



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**DISEÑO DE PIRIDINAS 2,4,6-TRISUSTITUIDAS COMO
ANTICANCERÍGENOS INHIBIDORES DE LA AKT CINASA Y ESTUDIO
SOBRE SU SÍNTESIS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

DIANA LORENA PRADO ROMERO

DIRECTOR DE TESIS

DRA. MARÍA ALICIA HERNÁNDEZ CAMPOS



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX., 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dra. María Alicia Hernández Campos
VOCAL: Dr. Alfonso Sebastián Lira Rocha
SECRETARIO: M. en C. Nayeli López Balbiaux
1er. SUPLENTE: Dra. Guillermina Yazmín Arellano Salazar
2° SUPLENTE: Dr. José Luis Medina Franco

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**FACULTAD DE QUÍMICA, DEPARTAMENTO DE FARMACIA, CONJUNTO E, LABORATORIO
122, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

ASESOR DEL TEMA:

Dra. María Alicia Hernández Campos

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. Elkin Eduardo Sanabria Chanaga

SUSTENTANTE:

Diana Lorena Prado Romero

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de esta tesis, con el número de proyecto 251807 y número de becario 25690.

A la DGAPA-PAPIIT proyecto IN221416 y al PAIP proyecto 5000-9133, los cuales fueron de gran importancia para el desarrollo de esta tesis.

El cáncer agrupa un conjunto de enfermedades caracterizadas por el crecimiento y diseminación descontrolados de células. En los últimos años, se ha observado un aumento significativo en la incidencia de diferentes tipos de cáncer, posicionándose como la segunda causa de muerte a nivel mundial. Es por ello que existe un creciente interés por la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas para su tratamiento. En dicha búsqueda, se ha encontrado que la proteína cinasa B (AKT) es un blanco atractivo para el diseño de nuevas moléculas anticancerígenas, al encontrarse sobreexpresada en diferentes tipos de células cancerosas.

Se conocen tres isoformas de AKT (AKT1, AKT2 y AKT3), las cuales participan en una de las vías de señalización más importantes de la tumorigénesis, además de estar involucradas en la angiogénesis, la regulación del ciclo celular, la señalización de factores de crecimiento y citocinas, así como en la prevención de apoptosis. Por ello, su inhibición representa un excelente enfoque en la búsqueda de nuevas sustancias para el tratamiento del cáncer.

Estudios previos condujeron a la identificación de una piridina 2,4,6-trisustituida que mostró inhibición importante sobre las tres isoformas de AKT. Tomando como base dicha molécula se llevó a cabo el diseño de nuevos compuestos como inhibidores potenciales de las isoformas de AKT. Los nuevos compuestos fueron evaluados mediante estudios de acoplamiento y dinámica molecular.

Considerando los resultados de los estudios anteriores, se realizó la optimización del compuesto original y se diseñaron nuevas series de moléculas, incluyendo la serie DL5 presentada en este trabajo. Las piridinas 2,4,6-trisustituidas se evaluaron con estudios de acoplamiento molecular y se encontró una metodología de síntesis para obtener los compuestos finales DL5A y DL5G.

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
AcOEt	Acetato de etilo
AcOH	Ácido acético
AcOK	Acetato de potasio
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AKT/ PKB	Proteína cinasa B
APH	Aceptores de puentes de hidrógeno
Arg	Arginina
Asp	Ácido aspártico
ATP	Adenosín trifosfato
B₂Pin₂	4,4,4',4',5,5,5',5'-octametil-2,2'-di-1,3,2-dioxaborolano
BAD	Promotor de muerte celular asociado a Bcl-2
CDI	1,1-Carbonildiimidazol
CDKI	Inhibidor de cinasa dependiente de ciclina
CH₃CN	Acetonitrilo
CHCl₃	Cloroformo
COMU	Hexafluorofosfato de (1-ciano-2-etoxi-2-oxoetilidenaminoxi)dimetilamin o-morfolin-4-il-carbenio
COSY	Del inglés: <i>Correlation Spectroscopy</i>
d	Señal doble
-D₂O	Señal que desaparece con agua deuterada
DCC	<i>N,N</i> -diciclohexilcarbodiimida
dd	Señal doble de dobles
DMAP	4-(dimetilamino)piridina
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida

DMSO	Dimetil sulfóxido
DPH	Donadores de puentes de hidrógeno
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
eq	Equivalentes
ER	Enlaces rotables
ESOL	Del inglés: <i>Estimated Solubility</i>
Et₃N	Trietilamina
FoxOs	Del inglés: <i>Forkhead box class O</i>
g	Gramos
Glu	Glutamato
Gly	Glicina
HMBC	Del inglés: <i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i>
HSQC	Del inglés: <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
logP	Logaritmo del coeficiente de reparto octanol-agua
Lys	Lisina
m	Señal múltiple
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
MHz	Mega Hertz
mL	Mililitros
Mmol	Milimol
mTOR	Receptor mamífero de rapamicina
MW	Microondas
ND	No determinado
NMM	<i>N</i> -metilmorfolina
NOESY	Del inglés: <i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Pd(dPPf) Cl₂·CH₂Cl 2	[1,1'- bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloro o paladio(II) en complejo con diclorometano
Pd(PPh₃)₄	Tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0)
PDB	Del inglés: <i>Protein Data Bank</i>
PDGFR	Receptores de factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDK1	Cinasa-1 dependiente de PI3K
pf	Punto de fusión
PH	Dominio con homología a Pleckstrina
Phe	Fenilalanina
PI3K	Fosfatidilinositol-3 cinasa
PIP2	Fosfatidilinositol-3,4-bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PM	Peso molecular
ppm	Partes por millón
PyBOP	Hexafluorofosfato de (benzotriazol-1- iloxi)tripirridodinfosonio

RE	Receptor de estrógeno
Rf	Factor de retención
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMN ¹³C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
RMN ¹H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
s	Señal simple
S_N2	Sustitución nucleofílica bimolecular
t	Señal triple
t-BuOK	Terbutóxido de potasio
Thr	Treonina
tPSA	Área polar superficial topológica
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VEGFR	Receptores de VEGF
δ	Desplazamiento químico

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1. Cáncer como problema de salud.....	2
2.1.1. Tratamiento.....	4
2.1.2. Ruta de señalización de AKT.....	6
2.1.3. Inhibidores de AKT.....	8
2.2. Diseño de fármacos asistido por computadora.....	10
2.2.1. Acoplamiento molecular.....	10
2.2.2. Modelado por homología.....	11
2.3. Piridinas 2,4,6-trisustituidas como potenciales anticancerígenos.....	12
2.3.1. Formación de amidas.....	19
3. JUSTIFICACIÓN.....	21
4. HIPÓTESIS.....	22
5. OBJETIVOS.....	22
5.1. Objetivo general.....	22
5.2. Objetivos particulares.....	22
6. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	24
6.1. Piridinas 2,4,6-trisustituidas.....	24
6.2. Parte computacional.....	24
6.2.1. Modelado por homología.....	24
6.2.2. Estudio de acoplamiento molecular.....	25
6.3. Parte química.....	26
6.3.1. Síntesis del compuesto 6-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-2 <i>H</i> -benzo[<i>b</i>][1,4]oxazin-3(4 <i>H</i>)-ona (5).....	27
6.3.2. Síntesis de los compuestos DL5A y DL5G.....	28
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
7.1. Parte computacional.....	31
7.1.1. Modelado por homología.....	31
7.1.2. Acoplamiento molecular.....	33

7.1.3.	Propiedades moleculares de la serie DL5	39
7.2.	Parte química	41
7.2.1.	Síntesis de las <i>N</i> -(2,6-dicloropiridin-4-il)benzamidas (11-13)	41
7.2.2.	Síntesis del compuesto 6-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-2 <i>H</i> -benzo[<i>b</i>][1,4]oxazin-3(4 <i>H</i>)-ona (5).....	58
7.2.3.	Síntesis de los compuestos finales DL5A y DL5G.....	58
8.	CONCLUSIONES	60
9.	PERSPECTIVAS	61
10.	REFERENCIAS	62
11.	ANEXO I. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	69
11.1.	Instrumentación y materiales.....	70
11.2.	Técnicas para la síntesis de los compuestos.....	71
11.2.1.	(4-bromo-2-nitrofenoxi)acetato de etilo (3)	71
11.2.2.	6-bromo-2 <i>H</i> -1,4-benzoxazin-3(4 <i>H</i>)-ona (4)	72
11.2.3.	6-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-2 <i>H</i> -benzo[<i>b</i>][1,4]oxazin-3(4 <i>H</i>)-ona (5) 73	
11.2.4.	6,6'-(4-aminopiridin-2,6-diil)bis(2 <i>H</i> -1,4-benzoxazin-3(4 <i>H</i>)-ona) (7).....	74
11.2.5.	<i>N</i> -(2,6-dicloropiridin-4-il)benzamidas (11-13)	75
11.2.6.	<i>N</i> -(2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2 <i>H</i> -benzo[<i>b</i>][1,4]oxazin-6-il)piridin-4-il)benzamidas (DL5A, DL5G)	77
11.3.	Constantes físicas y rendimiento de los compuestos obtenidos	79
12.	ANEXO II. ESPECTROS	80
13.	ANEXO III. MODELADO POR HOMOLOGÍA.....	118
14.	ANEXO IV. ACOPLAMIENTO MOLECULAR.....	118

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Fármacos aprobados para el tratamiento de tumores sólidos y su blanco terapéutico5

Tabla 2. Valores de energías de unión de las estructuras de las piridinas trisustituidas de la serie 2 con las tres isoformas de AKT 16

Tabla 3. Valores de energías de unión de las estructuras de las piridinas trisustituidas de la serie 3 con las tres isoformas de AKT 18

Tabla 4. Resumen de los resultados de validación de modelos generados 31

Tabla 5. Valores de energías de unión de las estructuras de las piridinas trisustituidas de la serie DL5 con las tres isoformas de AKT 33

Tabla 6. Propiedades moleculares de los compuestos de la serie DL5..... 40

Tabla 7. Condiciones de reacción utilizadas para llevar a cabo la formación de amidas con agentes acoplantes..... 44

Tabla 8. Condiciones de reacción utilizadas para la formación de amidas con los cloruros de acilo correspondientes 48

Tabla 9. Condiciones de reacción utilizadas para la formación de amidas con el compuesto (7) 50

Tabla 10. Correlación del enlace $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ observada en el espectro HSQC de 12..... 52

Tabla 11. Correlación del enlace $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ observada en el espectro HMBC de 12..... 53

Tabla 12. Correlación del enlace $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ observada en el espectro HSQC de DL5A..... 55

Tabla 13. Correlación del enlace $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ observada en el espectro HMBC de DL5A..... 57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Incidencia mundial del cáncer.	3
Figura 2. Cascada de señalización de la vía PI3K/AKT/mTOR.....	7
Figura 3. Estructuras químicas de inhibidores de AKT.	9
Figura 4. Representación esquemática del acoplamiento molecular	11
Figura 5. Estructuras químicas de inhibidores de AKT	13
Figura 6. Comparación del modo de unión predicho para el compuesto A (azul) y la posición del compuesto B (amarillo) en la estructura cristalográfica de AKT2.....	13
Figura 7. Acoplamiento molecular de A y H-89 con AKT-2	15
Figura 8. Piridinas 2,4,6-trisustituidas diseñadas como inhibidores de AKT que interactúan con el sitio de unión a ATP.....	16
Figura 9. Interacciones consideradas para el diseño de piridinas trisustituidas.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 10. Diagramas de Ramachandran de los modelos A (izquierda) y D (derecha).	32
Figura 11. Acoplamiento molecular del compuesto S2-3 con AKT1	34
Figura 12. Acoplamiento molecular del compuesto DL5B con AKT1.....	35
Figura 13. Acoplamiento molecular de DL5A con AKT2	36
Figura 14. Acoplamiento molecular de DL5A (rojo), DL5F (verde) y DL5G con AKT1	38
Figura 15. Acoplamiento molecular del compuesto DL5I con AKT1.....	39
Figura 16. RMN ¹ H (DMSO-d ₆ , 400 MHz, δ en ppm) del compuesto <i>N,N</i> -díciclohexilcarbamimidato de 4-clorobenzoilo.....	46
Figura 17. Agentes acoplantes utilizados.	47
Figura 18. Correlación ¹ H- ¹ H a dos y tres enlaces de distancia (COSY) del compuesto 12.	52
Figura 19. Correlación del enlace ¹ H- ¹³ C (HSQC) del compuesto 12.	53
Figura 20. Correlación ¹ H- ¹³ C a dos y tres enlaces de distancia (HMBC) del compuesto 12.	54
Figura 21. Numeración arbitraria dada al compuesto DL5A para la asignación de señales en los espectros de RMN.....	55

Figura 22. Correlación ^1H - ^1H a dos y tres enlaces de distancia (COSY) del compuesto DL5A	56
Figura 23. Correlación del enlace ^1H - ^{13}C (HSQC) del compuesto DL5A.....	56
Figura 24. Correlación ^1H - ^{13}C a dos y tres enlaces (HMBC) del compuesto DL5A.	57
Figura 25. Mecanismo general del acoplamiento de Suzuki.....	57

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el cáncer representa una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Su incidencia se ha visto incrementada en los últimos años, por lo que se prevé que para el 2020 representará un problema de salud pública para México. Es por esto que la búsqueda de tratamientos más eficaces y seguros que los disponibles hoy en día es de suma importancia.

La palabra cáncer agrupa a un gran número de enfermedades, caracterizadas por la división descontrolada de células anormales, lo cual se debe a mutaciones genéticas. Entre estas mutaciones se encuentran aquellas que afectan a las isoformas de AKT (AKT1, AKT2 y AKT3), las cuales están involucradas en procesos como la regulación del ciclo celular.

Se sabe que cada una de las tres isoformas se encuentran comúnmente desequilibradas en distintos tipos de cáncer. Por ello, se han realizado investigaciones para encontrar inhibidores de AKT y desarrollarlos como posibles fármacos anticancerígenos.

Con este conocimiento, utilizando herramientas computacionales, ha sido posible identificar compuestos con potencial para inhibir a AKT. Se han hecho estudios de acoplamiento y dinámica molecular para llevar a cabo el diseño de moléculas basado en la estructura. A partir de estos estudios se han propuesto distintas piridinas 2,4,6-trisustituidas como posibles candidatos.

En nuestro grupo de investigación, se han diseñado series de compuestos de este tipo de piridinas como parte de la optimización de un compuesto encontrado a partir del cribado virtual. A raíz de ello, se originó la serie DL5 a la cual se le realizaron estudios de acoplamiento molecular, identificando de esta forma posibles compuestos inhibidores de AKT.

2. ANTECEDENTES

2.1. Cáncer como problema de salud

El término cáncer hace referencia a un grupo de padecimientos caracterizados por la división descontrolada de células anormales, las cuales pueden invadir tejidos adyacentes u otros órganos mediante un proceso denominado metástasis.^{1, 2}

Las células humanas son reemplazadas cuando envejecen o se dañan, sin embargo, este proceso de sustitución por nuevas células se descontrola conforme se desarrolla el cáncer.³ De esta forma, sobreviven células que deberían renovarse, al mismo tiempo que se generan nuevas células no requeridas. Estas células sobrantes pueden dividirse indefinidamente y formar tumores.¹

El cáncer puede originarse casi en cualquier parte del cuerpo humano, el cual está constituido por trillones de células.¹ Las células cancerosas proliferan rápidamente gracias a cambios metabólicos que les permiten utilizar nutrientes como glucosa y glutamina para producir ATP, así como metabolitos para su crecimiento.⁴

La capacidad de proliferación que poseen las células cancerígenas se debe a diversas razones, una de las cuales es su menor especialización. Es decir, al contrario de las células sanas, las células cancerígenas no maduran hasta convertirse en células especializadas. Aunado a ello, también son capaces de ignorar señales de apoptosis o de detención del ciclo celular. Asimismo, es posible que evadan al sistema inmune y favorezcan la angiogénesis.^{1, 5}

Los cambios anteriores son causados por mutaciones genéticas que afectan principalmente tres tipos de genes: proto-oncogenes, genes supresores de tumor y genes de reparación de ADN. De los estudios realizados respecto a

dichas afectaciones se sabe que ciertas mutaciones ocurren comúnmente en muchos tipos de cáncer.¹

El cáncer representa la segunda causa de muerte en el mundo, ocasionando aproximadamente una de cada seis defunciones.² En los últimos años se ha incrementado la incidencia de dicha enfermedad a nivel mundial (**Figura 1**), registrándose 14 millones de nuevos casos y 8.2 millones de defunciones; se prevé que este número aumente cerca del 70% en los siguientes 20 años.²

Tasas estandarizadas de incidencia mundial, en ambos sexos, para distintos tipos de cáncer excepto cáncer de piel no melanoma

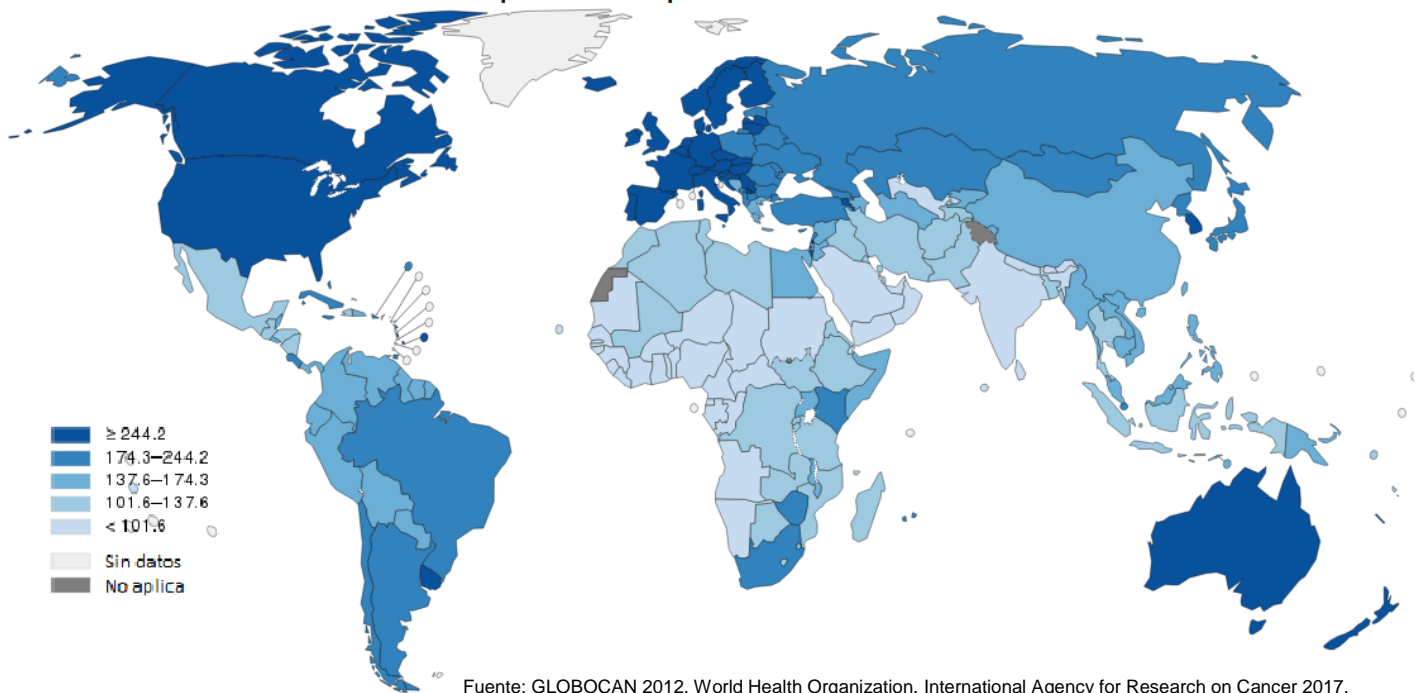


Figura 1. Incidencia mundial del cáncer.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2012, los tipos de cáncer más diagnosticados a nivel mundial fueron los de: pulmón, hígado, colon, recto, estómago y mama.² En México, durante 2014, el cáncer en órganos hematopoyéticos fue el de mayor presencia en hombres y mujeres menores de 20 años. Mientras que, en los varones de 20 años y más, el cáncer más común

fue el de órganos digestivos y en las mujeres del mismo grupo de edad, el de mama.⁶

Las defunciones causadas por cáncer en la edad adulta afectan seriamente la economía de un país, esto debido a los gastos que representa en términos de salud pública y a la pérdida de población económicamente activa. Se proyecta que las muertes prematuras tendrían un costo de 12,120.91 millones de pesos, en México para 2020, convirtiendo al cáncer en un problema de salud pública.⁷

2.1.1. Tratamiento

Una vez diagnosticado el cáncer, el protocolo a seguir para un tratamiento adecuado y eficaz puede abarcar una o más modalidades. Lo anterior se define de acuerdo al tipo y avance del cáncer. Los tratamientos más comunes incluyen la cirugía, la radioterapia o la quimioterapia.^{5, 8}

La quimioterapia surte su efecto en todo el cuerpo, debido a ello, es posible que los medicamentos utilizados afecten células sanas que crecen rápidamente.⁹ Esto es porque la mayoría de los fármacos utilizados dañan el ADN de todas las células que se dividen de forma rápida. Además, suelen administrarse a dosis altas, lo que puede desencadenar la resistencia de células cancerosas.⁵

Tanto la radioterapia como la quimioterapia suelen tener efectos secundarios como fatiga, náuseas y vómito, cambios en la piel, caída de cabello, anemia, falta de apetito, entre otros. Debido a que los tratamientos más utilizados provocan efectos indeseables, que suelen disminuir la calidad de vida de los pacientes, se ha buscado desarrollar opciones que combatan al cáncer de forma más selectiva.^{5, 8,9}

De esta forma han surgido otras opciones de tratamiento como: inmunoterapia, terapia dirigida o terapia con hormonas;⁸ esta última puede ser utilizada sólo en ciertos tipos de tumores hormono-dependientes, como sería el caso de la

mayoría de los cánceres de mama o próstata.⁵ La inmunoterapia incluye a los anticuerpos monoclonales, citocinas y vacunas. Los anticuerpos monoclonales son considerados como un tipo de terapia dirigida.^{8, 9}

La terapia dirigida surgió a partir del entendimiento del cáncer como un padecimiento originado a partir de células que sufren alteraciones genéticas, dando lugar al desarrollo de fármacos que actúan sobre los cambios que promueven el crecimiento, la división y diseminación de células cancerosas (**Tabla 1**). Algunas aberraciones, como la sobreexpresión de factores de crecimiento, son comunes en varios tipos de cáncer, lo cual lleva a la detección de blancos terapéuticos atractivos para el desarrollo de nuevos fármacos.^{5, 8, 9}

Tabla 1. Fármacos aprobados para el tratamiento de tumores sólidos y su blanco terapéutico⁵

Grupo terapéutico	Fármaco	Blanco	Proceso alterado
Anticuerpos monoclonales	Trastuzumab	Her-2	Amplificación de señal pro-crecimiento
	Cetuximab	EGFR	
	Bevacizumab	VEGF	Angiogénesis
Quimioterapia/ Radioterapia	Múltiple	ADN, complejo mitótico	Angiogénesis, Replicación de ADN, Activación ciclo celular
Terapia endócrina	Tamoxifen	RE	Amplificación de señal pro-crecimiento
	Fulvestrant	RE	
	Inhibidores de aromatasa	Aromatasa	
Moléculas pequeñas	Sunitinib	c-kit, PDGFR, VEGFR	Angiogénesis, Transmisión de señal pro-crecimiento
	Imatinib	c-kit, PDGFR	Transmisión de señal pro-crecimiento
	Lapatinib	Her-2	
	Erlotinib	EGFR	

Los tratamientos que tienen como blanco al metabolismo del tumor tienen mayor probabilidad de mejorar el pronóstico del paciente; sin embargo, las rutas metabólicas que se encuentran alteradas en las células cancerosas también se encuentran activas en células normales. Esto representa un reto para el desarrollo de fármacos que modifiquen procesos metabólicos, ya que la dosis se ve limitada por el riesgo de toxicidad.¹⁰

Durante la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos se ha planteado la posibilidad de desarrollar fármacos cuya actividad afecte principalmente a las células cancerosas y puedan utilizarse en diversos tipos de cáncer. En este contexto, ciertas rutas de señalización se encuentran alteradas en el cáncer convirtiéndolas en fuentes potenciales de nuevas dianas terapéuticas.¹¹

Dentro de esas rutas de señalización se encuentra la que involucra a AKT, cuyos componentes han sufrido amplificación, mutación o translocación con mayor frecuencia que cualquier otra ruta en diversos tipos de cáncer. Esto último posiciona a aquellos componentes en dicha vía de señalización como dianas terapéuticas para el desarrollo de nuevos anticancerígenos.¹¹⁻¹⁴

2.1.2. Ruta de señalización de AKT

La proteína cinasa B (PKB), conocida también como AKT, es una serina/treonina cinasa. Existen tres isoformas de AKT: AKT1, AKT2 y AKT3; las cuales se encuentran codificadas en tres cromosomas distintos; entre ellas comparten más del 80% de su secuencia de aminoácidos y contienen tres estructuras en común: el dominio con homología a Pleckstrina (PH) en N-terminal, el dominio catalítico de cinasa y la región reguladora en C-terminal.¹⁵

La cascada de señalización que involucra a la AKT cinasa es fundamental para la supervivencia celular y se sabe que su desequilibrio está altamente relacionado con la tumorigénesis en diversos tipos de cáncer.¹⁶⁻²¹ Dicha cascada de señalización incluye también a la fosfatidilinositol-3 cinasa (PI3K) y al receptor mamífero de rapamicina (mTOR).^{22, 23}

La vía de señalización de la AKT se activa por distintos eventos, lo más común es que se inicie por la unión de ligandos como factores de crecimiento, citocinas u hormonas, a receptores tirosina cinasa;^{15,24,25} provocando una

autofosforilación de los residuos de tirosina en el dominio intracelular del receptor.²⁴

Lo anterior tiene como resultado el reclutamiento de PI3K, la cual sufre un cambio conformacional que resulta en su activación como cinasa. PI3K fosforila al fosfatidilinositol-3,4-bifosfato (PIP2) para originar fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3).²⁴⁻²⁸ PIP3 se une a AKT en la membrana plasmática, lo cual permite la entrada de PDK1 cuya fosforilación activa parcialmente a AKT. La activación total de AKT es realizada por mTORC1 (Figura 2).^{21, 29}

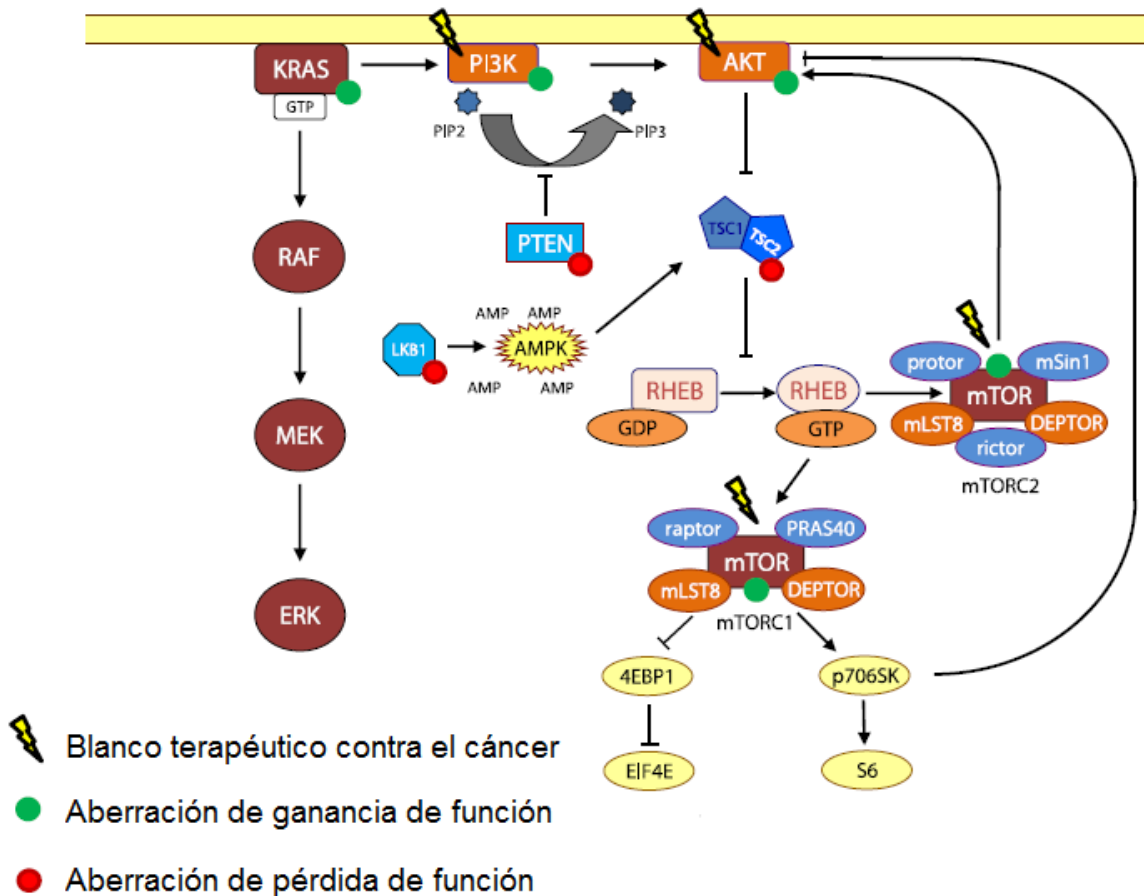


Figura 2. Cascada de señalización de la vía PI3K/AKT/mTOR.¹⁶

AKT regula el ciclo celular y la proliferación de forma directa cuando tiene como blanco a las CDKIs p21^{WAF1/CIP1} y p27^{KIP1}. También puede modular indirectamente los niveles de ciclina D1 y p53. En cuanto a la supervivencia celular, AKT inhibe directamente señales pro-apoptóticas como BAD y FoxOs.³⁰

Dada la participación en la tumorigénesis de la vía de señalización de PI3K/AKT/mTOR, los reguladores “upstream” y efectores “downstream” de AKT representan blancos atractivos para el desarrollo de nuevos fármacos.³⁰ Por ello, se han realizado múltiples intentos para identificar inhibidores específicos de AKT que presenten propiedades farmacológicas aceptables.¹⁶

2.1.3. Inhibidores de AKT

Resultado de las investigaciones realizadas, se sabe que cada una de las isoformas suele encontrarse alterada en ciertos tipos de cáncer. AKT2 y AKT3 son las más frecuentemente amplificadas, aunque los niveles de AKT1 pueden encontrarse elevados en cáncer de mama y próstata.^{15,16,30}

AKT2 se relaciona con la agresividad del cáncer y bajas tasas de supervivencia, además es común detectarla en cáncer de próstata, ovario, mama, páncreas y colorrectal. Mientras que AKT3 se sobreexpresa en cáncer de mama y próstata hormono-independientes.^{15, 16}

Sin embargo, la alta homología que presentan las isoformas de AKT ha dificultado la búsqueda de nuevos inhibidores selectivos para cada una de ellas.¹⁶ A pesar de ello, ha sido posible desarrollar inhibidores de AKT, los cuales se dividen por su mecanismo de acción en: inhibidores competitivos de ATP, con base lipídica, inhibidores de pseudosustrato, inhibidores alostéricos del dominio de cinasa de AKT, anticuerpos y compuestos que interactúan con el dominio PH.^{16, 24}

En la **Figura 3** se muestran ejemplos de algunos inhibidores de AKT. El blanco terapéutico de la Perifosina es el dominio PH; A-443654 y H-89 son inhibidores competitivos del sitio de unión a ATP; AKTi-1 inhibe específicamente a AKT1, mientras que AKTi-2 y 2UW9 inhiben a AKT2; finalmente el compuesto A inhibe a las tres isoformas de AKT.^{17, 31, 32}

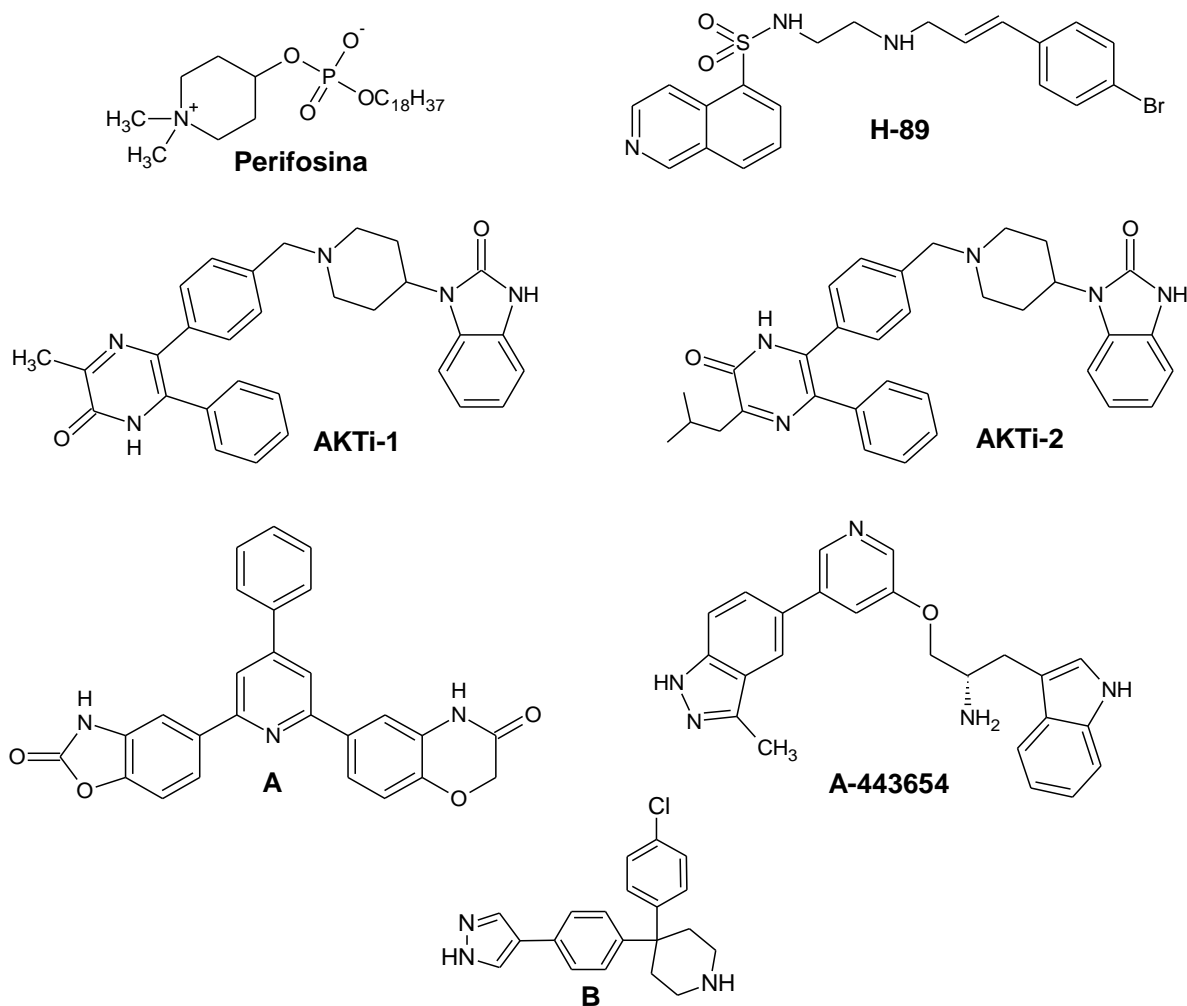


Figura 3. Estructuras químicas de inhibidores de AKT.

A partir de las estructuras químicas identificadas como inhibidores de AKT, se han realizado diversos cribados para desarrollar compuestos innovadores.³¹⁻³⁴ Hablando específicamente del grupo de los inhibidores competitivos de ATP, se han encontrado pirazoles, indazoles, aminofurazanos, entre otros.³⁵⁻³⁷

Aunado al conocimiento de dichas moléculas, se tiene disponible la estructura cristalográfica de las isoformas AKT1 y AKT2, con lo que se han llevado a cabo diversos estudios computacionales para la identificación de nuevos inhibidores. De esta forma, ha sido posible realizar optimizaciones hasta generar compuestos como el **A-443654 (Figura 3)**.³¹

Mediante la realización de cribado virtual se logró identificar el compuesto **A** (**Figura 3**) como inhibidor micromolar de AKT.³¹ Tomando dicho compuesto como punto de partida, se han hecho programas de optimización utilizando el diseño basado en la estructura para proponer una nueva serie de inhibidores de AKT.^{32,33}

2.2. Diseño de fármacos asistido por computadora

El diseño de fármacos asistido por computadora ha cobrado especial importancia en las últimas décadas para identificar nuevas moléculas clínicamente relevantes. Se utiliza principalmente para obtener grupos pequeños de compuestos que pueden evaluarse experimentalmente a partir de bibliotecas, guiar la optimización de compuestos líderes para mejorar sus propiedades y diseñar compuestos novedosos.^{38, 39}

Para su implementación existen dos aproximaciones importantes: una basada en la estructura del receptor y otra basada en el ligando. La primera de ellas se centra en el conocimiento de la estructura de la biomolécula blanco para calcular energías de interacción; mientras que la segunda utiliza el conocimiento de ligandos activos e inactivos para ejecutar búsquedas de similitud estructural o modelos predictivos.⁴⁰

Los métodos basados en la estructura incluyen técnicas como el acoplamiento molecular y la dinámica molecular.⁴⁰ En el caso particular del desarrollo de nuevos fármacos contra AKT es posible utilizar esta aproximación gracias a que hay estructuras cristalográficas reportadas de AKT1 y AKT2.

2.2.1. Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular o “*molecular docking*” es un método a través del cual es posible predecir la orientación preferente que tendrá una molécula pequeña

o ligando al interactuar con un blanco o una diana farmacológica. Es utilizado para predecir el modo de unión entre la molécula de interés y su receptor estimando la energía libre de unión entre ambos (**Figura 4**).^{41, 42}

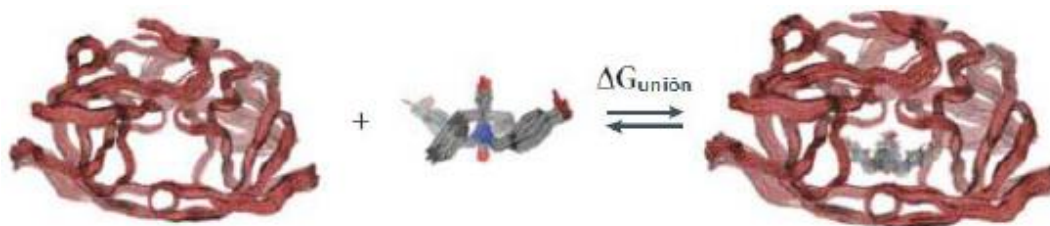


Figura 4. Representación esquemática del acoplamiento molecular.⁴²

Se utilizan diferentes funciones para estimar dicha energía de unión, las más comunes son: (a) las que suman la fuerza de interacciones de van der Waals, electrostáticas y de puentes de hidrógeno entre todos los átomos de las dos partes que forman el complejo de unión; o (b) funciones empíricas que suman interacciones como contactos hidrofóbicos, número de puentes de hidrógeno y enlaces rotables inmovilizados.⁴³

La función que se ocupa para realizar la evaluación depende del programa computacional utilizado. También puede variar el método utilizado para explorar el espacio conformacional del ligando, los cuales incluyen métodos sistemáticos y métodos aleatorios.⁴³

2.2.2. Modelado por homología

A pesar del avance en técnicas como la cristalografía de rayos X y la resonancia magnética nuclear (RMN), para obtener estructuras tridimensionales de proteínas, en ocasiones no se cuenta con la estructura de la macromolécula a utilizar para estudios basados en la estructura, como sería el acoplamiento molecular; sin embargo, es posible crear modelos de dicha macromolécula a partir de estructuras ya reportadas.^{41, 44}

El modelado por homología se basa en la premisa que dicta: proteínas evolutivamente relacionadas tendrán secuencias similares de aminoácidos, y por lo tanto, estructuras proteicas similares. De esta forma, es posible recurrir a estructuras cristalográficas de proteínas relacionadas con aquella que se quiere modelar, como sería el caso de distintas isoformas, para obtener un modelo de la estructura tridimensional del blanco.^{40, 41}

Para obtener un modelo por homología existen varios programas computacionales, con los cuales, siguiendo una secuencia general de pasos se consigue la estructura tridimensional deseada. Dicha secuencia se resume en la identificación inicial de las proteínas relacionadas, posterior selección de la secuencia de aminoácidos a modelar, alineación de las secuencias, construcción del modelo y finalmente la evaluación del modelo generado.⁴⁰⁻⁴³

2.3. Piridinas 2,4,6-trisustituidas como potenciales anticancerígenos

Las investigaciones realizadas para encontrar nuevos potenciales anticancerígenos han dado como resultado el descubrimiento de una gran variedad de moléculas. Hablando particularmente de los inhibidores de AKT, varias familias de compuestos han sido identificadas, entre estas se encuentran las piridinas 2,4,6-trisustituidas.

Recientemente, nuestro grupo de investigación ha identificado al compuesto **A** (**Figura 5**) como un potencial inhibidor de AKT, el cual posee una estructura novedosa para el desarrollo de nuevas moléculas anticancerígenas. A continuación se describen las estrategias utilizadas para originar nuevas familias de compuestos.

En la **Figura 5** se muestran algunos inhibidores de AKT, entre estos se destaca el compuesto **B**, el cual ha sido reportado como inhibidor de AKT2 (PDB ID: 2UW9) en el orden nanomolar.³¹ Anteriormente se ha comparado el modo de

unión de **B** con el compuesto **A** (**Figura 6**), encontrándose que ambos adoptan una conformación similar en el sitio activo de la proteína AKT2;³² por ello, la estructura del compuesto **B** se tomó como modelo para optimizar al compuesto **A**.

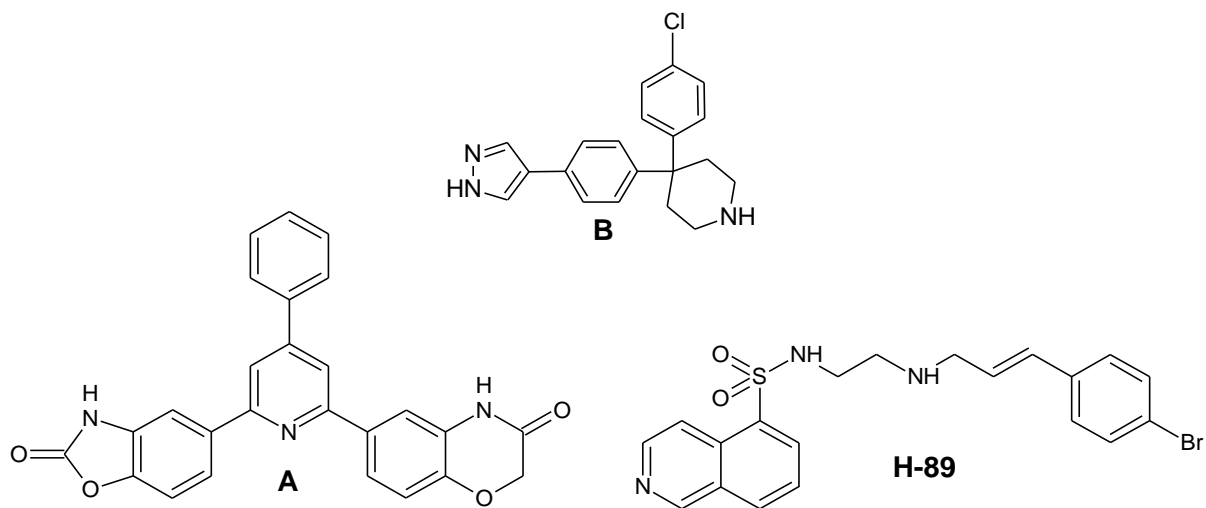


Figura 5. Estructuras químicas de inhibidores de AKT.^{31, 32}

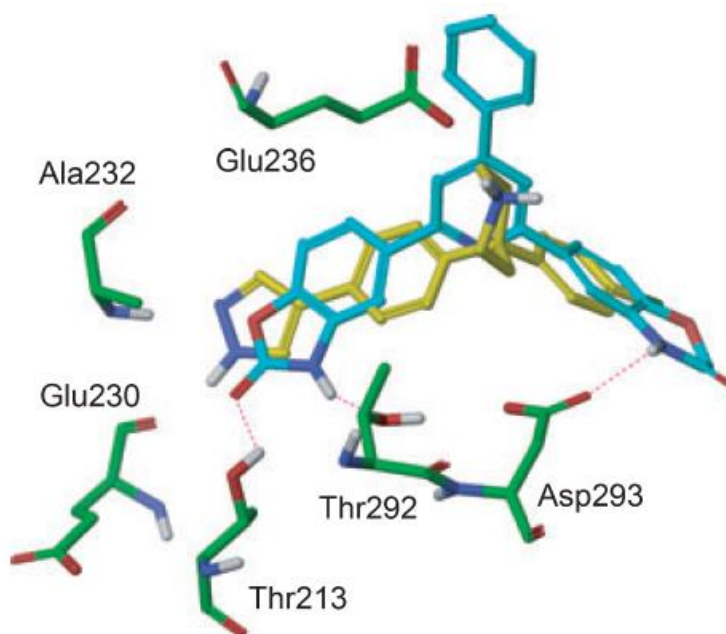


Figura 6. Comparación del modo de unión predicho para el compuesto **A** (azul) y la posición del compuesto **B** (amarillo) en la estructura cristalográfica de AKT2.³²

De esa forma, debido a la cercanía observada entre el ligando y el residuo Glu236 de AKT2 (**Figura 6**), se propuso la sustitución del fenilo de **A** por grupos polares para favorecer una interacción de tipo puente de hidrógeno con el residuo antes mencionado.³² También se ha reportado que el compuesto **A** adopta una conformación en forma de Y en el complejo de unión con las isoformas de AKT, en la cual los sustituyentes del anillo de piridina son determinantes para la interacción con el sitio de unión a ATP.³³

Esa conformación observada para el compuesto **A** es similar a la predicha para el compuesto **H-89**, otro inhibidor reportado para AKT.³¹ La similitud entre las conformaciones es evidenciada en la **Figura 7** en la que se muestran los residuos de aminoácidos a 4.5 Å de distancia al ligando. Los residuos de la proteína son representados como sigue: residuos polares en rosa, residuos hidrofóbicos en verde, residuos ácidos con contorno rojo, residuos básicos con contorno azul.³²

La **Figura 7 (B)** muestra además flechas verdes que indican puentes de hidrógeno, nubes azules que denotan superficie del ligando expuesta al disolvente, los halos azul claro representan interacción de los residuos con el ligando, el contorno punteado señala espacio para sustitución metálica, y los átomos expuestos completamente no presentan contorno.³²

De la conformación observada en estudios anteriores para el compuesto **A**, se sabe que este forma interacciones de tipo puente de hidrógeno con los residuos Thr213, Asp293 y Thr292 de AKT2,³³ las cuales dependen de los anillos de 2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)ona o 1,3-benzoxazol-2-(3*H*)ona presentes en las posiciones 2 y 6 del anillo de piridina.

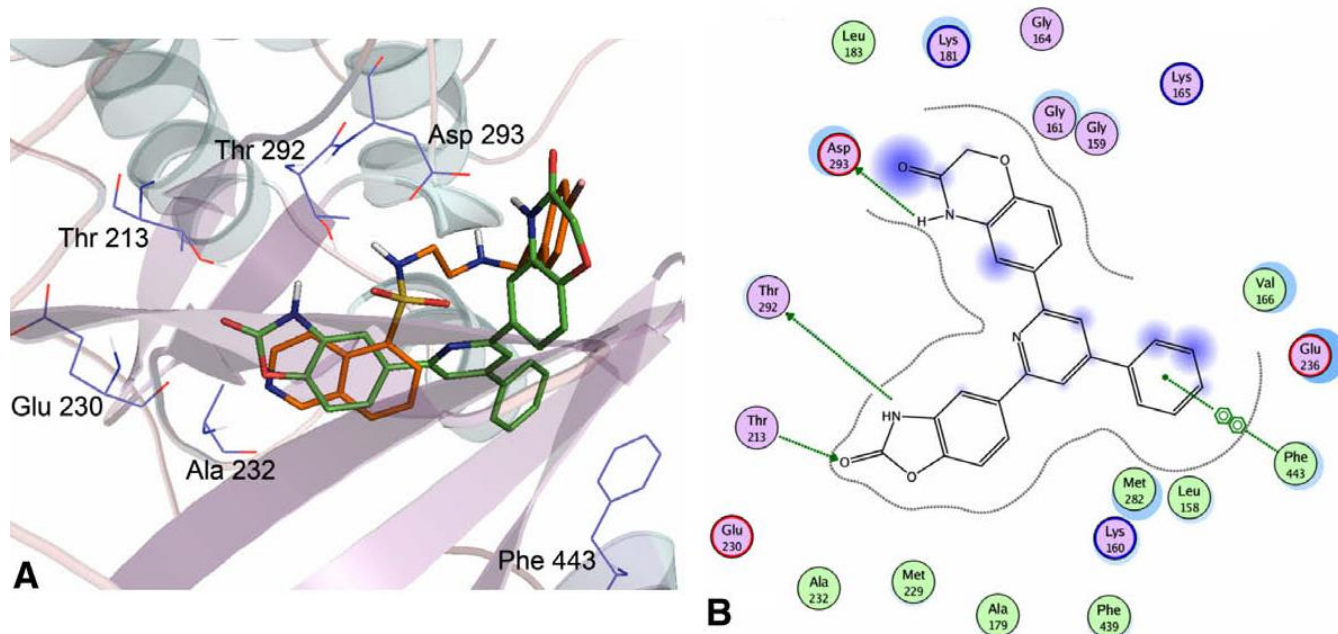


Figura 7. Acoplamiento molecular de A y H-89 con AKT-2. (A) Modelo 3D mostrando a A y H-89 en un acoplamiento molecular sobrepuesto. (B) Diagramas de interacción 2D de A con AKT-2.³²

Esas observaciones sumadas a las discutidas anteriormente sobre la similitud de la conformación de **A** y **B** originaron el diseño de nuevas familias de piridinas 2,4,6-trisustituídas en nuestro grupo de investigación (**Figura 8**); entre estas familias se encuentran las series 2 y 3, cuyos valores de energía de unión han sido determinados previamente a este trabajo y se presentan en las **Tablas 2** y **3**.

Continuando con el programa de optimización, en este trabajo se presentan moléculas simétricas en posiciones 2 y 6 del anillo de piridina para ocupar un mayor volumen en el *pocket* de las isoformas de AKT y favorecer aún más las interacciones encontradas anteriormente (**Figura 9**). Aunado a ello se conservó el fenilo en posición 4 para mantener las interacciones π - π observadas previamente y este se sustituyó con diferentes grupos para favorecer interacciones con residuos cercanos.³³

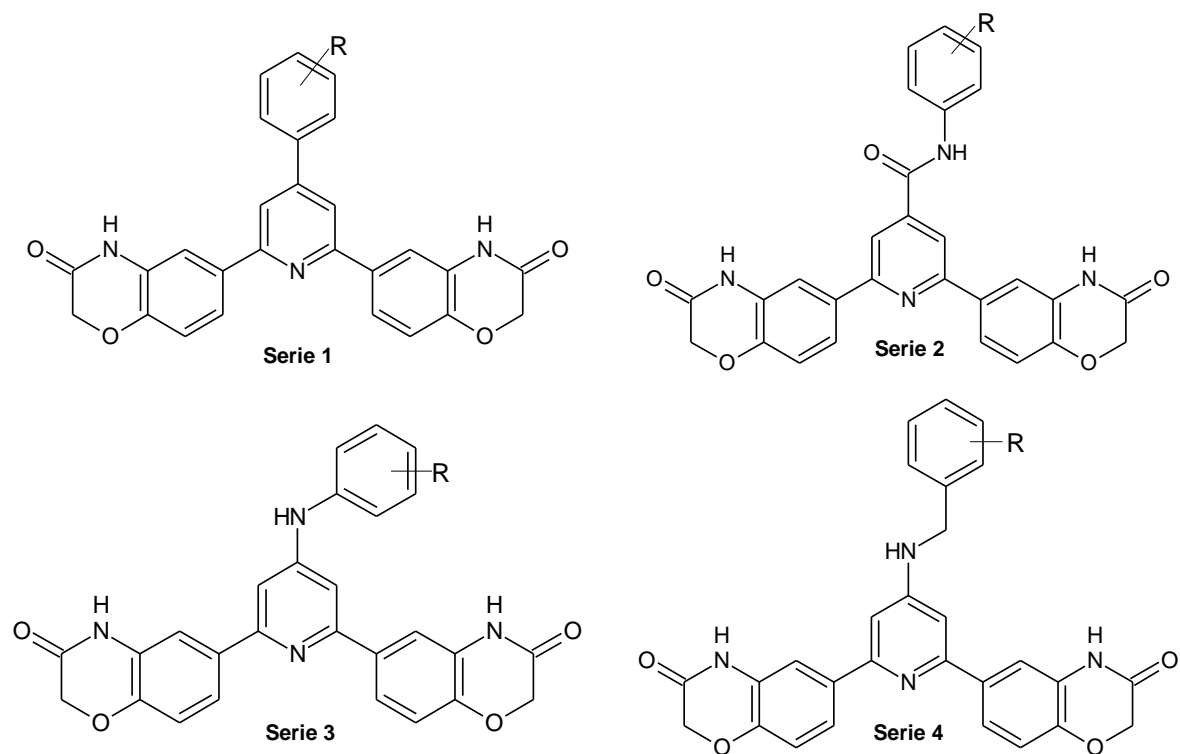
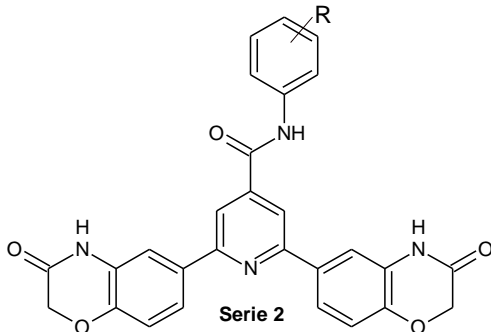


Figura 8. Piridinas 2,4,6-trisustituidas diseñadas como inhibidores de AKT que interactúan con el sitio de unión a ATP.³³

Además, tomando como base los compuestos de la serie 2, se realizó el cambio de posición del nitrógeno de la carboxamida (**Esquema 1**), con el propósito de favorecer la interacción por puentes de hidrógenos con las isoformas de AKT. Con este trabajo se pretende evaluar el efecto de la modificación estructural a compuestos de las series 2 y 3 mediante acoplamiento molecular; asimismo, se busca estudiar la formación de amidas a partir de una amina poco nucleofílica, lo cual representa uno de los pasos claves para acceder a este nuevo tipo de moléculas.

Tabla 2. Valores de energías de unión de las estructuras de las piridinas trisustituidas de la serie 2 con las tres isoformas de AKT³³



Clave	R	AKT1		AKT2		AKT3	
		$\Delta G_{\text{unión}}$ (Kcal/mol)	Clúster	$\Delta G_{\text{unión}}$ (Kcal/mol)	Clúster	$\Delta G_{\text{unión}}$ (Kcal/mol)	Clúster
S2-1	H	-12.72	20	-11.04	17	-12.87	20
S2-2	4-Cl	-13.27	20	-11.22	20	-13.43	20
S2-3	3,4-Cl	-13.64	20	-11.33	20	-13.79	20
S2-4	3,5-CF ₃	-12.46	18	-9.93	20	-12.57	19
S2-5	3-Cl	-12.97	19	-11.23	19	-13.08	18
S2-6	3-OCH ₃	-12.57	19	-10.98	17	-12.75	18
S2-7	4-CN	-13.82	20	-11.26	20	-13.99	20
S2-8	3-CF ₃	-12.45	9	-10.96	16	-12.83	19
S2-9	4-F	-12.74	20	-11.02	20	-12.92	20
S2-10	3,5-Cl	-12.94	20	-10.74	19	-13.12	20

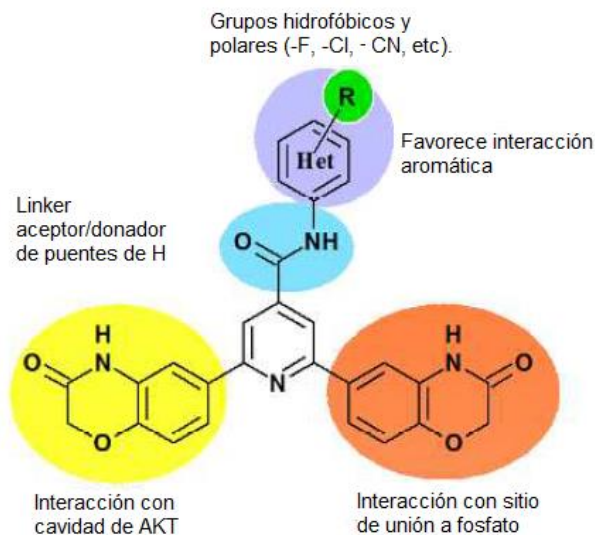
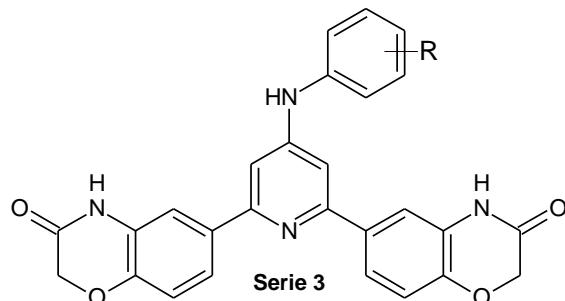


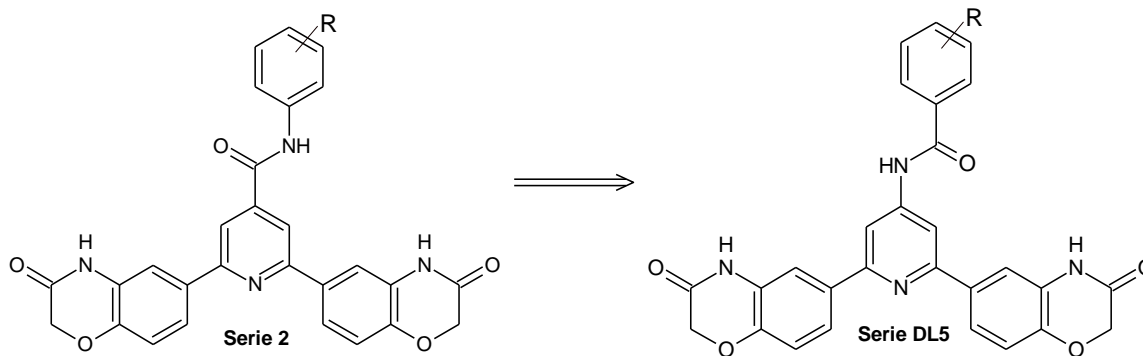
Figura 9. Interacciones consideradas para el diseño de piridinas trisustituidas.

NOTA: El *linker* utilizado para las series 2 y DL5 fue una amida, mientras que se eligió un grupo amino para la serie 4.³³

Tabla 3. Valores de energías de unión de las estructuras de las piridinas trisustituidas de la serie 3 con las tres isoformas de AKT



Clave	R	AKT1		AKT2		AKT3	
		$\Delta G_{\text{unión}}$ (Kcal/mol)	Clúster	$\Delta G_{\text{unión}}$ (Kcal/mol)	Clúster	$\Delta G_{\text{unión}}$ (Kcal/mol)	Clúster
S3-1	H	-10.79	10	-9.48	11	-9.58	13
S3-2	3,4-(metilendioxi)	-11.26	8	-10.24	11	-9.39	9
S3-3	3-CF ₃	-10.58	6	-9.77	10	-8.99	4
S3-4	4-CF ₃	-9.92	7	-9.57	11	-9.37	13
S3-5	3,5-CF ₃	-9.34	6	-9.71	8	-8.96	9
S3-6	4-(SO ₂ CH ₃)	-10.91	7	-10.70	8	-9.89	8
S3-7	4-(SO ₂ CF ₃)	-10.62	7	-10.28	13	-9.64	7
S3-8	4-(SO ₂ NH ₂)	-10.84	6	-10.42	6	-9.64	3
S3-9	4-(NH ₂ SO ₂ CH ₃)	-9.87	6	-10.55	7	-9.59	5
S3-10	4-OCH ₃	-10.52	10	-10.17	15	-9.41	13
S3-11	4-NO ₂	-10.46	6	-9.91	7	-9.36	7
S3-12	2-Cl	-10.83	10	-9.67	7	-8.97	6
S3-13	3-Cl	-10.92	7	-10.00	11	-9.81	11
S3-14	4-Cl	-11.01	4	-9.90	11	-9.13	6
S3-15	3,4-Cl	-11.83	8	-10.09	7	-9.42	6
S3-16	3,4-OCH ₃	-10.27	3	-9.71	7	-9.72	5
S3-17	3-CF ₃ , 4-Cl	-11.31	6	-9.68	8	-9.08	5
S3-18	3-OCF ₃	-10.67	7	-8.75	5	-9.04	10
S3-19	3-(morfolinsulfonil)	-10.82	4	-10.46	7	-10.60	4
S3-20	4-CONH ₂	-10.60	9	-10.37	7	-10.02	4



Esquema 1. Modificación de la posición del nitrógeno de la carboxamida de la serie 2.

2.3.1. Formación de amidas

Existen varios métodos reportados para obtener amidas a partir de aminas; en los últimos años se han popularizado aquellos que utilizan agentes acoplantes para aumentar la electrofilia de ácidos carboxílicos y facilitar el ataque nucleofílico de las aminas correspondientes.^{45, 46} También es posible sintetizar amidas a partir de aminas y cloruros de acilo, utilizando trietilamina como base.^{47,48}

En el caso de aminas poco nucleofílicas, existen otras estrategias que involucran el uso de bases fuertes como amiduro de sodio o trimetilaluminio.⁴⁹ Sin embargo, estos reactivos tienen algunos inconvenientes prácticos como que el amiduro de sodio es sensible a la cantidad de agua y oxígeno presentes en el medio de reacción, lo que limita su uso a gran escala; mientras que el trimetilaluminio es un agente altamente pirofórico e inestable térmicamente;⁵⁰ por ello, se prefieren las alternativas mencionadas anteriormente.

2.3.1.1. Amidas a partir de ácidos carboxílicos

Para formar el enlace amida a partir de la reacción de una amina y un ácido carboxílico, es necesario mejorar la electrofilia de este último. Como se mencionó anteriormente, es posible utilizar agentes acoplantes tales como:

PyBOP, COMU o DCC para formar un intermediario más reactivo a partir del ácido correspondiente.

La metodología general utilizada con dichos agentes requiere la presencia de *N*-metilmorfolina (NMM) como base en la mezcla de reacción, en la mayoría de los casos. La reacción llevada a cabo con gran parte de los agentes acoplantes no requiere calentamiento ya que son compuestos altamente reactivos; además pueden utilizarse diferentes disolventes, siendo CH₂Cl₂ uno de los más comunes.

2.3.1.2. Amidas a partir de cloruros de acilo

En el caso de los cloruros de acilo, no es necesario aumentar la electrofilia, por lo que las amidas son formadas en presencia de trietilamina como base y la amina correspondiente. La base se requiere para neutralizar el ácido clorhídrico que se libera con el progreso de la reacción. La metodología requiere la presencia de una atmósfera de nitrógeno, suele realizarse a temperaturas superiores al ambiente (alrededor de 25°C) y el disolvente más común es el acetonitrilo.

3. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, el cáncer representa una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. Aunado a ello, se ha observado un incremento en la incidencia de casos, con lo que se prevé que este padecimiento se convertirá en un problema de salud pública. A pesar de que existen varias opciones de tratamiento, estas siguen teniendo efectos secundarios que afectan la calidad de vida de los pacientes, además de no ser efectivas en el 100% de los casos.

Debido a lo anterior, resulta de particular importancia la búsqueda de nuevas opciones para tratar los distintos tipos de cáncer. En los últimos años, una de las estrategias utilizadas para aumentar la eficacia de los anticancerígenos y reducir sus efectos secundarios, ha sido el diseño de fármacos dirigidos a un blanco terapéutico. En dicha búsqueda, se ha encontrado que las isoformas de la AKT cinasa representan un blanco con alto potencial para el desarrollo de nuevos fármacos.

Siguiendo esta premisa, en nuestro grupo de investigación se realizaron estudios computacionales basados en la estructura para optimizar al compuesto **A**, un inhibidor, en el orden micromolar, de AKT con estructura novedosa. A partir de las distintas etapas de optimización virtual, se han propuesto series de compuestos sintéticamente accesibles (**Figura 8**). Además, se han realizado estudios de acoplamiento molecular que comprueban su potencial actividad contra AKT.

De esta forma, sería posible determinar si la posición del nitrógeno en la carboxamida de los compuestos de la serie 2 es significativa para la interacción del ligando con la proteína. Además, se averiguará si la restricción del enlace en posición cuatro de la piridina, con la adición de un grupo carbonilo a los compuestos de la serie 3 mejora la evaluación del complejo de unión proteína-ligando.

4. HIPÓTESIS

Los compuestos de la serie **DL5A-DL5I**, diseñados a partir de estudios de optimización *in silico* en nuestro grupo de investigación, presentarán valores favorables de energía de unión en los estudios de acoplamiento molecular, posicionándolos como inhibidores de AKT; la modificación estructural en estas nuevas moléculas mejorará la estabilidad del complejo proteína-ligando, dando origen a una familia de compuestos anticancerígenos.

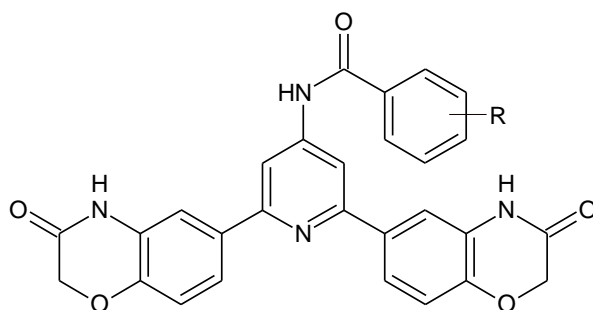
5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar *in silico* el potencial anticancerígeno de nuevos derivados de piridinas 2,4,6-trisustituidas diseñados como inhibidores de la AKT cinasa y encontrar una metodología para su síntesis.

5.2. Objetivos particulares

- ❖ Predecir el modo de unión de la serie **DL5A-DL5I** con las tres isoformas de AKT empleando estudios de acoplamiento molecular.



Clave	R
DL5A	-H
DL5B	3-Cl
DL5C	4-Cl
DL5D	3-CF ₃
DL5E	4-CF ₃
DL5F	3-F
DL5G	4-F
DL5H	3-NO ₂
DL5I	4-NO ₂

- ❖ Predecir propiedades estructurales (logP, PM, enlaces rotables, etc.) de los compuestos propuestos y determinar cuáles de estos poseen las mejores características farmacológicas.
- ❖ Diseñar una ruta de síntesis para obtener los compuestos de la serie DL5, a partir de las síntesis previamente realizadas por nuestro grupo de investigación, así como por la búsqueda bibliográfica realizada.
- ❖ Sintetizar los compuestos de la serie DL5 a partir de la ruta de síntesis propuesta.
- ❖ Determinar las constantes físicas (punto de fusión, Rf) y caracterizar la estructura de los compuestos obtenidos mediante técnicas espectroscópicas (RMN ^1H , RMN ^{13}C).

6. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

A continuación, se describe la metodología computacional utilizada para la evaluación de nuevas piridinas 2,4,6-trisustituidas, así como las diferentes rutas sintéticas establecidas para la obtención de los compuestos **DL5A** y **DL5G**.

6.1. Piridinas 2,4,6-trisustituidas

A partir de la identificación del compuesto **A** como candidato a optimización para el desarrollo de inhibidores de AKT, se han diseñado distintas series de compuestos en nuestro grupo de investigación.

Específicamente en este proyecto, se diseñó una serie de nueve compuestos derivados de piridinas trisustituidas. Con esta nueva serie se realizaron estudios de acoplamiento molecular y se predijeron sus propiedades estructurales para determinar su potencial como nuevos fármacos, empleando el servidor FAF-Drugs4.⁵¹

6.2. Parte computacional

6.2.1. Modelado por homología

Para realizar el modelado por homología de AKT3 se inició con la búsqueda de la secuencia de aminoácidos de la proteína utilizando la base de datos UniProt.⁵² La secuencia en formato FASTA se alineó con la base de datos del PDB, encontrándose que la isoforma de AKT1 (PDB ID: 4GV1) era la más similar.⁵³ Posteriormente, se construyeron modelos con los programas Modeler,⁵⁴ Prime⁵⁵ y Swissmodel Server.⁵⁶ Los modelos se optimizaron con el programa Maestro de Schrödinger⁵⁷ y después se evaluaron con el servidor MolProbity⁵⁸, con lo cual se eligió la mejor estructura para ejecutar los estudios de acoplamiento molecular.

6.2.2. Estudio de acoplamiento molecular

6.2.2.1. Preparación de las proteínas

Las estructuras cristalográficas de las isoformas AKT1 y AKT2 se obtuvieron en línea del *Protein Data Bank* (PDB); se seleccionaron aquellas con las claves 4GV1 y 1O6L⁵⁹ para las isoformas 1 y 2, respectivamente. Las proteínas fueron acondicionadas por remoción de las moléculas de agua y el sustrato GSK-3 β en el programa PyMOL 0.99.

Las proteínas obtenidas de los archivos PDB se optimizaron utilizando el programa GROMACS 4.6.7 empleando un campo de fuerza Amber99-ILDN; una vez optimizadas las estructuras de las isoformas 1 y 2, se procedió a prepararlas para el estudio de acoplamiento molecular junto con el modelo de AKT3. Para ello, se agregaron cargas Gasteiger y se fusionaron los hidrógenos no polares a las proteínas utilizando MGLTools 1.5.6.

6.2.2.2. Preparación de los ligandos

La estructura de las piridinas 2,4,6-trisustituidas se construyó con el programa Spartan 10⁶⁰ y su geometría se optimizó utilizando el método semi-empírico PM6. Empleando el programa AutoDock 4.2.⁶¹ y su interfaz gráfica Autodock Tools 1.5.4, los átomos de hidrógeno no polares se fusionaron a sus correspondientes carbonos, se detectaron los centros de torsión y enlaces rotables de la molécula,⁶² considerando rígidos los enlaces carbono-nitrógeno del enlace amida.

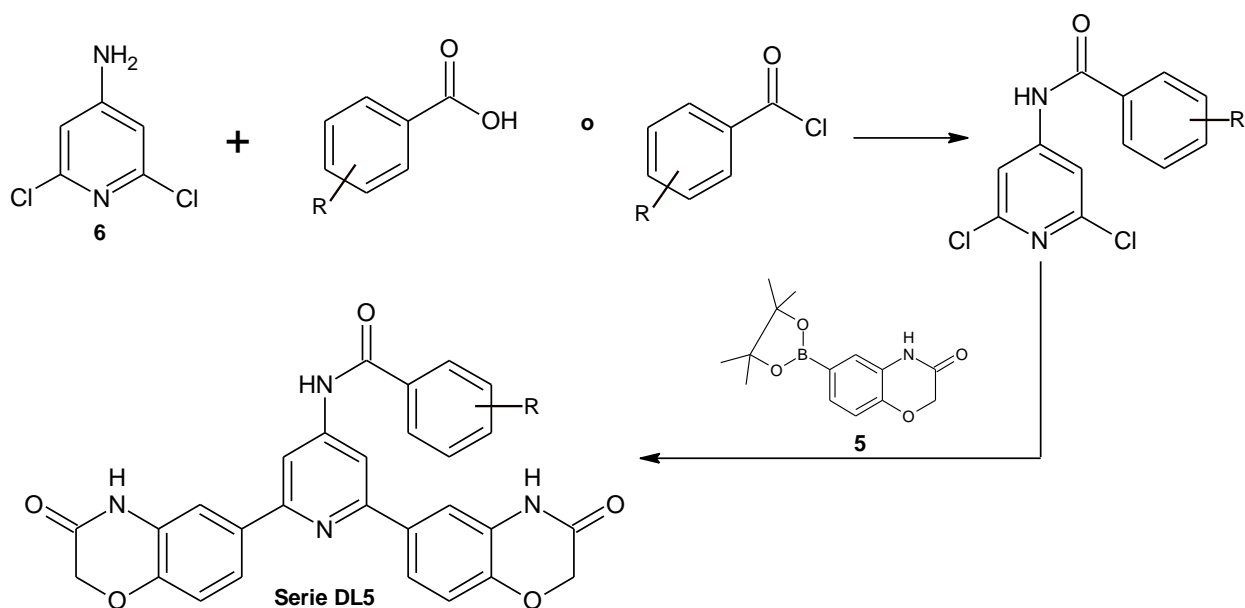
6.2.2.3. Acoplamiento molecular

Se realizó el acoplamiento molecular en la modalidad rígido-flexible. Utilizando la interfaz gráfica Autodock Tools 1.5.4 y el programa complementario Autogrid4, la caja de búsqueda se centró en las coordenadas (x, y, z) -19.687, 5.811, 16.166 para AKT1 y AKT3, mientras que para AKT2 se centró en 42.679, 30.329, 109.603; con 60x60x60 puntos de tamaño y un espaciado de 0.375 Å.

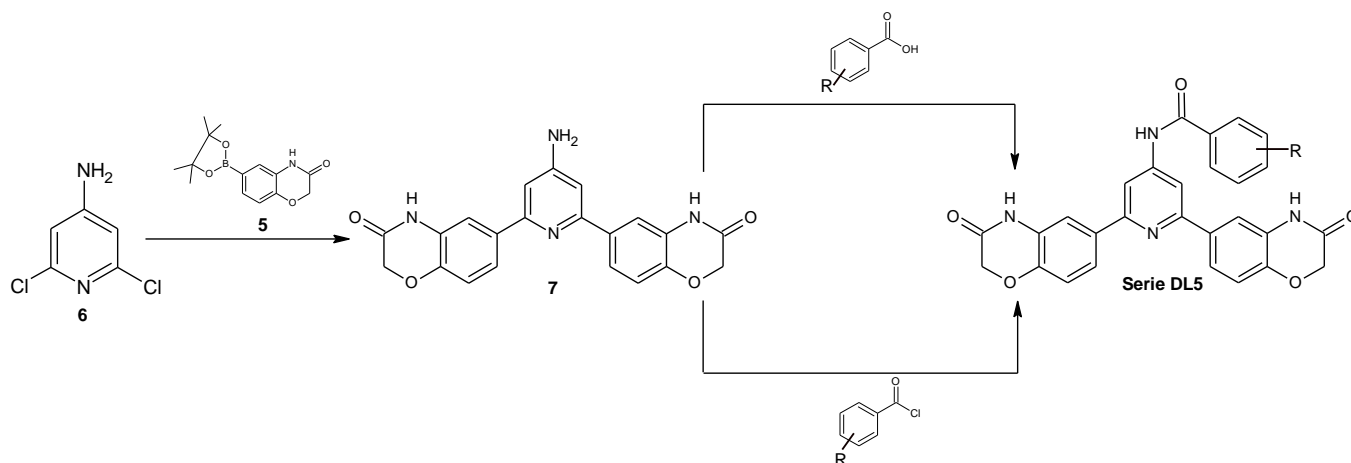
La búsqueda de los complejos de unión más favorables se realizó con el programa AutoDock 4.2.⁶¹; se utilizó el algoritmo genético Lamarckiano como método de búsqueda conformacional, con un total de 20 corridas, un tamaño de población de 150 conformeros, un número máximo de 2 500 000 evaluaciones energéticas y 27 000 generaciones.³³ Se seleccionó la menor energía de unión y el mayor tamaño de clúster para representar el mejor modo de unión.

6.3. Parte química

Para la obtención de los compuestos de la serie DL5 se plantearon dos propuestas, la primera de ellas involucró la síntesis de amidas y un posterior acoplamiento de Suzuki (**Esquema 2**), mientras que en la segunda se sintetizó el compuesto **7** para después realizar la formación del enlace amida (**Esquema 3**).



Esquema 2. Ruta 1 de síntesis de los compuestos de la serie DL5.

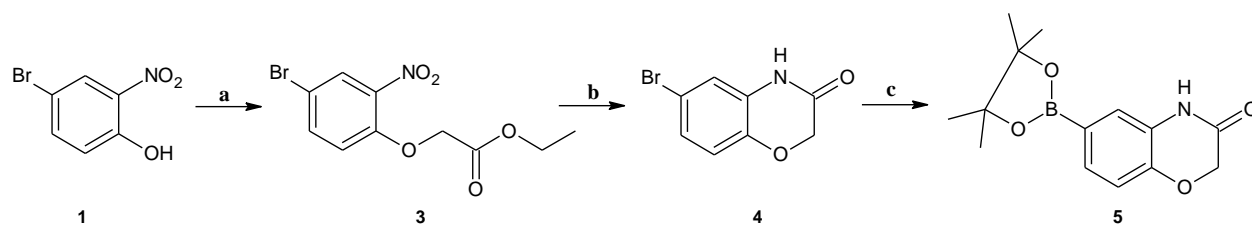


Esquema 3. Ruta 2 de síntesis de los compuestos de la serie DL5.

Debido a que el acoplamiento de Suzuki propuesto en los dos esquemas de síntesis requiere a **5** como intermediario, la síntesis se inició con dicho compuesto como se muestra a continuación.

6.3.1. Síntesis del compuesto 6-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona (**5**)

La obtención de **5** se inició por una reacción de sustitución nucleofílica S_N2 entre el α -bromoacetato de etilo y el 4-bromo-2-nitrofenol, utilizando carbonato de potasio como base y acetona como disolvente para acceder así al compuesto **3**. Este último se sometió a una reducción con Fe^0 , utilizando ácido acético como disolvente y catalizador ácido para la posterior sustitución nucleofílica del acilo y obtener el compuesto ciclado (6-bromo-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona (**4**). Finalmente, se realizó una borilación de Miyaura con diborobis(pinacolato) (B_2Pin_2), empleando el catalizador $Pd(dPPf)Cl_2 \cdot CH_2Cl_2$, acetato de potasio como base y 1,4-dioxano como disolvente (**Esquema 4**).



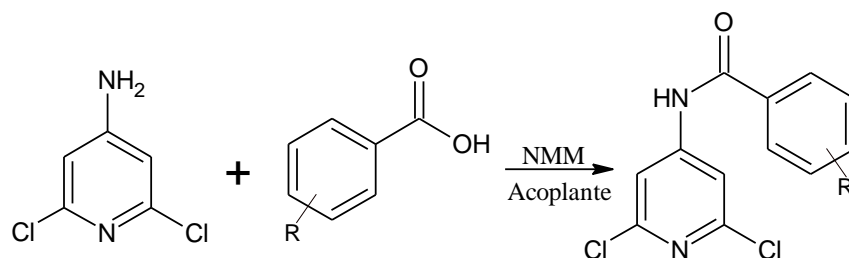
Esquema 4. Ruta sintética para obtener el compuesto **5**. Reactivos y condiciones: **a:** α -bromoacetato de etilo, K_2CO_3 , acetona, $50^\circ C$; **b:** Fe^0 , AcOH, $50^\circ C$; **c:** B_2Pin_2 , $Pd(dppf)Cl_2 \cdot CH_2Cl_2$, AcOK, 1,4-dioxano, reflujo.

6.3.2. Síntesis de los compuestos DL5A y DL5G

Para la obtención de los compuestos finales **DL5A** y **DL5G** se establecieron diferentes estrategias. Las primeras se basaron en la síntesis de amidas a partir de una amina poco nucleofílica (**6**), por lo que fue necesario utilizar un buen electrófilo, para ello se requirieron ácidos carboxílicos activados o cloruros de acilo; la última de ellas se centró en mejorar la nucleofilia de la amina mencionada, para ello se sustituyeron los cloros en las posiciones 2 y 6 mediante un acoplamiento de Suzuki. Las metodologías fueron las siguientes:

a. A partir de ácidos carboxílicos

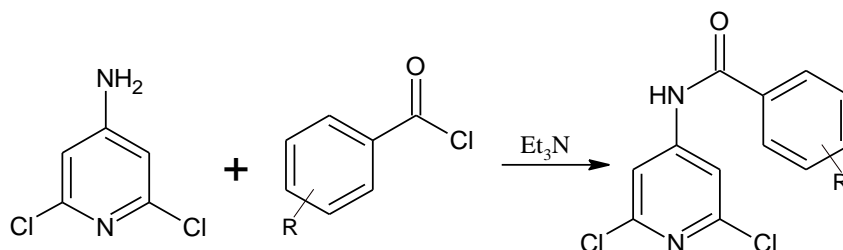
Recurriendo a diferentes agentes acoplantes (PyBOP, COMU, CDI, DCC), en presencia de *N*-metilmorfolina (NMM), se hicieron reaccionar los ácidos carboxílicos correspondientes junto con la 4-amino-2,6-dicloropiridina utilizando diferentes condiciones de temperatura y disolvente (**Esquema 5**).



Esquema 5. Síntesis de amidas a partir de ácidos carboxílicos.
NOTA: Las reacciones con DCC y CDI no requieren NMM.

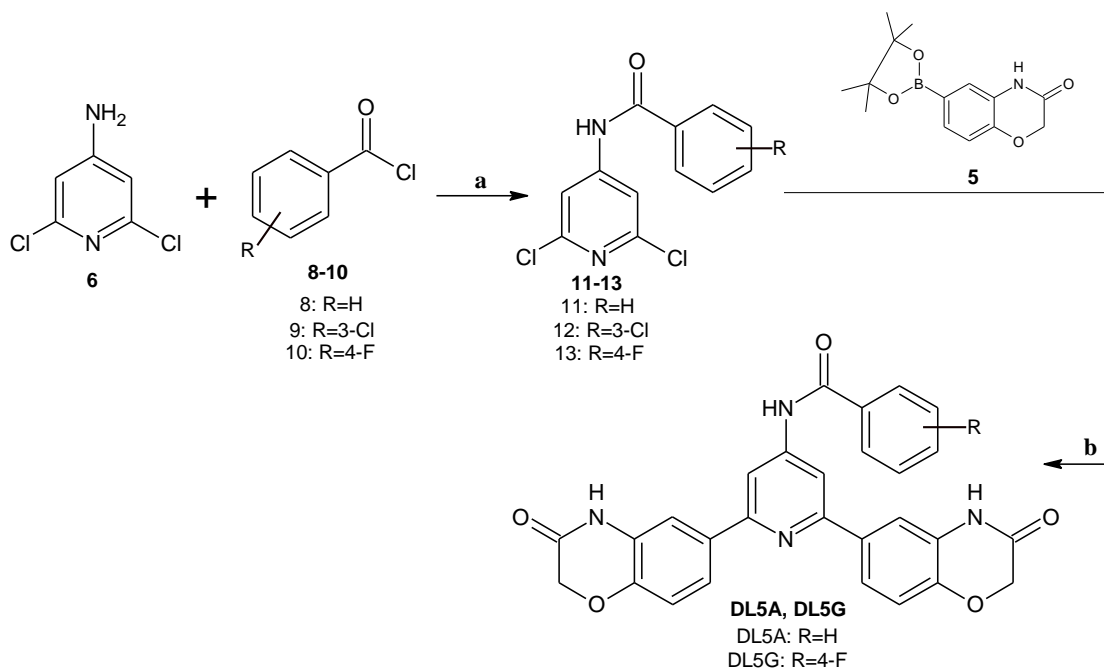
b. A partir de cloruros de acilo

Las amidas se obtuvieron mediante una sustitución nucleofílica sobre el acilo presente en los haluros de ácido correspondientes. Estos se hicieron reaccionar con la 4-amino-2,6-dicloropiridina (**6**) en presencia de Et₃N; se ensayaron diferentes condiciones de temperatura y disolvente. (**Esquema 6**).



Esquema 6. Síntesis de amidas a partir de cloruros de acilo.

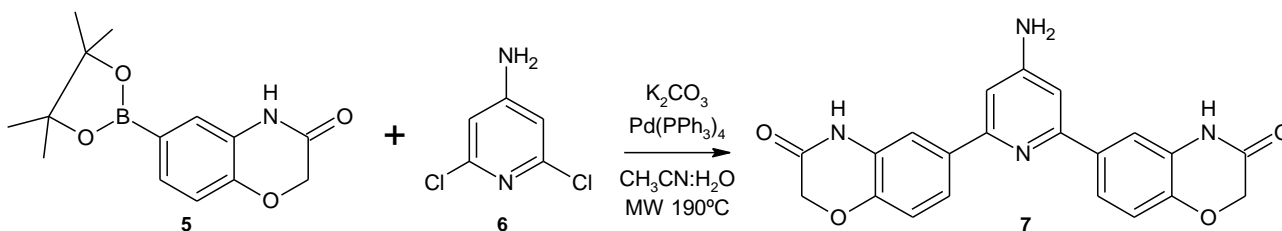
Las amidas **12** y **13** se hicieron reaccionar mediante un acoplamiento de Suzuki con carbonato de potasio como base, catalizador Pd(PPh₃)₄ y una mezcla de CH₃CN:H₂O 4:1 para aislar los compuestos finales **DL5A** y **DL5G**, respectivamente (**Esquema 7**).



Esquema 7. Ruta sintética para obtener los compuestos **DL5A** y **DL5G**. Reactivos y condiciones: **a:** Et₃N, DMF, 180°C; **b:** K₂CO₃, Pd(PPh₃)₄, CH₃CN:H₂O, MW 175°C.

c. A partir de 6,6'-(4-aminopiridin-2,6-diil)bis(2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona) (7)

Se hizo reaccionar a la 4-amino-2,6-dicloropiridina con el compuesto **5**, en presencia de K_2CO_3 como base, $Pd(PPh_3)_4$ como catalizador, y una mezcla de disolventes $CH_3CN:H_2O$ 4:1 para llevar a cabo un acoplamiento de Suzuki mediante calentamiento asistido por microondas y obtener el compuesto **7** (**Esquema 8**). Este último se sometió a las reacciones de los incisos a y b para obtener los productos finales deseados.



Esquema 8. Acoplamiento de Suzuki de la 4-amino-2,6-dicloropiridina.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Parte computacional

7.1.1. Modelado por homología

Para la realización del modelo de AKT3 se buscó la secuencia de la proteína en la base de datos UniProt⁵² (ID: Q9Y243) para posteriormente efectuar el alineamiento (**Anexo III**). Como resultado de la búsqueda de secuencias análogas se encontró que la isoforma de AKT1 era la más similar, con un 82.7% de aminoácidos iguales y 90.2% de aminoácidos positivos.

Los aminoácidos positivos se refieren a aquellos que tienen la misma naturaleza entre sí, lo cual es relevante debido a que, es más probable que la disposición tridimensional sea muy semejante, aunque los aminoácidos no sean exactamente iguales. Esto último permite crear un modelo más acertado, a partir de la secuencia más similar.

Posterior al alineamiento de secuencias se obtuvieron varios modelos, los cuales fueron evaluados con el servidor MolProbity⁵⁸, en la **Tabla 4** se muestra un resumen de los resultados de algunos de ellos. El modelo A fue el mejor evaluado, por lo que se seleccionó para el posterior acoplamiento molecular.

Tabla 4. Resumen de los resultados de validación de modelos generados

Modelo	Rotámeros favorecidos	Diagrama de Ramachandran		Aminoácidos girados	Evaluación MolProbity*
		Permitido	No permitido		
A	92.38 %	93.77 %	1.19 %	0.30%	100
B	80.32 %	76.31 %	6.50 %	0.84%	78
C	80.56 %	77.57 %	5.87 %	1.26 %	52
D	90.64 %	89.22 %	2.99 %	1.49 %	5

*La evaluación MolProbity toma en cuenta la evaluación de aminoácidos sobrepuestos, rotámeros y Ramachandran, donde 100 es la mejor puntuación.

Puede notarse que los modelos A y D tienen un porcentaje similar de rotámeros favorecidos, superior al porcentaje de los modelos B y C. Los valores de

Ramachandran también son similares para los modelos A y D (**Figura 10**), los cuales representan las combinaciones angulares ψ (psi) y ϕ (phi) de todos los aminoácidos que constituyen a una proteína.⁶³ El objetivo para un modelo es tener un porcentaje menor al 0.05% de valores no permitidos y un porcentaje mayor al 98% de valores permitidos.

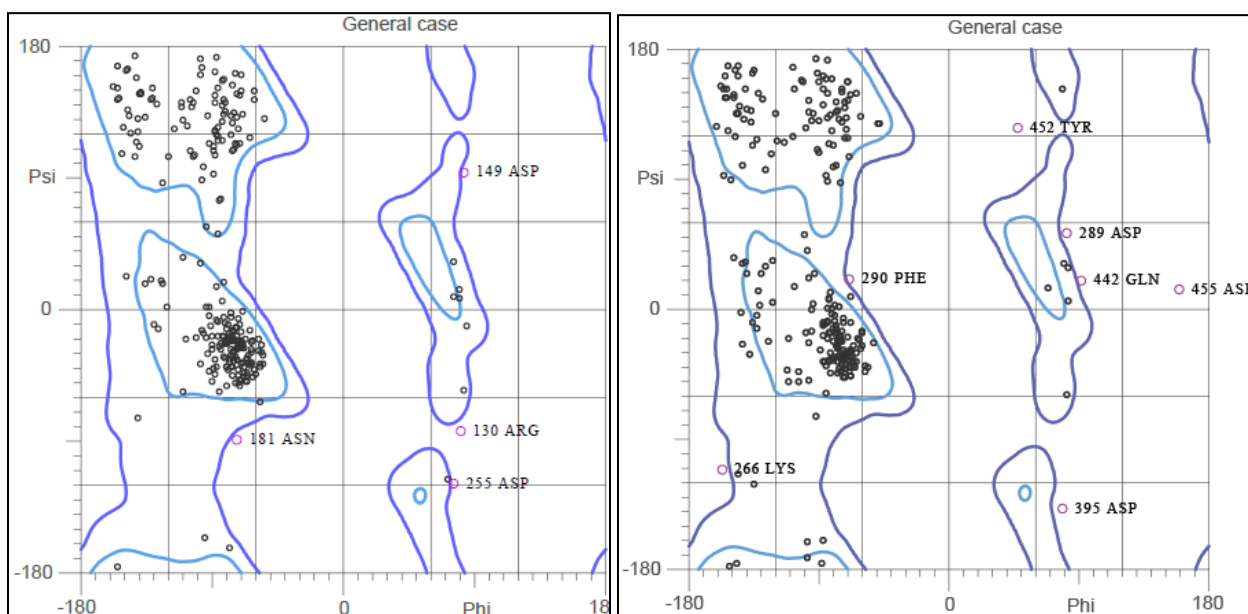


Figura 10. Diagramas de Ramachandran de los modelos A (izquierda) y D (derecha).

De lo anterior puede observarse que ninguno de los modelos cumple con los criterios deseables, pero el modelo A es el de mejor aproximación, seguido del modelo D. De esto, podríamos esperar que dichos modelos tuvieran un valor de evaluación MolProbity similar, sin embargo, esto no sucede.

Enfocándose en el porcentaje de aminoácidos girados, es clara la diferencia entre el modelo A y el modelo D. Lo ideal es que este porcentaje sea igual al 0%, por lo que el modelo A es mejor que el D en este aspecto. Esto influye directamente en la evaluación de cada uno de los modelos, indicando la importancia de este último parámetro.

Los aminoácidos girados son aquellos cuyo ángulo dihedro se desvía más de 30° de lo esperado para las conformaciones del enlace peptídico. La correcta posición

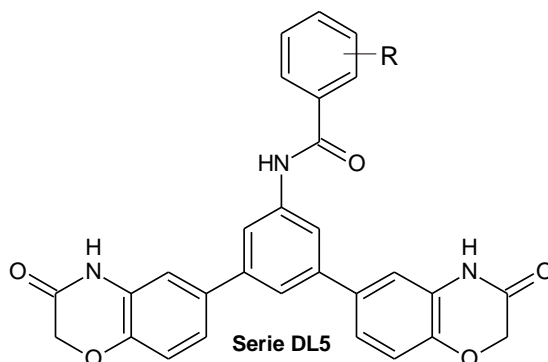
de los aminoácidos es crucial para el posterior acoplamiento molecular, de ahí que los aminoácidos girados no sean deseables en el modelo tridimensional generado. Esto es debido a que podrían obtenerse falsos positivos en los resultados, es decir, podrían predecirse interacciones que no serían posibles con la geometría correcta de la proteína.

7.1.2. Acoplamiento molecular

Como se mencionó previamente en la sección 2.3 (pág.12), en un intento de favorecer la interacción con los residuos Glu234/236/232 de las isoformas AKT1/2/3, respectivamente; se llevó a cabo la inversión de la carboxamida presente en los compuestos de la serie 2, originando la serie DL5 (**Tabla 5**). Para evaluar la influencia de este cambio en el diseño, se compararon los valores de energía de unión de cada una de las series de piridinas 2,4,6-trisustituidas (**Tablas 2, 3, 5**).

Tabla 5. Valores de energías de unión de las estructuras de las piridinas trisustituidas de la serie DL5 con las tres isoformas de AKT

Clave	R	AKT1		AKT2		AKT3	
		$\Delta G_{\text{unión}}$ (Kcal/mol)	Clúster	$\Delta G_{\text{unión}}$ (Kcal/mol)	Clúster	$\Delta G_{\text{unión}}$ (Kcal/mol)	Clúster
DL5A	H	-11.79	12	-11.31	18	-7.93	4
DL5B	3-Cl	-11.71	11	-11.52	16	-8.30	4
DL5C	4-Cl	-11.33	11	-11.38	14	-8.23	5
DL5D	3-CF ₃	-11.42	14	-11.11	13	-8.56	6
DL5E	4-CF ₃	-11.07	15	-9.66	10	-7.85	6
DL5F	3-F	-11.24	9	-11.28	19	-7.82	6
DL5G	4-F	-10.94	13	-11.25	17	-7.90	5
DL5H	3-NO ₂	-10.57	7	-10.19	14	-8.16	6
DL5I	4-NO ₂	-11.02	8	-9.99	13	-8.23	11



Comparando los valores obtenidos para AKT1, se observa que los compuestos de la serie 2 (**Tabla 3**) presentan mejores energías de unión (valores más negativos) que los compuestos de la serie DL5 (**Tabla 5**). Se observa también que los tamaños de clúster para la serie 2 son mayores, excepto en el caso del compuesto **S2-8**. Esto podría deberse a que los puentes de hidrógeno observados con los residuos Thr211 y Thr291, para los compuestos de la serie 2 (**Figura 11**), no se llevan a cabo para los compuestos de la serie DL5 (**Figura 12**).

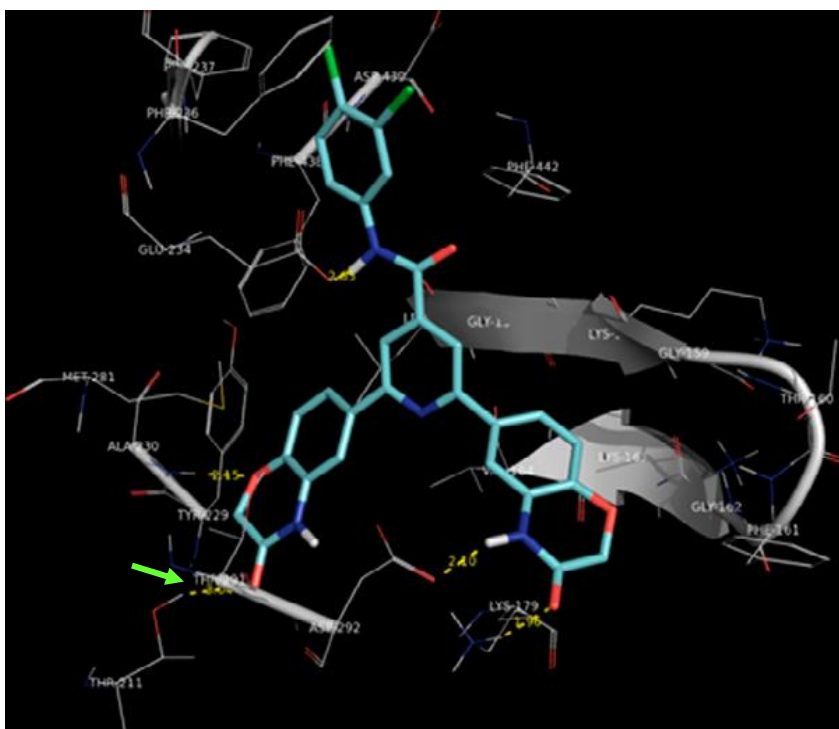


Figura 11. Acoplamiento molecular del compuesto **S2-3** con AKT1.³³

La interacción aromática con el residuo Phe442 observada en los compuestos de la serie 2 tampoco se observa para los compuestos de la serie DL5. Con la pérdida de estas interacciones, se esperaría que el valor de energía de unión observado fuera significativamente menor al que se obtuvo con los compuestos de la serie DL5. Sin embargo, se observan interacciones del anillo de 2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)ona con los residuos Lys179 y Glu228, además de conservar la interacción con Asp292 (**Figura 12**), lo que podría explicar la magnitud de $\Delta G_{\text{unión}}$ de los compuestos de la serie DL5, como se muestra en la **Tabla 5**.

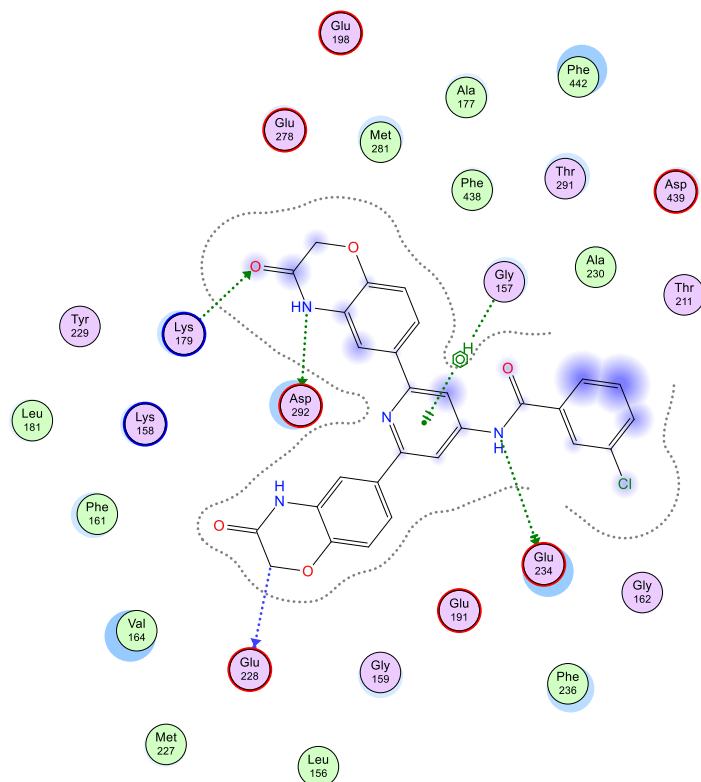


Figura 12. Acoplamiento molecular del compuesto **DL5B** con AKT1.

Comparando los valores de magnitud de $\Delta G_{\text{unión}}$ encontrados para los compuestos de la serie DL5 con los de la serie 2 (**Tabla 3**), en el caso de AKT2, no parece existir una diferencia significativa en los valores de energía de unión obtenidos para dichas series, además de presentar tamaños de clúster similares. Esto podría deberse a que se conserva el puente de hidrógeno con el residuo Asp293, además de las interacciones con Lys181 y Gly159. También se conserva la conformación en forma de Y observada previamente en la búsqueda de inhibidores de AKT2³¹⁻³³ (**Figura 13**).

Finalmente, para el caso de AKT3, los valores de $\Delta G_{\text{unión}}$ obtenidos con los compuestos de la serie DL5 son menores que los calculados para las otras dos isoformas. También son desfavorables al compararlos con las series 2 y 3 (**Tablas 2 y 3**). La razón de esto parece estar en que las conformaciones de los ligandos no son similares entre ellas, y tampoco se observan las interacciones de los anillos de

2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)ona que se mencionaron anteriormente (**Figura IV-1**, del Anexo IV).

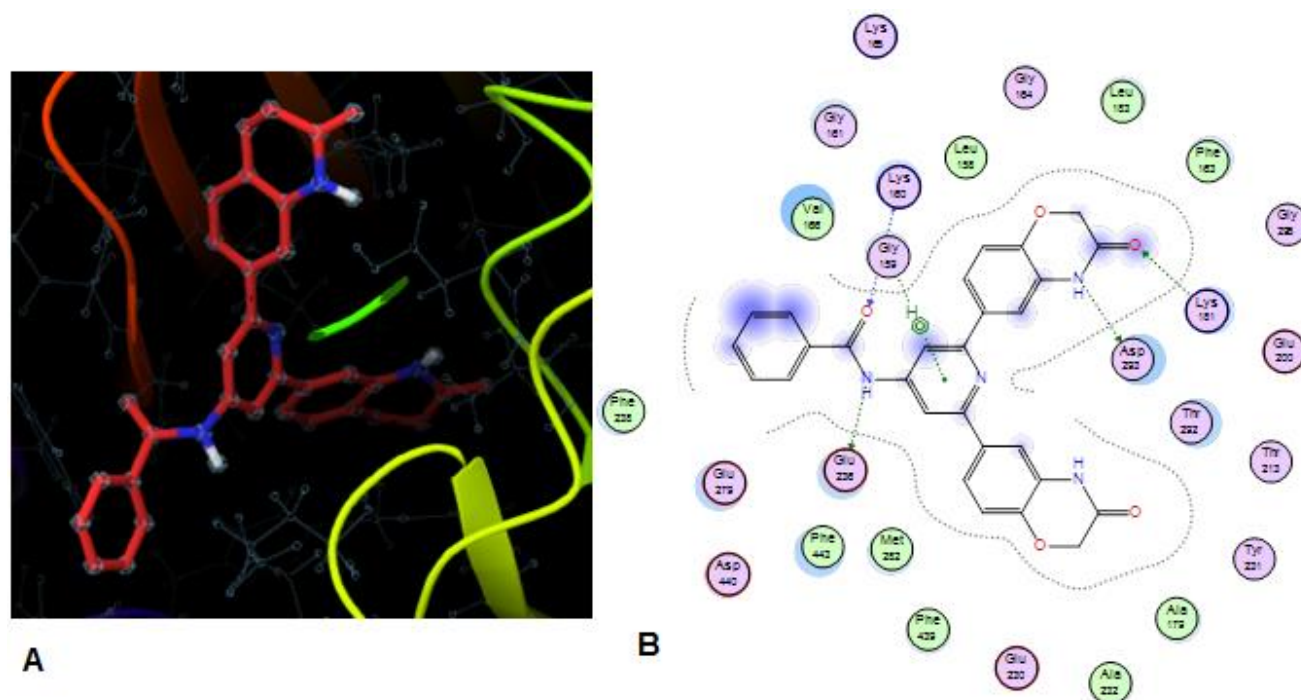


Figura 13. Acoplamiento molecular de **DL5A** con AKT2. (A) Modelo 3D que muestra la conformación en forma de Y que adopta **DL5A**. (B) Diagrama de interacción 2D.

En cambio, en el caso de AKT1, los valores obtenidos por la serie DL5 (**Tabla 5**) son similares a los obtenidos anteriormente para la mayoría de los compuestos de la serie 3 (**Tabla 4**). Para AKT2, la serie DL5 presenta, en general, mejores energías de unión. Mientras que, para la isoforma AKT3, la serie 3 presenta valores más negativos de $\Delta G_{\text{unión}}$, lo cual puede deberse a lo expuesto anteriormente sobre la diversidad de conformaciones adoptadas por los ligandos.

De lo anterior se puede decir que la serie DL5 parece tener características favorables para inhibir a las isoformas AKT1 y AKT2, pero no AKT3. Además, la restricción del enlace realizada a la serie 3 con la formación de la amida, parece tener una relación con el aumento de $\Delta G_{\text{unión}}$ observado para la serie DL5. Esto indicaría que la menor flexibilidad de la molécula favorece la estabilidad del complejo de unión. Esta idea se sostiene al observar que la energía de unión y los tamaños de clúster aumentan en la serie 2 con respecto a la serie 3.

De los diagramas de interacción realizados para los compuestos de la serie DL5, se encontró que la formación de un puente de hidrógeno con el residuo Glu234 de AKT1 se lleva a cabo con **DL5A** y con aquellos fenilos sustituidos en la posición 3 (**Figura IV-2**, del anexo IV). Esto sugiere que la conformación adoptada por los fenilos sustituidos en posición 4 aumenta la distancia con Glu234 y no permite que se lleve a cabo la interacción deseada.

Esto no se cumple para el par de compuestos sustituidos en 3-F (**DL5F**) y en 4-F (**DL5G**). En este caso, el compuesto **DL5G** es el que forma la interacción por puente de hidrógeno con el residuo Glu234. Se esperaría que ambos compuestos tuvieran conformaciones similares a **DL5A** debido al isosterismo del H con F⁶⁴; sin embargo se observó que, aunque los tres compuestos adoptan un acomodo similar en la cavidad de AKT1, la orientación del nitrógeno de la amida es determinante para la formación del puente de hidrógeno con Glu234 (**Figura 14**).

Las diferencias encontradas en los compuestos expuestos anteriormente sugieren la posibilidad de la existencia de complejos de unión con mayor estabilidad. Es decir, existe la probabilidad de que el compuesto **DL5F** adopte una conformación en la que haya interacción con Glu234. Esta misma suposición es aplicable al resto de los compuestos de la serie DL5, por lo que la realización de estudios de dinámica molecular permitiría esclarecer con mayor precisión la conformación y la energía del complejo de unión más estable.

En el caso de los compuestos sustituidos con nitro: **DL5H** (3-NO₂) y **DL5I** (4-NO₂), se observó que ambos poseen la interacción con Glu234 en la segunda mejor evaluación de acoplamiento molecular. Los tamaños de clúster de las dos mejores evaluaciones son muy similares entre sí para **DL5H** e iguales para **DL5I**. Estas observaciones refuerzan la sugerencia de llevar a cabo estudios de dinámica molecular y encontrar el modo de unión más probable.

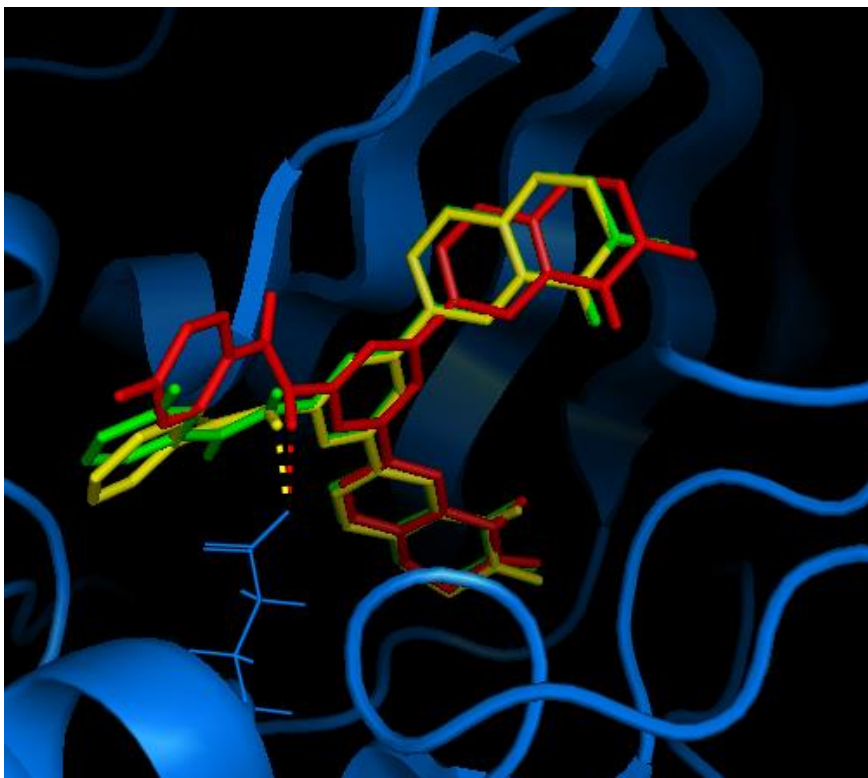


Figura 14. Acoplamiento molecular de **DL5A** (rojo), **DL5F** (verde) y **DL5G** con AKT1. Se muestra el residuo Glu234 formando un puente de hidrógeno con **DL5A** y **DL5G**.

Además, con dichos estudios podría determinarse si las interacciones no observadas anteriormente con Arg241 en el caso de **DL5I** se mantienen. Esa interacción supone una posible mejora del diseño de inhibidores selectivos contra AKT1 añadiendo grupos aceptores de puentes de hidrógeno en el fenilo presente en posición 4 del anillo de piridina (**Figura 15**).

Del acoplamiento molecular de los compuestos de la serie DL5 con la isoforma AKT2 no se observó una tendencia clara como en el caso de AKT1. Aunque se observó la formación de puentes de hidrógeno con el residuo Glu236 y el nitrógeno de la amida de los compuestos: **DL5A**, **DL5B**, **DL5D**, **DL5F** y **DL5G**. En el caso de AKT3, tampoco parece haber una relación con la sustitución del fenilo y la conformación adoptada en el complejo de unión ligando-proteína.

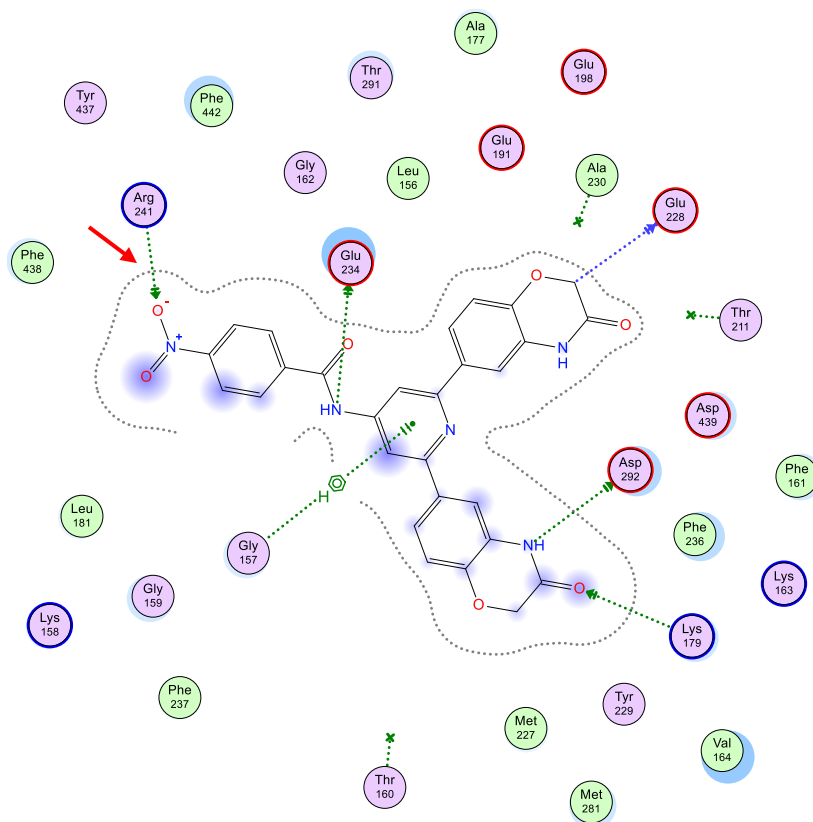


Figura 15. Acoplamiento molecular del compuesto **DL51** con AKT1. Se muestra un puente de hidrógeno con Arg241 no observada anteriormente para las series de piridinas trisustituidas.

7.1.3. Propiedades moleculares de la serie DL5

Continuando con el estudio de los compuestos de la serie DL5, se predijeron distintas propiedades estructurales tales como: peso molecular (PM), donadores de puentes de hidrógeno (DPH), aceptores de puentes de hidrógeno (APH), enlaces rotables (ER), área polar superficial topológica (tPSA) y logaritmo del coeficiente de partición (logP). Los valores obtenidos para las piridinas trisustituidas propuestas se muestran en la **Tabla 6**.

Las propiedades anteriores son comúnmente utilizadas para predecir la biodisponibilidad oral de nuevos fármacos en desarrollo. Para ello, se consideraron las reglas de Lipinski ($PM \leq 500$, $DPH \leq 5$, $APH \leq 10$ y $\log P \leq 5$), Egan ($0 \leq tPSA \leq 132$, $-1 \leq \log P \leq 6$) y Veber ($ER \leq 10$, $tPSA \leq 140$). Si estas reglas se cumplen, se

esperaría que los compuestos presenten una buena biodisponibilidad oral; por el contrario, si dos o más de estas propiedades se encuentran fuera del rango establecido, existe probabilidad de que estos posean baja biodisponibilidad.⁶⁵⁻⁶⁷

El compuesto **DL5A** cumple con todas las reglas de Lipinski, mientras que los compuestos **DL5B-DL5G** sólo incumplen con el peso molecular, por lo que se consideran aceptables bajo este criterio. Los compuestos **DL5H** y **DL5I** incumplen con el peso molecular y con el número de aceptores de puentes de hidrógeno, lo cual se considera una alerta para estas moléculas.

Tabla 6. Propiedades moleculares de los compuestos de la serie DL5

Clave	PM	logP	tPSA	DPH	APH	ER	Solubilidad (mg/L)*
DL5A	492.48	2.92	118.65	3	6	4	4132.53
DL5B	526.93	3.54	118.65	3	6	4	2416.53
DL5C	526.93	3.54	118.65	3	6	4	2416.53
DL5D	560.48	3.80	118.65	3	6	5	1922.87
DL5E	560.48	3.80	118.65	3	6	5	1922.87
DL5F	510.47	3.02	118.65	3	6	4	3597.46
DL5G	510.47	3.02	118.65	3	6	4	3597.46
DL5H	537.48	2.74	164.47	3	12	5	4125.96
DL5I	537.48	2.74	164.47	3	12	5	4125.96

*La solubilidad es estimada por medio del método ESOL.⁶⁸

Pasando a las reglas de Egan, los compuestos **DL5H** y **DL5I** incumplen con el tPSA establecido, el resto cumple con ambas especificaciones. El caso anterior se repite con las reglas de Veber. Ésto indica que la mayoría de los compuestos de la serie DL5 podrían presentar buena biodisponibilidad oral.

Con las propiedades anteriores, también pueden emplearse las reglas de GSK 4/400 y Pfizer 3/75 para la predicción de la toxicidad.⁶⁸ La primera de ellas establece que aquellos compuestos con $\log P > 4$ y $PM > 400$ tienen mayor probabilidad de ser tóxicos, mientras que la segunda dicta que compuestos con $\log P > 3$ y $tPSA < 75$ pueden presentar toxicidad.

En el caso de los parámetros GSK 4/400, se observa que ninguno cumple con el peso molecular indicado. En cambio, todos los compuestos cumplen con la condición del logP, lo cual los coloca como aceptables. En cuanto a las condiciones establecidas por Pfizer 3/75, los compuestos **DL5A**, **DL5H** y **DL5I** cumplen con ambas reglas; el resto de los compuestos sólo cumple con la de tPSA.

Con lo anterior, se deduce que la mayoría de los compuestos presentan riesgo de toxicidad, debido a su alto peso molecular y logP. Además, los compuestos **DL5H** y **DL5I** presentan un grupo nitro aromático, asociado con alta toxicidad.⁷⁰ Aunado a ello, estos dos últimos compuestos tampoco presentaron características que cumplieran con las reglas de Egan y Veber, por lo que no son buenos candidatos para el desarrollo de nuevos fármacos.

La solubilidad predicha para todos los compuestos es reducida. En la mayoría de los casos se observa que el aumento del PM afecta negativamente a la solubilidad. La predicción de la solubilidad para todas las moléculas es menor respecto a **DL5A**, lo cual era una tendencia esperada al añadir grupos polares hidrofóbicos. Esta limitante de solubilidad es sujeta a resolverse con estrategias de formulación u optimizaciones posteriores.

7.2. Parte química

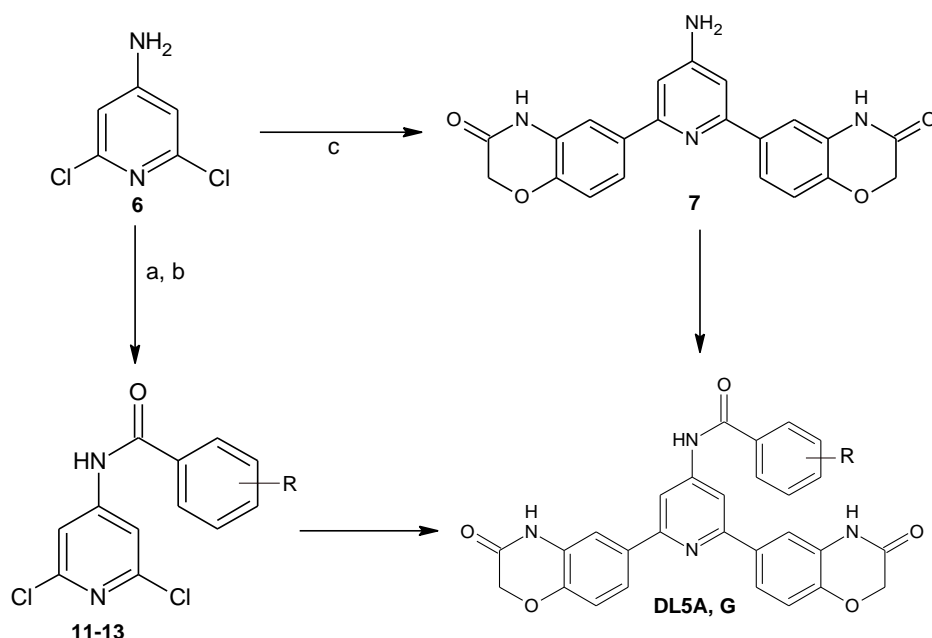
7.2.1. Síntesis de las *N*-(2,6-dicloropiridin-4-il)benzamidias (11-13)

Para la obtención de las amidias **11-13**, se planteó a la 4-amino-2,6-dicloropiridina como el sustrato a utilizar. Esto supone un reto sintético debido a que la amina presente en el sustrato es poco nucleofílica al encontrarse en resonancia con el sistema aromático de un sistema π -deficiente como lo es la piridina, además de presentar dos sustituyentes atrayentes de densidad electrónica.

Por ello, se realizaron tres estrategias distintas, las dos primeras (a y b) consistieron en aumentar la electrofilia del grupo acilo a utilizar en la reacción de formación de

la amida, mientras que la tercera (c) se centró en aumentar la nucleofilia del sustrato al remover los grupos electroattractores.

En primera instancia se planteó el uso de ácidos carboxílicos y agentes acoplantes (a). Se propuso también la utilización de cloruros de acilo (b), los cuales se hacen reaccionar con la amina correspondiente. En cuanto al aumento de nucleofilia del sustrato (c), se planeó la sustitución de los cloros presentes en las posiciones 2 y 4, los cuales se sustituyeron por 6-(2*H*-benzo[*b*][1,4]-oxazin-3(4*H*)-onas (**Esquema 9**).



Esquema 9. Diagrama general de las estrategias de síntesis para obtener los compuestos finales DL5.

NOTA: Las estrategias a y b contemplan la inicial formación de la amida y después el acoplamiento de Suzuki, se planeó el orden inverso para la estrategia c.

Se abordarán primero los resultados que se obtuvieron en la implementación de la ruta a, mediante la activación de los ácidos carboxílicos con agentes acoplantes. Los ácidos activados se hicieron reaccionar con la 4-amino-2,6-dicloropiridina. De esta forma se buscó aumentar la electrofilia del ácido carboxílico y facilitar el ataque del amino para formar la amida correspondiente.

Existe una gran diversidad de agentes acoplantes y su uso se ha popularizado debido a la facilidad de su manejo. Además, los tiempos de reacción suelen ser cortos y con buenos rendimientos. La elección del agente acoplante depende del ácido carboxílico y de la amina a utilizar para formar el enlace amida.⁷³

La metodología general con los agentes acoplantes fue: disolver el ácido carboxílico, agregar agente acoplante, añadir base, esperar 10 minutos y finalmente agregar la 4-amino-2, 6-dicloropiridina. Para encontrar las mejores condiciones de reacción, en este estudio se utilizaron varios agentes acoplantes, se varió el disolvente de la reacción y la temperatura.

Asimismo, se llevó a cabo la reacción utilizando calentamiento convencional y calentamiento por microondas. Se esperaba que este último contribuyera a disminuir el tiempo de reacción, además de aumentar el rendimiento;⁷⁴ en la **Tabla 7** se muestran los diferentes experimentos realizados.

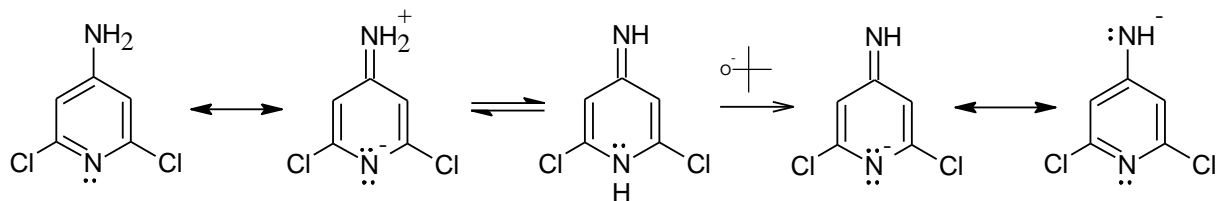
En los experimentos 1 y 2 no se obtuvo el producto deseado; en el primero, la reacción se realizó a temperatura ambiente, por lo que esta se intentó optimizar aumentando la temperatura. En los dos casos, el disolvente empleado fue diclorometano (CH_2Cl_2), este es un disolvente utilizado comúnmente con varios agentes acoplantes, es por eso que se eligió como primera opción. Sin embargo, al tener un bajo punto de ebullición (40°C), no permite realizar un calentamiento más allá de dicha temperatura.

No obstante, al no observar transformación de la materia prima aún después de aumentar la temperatura de la mezcla de reacción, se añadió terbutóxido de potasio para desprotonar el grupo amino de la piridina (**Esquema 10**) y aumentar su nucleofilia. A pesar de ello siguió sin observarse transformación a producto, por lo que se decidió cambiar el disolvente a tolueno.

Tabla 7. Condiciones de reacción utilizadas para llevar a cabo la formación de amidas con agentes acoplantes

Experimento	Disolvente	Agente acoplante	Base	Condiciones de reacción	Resultado
1	CH ₂ Cl ₂	DCC	DMAP	temperatura ambiente, 48 horas	sin formación del producto
2	CH ₂ Cl ₂	DCC	DMAP, t-BuOK	calentamiento 38°C, 24 horas	sin formación del producto
3	Tolueno	DCC	DMAP	calentamiento 80°C, 24 horas	mínima formación del producto
4	CH ₂ Cl ₂	PyBOP	NMM	temperatura ambiente, 24 horas	mínima formación del producto
5	CH ₂ Cl ₂	COMU	NMM	temperatura ambiente, 24 horas	mínima formación del producto
6	CH ₃ CN	DCC	----	temperatura ambiente, 24 horas	sin formación del producto
7	DMF	DCC	DMAP	MW 100°C, 100W, 20 minutos	sin formación del producto
8	DMF	DCC	DMAP	MW 120°C, 130W, 20 minutos	sin formación del producto
9	DMF	DCC	DMAP	MW 120°C, 150W, 20 minutos	sin formación del producto
10	DMF	CDI	---	MW 120°C, 275W, 20 minutos	mínima formación del producto

Después de llevar a cabo la reacción a una temperatura más alta, se observó transformación de la materia prima (experimento 3). El porcentaje de transformación de la metodología tres con tolueno es similar a la observada para las metodologías cuatro y cinco (PyBOP y COMU, respectivamente). Sin embargo, las reacciones con PyBOP y COMU se llevaron a cabo a temperatura ambiente, usando CH₂Cl₂ como disolvente y NMM como base (experimentos 4 y 5) (**Tabla 7**).

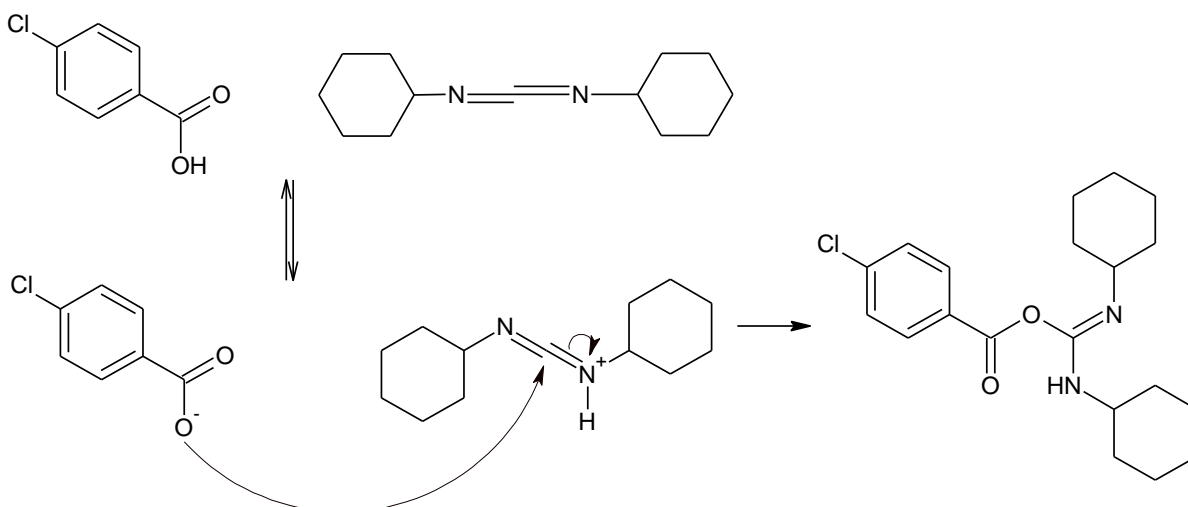


Esquema 10. Desprotonación de la 4-amino-2,6-dicloropiridina con terbutóxido de potasio.

En los experimentos con agentes acoplantes se emplean cantidades equivalentes de estos, lo cual representa un alto costo en el caso de PyBOP y COMU, en comparación con DCC, que es más económico. Además, las reacciones llevadas a cabo con esos agentes no suelen calentarse más allá de 60°C. Durante la realización de estos ensayos se calentó a 50°C sin observar diferencia significativa en la transformación de materia prima.

Por esa razón se decidió utilizar DCC y DMAP para llevar a cabo la síntesis asistida por microondas, de la cual se aisló un producto puro que coincidía en polaridad con la amida esperada (menos polar que la materia prima) detectada por ccf. El sólido obtenido se caracterizó por RMN ^1H (**Figura 16**), resultando ser el intermediario resultante de la reacción del ácido carboxílico con DCC (**Esquema 11**).

El espectro obtenido para dicho intermediario presentaba señales en la zona donde se observan hidrógenos alifáticos. Las señales presentes en 0.80-1.70 ppm corresponden a los hidrógenos de los ciclohexilos (2-6 y 14-18) (**Figura 16**). La señal múltiple en 3.20-3.09 ppm corresponde al H-1 y la señal triple en 4.13 ppm al H-13. La señal simple a 7.46 ppm, que integra para cuatro protones corresponde a los hidrógenos del anillo aromático. Finalmente, la señal doble presente en 7.91 ppm corresponde al hidrógeno 7.



Esquema 11. Mecanismo de formación del intermediario reactivo del ácido 4-clorobenzoico con dicitlohexilcarbodiimida (DCC).⁴⁶

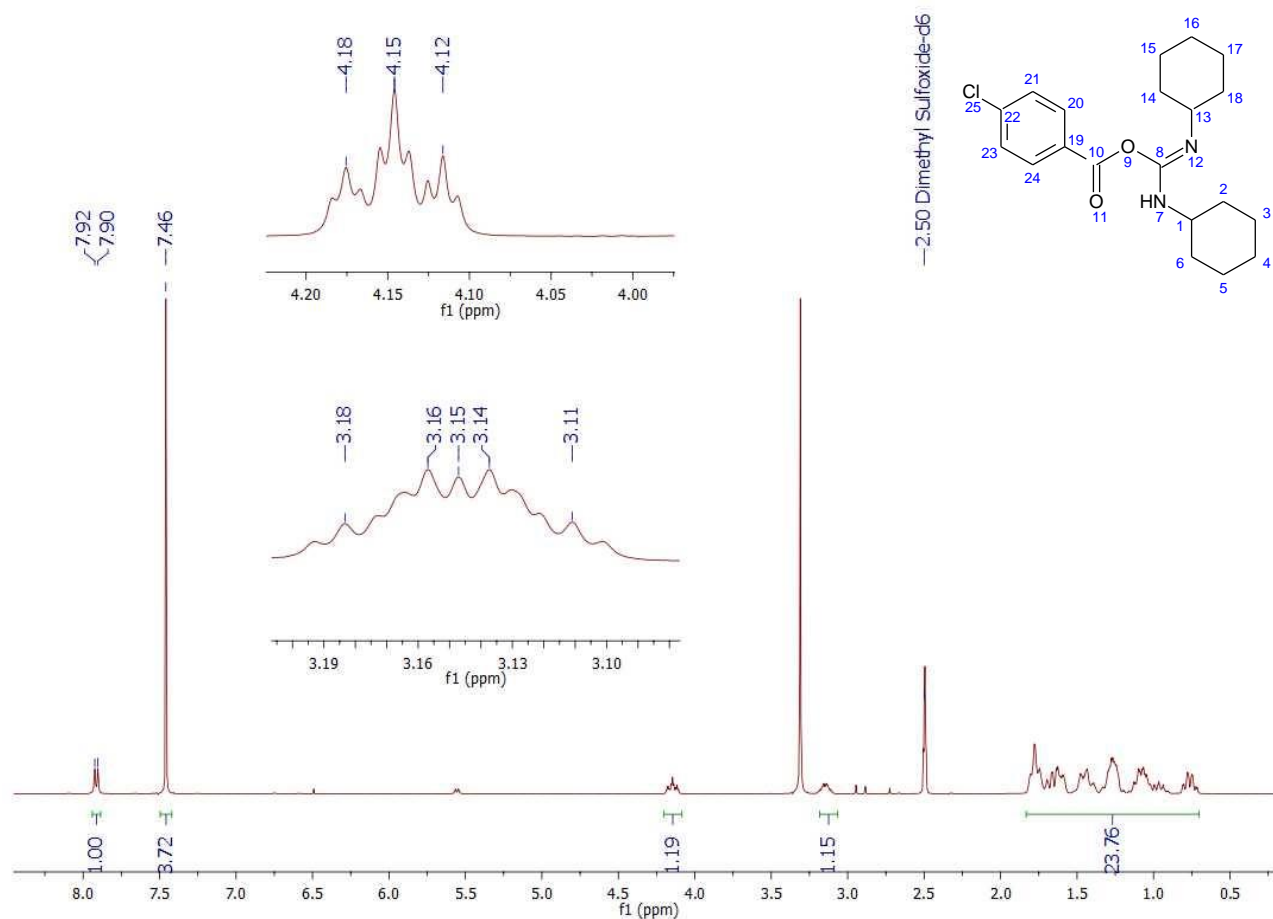


Figura 16. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz, δ en ppm) del compuesto *N,N*-dicitlohexilcarbamiato de 4-clorobenzoilo.

El espectro discutido anteriormente demuestra que el ácido carboxílico sí forma un intermediario más reactivo con el agente acoplante DCC. Sin embargo, la nucleofilia de la 4-amino-2,6-dicloropiridina (**6**) sigue siendo insuficiente para formar las amidas deseadas. Ya que los agentes acoplantes utilizados forman un intermediario con mayor volumen molecular, lo que podría dificultar aún más la reacción por impedimento estérico, se propuso entonces utilizar CDI (**Figura 17**).

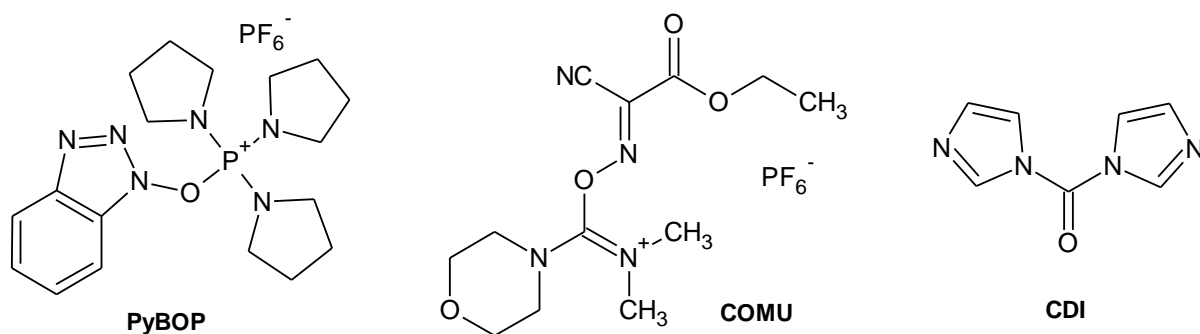
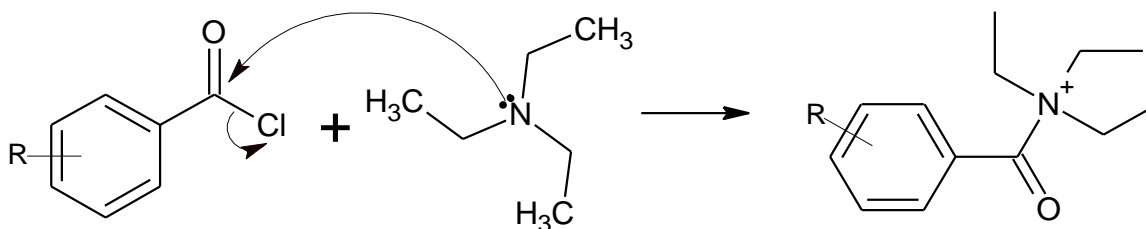


Figura 17. Agentes acoplantes utilizados.

Tras realizar la reacción por la metodología general descrita para los agentes acoplantes, se observó mediante ccf la transformación del ácido carboxílico con CDI; sin embargo, al no observar la formación satisfactoria de la amida deseada, se comprobó la presencia de dicho intermediario. Para ello, a la mezcla de reacción se le añadió metanol y se calentó a 50°C con el propósito de formar un éster a partir del intermediario con CDI. Al comparar la mezcla anterior con la reacción del ácido, CDI y metanol se observó que el éster correspondiente se había formado, confirmando la presencia del intermediario con CDI.

Esto último verifica que se lleva a cabo la reacción entre los ácidos carboxílicos y los agentes acoplantes, pero la nucleofilia del sustrato sigue siendo baja para lograr la síntesis deseada. Debido a que las reacciones realizadas con agentes acoplantes no presentan resultados favorables, se procedió a la utilización de cloruros de acilo; estos últimos son muy reactivos debido a que la electrofilia del

carbono carbonílico es muy alta. Para llevar a cabo dichas reacciones se utilizó como base Et_3N , la cual además de formar un intermediario reactivo tiene la función de neutralizar el HCl producido (**Esquema 12**).



Esquema 12. Reacción de Et_3N con cloruros de acilo. Se forma un intermediario que sigue siendo electrofílico.

Para llevar a cabo las reacciones con cloruros de acilo, se utilizó la metodología descrita en la literatura, con Et_3N a temperatura ambiente utilizando CH_2Cl_2 como disolvente.⁴⁷⁻⁴⁸ Con estas condiciones (experimento 1) se observó la formación de producto, sin embargo, aún se observaba materia prima en la cromatoplaaca realizada después del tiempo de reacción indicado en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Condiciones de reacción utilizadas para la formación de amidas con los cloruros de acilo correspondientes

Experimento	Disolvente	Base	Condiciones de reacción	Rendimiento*
1	CH_2Cl_2	2eq Et_3N	temperatura ambiente, 24 horas	60%
2	CH_3CN	2eq Et_3N	calentamiento a 50°C , 7 horas	30%
3	CH_3CN	2eq Et_3N	calentamiento a 75°C , 3 horas	65%
4	DMF	2.3eq Et_3N	MW 120°C , 130W, 20 minutos	20%
5	DMF	2.3eq Et_3N	MW 130°C , 175W, 20 minutos	30%
6	CH_3CN	2.5eq Et_3N	calentamiento a 75°C , 24 horas	35%
7	DMF	3.2eq Et_3N	calentamiento a 80°C , 24 horas	40%
8	DMF	3.5eq K_2CO_3	calentamiento a 110°C , 36 horas	25%
9	DMF	3.2eq Et_3N	calentamiento a 110°C , 36 horas	70%

*El rendimiento reportado es cualitativo, excepto en el caso de los experimentos 1, 3 y 9, donde se obtuvo un sólido cuantificable.

Se decidió variar el disolvente para llevar a cabo la reacción a una mayor temperatura, con esto se esperaba aumentar el rendimiento y disminuir el tiempo necesario para la obtención del producto. Con las pruebas 2 y 3 pudo elucidarse que la temperatura es un factor crucial para disminuir el tiempo de reacción. Sabiendo esto, se llevaron a cabo reacciones con calentamiento asistido por microondas.

Con los ensayos 4 y 5 se comprobó que la temperatura es uno de los factores que más se relacionan con el aumento del rendimiento. Sin embargo, decidió no incrementarse más el calentamiento debido a que la presión interna del vial aumentó considerablemente en los sistemas de reacción con trietilamina. Por esta razón, se decidió continuar con calentamiento convencional.

Tomando como base la prueba 3, se decidió modificar el tiempo de reacción; sin embargo, el rendimiento no se incrementó, evidenciando que dicho factor no era crucial para el aumento del rendimiento. Se decidió entonces aumentar los equivalentes de base para evitar la protonación del compuesto **6** con el HCl liberado del cloruro de acilo.

El rendimiento aumentó con la mayor cantidad de base, por lo que se decidió elevar la temperatura y ejecutar las condiciones de las pruebas 8 y 9. La presencia del carbonato de potasio como base hizo disminuir el rendimiento de la reacción, lo cual podría deberse a que el intermediario reactivo que se forma con la trietilamina influye en el rendimiento. Tras el estudio de diferentes condiciones de reacción, se encontró que las mejores condiciones a partir de cloruro de acilo son: DMF como disolvente a 110°C y 3.2 eq de trietilamina.

Con dichas condiciones de reacción se obtuvieron las amidas **12** y **13**; la amida **11** se obtuvo a partir de la primera metodología llevada a cabo (experimento 3, **Tabla 8**). Esta última se obtuvo en buen rendimiento (65%), seguida de la amida **13** (50%) y la **12** (20%). Las amidas **11** y **13** son las precursoras de los compuestos finales

DL5A y **DL5G**, donde el R de la parte ácida de la amida son H y 4-F, respectivamente. Debido al bajo rendimiento obtenido para la amida **12** no fue posible llevar a cabo la última reacción y originar el compuesto final **DL5B** (R= 3-Cl).

Debido a que en la reacción con cloruros de acilo no se agota la materia prima, se llevó a cabo la sustitución de los cloros presentes en las posiciones 2 y 6 de la piridina por los anillos de 2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)ona para originar el compuesto **7**. El compuesto **7** se obtuvo llevando a cabo un acoplamiento de Suzuki entre el compuesto **5** y la materia prima **6** (**Esquema 8**).

Se utilizaron diferentes condiciones de reacción para llevar a cabo la formación de las amidas a partir del compuesto **7** (**Tabla 9**), lo cual originaría los compuestos finales. Ninguna de estas resultó en la formación del producto, lo cual muy probablemente se debe al impedimento estérico que evita que el grupo amino ataque nucleofílicamente al cloruro de acilo o a los intermediarios reactivos formados con agentes acoplantes.

Tabla 9. Condiciones de reacción utilizadas para la formación de amidas con el compuesto (**7**)

Metodología	Materia prima*	Base	Condiciones de reacción	Rendimiento
1	cloruro de acilo	Et ₃ N	calentamiento a 45°C, 24 horas	sin formación del producto
2	cloruro de acilo	Et ₃ N	MW 130°C, 175W, 20 minutos	sin formación del producto
3	PyBOP	NMM	temperatura ambiente, 24 horas	sin formación del producto
4	COMU	NMM	temperatura ambiente, 24 horas	sin formación del producto
5	CDI	---	MW 130°C, 350W, 20 minutos	sin formación del producto

*La materia prima utilizada en las metodologías 3-5 fue el ácido carboxílico correspondiente y el agente acoplante mencionado en la tabla.

A continuación se describe la caracterización estructural de las amidas obtenidas, la cual se realizó utilizando espectroscopia RMN ¹H (**Anexo II**). En los espectros se

observa una señal simple correspondiente al hidrógeno de la amida alrededor de 11 ppm, la que desaparece con D₂O. Mientras que alrededor de 7.9 ppm está presente la señal que integra para los dos hidrógenos de la piridina. En el caso de la amida **11** se detallan las señales aromáticas en el **Anexo II**.

Para las amidas intermediarias **12** y **13**, las señales aromáticas correspondientes a los hidrógenos 1-6 (**Figura II-1**, del Anexo II) se observan duplicadas, es decir, se observa una señal principal y otra con las mismas características pero menor intensidad a campo más alto. Este fenómeno se observó también en los espectros de los compuestos finales, lo cual sugiere la presencia de dos conformeros del mismo compuesto.

Debido a lo anterior, para llevar a cabo la asignación de señales de las amidas se realizaron los siguientes experimentos bidimensionales: COSY, HSQC, HMBC y NOESY. A continuación, se muestra un ejemplo de esta asignación con el compuesto **12**. El análisis se enfocó en la asignación de las señales aromáticas, debido a que ya se había asignado el H-8.

Se comenzó por el experimento COSY (**Figura 18**), con el que se establecen correlaciones con hidrógenos vecinos. Aquí se encontró interacción de H-3 con H-2 y H-4; además de interacción de H-6 con H-2 y H-4. Se continuó con el espectro HSQC para la asignación de carbonos; en la **Tabla 10** se muestra la correlación de señales que indican un enlace carbono-hidrógeno. En la **Figura 19** se muestra una ampliación a la región aromática del espectro obtenido.

Para la asignación de carbonos cuaternarios se utilizó el experimento HMBC, descartando las señales obtenidas del experimento anterior. Los valores de desplazamiento se muestran en la **Tabla 11**, así como una ampliación del espectro en la **Figura 20**.

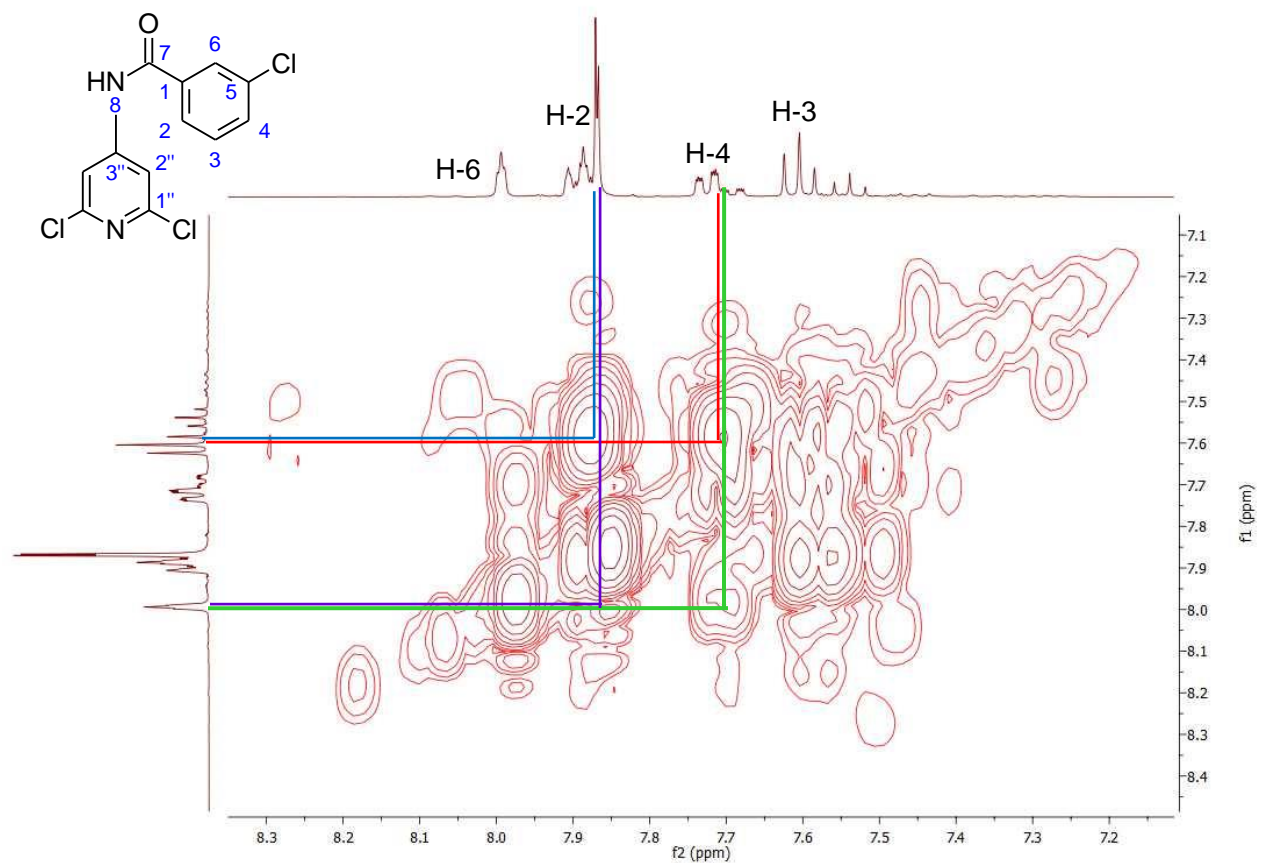


Figura 18. Correlación ^1H - ^1H a dos y tres enlaces de distancia (COSY) del compuesto **12**.

Tabla 10. Correlación del enlace ^1H - ^{13}C observada en el espectro HSQC de **12**

Posición del H	Desplazamiento del H (ppm)	Desplazamiento del C (ppm)
2	7.87	127.13
3	7.58	131.08
4	7.71	132.80
6	7.97	127.99
2''	7.85	113.05

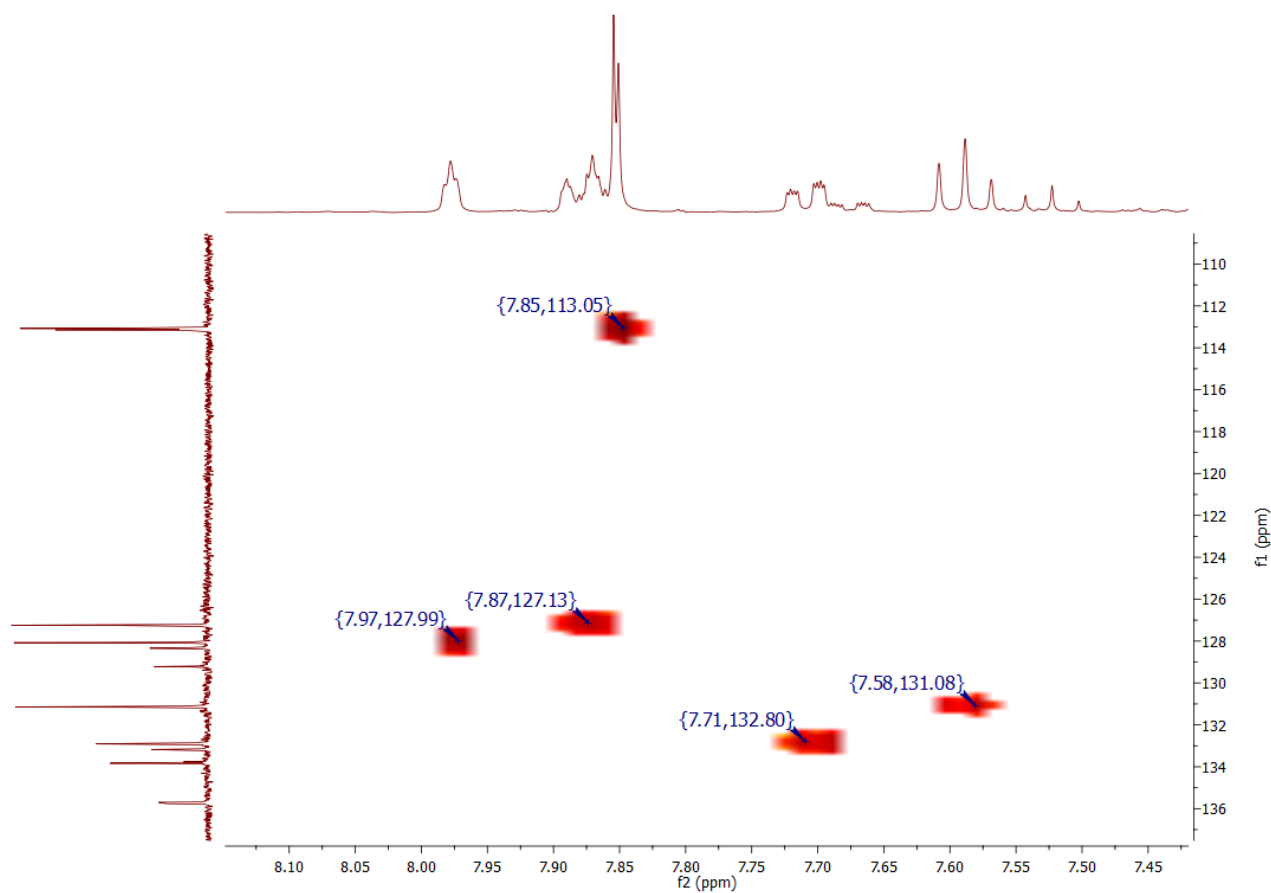


Figura 19. Correlación del enlace ^1H - ^{13}C (HSQC) del compuesto **12**.

Tabla 11. Correlación del enlace ^1H - ^{13}C observada en el espectro HMBC de **12**. Se enlistan las correlaciones no observados en el experimento HSQC

Posición del H	δ de H (ppm)	Carbono con el que correlaciona	δ de C (ppm)
2	7.89	4	132.85
		6	127.97
3	7.60	1	133.71
		5	135.65
6	7.98	7	165.70
2''	7.89	7	165.73
		1''	149.86

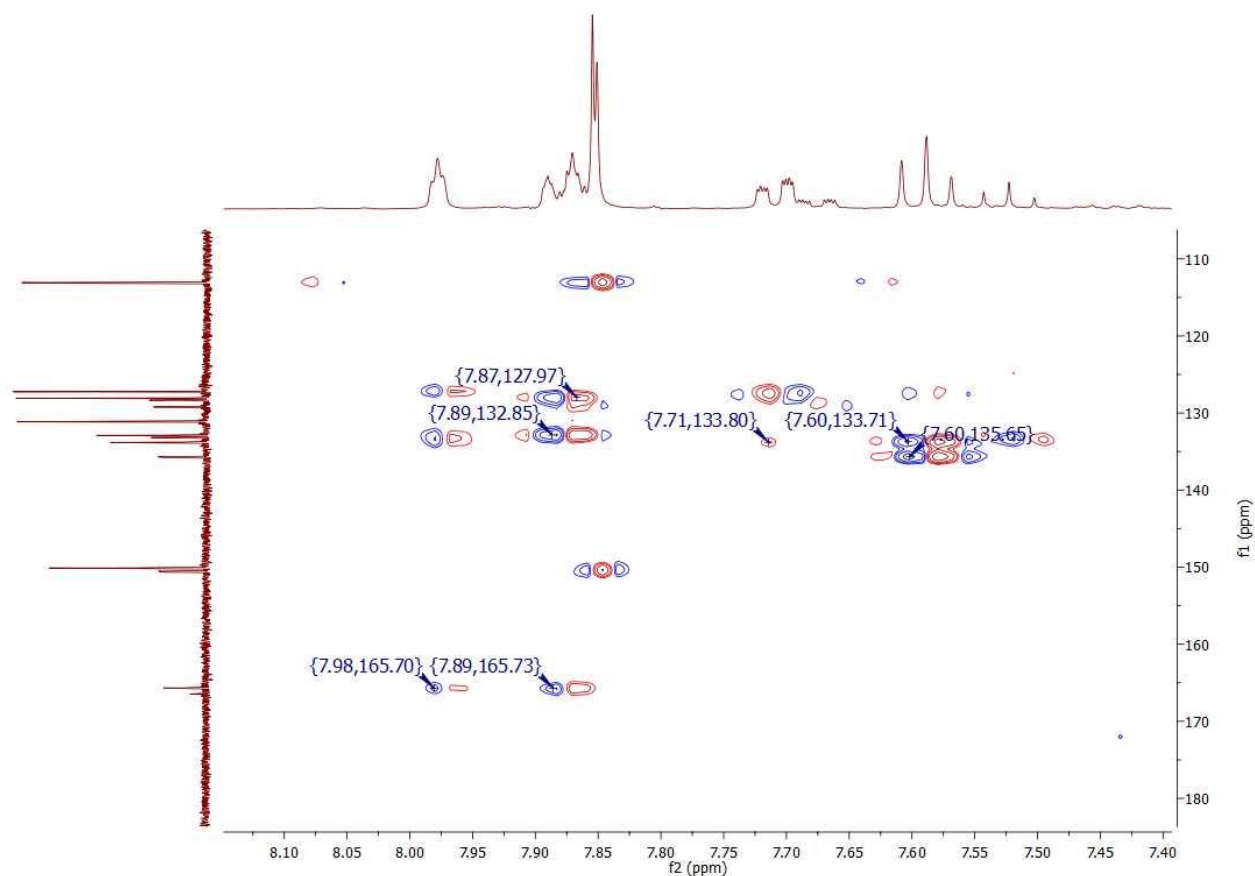


Figura 20. Correlación ^1H - ^{13}C a dos y tres enlaces de distancia (HMBC) del compuesto **12**.

Finalmente, con el experimento NOESY pudo observarse correlación en el espacio entre los hidrógenos 2'', 6 y 8, además de los hidrógenos 2 y 8; lo cual confirma la presencia de dos confórmeros.

Continuando con la caracterización estructural de los compuestos finales, en primera instancia se asignaron las señales de los hidrógenos correspondientes a los anillos de 2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)onas en las posiciones 2 y 6. Tomando como ejemplo al compuesto final **DL5A**, se obtuvo del espectro de RMN ^1H la siguiente asignación de señales en ppm (**Figura 21**): 4.65 (s, 4H, H-1'), 7.11 (d, $J= 8.3$ Hz, 2H, H-8'), 7.69 (dd, $J=8.3, 2.1$ Hz, 2H, H-7'), 7.72 (d, $J= 2.0$ Hz, 2H, H-5'), 8.23 (s, 2H, H-2''), 10.74 (s, -D₂O, 1H, H-8), 10.88 (s, -D₂O, 2H, H-3').

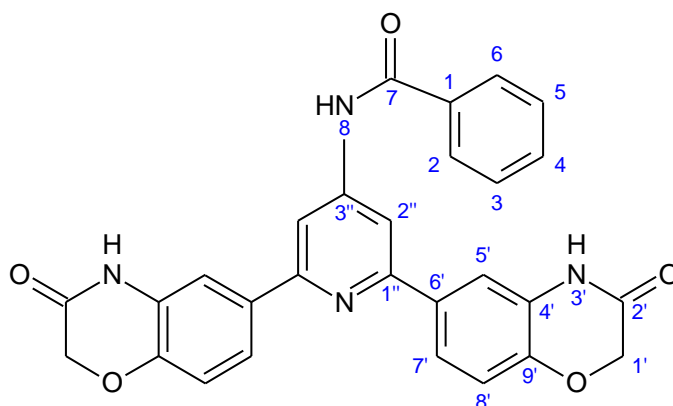


Figura 21. Numeración arbitraria dada al compuesto **DL5A** para la asignación de señales en los espectros de RMN.

Para la asignación de señales aromáticas se analizó el espectro 2D COSY, encontrándose interacción de los hidrógenos 3, 4 y 5 con los hidrógenos 2 y 6. Además se observó la interacción de H-7' con H-8' (**Figura 22**). Posteriormente con el espectro HSQC (**Figura 23**), se realizó la asignación de carbonos mostrada en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Correlación del enlace $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ observada en el espectro HSQC de **DL5A**

Posición del H	Desplazamiento del H (ppm)	Desplazamiento del C (ppm)
2	8.01	128.23
3	7.57	128.97
4	7.63	132.58
2''	8.21	108.56
1'	4.63	67.15
5'	7.70	114.41
7'	7.72	121.84
8'	7.09	116.76

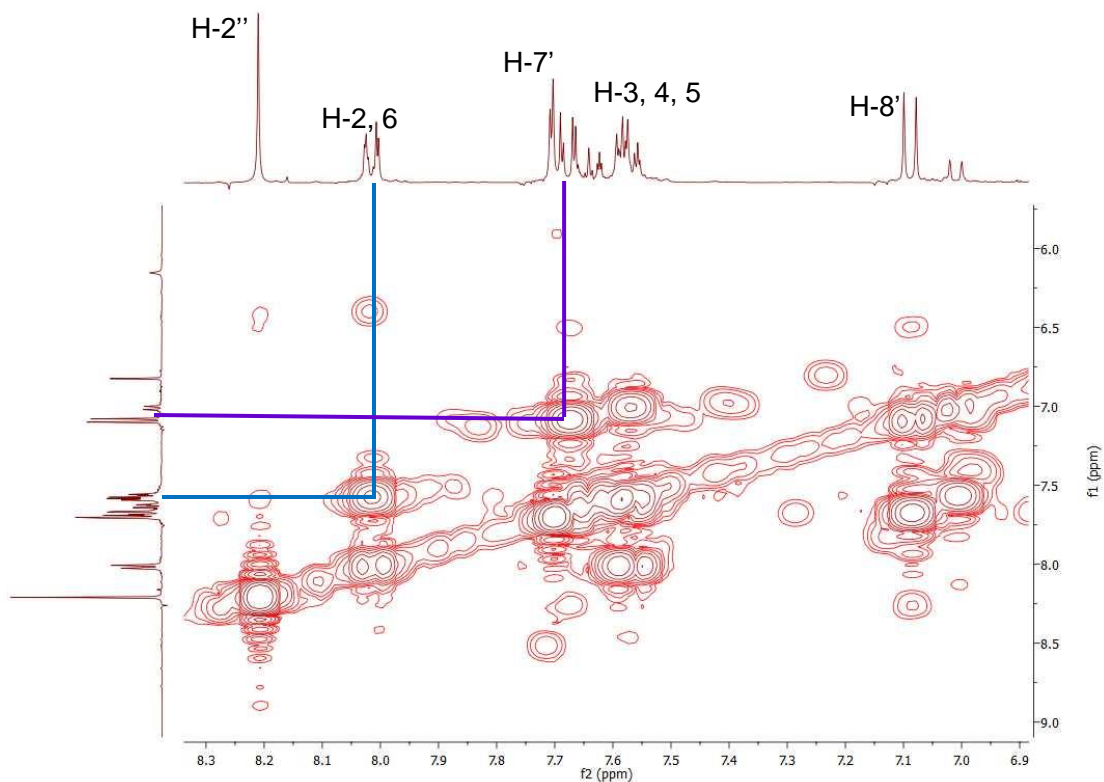


Figura 22. Correlación ^1H - ^1H a dos y tres enlaces de distancia (COSY) del compuesto DL5A.

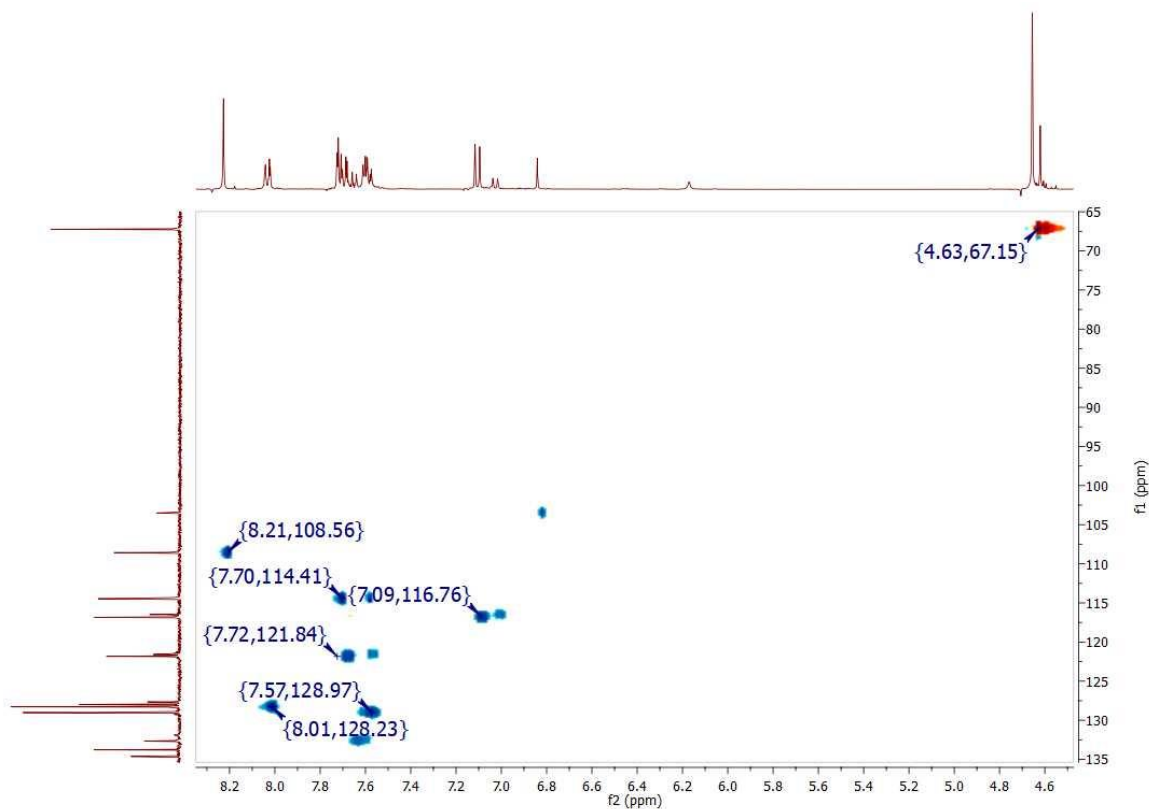


Figura 23. Correlación del enlace ^1H - ^{13}C (HSQC) del compuesto DL5A.

Para la asignación de carbonos cuaternarios se utilizó el experimento HMBC, descartando las señales obtenidas del experimento anterior. Los valores de desplazamiento se muestran en la **Tabla 13**, así como una ampliación del espectro en la **Figura 24**.

Tabla 13. Correlación del enlace ^1H - ^{13}C observada en el espectro HMBC de **DL5A**. Se enlistan las correlaciones no observados en el experimento HSQC

Posición del H	δ de H (ppm)	Carbono con el que correlaciona	δ de C (ppm)
1'	4.62	2'	165.08
		9'	144.61
8'	7.08	4'	133.72
7'	7.69	8'	114.42
		9'	144.07
		1''	156.25
3	7.56	1	134.56
2''	8.19	3''	148.51
6	8.02	7	166.96
8	10.72	2''	108.65
3'	10.85	9'	144.62

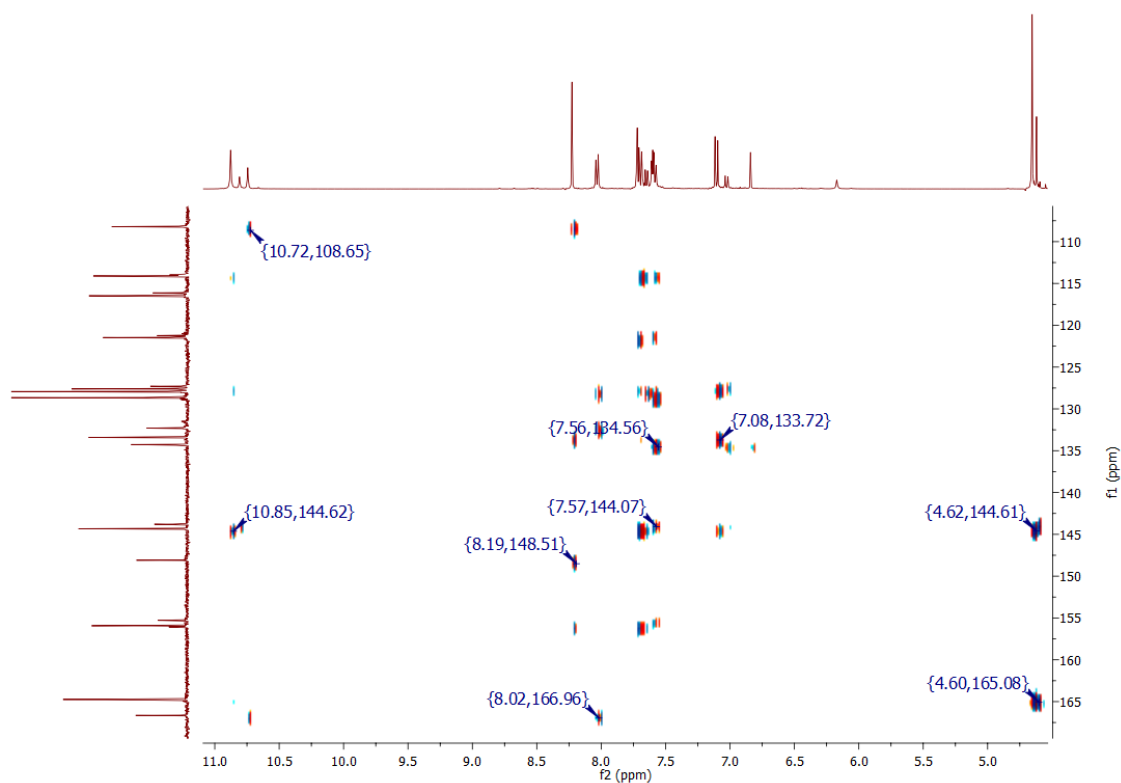


Figura 24. Correlación ^1H - ^{13}C a dos y tres enlaces (HMBC) del compuesto **DL5A**.

7.2.2. Síntesis del compuesto 6-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona (5)

La ruta de síntesis se inició con el 4-bromo-2-nitrofenol (**1**), el cual se hizo reaccionar con α -bromoacetato de etilo (**2**) para llevar a cabo una sustitución nucleofílica S_N2 ;⁷³ se empleó carbonato de potasio para favorecer la desprotonación del grupo hidroxilo y facilitar el ataque nucleofílico de este al compuesto **2**. El rendimiento obtenido fue muy alto (99.7%), por lo que sólo se realizaron lavados de agua fría para remover los restos de compuesto **2** y sales remanentes.

Posteriormente, el compuesto (4-bromo-2-nitrofenoxi)acetato de etilo (**3**) obtenido de la reacción anterior se sometió a reducción química con Fe^0 en presencia de ácido acético glacial. Para esta reacción, es necesario llevar a cabo la reducción química y no catalítica porque se desea que el grupo amino resultante de la reducción del nitro lleve a cabo un ataque nucleofílico intramolecular al grupo acilo. Esto se favorece con la catálisis ácida presente y el calentamiento a 50 °C. Una vez obtenido el compuesto **4** se lleva a cabo una borilación de Miyaura, de la cual se obtiene un rendimiento del 67.4% de compuesto puro.

7.2.3. Síntesis de los compuestos finales DL5A y DL5G

Los compuestos finales se sintetizaron a partir de las amidas correspondientes y el compuesto **5** mediante un acoplamiento de Suzuki-Miyaura. Para realizar dicho acoplamiento es necesario un catalizador de paladio, una base, un compuesto de organoboro y compuestos con un buen grupo saliente, como un haluro de arilo. Con esos reactivos es posible la formación de un enlace carbono-carbono.

Con el acoplamiento de Suzuki es posible utilizar una gran variedad de halogenuros, así como diferentes compuestos de organoboro como ésteres borónicos, ácidos borónicos o sales de trifluoroborato. Debido a la menor toxicidad de los reactivos,

el acoplamiento de Suzuki presenta ventajas frente a otros acoplamientos cruzados para la formación de enlaces carbono-carbono como el de Stille o Negishi.⁷⁴

Los principales pasos del mecanismo de reacción del acoplamiento de Suzuki son: la adición oxidante, la transmetalación y la eliminación reductora (**Figura 25**). Para aumentar el rendimiento en la obtención de los compuestos finales, es posible llevar a cabo modificaciones en las condiciones de reacción que favorezcan una o varias de las etapas del mecanismo.^{74, 75}

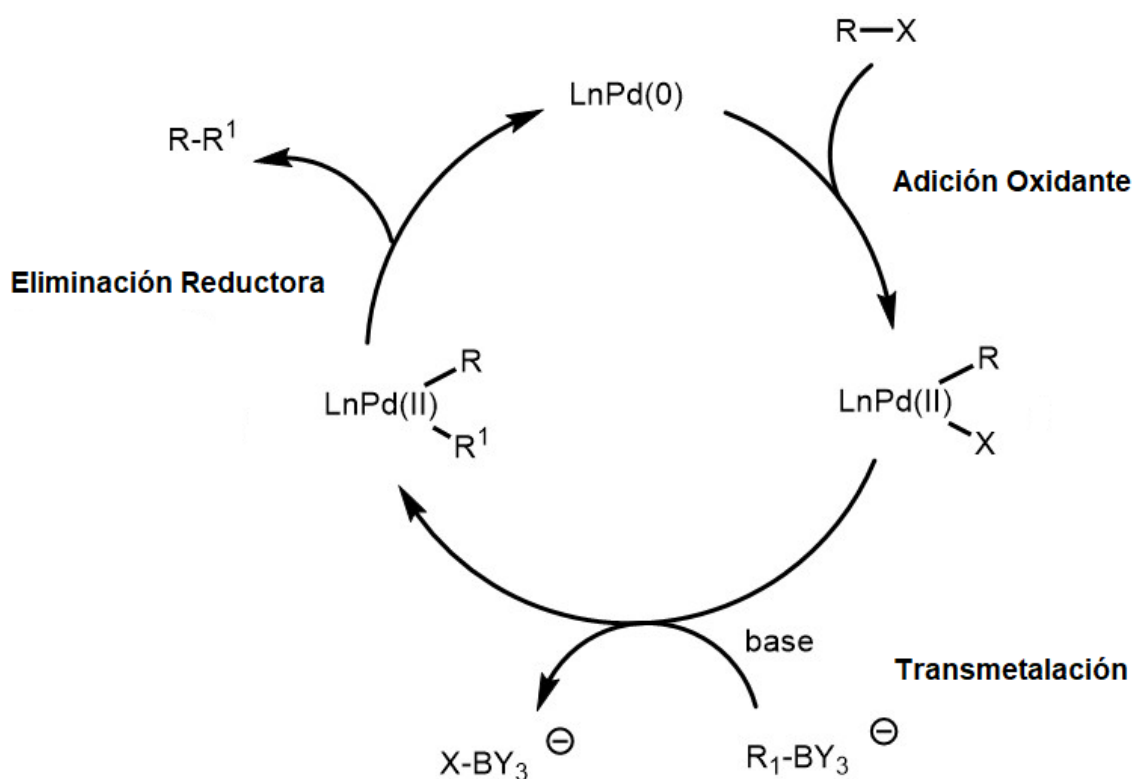


Figura 25. Mecanismo general del acoplamiento de Suzuki.⁷⁵

8. CONCLUSIONES

- Se realizó el diseño de una nueva serie de piridinas 2,4,6-trisustituidas a partir de un inhibidor en el rango micromolar detectado con técnicas de cribado virtual de alta eficiencia. Los compuestos de la nueva serie presentan buenos valores de energía libre de unión con AKT1 y AKT2, pero no con AKT3.
- No se conservan todas las interacciones observadas en la serie 2 con los anillos en posición 2 y 6 de la piridina para la serie DL5, sin embargo, existen otras que podrían compensarlas. Del acoplamiento molecular con AKT1 se sabe que aquellos compuestos de la serie DL5 sustituidos en la posición 3 del fenilo, presente en la posición 4 de la piridina, interaccionan con los residuos Glu234 y Glu236 para formar un puente de hidrógeno.
- Los compuestos de la serie DL5 presentan propiedades moleculares que aumentan su probabilidad para tener buena biodisponibilidad oral. Sin embargo, presentan características que los predicen como potencialmente tóxicos.
- Del estudio sobre la metodología para la síntesis de los compuestos diseñados, se obtuvo que la mejor opción para la obtención de los compuestos finales es la síntesis de amidas a partir de la 4-amino-2,6-dicloropiridina y cloruros de acilo; para después llevar a cabo un acoplamiento de Suzuki.
- Se sintetizaron dos compuestos finales a los cuales se les determinaron sus propiedades fisicoquímicas (R_f y p_f) y se caracterizaron por medio de RMN unidimensional y bidimensional. En dichos espectros se observa la presencia de dos confórmeros.

9. PERSPECTIVAS

- Realizar estudios de dinámica molecular para determinar cuáles de los compuestos poseen la mejor estabilidad en el complejo de unión con las isoformas de AKT.

- Sintetizar los compuestos finales obtenidos a mayor escala, así como la obtención del resto de los compuestos de la serie DL5 para llevar a cabo la evaluación de su actividad inhibitoria contra AKT. Correlacionar estos resultados con los de acoplamiento molecular y establecer si los últimos son predictivos.

- Realizar ensayos de actividad inhibitoria in vitro con líneas celulares de cáncer que sobreexpresen AKT, además de líneas celulares sanas. Determinar su CI50 y su índice de selectividad.

10. REFERENCIAS

1. National Cancer Institute. What is Cancer? <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer> (Consultado: Jul 15, 2017).
2. Organización Mundial de la Salud. Centro de prensa. Cáncer. Datos y cifras. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/> (Consultado: Jul 15, 2017).
3. Muñoz-Pinedo, C.; El Mjiyad, N.; Ricci, J-E. Cancer metabolism: current perspectives and future directions. *Cell Death Dis.* **2012**, *3(1)*, 248-256.
4. Jones, R. G.; Thompson, C. B. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev.* **2009**, *23*, 537-548.
5. Urruticoechea, A.; Alemany, R.; Balart, J.; Villanueva A.; Viñals, F.; Capellá, G. Recent Advances in Cancer Therapy: An Overview. *Curr. Pharm. Des.* **2010**, *16*, 3-10.
6. Instituto Nacional De Estadística y Geografía. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer (4 de febrero). Datos Nacionales. www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2017/cancer2017_Nal.pdf (Consultado: Jul 16, 2017).
7. Reynoso Noverón, N. Recursos contra el Cáncer: presupuesto en salud y necesidades actuales en la atención del cáncer en México. Documento presentado en el Foro Legislativo “Necesidades de la atención integral a pacientes con cáncer en México. Un abordaje económico, clínico y social”, Cámara de Diputados, Ciudad de México, 2015. www.cefp.gob.mx/difusion/evento/2015/forocancer/presentaciones/p10.pdf (Consultado: Ago 12, 2017).
8. Instituto Nacional del Cáncer. Tratamiento del cáncer. www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento (Consultado: Jul 16, 2017).
9. INFOCÁNCER 2015. México. Tratamientos. www.infocancer.org.mx/tratamientos-con454i0.html (Consultado: Jul 16, 2017).
10. Martínez-Outschoorn, U. E.; Peiris-Pagès, M.; Pestell, R. G., Sotgia, F.; Lisanti, M. P. Cancer metabolism: a therapeutic perspective. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2017**, *14*, 11-31.
11. Hennessy, B. T.; Smith, D. L.; Ram, P. T.; Lu, Y.; Mills, G. B. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discovery.* **2005**, *4*, 988-1004.
12. Nitulescu, G. M.; Margina, D.; Juzenas, P.; Peng, Q.; Olaru, O. T.; Saloustros, E.; Fenga, C.; Spandidos, D. A.; Libra, M.; Tsatsakis A. M. Akt inhibitors in cancer

- treatment: The long journey from drug Discovery to clinical use (Review). *Int. J. Oncol.* **2016**, *48*, 869-885.
13. Liu, Y.; Yin, Y.; Zhang, Z.; Li, C. J.; Zhang, H.; Zhang, D.; Jiang, C.; Nomie, K.; Zhang, L.; Wang, M. L.; Zhao, G. Structural optimization elaborates novel potent Akt inhibitors with promising anticancer activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *138*, 543-551.
 14. Robey, R. B.; Hay, N. Is Akt the “Warburg kinase”? -Akt-energy metabolism interactions and oncogenesis. *Semin. Cancer Biol.* **2009**, *19*, 25-31.
 15. Romano, G. The Role of the Dysfunctional Akt-Related Pathway in Cancer: Establishment and Maintenance of a Malignant Cell Phenotype, Resistance to Therapy, and Future Strategies for Drug Development. *Scientifica.* **2013**, *13*, 1-12.
 16. Polivka, J., Jr.; Janku, F. Molecular targets for cancer therapy in the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Pharmacol. Ther.* **2014**, *142*, 164-175.
 17. Crowell, J. A.; Steele, V. E.; Fay, J. R. Targeting the AKT protein kinase for cancer chemoprevention. *Mol. Cancer Ther.* **2007**, *6*, 2139-2148.
 18. Zhu, L.; Derijard, B.; Chakrabandhu, K.; Wang, B. S.; Chen, H. Z.; Hueber, A. O. Synergism of PI3K/Akt inhibition and Fas activation on colon cancer cell death. *Cancer Lett.* **2014**, *354*, 355-364.
 19. Zhu, J.; Wang, M.; Cao, B.; Hou, T.; Mao, X. Targeting the Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT Pathway for the Treatment of Multiple Myeloma. *Curr. Med. Chem.* **2014**, *21*, 3173-3187.
 20. Fumarola, C.; Bonelli, M. A.; Petronini, P. G.; Alfieri, R. R. Targeting PI3K/AKT/mTOR pathway in non small cell lung cancer. *Biochem. Pharmacol.* **2014**, *90*, 197-207.
 21. Houédé, N.; Pourquier, P. Targeting the genetic alterations of the PI3K-AKT-mTOR pathway: Its potential use in the treatment of bladder cancers. *Pharmacol. Ther.* **2015**, *145*, 1-18.
 22. Mabuchi, S.; Kuroda, H.; Takahashi, R.; Sasano, T. The PI3K/AKT/mTOR pathway as a therapeutic target in ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* **2015**, *137*, 173-179.
 23. Porta, C.; Paglino, C.; Mosca A. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer. *Front. Oncol.* **2014**, *4*, 1-11.
 24. Bhutani, J.; Sheikh, A.; Niazi, A. K. Akt inhibitors: mechanism of action and implications for anticancer therapeutics. *Infect. Agent Cancer.* **2013**, *8:49*, 1-4.

25. Manning, B. D.; Cantley, L. C. AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell*. **2007**, *129*, 1261-1274.
26. Gills, J. J.; Dennis, P. A. Perifosine: Update on a Novel Akt Inhibitor. *Curr. Oncol. Rep.* **2009**, *11*, 102-110.
27. Abraham, A. G.; O'Neill, E. PI3K/Akt-mediated regulation of p53 in cancer. *Biochem. Soc. Trans.* **2014**, *42*, 798-803.
28. Steelman, L. S.; Stadelman, K. M.; Chappell W. H.; Horn, S.; Bäsecke, J.; Cervello, M.; Nicoletti, F.; Libra, M.; Stivala, F.; Martelli, A. M.; McCubrey J. A. Akt as a therapeutic target in cancer. *Expert Opin. Ther. Targets.* **2008**, *12*:9, 1139-1165.
29. Hemmings, B. A.; Restuccia, D. F. PI3K-PKB/Akt Pathway. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* **2012**, *4*:9, 1-3.
30. Zhang, X.; Tang, N.; Hadden, T. J.; Rishi, A. K. Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta.* **2011**, *1813*, 1978-1986.
31. Medina-Franco, J. L.; Giulianotti, M. A.; Yu, Y.; Shen, L.; Yao, L.; Singh, N. Discovery of a novel protein kinase B inhibitor by structure-based virtual screening. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 4634-4638.
32. Hernández-Campos, A.; Velázquez-Martínez, I.; Castillo, R.; López-Vallejo, F.; Jia, P.; Yu, Y.; Giulianotti, M. A.; Medina-Franco, J. L. Docking of Protein Kinase B Inhibitors: Implications in the Structure-Based Optimization of a Novel Scaffold. *Chem. Biol. Drug Des.* **2010**, *76*, 269-276.
33. Trejo-Soto, P. J.; Hernández-Campos, A.; Romo-Mancillas A.; Medina-Franco, J. L.; Castillo, R. In search of AKT kinase inhibitors as anticancer agents: structure-based design, docking, and molecular dynamics studies of 2, 4, 6-trisubstituted pyridines. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2017**, *10*, 1-20.
34. Freeman-Cook, K. D.; Autry, C.; Borzillo, G.; Gordon, D.; Barbacci-Tobin, E.; Bernardo, V.; Briere, D.; Clark, T.; Corbett, M.; Jakubczak, J.; Kakar, S.; Knauth, E.; Lippa, B.; Luzzio, M. J.; Mansour, M.; Martinelli, G.; Marx, M.; Nelson, K.; Pandit, J.; Rajamohan, F.; Robonson, S.; Subramanyam, C.; Wei, L.; Wythes, M.; Morris, J. Design of Selective, ATP-Competitive Inhibitors of Akt. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 4615-4622.
35. Rouse, M. B.; Seefeld, M. A.; Leber, J. D.; McNulty, K. C.; Sun, L.; Miller, W. H.; Zhang, S.; Minthorn, E. A.; Concha, N. O.; Choudry, A. E.; Schaber, M. D.; Heering, D. A.

- Aminofurazans as potent inhibitors of AKT kinase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 1508-1511.
36. Saxty, G.; Woodhead, S. J.; Berdini, V.; Davies, T. G.; Verdonk, M. L.; Wyatt, P. G.; Boyle, R. G.; Barford, D.; Downham, R.; Garrett, M. D.; Carr, R. A. Identification of inhibitors of protein kinase B using fragment-based lead discovery. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 2293-2296.
37. Woods, K. W.; Fischer, J. P.; Claiborne, A.; Li, T.; Thomas, S. A.; Zhu, G. D.; Diebold, R. B.; Liu, X.; Shi, Y.; Klinghofer, V.; Han, E. K.; Guan, R.; Magnone, S. R.; Johnson, E. F.; Bouska, J. J.; Olson, A. M.; de Jong, R.; Oltersdorf, T.; Luo, Y.; Rosenberg, S. H.; Giranda, V. L.; Li, Q. Synthesis and SAR of indazole-pyridine based protein kinase B/Akt inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 6832-6846.
38. Nikaljea, A. P.; Bahetia, K. Computer Based Drug Design of Various Heterocyclic Compounds having Anticancer Activity: A Brief Review. *JSM Bioinformatics, Genomics and Proteomics.* **2017**, *2*, 1014-1026.
39. Gao, C. Computer-aided drug design approaches in developing anti-cancer inhibitors, Ph.D. Dissertation, University of Gothenburg, 2016.
40. Sliwoski, G. R. Computer Aided Drug Discovery. Descriptor Improvement and Application to Obesity-related Therapeutics, Ph.D. Dissertation, Universität Leipzig, 2015.
41. Maithri, G.; Manasa, B.; Vani S. S.; Narendra A.; Harshita T. Computational Drug Design and Molecular Dynamic Studies-A Review. *Int. J. Biomed.* **2016**, *6*, 1-7.
42. Kitchen, D. B.; Decornez, H.; Furr, J. R.; Bajorath, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nat. Rev. Drug Discovery.* **2004**, *3*, 935-949.
43. Lionta, E.; Spyrou, G.; Vassilatis, D. K.; Cournia, Z. Structure-Based Virtual Screening for Drug Discovery: Principles, Applications and Recent Advances. *Curr. Top. Med. Chem.* **2014**, *14*, 1923-1938.
44. Sliwoski, G.; Kothiwale, S.; Meiler, J.; Lowe, E. W., Jr. Computational Methods in Drug Discovery. *Pharmacol. Rev.* **2014**, *66*, 334-395.

45. Coste, J.; Frérot, E.; Jouin, P. Coupling *N*-Methylated Amino Acids Using PyBroP and PyCloP Halogenophosphonium Salts: Mechanism and Fields of Application. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 2437-2446.
46. Valeur, E.; Bradley, M. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 606-631.
47. Swenson, R. E.; Raju, N.; Estrella-Jiménez, M. E.; Ramalingam, K. JTE013 Analogs and Methods of Making and Using Same. WO2011/159864 A1, December 22, 2011.
48. Barril Alonso, X., García Collazo, A., Aymamí Bofarull, J., Revés Vilaplana, M. & Lavilla Grifols, R. Di(Hetero)Arylamides and Sulfonamides, Methods for their Preparation and Therapeutic Uses thereof. WO2015/014900, February 5, 2015.
49. Li, J.; Subramaniam, K.; Smith, D.; Qiao, J. X.; Li, J. J.; Qian-Cutrone, J.; Kadow, J. F.; Vite, G. D.; Chen, B. C. AlMe₃-Promoted Formation of Amides from Acids and Amines. *Org. Lett.* **2011**, *14*:1, 214-217.
50. Vrijdag, J. L.; Delgado, F.; Alonso, N.; De Borggraeve, W. M.; Pérez-Macias, N.; Alcázar, J. Practical preparation of challenging amides from non-nucleophilic amines and esters under flow conditions. *Chem. Comm.* **2014**, *50*, 15094-15097.
51. FAF-Drugs4. Free ADME/tox Filtering tool 4. <http://mobylye.rpbs.univ-paris-diderot.fr/data/jobs/FAF-Drugs4/T24583205801964> (Consultado: Sep 29, 2017).
52. UniProt Consortium 2002-2017 www.uniprot.org
53. Addie, M.; Ballard, P.; Buttar, D.; Crafter, C.; Currie, G.; Davies, B. R.; Debreczeni, J.; Dry, H.; Dudley, P.; Greenwood, R.; Johnson, P. D.; Kettle, J. G.; Lane, C.; Lamont, G.; Linette, R. Discovery of 4-Amino-*N*-[(1*S*)-1-(4-chlorophenyl)-3-hydroxypropyl]-1-(7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)piperidine-4-carboxamide (AZD5363), an Orally Bioavailable, Potent Inhibitor of Akt Kinases. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 2059-2073.
54. Eswar, N.; Webb, B.; Marti-Renom, M. A.; Madhusudhan, M. S.; Eramian, D.; Shen, M. Y.; Pieper, U.; Sali, A. Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller. *Curr. Protoc. Bioinformatics.* **2006**, *0 5*, Unit-5.6.
55. *Schrödinger Release 2015-4: Prime*, version 4.2; New York, NY: Schrödinger, LCC.
56. Schwede, T.; Kopp, J.; Guex, N.; Peitsch, M. C. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acid Res.* **2013**, *31*, 3381-3385.
57. *Schrödinger Release 2015-4: Maestro*, version 10.4; New York, NY: Schrödinger, LCC.

58. Chen, V. B.; Arendall, W. B.; Headd, J. J.; Keedy, D. A.; Immormino, R. M.; Kapral, G. J.; Richardson, D. C. MolProbity: All-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Cryst. D.* **2010**, *66*, 12-21.
59. Yang, J.; Cron, P.; Good, V. M.; Thompson, V.; Hemmings, B. A.; Barford, D. Crystal structure of an activated Akt/protein kinase B ternary complex with GSK3-peptide and AMP-PNP. *Nat. Struct. Biol.* **2002**, *9*, 940-944.
60. *Spartan*, version 10; Wavefunction Inc. Irvine, CA: Author, 2010.
61. Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. AutoDock4 and AUTODOCKTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 2785-2791.
62. Gasteiger, J.; Marsili, M. A new model for calculating atomic charges in molecules. *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19*, 3181-3184.
63. Cano González, L. Síntesis y evaluación *in silico* de nuevos carbamatos bencimidazólicos como inhibidores de la polimerización de la β -tubulina, Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, 2015.
64. Galbis Pérez, J. A., *Panorama Actual de la Química Farmacéutica*, 2ª ed.; Universidad de Sevilla: Sevilla, 2004.
65. Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings 1P11. *Adv. Drug Deliv.* **2001**, *46*, 3-26.
66. Egan, W. J.; Merz, K. M.; Baldwin, J. J. Prediction of drug absorption using multivariate statistics. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3867-3877.
67. Veber, D. F.; Johnson, S. R.; Cheng, H. Y.; Smith, B. R.; Ward, K. W.; Kopple, K. D. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2615-2623.
68. Delaney, J. S. ESOL: Estimating Aqueous Solubility Directly from Molecular Structure. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2004**, *44*, 1000-1005.
69. Lagorce, D.; Sperandio, O.; Baell, J. B.; Miteva, M. A.; Villoutreix, B. O. FAF-Drugs3: a web server for compound property calculation and chemical library design. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 200-207.

70. Kovacic, P.; Somanathan, R. Nitroaromatic compounds: Environmental toxicity, carcinogenicity, mutagenicity, therapy and mechanism. *J. Appl. Toxicol.* **2014**, *34*, 810-824.
71. Tripathy, S.; Sattigery, V.; Sahu, S. K. Application of coupling reagents in Amide bond formation. *Int. J. Chem. Pharm. Rev. Res.* **2015**, *1*, 6-9.
72. Kappe, C. O.; Stadler, A. Microwaves in Organic and Medicinal Chemistry. In *Methods and Principles in Medicinal Chemistry*; 1^a ed.; Wiley: New York, 2006; Vol. 25.
73. Powell, N. A.; Ciske, F. L.; Cai, C.; Holsworth, D. D.; Mennen, K.; Van Huis, C. A.; Jalaie, M.; Edmunds, J. J. Rational design of 6-(2,4-diaminopyrimidinyl)-1,4-benzoxazin-3-ones as small molecule rennin inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 5912-5949.
74. Nunes, C. A.; Monteiro, A. L. Pd-Catalyzed Suzuki Cross-Coupling Reaction of Bromostilbene: Insights on the Nature of the Boron Species. *J. Braz. Chem. Soc.* **2007**, *18*, 1443-1447.
75. Miyaura, N.; Suzuki, A. Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organoboron Compounds. *Chem Rev.* **1995**, *95*, 2457-2483.

11. ANEXO I. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

11.1. Instrumentación y materiales

- El peso de las sustancias se determinó en una balanza analítica Sartorius A210P o bien en una balanza granataria Scientech SL600.
- Para efectuar las reacciones a temperatura constante se empleó una parrilla automática IKA modelo IKAMAG RET básica con sensor de temperatura modelo IKATRON ETS-D4 fuzzy.
- Los acoplamientos de Suzuki se llevaron a cabo en un microondas Anton Paar modelo Monowave 400, con viales de 10 mL.
- Las metodologías de formación de amidas se realizaron en un microondas Anton Paar modelo Multiwave PRO, rotor 64GM.
- La evaporación de los disolventes se realizó a presión reducida empleando un rotaevaporador IKA modelo RV 10, con un baño de calentamiento IKA modelo HB10 acoplado a una bomba de vacío Vacuubrand, modelo 4C y un condensador conectado a un enfriador Brinkmann modelo IC-30.
- Los puntos de fusión no corregidos de los compuestos se determinaron utilizando capilares de vidrio en un aparato Büchi B-540.
- Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear se realizaron en espectrómetros Varian modelo Unity Inova de 400 MHz. Los disolventes deuterados empleados fueron dimetilsulfóxido y agua. Los desplazamientos químicos (δ) se reportan en ppm. Las constantes de acoplamiento J se reportan en Hertz. La simbología expresada es: s= señal simple, d= señal doble, t= señal triple, m= señal múltiple, dd= señal doble de dobles, $-D_2O$ = desaparece por intercambio con agua deuterada.

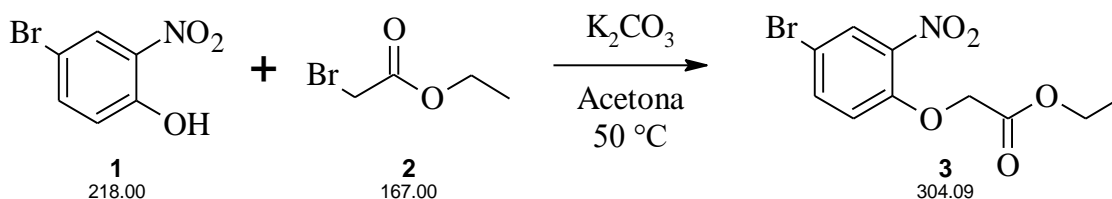
- Las cromatografías en capa fina (ccf) para el seguimiento de reacciones se hicieron en placas cromatográficas de gel de sílice 60 Merck® GF-254. La visualización de los compuestos se realizó con una lámpara UV UVGL-25 UVP®. Las cromatografías en columna se llevaron a cabo usando como fase estacionaria gel de sílice 60A Aldrich con una distribución de tamaño de partícula de 0.015-0.040 mm. Los sistemas de elución se listan en la **Tabla I-1**.

Tabla I-1. Sistemas cromatográficos utilizados

Sistema	Disolventes	Proporción
I	Hexano:AcOEt	60:40
II	Hexano:AcOEt	80:20
III	Hexano:AcOEt	85:15
IV	CHCl ₃ :MeOH	95:5
V	CHCl ₃ :MeOH	85:15

11.2. Técnicas para la síntesis de los compuestos

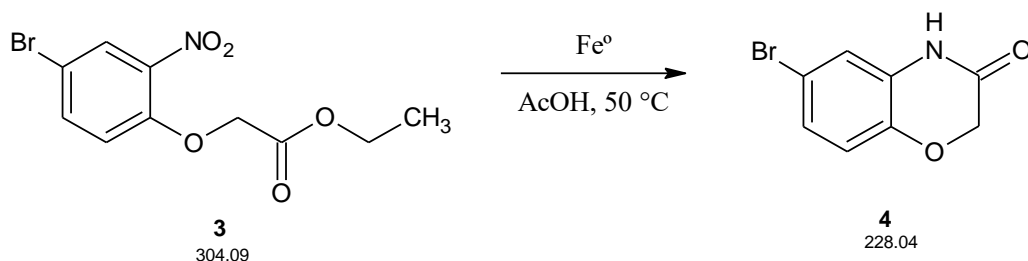
11.2.1. (4-bromo-2-nitrofenoxi)acetato de etilo (3)



En un matraz bola de una boca de 100 mL, equipado con agitador magnético y condensador en posición de reflujo, se añadieron 5.00 g (22.94 mmol) de 4-bromo-2-nitrofenol (**1**), los cuales se disolvieron en 50 mL de acetona. Una vez disuelto el compuesto **1**, se colocaron 4.11 g (29.78 mmol, 1.3 eq) de carbonato de potasio y la mezcla se dejó en agitación por 15 minutos (cambio de coloración a rojo). Finalmente se adicionaron 3.30 mL (29.84 mmol, 1.3 eq) de α-bromoacetato de etilo

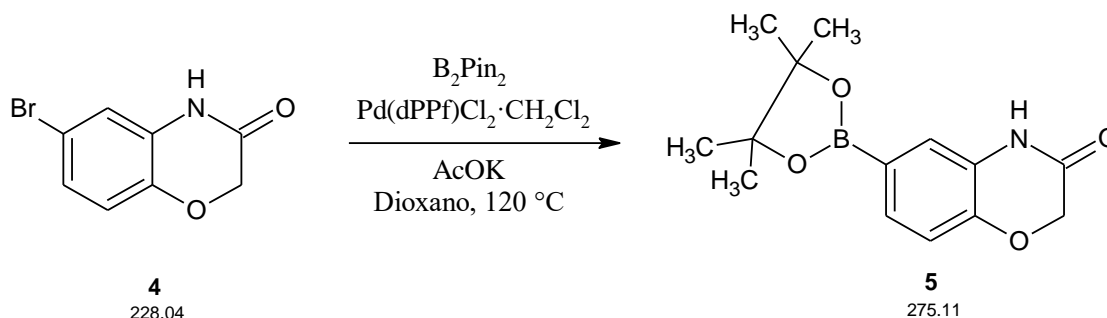
(2) y la mezcla se calentó a una temperatura de 50°C por 5 horas. La ausencia de materia prima se comprobó mediante análisis por ccf, posteriormente se eliminó el disolvente a presión reducida y se añadió agua fría al sólido resultante. El producto obtenido se separó mediante filtración al vacío, se lavó con agua fría y se dejó secar por succión. Se obtuvieron 6.94 g (rendimiento 99.7%) de un sólido amarillo correspondiente al compuesto **3**, el cual presentó un Rf de 0.30 (**Sistema I**) y un pf de 68.6-69.4°C.

11.2.2. 6-bromo-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona (4)



En un vaso de precipitados de 250 mL se colocaron 6.00 g de (4-bromo-2-nitrofenoxi)acetato de etilo (**3**), 12.00 g de Fe⁰ y 120.0 mL de ácido acético glacial. Utilizando un agitador mecánico, la mezcla se puso en agitación y se inició el calentamiento a 50°C por 3 horas. Tras comprobar la ausencia de materia prima por ccf, la mezcla de reacción se filtró al vacío para eliminar el exceso de hierro y sus sales, realizando varios lavados con acetato de etilo. Se eliminó el disolvente del filtrado mediante destilación a presión reducida y al residuo resultante se le adicionó agua hasta observar la formación de un precipitado. El sólido obtenido se separó mediante filtración al vacío, se lavó con agua y se dejó secar por succión. Se obtuvieron 2.75 g (rendimiento 61.1%) de un sólido beige correspondiente al producto **4**, el cual presentó un Rf de 0.23 (**Sistema I**) y un pf de 222.7-223.5°C.

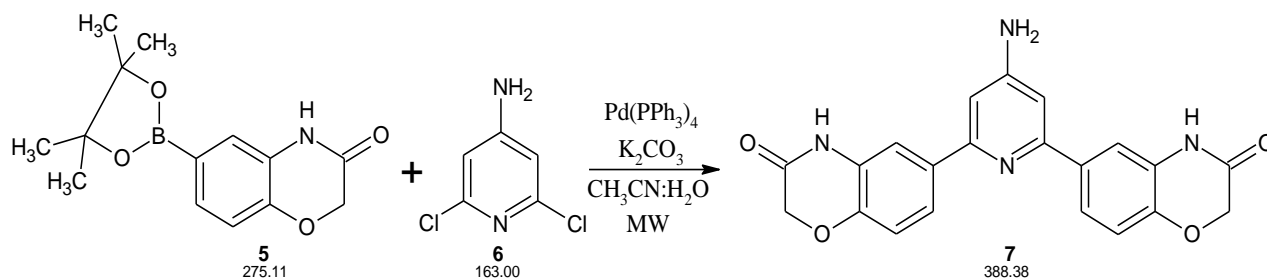
11.2.3. 6-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona (5)



En un matraz bola de dos bocas de 50 mL, equipado con agitador magnético, condensador en posición de reflujo y atmósfera de nitrógeno se colocaron 2.50 g (10.96 mmol) de 6-bromo-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)ona (**4**), 3.08 g (12.12 mmol, 1.1 eq) de diborobis(pinacolato) (B_2Pin_2), 3.24 g (33.06 mmol, 3.0 eq) de acetato de potasio y 0.45 g (5% mol) de [1,1'-bis(difenilfosfina)ferroceno]dicloropaladio (II) en complejo con diclorometano. Bajo atmósfera de nitrógeno se añadieron 15.0 mL de 1,4-dioxano; luego se inició la agitación y se calentó a 120°C por 5 horas. El término de la reacción se comprobó por ccf y la mezcla se hizo pasar por una columna de sílice, realizando varios lavados con acetato de etilo. Posteriormente, el disolvente se retiró mediante destilación a presión reducida y el sólido resultante se purificó mediante cromatografía en columna (**gradiente Sistema I y II**) obteniendo 2.04 g (rendimiento 67.4%) de un sólido blanco correspondiente al compuesto **5**. Este compuesto presentó un R_f de 0.41 (**Sistema I**) y un pf de 177.1-180.2°C.

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, δ ppm): 1.28 (s, 12H, H-1'''), 4.60 (s, 2H, H-1'), 6.91 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, H-7'), 7.22 (s, 1H, H-5') 7.39 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, H-8'), 9.05 (s, 1H, H-3').

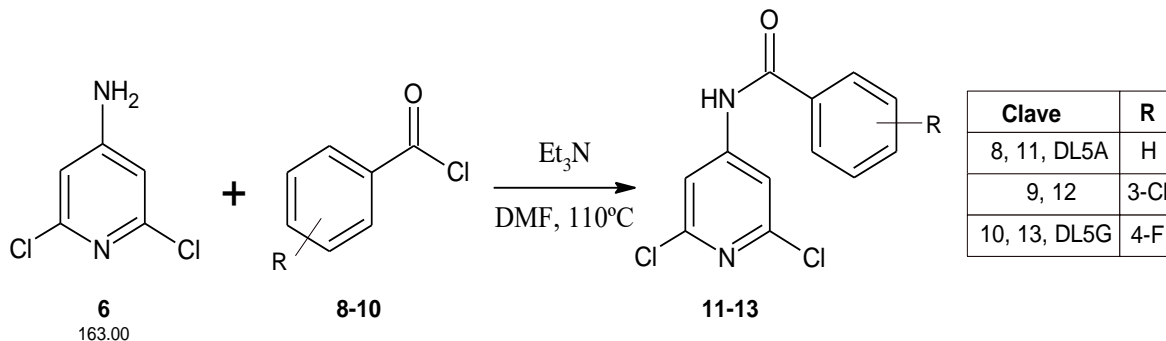
11.2.4. 6,6'-(4-aminopiridin-2,6-diil)bis(2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona) (7)



En un vial para microondas de 10 mL equipado con agitador magnético se colocaron 100 mg (0.61 mmol) de 4-amino-2,6-dicloropiridina (**6**), 71 mg (10% mol) de catalizador tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) ($\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$), 296 mg (2.14 mmol, 3.5 eq) de carbonato de potasio y 388 mg (1.41 mmol, 2.3 eq) de 6-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona (**5**). Tras la adición de los sólidos se adicionaron 4 mL de una mezcla $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (4:1) y se llevó a cabo la reacción mediante calentamiento asistido por microondas durante 50 minutos a 190°C . Se comprobó la ausencia de materia prima (**6**) por ccf y se añadió agua a la mezcla de reacción. La mezcla se transfirió a un matraz bola de una boca de 50 mL y se eliminó el CH_3CN mediante destilación a presión reducida. El precipitado obtenido se aisló mediante filtración al vacío y se lavó con CH_2Cl_2 para obtener 115 mg (rendimiento 49.4%) de un sólido amarillo claro correspondiente al compuesto **7**. Este sólido presentó un R_f de 0.36 (**Sistema I**) y un punto de descomposición de 243.4°C .

RMN ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz, δ ppm): 4.62 (s, 4H, H-1'), 6.17 (s, 2H, $-\text{D}_2\text{O}$, H-8), 6.84 (s, 2H, H-2''), 7.03 (d, $J=8.2$ Hz, 2H, H-5'), 7.57 (d, $J=7.6$ Hz, 2H, H-7'), 10.81 (s, 2H, $-\text{D}_2\text{O}$, H-2').

RMN ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz, δ ppm): 66.95 (C-1'), 103.15 (C-2''), 114.02 (C-5'), 116.14 (C-8'), 121.23 (C-7'), 127.30 (C-6'), 134.34 (C-4'), 143.80 (C-9'), 155.29 (C-1), 156.08 (C-3''), 164.84 (C-2').

11.2.5. *N*-(2,6-dicloropiridin-4-il)benzamidás (11-13)Método general.

En un matraz bola de una boca de 25 mL, equipado con agitador magnético, condensador en posición de reflujo y atmósfera de nitrógeno, se colocaron 100 mg (0.61 mmol) del compuesto (**6**), 2.0 eq del cloruro de acilo correspondiente (**8-10**), 3.2 eq de trietilamina (Et_3N) y 3 mL de DMF. La mezcla de reacción se calentó a 110°C por 24 horas; después de este tiempo se retiró el disolvente a presión reducida. El residuo se disolvió con acetato de etilo y se lavó con solución de NaOH al 20% (pH=10). La fase orgánica se trató con Na_2SO_4 anhidro, se concentró y el sólido resultante se purificó mediante cromatografía en columna (**Sistema III** o **Sistema IV**) obteniendo un sólido correspondiente a las amidás **11-13**.

11.2.5.1. *N*-(2,6-dicloropiridin-4-il)benzamida (**11**)

De 100 mg (0.61 mmol) del compuesto (**6**), 0.14 mL (1.21 mmol, 2.0 eq) de cloruro de benzoílo (**8**), 0.2 mL (1.44 mmol, 2.4 eq) de trietilamina (Et_3N) y 5 mL de CH_3CN se obtuvieron 105 mg (rendimiento 65.5%) de un sólido cristalino beige correspondiente al compuesto **11** con R_f de 0.42 (**Sistema III**) y un pf de 151.9-152.3°C.

RMN ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz, δ ppm): 7.58 (t, $J=7.5$ Hz, 2H, H-3, H-5), 7.66 (dt, $J=2.6$ Hz, 1H, H-4), 7.91 (s, 2H, H-3''), 7.92-7.99 (m, 2H, H-2, H-6), 10.93 (s, 1H, - D_2O , H-8).

11.2.5.2. 3-cloro-*N*-(2,6-dicloropiridin-4-il)benzamida (12)

De 100 mg (0.61 mmol) del compuesto (**6**), 0.12 mL (0.94 mmol, 1.5 eq) de cloruro de 3-clorobenzoílo (**9**), 0.27 mL (1.95 mmol, 3.2 eq) de trietilamina (Et₃N) y 3 mL de DMF se obtuvieron 37 mg (rendimiento 20%) de un sólido correspondiente al compuesto **12**. Debido al bajo rendimiento el punto de fusión no pudo ser determinado, se observó un R_f de 0.60 (**Sistema III**).

RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz, δ ppm): 7.61 (t, *J*=7.9 Hz, 1H, H-5), 7.74 (ddd, *J*=8.0, 2.1, 1.0 Hz, 1H, H-6), 7.88 (s, 2H, H-2''), 7.89 (m, 1H, H-4), 8.01 (t, *J*= 1.8 Hz, 1H, H-2), 11.01 (s, -D₂O, 1H,H-8).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz, δ ppm): 112.90 (C-2''), 116.04 (d, *J*=22.1 Hz, C-3, C-5), 130.07 (d, *J*=2.9 Hz, C-1), 131.18 (d, *J*=9.4 Hz, C-2, C-6), 150.03 (C-1'), 150.56 (C-3''), 164.97 (d, *J*=250.9 Hz, C-4), 165.95 (C-7).

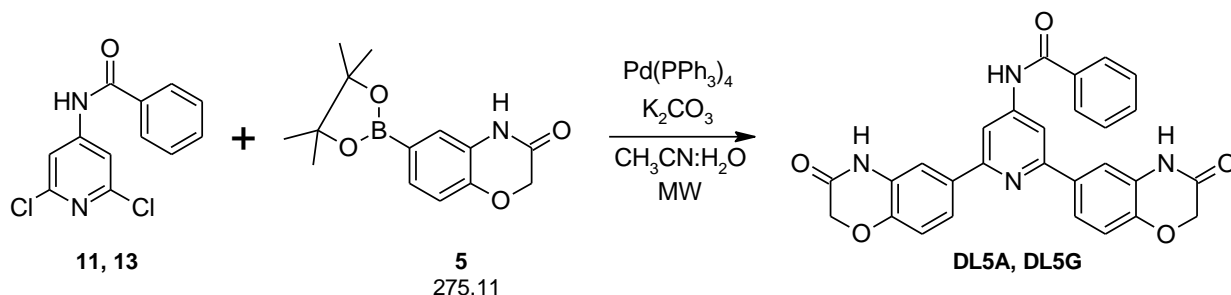
11.2.5.3. 4-fluoro-*N*-(2,6-dicloropiridin-4-il)benzamida (13)

De 100 mg (0.61 mmol) del compuesto (**6**), 0.10 mL (0.85 mmol, 1.4 eq) de cloruro de 4-fluorobenzoílo (**10**), 0.27 mL (1.95 mmol, 3.2 eq) de trietilamina (Et₃N) y 3 mL de DMF se obtuvieron 87 mg (rendimiento 49.7%) de un sólido correspondiente al compuesto **13**. El compuesto presentó un R_f de 0.57 (**Sistema III**) y un pf de 164.8-165.7°C.

RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz, δ ppm): 7.43 (t, *J* = 8.9 Hz, 2H, H-3, H-5), 7.89 (s, 2H, H-3''), 8.04 (dd, *J* = 8.9, 5.4 Hz, 2H, H-2, H-6), 10.93 (s, 1H, -D₂O, H-8).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz, δ ppm): 11 (C-2''), 127.0 (C-2), 127.83 (C-6), 130.9 (C-3), 132.66 (C-4), 133.58 (C-5), 135.45 (C-1), 149.86 (C-1'), 165.43 (C-7).

11.2.6. *N*-(2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-6-il)piridin-4-il)benzamidias (DL5A, DL5G)



Método general.

En un vial para microondas de 10 mL equipado con agitador magnético se colocaron 100 mg de la amida correspondiente, 2.5 eq de K_2CO_3 , 10% mol de catalizador tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) ($\text{Pd(PPh}_3)_4$), y 2.1 eq de 6-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona (**5**). Tras la adición de los sólidos se adicionaron 5 mL de una mezcla $\text{CH}_3\text{CN:H}_2\text{O}$ (4:1) y se llevó a cabo la reacción en microondas por 50 minutos a 190°C. Se comprobó la ausencia de materia prima (**6**) por ccf y se añadió agua a la mezcla de reacción. La mezcla se transfirió a un matraz bola de una boca de 50 mL y se eliminó el CH_3CN mediante destilación a presión reducida. El precipitado obtenido se aisló mediante filtración al vacío y el residuo se lavó con CH_2Cl_2 para obtener un sólido correspondiente a los compuestos finales **DL5A** o **DL5G**. Los compuestos se purificaron por cromatografía en columna (**Sistema IV**).

11.2.6.1. *N*-(2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-6-il)piridin-4-il)benzamida (DL5A)

De 100 mg (0.37 mmol) de **11**, 130 mg (0.95 mmol, 2.5 eq) de K_2CO_3 , 43 mg (10% mol) de catalizador tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) ($\text{Pd(PPh}_3)_4$), y 220 mg (0.8 mmol, 2.2 eq) de **5** se obtuvieron 120 mg (rendimiento 61%) de un sólido correspondiente a **DL5A** con *R_f* de 0.81 (**Sistema V**) y un punto de descomposición igual a 281.4°C.

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ ppm): 4.65 (s, 4H, H-1'), 7.11 (d, $J=8.3$ Hz, 2H, H-8'), 7.57-7.61 (m, 3H, H-3, H-4, H-5), 7.69 (dd, $J=8.3, 2.1$ Hz, 2H, H-7'), 7.72 (d, $J=2.0$ Hz, 2H, H-5'), 8.02-8.04 (m, 2H, H-6), 8.23 (s, 2H, H-2''), 10.74 (s, $-\text{D}_2\text{O}$, 1H, H-8), 10.88 (s, $-\text{D}_2\text{O}$, 2H, H-3').

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz, δ ppm): 66.88 (C-1'), 108.21 (C-2''), 114.11 (C-5'), 116.48 (C-8'), 121.47 (C-7'), 127.61 (C-4'), 127.92 (C-2, C-6), 128.65 (C-3, C-5), 132.30 (C-4), 133.42 (C-4'), 134.26 (C-1), 144.53 (C-9'), 148.10 (C-3''), 155.94 (C-1'), 164.75 (C-2'), 166.65 (C-7).

11.2.6.2. 4-fluoro-*N*-(2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-6-il)piridin-4-il)benzamida (DL5G)

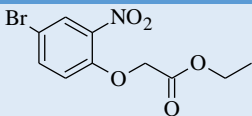
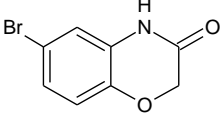
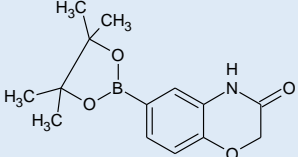
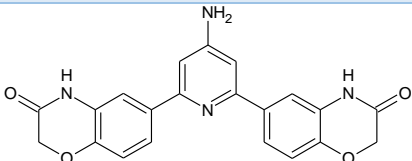
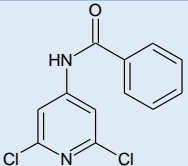
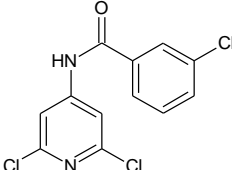
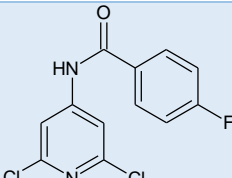
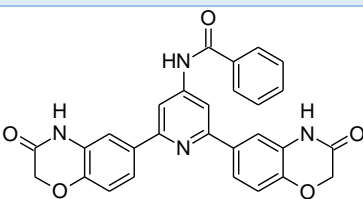
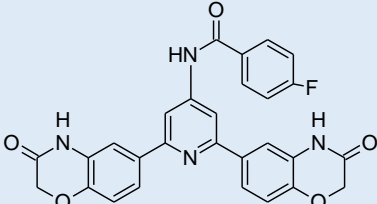
De 100 mg (0.35 mmol) de la amida **13**, 130 mg (0.95 mmol, 2.7 eq) de K_2CO_3 , 40 mg (10% mol) de catalizador tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) ($\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$), y 220 mg (0.8 mmol, 2.3 eq) del compuesto **5** se obtuvieron 84 mg (rendimiento 41%) de un sólido correspondiente a **DL5G**. El R_f encontrado para el compuesto fue de 0.70 (**Sistema V**) y un punto de descomposición igual a 261.5°C .

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ ppm): 4.63 (s, 4H, H-1'), 7.09 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, H-8'), 7.40 (t, $J=8.9$ Hz, 2H, H-3, H-5), 7.67 (dd, $J=8.4, 2.1$ Hz, 2H, H-7'), 7.71 (d, $J=2.1$ Hz, 2H, H-5'), 8.08 (dd, $J=8.9, 5.4$ Hz, 2H, H-2, H-6), 8.16 (s, $-\text{D}_2\text{O}$, 2H, H-2''), 10.73 (s, $-\text{D}_2\text{O}$, 1H, H-8), 10.86 (s, $-\text{D}_2\text{O}$, 2H, H-3').

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz, δ ppm): 67.08 (C-1'), 108.48 (C-2''), 114.36 (C-5'), 115.94 (d, $J=21.9$ Hz, C-3, C-5), 116.77 (C-8'), 121.87 (C-7'), 127.63 (C-4'), 130.83 (d, $J=2.9$ Hz, C-1), 130.99 (d, $J=9.2$ Hz, C-2, C-6), 133.63 (C-6'), 144.57 (C-9'), 148.08 (C-3''), 156.21 (C-1''), 164.76 (d, $J=250.2$ Hz, C-4), 165.05 (C-2'), 165.81 (C-7).

11.3. Constantes físicas y rendimiento de los compuestos obtenidos

Tabla I-2. Rf, pf y %rendimiento de los compuestos sintetizados.

Clave	Estructura	pf [°C]	Rf	%rendimiento
3		68.6-69.4	0.30 (Sistema I)	99.7
4		222.7-223.5	0.23 (Sistema I)	61.1
5		177.1-180.2	0.41 (Sistema I)	67.4
7		Descompone a 243.4	0.36 (Sistema I)	49.4
11		151.9-152.3	0.42 (Sistema III)	65.5
12		ND	0.60 (Sistema III)	20.0
13		164.8-165.7	0.57 (Sistema III)	49.7
DL5A		Descompone a 281.4	0.81 (Sistema V)	61.0
DL5G		Descompone a 261.5	0.70 (Sistema V)	41.0

12. ANEXO II. ESPECTROS

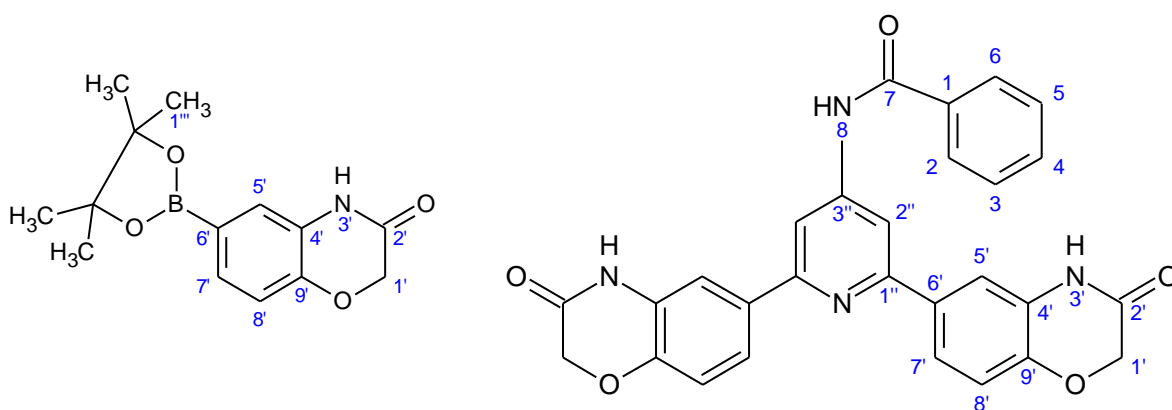
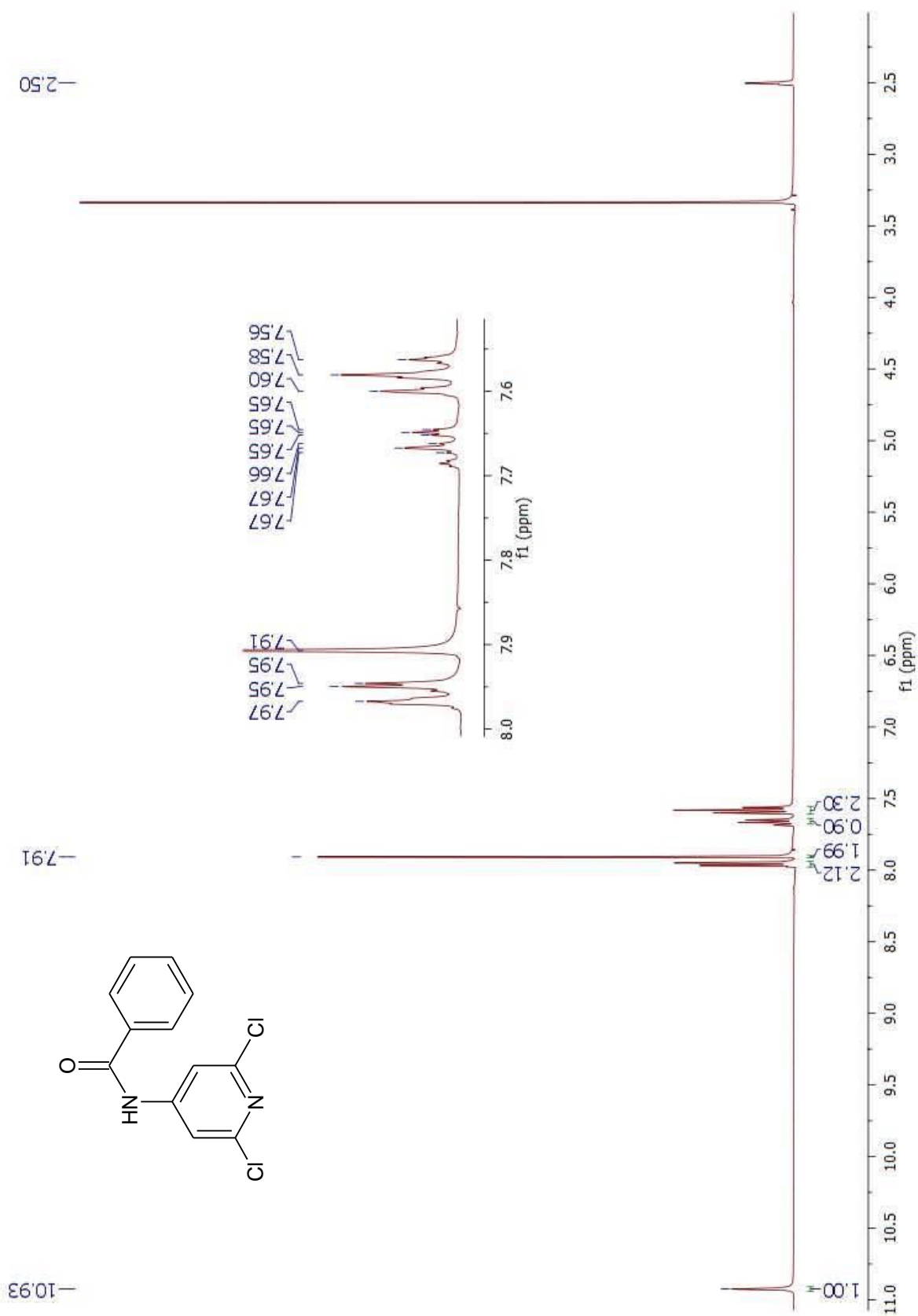
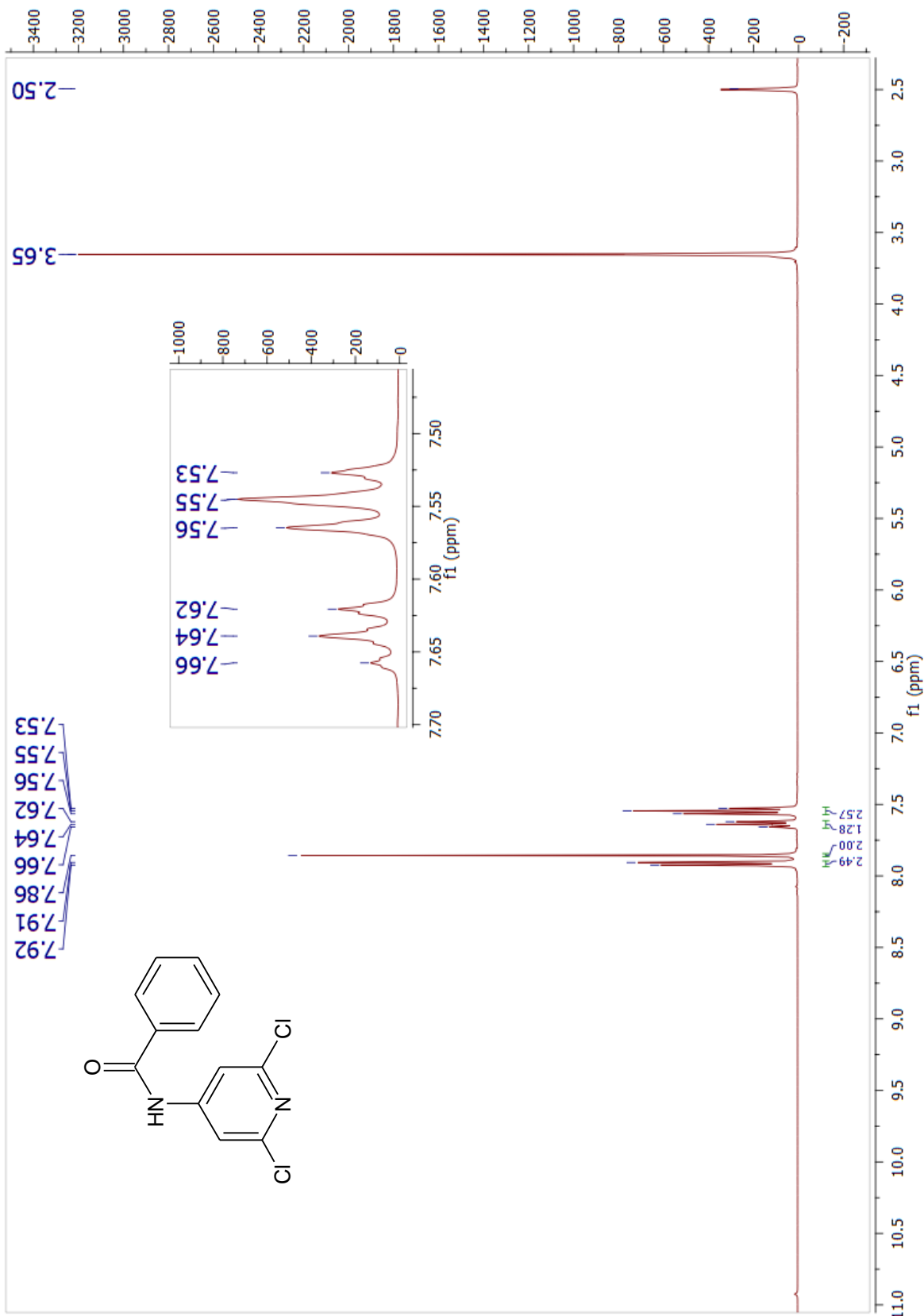


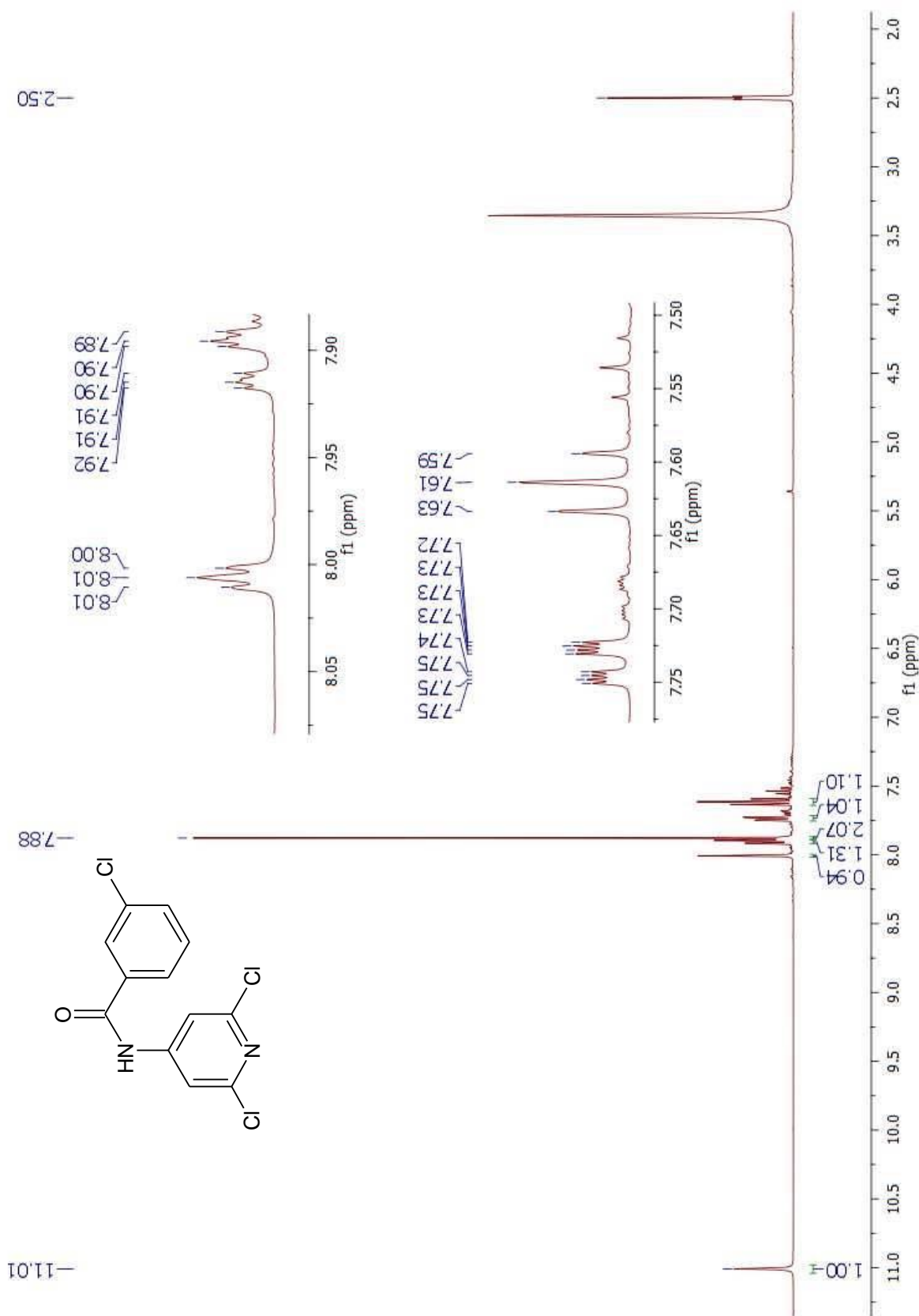
Figura II-1. Numeración arbitraria dada a los compuestos para la asignación de señales en los espectros de RMN.



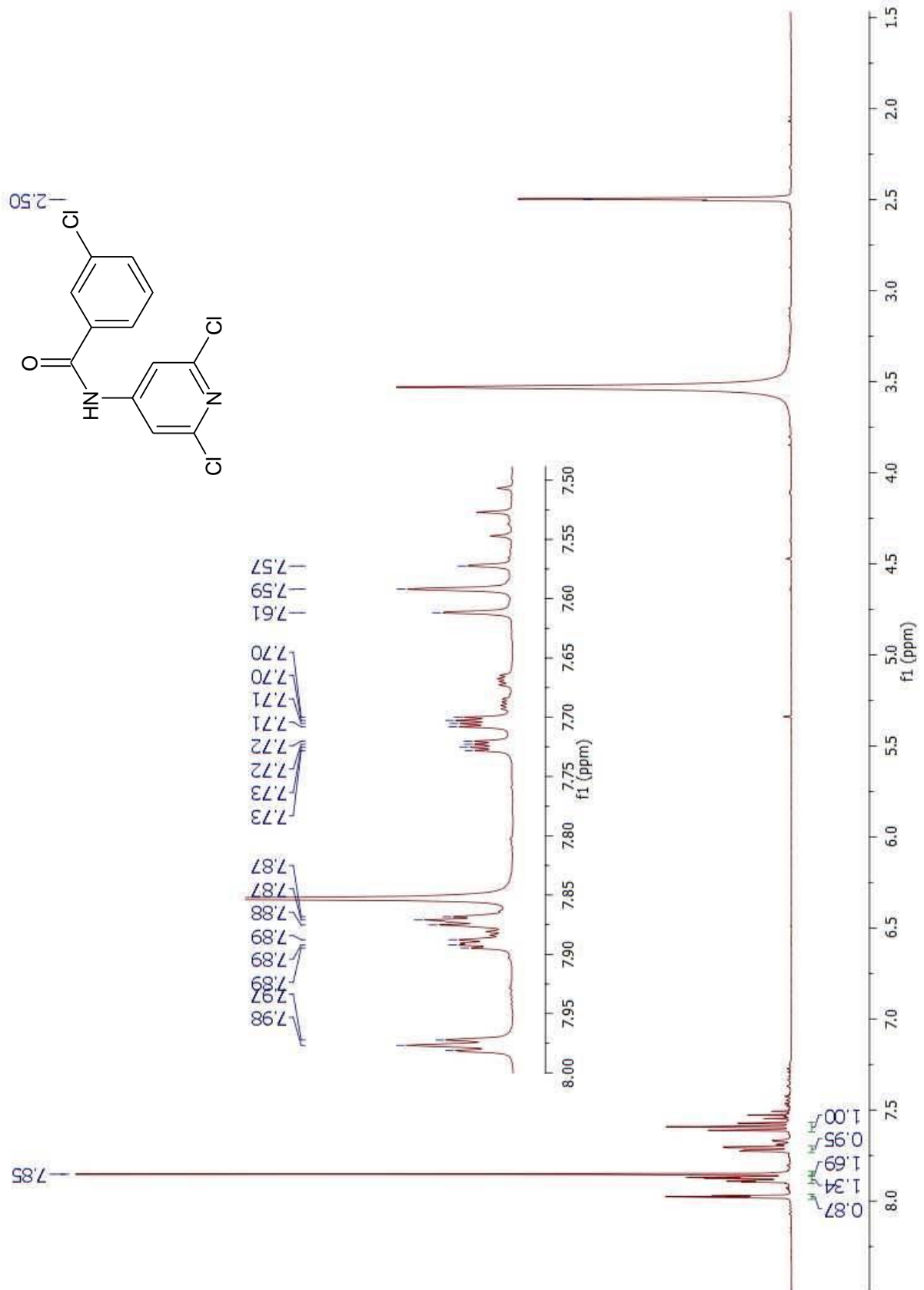
Espectro 1. RMN ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz, δ en ppm) del compuesto *N*-(2,6-dicloropiridin-4-il)benzamida (**11**).



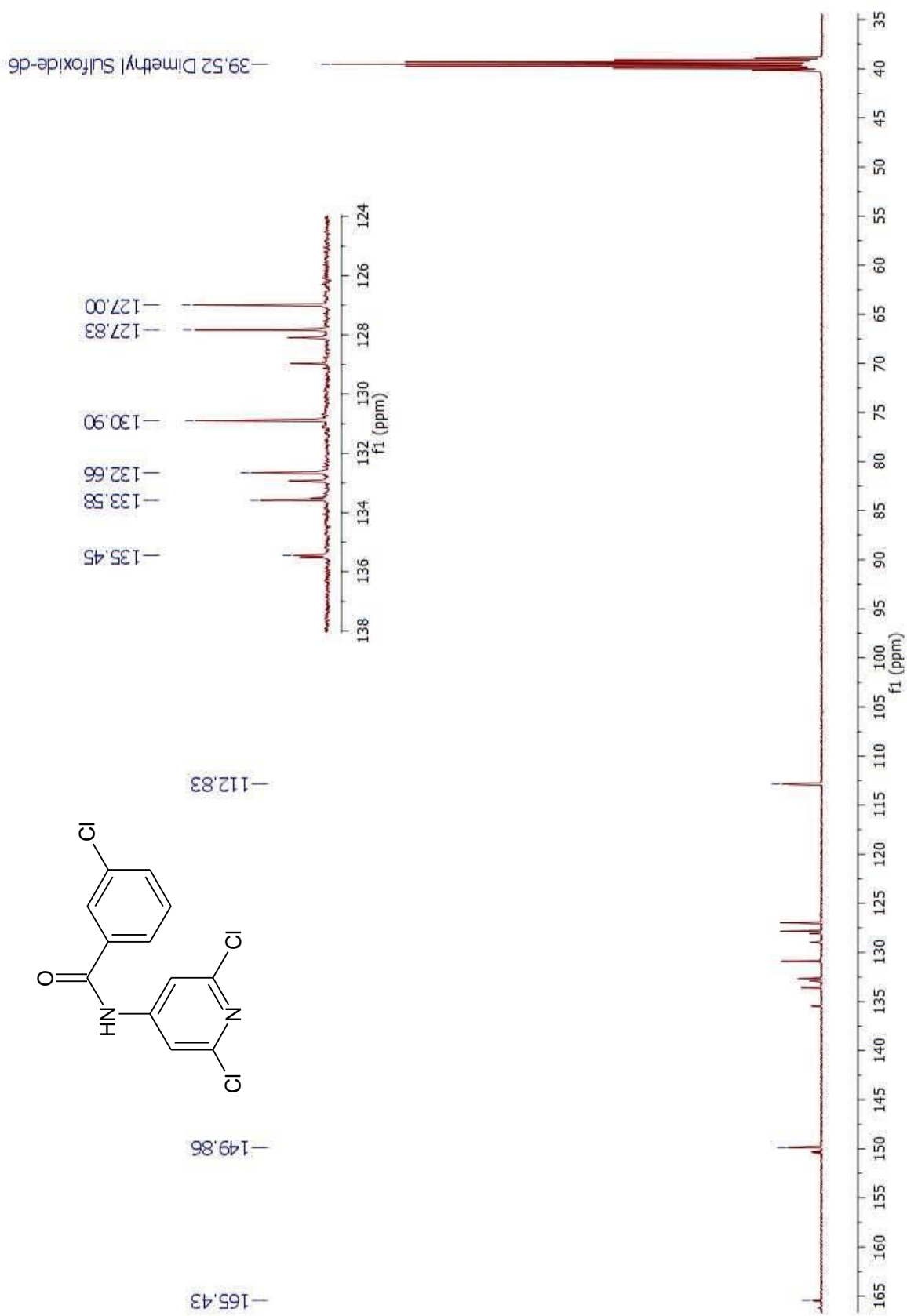
Espectro 2. RMN ^1H (DMSO- d_6 , D_2O , 400 MHz, δ en ppm) del compuesto *N*-(2,6-dicloropiridin-4-il)benzamida (11).



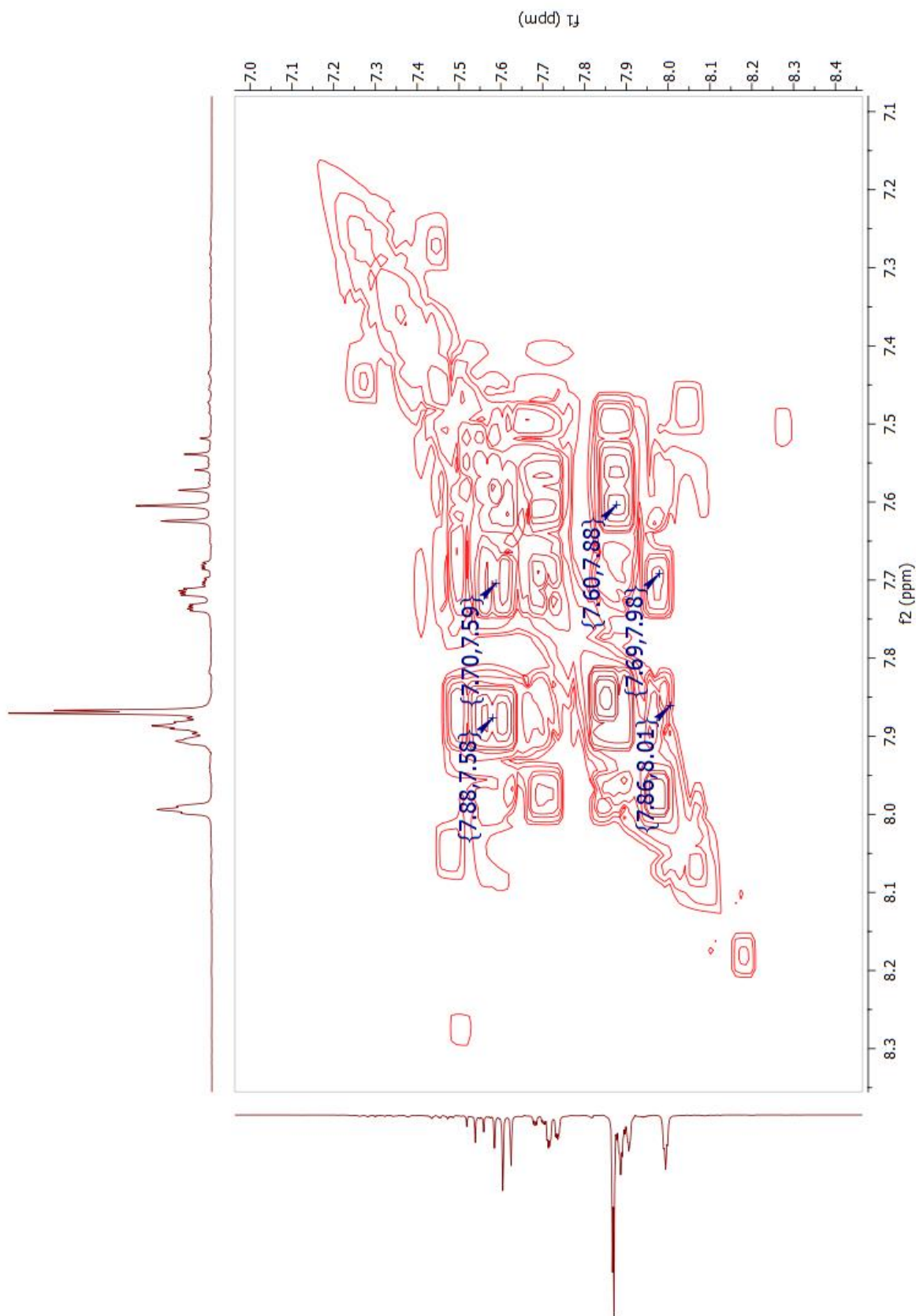
Espectro 3. RMN ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz, δ en ppm) del compuesto 3-cloro-N-(2,6-dicloropiridin-4-il)benzamida (**12**).



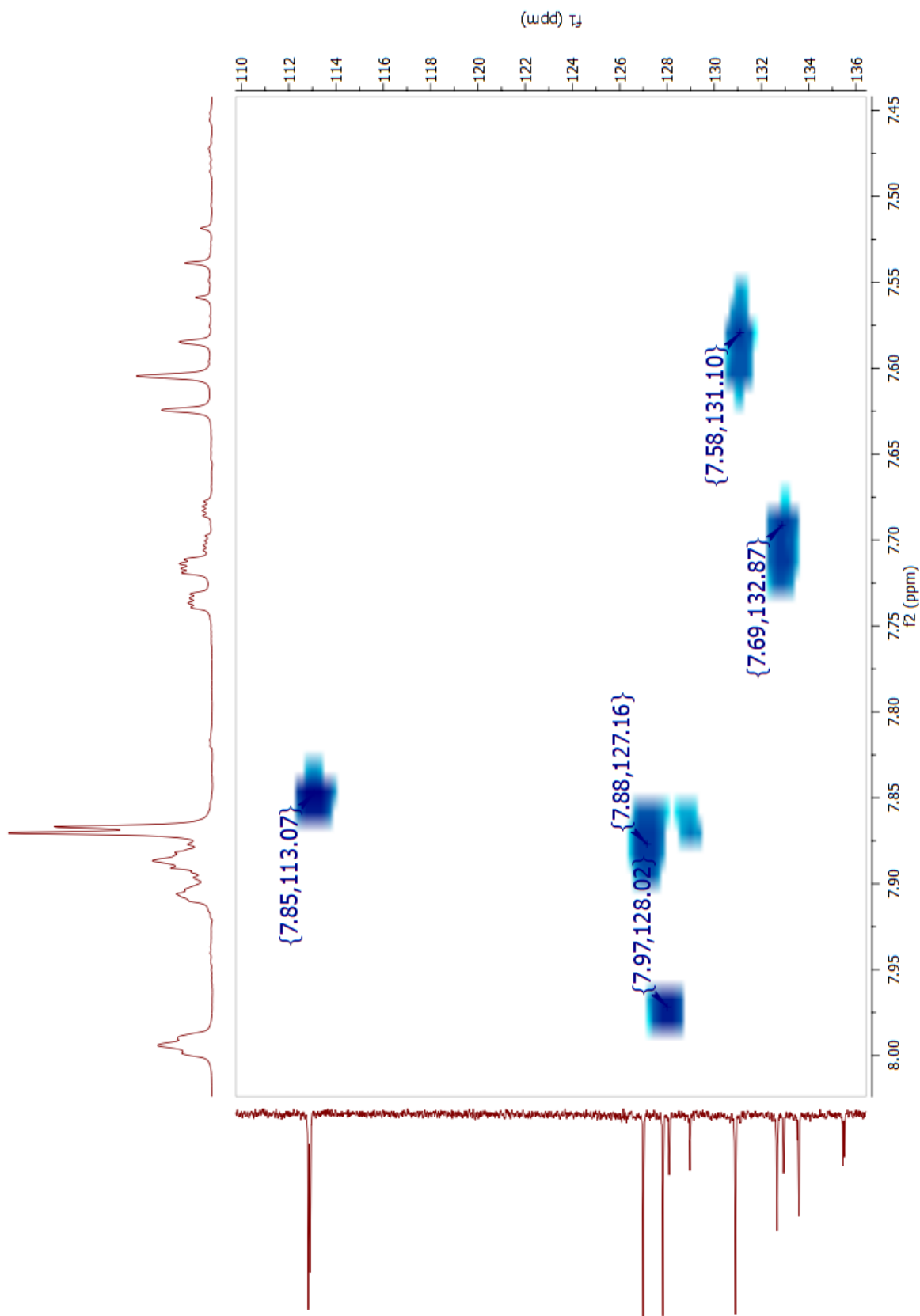
Espectro 4. RMN ¹H (DMSO-d₆, D₂O, 400 MHz, δ en ppm) del compuesto 3-cloro-N-(2,6-dicloropiridin-4-il)benzamida (**12**).



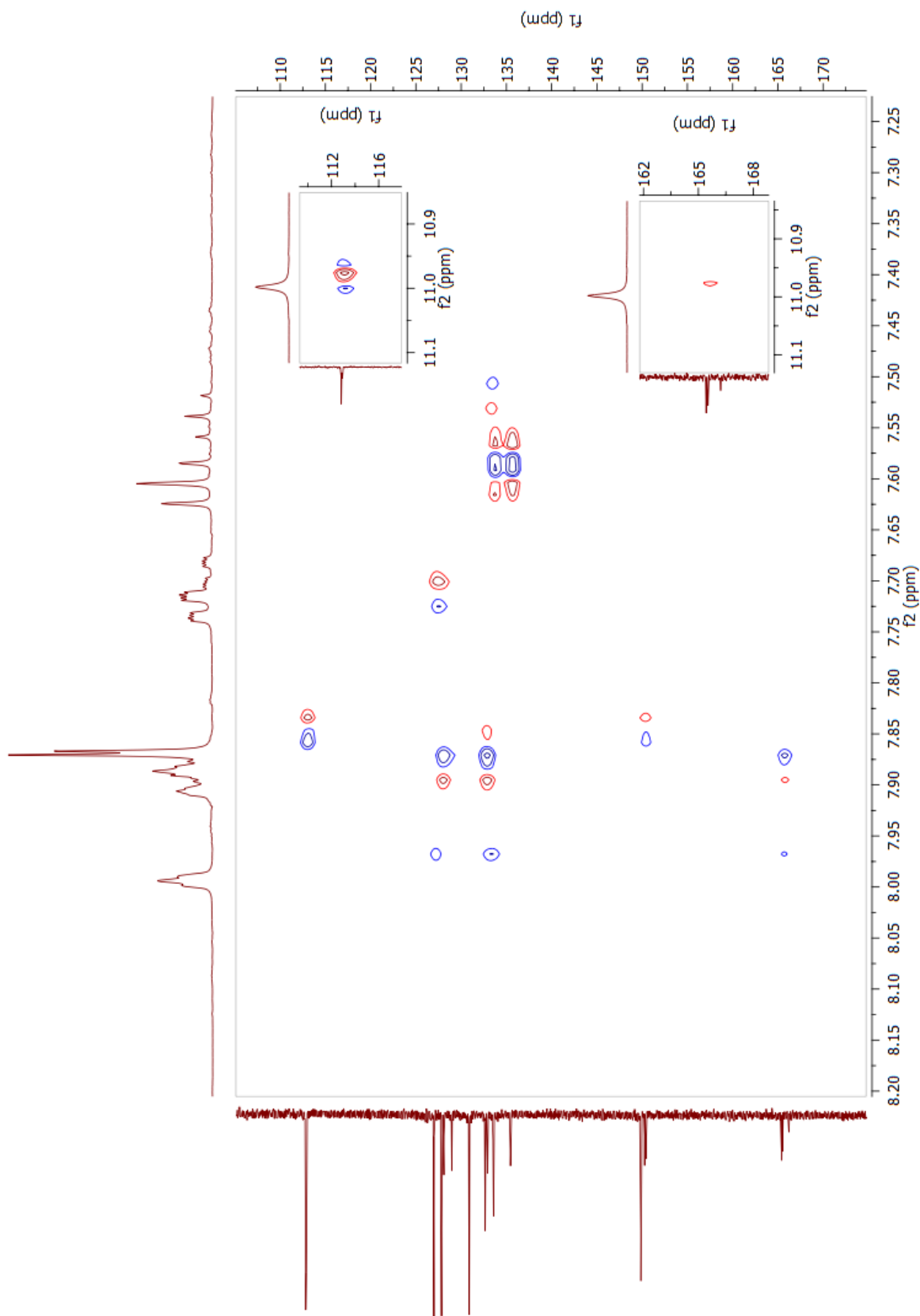
Espectro 5. RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz, δ en ppm) del compuesto 3-cloro-*N*-(2,6-dicloropiridin-4-il)benzamida (**12**).



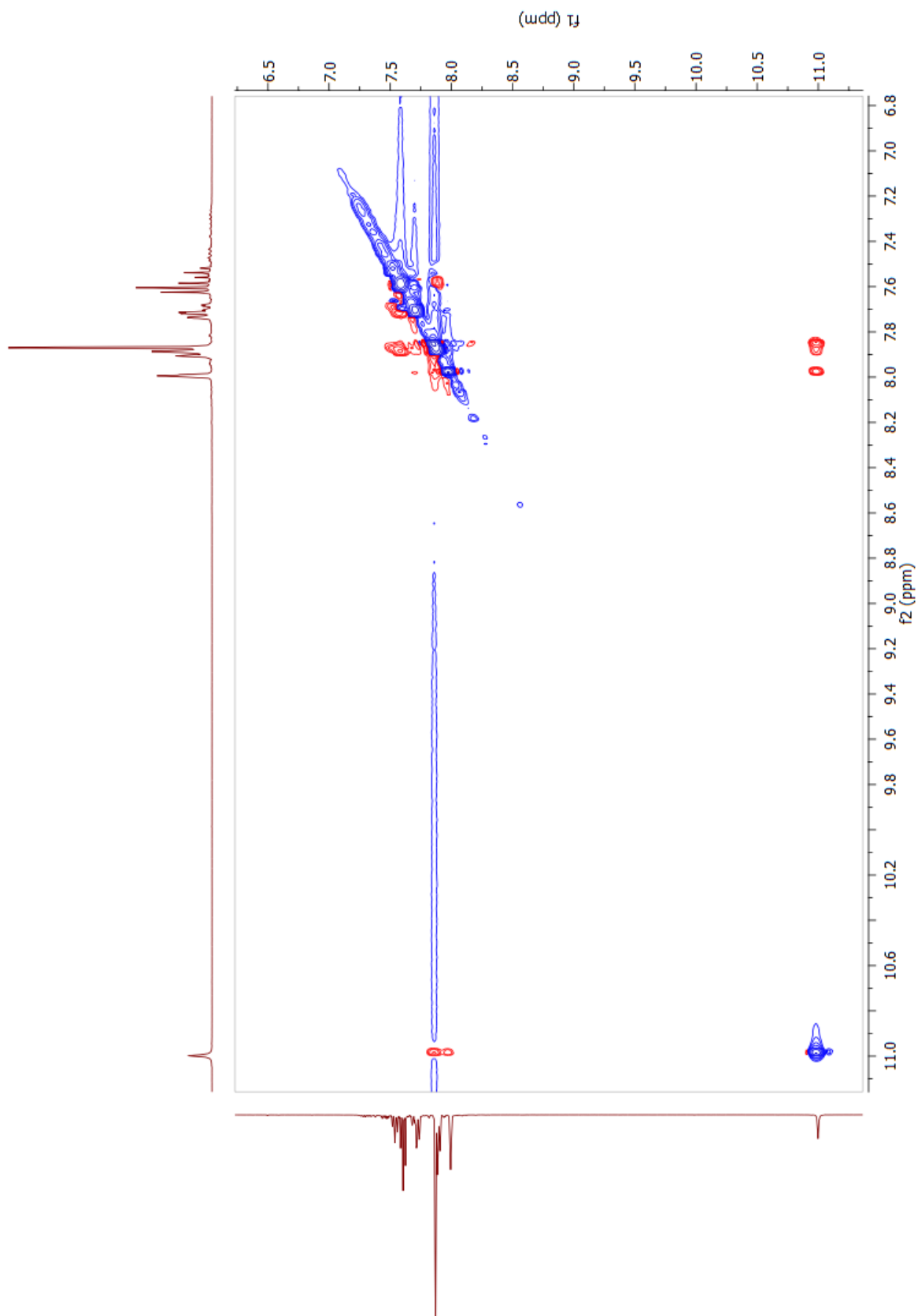
Espectro 6. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, D₂O, 400 MHz, δ en ppm). Experimento COSY del compuesto 3-cloro-*N*-(2,6-dicloropiridin-4-il)benzamida (**12**).



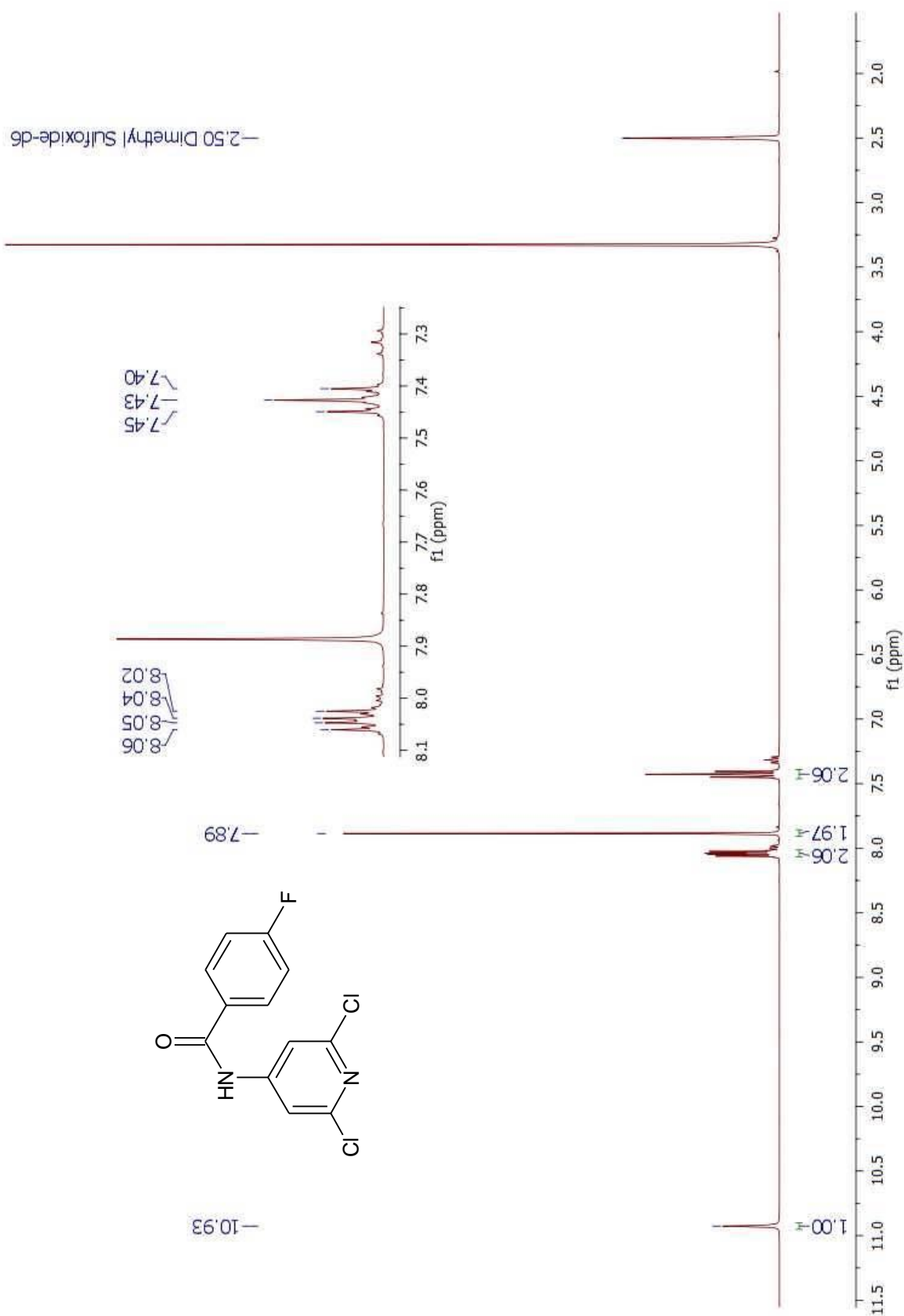
Espectro 7. RMN ^1H (DMSO- d_6 , D_2O , 400 MHz, δ en ppm), RMN ^{13}C (DMSO, 100 MHz, δ en ppm). Experimento HSQC del compuesto 3-cloro-*N*-(2,6-dicloropiridin-4-il)benzamida (**12**).



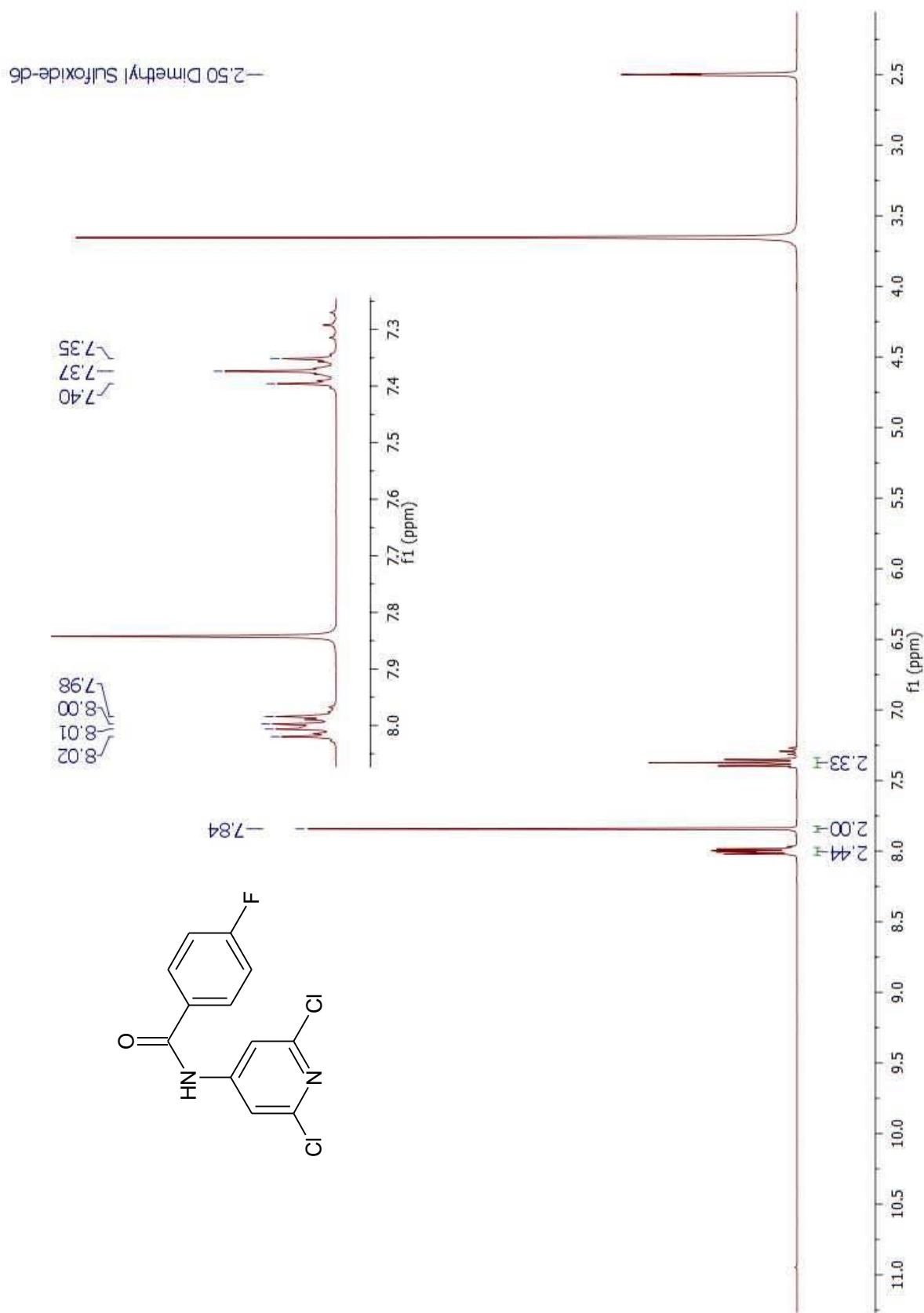
Espectro 8. RMN ^1H (DMSO- d_6 , D_2O , 400 MHz, δ en ppm), RMN ^{13}C (DMSO, 100 MHz, δ en ppm). Experimento HMBC del compuesto 3-cloro-*N*-(2,6-dicloropiridin-4-il)benzamida (**12**).



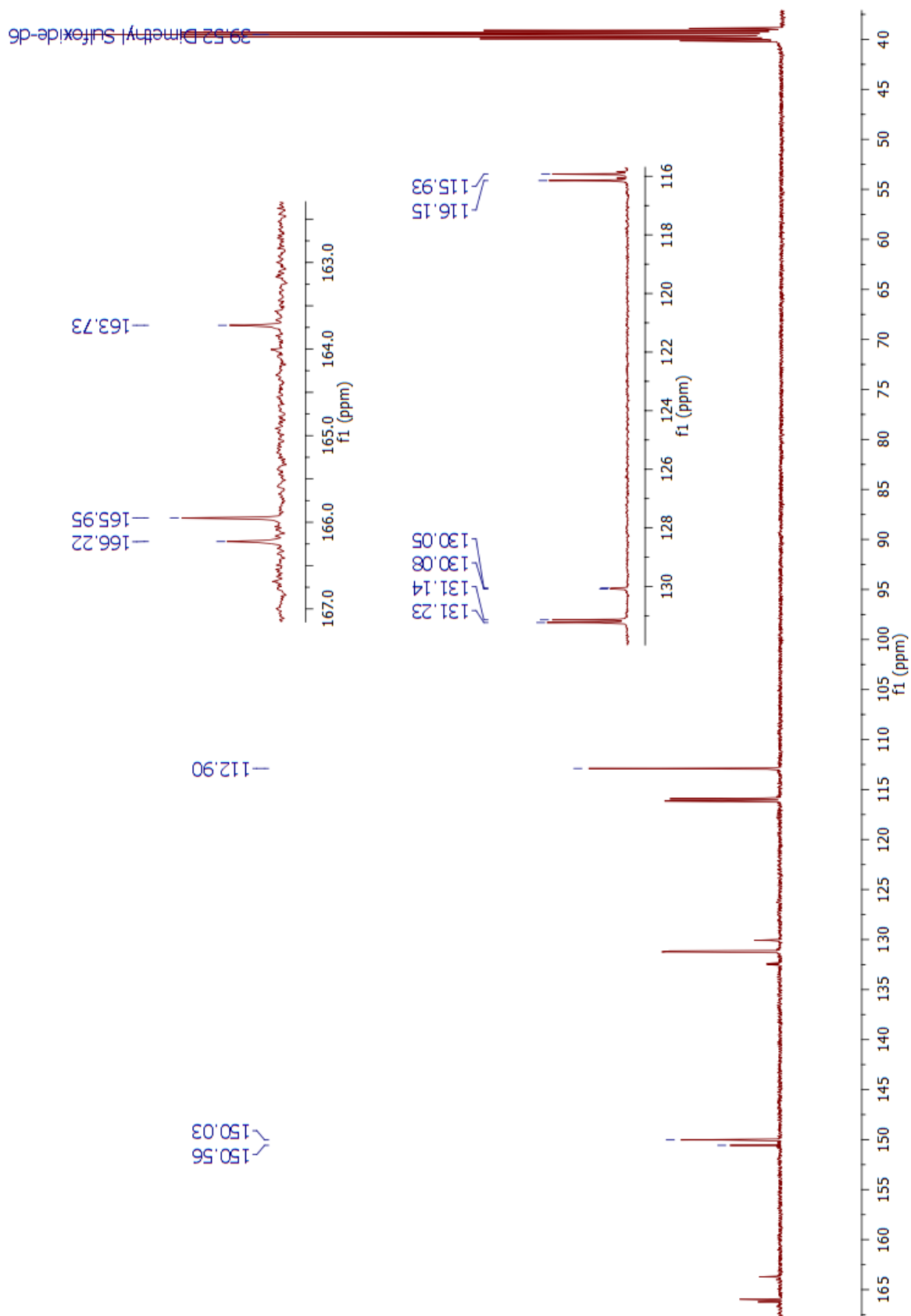
Espectro 9. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, D₂O, 400 MHz, δ en ppm). Experimento NOESY del compuesto 3-cloro-*N*-(2,6-dicloropiridin-4-il)benzamida (**12**).



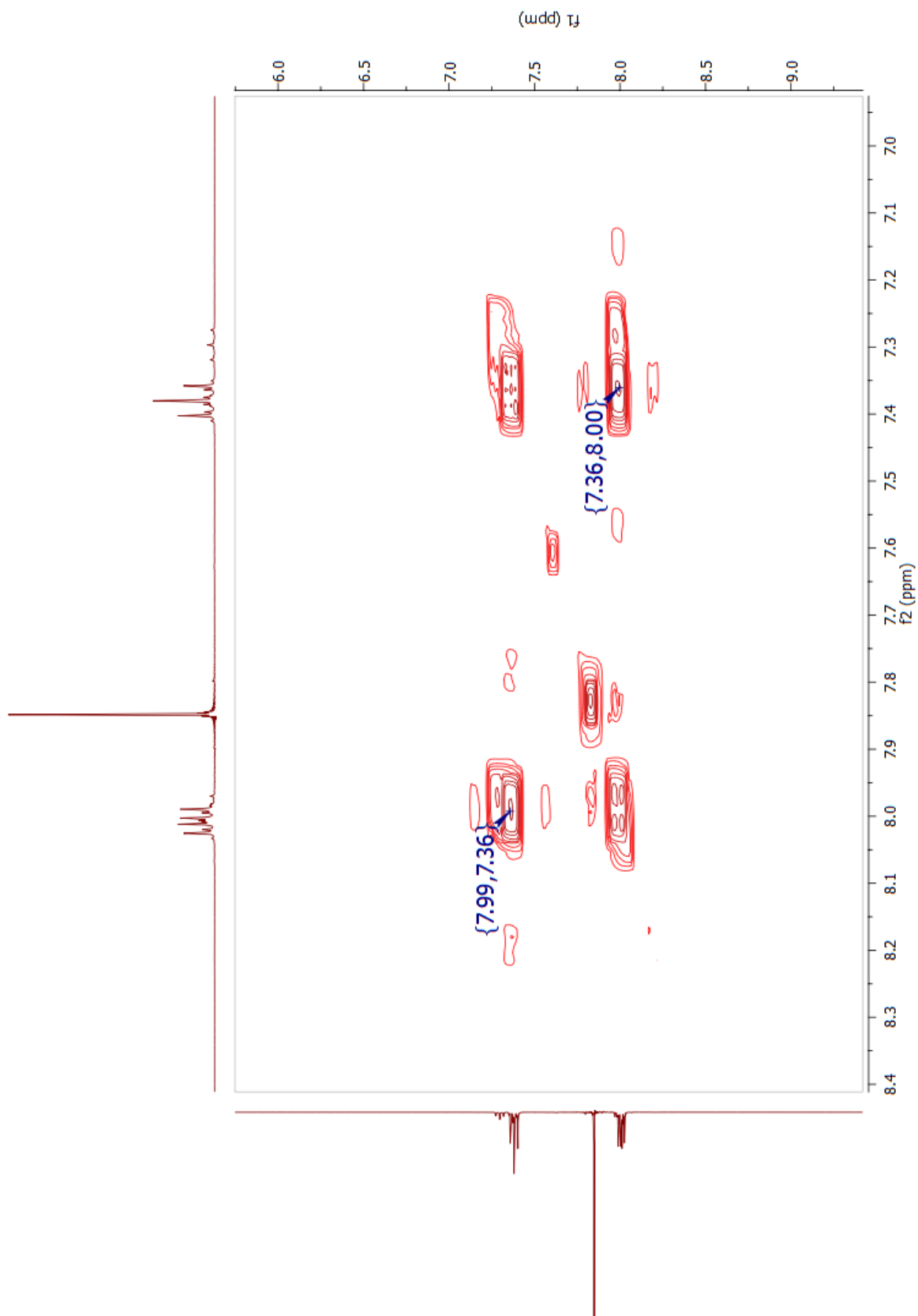
Espectro 10. RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz, δ en ppm) del compuesto 4-fluoro-*N*-(2,6-dicloropiridin-4-il)benzamida (**13**).



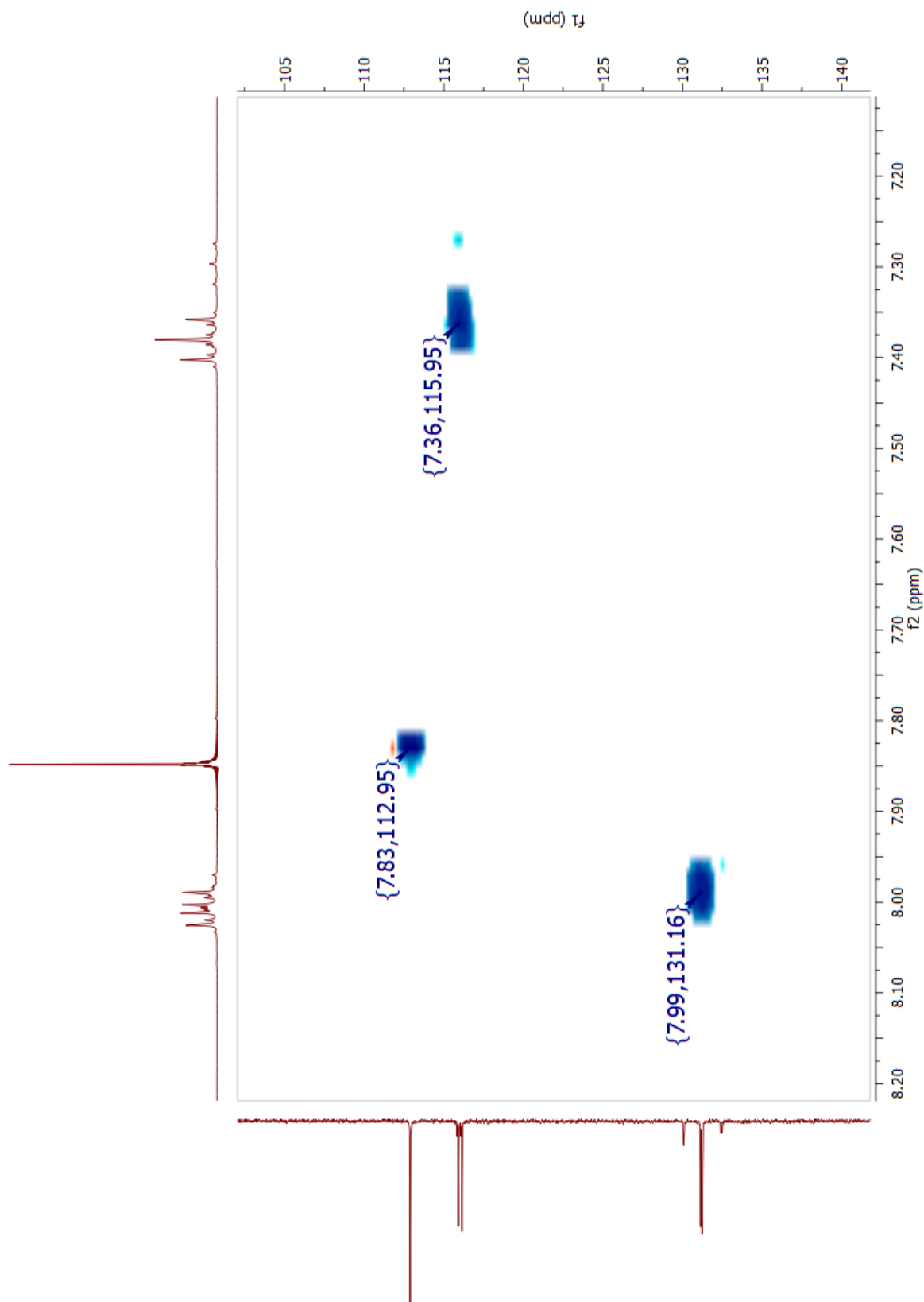
Espectro 11. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, D₂O, 400 MHz, δ en ppm) del compuesto 4-fluoro-*N*-(2,6-dicloropiridin-4-il)benzamida (**13**).



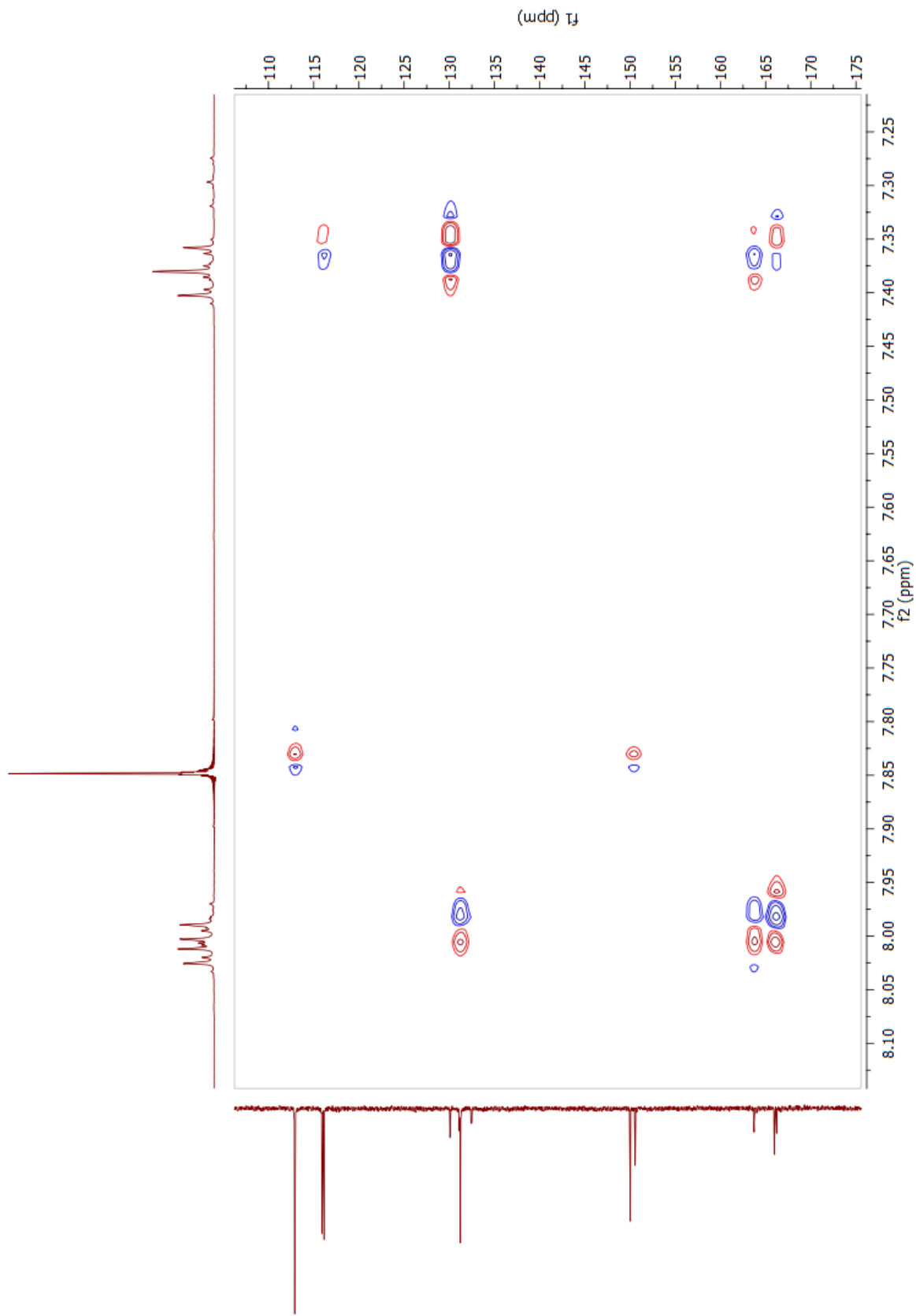
Espectro 12. RMN ^{13}C ($\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz, δ en ppm) del compuesto 4-fluoro-*N*-(2,6-dicloropiridin-4-il)benzamida (13).



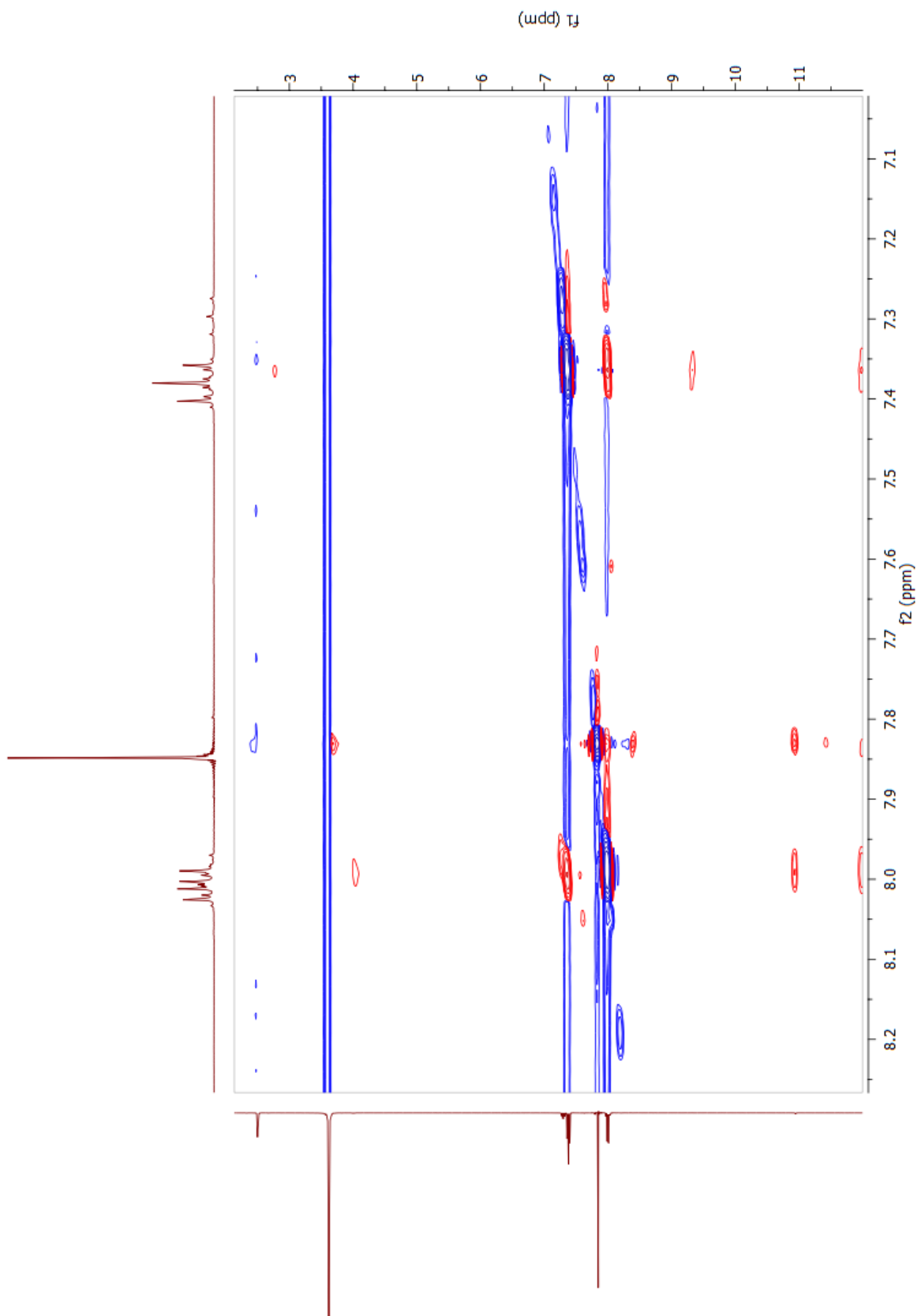
Espectro 13. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, D₂O, 400 MHz, δ en ppm). Experimento COSY del compuesto 4-fluoro-*N*-(2,6-dicloropiridin-4-il)benzamida (**13**).



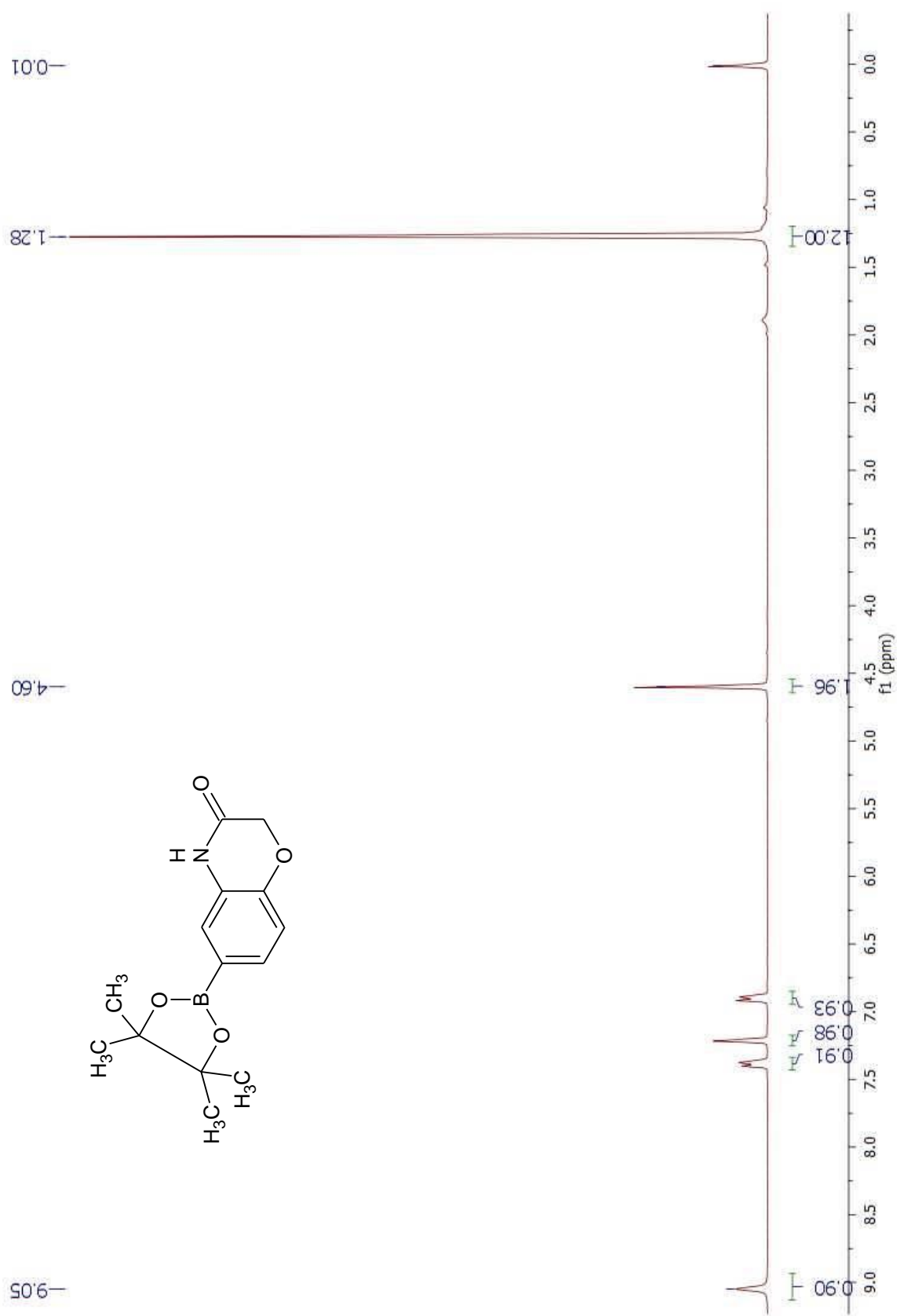
Espectro 14. RMN ^1H (DMSO- d_6 , D $_2$ O, 400 MHz, δ en ppm), RMN ^{13}C (DMSO, 100 MHz, δ en ppm). Experimento HSQC del compuesto 4-fluoro-*N*-(2,6-dicloropiridin-4-il)benzamida (**13**).



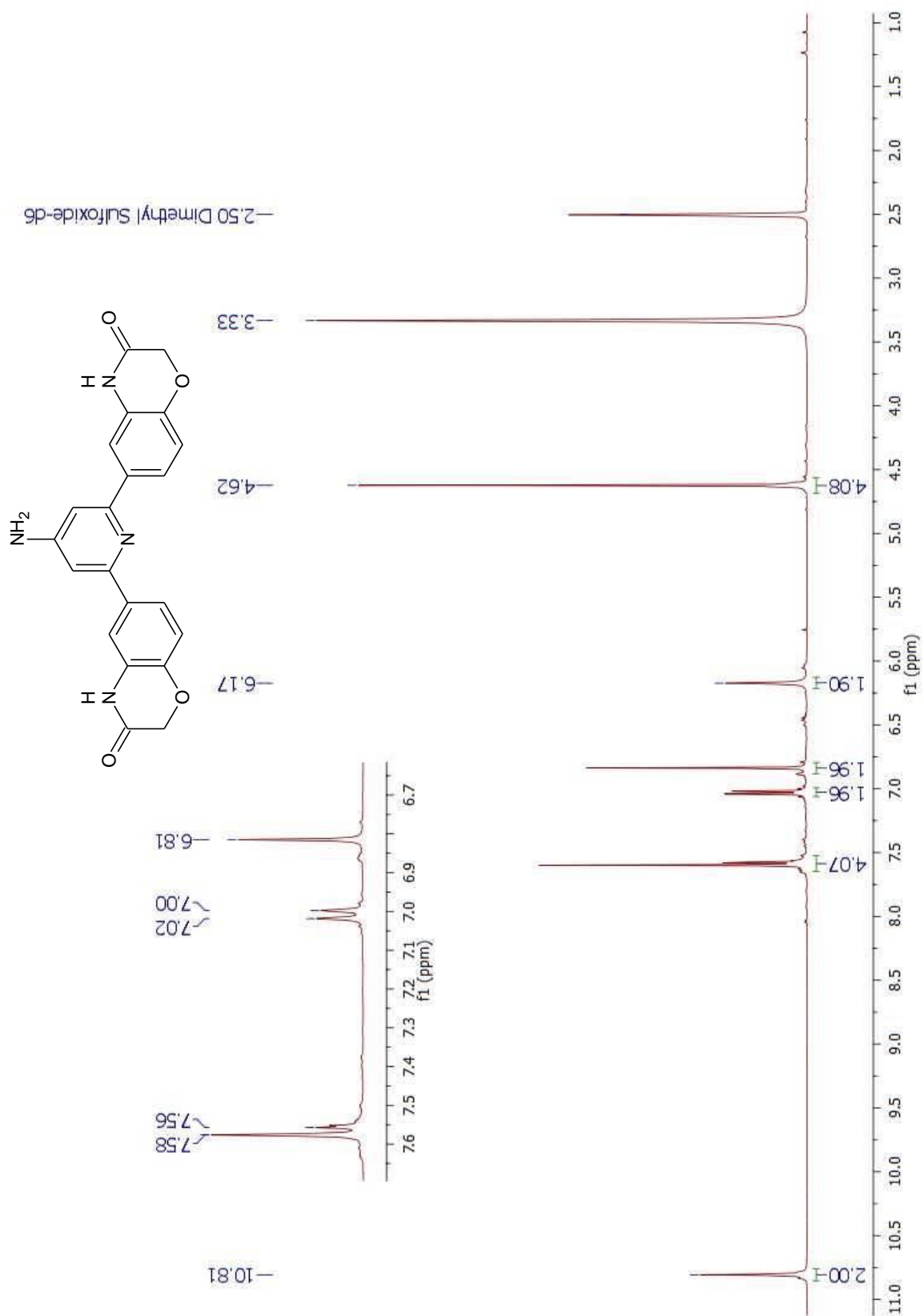
Espectro 15. RMN ^1H (DMSO- d_6 , D_2O , 400 MHz, δ en ppm), RMN ^{13}C (DMSO, 100 MHz, δ en ppm). Experimento HMBC del compuesto 4-fluoro-*N*-(2,6-dicloropiridin-4-il)benzamida (**13**).



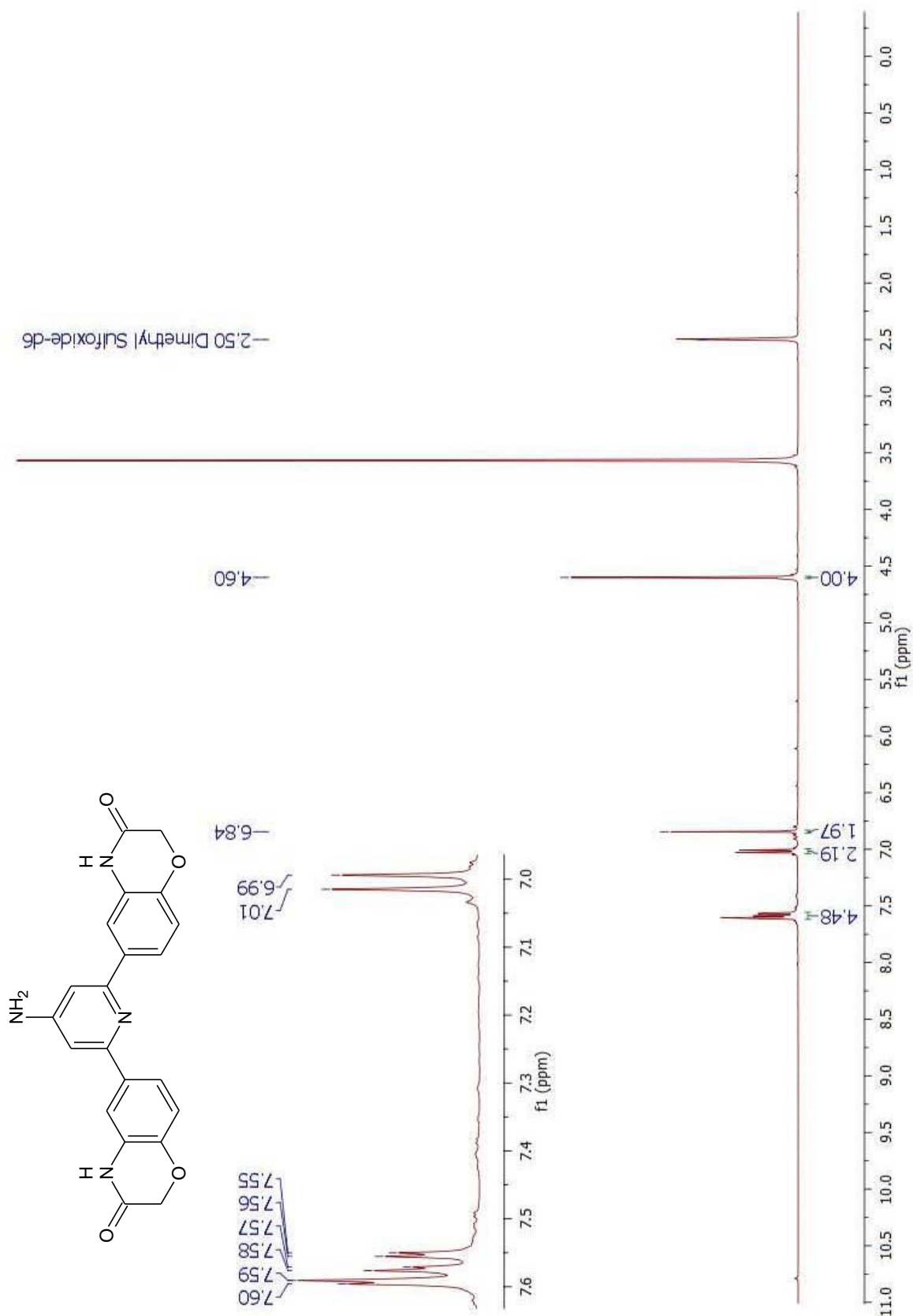
Espectro 16. RMN ^1H (DMSO- d_6 , D_2O , 400 MHz, δ en ppm). Experimento NOESY del compuesto 4-fluoro-*N*-(2,6-dicloropiridin-4-il)benzamida (**13**).



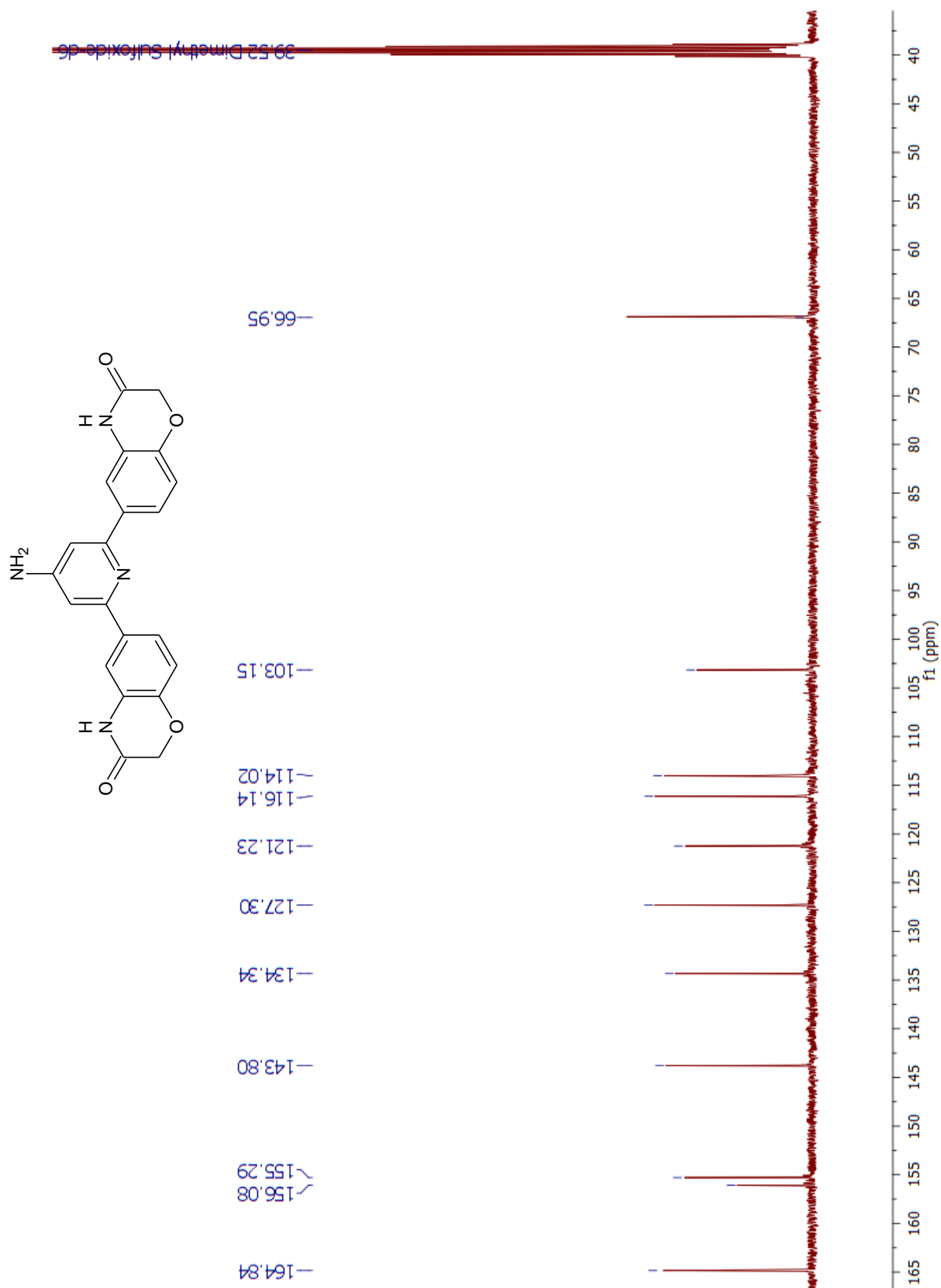
Espectro 17. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz, δ en ppm) del compuesto 6-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona (5).



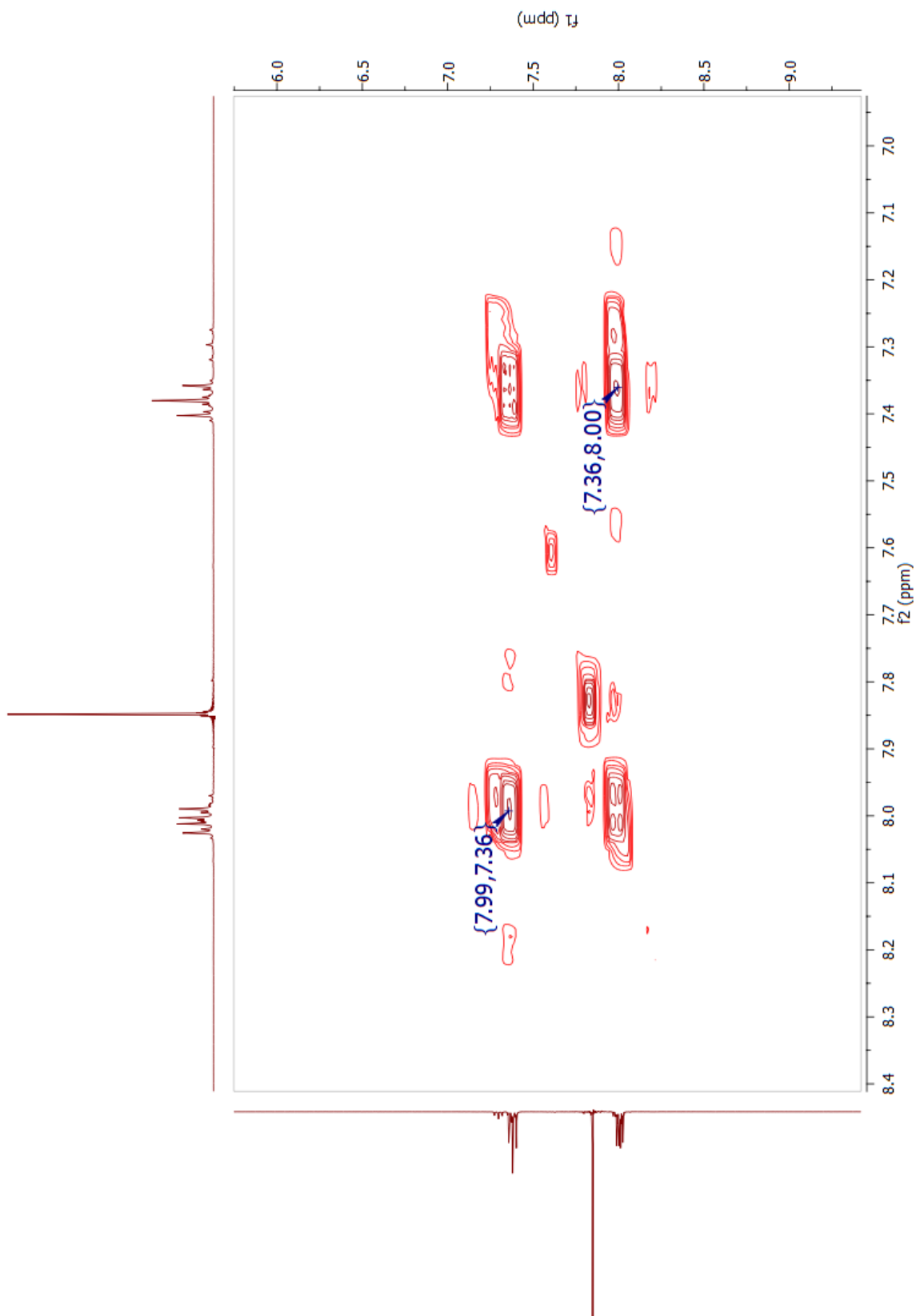
Espectro 18. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz, δ en ppm) del compuesto 6,6'-(4-aminopiridin-2,6-diil)bis(2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-ona) (**7**).



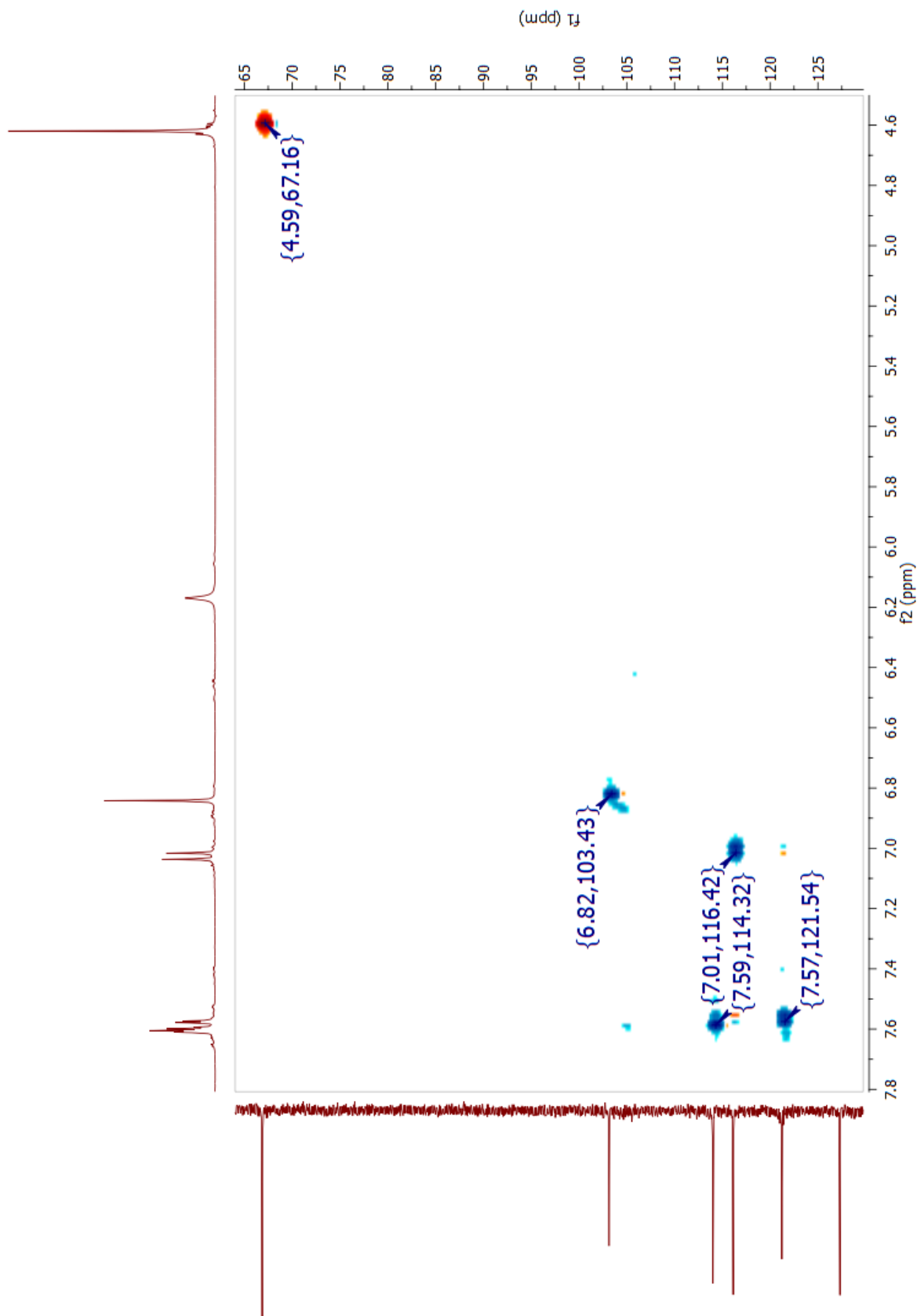
Espectro 19. RMN ¹H (DMSO-d₆, D₂O, 400 MHz, δ en ppm) del compuesto 6,6'-(4-aminopiridin-2,6-diil)bis(2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona) (7).



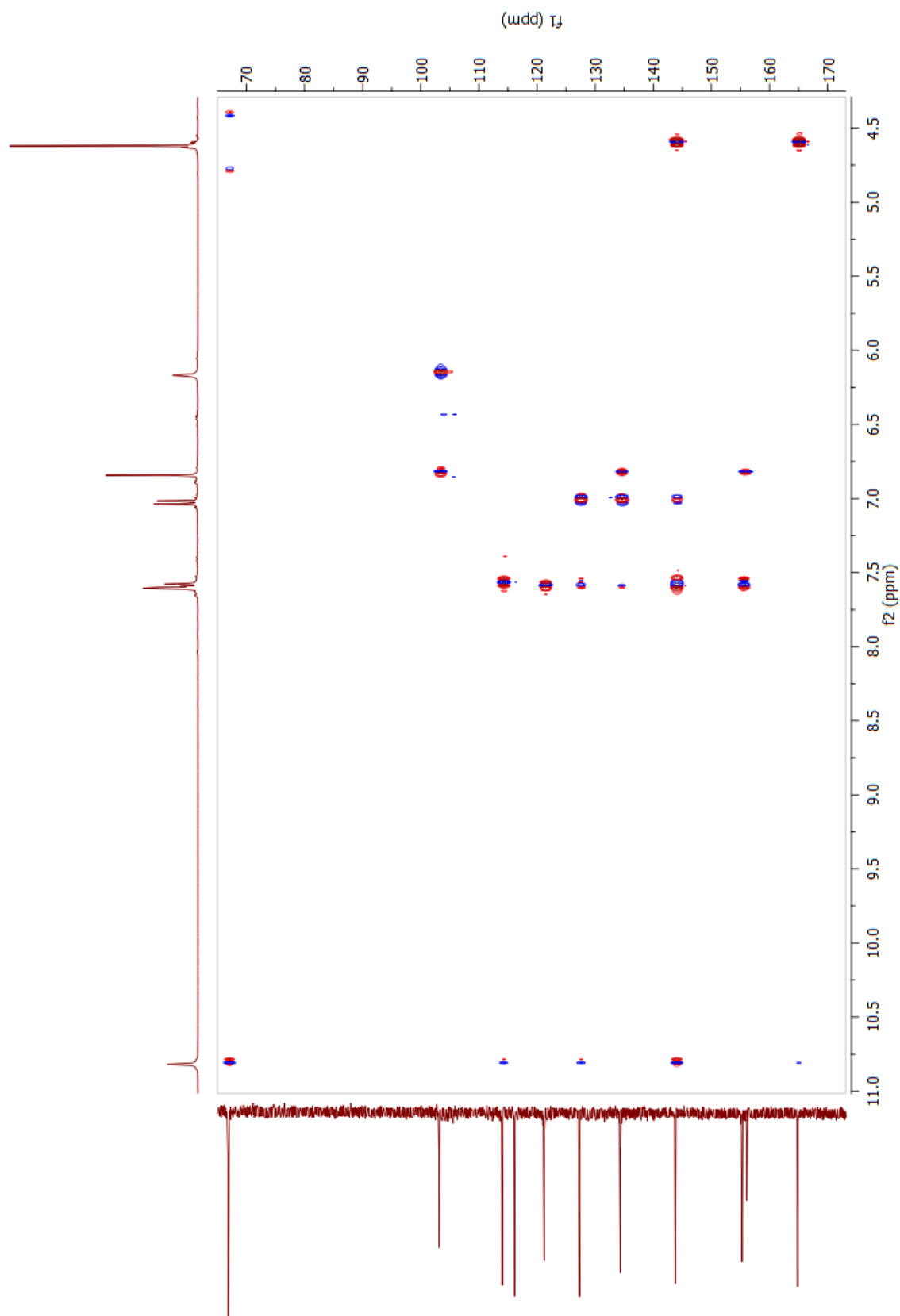
Espectro 20. RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz, δ en ppm) del compuesto 6,6'-(4-aminopiridin-2,6-diil)bis(2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-ona) (**7**).



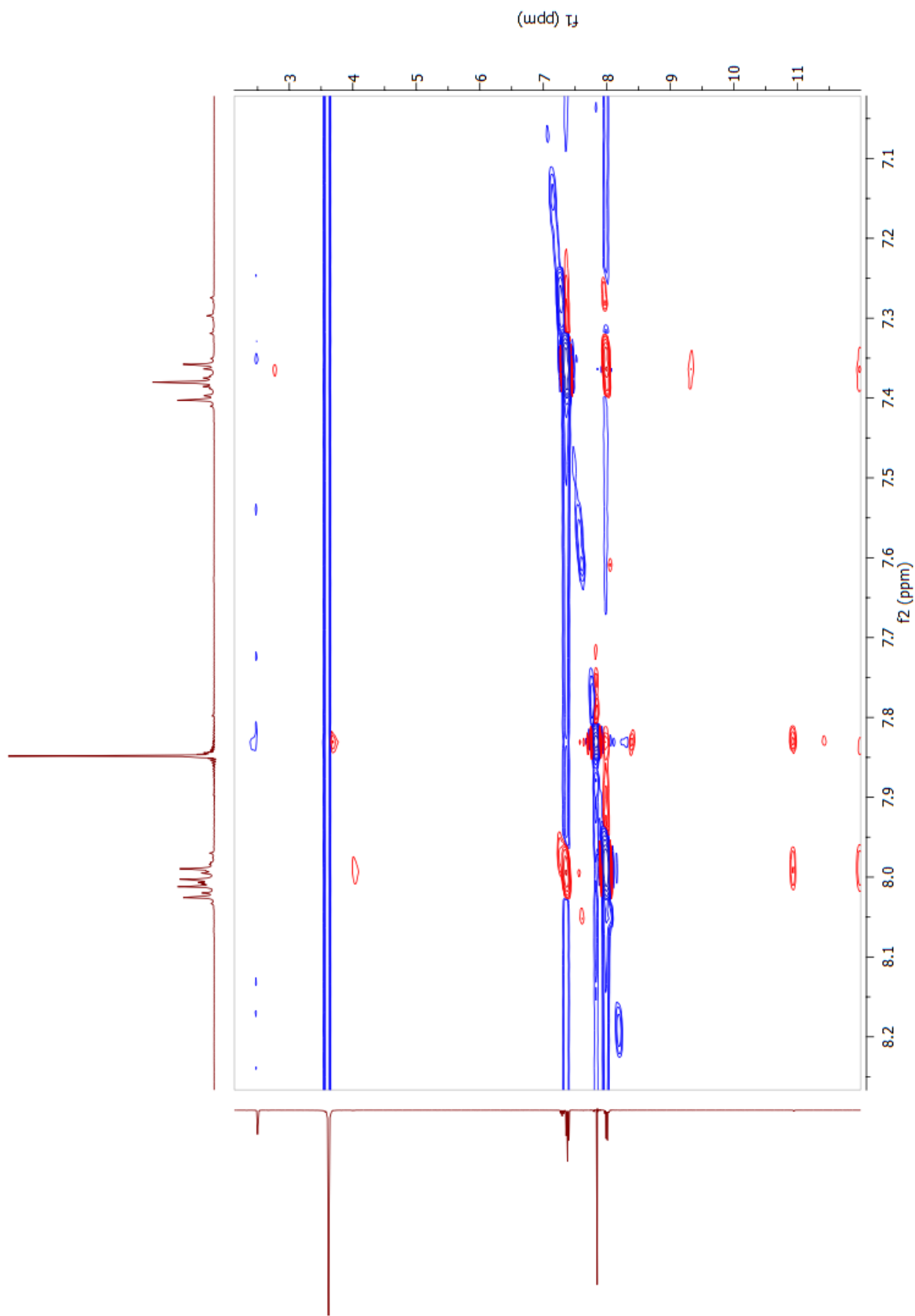
Espectro 21. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, D₂O, 400 MHz, δ en ppm). Experimento COSY del compuesto 6,6'-(4-aminopiridin-2,6-diil)bis(2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-ona) (**7**).



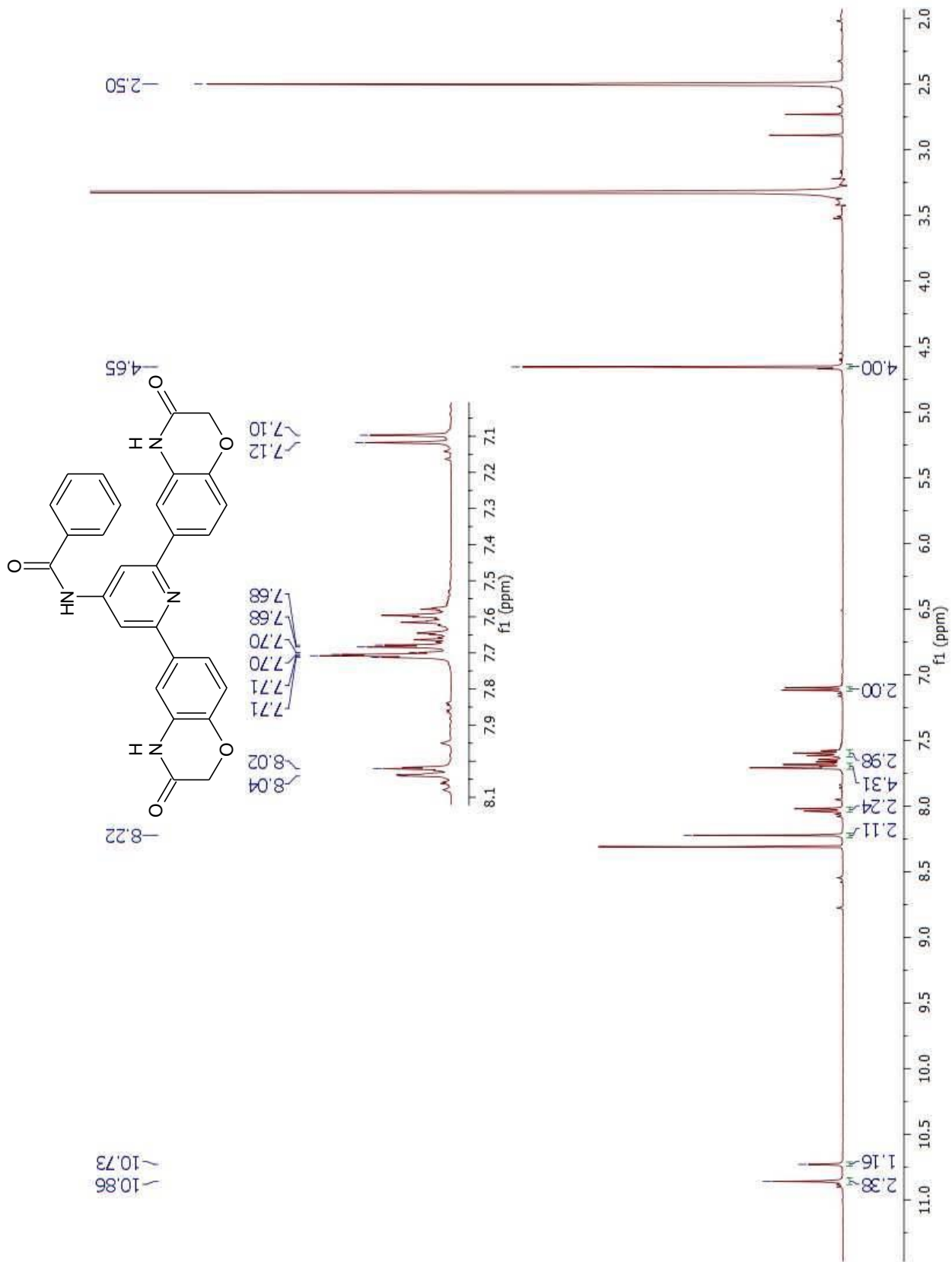
Espectro 22. RMN ^1H (DMSO- d_6 , D_2O , 400 MHz, δ en ppm), RMN ^{13}C (DMSO, 100 MHz, δ en ppm). Experimento HSQC del compuesto 6,6'-(4-aminopiridin-2,6-diil)bis(2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-ona) (**7**).



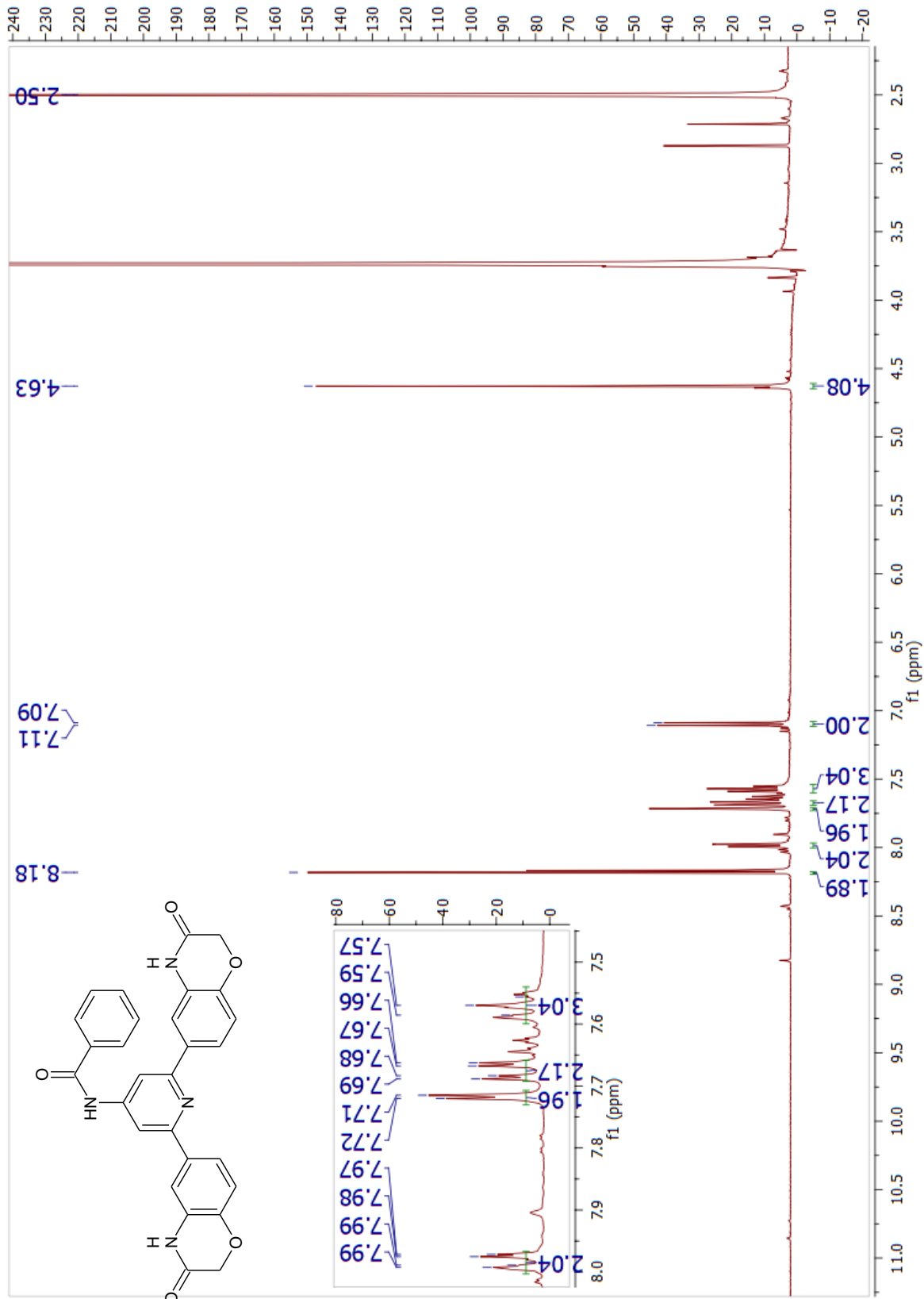
Espectro 23. RMN ^1H (DMSO- d_6 , D_2O , 400 MHz, δ en ppm), RMN ^{13}C (DMSO, 100 MHz, δ en ppm). Experimento HMBC del compuesto 6,6'-(4-aminopiridin-2,6-diil)bis(2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-ona) (**7**).



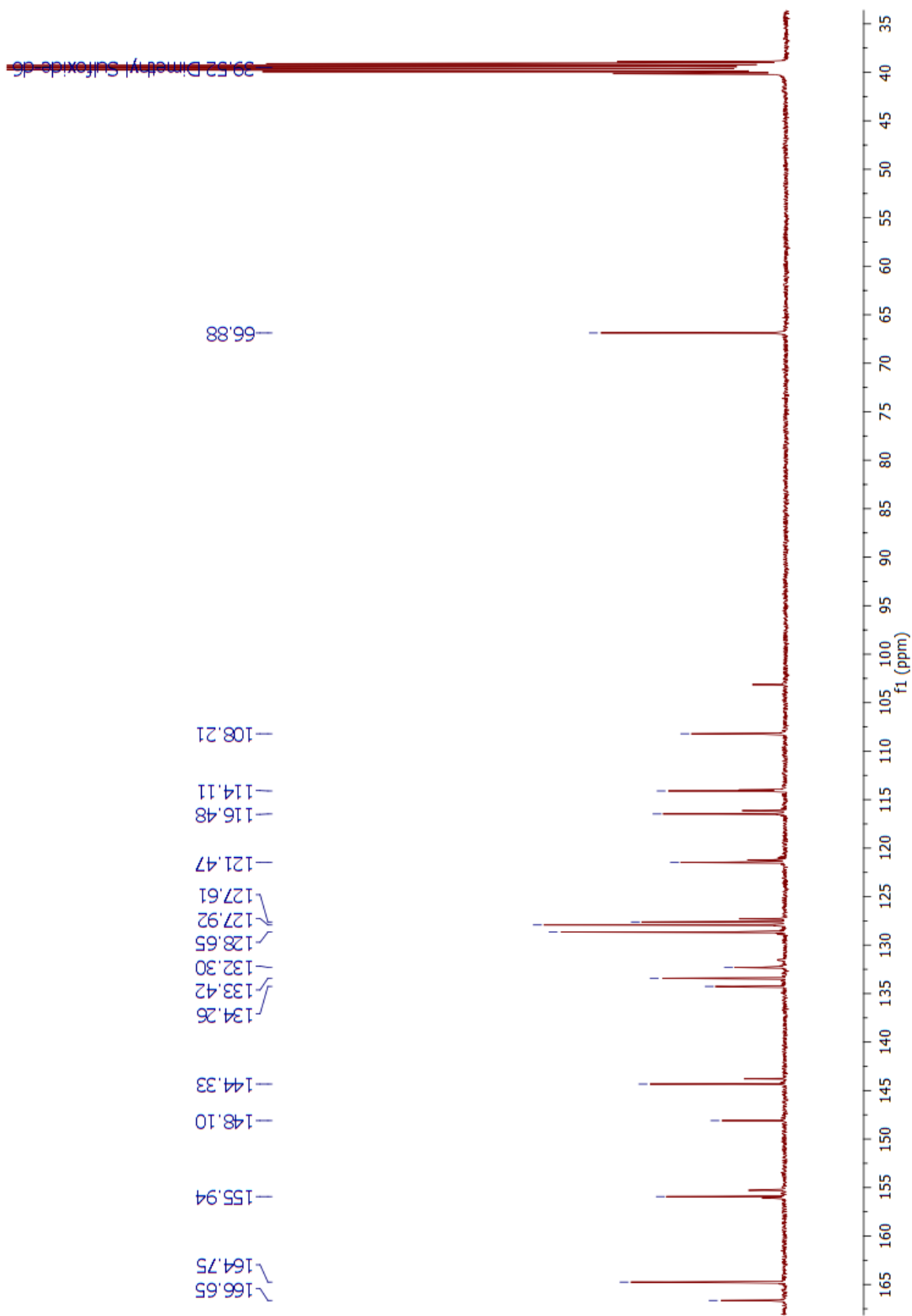
Espectro 24. RMN ^1H (DMSO- d_6 , D_2O , 400 MHz, δ en ppm). Experimento NOESY del compuesto 6,6'-(4-aminopiridin-2,6-diil)bis(2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-ona) (**7**).



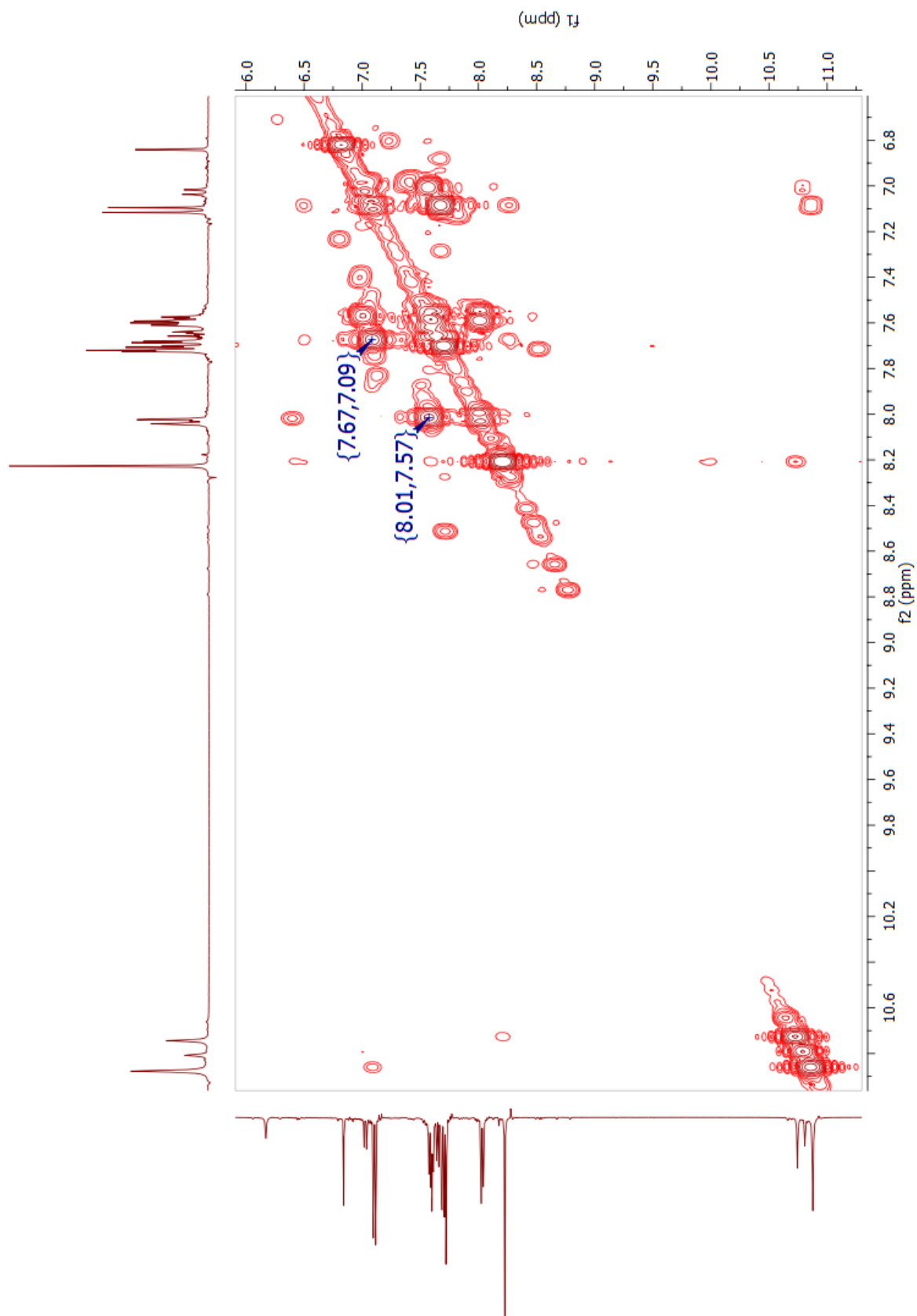
Espectro 25. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ en ppm) del compuesto *N*-(2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-6-il)piridin-4-il)benzamida (DL5A).



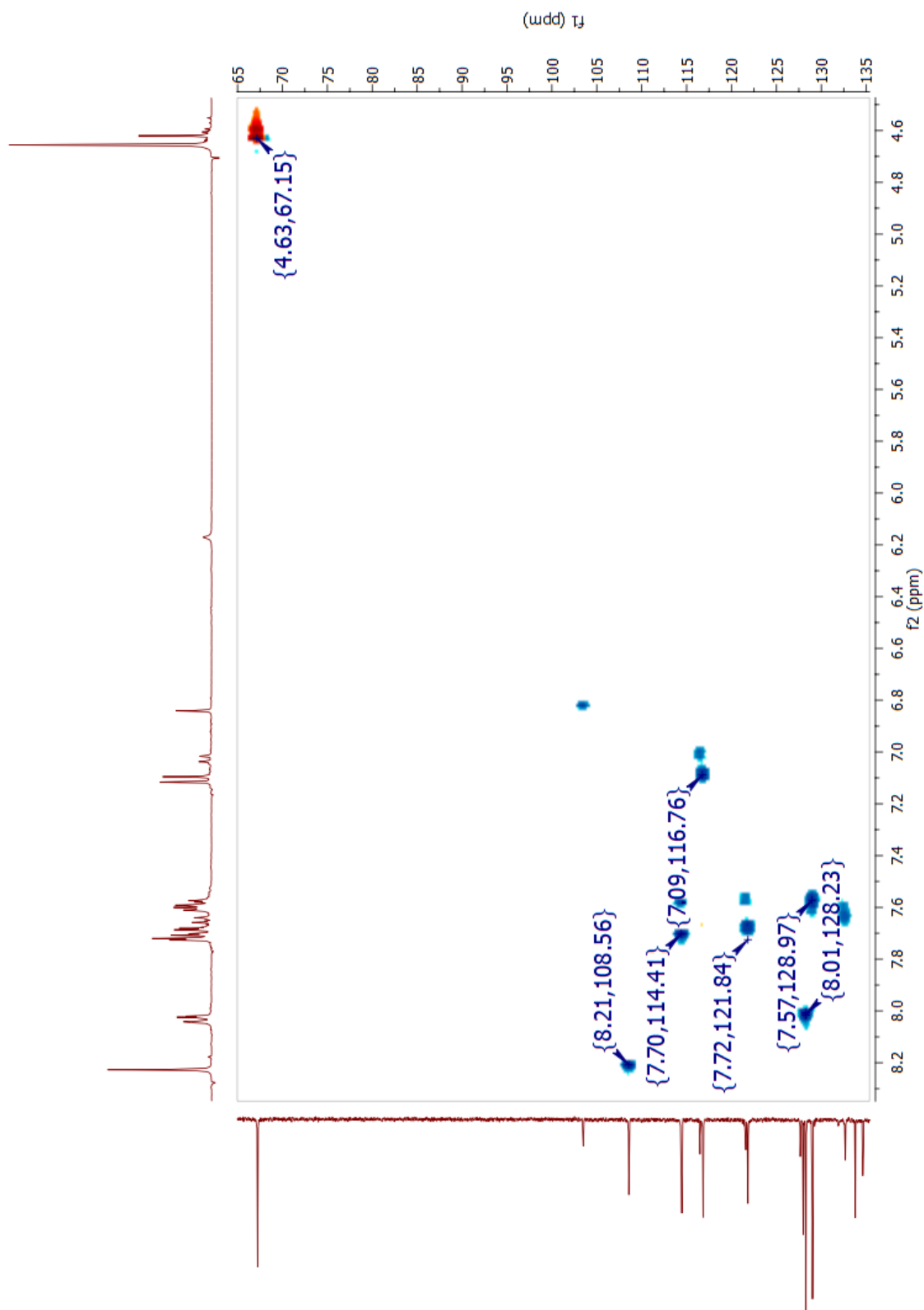
Espectro 26. RMN ^1H (DMSO- d_6 , D_2O , 400 MHz, δ en ppm) del compuesto *N*-(2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-6-il)piridin-4-il)benzamida (**DL5A**).



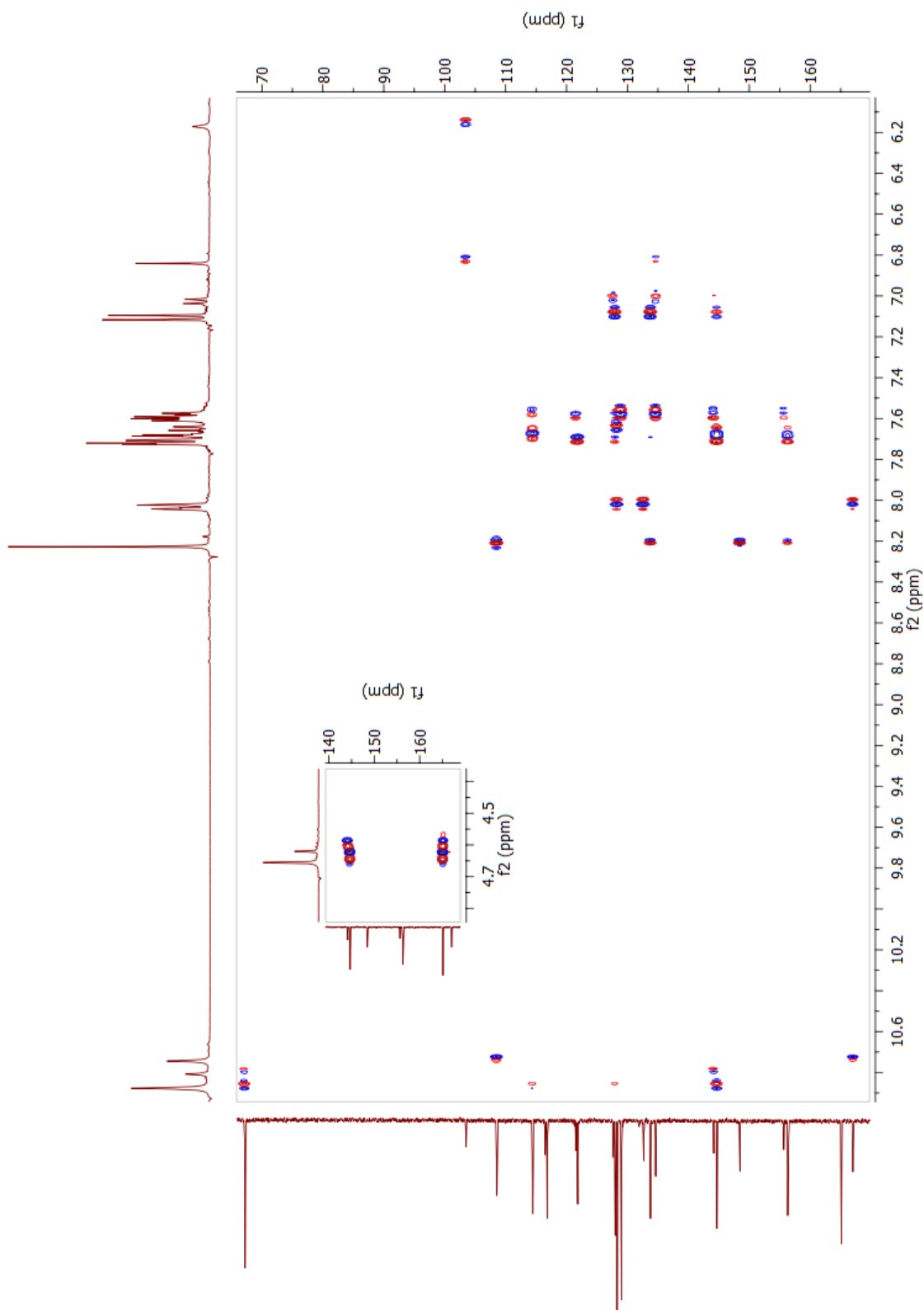
Espectro 27. RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz, δ en ppm) del compuesto *N*-(2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-6-il)piridin-4-il)benzamida (**DL5A**).



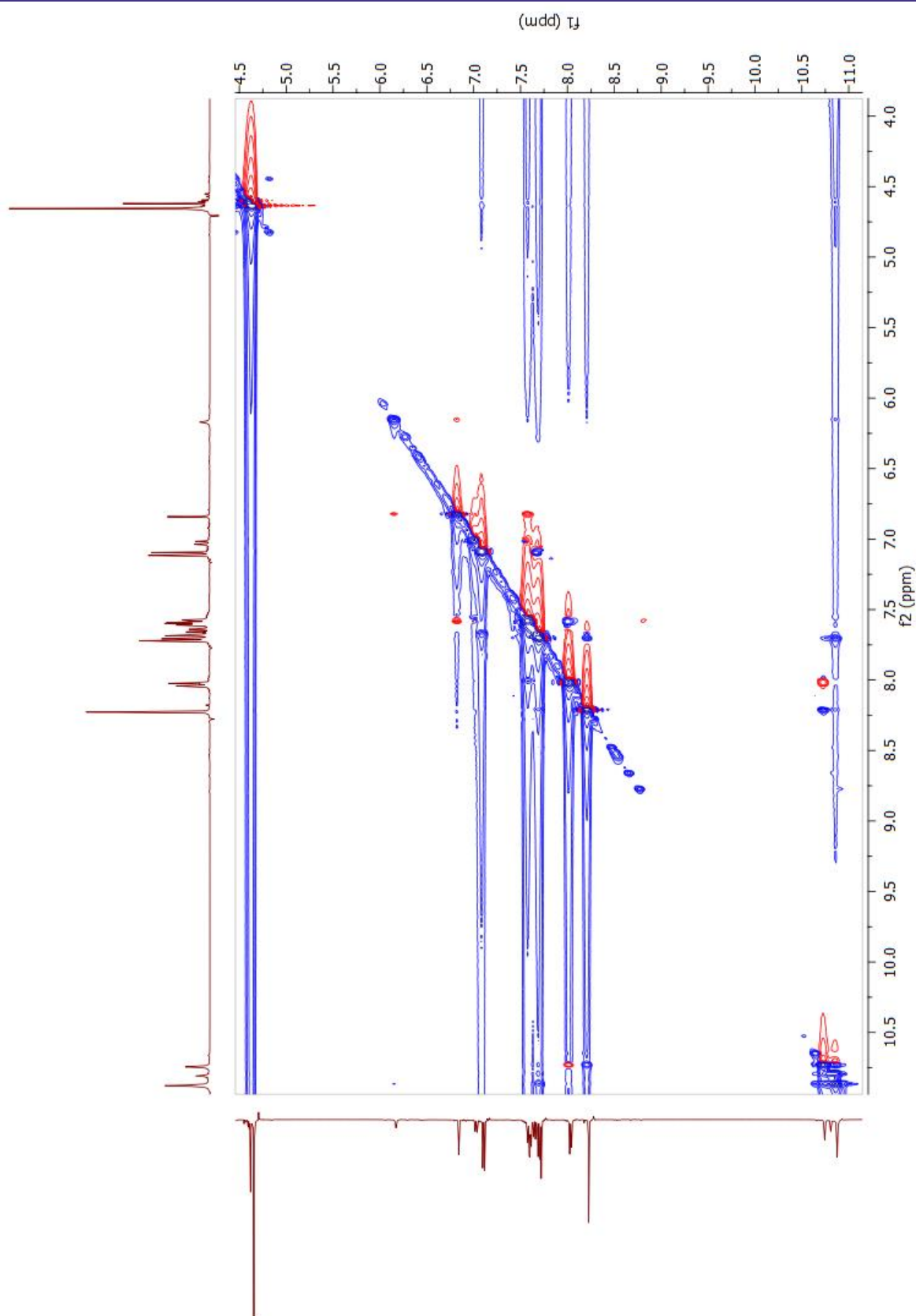
Espectro 28. RMN ^1H (DMSO- d_6 , D_2O , 400 MHz, δ en ppm). Experimento COSY del compuesto *N*-(2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-6-il)piridin-4-il)benzamida (**DL5A**).



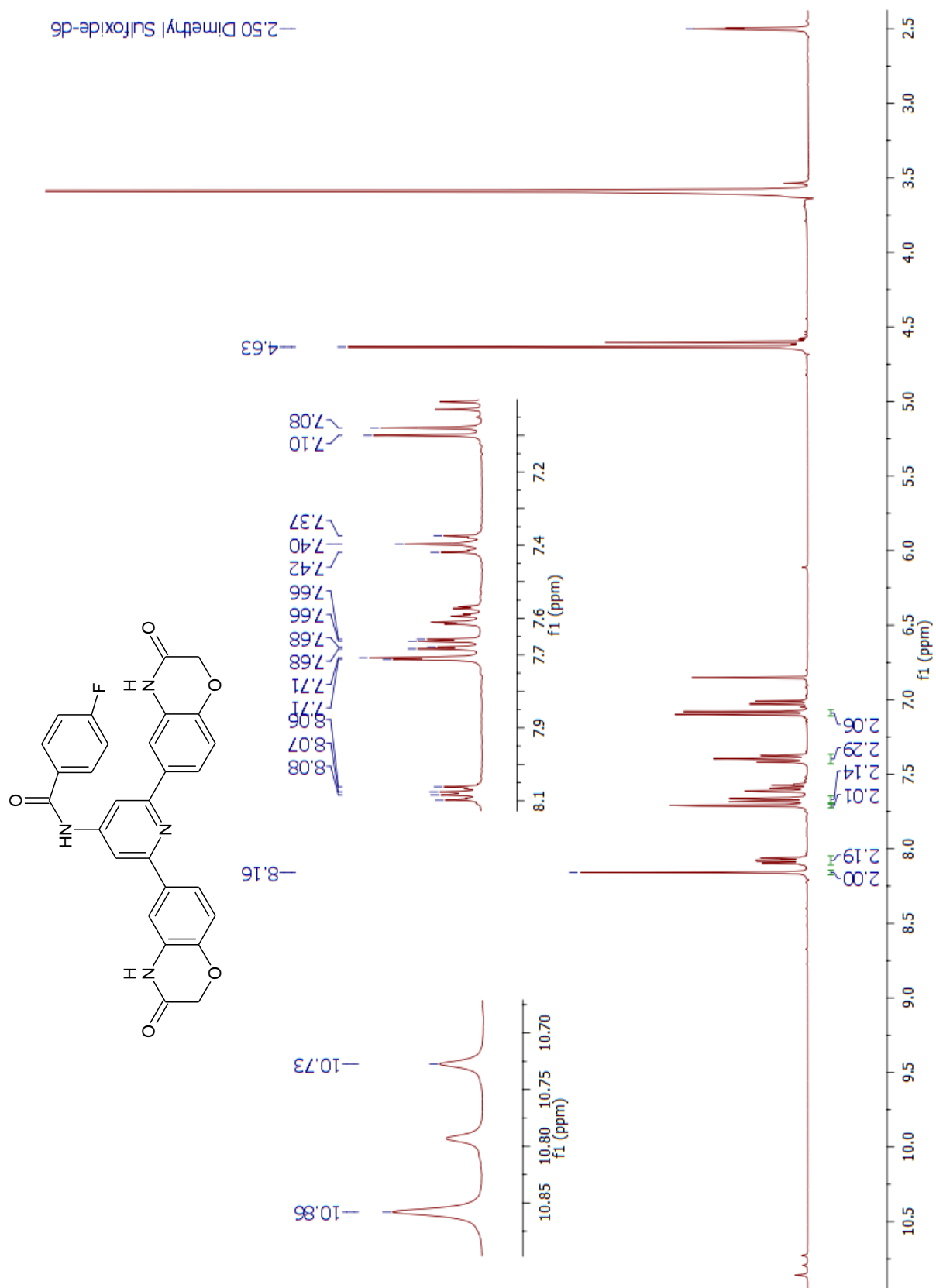
Espectro 29. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, D₂O, 400 MHz, δ en ppm), RMN ¹³C (DMSO, 100 MHz, δ en ppm). Experimento HSQC del compuesto *N*-(2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-6-il)piridin-4-il)benzamida (**DL5A**).



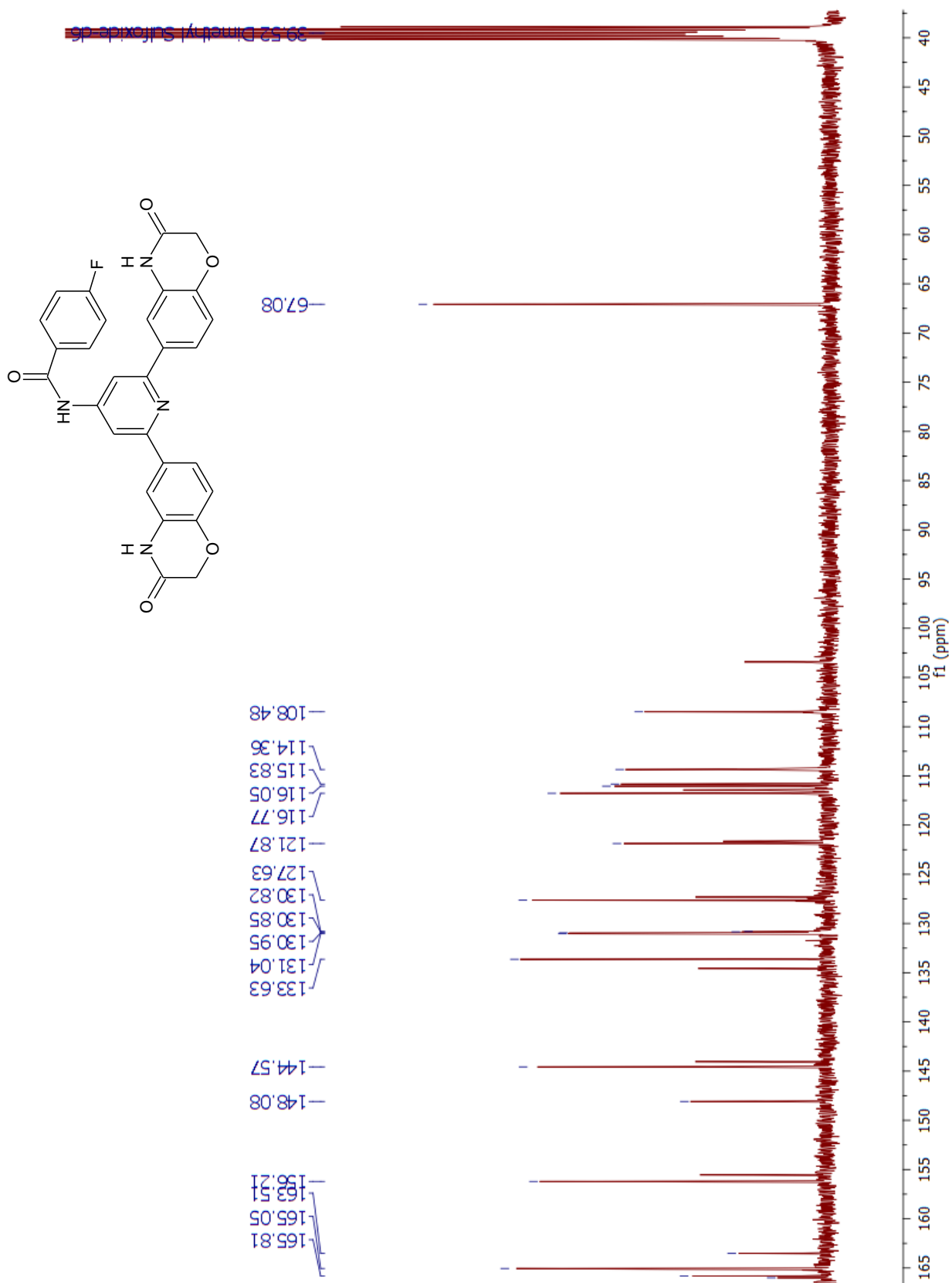
Espectro 30. RMN ^1H (DMSO- d_6 , D_2O , 400 MHz, δ en ppm), RMN ^{13}C (DMSO, 100 MHz, δ en ppm). Experimento HMBC del compuesto *N*-(2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-6-il)piridin-4-il)benzamida (**DL5A**).



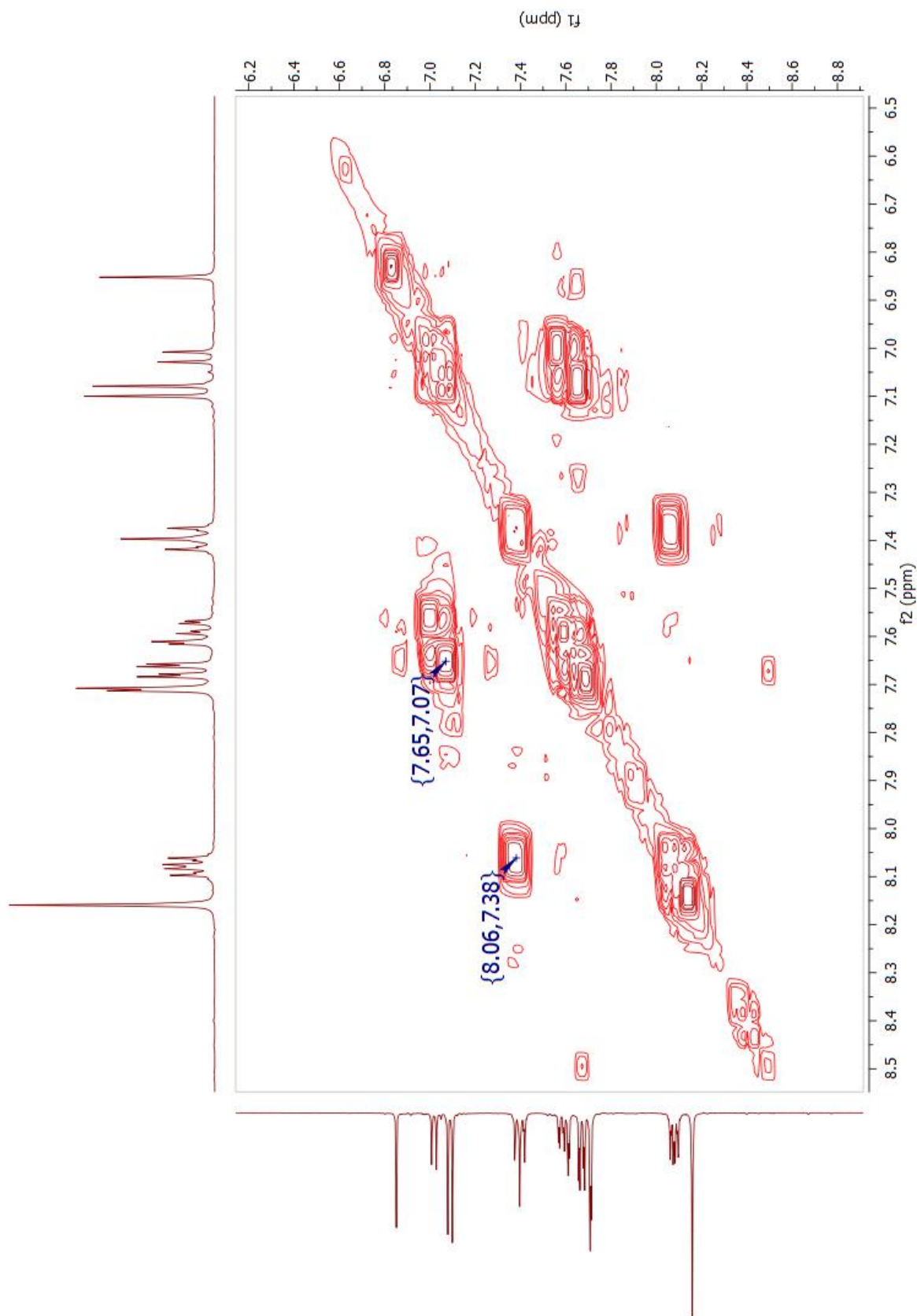
Espectro 31. RMN ^1H (DMSO- d_6 , D_2O , 400 MHz, δ en ppm). Experimento NOESY del compuesto *N*-(2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-6-il)piridin-4-il)benzamida (**DL5A**).



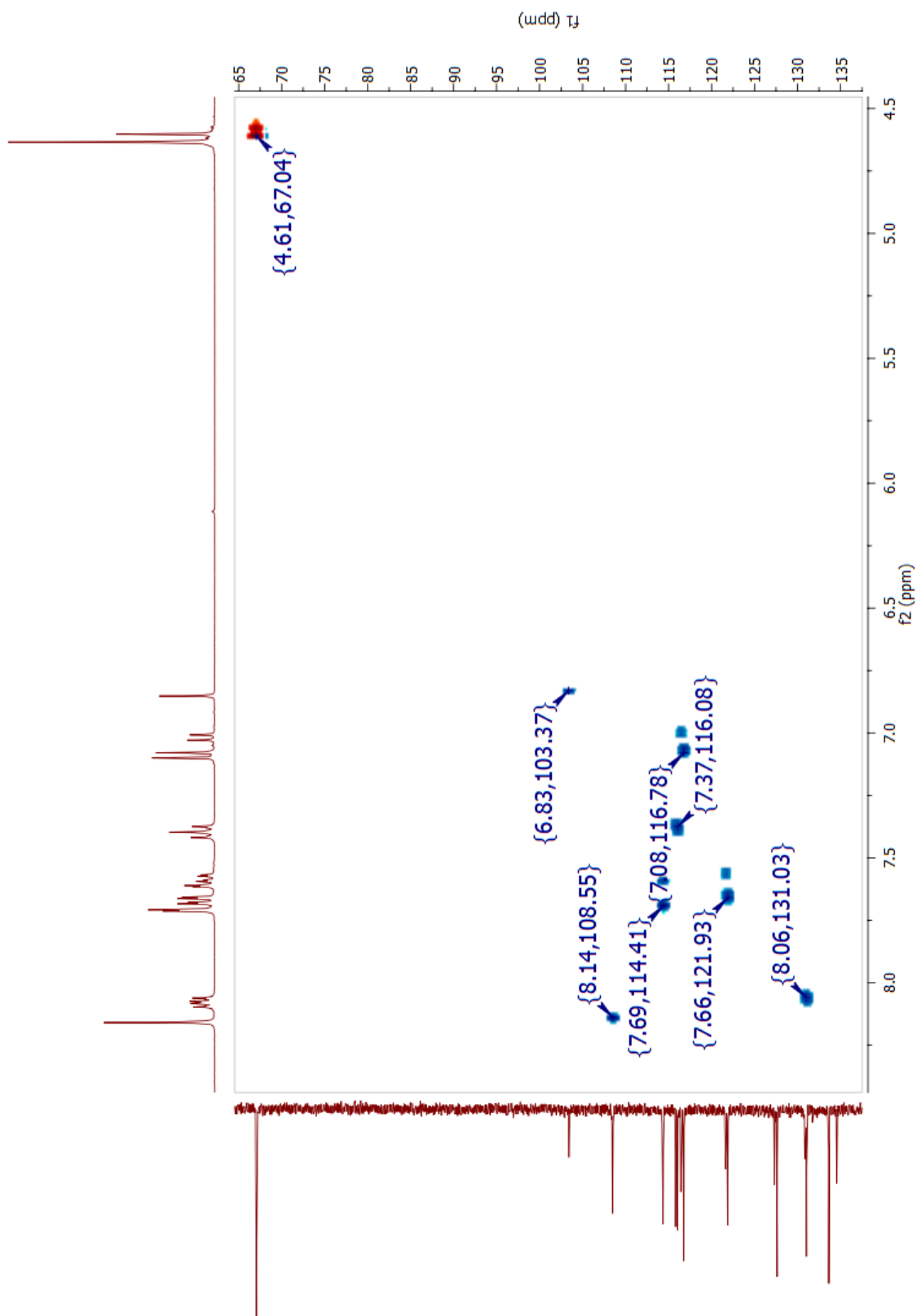
Espectro 32. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz, δ en ppm) del compuesto 4-fluoro-*N*-(2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-6-il)piridin-4-il)benzamida (**DL5G**).



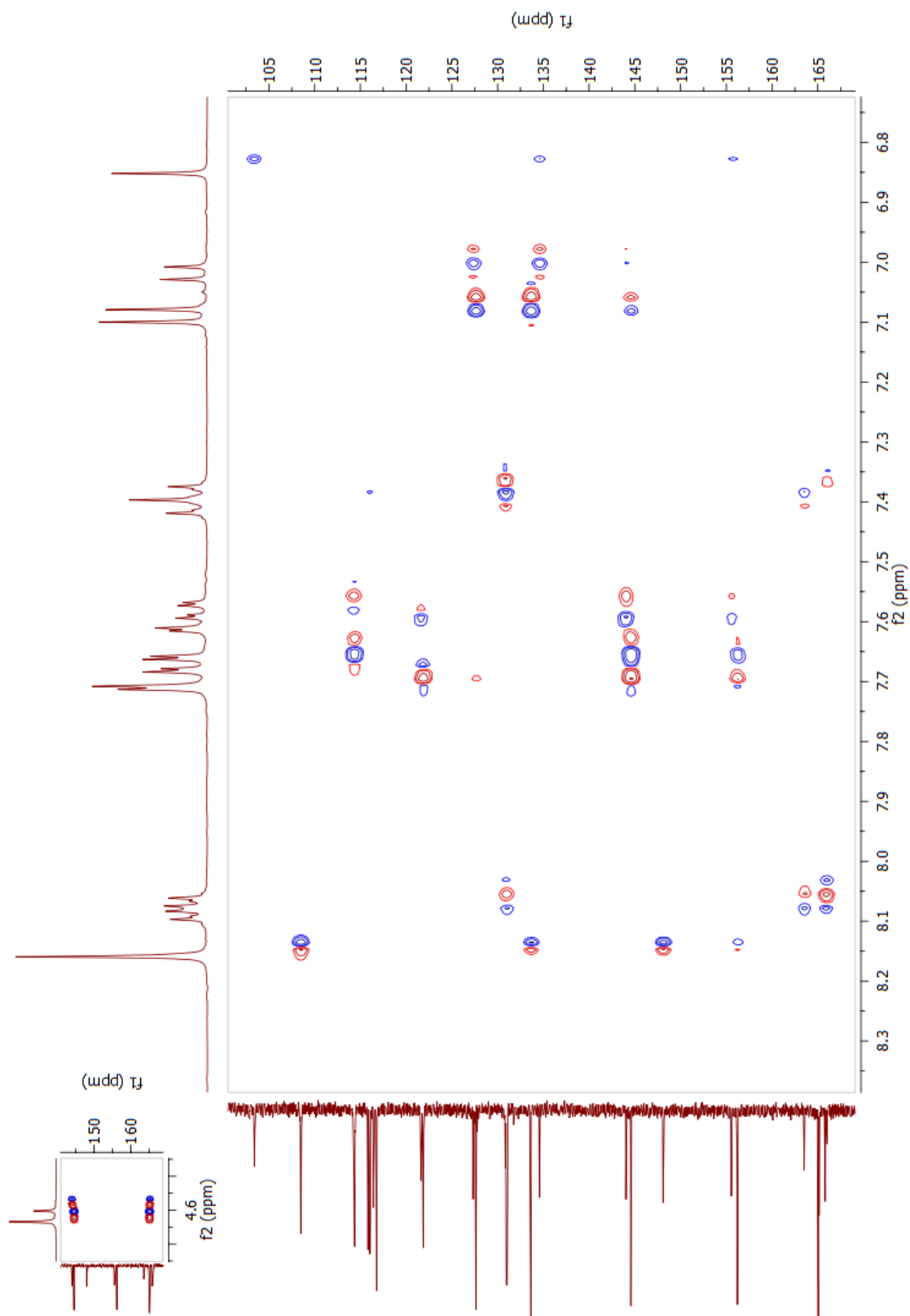
Espectro 33. RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz, δ en ppm) del compuesto 4-fluoro-*N*-(2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-6-il)piridin-4-il)benzamida (**DL5G**).



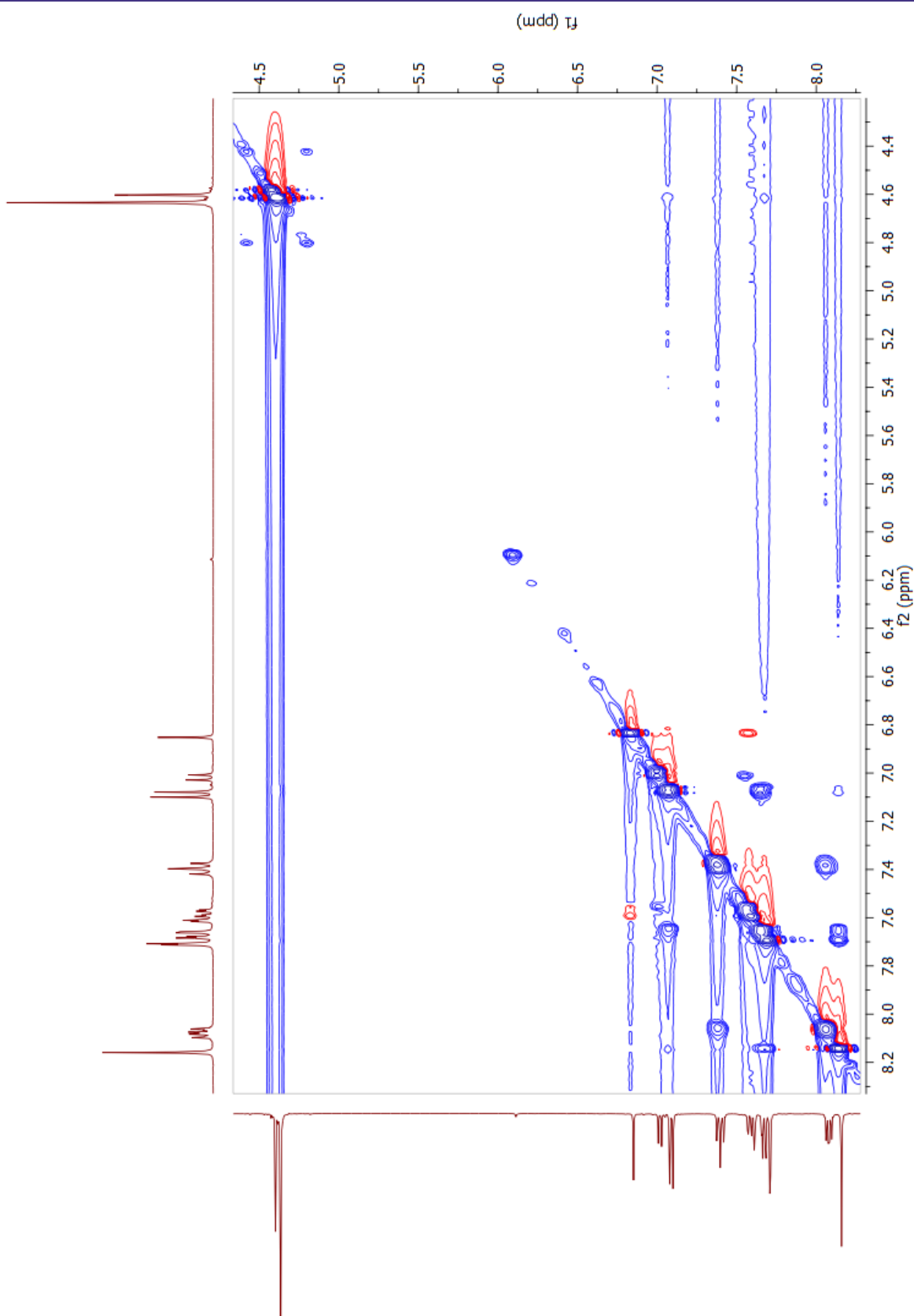
Espectro 34. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, D₂O, 400 MHz, δ en ppm). Experimento COSY del compuesto 4-fluoro-*N*-(2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-6-il)piridin-4-il)benzamida (**DL5G**).



Espectro 35. RMN ^1H (DMSO- d_6 , D $_2$ O, 400 MHz, δ en ppm), RMN ^{13}C (DMSO, 100 MHz, δ en ppm). Experimento HSQC del compuesto 4-fluoro-*N*-(2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2-*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-6-il)piridin-4-il)benzamida (**DL5G**).



Espectro 36. RMN ^1H (DMSO- d_6 , D $_2$ O, 400 MHz, δ en ppm), RMN ^{13}C (DMSO, 100 MHz, δ en ppm). Experimento HMBC del compuesto 4-fluoro-*N*-(2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-6-il)piridin-4-il)benzamida (**DL5G**).



Espectro 37. RMN ^1H (DMSO- d_6 , D_2O , 400 MHz, δ en ppm). Experimento NOESY del compuesto 4-fluoro-*N*-(2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-6-il)piridin-4-il)benzamida (**DL5G**).

13. ANEXO III. MODELADO POR HOMOLOGÍA

Q9Y243	AKT3_HUMAN	1	MSDVIIVKEGWVQKRGEYIKNWRPRYFLKTDGFIGYKEKPDVDL-PYPLNFSVAKC	59
P31749	AKT1_HUMAN	1	MSDYIVKEGW+KRGEYIKWRPRYFLKDG+FIGYKE+PQVDPLNNFSVA+C	60
Q9Y243	AKT3_HUMAN	60	QLMKTERPNTFIIRCLQWITVIERTFHVDTPTEEREETAIQAVADRIQRQFEERMNC	119
P31749	AKT1_HUMAN	61	QLMKTERPNTFIIRCLQWITVIERTFHV+TPEEREWTAIQVADL++QEEEM+	120
Q9Y243	AKT3_HUMAN	120	SPTSQIDNIGEEEMDASTTHHK-RKIMNDFDYLLKLGKTFGKVIIVREKASGYVAMKI	178
P31749	AKT1_HUMAN	121	S D S G EEM+ S K S IMN+F+YKLLGKTFGKVIIV+EKA+S+YVAMKI	180
Q9Y243	AKT3_HUMAN	179	LKKEVIIRKDEVAHTLTSRVLKNIRHPFLTSLKYSFQIKDRLCFVMEYVNGGELFFHLS	238
P31749	AKT1_HUMAN	181	LKKEVI+AKDEVAHILTE+RVI+N+RHPFLI+LKYSFQI DRLCFVMEY NGSGLFFHLS	240
Q9Y243	AKT3_HUMAN	239	RERVFSEDTRFYGAEIVSALDYLHSGK-IVYRDLKLENLMLDKDGHKIITDFGLCKEGI	297
P31749	AKT1_HUMAN	241	RERVFSEDRFYGAEIVSALDYLHSSK+VYRDLKLENLMLDKDGHKIITDFGLCKEGI	300
Q9Y243	AKT3_HUMAN	298	TDAATMKTFCGTPEYLAPEVLEDNDYGRAVDWVGLGVVYEMMCGRLPFYNDHEKLFEL	357
P31749	AKT1_HUMAN	301	TDAATMKTFCGTPEYLAPEVLEDNDYGRAVDWVGLGVVYEMMCGRLPFYNDHEKLFEL	360
Q9Y243	AKT3_HUMAN	358	ILMEDIKFRPRLISSDAKSLLSGLLIKDPNKRLLGGPDDAKEIMRHSFFSGVNWQVDYDKK	417
P31749	AKT1_HUMAN	361	ILMEI+RFRPRL+AKSLLSGLL KDF+RLGGG+DAKEIM+H EF+S+ WC VY+KR	420
Q9Y243	AKT3_HUMAN	418	LVPFPKQVITSEIDTRYFDEEFTAQITITPPEKYDEGDMDNERRRPHFPQFSYSASG	477
P31749	AKT1_HUMAN	421	LSPFPKQVITSEIDTRYFDEEFTAQITITPPEQ++ +D M+Q+D+ERRRPHFPQFSYSASG	478

Figura III-1. Alineamiento de secuencias de AKT3 (UniProt ID: Q9Y243) con AKT1 (UniProt ID: P31749).

14. ANEXO IV. ACOPLAMIENTO MOLECULAR

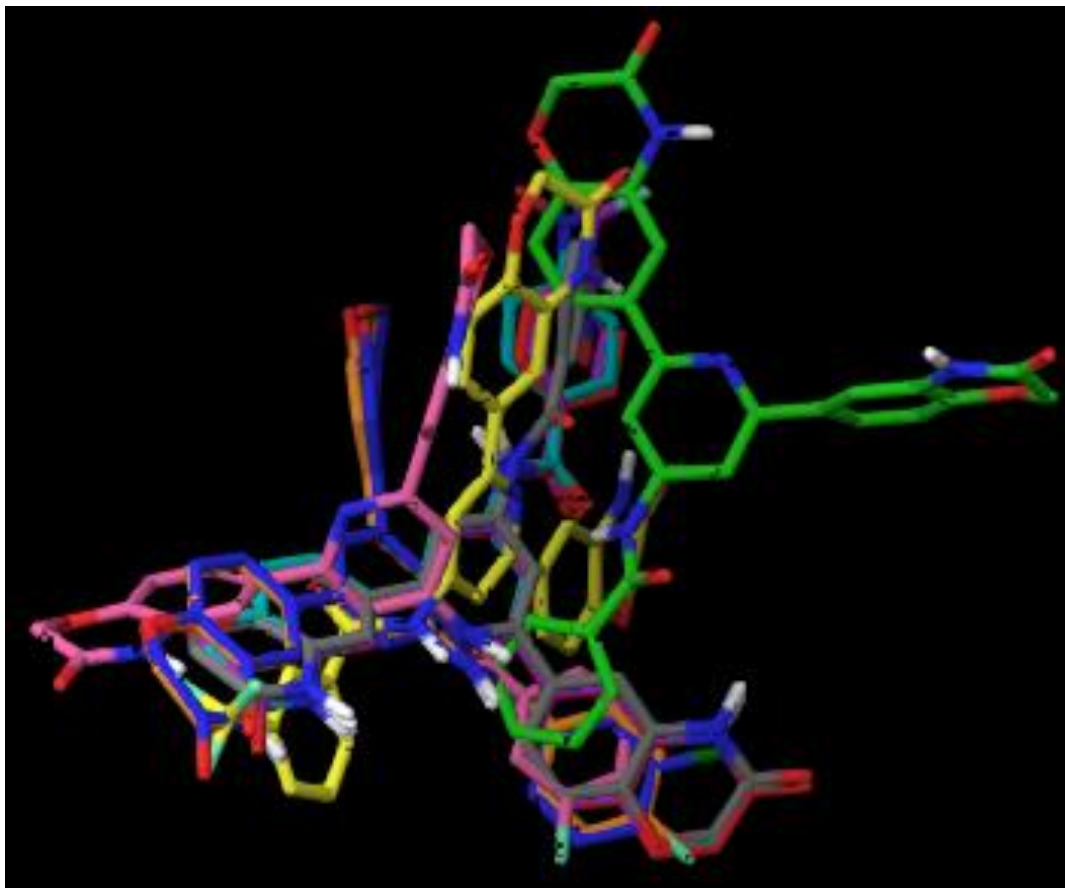


Figura IV-1. Modelo 3D de las conformaciones adoptadas por los compuestos de la serie DL5 con AKT3. Se muestran: **DL5A** en verde, **DL5B** en azul, **DL5C** en rojo, **DL5D** en amarillo, **DL5E** en morado, **DL5F** en rosa, **DL5G** en naranja, **DL5H** en gris y **DL5I** en verde azulado.

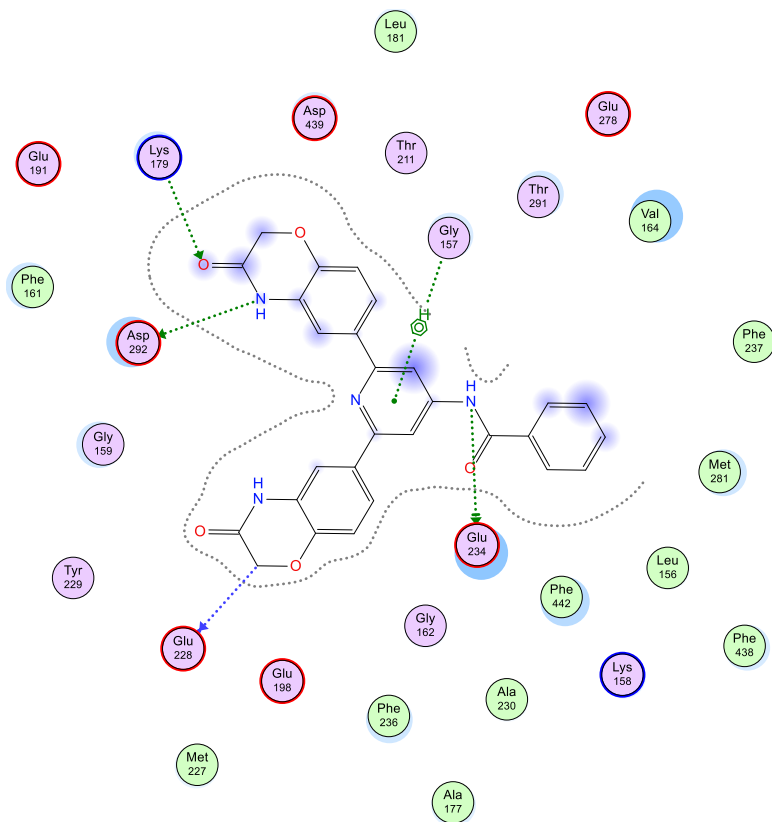


Figura IV-2. Diagrama 2D de interacciones de DL5A (H) con AKT1.

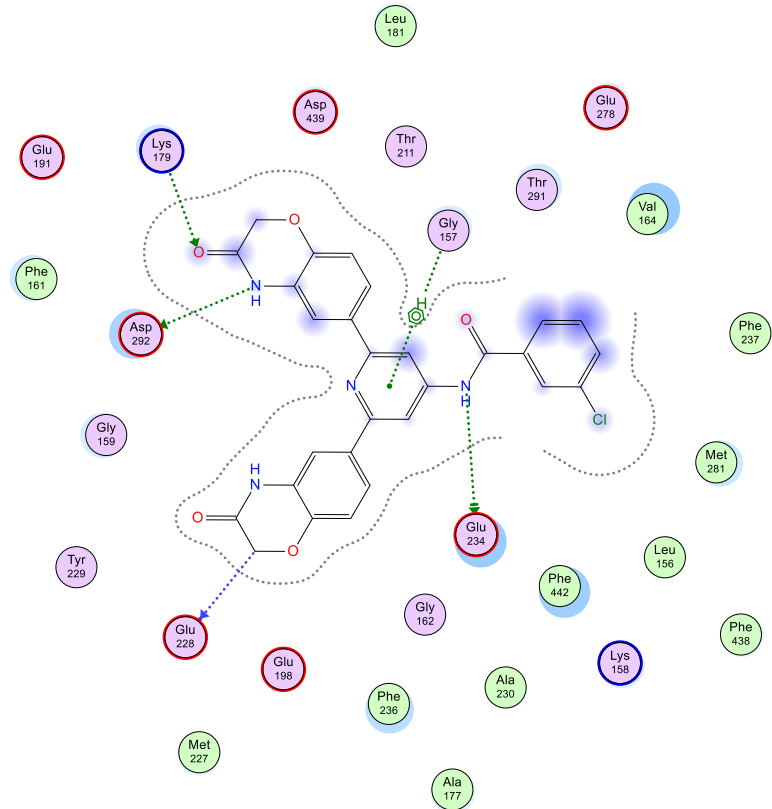


Figura IV-3. Diagrama 2D de interacciones de DL5B (3-Cl) con AKT1.

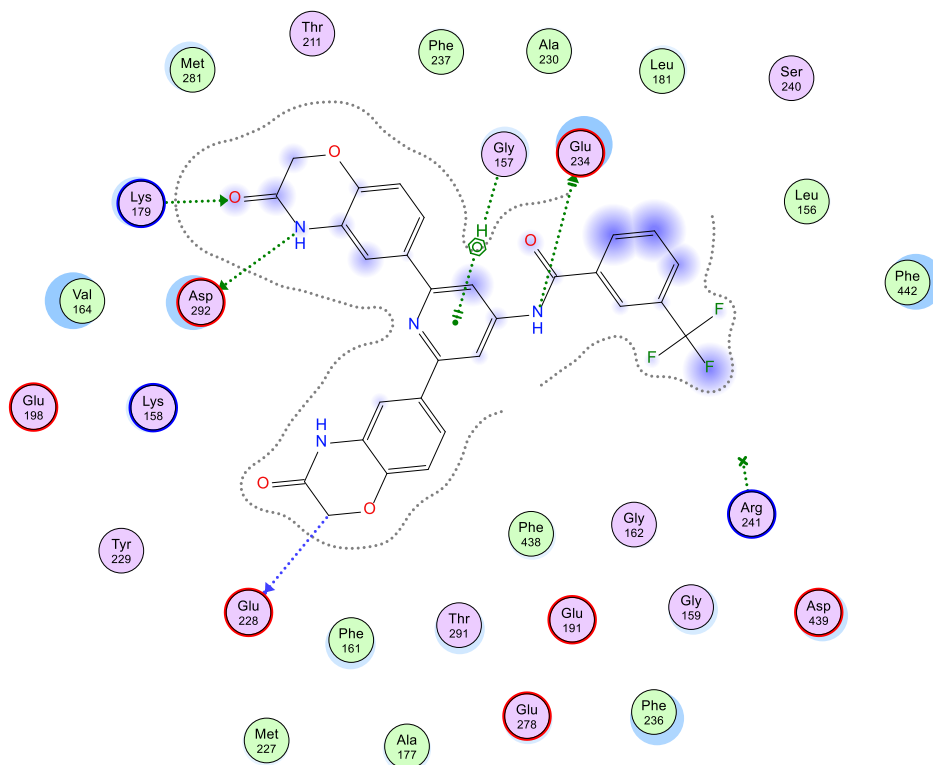


Figura IV-4. Diagrama 2D de interacciones de DL5D (3-CF₃) con AKT1.

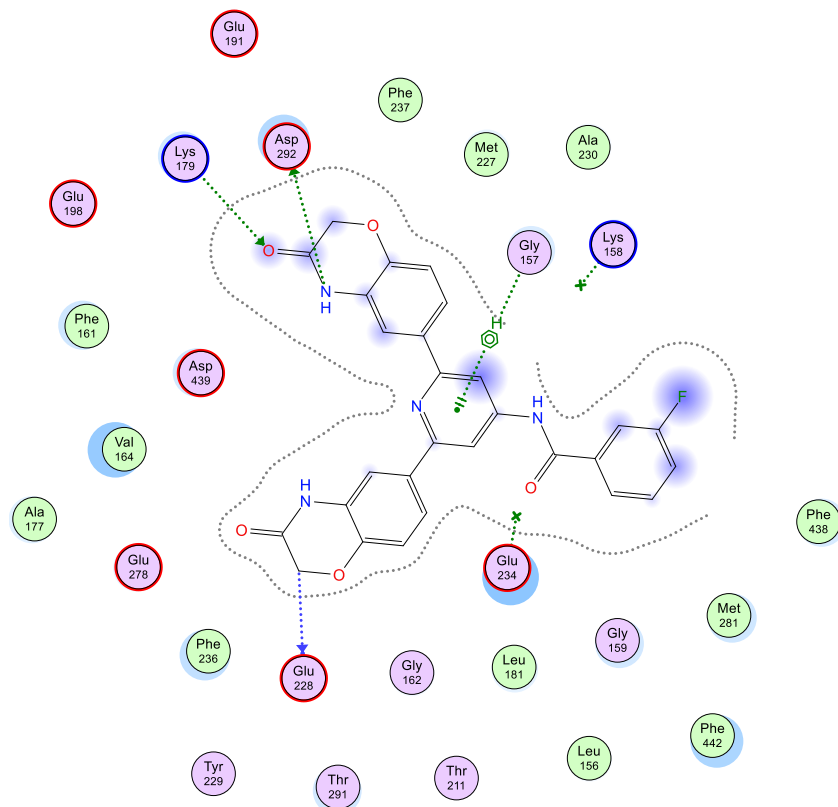


Figura IV-5. Diagrama 2D de interacciones de DL5F (3-F) con AKT1.

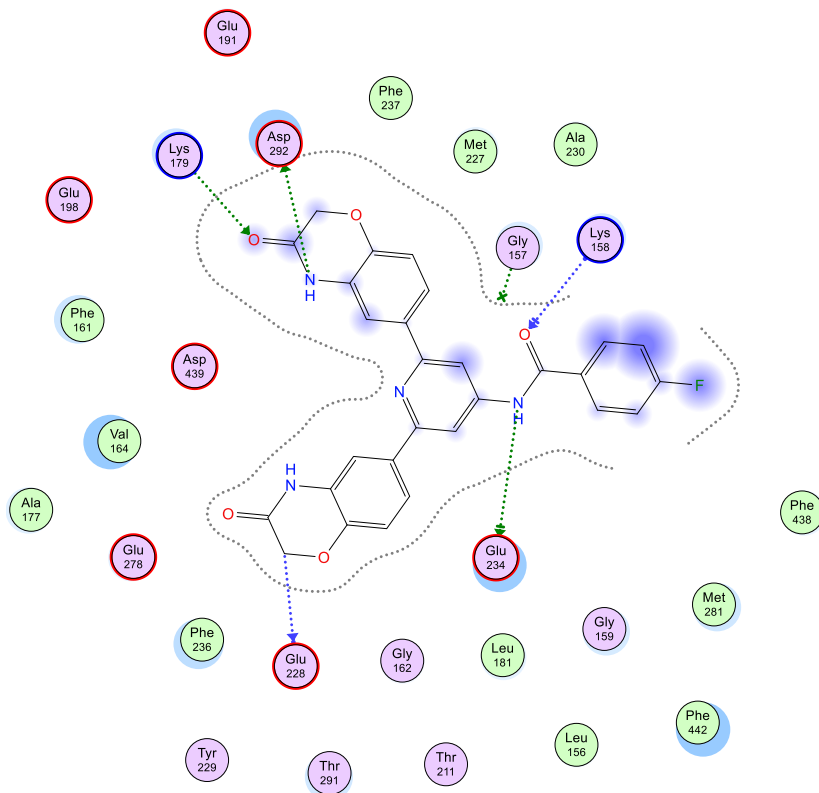


Figura IV-6. Diagrama 2D de interacciones de **DL5G** (4-F) con AKT1.

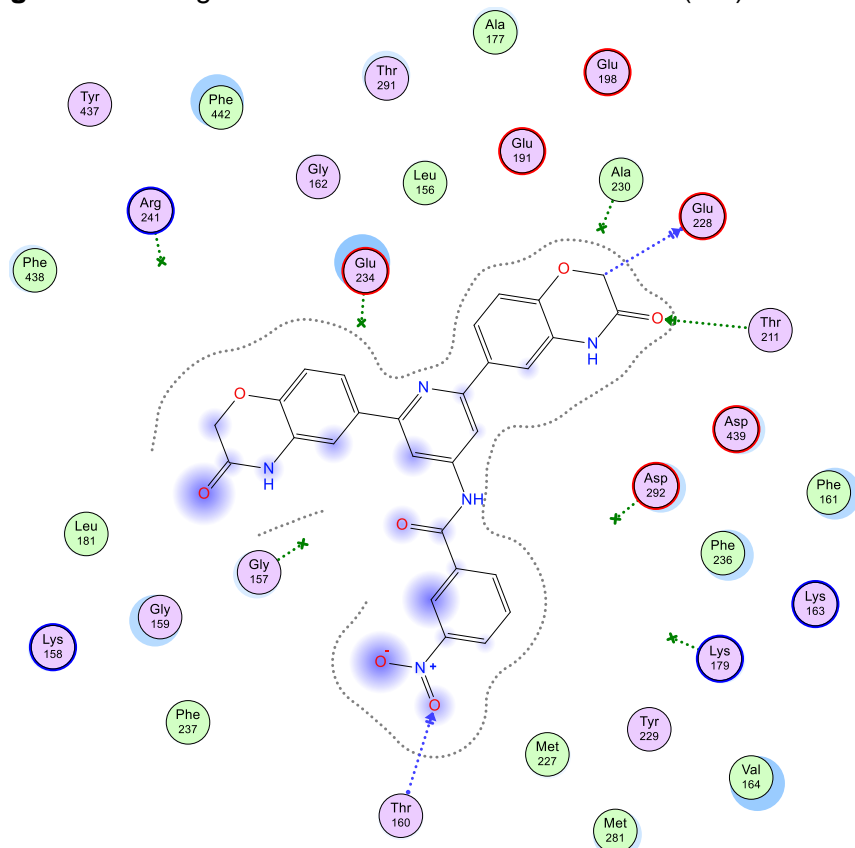


Figura IV-7. Diagrama 2D de interacciones de **DL5H** (3-NO₂) con AKT1.

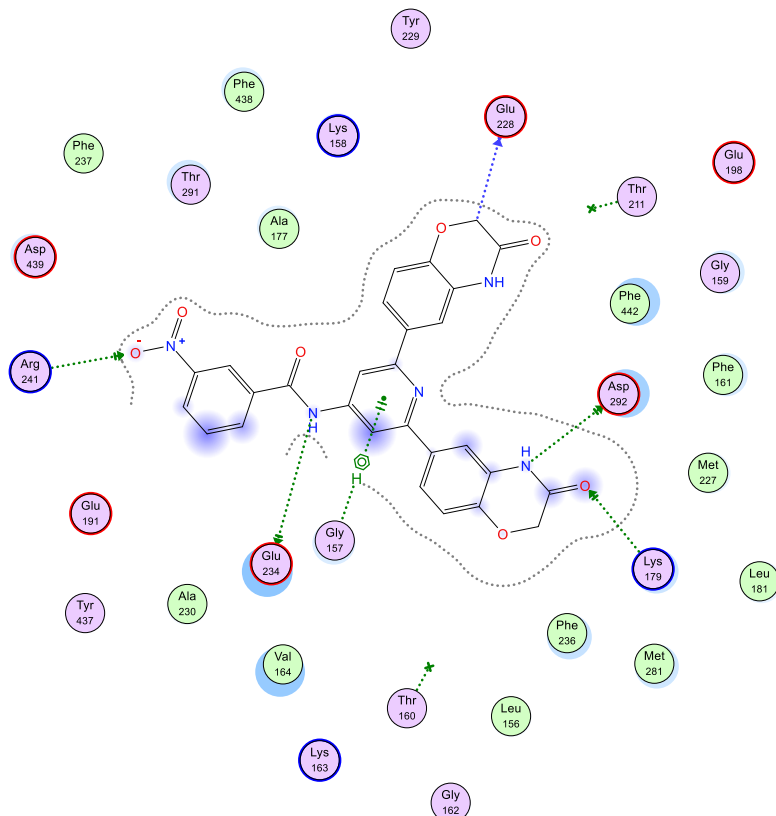


Figura IV-8. Diagrama 2D de interacciones de DL5H (3-NO₂) con AKT1. Se muestra el segundo mejor tamaño de clúster para este compuesto.

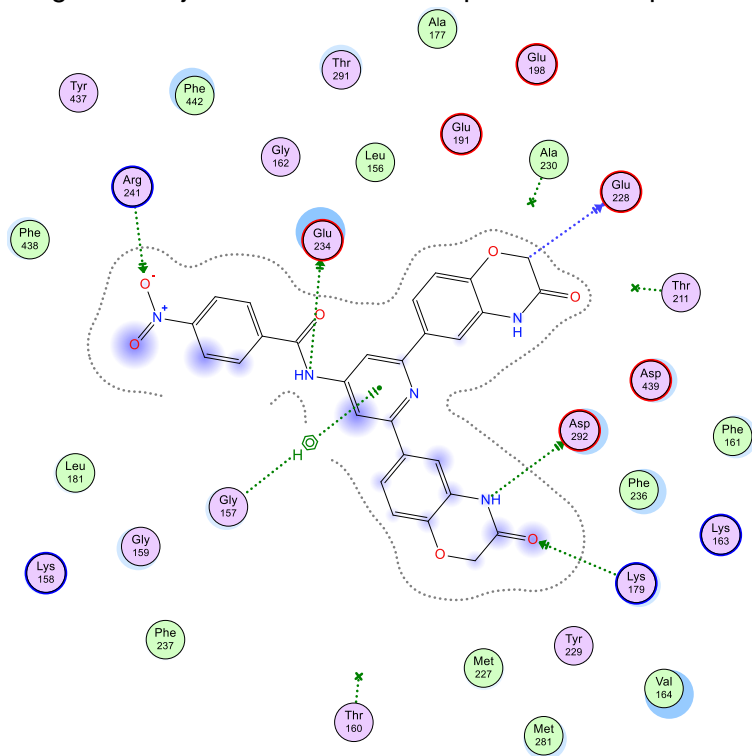


Figura IV-9. Diagrama 2D de interacciones de DL5I (4-NO₂) con AKT1.

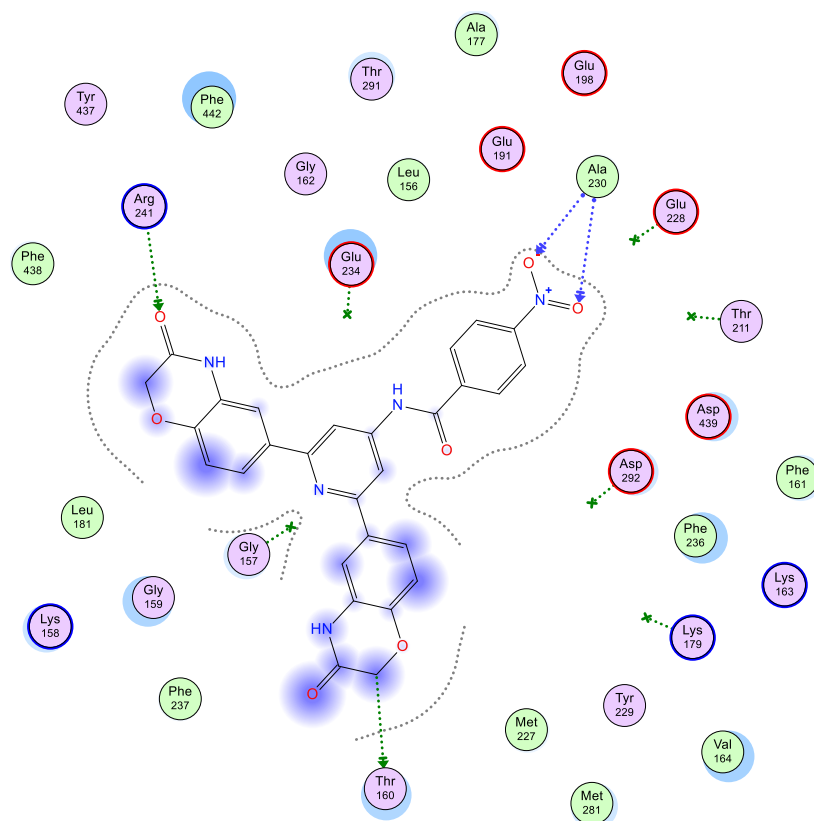


Figura IV-10. Diagrama 2D de interacciones de **DL5I (4-NO₂)** con **AKT1**. Se muestra el segundo mejor valor de energía de unión para este compuesto.