

Derivados de 3-[4-(4-Nitrofenil)Piperazin-1-il]-2-Quinoxalinacarbonitrilo como Posibles Agentes Antileucémicos

María Elena MONTOYA ¹, Yolanda SAINZ ², Miguel Angel ORTEGA ²,
Adela LOPEZ DE CERAIN ² y Antonio MONGE ^{2*}

¹ Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. Perú.

² Centro de Investigación en Farmacobiología Aplicada.
Universidad de Navarra. Pamplona 31080. España.

RESUMEN. Los derivados de quinoxalina son compuestos que presentan un amplio espectro de actividades biológicas y que a la vez ofrecen múltiples posibilidades para su modificación estructural. Dentro de las numerosas actividades demostradas, podemos destacar la acción antitumoral sobre células hipóxicas de 1,4-di-N-óxidos de quinoxalina. Continuando con la búsqueda de nuevos agentes anticancerosos, presentamos los derivados 3-[4-(4-nitrofenil)piperazin-1-il]-2-quinoxalinacarbonitrilos como inhibidores del crecimiento celular de tumores humanos, siendo especialmente selectivos sobre el panel de líneas celulares de leucemia.

SUMMARY. "3-[4-(4-nitrophenil)piperazin-1-il]-2-quinoxalinacarbonitrile derivatives as antileucemic agents". Quinoxaline derivatives are compounds that show a great spectrum of biological activities and offer a great variety of possibilities for its structural modification. We can detail quinoxaline 1,4-di-oxides as new anticancer compounds against hypoxic cells. Now, we report the synthesis of new derivatives, 3-[4-(4-nitrophenil)piperazin-1-il]-2-quinoxalinacarbonitriles. These compounds are cellular growing inhibitors especially over leucemia celular panel.

INTRODUCCION

El amplio espectro de actividades que presentan las quinoxalinas ha motivado un gran interés en su investigación, lo cual puede comprobarse por las innumerables referencias que se encuentran en la bibliografía.

Para nuestro equipo de trabajo, este tipo de compuestos representa una línea de investigación que se ha venido estudiando desde hace años. Hemos trabajado ampliamente con derivados de mono y di-N-óxidos de quinoxalina ¹⁻³, pirazoloquinoxalinas ⁴, oxadiazoloquinoxalinas ⁵ y quinoxalinacarbonitrilos ⁶⁻⁸, entre otros. Se han obtenido resultados especialmente interesantes con 1,4-di-N-óxidos de quinoxalina como agentes antitumorales de acción selectiva sobre células hipóxicas ^{2,3} y recientemente como agentes antituberculosos ^{6,9}.

PALABRAS CLAVE: Anticancerosos, Antileucémicos, Piperazinilquinoxalina, Quinoxalina.

KEY WORDS: Antitumoral, Antileucemic, Piperazinilquinoxaline, Quinoxaline.

* Autor a quien dirigir la correspondencia.

Continuando con la búsqueda de nuevos agentes anticancerosos y en concordancia con el programa de trabajo de nuestro equipo, hemos considerado el diseño, síntesis y evaluación biológica de una nueva serie de compuestos, los 3-(piperazin-1-il)-2-quinoxalinacarbonitrilos como análogos potenciales del metotrexato (MTX), ya que guardan cierta semejanza estructural con este compuesto, perteneciente al grupo de los antifolatos y ampliamente utilizado en el tratamiento de la leucemia linfocítica ^{10, 11}. Además, ya se ha observado que la presencia de 4-(4-nitrofenil)piperazina como sustituyente en dióxidos de quinoxalina tiene una influencia favorable sobre la actividad anticancerosa (resultados no publicados), por lo que ahora pretendemos probar su influencia en la posición 3 del anillo de quinoxalina con o sin sustitución en 6 y/ó 7 y cuyos resultados presentamos como un avance de los trabajos que actualmente estamos realizando.

MATERIAL Y METODOS

Síntesis de derivados de Quinoxalina

La síntesis de los compuestos propuestos se realiza de acuerdo al esquema que muestra la Figura 1. Los compuestos de partida son los benzofuroxanos con o sin sustitución en 5(6) (**1a-1c**), que se obtienen de acuerdo al proceso sintético seguido en nuestro laboratorio ².

Mediante reacción de Beirut entre benzofuroxano, **1a-1c**, y malononitrilo en presencia de trietilamina a baja temperatura (0^o-10 °C) se obtienen 1,4 di-*N*-óxidos de quinoxalinacarbonitrilo ¹, **2a-2c**. En el caso del compuesto **2b**, teóricamente se obtiene una mezcla de 2 isómeros, 6 y 7-sustituidos, siendo uno de ellos mayoritario, que posteriormente se separa mediante cromatografía en columna.

Los di-*N*-óxidos de quinoxalina obtenidos son desoxigenados mediante acción del ditionito sódico que actúa como un potente reductor obteniéndose así los derivados 3-amino-2-quinoxalinacarbonitrilo, **3a-3c**, proceso que ya ha sido descrito anteriormente ⁷.

Los derivados 3-cloro-2-quinoxalinacarbonitrilo, **4a-4c**, se obtienen a partir de **3a-3c** mediante reacción de diazotación bajo control estricto de temperatura (0 °C) ⁶. La purificación de estos compuestos se realiza por cromatografía en columna. En el caso del compuesto **2b**, con esta etapa se consiguen separar los isómeros 6 y 7-sustituidos trabajando posteriormente con la fracción mayoritaria que corresponde al isómero 7-cloro, analizado por cromatografía de alta resolución (CLAR), y descartándose la otra fracción por ser mínima ¹.

A partir de **4a-4c** por reacción con 4-(4-nitrofenil)piperazina en medio de cloroformo y carbonato de potasio y en condiciones anhidras y reductoras se obtienen los derivados 3-[4-(4-nitrofenil)piperazinil-1-il]-2-quinoxalinacarbonitrilo, **5a-5c**. La purificación de estos compuestos requiere, a su vez, separación por cromatografía en columna y posterior recristalización.

Todos los compuestos obtenidos fueron identificados mediante sus constantes físicas (Tabla 1), espectro de infrarrojo (IR), de Resonancia Magnética Nuclear de protón (¹H-RMN), espectro de masas (EM) y microanálisis elemental de C, H, N. En el caso de **4b** se utilizó la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) ⁶.

Los puntos de fusión fueron determinados en un equipo Mettler FP82 + FP80 y no fueron corregidos. Los espectros de infrarrojo fueron registrados en un

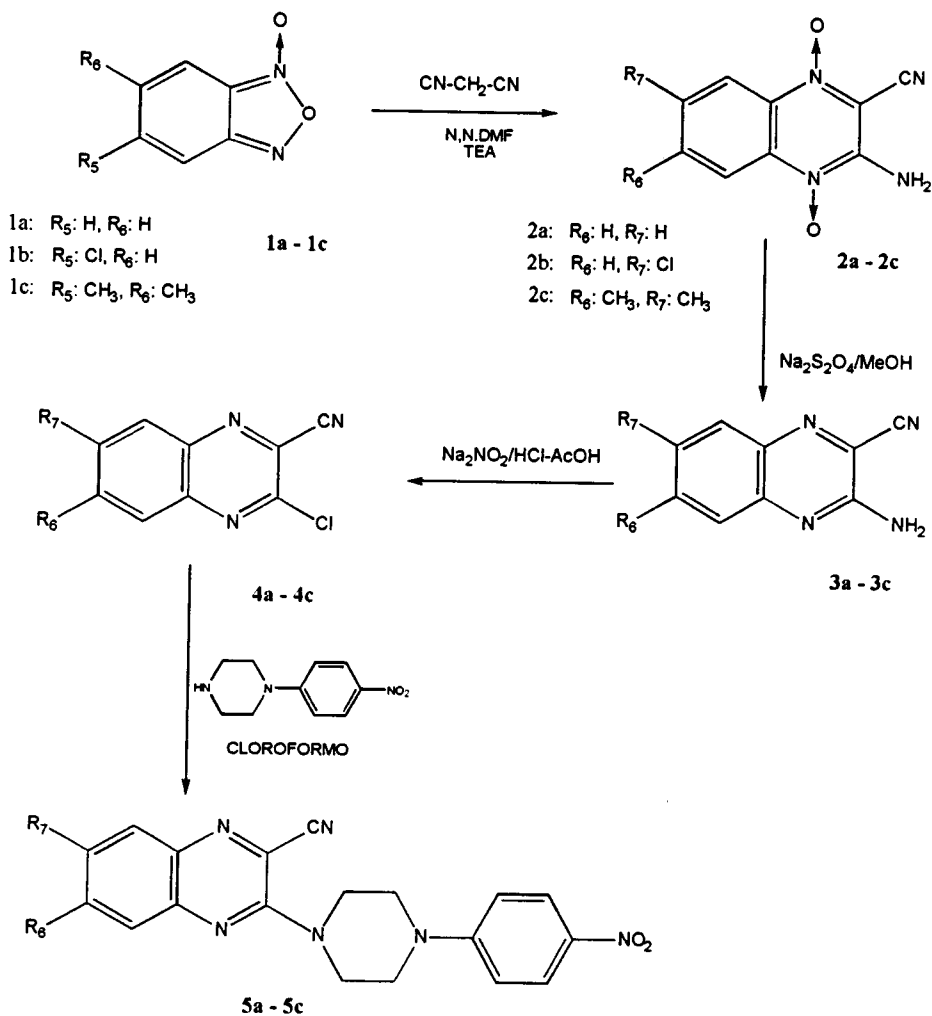
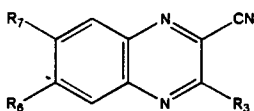


Figura 1. Vía sintética de derivados de 3-[4-(4-nitrofenil)piperazin-1-il]-2-quinoxalinacarbonitrilo



Comp.	R ₃	R ₆	R ₇	Fórmula	P.F. (°C)	Rend. (%)
4c	Cl	CH ₃	CH ₃	C ₁₁ H ₈ ClN ₃	167-170	39,38
5a	NFP	H	H	C ₁₉ H ₁₆ N ₆ O ₂	207-209	64,81
5b	NFP	H	Cl	C ₁₉ H ₁₅ ClN ₆ O ₂	224-226	21,28
5c	NFP	CH ₃	CH ₃	C ₂₁ H ₂₀ N ₆ O ₂	191-193	42,02

Tabla 1. Propiedades físico-químicas de nuevos derivados de quinoxalina. El solvente de cristalización utilizado en todos los casos fue NNDMF/EtOH. *NFP: 4-(4nitrofenil)piperazin-1-il.

espectrofotómetro Perkin Elmer FT-681 en KBr. Los espectros de ^1H -RMN en un espectrómetro BRÜCKER AC-200E con tetrametilsilano como estándar interno y los de masas en un HEWLETT-PACKARD 5988-A a 70 eV. Los análisis elementales se determinaron en un microanalizador CARLO ERBA 1160 sobre muestras desecadas a vacío (a 1-2 mm Hg, P_2O_5 , 60-80 °C), obteniéndose valores $\pm 0,4$ con respecto a los teóricos. La purificación por cromatografía en columna (CC) se realizó en columnas de vidrio de variada longitud y diámetro interno dependiendo de la cantidad de producto a purificar, fueron empaquetadas con sílica gel 60 y eluidas con gradientes crecientes de polaridad de diferentes mezclas de disolventes. El análisis por cromatografía de alta resolución se realizó utilizando un cromatógrafo HPLC WATERS 600E con detector ultravioleta de fotodiodos WATERSTM 996 en una estación de trabajo Millennium versión 2.15.01 de WATERS, con columna Nova-Pack C18 60Å, 4 μm (3,9 x 150), a un flujo de 1 mL/min y con una fase móvil de metanol:agua (80:20).

Evaluación Biológica

La evaluación biológica se realizó para los compuestos **5a**, **5b** y **5c** en colaboración con el National Cancer Institute (NCI) de Bethesda (USA) siguiendo el programa de screening antitumoral orientado *in vitro*, sobre 60 líneas celulares de tumores humanos. La actividad se deduce de las correspondientes curvas concentración-respuesta proporcionada por NCI.

RESULTADOS Y DISCUSION

Síntesis de derivados de Quinoxalina

La síntesis de los compuestos **1a-1c**, **2a-2c**, **3a-3c**, **4a** y **4b** ha sido descrita anteriormente ^{2, 6, 14}.

3-cloro-6,7-dimetil-2-quinoxalinacarbonitrilo (4c). En un baño de hielo y con agitación se mezclan 3-amino-6,7-dimetil-2-quinoxalinacarbonitrilo (7,00 mmol), ácido acético glacial (20 mL) y ácido clorhídrico 35% (25 mL). Se enfría la mezcla a 0 °C y se adiciona gota a gota una disolución recién preparada de nitrito de sodio (Na_2NO_2) (21,00 mmol) en agua (15 mL). Terminada la adición se mantiene la mezcla en reacción durante tres horas manteniendo la temperatura y agitación constante. Se filtra a vacío lavando el residuo con agua helada (0 °C) y se obtiene un sólido amarillo pálido que se cromatografía en columna con una mezcla en gradiente de hexano:tolueno como fase móvil, separándose el producto en la proporción 55:45. Se eliminan los disolventes a vacío obteniéndose un sólido blanco. IR (KBr) (cm^{-1}): 2988 (CH Alifático), 2238 ($\text{C}\equiv\text{N}$), 1544 ($\text{C}=\text{N}$), 1450 (CH_3). ^1H -RMN (DMSO-d_6 200 MHz), δ (ppm): 2,49 (s, 6H, CH_3); 7,89 (s, 1H, H_5); 7,97 (s, 1H, H_8). EM (m/z) (%): 217 (M^+ , 100), 202 (91), 167 (4), 103 (46). ANAL (C, H, N %): Calculado: C:60,70; H:3,70; N:19,30; Hallado: C: 61,08; H: 3,80; N:19,21.

Procedimiento general de síntesis de los derivados 3-[4-(4-nitrofenil)piperazín-1-il]-2-quinoxalinacarbonitrilo 6(7) con o sin sustitución en 6 y/ó 7 (5a-5c). Se mantiene a temperatura ambiente una mezcla del derivado correspondiente 3-cloro-2-quinoxalinacarbonitrilo (1,50 mmol), 4-(4-nitrofenil)-piperazina (5,00 mmol) en cloroformo seco (20 mL) y carbonato de potasio (0,50 g), con agitación constante, protegido de la luz y humedad durante 20 días. Se filtra a vacío lavando el

residuo con cloroformo seco, se reúnen filtrado y lavados, se elimina el disolvente a presión reducida y se obtiene un sólido amarillo que se cromatografía en columna.

3-[4-(4-nitrofenil)-piperazin-1-il]-2-quinoxaltnacarbonitrilo (5a). La fase móvil para CC es una mezcla en gradiente de hexano:diclorometano, el compuesto se separa en la proporción 2:8. Se adiciona carbón activo, se filtra a vacío, se elimina el disolvente a presión reducida y se obtiene un sólido amarillo. IR (KBr) (cm^{-1}): 3070 (CH aromático), 2217 (CN), 1600 (C=N), 1481 (CH_2), 1386 (m, NO_2). $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 200 MHz) δ (ppm): 3,68 (m, 2H, CH_2 piperazina); 3,95 (m, 2H, CH_2 piperazina); 6,89 (d, 2H, $\text{H}_2 + \text{H}_6$, $J = 9,3$ Hz); 7,56 - 7,64 (m, 2H, H_6 , H_7); 7,78 (d, 1H, H_5 , $J = 8$ Hz); 7,98 (d, 1H, H_8 , $J = 8$ Hz); 8,16 (d, 2H, $\text{H}_3 + \text{H}_5$, $J = 9,3$ Hz). EM (m/z) (%): 360 (M^+ , 20), 183 (11), 177 (100), 161 (19). ANAL (C, H, N %): Calculado: C: 63,32; H: 4,47; N: 23,32; Hallado: C: 63,37; H: 4,63; N: 23,05.

7-cloro-3-[4-(4-nitrofenil)piperazin-1-il]-2-quinoxaltnacarbonitrilo (5b). La fase móvil para CC es una mezcla en gradiente de hexano:diclorometano, el compuesto se separa con 0:100. Se adiciona carbón activo, se filtra y se elimina el disolvente a vacío. Se recrystaliza de hexano:cloroformo obteniéndose un sólido amarillo. IR (KBr) (cm^{-1}): 3081 (CH aromático), 2224 $\text{C}\equiv\text{N}$, 1604 (C=N), 1482 (CH_2), 1323 (NO_2). $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 200 MHz) δ (ppm): 3,66 (t, 4H, 2 CH_2 piperazina); 3,95 (t, 4H, 2 CH_2 piperazina); 6,88 (d, 2H, $\text{H}_2 + \text{H}_6$, $J = 9,3$ Hz); 7,70 - 7,74 (m, 2H, H_5 , H_6); 7,97 (s, 1H, H_8); 8,16 (d, 2H, $\text{H}_3 + \text{H}_5$, $J = 9,3$ Hz). EM (m/z) (%), 394 (M^+ , 6), 217 (3), 190 (11), 177 (100). ANAL (C, H, N %): Calculado: C:57,80; H:3,82; N:21,28; Hallado: C: 58,28; H: 3,87; N: 21,43.

6,7-dimetil-3-[4-(4-nitrofenil)piperazin-1-il]-2-quinoxaltnacarbonitrilo (5c). La fase móvil para CC es una mezcla en gradiente de hexano:diclorometano, el compuesto se separa con 0:100. Se adiciona carbón activo, se filtra, se elimina el disolvente con vacío y se recrystaliza de hexano:diclorometano obteniendo un sólido amarillo. IR (KBr) (cm^{-1}): 2920 (CH_2), 2226 $\equiv\text{C(N)}$, 1603 (C=N), 1484 (CH_2), 1431 (CH_3), 1339 (m, NO_2). $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 200 MHz) δ (ppm): 2,38 (s, 3H, CH_3); 2,41 (s, 3H, CH_3) 3,60 (m, 4H, 2 CH_2 piperazina); 3,82 (t, 4H, 2 CH_2 piperazina); 6,83 (d, 2H, $\text{H}_2 + \text{H}_6$, $J = 9,3$ Hz); 7,59 (s, 1H, H_5); 7,71 (s, 1H, H_8); 8,16 (d, 2H, $\text{H}_3 + \text{H}_5$, $J = 9,3$ Hz). EM (m/z) (%) : 388 (M^+ , 18), 211 (100), 177 (93), 161 (73). ANAL (C, H, N %): Calculado: C: 64,93; H: 5,19; N: 21,63; Hallado: C: 64,73; H: 5,19; N: 21,46.

Acción antileucémica

En la Tabla 2 se consignan los valores medios del ensayo de actividad *in vitro* con el panel de líneas celulares de leucemia. Los parámetros correspondientes a IG_{50} , TGI_{50} y LC_{50} se refieren respectivamente, a la concentración del producto en la que se produce el 50% de inhibición del crecimiento, inhibición total del crecimiento y 50% de citotoxicidad (Tabla 2), expresados como punto medio de la gráfica (Mean Graph Midpoints, MG-MID: Promedio de sensibilidad de las líneas celulares frente al compuesto ensayado) ¹³.

Se puede observar que la sensibilidad de las líneas celulares del panel de

Comp.	-Log ₁₀ GI ₅₀	-Log ₁₀ TGI	-Log ₁₀ LC ₅₀
5a	5,28	4,33	4,00
5b	4,00	4,00	4,00
5c	6,06	5,01	4,61

Tabla 2. Valores medios (Mean Graph Midpoint, MG MID) de -Log₁₀ GI₅₀, -Log₁₀ TGI y -Log₁₀ LC₅₀, (Molar) del ensayo de actividad *in vitro* con el panel de líneas celulares de Leucemia. MG-MID: Promedio de sensibilidad de las líneas celulares frente al compuesto ensayado) ¹³.

en porcentaje de inhibición del crecimiento. Puede comprobarse de lo que se deduce que el compuesto **5c** es más activo que **5a** en las 3 concentraciones reportadas y en todas las líneas celulares con que fue evaluado, destacando la mayor actividad y selectividad con células K-562 y Molt-4. De todos modos **5a** presenta resultados interesantes con células Molt-4 y SR. (en ambos casos la concentración es 10⁻⁵ Molar).

En la Figura 2 se comparan las curvas concentración-respuesta de los 3 compuestos observándose que los menores valores de IG₅₀ (< 10⁻⁷ Molar) corresponden al compuesto **5c** con las líneas celulares K-562 y Molt-4. En el caso de **5a** los menores valores de IG₅₀ (≤10⁻⁷ Molar) se obtienen con las líneas celulares SR y Molt-4; asimismo la selectividad por estas líneas celulares es notable. Mientras, el compuesto **5b** presenta porcentajes de inhibición no detectables.

Estructuralmente los compuestos evaluados son similares, sólo se diferencian en la ausencia o presencia de sustituyentes en las posiciones 6 y 7 del anillo de quinoxalina. La ausencia de sustituyentes en estas posiciones conlleva niveles de actividad interesantes. La sustitución en posición 7 por un grupo electroatrayente, como el cloro, implica pérdida de actividad, mientras que la sustitución de ambos

Leucemia es mayor para el compuesto **5c**, en segundo lugar para el compuesto **5a** y en tercer lugar para el compuesto **5b**. De acuerdo a los datos de LC₅₀ el compuesto más activo, **5c**, presenta, a la vez, la mayor citotoxicidad (LC₅₀ = 10^{-4,61} Molar).

En la Tabla 3 se observa la actividad inhibitoria del crecimiento celular de los compuestos **5a**, **5b** y **5c**, a 3 concentraciones de los productos ensayados, 10⁻⁴, 10⁻⁵ y 10⁻⁶ Molar, expresada

Líneas celulares	Concentración								
	10 ⁻⁴ Molar			10 ⁻⁵ Molar			10 ⁻⁶ Molar		
	5a	5b	5c	5a	5b	5c	5a	5b	5c
Leucemia									
CCR-CEM	45	nt	nt	40	nt	nt	22	nt	nt
HL-60(TB)	46	nt	nt	49	nt	nt	44	nt	nt
K-562	01	13	184	72	-	134	77	-	44
MOLT-4	110	09	184	123	-	167	99	-	65
RPMI-8226	38	08	82	19	-	15	26	-	09
SR	89	nt	nt	85	nt	nt	81	nt	nt

Tabla 3. Porcentaje de inhibición del crecimiento del panel de líneas celulares. Leucemia a concentraciones 10⁻⁴, 10⁻⁵ y 10⁻⁶ Molar de **5a**, **5b** y **5c**. nt: no ensayado, (-): no significativo.

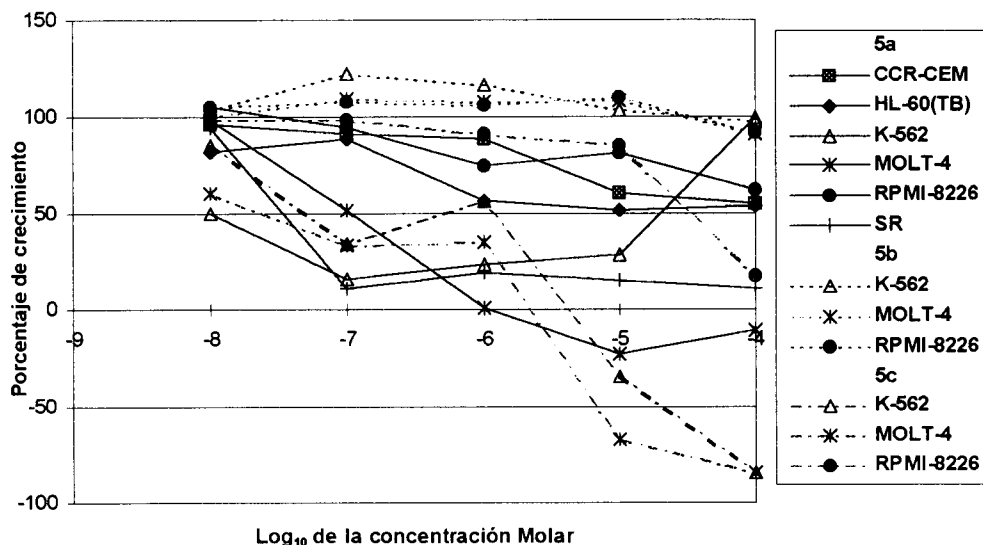


Figura 2. Curva dosis-respuesta del ensayo *in vitro* con el panel celular de Leucemia para los compuestos **5a**, **5b** y **5c**.

hidrógenos, en posiciones 6 y 7, por grupos electrodonantes, como CH₃, parece incrementar los niveles de actividad y selectividad.

Asimismo, se ha observado que la presencia de grupos N-óxidos parece influir favorablemente sobre la actividad, cuestión en la que actualmente estamos efectuando estudios más detallados ¹¹.

De todas las observaciones realizadas hasta el momento, deducimos la importancia de la presencia y del carácter de los sustituyentes en el anillo de quinoxalina para la modulación de la actividad antileucémica en este tipo de compuestos.

Agradecimientos. La evaluación *in vitro* de la actividad anticancerosa de nuestros compuestos, se realizó en colaboración con el National Cancer Institute de Bethesda (USA). M. E. Montoya disfrutó de una Beca pre-doctoral concedida por el Instituto de Cooperación Iberoamericana (ICI). Se ha contado con el apoyo del Programa X.2 de CYTED.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Monge, A., J.A. Palop, P. Oria, A. Fernández & E. Fernández-Alvarez (1989) *An. Quim.* **85**: 98-101
2. Monge, A., J.A. Palop, V. Senador, F.J. Martínez Crespo, Y. Sainz, S. Narro, E. García, C. de Miguel, M. González, E. Hamilton, A. J. Barker, E. D. Clarke & D.T. Greenhow (1995) *J. Med. Chem.* **38**: 1786-92
3. Monge, A., F. Martínez-Crespo, A. López de Cerain, J.A. Palop, S. Narro, V. Senador, A. Marin, Y. Sainz, M. Gonzalez, E. Hamilton & A.J. Barker (1995) *J. Med. Chem* **38**: 4488-94
4. Monge, A., J.A. Palop, A. Ochoa de Retama, I. Urbasos & E. Fernández-Alvarez (1988) *An. Quim.* **84**: 364-6

5. Martínez-Crespo, F., J.A. Palop, Y. Sainz, S. Narro, V. Senador, M. Gonzalez, A. López de Cerain, E. Hamilton, A.J. Barker & A. Monge (1996) *J. Heterocyclic Chem.* **33**: 1671-7
6. Montoya, M.E., Y. Sainz, M.A. Ortega, A. López de Ceráin & A. Monge (1998) *Il Farmaco* (en prensa)
7. Monge, A., J.A. Palop, A. Piñol, F.J. Martiínez-Crespo, S. Narro, M. Gonzalez, Y. Sainz, A. López de Cerain, E. Hamilton & J. Barker (1994) *J. Heterocyclic Chem.* **31**: 1135-9
8. Monge, A., J.A. Palop & J.C. Del Castillo (1994) *J. Heterocyclic Chem.* **31**: 33-8
9. Sainz, Y., M.E. Montoya, F.J. Martínez-Crespo, M.A. Ortega, A. López de Ceráin & A. Monge (1998) *Arzneimittel Forschung* (en prensa)
10. Loriga, M., M.Fiore, P.Sanna & G. Paglietti (1995) *Il Farmaco* **50**: 289-301
11. Loriga, M., S. Piras, P. Sanna & G. Paglietti (1997) *Il Farmaco* **52**: 157-66
12. Montoya, M.E., Y. Sainz, M.A. Ortega, A. López de Ceráin & A. Monge (1998) *Bol. Soc. Química del Perú* (en prensa)
13. Monks, A., D. Scudiero, P. Skehan, R. Shoemaker, K. Paull, D. Vistica, C. Hose, J. Langley, P. Cronise, A. Vaigro-Wolff, M. Gray-Goodrich, H. Campbell, J. Mayo, M. Boyol. (1991) *J. Natl. Cancer Inst.* **83**: 757-66