



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**“Síntesis y evaluación biológica de nuevos derivados de 2-aminoimidazo[1,2-a]piridin-5-ilcetonas como
inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas”**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. Miguel Ángel Martínez Urbina



TUTOR: Dr. Eduardo Díaz Torres

AÑO: 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

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

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

Un reconocimiento especial para el CONACyT (beca No. 162820) y al SNI por el apoyo económico brindado.

Dedicatoria

A mis mayores inspiraciones en esta vida, mi esposa y mi hija.

ÍNDICE		Pag.
	INTRODUCCIÓN	1
	MARCO TEÓRICO	3
1.	El ciclo celular	3
1.1.	Regulación del ciclo celular	5
1.1.1.	Regulación intracelular	5
1.1.1.1.	Punto de restricción	7
1.1.1.2.	Puntos de control	9
1.1.1.2.1.	Primer punto de control	9
1.1.1.2.2.	Fase sin punto de control	10
1.1.1.2.3.	Segundo punto de control	10
1.1.1.2.4.	Tercer punto de control	11
1.1.2.	Control extracelular del ciclo celular	11
2.	APOPTOSIS	13
2.1.	Morfología de la apoptosis	14
2.2.	Mecanismo de la apoptosis	15
3.	CDKs y su desregulación en algunos padecimientos	17
4.	CÁNCER	18
4.1.	Situación actual en la quimioterapia del cáncer	19
5.	INHIBIDORES DE CDKs	22
6.	Imidazo[1, 2a]piridinas	29
6.1.	Métodos de síntesis	29
6.2.	Farmacología	31
6.2.1.	Imidazo[1, 2a]piridinas como inhibidores de CDK's	32

7.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	33
8.	OBJETIVOS	34
9.	HIPOTESIS	34
10.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	35
10.1.	Parte química	35
10.1.1.	Síntesis	35
10.1.1.1.	Síntesis del compuesto 5	36
10.1.1.2.	Síntesis de los compuestos 6a-e	37
10.1.1.3.	Síntesis de los compuestos 11a-c	40
10.1.2	Datos espectroscópicos	45
10.1.2.1.	Características espectroscópicas del compuesto 4	47
10.1.2.2.	Características espectroscópicas compuesto 5	48
10.1.2.3.	Características espectroscópicas del compuesto 6a	49
10.1.2.4.	Características espectroscópicas del compuesto 6b	51
10.1.2.5.	Características espectroscópicas del compuesto 6c	52
10.1.2.6.	Características espectroscópicas del compuesto 6d	54
10.1.2.7.	Características espectroscópicas del compuesto 6e	55
10.1.2.8.	Características espectroscópicas del compuesto 11a	57
10.1.2.9.	E Características espectroscópicas del compuesto 11b	59
10.1.2.10.	Características espectroscópicas del compuesto 11c	60

10.2	Actividades Biológicas	61
10.2.1.	Citotoxicidad	61
10.2.2.	Análisis del ciclo celular	63
10.2.3.	Apoptosis	65
10.2.4.	Inhibición de las actividades enzimáticas de CDK 1 y CDK 2	70
11.	CONCLUSIONES	71
12.	PERSPECTIVAS	72
13.	PROTOCOLO EXPERIMENTAL	73
13.1.	Síntesis	73
13.2	Parte biológica	84
13.2.1.	Cultivo celular y ensayos de citotoxicidad	84
13.2.2.	Análisis del ciclo celular	85
13. 2. 3.	Apoptosis	85
13. 2. 4.	Actividad de CDKs	86
14.	BIBLIOGRAFÍA	87
13.	ANEXOS (artículo publicado)	92

Abreviaturas

AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Apaf	Factor promotor de la apoptosis
APC	Complejo promotor de anafase
ARN	Ácido ribonucleico
ATFA	Anhídrido trifluoroacético
ATP	Trifosfato de adenosina
CAK	Complejo activador de cinasas dependientes de ciclinas, está constituido por la cinasa dependiente de ciclina 7 (Cdk7), la ciclina H y la proteína MAT1
Cl ₅₀	Concentración a la que se inhibe el cincuenta por ciento del crecimiento celular
COSY	Espectroscopía de correlación homonuclear de hidrógeno
CDKs	Cinasas dependientes de ciclinas
Cip/Kip	Inhibidores de amplio espectro que afectan las actividades de las cinasas que dependen de las ciclinas D-, E-, y A. Esta familia incluye a los inhibidores p21 (CIP1), p27 (KIP1), y p57 (KIP2), todos ellos capaces de fijarse no solo a las CDKs, sino también a las diferentes ciclinas
DIPEA	<i>N,N'</i> -Diisopropiletilamina
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
Et ₃ N	Trietilamina
E2F	La familia de proteínas E2F tiene papeles importantes en el control del ciclo celular y funciona como supresora de tumores. Es un factor de transcripción que se regula por unión a Rb
FAK	Cinasa de adhesión focal implicada en procesos celulares de la adherencia y el separación celular
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FL-1	Canal que mide la fluorescencia verde en citometría de flujo
G1	La fase G1 del ciclo celular es el periodo del ciclo celular que abarca desde que termina la fase M hasta el inicio de la fase S
G2	La fase G2 del ciclo celular es el periodo del ciclo celular que abarca desde

	que termina la fase S hasta el inicio de la fase M
GABA	Ácido gamma-aminobutirico
HEPES	Ácido <i>N</i> -2-hidroxietilpiperazina- <i>N'</i> -2'-etanosulfónico
Hz	Hertz
HMBC	Conectividad heteronuclear de enlaces múltiples
HSQC	Coherencia heteronuclear cuántica simple
INK 4	Inhibidores de CDK4, llamados así por su estricta especificidad de acción sobre las subunidades catalíticas CDK4 y CDK6.
IE	Impacto electrónico
<i>i</i> -PrMgCl	Cloruro de isopropilmagnesio
MAPK	Cinasas activadas por mitógenos
MAPK/ERK	Cinasa que participa en la vía de las MAPK
NOESY	Espectroscopía del efecto nuclear de Overhauser
p35	Es un activador específico de las neuronas de CDK5
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
ppm	Partes por millón
RAF	Serina/treonina cinasa, activada por Ras
Ras	Los <i>genes ras</i> codifican proteínas conservadas que pertenecen a una <i>familia</i> extensa de GTPasas
Rb	Proteína del retinoblastoma, impide que una célula se divida en ausencia de los estímulos necesarios.
RMN ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono-13
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear de protón
S	Fase del ciclo celular donde se duplica el ADN
Ser	Serina
THF	Tetrahidrofurano
TMS	Tetrametilsilano
Tre	Treonina
Tris-HCl	Clorhidrato de tris(hidroximetil)aminometano
TUNEL	Del inglés: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
uma	Unidades de masa atómica
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

INTRODUCCIÓN

Las cinasas han llegado a ser uno de los objetivos farmacológicos más estudiados en los últimos años, con aproximadamente 30 subtipos que están siendo analizados a nivel de estudios clínicos de Fase I. La mayoría, están siendo investigados para el tratamiento del cáncer, sin embargo, la desregulación de la función de la cinasas está implicada también en otros desórdenes, tales como, los inmunológicos, neurológicos, metabólicos e infecciosos. Esto ha generado un interés considerable en el desarrollo de moléculas que puedan ser inhibidoras de las cinasas para el tratamiento de estos trastornos. La popularidad actual de las cinasas como blancos farmacológicos está dirigida por la convergencia de varios factores, el primero de ellos es que existen cerca de 518 cinasas codificadas en el genoma humano, virtualmente cada proceso de transducción de señales está ensamblado a través de una cascada de fosforilación, sugiriendo que la inhibición de la actividad de las cinasas puede originar una respuesta fisiológica real; el segundo, a pesar de un alto grado de conservación en el sitio de unión a ATP, es posible desarrollar moléculas altamente selectivas con propiedades farmacéuticas favorables; y el tercero, la inhibición de la actividad de las cinasas en células normales puede ser tolerada, originando una ventana terapéutica para aniquilar selectivamente células tumorales.

Entre las cinasas codificadas en el genoma humano, las cinasas dependientes de ciclinas CDKs han inspirado un interés considerable debido a su participación esencial en el control del ciclo celular. Las CDKs son complejos heterodiméricos compuestos de una subunidad catalítica y una subunidad reguladora o cíclica y comprenden una familia dividida en dos grupos basados en su participación en la regulación del ciclo celular y la regulación transcripcional.

La búsqueda de inhibidores de CDK ha originado el descubrimiento de una familia de aminoimidazo[1,2-*a*]piridinas sustituidas que presentan una alta selectividad hacia las CDK. Al igual que otros inhibidores de cinasas, se ha demostrado que los miembros de esta familia de moléculas interactúan con la CDK 2 en el sitio de unión a la molécula de adenosina-5'-trifosfato (ATP).

En reportes recientes ^{1, 2} fue diseñada una nueva clase de aminoimidazo[1,2-*a*]piridinas altamente selectivas como inhibidores de CDKs, sin embargo, en estos reportes solo se incluyen modificaciones realizadas sobre los sustituyentes en las posiciones 2 y 3 del anillo de imidazo[1,2-*a*]piridina. Pocos reportes existen sobre el cambio de sustituyentes en la posición 6 de este anillo, por lo que resulta interesante hacer un estudio sobre el efecto de diferentes sustituyentes en esta posición.

El presente trabajo evalúa el efecto sobre la actividad biológica del cambio de diferentes sustituyentes en posición 6 del anillo de imidazo[1,2-*a*]piridina. En base a esto, se sintetizó una serie de derivados sustituidos en la posición 6, y los resultados obtenidos contribuirán a incrementar los conocimientos sobre los requerimientos estructurales para que esta clase de compuestos tengan un mayor efecto biológico y puedan aplicarse farmacológicamente para inhibir el ciclo celular con fines terapéuticos.

MARCO TEÓRICO

1. EL CICLO CELULAR

En los metazoos, uno de los eventos cruciales que cada célula proliferante debe sobrepasar es el de continuar con otra ronda más de división celular o salir del ciclo y alcanzar un estado latente. En forma análoga, las células en estado latente deben recibir las señales adecuadas que la lleven a permanecer en su estado no proliferativo o reiniciar el ciclo celular. Durante las etapas tempranas del desarrollo de un organismo, pocas células abandonan el ciclo, pero en un organismo adulto, la mayoría de ellas están en estado latente. Hay que remarcar que solo algunas células especializadas tales como las que componen el sistema hematopoyético o el epitelio del tracto gastrointestinal, mantienen una proliferación activa.³

Las células existentes en cualquier organismo se dividen a través de una serie ordenada de pasos denominados ciclo celular, en el cual, a través de varios procesos, la célula aumenta su tamaño, el número de componentes intracelulares (proteínas y organelos), duplica su material genético y finalmente se divide a través de un mecanismo que asegura la segregación balanceada del material genético duplicado (Figura 1).

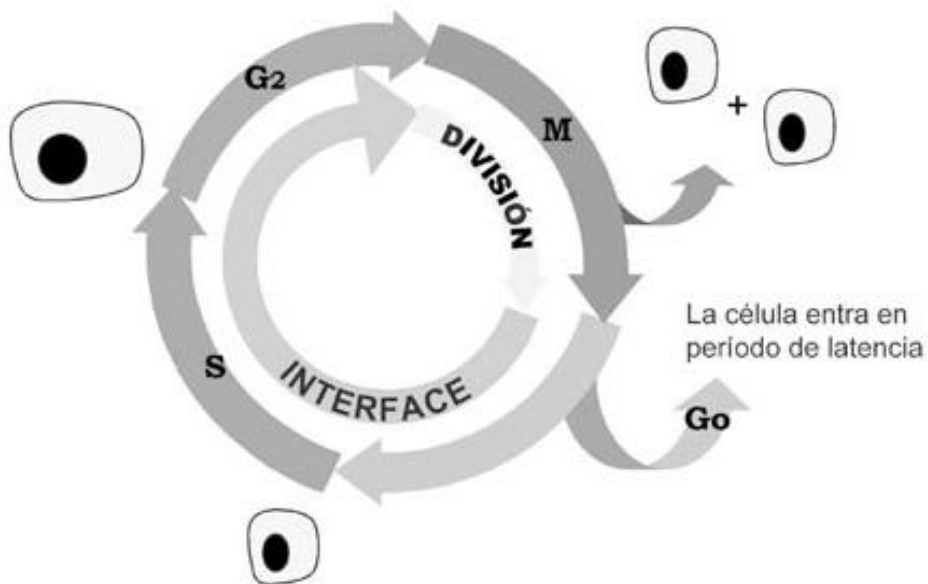


Figura 1. Fases sucesivas del ciclo de una célula eucariota típica.

El ciclo celular se divide en dos fases:

1) **Interfase**, que consta de:

- Fase de síntesis (S): En esta etapa la célula duplica su material genético para transferirle una copia genética completa a cada una de sus células hijas.
- Fases G1 y G2 (intervalos): Entre la fase S y M de cada ciclo hay dos fases denominadas intervalo en las cuales la célula está muy activa metabólicamente, lo cual le permite incrementar su tamaño (aumentando el número de proteínas y organelos), de lo contrario, las células se harían más pequeñas con cada división.

2) **Fase de división o Mitosis (M)**: En esta fase se reparte entre las células hijas el material genético duplicado, a través de un proceso de segregación de los cromosomas. La fase M, para su estudio se divide en:

- Profase: En esta etapa los cromosomas (constituidos de dos cromátidas hermanas) se condensan en el núcleo, mientras en el citoplasma se comienza a ensamblar el huso mitótico entre los centrosomas.
- Metafase: Comienza con el rompimiento de la membrana nuclear, de esta manera los cromosomas se pueden unir al huso mitótico (mediante los cinetocoros). Una vez unidos los cromosomas estos se alinean en la parte media o ecuador de la célula.
- Anafase: Se produce la separación de las cromátidas hermanas, dando lugar a dos cromosomas hijos, los cuales migran hacia polos opuestos de la célula.
- Telofase: En esta etapa, ambos juegos de cromosomas llegan a los polos de la célula y adoptan una estructura menos densa, posteriormente se forma nuevamente la envoltura nuclear. Al finalizar esta fase, la división del citoplasma y sus contenidos comienza con la formación de un anillo contráctil.
- Citocinesis: Finalmente, la célula se divide mediante la constricción del anillo contráctil de actina y miosina, produciendo dos células hijas, cada una con un juego completo de cromosomas.

Cuando ya no se requieren más células, estas entran en un estado denominado G0, en el cual abandonan el ciclo celular y entran en un periodo de latencia, lo cual no significa que entren en reposo ya que éstas células presentan un metabolismo activo. Si estas

células reciben el estímulo adecuado, abandonan el estado G₀ y entran al G₁. Algunas poblaciones celulares altamente especializadas como las fibras musculares o neuronas al entrar en estado G₀ abandonan indefinidamente el ciclo celular.

1.1. Regulación del ciclo celular

El conjunto de procesos que ocurren durante el ciclo celular se rigen por un orden y supervisión estrictos. Señales provenientes del medio y algunos controladores dentro de la célula, se encargan de dirigir el progreso de esta a través de las distintas fases del ciclo celular. De esta manera, hay una regulación extracelular y una regulación intracelular.⁴

1.1.1. Regulación intracelular

El control interno del ciclo celular está a cargo de proteínas, cuyas acciones podrían resumirse en series de activaciones e inhibiciones sobre otras proteínas, que son indispensables durante las fases del ciclo (Figura 2). Los principales participantes en esta regulación son dos: i) las proteínas que permiten el progreso del ciclo, (complejos CDK-ciclina) y ii) las proteínas CIP e INK4 que las inhiben.⁵

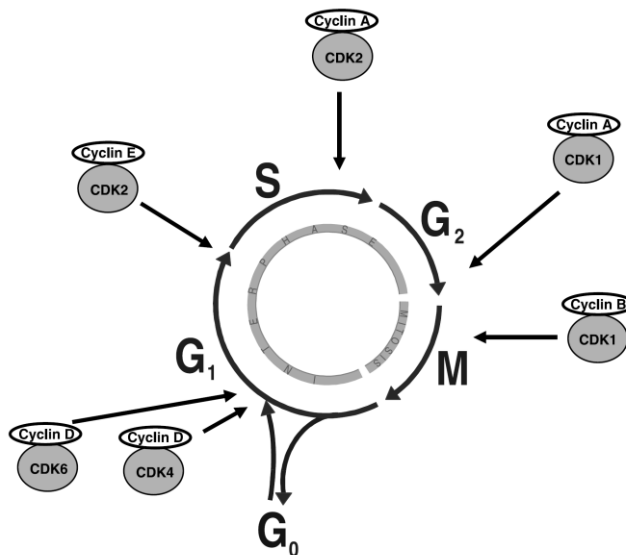


Figura 2. Las fases del ciclo celular y la actividad regulatoria de los complejos CDK-ciclina.

En el primer proceso (i), las CDKs son reguladas por fosforilación positiva gobernada por la cinasa activadora de CDKs (CAK) formada por el complejo CDK 7-ciclina H-MAT1.⁶

Los complejos CDK-ciclina están compuestos por dos tipos de proteínas, las CDK (cinasa dependiente de ciclina) y las ciclinas, llamadas así porque pasan por un ciclo de síntesis y degradación.

Las cinasas dependientes de ciclinas (CDKs) son complejos heterodiméricos formados por una subunidad catalítica o cinasa y una subunidad regulatoria o ciclina y comprenden una familia dividida en dos grupos basados en su función sobre la regulación del ciclo celular y su función transcripcional.^{7, 8} Los miembros del primer grupo regulan el ciclo celular e incluyen a las CDK 4 y CDK 6 con sus subunidades reguladoras las ciclinas D 1, 2 y 3, así como a los complejos CDK 2-ciclina E, los cuales secuencialmente fosforilan la proteína de retinoblastoma (Rb), para facilitar la transición G1 S.⁹ Las CDK 2 y CDK 1 junto con la ciclina A y los complejos CDK 1-ciclina B, son requeridos para la progresión ordenada a través de la fase S y la transición G2 M, respectivamente.¹⁰

Se conocen al menos 12 CDKs y 20 ciclinas (A-T),⁵ las CDKs fosforilan aminoácidos específicos de algunas proteínas (Ser, Tre), pero esto ocurre sólo si están unidas a una ciclina. Se conocen nueve distintas combinaciones de CDK-ciclina¹¹ que actúan en tiempos específicos durante el ciclo (Figura 2).

Para el proceso de regulación se sabe que las células sintetizan proteínas inhibitoras de los complejos CDK-ciclinas, que colaboran en el control del ciclo celular. Estas proteínas se han agrupado en dos grupos: a) las proteínas INK4 (inhibidoras de cinasa 4) y b) las CIP (proteínas inhibitoras de CDKs). Las INK4 (p15, p16, p18 y p19) se unen a CDK 4 y CDK 6 e inhiben sus actividades de cinasas al interferir con su asociación con ciclinas tipo D.¹² Los miembros de la familia CIP se unen e inhiben a todos los complejos que contengan CDK 1, CDK 2, CDK 4 y CDK 6;¹³ actualmente se conocen dentro de esta familia a las proteínas p21, p27 y p57.

Las proteínas INK4 y CIP, llamadas en conjunto inhibidores de CDK (CKI), así como algunos factores de transcripción (como el p53) tienen la función de impedir la proliferación celular fisiológicamente o cuando existe un estrés.¹² La mutación de los genes que las codifican

y/o la pérdida de función de estas proteínas, resulta en la pérdida de control sobre el ciclo celular y la incapacidad para detenerlo, originando una proliferación celular incontrolada.¹⁴

Estas proteínas actúan con diferentes intervalos de tiempo, ya sea permitiendo o inhibiendo el progreso adecuado del ciclo celular. Esta capacidad de orden, se debe principalmente a que las proteínas que no se utilizan (ciclinas), son eliminadas por un complejo enzimático de degradación llamado proteasoma que está acoplado a un sistema de marcaje de proteínas por ubiquitinación.

El paso por cada una de las fases del ciclo celular, está perfectamente regulado por los complejos CDK-ciclinas y sus inhibidores, así como por otras proteínas adicionales. Además, para el control del ciclo celular, se conocen cuatro puntos en los que se inspecciona a la célula y al medio extracelular para dar lugar o restringir las acciones propias de cada una de las fases del ciclo.¹⁵ Estos cuatro puntos son: un punto de restricción y tres puntos de control.³

1.1.1.1. Punto de restricción

El punto de restricción se encuentra casi al final de G1, se le conoce con ese nombre debido a que si la célula lo ignora, se encontrará “comprometida” irreversiblemente a entrar al ciclo celular, independientemente de lo que suceda en el exterior.¹⁶ Este punto, está controlado principalmente por el medio externo y dependiendo de los factores (mitógenos) presentes en él, la célula se comprometerá o no, a completar el ciclo celular. La señal de los mitógenos del exterior a través de la vía Ras/Raf/MAPK origina que la célula produzca ciclina D.³ La proteína de susceptibilidad a retinoblastoma, Rb, juega un papel relevante en la transición G1 S.¹⁷ En su estado fosforilado, Rb previene la progresión de G1 a S mediante su interacción con los miembros de la familia de transcripción E2F. Esta interacción no solamente bloquea la activación transcripcional de E2F, sino que también reprime activamente la transcripción capturando desacetilasas de histona y enviándola hacia los promotores de genes requeridos para la entrada a la fase S.¹⁸ Durante la progresión del ciclo celular, Rb es inactivado por fosforilación secuencial mediada por los complejos CDK 4-ciclina D, CDK 6-ciclina D y CDK 2-ciclina E.¹⁹ En respuesta a un estímulo mitogénico, las células sintetizan ciclinas tipo D que se unen con CDK 4 y CDK 6, un proceso que requiere la contribución de un miembro de la familia

Cip/Kip. Aunque los miembros de la familia Cip/Kip promueven la actividad de las cinasas dependientes de ciclina D, también son potentes inhibidores de CDK 2.¹² Por lo tanto, las cinasas dependientes de ciclina D facilitan la progresión de G1 primeramente fosforilando Rb, liberando la represión transcripcional por los complejos Rb-E2F y secuestrando proteínas Cip/Kip, facilitando la activación de CDK 2-ciclina E. La fosforilación de Rb inducida por CDK 2-ciclina E interrumpe la unión de Rb a E2F, permitiendo con esto, la activación de E2F y la transcripción de genes necesarios para la entrada y progresión de la fase S (Figura 3), incluyendo a los genes que codifican para la ciclina E por si mismos.²⁰ La inactivación de Rb es mantenida a lo largo del ciclo por la concentración de distintos complejos CDK-ciclina, una vez que las ciclinas se degradan, la proteína Rb es de nuevo activa y une al E2F.⁶

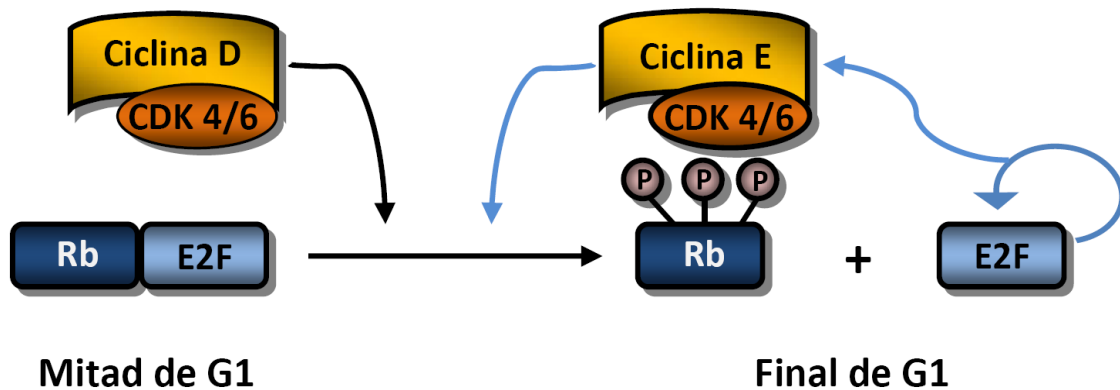


Figura 3. Punto de restricción. La estimulación de células en fase G0 con mitógenos induce la expresión de CDK 4, CDK 6, ciclinas tipo D y los factores de transcripción E2F. La proteína Rb inicialmente inhibe la actividad de E2F. Cuando la señal de los mitógenos es sostenida, los complejos CDK 4-ciclina D y CDK 6-ciclina D comienzan a fosforilar a Rb, liberando a E2F, el cual estimula la transcripción de genes que codifican para ciclina E, CDK 2 y E2F (autoestimulación). Los complejos CDK 4-ciclina E fosforilan más Rb, resultando en un ciclo de retroalimentación positiva (flechas azules) que origina un incremento rápido en la expresión y actividad de E2F Y CDK 2-ciclina E.

El paso por este punto es también regulado por la p16 (INK4), que se encarga de inhibir a los complejos CDK 4-ciclina D y CDK 6-ciclina D. La p16 inhibe la unión de la CDK con la ciclina y se interpone entre ellos haciéndolos inactivos. Esto es debido a que el E2F no se puede liberar y en consecuencia no se pasa el punto de restricción.¹² La acción de la p16 tiene que ver con el

medio extracelular, pues se sabe que si no existen suficientes señales del exterior (mitógenos, factores de crecimiento, nutrientes, etc.) p16 y p27 tienden a acumularse, por lo que se hacen muy activos.¹² La fosfoproteína p27 es una CIP, y su importancia radica en que no sólo se encarga de suprimir la actividad de los complejos CDK-ciclinas activos en los primeros dos puntos de control, sino que además, ayuda a retirar a la célula del ciclo celular llevándola a G₀.²¹

1.1.1.2. Puntos de control

Los puntos de control son “retenes” donde se revisan distintas características del medio y de la célula misma. La célula debe estar sana y el medio debe tener los suficientes indicadores para que continúe el ciclo celular,³ pero además de ello, los controladores implicados en estos puntos tienen la capacidad de “llamar” a otros participantes a reparar, cuando por ejemplo, el material genético está dañado, o bien a terminar procesos incompletos.⁴

1.1.1.2.1. Primer punto de control

El primer punto de control se efectúa justo después del punto de restricción y aún en la fase G₁. El primer control se encarga de: 1) revisar las condiciones del medio, buscando factores externos que induzcan el progreso del ciclo celular, 2) revisar que la célula haya crecido lo suficiente y 3) que el material genético esté intacto. La búsqueda de factores externos es muy importante, ya que estimulan la síntesis de proteínas como algunas CDKs y ciclinas. Sin estas, la continuación y el control del ciclo celular serían imposibles.⁴ El complejo CDK 2-ciclina E participa en este punto, que como los otros implicados en el punto de restricción está a cargo de inactivar a Rb y así favorecer la activación de E2F para que estén listas las enzimas necesarias para comenzar la síntesis de ADN en la fase S.²² Los encargados de la inhibición en este punto de control son el factor de transcripción p53 y la CIP p21. La p53 es uno de los más conocidos supresores de tumores y usualmente se encuentra en la célula; es muy inestable en condiciones normales debido a que se encuentra unido a otra proteína llamada Mdm2, que funciona como un “marcador” para que la p53 sea ubiquitinada y se degrade en el proteasoma. Si existe una alteración en el ADN, se activan distintas enzimas para “separar” la p53 de su “marcador”, una

mayor concentración de p53 estimula la síntesis de p21 (CIP) que se une a CDK 2 y ciclina E, inhibiendo la acción del complejo y la célula entonces no puede entrar a la fase S.^{23, 24}

1.1.1.2.2. Fase sin punto de control

La fase S no tiene como tal un punto de control, aún cuando algunos autores los consideran; sin embargo, es indispensable la presencia del complejo CDK 2-ciclina A para que la síntesis de ADN se lleve a cabo. Durante la fase S, el ADN se replica, y para ello es necesario que se arme la “maquinaria” específica, dentro de ella hay un conjunto de proteínas conocido como complejo de reconocimiento del origen de replicación del ADN u ORC que reconocen secuencias bien definidas de bases en el ADN llamadas orígenes de replicación. Durante la fase G1 se forma el ORC, tras el cual otras proteínas (como Cdc6 y Mcm) se unen para formar el complejo de pre-replicación (pre-RC).^{25, 26} El complejo CDK 2-ciclina A se encarga de deshacerse de las proteínas del pre-RC y de unir las enzimas necesarias para la replicación (como la ADN polimerasa). Así se asegura que la “maquinaria” de replicación no vuelva a activarse hasta que se haya terminado el ciclo y la replicación ocurra una sola vez por cada ciclo.²⁷

1.1.1.2.3. Segundo punto de control

El segundo punto de control se encuentra al final de la fase G2. Los complejos CDK 1-ciclina A y ciclina B permiten el paso de la célula a través de este punto; en conjunto, la actividad de estos dos complejos se denominó Factor Promotor de la Mitosis (FPM). A grandes rasgos, el segundo punto de control se encarga de revisar: 1) que el material genético se haya duplicado completamente, 2) que el material genético no tenga errores y 3) que el medio extracelular sea el adecuado.

Se sabe que una vez activado el complejo CDK-ciclina, éste se encargará de llevar a cabo tareas indispensables durante las primeras subfases de la mitosis. En resumen, los complejos CDK 1-ciclina A y ciclina B, se encargan de inducir el ensamble del huso mitótico y en parte también de asegurarse de que los cromosomas se unan a éste. Se encargan además, de iniciar la condensación del material genético, activando un grupo de proteínas conocidas como condensinas, de desensamblar la envoltura nuclear, fosforilando las láminas nucleares, de

armar nuevamente el citoesqueleto celular y de la reorganización del aparato de Golgi y el retículo endoplasmático. En este punto actúa también la p53, que como ya se mencionó, detecta alteraciones en el ADN y desencadena la activación de la CIP p21 encargada de la inhibición de cualquier complejo CDK 1, CDK 2, CDK 4 y CDK 6-ciclina.

Por otro lado, las cohesinas son proteínas requeridas para mantener unidas a las cromátidas hermanas y es durante la anafase cuando las cromátides se separan. Para que esto suceda es necesaria la actividad de varios complejos proteicos, el principal de éstos es el complejo promotor de la anafase (APC). Este complejo es activado por la unión de una proteína semejante a una CDK, llamada Cdc20 (Cdc= ciclo de división celular), el cual una vez activado, se encarga de marcar por ubiquitinación a diversas proteínas para que se degraden, una de ellas es la securina, que inactiva a la separasa.^{28, 29} Esta separasa es la enzima encargada de inactivar a las cohesinas eliminando las uniones entre las cromátides hermanas.

1.1.1.2.4. Tercer punto de control

Este último punto de control se encuentra en la fase M, entre la metafase y la anafase y se encarga de revisar que todos los cromosomas se hayan unido al huso mitótico y si detecta que uno de los cinetocoros no se encuentra unido, manda una señal negativa al sistema de control bloqueando la activación de proteínas implicadas en la separación de las cromátidas hermanas. Específicamente inactiva al conjunto APC-Cdc20, lo que inhibe la liberación de la separasa, impidiendo que las cromátides hermanas se separen hasta que la señal desaparezca.

1.1.2. Control extracelular del ciclo celular

La forma y el tamaño de un organismo están definidos por el crecimiento celular, la muerte celular y la proliferación celular. Esta última es el resultado del ciclo celular que como se mencionó anteriormente, está regulado por mediadores intracelulares (CDK-ciclinas). Cabe señalar que la entrada al ciclo celular no es un proceso autónomo de la célula, sino que se requiere de la activación de estas vías (ciclinas-CDK), a través de la señalización mediante factores solubles de naturaleza proteica denominados mitógenos. De esta manera las células en organismos multicelulares proliferan sólo cuando se requieren más células. La mayoría de los

mitógenos controlan la tasa de división celular actuando en la fase G1; liberan el control negativo del ciclo celular permitiendo el acceso a la fase S. Actúan uniéndose a receptores de membrana con actividad de tirosina-quinasas los cuales activan a la proteína G monomérica Ras cambiándola de su estado unido a GDP por GTP; esta activación desencadena una cascada de fosforilaciones a través de las proteínas MAPK (quinasas activadas por mitógenos). A su vez estas proteínas MAPK transmiten el estímulo a diversas moléculas efectoras tales como cinasas de proteínas o factores de transcripción. Esta cascada de fosforilaciones ocasiona la transcripción de genes tempranos (entre los que destacan los que codifican a las ciclinas de G1), algunos de estos genes a su vez activan la transcripción de otros genes denominados genes tardíos. De esta manera, la vía de señalización Ras-MAPK transmite señales extracelulares al núcleo activando la maquinaria del ciclo celular. Muchos tipos celulares como los fibroblastos o las células epiteliales, requieren de adhesión a sustratos de la matriz extracelular (fibronectina o laminina), para crecer y proliferar en función de las señales dependiendo de los medios adecuados. Este requerimiento se debe a que la unión de moléculas de matriz extracelular a integrinas (moléculas receptoras de matriz en la membrana celular, las cuales están unidas al citoesqueleto) activan otras vías de señalización requeridas para entrar al ciclo celular, mediadas también por la activación de otras cinasas (FAK, cinasa de adhesión focal).

Las células de mamífero no se dividen infinitamente, muchas células se dividen un número limitado de veces antes de diferenciarse en células altamente especializadas. Por ejemplo, los fibroblastos humanos en un medio de cultivo estándar se dividen entre 25 y 50 veces y hacia el final la proliferación disminuye su ritmo y finalmente se detiene. A este fenómeno se le ha denominado senescencia replicativa. La figura 4 resume algunos de los puntos principales de regulación del ciclo celular en células eucariontes.

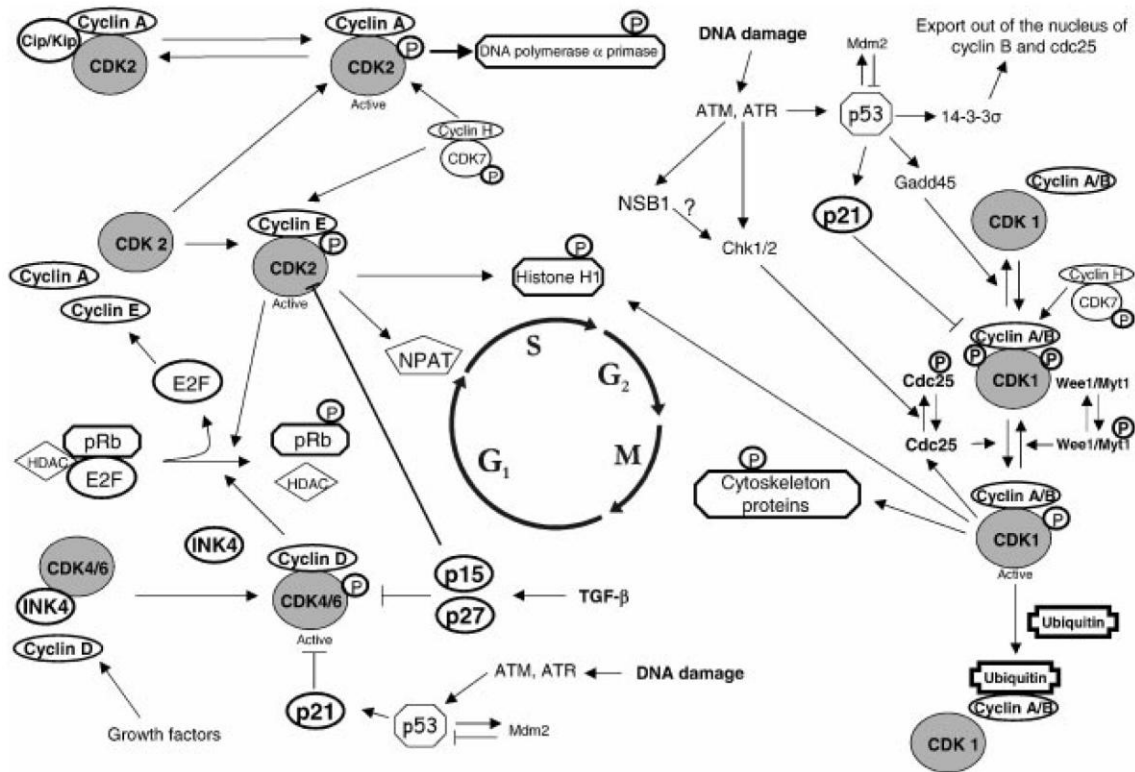


Figura 4. Visión esquemática de algunos pasos esenciales en la regulación del ciclo celular.

2. APOPTOSIS

Los animales multicelulares tienen la necesidad de eliminar células que se encuentran en exceso o que son potencialmente peligrosas; para esto, las células utilizan un programa molecular enfocado a esta tarea. Tan importante como la división y la migración celular, la apoptosis permite a un organismo mantener la homeostasis controlando el número de células y el tamaño del tejido.³⁰ La apoptosis también se presenta como un mecanismo de defensa en reacciones inmunes o cuando las células son dañadas por algún padecimiento o agentes nocivos.³¹ La apoptosis es un proceso genéticamente controlado, cuya ocurrencia requiere tanto de síntesis de ATP como de síntesis de proteínas además del mantenimiento del potencial de membrana,³² aunque hay una amplia variedad de estímulos y condiciones (fisiológicos o patológicos) que pueden estimular la apoptosis, no todas las células necesariamente mueren en respuesta al mismo estímulo. En algunos casos el tipo y grado de estímulo es el que determina

el tipo de muerte que ocurre. Si el daño es severo o el estímulo es prolongado, incapacitando funciones celulares esenciales, el proceso ordenado de la apoptosis puede no ocurrir, de manera que una forma de muerte lítica se presenta; esta forma de muerte es denominada necrosis.³² Los procesos de apoptosis y necrosis pueden ocurrir independientemente, secuencialmente, o bien simultáneamente.^{33, 34}

2.1. Morfología de la apoptosis

Los primeros en describir dos distintos tipos de muerte fueron Kerr, Willie y Currie en 1972,³⁵ al analizar morfológicamente células que morían en diferentes circunstancias.

El uso de las técnicas de microscopía ha ayudado a la identificación de los cambios morfológicos que ocurren durante la apoptosis.³⁶ Uno de los primeros eventos de dicho proceso es la deshidratación celular, originando la condensación del citoplasma, y como resultado se presenta un cambio en el volumen y tamaño de la célula provocando su encogimiento. Otra alteración, quizá la más característica de la apoptosis, es la condensación de la cromatina nuclear, esta condensación comienza en la periferia nuclear y la cromatina condensada a menudo aparece como una figura cóncava como media luna o herradura. El ADN en la cromatina condensada (picnotica) exhibe hipercromía, tiñéndose fuertemente con colorantes.³⁵ La envoltura nuclear se desintegra y las proteínas laminares sufren degradación proteolítica, seguida por fragmentación nuclear (*karyorrhexis*). La activación de endonucleasas que preferentemente rompen el ADN entre los nucleosomas, es otro evento característico de la apoptosis.^{37, 38} Los fragmentos nucleares, junto con los constituyentes del citoplasma (incluyendo organelos intactos), son empacados y cubiertos por fragmentos de la membrana plasmática. Estas estructuras, llamadas cuerpos apoptóticos, son entonces desprendidas de la célula. Cuando la apoptosis ocurre in vivo, los cuerpos apoptóticos son fagocitados por las células vecinas, incluyendo las de origen epitelial o fibroblastos, sin que se produzca reacción inflamatoria en el tejido.^{39, 40}

2.2. Mecanismo de la apoptosis

Los mecanismos de la apoptosis son altamente complejos y sofisticados, involucrando una gran cantidad de eventos moleculares dependientes de energía (Figura 5). A la fecha, se sabe que existen dos vías apoptóticas principales: la vía de los receptores de muerte y la vía mitocondrial. Se sabe que las dos vías trabajan unidas y que las moléculas en una vía pueden influenciar a la otra.⁴¹ Existe una vía adicional que involucra citotoxicidad mediada por células-T con destrucción de las células dependientes de perforina y granzima. La vía de la perforina y granzima puede inducir apoptosis por medio de la granzima A o la granzima B. Todas estas vías, a excepción de la de la granzima A, convergen en la misma vía terminal o de ejecución. Esta vía es iniciada por el procesamiento de la procaspasa-3 y resulta en la activación de endonucleasas y la fragmentación del ADN, con la degradación del citoesqueleto y de las proteínas nucleares, así como entrecruzamiento de proteínas, formación de cuerpos apoptóticos, expresión de ligandos para receptores celulares fagocíticos y finalmente fagocitosis.⁴² La vía de la granzima A activa una vía de muerte celular paralela independiente de caspasas con daño al ADN en una sola hebra.⁴³

Para que todos los cambios morfológicos antes mencionados se lleven a cabo al desencadenarse la apoptosis, es necesario que estos procesos bioquímicos sean inducidos por efectores de muerte, tales como proteasas, las cuales pueden originar la fragmentación nuclear y celular. Antes de la activación de estas vías efectoras de muerte, el equilibrio de vida y muerte de la célula es modulada por la interacción de activadores de muerte. Así, cuando el balance se inclina hacia la muerte, los efectores inician el desensamble de los componentes celulares sistemáticamente.⁴⁴

La maquinaria intracelular de la apoptosis depende de una familia de proteasas llamadas caspasas, que cortan a la proteína objetivo en los residuos de ácido aspártico. Las caspasas se encuentran en las células en forma de zimógenos inactivos (procaspasas), y son activados por un corte proteolítico, estos a su vez activan otras procaspasas en una cascada de amplificaciones.⁴⁵ A la fecha 10 caspasas principales han sido ampliamente identificadas y se han clasificado en grupos conocidos como a) iniciadoras (caspasa 2, 8, 9 y 10), b) efectoras (caspasas 3, 6 y 7) y c) inflamatorias (caspasas 1, 4 y 5).^{46, 47}

Las caspasas tienen la propiedad de fragmentar algunas proteínas clave en la célula, como la laminina, que al romperse desintegra la membrana nuclear además las caspasas degradan a la enzima que inactiva a la ADNasa ocasionando la fragmentación del material genético, generalmente en fragmentos de ADN de entre 180 a 200 pares de bases.⁴⁸ Una “escalera de ADN” característica puede ser visualizada fácilmente por medio de electroforesis en gel de agarosa con una tinción con bromuro de etidio e iluminación ultravioleta.

Otra característica bioquímica de la apoptosis es la expresión de marcadores celulares de superficie que resultan en el reconocimiento fagocítico prematuro de células apoptóticas por células adyacentes, permitiendo una rápida fagocitosis con un daño mínimo hacia el tejido circundante. Este reconocimiento es logrado por el movimiento de la fosfatidilserina, que normalmente se encuentra en el interior de la membrana lipídica, hacia el exterior de la membrana plasmática.⁴⁹

El inicio de la apoptosis es semejante al inicio de un nuevo ciclo celular que se resume como un “todo o nada”, donde una célula que ha iniciado este proceso ya no puede detenerse. El mecanismo propuesto de la activación de estas procaspasas gira alrededor de proteínas adaptadoras que juntan múltiples caspasas en un agregado y en este agregado las caspasas se activan entre sí mediante una pequeña actividad de proteasa basal. En un periodo muy corto de tiempo estas caspasas activas desencadenan la cascada de activación, amplificando la señal de muerte.

Las señales de muerte pueden originarse a dos niveles: en algunas células se puede inducir apoptosis presentando el ligando de Fas en su membrana (vía extrínseca), el cual se une a un receptor de muerte (Fas) en la superficie celular de la célula diana, el agregado de Fas y su ligando recluta a los adaptadores que unen y activan a la procaspasa 8.^{50, 51} La célula también en respuesta a daño o estrés puede activar la apoptosis (vía intrínseca). Por ejemplo un daño severo al DNA puede inducir esta vía mediante la p53, la cual activa la transcripción de genes que codifican para proteínas que promueven la liberación del citocromo C de la mitocondria. En el citoplasma se une al factor promotor de la apoptosis 1 (Apaf1) el cual agrega y activa a la procaspasa 9.^{52, 53, 54}

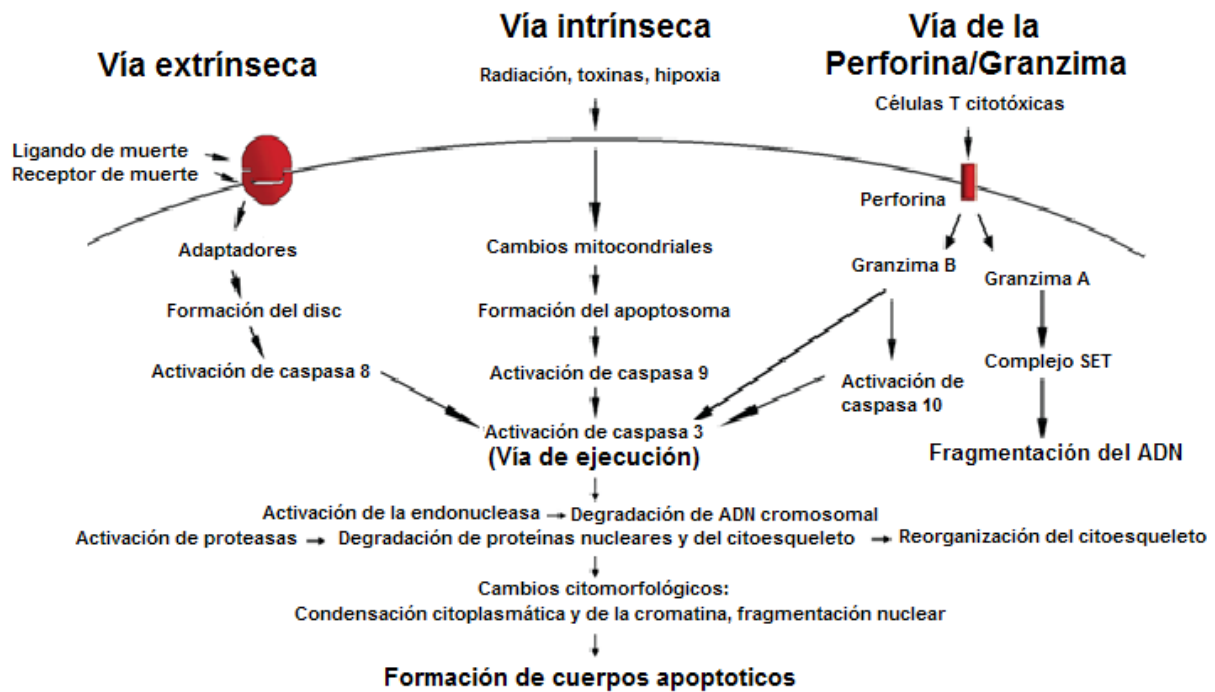


Figura 5. Integración de las tres vías de iniciación de apoptosis

3. LAS CDKs Y SU DESREGULACION EN ALGUNOS PADECIMIENTOS

La fosforilación de residuos de serina, treonina y tirosina representa uno de los mecanismos postraduccionales más comunes usados por las células para regular sus proteínas enzimáticas y estructurales. Entre las 518 proteín-cinasas existentes,⁵⁵ las cinasas dependientes de ciclinas (CDKs) son de un interés considerable debido a su participación en el control del ciclo celular,³ en la fisiología neuronal,⁵⁶ así mismo son importantes en las vías de señalización del dolor,⁵⁷ en la apoptosis^{58,59} y en la transcripción y empalme del ARN.^{60,61}

Las alteraciones en la fosforilación de proteínas frecuentemente se asocian con diversos padecimientos humanos; por lo cual ha crecido exponencialmente la inversión en el descubrimiento, optimización y evaluación terapéutica de inhibidores farmacéuticos de proteína cinasas, especialmente aquellos de bajo peso molecular.^{62,63,64} Se estima que de los programas de investigación enfocados al descubrimiento de fármacos en la industria farmacéutica, actualmente de 30 al 35 % están relacionados con una proteína cinasa. Hasta el

día de hoy, aproximadamente 55 inhibidores de cinasas se encuentran en evaluación clínica contra padecimientos tales como cáncer, inflamación, diabetes y neurodegeneración.⁶⁴

Las anomalías en la actividad y regulación de las CDKs en diferentes tipos de cáncer,⁶⁵ en infecciones virales,^{66, 67} en padecimientos renales,⁶⁸ y en desordenes neurodegenerativos tales como Alzheimer's,⁶⁹ Parkinson's^{70, 71} y Nieman-Pick's,⁷² isquemia^{73, 74} o daño cerebral por trauma⁷⁵ han estimulado la búsqueda intensiva de inhibidores farmacológicos potentes y selectivos de esas cinasas.^{76, 77, 78, 79} Cerca de cien inhibidores farmacológicos de CDKs han sido caracterizados, muchos de ellos parecen actuar por competencia directa con ATP para su unión al sitio catalítico de la cinasa. Aproximadamente 30 de esos compuestos han sido co-cristalizados con CDK 2⁸⁰ y/o CDK 5,⁸¹ demostrando su asociación en el sitio de unión a ATP de estas CDKs.

4. CÁNCER

El cáncer es una enfermedad en la cual los mecanismos de regulación de la proliferación celular están fuera de control, es decir, las células presentan un desorden en el control de su crecimiento y diferenciación.⁸²

El desarrollo de este padecimiento comienza con la alteración genética de una célula dentro de un tejido. Esta mutación permite una proliferación acelerada de la célula y forma una hiperplasia o displasia. Esta última lleva a la formación de un tumor, que puede permanecer localizado en su sitio de origen o invadir tejidos circundantes resultando en el fenómeno conocido como metástasis.^{83, 84, 85}

El cáncer puede ser inducido por efectos específicos de factores ambientales, o bien relacionado con el hábito de fumar y la dieta, teniendo amplia participación los antecedentes genéticos. En otros tipos de cáncer como el cáncer de mama o de próstata se involucran también las hormonas siendo el factor genético el factor de riesgo más poderoso que el estilo de vida. Dos clases de genes son los que tienen mayor injerencia en el origen del cáncer. Por un lado los protooncogenes fomentan el crecimiento tumoral, mientras que los genes supresores tumorales lo inhiben. La acción coordinada de esas dos clases de genes, normalmente regulan

la proliferación de la célula; sin embargo, cuando mutan, los oncogenes promueven una división celular excesiva, mientras que los genes supresores tumorales fallan en bloquear el mecanismo de división.^{86, 87} El desarrollo tumoral es un proceso de múltiples pasos que requiere de una acumulación de mutaciones sobre estos genes.

Las CDKs a menudo se observan sobreactivadas en el cáncer, debido a varios eventos genéticos y epigenéticos que afectan sus vías de regulación. El efecto general de esta sobreactivación es la pérdida de la integridad de los puntos de control del ciclo celular, originando una proliferación celular descontrolada.⁸⁸ Por lo tanto, la inhibición selectiva de las CDKs podría limitar la progresión de una célula tumoral a través de su ciclo y facilitar la inducción de vías apoptóticas.⁸⁹

Las modificaciones en la función de inhibidores naturales de CDK también son comunes en tumores humanos. La proteína p27 esta frecuentemente expresada de una forma aberrante en cáncer de mama, mientras que por otra parte concentraciones bajas de p27 son asociadas con tumores más agresivos.⁹⁰ De la misma forma un decremento en la expresión de p57 es reportada en cánceres de vejiga⁹¹ y la disminución de p15 y p16 o bien su inactivación por metilación, está ligada a la patogénesis de melanomas humanos, linfomas, mesoteliomas y cáncer pancreático.⁹²

En general se ha observado que las alteraciones en los genes y proteínas que regulan la progresión del ciclo celular está directamente relacionada con la mayoría de los diferentes tipos de cáncer pero paradójicamente este punto de desregulación a últimas fechas ha sido motivo de estudio para encontrar nuevas moléculas que mediante su interacción con estas proteínas y genes, eventualmente lleven a las células a su muerte y que puedan selectivamente diferenciar entre las células normales y las tumorales.

4.1. Situación actual en la quimioterapia del cáncer

La oncología tiene uno de los más pobres registros de fármacos en desarrollo clínico, con porcentajes de éxito que son tres veces más lentos que aquellos observados para padecimientos cardiovasculares.⁹³

Existen cerca de 200 fármacos aprobados contra el cáncer con cientos más en desarrollo y representan un amplio número de mecanismos y modalidades de acción.⁹⁴ Por muchas décadas, el descubrimiento de fármacos se enfocó en agentes que bloqueaban funciones esenciales destruyendo células en división, los tradicionales citotóxicos. Esos fármacos incluyen compuestos con efectos pleyotróficos, tales como los agentes que modifican el ADN (por ejemplo, cisplatino). También existen fármacos que interfieren precisamente con procesos fisiológicos definidos tales como la polimerización de los microtúbulos (por ejemplo, taxol); síntesis de metabolitos (por ejemplo, metotrexato) y la topología cromosomal (por ejemplo, irinotecan). Una excepción al enfoque histórico de hacer mella en funciones esenciales, son las terapias anti hormonales tales como los moduladores sobre los receptores a estrógenos (por ejemplo, tamoxifen) e inhibidores de la aromatasa (por ejemplo, letrozol). Los anti hormonales afectan actividades que son clasificadas como no esenciales, porque esas funciones están relacionadas a la proliferación de tejidos normales especializados que pueden ser poco importantes, por ejemplo el epitelio de mama.⁹⁴

Recientemente, nuevos compuestos sobresalen y algunos de estos compuestos se unen a proteínas que son esenciales para las células y, por lo tanto, no son distinguidos fácilmente de los compuestos citotóxicos tradicionales. Estos agentes incluyen aquellos que presentan efectos en la división celular mediante nuevas formas de acción (por ejemplo, inhibidores de Auroracinasas e inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas). También como sucede en otros procesos tal como la interconversión de proteínas (por ejemplo, bortezomib) y modificaciones de la cromatina como los inhibidores de histona-desacetilasa.^{95, 96, 97} Esos nuevos fármacos razonablemente podrían ser nombrados como neocitotóxicos y atraen el interés debido a la posibilidad de interferir con diferentes mecanismos bioquímicos. En algunos casos, una amplia gama terapéutica podría ser lograda al refinar la selectividad de los compuestos, de tal manera que ellos permitan inhibir funciones celulares esenciales y ser efectivos solo en los miembros de una familia de proteínas que sean prominentes en los tumores.

Otros compuestos de bajo peso molecular desarrollados recientemente inhiben elementos en vías de señalización clave, mayormente cinasas, las cuales podrían no ser

esenciales en células adultas normales. De esta forma ofrecen una propuesta para la terapia del cáncer que es, en principio, distinta de la tradicional y de los neocitotóxicos. El imatinib es el prototipo para esta clase de nuevos fármacos contra el cáncer. Debido a que el objetivo contra el cual fue diseñado es la cinasa de Aleson (ABL), activada en la leucemia mieloide crónica (LMC) por una translocación cromosomal, la cual crea una dependencia única sobre esta cinasa específica. Esta es la razón por la que el imatinib es altamente efectivo en LMC y es bien tolerado cuando se usa en una terapia crónica.⁹⁸

De todos los cambios en la medicina, ninguno ha tenido un comienzo más controversial y ninguno ha experimentado una pelea más dura que el tratamiento y cura del cáncer. Aunque el proceso neoplásico ha sido reconocido por siglos, poco fue lo conocido acerca del mecanismo biológico de transformación y progresión tumoral hasta el advenimiento de la medicina molecular en la última mitad del siglo veinte. Antes de 1950, la terapia permaneció limitada a la cirugía. La terapia con radiación se convirtió en una herramienta invaluable para el tratamiento de este padecimiento después de 1960 con la invención del acelerador lineal; pero al igual que la cirugía, no podía erradicar el cáncer metastásico. Los fármacos, las moléculas biológicas y la terapia inmunomediada han venido siendo por lo tanto el enfoque principal de los esfuerzos actuales para curar el cáncer. Desde los primeros experimentos con mostazas nitrogenadas hace 60 años a los actuales intentos para desarrollar fármacos contra objetivos específicos en células tumorales, los investigadores de múltiples disciplinas han unido esfuerzos en la búsqueda de fármacos más efectivos. Con el tiempo, el desarrollo de las terapias anticáncer, basadas en un principio en observaciones empíricas, ha venido incrementándose dependiendo del entendimiento de la biología de los tumores en los humanos.

Mientras los intentos para mejorar el ritmo de descubrimiento de agentes citotóxicos continuaron hasta finales de 1980, los enfoques moleculares y genéticos para entender la biología celular revelaron nuevas redes de señalización que regulan actividades celulares fundamentales, tales como proliferación y supervivencia. Se encontró que muchas de esas redes estaban radicalmente alteradas en las células tumorales. Con el comportamiento de las compañías farmacéuticas intentando reparar esos defectos moleculares, comenzó la era de la

“terapia dirigida”. Los nuevos objetivos incluyen factores de crecimiento, moléculas de señalización, proteínas del ciclo celular, moduladores de la apoptosis y moléculas que promueven angiogénesis.⁹⁹ A principios de 1990, el desarrollo de fármacos contra el cáncer se transformó de una investigación apoyada por el gobierno y con bajo presupuesto a una industria multimillonaria con grandes intereses.¹⁰⁰

5. INHIBIDORES DE CDKS

El valor terapéutico de acertar sobre los miembros de la familia de las CDKs ha sido estudiado intensamente y particularmente para las CDKs involucradas en la interfase (CDK 2, CDK 4 y CDK 5); la CDK 1 también ha emergido como un nuevo objetivo potencial. Otras CDKs, las cuales no están involucradas en el ciclo celular, tienen funciones específicas sobre procesos particulares en diferentes tipos celulares, sin embargo, su uso potencial como objetivos terapéuticos para el cáncer permanece aún sin ser plenamente investigado. Por ejemplo se ha mostrado que la CDK 5 interviene en el control de la motilidad celular y sobre el efecto metastásico en el cáncer de próstata.¹⁰¹

La CDK 7, es un componente del complejo activador de CDKs y es necesaria para el ensamble del heterodímero CDK 1-ciclina B.¹⁰² Esta cinasa pertenece a un segundo grupo de CDKs, que también comprende a las conocidas como CDK 8, CDK 9, CDK 10 y CDK 11, las cuales están involucradas en la regulación de la transcripción.⁸⁸ En contraste con las ciclinas del ciclo celular, cuyos niveles fluctúan con la progresión del ciclo, las ciclinas (ciclinas tipo H, C y T) que se asocian con las CDKs de la transcripción tienen niveles de expresión constante a través de las distintas fases del ciclo. Por ejemplo, actuando por fosforilación de la ARN polimerasa II, el complejo CDK 9-ciclina T estabiliza la elongación de los transcritos nacientes de ARNm y tiene una importancia crucial en varios procesos biológicos como el crecimiento celular, así como en la proliferación y la diferenciación.¹⁰³ Varios inhibidores de CDKs no específicos que compiten con el ATP son altamente activos contra CDK 9 y posiblemente contra otras CDKs relacionadas con la transcripción, solo que no han sido evaluadas exhaustivamente. La inactivación de estas CDKs tiene un impacto general en la transcripción celular, afectando primariamente la

acumulación de transcriptos de ARNm que presentan un recambio rápido, tales como aquellos que codifican para los reguladores del ciclo celular, el factor nuclear- $\kappa\beta$, transcriptos de respuesta a p53 y factores antiapoptóticos. Consecuentemente, todos los compuestos que inhiban CDKs transcripcionales, podrían poseer actividad anticancerosa al aumentar las respuestas apoptóticas en células de cáncer, particularmente en células hematopoyéticas tumorales en las cuales la supervivencia depende de la expresión continua de proteínas antiapoptóticas.¹⁰⁴ Sin embargo, hay que remarcar que dichos compuestos podrían tener efectos tóxicos en células no tumorales debido a la desregulación de factores celulares cruciales y con esto limitar la aplicación terapéutica de inhibidores de CDKs de amplio espectro.⁸⁹

En las últimas dos décadas ha habido una intensa búsqueda de moléculas que hagan mella en las CDKs; sin embargo, hasta el día de hoy, ningún inhibidor de CDKs ha sido aprobado aún para su venta. Los compuestos de primera generación como aquellos que poseen una amplia especificidad conocidos como pan-Inhibidores (flavopiridol, olomucina y R-roscovitina) (Figura 5), no cumplieron las expectativas después de los estudios preclínicos, exhibiendo al final baja actividad y/o toxicidad en las fases clínicas.¹⁰⁴ Esto podría reflejar la existencia de una falla en el proceso para identificar los objetivos moleculares clave o bien proteínas fuera de objetivo de los inhibidores y/o una falla para optimizar el plan de dosificación y la farmacocinética.

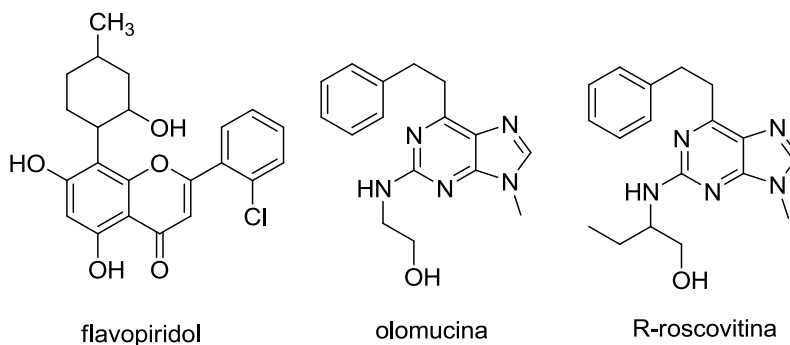


Figura 5. Inhibidores de CDKs de primera generación (pan-inhibidores).

A pesar de la amplia diversidad química que presentan los inhibidores de CDKs, estos tienen algunas propiedades en común:

- 1) Tienen bajos pesos moleculares (<600).
- 2) Son heterociclos planos hidrofóbicos.
- 3) Actúan al competir con el ATP por su sitio de unión en la correspondiente cinasa.
- 4) Se unen mayoritariamente por interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno con la correspondiente cinasa.

Varias estrategias pueden ser consideradas para modular la actividad de CDKs. Las cuales están divididas en: 1) las que buscan directamente inhibir la subunidad catalítica de las CDKs y 2) las que buscan inhibir indirectamente a las CDKs mediante una perturbación en las vías que regulan la actividad de estas.¹⁰⁵

Los compuestos que directamente hacen mella en la subunidad catalítica de las CDKs son los inhibidores químicos (moléculas pequeñas); muchos de esos compuestos modulan la actividad de las CDKs al interactuar específicamente con su sitio de unión a ATP.^{105, 106, 107, 108} Algunos ejemplos de esta primera clase son: el flavopiridol, roscovitina, aminotiazol, UCN-01 y la alsteropaulona.

Con respecto a la segunda clase, son compuestos que se caracterizan por alterar las vías regulatorias de la actividad de las CDKs : afectan la expresión y síntesis de de las subunidades de CDK-Ciclina y también a las proteínas que las inhiben, modulan la fosforilación de las CDKs, perturban a la cinasa activadora de CDKs (CAK), cdc25 y wee1/mytl o bien manipulan la maquinaria proteolítica que regula el catabolismo de los complejos CDK-cilina y sus reguladores,^{105, 109} como ejemplos de esta clase se tienen a la perifosina y el UCN-01 entre otros (Figura 6).

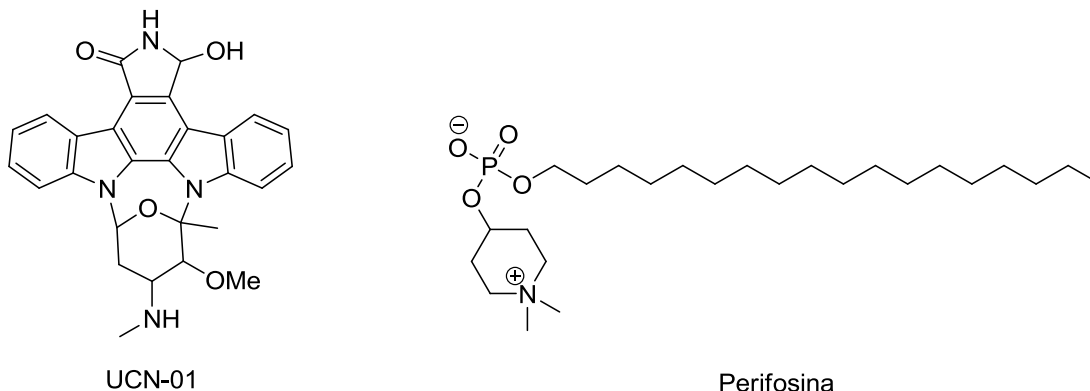


Figura 6. Compuestos inhibidores de CDKs de segunda generación.

Recientemente, un inhibidor de CDKs de segunda generación (SNS-032, Figura 7) mostró sensibilizar células no pequeñas de carcinoma de pulmón resistentes a radiación ionizante.¹¹⁰ La actividad inhibitoria de esta molécula hacia CDKs no relacionadas con el ciclo celular (CDK 7 y CDK 9) ha sido sugerida como el mecanismo que fundamenta la modulación de la reparación de la fragmentación de la doble hebra del ADN por parte de este compuesto.¹¹⁰ El SNS-032 actualmente está en estudios clínicos de fase I como un agente intravenoso. La bioviabilidad de este compuesto es limitada debido a una pobre absorción resultado de su expulsión celular mediada por glicoproteína P. Una serie de derivados han sido sintetizados y estos poseen una permeabilidad mejorada con bajos niveles de expulsión in vitro.^{111, 112}

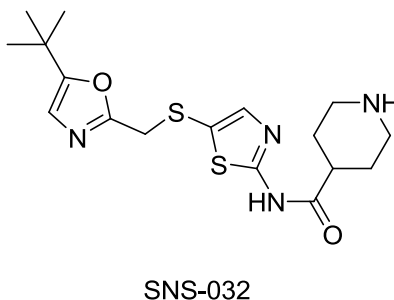
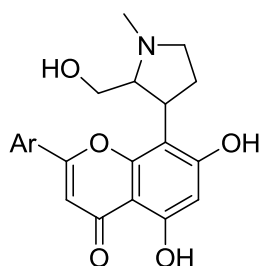


Figura 7. Estructura del compuesto SNS-032, un inhibidor de CDKs de segunda generación.

En la actualidad una nueva generación de inhibidores de CDKs se encuentra en evaluaciones clínicas. La flavona sintética P276-00 (Figura 8) pertenece a la misma clase química del flavopiridol, posee una selectividad superior hacia CDKs, particularmente hacia CDK 4-ciclina D1, CDK 1-ciclina B y CDK 9-ciclina T1, mostrando además una actividad antiproliferativa de dos

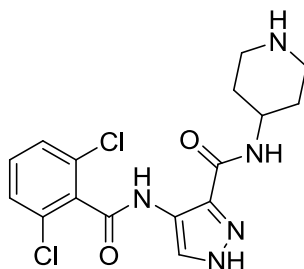
a tres veces mayor en células tumorales.¹⁰³ Este compuesto baja los niveles celulares de ciclina D1, un efecto que podría depender de la inhibición de la actividad transcripcional de CDK 9.¹⁰³ Este compuesto se encuentra actualmente en fase clínica I-II para el tratamiento de mieloma múltiple, linfoma de células del manto y melanoma las cuales se caracterizan por sobreexpresión de ciclina D.



P276-00

Figura 8. Estructura de la flavona sintética P276-00

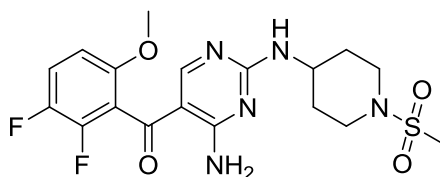
La pirazol 3-carboxamida AT7519 (Figura 9) es otro pan-inhibidor que actualmente se encuentra en ensayos de fase clínica I en pacientes con tumores sólidos avanzados o linfoma de no-Hodkin refractivo. El compuesto AT7519 mostró preferencia por la CDK 2 pero es altamente activo también contra CDK 9 y CDK 5. Las pruebas preclínicas mostraron que este compuesto tiene actividad antiproliferativa a concentraciones submicromolares en numerosas líneas celulares y esta actividad fue independiente del estatus de p53 y RB1, además tiene una muy reducida actividad en fibroblastos. Por otra parte este compuesto también promueve regresión tumoral en modelos de xenógrafos de cáncer de colon.¹¹⁴



AT7519

Figura 9. Estructura de la pirazol 3-carboximida AT7519.

La diaminopiridina R547 (Figura 10) es un potente inhibidor de CDK 1, CDK 2, CDK 4, CDK 7 y CDK 9, con actividad antitumoral promisorio en estudios preclínicos.¹¹⁵ Se ha confirmado que el compuesto R547 inhibe la fosforilación de RB1, muestra actividad antitumoral, adicionalmente, se han determinado sus efectos adversos y su dosis tolerable.¹¹⁶



R547

Figura 10. Estructura de la diaminopiridina R547.

Otro candidato es el ZK 304709, un inhibidor del crecimiento tumoral de amplio espectro vía oral que actualmente se encuentra en estudios de Fase I. En estudios enzimáticos este compuesto bloquea varias CDKs (CDK 1, CDK 2, CDK 4, CDK 7 y CDK 9) y también tirosina cinasas involucradas en la angiogénesis [el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 1 (VEGFR1), VEGFR2, VEGFR3 y el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas], todos a concentraciones nanomolares.¹¹⁷ En modelos de tumores pancreáticos en ratones, el ZK 304709 indujo efectos consistentes con la inhibición de CDKs (arresto del ciclo celular en G2 y apoptosis) y causó una reducción en la densidad de microvasos tumorales, lo que resultó en una reducción de un 80 % del crecimiento en tumores primarios.¹¹⁸

La familia de purinas 2,6,9-trisustituidas, la cual incluye a la R-roscovitina¹¹⁹ y los inhibidores de segunda generación purvalanol A¹²⁰ y NU6140,¹²¹ han sido objeto de una intensa exploración con el fin de identificar nuevos análogos sintéticos con una actividad superior. Los análogos de R-roscovitina recientemente sintetizados, incluyen a la pirazolotriazina N-&N1 y el derivado de purina CR8 (Figura 11).¹²² Aunque ambas moléculas muestran selectividad contra CDK 1, CDK 2, CDK 5, CDK 7 y CDK 9 y actividad similar in vitro a la de su compuesto antecesor, CR8 fue de 25 a 50 veces más potente que la R-roscovitina para inducir apoptosis en 25 líneas

celulares¹²³ y N-&-N1 fue dos veces más potente como inhibidor del crecimiento tumoral in vivo.¹²⁴

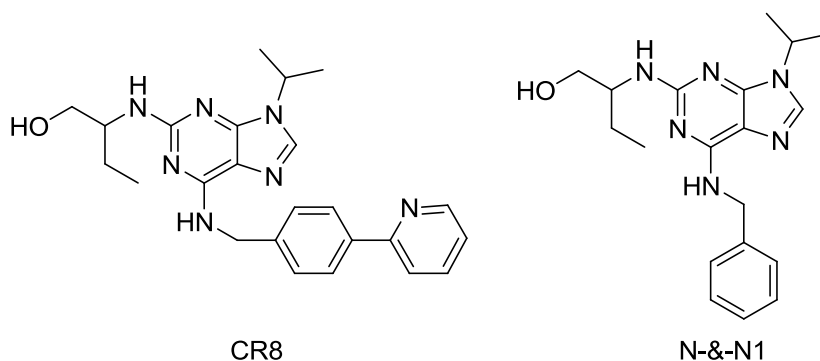


Figura 11. Análogos de la R-roscovitina

Otros inhibidores de CDKs de amplio espectro que se encuentran en evaluación preclínica avanzada y han mostrado actividad antitumoral en modelos animales incluyen a la tiazolourea CDKi-277,¹²⁵ así como un derivado de indenopirazol RGB-286199¹²⁶ y la triazol diamina acil-sustituída JNJ-7706621.¹²⁷

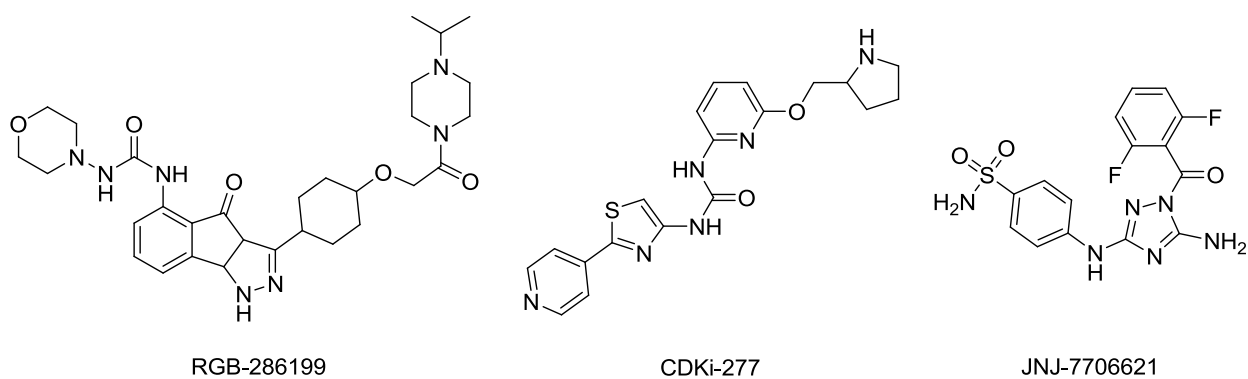


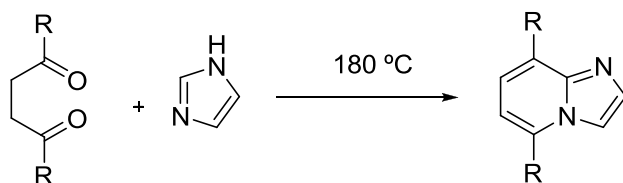
Figura 12. Estructura de inhibidores de CDKs de amplio espectro en evaluación preclínica.

6. IMIDAZO[1,2-*a*]PIRIDINAS

6.1. Métodos de síntesis.

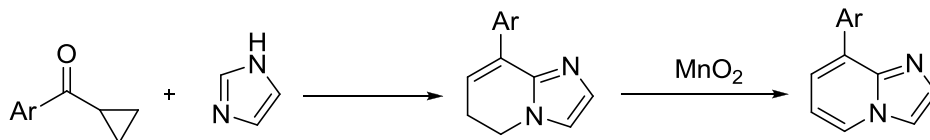
El anillo de imidazo[1,2-*a*]piridina fue descrito por primera vez en 1925 por Chichibabin.¹²⁸ Durante mucho tiempo este tipo de estructura fue de poco interés debido a que se carecía de métodos de síntesis eficientes para agregar grupos funcionales a este sistema, no obstante en décadas recientes muchos trabajos fueron reportados sobre las síntesis, propiedades físicas y reactividad de este tipo de estructuras.

Existe una gran cantidad de métodos para la síntesis del anillo de imidazo[1,2-*a*]piridina y uno de los más antiguos consiste en la condensación térmica del imidazol con compuestos 1,4-dicarbonílicos (Esquema 1).¹²⁹



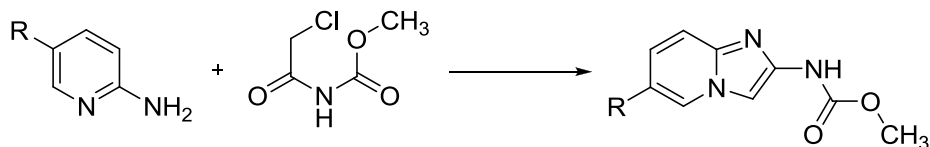
Esquema 1. Condensación térmica del imidazol con compuestos 1,4-dicarbonílicos.

En otro método, la 3-metilimidazo[1,2-*a*]piridina fue preparada sometiendo la 2-aminopiridina a reflujo en ácido fórmico.¹³⁰ Por otro lado, el imidazol puede ser convertido a 8-aryl-5,6-dihidroimidazo[1,2-*a*]piridinas al hacer reaccionar una 4-halobutirofenona con ciclopropil(aryl)cetonas seguida de la oxidación con dióxido de manganeso (Esquema 2).¹³⁰



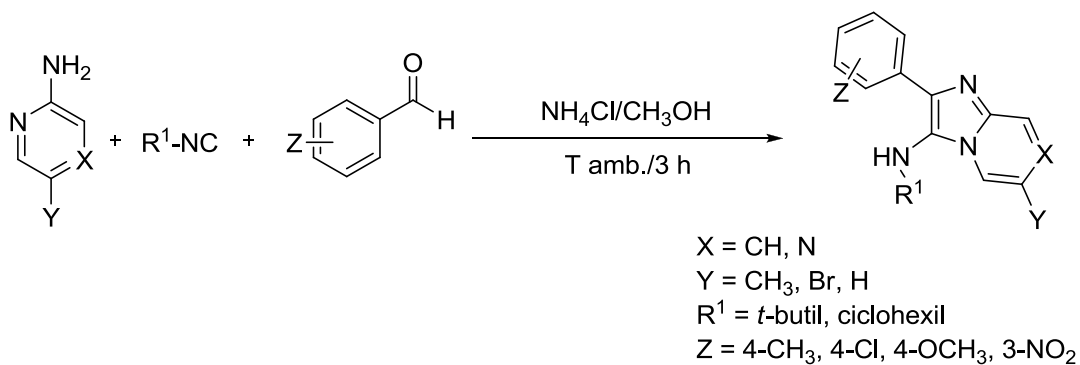
Esquema 2. Formación de 8-aryl-imidazopyridinas a partir de imidazol

Algunos imidazopiridin-2-carbamatos sustituidos en la posición 6, han sido sintetizados al hacer reaccionar la correspondiente 2-aminopiridina con metil-*N*-(cloroacetil)carbamato (Esquema 3).¹³¹



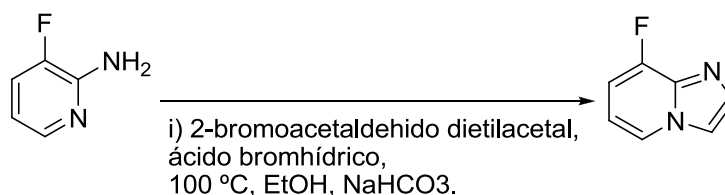
Esquema 3. Imidazo[1,2-*a*]piridin-2-carbamatos

Recientemente, fue reportada la síntesis en un solo paso de imidazo[1,2a]piridinas mediante la condensación de 2-aminopiridina con aldehídos e isonitrilos, catalizada con cloruro de amonio a temperatura ambiente (Esquema 4).¹³²



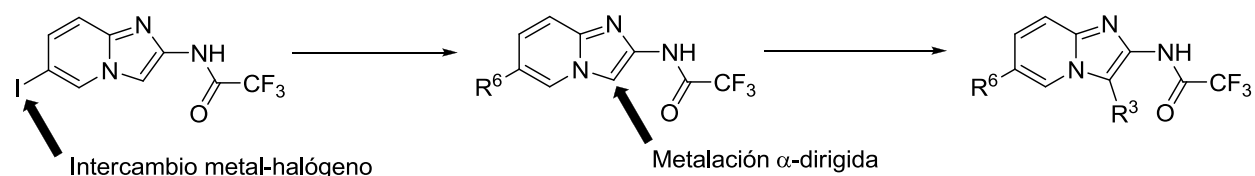
Esquema 4. Síntesis de imidazo[1,2-*a*]piridinas catalizada con cloruro de amonio

Sin embargo, el método de elección para la síntesis de la mayoría de las imidazo[1,2-*a*]piridinas es la condensación de 2-aminopiridina y un compuesto α -halocarbonílico. Un ejemplo de ello, es la síntesis de 8-fluoroimidazopiridinas al hacer reaccionar 2-aminopiridina con bromoacetaldehído, utilizado como su dietil o dimetil acetal (Esquema 5).¹³³



Esquema 5. Síntesis de 8-fluoroimidazo[1,2-*a*]piridina.

En la actualidad, la preparación sencilla del anillo de imidazo[1,2-*a*]piridina, su buena estabilidad, el reciente desarrollo de nuevos métodos sintéticos, además del progreso en la química catalizada por metales han permitido un mayor acceso a nuevos derivados con una gran variedad de grupos funcionales. Jaramillo y colaboradores,¹ reportaron la síntesis regioselectiva de 2-aminoimidazo[1,2a]piridinas 3,6-disustituidas mediante la introducción selectiva de sustituyentes en la posición 6 por un intercambio metal-halógeno y la posterior adición de electrófilos, seguida por la metalación α -dirigida hacia la posición 3 y la subsiguiente adición de electrófilos (Esquema 6).



Esquema 6. Síntesis regioselectiva de 2-aminoimidazo[1,2a]piridinas 3,6-disustituidas

6.2. Farmacología

La farmacología de las imidazo[1,2-*a*]piridinas es actualmente el objeto de un renovado interés, así lo demuestra el número de recientes patentes respecto a esta serie. Existen cerca de 1470 patentes conteniendo este anillo y el 56 % ha sido publicado desde el año 2000.¹³⁴

Algunos derivados de imidazo[1, 2-*a*]piridina que ya han sido comercializados son: el Zolpidem, un hipnótico;¹³⁵ el Alpidem, un ansiolítico no sedativo que se retiró del mercado por su hepatotoxicidad;¹³⁶ el Zolimidin que fue comercializado como antiulceroso¹³⁷ y la olpirona, un inhibidor de la fosfodiesterasa 3 usado en Japón para el tratamiento de la falla aguda del corazón.¹³⁸

6.2.1. Imidazo[1,2-*a*]piridinas como inhibidores de CDKs

Como resultado de un tamizado en una biblioteca de compuestos de la compañía Astra-Zeneca, el derivado de imidazo[1,2-*a*]piridina AZ709 (Figura 7) fue identificado como un inhibidor de CDK2 y CDK4 (Cl_{50} = 4 y 8 μ M respectivamente). Posteriormente, una serie de análogos fue sintetizada y evaluada hasta obtener el compuesto AZ703 (Figura 7) con Cl_{50} contra CDK 2 y CDK 1 de 34 y 29 nm respectivamente.¹³⁹

De la misma forma, Hamdouchi y colaboradores,¹⁴⁰ partiendo de resultados de Docking, relaciones estructura-actividad, así como datos de rayos-X sobre inhibidores competitivos de ATP, obtuvieron la molécula líder AZ712 (Figura 13) que mostró actividad inhibitoria contra CDK 2 (Cl_{50} = 28 nM), CDK 4 (Cl_{50} = 464 nM) y CDK 1 (143 nM).

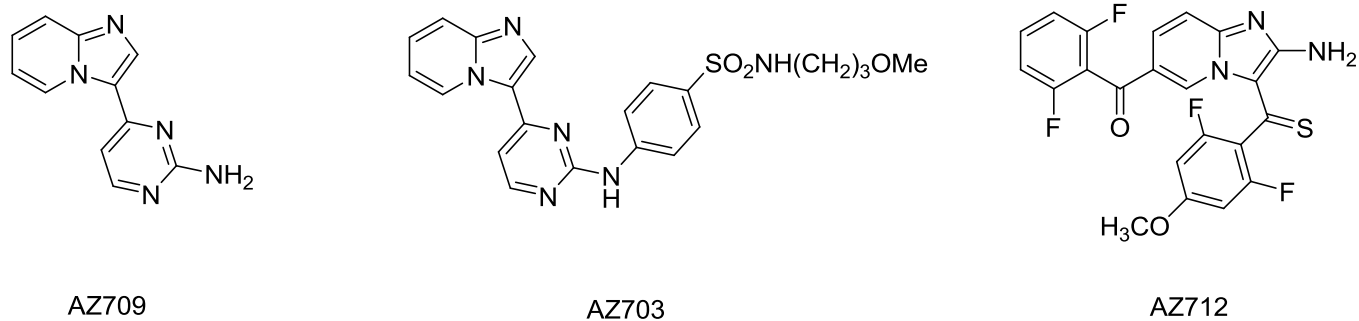


Figura 13. Imidazo[1,2-*a*]piridinas como inhibidores de CDKs

El compuesto AZ712 inhibe la proliferación de las células HCT 116 in vitro de forma dosis y tiempo dependiente, causa su arresto en la fase G2/M y activa a la caspasa-3 involucrada en el fenómeno de apoptosis. Los estudios de rayos-X sobre este compuesto y algunos análogos, muestran que su mecanismo de inhibición de la CDK 2 es debido a que ocupan el sitio de unión a ATP en esta enzima, actuando como inhibidores competitivos. En estos mismos estudios se observó la formación de un puente de hidrogeno entre el N₁ de la imidazopiridina y el NH de la amida en el residuo Leu 83 y entre el carbonilo de este mismo residuo y el NH en posición 3 de la imidazopiridina, además de otro puente de hidrogeno entre el oxígeno del carbonilo del grupo benzoilo en posición 6 de la imidazopiridina y el NH del residuo Asp 145 (Figura 14).^{1,2}

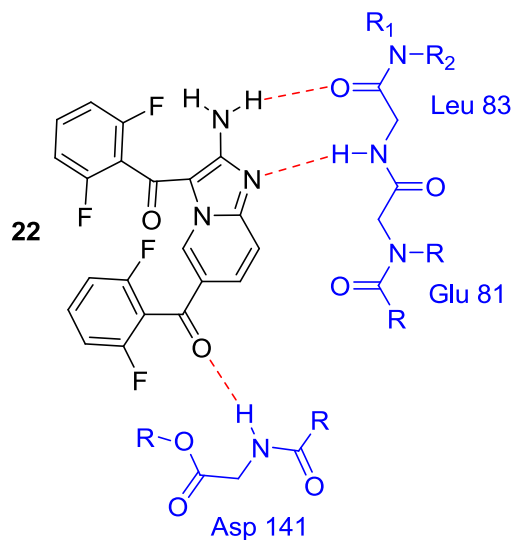


Figura 14. Representación bidimensional del modo de unión del compuesto 22 con CDK 2. ²

7. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer es una enfermedad causada por diversos factores tanto físicos, químicos y biológicos que no ha mostrado una disminución en su incidencia en los últimos años.¹⁴¹ Se calcula estadísticamente que para el año 2020 la morbilidad y mortalidad a causa de esta enfermedad se incrementará al doble, afectando mayoritariamente a países en desarrollo.¹⁴² Por lo tanto, es de gran importancia contar con compuestos que posean actividad citotóxica que puedan utilizarse en la quimioterapia de esta enfermedad.

Como el cáncer es causado por aberraciones en el control del ciclo celular y la apoptosis, la interferencia en los procesos que controlan la división celular podría ser una alternativa para la terapia del cáncer,¹⁴³ siendo la familia de proteínas perteneciente a las CDK (quinasas dependientes de ciclinas) un objetivo plausible en la lucha contra el cáncer.¹⁴⁴

La búsqueda de inhibidores de CDK ha originado el descubrimiento de una familia de aminoimidazo[1,2-*a*]piridinas sustituidas, caracterizada por su alta selectividad hacia las CDK. Se ha demostrado que los miembros de esta familia de moléculas interactúan con la CDK 2 en el sitio de unión a la molécula de adenosina-5'-trifosfato (ATP).

Recientemente Hamdouchi y colaboradores² reportaron el diseño de una nueva clase de aminoimidazo[1,2-*a*]piridinas como inhibidores de CDKs, sin embargo este grupo de investigadores realizó modificaciones únicamente sobre los sustituyentes en las posiciones 2 y 3 del anillo de imidazo[1,2-*a*]piridina. Pocos reportes hay sobre el cambio de sustituyentes en posición 6 del heterociclo, por lo que resulta interesante hacer un estudio sobre el efecto de diferentes sustituyentes en esta posición.

El presente trabajo evalúa el efecto sobre la actividad biológica del cambio de diferentes sustituyentes en la posición 6 del anillo de imidazo[1,2-*a*]piridina. Para esto se sintetizó una serie de derivados de imidazo[1,2-*a*]piridina (Figura 15) sustituidos en la posición 6. Los resultados contribuirán a incrementar los conocimientos sobre los requerimientos estructurales para que esta clase de compuestos aumenten su actividad biológica.

8. OBJETIVOS

- ❖ Sintetizar nuevos derivados de aminoimidazo[1,2-*a*]piridinas (**6a-e** y **11a-c**)
- ❖ Caracterizar a las moléculas mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos.
- ❖ Evaluar la actividad citotóxica de los compuestos sintetizados en líneas celulares tumorales.
- ❖ Analizar el tipo de muerte originado por los compuestos más activos.
- ❖ Realizar un análisis del ciclo celular en células tratadas con estos compuestos.
- ❖ Evaluar la actividad de estas moléculas como inhibidores de CDK.

9. HIPOTESIS

Los derivados de aminoimidazo[1,2-*a*]piridinas (**6a-e** y **11a-c**), debido a sus características estructurales, presentarán un efecto citotóxico sobre células tumorales humanas, causando su muerte por apoptosis y el mecanismo de citotoxicidad involucrará a las CDKs que regulan el ciclo celular.

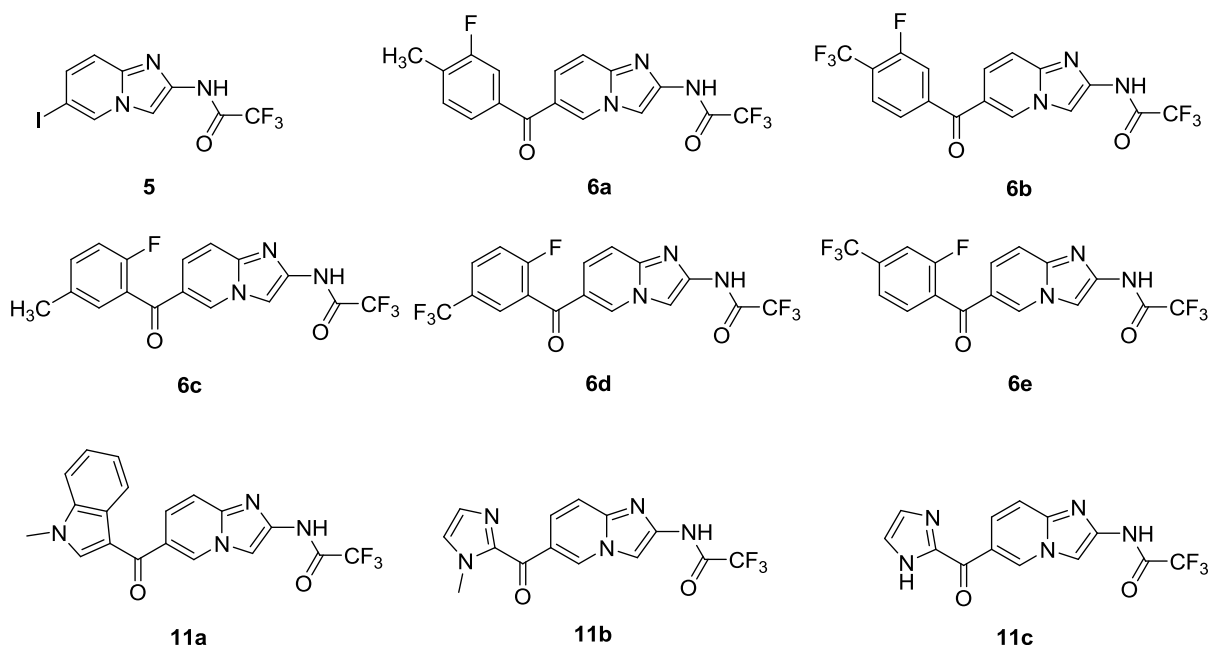


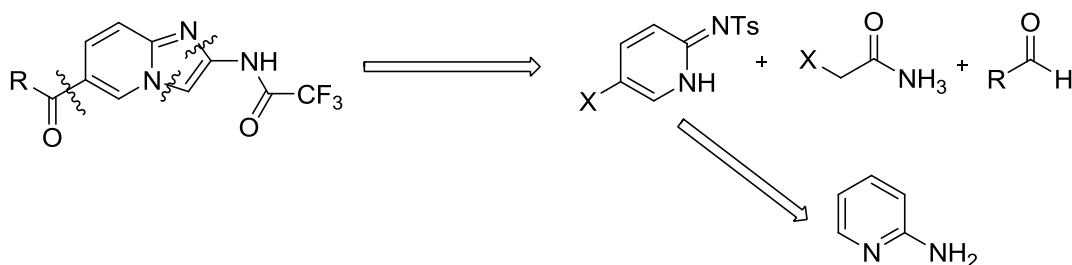
Figura 15. Compuestos sintetizados durante el presente proyecto.

10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

10.1 Parte Química

10.1.1. Síntesis

El diseño sintético inicial para los compuestos propuestos surgió de los reportes previos de Hamdouchi y colaboradores,² que describen la síntesis de imidazo[1,2-*a*]piridinas sustituidas en las posiciones 3 y 6. De esta manera se planteó el esquema de retrosíntesis (Esquema 7) del cual se deduce que es posible partir de materias primas disponibles comercialmente o de fácil síntesis.

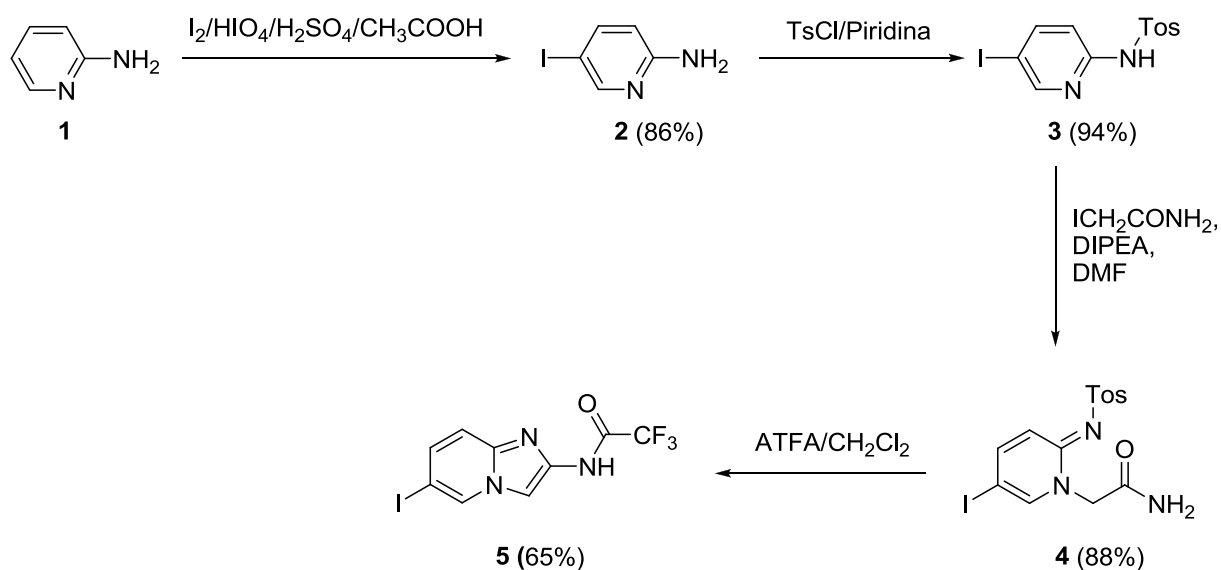


Esquema 7. Esquema retrosintético propuesto para la síntesis de los compuestos **6a-e** y **11a-c**.

Para obtener los compuestos propuestos (**6a-e** y **11a-c**), se planteó en primer lugar preparar el derivado 6-yodo-imidazo[1,2-*a*]piridina (Esquema 8) y posteriormente introducir sustituyentes en la posición 6 mediante un intercambio yodo magnesio con cloruro de isopropilmagnesio y la posterior adición de un aldehído hacia el Grignard resultante, para obtener el correspondiente alcohol, este sería oxidado con dióxido de manganeso para así obtener la correspondiente imidazopiridina sustituida en posición 6.

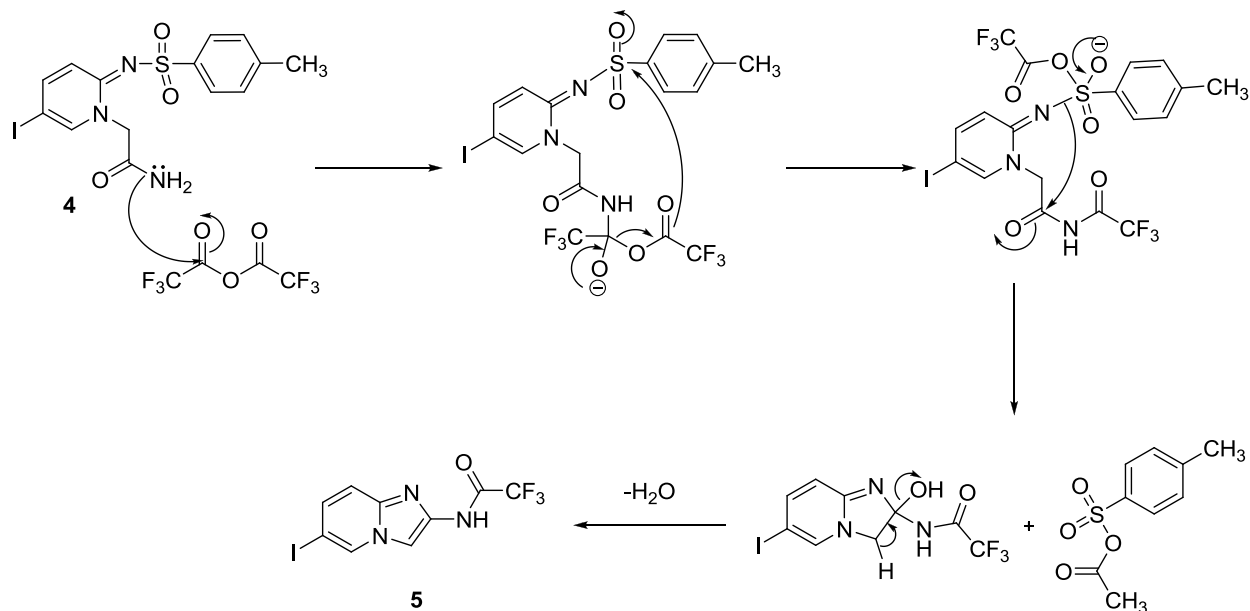
10.1.1.1. Síntesis del compuesto 5

La 2-aminopiridina **1** fue yodada en la posición 5 mediante el método de Ogura,¹⁴⁵ lo que permitió obtener la 2-amino-5-yodo piridina **2** en un 86 % de rendimiento. Posteriormente, **2** se hizo reaccionar con cloruro de para-toluensulfonilo en piridina, obteniéndose el compuesto N-protegido **3** en un 94 % de rendimiento, el cual, posteriormente se trató con 2-yodoacetamida en la presencia de la base de Hünig DIPEA para obtener la correspondiente carbamida **4** en un 88 % de rendimiento. Finalmente, el compuesto **4** se reflujoó con anhídrido trifluoroacético empleando cloruro de metileno como disolvente, con ello se obtuvo la 2-(*N*-trifluoroacetilamino)imidazo[1,2-*a*]piridina **5** en un 65 % de rendimiento en este último paso y un rendimiento general del 46 % a partir de **1** (Esquema 8).



Esquema 8. Preparación de la 6-yodo-2-(trifluoroacetamido)imidazo[1,2-*a*]piridina **5**.

Se propone que el mecanismo mediante el cual se realiza la ciclación del compuesto **4** para formar la correspondiente imidazopiridina, involucra una acilación inicial de la amida con el anhídrido trifluoroacético y la posterior desprotección y ciclación, lo que puede suceder de una forma concertada como se plantea en el Esquema 9. El mecanismo propuesto concuerda con el propuesto por Van der Eijk¹⁴⁶ para la desprotección de imidazol utilizando anhídridos carboxílicos.



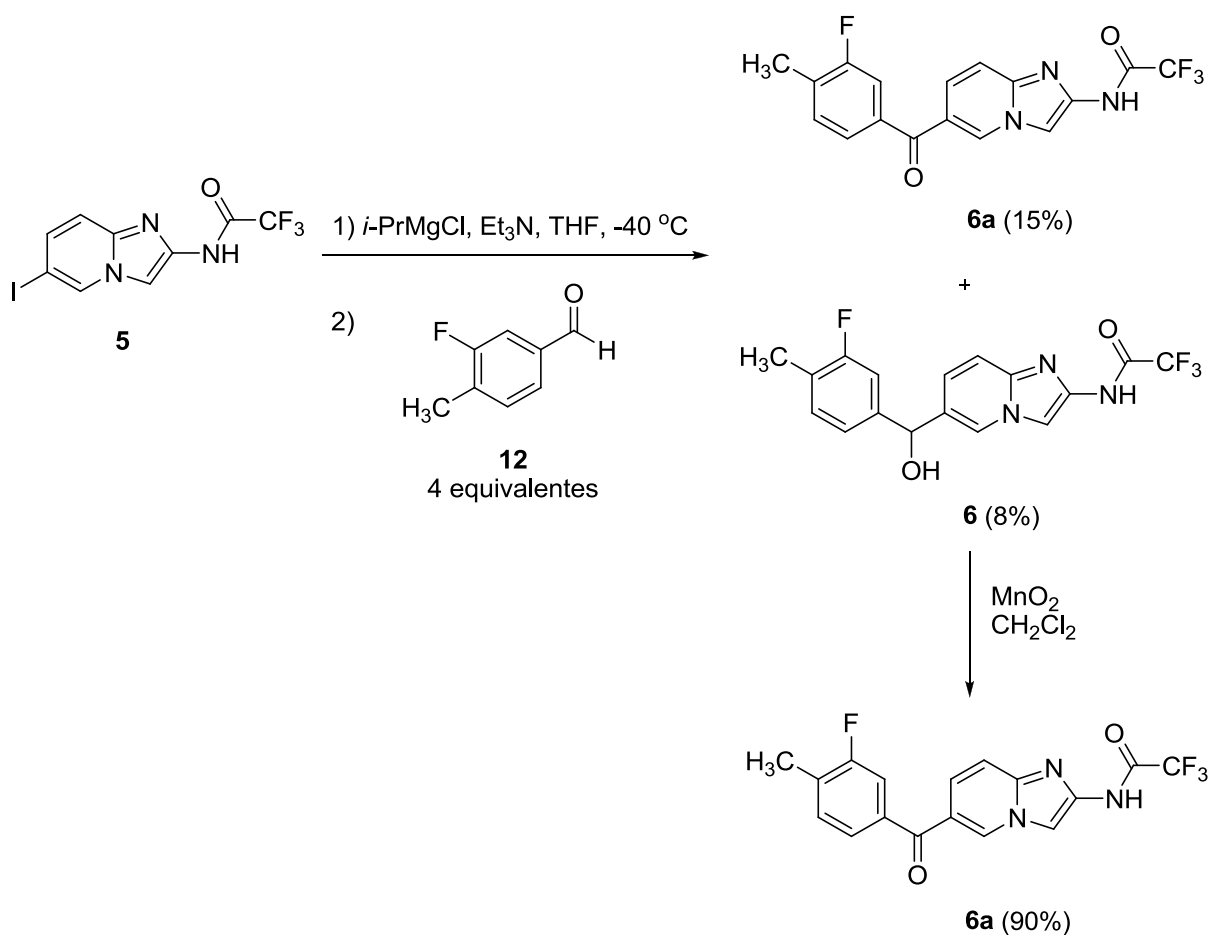
Esquema 9. Mecanismo propuesto para la ciclación de **4**.

Con el fin de funcionalizar el anillo de imidazopiridina en la posición 6 se intentó un intercambio halógeno magnesio entre el yodo de la posición 6 de la imidazopiridina y el cloruro de *i*-propilmagnesio con la posterior reacción entre el Grignard resultante y el correspondiente aldehído para de esta manera obtener los compuestos **6a-e**.

10.1.1.2 Síntesis de los compuestos **6a-e**

Para la síntesis de **6a** (Esquema 10) se hizo reaccionar la 6-yodo-(trifluoroacetamido)imidazo[1,2-*a*]piridina **5** con 2 equivalentes de cloruro de *i*-propilmagnesio. Posteriormente a la reacción se le adicionaron 4 equivalentes de 3-fluoro-4-metil-benzaldehído **12**, aquí cabe hacer mención que después de ensayar varias condiciones estequiométricas se

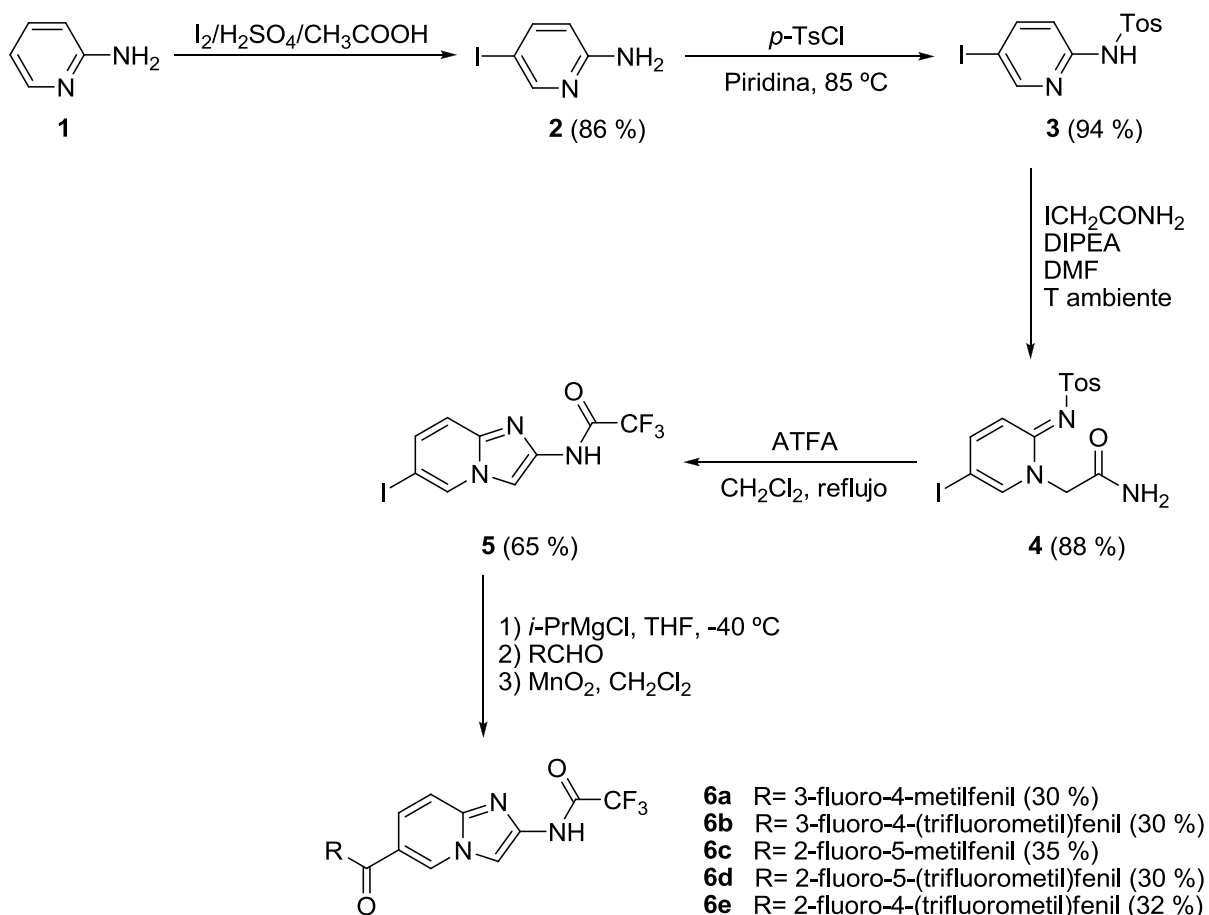
determinó que 4 equivalentes de aldehído fueron las necesarias para alcanzar un mayor rendimiento. Después de la correspondiente purificación del crudo de reacción, se encontró que se obtenía el 8 % del correspondiente alcohol **6** y de un 12 al 15 % de la cetona **6a**. La oxidación del alcohol **6** con dióxido de manganeso para obtener **6a** procedió con un rendimiento del 90 %. De esta manera purificando los productos de la reacción finalmente se obtenía el compuesto **6a** en un rendimiento del 20 % a partir del compuesto **5**. Debido al bajo rendimiento con el cual fue obtenido **6a**, se decidió oxidar directamente el crudo de la reacción entre la imidazo[1,2-*a*]piridina halometalada en la posición 6 y el aldehído para así obtener la diarilcetona **6a** en un 30 % de rendimiento sin necesidad de purificar su alcohol antecesor.



Esquema 10. Obtención del compuesto **6a** a partir de la 6-yodo-(trifluoroacetamido)imidazo[1,2-*a*]piridina **5**.

El hecho de haber obtenido directamente la cetona **6a** como se acaba de mencionar puede ser explicado por el exceso de aldehído en la reacción (4 equivalentes) lo que pudo haber ocasionado una reacción semejante a la de Canizzaro, pues cabe aclarar que en este caso se pudo purificar como subproducto de la reacción el correspondiente alcohol proveniente del 3-fluoro-4-metil-benzaldehído

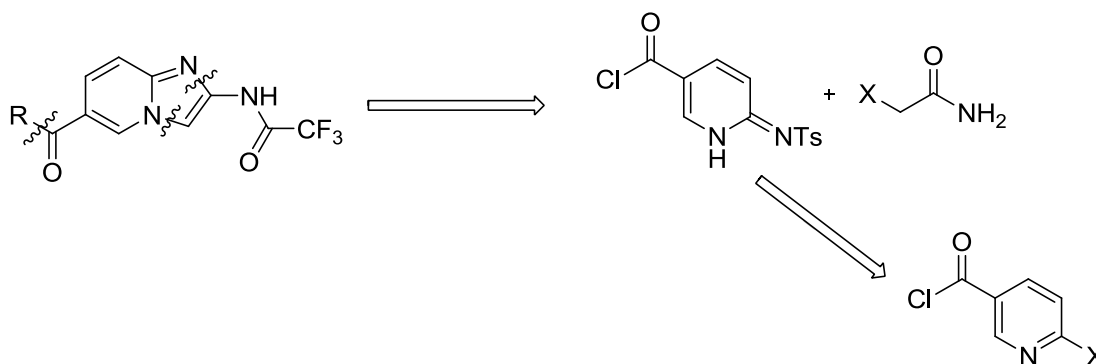
Finalmente la ruta optimizada para la obtención de **6a** fue la utilizada para la síntesis de los compuestos **6b-e** como se describe en el Esquema 11.



Esquema 11. Ruta sintética para la obtención de los compuestos **6a-e**.

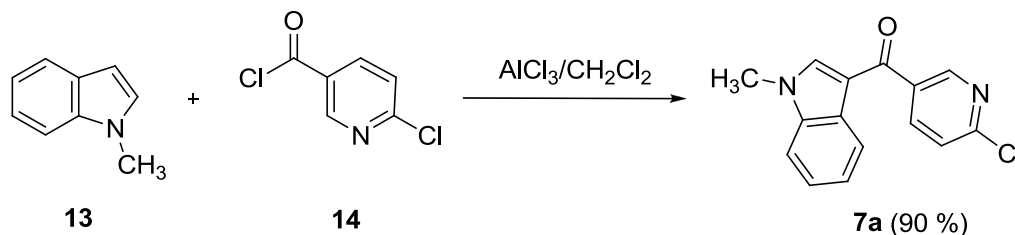
10.1.1.3. Síntesis de los compuestos 11a-c

El paso clave en la obtención de los compuestos **11a-c** fue la obtención de las diarilcetonas **7a-c**, puesto que en un principio se intentó la síntesis del compuesto **11a** a partir del 1-metil-indol-3-carboxaldehído y del compuesto **5** en analogía con los compuestos **6a-e**, pero la reacción no procedió como se esperaba. De esta manera se planteó un nuevo esquema retrosintético para la síntesis de los compuestos **11a-c** (Esquema 12).



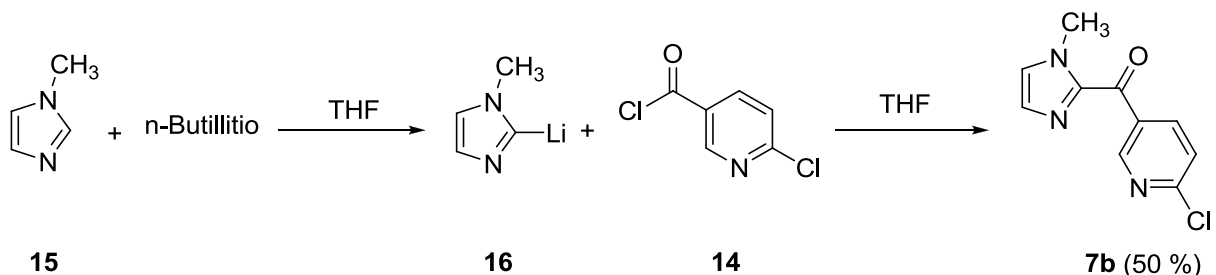
Esquema 12. Esquema retrosintético para la síntesis de los compuestos **11a-c**.

En base al esquema retrosintético (Esquema 12), se tomó la decisión de partir del cloruro de 6-cloronicotinoilo **14**, compuesto que se encuentra disponible comercialmente. El compuesto **7a** fue sintetizado mediante una acilación de Friedel-Crafts entre el *N*-metil indol **13** y el cloruro de ácido **14** en presencia de 2 equivalentes de AlCl_3 obteniéndose con esto la diarilcetona **7a** en un 90 % de rendimiento (Esquema 13).



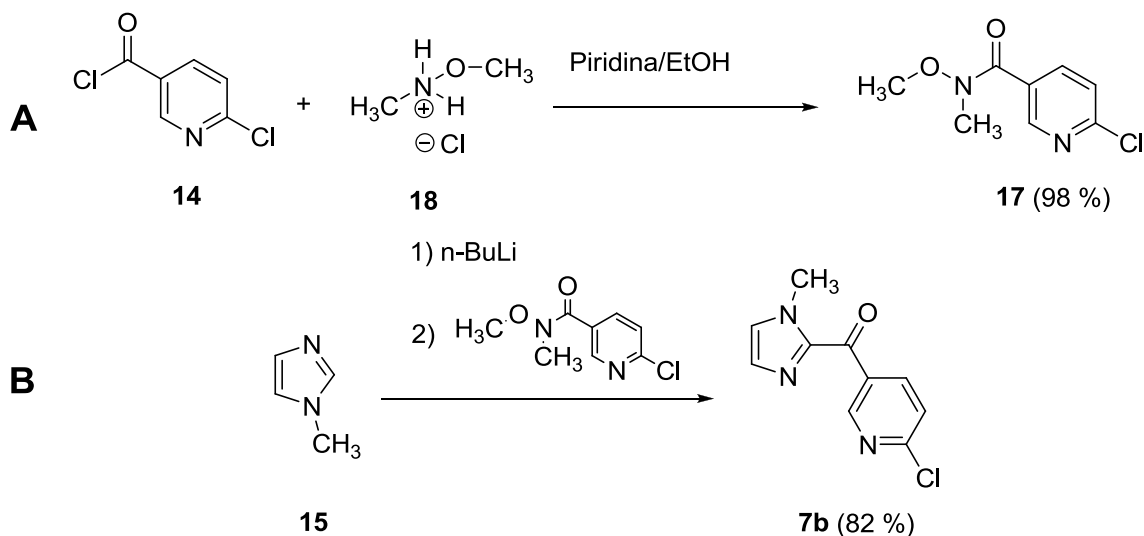
Esquema 13. Síntesis de la diarilcetona **7a** mediante una acilación de Friedel-Crafts.

De la misma forma que se obtuvo el compuesto **7a**, se intentó la acilación de Friedel-Crafts del *N*-metilimidazol **15** con el compuesto **14** sin embargo, la reacción no procedió, por lo que se decidió formar primero la sal de litio del *N*-metilimidazol **16** y posteriormente hacerla reaccionar con el cloruro de ácido **14**. De esta manera se pudo obtener la diarilcetona **7b** en un 50 % de rendimiento (Esquema 14).



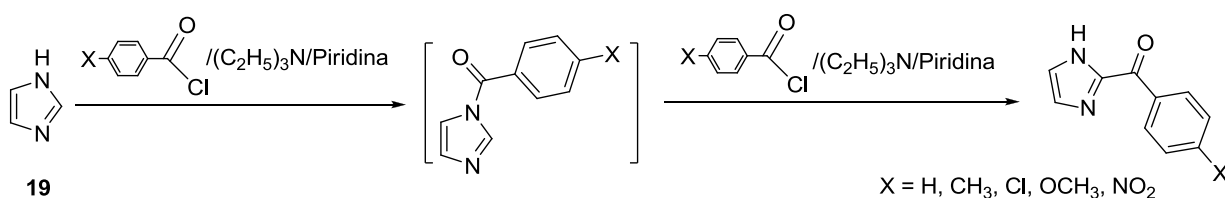
Esquema 14. Síntesis de la diarilcetona **7b**.

Debido a que el rendimiento de la reacción con la cual se logró la obtención de **7b** fue únicamente del 50 %, debido probablemente a la formación de subproductos como el de la doble adición de la sal de litio del imidazol al cloruro de ácido, se decidió utilizar una materia prima menos reactiva que el cloruro de ácido **14**, por lo que se decidió sintetizar su amida de Weinreb de acuerdo al método reportado por Nahm y Weinreb.¹⁴⁷ La amida de Weinreb **17** se obtuvo en un 98 % de rendimiento a partir del cloruro de ácido **14** y el Cloruro de *N,O*-dimetilhidroxilamina **18** (Esquema 15 A). La amida **17** fue utilizada en lugar del cloruro de ácido **14**, aumentándose considerablemente el rendimiento (de un 50 a un 82 %) para la obtención de la diarilcetona **7b** (Esquema 15 B).

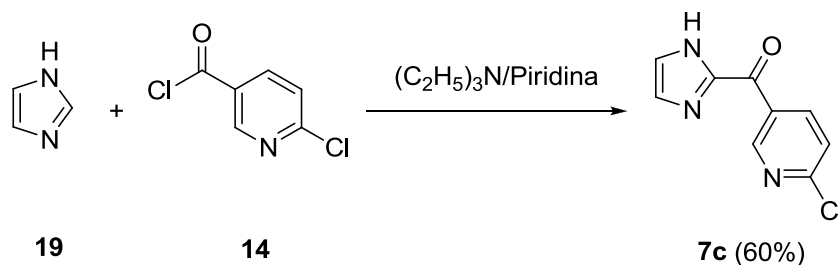


Esquema 15. Optimización de la reacción para la obtención de la diarilcetona **7b**. A) Síntesis de la amida de Weinreb **17**. B) Síntesis de **7b** mediante el acoplamiento de la sal de litio del *N*-metil-imidazol con la amida de Weinreb **17**.

Después de la síntesis del compuesto **7b** nos pareció interesante obtener también el compuesto con el imidazol sin metilar con el fin de comparar si existían diferencias en las actividades biológicas de ambos derivados. Bastiaansen y Godefroi¹⁴⁸ reportaron la obtención de 2-arilimidazoles con rendimientos que van del 60-80 %, haciendo reaccionar imidazol con 2 equivalentes de cloruro de arilo y dos equivalentes de trietilamina en piridina (Esquema 16). En semejanza con lo descrito por Bastiaansen y Godefroi se realizó la acilación del imidazol **19** con el cloruro de ácido **14** en presencia de trietilamina y piridina (Esquema 17) obteniéndose la diarilcetona **7c** con un 60 % de rendimiento



Esquema 16. Acilación de imidazol con diferentes cloruros de ácido de acuerdo a Bastiaansen y Godefroi.



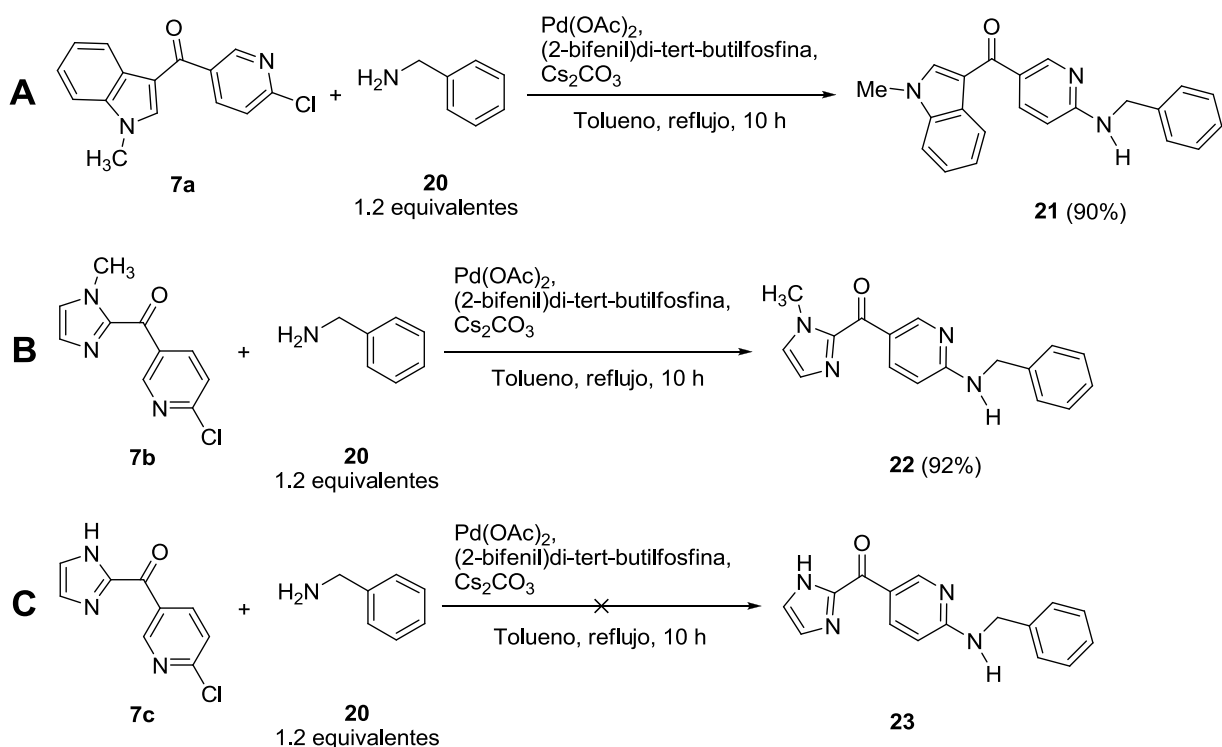
Esquema 17. Síntesis de la diarilcetona **7c**.

El siguiente paso en la obtención de los compuestos **11a-c** fue el de sustituir el cloro presente en el anillo de piridina por el grupo amino. La estrategia planteada para realizar la sustitución fue utilizar bencilamina para sustituir el cloro de la posición deseada y luego hidrogenar con el fin de obtener la correspondiente amina. Como primer intento, en similitud con lo reportado por Gatto y colaboradores,¹⁴⁹ el compuesto **7a** fue hecho reaccionar con 16 equivalentes de bencilamina durante 28 h a reflujo, después de ese tiempo y del correspondiente trabajo de la reacción, fue purificado el producto mayoritario pero se observó mediante RMN H¹ que no aparecían las señales del compuesto deseado.

Como el producto deseado no se logró obtener de la forma descrita arriba, se realizó entonces la aminación catalítica de la 6-cloropiridina **7a** con paladio en analogía con Wolfe, Buchwald y colaboradores (Esquema 18 A).¹⁵⁰ Las condiciones de reacción fueron las siguientes:

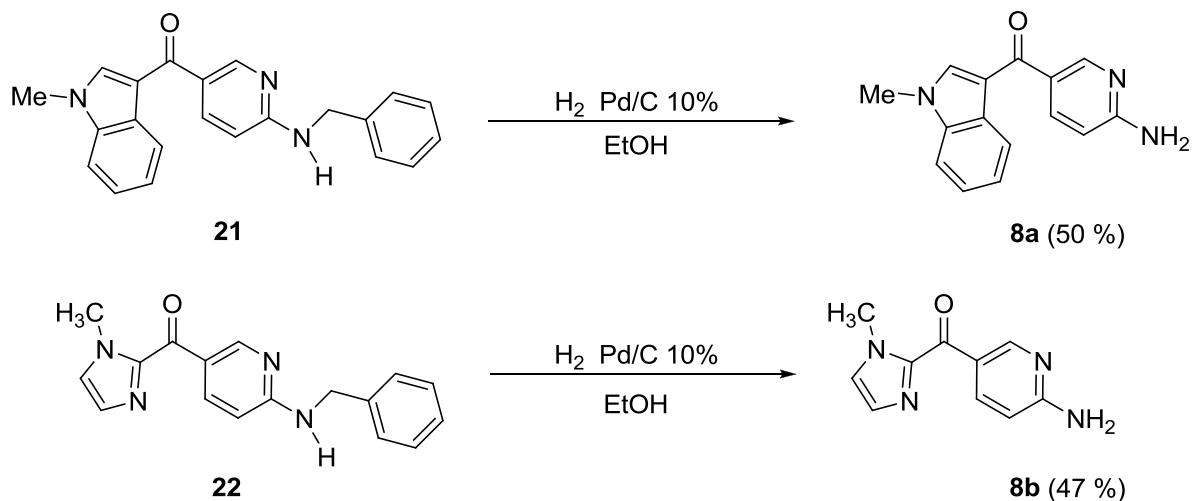
1.2 equivalentes de bencilamina **20**, 1.4 equivalentes de Cs_2CO_3 , 0.5 % en mol de $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, 1 % en mol de (2-bifenil)di-*tert*-butilfosfina en tolueno (2 mL/mmol de cloropiridina) a reflujo toda la noche, de esta manera se obtuvo el compuesto **21** en un 90 % después de purificarse por cromatografía en columna.

Se realizó entonces la aminación catalítica de los otros compuestos (**7b** y **7c**) obteniéndose el producto **22** en un 92 % de rendimiento a partir de **7b** (Esquema 18 B); sin embargo, en la aminación de **7c** se observaron solamente compuestos de muy alta polaridad que no pudieron ser purificados para obtener **23** (Esquema 18 C). Una razón para explicar lo anterior pudo ser debido a que el compuesto **7c** reaccionó con él mismo y se polimerizó ya que el nitrógeno del imidazol está libre y es susceptible de reaccionar bajo las condiciones utilizadas.



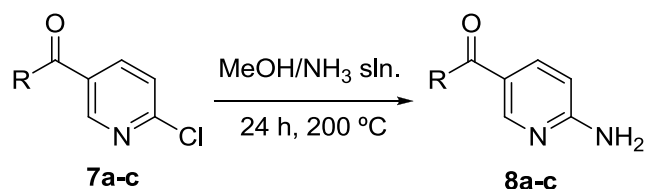
Esquema 18. A) Aminación catalítica del compuesto **7a**. B) Aminación catalítica del compuesto **7b**. Aminación catalítica del compuesto **7c**, la reacción no procedió.

Los compuestos **21** y **22** fueron hidrogenados utilizando paladio sobre carbono como catalizador, generando de esta forma la correspondiente amina (Esquema 19).



Esquema 19. Hidrogenación de los compuestos **21** y **22**.

Debido a que los compuestos **8a** y **8b** se obtenían en un 45 % y 43 % respectivamente a partir de **7a** y **7b** en dos pasos de reacción, se decidió optimizar la síntesis de estos compuestos para mejorar el rendimiento. Para lograr lo anterior se decidió sustituir el cloro de las diarilcetonas **7a-7c** con una disolución saturada de amoníaco en metanol a 200 °C durante 24 horas (Esquema 20). De esta forma se prepararon las aminopiridinas **8a**, **8b** y **8c** en 58 %, 35 % y 30 % de rendimiento respectivamente (Tabla 1).

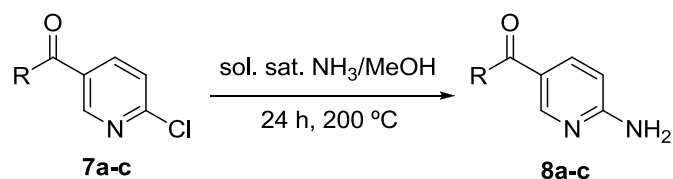


Esquema 20. Síntesis de **8a-c** utilizando una disolución saturada de amoníaco en metanol.

Tabla 1

Compuesto	R	Rendimiento %
8a		58
8b		35
8c		30

Aunque la síntesis de **8a-c** se redujo a un solo paso, los rendimientos no fueron los óptimos, se decidió entonces realizar la misma reacción (Esquema 21) pero utilizando amoníaco anhidro en lugar de una disolución saturada de amoníaco en MeOH. Después de ensayar varias condiciones de tiempo y temperatura los mejores resultados se generaron llevando a cabo la reacción a 150 °C durante 8 horas. Los rendimientos con los cuales se prepararon los compuestos **8a-c** fueron del 80 % al 85 % (Tabla 2).

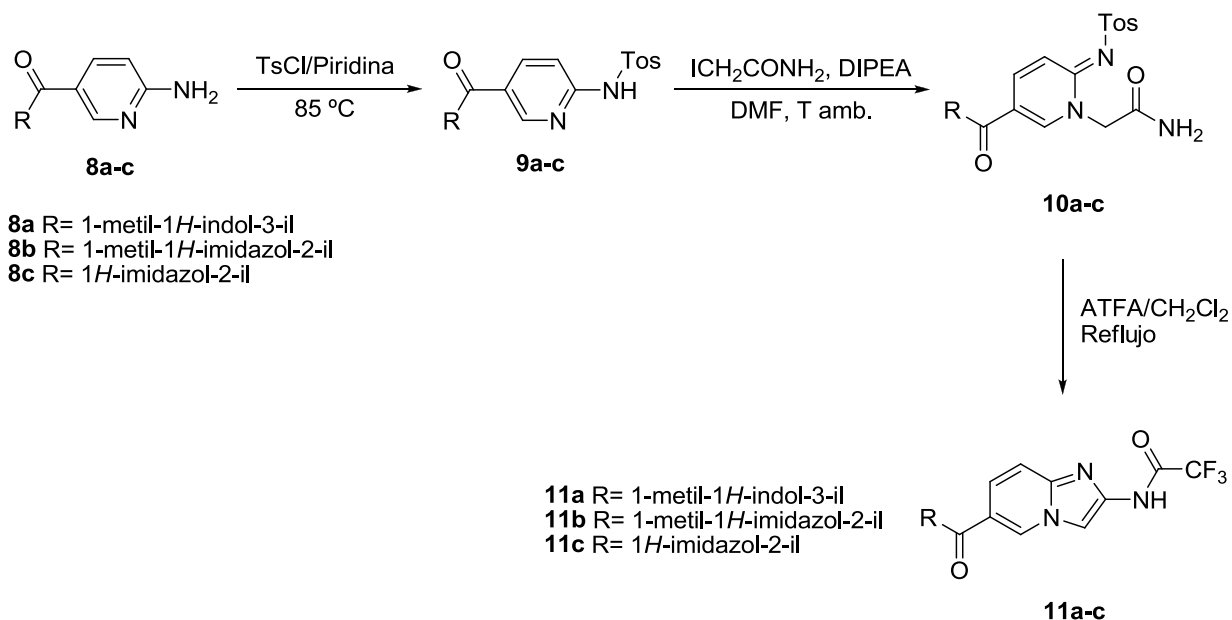


Esquema 21. Síntesis de **8a-c** utilizando amoníaco anhidro.

Tabla 2.

Compuesto	R	Rendimiento %
8a		84
8b		80
8c		85

Para continuar con la síntesis de los compuestos **11a-c** y basados en el método que nos llevó a los compuestos **6a-e**, las aminopiridinas **8a-c** fueron *N*-protegidas con *p*-TsCl en piridina, obteniéndose los compuestos **9a-c** en rendimientos del 87 %, 82 % y 75 % respectivamente. Los compuestos **9a-c** se trataron con 2-yodoacetamida utilizando DIPEA como catalizador, de esta manera las correspondientes carbamidas **10a-c** fueron preparadas en rendimientos del 75 %, 78 % y 67 % respectivamente. Finalmente, se realizó la ciclación *in situ* de los compuestos **10a-c** al ser tratados con anhídrido trifluoroacético en cloruro de metileno a reflujo, obteniendo las 2-(*N*-trifluoroacetilamino)imidazopiridinas 6 sustituidas **11a-c** en rendimientos del 72 %, 60 % y 56 % respectivamente (Esquema 22).



Esquema 22. Ruta sintética para la obtención de los compuestos **11a-c**.

10.1.2. Análisis de datos espectroscópicos

Las características espectroscópicas de cada producto sintetizado se pueden consultar en la parte experimental, en esta sección se hará mención únicamente de los productos finales **4**, **5**, **6a-e** y **11a-c**. Las técnicas espectroscópicas utilizadas para la elucidación de los productos finales fueron RMN ^1H , RMN ^{13}C , IR y masas. Además, para la asignación correcta de las señales en los espectros de RMN ^1H y RMN ^{13}C se utilizaron las técnicas bidimensionales COSY, NOESY, HSQC y HMBC, aunque las correlaciones observadas mediante estas técnicas solo se discutirán para los casos más representativos.

El HSQC es un experimento heteronuclear bidimensional que permite observar las interacciones carbono-hidrógeno a un enlace de distancia ($^1 J_{\text{C-H}}$); es decir, permite determinar que carbono e hidrógeno se encuentran directamente unido. De esta manera la técnica permite determinar el grado de protonación de cada uno de los carbonos en la molécula, aunque no es posible asignar una posición dentro de la molécula a los carbonos cuaternarios.

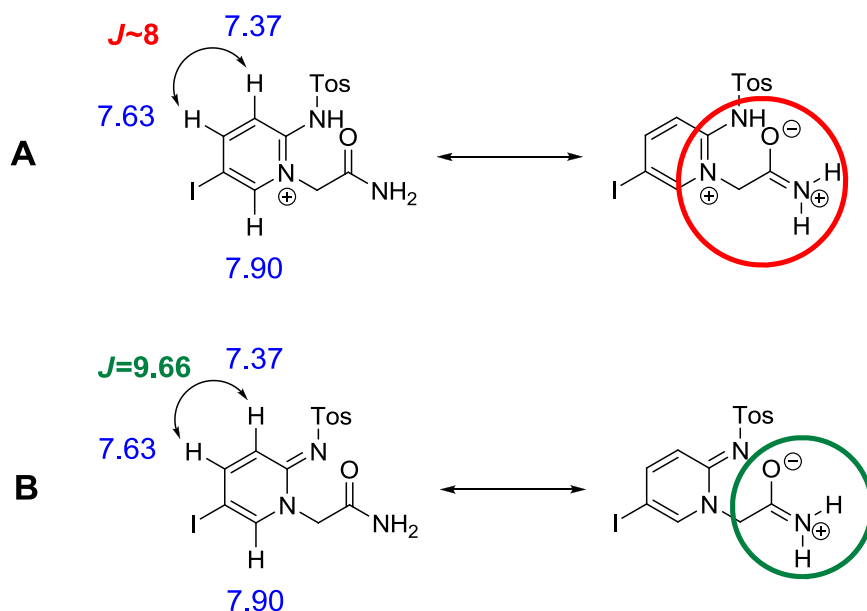
El HMBC es un experimento heteronuclear bidimensional que permite observar las interacciones carbono-hidrógeno a dos y tres enlaces de distancia ($^2 J_{\text{C-H}}$, $^3 J_{\text{C-H}}$). Es un experimento complementario del HSQC, pero más eficaz, pues es posible asignar la posición de carbonos cuaternarios o carbonílicos en una molécula, dado que permite hacer conectividades entre los carbonos y los protones presentes en la molécula.

El COSY es un experimento homonuclear bidimensional que nos permite observar las interacciones hidrógeno-hidrógeno a dos y tres enlaces en el espacio.

El NOESY es un experimento homonuclear bidimensional que nos permite observar las interacciones hidrógeno-hidrógeno en el espacio. Para que pueda existir una interacción los protones deben encontrarse a una distancia máxima de entre 2.5-2.8 Å entre sí. Este experimento además de corroborar los experimentos COSY y HMBC, permite también establecer una conformación espacial a la molécula.

10.1.2.1. Características espectroscópicas del compuesto 4

De interés espectroscópico resulto ser el compuesto **4**, pues en un principio se tuvo la idea de que el compuesto presentaría una estructura con una carga positiva sobre el nitrógeno del anillo piridínico como la representada por la estructura A en el esquema 23, pero la resonancia magnética nuclear de hidrogeno de este compuesto arrojó la evidencia necesaria para asignarle al compuesto la estructura B mostrada en el esquema 23. La evidencia mencionada fue la siguiente: 1) en el espectro de RMN ^1H no aparece la señal en aproximadamente 4 ppm correspondiente a la sulfonamida de la estructura A y 2) la constante de acoplamiento (J) entre los protones en 7.37 y 7.63 ppm debería presentar un valor de aproximadamente 8 Hz si fuera un sistema aromático, sin embargo, presenta un valor de 9.66 Hz característica de un sistema no aromático. Por otro lado, en el espectro de RMN ^1H aparecen dos singuletes amplios que integran cada uno para un protón en 6.31 y 7.53 ppm, los cuales pueden ser asignados a la amida en la estructura resonante B del esquema 23. La estructura A no podría soportar esta forma resonante pues tendría dos cargas positivas sobre la misma estructura.

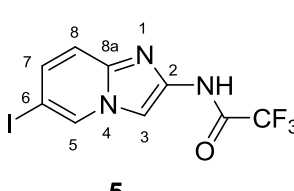


Esquema 23. Evidencia espectroscópica para la asignación de la estructura correcta del compuesto **4**.

10.1.2.2. Características espectroscópicas del compuesto 5

Los desplazamientos químicos de las señales presentes en el espectro de RMN ^1H y RMN ^{13}C para el compuesto **5** se muestran en la Tabla 3

Tabla 3. Asignación de las señales presentes en el espectro de RMN ^1H y RMN ^{13}C para el compuesto **5**

C/H No	^1H δ ppm (<i>J</i> en Hz)	^{13}C δ ppm (<i>J</i> en Hz)	Numeración
2		102.1, s	 <p style="text-align: center;">5</p>
3	8.17, s	139.3, s	
5	8.69, dd (0.5, 1.5)	132.3, s	
6		74.6, s	
7	7.39, dd (1.5, 9.5)	130.7, s	
8	7.28, d (9.5)	116.7, s	
8a		139.7, s	
CF ₃		115.3, c (287.2)	
NH	12.10, s amplio		
NHCOCF ₃		154.0, c (38.6)	

Para la asignación correcta de las señales en el compuesto **5** se realizaron las técnicas bidimensionales HSQC y HMBC (Figura 16).

El espectro de masas del compuesto **5**, realizado por el método FAB⁺, mostró un ión molecular (M+H)⁺ en 356 uma.

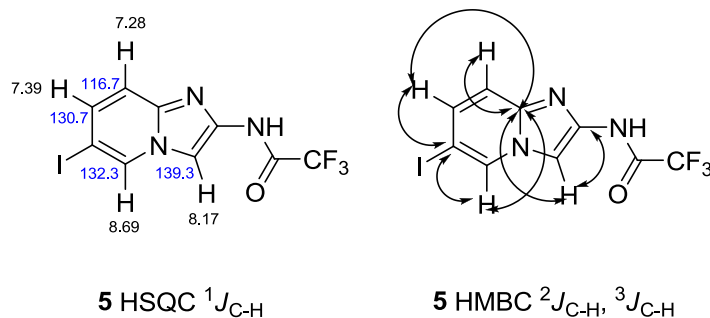


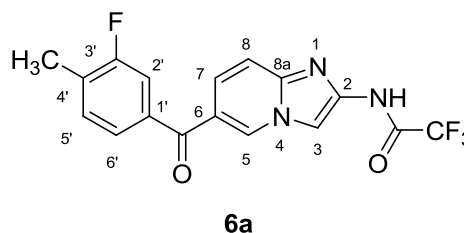
Figura 16. Experimentos HSQC y HMBC para el compuesto **5**.

10.1.2.3. Características espectroscópicas del compuesto 6a

Los desplazamientos químicos de las señales presentes en el espectro de RMN ^1H y RMN ^{13}C para el compuesto **6a** se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Asignación de las señales presentes en el espectro de RMN ^1H y RMN ^{13}C para el compuesto **6a**.

C/H No	^1H δ ppm (<i>J</i> en Hz)	^{13}C δ ppm (<i>J</i> en Hz)	Numeración
2		140.7, s	
3	8.26, s	103.6, s	
5	8.92, s amplio	131.5, s	
6		122.3, s	
7	7.60, dd (1.5, 9.0)	124.3, s	
8	7.47, d (7.0)	115.2, s	
8a		141.6, s	
1'		136.2, d (6.4)	
2'	7.41, dd (2.0, 9.5)	115.4, d (24)	
3'		160.2, d (246.6)	
4'		129.5, d (17.5)	
5'	7.33, dd (7.5, 7.5)	131.2, d (4.7)	
6'	7.46, dd (2.0, 7.5)	129.9, d (1.7)	
CF ₃		115.3, c (288.9)	
CH ₃	2.31, d (1.5)	14.2, d (2.8)	
NH	12.09, s amplio		
NHCOCF ₃		154.1, c (38.7)	
CCOC		190.8, s	



El espectro de masas para el compuesto **6a** por el método de impacto electrónico mostró un pico base en 365 uma correspondiente al ión molecular. Se observan además pérdidas de $M^+ - 69$, $M^+ - 109$ y $M^+ - 228$, correspondientes a trifluorometilo, 1-metil-2-fluorobenceno y al anillo de 2-(*N*-trifluoroacetilamino)imidazopiridina respectivamente.

Para la asignación correcta de las señales en los espectros se realizaron las técnicas bidimensionales COSY, NOESY, HSQC y HMBC (Figura 16). Para este caso las interacciones observadas en los espectros NOESY y HMBC nos ayudaron a asignar correctamente la posición de los hidrógenos unidos a los carbonos 8 y 6'.

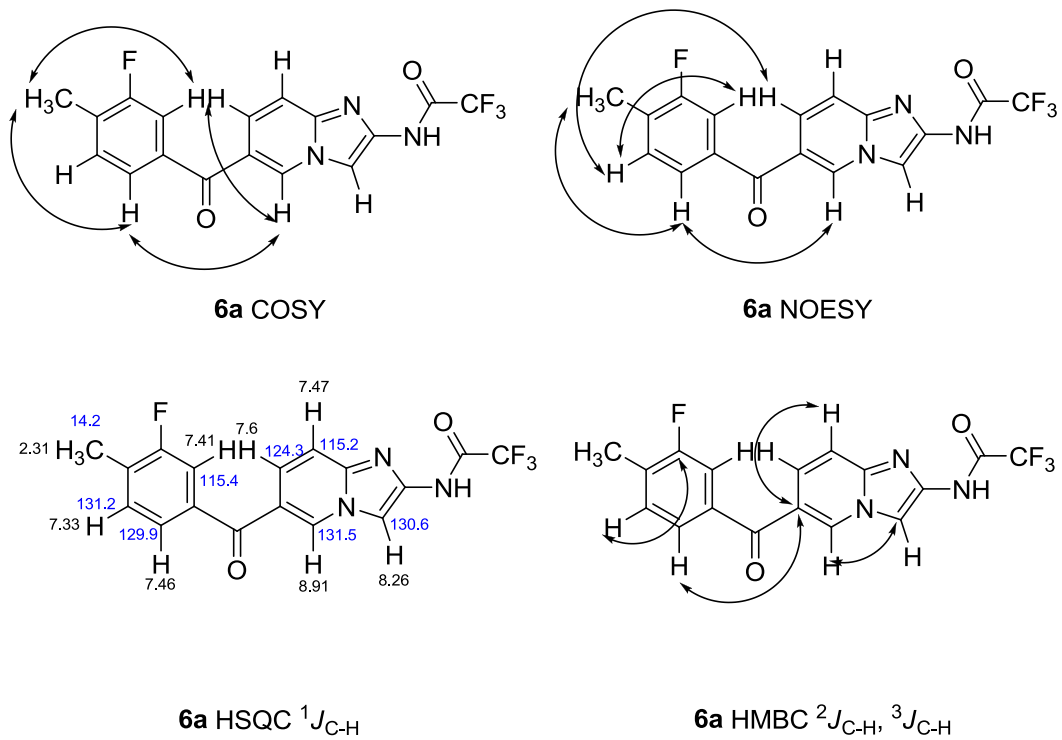


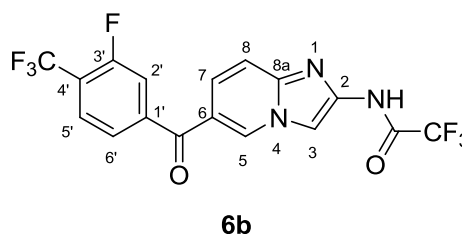
Figura 17. Experimentos COSY, NOESY, HSQC y HMBC para el compuesto **6a**.

10.1.2.4. Características espectroscópicas del compuesto 6b

Los desplazamientos químicos de las señales presentes en el espectro de RMN ^1H y RMN ^{13}C para el compuesto **6b** se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Asignación de las señales presentes en el espectro de RMN ^1H y RMN ^{13}C para el compuesto **6b**.

C/H No	^1H δ ppm (<i>J</i> en Hz)	^{13}C δ ppm (<i>J</i> en Hz)	Numeración
2		140.7, s	
3	8.36, s amplio	102.4, s	
5	8.89, s amplio	131.5, s	
6		122.1, s	
7	7.57, dd (1.5, 9.0)	124.3, s	
8	7.48, d (7.0)	115.0, s	
8a		141.6, s	
1'		136.2, d (6.4)	
2'	7.44, dd (2.0, 8.0)	115.6, d (24.0)	
3'		160.6, d (246.6)	
4'		128.9, d (17.5)	
5'	7.35, dd (7.5, 7.5)	131.2, d (4.7)	
6'	7.47, dd (2.0, 7.5)	129.6, d (1.7)	
COCF ₃		115.4, c (287.2)	
CF ₃		122.5, c (287.2)	
NH	12.21, s amplio		
NHCOCF ₃		154.3, c (38.7)	
CCOC		189.8, s	



El espectro de masas para el compuesto **6b** por el método de impacto electrónico mostró un pico base en 419 una correspondiente al ión molecular. Se observan además pérdidas de $M^+ - 19$, $M^+ - 69$ y $M^+ - 191$, correspondientes a Flúor, trifluorometilo y al anillo de 2-(*N*-trifluoroacetilamino)imidazopiridina respectivamente.

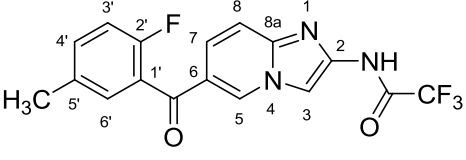
El espectro de infrarrojo para el compuesto **6b** mostró las siguientes señales en cm^{-1} : 3027 para C-H aromáticos, 3128 para el NH de la amida, 1750 para carbonilo además de 1645 y 1610 para la amida.

Para la asignación correcta de las señales en los espectros se realizaron las técnicas bidimensionales COSY, NOESY, HSQC y HMBC pero las interacciones no se muestran por ser similares a las de **6a**.

10.1.2.5. Características espectroscópicas del compuesto **6c**

Los desplazamientos químicos de las señales presentes en el espectro de RMN ^1H y RMN ^{13}C para el compuesto **6c** se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Asignación de las señales presentes en el espectro de RMN ^1H y RMN ^{13}C para el compuesto **6c**.

C/H	^1H	^{13}C	Numeración
No	δ ppm (<i>J</i> en Hz)	δ ppm (<i>J</i> en Hz)	
2		140.7, s	 <p style="text-align: center;">6c</p>
3	8.41, s	104.3, s	
5	9.16, dd (1.0, 1.5)	133.5, s	
6		123.1, s	
7	7.69, dd (2.0, 7.5)	123.8, s	
8	7.63, t (1.0, 2.0)	115.6, s	
8a		142.0, s	
1'		125.6, s	
2'		157.4, d (246.7)	
3'	7.29, dd (1.5, 8.5)	116.1, d (22.1)	
4'	7.49 cdd, (0.5, 2.0, 7.5, 8.5)	133.9, d (7.3)	
5'		134.1, s	
6'	7.43, dd (2.0, 4.5)	130.4, s	
CF ₃		115.8, c (287.22)	
CH ₃	2.36, s	20.0, s	
NH	12.58, s amplio		
NHCOCF ₃		154.1, c (38.3)	
CCOC		189.8, s	

El espectro de masas para el compuesto **6c** por el método de impacto electrónico mostró un pico base en 365 uma correspondiente al ión molecular. Se observan además pérdidas de $M^+ - 69$, $M^+ - 109$ y $M^+ - 228$, correspondientes a trifluorometilo, 1-metil-2-fluorobenceno y al anillo de 2-(*N*-trifluoroacetilamino)imidazopiridina respectivamente.

El espectro de infrarrojo para el compuesto **6c** mostró las siguientes señales en cm^{-1} : 3037 para C-H aromáticos, 3258 para el NH de la amida, 1718 para carbonilo además de 1615 y 1564 para la amida.

Para la asignación correcta de las señales en los espectros se realizaron las técnicas bidimensionales HSQC y HMBC y las interacciones se muestran en la Figura 18.

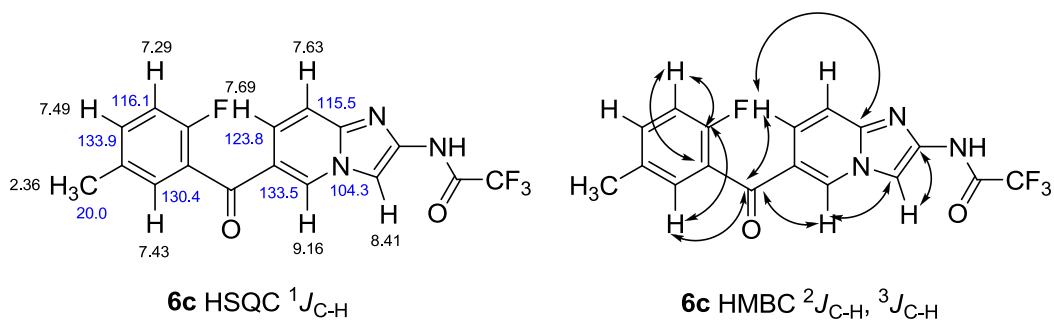


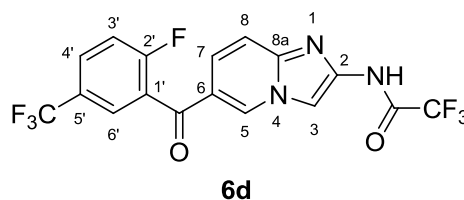
Figura 18. Experimentos HSQC y HMBC para el compuesto **6c**.

10.1.2.6. Características espectroscópicas del compuesto 6d

Los desplazamientos químicos de las señales presentes en el espectro de RMN ^1H y RMN ^{13}C para el compuesto **6d** se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Asignación de las señales presentes en el espectro de RMN ^1H y RMN ^{13}C para el compuesto **6d**.

C/H No	^1H δ ppm (<i>J</i> en Hz)	^{13}C δ ppm (<i>J</i> en Hz)	Numeración
2		141.2, s	
3	8.41, s	104.19, s	
5	9.12, dd (1.0, 1.5)	131.4, s	
6		123.1, s	
7	7.69, dd (2.0, 7.5)	123.8, s	
8	7.53, t (1.0, 2.0)	115.3, s	
8a		142.2, s	
1'		134.1, s	
2'		157.4, d (246.7)	
3'	7.25, dd (1.5, 8.5)	116.1, d (22.1)	
4'	7.46, cddd (0.5, 2.0, 7.0, 8.5)	133.9, d (7.29)	
5'		133.48, d (33.8)	
6'	7.39, dd (2, 4.5)	126.6, s	
COCF ₃		115.8, c (287.22)	
CF ₃		124.1, c (246.75)	
NH	12.48 s, amplio		
NHCOCF ₃		153.9, c (38.7)	
CCOC		188.6, s	



El espectro de masas para el compuesto **6d** por el método de impacto electrónico mostró un pico base en 419 una correspondiente al ión molecular. Se observan además pérdidas de $M^+ - 19$, $M^+ - 69$ y $M^+ - 191$, correspondientes a Flúor, trifluorometilo y al anillo de 2-(*N*-trifluoroacetilamino)imidazopiridina respectivamente.

El espectro de infrarrojo para el compuesto **6d** mostró las siguientes señales en cm^{-1} : 3014 para C-H aromáticos, 3265 para el NH de la amida, 1725 para carbonilo además de 1670 y 1615 para la amida.

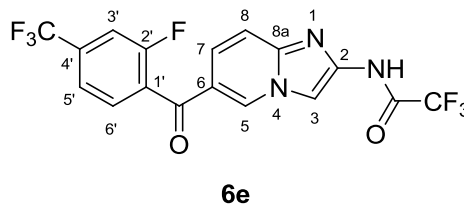
Para la asignación correcta de las señales en los espectros se realizaron las técnicas bidimensionales HSQC y HMBC. Las interacciones observadas no se muestran por ser similares a las de **6c**.

10.1.2.7. Características espectroscópicas del compuesto **6e**

Los desplazamientos químicos de las señales presentes en el espectro de RMN ^1H y RMN ^{13}C para el compuesto **6e** se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Asignación de las señales presentes en el espectro de RMN ^1H y RMN ^{13}C para el compuesto **6e**.

C/H No	^1H δ ppm (<i>J</i> en Hz)	^{13}C δ ppm (<i>J</i> en Hz)	Numeración
2		140.8, s	
3	8.26, s	103.7, s	
5	8.63, s	131.3, s	
6		124.0, s	
7	7.77, dt (1.0, 9.0)	125.0, s	
8	7.55, d (9.0)	116.1, s	
8a		142.7, s	
1'		129.2, d (15.5)	
2'		159.3, d (254.4)	
3'	7.53, d (9.0)	114.3, dd (3.6, 22.0)	
4'		135.6, dd (34.0)	
5'	7.63, dd (8.5)	121.8, s	
6'	7.73, t (7.0)	131.4, s	
COCF ₃		115.6, c (289.0)	
CF ₃		122.5, c (289.9)	
NH	11.20, s amplio		
NHCOCF ₃		154.7, c (39.4)	
CCOC		188.3, s	



El espectro de masas para el compuesto **6e** por el método de impacto electrónico mostró un pico base en 419 una correspondiente al ión molecular. Se observan además pérdidas de $M^+ - 19$, $M^+ - 69$ y $M^+ - 191$, correspondientes a Flúor, trifluorometilo y al anillo de 2-(*N*-trifluoroacetilamino)imidazopiridina respectivamente.

El espectro de infrarrojo para el compuesto **6e** mostró las siguientes señales en cm^{-1} : 3014 para C-H aromáticos, 3180 para el NH de la amida, 1726 para carbonilo además de 1630 y 1572 para la amida.

Para la asignación correcta de las señales en los espectros se realizaron las técnicas bidimensionales HSQC y HMBC. Las interacciones observadas se muestran en la Figura 19.

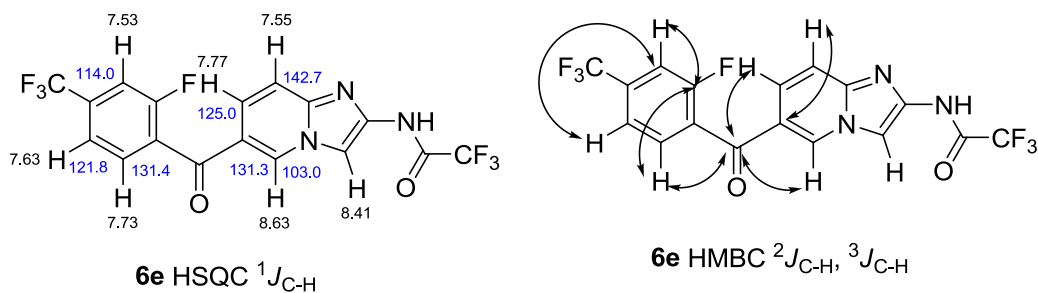


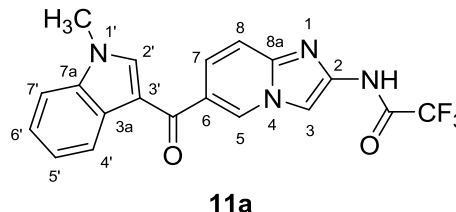
Figura 19. Experimentos COSY, NOESY, HSQC y HMBC para el compuesto **6e**.

10.1.2.8. Características espectroscópicas del compuesto 11a

Los desplazamientos químicos de las señales presentes en el espectro de RMN ^1H y RMN ^{13}C para el compuesto **11a** se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Asignación de las señales presentes en el espectro de RMN ^1H y RMN ^{13}C para el compuesto **11a**.

C/H No	^1H δ ppm (<i>J</i> en Hz)	^{13}C δ ppm (<i>J</i> en Hz)	Numeración
2		140.1, s	
3	8.36, s	103.8, s	
5	9.22, dd (1.0, 1.5)	129.61, s	
6		125.3, s	
7	7.67, dd (1.5, 9.5)	122.1, s	
8	7.61, d (9.5)	115.3, s	
8a		141.5, s	
2'	8.29, s	139.5, s	
3'		113.5, s	
3a		126.6, s	
4'	8.26, dt (0.5, 1.5, 7.0)	121.5, s	
5'	7.29, td (1.0, 1.5, 7.0)	122.3	
6'	7.34, td (1.0, 1.5, 7.0)	123.2, s	
7'	7.59, dd (1.5, 7.0)	110.6, s	
7a		137.3, s	
CH ₃	3.9, s	33.2, s	
COCF ₃		115.6, c (288.2)	
NH	12.55, s amplio		
NHCOCF ₃		154.0, c (37.83)	
CCOC		185.5, s	



El espectro de masas para el compuesto **11a** por el método de impacto electrónico mostró un pico base en 386 uma correspondiente al ión molecular. Se observan además la pérdida de $\text{M}^+ -69$, correspondientes a trifluorometilo.

El espectro de infrarrojo para el compuesto **11a** mostró las siguientes señales en cm^{-1} : 3029 para C-H aromáticos, 3296 para el NH de la amida, 1718 para carbonilo además de 1645 y 1597 para la amida.

Para la asignación correcta de las señales en los espectros se realizaron las técnicas bidimensionales COSY, NOESY, HSQC y HMBC la Figura 20 muestra las interacciones más importantes encontradas con estos experimentos.

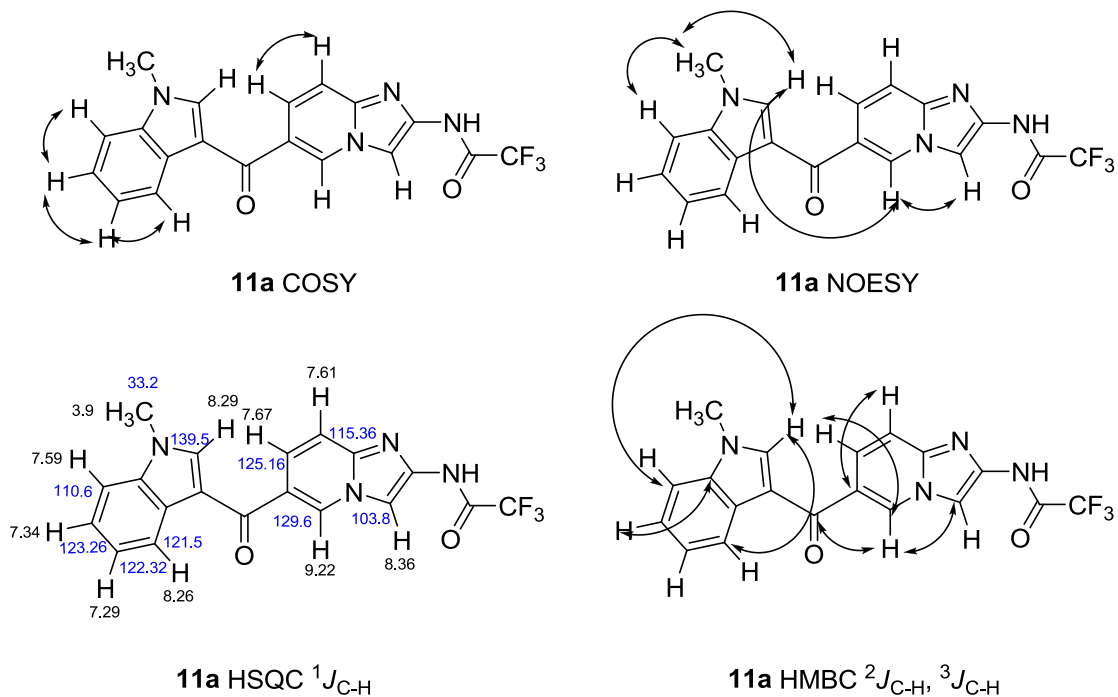


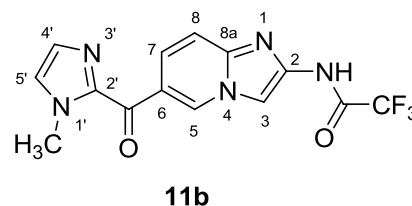
Figura 20. Experimentos COSY, NOESY, HSQC y HMBC para el compuesto **11a**.

10.1.2.9. Características espectroscópicas del compuesto **11b**

Los desplazamientos químicos de las señales presentes en el espectro de RMN ^1H y RMN ^{13}C para el compuesto **11b** se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Asignación de las señales presentes en el espectro de RMN ^1H y RMN ^{13}C para el compuesto **11b**.

C/H No	^1H δ ppm (<i>J</i> en Hz)	^{13}C δ ppm (<i>J</i> en Hz)	Numeración
2		142.3, s	
3	8.44, s	104.6, s	
5	9.83, t (0.5)	134.1, s	
6		123.0, s	
7	7.98, dd (1.5, 9.5)	125.8, s	
8	7.57, d (9.5)	114.9, s	
8a		141.1	
2'		142.5, s	
4'	7.63, s	129.4, s	
5'	7.25, s	128.8, s	
CH ₃	4.0, s	36.5, s	
COCF ₃		116.1, c (287.2)	
NH	12.54, s amplio		
NHCOCF ₃		154.5, c (38.4)	
CCOC		179.8, s	



El espectro de masas para el compuesto **11b** por el método de impacto electrónico mostró un pico base en 337 una correspondiente al ión molecular. Se observan además la pérdida de $\text{M}^+ -69$, correspondientes a trifluorometilo.

El espectro de infrarrojo para el compuesto **11b** mostró las siguientes señales en cm^{-1} : 3038 para C-H aromáticos, 3296 para el NH de la amida, 1724 para carbonilo además de 1637 y 1567 para la amida.

Para la asignación correcta de las señales en los espectros se realizaron las técnicas bidimensionales COSY, NOESY, HSQC y HMBC la Figura 21 muestra las interacciones más importantes encontradas con estos experimentos.

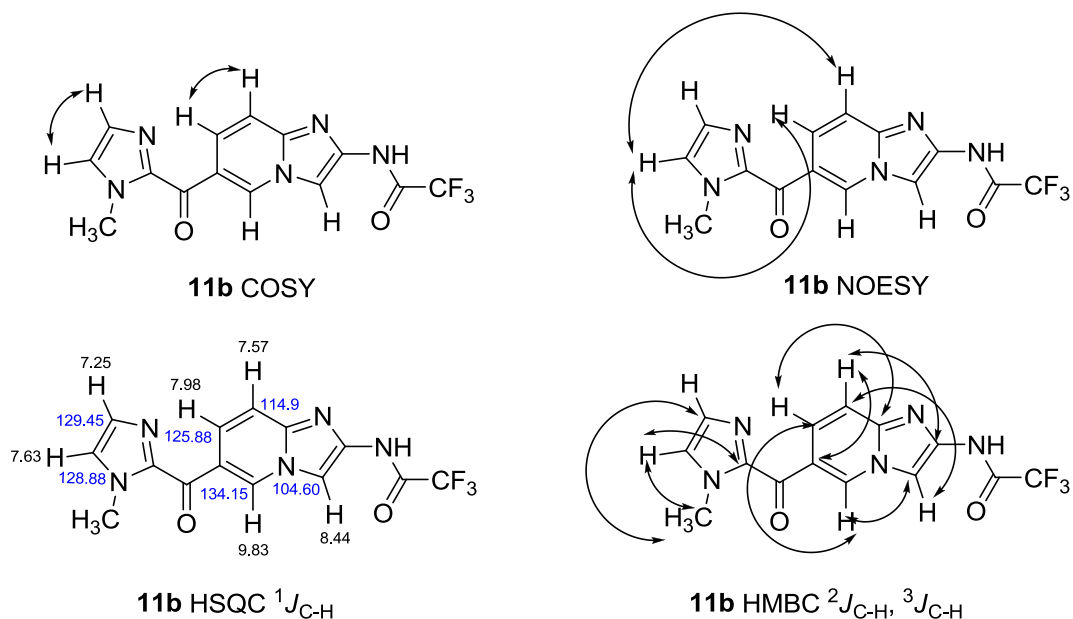


Figura 21. Experimentos COSY, NOESY, HSQC y HMBC para el compuesto **11b**.

10.1.2.10. Características espectroscópicas del compuesto **11c**

Los desplazamientos químicos de las señales presentes en el espectro de RMN ^1H y RMN ^{13}C para el compuesto **11c** se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Asignación de las señales presentes en el espectro de RMN ^1H y RMN ^{13}C para el compuesto **11c**.

C/H No	^1H δ ppm (J en Hz)	^{13}C δ ppm (J en Hz)	Numeración
2		142.4, s	<p>11c</p>
3	8.48, s	103.9, s	
5	10.09, s amplio	133.9, s	
6		123.5, s	
7	8.13, dd (1.8, 7.8)	126.1, s	
8	7.61, d (9.6)	114.3, s	
8a		141.1, s	
2'		145.5, s	
4'	7.47, s amplio	123.9, s	
5'	7.47, s amplio	123.9, s	
CO $\underline{\text{C}}$ CF ₃		115.8, c (288.3)	
NH	12.60, s amplio		
NH $\underline{\text{C}}$ OCF ₃		154.5, c (38.38)	
$\underline{\text{C}}$ OC		180.2, s	

El espectro de masas para el compuesto **11c** por el método de impacto electrónico mostró un pico base en 323 una correspondiente al ión molecular. Se observan además la pérdida de $M^+ -69$, correspondientes a trifluorometilo.

10.2. Actividades Biológicas

10.2.1. Citotoxicidad

Todos los compuestos fueron evaluados para su actividad citotóxica *in vitro* contra seis líneas celulares tumorales humanas (U251 carcinoma de glía, PC-3 próstata, K-562 leucemia, HCT-15 colon, MCF7 mama y SKLU-1 carcinoma de pulmón) utilizando el 5-fluorouracilo y olomucina como compuestos de referencia para citotoxicidad e inhibición de CDKs respectivamente y DMSO como control de disolvente. Un ensayo primario utilizando una concentración fija de 50 μ M mostró citotoxicidad de los compuestos sintetizados hacia las seis líneas celulares (Tabla 12) con porcentajes de inhibición mayores que los inducidos por el intermediario **5**. La Tabla 12 muestra que la mayoría de los compuestos sintetizados presentan una mayor inhibición del crecimiento que el 5-fluorouracilo y la olomucina. Los compuestos **6a**, **6c**, **6e** y **11a** fueron los más activos por lo que sus valores de CI_{50} (concentración a la que se inhibe el 50 % del crecimiento celular respecto al control de disolvente) fueron determinados (Tabla 13).

Como se muestra en la Tabla 4, MCF7 y SK-LU-1 fueron las líneas celulares más sensibles y los compuestos **6a**, **6c** y **11a** exhibieron los valores de CI_{50} más bajos (mayor actividad citotóxica) en todas las líneas celulares. La comparación de los datos de citotoxicidad para los compuestos **6a-6e** (Tablas 12 y 13) muestra que la sustitución con flúor en la posición 2 del benzoilo (compuestos **6c**, **6d** y **6e**) conduce a una mejor actividad citotóxica que la sustitución en posición 3 (**6a** y **6b**). Comparando la citotoxicidad de los compuestos **6a** con **6b** y **6c** con **6d** se observa que la sustitución de un grupo trifluorometilo en lugar de un grupo metilo en el anillo de benzoilo no confiere un efecto significativo sobre la actividad citotóxica de estos compuestos. Por otra parte, los compuestos **11a** y **11c** con sustituyentes heterocíclicos (indol e imidazol) en la posición 6 del anillo de imidazopiridina también mostraron actividad citotóxica

equiparable con la mostrada por los compuestos que contenían un grupo benzoilo en la misma posición.

Tabla 12

Citotoxicidad de los compuestos sintetizados contra seis líneas celulares. Tamizado primario a una concentración de 50 μ M.^a

Compuesto	Línea celular (% Inhibición del crecimiento)					
	U251	PC-3	K562	HCT-15	MCF7	SK-LU-1
5	20.77	50.91	33.14	56.28	36.70	25.59
6a	37.91	30.65	52.19	65.46	57.28	81.50
6b	38.41	32.61	50.12	59.22	56.46	48.32
6c	61.50	59.22	92.56	91.22	66.32	71.65
6d	59.30	61.50	88.00	91.70	65.10	70.50
6e	80.14	92.64	90.21	100	97.22	100
11a	92.70	63.70	95.50	78.00	80.40	69.20
11b	11.93	6.08	45.34	NA	30.77	29.17
11c	80.24	58.05	88.32	47.78	60.72	67.47
5-FU	64.20	45.40	73.70	71.30	55.14	60.50
olomucina	32.05	22.66	19.84	28.87	3756	36.9

^a Cada experimento fue realizado de manera independiente 2 veces a 48 h de exposición a los compuestos. NA= no activo.

Tabla 13

Valores de CI_{50} para los compuestos **6a**, **6c**, **6e**, **11a**, **11c** y olomucina en seis líneas celulares tumorales.^a

Compuesto	Línea Celular CI_{50} (μ M)					
	U251	PC-3	K562	HCT-15	MCF7	SK-LU-1
6a	80.63 \pm 2.1	ND	83.63 \pm 0.1	56.2 \pm 2.7	47.46 \pm 0.9	53.06 \pm 7.7
6b	84.23 \pm 4.5	69.12 \pm 1.5	83.25 \pm 3.1	57.15 \pm 3.2	50.77 \pm 1.3	57.12 \pm 3.1
6c	51.88 \pm 2.3	36.29 \pm 3.0	10.92 \pm 2.0	10.47 \pm 0.8	10.75 \pm 1.6	11.23 \pm 1.0
6e	52.28 \pm 4.6	28.04 \pm 1.9	56.65 \pm 3.3	25.03 \pm 1.5	24.95 \pm 2.1	35.10 \pm 4.3
11a	27.81 \pm 1.5	ND	54.62 \pm 5.4	65.15 \pm 4.3	44.28 \pm 0.1	24.81 \pm 0.4
11c	37.67 \pm 5.5	52.31 \pm 2.5	61.51 \pm 3.3	56.78 \pm 8.5	52.36 \pm 4.1	35.12 \pm 1.1
olomucina	81.49 \pm 2.1	81.04 \pm 7.4	89.35 \pm 1.9	62.46 \pm 3.0	55.91 \pm 1.1	68.11 \pm 0.41

^a Los resultados expresan el promedio de la $CI_{50} \pm$ DE obtenida de tres experimentos independientes. ND no determinada a las concentraciones utilizadas.

Con el fin de examinar los efectos en el ciclo celular, así como la inducción de la apoptosis e inhibición enzimática, fueron seleccionados los compuestos más activos en el

ensayo de citotoxicidad (Tabla 13) y representativos de cada patrón de sustitución (compuestos **6a**, **6c** y **11a**). Para esto se utilizaron las líneas celulares MCF7 y SK-LU-1, que mostraron ser las más sensibles en el ensayo de citotoxicidad (Tabla 13), cuyo origen además es representativo de los tipos de cáncer más frecuentes en México y el mundo entero.¹⁵¹

10.2.2. Análisis del ciclo celular

Para analizar como los compuestos **6a**, **6c**, y **11a** interfieren con la progresión del ciclo celular, las líneas celulares MCF7 y SK-LU-1 (más sensibles) asincrónicamente cultivadas fueron expuestas a dichos compuestos durante 24 h a concentraciones de $2XCl_{50}$, teñidas con yoduro de propidio y posteriormente analizadas por citometría de flujo para determinar la distribución de la población total en las diferentes fases del ciclo (G0/G1, S, and G2/M). Las células control tratadas únicamente con DMSO a la más alta concentración utilizada en los ensayos procedieron a través de un ciclo normal (Figura 22a y Tabla 14). Bajo las mismas condiciones, el tratamiento de las células de la línea MCF7 con el compuesto **6a** no mostraron alguna diferencia significativa en la distribución de su población comparada con el control (Figura 22b y Tabla 14). Cuando estas mismas células de cáncer de mama (MCF7) fueron tratadas con el compuesto **6c** se observó un incremento de la población celular en fase G0/G1 de 57.2 % para el control a un 74.1 % después del tratamiento, además de una disminución de la población en fases S y G2/M (Figura 22c y Tabla 14). El tratamiento con el compuesto **11a** sobre las células MCF7 originó un enriquecimiento de la población celular en fase G0/G1 de un 57.2 % para el control a un 70.6 % después del tratamiento. Así mismo, se observó un decremento de células en fase S y aquellas en fase G2/M no mostraron un cambio significativo respecto al control (Figura 22d y Tabla 14). El compuesto olomucina utilizado como control para la inhibición de CDKs no tuvo efecto en el ciclo celular de las células MCF7 a la concentración usada en el experimento (Tabla 14).

Los histogramas y el porcentaje de distribución de células SK-LU-1 tratadas únicamente con DMSO a la máxima concentración utilizada en el experimento (control) se muestran en la Figura 22e y la Tabla 14. Cuando las células de carcinoma de pulmón SK-LU-1 fueron tratadas con el compuesto **6a** una acumulación estadísticamente significativa de células en fase G2/M

fue observada, de 16.68 % para el control a un 60.59 % para las células tratadas; mientras que las células en fase S permanecieron sin cambio y la población en fase G0/G1 disminuyó significativamente de 61.72 % para el control a 22.56 % para las células tratadas. Se observó además, la aparición de una cantidad de células en fase sub G0/G1 (Figura 22f y Tabla 14). El compuesto **6c** causa un arresto más evidente en la fase G2/M con un 75.70 % de la población total en esta fase, con sólo un 10.37 % de células en fase G0/G1. La fase S permaneció sin cambio comparada con el control. En este experimento también fue posible observar una ligera cantidad de células en fase sub G0/G1 (Figura 22g y Tabla 14). El tratamiento con el compuesto **11a** induce una alteración del ciclo celular similar pero menos evidente, con arresto de la población celular en fase G2/M (47.52 %) con una disminución del porcentaje de células en fase G0/G1 (32.87 %), permaneciendo la fase S sin cambio respecto al control (Figura 22h y Tabla 14). El tratamiento con olomucina mostró una disminución de células en fase G0/G1 y un ligero arresto de células en fase G2/M mientras que las células en fase S permanecieron sin cambio.

Tabla 14

Distribución del porcentaje de células en cada fase del ciclo celular obtenido por citometría de flujo en células MCF7 y SK-LU-1 tratadas durante 24 h^a

Compuesto	MCF7			SK-LU-1		
	% G0/G1	%S	%G2/M	% G0/G1	%S	%G2/M
Control	57.23±3.4	16.98±1.2	22.12±0.1	61.72±2.9	18.17±1.5	16.68±0.9
6a	63.48±4.9	14.54±3.3	18.05±3.5	22.56±5.7*	16.24±5.3	60.59±1.1*
6c	74.08±2.4*	7.07±2.1*	13.35±2.4	10.37±11.9*	21.15±1.8	75.70±11.5*
11a	70.62±3.2	6.26±1.2*	20.17±0.3	32.87±6.1*	14.65±6.5	47.52±7.7*
olomucina	60.59±3.1	15.01±2.4	23.17±0.4	44.21±2.9*	19.67±8.5	31.82±3.6*

^a Los resultados expresan los promedios ±DE obtenidos de tres experimentos independientes.

* $P < 0.05$ al comparar con el control de disolvente (DMSO) después de 24h de tratamiento.

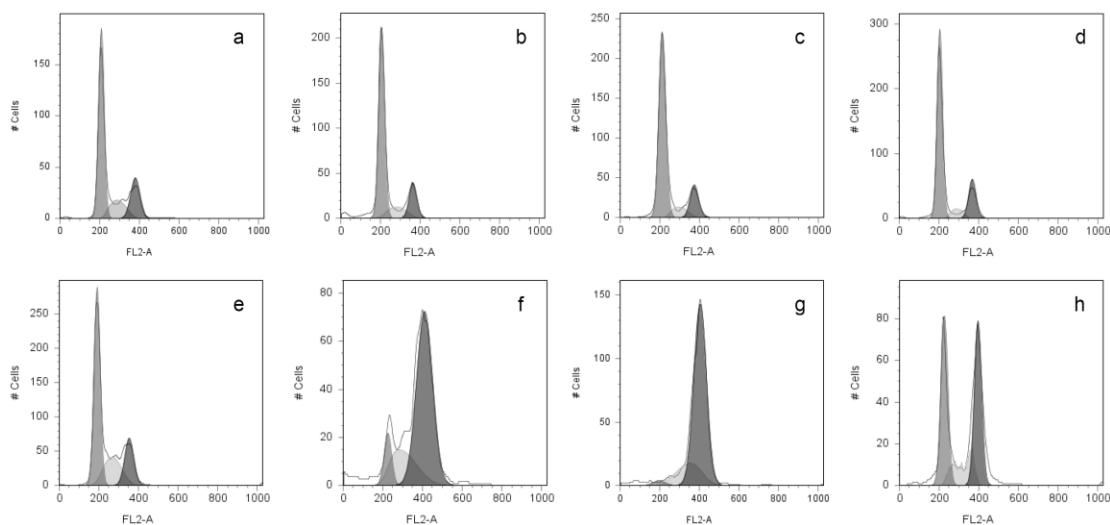


Figura 22. Los histogramas muestran la distribución de la población de células MCF7 en el ciclo después del tratamiento durante 24 h con a) DMSO control, b) **6a** (95 μM), c) **6c** (22 μM), d) **11a** (89 μM) y de células SK-LU-1 tratadas con e) DMSO control, f) **6a** (106 μM), g) **6c** (70 μM), y h) **11a** (50 μM). Las concentraciones utilizadas son el doble de su CI_{50} . Los histogramas son los más representativos de tres experimentos independientes.

10.2.3. Apoptosis

Uno de los métodos más utilizados para evaluar la presencia de apoptosis es aquel en el que se detectan los cambios en la posición de la fosfatidilserina en la membrana celular. En células no apoptóticas, las moléculas de fosfatidilserina están localizadas en la capa interna de la membrana plasmática; pero, justo después de inducir apoptosis la fosfatidilserina se redistribuye a la membrana externa quedando expuesta al medio extracelular.¹⁵² La exposición de la fosfatidilserina puede ser fácilmente detectada con Anexina V conjugada con un fluorógeno. La Anexina V es una proteína que tiene una fuerte afinidad por la fosfatidilserina por lo que puede ser utilizada para detectar células en apoptosis temprana mediante citometría de flujo. Sin embargo, conforme el proceso apoptótico progresa, la integridad de la membrana celular se pierde, por lo que es necesario utilizar colorantes que se unan específicamente al ADN como el yoduro de propidio con el fin de distinguir entre apoptosis temprana, tardía y células necróticas. Así en un histograma (Figura 23) de células a las cuales se les indujo apoptosis y fueron teñidas con Anexina V y PI, obtenido mediante citometría de flujo se pueden

observar cuatro cuadrantes en los que las células se ubicarían de la siguiente manera debido a su fluorescencia: cuadrante inferior izquierdo, células vivas; cuadrante inferior derecho, células en apoptosis temprana (teñidas únicamente con Anexina V), cuadrante superior derecho, células en apoptosis tardía (teñidas con Anexina V y PI); cuadrante superior izquierdo, células necróticas (teñidas únicamente con PI).

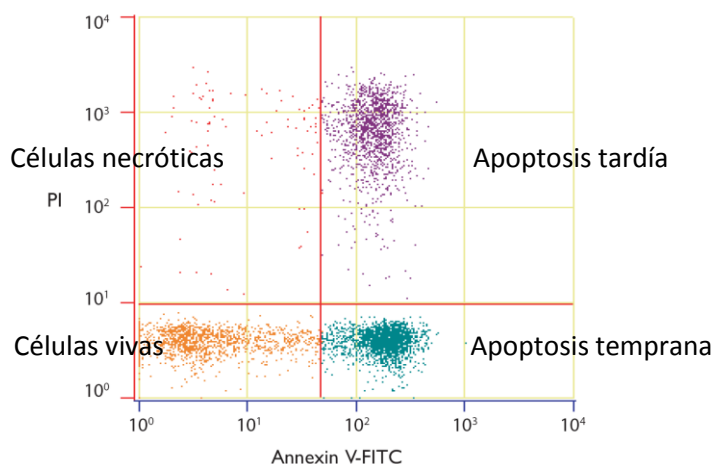


Figura 23. Histograma representativo de los cuadrantes que es posible observar mediante citometría de flujo de células a las que se les indujo apoptosis y fueron teñidas con Anexina V y PI

Para investigar el efecto de los compuestos **6a**, **6c** y **11a** con más detalle, examinamos si estos compuestos causan apoptosis en células SK-LU-1. La apoptosis fue evaluada determinando la exposición de fosfatidilserina en la membrana de las células SK-LU-1 junto con la fragmentación de su ADN después de 24 horas de exposición a los compuestos **6a**, **6c** y **11a** usando concentraciones de $106 \mu\text{M}$, $70 \mu\text{M}$ y $50 \mu\text{M}$ ($2XCI_{50}$). Después de los diferentes tratamientos las células fueron marcadas con un conjugado de Anexina V e isotiocianato de fluoresceína, además de yoduro de propidio y posteriormente analizadas con un citómetro de flujo. Los análisis muestran poblaciones de células teñidas con Anexina V correspondientes a poblaciones en fase apoptótica temprana y fase apoptótica tardía (Figura 24). La cuantificación del número de células apoptóticas (Figura 25) muestra que para el caso de las células SK-LU-1 tratadas con DMSO (control negativo) solo se observó un 5 % de células apoptóticas mientras que cuando fueron tratadas con el compuesto **6a** se obtuvo un porcentaje de 39 % de células

apoptóticas. El tratamiento con el compuesto **6c** indujo un 20 % de células apoptóticas y el compuesto **11a** causó un 24 % de apoptosis.

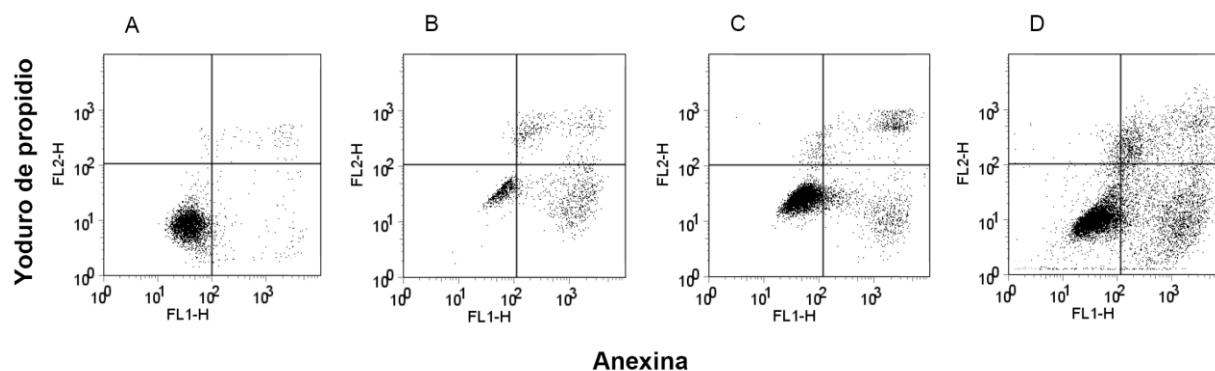


Figura 24. Apoptosis inducida en la línea celular SK-LU-1. La apoptosis fue evaluada por la exposición de fosfatidilserina en la membrana celular después de 48 h de tratamiento con a) DMSO como control negativo, b) **6a** (106 μ M), c) **6c** (70 μ M), y d) **11a** (50 μ M). Las concentraciones utilizadas son el doble de su CI_{50} . Los histogramas son los más representativos de tres experimentos independientes.

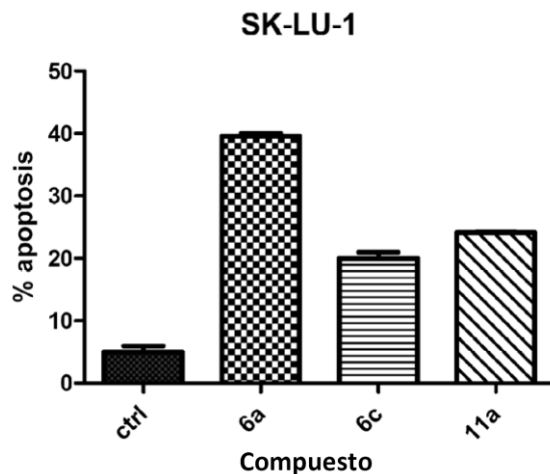


Figura 25. Apoptosis inducida en células SK-LU-1. Los porcentajes fueron 5 % para el control de DMSO, 39 % para el compuesto **6a**, 20 % para el compuesto **6c** y 24 % para el compuesto **11a**. Los porcentajes son el promedio de tres experimentos diferentes.

Con el fin de comprobar visualmente la inducción de apoptosis por parte de los compuestos seleccionados, además de observar si existía algún cambio morfológico en las células SK-LU-1, fue llevado a cabo un análisis celular mediante microscopia de fluorescencia utilizando la técnica de TUNEL (Figura 26). La Figura 26a muestra el control negativo de la técnica, en el que se observa la morfología normal de las células SK-LU-1 con un tamaño promedio de 10 μm . La Figura 26b muestra células SK-LU-1 tratadas con ADNasa (control positivo de la técnica), estas células se observan básicamente con la misma morfología que las células del control negativo, observándose la fluorescencia verde indicativa de la degradación internucleosomal de ADN inducida por la ADNasa. La figura 26c muestra células SK-LU-1 tratadas con el compuesto **6a** (106 μM). En ella se observan células apoptóticas que presentan la fluorescencia verde indicativa de degradación de ADN. Las células presentan una morfología diferente a las células control, observándose células con cromatina condensada, núcleos fragmentados y un patrón punteado tanto dentro como fuera de las células que sugiere la presencia de cuerpos apoptóticos. Con respecto al tamaño en estas células, se observa un tanto aumentado aunque no de una manera considerable. La figura 26d muestra células SK-LU-1 tratadas con el compuesto **6c** (70 μM), en ella se observan células apoptóticas que presentan la fluorescencia verde en sus núcleos (algunos fragmentados) indicativa de degradación de ADN. La morfología de estas células es significativamente diferente de las células control pues presentan un gran aumento en su tamaño, se observan alargadas con extensiones del citoplasma lo que concuerda con el arresto en G2/M observado en la citometría de flujo pues esta morfología es similar a la de una célula preparándose para dividirse. La figura 26e muestra células SK-LU-1 tratadas con el compuesto **11a** (50 μM), en ella se observan células apoptóticas que presentan la fluorescencia verde indicativa de degradación de ADN. Las células presentan una morfología diferente a las células control, se observan tanto células con cromatina condensada, como células con núcleos fragmentados y un patrón punteado tanto dentro como fuera de las células lo cual sugiere la presencia de cuerpos apoptóticos, el tamaño de estas células también se encuentra ligeramente aumentado.

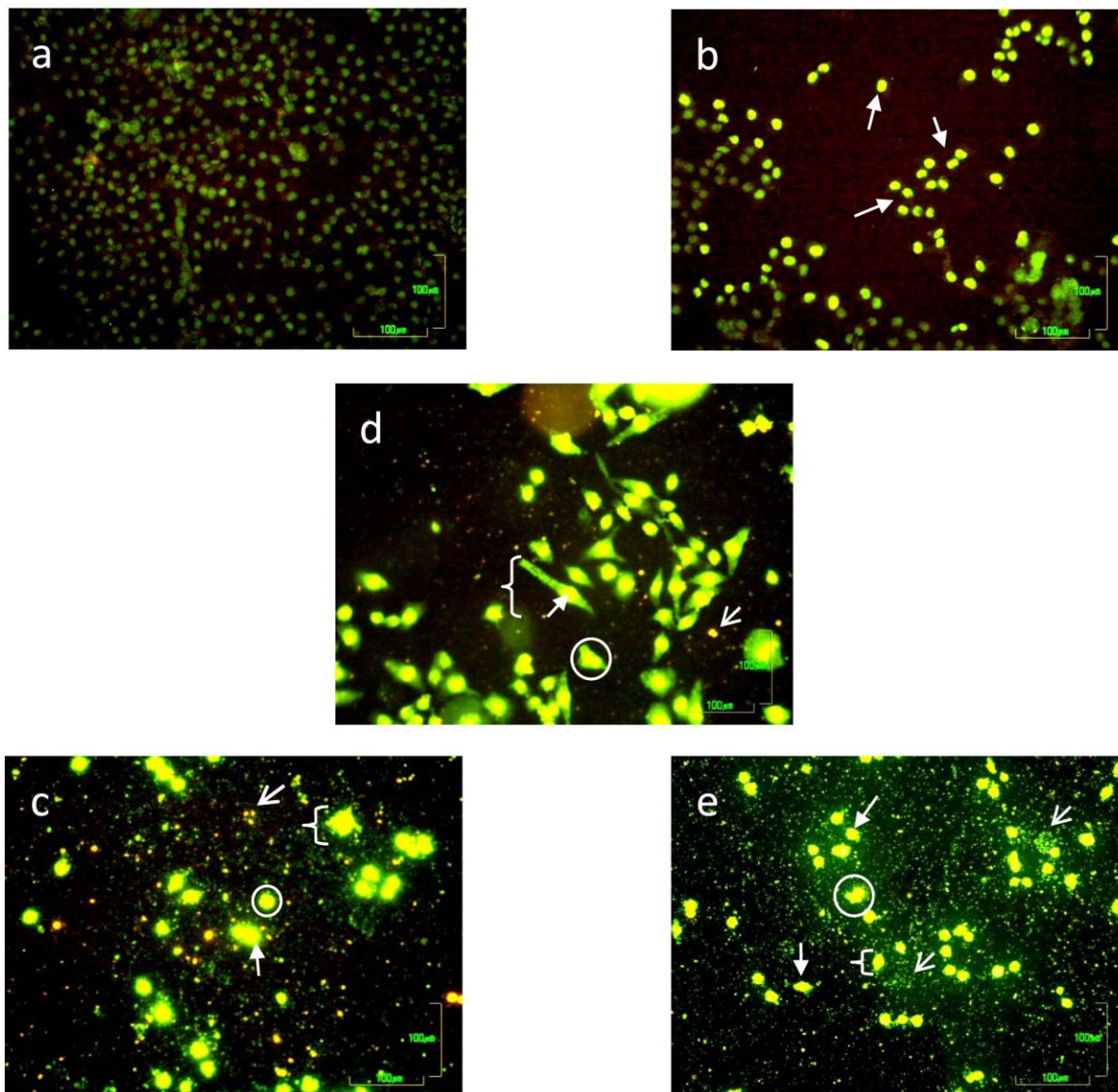


Figura 26. Análisis celular mediante microscopía de fluorescencia utilizando la técnica de TUNEL. a) Control negativo, morfología normal de las células SK-LU-1. b) Células SK-LU-1 tratadas con DNAsa (control positivo). c) Células SK-LU-1 tratadas con el compuesto **6a** (106 μM). d) Células SK-LU-1 tratadas con el compuesto **6c** (70 μM). e) Células SK-LU-1 tratadas con el compuesto **11a** (50 μM). Las flechas con punta cerrada muestran células con fluorescencia verde (degradación de ADN). Los círculos muestran células con cromatina condensada y núcleos fragmentados. Los corchetes indican un tamaño aumentado en las células y las flechas con punta abierta muestran el patrón punteado característico de la presencia de cuerpos apoptóticos.

10.2.4. Inhibición de las actividades enzimáticas de CDK1 y CDK2.

Debido a que se ha reportado que las imidazo[1,2-*a*]piridinas muestran inhibición contra CDK 2 y CDK 1 in vitro,^{1, 153} se analizaron las actividades de los complejos enzimáticos CDK 1-ciclina B y CDK 2-ciclina E en presencia de los compuestos **6a**, **6c**, **11a**, **11b** y **11c** (Tabla 15). Con el fin de comparar el grado de inhibición enzimática de estos compuestos con aquel generado por la olomucina (un inhibidor de CDKs), se realizó una determinación cuantitativa de un solo punto a una concentración de 7 μ M que es la CI_{50} para la olomucina.¹⁵⁴ Los resultados muestran que los compuestos **6a**, **6c**, **11a**, **11b** y **11c** inhiben la actividad del complejo enzimático CDK 1-ciclina B. Se observa que los compuestos **6a**, **11a**, **11b** y **11c** tienen un porcentaje de inhibición del complejo CDK 1-ciclina B mayor que el de la olomucina (control positivo) a esta misma concentración, mientras que el compuesto **6c** no mostró inhibición para este complejo a la misma concentración. Para el caso del complejo CDK 2-ciclina E también se observa un efecto inhibitorio mayor al 40 % para los compuestos probados (Tabla 15) excepto para los compuestos **6e** y **11c** con porcentajes de inhibición de 29 y 37 % respectivamente. En cuanto a la selectividad hacia estos dos complejos, los resultados de la Tabla 15 muestran que los compuestos **6c**, **11a**, **11b** y **11c** tienen una mayor especificidad hacia el complejo CDK 1-ciclina B, mientras que los compuestos **6a**, y **6e** muestran mayor afinidad por el complejo CDK 2-ciclina E. Los resultados de inhibición enzimática concuerdan con los obtenidos en el análisis del ciclo celular, puesto que fue observado un arresto significativo de las células SK-LU-1 en fase G2/M cuando fueron tratadas con los compuestos **6c** y **11a**, que son capaces de inhibir el complejo CDK 1-ciclina B que es el encargado de dirigir el progreso celular a través de la fase G2/M.

Tabla 15

Datos de inhibición enzimática para los compuestos **6a**, **6c**, y **11a**.^a

Ciclina/CDK	Compuesto (% de inhibición)						Olo
	6a	6c	6e	11a	11b	11c	
B/CDK1	29	83	SA	61	54	62	50
E/CDK2	44	49	29	45	44	37	51

^a Los valores son el promedio de dos experimentos diferentes llevados a cabo con una concentración de 7 μ M para cada compuesto. SA = sin actividad.

11. CONCLUSIONES

Mediante la ruta sintética de cuatro pasos descrita en el presente trabajo, es posible obtener el núcleo de 6-yodo-2-(trifluoroacetamido)imidazo[1,2-*a*]piridina y a excepción del primer paso es posible obtener los intermediarios en cada paso sin necesidad de purificación (únicamente lavados) y con buenos rendimientos.

El intercambio metal halógeno entre el núcleo de 6-yodo-2-(trifluoroacetamido)imidazo[1,2-*a*]piridina con cloruro de isopropilmagnesio y la subsiguiente reacción con el correspondiente aldehído es un método sintético eficiente para la obtención de imidazo[1,2-*a*]piridinas sustituidas en la posición 6 con rendimientos cercanos al 30 %, tal fue el caso de los compuestos **6a-e**.

Los compuestos **11a-c** fueron sintetizados en buenos rendimientos a través de la correspondiente diaril cetona y posteriormente la formación del anillo de imidazopiridina.

Todos los compuestos pudieron ser plenamente caracterizados mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

La actividad antiproliferativa de las 2-(N-trifluoroacetilamino)imidazopiridinas 6-sustituidas fue evaluada contra una variedad de líneas celulares tumorales. La mayoría de los compuestos sintetizados mostraron una moderada citotoxicidad en el rango micromolar, especialmente contra las líneas MCF7 y SK-LU-1. Los compuestos **6a**, **6c** y **11a** ocasionaron un arresto significativo, en la fase G2/M seguido de muerte celular apoptótica en células SK-LU-1. Los resultados muestran que los efectos causados por los compuestos **6a**, **6c** y **11a** podrían ser debidos a la inhibición de la actividad de los complejos CDK 1-Ciclina B y CDK 2-Ciclina A, aunque otros mecanismos podrían también estar involucrados. Los resultados aquí descritos pueden proporcionar un mayor conocimiento de los requerimientos estructurales de esta clase de moléculas para aumentar su actividad biológica.

12. PERSPECTIVAS

En la actualidad existen tecnologías avanzadas que permiten el diseño de fármacos basado en su estructura, la genética química y eficaces plataformas de tamizado para investigar la actividad de compuestos y su selectividad hacia un objetivo. Es de suponerse que nuevos compuestos con potencia incrementada, especificidad mejorada y propiedades farmacocinéticas favorables puedan estar disponibles en un futuro cercano para su evaluación clínica. Los estudios actuales están abasteciendo nuevas estructuras que contienen moléculas líderes para el diseño de inhibidores, información acerca de sitios adicionales de acoplamiento sobre cinasas específicas, así como una lista cada vez más grande de cinasas como objetivos potenciales, lo cual tiene una gran relevancia sobre la generación de nuevos métodos que permitan desarrollar o redescubrir fármacos contra el cáncer así como conocer su mecanismo de acción.

Las ideas que actualmente han emergido sobre el requerimiento concreto de CDKs específicas para la supervivencia de células tumorales definidas, ofrecen la oportunidad para diseñar ensayos clínicos que involucren la especificidad del fármaco candidato con el tipo de cáncer a combatir. En este contexto, las tecnologías genómicas podrían ser usadas para identificar a los pacientes que pudieran beneficiarse mayormente en base al perfil de sus mutaciones oncogénicas. Las metas de la investigación actual también incluyen el establecimiento de bases racionales para combinar inhibidores de CDKs con fármacos quimioterapéuticos clásicos para aumentar la eficacia clínica, inhibiendo cinasas que señalicen el daño al ADN para aumentar la sensibilidad de las células cancerosas a agentes genotóxicos y haciendo blanco en Cinasas SAC para destruir selectivamente células tumorales al incrementar su inestabilidad cromosomal intrínseca.

13. PROTOCOLO EXPERIMENTAL.

Todas las reacciones que incluyen reactivos sensibles al aire, fueron llevadas a cabo en atmósfera inerte (Nitrógeno o Argón). El material de vidrio fue secado en un horno a 110 °C antes de ser usado. Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato MEL-TEMP® y no están corregidos. Los espectros de infrarrojo fueron determinados en los espectrofotómetros Perkin-Elmer 282-B y Nicolet FT-IR magna 55X. Los espectros de masas fueron determinados en un espectrómetro JEOL JMS-SX 10217 (IE). Los espectros de RMN ¹H fueron determinados en los espectrómetros Varian Gemini 200 MHz, Varian Unity 300 MHz y Varian Inova 500 MHz (RMN ¹H y 125 MHz ¹³C RMN). Los desplazamientos químicos están expresados como valores δ en relación al TMS como estándar interno, los valores *J* están expresados en Hz. Los espectros fueron determinados en CDCl₃, DMSO-*d*₆ o una mezcla de ambos. La cromatografía en columna Flash fue llevada a cabo utilizando sílica gel 60 (230-400 mm).

Los reactivos utilizados fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis MO.) y fueron utilizados sin purificar, a menos que se indique lo contrario. El THF utilizado fue destilado de Na-benzofenona bajo atmósfera de N₂.

13.1 Síntesis

2-Amino-5-yodo-piridina (2)

Una mezcla de 2-aminopiridina **1** (2.4 g, 25 mmol), ácido peryódico dihidratado (0.86 g, 3.75 mmol), y yodo (2.7 g, 10.7 mmol) se calentó en conjunto con una disolución de ácido acético (60 mL), agua (3 mL), y ácido sulfúrico (0.5 mL) a 80 °C por 4 h. La mezcla de reacción posteriormente se vertió en una disolución acuosa al 10 % de Na₂S₂O₃ para eliminar todo el yodo sin reaccionar, y posteriormente se extrajo con éter. El extracto se lavó con una solución acuosa de NaOH al 10 %, se secó con Na₂SO₄ y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en sílica gel (AcOEt:Hexano). El compuesto **2** se obtuvo como prismas color amarillo pálido después de su recristalización de etanol (4.7 g, 21.5 mmol, 86 % de rendimiento); p.f. 130 ° (132-133 °C).¹⁴⁴

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ = 4.25 (s amplio, 2H), 6.38 (d, 1H, J = 8.4 Hz), 7.64 (dd, 1H, J = 8.4 y 6 Hz), 8.21 (d, 1H, J = 1.8 Hz). $\text{C}_5\text{H}_5\text{IN}_2$ PM. Calc 220.96. EM (FAB $^+$) m/z: 221 (M + H) $^+$

5-Yodo-N-tosilpiridin-2(1 H)-imina (3)

Se disolvieron 2.2 g (10 mmol) de 2-amino-5-yodo-piridina **2** en piridina anhidra (10 mL) y se adicionaron 2.1 g (11 mmol) de cloruro de *p*-toluensulfonilo. La disolución se calentó a 90 °C toda la noche bajo atmósfera de nitrógeno. Después de remover la piridina al vacío se obtuvo un sólido café al cual se le agregó agua (200 mL) y se agitó por una hora. El sólido se filtró y secó al vacío para obtenerse **3** como un sólido color beige sin recristalizar (3.5 g, 9.4 mmol, 94 % de rendimiento); p. f. 177-178 °C sin recristalizar (180 °C 153).

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3): δ = 2.34 (s, 3H), 6.92 (d, 1H, J = 8.7 Hz), 7.56 (sistema AA' BB', 4H, J = 8.1 Hz), 7.98 (dd, 1H, J =8.6 y 2.1 Hz), 8.34 (d, 1H, J = 2.2 Hz), 11.23 (s amplio, 1H, NH). $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{IN}_2\text{O}_2\text{S}$ PM. calc 374.2. EM (FAB $^+$) m/z: 375 (M + H) $^+$

(E)-2-(5-yodo-2-(tosilimino)piridin-1(2H)-il)acetamida (4)

A una suspensión de **3** (3.7 g, 10 mmol) en DMF anhidra (20 mL) se le adicionó *i*-Pr $_2$ NEt (1.42 g, 11 mmol) bajo atmósfera de argón, se agitó durante 5 minutos y posteriormente a la disolución se le adicionó 2-yodoacetamida (2.1 g, 11 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente toda la noche, se vertió en agua (50 mL), se filtró, se lavó con agua (200 mL) y se secó al vacío para obtener el compuesto **4** como un sólido blanco sin recristalizar (3.8 g, 8.8 mmol, 88 %) p.f. 245 °C (246-247 °C 153)

RMN ^1H (200 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 2.37 (s, 3H), 4.79 (s, 2H), 6.31 (s amplio, 1H, NH), 7.22 (d, 2H, J = 8.19 Hz), 7.37 (d, 1H, J = 9.39 Hz), 7.53 (s amplio, 1H, NH), 7.63 (dd, 1H, J = 2, 9.66 Hz), 7.75 (d, 2H, J = 8.19 Hz), 7.90 (d, 1H, J = 2.2 Hz). $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{IN}_3\text{O}_3\text{S}$ PM. calc 431.25. EM (FAB $^+$) m/z: 432 (M+H) $^+$

6-Yodo-2-(trifluoroacetamido)imidazo[1,2-a]piridina (5).

A una suspensión de **4** (2.16 g, 5 mmol) en diclorometano anhidro (40 mL) se le adicionó anhídrido trifluoroacético hasta disolución y se refluxó durante 6 h. Consecutivamente, los disolventes se removieron al vacío y el sólido se suspendió en EtOAc (100 mL) y se agitó durante 30 min. El sólido se filtró y resuspendió en agua (100 mL) por 30 min. Posteriormente el sólido se filtró nuevamente y secó al vacío para obtenerse 1.2 g de **5** (3.38 mmol 65%) sin recristalizar, p.f. 245-246 °C (247 °C).¹⁵³

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃ + DMSO-*d*₆): δ=7.28 (d, 1H, *J*= 9.5 Hz), 7.39 (dd, 1H, *J*= 1.5 y 9.5 Hz), 8.17 (s, 1H), 8.69 (dd, 1H, *J*= 0.5 y 1.5 Hz), 12.10 (s amplio, 1H, NH).

¹³C RMN (125.7 MHz, CDCl₃ + DMSO- *d*₆): δ= 74.6 (C), 102.1 (C), 115.3 (C, *J*_{CF}= 287.2 Hz, COCF₃), 116.7 (CH), 130.7 (CH), 132.3 (CH), 139.3 (CH), 139.7 (C), 154.0 (C, *J*_{CF}= 38.6, COCF₃). C₉H₅F₃IN₃O PM. Calc. 355.06 EM (FAB⁺): *m/z* = 356 (M + H)⁺.

Procedimiento general para la síntesis de los compuestos 6a-e:

A una solución de **5** (354.9 mg, 1 mmol) en THF (10 mL) a -40 °C con agitación magnética y bajo atmósfera de argón, se le adicionó una disolución de *i*-PrMgCl 2 M en THF (1 mL, 2mmol), la adición se llevó a cabo lentamente durante 2 minutos. La agitación se continuó durante una hora a -40 °C antes de adicionar trietilamina (1 mL, 2 mmol). Después de 15 minutos, se adicionó el aldehído correspondiente (4 mmol), la mezcla de reacción se agitó toda la noche a temperatura ambiente y posteriormente se trató con una solución saturada de NH₄Cl (10 mL) y se lavó con agua (5 mL) para disolver el precipitado formado. La mezcla se extrajo con CH₂Cl₂ (3 × 10 mL) y las fases orgánicas resultantes se mezclaron, se secaron con Na₂SO₄ y se hicieron reaccionar con dióxido de manganeso (1.5 g, 17 mmol) a reflujo hasta que la reacción se completó (monitoreo por cromatografía en capa fina), la reacción se filtró sobre celita, la cual se lavó con diclorometano y acetona. Los disolventes se evaporaron al vacío y el sólido residual se purificó por cromatografía en columna de sílica gel (AcOEt:Hexano) para obtener los productos **6a-e**.

2, 2, 2-Trifluoro-N-(6-(3-fluoro-4-metilbenzoil)imidazo[1,2-a]piridin-2-il)acetamida (6a)

El compuesto **6a** se preparó de acuerdo al procedimiento general descrito anteriormente a partir del 3-fluoro-4-metilbenzaldehído como electrófilo y aislado como un sólido amarillo sin recristalizar (109 mg, 0.3 mmol) 30 % de rendimiento, p.f. 210 °C.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃ + DMSO-*d*₆): δ= 2.31 (d, 3H, *J*= 1.5 Hz), 7.33 (dd, 1H, *J*_{HH}= 7.5 y *J*_{HF}= 7.5 Hz), 7.41 (dd, 1H, *J*= 2 y 8 Hz), 7.46 (dd, 1H, *J*= 2 y 7.5 Hz), 7.47 (d, 1H, *J*= 7 Hz), 7.60 (dd, 1H, *J*= 1.5 y 9.0 Hz), 8.26 (s amplio, 1H), 8.92 (s amplio, 1H), 12.09 (s amplio, 1H). ¹³C RMN (125.7 MHz, CDCl₃ + DMSO- *d*₆): δ= 14.2 (d, CH, *J*= 2.8 Hz), 103.6 (CH), 115.2 (CH), 115.3(c, *J*_{CF}= 288.98 Hz), 115.4 (d, CH, *J*_{CF}= 24 Hz), 122.3(C), 124.3 (CH), 129.5 (d, C, *J*_{CF}= 17.50 Hz), 129.9 (d, CH, *J*_{CF}= 1.7 Hz), 131.2 (d, CH, *J*_{CF}= 4.7 Hz), 131.5 (CH), 136.2 (d, CH, *J*_{CF}= 6.4 Hz), 140.7 (C), 141.6 (C), 154.1 (c, *J*_{CF}= 38.7 Hz), 160.2 (d, CF, *J*_{CF}= 246.6 Hz), 190.8 (C). C₁₇H₁₁F₄N₃O₂ PM calcd 365.28 EM (IE) (m/z, %): 365 (M⁺, 100), 296 (35), 256 (20), 137 (22). IR (KBr, cm⁻¹): 3115, 3028, 1730, 1655, 1597.

2, 2, 2-trifluoro-N-(6-(3-fluoro-4-(trifluorometil)benzoil)imidazo[1,2-a]piridin-2-il)acetamida (6b)

El compuesto **6b** fue preparado de acuerdo al procedimiento general a partir del 2-fluoro-5-trifluorometilbenzaldehído como electrófilo y aislado como un sólido amarillo sin recristalizar (126 mg, 0.3 mmol) 30 % de rendimiento, p.f. 120 °C.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃ + DMSO-*d*₆): δ= 7.35 (dd, 1H, *J*_{HH}= 7.5 y *J*_{HF}= 7.5 Hz), 7.44 (dd, 1H, *J*= 2 y 8 Hz), 7.47 (dd, 1H, *J*= 2 y 7.5 Hz), 7.48 (d, 1H, *J*= 7 Hz), 7.57 (dd, 1H, *J*= 1.5 y 9.0 Hz), 8.36 (s amplio, 1H), 8.89 (s amplio, 1H), 12.21 (s amplio, 1H). RMN ¹³C (125.7 MHz, CDCl₃ + DMSO- *d*₆): δ= 102.4 (CH), 115.0 (CH), 115.4 (c, *J*_{CF}= 287.2 Hz), 115.6 (d, CH, *J*_{CF}= 24 Hz), 122.1(C), 122.3 (c, *J*_{CF}= 288.9 Hz) 124.3 (CH), 128.9 (d, C, *J*_{CF}= 17.50 Hz), 129.6 (d, CH, *J*_{CF}= 1.7 Hz), 131.2 (d, CH, *J*_{CF}= 4.7 Hz), 131.5 (CH), 136.2 (d, CH, *J*_{CF}= 6.4 Hz), 140.7 (C), 141.6 (C), 154.3 (c, *J*_{CF}= 38.7 Hz), 160.6 (d, CF, *J*_{CF}= 246.6 Hz), 189.8 (C). C₁₇H₈F₇N₃O₂ PM calcd 419.25 EM (IE) (m/z, %): 419 (M⁺, 100), 400 (15), 350 (95), 191 (63). IR (KBr, cm⁻¹): 3118, 3027, 1750, 1645, 1610.

2, 2, 2-Trifluoro-N-(6-(2-fluoro-5-metilbenzoil)imidazo[1,2-a]piridin-2-il)acetamida (6c)

El compuesto **6c** fue preparado de acuerdo al procedimiento general descrito, a partir del 2-fluoro-5-metilbenzaldehído y aislado como un sólido amarillo (sin recristalizar) en un 35 % de rendimiento (128 mg, 0.35 mmol), p.f. 208-210 °C

RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ= 2.36 (s, 3H, CH₃), 7.29 (dd, 1H, *J*=1.5 y 8.5 Hz), 7.43 (dd, 1H, *J*= 2.0 y 4.5 Hz), 7.49 (cddd, 1H, *J*= 0.5, 2.0, 7 y 8.5 Hz), 7.63 (t, 1H, *J*= 1 y 2 Hz), 7.69 (dd, 1H, *J*= 2 y 7.5 Hz), 8.41 (s, 1H), 9.16 (dd, 1H, *J*=1 y 1.5 Hz), 12.58 (s amplio, 1H, NH). RMN¹³C (125.7 MHz, DMSO-*d*₆): δ= 20.0 (CH₃), 104.31 (CH), 115.8 (c, *J* = 287.22 Hz), 115.56 (CH), 116.10 (d, CH, *J*= 22.12 Hz), 123.10 (C), 123.8 (CH), 125.6 (C), 130.4 (CH), 133.48 (CH), 133.9 (d, CH, *J*= 7.29 Hz), 134.12 (C), 140.7 (C), 142.0 (C), 154.12 (c, *J*= 77.3 Hz), 157.45 (d, *J*_{CF}= 246.75 Hz), 189.82 (C). RMN ¹⁹F (282.2 MHz, DMSO-*d*₆) δ= -117.28 (td, F, *J*= 2.0, 7 y 8.5 Hz), -72.0 (CF₃). C₁₇H₁₁F₄N₃O₂ PM calcd 365.28 EM (IE) (m/z, %): 365 (M⁺, 100), 296 (35), 256 (20), 137 (22). IR (KBr, cm⁻¹): 3258, 3093, 1718, 1615, 1564, 1212, 1147.

2,2,2-trifluoro-N-(6-(2-fluoro-5-(trifluorometil)benzoil)imidazo[1,2-a]piridin-2il)acetamida (6d)

El compuesto **6d** fue preparado de acuerdo al procedimiento general descrito, a partir del 2-fluoro-5-trifluorometilbenzaldehído como electrófilo y aislado como un sólido amarillo en un 30 % de rendimiento (126 mg, 0.3 mmol), p.f 145-147 °C sin recristalizar.

RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.25 (dd, 1H, *J*=1.5 y 8.5 Hz), 7.39 (dd, 1H, *J*= 2.0 y 4.5 Hz), 7.46 (cddd, 1H, *J*= 0.5, 2.0, 7 y 8.5 Hz), 7.53 (dd, 1H, *J*= 1 y 2 Hz), 7.69 (dd, 1H, *J*= 2 y 7.5 Hz), 8.41 (s, 1H), 9.12 (dd, 1H, *J*=1 y 1.5 Hz), 12.48 (s amplio, 1H, NH). ¹³C NMR (125.7 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 104.19 (CH), 115.26 (CH), 115.8 (c, *J* = 287.22 Hz), 116.1 (d, CH, *J*= 22.12 Hz), 123.10 (C), 123.8 (CH), 124.10 (c, *J*= 246.75 Hz) 126.6 (C), 131.4 (CH), 133.48 (dd, *J* = 34 Hz, C), 133.9 (d, CH, *J*= 7.29 Hz), 134.12 (C), 141.2 (C), 142.2 (C), 153.9 (c, *J*= 246.75 Hz), 157.45 (d, *J*= 77.3 Hz), 188.61 (C). C₁₇H₈F₇N₃O₂ PM calcd 419.25 EM (IE) (m/z, %): 419 (M⁺, 100), 400 (15), 350 (95). IR (KBr, cm⁻¹): 3014, 3265, 1725, 1670, 1615.

2, 2, 2-Trifluoro-N-(6-(2-fluoro-4-(trifluorometil)benzoil)imidazo[1,2-a]piridin-2-il)acetamida (6e)

El compuesto **6e** fue preparado de acuerdo al procedimiento general, a partir del 2-fluoro-4-trifluorometilbenzaldehído como electrófilo y aislado como un sólido amarillo en un 32 % de rendimiento (134 mg, 0.32 mmol), p.f. 100-102 °C sin recrystalizar.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ= 7.53 (d, 1H, *J*= 9Hz), 7.55 (d, 1H, *J*= 9 Hz), 7.63 (dd, 1H, *J*= 8.5 Hz), 7.73 (t, 1H, *J*= 7 Hz), 7.77 (dt, 1H, *J*= 1 y 9 Hz), 8.26 (s, 1H), 8.63 (s, 1H), 11.20 (s amplio, 1H). ¹³C NMR (125.7 MHz, CDCl₃): δ= 103.73 (CH), 114.27 (CH), 115.57 (c, CF₃, *J*= 289.9 Hz), 116.13 (CH), 121.85 (CH), 122.5 (c, CF₃, *J*= 289.9 Hz), 124 (C), 125 (CH), 129.18 (C), 131.30 (CH), 131.38 (CH), 135.6 (dd, *J*= 34 Hz, C), 140.8 (C), 142.70 (C), 154.7 (CO), 159.30 (d, *J*_{CF}= 254.4 MHz), 188.3 (CO). C₁₇H₈F₇N₃O₂; PM calcd 419.25. EM (IE) (m/z, %): 419 (M⁺, 100), 400 (15), 350 (95), 191 (63). IR (KBr, cm⁻¹): 3180, 3033, 1726, 1630, 1572.

6-(cloropiridin-3-il-1-metil-1H-indol-3-il)metanona (7a)

Una suspensión de cloruro de aluminio III (10.67 g, 80 mmol) en diclorometano anhidro (15 mL) se enfrió a 0 °C y se le adicionó lentamente cloruro de 6-cloronicotínico (7.74 g, 44 mmol) durante un periodo de 5 minutos, la mezcla resultante se llevó a temperatura ambiente durante 30 min., se reenfrió a 0 °C y se le adicionó gota a gota durante 15 minutos una disolución de *N*-metilindol (5 g, 40 mmol) en 25 mL de diclorometano. Después, la reacción se reflujo durante 4 h, la mezcla de reacción se vertió sobre acetato de etilo (300 mL) y se le adicionaron 100 mL de NaOH 2N. El precipitado resultante se filtró, la fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄, los disolventes se removieron al vacío y el sólido se purificó por cromatografía en columna de sílica gel (AcOEt:Hexano), para obtener **7a** en un 90 % de rendimiento (9.72 g, 36 mmol), p.f. 89 °C sin recrystalizar.

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ= 3.88 (s, 3H, CH₃), 7.37 (t, 1H, *J*= 4.8 Hz), 7.40 (t, 1H, *J*=5.2 Hz), 7.45 (d, 1H, *J*= 0.8 Hz), 7.49 (d, 1H, *J*= 0.8 Hz), 7.53 (s, 1H), 8.10 (dd, 1H, *J*= 2.4 y 5.8 Hz), 8.39 (dt, 1H, *J*= 6 y 1.6 Hz), 8.81 (d, 1H, *J*= 2.4 Hz). C₁₅H₁₁ClN₂O PM calcd 270.71. EM (IE) (m/z, %): 270 (M⁺, 78), 158 (100). IR (KBr, cm⁻¹): 3048, 1631, 1524, 1364, 1100.

6-(cloropiridin-3-il-1-metil-1H-imidazol-2-il)metanona (7b)

Se disolvió 1-metil-1H-imidazol (2.07 g, 25.21 mmol) en diclorometano anhidro (50 mL) y se enfrió a -60 °C bajo atmósfera de argón. A la disolución se le adicionó gota a gota *n*-butillitio 1.6 M (18.9 mL, 30.25 mmol) en un periodo de 15 min. Después de 1 h a -60 °C, se le adicionó gota a gota una disolución de la amida de Weinreb 6-cloro-*N*-metilnicotinamida **13** (6.06 g, 30.25 mmol) en 20 mL de diclorometano, cuidando que la temperatura se mantuviera debajo de -50 °C. La mezcla se agitó durante 4 h a temperatura ambiente y posteriormente se trató con una disolución de cloruro de amonio (20 mL). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y se purificó por columna de sílica gel (AcOEt:Hexano) para obtener **7b** en un 82 % de rendimiento (4.57 g, 20.67 mmol), p.f. 104-105 °C recristalizado en metanol.

RMN ¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 4.11 (s, 3H, CH₃), 7.17 (s, 1H), 7.26 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz), 7.44 (dd, 1H, *J* = 0.6 y 8.2 Hz), 8.64 (dd, 1H, *J* = 2.6, 5.8 Hz), 9.29 (dd, 1H, *J* = 0.6 y 1.8 Hz). C₁₀H₈ClN₃O, PM calcd 221.64. EM (IE) (*m/z*, %): 220 (M⁺-1, 100), 192 (85), 186 (55). IR (KBr, cm⁻¹): 3106, 1642, 1406, 1262, 1180, 900, 776.

6-(cloropiridin-3-il-1H-imidazol-2-il)metanona (7c)

Una disolución de cloruro de 6-cloronicotínico (544.6 mg, 8 mmol) en 10 mL de diclorometano se adicionó gota a gota a una disolución de imidazol (2.82 g, 16 mmol) y trietilamina (1.62 g, 16 mmol) en piridina (5 mL) a 0 °C bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla se agitó durante 4 h a temperatura ambiente y posteriormente se trató con NaOH 2N (80 mL). La reacción se reflujo por 1 h, se le adicionó agua (10 mL) y el posterior enfriamiento originó la precipitación del producto, el cual se purificó por cromatografía en columna de sílica gel (AcOEt:Hexano) para obtenerse un sólido blanco en un 60 % de rendimiento (1.99 g, 9.6 mmol), p.f. 192-193 °C sin recristalizar.

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃ + DMSO-*d*₆): δ = 7.46 (d, 1H, *J* = 0.6), 7.48 (s, 1H), 7.51 (d, 1H, *J* = 0.6), 8.88 (dd, 1H, *J* = 2.4 y 6.0 Hz), 9.45 (dd, 1H, *J* = 0.6 y 1.8). C₉H₆ClN₃O PM calcd 207.62. EM (IE) (*m/z*, %): 207 (M⁺, 20), 179 (100), 144 (35). IR (KBr, cm⁻¹): 3275, 3114, 1639, 1409, 1135, 776.

6-(Aminopiridin-3-il-1-metil-1H-indol-3-il)metanona (8a)

A una suspensión de **7a** (541.5 mg, 2 mmol) en etanol (10 mL) se le adicionó NH₃ anhidro (15 mL) en un reactor Parr y la mezcla fue agitada a 150 °C por 8 h. Posteriormente se permitió que el exceso de amoníaco se evaporara a temperatura ambiente y el producto se purificó por columna de sílica gel (AcOEt) obteniéndose el producto deseado en un 84 % de rendimiento (421.7 mg, 1.68 mmol) p.f. 222-224 °C sin recrystalizar.

RMN ¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 3.87 (s, 3H, CH₃), 6.52 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz), 6.65 (s amplio, 2H, NH₂), 7.22 (t, 1H, *J* = 5.8 Hz), 7.29 (t, 1H, *J* = 5.2 Hz), 7.54 (dd, 1H, *J* = 1.8 y 5.4 Hz), 7.84 (dd, 1H, *J* = 2.4 y 6.2 Hz), 8.07 (s, 1H), 8.19 (dd, 1H, *J* = 1.6 y 4.6 Hz), 8.45 (d, 1H, *J* = 2.2). C₁₅H₁₃N₃O PM calcd 251.28 EM (IE) (m/z, %): 251 (M⁺, 100), 158 (70). IR (KBr, cm⁻¹): 3213, 3044, 1586, 1398, 1371.

6-(Aminopiridin-3-il-1-metil-1H-imidazol-2-il)metanona (8b)

El compuesto **8b** fue preparado de acuerdo al procedimiento descrito para **8a**, partiendo de 6-(cloropiridin-3-il-1-metil-1H-imidazol-2-il) metanona **7b** y fue purificado por cromatografía en columna de sílica gel (AcOEt) obteniéndose el producto deseado en un 80 % de rendimiento (323.2, 1.6 mmol), p.f. 210-211 °C sin recrystalizar.

RMN ¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 3.93 (s, 3H, CH₃), 6.46 (dd, 1H, *J* = 0.8, 8.2 Hz), 6.94 (s, 2H, NH₂), 7.14 (d, 1H, *J* = 1.0 Hz), 7.49 (d, 1H, *J* = 0.8 Hz), 8.21 (dd, 1H, *J* = 2.4 y 6.4 Hz), 9.02 (dd, 1H, *J* = 0.4 y 1.8 Hz). C₁₀H₁₀N₄O PM calcd 202.1

6-(Aminopiridin-3-il-1H-imidazol-2-il)metanona (8c)

El compuesto **8c** fue preparado de acuerdo al procedimiento descrito para **8a**, partiendo de 6-(cloropiridin-3-il-1H-imidazol-2-il) metanona **7c** y purificado por cromatografía en columna de sílica gel (AcOEt) para obtener el compuesto deseado en un 85 % de rendimiento (319.6 mg, 1.7 mmol), p.f. 225 °C sin recrystalizar.

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃ + DMSO-*d*₆): δ = 5.56 (s amplio, 2H), 6.56 (dd, 1H, *J* = 0.6 y 8.4 Hz), 7.28 (s amplio, 2H), 8.66 (dd, 1H, *J* = 2.2 y 6.4 Hz), 9.34 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz), 12.49 (s amplio, 1H). C₉H₈N₄O PM calcd 188.19 EM (IE) (m/z, %): 188 (M⁺, 55), 160 (70), 121 (35). IR (KBr, cm⁻¹): 3447, 3303, 2919, 1604, 1411, 1314, 1107.

4-Metil-N-(5-(1-metil-1H-indol-3-carbonil)piridin-2-il)bencensulfonamida (9a)

La 6-(aminopiridin-3-il-1-metil-1H-indol-3-il)metanona **8a** (628.2 mg, 2.5 mmol) se disolvió en piridina anhidra (10 mL) y se le adicionó cloruro de *p*-toluensulfonilo (567.4 mg, 3 mmol), la disolución fue calentada toda la noche a 90 °C bajo atmósfera de argón. Posteriormente la piridina se removió al vacío obteniéndose un sólido café, al cual se le adicionó agua (20 mL), la suspensión resultante se agitó por 1 h, el sólido se filtró y secó al vacío para obtener **9a** como un sólido blanco en un 87 % de rendimiento (882 mg, 2.17 mmol), p.f. 205 °C sin recrystalizar.

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃ + DMSO-*d*₆): δ = 2.40 (s, 3H, CH₃), 3.87 (s, 3H, CH₃), 7.26-7.41 (m, 6H), 7.62 (s, 1H), 7.89 (dd, 2H, *J* = 1.6 y 4.8 Hz), 8.03 (dd, 1H, *J* = 2.4 y 6.4 Hz), 8.37 (m, 1H), 8.59 (s amplio, 1H). C₂₂H₁₉N₃O₃S PM. calcd 405.47.

4-Metil-N-(5-(1-metil-1H-imidazol-2-carbonil)piridin-2-il)bencensulfonamida (9b)

El compuesto **9b** fue preparado de acuerdo al procedimiento descrito para **9a** partiendo de **8b**. El producto resultó ser un sólido café y se obtuvo en un 82 % de rendimiento (729.8 mg, 2 mmol) p.f. 180 °C sin recrystalizar.

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃ + DMSO-*d*₆): δ = 2.39 (s, 3H, CH₃), 4.04 (s, 3H, NCH₃), 7.12 (s, 1H), 7.18 (s, 1H), 7.26 (d, 2H, *J* = 8 Hz), 7.35 (s amplio, 1H, NH), 7.86 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz), 8.47 (dd, 1H, *J* = 2.2 y 7 Hz), 9.30 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz). C₁₇H₁₆N₄O₃S PM calcd 356.4

N-(5-(1H-imidazol-2-carbonil)piridin-2-il)-4-metilbencensulfonamida (9c)

El compuesto **9c** fue preparado de acuerdo al procedimiento descrito para **9a** partiendo de **8c** obteniéndose un sólido blanco en un 75 % de rendimiento (641 mg, 1.87 mmol), p.f. 176 °C sin recrystalizar.

RMN ¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.34 (s, 3H, CH₃), 7.27 (dd, 1H, *J* = 0.8 y 7.2 Hz), 7.28 (d, 1H, *J* = 7.2 Hz), 7.35 (d, 2H, *J* = 8 Hz), 7.52 (dd, 1H, *J* = 0.8, 1.8 Hz), 7.80 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz), 8.49 (dd, 1H, *J* = 2.2 y 7.2 Hz), 9.40 (d, 1H, *J* = 1.6 Hz), 13.50 (s amplio, 1H). C₁₆H₁₄N₄O₃S PM calcd 342.37. EM (IE) (*m/z*, %): 342 (M⁺ + 1, 5), 277 (100).

(Z)-2-(5-(1-Metil-1H-indol-3-carbonil)-2-(tosilimino)piridin-1(2H)-il)acetamida (**10a**)

A una suspensión de **9a** (446 mg, 1.1 mmol) en DMF anhidra (5 mL) se le adicionó *i*-Pr₂NEt (2.1 mL, 1.21 mmol) bajo atmósfera de argón. A la mezcla de reacción posteriormente se le adicionó 2-yodoacetamida (219 mg, 1.2 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente toda la noche. A continuación la solución se vertió en agua (20 mL), se filtró, se lavó con agua (50 mL) y se secó al vacío para obtener el compuesto **10a** como un sólido amarillo en un 75 % de rendimiento (382 mg, 0.8 mmol), p.f. 275 °C sin recrystalizar.

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃ + DMSO-*d*₆): δ = 2.39 (s, 3H, CH₃), 3.88 (s, 3H, NCH₃), 4.97 (s, 2H, NH₂), 6.47 (s amplio, 1H, R₂NH), 7.23-7.42 (m, 5H), 7.60 (d, 1H, *J* = 9.4 Hz), 7.74 (s amplio, 1H), 7.81 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 7.84 (s, 1H), 8.0 (dd, 1H, *J* = 2.2 y 7.2 Hz), 8.27 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz), 8.31 (d, 1H, *J* = 1.8). C₂₄H₂₂N₄O₄S PM. calcd 462.52

(Z)-2-(5-(1-Metil-1H-imidazol-2-carbonil)-2-(tosilimino)piridin-1(2H)-il)acetamida (**10b**)

El compuesto **10b** fue preparado de acuerdo al procedimiento descrito para **10a** partiendo de **9b**, de esta forma se obtuvo un sólido blanco en un 78 % de rendimiento (355 mg, 0.86 mmol) p.f. 218-220 °C sin recrystalizar.

RMN ¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.34 (s, 3H, CH₃), 3.96 (s, 3H, NCH₃), 4.93 (s amplio, 2H), 7.21 (d, 1H, *J* = 0.8 Hz), 7.29 (d, 1H, *J* = 0.4 Hz), 7.37 (s, 1H), 7.42 (s amplio, 1H, NH), 7.61 (d, 1H, *J* = 0.4), 7.7 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz), 7.82 (s amplio, 1H), 8.46 (dd, 1H, *J* = 2.2 y 9.6 Hz), 9.18 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz). C₁₉H₁₉N₅O₄S PM. calcd 413.45

(Z)-2-(5-(1H-imidazole-2-carbonyl)-2-(tosylimino)pyridin-1(2H)-yl)acetamide (**10c**)

El compuesto **10c** fue preparado de acuerdo al procedimiento descrito para **10a** partiendo de **9c**, obteniéndose de esta forma un sólido blanco en un 67 % de rendimiento (294 mg, 0.7 mmol) p.f. 214-215 °C sin recrystalizar.

RMN ¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.34 (s, 3H, CH₃), 4.94 (s, 2H), 7.29 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz), 7.43 (d, 1H, *J* = 4.6 Hz), 7.44 (s amplio, 2H), 7.45 (d, 1H, *J* = 5 Hz), 7.70 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz), 7.84 (s amplio, 1H), 8.60 (dd, 1H, *J* = 2.2 y 7.4 Hz), 9.40 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz), 13.50 (s amplio, 1H). C₁₈H₁₇N₅O₄S PM. calcd 399.42

2,2,2-Trifluoro-N-(6-(1-metil-1H-indol-3-carbonil)imidazo[1,2-a]piridin-2-il)acetamida (11a)

A una suspensión de **10a** (463.5 mg, 1 mmol) en diclorometano anhidro (10 mL) se le adicionó anhídrido trifluoroacético hasta disolución. La disolución se reflujo durante 6 h, posteriormente los disolventes se removieron al vacío y el sólido residual se purificó por cromatografía en columna de sílica gel (AcOEt:Hexano) para obtenerse **11a** en un 72 % de rendimiento (278 mg, 0.72 mmol), p.f. 235-237 °C sin recristalizar.

RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 3.90 (s, 3H, CH₃), 7.29 (td, 1H, *J*= 1.0, 1.5 y 7.0 Hz), 7.34 (td, 1H, *J*= 1.5, 7 y 7 Hz), 7.59 (dd, 1H, *J*= 1.5 y 7 Hz), 7.61 (d, 1H, *J*= 9.5 Hz), 7.67 (dd, 1H, *J*= 1.5 y 9.5 Hz), 8.26 (td, 1H, *J*= 0.5, 1.5 y 7.0 Hz), 8.29 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 9.22 (dd, 1H, *J*= 1.0, 1.5 Hz), 12.55 (s amplio, 1H, NH). ¹³C NMR (125.7 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 33.23 (CH₃), 103.85 (CH), 110.67 (CH), 113.51 (C), 115.36 (CH), 115.65 (c, *J*_{CF₃}= 288.25), 121.50 (CH), 122.32 (CH), 123.26 (CH), 125.16 (CH), 125.38 (C), 126.64 (C), 129.61 (CH), 137.36 (C), 139.55 (CH), 140.13 (C), 141.58 (C), 154.00 (c, *J*_{CF}= 37.83), 185.54 (CO). C₁₉H₁₃F₃N₄O₂ PM. calcd 386.33. EM (IE) (m/z, %): 386 (M⁺, 100), 317 (20). IR (KBr, cm⁻¹): 3029, 3296, 1718, 1645, 1597.

2,2,2-Trifluoro-N-(6-(1-metil-1H-imidazole-2-carbonil)imidazo[1,2-a]piridin-2-il)acetamida (11b)

A una suspensión de **10b** (415 mg, 1 mmol) en diclorometano anhidro (10 mL) se le adicionó anhídrido trifluoroacético hasta disolución. La disolución se reflujo durante 5 h, posteriormente los disolventes se removieron al vacío y el sólido residual se purificó por cromatografía en columna de sílica gel (AcOEt:Hexano), obteniéndose el producto correspondiente en un 60 % de rendimiento (202 mg, 0.6 mmol), p.f. 218-220 °C sin recristalizar.

RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 4.0 (s, 3H, CH₃), 7.25 (s, 1H), 7.57 (d, 1H, *J*= 9.5 Hz), 7.63 (s, 1H), 7.98 (dd, 1H, *J*= 1.5 y 9.5 Hz), 8.44 (s, 1H), 9.83 (t, *J*= 0.5 Hz), 12.54 (s amplio, 1H, NH). ¹³C NMR (125.7 MHz, DMSO-*d*₆): δ= 36.5 (CH₃), 104.60 (CH), 114.98 (CH), 116.1 (c, *J*_{CF}= 287.25), 123.0 (C), 125.88 (CH), 128.88 (C), 129.41 (CH), 134.15 (CH), 141.1 (C), 142.25 (C), 142.52 (C), 154.54 (d, *J*_{CF}= 38.38), 179.84 (CO). C₁₄H₁₀F₃N₅O₂, PM calcd 337.26. EM (IE) (m/z, %): 337 (M⁺, 100), 268 (20), 240 (15). IR (KBr, cm⁻¹): 3038, 3296, 1724, 1637, 1567.

N-(6-(1*H*-Imidazol-2-carbonil)imidazo[1,2-*a*]piridin-2-il)-2,2,2-trifluoroacetamida (**11c**)

A una suspensión de **10c** (400 mg, 1 mmol) en diclorometano anhidro (10 mL) se le adicionó anhídrido trifluoroacético hasta disolución y se reflujo durante 5 h, posteriormente los disolventes se removieron al vacío y el sólido fue purificado por cromatografía en columna de sílica gel (AcOEt:Hexano) en un 56 % de rendimiento (181 mg, 0.56 mmol), p.f. 302-304 °C sin recristalizar.

RMN ¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆): δ= 7.47 (s, 2H), 7.62 (d, 1H, *J*= 9.6), 8.13 (dd, 1H, *J*= 1.8 y 7.8 Hz), 8.48 (s, 1H), 10.09 (s amplio, 1H), 12.60 (s amplio, 1H). C₁₃H₈F₃N₅O₂ PM calcd 323.2. EM (IE) (*m/z*, %): 323 (M⁺, 100), 254 (75), 226 (40).

13.2 Parte biológica

13.2.1. Cultivo celular y ensayos de citotoxicidad.

Todas las sustancias evaluadas fueron disueltas en DMSO y diluidas a las concentraciones utilizadas. Las líneas celulares fueron cultivadas en el medio RPMI-1640 suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) y L-glutamina 2 mM a 37 °C bajo una atmósfera al 5 % de CO₂. Por cada línea celular, una botella de cultivo con un 70 % de confluencia fue tripsinizada y las células fueron cosechadas y colocadas en cajas de 96 pozos a una densidad de 5000 células por pozo, 24 h después de la cosecha, las células fueron tratadas con los diferentes compuestos por 48 h y su viabilidad fue determinada por el método de sulforodamina B (SRB).

Cuando la incubación con los compuestos evaluados terminó, los cultivos de células adherentes fueron fijados *in situ* por la adición de 50 µL de una disolución al 50 % (peso/volumen) de ácido tricloroacético e incubadas a 4 °C por 1 h. El sobrenadante fue eliminado, los pozos fueron lavados con agua y secados al aire libre. Las células fijadas fueron teñidas con 100 µL de una disolución al 0.4 % de SRB. El colorante unido a proteínas fue disuelto con Tris base 10 mM y la densidad óptica fue determinada en un lector de microplacas (Elx 808; Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) utilizando una longitud de onda de prueba de 515 nm. Un tamizado preliminar fue realizado a una concentración de 50 µM para cada compuesto evaluado, utilizando 5-fluorouracilo como control positivo de citotoxicidad y

olomucina como control de la inhibición de CDKs. Una curva dosis-respuesta fue graficada para los compuestos más activos y la CI_{50} fue estimada de una regresión no lineal utilizando el programa JMP (versión 3.2.1.; SAS Institute Inc. Cary, NC, USA).

13.2.2. Análisis del ciclo celular

Las células MCF7 y SK-LU-1 en fase Log fueron cosechadas en medio RPMI-1640 + 10 % SFB a una densidad de 1×10^6 células por caja petri de 10 cm y cultivadas 24 h a 37 °C, después de este tiempo los compuestos a evaluar fueron adicionados e incubados por 24 h adicionales. Después del periodo de incubación, las células fueron cosechadas con PBS-EDTA y centrifugadas a 3000 r.p.m. durante 5 min. El PBS-EDTA fue removido y el paquete celular fue lavado 3 veces con PBS 1X, seguido por centrifugación a 3000 r.p.m. por 5 min. El sobrenadante fue eliminado y el paquete celular fue resuspendido en 5 mL de etanol al 70 % a 4 °C. Las células así fijadas fueron guardadas a -20 °C de 24 a 48 h. Las células fijadas en etanol fueron posteriormente centrifugadas a 3000 r.p.m. por 5 min., el sobrenadante fue desechado y el paquete celular fue lavado 2 veces con PBS 1X, después de otra centrifugación a 3000 r.p.m. durante 5 min. el PBS fue descartado y cada paquete celular fue mezclado con 1 mL de solución de teñido (0.1 % Triton X-100, 0.2 mg/ml de RNAsa A libre de DNAsa, 20 µg/ml de yoduro de propidio (PI) en PBS). El contenido de DNA celular fue medido en un citómetro de flujo (FACscan, Becton Dickinson, USA) y el análisis fue hecho con el programa Flowjo V 7.2.5 (*Tree Star Inc, Ashland OR, USA*).

13.2.3. Apoptosis

La apoptosis fue detectada al determinar la exposición de fosfatidilserina en la membrana celular y la fragmentación de ADN. Las células fueron marcadas con Anexina V conjugada con isotiocianato de fluoresceína y yoduro de propidio (PI) en un amortiguador de unión (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y posteriormente analizadas utilizando un citómetro de flujo (FACscan, Becton Dickinson, USA) con el programa Flowjo V 7.2.5 (*Tree Star Inc, Ashland OR, USA*).

13.2.4. Actividad de CDKs

Todas las reacciones fueron llevadas a cabo a 37 °C en un volumen de 20 µL conteniendo un 2.5 % de DMSO y 7 µM de cada compuesto evaluado. Las condiciones para evaluar la actividad del complejo CDK 1-ciclina B fueron 50 mM Tris-HCl (pH = 7.4), 10 mM MgCl₂, 50 mM NaF, 500 µM Na₃VO₄, 8 mM β-glicerofosfato, 1 mM DTT, 400 µM ATP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 4 µCi ATP^{γ32}, 250 ng de Histona 1.2 recombinante (Calbiochem, San Diego, CA), y 220 ng del complejo CDK 1-ciclina B (Biofin, Kassel, Germany).

Las condiciones para evaluar la actividad del complejo CDK 2-ciclina E fueron 50 mM Tris-HCl (pH = 7.4), 10 mM MgCl₂, 50 mM NaF, 500 µM Na₃VO₄, 8 mM β-glicerofosfato, 1 mM DTT, 400 µM ATP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 4 µCi ATP^{γ32}, 250 ng de Histona 1.2 recombinante (Calbiochem, San Diego, CA), y 135 ng del complejo CDK 2-ciclina E (Biofin, Kassel, Germany). Todas las reacciones fueron detenidas con µL de β-Mercaptoetanol, separadas en geles de poliacrilamida al 10 % y reveladas en un aparato Typhoon 9400 (Amersham Biosciences, Inc.). La cuantificación de las bandas fue hecha utilizando un programa Kodak MI.

14. Bibliografía

1. Jaramillo, C; de Diego, J. E; Hamdouchi, C; Collins, E; Keyser, H; Sánchez-Martinez, C; del Prado, M; Norman, B; Brooks, H. B; Watkins, S. A; Spencer, C. D; Dempsey, J. A; Anderson, B. D; Campbell, R. M; Leggett, T; Patel, B; Schultz, R. M; Espinosa, J; Vieth, M; Zhang, F; Timm D. E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**. 14(24):6095-6099
2. Hamdouchi, C; Zhong, B; Mendoza, J; Collins, E; Jaramillo, C; de Diego, J.E; Robertson, D; Spencer, C. D; Anderson, B. D; Watkins, S. A; Zhang, F; Brooks, H. B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**. 15(7):1943
3. Malumbres, M; Barbacid, M. *Nat. Rev. Cancer.* **2001**. 1:222–231
4. Hartwell, L; Weinert, T. *Science.* **1989**. 246:629–634
5. Dickson, M. A; Schwartz, G. K. *Curr. Onc.* **2009**. 16 (2):36-43
6. Elledge, S. J; Harper, J. W. *Biochim. Biophys. Acta.* **1998**. 1377:61-70
7. Meyerson, M; Enders, G. H; Wu, C. L. *EMBO J.* **1992**. 11:2909-2917
8. Sausville E, A. *Trends. Mol. Med.* **2002**. 8:S32-S37
9. Sherr, C. J. *Cell.* **1994**. 79:551-555
10. Pines, J. *Cell Growth Differ.* **1991**. 2:305-310
11. Hochegger, H; S, Takeda; T, Hunt. *Nature.* **2008**. 9:910-916
12. Sherr, C. J; Roberts, J. M. *Genes Dev.* **1999**. 13 1501–1512
13. Besson, A; Steven, F; Downy, J; M, Roberts. *Developmental cell.* **2008**.14:159-169
14. Sherr C. J. *Cancer res.* **2000**. 60:3689-3695
15. Elledge, S. J. *Science.* **1996**. 274:1664
16. Pardee, A. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1974**. 71:1286–1290
17. Weinberg, R. A. *Cell.* **1995**. 81:323-330
18. Harbour, J. W. and Dean, D. C. *Genes Dev.* **2000**. 14:2393–2409
19. Harbour, J. W; Luo, R. X; Dei Santi, A; Postigo, A. A; Dean, D. C. *Cell.* **1999**. 98(6):859–869
20. Geng, Y; Eaton, E. N; Picon, M; Roberts, J. M; Lundberg, A. S; Gifford, A; Sardet, C; Weinberg, R. A. *Oncogene.* **1996**. 12(6):1173-1180
21. James, M. K; Ray, A; Leznova, D; Blain, S. W. *Mol. Cel. Biol.* **2007**. 28(1):498-510
22. Hwang, H. C; Clurman, B. E. *Oncogene.* **2005**. 24:2776-2786
23. Bartek, J.; Lukas, J. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2001**. 13: 738-747
24. Skladanowski, A; Bozko, P; Sabisz, M. *Chem. Rev.* **2009**. 109(7):2951-2973
25. Piatti, S; Bohm, T; Cocker, J. H; Diffley, J. F; Nasmyth, K. *Genes Dev.* **1996**. 10(12):1516-1531
26. Detweiler, C. S; Li, J. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**. 95(5):2384-2389
27. Harper, J. W; Adams, P. D. *Chem. Rev.* **2001**. 101:2511-2526
28. Shah, J. V; Cleveland, D. W. *Cell.* **2000**. 103:997–1000
29. Nigg, E. A. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* **2001**. 2:21–32
30. Williams, G. T. *Cell.* **1991**. 65:1097-1098
31. Norbury, C. J; Hickson, I. D. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2001**. 41:367–401
32. Majno, G; Joris, I. *Am. J. Pathol.* **1995**. 146:3–15
33. Hirsch, T; Marchetti, P; Susin, S. A; Dallaporta, B; Zamzami, N; Marzo, I; Geuskens, M; Kroemer, G. *Oncogene.* **1997**. 15(13):1573-1581
34. Zeiss, C. J. *Vet. Pathol.* **2003**. 40(5):481–495
35. Kerr, J. F; Wyllie, A. H; Currie, A. R. *Br. J. Cancer.* **1972**. 26:239–257

36. Hacker, G. *Cell Tissue Res.* **2000.** 301:5–17
37. Arends, M. J; Morris, R.G; Wyllie, A. H. *Am. J. Pathol.* **1990.** 136:539-608
38. Compton, M.M. *Cancer Metast. Rev.* **1992.** 11:105-119
39. Savill, J; Fadok, V. *Nature.* **2000.** 407:784–788
40. Kurosaka, K; Takahashi, M; Watanabe, N; Kobayashi, Y. *J Immunol.* **2003.** 171(9):4672–4679
41. Igney, F. H; Krammer, P. H. *Nat. Rev. Cancer.* **2002.** 2:277–288
42. Elmore, S. *Toxicologic pathology.* **2007.** 35:495-516
43. Martinvalet, D; Zhu, P; Lieberman, J. *Immunity.* **2005.** 22:355–70
44. Kinloch, A; Ross, T; J. Mark; Furness, I; Mike; Irad, Hajimohamadreza. *Tips.* **1999.** 20:35-42
45. Hengartner, M. O; *Nature.* **2000.** 407:770-776
46. Cohen, G. M. *Biochem. J.* **1997.** 326 (Pt 1):1–16
47. Rai, N. K; Tripathi, K; Sharma, D; Shukla, V. K. *Int. J. Low. Extrem. Wounds.* **2005.** 4:138–144
48. Bortner, C. D; Oldenburg, N. B; Cidlowski, J. A. *Trends. Cell. Biol.* **1995.** 5: 21–26
49. Bratton, D. L; Fadok, V. A; Richter, D. A; Kailey, J. M; Guthrie, L. A; and Henson, P. M. *J. Biol. Chem.* **1997.** 272(42):26159-65
50. Ashkenazi, A. y Dixit, V. M. *Science.* **1998.** 281(5381):1305–1308
51. Wajant, H. *Science.* **2002.** 296:1635–1636
52. Saelens, X; Festjens, N; Vande Walle, L; van Gurp, M; van Loo, G; Vandenabeele, P. *Oncogene.* **2004.** 23:2861–2874
53. Garrido, C; Galluzzi, L; Brunet, M; Puig, P. E; Didelot, C. and Kroemer, G. *Cell Death Differ.* **2006.** 13:1423–1433
54. Hill, M. M; Adrain, C; Duriez, P. J; Creagh, E. M; Martin, S. J. *EMBO J.* **2004.** 23:2134-2145
55. Malumbres, M; Barbacid, M. *Trends in Biochem. Sci.* **2005.** 30(11):630–641
56. Cruz, J.C; Tsai, L.H. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2004.** 14:390–394
57. Pareek, T. K; Keller, J; Kesavapany, S; Pant, H. C; Ladarola, M. J; Brady, R. O; Kulkarni, A. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006.** 103:791
58. Borgne, A; Golsteyn, R. M. **2003** L. Meijer, A. Jézéquel, y M. Roberge (Editores). *Life in Progress Editions, Roscoff, France.* 453
59. Borgne, A., Versteeg, I., Mahé, M., Studeny, A., Léonce, S., Rodriguez, M., Hickman, J.A., Meijer, L; Golsteyn, R.M. *Oncogene.* **2006.** 25(56):7361-7372
60. Garriga, J; Grana, X. *Gene.* **2004.** 337:15-19
61. Loyer, P; Trembley, J. H; Katona, R; Kidd, V. J; Lahti, J. M. *Cell Signal.* **2005.** 17(9):1033-1051
62. Cohen, P. *Nature Rev. Drug Discovery.* **2002.** 1(4) 309-315
63. Fischer, P. M. *Curr. Med. Chem.* **2004.** 11(12):1563-1583
64. Weinmann, H; Metternich, R. *Chem. BioChem.* **2005.** 6(3):455-459
65. Vermeulen, K; Van Bockstaele, D. R; Berneman, Z. N. *Cell Prolif.* **2003.** 36(3):131-149
66. Wang, D; de la Fuente, C; Deng, L; Wang, L; Zilberman, I; Eadie, C; Healey, M; Stein, D; Denny, T; Harrison, L. E; Meijer, L; Kashanchi, F. *J. Virol.* **2001.** 75(16):7266–7279
67. Schang, L. M. *Biochim. Biophys. Acta.* **2004.** 1697(1-2):197-209
68. Nelson, P.J; Shankland, S. J. *Nephron Exp. Nephrol.* **2005.** 103(1): 6-15
69. Tsai, L. H; Lee, M. S; Cruz, J. *Biochim. Biophys. Acta.* **2004.** 1697(1-2)137-142
70. Smith, P. D; Crocker, S. J; Jackson-Lewis, V; Jordan-Sciutto, K. L; Hayley, S; Mount, M. P; O'Hare, M. J; Callaghan, S; Slack, R. S; Przedborski, S; Anisman, H; Park, D.S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003.** 100(23):13650-13655

71. Smith, P. D; O'Hare, M. J; Park, D.S. *Trends Mol. Med.* **2004.** 10(9):445-451
72. Zhang, M; Li, J; Chakrabarty, P; Bu, B; Vincent, I. *Am. J. Pathol.* **2004.** 165(3):843-853
73. Wang, J; Liu, S. H; Fu, Y. P; Wang, J. H; Lu, Y.M. **2003.** *Nature Neurosci.* 6(10):1039-1047
74. Rashidian, J; Iyirhiaro, G; Aleyasin, H; Rios, M; Vincent, I; Callaghan, S; Bland, R. J; Slack, R. S; During, M. J; Park, D.S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005.** 102(39):14080-14085
75. Di Giovanni, S; Movsesyan, V; Ahmed, F; Cernak, I; Schinelli, S; Stoica, B; Faden, A.I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005.** 102(23):8333-8338
76. Knockaert, M; Greengard, P; Meijer, L. *Trends Pharmacol. Sci.* **2002.** 23(9):417-425
77. Fischer, L; Endicott, J. and Meijer, L. Cyclin-dependent kinase inhibitors, in "*Cell Cycle Regulators as Therapeutic Targets*", L. Meijer, A. Jézéquel; M. Roberge. **2003.** Eds., Progr. Cell Cycle Res., vol. 5, Editions "Life in Progress", Station Biologique de Roscoff, France. 248
78. Benson, C; Kaye, S; Workman, P; Garrett, M; Walton, M; De Bono, J. *Br. J. Cancer.* **2005.** 92(1):7-12
79. Fischer, P.M; Gianella-Borradori, A. *Exp. Opin. Investig. Drugs.* **2005.** 14(4):457-477
80. Noble, M.E; Endicott, J. A; Johnson, L. N. *Science.* **2004.** 303(5665):1800-1805
81. Mapelli, M; Massimiliano, L; Crovace, C; Seeliger, M; Tsai, L. H; Meijer, L; Musacchio, A. *J. Med. Chem.* **2005.** 48:671-677
82. Rubenstein, E; Federmann. E. editores. **1997.** Scientific American. Medicina. Vol. 5, seccion 13 p 11-17
83. Dulbecco, R. *Mundo Cient.* **1983.** 3 (22):168-179
84. Brown, J. M; A. J, Galicia. *Cancer Res.* **1998.** 55:2325-2333
85. Darnell, J; H, Fodish. *Mol. Cell. Biol. Cancer* 4^a edicion. New York. p 1054-1084
86. Lewin, B. *Genes.* **1997.** 6(37):1131-1172
87. Marsall, C. J. *Cell.* **1991.** 64:313-326
88. Malumbres, M; Barbacid, M. *Nature Rev. Cancer.* **2009.** 9:153-166
89. Lapenna, S; Giordano, A. *Nature reviews Drug discovery.* **2009.** 8:547-565
90. Stewart, Z. A; Westfall, M. D; Pietenpol, J. A. *Trends in pharm. Sci.* **2003.** 23:1342-1350
91. Oya, M; Schulz W. A. *Br. J. Cancer.* **2000.** 83(5):626-631
92. Elsayed, A; Sausville, E. A. *Oncologist.* **2001.** 6(6):517-537
93. Kola, I; Landis, J. *Nature Rev. Drug Discov.* **2004.** 3:711-715
94. Kamb, A; S. Wee; C. Languarer. *Nature Rev.* **2007.** (6):115-120
95. Mortlock, A. A;m Keen, N. J; Jung, F. H; Heron, N. M; Foote, K. M; Wilkinson, R. W; Green, S. *Curr. Top. Med. Chem.* **2005.** 5(80):807-821
96. Ruetz, S; Fabbro, D; Zimmermann, J; Meyer, T; Gray, N. *Curr. Med. Chem. Anti-Canc. Agents.* **2003.** 3:1-14
97. Garcia-Manero, G; Issa, J. P. *Cancer Invest.* **2005.** 23:635-642
98. Lahaye, T; Riehm, B; Berger, U; Paschka, P; Müller, M. C; Kreil, S; Merx, K; Schwindel, U; Schoch, C; Hehlmann, R; Hochhaus, A. *Cancer.* **2005.** 103(8):1659-1669
99. Hanahan, D; Weinberg, R. A. *Cell.* **2000.** 100:57-70
100. Chabner, B. A; Roberts, T. G. *Nature Rev. Cancer.* **2005.** 5:65-72
101. Strock, C. J; Park, J. I; Nakakura, E. K; Bova, G. S; Isaacs, J. T; Ball, D. W; Nelkin, B. D. *Cancer Res.* **2006.** 66(15):7509-7515
102. Larochelle, S; Merrick K. A; Terret, M. E; Wohlbold, L; Barboza, N. M; Zhang, C; Shokat, K M; Jallepalli, P. V; Fisher, R. P. *Mol. Cell.* **2007.** 25(6):839-850

103. Romano, G; Giordano, A. *Cell Cycle*. **2008**. 7:3664–3668
104. Shapiro, G. I. *J. Clin. Oncol.* **2006**. 24:1770–1783
105. Senderowicz, A. M; Sausville, E. A. *J. Natl. Cancer Inst.* **2000**. 92:376–387
106. De Azevedo, W. F; Leclerc, S; Meijer, L; Havlicek, L; Strnad, M; Kim, S.H. *Eur. J. Biochem.* **1997**. 243:518–526
107. Zaharevitz, D. W; Gussio, R; Leost, M; Senderowicz, A. M; Lahusen, T; Kunick, C; Meijer, L; Sausville, E. A. *Cancer Res.* **1999**. 59:2566–2569
108. Meijer, L; Kim, S. H. *Methods Enzymol.* **1997**. 283:113–128
109. Senderowicz, A. M. *Oncogene*. **2003**. 22:6609–6620
110. Kodym, E; Kodym, R; Reis, A. E; Habib, A. A; Story, M. D; Saha, D; *Lung Cancer*. **2009**. 66(1):37-47
111. Choong, I. C.; Serafimova, I; Fan, J; Stockett, D; Chan, E; Cheeti, S; Lu, Y; Fahr, B; Pham, P; Arkin, M. R; Walker, D. H; Hoch, U. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**. 18(21):5763–5765
112. Fan, J; Fahr, B; Stockett, D; Chan, E; Cheeti, S; Serafimova, I; Lu, Y; Pham, P; Walker, D. H; Hoch, U; Choong, I. C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**. 18(23):6236–6239
113. Joshi, K. S; Rathos, M. J; Joshi, R. D; Sivakumar, M; Mascarenhas, M; Kamble, S; Lal, B; Sharma, S. *Mol. Cancer Ther.* **2007**. 6(3):918-925
114. Squires, M. S; Feltell, R. E; Wallis, N. G; Lewis, E. J; Smith, D. M; Cross, D.M; Lyons, J. F; Thompson, N. T. *Mol Cancer Ther.* **2009**. 8(2):324-332
115. DePinto, W; Chu, X; Yin, X; Smith, M; Packman, K; Goelzer, P; Lovey, A; Chen, Y; Qian, H; Hamid, R; Xiang, Q; Tovar, C; Blain, R; Nevins, T; Higgins, B; Luistro, L; Kolinsky, K; Felix, B; Hussain, S; Heimbrook, D. *Mol. Cancer Ther.* **2006**. 5(11):2644–2658
116. Diab, S. *et al. J. Clin. Oncol.* **2007**. 25:3528-3531
117. Siemeister, G; Luecking, U; Wagner, C; Detjen, K; Mc Coy, C; Bosslet, K. *Biomed. Pharmacother.* **2006**. 60(6):269–272
118. Scholz, A; Wagner, K; Welzel, M; Remlinger, F; Wiedenmann, B; Siemeister, G; Rosewicz, S; Detjen, K. M. *Gut*. **2009**. 58(2):261–270
119. McClue, S. J; Blake, D; Clarke, R; Cowan, A; Cummings, L; Fischer, P. M; MacKenzie, M; Melville, J; Stewart, K; Wang, S; Zhelev, N; Zheleva, D; Lane, D. P. *Int. J. Cancer*. **2002**. 102(5):463-468
120. Villerbu, N; Gaben, A. M; Redeuilh, G; Mester, J. *Int. J. Cancer*. **2002**. 97:761–769
121. Pennati, M; Campbell, A. J; Curto, M; Binda, M; Cheng, Y; Wang, L. Z; Curtin, N; Golding, B. T; Griffin, R. J; Hardcastle, I.R; Henderson, A; Zaffaroni, N; Newell, D. R. *Mol. Cancer Ther.* **2005**. 4(9):1328-1337
122. Bettayeb, K; Oumata, N; Echalié, A; Ferandin; Endicott, J; A, Galons, H; Meijer, L. *Oncogene*. **2008**. 27(44):5797–5807
123. Bettayeb, K; Sallam, H; Ferandin, Y; Popowycz, F; Fournet, G; Hassan, M; Echalié, A; Bernard, P; Endicott, J; Joseph, B; Meijer, L. *Mol. Cancer Ther.* **2008**. 7(9):2713-2724
124. Popowycz, F; Fournet, G; Schneider, C; Bettayeb, K; Ferandin, Y; Lamigeon, C; Tirado, O.M; Mateo-Lozano, S; Notario, V; Colas, P; Bernard, P; Meijer, L; Joseph, B. *J. Med. Chem.* **2009**. 52(3):655–663
125. Payton, M; Chung, G; Yakowec, P; Wong, A; Powers, D; Xiong, L; Zhang, N; Leal, J; Bush, T. L; Santora, V; Askew, B; Tasker, A; Radinsky, R; Kendall, R; Coats, S. *Cancer Res.* **2006**. 66(8):4299-4308
126. Wang, S; Ayyub, E; Lamphere. *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.* **2005**. 46:4428-4432

127. Lin, R; Connolly, P. J; Huang, S; Wetter, S. K; Lu, Y; Murray, W. V; Emanuel, S. L; Gruninger, R. H; Fuentes-Pesquera, A. R; Rugg, C. A; Middleton, S. A; Jolliffe, L. K. *J. Med. Chem.* **2005**. 48(13):4208–4211
128. Chichibabin, A.E. *Ber.* **1925**. 58:1704-1707
129. Mosby. **1961** Heterocyclic Systems With Bridgehead Nitrogen Atoms. Interscience Publ; New York. Part. 1. 461-477
130. Handbook of heterocyclic chemistry, Alan R. Katritzky. **1985**. Pergamon Press, New York. P. 542
131. Bochis, R. J; Olen, L; Wakszynski, F; Mroczek, H; Eskola, P; Kulsa, P. *J. Med. Chem.* **1981**. 2:1518-1521
132. Shaabani, A; Rezazadeh, F; Soleimani, E. *Monatsh. Chem.* **2008**. 139:931-933
133. Humphries, A; Gancia, E; Gilligan, M. T; Goodacre, S; Hallett, D; Merchant, K. J; Thomas, R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**. 16:518-1522
134. Enguehard-Gueffier, C; Gueffier, A. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry.* **2007**. 7:888-899
135. Swainston, H.T.; Keating, G.M. *CNS Drugs.* **2005**. 19(1):65-70
136. Berson, A; Descatoire, V; Sutton, A; Fau, D; Maulny, B; Vadrot, N; Feldmann, G; Berthon, B; Tordjmann, T; Pessayre, D. *J. Pharm. Exp. Ther.* **2001**. 299(2):793-800
137. Almirante, L; Polo, L; Mugnaini, A; Provinciali, E; Rugarli, P; Biancotti, A.; Gamba, A; Murmann, W. *J. Med. Chem.* **1965**. 8(3):305-312
138. Ueda, T; Mizushige, K. *Curr. Vasc. Pharmacol.* **2006**. 4(1):1-7
139. Anderson, M; Beattie, J. F; Breault, G. A; Breed, J; Bith, K. F; Culshaw, J. D; Ellston, R. P; Green, S; Minshull, C. A; Norman, R. A; Paupit, R. A; Stanway, J; Thomas, A. P; Jewsbury, P. J; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**. 13(18):3021-325
140. Hamdouchi, C; Keyser, H; Collins, E; Jaramillo, C; de Diego, J.E; Spencer, C.D; Dempsey, J. A; Anderson, B. D; Leggett, T; Stamm, N. B; Schultz, R. M; Watkins, S. A; Cocke, K; Lemke, S; Burke, T. F; Beckmann, R. P; Dixon, J. T; Gurganus, T. M; Rankl, N. B; Houck, K. A; Zhang, F; Vieth, M; Espinosa, J; Timm, D. E; Campbell, R. M; Patel, B. K. R; Brooks, H. B. *Mol. Cancer Ther.* **2004**. 3(1):1-11
141. World Health Organization. *Cancer Strat.* **1999**. 1:33-57
142. Jones, S. B. *Bri. Med. J.* **1999**. 319:505-508
143. Senderowicz, A. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2004**. 16:670-678 Sielecki, T. M; Boylan, J. F; Benfield, P. A; Trainor, G. L. *J. Med. Chem.* **2000**. 43(1):1-18
145. Hama, Y; Nobuhara, Y; Aso, Y; Otsubo, T; Ogura, F. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1988**. 61:1683-1686
146. Van der Eijk, J. M; Roeland, J. M; Zwikker, J. W. *J. Org. Chem.* **1980**. 45:547-548
147. Nahm, S; Weinreib, S. M. *Tetrahedron Lett.* **1981**. 22(39)3815-3818
148. Bastiaansen, L. A. M; Godefroi, E. F. *Synthesis.* **1978**. 675-676
149. Gatto, V. J; Miller, S. R; Gokel, G. W. *Org. Syntheses.* **1993**. 8:152-154
150. Wolfe, J. P; Tomori, H; Sadighi, J. P; Buchwald, S. L. *J. Org. Chem.* **2000**. 65:1158-1174
151. Ferlay, J; Bray, P. Pisani, D.M. Parkin. Globocan. **2004**. IACR Cancer Base No. 5, Version 2.0. IACR Press, Lyon
152. Martin, S. J; Reutelungspurger, C. P; Mc Gahon, A; Rader, J. A; Van Schie, R. C; La Face, D. M; Green, D. *J. Exp. Med.* **1995**. 182:1545-1556
153. Hamdouchi, C; Sanchez, C. Ezquerro, J. *Synthesis.* **1998**. 867-871
154. Vesel, J; Havlicek, M. Strnad. *Eur. J. Biochem.* **1994**. 224: 771–786



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmech>

Short communication

6-Substituted 2-(N-trifluoroacetyl-amino)imidazopyridines induce cell cycle arrest and apoptosis in SK-LU-1 human cancer cell line

Miguel Angel Martínez-Urbina^{a,*}, Alejandro Zentella^b, Miguel Angel Vilchis-Reyes^a, Ángel Guzmán^a, Omar Vargas^b, María Teresa Ramírez Apan^a, José Luis Ventura Gallegos^b, Eduardo Díaz^{a,*}^a Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México 04510, D. F., México^b Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México 04510, D. F., México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 March 2009

Received in revised form

19 November 2009

Accepted 23 November 2009

Available online 11 December 2009

Keywords:

Imidazo[1,2-a]pyridine derivatives

Cell cycle

CDKs

Apoptosis

ABSTRACT

A series of 6-substituted 2-(N-trifluoroacetyl-amino)imidazopyridines have been synthesized and their bioactivities were evaluated. Compounds **6a**, **6c**, and **11a** were the most active compounds with modest cytotoxic activity against six human cancer cell lines U251 (glioma), PC-3 (prostate), K-562 (leukemia), HCT-15 (colon), MCF7 (breast) and SK-LU-1 (lung). The cell cycle analysis showed that compounds **6a**, **6c**, and **11a** induce a G2/M phase cell cycle arrest on SK-LU-1 cell line where inhibition of CDK-1 and CDK-2 may be implicated.

© 2009 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Advances in molecular and cellular biology through the last decades have revealed some of the many processes implicated in cancer. However, at the present time the prognosis against most human malignancies has not been improved significantly. The continuous search for novel agents which target pathological processes of human carcinogenesis has led to the synthesis of small molecules which may modulate cell cycle and apoptotic pathways [1]. Special interest has been focused on molecules that can arrest cell cycle mechanism by the inhibition effect for cyclin-dependent kinases (CDK) family, because perturbation of the cell cycle has been related to human neoplastic diseases [2]. From various subtypes of CDKs, the most important explored targets in cancer therapy have been CDK-1, -2, and -4 [3].

Nitrogen-bridgehead fused heterocycles containing an imidazole ring have been shown as a common structural moiety in pharmacologically important molecules, displaying a wide range of activities and spreading on diverse number of targets. Probably the most widely used heterocyclic system from this group is imidazo[1,2-a]pyridine [4]. Imidazo[1,2-a]pyridines shown anticytomegalovirus and anti-herpesvirus [5], antibacterial [6], hypnosedative, and

anxiolytic activities [7]. They work as α -amyloid formation inhibitors [8] and constitute a novel class of orally active nonpeptide bradykinin B2 receptor antagonists [9]. Recently [10] it was described that 2-aminoimidazo[1,2-a]pyridine scaffold represents a novel structural class of protein serine/threonine kinase inhibitors and these kinds of compounds affect potently the cyclin-dependent kinases by competing with ATP for binding to a catalytic subunit of the protein.

In addition, Jaramillo et al. [11] disclose a detailed SAR study of 2-aminoimidazo[1,2-a]pyridines around the role of substituent at 3-position, and with respect to the optimal spacer between phenyl and imidazopyridine rings, in this study the presence of an sp² carbon was shown to be necessary in order to keep activity. Carbonyl, vinyl, or Z-configured cyanovinyl substituents, were also efficient; nevertheless activity was lost partially when either E-configured olefins or bulkier substituents such as tetrazole were introduced.

Because most of the actual SAR reports over this subject have been made on substituents 2 and 3 of imidazopyridine ring as well as the spacer between the aromatic bicyclic moiety, it appears to be interesting to determine the effect of removing the substituent at 3-position, and the effect of other groups such as heterocyclic compounds at 6-position of the imidazo[1,2-a]pyridine ring. Herein we described the synthesis of a series of 6-substituted 2-(N-trifluoroacetyl-amino)imidazopyridines compounds **6a–e** and **11a–c**, which displayed cytotoxicity against six human cancer cell lines U251 (glioma), PC-3 (prostate), K-562 (leukemia), HCT-15 (colon), MCF7 (breast) and SK-LU-1 (lung). The effects on the cell cycle,

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

E-mail addresses: urbinarepowered@yahoo.com (M.A. Martínez-Urbina), maudiaz@servidor.unam.mx (E. Díaz).

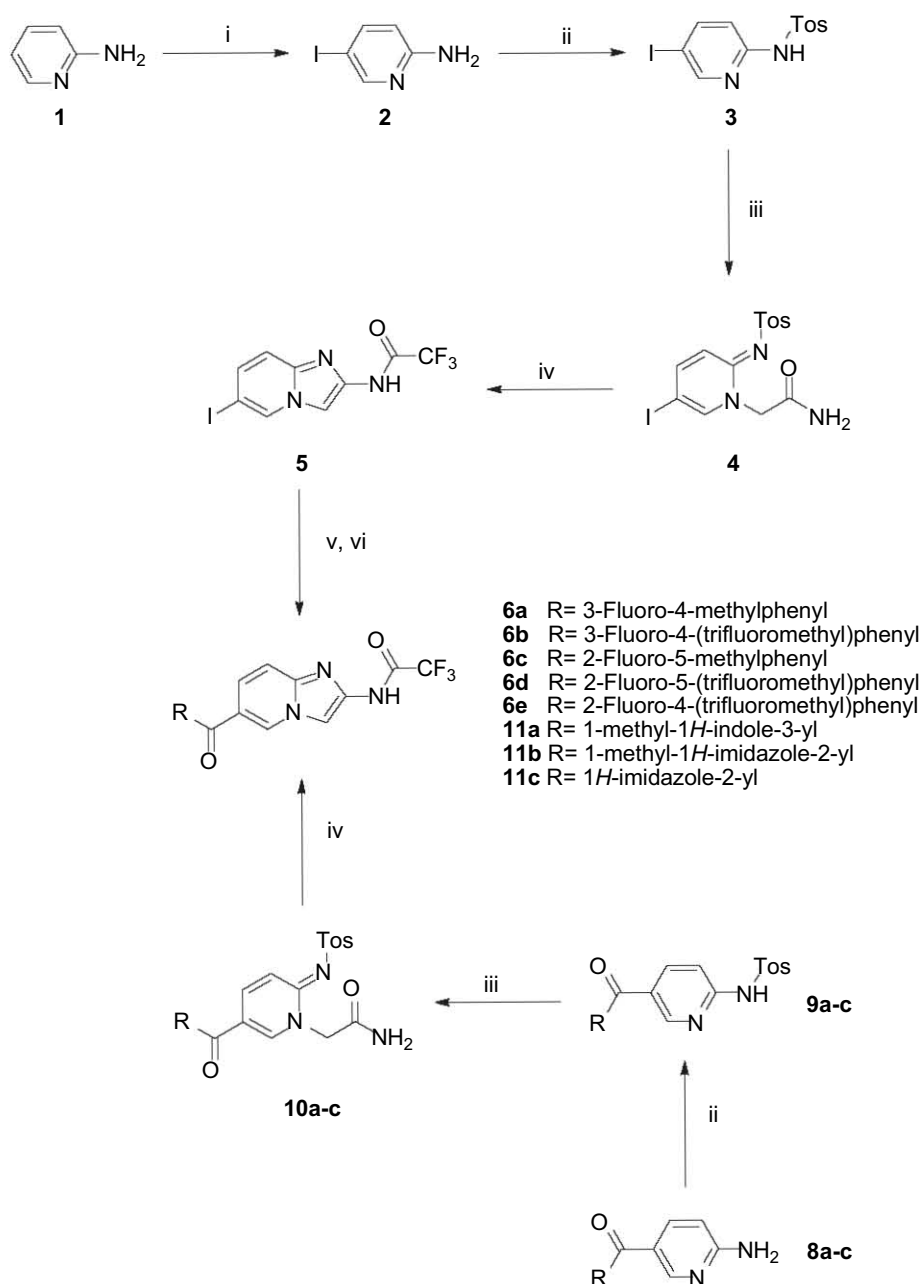
apoptosis induction, and inhibitory activity on CDK-1 and CDK-2 of selected compounds were also studied.

2. Results and discussion

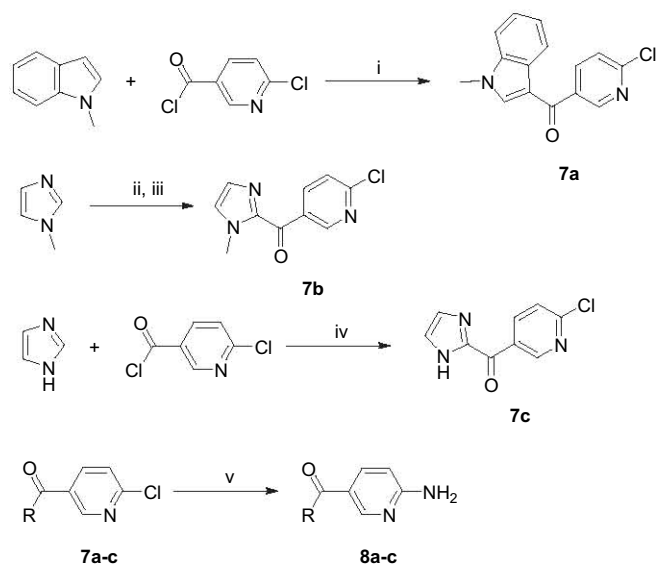
2.1. Chemistry

The synthesis of compounds **6a–e** (Scheme 1) was accomplished according to the previous reported proceedings [12]. The protection of 2-amino-5-iodo-pyridine **2** with *p*-tolylsulfonyl chloride in pyridine and subsequent treatment with iodoacetamide in the presence of diisopropylethylamine in DMF provided compound **4**. Conversion of **4** to the desired 2-(*N*-trifluoroacetyl-amino)imidazopyridine **5** was achieved by treatment

with trifluoroacetic anhydride in refluxing methylene chloride. Metalation of compound **5** with *i*-propyl magnesium chloride, and then reaction with 4 equivalents of the corresponding fluorinated aldehyde with further oxidation of the crude reaction with manganese dioxide afforded diarylketones **6a–e** in yields over 30%. Synthesis of compounds **8a–c** is summarized in Scheme 2. Compound **7a** was obtained by classical Friedel-Crafts acylation of *N*-methylindole with 6-chloronicotiny chloride. Reaction of *N*-methylimidazole with *n*-Butyllithium and quenching with 6-chloro-*N*-methoxy-*N*-methylnicotinamide (Weinreb amide) leads to the desired compound **7b**. Diarylketone **7c** was obtained by acylation of imidazole with 6-chloronicotiny chloride under conditions reported by Bastiaansen and Godefroi [13]. Finally, treatment of **7a–c** with ammonia yields corresponding amines



Scheme 1. Reagents and conditions i) $I_2/HIO_4/H_2SO_4/CH_3COOH$, 80 °C; ii) TsCl, py, 85 °C; iii) ICH_2CONH_2 , DIPEA, DMF, r.t.; iv) TFAA, CH_2Cl_2 reflux; v) *i*-PrMgCl, THF, -40 °C, aldehyde; vi) MnO_2 , CH_2Cl_2 .



Scheme 2. Reagents and conditions i) AlCl_3 , CH_2Cl_2 ; ii) $n\text{-BuLi}$, THF, -70°C ; iii) 6-chloro-N-methoxy-N-methylnicotinamide, -70°C to r.t.; iv) $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}$ /Pyridine r.t. to reflux; v) NH_3 anh./EtOH 150°C .

8a–c. Synthesis of compounds **11a–c** (Scheme 1) was performed just as it was described for synthesis of **5**, using as starting material the amines **8a–c** instead of 2-amino-5-iodo-pyridine **3**.

2.2. Biological activities

2.2.1. Cytotoxicity

All compounds were evaluated for cytotoxic activity *in vitro* against six human cell lines (glia carcinoma U251, prostate PC-3, leukemia K-562, colon HCT-15, human breast MCF7 and lung carcinoma SK-LU-1). To compare cytotoxic effects between a known CDK inhibitor and the compounds herein described we used Olomucine as a positive control and DMSO as solvent control. A starting screening with a fixed concentration of $50\ \mu\text{M}$ showed cytotoxicity for everyone of these six human cell lines (Table 1) with growth inhibition activity greatest than the observed for intermediary **5** and Olomucine. Compounds **6a**, **6b**, **6c**, **6e**, **11a**, and **11c** displayed to be the most active. In addition, the IC_{50} values for these compounds were determined and the results are summarized in Table 2.

As shown in Table 2, MCF7 and SK-LU-1 displayed to be the most sensitive cell lines. Comparing data of compounds **6a–e** (Tables 1 and 2) it is possible to observe that substitution with fluorine at 2-position (**6c**, **6d** and **6e**) of the phenyl ring shown better cytotoxic activity than those having a substitution at 3-position (**6a** and **6b**). Negligible

Table 1

Cytotoxicity of target compounds against six human cancer cell lines. Primary screening at $50\ \mu\text{M}$.^a

Compound	Cell line (growth inhibition %)					
	U251	PC-3	K-562	HCT-15	MCF7	SK-LU-1
5	20.8	50.9	33.1	56.3	36.7	25.6
6a	37.9	30.7	52.2	65.5	57.3	81.5
6b	38.4	32.6	50.1	59.2	56.5	48.3
6c	61.5	59.2	92.6	91.2	66.3	71.7
6d	59.3	61.5	88.0	91.7	65.1	70.5
6e	80.1	92.6	90.2	100	97.2	100
11a	92.7	63.7	95.5	78.0	80.4	69.2
11b	11.9	6.1	45.3	NA	30.8	29.2
11c	80.2	58.1	88.3	47.8	60.7	97.5
Olomucine	32.0	22.7	19.8	28.9	37.6	36.9

^a Each experiment was independently performed two times at a time of 48 h. NA, not active.

effect was observed when substitution with trifluoromethyl instead methyl attached to phenyl ring occurs (compounds **6a** and **6c** vs. **6b** and **6d**). When heterocyclic substituents at 6-position were introduced (compounds **11a–c**) comparable or improved cytotoxic activity was detected (Tables 1 and 2).

In order to examine the effect on cell cycle, apoptosis induction, and enzyme inhibition we selected the most active compounds (in the cytotoxicity assay) representing each substitution pattern (compounds **6a**, **6c**, and **11a**) and we used the most sensitive cell lines, MCF7 and SK-LU-1 (Table 2). Furthermore, the origin of these cell lines is representative of the most frequent cancer types worldwide [14].

2.2.2. Cell cycle analysis

Asynchronously growing MCF7 and SK-LU-1 cells were exposed to the chosen compounds at concentrations of $2 \times \text{IC}_{50}$ for 24 h, stained with propidium iodide and analyzed by flow cytometry in order to determine the total population distribution in the different phases (G0/G1, S, and G2/M). Control cells treated only with DMSO using the highest amount into the experiments proceeded through a normal cell cycle (Fig. 1a, and Table 3). However, under the same conditions, treatment of MCF7 cells with compound **6a** ($95\ \mu\text{M}$) did not show any difference compared with DMSO control (Fig. 1b, and Table 3). When MCF7 cells were treated with compound **6c** ($22\ \mu\text{M}$) it was observed a statistically significant increase of cell population in phase G0/G1 from 57.2% for control to 74.1% after treatment. Nevertheless for S and G2/M phase a decreasing of cell population was displayed (Fig. 1c, and Table 3). Treatment of MCF7 cells with compound **11a** ($89\ \mu\text{M}$) led to the enrichment of G0/G1 cell population going from 57.2% for control to 70.6% after treatment, while a decreasing of cells in S phase was observed, remaining cells in G2/M phase unchanged (Fig. 1d, and Table 3). The use of Olomucine as control did not have any effect on cell cycle of MCF7 cells (Table 3) at the selected concentration for these experiments ($112\ \mu\text{M}$). Control (DMSO), SK-LU-1 cell cycle histograms and percentage of population distribution are shown in Fig. 1e and Table 3. When SK-LU-1 cells were treated with compound **6a** ($106\ \mu\text{M}$) a statistically significant accumulation of cell population in G2/M phase was observed with 16.7% for control to 60.6% for treated cells. With respect to cells in S phase, they were unchanged and population in G0/G1 decreased significantly from 61.7% for control to 22.6% for treated cells (Fig. 1f, and Table 3). Compound **6c** ($70\ \mu\text{M}$) causes a most evident arrest at G2/M phase with a 75.7% of overall cell population in this phase only a 10.4% of cells in G0/G1 phase and cells in S phase were observed without change (Fig. 1g, and Table 3). Treatment with compound **11a** ($50\ \mu\text{M}$) induced weaker cell cycle alteration with arrest in G2/M phase (47.5%) decreasing the population in G0/G1 phase (32.9%) and displaying S phase without change (Fig. 1h, and Table 3). Olomucine treatment ($64\ \mu\text{M}$) showed a decrease of cells in G0/G1 phase and a weak arrest of cells in G2/M phase while cells in S phase remained unchanged. Differences observed with the stage of arrest between MCF7 and SK-LU-1 cells could be due to the genetic differences of each both cell line.

2.2.3. Apoptosis

In this work we also examined the effect of compounds **6a**, **6c** and **11a** on cell death (apoptosis) for SK-LU-1 cells. The appearance of phosphatidylserine (PS) residues (normally hidden within the plasma membrane) on the surface of the cell is used as a parameter to detect and measure apoptosis. The presence of PS on the cell surface creates one of the specific signals for recognition and removal of apoptotic cells by macrophages. These PS changes can be detected with the anticoagulant (annexin V), which has shown a high affinity for binding to PS. As the apoptotic process progresses, cell membrane integrity is lost. Using DNA specific viability

Table 2
Cytotoxicity IC₅₀ values for compounds **6a**, **6c**, **6e**, **11a** and Olomoucine against six cancer cell lines.^a

Compound	Cell line IC ₅₀ (μM)					
	U251	PC-3	K-562	HCT-15	MCF7	SK-LU-1
6a	80.6 ± 2.1	ND	83.6 ± 0.1	56.2 ± 2.7	47.5 ± 0.9	53.0 ± 7.7
6b	84.2 ± 4.5	69.1 ± 1.5	83.2 ± 3.1	57.1 ± 3.2	50.8 ± 1.3	57.1 ± 3.1
6c	51.9 ± 2.3	36.3 ± 3.0	10.9 ± 2.0	10.5 ± 0.8	10.7 ± 1.6	11.2 ± 1.0
6e	52.3 ± 4.6	28.0 ± 1.9	56.6 ± 3.3	25.0 ± 1.5	24.9 ± 2.1	35.1 ± 4.3
11a	27.8 ± 1.5	ND	54.6 ± 5.4	65.1 ± 4.3	44.3 ± 0.1	24.8 ± 0.4
11c	37.7 ± 5.5	52.3 ± 2.5	51.5 ± 3.3	56.8 ± 8.5	42.4 ± 4.1	25.1 ± 1.1
Olomoucine	81.5 ± 2.1	81.0 ± 7.4	89.3 ± 1.9	62.5 ± 3.0	55.9 ± 1.1	68.1 ± 0.41

^a Results express the mean IC₅₀ ± SD obtained from three independent experiments performed at 48 h. ND, not determinate at tested concentrations.

dyes, such as Propidium Iodide (PI) it is possible to distinguish between early apoptotic, late apoptotic, and dead cells. In order to prove these findings, selected cells were treated with compounds **6a**, **6c** and **11a** for 48 h at 106 μM, 70 μM and 50 μM respectively (2 × IC₅₀). FACS analyses (Fig. 2) showed populations of annexin V-stained cells (early apoptotic) and annexin V-PI stained cells (late apoptotic) with the drug concentrations used. Control cells treated only with DMSO alone showed a 5% of apoptosis. However when cells were treated with compound **6a** an average of 39.5% of cells underwent apoptosis, apoptosis was evident inclusive at 24 h of exposition as shown by the appearance of an evident sub-G1 peak in cell cycle analysis histograms (Fig. 1f), while compound **6c** and compound **11a** causes a 20% and 24.1% of apoptotic death respectively (Fig. 3). A weaker effect was observed at 24 h of treatment with compounds **6c** and **11a** as shown in cell cycle analysis histograms (Fig. 1g and h).

2.2.4. Inhibiting CDK-1 and CDK-2 activities

Since imidazo[1,2-a]pyridines have shown both cytotoxic activity and inhibition against CDK-2 and CDK-1 *in vitro* [10,11] we examined the activities for cell cycle relative complex cyclin B/CDK-1, and cyclin E/CDK-2 in presence of compounds **6a**, **6c**, and **11a**. In order to compare the inhibition grade of the activity of cyclin B/CDK-1, and cyclin E/CDK-2 complexes by tested compounds with that of Olomoucine (a CDK inhibitor), we performed a one-point

quantitative determination at IC₅₀ of Olomoucine (7 μM) [15]. We found a strong inhibition effect for cyclin B/CDK-1 activity when compound **6c** and compound **11a** were presented, 83% and 61% respectively (Table 4). Both compounds were most active than Olomoucine. A weaker inhibition of cyclin B/CDK-1 was observed with compound **6a** (Table 4). Evaluation of cyclin E/CDK-2 inhibition activities enabled us to detect inhibition percents of 44, 49, 45 and 51% for compounds **6a**, **6c**, **11a**, and Olomoucine respectively (Table 4). These results allow us to assume that compounds **6a**, **6c**, and **11a** may affect the cell cycle via modifying cyclin B/CDK-1, and cyclin E/CDK-2 activities; even though other targets can be involved so further experiments are necessary to make sure the exact mechanism.

3. Conclusion

The antiproliferative activity of 2-(N-trifluoroacetyl-amino)-imidazopyridines 6-substituted against a variety of cancer cell lines was evaluated. Most of synthesized compounds displayed modest cytotoxic activity in the micromolar range, especially against MCF7 and SK-LU-1. Compounds **6a**, **6c**, and **11a** showed significant arrest in G2/M phase, followed by apoptotic cell death in SK-LU-1 cells. Compounds **6a**, **6c**, and **11a** could affect the cell cycle via inhibition of cyclin B/CDK-1, and cyclin A/CDK-2 activities but since synthesized compounds are each basically equitoxic against MCF7 and SK-LU-1

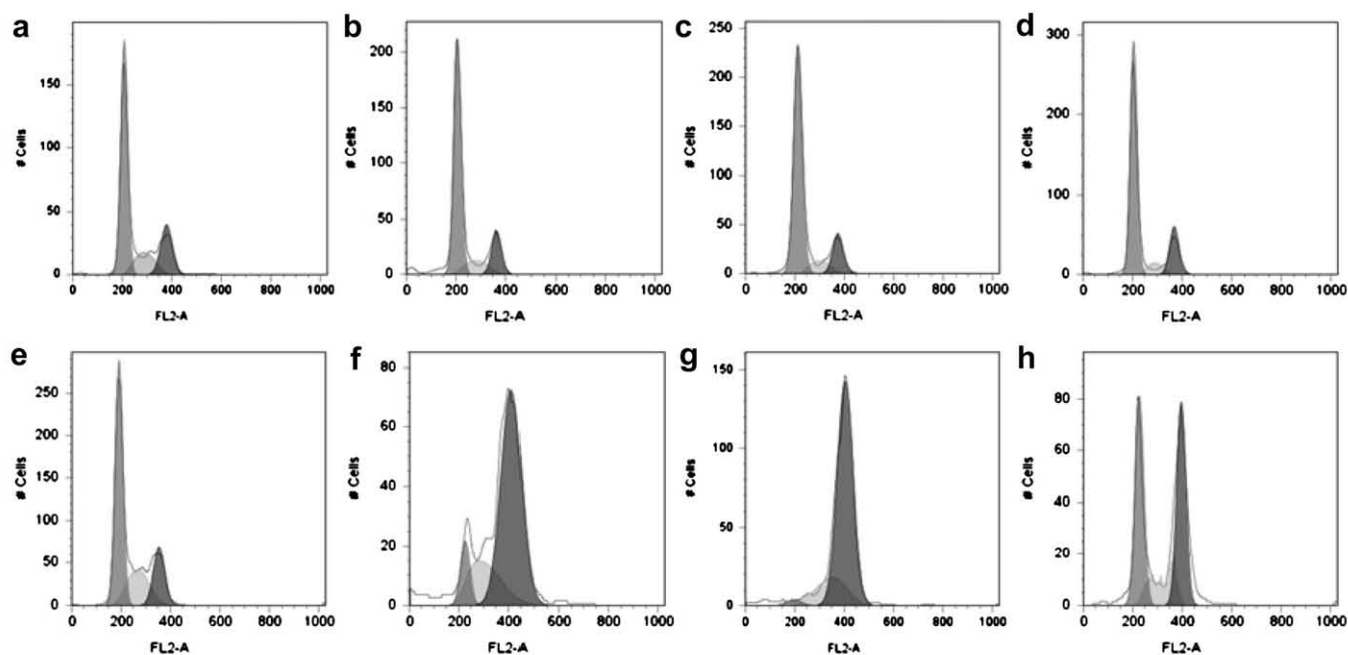


Fig. 1. Cell cycle distribution by flow cytometry in MCF7 cells treated with a) DMSO control, b) **6a** (95 μM), c) **6c** (22 μM), d) **11a** (89 μM); and SK-LU-1 cells treated with e) DMSO control, f) **6a** (106 μM), g) **6c** (70 μM), h) **11a** (50 μM). Compounds were tested at 2 × IC₅₀. Histograms are the most representative of three independent experiments.

Table 3Cell cycle distribution percentage by flow cytometry in MCF7 and SK-LU-1 cells treated for 24 h at $2 \times IC_{50}$.^a

Compound	MCF7			SK-LU-1		
	%G0/G1	%S	%G2/M	%G0/G1	%S	%G2/M
Control	57.2 ± 3.4	17.0 ± 1.2	22.1 ± 0.1	61.7 ± 2.9	18.2 ± 1.5	16.7 ± 0.9
6a	63.5 ± 4.9	14.5 ± 3.3	18.1 ± 3.5	22.6 ± 5.7*	16.2 ± 5.3	60.6 ± 1.1*
6c	74.0 ± 2.4*	7.1 ± 2.1*	13.4 ± 2.4	10.4 ± 11.9*	21.2 ± 1.8	75.7 ± 11.5*
11a	70.6 ± 3.2	6.3 ± 1.2*	20.2 ± 0.3	32.9 ± 6.1*	14.7 ± 6.5	47.5 ± 7.7*
Olomucine	60.6 ± 3.1	15.0 ± 2.4	23.2 ± 0.4	44.2 ± 2.9*	19.7 ± 8.5	31.8 ± 3.6*

^a Results express the means ± SD obtained from three independent experiments. * $P < 0.05$ as compared with solvent (DMSO) on 24 h treatment. Tested concentrations for MCF7 cells were **6a** (95 μM), **6c** (22 μM), **11a** (89 μM), and for SK-LU-1 cells **6a** (106 μM), **6c** (70 μM), **11a** (50 μM).

cells (Table 2) but have minimal cell cycle effects in MCF7 cells and significant cell cycle effects in SK-LU-1 cells we could consider that other targets may be involved and further experiments are necessary to assess the exact mechanism.

4. Experimental protocols

All reactions involving air-sensitive reagents were performed under inert atmosphere (N_2 or argon) using syringe-septum cap techniques. All glassware was oven-dried prior to use. All melting points were determined with a MEL-TEMP[®] capillary melting point apparatus and were uncorrected. Infrared spectra were determined in a spectrophotometer Perkin–Elmer 282-B and Nicolet FT-IR magna 55×. The mass spectra were recorded on a JEOL JMS-SX 10217 instrument (EI). The 1H NMR spectra were recorded on a Varian Gemini 200 MHz, Varian Unity 300 MHz. High resolution spectra were recorded using a Varian Inova 500 MHz (1H NMR and 125 MHz ^{13}C NMR) spectrometers. Chemical shifts are expressed as δ values relative to TMS as internal standard, J values are given in Hz and spectra were recorded in $CDCl_3$, $DMSO-d_6$ or a mixture of both. Flash chromatography was performed on silica gel 60 (230–400 mm) by Merck.

All the aldehydes and reagents herein used were acquired from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO) and used without further purification unless otherwise stated. THF was distilled from Na–benzophenone under N_2 .

4.1. Synthesis

4.1.1. 2-Amino-5-iodo-pyridine (**2**)

A mixture of 2-aminopyridine **1** (2.4 g, 25 mmol), periodic acid dihydrate (0.86 g, 3.75 mmol), and iodine (2.7 g, 10.7 mmol) was heated in a mixed solution of acetic acid (60 mL), water (3 mL), and sulphuric acid (0.5 mL) at 80 °C for 4 h. The reaction mixture was then poured into 10% aqueous $Na_2S_2O_3$ solution to quench any unreacted iodine and extracted with ether. The extract was washed

with 10% aqueous NaOH, dried (Na_2SO_4), and concentrated in vacuum. The residue was purified by flash chromatography on silica gel. Recrystallization from ethanol gave pale yellow prisms of **2** (4.75 g, 86% yield).

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 4.51 (s, 2H), 6.35 (d, 1H, J = 8 Hz), 7.62 (d, 1H, J = 8 Hz), 8.21 (s, 1H). $C_5H_5IN_2$, MW calcd. 220.96.

4.1.2. 5-Chloro-*N*-tosylpyridin-2(1*H*)-imine (**3**)

2-Amino-5-iodo-pyridine **2** (2.2 g, 10 mmol) was dissolved in anhydrous pyridine (10 mL). *p*-Toluensulphonyl chloride (2.1 g, 11 mmol) was added and the solution was heated at 90 °C under Nitrogen overnight. Pyridine was removed *in vacuo* to yield a brown solid. Water (200 mL) was added and the mixture was stirred for 1 h. The solid was collected and dried in vacuum to give 3.52 g (94% yield) of **3** as a beige solid; m.p. 177–178 °C.

1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$): δ = 2.34 (s, 3H), 6.92 (d, 1H, J = 8.7 Hz), 7.56 (AA'BB' system, 4H, J = 8.1 Hz), 7.98 (dd, 1H, J = 8.6 and 2.1 Hz), 8.34 (d, 1H, J = 2.2 Hz), 11.23 (bs, 1H, NH). $C_{12}H_{11}IN_2O_2S$, MW calcd. 374.2. Mass (FAB⁺) m/z = 374.9 (M + H)⁺.

4.1.3. (*E*)-2-(5-iodo-2-(tosylimino)pyridin-1(2*H*)-yl)acetamide (**4**)

To a suspension of **3** (3.7 g, 10 mmol) in anhydrous DMF (20 mL) was added *i*-Pr₂Net (1.42 g, 11 mmol) under argon. To the solution was added 2-iodoacetamide (2.1 g, 11 mmol) and the mixture was stirred at r.t. overnight. The solution was poured onto water (50 mL), filtered, washed with water (200 mL) and dried in vacuum to give **4** as a white solid (3.8 g, 88% yield) m.p. 245 °C.

1H NMR (200 MHz, $DMSO-d_6$): δ = 2.32 (s, 3H), 4.75 (s, 2H), 7.15 (d, 1H, J = 9.4 Hz), 7.38 (bs, 1H, NH), 7.43 (AA'BB' system, 4H, J = 8.3 Hz), 7.77 (bs, 1H, NH), 7.90 (dd, 1H, J = 9.5 and 2.2 Hz), 8.35 (d, 1H, J = 2.2 Hz). $C_{14}H_{14}IN_3O_3S$, MW calcd. 431.25.

4.1.4. 6-Iodo-2-(trifluoroacetamido)imidazo[1,2-*a*]pyridine (**5**)

To a suspension of **4** (2.16 g, 5 mmol) in anhydrous dichloromethane (40 mL) was added trifluoroacetic anhydride until dissolution and the solution was refluxed for 6 h. Solvents were removed

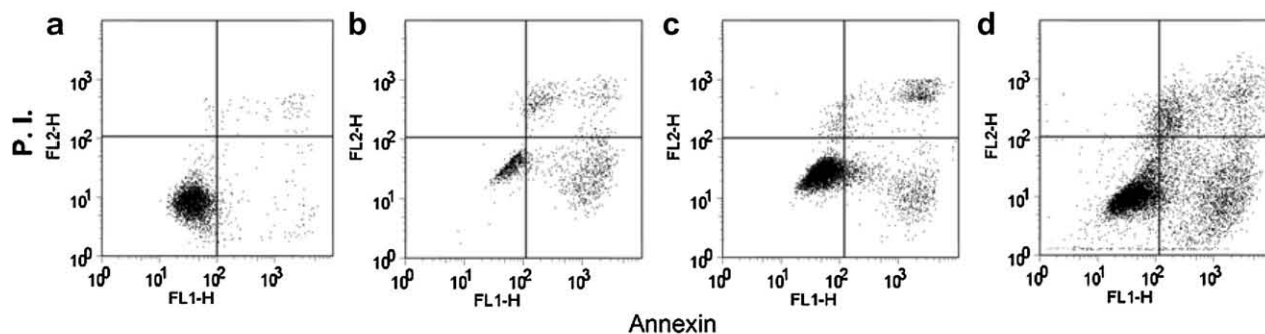


Fig. 2. Apoptosis induced in SK-LU-1 cell line. Apoptosis was assessed by phosphatidylserine exposure on the cell membrane after 48 h treatment with a) DMSO control, b) compound **6a** (106 μM), c) compound **6c** (70 μM), d) compound **11a** (50 μM). Concentrations are $2 \times IC_{50}$. Histograms are the most representative of three independent experiments.

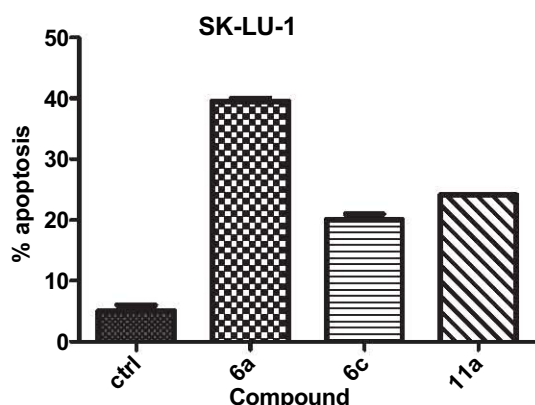


Fig. 3. Apoptosis percentage induced in SK-LU-1 cells. Apoptosis was assessed by phosphatidylserine exposure on the cell membrane after 48 h treatment at $2 \times IC_{50}$. The percentages were 5.1% for DMSO control, 39.5% for compound **6a** (106 μ M), 20.0% for compound **6c** (70 μ M), and 24.1% for compound **11a** (50 μ M). Percentages are the means of three independent experiments.

in vacuum and the solid was suspended in EtOAc (100 mL) and stirred for 30 min. The solid was collected and again stirred in water for 30 min. The solid was collected and dried in vacuum to give 1.2 g (65% yield) of **5** m.p. 245–246 °C.

1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$ + $DMSO-d_6$): δ = 7.28 (d, 1H, J = 9.5 Hz), 7.39 (dd, 1H, J = 1.5 and 9.5 Hz), 8.17 (s, 1H), 8.69 (dd, 1H, J = 0.5 and 1.5 Hz), 12.10 (bs, 1H, NH).

^{13}C NMR (125.7 MHz, $CDCl_3$ + $DMSO-d_6$): δ = 74.6 (C), 102.1 (C), 115.3 (q, J_{CF} = 287.2 Hz, $COCF_3$), 116.7 (CH), 130.7 (CH), 132.3 (CH), 139.32 (CH), 139.7 (C), 154.0 (q, J_{CF} = 38.6, $COCF_3$). $C_9H_5F_3IN_3O$, MW calcd. 355.06. Mass (FAB⁺): m/z = 356 (M + H)⁺.

4.1.5. General procedure for the synthesis of compounds **6a–e**

To a stirred solution of **5** (354.9 mg, 1 mmol) in THF (10 mL) at -40 °C under argon was added 2 M *i*-PrMgCl in THF (1 mL, 2 mmol) over a period of 2 min. Stirring was continued for 1 h at -40 °C before triethylamine (0.140 mL, 2 mmol) was added. After 15 min corresponding aldehyde (4 mmol) was added. The reaction mixture was stirred overnight at r.t. before quenching with sat. NH_4Cl (10 mL). Water (5 mL) was added to dissolve the formed precipitate and the mixture was extracted with CH_2Cl_2 (3×10 mL). The combined organic phases were dried (Na_2SO_4) and column chromatography on silica gel afforded **6a–e**.

4.1.6. 2,2,2-Trifluoro-*N*-(6-(3-fluoro-4-methylbenzoyl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-2-yl)acetamide (**6a**)

Compound **6a** was prepared starting from 3-fluoro-4-methylbenzaldehyde as electrophile and isolated as a yellow solid (109 mg, 30% yield); m.p. 210 °C.

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$ + $DMSO-d_6$): δ = 2.31 (d, 3H, J = 1.5 Hz), 7.33 (dd, 1H, J_{HH} = 7.5 and J_{HF} = 7.5 Hz), 7.41 (dd, 1H, J = 2 and 8 Hz), 7.46 (dd, 1H, J = 2 and 7.5 Hz), 7.47 (d, 1H, J = 7 Hz), 7.60 (dd, 1H, J = 1.5 and 9.0 Hz), 8.26 (bs, 1H), 8.92 (bs, 1H), 12.09 (bs, 1H). ^{13}C NMR (125.7 MHz, $CDCl_3$ + $DMSO-d_6$): δ = 14.2 (d, CH, J = 2.8 Hz),

103.6 (CH), 115.2 (CH), 115.3 (q, J_{CF} = 288.98 Hz), 115.4 (d, CH, J_{CF} = 24 Hz), 122.3 (C), 124.3 (CH), 129.5 (d, C, J_{CF} = 17.50 Hz), 129.9 (d, CH, J_{CF} = 1.7 Hz), 131.2 (d, CH, J_{CF} = 4.7 Hz), 131.5 (CH), 136.2 (d, CH, J_{CF} = 6.4 Hz), 140.7 (C), 141.6 (C), 154.1 (q, J_{CF} = 38.7 Hz), 160.2 (d, CF, J_{CF} = 246.6 Hz), 190.8 (C). $C_{17}H_{11}F_4N_3O_2$, MW calcd. 365.28. Mass (m/z , %): 365 (M^+ , 100), 296 (35), 256 (20), 137 (22).

4.1.7. 2,2,2-Trifluoro-*N*-(6-(3-fluoro-4-(trifluoromethyl)benzoyl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-2-yl)acetamide (**6b**)

Compound **6b** was prepared starting from 2-fluoro-5-trifluoromethylbenzaldehyde as electrophile and isolated as a yellow solid (126 mg, 30% yield); m.p. 120 °C.

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$ + $DMSO-d_6$): δ = 7.35 (dd, 1H, J_{HH} = 7.5 and J_{HF} = 7.5 Hz), 7.44 (dd, 1H, J = 2 and 8 Hz), 7.47 (dd, 1H, J = 2 and 7.5 Hz), 7.48 (d, 1H, J = 7 Hz), 7.57 (dd, 1H, J = 1.5 and 9.0 Hz), 8.36 (bs, 1H), 8.89 (bs, 1H), 12.21 (bs, 1H). ^{13}C NMR (125.7 MHz, $CDCl_3$ + $DMSO-d_6$): δ = 102.4 (CH), 115.0 (CH), 115.4 (q, J_{CF} = 287.2 Hz), 115.6 (d, CH, J_{CF} = 24 Hz), 122.1 (C), 122.3 (q, J_{CF} = 288.9 Hz), 124.3 (CH), 128.9 (d, C, J_{CF} = 17.50 Hz), 129.6 (d, CH, J_{CF} = 1.7 Hz), 131.2 (d, CH, J_{CF} = 4.7 Hz), 131.5 (CH), 136.2 (d, CH, J_{CF} = 6.4 Hz), 140.7 (C), 141.6 (C), 154.3 (q, J_{CF} = 38.7 Hz), 160.6 (d, CF, J_{CF} = 246.6 Hz), 189.8 (C). $C_{17}H_8F_7N_3O_2$, MW calcd. 419.25. Mass (m/z , %): 419 (M^+ , 100), 400 (15), 350 (95), 191 (63). IR (KBr, cm^{-1}): 3012, 2874, 1750, 1472, 1309.

4.1.8. 2,2,2-Trifluoro-*N*-(6-(2-fluoro-5-methylbenzoyl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-2-yl)acetamide (**6c**)

Compound **6c** was prepared starting from 2-fluoro-5-methylbenzaldehyde as electrophile and isolated as a yellow solid (128 mg, 35% yield); m.p. 208–210 °C.

1H NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$): δ = 2.36 (s, 3H, CH_3), 7.29 (dd, 1H, J = 1.5 and 8.5 Hz), 7.43 (dd, 1H, J = 2.0 and 4.5 Hz), 7.49 (qddd, 1H, J = 0.5, 2.0, 7 and 8.5 Hz), 7.63 (t, 1H, J = 1 and 2 Hz), 7.69 (dd, 1H, J = 2 and 7.5 Hz), 8.41 (s, 1H), 9.16 (dd, 1H, J = 1 and 1.5 Hz), 12.58 (bs, 1H, NH). ^{13}C NMR (125.7 MHz, $DMSO-d_6$): δ = 20.0 (CH_3), 104.31 (CH), 115.56 (CH), 116.10 (d, CH, J = 22.12 Hz), 123.10 (C), 123.8 (CH), 125.6 (C), 130.4 (CH), 133.48 (CH), 133.9 (d, CH, J = 7.29 Hz), 134.12 (C), 140.7 (C), 142.0 (C), 154.12 (q, J = 77.3 Hz), 157.45 (d, J_{CF} = 246.75 Hz), 189.82 (C). ^{19}F NMR (282.2 MHz, $DMSO-d_6$) δ = -117.28 (td, F, J = 2.0, 7 and 8.5 Hz), -72.0 (CF_3). $C_{17}H_{11}F_4N_3O_2$, MW calcd. 365.28. Mass (m/z , %): 365 (M^+ , 100), 296 (35), 256 (20), 137 (22). IR (KBr, cm^{-1}): 3258, 3093, 1718, 1615, 1564, 1212, 1147.

4.1.9. 2,2,2-Trifluoro-*N*-(6-(2-fluoro-5-(trifluoromethyl)benzoyl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-2-yl)acetamide (**6d**)

Compound **6d** was prepared starting from 2-fluoro-5-trifluoromethylbenzaldehyde as electrophile and isolated as a yellow solid (126 mg, 30% yield); m.p. 145–147 °C.

1H NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$): δ = 7.25 (dd, 1H, J = 1.5 and 8.5 Hz), 7.39 (dd, 1H, J = 2.0 and 4.5 Hz), 7.46 (qddd, 1H, J = 0.5, 2.0, 7 and 8.5 Hz), 7.53 (t, 1H, J = 1 and 2 Hz), 7.69 (dd, 1H, J = 2 and 7.5 Hz), 8.41 (s, 1H), 9.12 (dd, 1H, J = 1 and 1.5 Hz), 12.48 (bs, 1H, NH). ^{13}C NMR (125.7 MHz, $DMSO-d_6$): δ = 104.19 (CH), 115.26 (CH), 115.80 (d, CH, J = 22.12 Hz), 123.10 (C), 123.8 (CH), 124.10 (q, J = 246.75 Hz), 126.6 (C), 131.4 (CH), 133.48 (CH), 133.9 (d, CH, J = 7.29 Hz), 134.12 (C), 141.2 (C), 142.2 (C), 153.9 (q, J = 246.75 Hz), 157.45 (d, J = 77.3 Hz), 188.61 (C). $C_{17}H_8F_7N_3O_2$, MW calcd. 419.25. Mass (m/z , %): 419 (M^+ , 100), 400 (15), 350 (95). IR (KBr, cm^{-1}): 3014, 2836, 1725, 1670, 1492, 1217.

4.1.10. 2,2,2-Trifluoro-*N*-(6-(2-fluoro-4-(trifluoromethyl)benzoyl)imidazo[1,2-*a*]pyridin-2-yl)acetamide (**6e**)

Compound **6e** was prepared starting from 2-fluoro-4-trifluoromethylbenzaldehyde as electrophile and isolated as a yellow solid (134 mg, 32% yield); m.p. 100–102 °C.

Table 4
Enzyme inhibition data for compounds **6a**, **6c**, and **11a**.^a

CDK/cyclin	Compound (% inhibition)			Olomucine
	6a	6c	11a	
CDK-1/B	29	83	61	50
CDK-2/E	44	49	45	51

^a Values are the means for two experiments performed at 7 μ M of each tested compound.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 7.53 (d, 1H, J = 9 Hz), 7.55 (d, 1H, J = 9 Hz), 7.63 (d, 1H, J = 8.5 Hz), 7.73 (t, 1H, J = 7 Hz), 7.77 (dt, 1H, J = 1 and 9 Hz), 8.26 (s, 1H), 11.20 (bs, 1H). ^{13}C NMR (125.7 MHz, CDCl_3): δ = 103.73 (CH), 114.19 (CH), 115.57 (q, CF_3 , J = 289.9 Hz), 116 (CH), 121.85 (CH), 122.5 (q, CF_3 , J = 289.9 Hz), 124 (C), 125 (CH), 129.18 (C), 131.30 (CH), 131.38 (CH), 135.6 (C), 140.8 (C), 142.70 (C), 154.7 (CO), 159.30 (d, J_{CF} = 254.4 MHz), 188.3 (CO). $\text{C}_{17}\text{H}_8\text{F}_7\text{N}_3\text{O}_2$, MW calcd. 419.25. Mass (m/z , %): 419 (M^+ , 100), 400 (15), 350 (95), 191 (63). IR (KBr, cm^{-1}): 3033, 2866, 2832, 1726, 1630, 1572, 1332, 1217, 1137.

4.1.11. (6-Chloropyridin-3-yl)(1-methyl-1H-indol-3-yl)methanone (**7a**)

A suspension of aluminium(III)chloride (10.67 g, 80 mmol) in anhydrous dichloromethane (15 mL) was cooled to 0 °C and 6-chloronicotinyl chloride (7.74 g, 44 mmol) was slowly added over 5 min. The resulting mixture was then allowed to warm to r.t. over 30 min. The resulting suspension was then re-cooled to 0 °C and a solution of *N*-methylindole (5 g, 40 mmol) in dichloromethane (25 mL) was added dropwise over 15 min and then heated to reflux for 4 h. The reaction mixture was poured onto ethyl acetate (300 mL) and NaOH 2 N (100 mL) was added. Resulting precipitate was filtered and the organic phase was dried over NaSO_4 . Solvents were removed *in vacuo* and the solid was purified by silica gel column chromatography (9.7 g, 90% yield), m.p. 89 °C.

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ = 3.88 (s, 3H, CH_3), 7.37 (t, 1H, J = 4.8 Hz), 7.40 (t, 1H, J = 5.2 Hz), 7.45 (d, 1H, J = 0.8 Hz), 7.49 (d, 1H, J = 0.8 Hz), 7.53 (s, 1H), 8.10 (dd, 1H, J = 2.4 and 5.8 Hz), 8.39 (dt, 1H, J = 1.6 Hz), 8.81 (d, 1H, J = 2.4 Hz). $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{O}$, MW calcd. 270.71. Mass (m/z , %): 270 (M^+ , 78), 158 (100). IR (KBr, cm^{-1}): 3048, 1631, 1524, 1364, 1100.

4.1.12. (6-Chloropyridin-3-yl)(1-methyl-1H-imidazol-2-yl)methanone (**7b**)

1-Methyl-1H-pyrrole (2.07 g, 25.21 mmol) was dissolved in anhydrous dichloromethane (50 mL) and cooled to -60 °C under argon atmosphere. To the stirred solution was added dropwise *n*-Butyllithium 1.6 M (18.9 mL, 30.25 mmol) over a 15 min period. After 1 h at -60 °C a solution of Weinreb amide 6-chloro-*N*-methoxy-*N*-methylnicotinamide (6.06 g, 30.25 mmol) in dichloromethane (20 mL) was added dropwise maintaining the temperature below -50 °C. The mixture was stirred for 4 h at r.t. before quenching with a saturated ammonium chloride solution (20 mL). Organic layer was dried over Na_2SO_4 and purified by silica gel column chromatography to yield **7b** (4.6 g, 82% yield) m.p. 104–105 °C.

^1H NMR (200 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 4.11 (s, 3H, CH_3), 7.17 (s, 1H), 7.26 (d, 1H, J = 1.8 Hz), 7.44 (dd, 1H, J = 0.6 and 8.2 Hz), 8.64 (dd, 1H, J = 2.6, 5.8 Hz), 9.29 (dd, 1H, J = 0.6 and 1.8 Hz). $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{ClN}_3\text{O}$, MW calcd. 221.64. Mass (m/z , %): 220 (M^+ - 1, 100), 192 (85), 186 (55). IR (KBr, cm^{-1}): 3106, 1642, 1406, 1262, 1180, 900, 776.

4.1.13. (6-Chloropyridin-3-yl)(1H-imidazol-2-yl)methanone (**7c**)

6-Chloronicotinyl chloride (544.6 mg, 8 mmol) is added dropwise to a solution of imidazole (2.82 g, 16 mmol) and triethylamine (1.62 g, 16 mmol) in pyridine (5 mL) at 0 °C under Nitrogen. The mixture was stirred for 4 h at r.t. and then treated with 2 N NaOH (80 mL). Subsequent refluxing for 1 h, and addition of water (10 mL), and cooling leads to precipitation of the product which was purified by column chromatography. White solid (997 mg, 60% yield), m.p. 192–193 °C.

^1H NMR (200 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}-d_6$): δ = 7.46 (d, 1H, J = 0.6), 7.48 (s, 1H), 7.51 (d, 1H, J = 0.6), 8.88 (dd, 1H, J = 2.4 and 6.0 Hz), 9.45 (dd, 1H, J = 0.6 and 1.8). $\text{C}_9\text{H}_6\text{ClN}_3\text{O}$, MW calcd. 207.62. Mass (m/z , %): 207 (M^+ , 20), 179 (100), 144 (35). IR (KBr, cm^{-1}): 3275, 3114, 1639, 1409, 1135, 776.

4.1.14. (6-Aminopyridin-3-yl)(1-methyl-1H-indol-3-yl)methanone (**8a**)

Anhydrous NH_3 (15 mL) was added to a suspension of **7a** (541.5 mg, 2 mmol) in ethanol (15 mL) in a Parr reactor, the mixture was stirred at 150 °C for 8 h. Excess ammonia was permitted to evaporated and the product was purified by silica gel column chromatography (422 mg, 84% yield) m.p. 222–224 °C.

^1H NMR (200 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 3.87 (s, 3H, CH_3), 6.52 (d, 1H, J = 8.8 Hz), 6.65 (bs, 2H, NH_2), 7.22 (t, 1H, J = 5.8 Hz), 7.29 (t, 1H, J = 5.2 Hz), 7.54 (dd, 1H, J = 1.8 and 5.4 Hz), 7.84 (dd, 1H, J = 2.4 and 6.2 Hz), 8.07 (s, 1H), 8.19 (dd, 1H, J = 1.6 and 4.6 Hz), 8.45 (d, 1H, J = 2.2). $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}$, MW calcd. 251.28. Mass (m/z , %): 251 (M^+ , 100), 158 (70). IR (KBr, cm^{-1}): 3213, 3044, 1586, 1398, 1371.

4.1.15. (6-Aminopyridin-3-yl)(1-methyl-1H-imidazol-2-yl)methanone (**8b**)

Compound **8b** was prepared as described for **8a**, starting from (6-chloropyridin-3-yl)(1-methyl-1H-imidazol-2-yl)methanone **7b**, and purified by silica gel column chromatography (323 mg, 80% yield), m.p. 210–211 °C.

^1H NMR (200 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 3.93 (s, 3H, CH_3), 6.46 (dd, 1H, J = 0.8, 8.2 Hz), 6.94 (s, 2H, NH_2), 7.14 (d, 1H, J = 1.0 Hz), 7.49 (d, 1H, J = 0.8 Hz), 8.21 (dd, 1H, J = 2.4 and 6.4 Hz), 9.02 (dd, 1H, J = 0.4 and 1.8 Hz). $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}$, MW calcd. 202.1.

4.1.16. (6-Aminopyridin-3-yl)(1H-imidazol-2-yl)methanone (**8c**)

Compound **8c** was prepared as described for **8a**, starting from (6-chloropyridin-3-yl)(1H-imidazol-2-yl)methanone **7c**, and purified by silica gel column chromatography (320 mg, 85% yield), m.p. 225 °C.

^1H NMR (200 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}-d_6$): δ = 5.56 (bs, 2H), 6.56 (dd, 1H, J = 0.6 and 8.4 Hz), 7.28 (bs, 2H), 8.66 (dd, 1H, J = 2.2 and 6.4 Hz), 9.34 (d, 1H, J = 1.8 Hz), 12.49 (bs, 1H). $\text{C}_9\text{H}_8\text{N}_4\text{O}$, MW calcd. 188.19. Mass (m/z , %): 188 (M^+ , 55), 160 (70), 121 (35). IR (KBr, cm^{-1}): 3447, 3303, 2919, 1604, 1411, 1314, 1107.

4.1.17. 4-Methyl-*N*-(5-(1-methyl-1H-indole-3-carbonyl)pyridin-2-yl)benzenesulfonamide (**9a**)

(6-Aminopyridin-3-yl)(1-methyl-1H-indol-3-yl)methanone **8a** (628.2 mg, 2.5 mmol) was dissolved in anhydrous pyridine (10 mL). *p*-Toluensulphonyl chloride (567.4 mg, 3 mmol) was added and the solution was heated at 90 °C under Nitrogen overnight. Pyridine was removed in vacuum to yield a brown solid. Water (20 mL) was added and the mixture was stirred for 1 h. The solid was collected and dried in vacuum to give **9a** as a white solid (882 mg, 87% yield), m.p. 205 °C.

^1H NMR (200 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}-d_6$): δ = 2.40 (s, 3H, CH_3), 3.87 (s, 3H, CH_3), 7.26–7.41 (m, 6H), 7.62 (s, 1H), 7.89 (dd, 2H, J = 1.6 and 4.8 Hz), 8.03 (dd, 1H, J = 2.4 and 6.4 Hz), 8.37 (m, 1H), 8.59 (bs, 1H). $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$, MW calcd. 405.47.

4.1.18. 4-Methyl-*N*-(5-(1-methyl-1H-imidazole-2-carbonyl)pyridin-2-yl)benzenesulfonamide (**9b**)

Compound **9b** was prepared as described for **9a**, starting from **8b** and was obtained as a brown solid (731 mg, 82% yield) m.p. 180 °C.

^1H NMR (200 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}-d_6$): δ = 2.39 (s, 3H, CH_3), 4.04 (s, 3H, NCH_3), 7.12 (s, 1H), 7.18 (s, 1H), 7.26 (d, 2H, J = 8 Hz), 7.35 (bs, 1H, NH), 7.86 (d, 2H, J = 8.2 Hz), 8.47 (dd, 1H, J = 2.2 and 7 Hz), 9.30 (d, 1H, J = 2.2). $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$, MW calcd. 356.4.

4.1.19. *N*-(5-(1H-imidazole-2-carbonyl)pyridin-2-yl)-4-methylbenzenesulfonamide (**9c**)

Compound **9c** was prepared as described for **9a**, starting from **8c** and was obtained as a white solid (642 mg, 75% yield), m.p. 176 °C.

^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ = 2.34 (s, 3H, CH₃), 7.27 (dd, 1H, J = 0.8 and 7.2 Hz), 7.28 (d, 1H, J = 7.2), 7.35 (d, 2H, J = 8), 7.52 (dd, 1H, J = 0.8, 1.8 Hz), 7.80 (d, 2H, J = 8.2 Hz), 8.49 (dd, 1H, J = 2.2 and 7.2 Hz), 9.40 (d, 1H, J = 1.6 Hz), 13.50 (bs, 1H). C₁₆H₁₄N₄O₃S, MW calcd. 342.37. Mass (m/z , %): 342 (M^+ + 1, 5), 277 (100).

4.1.20. (Z)-2-(5-(1-methyl-1H-indole-3-carbonyl)-2-(tosylimino)-pyridin-1(2H)-yl)acetamide (**10a**)

To a suspension of **9a** (446 mg, 1.1 mmol) in anhydride DMF (5 mL) was added *i*-Pr₂Net (2.1 mL, 1.21 mmol) under argon. To the solution was added 2-iodoacetamide (219 mg, 1.2 mmol) and the mixture was stirred at r.t. overnight. The solution was poured onto water (20 mL), filtered, washed with water (50 mL) and dried in vacuum to give **10a** as a yellow solid (382 mg, 75% yield), m.p. 275 °C.

^1H NMR (200 MHz, CDCl₃ + DMSO- d_6): δ = 2.39 (s, 3H, CH₃), 3.88 (s, 3H, NCH₃), 4.97 (s, 2H, NH₂), 6.47 (bs, 1H, R₂NH), 7.23–7.42 (m, 5H), 7.60 (d, 1H, J = 9.4), 7.74 (bs, 1H), 7.81 (d, 1H, J = 8.2), 7.84 (s, 1H), 8.0 (dd, 1H, J = 2.2 and 7.2 Hz), 8.27 (d, 1H, J = 2.4), 8.31 (d, 1H, J = 1.8). C₂₄H₂₂N₄O₄S, MW calcd. 462.52.

4.1.21. (Z)-2-(5-(1-methyl-1H-imidazole-2-carbonyl)-2-(tosylimino)pyridin-1(2H)-yl)acetamide (**10b**)

Compound **10b** was prepared as described for **10a**, starting from **9b** and was obtained as a white solid (355 mg, 78% yield), m.p. 218–220 °C.

^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ = 2.34 (s, 3H, CH₃), 3.96 (s, 3H, NCH₃), 4.93 (bs, 2H), 7.21 (d, 1H, J = 0.8 Hz), 7.29 (d, 1H, J = 0.4 Hz), 7.37 (s, 1H), 7.42 (bs, 1H, NH), 7.61 (d, 1H, J = 0.4), 7.7 (d, 2H, J = 8.4 Hz), 7.82 (bs, 1H), 8.46 (dd, 1H, J = 2.2 and 9.6 Hz), 9.18 (d, 1H, J = 2.0 Hz). C₁₉H₁₉N₅O₄S, MW calcd. 413.45.

4.1.22. (Z)-2-(5-(1H-imidazole-2-carbonyl)-2-(tosylimino)pyridin-1(2H)-yl)acetamide (**10c**)

Compound **10c** was prepared as described for **10a**, starting from **9c** and was obtained as a white solid (294 mg, 67% yield) m.p. 214–215 °C.

^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ = 2.34 (s, 3H, CH₃), 4.94 (s, 2H), 7.29 (d, 2H, J = 8.4 Hz), 7.43 (d, 1H, J = 4.6 Hz), 7.44 (bs, 2H), 7.45 (d, 1H, J = 5 Hz), 7.70 (d, 2H, J = 8.2), 7.84 (bs, 1H), 8.60 (dd, 1H, J = 2.2 and 7.4 Hz), 9.40 (d, 1H, J = 2.0 Hz), 13.50 (bs, 1H). C₁₈H₁₇N₅O₄S, MW calcd. 399.42.

4.1.23. 2,2,2-Trifluoro-N-(6-(1-methyl-1H-indole-3-carbonyl)-imidazo[1,2-a]pyridin-2-yl)acetamide (**11a**)

To a suspension of **10a** (463.5 mg, 1 mmol) in anhydrous dichloromethane (10 mL) was added trifluoroacetic anhydride until dissolution and the solution was refluxed for 6 h. Solvents were removed in vacuum and the solid was purified by silica gel column chromatography (278 mg, 72% yield), m.p. 235–237 °C.

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ = 3.90 (s, 3H, CH₃), 7.29 (td, 1H, J = 1.0, 1.5 and 7.0 Hz), 7.34 (td, 1H, J = 1.5, 7 and 7 Hz), 7.59 (dd, 1H, J = 1.5 and 7 Hz), 7.61 (d, 1H, J = 9.5 Hz), 7.67 (dd, 1H, J = 1.5 and 9.5 Hz), 8.26 (td, 1H, J = 0.5, 1.5 and 7.0 Hz), 8.29 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 9.22 (dd, 1H, J = 1.0, 1.5 Hz), 12.55 (bs, 1H, NH). ^{13}C NMR (125.7 MHz, DMSO- d_6): δ = 33.23 (CH₃), 103.85 (CH), 110.67 (CH), 113.51 (C), 115.36 (CH), 115.65 (q, J_{CF} = 288.25), 121.50 (CH), 122.32 (CH), 123.26 (CH), 125.16 (CH), 125.38 (C), 126.64 (C), 129.61 (CH), 137.36 (C), 139.55 (CH), 140.13 (C), 141.58 (C), 154.00 (q, J_{CF} = 37.83), 185.54 (CO). C₁₉H₁₃F₃N₄O₂, MW calcd. 386.33.

4.1.24. 2,2,2-Trifluoro-N-(6-(1-methyl-1H-imidazole-2-carbonyl)-imidazo[1,2-a]pyridin-2-yl)acetamide (**11b**)

To a suspension of **10b** (415 mg, 1 mmol) in anhydrous dichloromethane (10 mL) was added trifluoroacetic anhydride until

dissolution and the solution was refluxed for 5 h. Solvents were removed in vacuum and the solid was purified by silica gel column chromatography (202 mg, 60% yield) m.p. 218–220 °C.

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ = 4.0 (s, 3H, CH₃), 7.25 (s, 1H), 7.57 (d, 1H, J = 9.5 Hz), 7.63 (s, 1H), 7.98 (dd, 1H, J = 1.5 and 9.5 Hz), 8.44 (s, 1H), 9.83 (t), 12.54 (bs, 1H, NH). ^{13}C NMR (125.7 MHz, DMSO- d_6): δ = 36.5 (CH₃), 104.60 (CH), 114.98 (CH), 116.1 (q, J_{CF} = 287.25), 123.0 (C), 141.1 (C), 142.25 (C), 142.52 (C), 154.54 (d, J_{CF} = 38.38), 179.84 (CO). C₁₄H₁₀F₃N₅O₂, MW calcd. 337.26. Mass (m/z , %): 337 (M^+ , 100), 268 (20), 240 (15). IR (KBr, cm⁻¹): 3432, 3296, 2925, 2852, 1724, 1637, 1567, 1406, 1153.

4.1.25. N-(6-(1H-imidazole-2-carbonyl)imidazo[1,2-a]pyridin-2-yl)-2,2,2-trifluoroacetamide (**11c**)

To a suspension of **10c** (400 mg, 1 mmol) in anhydrous dichloromethane (10 mL) was added trifluoroacetic anhydride until dissolution and the solution was refluxed for 5 h. Solvents were removed in vacuum and the solid was purified by silica gel column chromatography (181 mg, 56% yield), m.p. 302–304 °C.

^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ = 7.47 (s, 2H), 7.62 (d, 1H, J = 9.6), 8.13 (dd, 1H, J = 1.8 and 7.8 Hz), 8.48 (s, 1H), 10.09 (bs, 1H), 12.60 (bs, 1H). C₁₃H₈F₃N₅O₂, MW calcd. 323.2. Mass (m/z , %): 323 (M^+ , 100), 254 (75), 226 (40).

4.2. Biology

4.2.1. Cell culture and cytotoxicity assays

All tested substances were dissolved in DMSO and diluted to tested concentrations. Cell lines were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 2 mM L-glutamine at 37 °C under a 5% CO₂ atmosphere. For each cell line, 70% confluent cell culture flask was trypsinized and cells were seeded in 96 well plates at a density of 5000 cells/well; 24 h after seeding, the cells were treated with the different compounds for 48 h and viability was accessed by sulphorhodamine B (SRB) method.

When incubation with tested compounds was finished, adherent cell cultures were fixed out in situ by adding 50 μL of cold 50% (wt/vol) trichloroacetic acid and incubated at 4 °C for 1 h. The supernatant was discarded and the plates were washed with water and left dry to the air. The fixed cells were stained with 100 μL of 0.4% SRB solution. Protein-bonded dye was solubilized with 10 mM unbuffered Tris base and the optical density was achieved on a microplate reader (Elx 808; Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) using a test wavelength of 515 nm. Preliminary screening was made at 50 μM for tested compounds using 5-Fluorouracil as a positive control. A dose response curve was plotted for each most active compound and the IC₅₀ was estimated from non-linear regression using JMP software (version 3.2.1; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

4.2.2. Cell cycle analysis

Log phase MCF7 and SK-LU-1 cells were seeded out using RPMI-1640 + 10% FBS at 1×10^6 cells per 10 cm petri dish, and the cells were allowed to attach for 24 h at 37 °C. The compounds were added to the cells and incubated for an additional 24 h. After incubation, the cells were harvested with PBS-EDTA and then centrifuged at 3000 r.p.m. for 5 min. The PBS-EDTA was removed, and the cell pellet was washed with $1 \times$ PBS, followed by centrifugation at 3000 r.p.m. for 5 min. The supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in 5 mL of ice-cold 70% ethanol. The cells were then held at –20 °C for 24–48 h. The ethanol-fixed cells were centrifuged at 3000 r.p.m. for 5 min, the supernatant was removed, and the cell pellet was washed with $1 \times$ PBS. Following another centrifugation at 3000 r.p.m. for 5 min, the PBS was removed, and each sample pellet was mixed with 1 mL of staining

solution (0.1% Triton X-100, 0.2 mg/mL DNase-free RNase A, 20 µg/mL propidium iodide in PBS). The cells DNA content of cells was measured on a FACScan Flow Cytometer (Becton Dickinson, USA) and analysis was made with Flowjo software V 7.2.5 (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA).

4.2.3. Apoptosis

Apoptosis was performed by determining phosphatidylserine exposure on the cell membrane and DNA fragmentation. Cells were labeled with fluorescein isothiocyanate-conjugated annexin V and propidium iodide (PI) in binding buffer (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA), and analyzed using a FACScan Flow Cytometer (Becton Dickinson, USA) with Flowjo software V 7.2.5 (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA).

4.2.4. Kinase assays

All reactions were run in 20 µL containing 2.5% DMSO for 30 min at 37 °C and 7 µM of each tested compound. The cyclin B/CDK-1 assay conditions were 50 mM Tris–HCl (pH = 7.4), 10 mM MgCl₂, 50 mM NaF, 500 µM Na₃VO₄, 8 mM β-glycerophosphate, 1 mM DTT, 400 µM ATP (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA), 4 µCi ATP^γ³², 250 ng recombinant Histone 1.2 (Calbiochem, San Diego, CA, USA), and 220 ng cyclin B/CDK-1 (Biofin, Kassel, Germany) enzyme. The cyclin E/CDK-2 assay conditions were 50 mM Tris–HCl (pH = 7.4), 10 mM MgCl₂, 50 mM NaF, 500 µM Na₃VO₄, 8 mM β-glycerophosphate, 1 mM DTT, 400 µM ATP (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA), 4 µCi ATP^γ³², 250 ng recombinant Histone 1.2 (Calbiochem, San Diego, CA, USA), and 135 ng cyclin E/CDK-2 (Biofin, Kassel, Germany) enzyme. All reactions were terminated with 5 µL β-Merchптоethanol and the samples were resolved by

10% polyacrilamide gels and revealed in a Typhoon 9400 (Amersham Biosciences, Inc.). Band quantifications were made using a Kodak MI software.

References

- [1] A.M. Senderowicz, *Curr. Opin. Cell Biol.* 16 (2004) 670–678.
- [2] J.W. Huang, C.W. Shiau, J. Yang, D.S. Wang, H.C. Chiu, C.Y. Chen, C.S. Chen, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 4684.
- [3] M. Knockaert, P. Greengard, L. Meijer, *Trends Pharmacol. Sci.* 23 (2002) 417–426.
- [4] A.C. Humphries, E. Gancia, M.T. Gillian, S. Goodacre, D. Hallett, K.J. Merchant, S.R. Thomas, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16 (2006) 1518–1522.
- [5] S. Mavel, J.L. Renou, C. Galtier, R. Snoeck, G. Andrei, J. Balzarini, E. de Clercq, A. Gueiffier, *Arzneim. Forsch.* 51 (2001) 304.
- [6] J.C. Teulade, G. Grassy, J.P. Girard, J.P. Chapat, M.S. deBuochberg, *Eur. J. Med. Chem.* 13 (1978) 271.
- [7] T.S. Harrison, G.M. Keating, *CNS Drugs* 19 (2005) 65.
- [8] K. Fuchs, M. Romig, K. Mendla, H. Briem, K. Fechteler, *Chem. Abstr.* 136 (2002) 183824r.
- [9] Y. Abe, H. Kayakiri, S. Satoh, T. Inoue, Y. Sawada, K. Imai, N. Inamura, M. Asano, C. Hatori, A. Katayama, T. Oku, H. Tanaka, *J. Med. Chem.* 41 (1998) 564.
- [10] C. Hamdouchi, H. Keyse, E. Collins, C. Jaramillo, J.E. de Diego, C.D. Spencer, J.A. Dempsey, B.D. Anderson, T. Leggett, N.B. Stamm, R.M. Scyltz, S.A. Watkins, K. Cocke, S. Lemke, T.F. Burke, R.P. Beckmann, J.T. Dixon, T.M. Gurganus, N.B. Rankl, K.A. Houck, F. Zhang, M. Vieth, J. Espinosa, D.E. Timm, R.M. Campbell, B.K.R. Patel, H.B. Brooks, *Mol. Cancer Ther.* 3 (2004) 1–9.
- [11] C. Jaramillo, J.E. de Diego, C. Hamdouchi, E. Collins, H. Keyser, C. Sanchez-Martinez, M. del Prado, B. Norman, H.B. Brooks, S.A. Watkins, C.D. Spencer, J.A. Dempsey, B.D. Anderson, R.M. Campbell, T. Leggett, B. Patel, R.M. Schultz, J. Espinosa, M. Vieth, F. Zhang, D.E. Timmb, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14 (2004) 6095–6099.
- [12] C. Hamdouchi, C. Sanchez, J. Ezquerro, *Synthesis* (1998) 867–872.
- [13] L.A.M. Bastiaansen, E.F. Godefroi, *Synthesis* (1978) 675–676.
- [14] J. Ferlay, F. Bray, P. Pisani, D.M. Parkin, *Globocan 2002 Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide*, IACR Cancer Base No. 5, Version 2.0. IACR Press, Lyon, 2004.
- [15] J. Vesely, J. Havlicek, M. Strnad, et al., *Eur. J. Biochem.* 224 (1994) 771–786.