la conveniencia de que sean cadenas con 4-5 átomos de C para mejorar la actividad biológica objetivo (Font, M., 2011).

En el presente trabajo, se ha estudiado el efecto de sustituir el NH de la posición 4 por un heteroátomo de S o Se, AH, aún teniendo la cadena alquílica adecuada. Los resultados demuestran que en posición 4 debe haber un DH y corroboran que en posición 2 se tolera un AH, siempre que la longitud de la cadena alifática sea la óptima.



2. Considerando la longitud/tamaño de la cadena unida al núcleo de pirido[2,3-*d*]pirimidina, estudios anteriores concluyen que derivados de pirido[2,3-*d*]pirimidina sustituidos en las posiciones 2 y 4 por aminas con una cadena alifática de entre 4-5 átomos de C poseen las actividades más altas, siendo éstas similares a las que se obtienen si en las posiciones 2 y 4 se encuentran grupos bencilamina. Se observa que los mejores resultados son para derivados de bencilamina sustituidos por un grupo electrodonante en 4. Además, cuando hay grupos OH terminales en la cadena alifática la actividad desaparece, con valores de AlogP fuera del intervalo de solubilidad aceptable ( $AlogP < 5$ ), según las reglas de Lipinski (Font, M., 2011).

En este trabajo, se ha mantenido en posición 4 de la estructura de pirido[2,3-*d*]pirimidina el grupo arilalquilamina y se han seleccionado las diferentes aminas entre las más activas de las series precedentes. Se han introducido los grupos  $OCH_3$ ,  $SCH_3$  como ejemplos de grupos en los que se modula el carácter dador de electrones y la capacidad de estos átomos de actuar como AH. En la posición 2 se ha jugado con el carácter de AH de S y Se, ya que en las series precedentes se ha comprobado que esta sustitución se tolera. Se demuestra que, de forma general, la presencia de un grupo electrodonante en 4 mejora la actividad, aunque la introducción en 2 de S o Se hace que la actividad disminuya con respecto a los derivados 2,4 diarilalquilamino. Además, se corrobora que la presencia de grupos OH terminales en la cadena disminuye a la actividad biológica.

Con respecto a la búsqueda del fragmento mínimo eficaz:

1. Se toman estructuras de productos de referencia como Piritrexim y Trimetrexato (comentados con anterioridad en el apartado de antecedentes y justificación: figuras 36 y 48, respectivamente). En ambas se observa que sobre las posiciones 2 y 4 del núcleo central hay sustituidos grupos  $NH_2$  a los que les atribuimos la actividad como DH.
2. Se plantea la simplificación progresiva de las moléculas, primero valorando la eliminación de uno de los sustituyentes en 2 y/o 4 y después valorando la eliminación de ambos sustituyentes, dejando sólo elementos, heteroátomos, a los que se ha atribuido un papel importante en la actividad relacionada con su carácter aceptor/dador de puentes de hidrógeno.

Tras la evaluación biológica de estas estructuras se puede concluir que:

1. Se prefiere en posición 4 de las estructuras de quinazolina y pirido[2,3-*d*]pirimidina grupos de arilalquilaminas con sustituyentes electrodonantes en lugar del grupo  $NH_2$ . Ya que los grupos electrodonantes pueden actuar como AH estabilizando la molécula.
2. Cuando en posición 4 de los núcleos de quinazolina y pirido[2,3-*d*]pirimidina hay un grupo  $NH_2$  se observa una tendencia hacia una mejor actividad si en posición 2 están sustituidos los

grupos SH o SeH en vez de SCH<sub>3</sub>, S-pentilo, SeCH<sub>3</sub> o Se-pentilo. Los hidrógenos de los grupos SH y SeH pueden estar implicados en la formación de puentes de hidrógeno y proporcionar un carácter DH a la molécula. Por otro lado, los resultados obtenidos sugieren la posibilidad de que los grupos SH y SeH intervengan en la formación de puentes disulfuro o puentes mixtos sulfuro-seleniuro con diversas proteínas, como quinasas y fosfatasa, que podrían modular su actividad biológica. Además, el aumento en la longitud de la cadena alifática hace que se obtengan valores de AlogP>5 (fuera del intervalo óptimo de solubilidad: AlogP<5). Al mismo tiempo se prefiere en posición 4 los heteroátomos S o Se al grupo NH<sub>2</sub>, por lo que se corrobora lo comentado anteriormente que en posiciones 2 y 4 la actividad mejora cuando hay un DH.

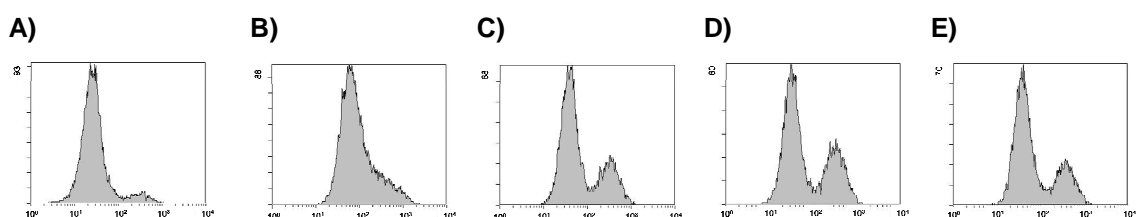
#### 4. DETERMINACIÓN DE MUERTE CELULAR

Se ha determinado la capacidad de inducción de muerte celular de los compuestos líderes I.3, IV.7 y IV.14 en la línea celular MCF-7, ya que ha resultado ser la línea celular más sensible a estos compuestos. Dicha actividad se ha determinado por citometría de flujo utilizando el kit *ApoDirect*<sup>TM</sup>, basado en el efecto TUNEL. Mediante este procedimiento se evalúa la fluorescencia imitada por el yoduro de propidio en escala logarítmica.

Los estudios se han realizado utilizando diferentes concentraciones de los compuestos y distintos tiempos de incubación con el fármaco. Se utiliza la camptotecina como control positivo a una concentración 25 µM en todos los ensayos realizados, así como un control negativo al que se añade DMSO. Los experimentos se han realizado para cada compuesto al menos tres veces independientes, en los cuales cada compuesto se determina por duplicado.

##### 4.1 ESTUDIOS DE MUERTE CELULAR A DISTINTOS TIEMPOS

Se han realizado estudios para determinar la capacidad de los compuestos de inducir muerte celular utilizando una concentración fija de los compuestos a evaluar de 10 µM durante 4, 12, 24 y 48 horas de tratamiento. A continuación aparece el resultado obtenido en uno de los experimentos realizado a 24 horas y una concentración de los compuestos 10 µM.



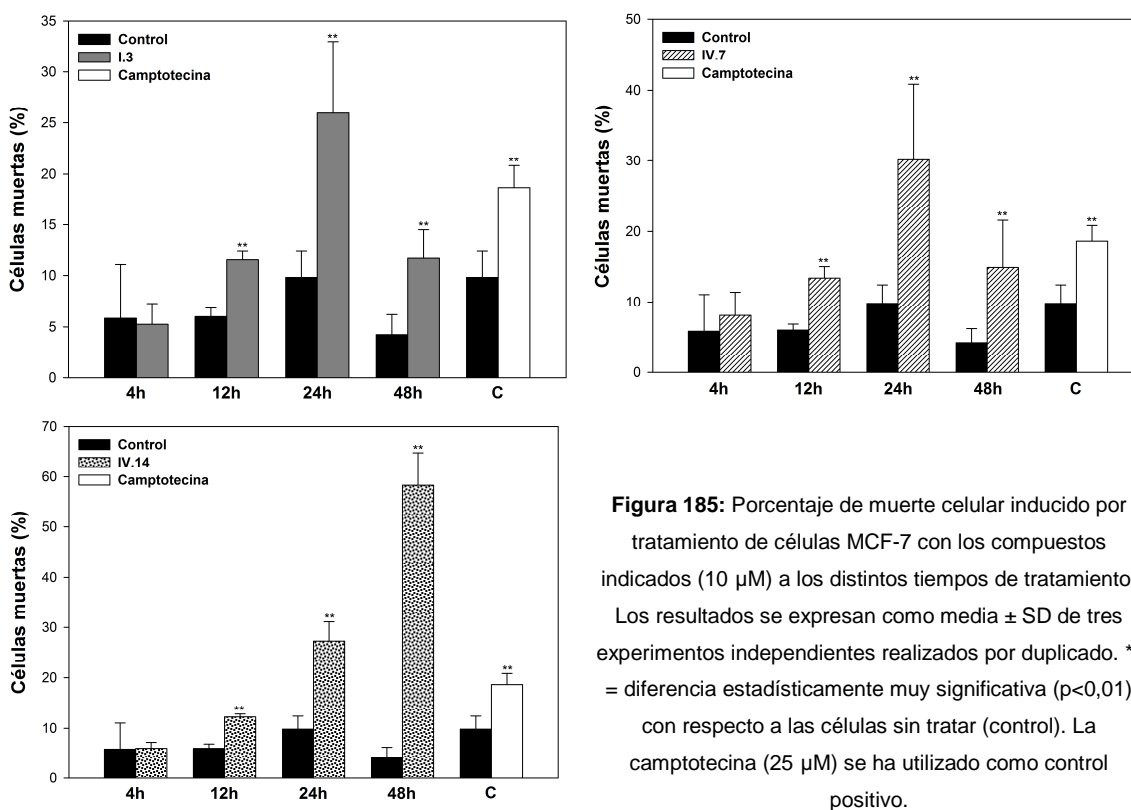
**Figura 184:** Análisis por citometría de flujo de un experimento representativo de la inducción de muerte celular para las células no tratadas (control) (A) y tratadas con camptotecina (B), I.3 (C), IV.7 (D) y IV.14 (E). En el eje de abscisas se representa la fluorescencia debida al yoduro de propidio en escala logarítmica y en el eje de ordenadas los eventos.

En la tabla 11 y figura 185 se muestran los porcentajes de muerte celular tras el tratamiento con los compuestos a distintos tiempos.

**Tabla 11:** Porcentaje de muerte celular inducido por tratamiento de células MCF-7 con los compuestos indicados (10  $\mu$ M) a los distintos tiempos de tratamiento. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes realizados por duplicado. \*\* = diferencia estadísticamente muy significativa ( $p < 0,01$ ) con respecto a las células sin tratar (control). La camptotecina (25  $\mu$ M) se ha utilizado como control positivo.

TIEMPO	MUERTE CELULAR (%)				
	Control	I.3	IV.7	IV.14	Camptotecina
4 h	6 $\pm$ 5	5 $\pm$ 2	8 $\pm$ 3	6 $\pm$ 1	7 $\pm$ 1
12 h	6 $\pm$ 1	12** $\pm$ 1	13** $\pm$ 2	12** $\pm$ 1	11** $\pm$ 1
24 h	10 $\pm$ 3	26** $\pm$ 7	30** $\pm$ 2	27** $\pm$ 4	19** $\pm$ 1
48 h	4 $\pm$ 2	12** $\pm$ 3	15** $\pm$ 7	58** $\pm$ 6	46** $\pm$ 3

Como se observa en la tabla 11 y figura 185 los 3 compuestos evaluados inducen muerte celular dependiente del tiempo. Tras 12 horas de tratamiento con los compuestos, el porcentaje de células muertas ha sido 2 veces superior al de las células control mientras que a 24 horas el valor obtenido es en torno a 4 veces más alto para los derivados testados.

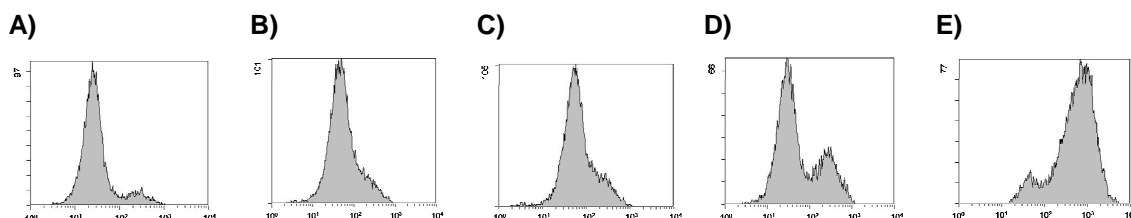


**Figura 185:** Porcentaje de muerte celular inducido por tratamiento de células MCF-7 con los compuestos indicados (10  $\mu$ M) a los distintos tiempos de tratamiento. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes realizados por duplicado. \*\* = diferencia estadísticamente muy significativa ( $p < 0,01$ ) con respecto a las células sin tratar (control). La camptotecina (25  $\mu$ M) se ha utilizado como control positivo.

Al prolongar el tiempo de tratamiento hasta 48 horas, el porcentaje de muerte celular inducido por los compuestos I.3 y I.7 disminuye, lo que sugiere que las células pueden llegar a metabolizar estos compuestos o bien degradarse con el tiempo. Por el contrario, el compuesto IV.14 aumenta considerablemente el porcentaje de células muertas a las 48 horas, siendo este valor 14 veces superior al mostrado por las células control.

**4.2 ESTUDIOS DE MUERTE CELULAR A DISTINTAS CONCENTRACIONES**

Se han realizado estudios de muerte celular utilizando distintas concentraciones de los compuestos a evaluar: 1, 5 10, 15 y 20  $\mu\text{M}$  durante 24 horas de tratamiento. A continuación aparece el resultado obtenido en uno de los experimentos realizado a 24 horas y una concentración de los compuestos 20  $\mu\text{M}$ .



**Figura 186:** Análisis por citometría de flujo de un experimento representativo de la inducción de muerte celular para las células no tratadas (control) (A) y tratadas con camptotecina (B), I.3 (C), IV.7 (D) y IV.14 (E). En el eje de abscisas se representa la fluorescencia debida al yoduro de propidio en escala logarítmica y en el eje de ordenadas los eventos.

La tabla 12 y la figura 187 muestran el porcentaje de células muertas inducido por los compuestos seleccionados a diferentes concentraciones de compuesto y 24 horas de tratamiento.

**Tabla 12:** Porcentaje de muerte celular inducido por tratamiento de células MCF-7 con los compuestos indicados a diferentes concentraciones y 24 horas de tratamiento. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes realizados por duplicado. \*\* = diferencia estadísticamente muy significativa ( $p < 0,01$ ) con respecto a las células sin tratar (control). \* = diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) con respecto a las células sin tratar (control). La camptotecina (25  $\mu\text{M}$ ) se ha utilizado como control positivo.

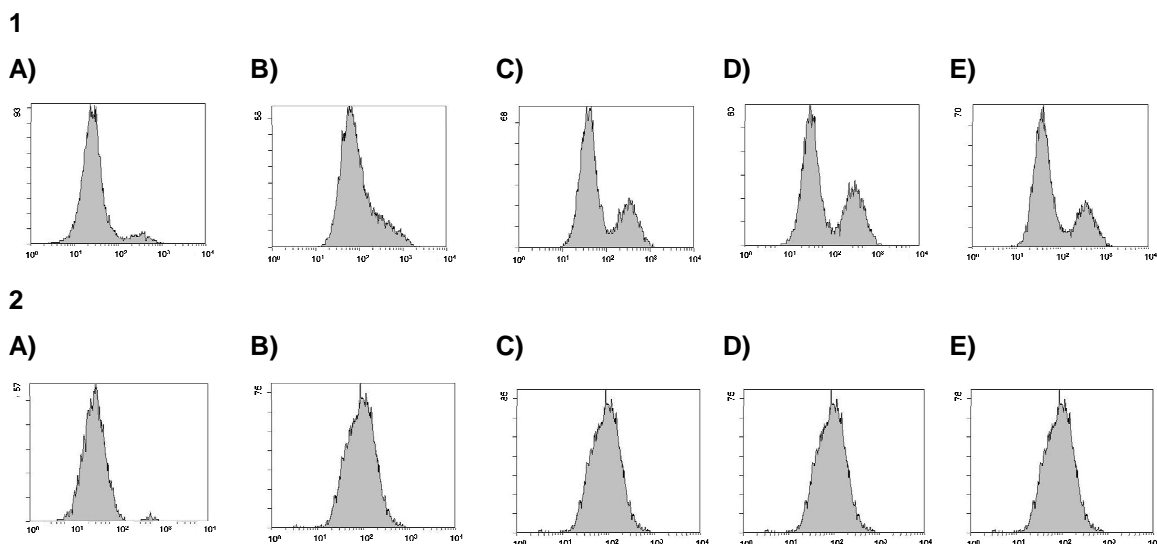
[Comp.]	MUERTE CELULAR (%)				
	Control	I.3	IV.7	IV.14	Camptotecina
1 $\mu\text{M}$	6 $\pm$ 2	3 $\pm$ 1	4 $\pm$ 1	3 $\pm$ 1	17** $\pm$ 1
5 $\mu\text{M}$	9 $\pm$ 2	14* $\pm$ 2	14 $\pm$ 4	16** $\pm$ 2	13* $\pm$ 2
10 $\mu\text{M}$	10 $\pm$ 3	26** $\pm$ 7	30** $\pm$ 7	27** $\pm$ 4	19** $\pm$ 1
15 $\mu\text{M}$	5 $\pm$ 4	24** $\pm$ 7	25** $\pm$ 6	77** $\pm$ 2	21** $\pm$ 4
20 $\mu\text{M}$	9 $\pm$ 1	23** $\pm$ 2	31** $\pm$ 1	88** $\pm$ 7	18** $\pm$ 1



Se observa que los 3 compuestos evaluados inducen muerte celular dependiente de la concentración, ya que a medida que aumentamos la concentración de compuesto el porcentaje de muerte celular aumenta. En el caso de los derivados I.3 y IV.7 llega un punto en el cual aunque la concentración de compuesto aumente no se induce más muerte celular y, en consecuencia, el porcentaje de muerte celular permanece constante. Por el contrario, en presencia del derivado IV.14, sigue aumentando el porcentaje de muerte celular inducido alcanzando valores en torno al 90 % de células muertas a una concentración 20  $\mu\text{M}$ , lo que demuestra que es un potente inductor de muerte celular.

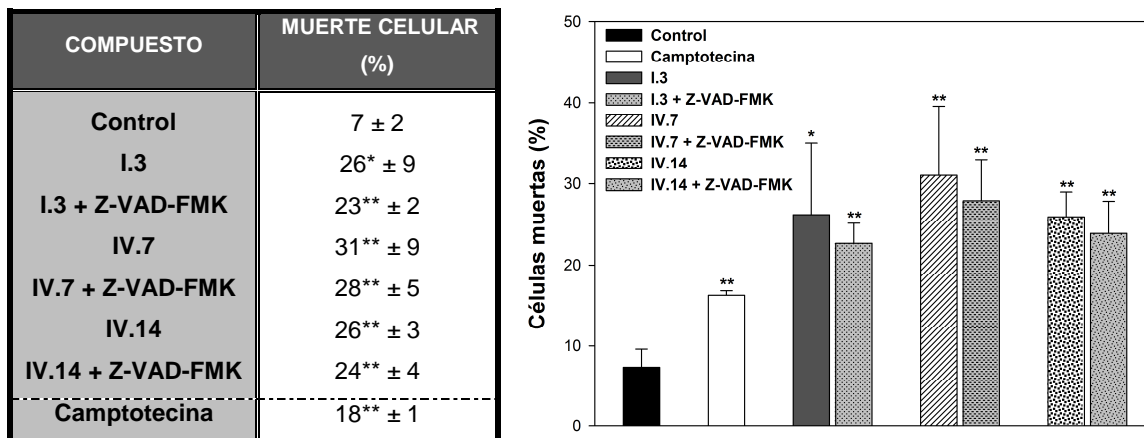
#### 4.3 ESTUDIOS DE MUERTE CELULAR EN PRESENCIA DE Z-VAD-FMK

Se han realizado estudios para determinar la muerte celular en presencia de un inhibidor general de caspasas, Z-VAD-FMK. La concentración de inhibidor utilizada en los ensayos ha sido de 25  $\mu\text{M}$  y los ensayos se han realizado a una concentración de compuesto de 10  $\mu\text{M}$  durante 24 horas. En la figura 188 aparece el resultado obtenido en uno de los experimentos en ausencia (1) y en presencia (2) de Z-VAD-FMK.



**Figura 188:** Análisis por citometría de flujo de un experimento representativo de la inducción de muerte celular en ausencia (1) y en presencia (2) de Z-VAD-FMK para las células no tratadas (control) (A) y tratadas con camptotecina (B), I.3 (C), IV.7 (D) y IV.14 (E). En el eje de abscisas se representa la fluorescencia debida al ioduro de propidio en escala logarítmica y en el eje de ordenadas los eventos.

La figura 189 muestra el porcentaje de muerte celular inducido por los compuestos (10  $\mu$ M) tras 24 horas de tratamiento en presencia y ausencia del inhibidor general de caspasas Z-VAD-FMK (25  $\mu$ M).



**Figura 189:** Porcentaje de muerte celular inducido por tratamiento de células MCF-7 con los compuestos indicados (10  $\mu$ M) tras 24 horas de tratamiento en presencia y ausencia de Z-VAD-FMK. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes realizados por duplicado. \*\* = diferencia estadísticamente muy significativa ( $p < 0,01$ ) con respecto a las células sin tratar (control). \* = diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) con respecto a las células sin tratar (control). La camptotecina (25  $\mu$ M) se ha utilizado como control positivo.

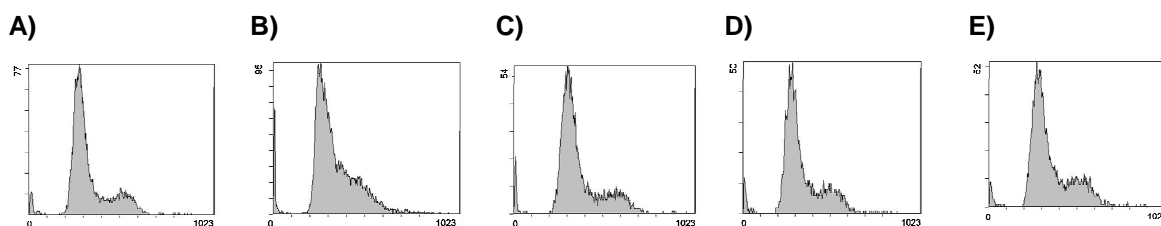
Los resultados obtenidos reflejan que los 3 compuestos testados producen muerte celular dependiente del tiempo tratamiento y de la concentración de compuesto. Además, sigue produciéndose muerte celular en presencia del inhibidor general de caspasas Z-VAD-FMK. Estos resultados parecen indicar que la muerte celular se produce de una forma programada y que las caspasas no están implicadas en el proceso de muerte celular, ya que los niveles de

muerte celular obtenidos en presencia del inhibidor son muy similares a los obtenidos en ausencia de éste.

## 5. ALTERACIÓN DEL CICLO CELULAR

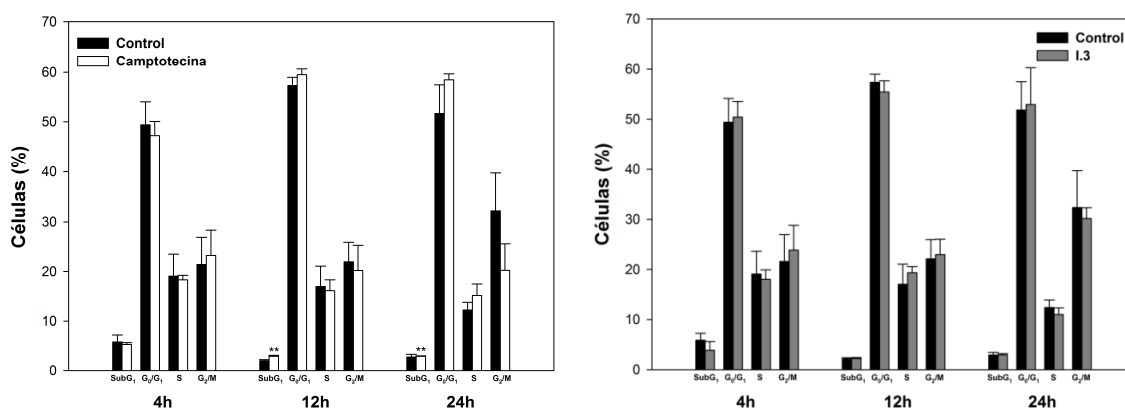
Se conoce que varios compuestos quimioterápicos, entre ellos la camptotecina y varios derivados de selenio, alteran el ciclo celular en alguna de sus fases, siendo éste uno de sus principales mecanismos de acción. Se ha determinado, mediante citometría de flujo, la capacidad de los compuestos seleccionados de afectar al ciclo celular en la línea celular MCF-7 después de 4, 12 y 24 horas de tratamiento. La camptotecina se ha utilizado como control positivo en los ensayos realizados a una concentración 25  $\mu\text{M}$ .

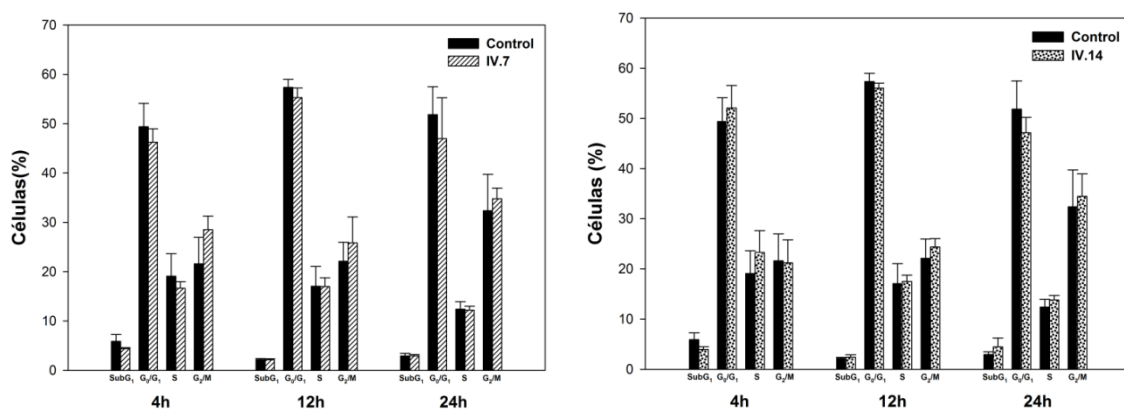
En la figura 190 aparece el resultado obtenido en uno de los experimentos representativos del análisis del ciclo celular realizado a 24 horas y una concentración de los compuestos 10  $\mu\text{M}$ .



**Figura 190:** Análisis por citometría de flujo de un experimento representativo del análisis del ciclo celular para las células no tratadas (control) (A) y tratadas con camptotecina (B), I.3 (C), IV.7 (D) y IV.14 (E). En el eje de abscisas se representa la fluorescencia debida al yoduro de propidio en escala logarítmica y en el eje de ordenadas los eventos.

La tabla 13 y la figura 191 muestran los valores obtenidos en las diferentes etapas del ciclo celular.





**Figura 191:** Porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular tras 4, 12 y 24 horas de tratamiento con los compuestos. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes realizados por duplicado. \*\* = diferencia estadísticamente muy significativa ( $p < 0,01$ ) con respecto a las células sin tratar (control). La camptotecina (25  $\mu$ M) se ha utilizado como control positivo.

**Tabla 13:** Porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular tras 4, 12 y 24 horas de tratamiento con los compuestos. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes realizados por duplicado. \*\* = diferencia estadísticamente muy significativa ( $p < 0,01$ ) con respecto a las células sin tratar (control). La camptotecina (25  $\mu$ M) se ha utilizado como control positivo.

COMPUESTO	TIEMPO	SubG <sub>1</sub>	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
Control	4 h	6 $\pm$ 1	49 $\pm$ 5	19 $\pm$ 4	22 $\pm$ 5
	12 h	2 $\pm$ 1	57 $\pm$ 2	17 $\pm$ 4	22 $\pm$ 4
	24 h	3 $\pm$ 1	52 $\pm$ 6	12 $\pm$ 2	32 $\pm$ 8
I.3	4 h	4 $\pm$ 2	50 $\pm$ 3	18 $\pm$ 2	24 $\pm$ 5
	12 h	2 $\pm$ 1	55 $\pm$ 2	19 $\pm$ 1	23 $\pm$ 3
	24 h	3 $\pm$ 1	53 $\pm$ 7	11 $\pm$ 1	30 $\pm$ 2
IV.7	4 h	4 $\pm$ 1	46 $\pm$ 3	17 $\pm$ 1	28 $\pm$ 3
	12 h	2 $\pm$ 1	55 $\pm$ 2	17 $\pm$ 2	26 $\pm$ 5
	24 h	3 $\pm$ 1	47 $\pm$ 8	12 $\pm$ 1	35 $\pm$ 2
IV.14	4 h	4 $\pm$ 1	52 $\pm$ 4	23 $\pm$ 4	21 $\pm$ 6
	12 h	2 $\pm$ 1	56 $\pm$ 1	18 $\pm$ 1	26 $\pm$ 2
	24 h	3 $\pm$ 2	48 $\pm$ 4	16 $\pm$ 1	35 $\pm$ 5
Camptotecina	4 h	5 $\pm$ 1	47 $\pm$ 3	18 $\pm$ 1	23 $\pm$ 5
	12 h	3** $\pm$ 1	59 $\pm$ 1	16 $\pm$ 2	20 $\pm$ 5
	24 h	3** $\pm$ 1	58 $\pm$ 1	15 $\pm$ 2	20 $\pm$ 5



Se puede observar que los compuestos no producen modificaciones significativas en ninguna de las etapas del ciclo celular obteniéndose datos muy similares a los del control.

## 6. EVALUACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS COMPUESTOS EN LA MUERTE CELULAR

Como ha quedado reflejado en el apartado 4 los tres derivados evaluados (I.3, IV.7 y IV.14) producen muerte celular dependiente de la concentración y del tiempo de tratamiento, por lo que se han realizado estudios para determinar qué proteínas están implicadas en la muerte celular y poder conocer la posible vía de acción de los compuestos.

### 6.1 REGULACIÓN DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE PI3K/AKT Y MAPK DE LAS CÉLULAS EN CONDICIONES NORMALES

AKT está implicada en muchas de las vías de señalización que controlan el crecimiento y la supervivencia celular (Wendel, H.G., 2004; Hwang, S.O., 2009).

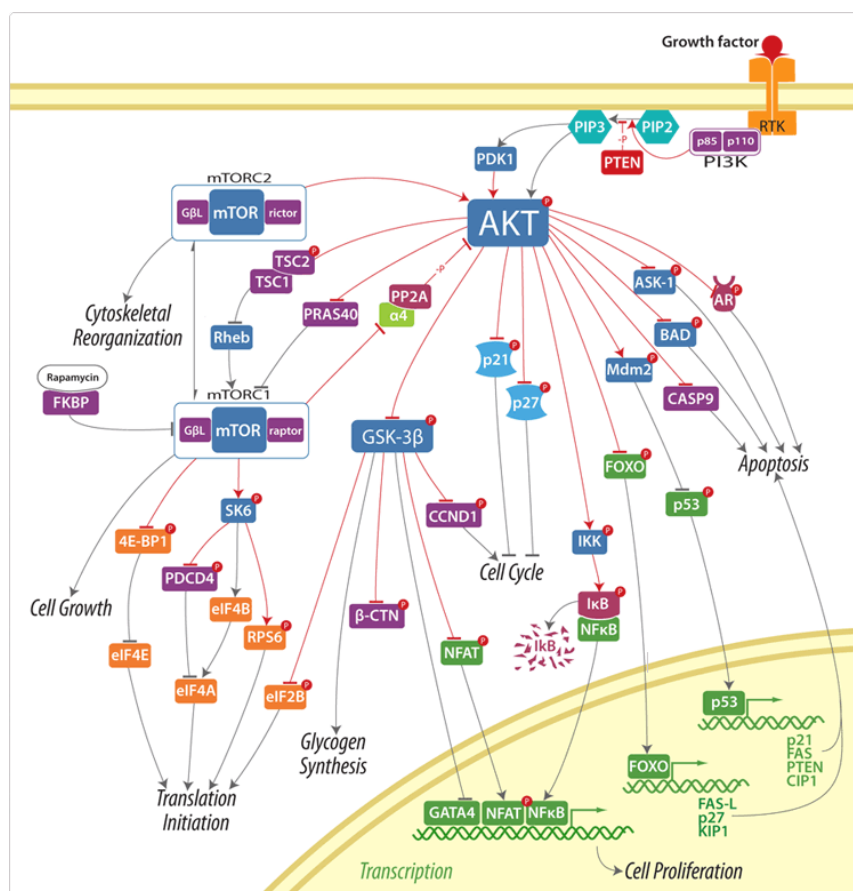
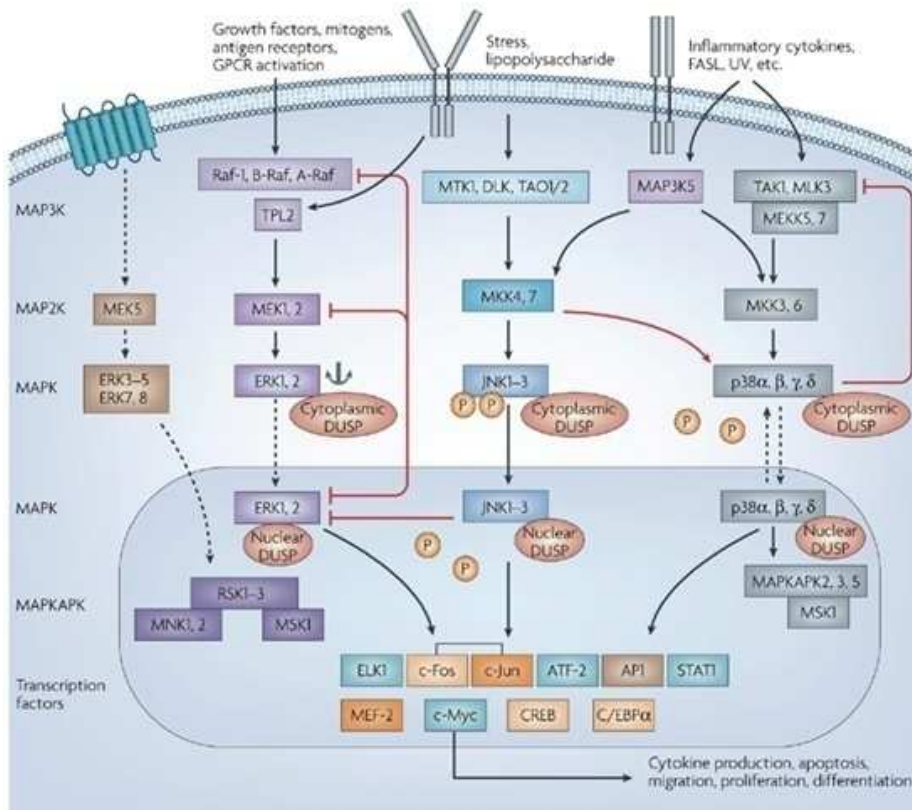


Figura 192: Cascada de señalización de PI3K/AKT. Imagen tomada

de: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Cell-and-Tissue-Analysis/Signaling-Pathways/Akt.html>

La activación de esta proteína, mediante fosforilación, se ha visto que inhibe la apoptosis por inactivación de proteínas pro-apoptóticas como Bad (Sun, X., 2008) promoviendo la supervivencia (Lee, J.E., 2011). Por otro lado, la activación de ERK es necesaria para la proliferación y diferenciación celular (Chambard, J.C., 2007), activación que se lleva a cabo por fosforilación de sus dos residuos de tirosina y treonina. Inhibidores de la ruta de señalización de ERK están actualmente en ensayos clínicos como potentes agentes antitumorales, ya que una activación de ERK trae consigo un descenso en la apoptosis (Nakata, K., 2011). El proceso apoptótico está regulado también por JNK. La activación de JNK por fosforilación está asociada con inducción de apoptosis (Cross, T.G., 2000) aunque también se ha observado un incremento en la supervivencia celular y una alteración en la proliferación. La activación de JNK trae consigo un gran número de alteraciones genéticas y, en consecuencia, sus implicaciones en el desarrollo del cáncer son complejas (Karin, M., 2005; Weston, C.R., 2007).



**Figura 193:** Cascada de señalización de MAPK. Imagen tomada de: Jeffrey, K.L., Camps, M., Rommel, C., Mackay, C.R. Targeting-dual specificity phosphatases: manipulating MAPK kinase signaling and immune responses. *Nature Reviews Drug Discovery*; 6:391-403, 2007.

## 6.2 AFECTACIÓN DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN PI3K/AKT, SAPK/JNK Y MAPK EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7 TRAS UN TRATAMIENTO CON LOS COMPUESTOS

Se han realizado estudios para determinar la fosforilación de las proteínas AKT, JNK y ERK en células MCF-7 después de un tratamiento de 24 horas con los compuestos a diferentes concentraciones (2,5 y 5  $\mu$ M).

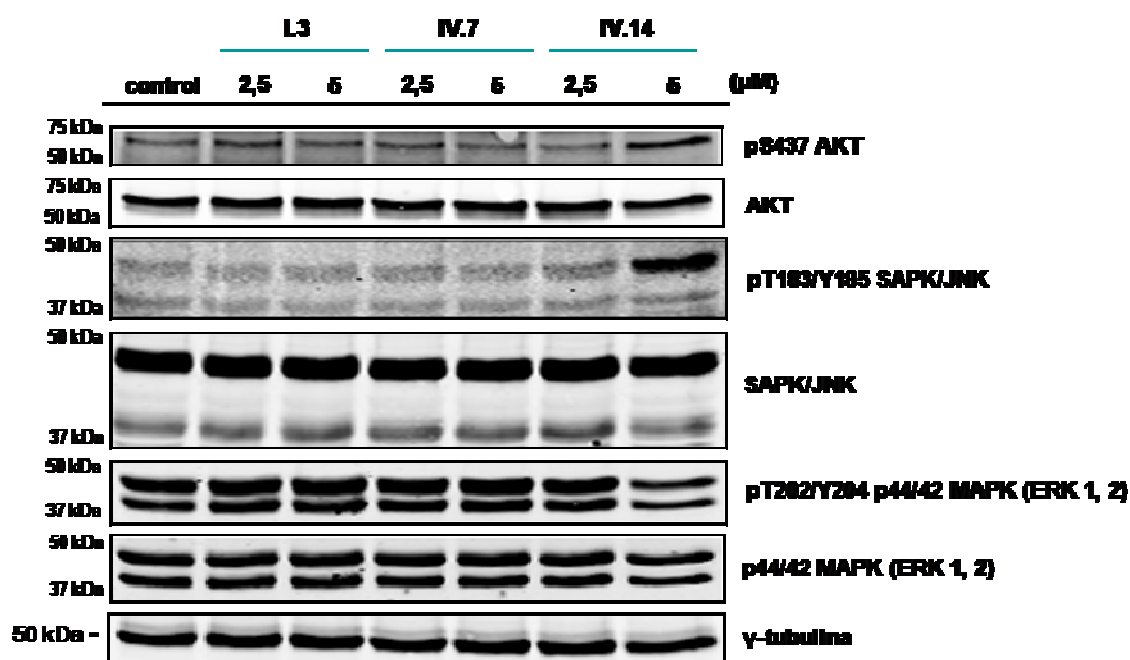


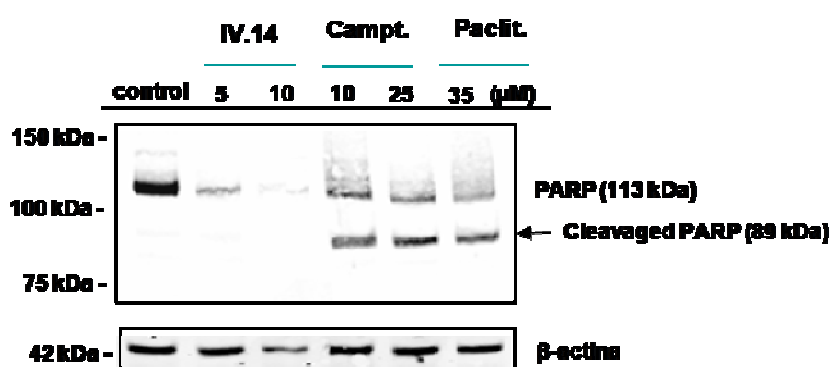
Figura 194: Niveles de fosforilación encontrados para las proteínas AKT, JNK y ERK en células MCF-7 tras un tratamiento con los compuestos de 24 horas a dos concentraciones.

Como se puede apreciar en la figura 194, en células tratadas con los derivados I.3 y IV.7 no aparecen cambios en los niveles de fosforilación de las proteínas ensayadas con respecto al control. Sin embargo, para las células tratadas con el compuesto IV.14 se aprecian cambios en los niveles de fosforilación de las proteínas a una concentración 5  $\mu$ M. Se observa un aumento de los niveles de fosforilación de AKT y JNK mientras que los niveles de fosforilación de ERK no parecen alterados o lo hacen levemente. Con estos resultados, se ha continuado ensayando más proteínas para poder determinar el posible mecanismo de acción del compuesto IV.14.

## 6.3 ANÁLISIS DE LA MODIFICACIÓN DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7 POR EL DERIVADO IV.14

Se ha determinado la fosforilación de diferentes proteínas implicadas en distintas vías de señalización al tratar las células con diferentes concentraciones del compuesto IV.14 durante 24 horas. Además de la actividad de AKT, JNK y ERK, que ya habían sido testadas previamente, se ha evaluado la actividad de proteínas como PARP, p38 MAPK y S6 ribosomal.

PARP es una familia de proteínas implicadas en la reparación del DNA (Sato, M.S., 2002) y en la muerte celular (Soldani, C., 2002). PARP-1 puede ser anclada por las caspasas produciendo la separación de dos dominios catalíticos, C-terminal y N-terminal, sirviendo el dominio catalítico C-terminal (89 kDa) (cleaved PARP) como marcador de apoptosis dependiente de caspasas, ya que el anclaje de PARP-1 a las caspasas produce su inactivación (Scovassi, A.I., 1998,1999; Sodhi, R.K., 2010). En la figura 195 se puede observar que para las células tratadas con el derivado IV.14 la cantidad de PARP disminuye con respecto al control y, además, no aparece el anclaje de PARP (89 kDa), mientras que para las células tratadas con camptotecina (10 y 25  $\mu$ M) y paclitaxel (35  $\mu$ M), usados como control positivo, sí que aparece. Esto refuerza la idea de que las caspasas no están implicadas en la muerte celular observada por el compuesto IV.14.

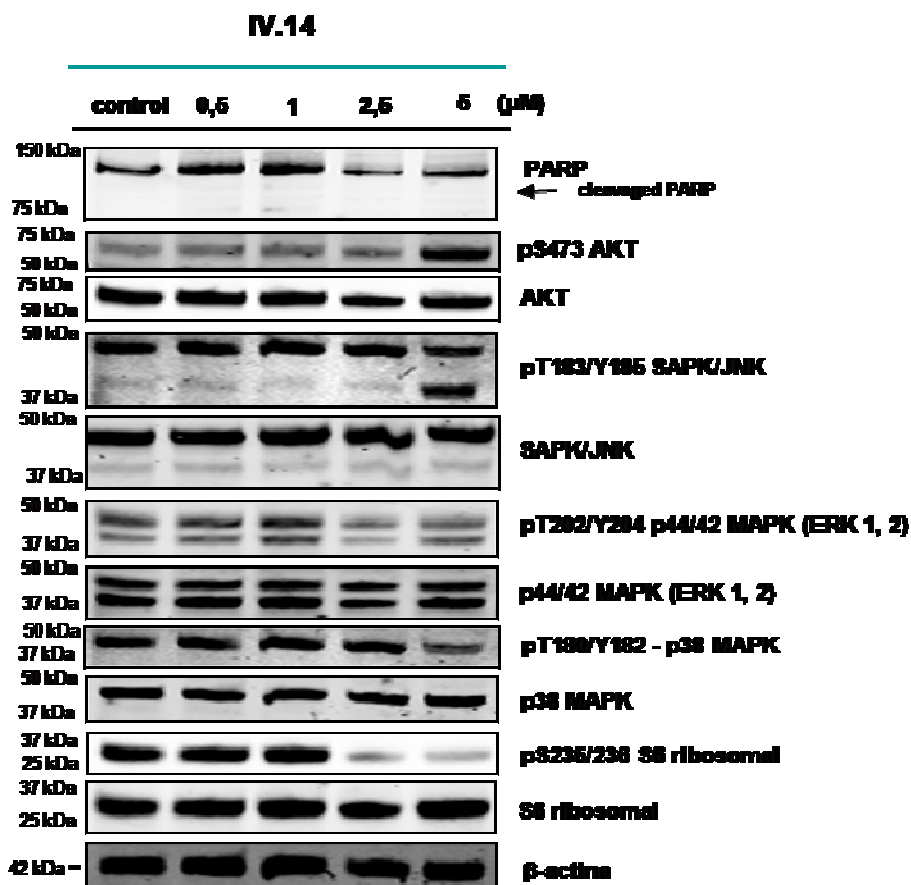


**Figura 195:** Niveles de fosforilación encontrados para la proteína PARP en células MCF-7 tras un tratamiento de 24 horas con el compuesto IV.14 (5 y 10  $\mu$ M) y los controles positivos camptotecina (10 y 25  $\mu$ M) y paclitaxel (35  $\mu$ M).

El aumento en los niveles de fosforilación de JNK (figura 196) estaría justificado, ya que su activación es requerida para la inducción de apoptosis en MCF-7 (Rotem-Dai, N., 2009). La vía de señalización de ERK no aparece afectada ya que la disminución en los niveles de fosforilación es inexistente o leve. Una actividad de ERK estaría asociada con inhibición de apoptosis (Cross, T.G., 2000). Además, la activación de ERK induce la fosforilación de eIF4E (factor 4E de iniciación a la traducción) incrementando la traducción (Waskiewicz, A.J., 1999; Chambard, J.C., 2007). La vía de señalización de p38 MAPK no parece afectada o lo hace levemente. Esta cascada regula múltiples procesos celulares como la proliferación, la supervivencia, la apoptosis y la regulación de la traducción (Wang, X., 1998; Takeda, K., 2002; Hsieh, C.C., 2004; Lee, K.H., 2009; Ohsawa., R., 2010).

Puesto que en la figura 196 se observa un aumento en los niveles de fosforilación de AKT y una disminución acusada en los niveles de fosforilación de S6 ribosomal, se han testado proteínas directamente implicadas en la actividad de AKT como PDK-1, GSK-3 $\beta$  y TSC-2. Se puede observar (figura 197) que no se producen cambios en los niveles de fosforilación de PDK-1 y GSK-3 $\beta$  mientras que sí se aprecia una disminución en la fosforilación de TSC-2. La tuberina es un producto formado por el gen supresor de tumores TSC-2 y un importante

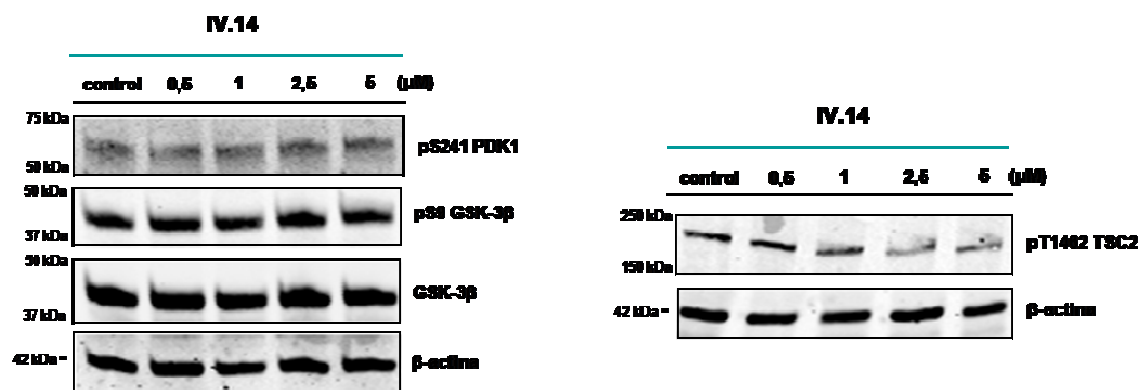
regulador de la proliferación celular y del desarrollo tumoral (Soucek, T., 1998; Han, J.M., 2011) y su actividad puede ser regulada por las principales cascadas de señalización como PI3K/AKT, ERK y MAPK (Han, J.M., 2011). Esta disminución en los niveles de fosforilación de TSC-2 es un indicador de que TSC-2 está activa. Cuando AKT está activa puede fosforilar TSC-2 inactivándola (Inoki, K., 2002; Han, J.M., 2011), por lo que la disminución en la fosforilación observada en TSC-2 indica que la proteína está activa y, por lo tanto, puede ser debido a que AKT está inactiva.



**Figura 196:** Niveles de fosforilación encontrados para las proteínas PARP, AKT, JNK, ERK p38 MAPK y s6 ribosomal en células MCF-7 tras un tratamiento de 24 horas con el compuesto IV.14 a diferentes concentraciones.

En la bibliografía consultada aparece una publicación en la cual un potente inhibidor de AKT, A-443654, induce una rápida fosforilación de AKT en la serina-473 inhibiendo la fosforilación de GSK-3 $\beta$ , m-TOR y TSC-2, substratos de AKT, de forma dependiente de la concentración y del tiempo. Se demuestra también una inactivación de S6 ribosomal en la serina 235/236 en células MCF-7 (Han, E.K.H., 2007), por lo que aunque los niveles de fosforilación aumentan, AKT no está activa. En nuestro caso, se ha observado un aumento en los niveles de fosforilación de AKT, pero ¿AKT está activa? Si AKT está activa fosforilaría a GSK-3 $\beta$  (Kwon, O., 2008) y TSC-2 inactivándolas y esto no ocurre, ya que en GSK-3 $\beta$  no se observa un aumento en la fosforilación y en TSC-2 hay una disminución (figura 197). PDK-1 fosforila directamente AKT (Toker, A., 2000; Heo, S.R., 2009) activándola. Los niveles de fosforilación

de PDK-1 indican que la actividad de esta proteína no está alterada, por lo que el compuesto IV.14 podría modificar la cascada de señalización a nivel de AKT y no antes. La inactivación de AKT corroboraría el hecho de que TSC-2 esté activo y S6 ribosomal inactivo como indica la disminución en los niveles de fosforilación de ambas proteínas.



**Figura 197:** Niveles de fosforilación encontrados para las proteínas PDK1, GSK-3β, TSC-2 en células MCF-7 tras un tratamiento de 24 horas con el compuesto IV.14 a diferentes concentraciones.

S6 ribosomal está implicado directamente en la proliferación y supervivencia celular y en la síntesis de proteínas (Fenton, T.R., 2011). Numerosos estudios muestran una relación entre la fosforilación de S6 ribosomal y una iniciación de la síntesis de proteínas seguida de estímulos nutricionales o mitógenos, lo que demuestra que la fosforilación de S6 ribosomal es requisito indispensable para la regulación de la síntesis proteica (Li, Y., 2007; Meyuhas, O., 2009). La disminución en los niveles de fosforilación de S6 ribosomal implica una menor síntesis de proteínas y una menor supervivencia celular, lo que está justificado ya que el derivado IV.14 produce muerte celular. Por otro lado, la activación de TSC-2, gen supresor de tumores, hace plantearse acerca de que el compuesto pueda activar TSC-2 frenando el crecimiento tumoral.

Con todos estos resultados obtenidos, la vía de señalización por la que podría actuar el derivado IV.14 sería PI3K/AKT (figura 198) y lo podría hacer inactivando AKT y en consecuencia S6 ribosomal y activando en gen supresor de tumores, TSC-2.

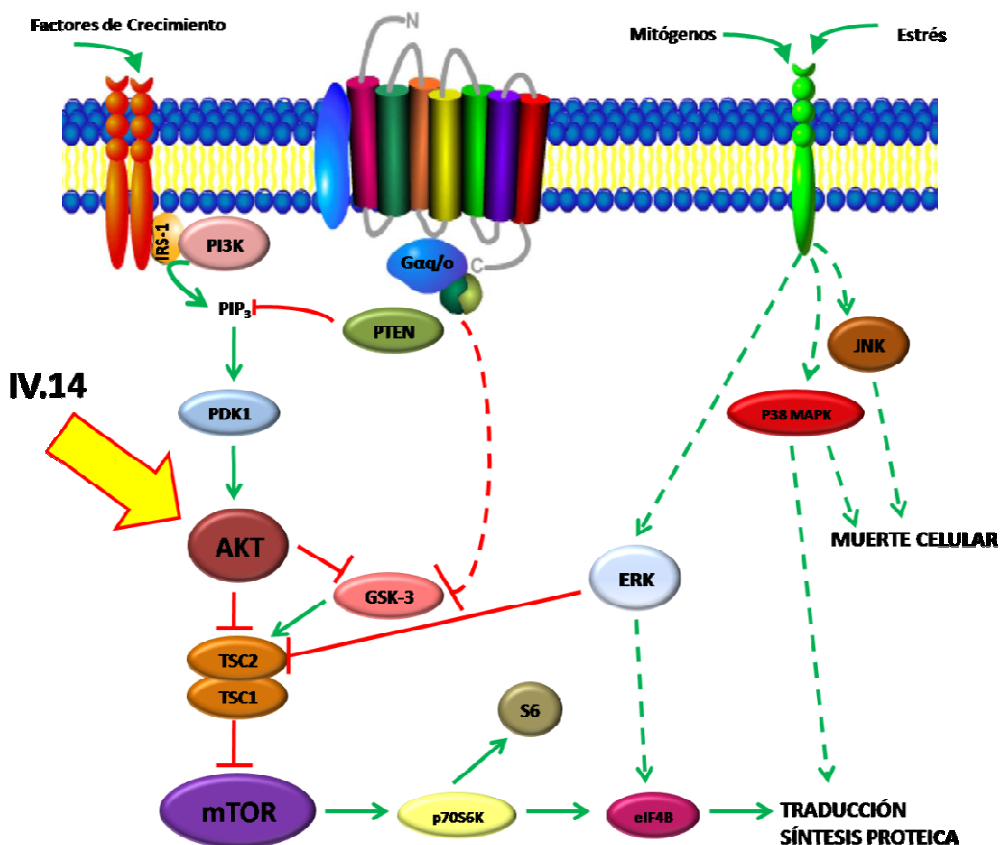
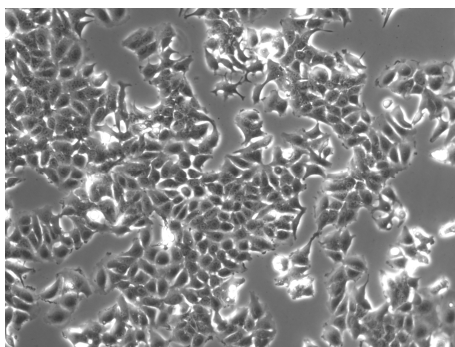


Figura 198: Posible vía de acción por la que podría actuar el derivado IV.14.

## 7. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE MIGRACIÓN CELULAR

La capacidad de migración celular se ha determinado mediante la técnica de Wound Healing en las líneas celulares tumorales de mama MCF-7, ya que los demás estudios se han realizado en esta línea, y MDA-MB-231. A continuación aparecen dos fotografías tomadas por el microscopio invertido con un objetivo 10x para las dos líneas.

A)



B)

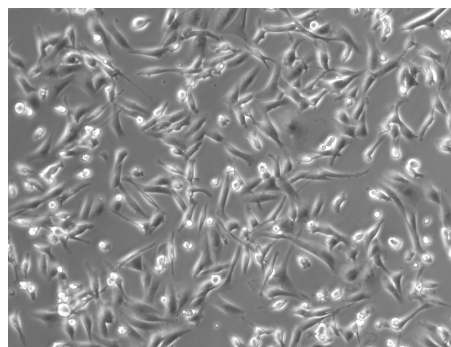
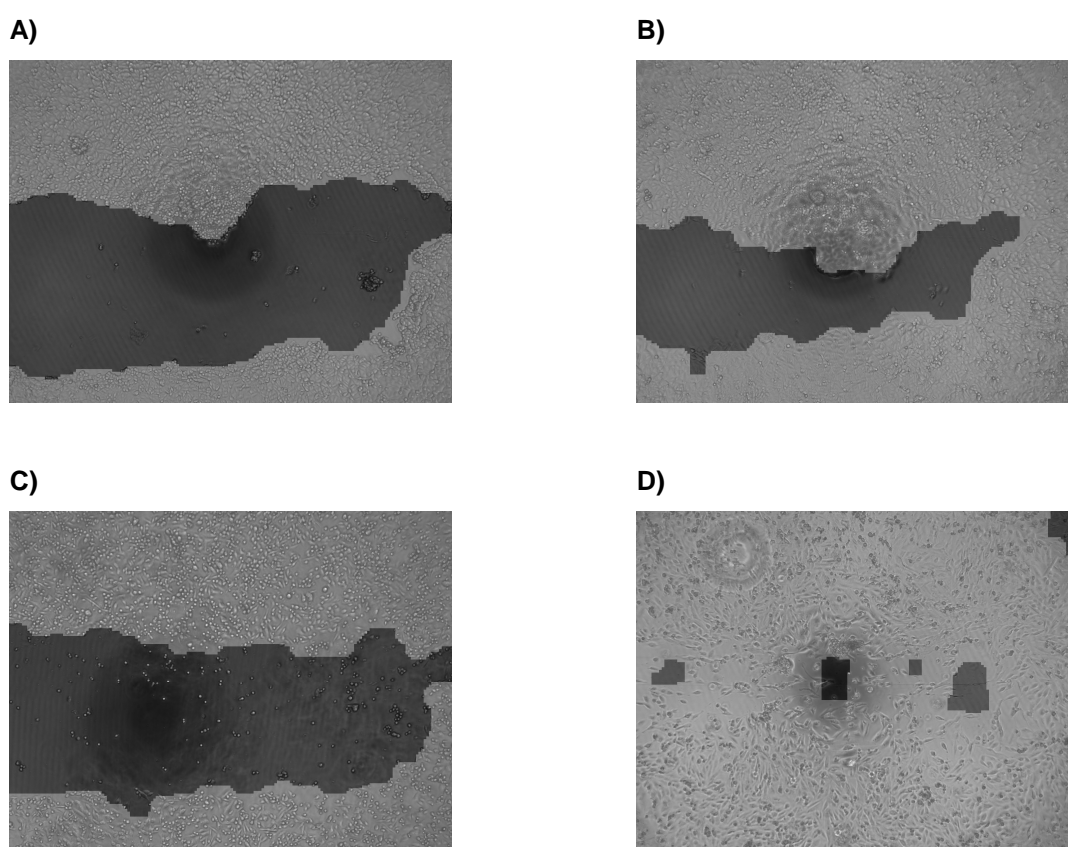


Figura 199: Imágenes tomadas por el microscopio invertido para las células MCF-7 (A) y MDA-MB-231 (B).

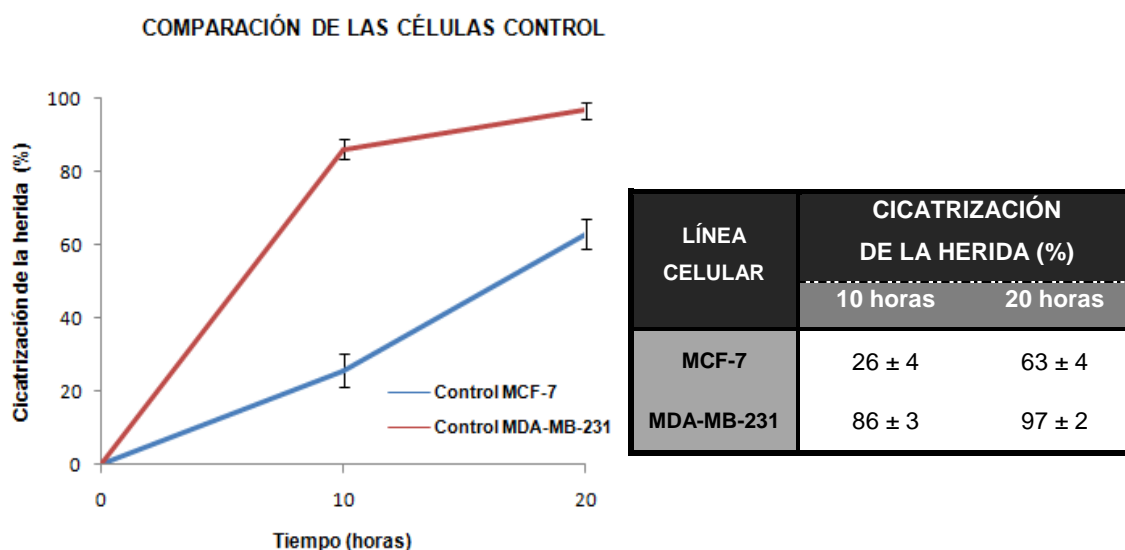
Se ha pensado en evaluar la capacidad de migración de los derivados sintetizados en las dos líneas celulares pero, haciendo estudios con las células control (sin añadir compuesto), se ha visto que las células MCF-7 no tienen una capacidad de migración muy elevada y, por consiguiente, su movilidad no es lo suficientemente grande como para cicatrizar la herida por completo después de 20 horas. Debido a ello, se considera difícil evaluar la capacidad de los compuestos para inhibir la migración celular en MCF-7. En la figura 200 aparecen las imágenes tomadas por el microscopio invertido, en uno de los experimentos representativos realizados para el control, recién hecha la herida y 20 horas después. Se puede observar que para las células MCF-7 hay superficie no cubierta por células (imagen B) mientras que para las células MDA-MB-231 la superficie está cubierta casi en su totalidad por células, cerrando la herida (imagen D).



**Figura 200:** Imágenes tomadas por el microscopio para las células control MCF-7 después de realizar la herida (A) y pasadas 20 horas (B) y para las células control MDA-MB-231 después de realizar la herida (C) y pasadas 20 horas (D).

Al comparar las células control de la línea celular MDA-MB-231 con las células control de la línea celular MCF-7, se ha visto que mientras las células MDA-MB-231 cicatrizan la herida casi por completo (97 %) a las 20 horas, las células MCF-7 lo hacen en un 63 %. Además, la velocidad de cicatrización es muy diferente para las líneas celulares ensayadas, ya que a las 10 horas, las células MCF-7 han cicatrizado la herida en un 26 % mientras que las células MDA-MB-231 lo han hecho en un 86 %. La figura 201 muestra los datos obtenidos para las células control en las dos líneas celulares.



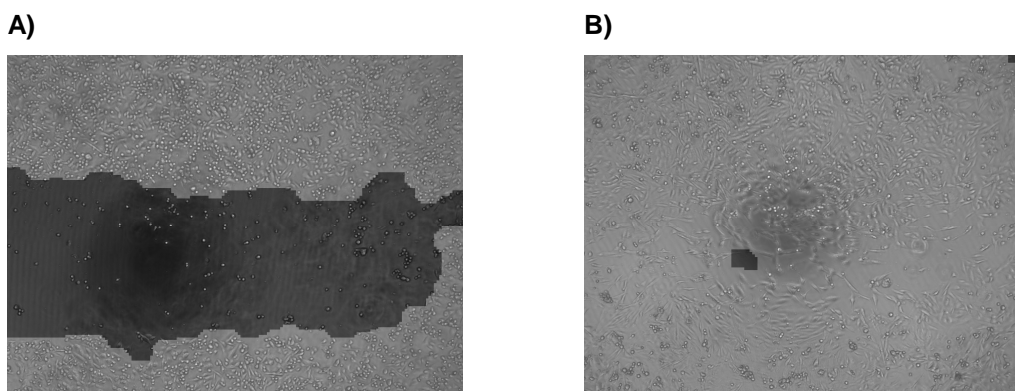


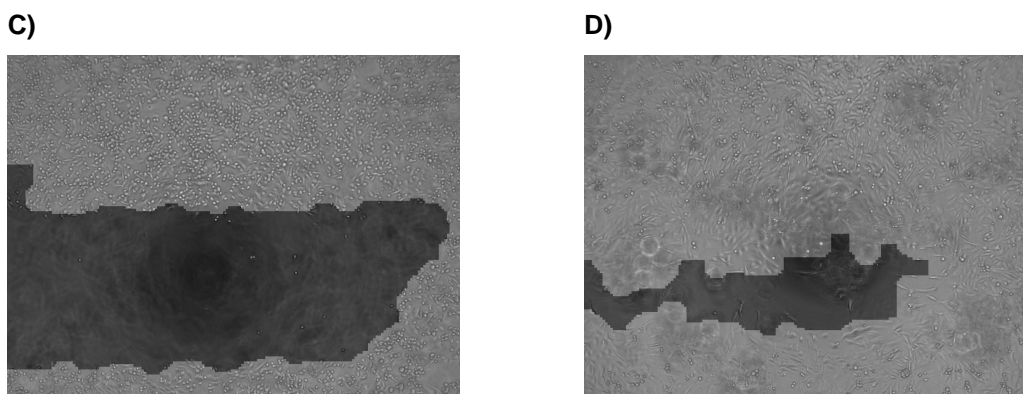
**Figura 201:** Comparación de la cicatrización de la herida en las células control MCF-7 y MDA-MB-231.

Numerosos estudios apuntan que las células MDA-MB-231 tienen un alto poder de migración e invasión (Navarro-Tito, N., 2008; Wang, L., 2010; Yodkeeree, S., 2010; Chen, S.J, 2011) llegándolas a considerar como pro-metastásicas (Isbilen, B., 2006). Debido a ello, es una de las líneas celulares más usadas para llevar a cabo estudios de migración e invasión celular. Por el contrario, la línea celular MCF-7 es menos utilizada en este tipo de estudios ya que se considera poco invasiva y no metastásica (Torricelli, C., 2006).

### 7.1 ALTERACIÓN EN LA MIGRACIÓN CELULAR OBSERVADA PARA LAS CÉLULAS MDA-MB-231 TRATADAS CON EL DERIVADO I.3

Se han tratado las células durante 24 horas con distintas concentraciones de compuesto I.3: 0,1, 0,25, 0,5, 1 y 2  $\mu\text{M}$ . A continuación, aparecen las imágenes tomadas por el microscopio invertido, en uno de los experimentos representativos realizados, recién hecha la herida y 20 horas después, en las células control y las tratadas con el derivado a una concentración 2  $\mu\text{M}$ .

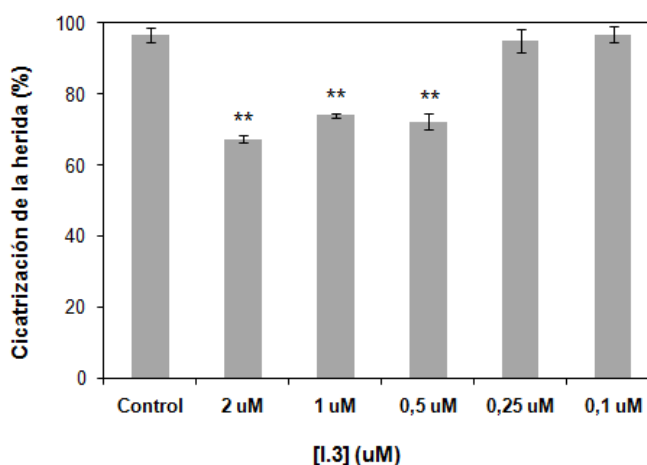




**Figura 202:** Imágenes tomadas por el microscopio para las células control después de realizar la herida (A) y pasadas 20 horas (B) y para las células tratadas con una concentración 2  $\mu\text{M}$  del derivado I.3 tras realizar la herida (C) y pasadas 20 horas (D).

La figura 203 muestra que el compuesto I.3 es capaz de inhibir la cicatrización de la herida reduciendo el cierre de ésta entre un 25 y un 30 % para las concentraciones más altas (2,1 y 0,5  $\mu\text{M}$ ). Se observa que a concentraciones bajas la cicatrización de la herida se produce casi por completo obteniéndose resultados semejantes a los del control. Además, el porcentaje de cicatrización de la herida varía sólo un 5 % cuando disminuimos 4 veces la concentración de compuesto (de 2 a 0,5  $\mu\text{M}$ ), por lo que se puede apreciar efecto a dosis nanomolares (nM).

[I.3] ( $\mu\text{M}$ )	CICATRIZACIÓN DE LA HERIDA (%) A LAS 20 HORAS
2	67** $\pm$ 1
1	74** $\pm$ 1
0,5	72** $\pm$ 2
0,25	95 $\pm$ 3
0,1	97 $\pm$ 2
0 (control)	97 $\pm$ 2

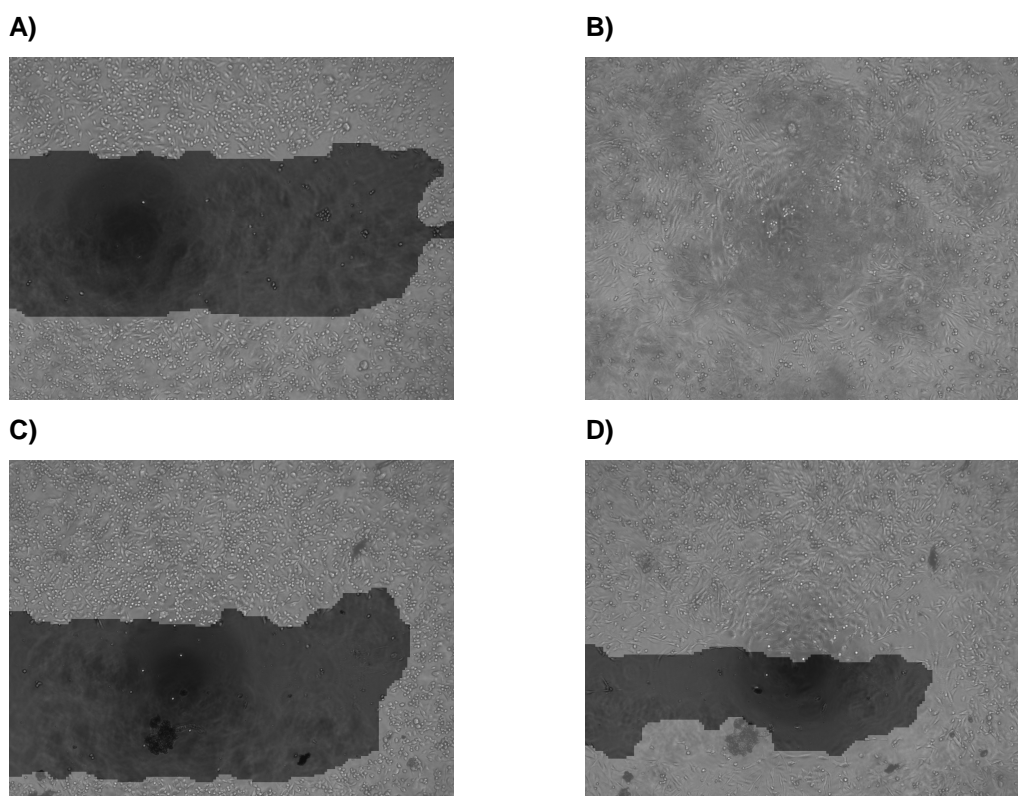


**Figura 203:** Porcentaje de cicatrización de la herida obtenido a diferentes concentraciones del derivado I.3 y 24 horas de tratamiento. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SD de dos experimentos independientes realizados por cuadruplicado. \*\* = diferencia estadísticamente muy significativa ( $p < 0,01$ ) respecto al control.

## 7.2 ALTERACIÓN EN LA MIGRACIÓN CELULAR OBSERVADA PARA LAS CÉLULAS MDA-MB-231 TRATADAS CON EL DERIVADO IV.7

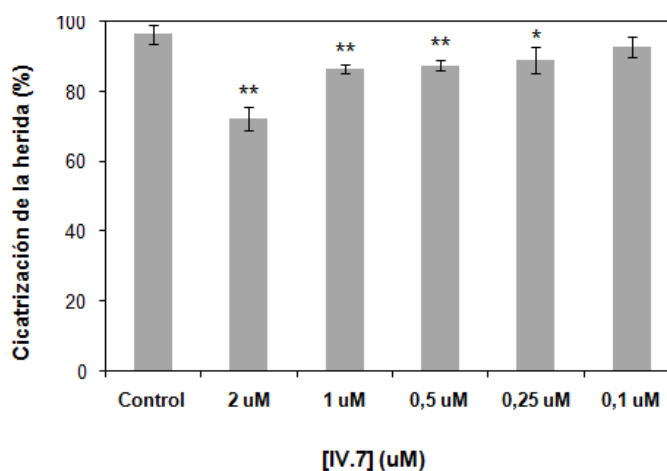
Se han tratado las células durante 24 horas con distintas concentraciones de compuesto: 0,1, 0,25, 0,5, 1 y 2  $\mu\text{M}$ . A continuación, aparecen las imágenes tomadas por el microscopio

invertido, en uno de los experimentos representativos realizados, recién hecha la herida y 20 horas después, en las células control y las tratadas a una concentración 2  $\mu\text{M}$ .



**Figura 204:** Imágenes tomadas por el microscopio para las células control después de realizar la herida (A) y pasadas 20 horas (B) y para las células tratadas con una concentración 2  $\mu\text{M}$  del derivado IV.7 tras realizar la herida (C) y pasadas 20 horas (D).

[IV.7] ( $\mu\text{M}$ )	CICATRIZACIÓN DE LA HERIDA (%) A LAS 20 HORAS
2	72 <sup>**</sup> $\pm$ 3
1	86 <sup>**</sup> $\pm$ 1
0,5	87 <sup>**</sup> $\pm$ 1
0,25	89 <sup>*</sup> $\pm$ 4
0,1	93 $\pm$ 3
0 (control)	96 $\pm$ 3

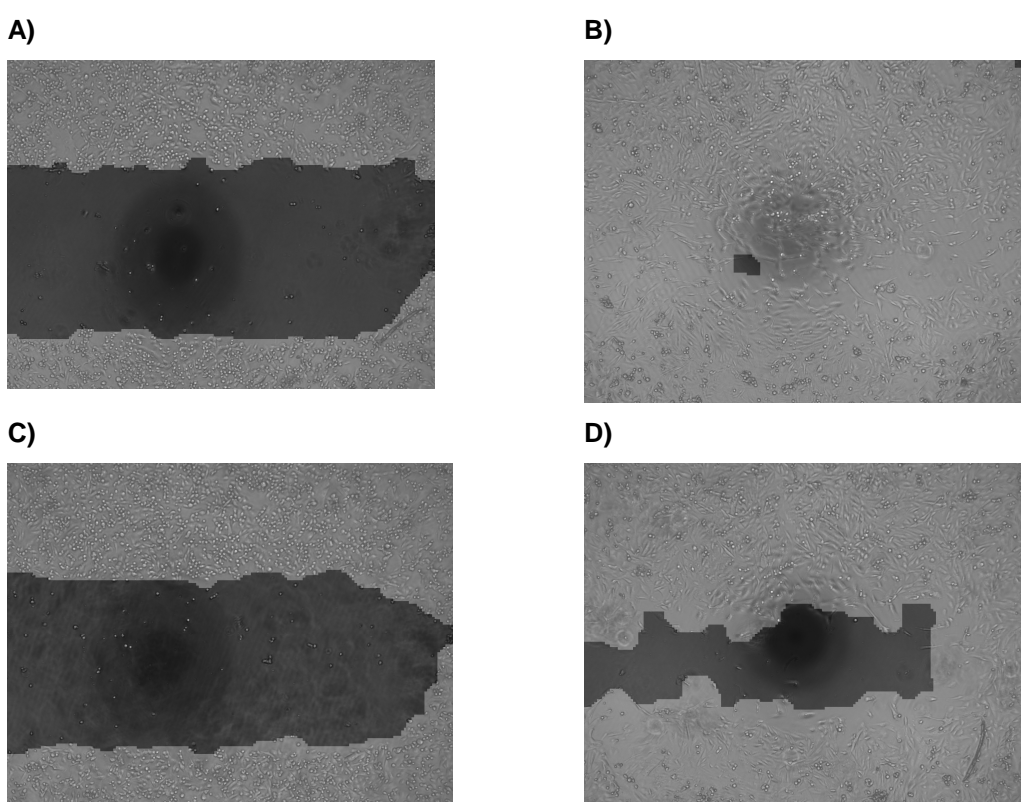


**Figura 205:** Porcentaje de cicatrización de la herida obtenido a diferentes concentraciones del derivado IV.7 y 24 horas de tratamiento. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SD de dos experimentos independientes realizados por cuádruplicado. \*\* = diferencia estadísticamente muy significativa ( $p < 0,01$ ) respecto al control; \* = diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) respecto al control.

La figura 205 muestra que el derivado IV.7 reduce la cicatrización de la herida en un 24 % a la concentración más alta (2  $\mu\text{M}$ ) y conforme se va reduciendo la concentración de compuesto el porcentaje de cicatrización de la herida va siendo mayor y más parecido al control.

### **7.3 ALTERACIÓN EN LA MIGRACIÓN CELULAR OBSERVADA PARA LAS CÉLULAS MDA-MB-231 TRATADAS CON EL DERIVADO IV.14**

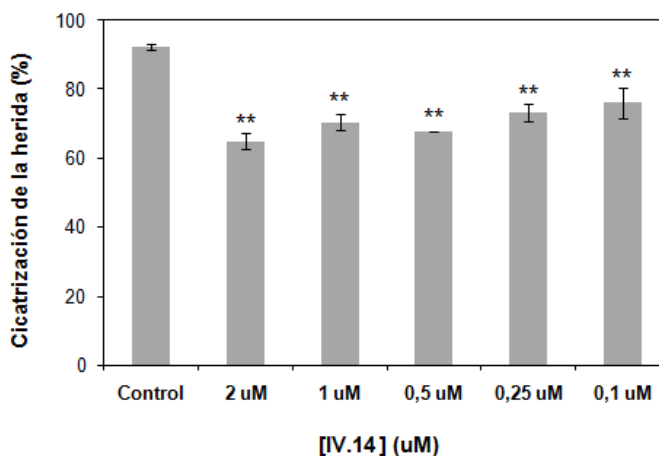
Se han tratado las células durante 24 horas con distintas concentraciones de compuesto IV.14: 0,1, 0,25, 0,5, 1 y 2  $\mu\text{M}$ . A continuación, aparecen las imágenes tomadas por el microscopio invertido, en uno de los experimentos representativos realizados, recién hecha la herida y 20 horas después en las células control y las tratadas a una concentración 2  $\mu\text{M}$ .



**Figura 206:** Imágenes tomadas por el microscopio para las células control después de realizar la herida (A) y pasadas 20 horas (B) y para las células tratadas con una concentración 2  $\mu\text{M}$  del derivado IV.14 tras realizar la herida (C) y pasadas 20 horas (D).

La figura 207 muestra que el derivado IV.14 inhibe la cicatrización de la herida entorno a un 30 % a una concentración 2  $\mu\text{M}$ . Se observa que a la dosis más baja evaluada (0,1  $\mu\text{M}$ ) la herida cierra un 18 % menos, no llegándose así a alcanzar los valores mostrados por el control. Esto hace del derivado IV.14 el más activo de los 3 evaluados.

[IV.14] ( $\mu\text{M}$ )	CICATRIZACIÓN DE LA HERIDA (%) A LAS 20 HORAS
2	65** $\pm$ 2
1	70** $\pm$ 3
0,5	68** $\pm$ 1
0,25	73** $\pm$ 3
0,1	76** $\pm$ 4
0 (control)	94 $\pm$ 1

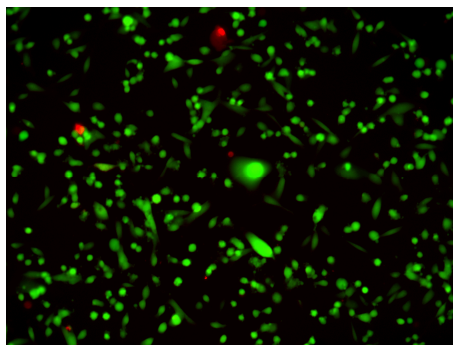


**Figura 207:** Porcentaje de cicatrización de la herida obtenido a diferentes concentraciones del derivado IV.14 y 24 horas de tratamiento. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SD de dos experimentos independientes realizados por cuadruplicado. \*\* = diferencia estadísticamente muy significativa ( $p < 0,01$ ) respecto al control.

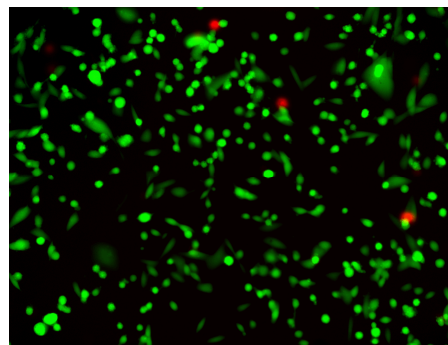
#### 7.4 TEST DE VIABILIDAD/TOXICIDAD CELULAR

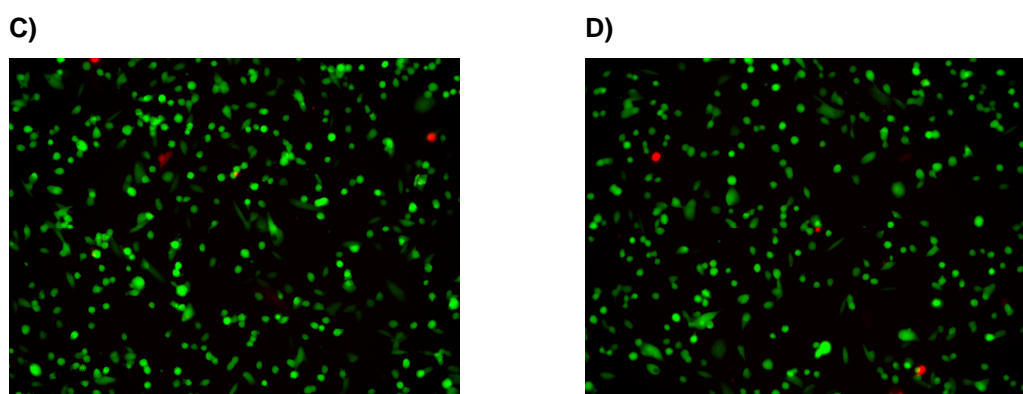
Para corroborar los resultados obtenidos se ha realizado un test de viabilidad celular. Las células MDA-MB-231 se han marcado con una solución de calceína-AM y etidio 1-homodímero hasta una concentración final de 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . La calceína-AM va a penetrar en células vivas emitiendo luz fluorescente verde. Por el contrario, el etidio 1-homodímero actuará exclusivamente en células muertas emitiendo luz fluorescente roja. A continuación, se presentan las imágenes tomadas por el microscopio de fluorescencia en uno de los experimentos representativos realizados para el control y los 3 compuestos a 24 horas de tratamiento y una concentración 2  $\mu\text{M}$ .

A)



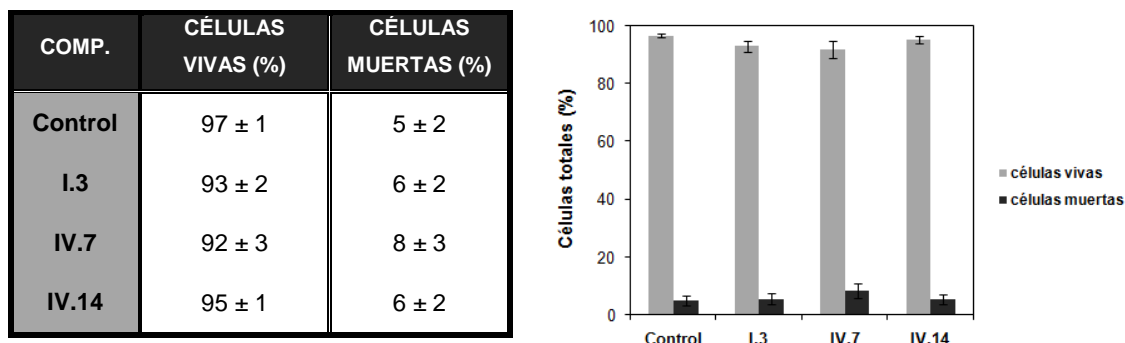
B)





**Figura 208:** Fotos tomadas por el microscopio de fluorescencia tras 24 horas para el control (A) y los compuestos testados (I.3 (B), IV.7 (C) y IV.14 (D)) a una concentración 2  $\mu$ M. El color verde indica células vivas y el color rojo células muertas.

La figura 209 muestra el porcentaje de células vivas y muertas obtenido tras 24 horas de tratamiento con los compuestos a una concentración 2  $\mu$ M.



**Figura 209:** Porcentaje de células vivas y muertas obtenido para el control y los compuestos a una concentración 2  $\mu$ M tras 24 horas de tratamiento. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SD de dos experimentos independientes realizados por cuádruplicado.

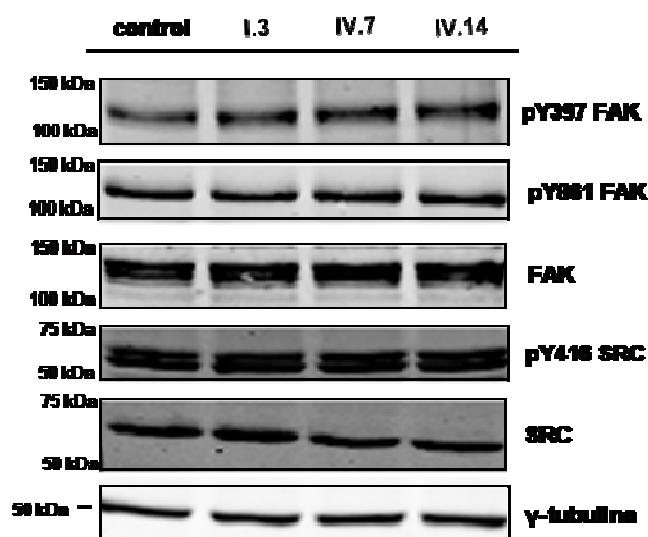
Se observa que el porcentaje de células vivas y muertas para los compuestos evaluados, a una concentración 2  $\mu$ M tras un tratamiento de 24 horas, es similar al obtenido para las células control. Por lo tanto, a la mayor concentración utilizada en los ensayos (2  $\mu$ M) la mayoría de las células están vivas. Con estos resultados, se elimina la posibilidad de que las células no cierren la herida porque estén muertas en vez de porque inhiban la migración celular. Sin embargo, descartado el efecto citotóxico de los compuestos, cabe la posibilidad de que los derivados inhiban la proliferación celular en el tiempo que dura el experimento (20 horas). Para ello, se tendrían que realizar estudios adicionales y determinar los parámetros de GI<sub>50</sub> y TGI en células MDA-MB-231 tras un tratamiento de 24 horas con los compuestos.

## 8. EVALUACIÓN DEL POSIBLE MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS COMPUESTOS EN LA MIGRACIÓN CELULAR

Los compuestos líderes han sido evaluados para comprobar su implicación de una de las vías de señalización de la migración celular. La vía de señalización elegida ha sido la ruta de las integrinas. Unas de las proteínas implicadas en esta vía son FAK y SRC por lo que, mediante ensayos de Western Blot, se ha determinado la actividad de estas proteínas en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 tras el tratamiento con los compuestos.

### 8.1 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE FAK Y SRC EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7 TRAS UN TRATAMIENTO CON LOS COMPUESTOS

A continuación, aparecen los niveles de actividad encontrados para las proteínas FAK y SRC en las células MCF-7 para el control y las células tratadas con los compuestos a una concentración 1  $\mu$ M tras 24 horas de tratamiento.



**Figura 210:** Niveles de fosforilación encontrados para las proteínas FAK y SRC en las células MCF-7 para el control y los compuestos tras 24 horas de tratamiento a una concentración 1  $\mu$ M.

En la figura 210 se observa que no aparecen cambios en los niveles de autofosforilación de FAK (Y397) y SRC (Y861) ni en los niveles de fosforilación de FAK (Y861). Los niveles totales de las proteínas permanecen también inalterados. Con estos resultados se descarta por completo la implicación de FAK y SRC en la inhibición de la migración.

## 8.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE FAK Y SRC EN LA LÍNEA CELULAR MDA-MB-231 TRAS UN TRATAMIENTO CON LOS COMPUESTOS

A continuación, aparecen los niveles de actividad encontrados para las proteínas FAK y SRC en las células MDA-MB-231 para el control y las células tratadas con los compuestos a una concentración 1  $\mu$ M y 24 horas de tratamiento.

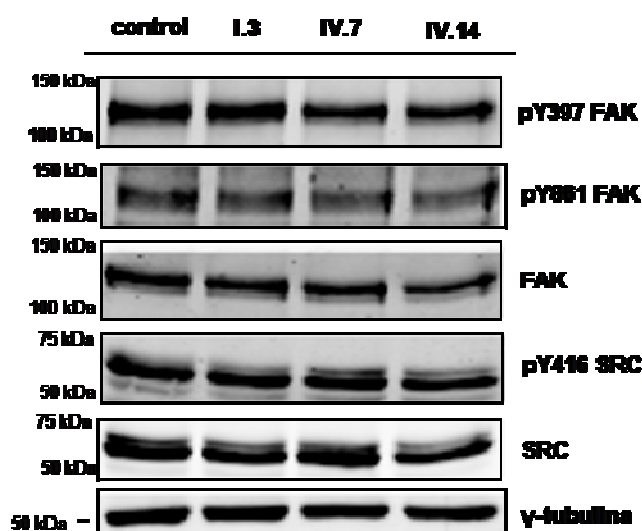
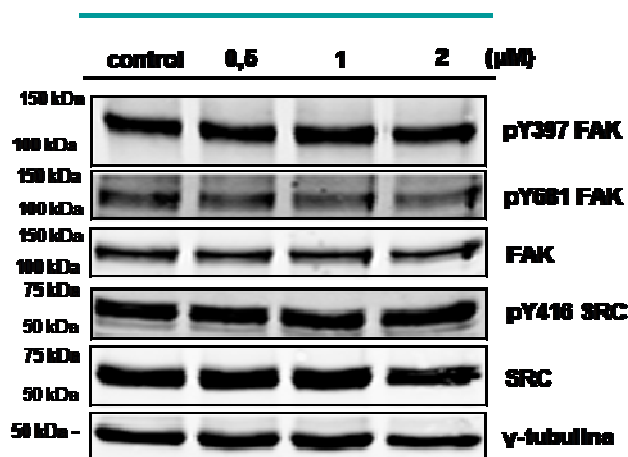


Figura 211: Niveles de fosforilación encontrados para las proteínas FAK y SRC en las células MDA-MB-231 para el control y los compuestos tras 24 horas de tratamiento a una concentración 1  $\mu$ M.

En la figura 211 se observa que no aparecen cambios en los niveles totales y de fosforilación de FAK y SRC para un tratamiento con los compuestos de 1  $\mu$ M y 24 horas. Con el derivado IV.14, el más activo en las pruebas de migración, se han realizado estudios a diferentes concentraciones (0,5, 1 y 2  $\mu$ M) durante 24 horas. Se ha aumentado la concentración hasta 2  $\mu$ M porque se conoce que a esta concentración no hay muerte celular y los cambios en los niveles de fosforilación de las proteínas puede que se aprecien mejor. Los datos obtenidos (figura 212) muestran que no hay alteraciones en los niveles de fosforilación de las proteínas tras el tratamiento con el compuesto a diferentes concentraciones, por lo que queda descartado que los compuestos líderes, aunque se ha visto que inhiben la migración celular, lo hagan a través de las proteínas FAK y SRC.



## IV.14



**Figura 212:** Niveles de fosforilación encontrados para las proteínas FAK y SRC en las células MDA-MB-231 para el control y el compuesto IV.14 tras 24 horas de tratamiento a una concentración 0,5, 1 y 2  $\mu\text{M}$ .

### 8.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE AKT Y S6 RIBOSOMAL EN LA LÍNEA CELULAR MDA-MB-231 TRAS UN TRATAMIENTO CON EL DERIVADO IV.14

Dado que para la línea celular MCF-7 se ha observado un cambio en la actividad de las proteínas AKT y S6 ribosomal al tratar las células con el compuesto IV.14, se han realizado estudios para determinar si la inhibición de estas proteínas está implicada en la inhibición de la migración celular observada para el compuesto IV.14 en la línea celular MDA-MB-231.

Numerosas referencias apuntan a una implicación directa de AKT y S6 ribosomal en la migración e invasión celular. Se ha observado que un aumento en los niveles de fosforilación de AKT produce una inhibición de la proliferación celular y de la movilidad celular en células MDA-MB-231 (Wang, W., 2011; Sophocleous, A., 2011). Estudios recientes han descubierto un inhibidor de la proliferación celular y la migración en células MDA-MB-231 que actúa disminuyendo la actividad de las proteínas implicadas en la vía de señalización PI3K/AKT (Shanmugaraj, S., 2010). Además, una inhibición en los niveles de AKT1 es suficiente para afectar a la migración e invasión celular en células de cáncer de ovario OVCAR-3 (Meng, Q., 2006) y, al mismo tiempo, es necesario una actividad en la proteína p70S6K1, localizada en la ruta de señalización PI3K/AKT, para la migración e invasión de estas células. La figura 213 muestra que no hay cambios en los niveles de fosforilación de las proteínas estudiadas al comparar el control con las células tratadas con el compuesto IV.14, por lo que se descarta que las proteínas AKT y S6 ribosomal estén implicadas en la inhibición de la migración observada con anterioridad.

IV.14

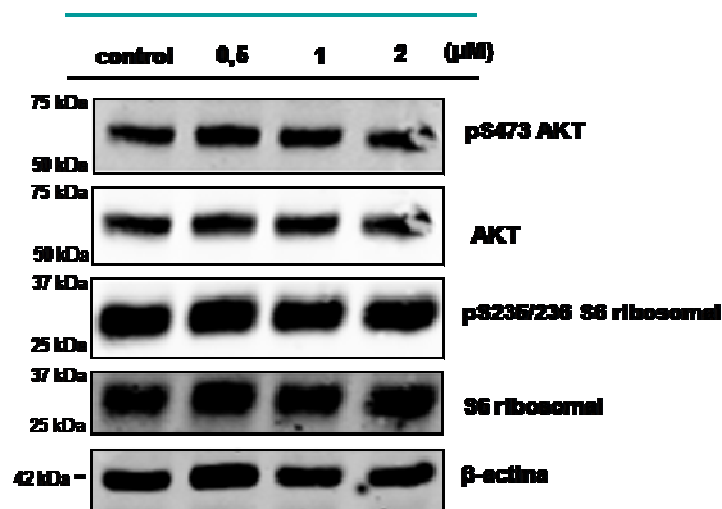


Figura 213: Niveles de fosforilación encontrados para las proteínas AKT y S6 ribosomal en las células MDA-MB-231 para el control y el compuesto IV.14 tras 24 horas de tratamiento a una concentración 0,5, 1 y 2 μM.

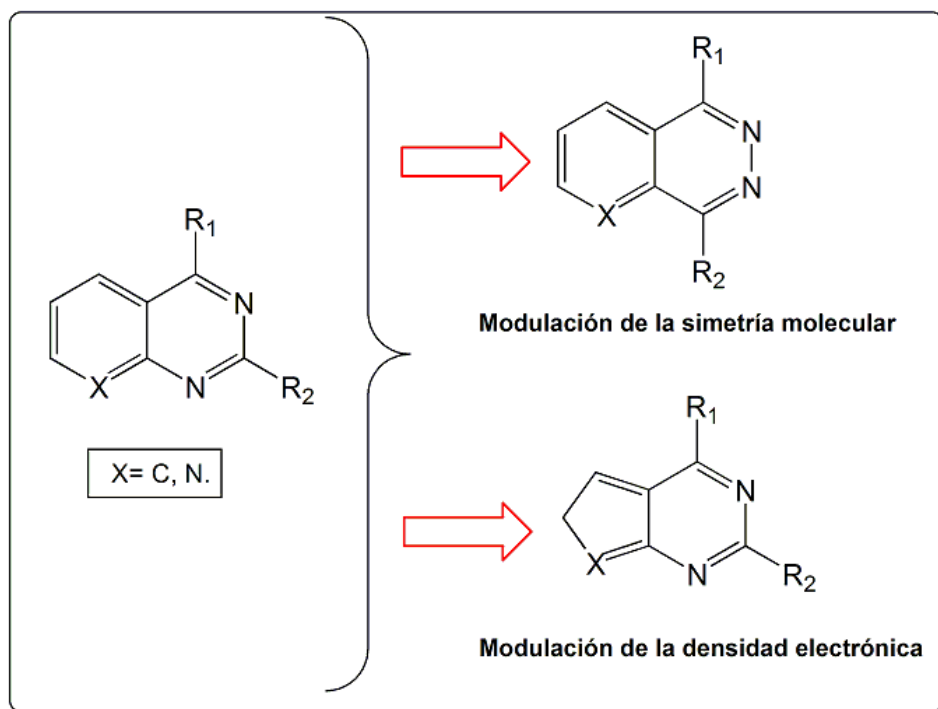
Alcanzados los objetivos planteados en esta Memoria y a la vista de los resultados obtenidos, se pretende continuar con la evaluación biológica de los compuestos líderes para determinar su posible mecanismo de acción y descifrar las vías de señalización implicadas en la muerte celular y en la inhibición de la migración observada en las células tras el tratamiento con los mismos. Además, el estudio en profundidad del mecanismo implicado en la inhibición de la migración celular puede permitir el avance hacia nuevos fármacos antimetastáticos.

Se ha observado una heterogeneidad en la actividad biológica de los compuestos testados. Los datos reflejan que estos derivados de selenio no siempre se muestran más activos que sus homólogos de azufre, de ahí que nuestro grupo de investigación se plantee seguir introduciendo estos dos heteroátomos en las nuevas moléculas a sintetizar. Por otra parte, queda elucidar el mejor comportamiento de los núcleos centrales, pirido[2,3-*d*]pirimidina o quinazolina, así como otras posibilidades de heterociclo.

La experiencia de nuestro grupo investigador con anillos bicíclicos abre una luz hacia nuevas rutas sintéticas modulando las estructuras de pirido[2,3-*d*]pirimidina y quinazolina (figura 214). Se pretende hacer modificaciones estructurales para valorar el efecto de la:

- *simetría*: sintetizando nuevos derivados de pirido[2,3-*d*]piridazina o ftalazina para explorar la importancia que la posición de los heteroátomos y de los sustituyentes tienen en el núcleo central.
- *densidad electrónica*: sintetizando nuevos derivados de pirrol para determinar si la actividad biológica mejora al sustituir sistemas π deficientes por π excedentes.

La figura 214 esquematiza la modulación de las nuevas estructuras:



**Figura 214:** Variaciones planteadas para los núcleos de pirido[2,3-d]pirimidina y quinazolina en trabajos futuros.

En conclusión, la información aportada por este trabajo ha supuesto un paso más en el todavía abierto camino hacia la obtención de nuevos antitumorales más potentes y seguros.



**CONCLUSIONES**



Como consecuencia de la experimentación llevada a cabo y de la interpretación de los resultados obtenidos en este trabajo, pueden concluirse las siguientes proposiciones:

1. Para la síntesis de pirido[2,3-*d*]pirimidinas 2-seleno sustituidas por ciclación con selenourea no han resultado operativos los métodos sintéticos descritos para los homólogos azufrados, por lo que ha sido necesario desarrollar métodos alternativos.
2. Se ha comprobado la menor reactividad de los derivados 2-selenados respecto de los 2-azufrados a la hora de llevar a cabo sustituciones en la posición 4 del anillo de pirido[2,3-*d*]pirimidina. Este hecho se puede atribuir a que la mayor capacidad de electrodonación del selenio desactiva el anillo para la sustitución nucleófila en la posición 4.
3. También se pone de manifiesto la menor reactividad de los derivados de selenio empleados para llevar a cabo la sustitución de pirido[2,3-*d*]pirimidinas halogenadas en posición 2.
4. La mayor capacidad de establecimiento de puentes de hidrógeno de los sustituyentes de las posiciones 2 y 4 de los anillos de pirido[2,3-*d*]pirimidina y quinazolina incrementa la actividad antiproliferativa. Así, los derivados con grupos mercapto e hidroseleno muestran mayor actividad que sus homólogos alquilados.
5. Los derivados de pirido[2,3-*d*]pirimidina y de quinazolina con sustituyentes 4-arilalquilamina resultan más activos que los correspondientes 4-aminoderivados, posiblemente debido a la capacidad de los grupos sustituidos en el anillo de actuar como aceptores de puentes de hidrógeno. Así, aumenta la actividad en el sentido metilseleno, metiltio y metoxilo.
6. La actividad citotóxica y antiproliferativa *in vitro* más potente la han mostrado los compuestos sintetizados frente a las líneas celulares tumorales de próstata (PC-3), mama (MCF-7) y pulmón (HTB-54). Así, ocho de ellos poseen valores de  $IC_{50} < 10 \mu M$  en la línea tumoral de próstata, trece muestran valores de  $GI_{50} < 10 \mu M$  en la línea tumoral de mama y en catorce de ellos se observan valores de  $GI_{50} < 10 \mu M$  en la línea tumoral de pulmón.
7. Algunos compuestos han mostrado un alto índice de selectividad en la inhibición del crecimiento celular al comparar su comportamiento frente a células tumorales y normales. Así, varios compuestos (III.4, III.18, IV.1, IV.7 y IV.15) muestran alta selectividad por células tumorales (MCF-7) frente a células no tumorales (184B5) de mama, presentando índices terapéuticos entre 12 y 1.400. También, los compuestos I.1 y IV.4 muestran selectividad moderada por células tumorales (HTB-54) frente a células no tumorales (BEAS-2B) de pulmón, con índices terapéuticos en torno a 5. Sin embargo, la mayoría de los compuestos presentan parámetros similares para ambos tipos de células.

8. Los derivados I.3 y IV.14 han resultado los compuestos más potentes como antiproliferativos en todas las líneas celulares tumorales ensayadas, mientras que el derivado IV.7 ha sido el más selectivo, de entre los compuestos más activos, en la línea celular MCF-7. Por ello, se han seleccionados como líderes para profundizar en su conocimiento biológico.

9. Los compuestos líderes (I.3, IV.7 y IV.14) inducen muerte celular en células MCF-7 de forma dependiente de la concentración y el tiempo de tratamiento. Además, esta muerte celular es independiente de la activación de caspasas y se produce sin modificaciones en la distribución del ciclo celular en los tiempos y concentraciones ensayadas.

10. El mecanismo de muerte celular inducido por los compuestos líderes I.3 y IV.7 es independiente de AKT, JNK y ERK, ya que no se han observado cambios en la fosforilación de dichas proteínas en células MCF-7. La cascada de señalización implicada en la muerte celular inducida por el compuesto IV.14 en células MCF-7 podría ser PI3K/AKT, ya que el compuesto inactiva AKT provocando un descenso en la actividad de S6 ribosomal y una disminución de la síntesis proteica.

11. Los tres compuestos líderes seleccionados (I.3, IV.7 y IV.14) inhiben la migración en células MDA-MB-231 de forma dependiente de la concentración. En este sentido, el compuesto IV.14 se ha mostrado el más potente inhibiendo la migración celular en un 20 % a una concentración 100 nM. En esta inhibición de la migración no están implicadas las proteínas FAK, SRC, AKT y S6 ribosomal, ya que su fosforilación no se ve afectada tras el tratamiento. La actividad mostrada por estos derivados sugiere su potencial empleo como antimetastáticos aunque, para ello, se requieren estudios adicionales.



# CONCLUSIONS



By means of detailed investigation and analysis of the ensuing results, the following conclusions can be deduced:

1. In the synthesis of pyrido[2,3-*d*]pyrimidines 2-seleno, substituted by cyclation with selenourea, the synthetic methods proposed for the sulfur analogs have not been successful, hence the development of alternative methods has been necessary.
2. It has been confirmed that 2-seleno derivatives possess lower reactivity than 2-sulfur derivatives for carrying out substitutions of position 4 in the pyrido[2,3-*d*]pyrimidine ring. This phenomenon may occur because selenium has greater capacity for electrodonation and deactivates the ring for the subsequent nucleophilic substitution at position 4.
3. Moreover, the lower reactivity of selenium derivatives has been confirmed by means of attempted substitution of halogenated pyrido[2,3-*d*]pyrimidines in position 2.
4. The greater capacity of the substituents in positions 2 and 4 of the pyrido[2,3-*d*]pyrimidine and quinazoline rings for forming H-bonds increases the antiproliferative activity of the compounds. In this way, mercapto and hydroseleno groups in the scaffolds improve the activity of the derivatives in comparison with the alkylated analogs.
5. Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine and quinazoline derivatives with 4-arylalkylamine are more active than the corresponding 4-amine derivatives due to the capacity of the aryl substituents to act as H-bond acceptors. This activity increases in the direction methylseleno, methylthio and methoxy.
6. The most potent *in vitro* cytotoxic and antiproliferative activity by the synthesized compounds has been shown against prostate (PC-3), breast (MCF-7) and lung (HTB-54) cancer cell lines. In summary, eight compounds have values for  $IC_{50} < 10 \mu M$  in prostate cancer cells, thirteen have values for  $GI_{50} < 10 \mu M$  in breast cancer cells and fourteen have values for  $GI_{50} < 10 \mu M$  in lung cancer cells.
7. Some derivatives have shown a high selectivity index for the inhibition of cellular growth when their behavior is evaluated with tumoral versus normal cells. Five compounds (III.4, III.18, IV.1, IV.7 and IV.15) show a high selectivity for breast tumoral cells (MCF-7) against non-tumoral cells (184B5) with therapeutic indexes between 12 and 1,400. Moreover, compounds I.1 and IV.4 show a moderate selectivity for lung tumoral cells (HTB-54) against non-tumoral cells (BEAS-2B) with therapeutic indexes around 5. However, most of the derivatives show similar parameters in both cell lines.
8. The derivatives I.3 and IV.14 have demonstrated the most potent activity as antiproliferative agents in all of the cell lines tested. Of the most potent derivatives, IV.7 has been the most

selective in the MCF-7 cell line. As a result, these three derivatives have been chosen as lead compounds for investigation of their mechanism of action.

9. The lead compounds (I.3, IV.7 and IV.14) induce time and concentration-dependent cell death in MCF-7 cells. Furthermore, this cell death is caspase-independent and is induced without modifications of the cell cycle in the times and concentrations tested.

10. The mechanism of cell death induced by the lead compounds I.3 and IV.7 is AKT, JNK and ERK independent, since no changes have been observed in the levels of phosphorylation for these proteins in MCF-7 cells upon treatment. The signaling pathway implicated in the cell death observed in MCF-7 cells by compound IV.14 may be PI3K/AKT, since AKT is inactivated and a decrease in the activity of S6 ribosomal protein is observed upon, implying reduced protein synthesis.

11. The three selected lead compounds (I.3, IV.7 and IV.14) induce concentration-dependent inhibition of the migration of MDA-MB-231 cells. Compound IV.14 inhibits the migration of these cells by 20 % at 100 nM concentration and is the most potent of the derivatives tested. In this inhibition of migration, the kinases FAK, SRC, AKT and S6 ribosomal protein are not implicated since the phosphorylation levels of these proteins are not affected following treatment. The activity shown by these derivatives suggests their utility as antimetastatic agents, although additional studies are required.

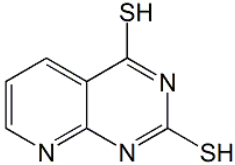
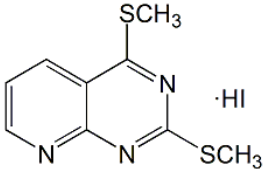
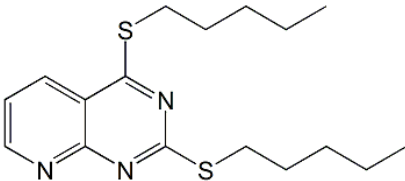
# ANEXOS



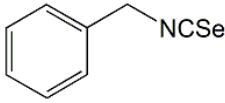

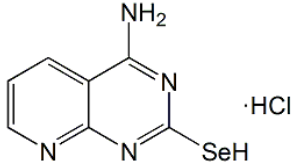
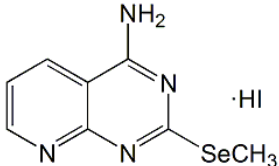
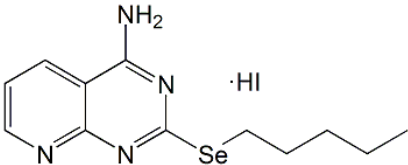
## 1. RELACIÓN DE PRODUCTOS SINTETIZADOS

1.1 DERIVADOS DE PIRIDO[2,3-*d*]PIRIMIDINA DE LA SERIE I

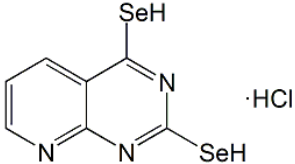
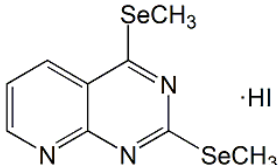
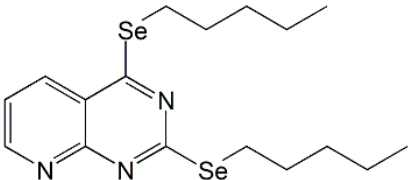
COMPUESTO	NOMBRE QUÍMICO	ESTRUCTURA
I.1	4-bencilamino-2-metilpirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidina	
I.2	2-metil-4-(4-metoxibencil)aminopirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidina	
I.3	2-metil-4-(4-metilbencil)aminopirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidina (Hidrocloruro)	
I.4	4-(5-hidroxilpentil)amino-2-metilpirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidina	
I.5	4-amino-2-mercaptopirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidina (Hidrocloruro)	
I.6	4-amino-2-metilpirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidina (Hidrioduro)	
I.7	4-amino-2-pentilpirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidina (Hidrioduro)	

I.8	2,4-dimercaptopirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidina	
I.9	2,4-dimetiltiropirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidina	
I.10	2,4-dipentiltiropirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidina	

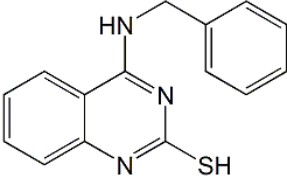
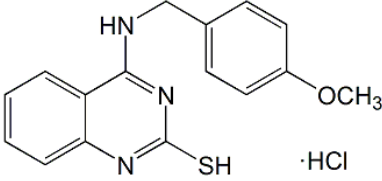
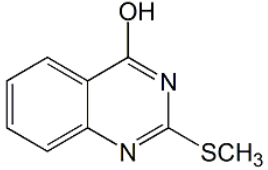
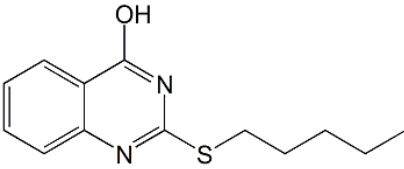
1.2 DERIVADOS DE PIRIDO[2,3-*d*]PIRIMIDINA DE LA SERIE II

COMPUESTO	NOMBRE QUÍMICO	ESTRUCTURA
II.1	Benciloselenocianato	
II.2	4-bencilamino-2-hidroselenopirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidina	
II.3	4-amino-2-hidroselenopirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidina (Hidrocloruro)	
II.4	4-amino-2-metilselenopirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidina (Hidrioduro)	
II.5	4-amino-2-pentilselenopirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidina (Hidrioduro)	

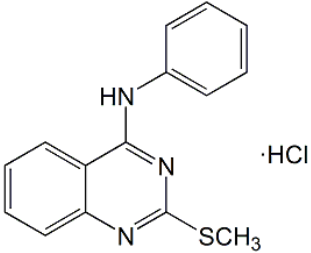
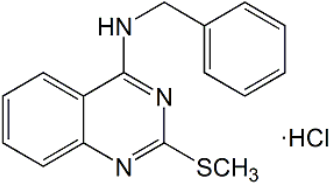
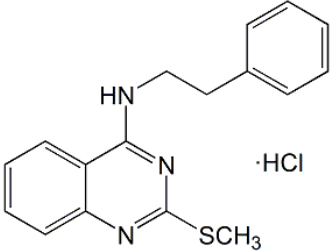
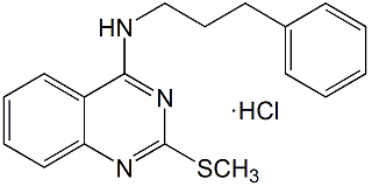
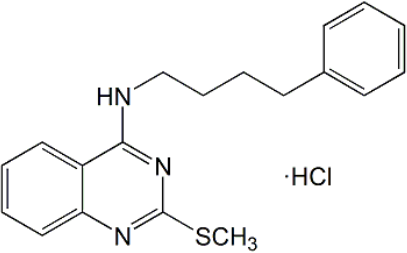
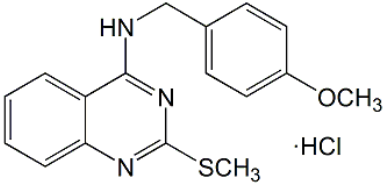
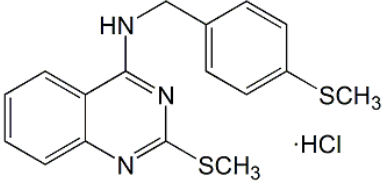


II.6	2,4-dihidroselenopirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidina (Hidrocloruro)	
II.7	2,4-dimetilselenopirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidina (Hidrioduro)	
II.8	2,4-dipentilselenopirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidina	

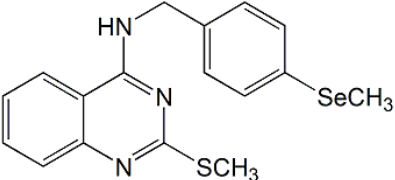
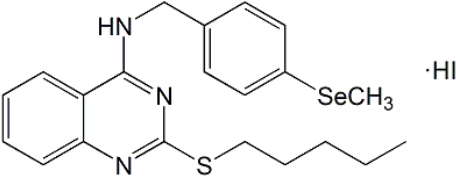
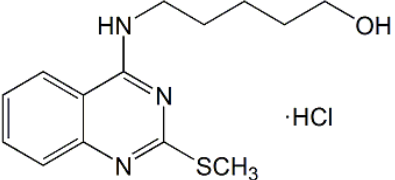
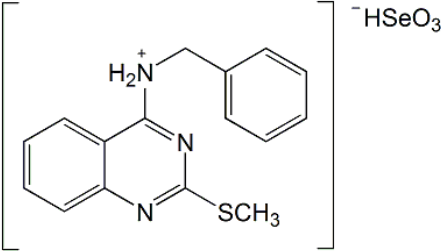
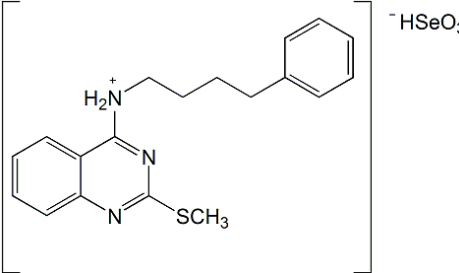
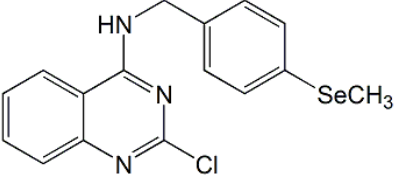
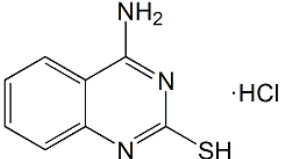
## 1.3 DERIVADOS DE QUINAZOLINA DE LA SERIE III

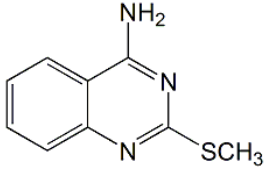
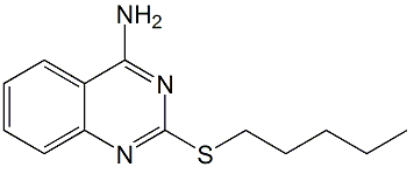
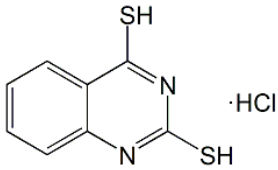
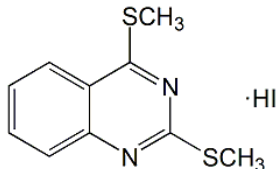
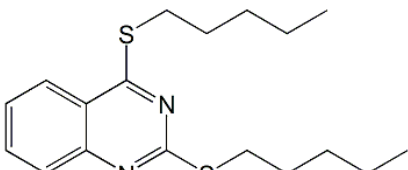
COMPUESTO	NOMBRE QUÍMICO	ESTRUCTURA
III.1	4-bencilamino-2-mercaptoquinazolina	
III.2	2-mercapto-4-(4-metoxibencil)aminoquinazolina (Hidrocloruro)	
III.3	4-hidroxi-2-metiltioquinazolina	
III.4	4-hidroxi-2-pentiltioquinazolina	

---

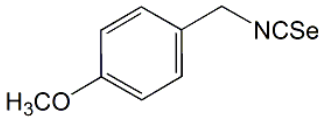
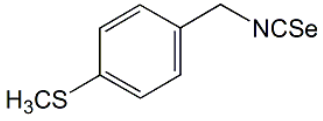
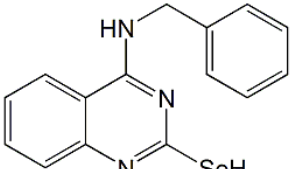
III.5	4-fenilamino-2-metiltioquinazolina (Hidrocloruro)	
III.6	4-bencilamino-2-metiltioquinazolina (Hidrocloruro)	
III.7	4-(2-feniletil)amino-2-metiltioquinazolina (Hidrocloruro)	
III.8	4-(3-fenilpropil)amino-2-metiltioquinazolina (Hidrocloruro)	
III.9	4-(4-fenilbutil)amino-2-metiltioquinazolina (Hidrocloruro)	
III.10	2-metiltio-4-(4-metoxibencil)aminoquinazolina (Hidrocloruro)	
III.11	4-(4-metiltiobencil)amino-2-metiltioquinazolina (Hidrocloruro)	

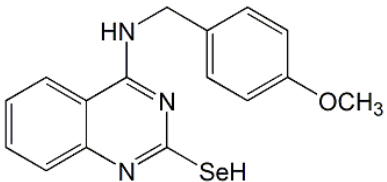
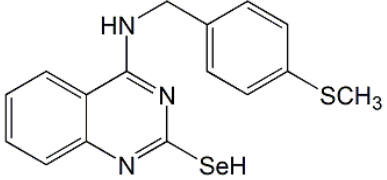
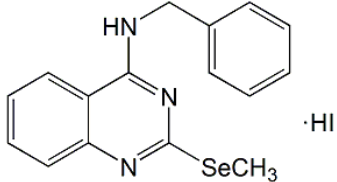
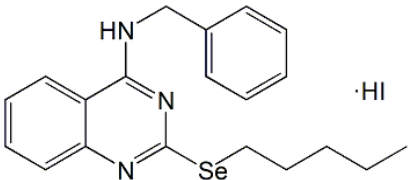


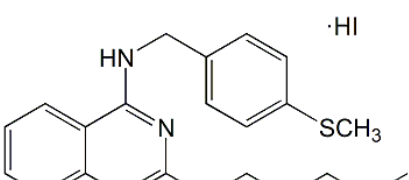
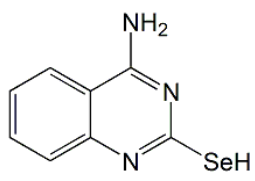
---

III.12	4-(4-metilselenobencil)amino-2-metiltioquinazolina	
III.13	4-(4-metilselenobencil)amino-2-pentiltioquinazolina (Hidroioduro)	
III.14	4-(5-hidroxipentil)amino-2-metiltioquinazolina (Hidrocloruro)	
III.15	Selenito de N-bencil-2-metiltioquinazolin-4-amonio	
III.16	Selenito de N-(4-fenilbutil)-2-metiltioquinazolin-4-amonio	
III.17	2-cloro-4-(4-metilselenobencil)aminoquinazolina	
III.18	4-amino-2-mercaptoquinazolina (Hidrocloruro)	

III.19	4-amino-2-metiltioquinazolina	
III.20	4-amino-2-pentiltioquinazolina	
III.21	2,4-dimercaptoquinazolina (Hidrocloruro)	
III.22	2,4-dimetiltioquinazolina (Hidrioduro)	
III.23	2,4-dipentiltioquinazolina	

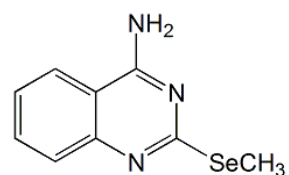
## 1.4 DERIVADOS DE QUINAZOLINA DE LA SERIE IV

COMPUESTO	NOMBRE QUÍMICO	ESTRUCTURA
IV.1	4-metoxibencilisosenocianato	
IV.2	4-metiltiobencilisosenocianato	
IV.3	4-bencilamino-2-hidroselenoquinazolina	

IV.4	2-hidroseleno-4-(4-metoxibencil)aminoquinazolina	
IV.5	2-hidroseleno-4-(4-metiltiobencil)aminoquinazolina	
IV.6	4-bencilamino-2-metilselenoquinazolina (Hidrioduro)	
IV.7	4-bencilamino-2-pentilselenoquinazolina (Hidrioduro)	
IV.8	2-metilseleno-4-(4-metoxibencil)aminoquinazolina	
IV.9	2-metilseleno-4-(4-metiltiobencil)aminoquinazolina (Hidrioduro)	
IV.10	4-(4-metiltiobencil)amino-2-pentilselenoquinazolina (Hidrioduro)	
IV.11	4-amino-2-hidroselenoquinazolina	

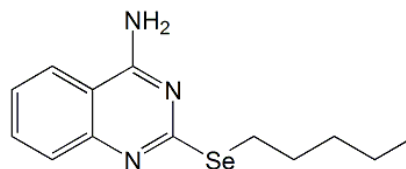
IV.12

4-amino-2-metilselenoquinazolina



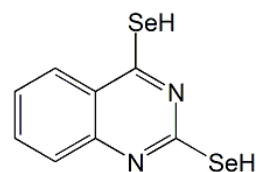
IV.13

4-amino-2-pentilselenoquinazolina



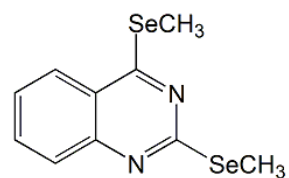
IV.14

2,4-dihidroselenoquinazolina



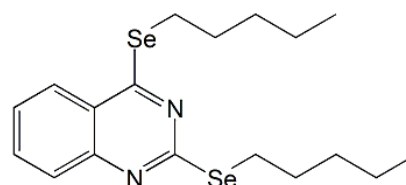
IV.15

2,4-dimetilselenoquinazolina



IV.16

2,4-dipentilselenoquinazolina



# BIBLIOGRAFÍA





Abdulah, R., Miyazaki, K., Nakazama, M., Koyama, H. Chemical forms of selenium for cancer prevention. *Journal of Trace Elements in Medicine & Biology*; 19: 141-150, **2005**.

Abulayha, A.M., Tabal, S.A., Shawesh, E.I., Elbasir, M.A., Elbanani, A.S., Lamami, Y.M., Bredan, A. Depletion of peripheral blood B cells with Rituximab and phenotype characterization of the recovering population in a patient with follicular lymphoma. *Leukemia Research*; 34: 307-311, **2010**.

Acton, E.M., Narayanan, V.L., Risbood, P.A., Shoemaker, R.H., Vistica, D.T., Boyd, M.R. Anticancer specificity of some ellipticinium salts against human brain tumors in vitro. *Journal of Medicinal Chemistry*; 37: 2185-2189, **1994**.

Adbel-Rhaman, B.A., Hafez, H.N. Synthesis of 4-substituted pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-4(1*H*)-one as analgesic and anti-inflammatory agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*; 19: 3392-3397, **2009**.

Aggarwal, N. Synthesis of 4-aryl substituted semicarbazones of some terpenes as novel anticonvulsants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*; 7: 260-264, **2004**.

Ahluwalia, M.S., de Groot, J., Liu, W.M., Gladson, C.D. Targeting SRC in glioblastoma tumors and brain metastases: rationale and preclinical studies. *Cancer Letters*; 298: 139-149, **2010**.

Ahmad, K.A., Harris, N.H., Johnson, A.D., Lindvall, H.C., Wang, G., Ahmed, K. Protein kinase CK2 modulates apoptosis induced by resveratrol and epigallocatechin-3-gallate in prostate cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*; 6: 1006-1012, **2007**.

Ahmed, K., Zhao, Q.L., Matsuya, Y., Yu, D.Y., Feril, L.B., Nemoto, H., Kondo, T. Rapid and transient intracellular oxidative stress due to novel macrospinelides trigger apoptosis via Fas/caspase-8-dependent pathway in human lymphoma U937 cells. *Chemico-Biological Interactions*; 170: 86-99, **2007**.

Akita, R.W., Sliwowski, M.X. Preclinical studies with Erlotinib (Tarceva). *Seminars in Oncology*; 3: 15-24, **2003**.

Alagarsamy, V., Raja Solomon, V., Murugan, M., Sankaranarayanan, R., Periyasamy, P., Deepa, R., Durai Anandkumar, T. Synthesis of 3-(2-pyridyl)-2-substituted-quinazolin-4(3*H*)-ones as new analgesics and anti-inflammatory agents. *Biomedicine & Pharmacotherapy*; 62: 454-461, **2008**.

Al-Damluji, S., Ganellin, C.R., Walters, M., Sechi, M., Cesare, F. The mechanism of action of antidepressants: a unitary hypothesis based on transport-P. *Current Drug Targets in CNS Neurology Disorders*; 3: 201-216, **2004**.

Al-Damluji, S., Porter, D., Krsmanovic, L.Z. Structural properties of group B ligands for transport-P. *British Journal of Pharmacology*; 117: 111-116, **1996**.

Al-Damluji, S., Porter, D., Krsmanovic, L.Z., Knutson, J.R., Kopin, I.J. Visual detection of transport-P in peptidergic neurons. *British Journal of Pharmacology*; 120: 876-882, **1997**.

Ali, A.S., Ali, S., El-Rayes, B.F., Philip, P.A., Sarkar, F.H. Exploitation of protein kinase C: a useful target for cancer therapy. *Cancer Treatment Reviews*; 35: 1-8, **2009**.

Ali, R., Ozcalemkas, F., Kimya, Y., Koksae, N., Ozkam, H., Ozkocaman, V., Hoyrazli, A., Calinkaya, M., Tunali, A. Acute leukemia and pregnancy. *Leukemia Research*; 33: 26-28, **2009**.

Al-Obaid, A.M., Abdel-Hamide, S.G., El-Kashef, H.A., Abdel-Aziz, A.A.M., El-Azab, A.S., Al-Khamees, H.A., El-Subbagh, H.I. Substituted quinazolines, part 3. Synthesis, in vitro antitumor activity and molecular modelling study of certain 2-thieno-4(3H)-quinazoline analogues. *European Journal of Medicinal Chemistry*; 56: 1-13, **2008**.

Amaral, A.F.S., Rothman, N., Kogevinas, M., Calle, M., Guey, L.T., Garcia-Closas, M., Silverman, D.T., Chanock, S., Real, F.X., Malats, N. Selenoproteins and bladder cancer risk: A case-control study. *Abstracts/Toxicology Letters*; 196S: S52, **2010**.

Anh, H.J., Koketsu, M., Yang, E.M., Kim, Y.M., Ishihara, H., Yang, H.O. 2-(4-methylphenyl)-1,3-selenazol-4-one induces apoptosis by different mechanisms in SKOV3 and HL 60 cells. *Journal of Cellular Biochemistry*; 99: 807-815, **2006**.

Appleton, J.D. Selenium in soil, grain, human hair and drinking water in relation to esophageal cancer in the Cixian area, Hebei Province, People's Republic of China. *Applied Geochemistry*; 4: 684-700, **2006**.

Aragon-Ching, J.B., Dahut, W.L. Anti-angiogenesis approach to genitourinary cancer treatment. *Update on Cancer Therapeutics*; 3: 182-188, **2009**.

Arienzo, R., Cramp, S., Dyke, H.J., Lockey, P.M., Norman, D., Roach, A.G., Swith, P., Wong, M., Wren, S.P. Quinazoline and benzimidazole MCH-1R antagonist. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*; 17: 1403-1407, **2007**.

Arthur, J.R. The glutathione peroxidases. *Cellular & Molecular Life Science*; 57: 1825-1835, **2000**.

Attanassov, P.K. Synthesis of 4-(phenylamino)quinazoline-2(1H)-selenoles and diselenides from isoselenocyanates: Dimroth rearrangement of an intermediate. *Helvetica Chimica Acta*; 87: 1873-1887, **2004**.

Aykin-Burns, N., Ercal, N. Effects of selenocystine on lead-exposed Chinese hamster ovary (CHO) and PC-12 cells. *Toxicology & Applied Pharmacology*; 214: 136-143, **2006**.

Azuma, M., Tamatani, T., Ashida, Y., Takashima, R., Harade, K., Sato, M. Cisplatin induces apoptosis in oral squamous carcinomacells by the mitochondria-mediated but not the NK-kB-suppressed pathway. *Oral Oncology*; 39: 282-289, **2003**.

Bacac, M., Stamenkovic, I. Metastatic cancer cell. *Annual Review of Pathology*; 3: 221-247, **2008**.

Ban, J.O., Kwak, D.H., Oh, J.H., Park, E.J., Cho, M.C., Song, H.S., Song, M.J., Han, S.B., Moon, D.S., Kang, K.W., Hong, J.T. Suppression of NF-B and GSK-3 is involved in colon cancer cell growth inhibition by the PPAR agonist troglitazone. *Chemico-Biological Interactions*; 188: 75-85, **2010**.

Barbosa, N.B.D., Nogueira, C.W., Guecheva, T.N., Bellinaso, M.D., Rocha, J.B.T. Diphenyl diselenide supplementation delays the development of *N*-nitroso-*N*-methylurea-induced mammary tumors. *Archives of Toxicology*; 82: 655-663, **2008**.

Barbosa, N.B.D., Rocha, J.B.T., Wondracek, D.C., Perottoni, J., Zeni, G., Nogueira, C.W. Diphenyl diselenide reduces temporarily hyperglycemia: possible relationship with oxidative stress. *Chemico-Biological Interactions*; 163: 230-238, **2006**.

Barton, D.H.R., Parekh, S.I., Tajbakhsh, M., Theodorakis, E.A., Tse, C.L. A convenient and high yielding procedure for the preparation of isoselenocyanates. Synthesis and reactivity of *o*-alkylselenocarbamates. *Tetrahedron*; 50: 639-654, **1994**.

Basnet, A., Thapa, P., Karki, R., Choi, H., Choi, J.H., Yun, M., Jeong, B.S., Jahng, Y., Na, Y., Cho, W.J., Kwon, Y., Lee, S.C., Lee, E.S. 2,6-dithienyl-4-furyl pyridines: Synthesis, topoisomerase I and II inhibition, cytotoxicity, structure-activity relationship and docking study. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*; 20: 42-47, **2010**.

Bazgir, A., Khanaposhtani, M.M., Soorki, A.A. One-pot synthesis and antibacterial activities of pyrazolo[4',3':5,6]pyrido[2,3-*d*]pyrimidine-dione derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*; 18: 5800-5803, **2008**.

Beckett, G.J., Arthur, J.R. Selenium and endocrine systems. *Journal of Endocrinology*; 184: 455-465, **2005**.

Bellmunt, J., Albiol, S., Suárez, C., Albanell, J. Optimizing therapeutic strategies in advanced bladder cancer: Update on chemotherapy and the role of targeted agents. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*; 69: 211-222, **2009**.

Benachour, N., Séralini, G.E. Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic and placental cells. *Chemical Research in Toxicology*; 22: 97-105, **2009**.

Bennett, J.S., Berger, B.W., Billings, P.C. The structure and function of platelet integrins. *Journal of Thrombosis & Haemostasis*; 7: 200-205, **2009**.

Berrier, A.L., Yamada, K.M. Cell-matrix adhesion. *Journal of Cell Physiology*; 231: 565-573, **2007**.

Bertoni, E., Salvadori, M. Antineoplastic effect of proliferation signal inhibitors: from biology to clinical application. *Journal of Nephrology*; 22: 457-462, **2009**.

Beshir, A.B., Ren, G., Magpusao, A.N., Barone, L.M., Yeung, K.C., Fenteany, G. Raf kinase inhibitor protein suppresses nuclear factor- $\kappa$ B-dependent cancer cell invasion through negative regulation of matrix metalloproteinase expression. *Cancer Letters*; 299: 137-149, **2010**.

Bhabak, K.P., Muges, G. Synthesis, characterization and antioxidant activity of some Ebselen analogues. *Chemistry-a European Journal*; 13: 4594-4601, **2007**.

Bhattacharyya, R.S., Husbeck, B., Feldman, D., Knox, S.J. Selenite treatment inhibits LAPC-4 tumor growth and prostate-specific antigen secretion in a xenograft model of prostate cancer. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*; 72: 935-940, **2008**.

Blankey, J., Bennet, L. Antihypertensive activity of 6-arylpyrido[2,3-d]pyrimidin-7-amine. Derivates 2,7-acylamide analogues. *Journal of Medicinal Chemistry*; 26: 403-412, **1983**.

Blume, S.W., Jackson, N.L., Frost, A.R., Grizzle, W.E., Shcherbakov, O.D., Choi, H., Meng, Z. Northwestern profiling of potential translation-regulatory proteins in human breast epithelial cells and malignant breast tissues: evidence for pathological activation of the IGF1R IRES. *Experimental & Molecular Pathology*; 88: 341-352, **2010**.

Böck, A., Forchhammer, K., Heider, J., Leinfelder, W., Sawers, G., Vepreek, B., Zinoni, F. Selenocysteine: the 21<sup>st</sup> amino acid. *Molecular Microbiology*; 5: 515-520, **1991**.

Bond, R.F. Cardiovascular adrenoreceptor function during compensatory and decompensatory hemorrhagic shock. *Circulatory Shock Journal*; 12: 9-24, **1984**.

Borges, L.P., Brandao, R., Godoi, B., Nogueira, C.W., Zeni, G. Oral administration of diphenyl diselenide protects against cadmium-induced liver damage in rats. *Chemico-Biological Interactions*; 171: 15-25, **2008**.

Borner, C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Molecular Immunology*; 39: 615-647, **2003**.

Borzilleri, R.M., Vite, G.D. Chapter 15 case history: discovery of Ixabepilone (IXEMPRA™), a first-in-class epothilone analog for treatment of metastatic breast cancer. *Annual Reports in Medicinal Chemistry*; 44: 301-322, **2009**.

Boutros, T., Chevet, E., Metrakos, P. Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death and cancer. *Pharmacology Review*; 60: 261-310, **2008**.

Brand, E. Organic Synthesis. Vol. III. *John Wiley and sons*; Capitulo: 21; p: 440, London, **1945**.

Brandt, W., Mologni, L., Preu, L., Lemcke, T., Gambacorti-Passerini, C., Kunick, C. Inhibitors of the RET tyrosine kinase based on a 2-(alkylsulfanyl)-4-(3-thienyl)nicotinonitrile scaffold. *European Journal of Medicinal Chemistry*; 45: 2919-2927, **2010**.

Brasca, M.G., Albanese, C., Alzani, R., Amici, R., Avanzi, N., Ballinari, D., Bischoff, J., Borghi, D., Casale, E., Croci, V., Fiorentini, F., Isacchi, A., Mercurio, C., Nesi, M., Orsini, P., Pastori, W., Pesenti, E., Pevarello, P., Roussel, P., Varasi, M., Volpi, D., Vulpetti, A., Ciomei, M. Optimization of 6,6-dimethyl pyrrolo[3,4-c]pyrazoles: Identification of PHA-793887, a potent CDK inhibitor suitable for intravenous dosing. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*; 18: 1844-1853, **2010**.

Brigelius-Flohé, R. Selenium compounds and selenoproteins in cancer. *Chemistry & Biodiversity*; 5: 389-395, **2008**.

Brooks, S.A., Lomax-Browne, H.J., Carter, T.M., Kinch, C.E., Hall, D.M.S. Molecular interactions in cancer cell metastasis. *Acta Histochemica*; 112: 3-25, **2010**.

Brozmanová, J., Maniková, D., Vlcková, V., Chovanec, M. Selenium: a double-edged sword for defense and offence in cancer. *Archives of Toxicology*; 84: 919-938, **2010**.

Bruey, J.M., Kantarjian, H., Estrov, Z., Zhang, Z., Ma, W., Albitar, F., Abdool, A., Thomas, D., Yeh, C., O'Brien, S., Albitar, M. Circulating Ki-67 protein in plasma as a biomarker and prognostic indicator of acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia Research*; 34: 173-176, **2010**.

Brunton, V.G., Frame, M.C. Src and focal adhesion kinase as therapeutic targets in cancer. *Current Opinion in Pharmacology*; 8: 427-432, **2008**.

Burk, R.F. Molecular biology of selenium with implications for its metabolism. *The FASEB Journal*; 5: 2274-2279, **1991**.

Burk, R.F., Hill, K.E. Selenoprotein P: an extracellular protein with unique physical characteristics and a role in selenium homeostasis. *Annual Review of Nutrition*; 25: 215-235, **2005**.

Burk, R.F., Hill, K.E., Motley, A.K. Selenoprotein metabolism and function: evidence for more than one function for selenoprotein P. *Journal of Nutrition*; 133: 1517-1520, **2003**.

Cao, S., Durrani, F.A., Rustum, Y.M. Selective modulation of the therapeutic efficacy of anticancer drugs by selenium containing compounds against human tumors xenografts. *Clinical Cancer Research*; 10: 2561-2569, **2004**.

Caridha, D., Kathcart, A.K., Jirage, D., Waters, N.C. Activity of substituted thiophene sulfonamides against malarial and mammalian cyclin dependent protein kinases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*; 20: 3863-3867, **2010**.

Carpenter, A., Trebitz, A.S., Shephen, R., Douglas, A., Turner, S. Melanin-concentrating hormone receptor antagonists as potential antiobesity agents. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*; 12: 1639-1647, **2002**.

Cavero, I., Spedding, M. A new drug: Alfuzosin. *Journal of Pharmacology*; 81: 13, **1984**.

Cemell, E. Selenium derivatives and its role in chemoprevention. *The Scientific World Journal*; 6: 1202, **2006**.

Chambard, J.C., Lefloch, R., Pouysségur, J., Lenormand, P. ERK implication in cell cycle regulation. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1773: 1299-1310, **2007**.

Chandrika, P.M., Wakaiah, T., Raghu-Ram-Rao, A., Narsaiah, B., Reedy, N.C., Sridhar, V. Synthesis of novel 4,6-disubstituted quinazoline derivatives, their anti-inflammatory and anti-cancer activity (cytotoxic) against U937 leukemia cell lines. *European Journal of Medicinal Chemistry*; 43: 846-852, **2008**.

Chang, C.W., Tsai, W.S., Chuang, W.J., Lin, Y.S., Wu, J.J., Liu, C.C., Tsai, P.J., Lin, M.T. Procaspase 8 and Bax are up-regulated by distinct pathways in Streptococcal pyrogenic exotoxin B-induced apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*; 284: 33195-33205, **2009**.

Chen, C.J., Nguyen, T., Shively, J.E. Role of calpain-9 and PKC- $\delta$  in the apoptotic mechanism of lumen formation in CEACAM1 transfected breast epithelial cells. *Experimental Cell Research*; 316: 638-648, **2010**.

Chen, K.M., Sacks, P.G., Spratt, T.E., Lin, J.M., Boyiri, T., Schwartz, J., Richie, J.P., Calcagnotto, A., Das, A., Bortner, J., Zhao, Z., Amin, S., Guttenplan, J., El-Bayoumy, K. Modulations of benzo[a]pyrene-induced DNA adduct cyclin D1 and PCNA in oral tissue by 1,4-phenylenebis(methylene)selenocyanate. *Biochemical & Biophysical Research Communications*; 383: 151-155, **2009**.

Chen, S.J., Hsu, C.H., Li, H.W., Lu, J.H., Chuang, L.T. Pinolenic acid inhibits human breast cancer MDA-MB-231 cell metastasis in vitro. *Food Chemistry*; 126: 1708-1715, **2011**.

Chen, T., Wong, Y.S. Selenocystine induces apoptosis of A375 human melanoma cells by activating ROS-mediated mitochondrial pathway and p53 phosphorylation. *Cellular & Molecular Life Sciences*; 65: 2763-2775, **2008**.

Chen, T., Wong, Y.S. Selenocystine induces reactive oxygen species-mediated apoptosis in human cancer cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*; 63: 105-113, **2009**.

Chen, T., Wong, Y.S., Zhang, W., Liu, J. Caspase- and p53-dependent apoptosis in breast carcinoma cells induced by a synthetic selenadiazole derivative. *Chemico-Biological Interactions*; 180: 54-60, **2009**.

Chen, Y., Hall, M., Graziano, J.H., Slavkovich, V., van Geen, A., Parvez, F., Ahsan, H. A prospective study of blood selenium levels and the risk of arsenic-related premalignant skin lesions. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*; 16: 207-213, **2007**.

Chhikara, B.S., Mandal, D., Parang, K. Synthesis and evaluation of fatty acyl ester derivatives of cytarabine as anti-leukemia agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*; 45: 4601-4608, **2010**.

Chilin, A., Marzaro, G., Marzano, C., Dalla-Via, L., Ferlin, M.G., Pastorini, G., Guiotto, A. Synthesis and antitumor activity of novel ams-acrine analogs: The critical role of the acridine moiety in determining its biological activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*; 17: 523-529, **2009**.

Chun, J.Y., Nadiminty, N., Lee, S.O., Onate, S.A., Lou, W., Gao, A.C. Mechanisms of selenium down-regulation of androgen receptor signalling in prostate cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*; 5: 913-918, **2006**.

Citri, A., Yarden, Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*; 7: 505-516, **2006**.

Collins, C.A., Marsh, C., Kym, P.R. Prospects for obesity treatment: MCH receptor antagonists. *Current Opinion in Investigational Drugs*; 4: 386-395, **2003**.

Combs, G.F. Current evidence and research needs to support a health claim for selenium and cancer prevention. *Journal of Nutrition*; 135: 343-347, **2005**.

Combs, G.F., Gray, W.P. Chemopreventive agents: selenium. *Pharmacology & Therapeutics*; 79: 179-192, **1998**.

Connolly, C.J., Hamby, J.M., Schroeder, M.C., Barbian, M., Lu, G.H., Panek, R.L., Amer, A., Shen, C., Kraker, A.J., Fry, D.W., Klohs, W.D., Doherty, A.M. Discovery and structure-activity study of a novel series of pyrido[2,3-d]pyrimidine tyrosine kinase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*; 7: 2415-2420, **1997**.

Cordeu, L., Cubedo, E., Bandrés, E., Rebollo, A., Sáenz, X., Chozas, H., Domínguez, M.V., Echeverría, M., Mendivil, B., Sanmartín, C., Palop, J.A., Font, M., García-Foncillas, J. Biological profile of new apoptotic agents based on 2,4-pyrido[2,3-*d*]pyrimidine derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*; 15: 1659-1669, **2007**.

Coumar, M.S., Wu, J.S., Leou, J.S., Tan, U.K., Chang, C.Y., Chang, T.Y., Lin, W.H., Hsu, J.A., Chao, Y.S., Wua, S.Y., Hsieh, Y.P. Aurora kinase A inhibitors: Identification, SAR exploration and molecular modeling of 6,7-dihydro-4*H*-pyrazolo-[1,5-*a*]pyrrolo[3,4-*d*]pyrimidine-5,8-dione scaffold. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*; 18: 1623-1627, **2008**.

Cross, T.G., Scheel-Toellner, D., Henriquez, N.V., Deacon, E., Salmon, M., Lord, M.J. Serine/threonine protein kinases and apoptosis. *Experimental Cell Research*; 256: 34-41, **2000**.

Cubedo, E., Cordeu, L., Bandrés, E., Rebollo, A., Malumbres, R., Sanmartín, C., Font, M., Palop, J.A., García-Foncillas, J. New symmetrical quinazoline derivatives selectively induce apoptosis in human cancer cells. *Cancer Biology & Therapy*; 5: 850-859, **2006**.

Cuevas, B.D., Abell, A.N., Johnson, G.L. Role of mitogen-activated protein kinases in signal integration. *Oncogene*; 26: 3159-3171, **2007**.

Das, A., Bortner, J., Desai, D., Amin, S., El-Bayoumy, K. The selenium analog of the chemopreventive compound *S*-*S*'-(1,4-phenylenebis[1,2-ethanediyl])bis(isothioureia) is a remarkable inducer of apoptosis and inhibitor of cell growth in human non-small cell lung cancer. *Chemico-Biological Interactions*; 180: 158-164, **2009**.

Daub, H., Specht, K., Ullrich, A. Strategies to overcome resistance to targeted protein kinase inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery*; 3: 1001-1010, **2004**.

Dave, C., Shap, P., Shah, G. Pyrido-pyrimidines: Synthesis and analgesic activity of 4-amino-pyrido[2,3-*d*]pyrimidines. *Indian Journal of Pharmacology Science*; 4: 78, **1986**.

David, M., Leblanc, R., Deux, B., Serre, C., Ribeiro, J., Clézardin, P., Peyruchaud, O. Interaction of autotaxin with breast cancer cell integrins might contribute to lysophosphatidic acid-mediated bone metastases. *Bone*; 48: P55, **2011**.

Davis, C.D., Emenaker, N.J., Milner, J.A. Cellular proliferation, apoptosis and angiogenesis: Molecular targets for nutritional prevention on cancer. *Seminars in Oncology*; 37: 243-257, **2010**.

De Freitas, A.S., Funck, V.R., Rotta, M.D., Bohrer, D., Morschbacher, V., Puntel, R.L., Nogueira, C.W., Farina, M., Aschner, M., Rocha, J.B.T. Diphenyl diselenide, a simple organoselenium compound, decreases methylmercury-induced cerebral, hepatic and renal oxidative stress and mercury deposition in adult mice. *Brain Research Bulletin*; 79: 77-84, **2009**.



De Heer, P., Koudijs, M.M., van de Velde, C.H.J., Aalbers, R., Tollenaar, R., Putter, H., Morreau, J., van de Wate, B., Kuppen, P.J.K. Combined expression of the non-receptor protein tyrosine kinases FAK and Src in primary colorectal cancer is associated with tumor recurrence and metastasis formation. *Journal of Cancer Surgery*; 34: 1253-1261, **2008**.

Debatin, K.M., Fulda, S. Apoptosis and Cancer Therapy. *VERLAG CHEMIE*, GmbH: Germany, Vol. 1: 157, **2006**.

Deming, D., Geiger, P., Chen, H., Kunnimalaiyaan, M., Holen, K. ZM336372 induces apoptosis associated with phosphorylation of GSK-3 in pancreatic adenocarcinoma cell lines. *Journal of Surgical Research*; 161: 28-32, **2010**.

Desagher, S., Martinou, J.C. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends in Cell Biology*; 10: 369-377, **2000**.

Dhillon, S., Wagstaff, A.J. Several quinazoline derivatives as EGFR inhibitor. *Drugs*; 67: 2101-2114, **2007**.

Di Giacomo, V., Rapino, M., Sancilio, S., Patruno, A., Zara, S., Di Pietro, R., Cataldi, A. PKC- $\delta$  signaling pathway is involved in H9c2 cells differentiation. *Differentiation*; 76: 1456-1475, **2010**.

Díaz-Padilla, I., Siu, I.L., Durán, I. Cyclin-dependent kinase inhibitors as potencial targeted anticancer agents. *Investigational New Drugs*; 27: 586-594, **2009**.

Dietrich, C.S., Greenberg, V.L., De Simone, C.L., Modesitt, S.C., van Nagell, J.R., Craven, R., Zimmer, S.G. Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) potentiates paclitaxel-induced apoptosis in ovarian cancer cell lines. *Gynecologic Oncology*; 116: 126-130, **2010**.

Dissoki, S., Aviv, Y., Laky, D., Abourbeh, G., Levitzki, A., Mishani, E. The effect of the [ $^{18}\text{F}$ ]-PEG group on tracer qualification of [4-(phenylamino)-quinazoline-6-YL]-amide moiety- an EGFR putative irreversible inhibitor. *Applied Radiation & Isotopes*; 65: 1140-1151, **2007**.

Diwadkar-Navsariwala, V., Diamond, A.M. The link between selenium and chemoprevention: a case for selenoproteins. *Journal of Nutrition*; 134: 2899-2902, **2004**.

Docheva, D., Popov, C., Mutschler, W., Schieker, M. Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics and the integrin system. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*; 11: 21-38, **2007**.

Dodig, S., Cepelak, I. The facts and controversies about selenium. *Acta Pharmaceutica*; 54: 261-276, **2004**.

Dong, Y., Zhang, H., Hawthorn, L., Ganther, H.E., Ip, C. Delineation of the molecular basis for selenium-induced growth arrest in human prostate cancer cells by oligonucleotide array. *Cancer Research*; 63: 52-59, **2003**.

Drake, E.N. Cancer chemoprevention: Selenium as a prooxidant not an antioxidant. *Medical Hypotheses*; 67: 318-322, **2006**.

Echeverría, M., Mendivil, B., Cordeu, L., Cubedo, E., García-Foncillas, J., Font, M., Sanmartín, C., Palop, J.A. Synthesis and biological evaluation of heteroaryldiamides and heteroaryldiamines as cytotoxic agents, apoptosis inducers and caspase-3 activators. *Archiv Der Pharmazie*; 339: 182-192, **2006**.

El Heni, J., Messaoudi, I., Hammouda, F., Kerkeni, A. Protective effects of selenium (Se) and zinc (Zn) on cadmium (Cd) toxicity in the liver of the rat: Effects on the oxidative stress. *Ecotoxicology & Environmental Safety*; 72: 1559-1564, **2009**.

El-Azab, A.S., Al-Omar, M.A., Abdel-Aziz, A.M.A., Abdel-Aziz, N.I., El-Sayed, M.A.A., Aleisa, A.M., Sayed-Ahmed, M.M., Abdel-Hamide, S.G. Design, synthesis and biological evaluation of novel quinazoline derivatives as potential antitumor agents: Molecular docking study. *European Journal of Medicinal Chemistry*; 45: 4188-4198, **2010**.

El-Bayoumy, K. The protective role of selenium on genetic damage on cancer. *Mutation Research*; 475: 123-139, **2001**.

El-Bayoumy, K., Das, A., Narayanan, B., Narayanan, N., Fiala, E.S., Desai, D., Rao, C.V., Amin, S., Sinha, R. Molecular targets of the chemopreventive agent 1,4-phenylenebis (methylene)-selenocyanate in human non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis*; 27: 1369-1376, **2006**.

El-Bayoumy, K., Sinha, R. Mechanisms of mammary cancer chemoprevention by organoselenium compounds. *Mutation Research/Fundamental & Molecular Mechanisms of Mutagenesis*; 551: 181-197, **2004**.

Elgindy, N., Elkhodairy, K., Molokhia, A., Elzoghby, A. Lyophilization monophasic solution technique for improvement of the physicochemical properties of an anticancer drug, flutamide. *European Journal of Pharmaceutics & Biopharmaceutics*; 74: 397-405, **2010**.

El-Sayed, W.M., Aboul-Fadl, T., Lamb, J.G., Roberts, J.C., Franklin M.R. Effect of selenium-containing compounds on hepatic chemoprotective enzymes in mice. *Toxicology*; 220: 179-188, **2006**.

El-Sayed, W.M., Aboul-Fadl, T., Lamb, J.G., Roberts, J.C., Franklin M.R. Acute effects of novel selenazolidines on murine chemopreventive enzymes. *Chemico-Biological Interactions*; 162: 31-42, **2006**.

El-Sayed, W.M., Hussin, W.A., Franklin M.R. Antimutagenicity of 2-substituted selenazolidine-4-(R)-carboxylic acids. *Mutation Research*; 627:136-45, **2007**.

Emami, S., Hosseinimehr, S.J., Maghasi, S.M., Akhlaghpour, S. Kojic acid and its manganese and zinc complexes as potential radioprotective agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*; 17: 45-48, **2007**.

Enache, M., Anghelache, I., Volanschi, E. Coupled spectral and electrochemical evaluation of the anticancer drug mitoxantrone–sodium dodecyl sulfate interaction. *International Journal of Pharmaceutics*; 390: 100-106, **2010**.

Erkekoglu, P., Rachidi, W., Yuzugullu, O.G., Giray, B., Ozturk, M., Favier, A., Hincal, F. Evaluation of the effects of phthalates on antioxidant status, p53 expression and oxidative DNA damage in Leydig carcinoma cells and protection by selenium compounds. *Abstracts/Toxicology Letters*; 196S: S37-S351, **2010**.

Ermakov, V., Jovanović, L. Selenium deficiency as a consequence of human activity and its correction. *Journal of Geochemical Exploration*; 117: 200-205, **2010**.

Fang, J., Zhong, L., Zhao, R., Holmgren, A. Ebselen: a thioredoxin reductase dependent catalyst for alpha-tocopherol quinone reduction. *Toxicology & Applied Pharmacology*; 207: 103-109, **2005**.

Feng, W., Satyanarayana, M., Tsai, Y.C., Liu, A.A., Liu, L.F., LaVoie, E.J. Novel topoisomerase I-targeting antitumor agents synthesized from the *N,N,N*-trimethylammonium derivative of ARC-111,5*H*-2,3-dimethoxy-8,9-methylenedioxy-5-[(2-*N,N,N*-trimethylammonium)ethyl]dibenzo[*c,h*][1,6]naphthyridin-6-one iodide. *European Journal of Medicinal Chemistry*; 44: 3433-3438, **2009**.

Feng, W., Satyanarayana, M., Tsai, Y.C., Liu, A.A., Liu, L.F., LaVoie, E.J. 12-Substituted 2,3-dimethoxy-8,9-methylenedioxybenzo[*l*]phenanthridines as novel topoisomerase I-targeting antitumor agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*; 17: 2877-2885, **2009**.

Feng, Y., Shi, Z., Fang, X., Xu, M., Dai, J. Perfluorononanoic acid induces apoptosis involving the Fas death receptor signaling pathway in rat testis. *Toxicology Letters*; 190: 224-230, **2009**.

Fenton, T.R., Gout, I.T. Functions and regulation of the 70 kDa ribosomal S6 kinases. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*; 43: 47-59, **2011**.

Fernandes, C., Olivenia, C., Gano, L., Bourkoule, A., Pirmettis, I., Santos, I. Radioiodination of new EGFR inhibitors as potential SPECT agents for molecular imaging of breast cancer. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*; 15: 3974-3980, **2007**.

Fernández, E. Temario on-line. Tema 40: Configuración de los seres vivos. Departamento de Histología. Ciencias Experimentales. Universidad Miguel Hernández, **2009**.

Fixsen, S.M., Howard, M.T. Processive selenocysteine incorporation during synthesis of eukaryotic selenoproteins. *The Journal of Molecular Biology*; 399: 385-396, **2010**.

Flis, S., Gnyszka, A., Flis, K., Splawinski, J. MS275 enhances cytotoxicity induced by 5-fluorouracil in the colorectal cancer cell. *European Journal of Pharmacology*; 627: 26-32, **2010**.

Folkman, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Medicine*; 1: 27-31, **1995**.

Folkman, J. Angiogenesis. *Annual Review of Medicine*; 57: 1-18, **2006**.

Font, M., Ardaiz, E., Cordeu, L., Cubedo, E., García-Foncillas, J., Sanmartin, C., Palop, J.A. Structural characteristics of novel symmetrical diaryl derivatives with nitrogenated functions. Requirements for cytotoxic activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*; 14: 1942-1948, **2006**.

Font, M., González, A., Sanmartín, C., Palop, J.A. New insights into the structural requirements for pro-apoptotic agents based on 2,4-diaminoquinazoline, 2,4-diaminopyrido[2,3-*d*]pyrimidine and 2,4-diaminopyrimidine derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*; in press, **2011**.

Frame, M.C. Src in cancer: deregulation and consequences for cell behavior. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1602: 114-130, **2002**.

Franklin, M.R., Moos, P.J., El-Sayed, W.M., Aboul-Fadl, T., Roberts, J.C. Pre- and post-initiation chemoprevention activity of 2-alkyl/aryl selenazolidine-4(*R*)-carboxylic acids against tobacco-derived nitrosamine (NNK)-induced lung tumors in the *A/J* mouse. *Chemico-Biological Interactions*; 168: 211-220, **2007**.

Fraser, H.M., Lunn, S.F. Angiogenesis and its control in the female reproductive system. *British Medical Bulletin*; 56: 787-797, **2000**.

Friday, B.B., Adjei, A.A. Advances in targeting the Ras/raf/MEK/Erk mitogen-activated protein kinase cascade with MEK inhibitors for cancer therapy. *Clinical Cancer Research*; 14: 342-346, **2008**.

Galluzzi, L., Knoemer, G., Morselli, E. Cell death modalities: classifications and pathophysiological implications. *Cell Death Differentiation*; 14: 1237-1243, **2007**.

Gammelgaard, B., Gabel-Jensen, C., Stürup, S., Hansen, H. Complementary use of molecular and element specific mass spectrometry for identification of selenium compounds related to human selenium metabolism. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*; 390: 1691-1706, **2008**.

Gandin, V., Fernandes, A.P., Rigobello, M.P., Dani, B., Sorrentino, F., Tisato, F., Björnstedt, M., Bindoli, A., Sturaro, A., Rella, R., Marzano, C. Cancer cell death induced by phosphine gold (I) compounds targeting thioredoxin reductase. *Biochemical Pharmacology*; 79: 90-101, **2010**.

Gangjee, A., Adair, O., Queener, S.F. Synthesis of 2,4-diamino-6-(thioarylmethyl)pyrido[2,3-*d*]pyrimidines as dihydrofolate reductase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*; 9: 2929-2935, **2001**.

Gangjee, A., Kurup, S., Ihnat, M.A., Thorpe, J.E., Shenoy, S.S. Synthesis and biological activity of *N*-4-phenylsubstituted-6-(2,4-dichlorophenylmethyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine-2,4-diamines as vascular endothelial growth factor receptor-2 inhibitors and antiangiogenic and antitumor agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*; 18: 3575-3587, **2010**.

Gangjee, A., Li, W., Lin, L., Zeng, Y., Ihnat, M., Warnke, L.A., Green, D.W., Cody, V., Pace, J., Queener, S.F. Design, synthesis and X-ray crystal structures of 2,4-diaminofuro[2,3-*d*]pyrimidines as multireceptor tyrosine kinase and dihydrofolate reductase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*; 17: 7324-7336, **2009**.

Gangjee, A., Queener, S.F. 6-substituted-2,4-diaminopyrido[2,3-*d*]pyrimidines analogues of Piritrexim as inhibitors of hidrofolate reductase from rat liver, *Pneumocitis carinii* and *Toxoplasma gondii* as antitumor agents. *Journal of Medicinal Chemistry*; 41: 4533-4541, **1999**.

Ganther, H.E. Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. *Carcinogenesis*; 20: 1657-1666, **1999**.

García, M., Vecino, E. Vías de señalización intracelular que conducen a la apoptosis de las células de la retina. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*; 78:7, **2003**.

Garofalo, S., Rosa, R., Bianco, R., Tortora, G. EGFR-targeting agents in oncology. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*; 18: 889-901, **2008**.

Gehmert, S., Prantl, L., Vykoukal, J., Alt, E., Song, Y.H. Breast cancer cells attract the migration of adipose tissue-derived stem cells via the PDGF-BB/PDGFR- $\beta$  signaling pathway. *Biochemical & Biophysical Research Communications*; 398: 601-605, **2010**.

Ghisleni, G., Kazauckas, V., Both, F.L., Pagnussat, N., Mioranza, S., Rocha, J.B.T., Souza, D.O. Diphenyl diselenide exerts anxiolytic-like effect in Wistar rats: putative roles of GABAA and 5HT receptors. *Programs in Neuro-Psychopharmacology*; 32: 1508-1515, **2008**.

Gielen, M., Tiekink, E.R.T. Metallotherapeutic drugs and metal-based diagnostic. *Agents London, Willey*. 17; 1-17, **2005**.

Gilmore, A.P. Anoikis. *Cell Death Differentiation*; 12: 1473-1477, **2005**.

Go, K., Kurimoto, Y., Kitamura, M. Preparation of pyrido[2,3-*d*]pyrimidines derivatives as allergy inhibitors and antiasthmatics. *European Patology & Applied Chemistry/Abstracts*; 243: 311, **1988**.

Goel, A., Fuerst, F., Hotchkiss, E., Boland, C.R. Selenomethionine induces p53 mediated cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells. *Cancer Biology & Therapy*; 5: 529-535, **2006**.

Gordon, D.A., Kelley, W.N., Harris, E.D., Ruddy, S., Sledge, S.B. Textbook of rheumatology (IV ed.). *Philadelphia: WB Saunders Company*; 6: 805-823, **1989**.

Graffner-Nordberg, M., Kolmodin, K., Aquist, J., Queener, S.F., Hallberg, A. Design and synthesis of dihydrofolate reductase inhibitors encompassing a bridging ester group. Evaluation in a mouse colitis model. *Journal of Medicinal Chemistry*; 46: 3455-3462, **2003**.

Guan, L., Han, B., Li, J., Li, Z., Huang, F., Yang, Y., Xu, C. Exposure of human leukemia NB4 cells to increasing concentrations of selenite switches the signaling from pro-survival to pro-apoptosis. *Annals of Hematology*; 88: 733-742, **2009**.

Gunaratnam, M., Green, C., Moreira, J.B., Moorhouse, A.D., Kelland, L.R., Moses, J.E., Neidle, S. G-quadruplex compounds and cis-platin act synergistically to inhibit cancer cell growth in vitro and in vivo. *Biochemical Pharmacology*; 78: 115-122, **2009**.

Gundugola, A.S., Chandra, K.L., Perchellet, E.M., Waters, A.M., Perchellet, J.P.H., Sayat, S. Synthesis and antiproliferative evaluation of 5-oxo and 5-thio derivatives of 1,4-diaryl tetrazoles. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*; 20: 3920-3924, **2010**.

Guttenplan, J., Chen, K.M., Khmel'nitsky, M., Kosinska, W., Hennessy, J., Bruggeman, R., Desai, D., Amin, S., Sun, Y.W., Spratt, T.E., El-Bauyomy, K. Effects of 1,4-phenylenebis(methylene)selenocyanate on mutagenesis and p53 protein expression in the tongue of rats treated with 4-nitroquinolone-*N*-oxide. *Mutation Research*; 634: 146-155, **2007**.

Hajbi, Y., Neagoie, C., Biannic, B., Chilloux, A., Vedrenne, E., Baldeyrou, B., Bailly, C., Mérour, J.Y., Rosca, S., Routier, S., Lansiaux, A. Synthesis and biological activities of new furo[3,4-*b*]carbazoles: Potential topoisomerase II inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*; 45: 5428-5437, **2010**.

Hamilton, E.E., Fautch, J.M., Gentry, S.M., Wilker, J.J. Alkylation of inorganic oxo compounds and insights on preventing DNA damage. *Journal of the American Chemistry Society*; 128: 3388-3395, **2006**.

- Han, E.K.H., Levenson, J.D., McGonigal, T., Shah, O.J., Woods, K.W., Hunter, T., Giranda, V.L. Akt inhibitor A-443654 induces rapid Akt Ser-473 phosphorylation independent of mTORC1 inhibition. *Oncogene*; 26: 5655-5661, **2007**.
- Han, J.M., Sahin, M. TSC1/TSC2 signaling in the CNS. *FEBS Letters*; 585: 973-980, **2011**.
- Hanif, I.M., Ahmad, K.A., Ahmed, K., Pervaiz, S. Involvement of reactive oxygen species in apoptosis induced by pharmacological inhibition of protein kinase CK2. *Annals of the New York Academic of Science*; 1171: 591-599, **2009**.
- Hanif, I.M., Shazi, M.A., Ahma, K.A., Pervaiz, S. Casein Kinase II: An attractive target for anti-cancer drug design. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*; 42: 1602-1605, **2010**.
- Hatfield, D.L., Yoo, M.H., Carlson, B.A., Gladyshev, V.N. Selenoproteins that function in cancer prevention and promotion. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1790: 1541-1545, **2009**.
- Heidorn, S.J., Milagre, C., Whittaker, S., Nourry, A., Niculescu-Duvas, I., Dhomen, N., Hussain, J., Reis-Filho, J.S., Springer, C.J., Pritchard, C., Marais, R. 1-kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF. *Cell*; 140: 209-221, **2010**.
- Hengartner, M.O. The biochemistry of apoptosis. *Nature*; 407: 770-776, **2000**.
- Heo, S.R., Han, A., Kwonb, Y.K., Joung, I. p62 protects SH-SY5Y neuroblastoma cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced injury through the PDK1/Akt pathway. *Neuroscience Letters*; 450: 45-50, **2009**.
- Hernández, R., Angeli-Greaves, M., Carvajal, A.R., Guerrero, J., Armas, M.C., Armas-Hernández, M.J. Terazosin: ex viva and in vitro platelet aggregation effects in patients with arterial hypertension. *American Journal of Hypertension*; 9: 437-444, **1996**.
- Hervieu, G., Cluderay, J.E., Harrison, D.C. Melanin-concentrating hormone functions in the nervous system: food intake and stress. *Expert Opinion in Therapeutic Targets*; 7: 495-511, **2003**.
- Hoch, U., Lynch, J., Sato, Y., Kashimoto, S., Kajikawa, F., Furutani, Y., Silverman, J.A. Voreloxin, formerly SNS-595, has potent activity against a broad panel of cancer cell lines and *in vivo* tumor models. *Cancer Chemotherapy & Pharmacology*; 64: 53-65, **2009**.
- Hofseth, L.J., Hussain, S.P., Harris, C.C. p53: 25 years after its discovery. *Trends in Pharmacology Science*; 25: 177-181, **2004**.
- Holmgren, A. Selenite in cancer therapy: a commentary on "selenite induces apoptosis in sarcomatoid malignant mesothelioma cells through oxidative stress". *Free Radical Biology & Medicine*; 41: 862-865, **2006**.

Hou, G., Gravier, D., Casadebaig, F., Dupin, J.P., Bernard, H., Boisseau, M. Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-one derivatives and 1,2,3,4-tetrahydro-pyrido[2,3-*d*]pyrimidine derivatives: synthesis and *in vitro* study of their activity against platelet aggregation. *Pharmazie*; 50: 719-722, **1995**.

Hsieh, C.C., Papaconstantinou, J. Akt/PKB and p38 MAPK signaling, translational initiation and longevity in Snell dwarf mouse livers. *Mechanisms of Ageing & Development*; 125: 785-798, **2004**.

Hu, H., Jiang, C., Ip, C., Rustum, Y.M., Lu, J., Liu, M.J. Inorganic selenium sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis through superoxide/p53/Bax-mediated activation of mitochondrial pathway. *Molecular Cancer & Therapy*; 5: 246-252, **2006**.

Hu, H., Jiang, C., Ip, C., Rustum, Y.M., Lu, J. Methylseleninic acid potentiates apoptosis induced by chemotherapeutic drugs in androgen-independent prostate cancer cells. *Clinical Cancer Research*; 11: 2379-2388, **2005**.

Huang, F., Nie, C., Yang, Y., Yue, W., Ren, Y., Sharp, Y., Wang, X., Jin, H., Xu, C., Chen, Q. Selenite induces redox-dependent Bax activation and apoptosis in colorectal cancer cells. *Free Radical Biology & Medicine*; 46: 1186-1196, **2009**.

Hueso-Falcón, I., Girón, N., Velasco, P., Amaro-Luis, J.M., Ravelo, A.G., de las Heras, B., Hortelano, S., Estevez-Braun, A. Synthesis and induction of apoptosis signaling pathway of ent-kaurane derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*; 18: 1724-1735, **2010**.

Huh, W.K., Sill, M.W., Darcy, K.M., Elias, K.M., Hoffman, J.S., Boggess, J.F., Alvarez, R.D., Long, H.J., O'Malley, D.M., Birrer, M.J. Efficacy and safety of imatinib mesylate (Gleevec®) and immunohistochemical expression of c-Kit and PDGFR- $\beta$  in a Gynecologic Oncology Group Phase II Trial in women with recurrent or persistent carcinosarcomas of the uterus. *Gynecologic Oncology*; 117: 248-254, **2010**.

Humphries, J.D., Byron, A., Humphries, M.J. Integrin ligands at a glance. *Journal of Cell Science*; 119: 3901-3903, **2006**.

Huppertz, B., Kadyrov, M., Kingdom, J.C. Apoptosis and its role in the trophoblast. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*; 195: 29-39, **2006**.

Hurst, D.R., Welch, D.R. Metastasis suppressor genes: At the interface between the environment and tumor cell growth. *International Review of Cell & Molecular Biology*; 3: 107-180, **2011**.

Hurst, R., Elliot, R.M., Goldson, A.J., Fairweather, S.J. Se-methylselenocysteine alters collagen gene and protein expression in human prostate cells. *Cancer Letters*; 269: 117-126, **2008**.



Husbeck, B., Bhattacharyya, R.S., Feldman, D., Knox, D.S. Inhibition of androgen receptor signaling by selenite and methylseleninic acid in prostate cancer cells: two distinct mechanisms of action. *Molecular & Cancer Therapy*; 5: 2078-2085, **2006**.

Husbeck, B., Peelh, D.M., Knox, S.J. Redox modulation in human prostate carcinoma cells by selenite increases radiation-induced cell killing. *Free Radical Biology & Medicine*; 38: 50-57, **2005**.

Huynh, N., Liu, K.H., Baldwin, G.S., He, H. P21-activated kinase 1 stimulates colon cancer cell growth and migration/invasion via ERK- and AKT-dependent pathways. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1803: 1106-1113, **2010**.

Hwang, S.O., Lee, G.M. Effect of Akt overexpression on programmed cell death in antibody-producing Chinese hamster ovary cells. *Journal of Biotechnology*; 139: 89-94, **2009**.

Hynes, R.O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*; 110: 673-687, **2002**.

Ibáñez, E., Plano, D., Font, M., Calvo, A., Prior, C., Palop, J.A., Sanmartín, C. Synthesis and antiproliferative activity of novel symmetrical alkylthio -and alkylseleno- imidocarbamates. *European Journal of Medicinal Chemistry*; 46: 265-274, **2011**.

Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J., Guan, K.L. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signaling. *Nature Cell Biology*; 4: 648-57, **2002**.

Ip, C., Hayes, C., Budnick, R.M., Ganther, H.E. Chemical form of selenium, critical metabolites and cancer prevention. *Cancer Research*; 51: 595-600, **1991**.

Ip, C., Lisk, D.J., Ganther, H.E. Activities of structurally-related lipophilic selenium compounds as cancer chemopreventive agents. *Anticancer Research*; 18: 4019-4025, **1998**.

Ip, C., Thompson, Z., Ganther, H.E. *In vitro* and *in vivo* studies of methylseleninic acid: evidence that a monomethylated selenium metabolite is critical for cancer chemoprevention. *Cancer Research*; 60: 2882-2886, **2000**.

Irigaray, P., Newby, J.A., Clapp, R., Hardell, L., Howard, V., Montagnier, L., Epstein, S., Belpomme, D. Lifestyle-related factors and environmental agents causing cancer: An overview. *Biomedicine & Pharmacotherapy*; 61: 640-658, **2007**.

Isbilen, B., Fraser, S.P., Djamgoz, M.B.A. Docosahexaenoic acid (omega-3) blocks voltage-gated sodium channel activity and migration of MDA-MB-231 human breast cancer cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*; 38: 2173-2182, **2006**.

Jackson, M.I., Combs, G.F. Selenium and anticarcinogenesis: underlying mechanisms. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*; 11: 718-726, **2008**.

Jain, K.S., Bariwal, J.B., Kathiravan, M.K., Phoujdar, M.S., Shane, R.S., Chauhan, B.S., Shah, A.K., Yadav, M.R. Recent advances in selective  $\alpha_1$ -adrenoreceptor antagonist as antihypertensive agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*; 16: 4759-4800, **2008**.

Jallal, H., Valentino, M.L., Chen, G., Boschelli, F., Ali, S., Rabbani, S.A. A Src/Abl kinase inhibitor, SKI-606, blocks breast cancer invasion, growth and metastasis *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Research*; 67: 1580-1588, **2007**.

Janjetovic, K., Vucicevic, L., Misirkic, M., Vilimanovich, U., Tovilovic, G., Zogovic, N., Nikolic, Z., Jovanovic, S., Bumbasirevic, V., Trajkovic, V., Harhaji-Trajkovic, L. Metformin reduces cisplatin-mediated apoptotic death of cancer cells through AMPK-independent activation of Akt. *European Journal of Pharmacology*; 651: 41-50, **2011**.

Jarvis, M.F., Yu, H., McCarauhty, S., Wismer, C.T., Mikusa, J., Zhu, C., Chu, K., Kohlhass, K., Cowart, M., Lee, C.H., Stewart, A.O., Cox, B.F., Polakowski, J., Kowaluk, A. Analgesic and anti-inflammatory effects of A-286501, a novel orally active adenosine kinase inhibitor. *Pain*; 96: 107-118, **2002**.

Jatav, V., Mishra, P., Kashaw, S., Stables, J.P. CNS depressant and anticonvulsant activities of some novel 3-[5-substituted 1,3,4-thiadiazole-2-yl]-2-styrylquinazoline-4(3H)-ones. *European Journal of Medicinal Chemistry*; 43: 1945-1954, **2008**.

Jeffrey, K.L., Camps, M., Rommel, C., Mackay, C.R. Targeting-dual specificity phosphatases: manipulating MAPK kinase signaling and immune responses. *Nature Reviews Drug Discovery*; 6: 391-403, **2007**.

Jiang, C., Wang, Z., Ganther, H.E., Lü, J. Distinct effects of methylseleninic acid versus selenite in apoptosis, cell cycle and protein kinase pathways in DU145 human cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*; 1: 1059-1066, **2002**.

Jiang, G., Lui, Y.Q., Wei, Z.P., Pei, D.S., Mao, L.J., Zheng, J.N. Enhanced anti-tumor activity by the combination of a conditionally replicating adenovirus mediated interleukin-24 and dacarbazine against melanoma cells via induction of apoptosis. *Cancer Letters*; 294: 220-228, **2010**.

Juang, S.H., Lung, C.C., Hsu, P.C., Hsu, K.S., Li, Y.C., Hong, P.C., Shiah, H.S., Kuo, C.C., Huang, C.W., Wang, Y.C., Huang, L., Chen, T.S., Chen, S.F., Fu, K.C., Hsu, C.L., Lin, M.J., Chang, C.J., Ashendel, C.L., Chan, T.C.K., Chou, K.M., Chang, J.Y. D:501036. A novel selenophene-based triheterocycle derivate exhibits potent *in vitro* and *in vivo* antitumoral activity witch involves DNA damage and ataxia telangiectasia-mutated nuclear protein kinasa activator. *Molecular Cancer Therapeutics*; 6: 193-202, **2007**.

Kapuriya, N., Kapuriya, K., Dong, H.J., Zhang, X.G., Chou, T.C., Chen, Y.T., Lee, T.C., Lee, W.C., Tsai, T.H., Naliapara, Y., Su, T.L. Novel DNA-directed alkylating agents: Design, synthesis and potent antitumor effect of phenyl-*N*-mustard-9-anilinoacridine conjugates via a carbamate or carbonate linker. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*; 17:1264-1275, **2009**.

Karin, M., Gallagher, E. From JNK to pay dirt: Jun kinases, their biochemistry, physiology and clinical importance. *IUBMB Life*; 57: 283-295, **2005**.

Karki, R., Thapa, P., Kang, M.J., Jeong, T.C., Namb, J.M., Kim, H.L., Na, Y., Cho, W.J., Kwon, Y., Lee, E.S. Synthesis, topoisomerase I and II inhibitory activity, cytotoxicity and structure-activity relationship study of hydroxylated 2,4-diphenyl-6-arylpyridines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*; 18: 3066-3077, **2010**.

Katz, B.Z. Adhesion molecules- the lifelines of multiple myeloma cells. *Seminars in Cancer Biology*; 20: 186-195, **2010**.

Kaur, P., Evje, L., Aschner, M., Syversen, T. The *in vitro* effects of selenomethionine on methylmercury induced neurotoxicity. *Toxicology in Vitro*; 23: 378-385, **2009**.

Kim, A., Oh, J.H., Park, J.M., Chung, A.S. Methylselenol generated from selenomethionine by methioninase down regulates integrin expression and induces caspase-mediated apoptosis of B16F10 melanoma cells. *Journal of Cellular Physiology*; 212: 386-400, **2007**.

Kim, E.H., Sohn, H., Kwon, H.J., Kim, S.U., Kim, M.J., Lee, S.J., Choi, K.S. Sodium Selenite Induced Superoxide-Mediated Mitochondrial Damage and Subsequent Autophagic Cell Death in Malignant Glioma Cells. *Cancer Research*; 67: 6314-6324, **2007**.

Kim, H.J., Lee, J.S., Park, E.H., Lim, W.S., Sei, J.Y., Koh, B.S., Son, B.H., Ahn, J.H., Jeong, K.H., Kim, S.B., Ahn, S.H. Short term results from GHRH analogue use in pre-menopausal breast cancer in Korea. *European Journal of Surgical Oncology*; 35: 936-941, **2009**.

Kim, H.P., Frankel, A.E., Hogge, D.E. A diphtheria toxin interleukin-3 fusion protein synergizes with tyrosine kinase inhibitors in killing leukemic progenitors from BCR/ABL positive acute leukemia. *Leukemia Research*; 34: 1035-1042, **2009**.

Kim, H.Y., Choi, H., Lee, J., Hwang, I.C., Moon, S.H., Kim, S.J., Lee, H.W., Im, D.S., Lee, S.S., Ahn, S.K., Kim, S.W., Han, C.K., Yoon, J.H., Lee, K.J., Choi, N.S. Quinazolines as potent and highly selective PDE5 inhibitors as potential therapeutics for male erectile dysfunction. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*; 18: 6279-6282, **2008**.

Kim, S.J., Park, C., Han, A.L., Youn, M.J., Lee, J.H., Kim, Y., Kim, E.S., Kim, H.J., Kim, J.K., Lee, H.K., Chung, S.Y., So, H., Park, R. Ebselen attenuates cisplatin-induced ROS generation through Nfr2 activation. *Hearing Research*; 251: 70-82, **2009**.

Klayman, D.L., Griffin, T.S. Reaction of selenium with sodium borohydride in protic solvents. A facile method for the introduction of selenium into organic molecules. *Journal of the American Chemistry Society*; 95: 197-199, **1972**.

Klimes, D., Kubasek, M., Smid, R., Dusek, L. Internet-based system for anti-tumor chemotherapy evaluation. *Computer Methods & Programs in Biomedicine*; 93: 292-296, **2009**.

Knights, V., Cook, S.J. De-regulated FGF receptors as therapeutic targets in cancer. *Pharmacology & Therapeutics*; 125: 105-117, **2010**.

Kong, D., Dan, S., Yamazaki, K., Yamori, T. Inhibition profiles of phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors against PI3K superfamily and human cancer cell line panel JFCR39. *European Journal of Cancer*; 46: 1111-1121, **2010**.

Kooper, L. Lapatinib: A sword with two edges. *Pathology & Oncology Research*; 14: 1-8, **2008**.

Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K.T., McGarry, T.J., Kirschner, M.W., Kohts, K., Kwiatkowski, D.J., Williams, L.T. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science*; 278: 294-298, **1997**.

Kotra, S., Madale, K.K., Jamil, K. Homology models of the mutated EGFR and their response towards quinazoline analogues. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*; 27: 244-254, **2008**.

Kowalski, T.J. Melanin-concentrating hormone-1 receptor antagonism decreases feeding by reducing meal size. *Current Opinion in Investigational Drugs*; 13: 1113, **2004**.

Kraker, A.J., Hartl, B.G., Amar, A.M., Barvian, M.R., Showalters, H.D.H., Moore, C.W. Biochemical and cellular effects of c-Src Kinase-selective pyrido[2,3-*d*]pyrimidine tyrosine kinase inhibitors. *Biochemical Pharmacology*; 60: 885-898, **2000**.

Krause, D.S. Tyrosine Kinases as Targets for Cancer Therapy. *The New England Journal of Medicine*; 353: 172-179, **2005**.

Kroemer, G., Dallaporta, B., Resche-Rigon, M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annual Review of Physiology*; 60: 619-642, **1998**.

Kumar, R.S., Arunachalam, S., Periasamy, V.S., Preethy, C.P., Riyasdeen, A., Akbarsha, M.A. Synthesis, DNA binding and antitumor activities of some novel polymer-cobalt(III) complexes containing 1,10-phenanthroline ligand. *Polyhedron*; 27: 1111-1120, **2008**.

Kuyper, L., Garvey, J.M., Beccanari, D.P., Champness, J.N., Stammers, D.K., Beddell, C.R. Pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidines and pyrido[2,3-*d*]pyrimidines as conformationally restricted analogues of the antibacterial agent trimethoprim. *Journal of Medicinal Chemistry*; 39: 889-892, **1996**.

Kwon, O., Kyung, A.K., Lom, H., Sun, O.K., Min, S.K., Cha, E.Y., Yoon, D.B., Dai, E.S., Mira, J., Jong, S.A., Kimlonizing, B.O. Radiation can induce GSK-3 $\beta$  phosphorylation and NF- $\kappa$ B transcriptional transactivation in ATM-deficient fibroblasts. *Cellular Signalling*; 20: 602-612, **2008**.

Kyriakis, J.M., Avruch, J. Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation. *The Journal of Biological Chemistry*; 271: 24313-24316, **1996**.

Lakshmi Narayana, B., Rao, A.R.R., Rao, P.S. Synthesis of new 2-substituted pyrido[2,3-d]pyrimidin-4(1H)-ones and their antibacterial activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*; 23: 1-8, **2008**.

Lan, L.X., Zhao, F., Wang, Y., Zeng, H.H. The mechanism of apoptosis induced by a novel thioredoxin reductase inhibitor in A549 cells: Possible involvement of nuclear factor-kappa B-dependent pathway. *European Journal of Pharmacology*; 555: 83-92, **2007**.

Laskin, J.J., Sandler, A.B. Epidermal growth factor receptor: a promising target in solid tumours. *Cancer Treatment Reviews*; 30: 1-17, **2004**.

Lassus, H., Staff, S., Leminen, A., Isola, J., Butzow, R. Aurora-A overexpression and aneuploidy predict poor outcome in serous ovarian carcinoma. *Gynecologic Oncology*; 116: 342-349, **2010**.

Lauricella, M., Emanuele, S., D'Anneo, A., Calvaruso, G., Vassallo, B., Carlisi, D., Portanova, P., Vento, R., Tesoriere, G. JNK and AP-1 mediated apoptosis induced by bortezomib in HepG2 cell via FasL/caspase-8 and mitochondria-dependent pathway. *Apoptosis*; 11: 607-625, **2006**.

Lazebnik, Y.A., Takahashi, A., Poirier, G.G., Kaufmann, S.H., Earnshaw, W.C. Characterization of the execution phase of apoptosis *in vitro* using extracts from condemned phase cells. *Journal of Cell Science- Supplement*; 19: 41-49, **1995**.

Lee, F.Y.F., Borzilleri, R., Fairchild, C.R., Kamath, A., Smykla, R., Kramer, R., Vite, G. Preclinical discovery of ixabepilone, a highly active antineoplastic agent. *Cancer Chemotherapy & Pharmacology*; 63: 157-166, **2008**.

Lee, H.G., Yang, J.H. PKC- $\delta$  mediates TCDD-induced apoptosis of chondrocyte in ROS-dependent manner. *Chemosphere*; 81: 1039-1044, **2010**.

Lee, J.E., Kang, S.J., Ki, Y.W., Lee, S.H., Lee, S.J., Lee, Q.W., Koh, Y.C. Akt/GSK3-signaling is involved in fipronil-induced apoptotic cell death of human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Toxicology Letters*; 202: 133-141, **2011**.

Lee, J.J., Kelly, W.K. Epothilones: tubulin polymerization as a novel target for prostate cancer therapy. *Nature Clinical Practice Oncology*; 6: 85-92, **2009**.

Lee, K.H., Kim, J.R. Kiss-1 suppresses MMP-9 expression by activating p38 MAP kinase in human stomach cancer. *Oncology Research*; 18: 107-116, **2009**.

Lee, S.O., Chun, J.Y., Nadiminty, N., Trump, D.L., Ip, C., Dong, Y., Gao, A.C. Monomethylated selenium inhibits growth of LNCaP human prostate cancer xenograft accompanied by a decrease in the expression of androgen receptor and prostate-specific antigen (PSA). *The Prostate*; 66: 1070-1075, **2006**.

Lei, Y., Yana, S., Ming-Dea, L., Na, L., Rui-Faa, H. Prognostic significance of Aurora-A expression in human bladder cancer. *Acta Histochemica*; 112: 650-655, **2010**.

Leong, S.S., Fong, K.W., Lim, W.T., Toh, C.K., Yap, S.P., Hee, S.W., Tan, E.H. A phase II trial of induction gemcitabine and vinorelbine followed by concurrent vinorelbine and radiotherapy in locally advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*; 67: 325-329, **2010**.

Letavayová, L., Vlcková, V., Brozmanová, J. Selenium cancer prevention to DNA damage. *Toxicology*; 227: 1-14, **2006**.

Levitzi, A. Tyrosine kinases as target in cancer therapy. *European Journal of Cancer*; 38: 11-18, **2002**.

Li, G.X., Hu, H., Jiang, C., Schuster, T., Lu, J. Differential involvement of reactive oxygen species in apoptosis induced by two classes of selenium compounds in human prostate cancer. *International Journal of Cancer*; 120: 2034-2043, **2007**.

Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., Yuan, J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*; 94: 491-501, **1998**.

Li, J., Wang, G., Wang, C., Zhao, Y., Zhang, H., Tan, Z., Song, Z., Ding, M., Deng, H. MEK/ERK signaling contributes to the maintenance of human embryonic stem cell self-renewal. *Differentiation*; 75: 299-307, **2007**.

Li, J., Xu, Z., Tan, M., Su, W., Gong, X. 3-(4-(Benzo[d]thiazol-2-yl)-1-phenyl-1H-pyrazol-3-yl) phenyl acetate induced HepG2 cell apoptosis through a ROS-mediated pathway. *Chemico-Biological Interactions*; 183: 341-348, **2010**.

Li, Q., Li, H., Zu, Y., Qui, Z., Yao, L., Su, L., Liu, C., Wang, L. Synthesis and antitumor activity of novel 20s-camptothecin analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*; 19: 513-515, **2009**.

Li, W.Y., Chiu, L.C., Lam W.S., Wong, W.Y., Chan Y.T., Ho, Y.P. Ethyl acetate extract of Chinese medicinal herb *Sarcandra glabra* induces growth inhibition on human leukemia HL60 cells associated with cell cycle arrest and up-regulation of pro-apoptotic Bax/Bcl-2 ratio. *Oncology Reports*; 17: 425-431, **2007**.

Li, Y., Pan, J., Li, J.L., Lee, J., Tunkey, C., Saraf, K., Garbe, J., Whitley, M., Jelinsky, S., Stampfer, M., Haney, S. Transcriptional changes associated with breast cancer occur as normal human mammary epithelial cells overcome senescence barriers and become immortalized. *Molecular Cancer*; 6: 7-24, **2007**.

Li, Z., Zhai, F., Zhao, L., Guo, Q., You, Q. Design and synthesis of *N*-methylmaleimide indolocarbazole bearing modified 2-acetamino acid moieties as Topoisomerase I inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*; 19: 406-409, **2009**.

Lippa, B., Kauffman, G.S., Arcari, J., Kwan, T., Chen, J., Hungerford, W., Bhattacharya, S., Zhao, X., Williams, C., Xiao, J., Pustienik, L., Su, C., Moyer, J.D., Ma, L., Campbell, M., Steyn, S. The discovery of highly selective erbB2 (Her2) inhibitors for the treatment of cancer. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*; 17: 3081-3086, **2007**.

Liu, M., Fu, J., Li, J., Wang, J., Tan, Q., Ren, X., Peng, Z., Zeng, H. Preparation of tri-block copolymer micelles loading novel organoselenium anticancer drug BBSKE and study of tissue distribution of copolymer micelles by imaging *in vivo* method. *International Journal of Pharmaceutics*; 391: 292-304, **2010**.

Liu, P., Cheng, H., Roberts, T.M., Zhao, J.J. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*; 8: 627-644, **2009**.

Liu, X.S., Li, P., Widlak, P., Zou, H., Luo, X., Garrard, W.T., Wang, X.D. The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 95: 8461-8466, **1998**.

Losada-Barragán, M., Vallejo, A., Umaña-Pérez, A., Sánchez-Gómez, M. The IGF-II receptor regulates the metastatic properties of prostate cancer cells through the cross-talk with IGF-I and integrins receptors. *Growth Hormone & IGF Research*; 20: 38-42, **2010**.

Lu, H., Cai, L., Mu, L.N. Dietary mineral and trace element intake and squamous cell carcinoma of the Esophagus in a chinese population. *Nutrition & Cancer-An international Journal*; 55: 63-70, **2006**.

Lu, J., Berndt, C., Holmgren, A. Metabolism of selenium compounds catalyzed by the mammalian selenoprotein thioredoxin reductase. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1790: 1513-1519, **2009**.

Lü, J., Jiang, C. Selenium and cancer chemoprevention: hypotheses integrating the actions of selenoproteins and selenium metabolites in epithelial and non-epithelial cells. *Antioxidants & Redox Signalling*; 7: 1715-1727, **2005**.

Lu, X., Rodríguez, M., Wu, W., Silverman, R.B. Inactivation of mitochondrial monoamine oxidase B by methylthio substituted benzylamines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*; 11: 4423-4430, **2003**.

Lubos, E., Sinning, C.R., Schnabel, R.B., Wild, F.S., Zeller, T., Rupprecht, H.J., Bickel, C., Lackner, K.J., Peetz, D., Loscalzo, J., Münzel, T., Blankenberg, S. Serum selenium and prognosis in cardiovascular disease: results from the AtheroGene study. *Atherosclerosis*; 209: 271-277, **2010**.

Luchese, C., Brandao, R., Oliveira de, R., Nogueira, C.W., Santos, F.W. Efficacy of diphenyl diselenide against cerebral and pulmonary damage induced by cadmium in mice. *Toxicology Letters*; 173: 181-190, **2007**.

Luchese, C., Stangherlin, E.C., Gay, B.M., Nogueira, C.W. Antioxidant effect of diphenyl diselenide on oxidative damage induced by smoke in rats: Involvement of glutathione. *Ecotoxicology & Environmental Safety*; 72: 248-254, **2009**.

Lui, M., Fu, J., Li, J., Wang, L., Tan, Q., Ren, X., Pen, Z., Zeng, H. Preparation of tri-block copolymer micelles loading novel organoselenium anticancer drug BBSKE and study of tissue distribution of copolymer micelles by imaging *in vivo* method. *International Journal of Pharmaceutics*; 391: 292-304, **2010**.

Lum, C.T., Liu, X., Sun, R.W.Y., Li, X.P., Peng, Y., He, M.L., Kung, H.F., Che, C.M., Lin, M.C.M. Gold (III) porphyrin 1a inhibited nasopharyngeal carcinoma metastasis *in vivo* and inhibited cell migration and invasion *in vitro*. *Cancer Letters*; 294: 159-166, **2010**.

Lüpertz, R., Wätjen, W., Kahl, R., Chovolou, Y. Dose- and time-dependent effects of doxorubicin on cytotoxicity, cell cycle and apoptotic cell death in human colon cancer cells. *Toxicology*; 271: 115-121, **2010**.

Machover, D., Delmas-Marsalet, B., Misra, S.C., Ulusakarya, A., Gumus, Y., Fre'noy, E., Guettier, E., Saffroy, R., Innominato, P., Almohamad, W., Brahim, N., Haydar, M., Goldschmidt, E. Treatment with rituximab, dexamethasone, high-dose cytarabine and oxaliplatin (R-DHAOx) produces a strong long-term antitumor effect in previously treated patients with follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Biomedicine & Pharmacotherapy*; 64: 83-87, **2010**.

Madhunapantula, S.V., Desai, D., Sharma, A., Huh, S.J., Amin, S., Robertson, G.P. PBISe, a novel selenium-containing drug for the treatment of malignant melanoma. *Molecular Cancer Therapeutics*; 7: 1297-1308, **2008**.

Malacic, V., Dou, Q.P. The tumor proteasome as a novel target for gold (III) complexes: Implication for breast cancer therapy. *Coordination Chemistry Reviews*; 253: 1649-1660, **2009**.



Marchesi, F., Turriziani, M., Tortorelli, G., Avvisati, G., Torino, F., De Vecchis, L. Triazene compounds: Mechanism of action and related DNA repair systems. *Pharmacological Research*; 56: 275-287, **2007**.

Mathews, C.K. New advances of the cellular cycle. *Journal of Medicinal Chemistry*; 27: 345-356, **2003**.

Mautner, H. The synthesis and properties of some selenopurines and selenopyrimidines. *Journal of the American Chemistry Society*; 78: 5292-5294, **1956**.

May, T.W., Walther, M.J., Petty, J.D., Fairchild, J.F., Lucero, J., Delvaux, M., Manring, J., Armbruster, M., Hartman, D. An evaluation of selenium concentrations in water, sediment, invertebrates and fish from the Republican River Basin: 1997-1999. *Environmental and Monitoring Assessment*; 72: 179-206, **2000**.

Mebratu, Y., Tesfaigzi, Y. How ERK 1/2 activation controls cell proliferation and cell death is subcellular localization the answer? *Cell Cycle*; 8: 1168-1175, **2009**.

Medina, D., Thompson, H., Ganther, H.E., Ip, C. Se-methylselenocysteine: a new compound for chemoprevention of breast cancer. *Nutrition & Cancer*; 40: 12-17, **2001**.

Meiler, J., Schuler, M. Therapeutic targeting of apoptotic pathways in cancer. *Current Drugs Target*; 7: 1361-1369, **2006**.

Memmott, R.M., Dennis, P.A. Akt-dependent and -independent mechanisms of mTOR regulation in cancer. *Cell Signal*; 21: 656-664, **2009**.

Mendes da Silva, J.F., Walters, M., Al-Damluji, S., Ganellin, C.R. Molecular features of the prazosin molecule required for activation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*; 16: 7254-7263, **2008**.

Meng, Q., Xia, C., Fang, J., Rojanasakul, Y., Jiang, B. Role of PI3K and AKT specific isoforms in ovarian cancer cell migration, invasion and proliferation through the p70S6K1 pathway. *Cellular Signalling*; 18: 2262-2271, **2006**.

Méplan, C. Trace elements and ageing: a genomic perspective using selenium as an example. *Journal of Trace Elements in Medicine & Biology*; 24: 16-24, **2010**.

Meuillet, E., Stratton, S., Goulet, A.C., Kagey, J., Porterfield, B., Nelson, M.A. Chemoprevention of prostate cancer with selenium: an update on current clinical trials and preclinical findings. *Journal of Cellular Biochemistry*; 91: 443-458, **2004**.

Meyuas, O., Dreazen, A. Ribosomal Protein S6 Kinase: from TOP mRNAs to cell size. *Progress in Molecular Biology & Translational Science*; 90: 109-153, **2009**.

Miranda, G.S., Purdie, N.G., Osborne, V.R., Coomber, B.L., Cant, J.P. Selenomethionine increases proliferation and reduces apoptosis in bovine mammary epithelial cells under oxidative stress. *Journal of Dairy Science*; 94: 165-173, **2011**.

Miron, T., Arditti, F., Konstantinovski, L., Rabinkov, A., Mirelman, D., Berrebi, A., Wilchek, M. Novel derivatives of 6-mercaptopurine: Synthesis, characterization and antiproliferative activities of S-allylthio-mercaptopurines. *European Journal of Medicinal Chemistry*; 44: 541-550, **2009**.

Mitra, S.K., Hanson, D.A., Schlaepfer, D.D. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*; 6: 56-68, **2005**.

Monge, A., Martínez-Merino, V., Sanmartín, C., Fernández, J.F., Ochoa, M.C., Bellver, C., Artigas, P., Fernández-Álvarez, E. 2-arylamino-4-oxo-3,4-dihydropyrido[2,3-d]pyrimidines: synthesis and diuretic activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*; 24: 209-216, **1989**.

Morphy, R. Selectively nonselective kinase inhibition: Striking the right balance. *Journal of Medicinal Chemistry*; 53: 1413-1437, **2010**.

Mossmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*; 16: 55-63, **1983**.

Mpharm, A.J., Jain, S.K., Ganesh, N., Barve, J., Beg, A.M. Design and development of ligand-appended polysaccharidic nanoparticles for the delivery of oxaliplatin in colorectal cancer. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology & Medicine*; 6: 179-190, **2010**.

Müller, C., Wingler, K., Brigelius-Flohe, R. 3'UTRs of glutathione peroxidases differentially affect selenium-dependent mRNA stability and selenocysteine incorporation efficiency. *The Journal of Biological Chemistry*; 384: 11-18, **2003**.

Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B.A., Yuan, J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*; 403: 98-103, **2000**.

Nakata, K., Suzuki, Y., Inoue, T., Ra, C., Yakura, H., Mizuno, K. Deficiency of SHP1 leads to sustained and increased ERK activation in mast cells, thereby inhibiting IL-3-dependent proliferation and cell death. *Molecular Immunology*; 48: 472-480, **2011**.

Nasar, A., Jamaludin, M., Asha, A. Supplementation of selenium reduces chemical hepatocarcinogenesis in male Sprague-Dawley rats. *Journal of Trace Elements in Medicine & Biology*; 24: 119-123, **2010**.

Navarro-Tito, N., Robledo, T., Pérez-Salazar, E. Arachidonic acid promotes FAK activation and migration in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Experimental Cell Research*; 314: 3340-3355, **2008**.

Noda, K., Nakagawa, A., Motomura, T. Pyrido[2,3-*d*]pyrimidines, *Japan Kokai. Chemical Abstract*; 77: 995, **1977**.

Noda, K., Nakagawa, A., Motomura, T. Pyrido[2,3-*d*]pyrimidines, *Japan Kokai. Chemical Abstract*; 25: 526, **1982**.

Noravyan, A., Oganisyan, A.S. 2-methylamino-4-oxo-3,6,6-trimethyl-5,6-dihydro-8*H*-pyrano(4',3',4,5)thieno[2,3-*d*]pyrimidine or its salts possissing anticonvulsive activity. *Institut Farmakologii Amn. Sssr. URSS*, **1996**.

Nugochi, E. The Cell Cycle and Checkpoint controls: toward understanding of genome maintenance mechanisms. *Department of Biochemistry & Molecular Biology*. Drexel University College of Medicine, **2008**.

Ohsawa, R., Miyazaki, H., Niisato, N., Shiozaki, A., Iwasaki, Y., Otsuji, E., Marunaka, Y. Intracellular chloride regulates cell proliferation through the activation of stress-activated protein kinases in MKN28 human gastric cancer cells. *Journal of Cellular Physiology*; 223: 764-770, **2010**.

Olovnikov, I.A., Kravchenko, J.E., Chumakov, P.M. Homeostatic functions of the p53 tumor suppressor: regulation of energy metabolism and antioxidant defense. *Seminars in Cancer Biology*; 19: 32-41, **2009**.

Omar, R.M., Ismail, H.M., El-Lateef, B.M.A., Yousef, M.I., Gomaa, N.F., Sheta, M. Effect of processing on folic acid fortified Baladi bread and its possible effect on the prevention of colon cancer. *Food & Chemical Toxicology*; 47: 1626-1635, **2009**.

Osborn, M.T., Chambers, T.C. Role of the stress activated/c-Jun NH2-terminal protein kinase pathway in the cellular response to adriamycin and other chemotherapeutic drugs. *The Journal of Biological Chemistry*; 271: 30950-30955, **1996**.

Panee, J., Stoytcheva, Z.R., Liu, W., Berry, M.J. Selenoprotein H is a redox-sensing high mobility group family DNA-binding protein that up-regulates genes involved in glutathione synthesis and phase II detoxification. *The Journal of Biological Chemistry*; 282: 23759-23765, **2007**.

Pao, W., Miller, V.A., Politi, K.A., Riely, G.J., Sonwar, R., Zakowski, M.F., Knis, M.G., Varmus, H. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to genitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLOS Medicine*; 2: 225-235, **2005**.

Park, D., Dilda, P.J. Mitochondria as targets in angiogenesis inhibition. *Molecular Aspects of Medicine*; 31: 113-131, **2010**.

Park, H.J., Kim, Y.S., Kim, J.S., Lee, E.J., Yi, Y.J., Hwang, H.J., Suh, M.E., Ryu, C.K., Lee, S.K. 6-Arylamino-7-chloro-quinazoline-5,8-diones as novel cytotoxic and DNA topoisomerase inhibitory agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*; 14: 3385-3388, **2004**.

Pasetto, L.M., D'Andrea, M.L., Brandes, A.A., Rossi, E., Monfardini, S. Platinum based drugs in cancer therapy. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*; 60: 59-75, **2006**.

Pedrero, Z., Madrid, Y. Novel approaches for selenium speciation in food stuffs and biological specimens: A review. *Analytica Chimica Acta*; 634: 135-152, **2009**.

Pelicano, H., Carney, D., Huang, P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resistance Updates*; 7: 97-110, **2004**.

Peng, Z.F., Lan, L.X., Zhao, F., Li, J., Tan, Q., Yin, H.W., Zeng, H.H. A novel thioredoxin reductase inhibitor inhibits cell growth and induces apoptosis in HL-60 and K562 cells. *Journal of Zhejiang University-Science B*; 9: 16-21, **2008**.

Pera, M.F., Tam, P.P. Extrinsic regulation of pluripotent stem cells. *Nature*; 465: 713-720, **2010**.

Peters, U., Foster, C.B., Chatterjee, N., Schatzkin, A., Reding, D., Andriole, G.L., Crawford, E.D., Sturup, S., Chanock, S.J., Hayes, R.B. Serum selenium and risk of prostate cancer-a nested case-control study. *American Journal of Clinical Nutrition*; 85: 209-217, **2007**.

Phoerschke, R.L., Franklin, R.L., Moos, P.J. Modulation of redox status in human lung cell lines by organoselenocompounds: selenazolidines, selenomethionine and methylseleninic acid. *Toxicology in Vitro*; 22: 1761-1768, **2008**.

Pietkiewicz, P.P., Lutkowska, A., Lianeri, M., Jagodzinski, P.P. Tamoxifen epigenetically modulates CXCL12 expression in MCF-7 breast cancer cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*; 64: 54-57, **2010**.

Plano, D., Moreno, E., Font, M., Encío, I., Palop, J.A., Sanmartín, C. Synthesis and *in vitro* anticancer activities of some selenodiazole derivatives. *Archiv der Pharmazie*; 10: 680-691, **2010**.

Plano, D., Sanmartín, C., Moreno, E., Prior, C., Calvo, A., Palop, J.A. Novel potent organoselenium compounds as cytotoxic agents in prostate cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*; 17: 6853-59, **2007**.

Posser, T., Franco, J.L., dos Santos, D.A., Rigon, A.P., Farina, M., Dafre, A.L., Rocha, J.B.T., Leal, R.B. Diphenyl diselenide confers neuroprotection against hydrogen peroxide toxicity in hippocampal slices. *Brain Research*; 1199: 138-147, **2008**.

- Prowse, A.B.J., Chong, F., Gray, P.P., Munro, T.P. Stem cell integrins: implications for ex-vivo culture and cellular therapies. *Stem Cell Research*; 6: 1-12, **2011**.
- Puig, P.E., Guilly, M.N., Bouchot, A., Droin, N., Cathelin, D., Bouyer, F., Favier, L., Ghiringhelli, F., Kroemer, G., Solary, E., Martin, F., Chauffert, B. CDKs and their role in cancer therapy. *Cell Biology International*; 32: 1031-1038, **2008**.
- Pyrzynska, K. Selenium speciation in enriched vegetables. *Food Chemistry*; 114: 1183-1191, **2009**.
- Qi, G., Kudo, Y., Ando, T., Tsunematsu, T., Shimizu, N., Siriwardena, B.S.M., Yoshida, M., Keikhaee, M.R., Ogawa, I., Takata, T. Nuclear survivin expression is correlated with malignant behaviors of head and neck cancer together with Aurora-B. *Oral Oncology*; 46: 263-270, **2010**.
- Qi, X., Okamoto, Y., Murakawa, T., Wang, F., Oyama, O., Ohkawa, R., Yoshioka, K., Du, W., Sugimoto, N., Yatomi, Y., Takuwa, N., Takuwa, Y. Sustained delivery of sphingosine-1-phosphate using poly(lactic-co-glycolic acid)-based microparticles stimulates Akt/ERK-eNOS mediated angiogenesis and vascular maturation restoring blood flow in ischemic limbs of mice. *European Journal of Pharmacology*; 634: 121-131, **2010**.
- Quintela, J.M., Peinador, C., Botana, L., Estévez, M., Riguera, R. Synthesis and antihistaminic activity of 2-guanidino-3-cyanopyridines and pyrido [2,3-d]pyrimidines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*; 8: 1543-1553, **1997**.
- Rae, J.M., Lippman, M.E. Evaluation of novel epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Breast Cancer Research & Treatment*; 83: 99-107, **2004**.
- Rai, Y., Iwata, H., Masuda, N., Anan, K., Takeuchi, T., Kohno, N., Takei, H., Yanagita, Y., Noguchi, S. Monthly versus three-monthly goserelin treatment in premenopausal patients with oestrogen receptor-positive early breast cancer. *European Journal of Cancer Supplements*; 8: 193-199, **2010**.
- Raman, N., Jeyamurugan, R., Senthilkumar, R., Raj Kapoor, B., Franzblau, G. In vivo and in vitro evaluation of highly specific thiolate carrier group copper (II) and zinc (II) complexes on Ehrlich ascites carcinoma tumor model. *European Journal of Medicinal Chemistry*; 23: 1-14, **2010**.
- Ravi Kanth, S., Venkat Reddy, G., Hara Kishore, K., Shanthan Rao, P., Narsaiah, B., Sarya Narayana Murthy, U. Convenient synthesis of 4-substituted amino-5-trifluoromethyl-2,4-disubstituted pyrido[2,3-d]pyrimidines and their antibacterial activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*; 41: 1011-1016, **2006**.
- Rayman, M.P. Selenium in cancer prevention: A review of the evidence and mechanism of action. *Proceedings of the Nutrition Society*; 64: 527-542, **2005**.

Rayman, M.P. The importance of selenium to human health. *Lancet*; 356: 233-241, **2000**.

Reynolds, L.P., Redmer, D.A. Angiogenesis in the placenta. *Biology of Reproduction*; 64:1033-1040, **2001**.

Richardson, D.R., Kalinowski, D.S., Lau, S., Jansson, P.J., Lovejoy, D.B. Cancer cell iron metabolism and the development of potent iron chelators as anti-tumour agents. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1790: 702-717, **2009**.

Robins, R.K., Hitchings, G.H. Studies of condensed pyrimidine system. Synthesis of some 4 and 2,4-substituted pyrido[2,3-d]pyrimidines. *Journal of the American Chemistry Society*; 77: 973, **1955**.

Rocha da, A.B., Mans, D.R.A., Regner, A., Schmartmann, G. Targeting Protein Kinase C: New Therapeutic Opportunities Against High-Grade Malignant Gliomas? *The Oncologist*; 7: 17-33, **2002**.

Roos, F.C., Evans, A.J., Brenner, W., Wondergem, B., Klomp, J., Heir, P., Roche, O., Thomas, C., Schimmel, H., Furge, K.A., Teh, B.T., Thüroff, W.J., Hampel, C., Ohh, M. Deregulation of E2-EPF Ubiquitin carrier protein in papillary renal cell carcinoma. *The American Journal of Pathology*; 178: 853-860, **2011**.

Roos, W.P., Kaina, B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends in Molecular Medicine*; 12: 440-450, **2006**.

Rosa, R.M., Hoch, N.C., Furtado, G.V., Saffi, J., Henriques, J.A.P. DNA damage in tissues and organs of mice treated with diphenyl diselenide. *Mutation Research-Genetic Toxicology & Environmental Mutagenesis*; 633: 35-45, **2007**.

Rosa, R.M., Picada, J.D., Saffi, J., Henriques, J.A.P. Cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of diphenyl diselenide in Chinese hamster lung fibroblasts. *Mutation Research-Genetic Toxicology & Environmental Mutagenesis*; 628: 87-98, **2007**.

Rosenthal, S.A. Phase III multi-institutional trial of adjuvant chemotherapy with Paclitaxel, Estramustine and oral Etoposide combined with long-term androgen suppression therapy and radiotherapy versus long-term androgen suppression plus radiotherapy along for high-risk prostate cancer: preliminary toxicity analysis of RTOG 99-02. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*; 73: 672-678, **2009**.

Rossi, M., Inoue, S., Walewska, R., Knight, R.A., Dyer, M.J., Cohen, G.M., Melino, G. Caspase cleavage of Itch in chronic lymphocytic leukemia cells. *Biochemical & Biophysical Research Communications*; 379: 659-664, **2009**.

Rotem-Dai, N., Oberkovitz, G., Abu-Ghanem, S., Livneh, E. PKC $\eta$  confers protection against apoptosis by inhibiting the pro-apoptotic JNK activity in MCF-7 cells. *Experimental Cell Research*; 315: 2616-2623, **2009**.

Roy, S., Saha, S., Majundar, R., Dighe, R.R., Chakravarty, A.R. DNA photocleavage and anticancer activity of terpyridine copper(II) complexes having phenanthroline bases. *Polyhedron*; 29: 2787-2794, **2010**.

Royds, J.A., Iacopetta, B. p53 and disease: when the guardian angel fails. *Cell Death & Differentiation*; 13: 1017-1026, **2006**.

Ruzzene, M., Pina, L.A. Addiction to protein kinase CK2: A common denominator of diverse cancer cell? *Biochimica et Biophysica Acta*; 1804: 499-504, **2010**.

Saad, F., Lipton, A. SRC kinase inhibition: Targeting bone metastases and tumor growth in prostate and breast cancer. *Cancer Treatment Reviews*; 36: 177-184, **2010**.

Sagiv-Barfi, I., Weiss, E., Levitzki, A. Design, synthesis and evaluation of quinazoline T cell proliferation inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*; 18: 6404-6413, **2010**.

Sahara, S., Aoto, M., Eguchi, Y., Imamoto, N., Yoneda, Y., Tsujimoto, Y. Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation. *Nature*; 401: 168-173, **1999**.

Sahin, O., Wiemann, S. Functional genomics and proteomics approaches to study the ERBB network in cancer. *FEBS Letters*; 583: 1766-1771, **2009**.

Saini, K.S., Azim Jr., H.A., Cocorocchio, E., Vanazzi, A., Saini, M.L., Raviele, P.R., Pruneri, G., Peccatori, F.A. Rituximab in Hodgkin lymphoma: Is the target always a hit? *Cancer Treatment Reviews*; 37: 385-390, **2011**.

Sakahira, H., Enari, M., Nagata, S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*; 391: 96-99, **1998**.

Sanmartín, C. (PhD). Síntesis de nuevos derivados de pirido[2-3-*d*]pirimidina. Determinación de su actividad diurética y antihipertensiva. Estudio de la relación estructura química-actividad biológica. *Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica. Universidad de Navarra*, **1988**.

Sanmartin, C., Dominguez, M.V., Cordeu, L., Cubedo, E., Garcia-Foncillas, J., Font, M., Palop, J.A. Synthesis and biological evaluation of 2,4,6-functionalized derivatives of pyrido[2,3-*d*]pyrimidines as cytotoxic agents and apoptosis inducers. *Archiv Der Pharmazie*; 341: 28-41, **2008**.

Sanmartín, C., Echeverría, M., Mendivil, B., Cordeu, L., Cubedo, E., García-Foncillas, J., Font, M., Palop, J.A. Synthesis and biological evaluation of new symmetrical derivatives as cytotoxic agents and apoptosis inducers. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*; 13: 2031-2044, **2005**.

Sanmartín, C., Font, M., Palop, J.A. Molecular symmetry: A structural property frequently present in new cytotoxic and proapoptotic drugs. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*; 6: 639-650, **2006**.

Sanmartín, C., Plano, D., Font, M., Palop, J.A. Kinase regulation by sulfur and selenium containing compounds. *Current Cancer Drug Targets*; 11: 496-523, **2011**.

Sanmartín, C., Plano, D., Palop, J.A. Selenium compounds and apoptotic modulation: a new perspective in cancer therapy. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*; 8: 120-31, **2008**.

Sanmartín, C., Plano, D., Domínguez, E., Font, M., Calvo, A., Prior, C., Encío, I., Palop, J.A. Synthesis and pharmacological screening of several aryl and heteroaryl selenylacetic acid derivatives as cytotoxic and antiproliferative agents. *Molecules*; 14: 3313-3338, **2009**.

Santos, D.B., Schiar, V.P.P., Ribeiro, M.C.P., Schwab, R.S., Meinerz, D.F., Allebrandt, J., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., Aschner, M., Barbosa, N.B.V. Genotoxicity of organoselenium compounds in human leukocytes *in vitro*. *Mutation Research-Genetic Toxicology & Environmental Mutagenesis*; 676: 21-26, **2009**.

Sartelet, H., Oligny, L.L., Vassal, G. Akt pathway in neuroblastoma and its therapeutic implication. *Expert Review of Anticancer Therapy*; 8: 757-769, **2008**.

Satoh, M.S., Lindahl, T. The role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair. *Nature*; 26: 356-358, **2002**.

Saunders, E. The safety and efficacy of terazosin in the treatment of essential hypertension in blacks. *American Heart Journal*; 22: 936-942, **1991**.

Savegnago, L., Jesse, C.R., Pinto, L.G., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W. Diphenyl diselenide attenuates acute thermal hyperalgesia and persistent inflammatory and neuropathic pain behavior in mice. *Brain Research*; 1175: 54-59, **2007a**.

Savegnago, L., Pinto, L.G., Jesse, C.R., Alves, D., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., Zeni, G. Antinociceptive properties of diphenyl diselenide: evidences for the mechanism of action. *European Journal of Pharmacology*; 555: 129-138, **2007b**.

Savegnago, L., Pinto, L.G., Jesse, C.R., Barancelli, D.A., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., Zeni, G. Diphenyl diselenide exerts antidepressant-like and anxiolytic-like effects in mice: involvement of l-arginine-nitric oxide-soluble guanylate cyclase pathway in its antidepressant-like action. *Pharmacology & Biochemistry Behavior*; 88: 418-426, **2008**.



Savegnago, L., Pinto, L.G., Jesse, C.R., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., Zeni, G. Monoaminergic agents modulate antidepressant-like effect caused by diphenyl diselenide in rats. *Prog Neuropsychopharmacol & Biology Psychiatry*; 31: 1261-1269, **2007c**.

Sawyer, C.L. Cancer: mixing cocktails. *Nature*; 6: 449-993, **2007**.

Scaltriti, M., Verma, C., Guzman, M., Jiménez, J., Parra, J.L., Pedersen, K., Smith, D.J., Landolfi, S., Cajal, S.R.Y., Arribas, J., Baselga, J. Lapatinib, a HER2 tyrosine kinase inhibitor, induces stabilization and accumulation of HER2 and potentiates trastuzumab dependent cell cytotoxicity. *Oncogene*; 28: 803-814, **2009**.

Schayek, H., Bentov, I., Sun, S., Plymate, S.R., Werner, H. Progression to metastatic stage in a cellular model of prostate cancer is associated with methylation of the androgen receptor gene and transcriptional suppression of the insulin-like growth factor-I receptor gene. *Experimental Cell Research*; 316: 1479-1488, **2010**.

Schneider, J.G., Amend, R.S., Weilbaecher, K.N. Integrins and bone metastasis: Integrating tumor cell and stromal cell interactions. *Bone*; 48: 54-65, **2011**.

Schrauzer, G.N., Thead, W.J. Interpretation of the methylene blue reduction test of human plasma and the possible cancer-protecting effect of selenium. *Experientia*; 27: 1069-1071, **1971**.

Schweizer, U., Schomburg, L. New insights into the physiological actions of selenoproteins from genetically modified mice. *IUBMB Life*; 57: 737-744, **2005**.

Sciandrello, G., Mauro, M., Caradonna, F., Catanzaro, I., Saverini, M., Barbata, G. Acrylamide catalytically inhibits topoisomerase II in V79 cells. *Toxicology in Vitro*; 24: 830-834, **2010**.

Scovassi, A.I., Denegri, M., Donzelli, M. Poly(ADP-ribose)synthesis in cells undergoing apoptosis: An attempt to face death before PARP degradation. *European Journal of Histochemistry*; 4: 251-258, **1998**.

Scovassi, A.I., Poirier, G.G. Poly(ADP-ribosylation) and apoptosis. *Molecular & Cellular Biochemistry*; 199: 125-137, **1999**.

Serrels, A., Macpherson, I.R., Evans, T.R., Lee, F.Y., Clark, E.A., Sansom, O.J., Ashton, G.H., Frame, M.C., Brunton, V.G. Identification of potential biomarkers for measuring inhibition of Src kinase activity in colon cancer cells following treatment with dasatinib. *Molecular & Cancer Therapy*; 5: 3014-3022, **2006**.

Seto, T., Higashiyama, M., Funai, H., Imamura, F., Uematsu, K., Seki, N., Eguchi, K., Yamanaka, T., Ichinose, Y. Prognostic value of expression of vascular endothelial growth factor

and its flt-1 and KDR receptors in stage I non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*; 53: 91-96, **2006**.

Shah, M.A., Schwart, G.K. Cycling dependent kinases as targets for cancer therapy. *Update of Cancer Therapeutics*; 1: 311-332, **2006**.

Shamberger, R.J., Frost, D.V. Possible protective effect of selenium against human cancer. *Cancer Medical Association Journal*; 100: 682, **1969**.

Shanmugaraj, S., Selvaraja, S., Murugana, V.P., Rajaganapathya, B., Shanmuganathana, M.V., Devaraj, N., Subhadraa, L.B. 3-Hydroxylup-20(29)-ene-27,28-dioic acid dimethyl ester, a novel natural product from *Plumbago zeylanica* inhibits the proliferation and migration of MDA-MB-231 cells. *Chemico-Biological Interactions*; 188: 412-420, **2010**.

Sharma, A.K., Sharma, A., Desai, D., Madhunapantula, S.V., Huh, S.J., Robertson, G.P., Amin, S. Synthesis and anticancer activity comparison of phenylalkyl isoselenocyanates with corresponding naturally occurring and synthetic isothiocyanates. *Journal of Medicinal Chemistry*; 51: 7820-7826, **2008**.

Sharma, B.K., Mugesh, G. Antioxidant activity of the anti-inflammatory compound Ebselen: A reversible cyclization pathway via selenenic and seleninic acid intermediates. *Chemistry-a European Journal*; 14: 10603-10614, **2008**.

Sharma, B.K., Mugesh, G. Glutathione peroxidase (GPx)-like antioxidant activity of the organoselenium drug Ebselen: unexpected complications with thiol exchange reactions. *Journal of the American Chemical Society*; 127: 11477-11485, **2005**.

Sharma, P.S., Sharma, R., Tyagi, R. Inhibitors of cyclin dependent kinases: Useful targets for cancer treatment. *Current Cancer Drugs Targets*; 8: 53-75, **2008**.

Sharma, V., Tewari, R., Sk, U.H., Joseph, C., Sen, E. Ebselen sensitizes glioblastoma cells to Tumor Necrosis Factor (TNF alpha)-induced apoptosis through two distinct pathways involving NF-kappa B downregulation and Fas-mediated formation of death inducing signaling complex. *International Journal of Cancer*; 123: 2204-2212, **2008**.

Shen, H., Yuan, Y., Sun, J., Gao, W., Shu, Y.Q. Combined tamoxifen and gefitinib in non-small cell lung cancer shows antiproliferative effects. *Biomedicine & Pharmacotherapy*; 64: 88-92, **2010**.

Shen, S., Kengeri, S.S., Xu, H.P., Schlittler, D.L., Chiang, E., Chen, Y. Selenium, DNA damage and apoptosis: Defining the optimal selenium dose for prostate cancer prevention. *Environmental & Molecular Mutagenesis*; 47: 424-434, **2006**.

Shi, Y. Caspase activation: revisiting the induced proximity model. *Cell*; 25: 855-858, **2004**.

Shi, Y., Wang, F., He, J., Yadav, S., Wang, H. Titanium dioxide nanoparticles cause apoptosis in BEAS-2B cells through the caspase 8/t-Bid-independent mitochondrial pathway. *Toxicology Letters*; 196: 21-27, **2010**.

Shiah, H.S., Lee, W.S., Juang, S.H, Hong, P.C., Lung, C.C., Chang, C.J., Chou, K.M., Chang, J.Y. Mitochondria-mediated and p53-associated apoptosis induced in human cancer cells by a novel selenophene derivative, D-501036. *Biochemical Pharmacology*; 73: 610-619, **2007**.

Shin, S.H. The effects of nano-silver on the proliferation and cytokine expression by peripheral blood mononuclear cells. *International Immunology*; 7: 1813-1818, **2007**.

Siciliano, T.J., Deblock, M.C., Hindi, K.M., Durmus, S., Panzner, M.J., Tessier, C.A., Youngs, W.J. Synthesis and anticancer properties of gold (I) and silver (I) *N*-heterocyclic carbene complexes. *Journal of Organometallic Chemistry*; 696: 1066-1071, **2011**.

Siddiqui, M.K.J., Mehrotra, P.K., Sing, K., Sarangi, R. Comparison of some trace elements concentration in blood, tumor free breast and tumor tissues of women with benign and malignant breast lesions: An Indian study. *Environment International*; 32: 630-637, **2006**.

Siegel, R.M. Caspases at the crossroads of immune-cell life and death. *Nature Reviews Immunology*; 6: 308-317, **2006**.

Siesser, P.M., Hanks, S.K. The signaling and biological implications of FAK overexpression in cancer. *Clinical Cancer Research*; 12: 3233-3237, **2006**.

Singh, S.K., Tan, Q.W., Brito, C., De León, M., De León, D. Insulin-like growth factors I and II receptors in the breast cancer survival disparity among African–American women. *Growth Hormone & IGF Research*; 20: 245-254, **2010**.

Sinha, R., Pinto, J.T., Facompre, N., Kilheffer, J., Baatz, J.E., El-Bayoumi, K. Effects of naturally occurring and synthetic organoselenium compounds on protein profiling in androgen responsive and androgen independent human prostate cancer cells. *Nutrition & Cancer*; 60: 267-275, **2008**.

Sirisoma, N., Pervin, A., Zhang, H., Jiang, S., Williardseen, J.A., Anderson, M.B., Baichwal, V., Mather, G.G., Jessing, K., Hussan, R., Hoang, K., Pleiman, C.M., Tseng, B., Drewe, J., Gai, S.X. Discovery of 2-chloro-*N*-(4-methoxyphenyl)-*N*-methylquinazolin-4-amine as a potent inducer of apoptosis with high *in vivo* activity. *Journal of Medicinal Chemistry*; 51: 4771-4779, **2008**.

Sirisoma, N., Pervin, A., Zhang, H., Jiang, S., Williardseen, J.A., Anderson, M.B., Mather, G.G., Pleiman, C.M., Kasibhatla, S., Tseng, B., Drewe, J., Gai, S.X. Discovery of *N*-methyl-4-(4-methoxyanilino)quinazolines as potent apoptosis inducers. Structure-activity relationship of the quinazoline ring. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*; 20: 2330-2334, **2010**.

Sirvent, A., Benistant, C., Roche, S. Cytoplasmic signalling by the c-Abl tyrosine kinase in normal and cancer cells. *Biology of the Cell*; 100: 617-631, **2008**.

Smrkolj, P., Pograjc, L., Hlastan-Ribic, C., Stibilj, V. Selenium content in selected Slovenian foodstuffs and estimated daily intakes of selenium. *Food Chemistry*; 90: 691-697, **2010**.

Sodhi, R.K., Singh, N., Jaggi, A.S. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) and its therapeutic implications. *Vascular Pharmacology*; 53: 77-87, **2010**.

Soldani, C., Scovassi, A.I. Poly(ADP-ribose)polymerase-1 cleavage during apoptosis: An update. *Apoptosis*; 7: 321-328, **2002**.

Sophocleous, A., Mackintosh, A., Landao-Bassonga, E., Ralston, S.H., Idris, A.I. Peripheral cannabinoid type 2 receptor regulates osteoclast formation, MDA-MB-231 breast cancer cell migration and bone marrow/tumour cell interaction via PI3 kinase/AKT and P38 pathways. *Abstracts / Bone*; 48: S22-S55, **2011**.

Soucek, T., Yeung, R.S., Hengstschläger, M. Inactivation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 upon loss of the tuberous sclerosis complex gene-2. *Proc. Natl. Acad. USA*; 95: 15653-15658, **1998**.

Sousou, T., Friedberg, J. Rituximab in indolent lymphomas. *Seminars in Hematology*; 47: 148-155, **2010**.

Spallholz, E. On the nature of selenium toxicity and carcinostatic activity. *Free Radical Biology & Medicine*; 17: 45-64, **1994**.

Srinivasan, D., Plattner, R. Activation of Abl tyrosine kinases promotes invasion of aggressive breast cancer cells. *Cancer Research*; 66: 5648-5655, **2006**.

Srinivasan, D., Sims, J.T., Plattner, R. Aggressive breast cancer cells are dependent on activated Abl kinases for proliferation, anchorage-independent growth and survival. *Oncogene*; 27: 1095-1105, **2008**.

St Germain, D.L., Galton, V.A., Hernandez, A. Defining the roles of the iodothyronine deiodinases: current concepts and challenges. *Endocrinology*; 150: 1097-1107, **2009**.

Steevens, J., van der Brandt, P.A., Goldbohm, A., Schouten, L.J. Selenium status and the risk of esophageal and gastric cancer subtypes: The Netherlands Cohort study. *Gastroenterology*; 138: 1704-1713, **2010**.

Stein, G.S., Pardee, A.B. *Cell Cycle & Growth Control*. Wiley-Liss; 2<sup>nd</sup> edition: **2004**.

Steinbrenner, H., Sies, H. Protection against reactive oxygen species by selenoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1790: 1478-1485, **2009**.

Stoytcheva, Z.R., Vladimirov, V., Douet, V., Stoychev, I., Berry, M.J. Metal transcription factor-1 regulation via MREs in the transcribed regions of selenoprotein H and other metal-responsive genes. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1800: 416-424, **2010**.

Strasser, A. The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nature Reviews in Immunology*; 5: 189-200, **2005**.

Summy, J.M., Gallick, G.E. Src family kinases in tumor progression and metastasis. *Cancer Metastasis Review*; 22: 337-358, **2003**.

Sun, R.W.Y., Che, C.M. The anti-cancer properties of gold (III) with dianionic porphyrin and tetradentate ligands. *Coordination Cancer Reviews*; 253: 1682-1691, **2009**.

Sun, X., Yasuda, O., Takemura, Y., Kawamoto, H., Higuchi, M., Baba, Y., Katsuya, T., Fukuo, K., Ogihara, T., Rakugi, H. Akt activation prevents Apop-1-induced death of cells. *Biochemical & Biophysical Research Communications*; 377: 1097-1101, **2008**.

Sutherland, J.J., Higgs, R.E., Watson, I., Vieth, M. Chemical fragments as foundations for understanding target space and activity prediction. *Journal of Medicinal Chemistry*; 51: 2689-2700, **2008**.

Suzuki K.T., Kurasaki, K., Suzuki, N. Selenocysteine  $\beta$ -lyase and methylselenol demethylase in the metabolism of Se-methylated selenocompounds into selenide. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1770: 1053-1061, **2007**.

Suzuki, K.T., Tsuji, Y., Ohta, Y., Suzuki, N. Preferential organ distribution of methylselenol source Se-methylselenocysteine relative to methylseleninic acid. *Toxicology & Applied Pharmacology*; 227: 76-83, **2008**.

Tabassum, A., Bristow, G.R., Venkateswaran, V. Ingestion of selenium and other antioxidants during prostate cancer radiotherapy: A good thing? *Cancer Treatment Reviews*; 36: 230-234, **2010**.

Takahashi, H., Nishina, A., Fukumoto, R.H., Kimura, H., Koketsu, M., Ishihara, H. Selenocarbamates are effective superoxide anion scavengers in vitro. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*; 24: 24291-24295, **2005**.

Takahashi, M. Sodium selenite and its role in oral cancer. *International Journal of Oncology*; 27: 489-495, **2005**.

Takahashi, N., Honda, T., Ohba, T. Anticancer and superoxide scavenging activities of p-alkylaminophenols having various length alkyl chains. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*; 14: 409-417, **2006**.

Takano, T., Ohe, Y., Sakamoto, H., Tsuta, K., Matsuno, Y., Tateishi, U., Yamamoto, S., Nokihara, H., Yamamoto, N., Sekine, I., Kunitoh, H., Shibata, T., Sakiyama, T., Yoshida, T., Tamura, T. Epidermal growth factor receptor gene mutations and increased copy numbers predict gefitinib sensitivity in patients with recurrent non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*; 23: 6829-6837, **2005**.

Takano, Y., Iwata, H., Yano, Y., Miyazawa, M., Virgona, N., Sato, H., Ueno, K., Yano, T. Up-regulation of connexin 32 gene by 5-aza-20-deoxycytidine enhances vinblastine-induced cytotoxicity in human renal carcinoma cells via the activation of JNK signaling. *Biochemical Pharmacology*; 80: 463-470, **2010**.

Takeda, K., Ichijo, H. Neuronal P38 MAPK signaling: an emerging regulator of cell fate and function in the nervous system. *Genes Cells*; 7: 1099-1111, **2002**.

Tapiero, H., Townsend, D.M., Tew, K.D. The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. *Biomedicine & Pharmacotherapy*; 57: 134-144, **2003**.

Tewari, R., Sharma, V., Koul, N., Ghosh, A., Joseph, C., Hossain, U., Sen E. Ebselen abrogates TNF $\alpha$  induced pro-inflammatory response in glioblastoma. *Molecular Oncology*; 3: 77-83, **2009**.

Thamilselvan, V., Menon, M., Thamilselvan, S. Synergistic antitumor effect of carmustine and selenite: a new treatment strategy for hormone refractory prostate cancer. *The Journal of Urology*; 183: 31-39, **2010**.

Timmermans, P., Zwieter, P.A. Hypotensive and bradycardic effects of classical alpha-sympathomimetic drugs upon intravenous administration to pentobarbitone-anaesthetized rats. *Archieve International in Pharmacology Therapy*; 245: 218, **1980**.

Toker, A., Newton, A.C. Cellular Signaling: pivoting around PDK-1. *Cell*; 103: 185-188, **2000**.

Torkamani, A., Verkhivker, G., Schork, N.J. Cancer driver mutations in protein kinase genes. *Cancer Letters*; 281: 117-127, **2009**.

Torricelli, C., Fortino, V., Capurro, E., Sacchi, G., Ponzio, P., Pacini, A., Muscettola, M., Maioli, E. Role of PTHrP and PTHrP-engaged pathways in MCF-7 cells migration/invasion. *Matrix Biology*; 25: 104-111, **2006**.

Traulsen, A., Pacheco, J.M., Dingli, D. Reproductive fitness advantage of BCR-ABL expressing leukemia cells. *Cancer Letters*; 294: 43-48, **2010**.

Trávnicek, Z., Mikulík, J., Cajan, M., Zboril, R., Popa, I. Novel iron complexes bearing *N*6-substituted adenosine derivatives: Synthesis, magnetic,  $^{57}\text{Fe}$  Mössbauer, DFT and in vitro cytotoxicity studies. *Journal of Inorganic Biochemistry*; 16: 8719-8728, **2008**.

Trávnicek, Z., Popa, I., Cajan, M., Zboril, R., Krystof, V., Mikulík, J. The first iron (III) complexes with cyclin-dependent kinase inhibitors: Magnetic, spectroscopic (IR, ES+MS, NMR,  $^{57}\text{Fe}$  Mossbauer), theoretical and biological activity studies. *Journal of Inorganic Biochemistry*; 104: 405-417, **2010**.

Trevisan, R., Mello, D.F., Fisher, A.S., Schuwerack, P.M., Dafre, A.L., Moody, J.A. Selenium in water enhances antioxidant defenses and protects against copper-induced DNA damage in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology*; 101: 64-71, **2011**.

Tu, S., Zhang, J., Zhu, X., Xu, J., Zhang, Y., Wang, Q., Jia, R., Jiang, B., Zhang, J. New potential inhibitors of cyclin-dependent kinase 4: design and synthesis of pyrido[2,3-*d*]pyrimidine derivatives under microwave irradiation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*; 16: 3578-3581, **2006**.

Valdez, B.C., Li, Y., Murray, D., Corn, P., Champlin, R.E., Andersson, B.S. 5-aza-2-deoxycytidine sensitizes busulfan-resistant myeloid leukemia cells by regulating expression of genes involved in cell cycle checkpoint and apoptosis. *Leukemia Research*; 34: 364-372, **2010**.

Valdez, B.C., Li, Y., Murray, D., Corn, P., Champlin, R.E., Andersson, B.S. The synergistic cytotoxicity of clofarabine, fludarabine and busulfan in AML cells involves ATM pathway activation and chromatin remodeling. *Biochemical Pharmacology*; 81: 222-232, **2011**.

Verma, S.S. Synthesis of some new 4-imino-3,5,7-trisubstituted-pyrido[2,3-*d*]pyrimidine-2(1*H*)-thioles. *Journal of Heterocyclic Chemistry*; 24: 1169-1171, **1987**.

Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R., Berneman, Z.N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation*; 36: 131-149, **2003**.

Vieth, M., Siegel, M.G. Structural fragments in marketed oral drugs. In fragment based drug discovery. *Erlanson, J., Ed.; Wiley-VCH, Weinheim*; 123-135, **2006**.

Vieth, M., Siegel, M.G., Higgs, R.E., Watson, I.A., Robertson, D.H., Savin, K.A., Durst, G.L., Hipskind, P.A. Characteristic physical properties and structural fragments of marketed oral drugs. *Journal of Medicinal Chemistry*; 47: 224-232, **2004**.

Voss, M.E., Ralph, J.M., Xie, D., Manning, D.D., Chen, X., Frank, A.J., Leyhane, A.J., Liu, L., Stevens, J.M., Budde, C., Surman, M.D., Friedrich, T., Peace, D., Scott, I.L., Wolf, M., Johnson, R. Synthesis and SAR of vinca alkaloid analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*; 19: 1245-1249, **2009**.

Waetzig, V., Wacker, U., Haeusgen, W., Björkblom, B., Courtney, M.J., Coffey, E.T., Herdegen, T. Concurrent protective and destructive signaling of JNK2 in neuroblastoma cells. *Cellular Signalling*; 21: 873-880, **2009**.

Walden, P.D., Globina, Y., Mieder, A. Induction of anoikis by doxazosin in prostate cancer cells is associated with activation of caspase-3 and a reduction of focal adhesion kinase. *Urological Research*; 32: 261-265, **2004**.

Wang, J.J., Chang, Y.F., Chern, Y.T., Chi, C.W. Study of *in vitro* and *in vivo* effects of 1,6-Bis[4-(4-amino-3-hydroxyphenoxy)phenyl]diamantane (DPD), a novel cytostatic and differentiation inducing agent on human colon cancer cells. *British Journal of Cancer*; 89: 1995-2003, **2003**.

Wang, L., Ling, Y., Chen, Y., Li, C., Feng, F., You, Q.D., Lu, N., Guo, Q.L. Flavonoid baicalein suppresses adhesion, migration and invasion of MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Cancer Letters*; 297: 42-48, **2010**.

Wang, W., Ju, J., Lee, K., Shin, I. Akt isoform-specific inhibition of MDA-MB-231 cell proliferation. *Cellular Signalling*; 23: 19-26, **2011**.

Wang, X., Martindale, J.L., Liu, Y., Holbrook, N.J. The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signaling pathways on cell survival. *Biochemical Journal*; 333: 291-300, **1998**.

Waskiewicz, A.J., Johnson, J.C., Penn, B., Mahalingam, M., Kimball, S.R., Cooper, J.A. Phosphorylation of the cap-binding protein eukaryotic translation initiation factor 4E by protein kinase Mnk1 *in vivo*. *Molecular & Cellular Biology*; 19: 1871-1880, **1999**.

Webb, D.J., Parsons, J.T., Horwitz, A.F. Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells - over and over and over again. *Nature and Cell Biology*; 4: 97-100, **2002**.

Wendel, H.G., de Stanchina, E., Fridman, J.S., Malina, A., Ray, S., Kogan, S., Cordon-Cardo, C., Pelletier, J., Lowe, S.W. Survival signaling by Akt and eIF4E in oncogenesis and cancer therapy. *Nature*; 428: 332-337, **2004**.

Weston, C.R., Davis, R.J. The JNK signal transduction pathway. *Current Opinion in Cell Biology*; 19: 142-149, **2007**.

Whanger, PD. Selenium and its relationship to cancer: an update. *British Journal of Nutrition*; 91: 11-28, **2004**.

Wickström, M., Viktorsson, K., Lundholm, L., Aesoy, R., Nygren, H., Sooman, L., Fryknäs, L., Vogel L.K., Lewensohn, R., Larsson, R., Gullbo, J. The alkylating prodrug J1 can be activated



by aminopeptidase N, leading to a possible target directed release of melphalan. *Biochemical Pharmacology*; 79: 1281-1290, **2010**.

Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M.B., Johnson, G.L. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiological Reviews*; 79: 143-180, **1999**.

Wojewoda, M., Duszyński, J., Szczepanowska, J. Antioxidant defence systems and generation of reactive oxygen species in osteosarcoma cells with defective mitochondria: Effect of selenium. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1797: 890-896, **2010**.

Woo, I.S., Eun, S.Y., Kim, H.J., Kang, E.S., Kim, H.J., Lee, J.H., Chang, K.J., Kim, J.H., Hong, S.C., Seo, H.G. Farnesyl diphosphate synthase attenuates paclitaxel-induced apoptotic cell death in human glioblastoma U87MG cells. *Neuroscience Letters*; 474: 115-120, **2010**.

Wu, Z., Shah, A., Patel, N., Yuan, X. Development of methotrexate proline prodrug to overcome resistance by MDA-MB-231 cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*; 20: 5108-5112, **2010**.

[www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Cell-and-Tissue-Analysis/Signaling-Pathways/Akt.html](http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Cell-and-Tissue-Analysis/Signaling-Pathways/Akt.html)

Wyllie, A.H. Apoptosis: an overview. *British Medical Bulletin*; 53: 451-465, **1997**.

Wyllie, A.H., Beattie, G.J., Hargreaves, A.D. Chromatin Changes in Apoptosis. *Histochemical Journal*; 13: 681-692, **1981**.

Xing, F.X., Li, S.L., Ge, X.Y., Wang, C.Y., Zeng, H.H., Li, D., Dong, L. The inhibitory effect of a novel organoselenium compound BBSKE on the tongue cancer Tca8113 *in vitro* and *in vivo*. *Oral Oncology*; 44: 963-969, **2008**.

Xue, W., Wang, Z., Chen, Q., Chen, J., Yang, H., Xue, S. High selenium status in individuals exposed to arsenic through coal-burning in Shaanxi (PR of China) modulates antioxidant enzymes, heme oxygenase-1 and DNA damage. *Clinica Chimica Acta*; 411: 1312-1318, **2010**.

Yadav, S., Chauhan, M.S., Sharma, A. Characterisation of bio-aerosols during dust storm period in N-NW India. *Atmospheric Environment*; 41: 6063-6073, **2007**.

Yamanoshita, O., Ichihara, S., Hama, H., Ichihara, G., Chiba, M., Kamijima, M., Takeda, I., Nakajima, T. Chemopreventive effect of selenium-enriched Japanese radish sprout against breast cancer induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in rats. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*; 212: 191-198, **2007**.

Yenugonda, V.M., Deb, T.B., Grindrod, S.C., Dakshanamurthy, S., Yang, Y., Paige, M., Brown, M.L. Fluorescent cyclin-dependent kinase inhibitors block the proliferation of human breast cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*; 19: 2714-2725, **2011**.

Yi, C., Maksimoska, J., Marmorstein, R., Kissil, J.L. Development of small-molecule inhibitors of the group I p21-activated kinases, emerging therapeutic targets in cancer. *Biochemical Pharmacology*; 80: 683-689, **2010**.

Yodkeeree, S., Ampasavate, C., Sung, B., Aggarwal, B., Limtrakul, P. Demethoxycurcumin suppresses migration and invasion of MDA-MB-231 human breast cancer cell line. *European Journal of Pharmacology*; 627: 8-15, **2010**.

Zeng, H., Combs, G.F. Selenium as an anticancer nutrient: roles in cell proliferation and tumor cell invasion. *The Journal of Nutritional Biochemistry*; 19: 1-7, **2008**.

Zhang, Y., Zhou, L., Bao, Y.L., Wu, Y., Yu, C.L., Huang, Y.X., Sun, Y., Zheng, L.H., Li, X.Y. Butyrate induces cell apoptosis through activation of JNK MAP kinase pathway in human colon cancer RKO cells. *Chemico-Biological Interactions*; 185: 174-181, **2010**.

Zhou, Y., Zhang, S., Liu, C., Cai, Y. The protection of selenium on ROS mediated-apoptosis by mitochondria dysfunction in cadmium-induced LLC-PK1 cells. *Toxicology in Vitro*; 23: 288-294, **2009**.

Zhu, G., Conner, S.E., Zhou, X., Shih, C., Li, T., Anderson, B.D., Brooks, H.B., Campbell, R.M., Considine, E., Dempsey, J.A., Faul, M.M., Ogg, C., Patel, B., Schultz, R.M., Spencer, C.D., Teicher, B., Watkins, S.A. Synthesis, structure-activity relationship and biological studies of indolocarbazoles as potent cyclin D1-CDK4 inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*; 46: 2027-2030, **2003**.

Zhu, Z., Jiang, W., Ganther, H.E., Thompson, H.J. Mechanisms of cell cycle arrest by methylseleninic acid. *Cancer Research*; 62: 156-164, **2002**.

Zink, M., Lanig, H., Troschütz, R. Structural variations of piritrexim, a lipophilic inhibitor of human dihydrofolate reductase: synthesis, antitumor activity and molecular modeling investigations. *European Journal of Medicinal Chemistry*; 39: 1079-1088, **2004**.