

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

GRADO EN FARMACIA

Departamento de Química Orgánica

TRABAJO DE FIN DE GRADO

SÍNTESIS DE DERIVADOS DE 4-HIDROXI-6-METIL-2-PIRONA POTENCIALMENTE BIOACTIVOS

Sheila Zulema Gutiérrez Ravelo

Tutor: Ana Estévez Braun

Cotutor: Sandra Oramas Royo

La Laguna, 2020

ÍNDICE

	<i>Página</i>
1. RESUMEN.....	5
2. INTRODUCCIÓN	
2.1 QUÍMICA MÉDICA.....	6
2.2 PROTEÍNA JAK-2.....	6
2.3 INHIBIDORES DE JAK-2.....	8
3. OBJETIVOS.....	11
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1 SÍNTESIS.....	12
4.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS.....	18
4.3 TRANSFORMACIONES.....	21
4.4 DOCKING.....	22
5. MATERIAL Y MÉTODOS	
5.1 MATERIALES.....	24
5.2 APARATOS.....	24
5.3 PROGRAMAS INFORMÁTICOS.....	25
5.4 MÉTODOS.....	26
6. CONCLUSIONES.....	30
7. BIBLIOGRAFÍA.....	31

ABREVIATURAS

δ :	Desplazamiento químico en un espectro
μL :	Microlitros
Ala:	Alanina
ATP:	Trifosfato de adenosina
CCF:	Cromatografía en capa fina
CCP:	Cromatografía en capa preparativa
DCM:	Diclorometano
DDQ:	2,3-dicloro-5,6-diciano- <i>p</i> -benzoquinona.
EtOH:	Etanol
ESI:	Electrospray
Gln:	Glutamina
Gly:	Glicina
HMBC:	Correlación de enlaces múltiples heteronucleares.
HSQCed:	Correlación heteronuclear a un enlace
J:	Constante de acoplamiento
JAK-2:	Janus kinasa 2
Leu:	Leucina
MCR:	Reacción multicomponente
MeOH:	Metanol
Met:	Metionina
MHz:	Megahertzios
mmol:	Milimol
MW:	Microondas
min:	Minutos
mg:	Miligramos
mL:	Mililitros
m/z:	Relación masa/carga
PDB:	Protein Data Bank
ppm:	Partes por millón
RMN:	Resonancia magnética nuclear
Rto:	Rendimiento
Ser:	Serina
STAT:	Transductores y activadores de señales de transcripción
Tyr:	Tirosina
Val:	Valina

RESUMEN

La enzima JAK-2 es una proteína tirosina kinasa que interviene en procesos tumorales, inflamatorios e inmunitarios. Una mutación en esta enzima provoca enfermedades raras como la mielofibrosis y la policitemia vera que, a pesar de presentar una incidencia muy baja en la población, provoca alteraciones en el organismo que conlleva a una discapacidad grave, pudiendo poner en peligro la vida del paciente. En este trabajo una serie de catorce hexahidroquinolinas funcionalizadas se han sintetizado mediante una reacción multicomponente a partir de 4-hidroxi-6-metil-2-pirona, diferentes aldehídos sustituidos y 3-amino-2-ciclohexen-1-ona. Dichas hexahidroquinolinas en un estudio de modelización molecular tipo docking han presentado buenas interacciones en el sitio activo de la enzima JAK-2.

ABSTRACT

JAK-2 enzyme is a protein tyrosine kinase that is involved in tumor cell, inflammatory and immune processes. A mutation in this enzyme causes diseases such as myelofibrosis and polycythemia vera in spite of a very low incidence in the population, causes alterations in the organism that leads to severe disability, which can compromise the patient's life. In this work a series of fourteen hexahydroquinolines has been synthesized by a multicomponent reaction from 4-hydroxy-3-methyl-2-pyrone, different substituted aldehydes and 3-amine-2-cyclohexen-1-one. These compounds in molecular docking simulation presented good interactions in the active site of the JAK-2.

INTRODUCCIÓN

1. QUÍMICA MÉDICA

La química médica tiene como objetivo el estudio químico de los fármacos para determinar la relación existente entre la estructura química, las propiedades fisicoquímicas, la reactividad y la respuesta biológica, con el fin último de proporcionar los conocimientos necesarios para la creación de nuevos fármacos.

En sus orígenes, la química médica se centró fundamentalmente en las modificaciones químicas simples de moléculas de origen natural, aunque actualmente están orientadas hacia el estudio de las interacciones de los fármacos con sus estructuras dianas a nivel molecular. Ello se debe al desarrollo de la biología molecular y de la ingeniería genética que ha permitido el estudio detallado de muchas moléculas diana en la acción de los fármacos, tales como enzimas, receptores de membrana y ácidos nucleicos. También se han determinado características tridimensionales del centro activo sobre el que ejercen su acción muchos fármacos conocidos. Por este motivo, en la actualidad, una parte del diseño de nuevos fármacos se basa en los resultados de modelización tridimensional derivados del estudio de la interacción fármaco-receptor⁽¹⁾.

Una de las áreas de interés de la química médica es la búsqueda de compuestos antitumorales, debido a la alta incidencia del cáncer en la población. Según la OMS, en 2018 los tumores más frecuentes a nivel mundial fueron los de pulmón, mama y colorrectal⁽²⁾.

Una de las maneras de abordar el cáncer es mediante el uso de compuestos antitumorales que interactúen de manera eficiente en dianas biológicas con actividad terapéutica como pueden ser las enzimas JAK-2⁽³⁾.

2. PROTEÍNA JAK-2

Las proteínas Janus Kinasas (JAKs) son las únicas clases de proteínas con actividad tirosina kinasa que se asocian con receptores de citocinas y que activan las proteínas STAT, transductores y activadores de señales de transcripción. Debido al papel que tienen en la inflamación e inmunidad, podría suponerse que la activación de las JAKs puede contribuir a los desórdenes hematopoyéticos y a las enfermedades inflamatorias y de autoinmunidad⁽⁴⁾.

Las citocinas son un grupo de proteínas producidas por diversos tipos celulares y que actúan como reguladores sistémicos de la respuesta inmunitaria e inflamatoria, además de intervenir como factor de crecimiento de distintos tipos de células como las hematopoyéticas. Su actuación biológica se produce por la interacción con receptores específicos y la célula diana determinando de esta manera su acción biológica. Sin

embargo, también pueden conducir a una desregulación de la respuesta inmune cuando se encuentran en elevadas concentraciones⁽⁵⁾.

Esta desregulación se traduce en la aparición de citocinas proinflamatorias a nivel local y sistémico, las cuales estimulan la producción y liberación de otros mediadores proinflamatorios como puede ser el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), interferón gamma (IFN- γ) y el factor inhibitorio de la migración del macrófago (FIM)⁽⁶⁾.

Muchas citocinas implicadas en enfermedades inflamatorias, autoinmunes y distintos tipos de cáncer usan la ruta JAK-STAT para transducir las señales intracelulares. Esta ruta da lugar a conexiones más directas entre receptores de factores de crecimiento y de transcripción. Cuando se estimulan los receptores de citocinas, las proteínas STATs se agrupan y se unen a través de los dominios SH₂ a los receptores con secuencias de fosfotirosinas. Tras esta unión, las STATs son fosforiladas por las JAKs, se translocan al núcleo, donde se unen a regiones promotoras del DNA y activan la transcripción del gen diana^(3,7) (Figura 1).

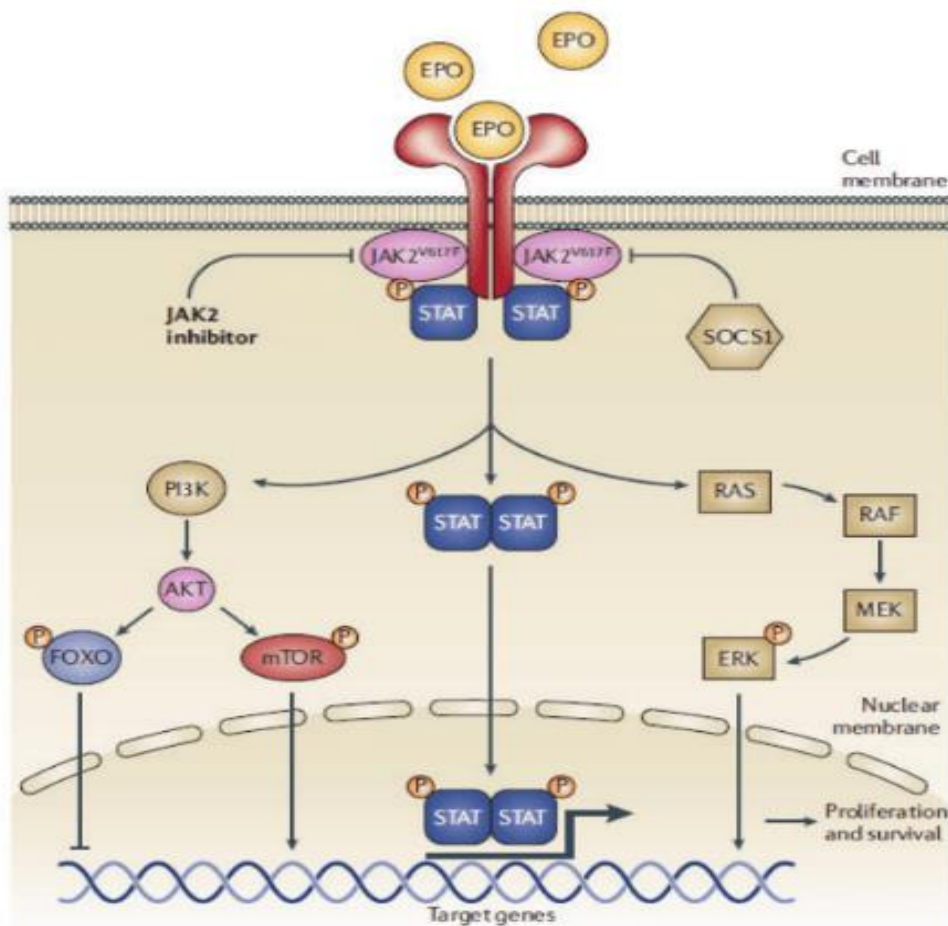


Figura 1: Ruta JAK/STAT⁽⁸⁾.

La ruta interviene en muchos procesos celulares vitales como el crecimiento celular, diferenciación, proliferación y funciones inmunitarias reguladoras, además de regular numerosos genes, pero una alteración en la regulación está asociada con la aparición

de varias enfermedades como neoplasia mieloproliferativa crónica, obesidad, diabetes mellitus tipo 2, enfermedad inflamatoria intestinal, y otros tipos de cáncer^(8,9,10,11).

También existen enfermedades asociadas a una mutación en JAK-2 como son los trastornos mieloproliferativos. En esta mutación conocida como V617F hay una sustitución de valina por fenilalanina (Figura 2) que provoca que la proteína esté activada continuamente y haya una producción descontrolada de células de la sangre, dando lugar a policitemia vera, mielofibrosis idiopática y trombocitemia esencial, además de una hipersensibilidad al factor de crecimiento^(12,13).

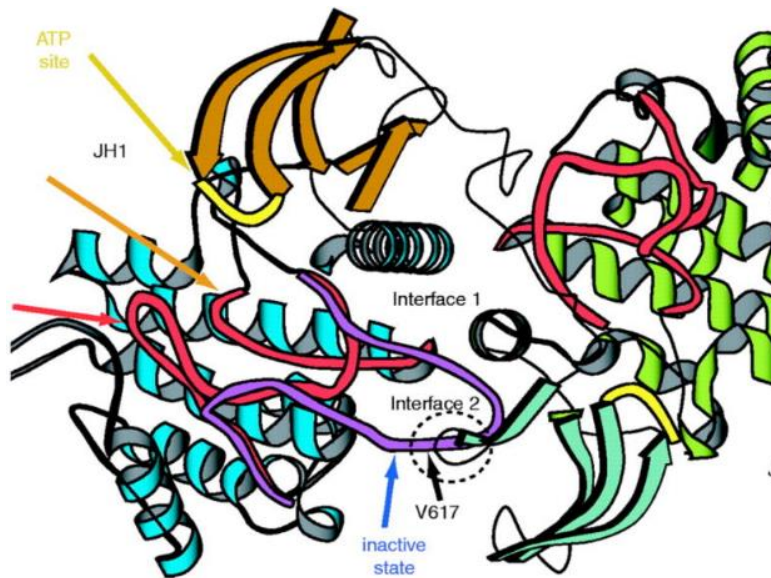


Figura 2: Localización de la mutación V617F⁽¹⁹⁾.

Estas enfermedades son de tipo maligno donde las células de la sangre adquieren un defecto genético produciendo células de estirpe mieloide de manera descontrolada. En la mielofibrosis aparece tejido fibroso en la médula ósea, agrandamiento de órganos como el bazo e hígado y anemia⁽¹⁴⁾.

Esta enfermedad es muy poco frecuente y se desconoce su causa, pero puede aparecer de manera secundaria a otros síndromes mieloproliferativos. Afecta sobre todo a pacientes varones de 50 a 65 años⁽¹⁵⁾.

Para el tratamiento de estos síndromes se usa la quimioterapia, radioterapia y el trasplante de células madres y desde hace pocos años se han desarrollado inhibidores de JAK-2, los jakinibs, como el ruxolitinib^(15,16).

3. INHIBIDORES DE JAK2

La proteína JAK-2 comprende varios dominios en su estructura. Dos de ellos son dominios C-terminales llamados JH1 y JH2, dominio quinasa y dominio pseudoquinasa respectivamente, que son cruciales para la función y regulación de la proteína. El dominio SH₂ compuesto por JH4 y JH3 que estabiliza la conformación estructural de la enzima. Por último, se encuentran los dominios FERM unidos al extremo N-terminal al

que pertenecen JH5-JH7 que son claves para la asociación con los receptores (Figura 3)⁽¹⁷⁾.



Figura 3: *Dominios estructurales de JAK-2.*



Figura 4: *Estructura cristalina de JAK-2 (PDB 5CF4)*

El mecanismo de acción de los inhibidores de JAK-2 en los síndromes mieloproliferativos cromosoma Philadelphia negativo no está muy claro, ya que la respuesta se observa tanto en pacientes con mutación como sin ella ⁽¹⁸⁾.

El primer jakinib conocido de primera generación es el ruxolitinib (Figura 5), considerado como agente antineoplásico. Es un fármaco de diagnóstico hospitalario, inhibidor de las proteínas kinasas JAK2 y JAK1 que inhibe la transducción de señales de JAK-STAT y la proliferación celular dependiente de citocinas y de células Ba/F3 en procesos hematológicos malignos, disminuyendo así los marcadores inflamatorios. Se une al dominio quinasa para inhibir la actividad enzimática en la mutación JAK-V617F^(20,21) (Figura 6).

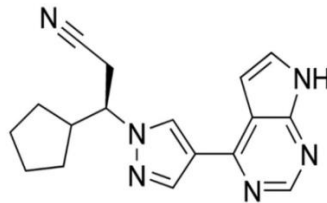


Figura 5: *Estructura de ruxolitinib (INCB018424).*

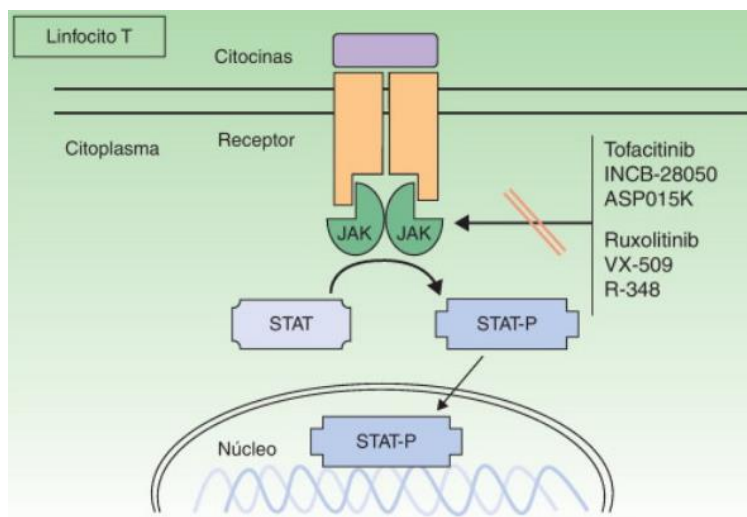


Figura 6: Mecanismo de acción de ruxolitinib⁽²¹⁾.

Se usa como tratamiento no paliativo de primera línea en la mielofibrosis, es administrado por vía oral para tratar la esplenomegalia y el alivio de los síntomas debilitantes relacionados con la enfermedad. La administración del fármaco también se asocia a una reducción de la proteína STAT3 fosforilada⁽²¹⁾.

Otro inhibidor de JAK-2 es el fedratinib (Figura 7), que también se usa en pacientes con riesgo elevado de mielofibrosis y policitemia vera. Mejora los síntomas fatigosos, la respuesta del bazo y la normalización de los recuentos sanguíneos, además produce una disminución de la carga de los alelos correspondientes a la mutación^(18,23).

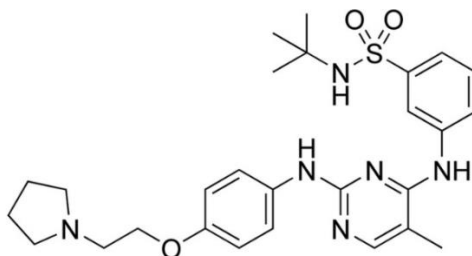


Figura 7: Estructura de fedratinib (TG101348).

Con estos antecedentes y dado que no existen muchos inhibidores conocidos de JAK-2, en este trabajo nos hemos propuesto la preparación de una serie de compuestos bicíclicos polifuncionalizados que en estudios de modelización tipo docking han mostrado buenas interacciones en el sitio de unión de JAK-2.

OBJETIVOS

- Preparación de hexahidroquinolinas sustituidas mediante una reacción multicomponente a partir de 4-hidroxi-6-metil-2-pirona, aldehídos y 3-amino-2-ciclohexen-1-ona.
- Purificación mediante técnicas cromatográficas y caracterización mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear de los productos obtenidos.
- Realización de transformaciones selectivas sobre alguno de los productos obtenidos al objeto de diversificar las estructuras resultantes.
- Estudios de modelización molecular tipo Docking de los productos obtenidos en el bolsillo de unión al ATP de la proteína JAK-2.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. SÍNTESIS

Los compuestos a sintetizar se obtienen mediante una reacción multicomponente (MCR), a partir de 4-hidroxi-6-metil-2-pirona, 3-amino-2-ciclohexen-1-ona y aldehídos, todos ellos comerciales.

Las reacciones multicomponentes son reacciones convergentes en las que tres o más productos de partida reaccionan para formar un producto final a partir de una secuencia multietapa, y cuyo resultado final depende de las condiciones de reacción, en las que intervienen los disolventes, la temperatura, la concentración, el tipo de producto de partida y los grupos funcionales que presentan⁽²⁴⁾.

Este tipo de reacciones presentan muchas ventajas frente a la síntesis tradicional ya que implican una sola etapa de reacción y sigue un proceso "one-pot", que requiere un solo recipiente y un único proceso de purificación, dando lugar a un ahorro en el tiempo y a la obtención de rendimientos mayores en comparación con la síntesis convencional. Además, dado su carácter modular se puede acceder a un gran número de compuestos más complejos^(24,25,26).

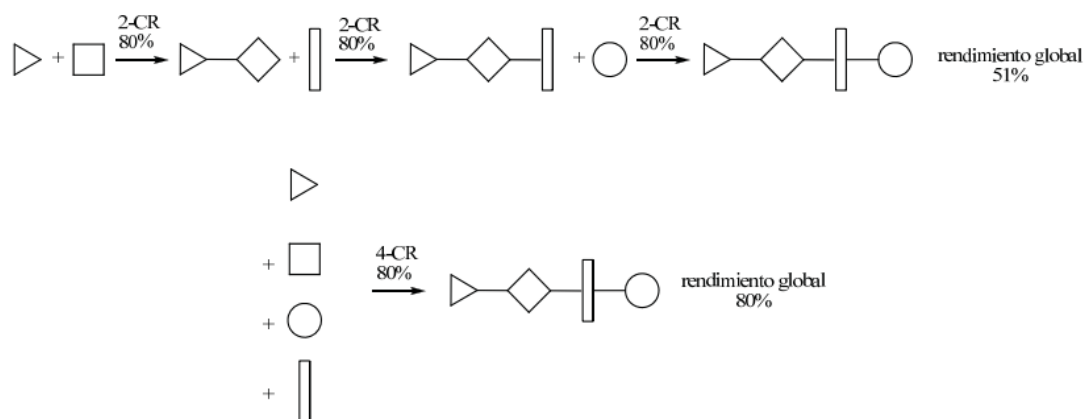
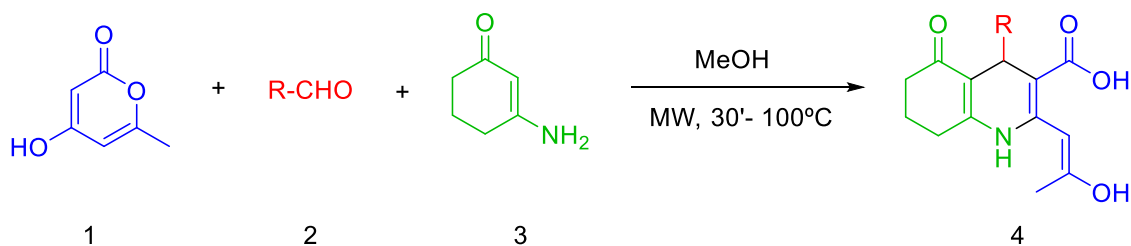


Figura 8: Síntesis Tradicional vs Síntesis Multicomponente⁽²⁷⁾.

Hay que tener en cuenta que en las reacciones multicomponentes la coexistencia de varios componentes en el seno de la reacción da lugar a una gran variabilidad de interacciones entre los reactivos, pudiendo dar resultados diferentes a los esperados y más si se varían las condiciones de reacción, es decir, la temperatura, el tiempo, la presencia o no de catalizadores, solventes, etc.

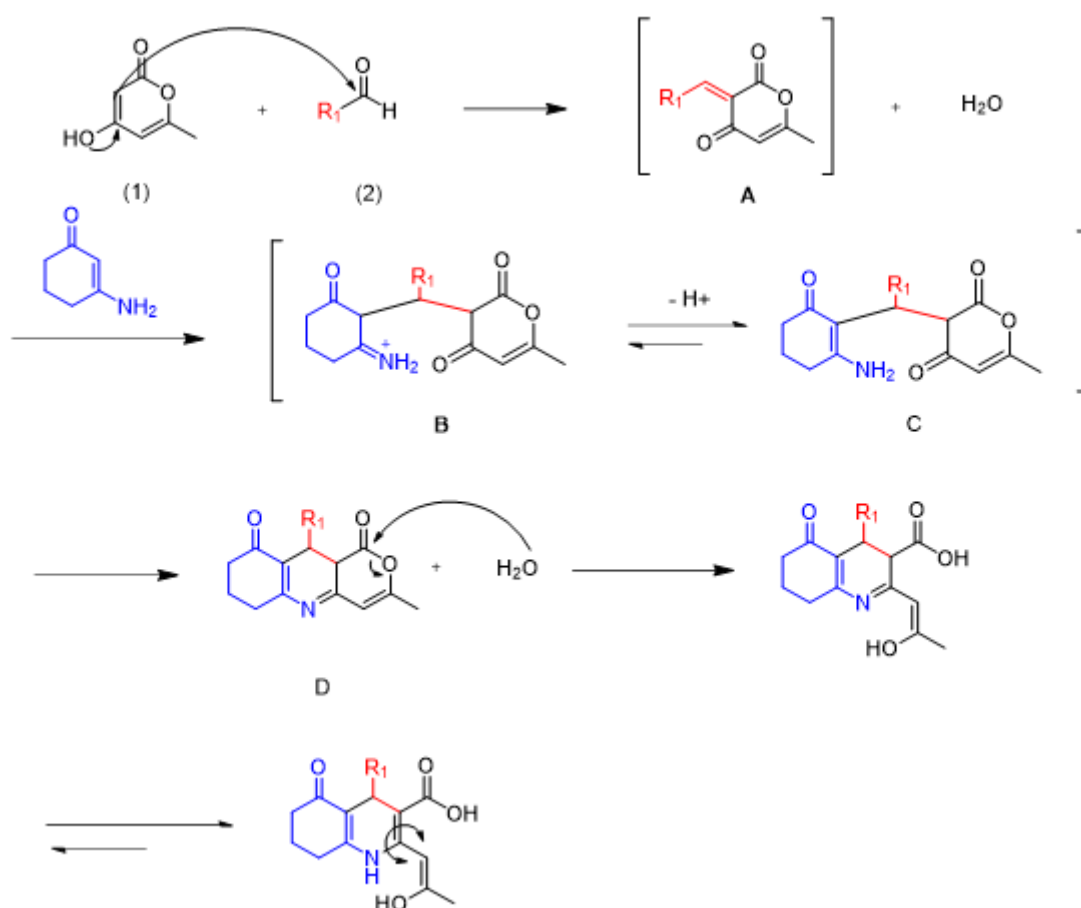
Los distintos derivados de hexahidroquinolinas se obtuvieron usando condiciones ya optimizadas en el grupo de investigación, tal y como se ilustra en el esquema 1.



Esquema 1: Síntesis de hexahidroquinolinas.

El mejor resultado de optimización se obtuvo utilizando como disolvente MeOH, bajo irradiación de microondas a 100°C durante 30 minutos y en ausencia de catalizador.

A continuación, se propone el siguiente mecanismo de reacción para la formación de los mismos:

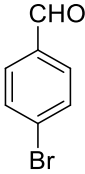
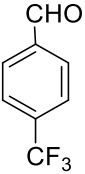
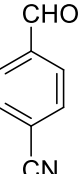
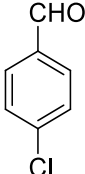
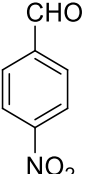
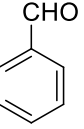
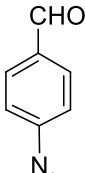
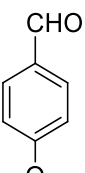


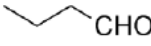
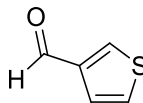
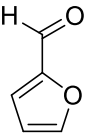
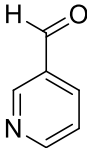


Esquema 2: Mecanismo de la reacción multicomponente.

En la reacción multicomponente, se produce una condensación entre el aldehído (**2**) y la pirona (**1**), generando un intermedio carbonílico α,β - insaturado (**A**). La reacción de la enaminona primaria (**3**) con **A** genera un segundo intermedio (**B**) que se encuentra en equilibrio con **C**. Con el par de electrones desapareados del nitrógeno, se produce el ataque hacia el carbonilo dando lugar al compuesto ciclado (**D**). A continuación, el anillo lactónico sufre el ataque de una molécula de agua, lo que conlleva a su apertura y a la formación del derivado deseado.

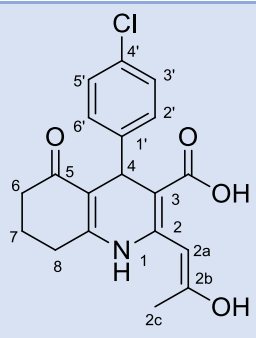
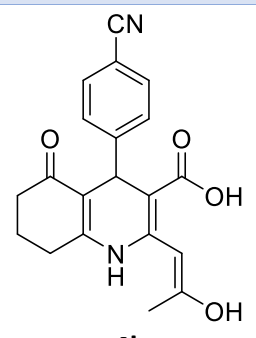
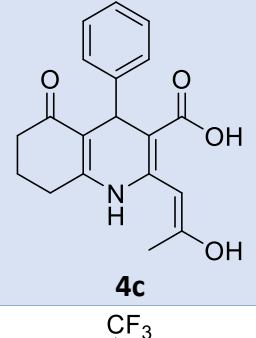
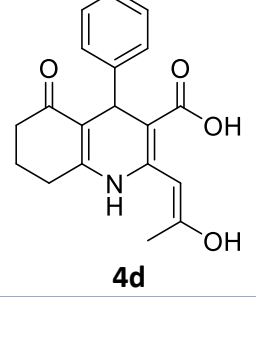
Para sintetizar la quimioteca se siguieron las condiciones de optimización mencionadas anteriormente y se utilizaron los aldehídos mostrados en la tabla 1.

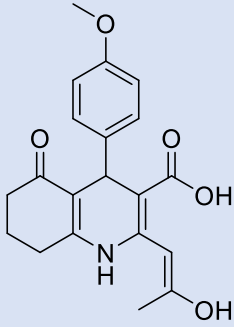
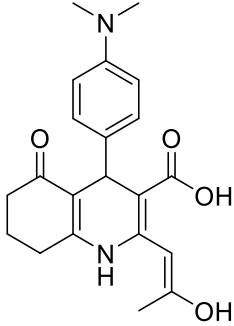
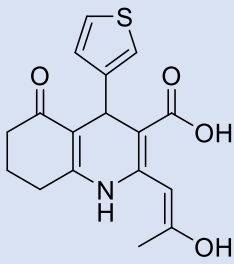
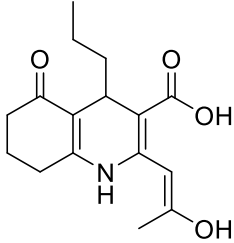
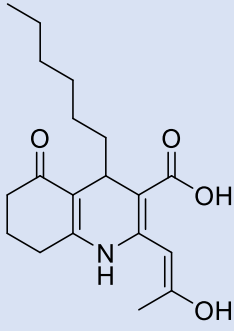
Tabla 1: Aldehídos usados en la reacción

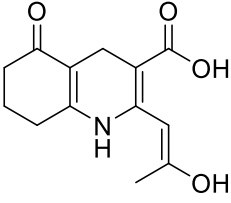
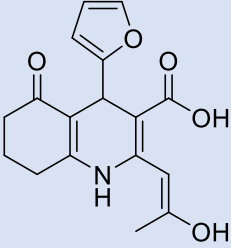
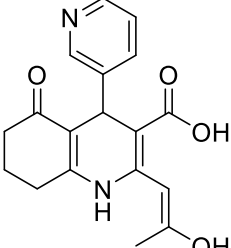
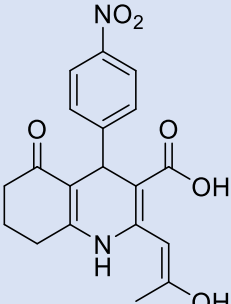
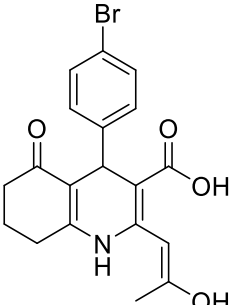
Aromáticos		
		
4-bromobenzaldehído	4-trifluorometilbenzaldehído	4-cianobenzaldehído
		
4-clorobenzaldehído	4-nitrobenzaldehído	Benzaldehído
		
4- (dimetilamino)benzaldehído	4-metoxibenzaldehído	
Alifáticos		
		
Heptaldehído	formaldehído	Butiraldehído
Heteroaromáticos		
		
tiofeno-3- carbaldehído	2-furaldehído	3-piridincarboxaldehído

En la siguiente tabla, se muestran las estructuras de los compuestos obtenidos, así como los correspondientes rendimientos.

Tabla 2: Estructura y rendimiento de los compuestos **4 (a-n)** obtenidos.

Entrada	Estructura	Nombre del compuesto	Rendimiento
1	 <p>4a</p>	Ácido (Z)-4-(4-clorofenil)-2-(2-hidroxi-prop-1-en-1-il)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3-carboxílico.	42
2	 <p>4b</p>	Ácido (Z)-4-(4-cianofenil)-2-(2-hidroxi-prop-1-en-1-il)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3-carboxílico.	57
3	 <p>4c</p>	Ácido (Z)-2-(2-hidroxi-prop-1-en-1-il)-5-oxo-4-fenil-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3-carboxílico.	27
4	 <p>4d</p>	Ácido (Z)-2-(2-hidroxi-prop-1-en-1-il)-5-oxo-4-(trifluorometil)fenil)-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3-carboxílico.	66

5	 <p style="text-align: center;">4e</p>	<p style="text-align: center;">Ácido (<i>Z</i>)-2-(2-hidroxi-prop-1-en-1-il)-4-(4-metoxifenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3-carboxílico.</p>	49
6	 <p style="text-align: center;">4f</p>	<p style="text-align: center;">Ácido (<i>Z</i>)-4-(4-dimetilamino)fenil)-2-(2-hidroxi-prop-1-en-1-il)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3-carboxílico.</p>	62
7	 <p style="text-align: center;">4g</p>	<p style="text-align: center;">Ácido (<i>Z</i>)-2-(2-hidroxi-prop-1-en-1-il)-5-oxo-4-(tiofen-3-il)-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3-carboxílico.</p>	38
8	 <p style="text-align: center;">4h</p>	<p style="text-align: center;">Ácido (<i>E</i>)-2-(2-hidroxi-prop-1-en-1-il)-5-oxo-4-propil-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3-carboxílico</p>	49
9	 <p style="text-align: center;">4i</p>	<p style="text-align: center;">Ácido (<i>Z</i>)-4-heptil-2-(2-hidroxi-prop-1-en-1-il)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3-carboxílico</p>	45

10	 <p style="text-align: center;">4j</p>	Ácido (<i>Z</i>)-2-(2-hidroxi-prop-1-en-1-il)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3-carboxílico.	58
11	 <p style="text-align: center;">4k</p>	Ácido (<i>Z</i>)-4-(furan-2-il)-2-(2-hidroxi-prop-1-en-1-il)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3-carboxílico.	24
12	 <p style="text-align: center;">4l</p>	Ácido (<i>Z</i>)-2-(2-hidroxi-prop-1-en-1-il)-5-oxo-4-(piridin-3-il)-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3-carboxílico.	71
13	 <p style="text-align: center;">4m</p>	Ácido (<i>Z</i>)-2-(2-hidroxi-prop-1-en-1-il)-4-(4-nitrofenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3-carboxílico.	64
14	 <p style="text-align: center;">4n</p>	Ácido (<i>Z</i>)-4-(4-bromofenil)-2-(2-hidroxi-prop-1-en-1-il)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3-carboxílico.	67

Como podemos observar, en general se obtuvieron rendimientos de buenos a moderados. Con respecto a los sustituyentes aromáticos, la mayoría presenta un rendimiento de más de un 57 %, sin embargo, con el compuesto **4c** se obtuvo el peor rendimiento (27%).

Con los aldehídos alifáticos el rendimiento fue moderadamente bueno, de más de un 40%. Por último, con los aldehídos heteroaromáticos se obtuvieron rendimientos bajos excepto con el 3-piridincarboxaldehído (**4i**) con el que conseguimos un 71%.

2. CARACTERIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS

Una vez obtenido el producto, se confirma su estructura mediante resonancia magnética nuclear de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN. A continuación, se muestran a modo de ejemplo los espectros del compuesto **4b**.

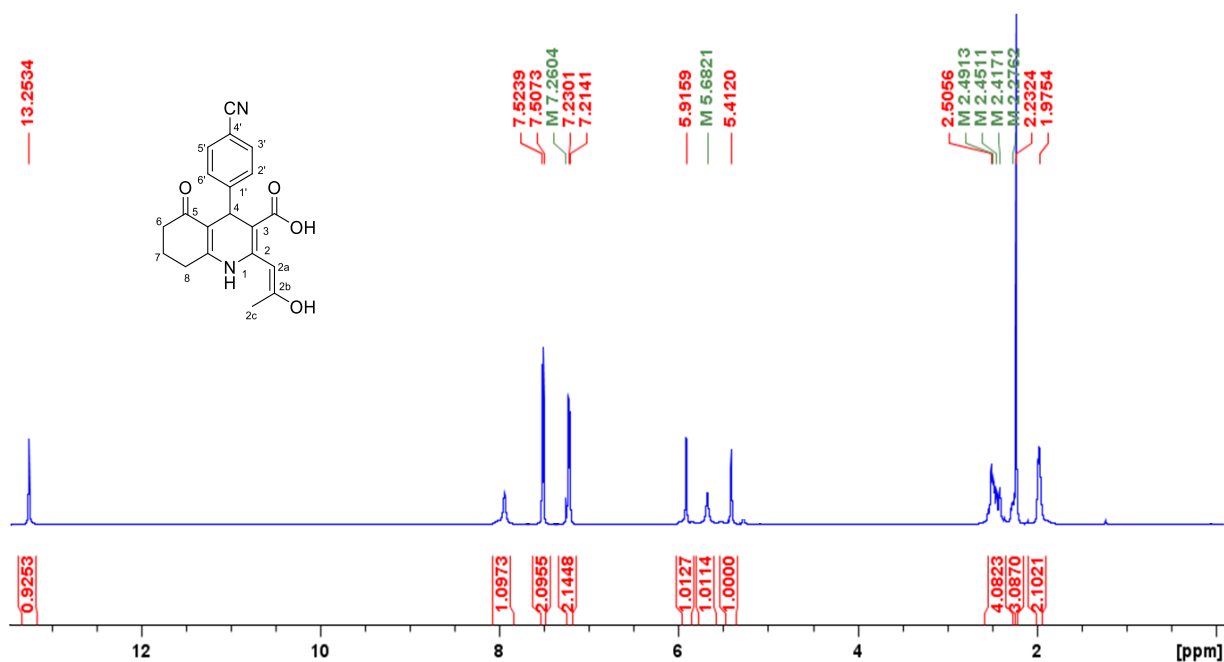


Figura 9: Espectro de ^1H -RMN (CDCl_3 , 500 MHz) del compuesto **4b**.

En el espectro ^1H -RMN del compuesto **4b**, se observa un singlete a δ 2.28 ppm que integra para tres hidrógenos asignables al único metilo presente en la molécula. Las señales multipletes a δ 1.98 ppm y 2.47 ppm se corresponden a los hidrógenos sobre los carbonos C-6, C-7 y C-8.

Seguidamente se observan varias señales singletes a δ 5.41, atribuible al hidrógeno vinílico, a δ 5.68 ppm que corresponde al NH y a δ 5.92 ppm asignables al hidrógeno H-4.

Los protones en posición 2',6' del anillo aromático aparecen como un doblete con una constante de acoplamiento de $J = 8.1$ Hz a δ 7.22 ppm, mientras que los protones en posición 3',5', se detectan a δ 7.52 ppm con una constante de acoplamiento $J = 8.4$ Hz.

Por último, la señal singlete a δ 7.92 ppm es atribuible al OH del grupo propenilo, mientras que el singlete a δ 13.25 ppm es asignable al grupo hidroxilo del carboxilo en posición 3.

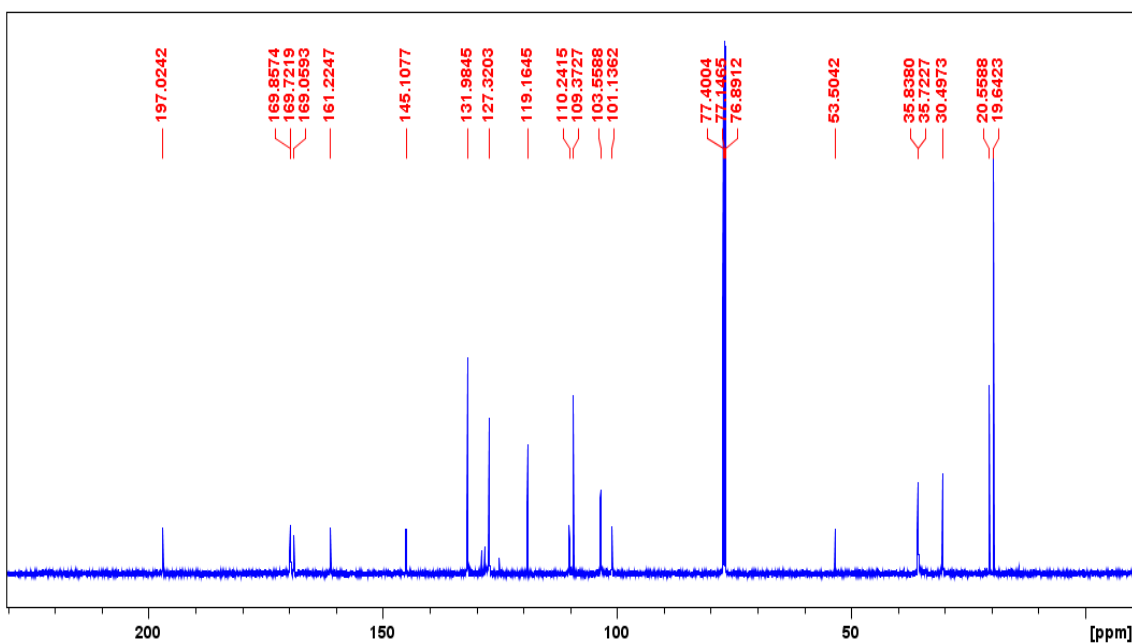


Figura 10: Espectro de ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 125 MHz) del compuesto **4b**.

En el espectro de ^{13}C -RMN observamos que existen señales para un CH_3 , tres CH_2 , seis CH y diez carbonos cuaternarios (Figura 10). Algunas de las señales más significativas son:

La señal a δ 19.6 ppm correspondiente al metilo sobre el doble enlace. Las señales a δ 20.5, 30.5 y 35.7 ppm de los CH_2 en C-8, C-7 y C-6.

El CH del anillo nitrogenado de C-4, aparece a δ 35.8 ppm. Por otra parte, se observa a δ 103.5 ppm la señal del carbono vinílico, mientras que a δ 110.2 vemos el carbono C-4' que soporta al grupo CN.

Con respecto al grupo ciano se observa la señal a δ 119.1 ppm. Por último, aparecen señales a δ 169.0 ppm del carbono carbonílico del ácido carboxílico (**C-3a**), y la señal a δ 197.0 ppm correspondiente a la cetona.

La asignación inequívoca de cada uno de los carbonos y de los protones se llevó a cabo mediante el análisis de los espectros bidimensionales HSQCed y HMBC.

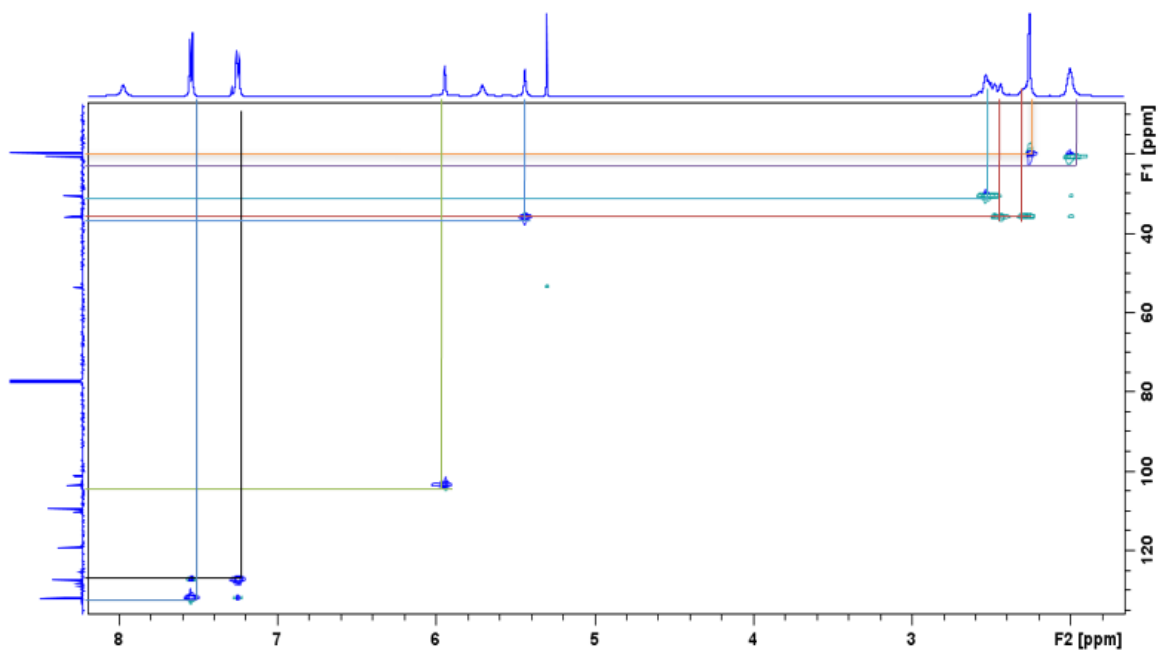


Figura 11: Ampliación de una parte del espectro HSQCed (CDCl_3 , 500 MHz) del compuesto **4b**.

El espectro bidimensional heteronuclear HSQCed nos permitió determinar qué hidrógenos estaban unidos a qué carbonos (Figura 11), mientras que el espectro bidimensional HMBC (Figura 12) permitió establecer las correlaciones carbono-hidrógeno a tres y dos enlaces.

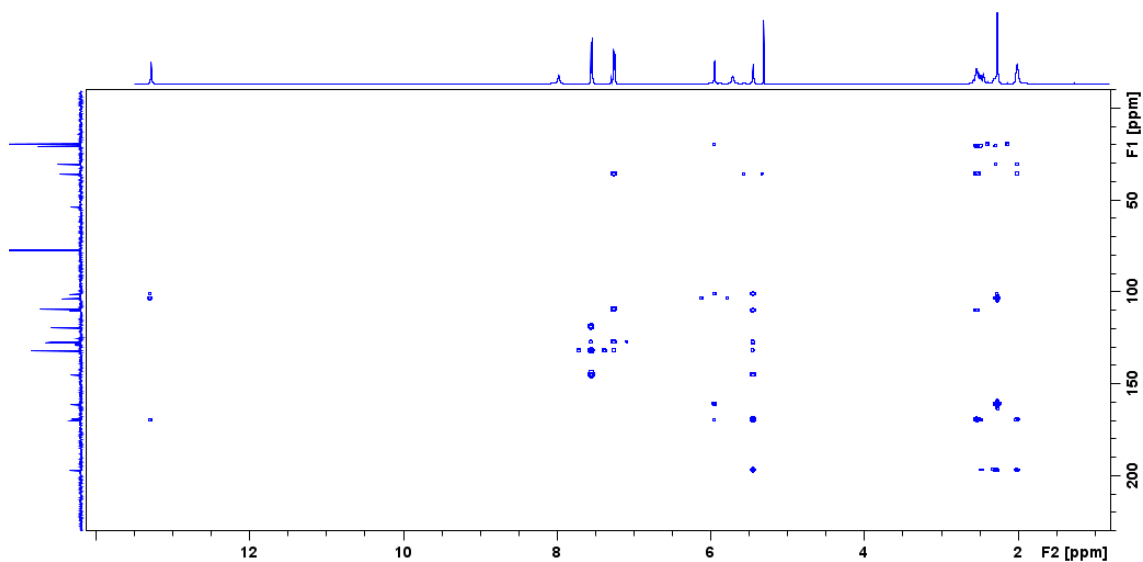


Figura 12: Espectro HMBC del compuesto **4b**

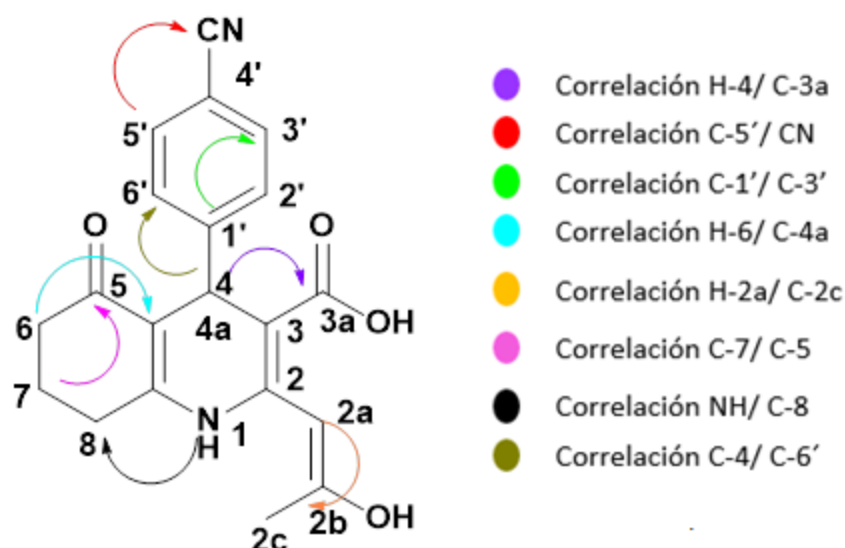


Figura 13: Correlaciones HMBC.

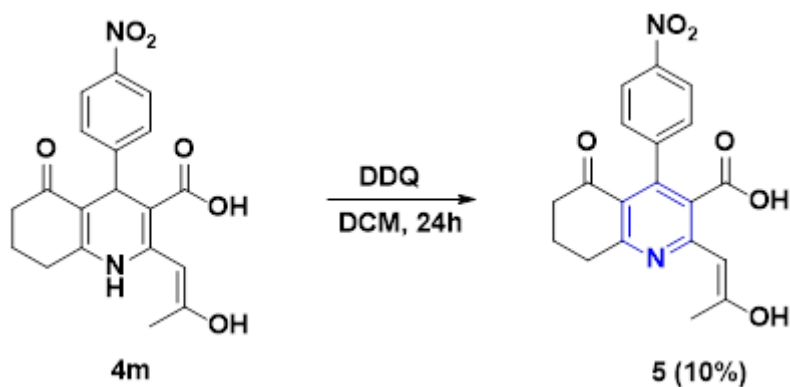
Además, la estructura de **4b** se corroboró mediante espectrometría de masas con la técnica de electrospray.

3. TRANSFORMACIONES

Con uno de los productos sintetizados se decidió realizar una serie de transformaciones para aumentar la diversidad estructural siguiendo métodos descritos en la bibliografía.

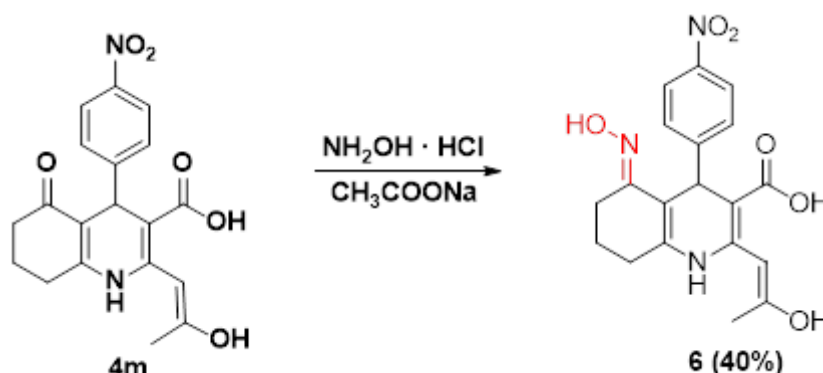
Una de las transformaciones que se realizó fue la aromatización del anillo de dihidropiridina. Para ello usamos como agente oxidante el 2,3-dicloro-5,6-diciano-*p*-benzoquinona (DDQ).

Esta transformación permitiría evaluar el efecto de la planaridad en la actividad biológica a determinar.



Esquema 3: Transformación con DDQ.

La siguiente transformación que se planteó fue la introducción de un grupo oxima. Para ello se realizó la condensación del grupo carbonilo en posición 5 con hidroxilamina en presencia de acetato sódico.



Esquema 4: Formación de la oxima.

4. DOCKING MOLECULAR

El Docking molecular es una herramienta clave en la biología molecular estructural y en el diseño de fármacos. Su objetivo es la predicción del modo de unión entre ligando y proteína⁽²⁸⁾.

El ligando al ser flexible adopta distintas conformaciones en el sitio activo según el modo de unión con los aminoácidos. La afinidad depende de la energía libre de los enlaces dando lugar a la mejor conformación, conocida como bioactiva⁽²⁹⁾.

Los resultados del estudio de modelización para los compuestos obtenidos en el sitio activo de la proteína JAK-2 (PDB 5CF4) revelan que los mejores valores de Docking score, que se obtiene a partir de los algoritmos de evaluación y búsqueda que nos indica el valor de las mejores interacciones y poses en el receptor, corresponden a los reflejados en la Tabla 3:

Tabla 3: Resultados de los mejores valores de Docking score:

Ligando	Glide score (Kcal/mol)	Glide emodel (Kcal/mol)
Compuesto 4i	-7.79	-52.01
Compuesto 4j	-7.48	-54.24
Compuesto 4h	-7.45	-46.10
Compuesto 4d	-7.44	-63.03
Compuesto 4e	-6.98	-54.05
Compuesto 4k	-6.93	-48.03
Compuesto 4f	-6.64	-58.72
Compuesto 4b	-6.50	-65.12

Como podemos observar en la figura 14, el estudio de las interacciones presentes en el docking de la molécula **4i** con mejor valor de Docking score, muestra la existencia de

dos puentes de hidrógeno. El primero se produce en el grupo carboxilo, que hace un doble puente de hidrógeno con el residuo Leu 932 de la proteína, mientras que el segundo se realiza con el grupo carbonilo en C-5 y la Ser 936.

Por otro lado, observamos numerosas interacciones hidrofóbicas. Una de ellas tiene lugar en la cadena lateral carbonada con el residuo de Tyr 931, otro con Gln 853. También se producen otras interacciones con otros residuos, como: Leu 855, Val 863, Ala 880, Met 929, Gly 935, Leu 983 y por último con Val 911 (Figura 14 y 15).

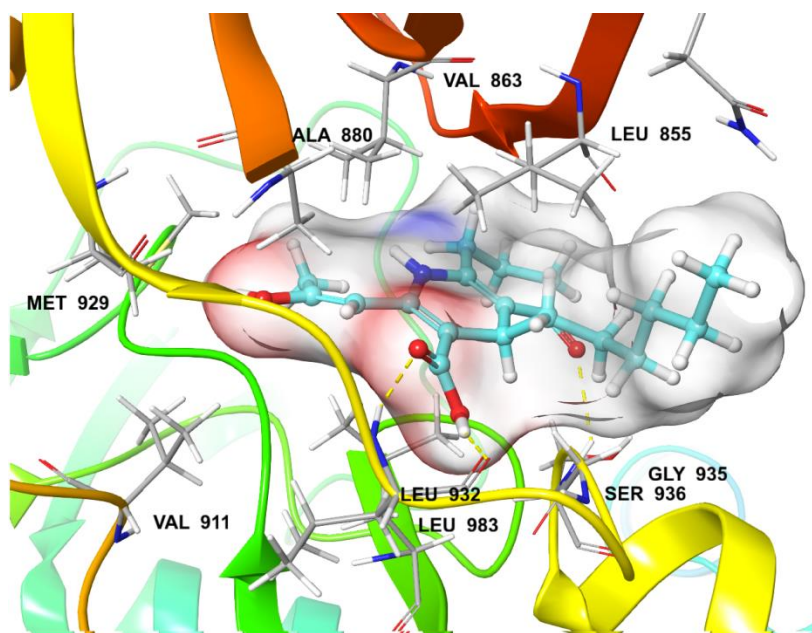


Figura 14: Docking molecular del compuesto **4i** y sus interacciones con la proteína JAK2

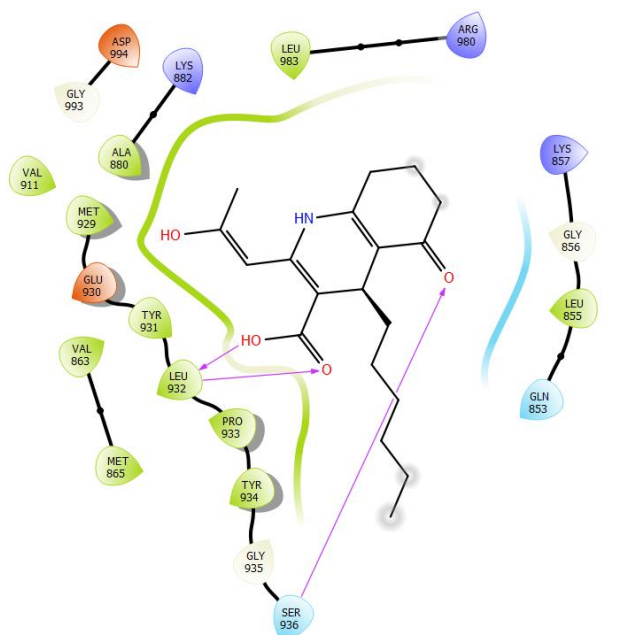


Figura 15: Interacciones del ligando **4i** con los residuos de la enzima JAK-2

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL

1. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

La cromatografía se usa para el monitoreo de las reacciones, la purificación de las muestras y la identificación de los compuestos de una mezcla. Para llevar a cabo esta técnica usamos:

- **Cromatografía en capa fina (CCF o TLC):** Placas de silicagel. Para la detección del producto se usan lámparas UV de 250nm.
- **Cromatografía en capa preparativa (CCP o PLC):** Placas de silicagel (20x20) con base de vidrio. Se usan lámparas UV de 250nm o 360nm.

Para ambas cromatografías se utilizó una mezcla de eluyente de tolueno/acetona al 20%.

2. APARATOS

- **Reactor Biotage modelo Initiator 2.5**

Microondas usado para llevar a cabo las reacciones multicomponentes. Requiere viales que resistan altas temperaturas y presiones. Permite obtener las reacciones en corto periodo de tiempo y con un control preciso del proceso.



Figura 16: *Reactor Biotage modelo Initiator 2.5*

- **Resonancia Magnética Nuclear (RMN):**

Para llevar a cabo la caracterización de las estructuras de los diferentes productos obtenidos se usaron aparatos de RMN Bruker Avance 500 (500 MHz para ^1H -RMN y 125 MHz para ^{13}C -RMN) y Bruker Avance 600 (600 MHz para ^1H -RMN y 150 MHz para ^{13}C -RMN).

Como disolvente hemos utilizado el cloroformo deuterado (CDCl_3). En ^1H -RMN las multiplicidades se describen como singlete (s), singlete ancho (sa), doblete (d), triplete (t) y multiplete (m).



Figura 17: RMN Bruker 600



Figura 18: RMN Bruker 500

- **Espectrometría de masas (EMA):** Determina la estructura molecular de las sustancias en función de la masa ya que presenta una alta sensibilidad analítica. Utilizamos el electro spray (ESI) que permite analizar compuestos lábiles que en disolución generan iones cargados.



Figura 19: Espectrofotómetro LCT Premier XE con aceleración ortogonal (oa-TOF)

3. PROGRAMAS

- **ChemBioDraw Ultra 12.0:** Con este programa se dibujaron todas las estructuras moleculares.
- **Bruker TopSpin 3.2:** Permite procesar los espectros obtenidos de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN
- **Programa Maestro 11.1,** interfaz gráfica de Schrödinger Small Molecule Drug Discovery.

MÉTODOS

PROCEDIMIENTO GENERAL:

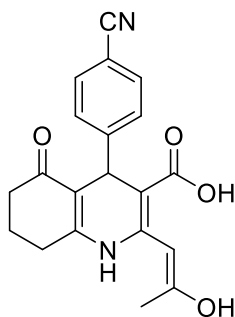
Siguiendo las condiciones de optimización ya obtenidos en el laboratorio, en un tubo de microondas, se añadieron 50 mg de 4-hidroxi-6-metil-2-pirona (0.404 mmol), 45.8 mg de la 3-amino-2-ciclohexen-1-ona y la cantidad necesaria de aldehído en proporción 1:1:1. Esto se disolvió en 2 ml de metanol y la mezcla de reacción se sometió a irradiación de microondas a 100°C, durante 30 minutos con agitación.

Posteriormente se realizó una cromatografía en capa fina para observar la ausencia del aldehído y luego se purificó la reacción por cromatografía en placa preparativa usando como disolvente tolueno/acetona al 20%.

Por último, tras concentrar los productos, se observó y verificó la estructura de éstos mediante espectroscopía.

Aunque se realizó el análisis espectroscópico de todos los compuestos, sólo mostraremos por limitación de número de palabras, la caracterización de algunos de ellos a modo de ejemplo.

- **Ácido (Z)-4-(4-cianofenil)-2-(2-hidroxi-1-propen-1-il)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3-carboxílico (4b).**



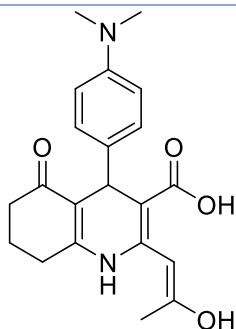
Siguiendo el procedimiento general, en un tubo de microondas, se disolvieron 50.0 mg de pirona (0.404 mmoles), 45.8 mg de enaminona y 52.45 mg de *p*-cianobenzaldehído en 2 mL de metanol. Se obtuvieron 80.8 mg de un sólido con un rendimiento de 57%.

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 2.00 (m, 2H); 2.25 (s, 3H); 2.52 (m, 4H); 5.40 (s, 1H); 5.78 (s, 1H); 5.91 (s, 1H); 7.22 (d, *J* = 8.15 Hz, 2H); 7.51 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H); 7.92 (s, 1H); 13.27 (s, 1H).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): δ 19.6 (CH₃); 20.5 (CH₂); 30.5 (CH₂); 35.7 (CH₂); 35.8 (CH); 101.1 (C); 103.5 (CH); 109.4 (C); 110.2 (C); 119.1 (C); 127.3 (2xCH); 132.0 (2xCH); 145.10 (C); 161.2 (C); 169.05 (C); 169.72 (C); 169.85 (C); 197.0 (C).

EMAR-ES (+): 373.1167 (Calculado para C₂₀H₁₈O₄N₂Na 373.1164).

- **Ácido (Z)-4-(4-dimetilamino)fenil)-2-(2-hidroxi-1-propen-1-il)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3-carboxílico (4f).**

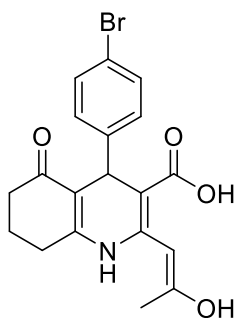


Siguiendo el procedimiento general, en un tubo de microondas, se disolvieron 50.0 mg de pirona (0.404 mmoles), 45.8 mg de enaminona y 60.27 mg de dimetilaminobenzaldehído en 2 mL de metanol. Se obtuvieron 93.0 mg de un sólido con un rendimiento de 62%.

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 2.00 (m, 2H); 2.25 (s, 3H); 2.50 (m, 4H); 2.90 (s, 6H); 5.25 (s, 1H); 5.40 (s, 1H); 5.95 (s, 1H); 6.67 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H); 7.00 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): δ 19.6 (CH₃); 20.7 (CH₂); 30.7 (CH₂); 34.5 (CH); 36.0 (CH₂), 40.8 (2xCH₃); 102.7 (C); 103.6 (CH); 112.7 (CH); 125.3 (CH); 127.1 (CH); 128.2 (2xCH); 129.0 (2xCH); 148.8 (C); 160.4 (C); 168.4 (C); 169.7 (C); 171.2 (C); 197.1 (C).

- **Ácido (Z)-4-(4-bromofenil)-2-(2-hidroxi-1-propen-1-il)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3-carboxílico (4n).**

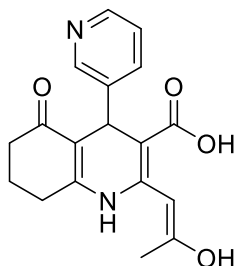


Siguiendo las condiciones optimizadas en el laboratorio, en un tubo de microondas, se disolvieron 50.0 mg de pirona (0.404 mmoles), 45.8 mg de enaminona y 75.5 mg de *p*-bromobenzaldehído en 2 mL de metanol. Se obtuvieron 109.0 mg de un sólido con un rendimiento de 67%.

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 1.96 (m, 2H); 2.24 (s, 3H); 2.46 (m, 2H); 5.38 (s, 1H); 5.73 (sa, 1H); 5.92 (s, 1H); 7.01 (m, 2H); 7.35 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H); 7.95 (s, 1H); 13.43 (s, 1H).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): δ 19.6 (CH₃); 20.6 (CH₂); 30.5 (CH₂); 35.1 (CH); 35.8 (CH₂); 101.7 (C); 103.6 (CH); 110.7 (C); 119.4 (CH); 128.2 (2xCH); 131.1 (2xCH); 137.9 (C); 160.8 (C); 169.2 (C); 169.3 (C); 169.8 (C); 197.0 (C).

- **Ácido (Z)-2-(2-hidroxi-prop-1-en-1-il)-5-oxo-4-(piridin-3-il)-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3-carboxílico (4l).**



Siguiendo el procedimiento general, en un tubo de microondas, se disolvieron 50.0 mg de pirona (0.404 mmoles), 45.8 mg de enamina y 37.92 μ L de 3-piridincarboxaldehído en 2 mL de metanol. Se obtuvieron 94.0 mg de un sólido con un rendimiento de 71%.

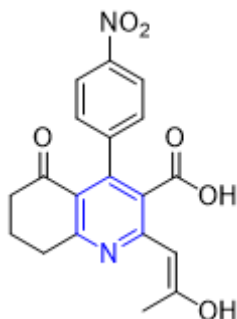
$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 1.96 (m, 2H); 2.24 (s, 3H); 2.46 (m, 2H), 5.43 (s, 1H); 5.92 (s, 1H); 6.38 (s, 1H); 7.18 (dd, $J = 4.9, 7.6$ Hz, 1H); 7.43 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H); 7.96 (s, 1H); 8.34 (sa, 2H).

$^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 19.6 (CH_3); 20.5 (CH_2); 30.4 (CH_2); 33.6 (CH); 35.6 (CH_2); 101.0 (C); 103.6 (CH); 109.8 (C); 123.0 (CH); 128.2 (C); 129.0 (C); 134.4 (CH); 146.6 (CH); 148.2 (CH); 161.1 (C); 169.0 (C); 170.0 (C); 196.8 (C).

TRANSFORMACIONES

- **Preparación del compuesto Ácido (Z)-2-(2-hidroxi-prop-1-en-1-il)-4-(4-nitrofenil)-5-oxo-5,6,7,8-tetrahidroquinolina-3-carboxílico:**

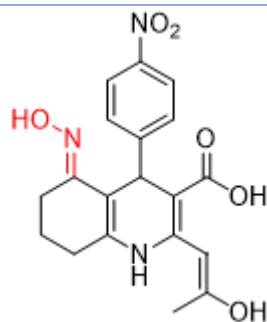
A 60mg (0.40 mmoles) del compuesto **4m** en 4 mL de DCM se le añadieron 90.8 mg de DDQ (0.4 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo bajo agitación a temperatura ambiente hasta la desaparición del producto de partida. Posteriormente se trató con una solución saturada de NaHCO_3 y se extrajo con DCM, obteniendo 15.4 mg (10%) del derivado piridínico.



- **$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3):** δ 1.65 (m, 2H); 2.02 (m, 2H); 2.26 (s, 3H); 2.55 (m, 2H); 5.47 (s, 1H); 5.95 (s, 1H); 7.27 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H); 8.10 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H); 13.15 (s, 1H).

- **Preparación del compuesto Ácido (*E*)-5-(hidroxiimino)-2-((*Z*)-2-hidroxi-1-prop-1-en-1-il)-4-(4-nitrofenil)-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3-carboxílico:**

A 39.9mg (0.113 mmoles) del compuesto **4m**, se añaden 23.56 mg de cloruro de hidroxilamina disueltos en 5.14 mL de agua, 15.75 mg (1,7 equivalentes) de acetato de sodio y 8.20 mL de etanol. La mezcla de reacción fue calentada a reflujo durante 20 horas. A continuación, fue enfriada a temperatura ambiente y el EtOH eliminado. La fase acuosa resultante se extrae varias veces con DCM, las fases orgánicas reunidas se secan sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtran y el disolvente se elimina en el rotavapor. El residuo resultante se purifica por CCP, obteniendo 18.3 mg (40%) de la oxima.



- **¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃):** δ 1.80 (m, 2H); 2.14 (s, 3H); 2.29 (m, 1H); 2.40 (m, 1H); 2.51 (m, 1H); 2.71 (m, 1H); 4.89 (s, 1H); 5.86 (s, 1H); 6.92 (s, 1H); 7.42 (d, *J*= 8.7 Hz, 2H); 8.02 (d, *J*= 8.7 Hz, 2H).

CONCLUSIONES

- Se ha procedido, mediante una síntesis eficiente, a la preparación de 14 hexahidroquinolinas altamente funcionalizadas, con rendimientos moderados.
- Dicha síntesis se ha llevado a cabo mediante una reacción multicomponente a partir de los compuestos 4-hidroxi-6-metil-2-pirona, 3-amino-2-ciclohexen-1-ona y aldehídos aromáticos, heteroaromáticos y alifáticos.
- Las características estructurales de estos compuestos y los estudios de modelización usando la proteína JAK-2 apuntan a esta enzima como una posible diana terapéutica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Delgado A, Minguillón C, Joglar J. Introducción a la química terapéutica. Editorial Díaz de Santos.
2. The Global Cancer Observatory. Organización Mundial de la Salud. Cancer Today. 2019. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/home>
3. Recio C, Guerra B, Estévez-Braun A, Fernando-Pérez L. Signal transducer and activator of transcription (STAT)-5: an opportunity for drug development in oncohematology. *Oncogen*, 38, 4657-4668 (2019).
4. Martín Acosta P. Síntesis dominó en compuestos quinónicos con potencial actividad frente a dianas de interés farmacológico. Tesis Doctoral, Universidad de La Laguna, La Laguna, noviembre 2018.
5. Filella X, Molina R, Ballesta AM. Estructura y función de las citocinas. *Medicina integral*, Elsevier. Enero 2002, volumen 39, pp. 47-88.
6. González Álvarez R, Zamora Rodríguez Z, Alonso Y. Citocinas inflamatorias, sus acciones y efectos en la sepsis y el choque séptico. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 2007, volumen 26, n.4.
7. Valle Mendiola A, Soto Cruz I. Vía JAK-STAT, una visión general. *Vertiente*, Revista especializada en ciencias de la salud, 8(1-2): 14-25, 2005
8. Coskun M, Salem M, Perderson J, Nielsen O. Involvement of JAK/STAT signaling in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Pharmacological Research*, Elsevier. Volume 76, October 2013, pp. 1-8.
9. Harrison D. The JAK/STAT Pathway. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2012 March; 4(3): a011205.
10. Cooper and Hausman, *La célula*. Editorial Marbán libros, 2011, pp. 336-337
11. Ocaña Salceda C. Identificación de nuevos mecanismos patogénicos de la inflamación renal por inhibidores de calcineurina. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, 2015.
12. Lens D. Determinación de la mutación V617F del gen JAK2 en los síndromes mieloproliferativos crónicos en nuestro país: a propósito de un caso. *Revista Médica del Uruguay*, (online). 2007, vol.23, n.2, pp. 122-125.
13. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005 July 9-15; 366(9480):122.
14. Síndromes mieloproliferativos crónicos. Fundación Josep Carreras contra la leucemia. Última actualización marzo 2019. Disponible en: https://www.fcarreras.org/es/sindromes-mieloproliferativos-cronicos_360402
15. AEAL- Asociación Española de afectados por Linfoma. Mielofibrosis, 2019. Disponible en: <http://www.aeal.es/sindromes-mieloproliferativos-espana/4-mielofibrosis/>

16. Hernández-Flórez, D. Valor, L. Protein-kinase inhibitors: a new treatment pathway for autoimmune and inflammatory diseases. *Reumatología Clínica*. Abril 2016, volumen 12, pp 91-99.
17. Álvarez López, A. Búsqueda de alternativas experimentales para reducir costes en el diagnóstico molecular en cáncer. Trabajo Fin de Máster. Universidad de A Coruña, A Coruña, febrero 2016.
18. Quintás-Cardama A, Kantarjian H, Cortes J, Verstovsek S. Janus kinase inhibitors for the treatment of myeloproliferative neoplasias and beyond. *Nature Reviews Drug Discovery* 10, 127-140 (2011).
19. Pesu M, Laurence A, Kishore N. Therapeutic targeting of Janus Kinases. *Immunol Rev.* 2008 June. 223: 132-142.
20. Vargas-Viveros P, Hurtado-Monroy R, Candelaria-Hernández M. Mejoría en la calidad de vida y respuesta sintomática en pacientes con mielofibrosis primaria, mielofibrosis post-policitemia vera y mielofibrosis post-trombocitemia esencial tratados con el inhibidor de JAK1 y JAK2 ruxolitinib. *Medicina Interna de México*, 2013; volumen 29, pp. 363-369.
21. Arenas Cortés A, Ayala Díaz R, Hernández-Campo P. Ruxolitinib in combination with prednisone and nilotinib exhibit synergistic effects in human cells lines and primary cells from myeloproliferative neoplasms. Ferrata Storti Foundation, *Haematologica*, 2019. Volume 104(5): 937-946.
22. Ortíz-Ibáñez K, Alsina M.M, Muñoz-Santos C. Tofacitinib y otros inhibidores de las cinasas en el tratamiento de la psoriasis. *Actas Dermo-sifiliográficas*, mayo 2013, volumen 104, pp. 304-310.
23. Pardanani A, Gotlib J, Jamieson C. Safety and efficacy of TG101348, a selective JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. *Journal of Clinical Oncology*, 2011 Mar 1; 29(7): 789-796.
24. AKALAI, K. Reacciones multicomponentes en la búsqueda de nuevos fármacos. Trabajo fin de grado, Universidad de Sevilla, Sevilla, septiembre 2016
25. Dömbing, A. Multicomponente reactions-superior Chemistry Technology for the new Millennium. *Organic Chemistry Portal (online)*. April 5, 2005.
26. Peña R, Jiménez-Alonso S, Gutiérrez-Ravelo A, Estévez-Braun A. Multicomponet synthesis of antibacterial dihydropyridin and dihidropyran embelin derivates. *J. Org. Chem.* 2013, 78,16,7977-7985.
27. Kielland, N. Desarrollo de nuevas reacciones multicomponentes basadas en la activación de isonitrilos. Aplicaciones en biomedicina. Tesis Doctoral, Universidad de Barcelona, 2011.
28. Morris GM, Lim-Willby M. Molecular docking, PubMed, *Methods Mol Biol.* 2008; 443:365-382.
29. Davis IW, Baker D. RosettaLigand docking with full ligand and receptor flexibility. *Journal of Molecular Biology.* January 2009; volumen 385(2), pp.381-92

