



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Estudios computacionales y síntesis de piridinas 2,4,6-trisustituidas inhibidores de
AKT cinasas para el tratamiento del cáncer

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. Pedro Josué Trejo Soto

Dr. Rafael Castillo Bocanegra
Departamento de Farmacia, Facultad de Química UNAM

Ciudad de México, octubre de 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

TEMA DE TESIS

**Estudios computacionales y síntesis de compuestos inhibidores de AKT
cinastas para el tratamiento del cáncer**

**T E S I S
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. en C. Pedro Josué Trejo Soto

Dr. Rafael Castillo Bocanegra
Departamento de Farmacia, Facultad de Química UNAM



Ciudad de México, octubre de 2018

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dr. José Alfredo Vázquez Martínez. Facultad de Química, UNAM

Vocal: Dr. José Guadalupe López Cortes. Instituto de Química, UNAM

Vocal: Dra. Karina Martínez Mayorga. Instituto de Química, UNAM

Vocal: Dr. Jaime Pérez Villanueva. UAM-Xochimilco

Secretario: Dr. Alejandro Cordero Vargas. Instituto de Química, UNAM

COMITÉ TUTOR DE EVALUACIÓN

Dr. Rafael Castillo Bocanegra, Departamento de Farmacia, Facultad de Química UNAM

Dr. Eugene A. Bratoeff Titeff[†], Departamento de Farmacia, Facultad de Química UNAM

Dr. Roberto Martínez. Instituto de Química UNAM

Dr. José Guadalupe López Cortes, Instituto de Química UNAM

LUGARES DONDE SE DESARROLLARON LAS ACTIVIDADES DE ESTA TESIS

Los estudios computacionales y la síntesis de piridinas trisustituidas se desarrolló en el Laboratorio 122 del Edificio E, Facultad de Química de la UNAM bajo la dirección del Dr. Rafael Castillo Bocanegra. Los ensayos de actividad citotóxica en células cancerosas se desarrollaron en la Unidad de Sistemas Biológicos de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco (UAM-X) bajo la dirección del Dr. Ignacio González. La parte de la ruptura oxidativa de alquenos se desarrolló durante la estancia de investigación en el departamento Química y Bioquímica de la *University of California-Santa Barbara* (UCSB), en la ciudad de Santa Barbara California EUA, bajo la dirección del Dr. Bruce H. Lipshutz.

Parte de los resultados de este trabajo se presentó en los siguientes congresos:

- 3er Coloquio Internacional: Retos e Innovaciones en la Investigación Farmacéutica. “*Activity landscape modeling of AKT inhibitors*”. 6-8 de mayo 2014, Cuernavaca, Morelos.
- 248th ACS National Meeting & Exposition. “*Activity landscape modeling of AKT inhibitors*”. 10-14 de agosto 2014, San Francisco, California, EUA.
- 250th ACS National Meeting & Exposition. “*Synthesis of 2,4,6-trisubstituted pyridines using palladium-catalyzed cross-coupling reactions*”. 16-20 de agosto 2015, Boston, Massachusetts, EUA.
- 253er ACS National Meeting & Exposition. “*In search of AKT inhibitors as anticancer agents, an in silico approach*”. 2-6 de abril de 2017, San Francisco, California, EUA.
- 253er ACS National Meeting & Exposition. “*Synthesis of 2,4,6-trisubstituted pyridines using palladium-catalyzed cross-coupling reactions and in vitro anticancer evaluation*”. 2-6 de abril de 2017, San Francisco, California, EUA.

Publicaciones

- **Pedro Josué Trejo-Soto**, Alicia Hernández-Campos, Antonio Romo-Mancillas, José L. Medina-Franco, Rafael Castillo. *In search of AKT kinase inhibitors as anticancer agents: structure-based design, docking, and molecular dynamics studies of 2,4,6-trisubstituted pyridines*. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2018, 36(2), 423-442. DOI: 10.1080/07391102.2017.1285724.
- Daniel J. Lippincott, **Pedro J. Trejo-Soto**, Fabrice Gallou, and Bruce H. Lipshutz. *Copper-Catalyzed Oxidative Cleavage of Electron-Rich Olefins in Water at Room Temperature*. *Organic Letters*. 2018, 20(17), 5094-5097.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, ya que ser un egresado de la máxima casa de estudios de México es un honor. Particularmente, a la Facultad de Química y a sus académicos e investigadores por haberme brindado las herramientas y conocimientos necesarios para cursar mis estudios profesionales.

Agradezco enormemente al Dr. Rafael Castillo por permitirme trabajar en su grupo de investigación, por desarrollarme con libertad en mi proyecto, por su confianza depositada y sobre todo por su apoyo y enseñanzas. ¡Gracias Doc!

Agradezco profundamente a la Dra. Alicia Hernández Campos por su supervisión, apoyo y por siempre impulsarme a culminar este trabajo. Gracias por las enseñanzas y su confianza a lo largo de mi paso por el 122, por su apoyo siempre presente en las buenas y malas, y en especial por su amistad y cariño incondicional. ¡Gracias Teacher!

Un agradecimiento especial a los estudiantes que participaron durante sus estancias, y que tuve la oportunidad de apoyar, que contribuyeron al desarrollo de este trabajo. Carlos Carvente, Eduardo Luján, Diana Prado, Montserrat Moreno, Ulises Téllez, Guillermo Hernández, Frida Lagar, Daniela Fregoso, Tania López.

Al Dr. Ignacio González de la UAM-X y a la estudiante Viridiana Aurelio Navarro de la Facultad de Química por su apoyo en la realización de los ensayos de citotoxicidad. A la Dra. Lilián Yépez Mulia del IMSS-Centro Médico y al Dr. Alfredo Téllez Valencia de la UJED-Durango por su apoyo para la adquisición de reactivos.

Agradezco al M. en C. Rodrigo Aguayo Ortiz por su apoyo en los estudios de quimioinformática reportados en este trabajo.

Agradezco al Dr. Bruce Lipshutz de la UCSB por haberme aceptado a trabajar en su grupo de investigación y darme la oportunidad de haber vivido esta enriquecedora experiencia profesional. Agradezco también a Daniel J. Lippincott por su atenta supervisión durante la estancia, y a todos los chicos de *The Lipshutz Research Group* por esta maravillosa experiencia.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada CVU: 409406/No. 258048 para la realización de los estudios de doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo financiero al proyecto No. 251807.

A la DGSCA-UNAM por el soporte recibido en el uso de la supercomputadora HP Cluster Platform 3000SL, "Miztli".

Al Posgrado en Ciencias Químicas, al Comité Académico del Doctorado en Ciencias Químicas, al SPIED, y en particular a la Dra. Adela Rodríguez y Josefina Tenopala por el apoyo brindado durante el doctorado, en especial por el apoyo financiero otorgado para la realización de la estancia de investigación en la UCSB.

Al Dr. Eugene Bratoeff (QEPD), Dr. José Gpe. López y Dr. Roberto Martínez de mi comité tutor de evaluación por su apoyo y valiosas observaciones para culminar bien este trabajo.

A la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI), en particular a la M. en C. Rosa Isela del Villar y la M. en C. Nayeli López Balbiaux del laboratorio de resonancia magnética nuclear por el apoyo en la adquisición de espectros de RMN. Así mismo, al Instituto de Química UNAM por las facilidades otorgadas para la realización de los espectros de masas de alta resolución.

A los miembros del jurado por sus valiosas observaciones al trabajo de tesis.

A Nayeli López Balbiaux por su amistad y apoyo incondicional, ayudándome e impulsándome a seguir adelante.

A los compañeros del laboratorio 122: Anuar Flores, Carlos Carvente, Paulina Flores, Elkin Sanabria, Jorge Victoria, José Luis Zavala, Ángel, Sebastián Huerta, Diana Prado, Gustavo Rico, Nayeli González, Lucia Cano, Francisco Barrera, porque además de aprender siempre la pasamos muy bien.

A mis amigos del laboratorio 122, Dr. Antonio Romo, Dr. Jaime Pérez, Dr. Oscar Méndez y Dr. Carlos Méndez esperando continuar discutiendo y compartiendo ideas con la diversión e irreverencia que nos caracteriza.

A las personas que han contribuido directa o indirectamente en la realización del trabajo de tesis y en general a mi formación profesional y personal, muchas gracias.

Abreviaturas y símbolos

ECD	Enfermedades Crónico-Degenerativas	GpiDAPH3	Three points pharmacophore fingerprint 2D
NCD	Noncommunicable Diseases	TGD	Typed graph distances
OMS	Organización Mundial de la Salud	TGT	Typed graph triangles
AKT	Serina-treonina cinasa B	TAD	Typed atom distances
PKB	<i>Protein kinase B</i> (Proteína cinasa B)	TAT	Typed atom triangles
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i> (célula B linfoma 2)	ROCS	<i>Rapid Overlay of Chemical Structures</i>
FOXO	<i>Forkhead box proteins</i>	AC	<i>Activity cliff</i>
p53	<i>Tumor suppressor p53</i> (proteína supresora de tumores p53)	MOE	<i>Molecular Operating Environment</i>
mTOR	<i>mammalian Target of Rapamycin</i>	MMFF94x	<i>Merck molecular force field 94x</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (factor de crecimiento endotelial vascular)	PM6	<i>Parameterization Method 6</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase</i>	OPLS	<i>Optimized potentials for liquid simulations</i> (campo de fuerza de potenciales optimizados para simulación de líquidos)
PtdIns	<i>Phosphatidylinositol</i> (fosfatidilinositol)	XP	<i>Extra precision</i>
PDK1	<i>3-Phosphoinositide-dependent kinase 1</i>	GROMACS	<i>GROningen MAchine for Chemical Simulations</i>
BAD	<i>Bcl-2-associated death promoter protein</i> (proteína promotora de muerte celular asociada a Bcl-2)	ACPYPE	<i>AnteChamber PYTHON Parser interface</i>
SAR	<i>Structure-activity relationship</i> (relaciones estructura-actividad)	AMBER	Assisted Model Building with Energy Refinement
QSAR	<i>Quantitative structure-activity relationship</i> (relaciones cuantitativas estructura-actividad)	TIP3P	<i>Three-site models</i> (modelo de agua de tres puntos)
SAS maps	<i>Structure-Activity Similarity maps</i> (mapas de similitud estructura-actividad)	NTV	<i>Canonical ensemble, number of atoms, temperature, and volume constant</i>
DAD maps	<i>Dual-activity difference maps</i> (mapas de diferencia de actividad dual)	NPT	<i>Isothermal-isobaric ensemble, pressure and temperature constant</i>
TAD maps	<i>Triple-activity difference maps</i> (mapas de diferencia de actividad triple)	PME	<i>Particle mesh Ewald</i>
SMILES	<i>Simplified Molecular Input Line Entry Specification</i> (especificación de introducción lineal molecular simplificada)	ns	Nanosegundos
MACCS	<i>Molecular ACCESS System</i>	ps	picosegundos
EStateIndices	<i>Electrotopological state indices</i>	RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i> (desviación de la media cuadrática)
TopAtomPairs	<i>Topological atom pairs</i>	RMSF	<i>Root Mean Square fluctuations</i> (desviación cuadrática de la fluctuación)
TopAtomTorsions	<i>Topological atom torsions</i>	MM-PBSA	<i>Molecular Mechanics/Poisson-Boltzmann Surface Area</i>
TopAtomTriplets	<i>Topological atom triplets</i>	MAX	Máximo
TopPh4Pairs	<i>Topological pharmacophore atom pairs</i>	Median	Mediana
TopPh4Triplets	<i>Topological pharmacophore atom triplets</i>	Min	Mínimo
Ph	Fenilo	STD	<i>Standard deviation</i> (desviación estandar)
Na ⁺	Catión sodio	Q1	Primer cuartil
Cl ⁻	Ion cloruro	Q3	Tercer cuartil
Bpin ₂	Dipinacoldiborano	PDB	<i>Protein Data Bank</i>
OTf	Triflato (OSO ₂ CF ₃)	-H	Hidrógeno
PPh ₃	Trifenilfosfina	-CH ₃	Metilo
SPhos	2-Diciclohexilfosfino-2',6'-dimetoxibifenilo	ccf	Cromatografía en capa fina
dppf	1,1'-Bis(difenilfosfino)ferroceno	δ	Desplazamiento químico
Pd(dtbpf)Cl ₂	[1,1'-Bis(di- <i>terc</i> -butilfosfino)ferroceno] dicloropaladio(II)	D	Deuterio
NHC	<i>N-heterocyclic carbene palladium complex</i>	MHz	Megahertz
Xantphos	4,5-Bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilxantano	J	Constante de acoplamiento
Pd(dppf)Cl ₂ •CH ₂ Cl ₂	[1,1'-Bis(difenilfosfino)ferroceno]	ppm	Partes por millón

	dicloropaladio(II), complejo con diclorometano		
Pd(PPh ₃) ₄	Tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0)	IE ⁺	Impacto electrónico
Na ₂ CO ₃	Carbonato de potasio	DART	<i>Direct analysis in real time</i> (análisis directo en tiempo real)
TBHP	hidroperóxido de <i>t</i> -butilo	EM-AR	Espectrometría de masas alta resolución
DHA	Ácido docosaheptaenoico	S _N 2	Sustitución nucleofílica bimolecular
ALA	Ácido α -linolénico	SNAr	Sustitución nucleofílica aromática
TZD	Tiazolidindionas	Å	Amstrong (1x10 ⁻¹⁰ m)
L	Ligante	%	Porcentaje
PyBOP	<i>Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate</i> (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio <i>(1-Cyano-2-ethoxy-2-oxoethylidenaminoxy)dimethylamino-morpholino-carbenium hexafluorophosphate</i>	nM	Nanomolar
COMU	<i>DL-α-Tocopherol methoxypolyethylene glycol succinate</i>	μ M	Micromolar
TPGS-750	bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio	M	Molar
MTT	Ácido desoxiribonucleico	T. Amb.	Temperatura ambiente
ADN	1,2-dimetoxietano (glima)	MW	Microondas
DME	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>	h	Hora(s)
DMEM	Etanol	min	Minuto(s)
EtOH	4-metilmorfolina	nm	Nanómetros
NMM	Trietilamina	eq	Equivalentes
Et ₃ N	<i>N,N'</i> -dimetilformamida	mmol	milimol
DMF		mL	Militros
MeCN	Acetonitrilo	°C	Grados Celsius
DMSO	Dimetilsulfóxido	p.f.	Punto de fusión
AcOH	Ácido acético	wt	<i>Weight</i> (peso)
THF	Tetrahidrofurano	v/v	Relación volumen/volumen
AcOEt	Acetato de etilo		
MeOH	Metanol		
SW620	Línea celular de cáncer de colon		
HeLa	Línea celular de cáncer cérvico-uterino		
SKLU-1	Línea celular de cáncer de pulmón		
AMPA	Receptor del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico		
IR	Receptor de insulina		
IRS	<i>Insulin receptor substrates</i> (Sustratos del receptor de insulina)		
RMN	Resonancia magnética nuclear		
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno		
RMN ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13		
RMN ¹⁹ F	Resonancia magnética nuclear de flúor 19		

Índice

Resumen.....	1
Abstract	2
Introducción	3
Hipótesis	8
Objetivo general.....	8
Objetivos particulares	8
Capítulo I <i>Análisis quimioinformático de inhibidores de AKT</i>	9
1.1. Introducción.....	10
1.2. Justificación.....	12
1.3. Objetivos	13
1.4. Metodología.....	13
1.4.1. Base de datos	13
1.4.2. Similitud estructural.....	13
1.4.3. Panoramas de actividad e identificación de <i>activity cliff generators</i>	15
1.5. Resultados y discusión	18
1.5.1. Distribución de las medidas de similitud y selección de representaciones estructurales	18
1.5.2. Panorama de actividad – Mapas SAS.....	20
1.5.3. Mapas TAD-2D	26
1.6. Conclusiones	29
Capítulo II <i>Diseño de piridinas trisustituidas como inhibidores de AKT</i>	31
2.1. Introducción.....	32
2.2. Justificación.....	35
2.3. Objetivos	35
2.4. Estudios computacional.....	36
2.4.1. Modelado por homología de la isoforma AKT3.....	36
2.4.2. Acoplamiento molecular.....	36
2.4.3. Dinámica molecular.....	37
2.5. Resultados y discusión	39
2.5.1. Diseño basado en la estructura	39
2.5.2. Estudios de acoplamiento molecular	41
2.5.3. Dinámica molecular.....	51
2.5.4. Relevancia de las isoformas de AKT.....	62
2.6. Conclusiones	65
Capítulo III <i>Síntesis y evaluación de piridinas trisustituidas</i>	67
3.1. Introducción.....	68
3.2. Justificación.....	71
3.3. Objetivos	72
3.4. Metodología.....	74
3.4.1. Metodología parte química	74
3.4.1.1. Síntesis del intermediario 6-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-2 <i>H</i> -1,4-benzoxazin-3(4 <i>H</i>)-ona (Int4)	74
3.4.1.2. Síntesis de compuestos de la Serie 1.....	75
3.4.1.3. Síntesis de compuestos de la Serie 2.....	75
3.4.2. Metodología parte biológica.....	77
3.4.2.1. Determinación de citotoxicidad en líneas celulares cancerosas.....	77
3.5. Resultados y discusión	78
3.5.1. Parte química	78

3.5.1.1. Síntesis Serie 1: síntesis de 4-aryl-2,6-dicloropiridinas.....	80
3.5.1.2. Síntesis Serie 1: síntesis de piridinas trisustituidas.....	83
3.5.1.3. Síntesis Serie 2: síntesis de piridinas trisustituidas.....	86
3.5.2. Parte biológica.....	89
3.5.2.1. Evaluación de la actividad citotóxica de piridinas 2,4,6-trisustituidas.....	89
3.6. Conclusiones.....	94
Anexo I <i>Ruptura oxidativa de éteres de enol en agua a temperatura ambiente</i>	100
Introducción.....	101
Objetivos particulares.....	104
Resultados y Discusión.....	105
Conclusiones.....	110
Anexo II <i>Homología de AKT3 y modo de unión de ligandos en las isoformas de AKT</i>	111
Anexo III <i>Procedimientos de síntesis y caracterización de los compuestos obtenidos</i>	118
Anexo IV <i>Espectros</i>	143
Anexo V <i>Publicaciones</i>	259

Resumen

Las Enfermedades Crónico-Degenerativas (ECD) representan en la actualidad la principal causa de muerte a nivel mundial. Particularmente, el cáncer (en especial de mama, próstata y pulmón) es una de las principales ECD que tienen alta incidencia y mortalidad. La quimioterapia es la principal opción para tratar esta enfermedad, lo cual permite mejorar significativamente la salud y ayuda a prolongar la esperanza de vida de los pacientes. Si bien actualmente se cuenta con una amplia gama de tratamientos, desafortunadamente se presentan casos de resistencia, respuesta farmacológica variada y efectos adversos. Por estas razones, continuar con la búsqueda de moléculas activas potentes y selectivas que actúen en blancos relevantes de la enfermedad continua siendo muy importante.

El presente trabajo de tesis busca brindar información que sea útil para el desarrollo de compuestos anticancerígenos. Adicional a esto, también busca brindar información en la aplicación de la química verde en la síntesis orgánica. La primera parte del trabajo está dedicado a la obtención de compuestos anticancerígenos. Aquí, se seleccionó a las AKT cinasas como un blanco atractivo y relevante para el desarrollo de moléculas, ya que éstas juegan un papel vital en el desarrollo y proliferación del cáncer, por lo que su inhibición permitiría eliminar las células cancerosas. En un primer estudio, se utilizó el concepto de panorama de actividad para estudiar las relaciones estructura-actividad de inhibidores reportados sobre las tres isoformas de AKT, lo cual permitió conocer las porciones estructurales que favorecen la actividad y también la selectividad hacía alguna isoforma de AKT. Luego, a través de la optimización y evaluación *in silico* se propusieron nuevas piridinas trisustituidas como inhibidores de AKT, de estos estudios se seleccionaron y sintetizaron 20 compuestos con núcleo base de piridina 2,4,6-trisustituida utilizando reacciones de acoplamiento catalizadas por paladio. Los compuestos se evaluaron en líneas celulares cancerosas de mama, colon y pulmón, donde dos compuestos (**S1-3** y **S1-9**) mostraron actividad citotóxica moderada. En la última parte del trabajo se presenta la aplicación de la química verde usando sistemas micelares para efectuar reacciones orgánicas en agua a temperatura ambiente, en particular se presenta su aplicación en la ruptura oxidativa de éteres de enol.

Abstract

Noncommunicable Diseases (NCD) currently represents the main cause of death worldwide. In particular, cancer (especially breast, prostate and lung cancers) is the leading NCD with high incidence and mortality in the world. Chemotherapy is the first option to attend this disease; it can help to improvement and extend the life of patients. Nowadays a wide variety of treatments exist for cancer, unfortunately this disease have generated resistance in patients, have varied pharmacological response and side effects. All these reasons show the necessity to continue the efforts to develop potent and selective bioactive compounds that act in relevant targets present in these diseases.

The present thesis seeks to provide useful information for the development of anticancer compounds. In addition to this, it shows an example of organic synthesis using a green chemistry approach. The first part of the work is dedicated to identify anticancer agents. For this, the AKT kinases were selected as attractive and relevant targets to generate inhibitors, since they play a key role in progress and proliferation of cancer. In a first study, the activity landscape of AKT inhibitors was generated to study the structure-activity relationship of inhibitors against the three AKT isoforms; this was useful to establish the structures that favor the activity and also selectivity against a particular isoform. Then, using an *in silico* approach, a series of novel trisubstituted pyridines were designed and postulated as AKT inhibitors. From the computational studies, 20 compounds with the 2,4,6-trisubstituted pyridine scaffold were synthesized through cross-coupling reactions using palladium as a catalyst. The target compounds were evaluated against cancer cell lines of breast, colon and lung, where two compounds (**S1-3** and **S1-9**) shown moderate cytotoxicity effect. In the last part of the work, the application of green chemistry using micelles to carry out organic reactions in water at room temperature is shown, in particular for its application in oxidative bond cleavage of enol ethers.

Introducción

Las enfermedades crónico-degenerativas (ECD) son una condición médica o enfermedad que progresa lentamente por un periodo prolongado de tiempo y son resultado de una combinación de factores genéticos, fisiológicos, de comportamiento y ambientales. Las enfermedades crónico-degenerativas son en la actualidad la principal causa de muerte a nivel mundial, matando más personas que otras causas de muerte combinadas. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), de las 57 millones de personas que mueren anualmente, 40 millones mueren a causa de una ECD, equivalente al 70% de las muertes totales. De estos números, 15 millones de personas mueren cada año en edades de 30 a 69 años, lo cual ocurre en edades productivas de los individuos causando pérdidas significativas en el campo laboral. Las principales ECD son enfermedades cardiovasculares, siendo la principal causa de muerte, las cuales causan la muerte de 17.7 millones de personas anualmente, seguido por cáncer con 8.8 millones, enfermedades respiratorias crónicas 3.9 millones, y diabetes con 1.6 millones. Es importante mencionar, que el 80% de las muertes por ECD ocurren en países con bajos y medios ingresos, principalmente es países de América, del este del mediterráneo, sureste asiático y del pacifico occidental. Las proyecciones de las OMS para las ECD son alarmantes ya se proyecta un aumento significativo del número de muertes en la siguiente década con una alza del 15% entre 2010 y 2020 ¹.

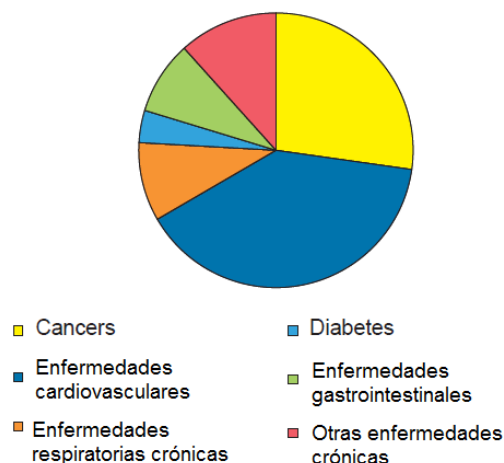


Figura 1. Principales enfermedades crónico-degenerativas y su distribución a nivel mundial.

El incremento de las ECD se ha impulsado por factores que incluyen la rápida urbanización no planificada, la globalización, estilos de vida poco saludables y el envejecimiento de la población. Las dietas poco saludables y la falta de actividad física en las personas traen como consecuencia aumento de la presión arterial, aumento de la glucosa en sangre, elevación de lípidos en sangre y obesidad. Estos son llamados factores de riesgo metabólicos. Por otra parte, el consumo de tabaco, la inactividad física, la mala alimentación y el uso nocivo del alcohol, también aumentan el riesgo de desarrollar alguna ECD.

Cáncer

Cáncer es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. Una característica definitoria del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales. Las células anormales pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos en un proceso que se denomina metástasis el cual es la principal causa de muerte por cáncer.

El cáncer es la segunda causa de morbilidad y mortalidad en el mundo, con 14 millones de nuevos casos anualmente. Se prevé que el cáncer sea una causa cada vez más importante de morbilidad y mortalidad en los próximos años, con un aumento de 70% en las próximas dos décadas. En 2008 se detectaron 12,7 millones de nuevos casos de cáncer, se estima esta cifra aumentará a 21,4 millones para 2030, dos tercios de todos los diagnósticos de cáncer ocurrirán en países de bajos y medianos ingresos. Alrededor de un tercio de las muertes por cáncer se debe a los cinco principales factores de riesgo conductuales y dietéticos: índice de masa corporal elevado, ingesta reducida de frutas y verduras, falta de actividad física, consumo de tabaco y consumo de alcohol. La detección de cáncer en una fase avanzada y la falta de diagnóstico y tratamiento son problemas frecuentes. En 2015, solo el 35% de los países de ingresos bajos informaron de que la sanidad pública contaba con servicios de patología para

atender a la población en general. Más del 90% de los países de ingresos altos ofrecen tratamiento a los enfermos oncológicos, mientras que en los países de ingresos bajos este porcentaje es inferior al 30% ².

De los tipos de cáncer, el cáncer de próstata y pulmón son los más frecuentemente diagnosticados en hombres, mientras que para las mujeres el cáncer de mama y pulmón son los más frecuentes.

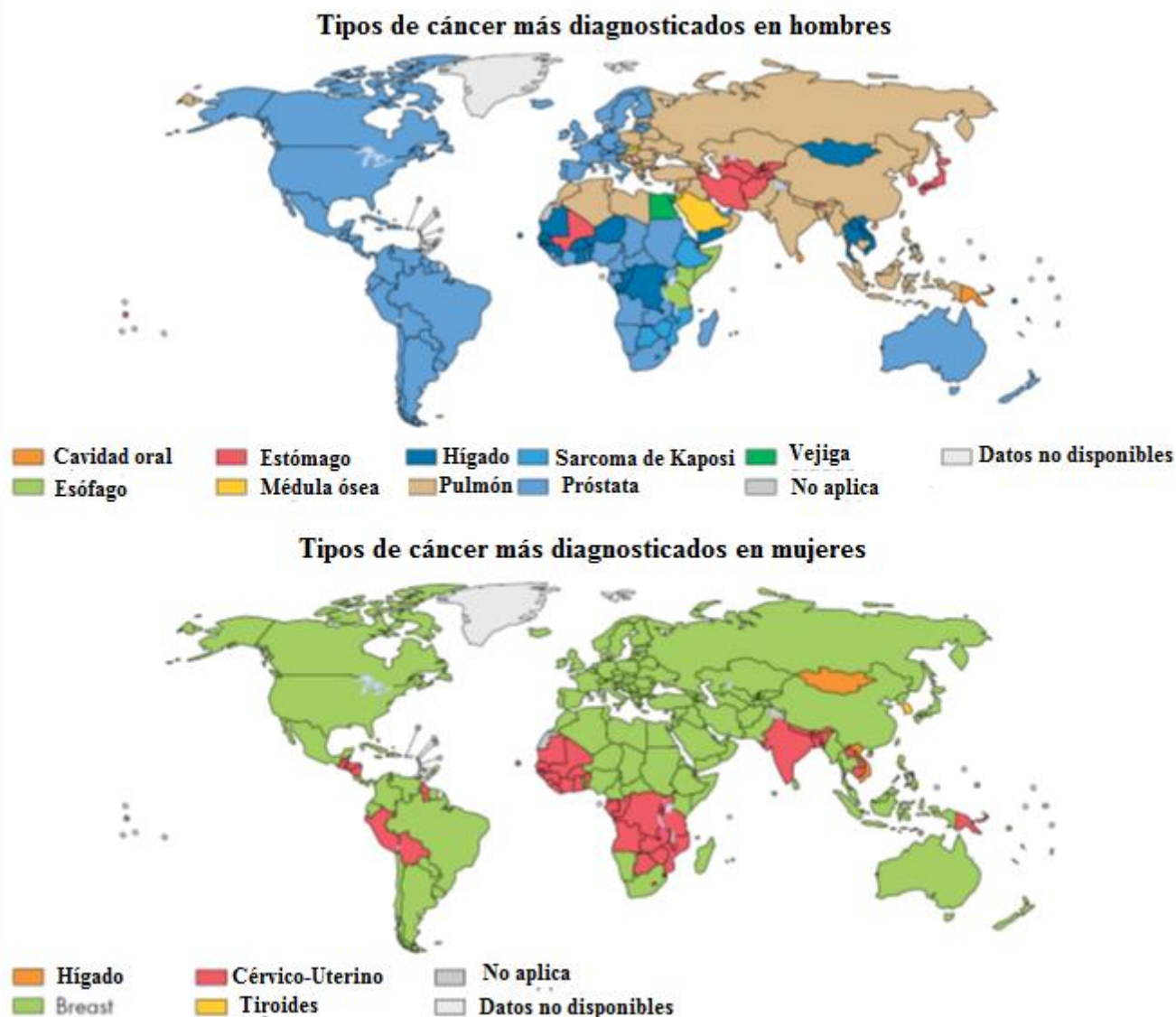


Figura 2. Distribución de los principales tipos a nivel mundial en hombre y mujeres.

En México, el cáncer es la tercera causa de muerte sólo detrás de las enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo 2. Cada año se detectan 190 mil nuevos casos y 70 mil personas

mueren a causa de algún tipo de cáncer. Los tipos de cáncer más frecuentes en la población masculina son el de próstata, seguido por el de vías respiratorias (pulmón o esófago), estómago e hígado. En el caso de las mujeres, el cáncer de mama y cérvico-uterino son los más frecuentes, Figura 3 ³.

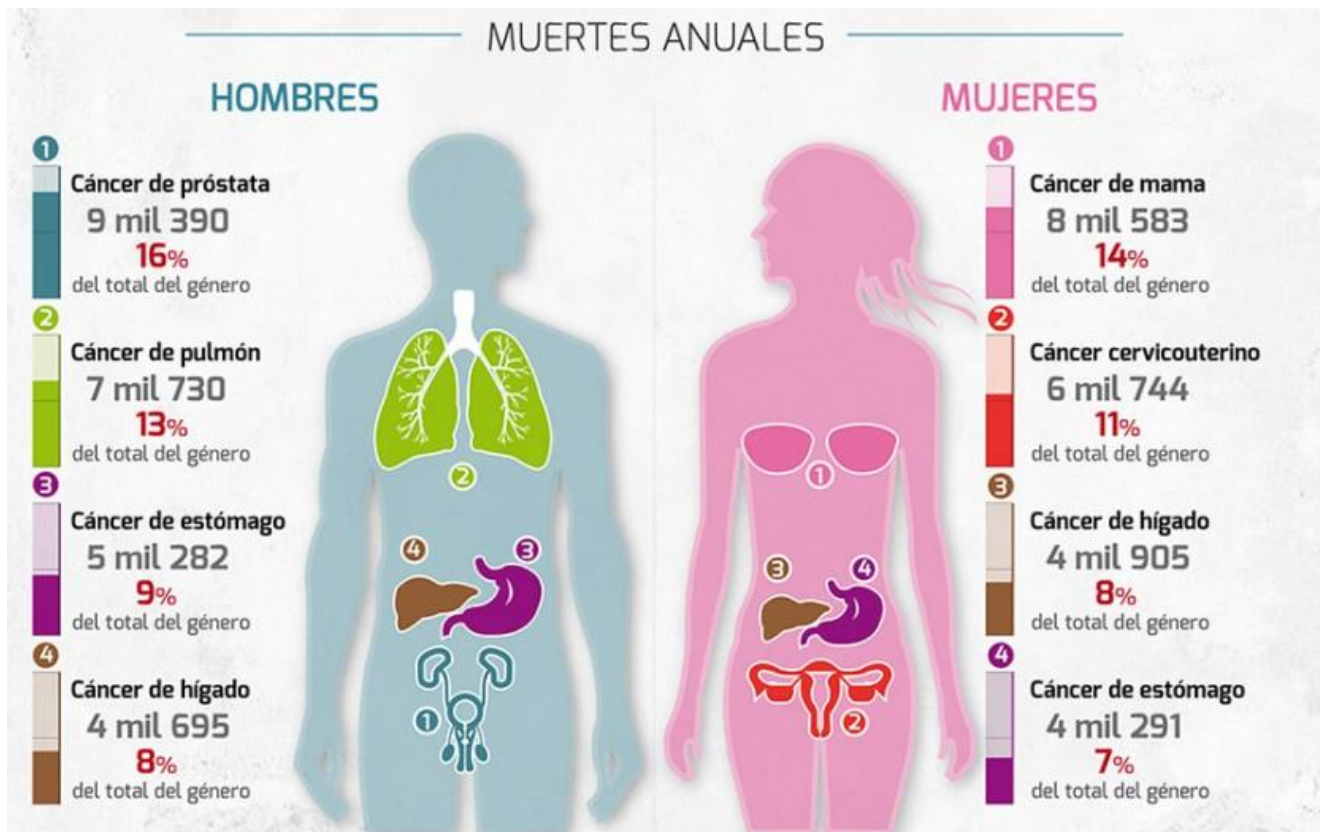


Figura 3. Distribución de los tipos de cáncer más frecuentes en la población mexicana.

Existen diferentes opciones de tratamiento según el tipo y estado de desarrollo del cáncer. Dentro de las opciones de tratamiento para combatir el cáncer se encuentran la cirugía, radioterapia y la quimioterapia. La cirugía suele ser exitosa y es posible efectuarse si el cáncer es sólido, focalizado y en un área operable. La radioterapia consiste en administrar radiación gamma o rayos X en la sección del cuerpo donde se encuentre el tumor. La quimioterapia es la administración de fármacos que afecten los procesos celulares de las células cancerosas en particular. Suele ser el tratamiento de primera elección para algunos tipos de cáncer y es también administrada en combinación con la cirugía y radioterapia. En la quimioterapia del cáncer existen diversas opciones de farmacológicas entre las cuales se encuentran agentes alquilantes (mostazas nitrogenadas, cisplatino), antimetabolitos (5-fluorouracilo,

análogos de folato), inhibidores de la replicación y división celular (hidroxiureas, taxanos), anticuerpos (Rituximab, Trastuzumab), inhibidores de cinasas (imatinib, sunitinib). A pesar de estas opciones, debido a la importancia de la enfermedad a nivel mundial, el reporte de casos de resistencia a algunos tratamientos, respuesta farmacológica variada y efectos adversos, la búsqueda de nuevos blancos anticancerígenos para el desarrollo de potentes y efectivos anticancerígenos está siendo de gran interés para la academia y la industria farmacéutica ⁴.

Hipótesis

Mediante el uso de metodologías computacionales será posible la identificación y optimización de moléculas anticancerígenas. Estos resultados a su vez serán útiles para el diseño de nuevas estructuras, las cuales se sintetizarán para comprobar su actividad en cinasas propuestas en este trabajo como blancos anticancerígenos.

Objetivo general

Identificar moléculas con potencial anticancerígeno a través de la inhibición de un grupo particular de cinasas, blancos moleculares importantes en dicha enfermedad.

Objetivos particulares

1. Seleccionar blancos moleculares para la identificación y diseño de nuevas estructuras que muestren actividad anticancerígena.
2. Emplear metodologías computacionales como el panorama de actividad, acoplamiento molecular y dinámica molecular para el diseño de moléculas con actividad anticancerígena y antidiabética
3. Sintetizar compuestos derivados de los estudios computacionales para evaluar su potencial anticancerígeno.
4. Realizar ensayos biológicos de actividad anticancerígena para determinar el potencial citotóxico de los compuestos sintetizados, y con esto también establecer la validez de los estudios computacionales.
5. Conocer metodologías de síntesis orgánica con un enfoque de Química Verde que puedan ser aplicables en reacciones químicas bien conocidas y de alto impacto en el área.

Capítulo I

Análisis quimioinformático de inhibidores de AKT

1.1. Introducción

Las relaciones estructura-actividad (SAR por sus siglas en inglés) tienen un rol importante para obtener información que puede ser utilizada para la optimización de moléculas *hit* o moléculas líder (*lead*). Las relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR por sus siglas en inglés) es uno de los métodos más conocidos para analizar las relaciones SAR de bases de datos de compuestos; sin embargo, bases de datos muy grandes y diversas limitan el uso de los métodos QSAR ya que para el desarrollo de modelos se necesita que las estructuras que conforman la base de datos tengan características similares (misma estructura base o *scaffold*)^{5,6}. Los modelos QSAR están basados en el principio de similitud, donde se asume que moléculas similares tendrán actividades similares, sin embargo, este concepto no siempre se cumple y es común encontrar moléculas similares que presentan actividades muy diferentes, en modelos QSAR estas moléculas se encuentran como valores atípicos (*outliers*) ya que no siguen una tendencia lineal⁵. Si bien este comportamiento contradice el principio de similitud, es muy común encontrar compuestos con esta naturaleza por lo que a estas moléculas se les conoce como *activity cliff*, los cuales se definen por la relación entre la diferencia de actividad para dos compuestos y su distancia en un espacio químico (similitud estructural)⁵. Para resolver este problema, el desarrollo del panorama de actividad (*activity landscape*) es una metodología que ha ganado interés ya que pueden estudiar las relaciones SAR de bases de datos extensas (cientos o miles) y con alta diversidad estructural^{7,8}. El panorama de actividad es una representación gráfica que permite analizar el espacio químico y la actividad biológica. Además, una de las características de las representaciones del panorama de actividad es que facilitan la detección de *activity cliffs*. La ventaja de encontrar *activity cliff* es que brindan información valiosa para la optimización de estructuras que mejoren la actividad biológica^{8,9}.

El panorama de actividad se puede conceptualizar como una representación del espacio químico de una serie de compuestos en relación con su actividad biológica. En esta superficie, los compuestos con mayor similitud estructural se localizan en regiones cercanas del espacio, mientras que compuestos diferentes se encuentran en regiones más alejadas. Como se ejemplifica en la Figura 1.1, el SAR continuo se representa por pequeñas colinas, lo que indica que pequeños cambios estructurales producen pequeños cambios en la actividad biológica. El SAR discontinuo presenta un panorama más accidentado debido a que pequeñas modificaciones estructurales generan cambios sustanciales en la actividad biológica. Usualmente el comportamiento de bases de datos suelen presentar una combinación de ambos panoramas de actividad, por lo que se le conoce como SAR heterogéneo^{10,11}.

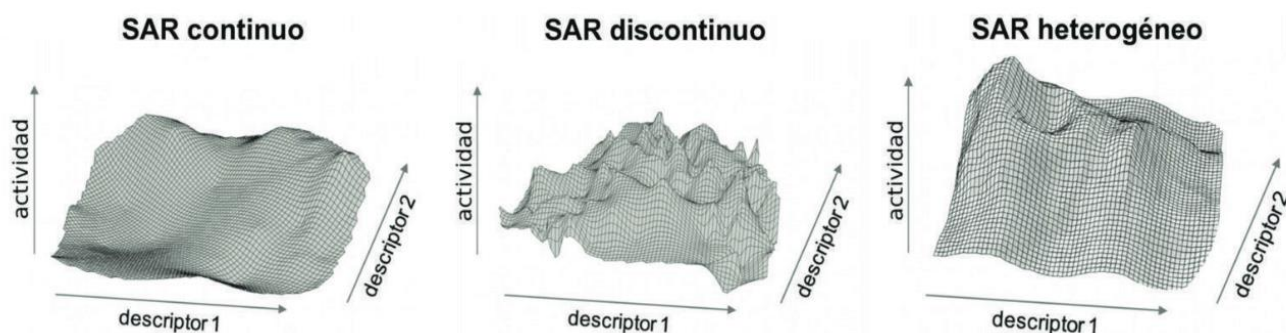


Figura 1.1. Representación esquemática de los diferentes tipos de SAR.

Para la caracterización del panorama de actividad se emplean herramientas de visualización como los mapas de similitud estructura-actividad (mapas SAS, *Structure-Activity Similarity maps*), los cuales se construyen graficando la similitud estructural contra la similitud en la actividad de pares de compuestos^{10,11}. Además de estos mapas, se han desarrollado mapas de diferencia de actividad dual (mapas DAD) y triples (mapas TAD) para evaluar las comparaciones pareadas con la actividad contras dos o tres receptores^{12,13}.

1.2. Justificación

El panorama de actividad es una metodología muy importante para la caracterización cuantitativa de bases de datos amplias y/o diversas. Con esta metodología se pueden identificar moléculas que a pesar de ser similares tienen una gran diferencia de actividad, las cuales son muy importantes para optimización. En este sentido, los inhibidores de cinasas para el tratamiento del cáncer han sido uno de los casos más exitosos para el tratamiento de esta enfermedad. Actualmente, diversos inhibidores se encuentran en el mercado y muchos más están siendo desarrollados en diferentes cinasas. Estudios del panorama de actividad en diferentes cinasas ha permitido caracterizar estructuralmente diversos inhibidores, lo que ha permitido establecer algunas o varias características estructurales que favorecen su actividad y más aún que sean selectivos. En particular, las AKT cinasas son un grupo de cinasas que tiene una gran relevancia en cáncer, ya que su sobreexpresión e hiperactivación conlleva al desarrollo y progresión de esta enfermedad. Por su relevancia diversos inhibidores, particularmente del sitio de unión a ATP, se han desarrollado. Estos inhibidores se han diseñado mediante técnicas del diseño basado en el receptor o mediante análisis SAR con buenos resultados en general; sin embargo, ninguna caracterización del espacio químico o estudios SAR de inhibidores de AKT ha sido desarrollado. Por lo que el panorama de actividad es una alternativa atractiva para la caracterización conjunta de diversos inhibidores y su comportamiento en cada isoforma de AKT, lo cual podría ayudar a la optimización de futuras estructuras que sean más potentes y selectivas.

1.3. Objetivos

- 1) Analizar las relaciones estructura-actividad de inhibidores de las isoformas de AKT mediante el modelo de panorama de actividad.
- 2) Identificar y cuantificar las estructuras con alta similitud estructural con grandes cambios en actividad para cada isoforma. Identificar las porciones estructurales que conllevan al cambio radical en la actividad biológica mediante estudios de acoplamiento molecular.
- 3) Analizar mediante el panorama de actividad la información conjunta de las actividades en las tres isoformas de AKT para identificar promiscuidad y selectividad.

1.4. Metodología

1.4.1. Base de datos

La estructura de los compuestos y su actividad se tomó de la base de datos pública *Binding Database*¹⁴ y de la literatura científica¹⁵⁻¹⁹. Se consideraron únicamente los compuestos inhibidores del sitio de unión a ATP y con valores de inhibición de CI_{50} . Se recopiló un total de 50 moléculas con actividad inhibitoria en las tres isoformas de AKT. La representación de las estructuras con el código SMILES y sus correspondientes pCI_{50} se enlistan en el Anexo 1. Para AKT1, el valor de pCI_{50} va del rango de 6.2 a 9.0, para AKT2 va del rango de 5.52 a 9.0 y para AKT3 va del rango de 6.4 a 9.0.

1.4.2. Similitud estructural

Se empleó el programa libre MayaChemTools²⁰ para calcular las siguientes representaciones moleculares (*fingerprints*) de dos dimensiones (2D) de las moléculas seleccionadas: atom neighborhoods²¹, atom types, electrotopological state indices (EStateIndices)²², extended connectivity²³, MACCS (322 bits)²⁴, path length, topological atom pairs (TopAtomPairs)²⁵, topological atom

torsions (TopAtomTorsions) ²⁶, topological atom triplets (TopAtomTriplets), topological pharmacophore atom pairs (TopPh4Pairs) ²⁷ y topological pharmacophore atom triplets (TopPh4Triplets) ²⁸. Estas representaciones se complementaron con las representaciones 2D y 3D proporcionadas por el programa MOE usando una conformación de mínima energía calculada con el campo de fuerza MMFF94x: BIT MACCS (166 bits), GpiDAPH3, typed graph distances (TGD) y typed graph triangles (TGT), typed atom distances (TAD), typed atom triangles (TAT), piDAPH3 y piDAPH4; y las proporcionadas por el programa ROCS (Rapid Overlay of Chemical Structures por sus siglas en inglés, presente el programa Openeye): ComboScore/2 y ShapeTanimoto.

Para determinar la similitud entre los compuestos se empleó el coeficiente de Tanimoto ²⁹, el cual establece que para las moléculas C_i y C_j la similitud estructural por pares (T_{ij}) se obtiene de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$T_{ij} = \frac{C_{ij}}{C_i + C_j - C_{ij}}$$

donde T_{ij} es la similitud molecular entre la i -ésima y la j -ésima molécula, C_{ij} es el número total de características en común, C_i es el número total de características en la i -ésima moléculas y C_j es el número total de características en la j -ésima molécula. El número total de comparaciones pareadas sin repetición se obtuvo con la siguiente ecuación:

$$No. \text{ pares} = n(n-1)/2$$

Para cada representación, 1225 pares de similitud se calcularon para los 50 compuestos. La similitud promedio (*mean similarity*) se determinó con base en la selección de las representaciones no correlacionadas en función de su distribución y parámetros estadísticos. En este caso, la similitud promedio se obtuvo de la combinación de las tres representaciones EStateIndices, TopologicalPharmacophoreAtomPairs y ShapeTanimoto.

Similitud de actividad

La similitud de actividad se calculó como la diferencia de actividad que existe entre cada compuesto inhibidor de las isoformas de AKT en la base de datos, esto se determinó con la ecuación

$$|\Delta pIC_{50}(R)_{ij}| = |pIC_{50}(R)_i - pIC_{50}(R)_j|$$

donde $pIC_{50}(R)_i$ y $pIC_{50}(R)_j$ son las actividades de la i -ésima y j -ésima molécula hacia el tipo de isoforma (R) ¹³. En este trabajo R= AKT1, AKT2 y AKT3.

1.4.3. Panoramas de actividad e identificación de *activity cliff generators*

Para cada isoforma de AKT se construyó un mapa de similitud estructura-actividad (*Structure-Activity Similarity*, SAS) graficando el valor absoluto de la diferencia en potencia contra la similitud estructural para cada par de compuestos. Con el fin de caracterizar cuantitativamente los mapas SAS, cada gráfico se dividió con base en los límites de diferencia en potencia y similitud estructural a lo largo del eje X y Y respectivamente; éstos contienen la información del número de pares en cada región generada (región I–IV). En este trabajo se usó un umbral de 1 unidad logarítmica del valor absoluto de la diferencia en potencia. El umbral para la similitud estructural se definió de acuerdo a la similitud promedio para la base de datos usando los tres *fingerprints* seleccionados (similitud promedio 0.45). Las cuatro principales regiones del mapa SAS (región I–IV) se identificaron e interpretaron de acuerdo a reportes previos de nuestro grupo. Usando los mapas SAS para cada isoforma, se cuantificó el número de *activity cliffs* consenso que forma cada compuesto en la base de datos, en particular de la frecuencia de cada compuesto en la región de pares de compuestos IV del mapa SAS ^{30,31}. Compuestos con alta asociación de *activity cliffs* se designaron como generadores de *activity cliff* (en inglés *AC generators*), los cuales se definen como estructuras moleculares con alta probabilidad de formar *activity cliffs* con moléculas evaluadas en el mismo ensayo biológico. La determinación de los generadores de AC se realizó de acuerdo a reportes previos ³².

Para el panorama de actividad en tres blancos moleculares usando mapas de color 2D de diferencia de actividad triple. Las diferencias en potencia para cada par en el conjunto de datos contra las tres isoformas se calcularon de acuerdo a lo descrito previamente en la literatura. Las líneas verticales y horizontales en $\Delta pCI_{50 \pm t}$ definen los límites para la diferencia de potencia baja/alta para los blancos I y II, respectivamente. La tercera actividad se representó usando una escala de color continua de verde (baja diferencia en actividad) a rojo (alta diferencia en actividad). Se seleccionó $t=1$, una unidad logarítmica o 10 veces el cambio de actividad, por lo que los puntos de la base de datos se consideraron con baja diferencia en potencia si $-1 \leq \Delta pIC_{50} \leq 1$ para cada isoforma. Los límites dan lugar a cinco zonas diferentes, TZ1–TZ5. Un ejemplo de mapa TAD 2D y su interpretación se muestra en la Figura 1.2^{30,33}.

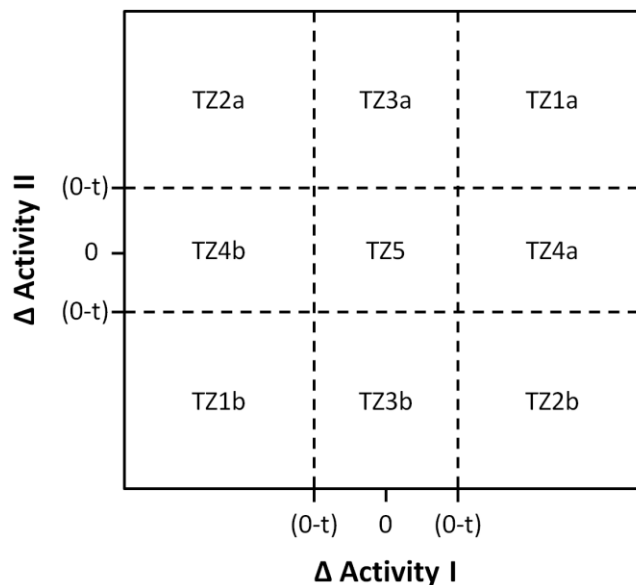


Figure 1.2. Forma general de un mapa de color TAD 2D. La tercera actividad se representó usando una escala continua de color de verde a rojo.

Tabla 1.1. Distribución y descripción de los pares en el mapa TAD 2D

Región	Color del punto	Interpretación	Cambio estructural
TZ1a	Verde	<i>Activity cliff</i> triple	Disminuye la actividad para las tres receptores
	Rojo	<i>Activity switch</i> dual	Disminuye la actividad para el receptor 1 y 2 pero incrementa la actividad para el receptor 3
TZ1b	Verde	<i>Activity switch</i> dual	Incrementa la actividad para el receptor 1 y 2 pero disminuye para el receptor 3
	Rojo	<i>Activity cliff</i> triple	Incrementa la actividad para los tres receptores
TZ2a	Verde	<i>Activity switch</i> dual	Disminuye la actividad para el receptor 2 y 3 pero incrementa la actividad para el receptor 1
	Rojo	<i>Activity switch</i> dual	Incrementa la actividad para el receptor 1 y 3 pero disminuye la actividad para el receptor 2
TZ2b	Verde	<i>Activity switch</i> dual	Disminuye la actividad para el receptor 1 y 3 pero disminuye la actividad para el receptor 2
	Rojo	<i>Activity switch</i> dual	Incrementa la actividad para el receptor 2 y 3 pero disminuye la actividad en el receptor 1
TZ3a	Verde	<i>Activity cliff</i> dual	Disminuye la actividad para el receptor 2 y 3 pero no afecta la actividad del receptor 1
	Rojo	<i>Activity switch</i> sencillo	Disminuye la actividad para el receptor 2, incrementa la actividad para el receptor 3, pero no afecta la actividad del receptor 1
TZ3b	Verde	<i>Activity switch</i> sencillo	Incrementa la actividad para el receptor 2, disminuye la actividad para el receptor 3, pero no afecta la actividad del receptor 1
	Rojo	<i>Activity cliff</i> dual	Incrementa la actividad para el receptor 2 y 3 pero no afecta a actividad del receptor 1
TZ4a	Verde	<i>Activity cliff</i> dual	Disminuye la actividad para el receptor 1 y 3 pero no afecta la actividad para el receptor 2
	Rojo	<i>Activity switch</i> sencillo	Disminuye la actividad para el blanco 1, incrementa la actividad para el receptor 3, pero no afecta la actividad para el receptor 2
TZ4b	Verde	<i>Activity switch</i> sencillo	Incrementa la actividad para el receptor 1, disminuye la actividad para el receptor 3, pero no afecta la actividad para el receptor 2
	Rojo	<i>Activity cliff</i> dual	Incrementa la actividad para el receptor 1 y 3 pero no afecta la actividad para el receptor 2
TZ5	Ambos	<i>Activity cliff</i> sencillo	Incrementa o disminuye la actividad para el receptor 3 pero no afecta la actividad para el receptor 1 y 2

1.5. Resultados y discusión

1.5.1. Distribución de las medidas de similitud y selección de representaciones estructurales

En la Figura 1.3 se representa Función de Distribución Acumulada para la diversidad estructural de las 1225 comparaciones pareadas correspondiente a los 50 compuestos de la base de datos. Ya que el panorama de actividad es dependiente de la representación molecular que se utilice, este tipo de funciones permiten seleccionar que representaciones diferencian mejor a los compuestos que conforman la base de datos.

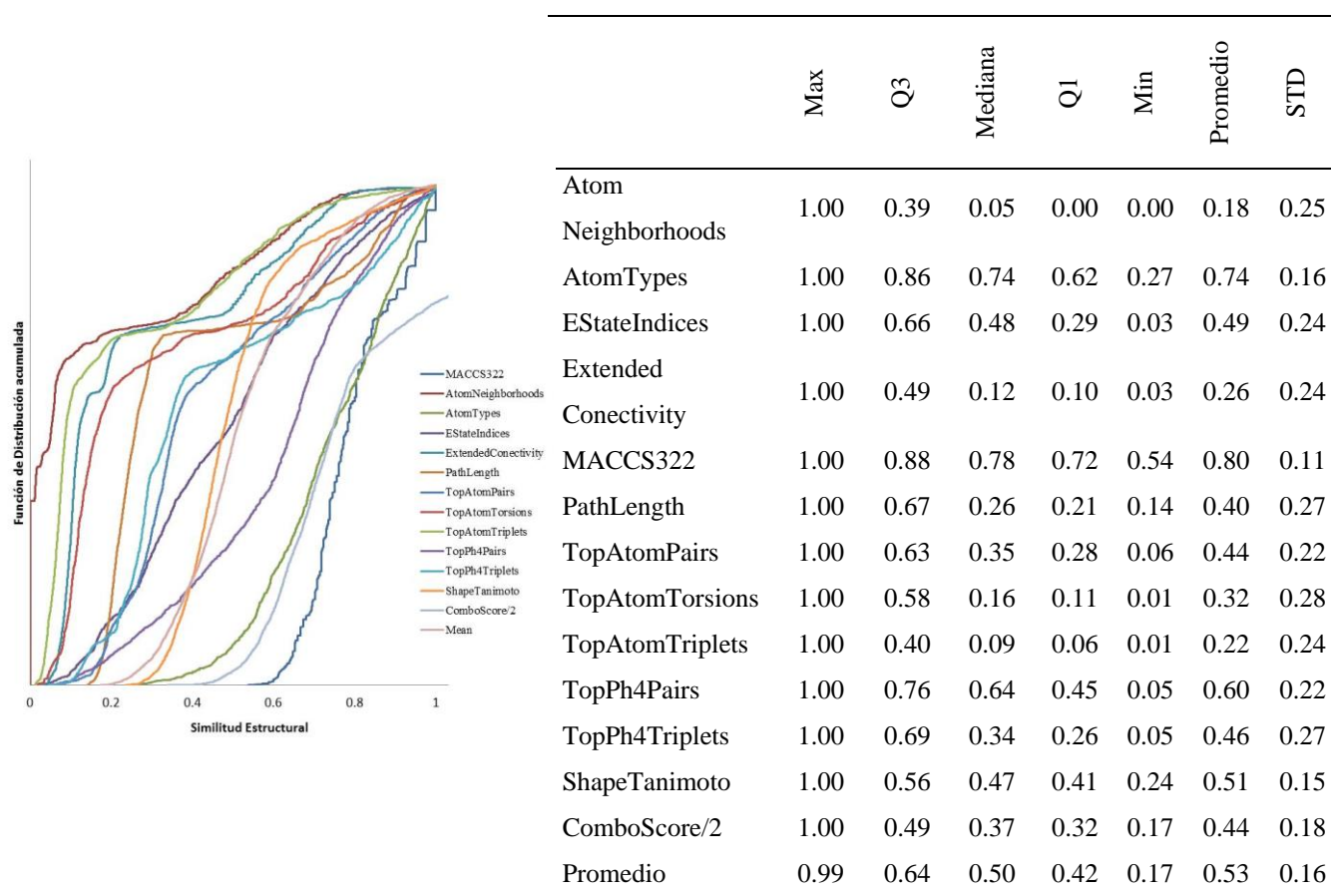


Figura.1.3. Función de distribución acumulada de los 1225 pares de similitudes estructurales usando diferentes representaciones 2D y 3D. La tabla resume la información de distribución. Q3 y Q1 indican el tercer y primer cuartil, respectivamente

Tabla 1.3. Matriz de correlación entre las representaciones moleculares

	AtomNeighborhoods	AtomTypes	EStateIndices	ExtendedConectivity	MACCS322	PathLength	TopAtomPairs	TopAtomTorsions	TopAtomTriplets	TopPhAtomPairs	TopPhAtomTriplets	ShapeTanimoto	ComboScore/2
AtomNeighborhoods	1.000												
AtomTypes	0.663	1.000											
EStateIndices	0.728	0.583	1.000										
ExtendedConectivity	0.980	0.660	0.749	1.000									
MACCS322	0.770	0.529	0.829	0.801	1.000								
PathLength	0.959	0.632	0.727	0.972	0.812	1.000							
TopologicalAtomPairs	0.892	0.853	0.671	0.883	0.682	0.875	1.000						
TopologicalAtomTorsions	0.958	0.739	0.708	0.942	0.734	0.943	0.947	1.000					
TopologicalAtomTriplets	0.943	0.720	0.690	0.931	0.735	0.922	0.958	0.961	1.000				
TopologicalPharmacophoreAtomPairs	0.638	0.690	0.490	0.653	0.466	0.613	0.744	0.678	0.675	1.000			
TopologicalPharmacophoreAtomTriplets	0.870	0.688	0.614	0.883	0.640	0.894	0.912	0.916	0.908	0.721	1.000		
ShapeTanimoto	0.567	0.523	0.470	0.559	0.479	0.542	0.611	0.621	0.633	0.395	0.520	1.000	
ComboScore/2	0.714	0.607	0.578	0.718	0.611	0.712	0.748	0.764	0.769	0.500	0.682	0.910	1

Como se observa en las curvas de distribución acumulada, representaciones con valores bajos de similitud calculada fueron AtomNeighborhoods, ExtendedConectivity, TopologicalAtomTorsions y TopologicalAtomTriplets con valores para la mediana de 0.05, 0.12, 0.16 y 0.09, respectivamente; mientras que las representaciones con altos valores de similitud fueron AtomTypes y MACCS322 con valores de mediana de 0.74 y 0.78, respectivamente. En la Tabla 1.3 se muestra la matriz de correlación entre las 1225 comparaciones pareadas para cada par de cada una de las 13 representaciones 2D y 3D utilizadas. Junto con los datos de la función de distribución acumulada (distribución normal, ~ 0.5) y los datos de coeficiente de la matriz de correlación (baja correlación, < 0.5), se seleccionaron las representaciones EStateIndices, TopologicalPharmacophoreAtomPairs y ShapeTanimoto para los estudios del panorama de actividad. Para reducir la dependencia de la representación estructural con el espacio química, se combinaron los datos de las medidas de similitud de las representaciones seleccionadas bajo el principio de fusión de datos, obteniendo así el valor promedio de similitud. Esta aproximación se ha utilizado por el grupo de investigación para obtener modelos consenso y estudiar el panorama de actividad de otras bases de datos^{30,34}.

1.5.2. Panorama de actividad – Mapas SAS

Las Figuras 1.4 muestran los mapas SAS para AKT1, AKT2 y AKT3, respectivamente, y las estructuras químicas de los pares representativos de las regiones de mayor interés (región I y IV). Estos mapas representan la diferencia en potencia y la similitud estructural promedio. En Tabla 1.4 se resumen los datos de la mediana de la similitud de los compuestos de la base de datos y el número de pares consenso que se encuentran en las regiones I–IV de los mapas SAS. La región IV (zona de *activity cliffs*) se dividió su vez por su diferencia en actividad, pares de compuestos en la región entre 1 y 2 unidades logarítmicas de actividad se identificaron como *shallow activity cliffs*, mientras que en la región superior a 2 unidades logarítmicas de actividad se identificaron como *deep activity cliffs*.

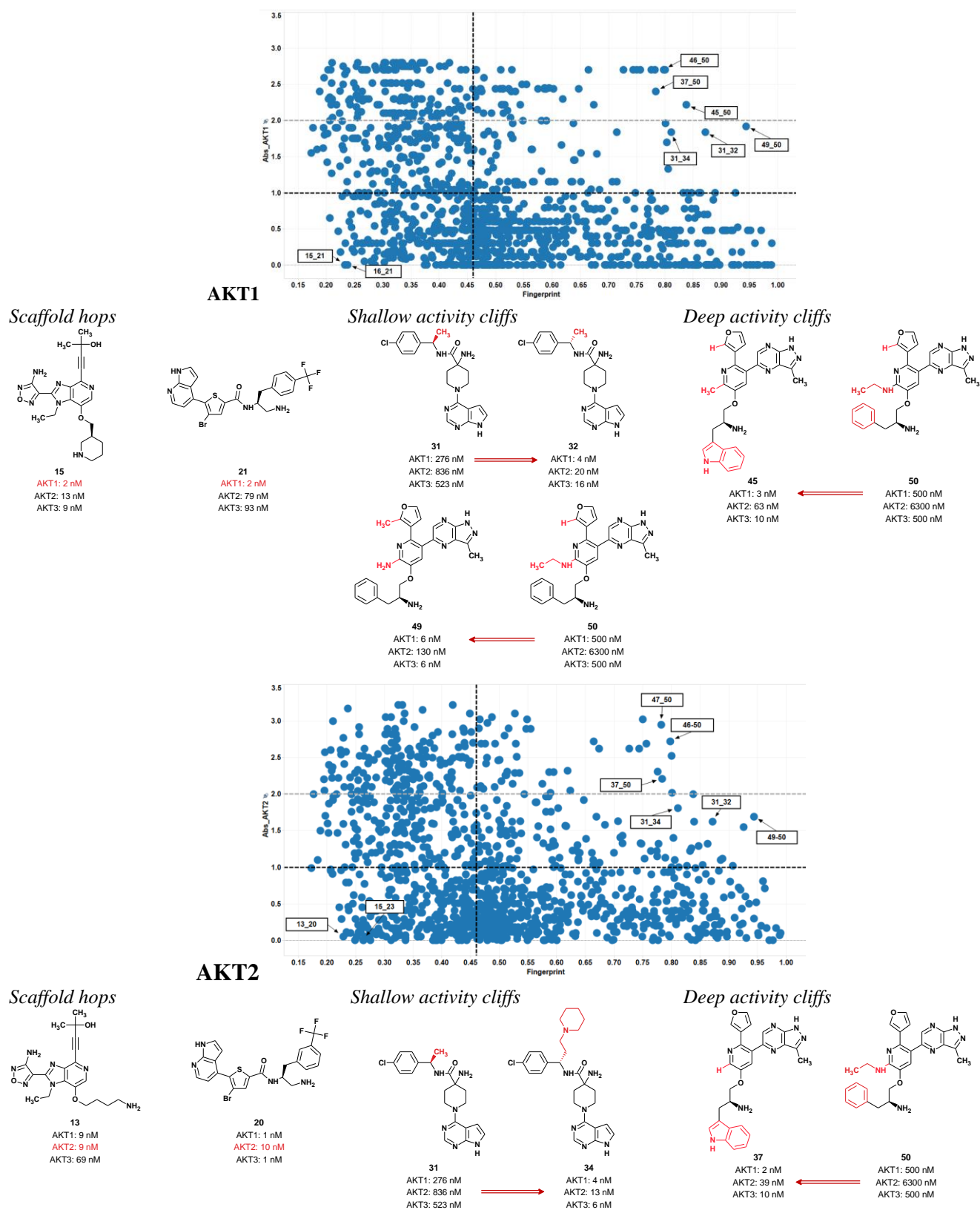


Figura 1.4. Mapas SAS para cada isoforma de AKT. Se presentan ejemplos representativos de pares de moléculas de las regiones I y IV. En rojo se indica el cambio estructural.

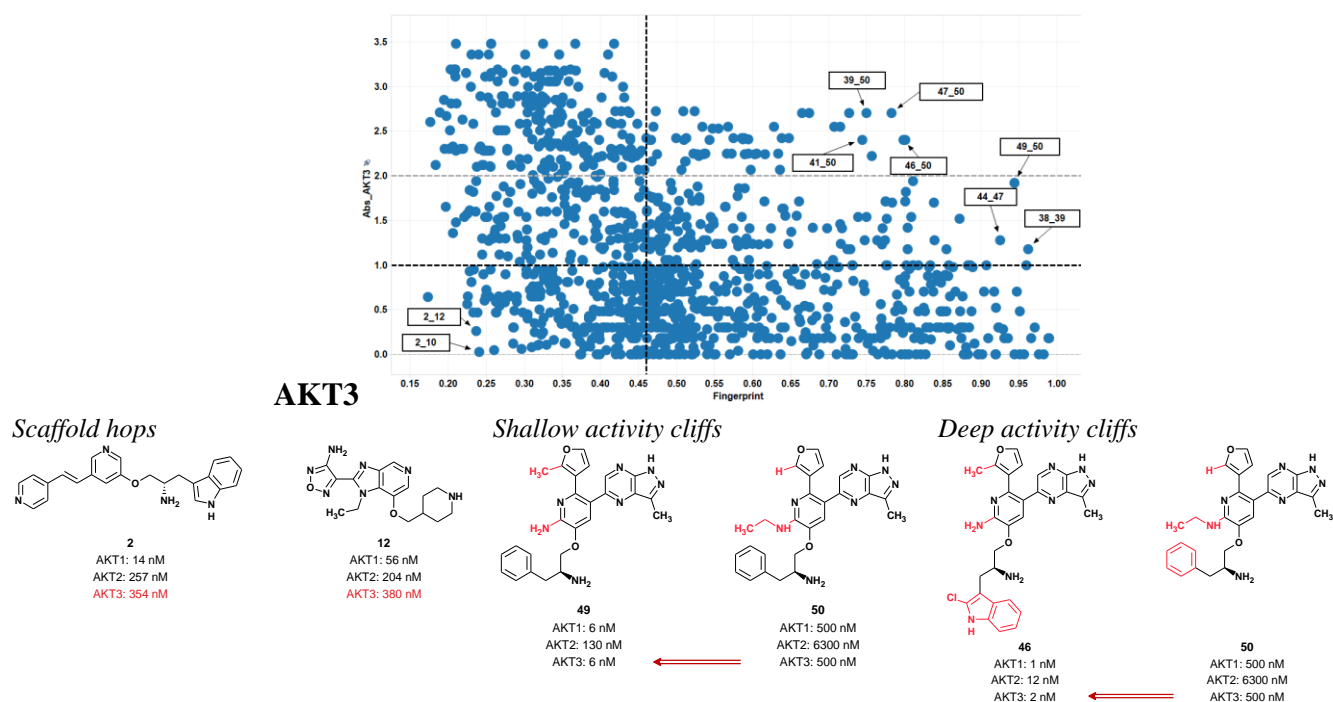


Figura 1.4 (continuación). Mapas SAS para cada isoforma de AKT. Se presentan ejemplos representativos de pares de moléculas de las regiones I y IV. En rojo se indica el cambio estructural.

Tabla 1.4. Distribución de los puntos en las diferentes regiones de los mapas SAS

		I	II	III	IVA	IVB	Total
AKT1	EStateIndices	365	393	246	127	94	1225
	TopologicalPharmacophoreAtomPairs	249	509	375	51	41	1225
	ShapeTanimoto	315	443	297	108	62	1225
	Similitud promedio	267	491	344	70	53	1225
		I	II	III	IVA	IVB	Total
AKT2	EStateIndices	356	383	255	132	99	1225
	TopologicalPharmacophoreAtomPairs	274	465	350	102	34	1225
	ShapeTanimoto	339	400	273	133	80	1225
	Similitud promedio	288	451	323	113	50	1225
		I	II	III	IVA	IVB	Total
AKT3	EStateIndices	316	344	295	151	119	1225
	TopologicalPharmacophoreAtomPairs	225	435	399	115	51	1225
	ShapeTanimoto	284	376	328	142	95	1225
	Similitud promedio	242	418	369	142	54	1225

Como se observa en los mapas SAS para cada isoforma, en la región I se identificaron pares de compuestos con baja similitud estructural y baja diferencia en potencia (ej. **15_21**, **13_20** y **2_12**), estos pares representan *scaffold hops*. En particular, llama la atención la estructura **21** ya que presenta cierta

selectividad hacia AKT1. Sin embargo, si se realiza un cambio en la posición del grupo trifluorometilo (-CF₃), como sucede en **20** (posición *meta*), esta selectividad se pierde. Por lo que este *scaffold* presente en esta estructura es atractivo para el desarrollo de compuestos selectivos a AKT1. En lo que refiere a la región de *activity cliffs*, se identificaron particularmente pares de compuestos con núcleo base (*scaffold*) de piperidina y piridina polisustituída. Un ejemplo de *shallow activity cliff* es el par **31_32**, en este caso se observa que la estereoquímica es determinante para la actividad, donde la configuración (*S*) es la de mayor actividad. Un ejemplo de *deep activity cliff* es el par **45_50**, en donde se observa que la presencia de un sustituyente largo como aminoetil y un sustituyente fenilo tienen un efecto negativo en la actividad. Se observa que los pares **45_50**, **46_50** y **49_50** son ejemplos de *pan activity cliffs* o *activity cliffs* triples, éstos son pares con alta similitud estructural con alta diferencia en actividad para las tres isoformas. Como se mencionó anteriormente, se identificaron diferentes *activity cliffs* para cada isoforma; sin embargo, algunas moléculas generaron un número alto de *activity cliffs* comparado con la base de datos, estas moléculas se denominan “generadores de *activity cliffs*” (*activity cliffs generators*). En la Figura 1.5 se ilustran los *activity cliffs* asociados a cada isoforma, indicando los generadores de *activity cliffs* y sus estructuras, los cuales tienen valores mayores al promedio + 2SD. Para las isoformas estos valores fueron AKT1= 16.21, AKT2= 18.36 y AKT3= 20.6. Se observa que los compuestos **2**, **31** y **50** se identifican como generadores de *activity cliff* para las tres isoformas, por lo que pueden ser definidos como *pan activity cliff generators*. Esto indica que el diseñar estructuras con estas características estructurales tendrá una alta probabilidad de generar *activity cliffs* para las tres isoformas. Además, los tres compuestos tienen altos valores de CI₅₀ (CI₅₀ > 200 nM), siendo poco activos en la tres isoformas. Por otra parte, llama la atención los compuestos **3** y **44**, estos compuestos solo fueron generadores de *activity cliffs* solo para la isoformas AKT3 y AKT2, respectivamente, por lo que pueden ser denominados generadores simples de *activity cliff* (*single-target activity cliffs generators*). En el caso del compuesto **3**, éste presenta valores bajos de CI₅₀ para AKT1 (CI₅₀= 1.3 nM)

y AKT2 (CI_{50} = 6.8 nM), mientras que es ligeramente menos activo en AKT3 (CI_{50} = 35 nM). Para el compuesto **44**, éste es más activo con valores bajos de CI_{50} para AKT1 (CI_{50} = 10 nM) y AKT3 (CI_{50} = 19 nM), mientras que es menos activo para AKT2 con CI_{50} = 250 nM.

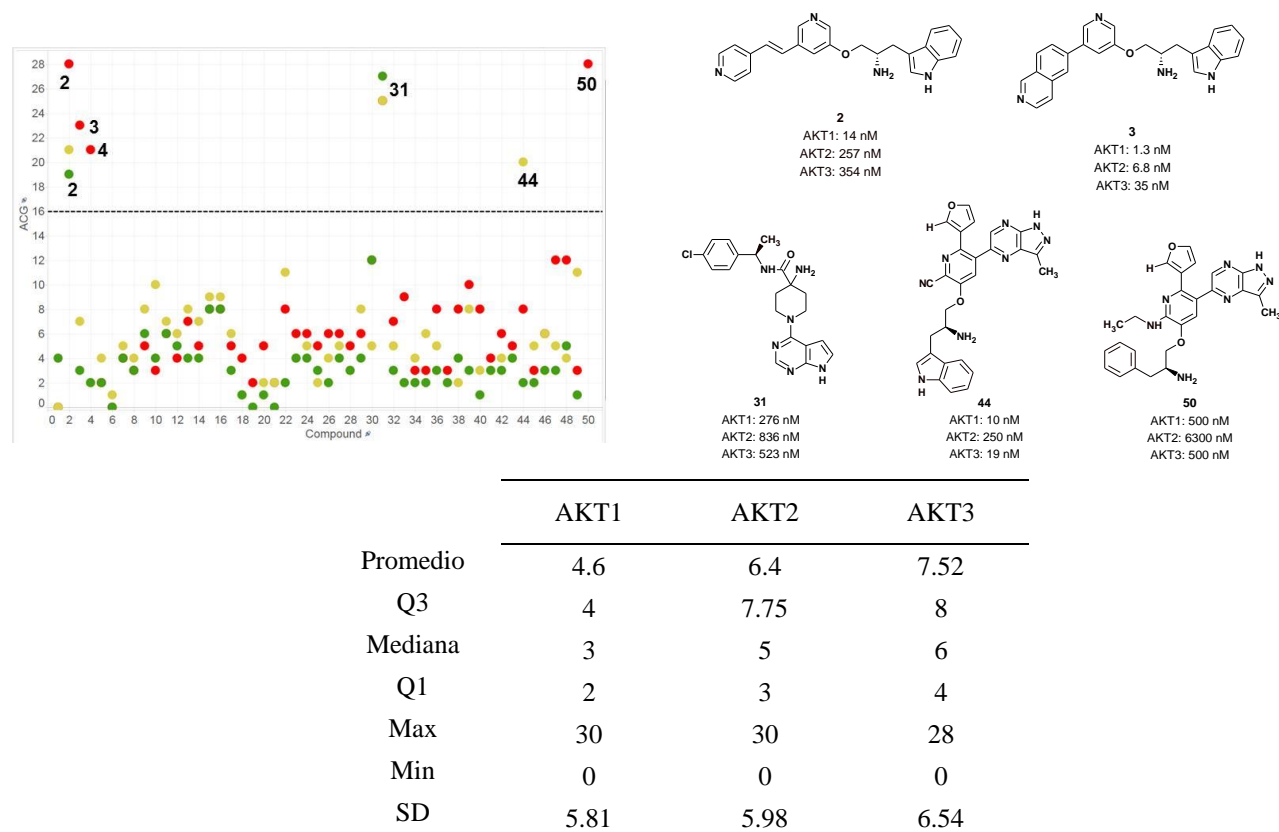


Figura 1.5. Número de *activity cliffs* asociados a cada compuestos en la base de datos, AKT1 (verde), AKT2 (amarillo), AKT3 (rojo). Estructura de generadores de *activity cliffs*, compuestos asociados con un alto número de *activity cliffs*. La tabla indica el número de *activity cliffs* asociados a cada isoforma de AKT.

De acuerdo con las estructuras de los generadores de *activity cliffs*, se observa que pequeños cambios asociados a la estructura tienen un alto cambio en la actividad para las isoformas. Por ejemplo, la estereoquímica (*R*) en el compuesto **31** es indeseable para la actividad, si este compuesto se compara con las estructuras que forman *activity cliffs* (ej. **32**, **34**, **35**) se observa que la configuración (*S*) de la cadena alifática es benéfica para la actividad en las tres isoformas, por lo que la orientación de este grupo permitiría una mayor interacción en el sitio activo de estas cinasas. En el caso del compuesto **50**, si se observan los pares de estructuras con los que forma *activity cliffs*, la introducción de un

sustituyente más largo en el grupo amino disminuye drásticamente la actividad para las isoformas, por lo que la presencia de sustituyentes pequeños (-H, -CH₃, -NH₂) en esta posición es importante para mantener la actividad biológica. En el caso particular de **44**, el cual se identificó como un *single-target activity cliff generator*, este compuesto presentó selectividad en las isoformas AKT1 y AKT3 donde la presencia de un grupo nitrilo (-CN) es determinante para esta selectividad.

Con el objetivo de explicar las diferencias de actividad que presentan los generadores de *activity cliffs* se analizaron por acoplamiento molecular las interacciones ligando-receptor que pueden presentar estos compuestos en la isoformas de AKT. Si bien los panoramas de actividad tienen un enfoque basado en el ligando, el acoplamiento molecular puede ser utilizado para proporcionar una interpretación estructural, ya que es una estrategia que puede predecir modos de unión razonables. Es importante mencionar, que la energía de unión no se tomó en cuenta para los análisis ya que no necesariamente correlacionó con los datos de actividad biológica.

En la Figura 1.6 se muestra el modo de unión del generador de *activity cliffs* **31** (A) y un el compuesto **35** (B) con el que forma *activity cliffs*. Se observa que el grupo metilo con configuración (*R*) de **31** queda expuesto al solvente y no tiene interacción con una pequeña región hidrofóbica de la proteína. Mientras que en **35** la configuración (*S*) de la cadena alifática favorece la interacción en región hidrofóbica de la proteína y a su vez permite que el hidroxilo terminal forme puente de hidrógeno. Esto explica la diferencia en la actividad biológica de **31** con otros compuestos con los que forma *activity cliffs* (ej. **32**, **34**). Estos resultados muestran que pequeños cambios estructurales presentes en los *activity cliffs* son responsables de afectar la CI₅₀ en las isoformas de AKT.

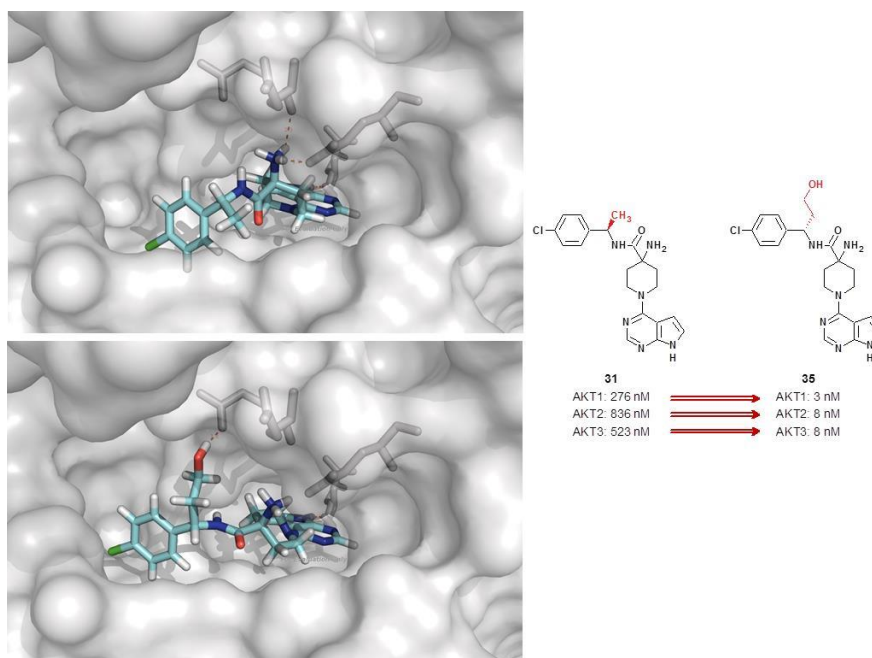


Figura 1.6. Modo de unión predicho por acoplamiento molecular para los compuestos **31** (identificado como generador de activity cliff), **35** en el sitio activo de AKT2. Las líneas punteadas indican la formación de puentes de hidrógeno.

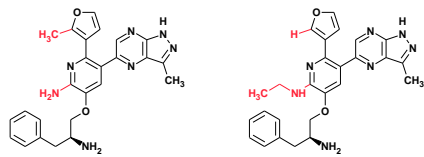
1.5.3. Mapas TAD-2D

Se analizaron las relaciones estructura-actividad de los 50 compuestos con actividad para las tres isoformas utilizando un modelado de multi-blancos. Para este análisis se usó una variante de los mapas 2D de diferencia de actividad triple (*color Triple Activity Difference 2D maps, color TAD maps*). Este tipo de análisis permite realizar estudios de la relación de actividad para identificar selectividad o promiscuidad. En la Figura 1.7 se muestra el color TAD map para la base de datos de compuestos. Es importante destacar que el color está asociado para la diferencia de actividad entre los compuestos para AKT2. Se encontraron en la zona TZ1a-b los pares de compuestos **31_34**, **31_35**, **42_50** y **49_50** los cuales son ejemplos de *pan activity cliffs*, que son cambios estructurales que afectan de la misma manera en la actividad a los tres receptores. Estos mismos pares se habían encontrado previamente en el análisis de los mapas SAS. No se encontraron pares de compuestos para la zona TZ2, de haberse encontrado, esto representaría la presencia de compuestos con un efecto inverso en la actividad; es decir, cambios estructurales que aumentan o disminuyen la actividad hacía dos de los

receptores mientras que para el tercero la actividad se modifica en sentido inverso (conocido también como *activity switch* doble). En la zona TZ3a se ejemplifica el par **2_50**, el cual está relacionado con un cambio estructural que aumenta la actividad para dos receptores pero para el tercero no se modifica. Para este caso, el cambio estructural aumenta la actividad para AKT1 y AKT2 pero para AKT3 no se modifica (*activity cliff* doble). En la zona TZ3b solo se identificó el par **12_13**, en este caso el cambio estructural reduce la actividad para dos receptores (AKT1 y AKT2) pero no se modifica para el tercero (AKT3). Para la zona TZ4a se ejemplifica el par **40_44**, para este caso el cambio estructural reduce la actividad para los receptores AKT2 y AKT3 pero para AKT1 no se modifica (*activity cliff* doble). Para la zona TZ4b, el par **2_35** la modificación estructural aumenta la actividad para AKT2 y AKT3 pero no se modifica para AKT1. En esta zona se identificaron los pares **2_35** y **13_49**, los cuales resultaron muy interesantes ya que están definidos como *activity switches*, donde se observa que el cambio estructural no afecta en actividad a AKT1, para AKT2 la actividad aumenta mientras que para AKT3 la actividad disminuye, por lo que estos compuestos muestran selectividad en particular para AKT2 (**13, 35**) o bien para AKT3 (**49**).

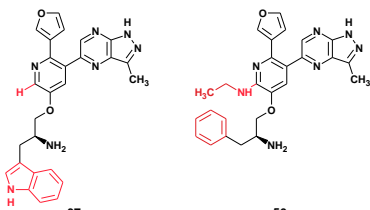
El uso de los color TAD maps 2D permitió conjuntar los datos experimentales para las tres isoformas efectuando un análisis más detallado. Este tipo de análisis permitió identificar promiscuidad molecular (identificando *pan activity cliffs*), y selectividad hacía algún tipo de isoforma (*activity switches*). Estos resultados hacen posible la búsqueda de nuevos compuestos inhibidores de AKT, ya sea del tipo multi-blanco o bien dirigido en especial a la inhibición en particular de un tipo de isoforma. Además, los estudios de acoplamiento molecular de los generadores de *activity cliff*, que en el mapa TAD también se observan, dan una posible explicación a la actividad de los compuestos encontrados como *triple-receptor activity cliff* (*pan activity cliffs*) e inclusive de tipo *activity switches*.

TZ1a



49
AKT1: 6 nM
AKT2: 130 nM
AKT3: 6 nM

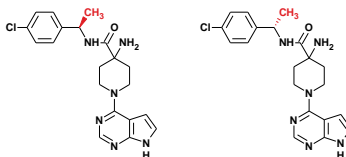
50
AKT1: 500 nM
AKT2: 6300 nM
AKT3: 500 nM



37
AKT1: 2 nM
AKT2: 39 nM
AKT3: 10 nM

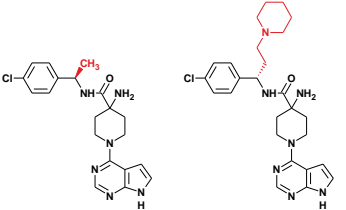
50
AKT1: 500 nM
AKT2: 6300 nM
AKT3: 500 nM

TZ1b



31
AKT1: 276 nM
AKT2: 836 nM
AKT3: 523 nM

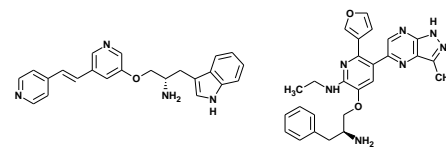
32
AKT1: 4 nM
AKT2: 20 nM
AKT3: 16 nM



31
AKT1: 276 nM
AKT2: 836 nM
AKT3: 523 nM

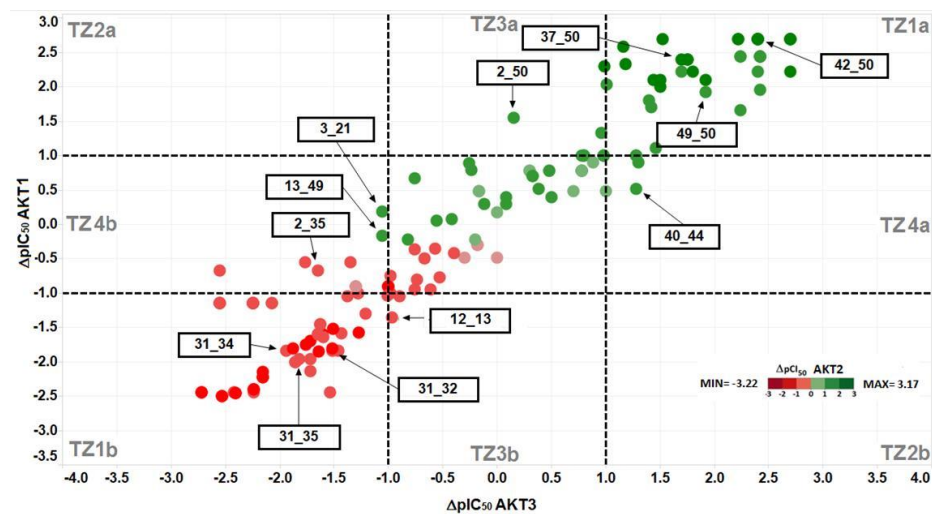
34
AKT1: 4 nM
AKT2: 13 nM
AKT3: 6 nM

TZ3a

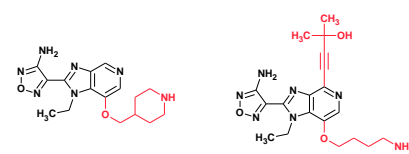


2
AKT1: 14 nM
AKT2: 257 nM
AKT3: 354 nM

50
AKT1: 500 nM
AKT2: 6300 nM
AKT3: 500 nM



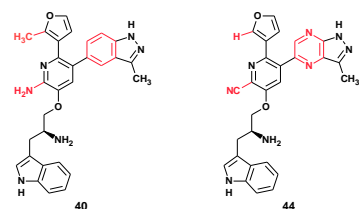
TZ3b



12
AKT1: 56 nM
AKT2: 204 nM
AKT3: 380 nM

13
AKT1: 9 nM
AKT2: 9 nM
AKT3: 69 nM

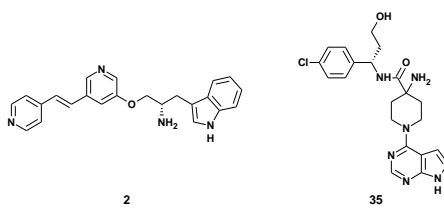
TZ4a



40
AKT1: 3 nM
AKT2: 15 nM
AKT3: 1 nM

44
AKT1: 10 nM
AKT2: 250 nM
AKT3: 19 nM

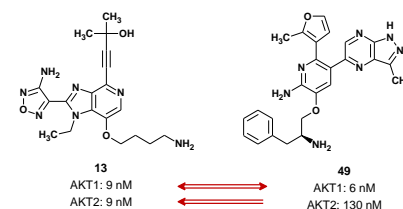
TZ4b



2
AKT1: 14 nM
AKT2: 257 nM
AKT3: 354 nM

35
AKT1: 3 nM
AKT2: 8 nM
AKT3: 8 nM

TZ4b



13
AKT1: 9 nM
AKT2: 9 nM
AKT3: 69 nM

49
AKT1: 6 nM
AKT2: 130 nM
AKT3: 6 nM

Figura 1.7. Color TAD map 2D para los 50 compuestos y estructura con sus valores de CI_{50} para algunos ejemplos de pares identificados en cada zona del mapa. El mapa se dividió en cinco regiones TZ1–TZ5. El color está asociado para la diferencia de actividad entre los compuestos para AKT2.

1.6. Conclusiones

- Se estudió el panorama de actividad para cada una de las isoformas de AKT empleando los mapas SAS. Particularmente, se estudiaron las zonas I para encontrar *scaffold hops* y la zona IV, de mayor interés en este trabajo, para la identificación de *activity cliffs*.
- Con el análisis cuantitativo de los mapas SAS se reveló qué compuestos formaron pares con otros con mayor frecuencia en la región IV de los mapas SAS, éstos se identificaron como generadores de *activity cliffs*. De éstos, **2**, **31** y **50** se identificaron como generadores de *activity cliffs* para las tres isoformas, mientras que **3** y **44** solo fueron generadores de *activity cliffs* para la isoformas AKT3 y AKT2, respectivamente.
- Los estudios de acoplamiento molecular sugieren que las características estructurales de los generadores de *activity cliffs* afectan el correcto modo de unión con el sitio activo de la enzima, particularmente con la región *hinge*, lo explicaría la diferencia sustancial en la actividad biológica. En particular, para el grupo de compuestos con núcleo base de piperidina, la estereoquímica (*R*) tiene un efecto negativo en la actividad, mientras que el grupo de compuestos con núcleo base de pirazinopirazina en donde la adición de una cadena alquílica larga tiene una repercusión negativa en la actividad.
- Con ayuda del mapa TAD-2D se caracterizó en conjunto la información de los inhibidores para estudiar la actividad de diferentes inhibidores de las tres isoformas. Se identificaron *pan activity cliff*, corroborando lo encontrado en los mapas SAS. Pocos compuestos se identificaron con posible selectividad hacia alguna isoforma, en particular para AKT2 se identificaron los compuestos **13**, **35**, mientras que para AKT3 el compuesto **49**.
- Los pocos compuestos selectivos encontrados se puede deber a la alta secuencia de homología en el sitio activo de estas cinasas, lo cual indica que pequeños cambios estructurales van a afectar en actividad a las tres isoformas de igual manera. Enriquecer la base de datos para el

análisis usando el panorama de actividad ayudaría a la identificación de posibles estructuras selectivas.

- Este es el primer análisis de panorama de actividad para el estudio SAR de inhibidores de AKT. Los resultados de este trabajo son útiles para el futuro diseño de inhibidores con nuevas estructura base (*scaffold hops*) o bien a la optimización estructural de moléculas encontradas en este trabajo para mejorar potencia y selectividad.

Capítulo II

Diseño de piridinas trisustituidas como inhibidores de AKT

2.1. Introducción

La serina-treonina cinasa B (AKT/PKB) es una cinasa clave en la señalización durante la tumorigénesis, ya que es un nodo central en la señalización de factores de crecimiento, citosinas y otros estímulos externos corriente abajo en la cascada de señalización, lo que favorece la progresión tumoral a través del incremento en la proliferación celular, la angiogénesis y la prevención de apoptosis³⁵⁻³⁸. Existen tres isoformas de AKT reportadas: AKT1, AKT2 y AKT3; estas isoformas se encuentran sobreexpresadas en algunos tipos de células cancerosas. AKT1 se sobreexpresa en cáncer de mama, colorrectal y ovario; AKT2, en cáncer de páncreas, mama y ovario; y AKT3, en cáncer de próstata y mama^{39,40}.

La relevancia que tiene AKT en la regulación celular durante la tumorigénesis es muy importante, ya que este grupo de cinasas tiene más de 100 proteínas sustrato (Figura 1). AKT aumenta la supervivencia celular mediante el bloqueo de las funciones de proteínas pro-apoptóticas como son BAD y las de la familia Bcl-2. También inhibe la expresión de factores de transcripción como FOXO y p53, impidiendo la expresión de genes que promueven la apoptosis y el arresto del ciclo celular. Por otra parte, AKT favorece el incremento en el crecimiento celular a través de la activación del complejo mTOR 1, el cual regula la absorción de nutrientes y la señalización de factores de crecimiento. Además, AKT tiene un rol significativo en la angiogénesis activando al receptor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) fomentando la vascularización en tumores; también AKT promueve la traslocación del transportador GLUT-4 estimulando el aumento en la toma de glucosa por las células cancerosas que favorece su crecimiento y proliferación^{39,40}.

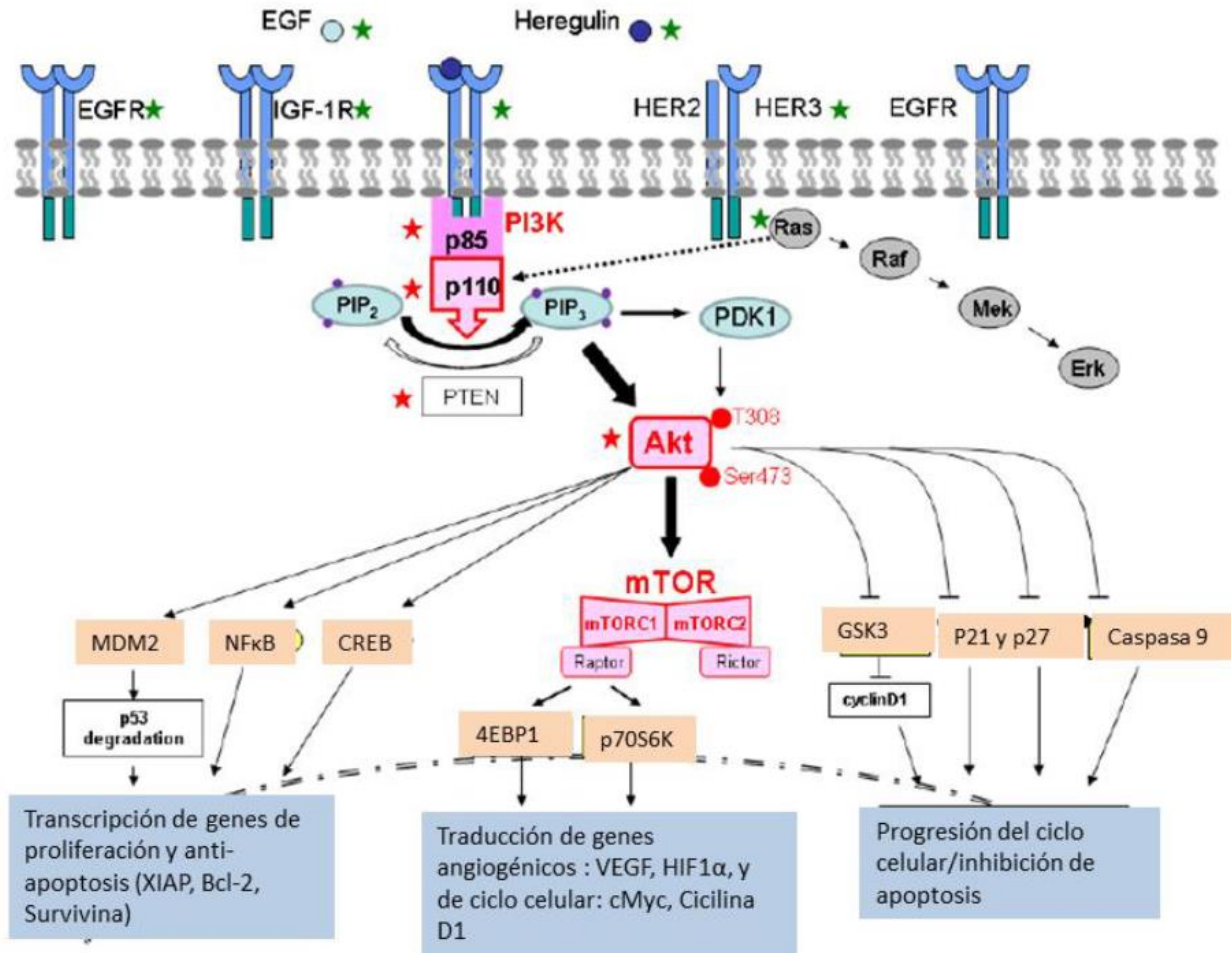


Figura 2.1. Sustratos y funciones celulares que regula AKT.

Debido al papel que tiene AKT como nodo central en el control de diversos procesos de las células cancerosas, se ha postulado que las isoformas de AKT cinasa son blancos atractivos para el diseño de moléculas anticancerígenas^{37,41}. En la literatura existen reportes de inhibidores competitivos de ATP en las AKT cinasas con buena actividad inhibitoria contra las tres isoformas, aunque con diferentes valores de concentración inhibitoria 50 (CI₅₀). Estructuralmente, estas moléculas incluyen: pirazoles⁴², indazoles¹⁷ y aminofurazanos¹⁵, entre otros^{43,44}. Así mismo, la estructura cristalográfica de las isoformas AKT1 y AKT2 ya se encuentra reportada, mientras que para AKT3 aún no se cuenta con una estructura determinada experimentalmente pero se ha propuesto su estructura por modelado

por homología. Esto ha permitido el desarrollo de nuevos inhibidores empleando técnicas de diseño basado en la estructura ⁴⁵.

Recientemente, con el propósito de contribuir en el descubrimiento de inhibidores de AKT para el tratamiento del cáncer, nuestro grupo de investigación identificó mediante el uso de metodologías de tamizado virtual, un inhibidor competitivo (compuesto **11**, Figura 2.2) del tipo piridina 2,4,6-trisustituida con actividad moderada sobre las tres isoformas de AKT ⁴⁶. El compuesto **11** es una molécula con un núcleo base distinto a los ya reportados. Este tipo de moléculas novedosas dará la oportunidad de explorar y ampliar el espacio químico de estructuras que inhiban la función de estas cinasas ⁴⁷.

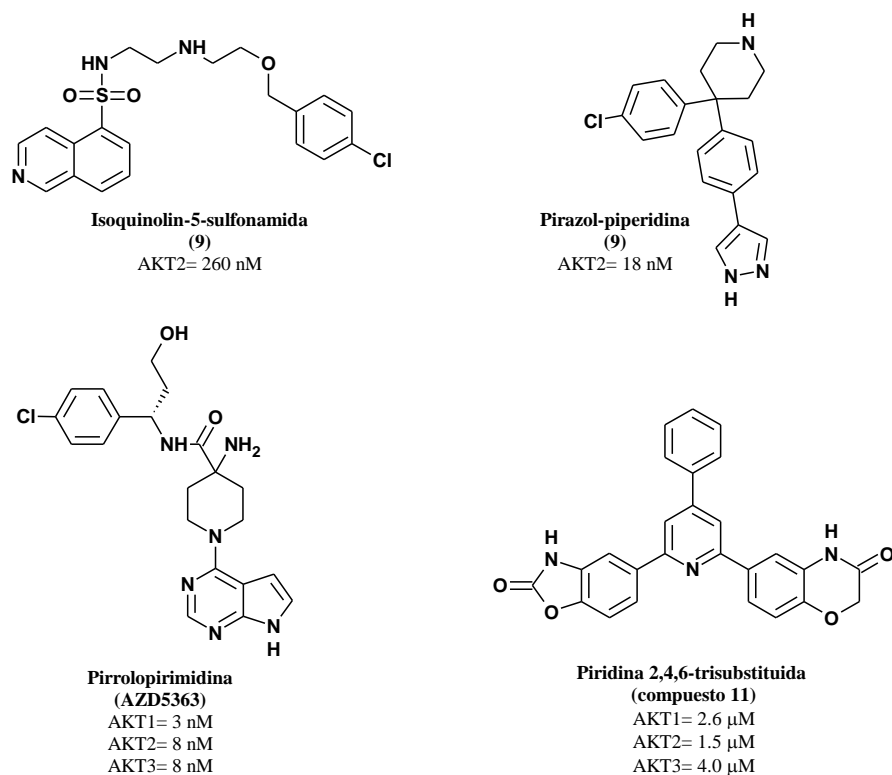


Figura 2.2. Estructura y actividad de algunos inhibidores reportados de AKT.

2.2. Justificación

El hallazgo del compuesto **11** como inhibidor de las AKT cinasas con una estructura novedosa abre una opción para el diseño de nuevos inhibidores. Este compuesto se identificó por cribado virtual y se validó su identificación por ensayos de inhibición sobre AKT mostrando actividad en el orden de bajo micromolar. Debido a lo trascendente del compuesto **11**, éste puede optimizarse para desarrollar nuevos inhibidores de AKT para aumentar potencia y selectividad. Aprovechando la información experimental de las estructuras tridimensionales de las isoformas de AKT y con el apoyo de métodos computacionales para el diseño de fármacos, particularmente de diseño basado en el receptor, se puede conocer la topología del sitio receptor y así optimizar la estructura de **11**.

2.3. Objetivos

- 1) Predecir el modo de unión y las interacciones que presenta el compuesto **11** en las tres isoformas de AKT que permitan establecer la relevancia de los grupos presentes en la estructura base de piridina 2,4,6-trisustituida para que puedan ser optimizados.
- 2) Proponer nuevos inhibidores de AKT mediante modificaciones que aumenten la interacción con el receptor manteniendo la estructura base de piridina 2,4,6-trisustituida.
- 3) Mediante acoplamiento molecular predecir el modo de unión y priorizar los inhibidores diseñados en las tres isoformas de AKT.
- 4) Por medio de simulaciones de dinámica molecular evaluar si los mejores complejos inhibidor-AKT se mantienen durante la simulación. De estos resultados junto con los de acoplamiento molecular, identificar los inhibidores más prometedores como inhibidores de AKT.

2.4. Estudios computacional

2.4.1. Modelado por homología de la isoforma AKT3

El modelo de homología de AKT3 se obtuvo tomando como estructura molde la estructura cristalográfica de la isoforma AKT1 disponible en el PDB con la clave PDB ID: 4GV1¹⁶. La secuencia de aminoácidos de AKT3 se obtuvo del NCBI (GenBank: CAB53537.1)^{48,49}. El modelo se construyó usando el módulo de Prime versión 4.2⁵⁰ presente en la paquetería de Maestro versión 10.4⁵¹. El modelo generado se optimizó con el módulo Protein Preparation Wizard⁵², presente en Maestro, asignando estados de protonación, cargas parciales y finalmente sometió a una optimización de la estructura para eliminar choques estéricos usando el campo de fuerza OPLS 2005. La calidad del modelo se determinó con los servidores SwissModel^{53,54} y MolProbity⁵⁵, empleando las herramientas de PROCHECK (se analiza la estereoquímica de los aminoácidos), QMEAN6 score (se determina la calidad local de la estructura) y los gráficos de Ramachandran.

2.4.2. Acoplamiento molecular

Las estructuras de las piridinas 2,4,6-trisustituidas se construyeron y optimizaron, mediante una minimización de energía usando el método semi-empírico PM6, en el programa Spartan 10⁵⁶. Las estructuras cristalográficas de la AKT1 y AKT2 se obtuvieron del PDB⁵⁷ con las claves PDB ID: 4GV1¹⁶ y PDB ID: 1O6K⁵⁸ respectivamente. Las estructuras se optimizaron retirando las moléculas de agua, ligandos y el péptido sustrato (GSK-3 β), se asignaron los estados de protonación y cargas parciales, y se sometieron a una optimización de la estructura para eliminar choques estéricos usando el campo de fuerza OPLS 2005. Los estudios de acoplamiento molecular se realizaron en los programas Glide versión 6.9⁵⁹, de la paquetería de Maestro, AutoDock 4.2⁶⁰ y AutoDock Vina⁶¹. En el caso de Glide 6.9 la zona de evaluación se centró en el residuo Asp292/293/289 para cada isoforma de AKT, el cual está ubicado en el sitio de unión de ATP. Los estudios de acoplamiento molecular se realizaron

con la opción Glide XP (extra precisión) y los parámetros por defecto del programa. En el caso de AutoDock 4.2 y AutoDock Vina se usó la interfaz gráfica MGLTools 1.5.6. Con esta herramienta los hidrógenos no polares de los ligandos y las proteínas se retiraron, y su carga y densidad electrónica las fusionó al carbono que los soportaba; así mismo, se asignaron enlaces rotables y cargas de tipo Gasteiger-Marsili⁶². La zona de búsqueda se centró en el residuo Asp292/293/289 para cada isoforma de AKT, con un tamaño de 50x50x50 puntos y un espacio entre puntos de 0.375 Å. Para los estudios de acoplamiento molecular se seleccionó el algoritmo genético Lamarckiano (AutoDock 4.2) o de búsqueda local iterativa (AutoDock Vina) con los parámetros por defecto de los programas. Se utilizó el programa Tableau Public 8.1 para la visualización y análisis de los datos consenso de energía de unión de los ligandos obtenidos de los estudios de acoplamiento molecular para cada programa. Los resultados de modo de unión e interacciones moleculares se visualizaron y extrajeron con el programa PyMOL versión 0.99⁶³.

2.4.3. Dinámica molecular

Los estudios de dinámica molecular se efectuaron en la supercomputadora Miztli de la UNAM empleando el programa GROMACS versión 4.5.5⁶⁴ y utilizando el campo de fuerza AMBER99SB-ILDN⁶⁵. Los parámetros de los ligandos se calcularon con ACPYPE del sistema de campo de fuerza de AMBER⁶⁶. Los complejos ligando-proteína se solvataron usando una caja cúbica periódica suficientemente grande para contener 1.0 nm de agua en todos los lados usando el modelo de agua de tres puntos (TIP3P). Luego se adicionaron al azar iones Na⁺ y Cl⁻ hasta una concentración de 0.15 M para neutralizar la carga del sistema. Posteriormente, se realizó una minimización de energía del sistema usando el algoritmo de descenso por gradiente (steepest-descent algorithm) para eliminar contactos de van der Waals no deseados. Después se realizó una minimización con el ensamble NTV (número N, temperatura T y volumen V constante) usando el termostato de Berendsen⁶⁷, seguido de una minimización con el ensamble NPT (número N, presión P y temperatura T constante) a 1 bar de

presión usando el baróstato de Parrinello-Rahman⁶⁸. Las fuerzas electrostáticas se calcularon con el método de partículas en malla de Ewald (PME, por sus siglas en inglés) a partir del método de la suma de Ewald⁶⁹. Finalmente, los complejos se sometieron a simulación por 10 ns con un tiempo de intervalo de 1 ps. Al término de las simulaciones los resultados se analizaron usando los parámetros de la desviación cuadrática media (RMSD), desviación cuadrática de la fluctuación (RMSF) de cada aminoácido y la energía libre de unión. La paquetería de *g_mmpbsa*⁷⁰, instalada en GROMACS, se utilizó para calcular la energía libre de unión basado en el método MM-PBSA (en inglés Molecular Mechanics/Poisson–Boltzmann Surface Area)⁷¹. En términos generales, la energía libre de unión de los complejos en disolvente es calculada de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$\Delta G_{\text{unión}} = \Delta E_{\text{MM}} - \Delta G_{\text{sol}}$$

$$\Delta E_{\text{MM}} = \Delta E_{\text{interna}} + \Delta E_{\text{electrostática}} + \Delta E_{\text{vdW}}$$

$$\Delta G_{\text{sol}} = \Delta G_{\text{polar}} + \Delta G_{\text{no polar}}$$

Donde ΔE_{MM} es la energía de interacción entre el ligando y la proteína, y ΔG_{sol} es la energía de solvatación. La energía libre por mecánica molecular (ΔE_{MM}) es la suma de la energía interna ($\Delta E_{\text{interna}}$) de enlaces, ángulos y torsiones; la energía de interacción electrostática ($\Delta E_{\text{electrostática}}$), y la energía de van der Waals (ΔE_{vdW}). El término ΔG_{sol} es el cambio de la energía de solvatación sobre la de unión, e incluye el componente ΔG_{polar} correspondiente a la energía libre electrostática de solvatación (contribución polar calculada por el modelo generalizado de Born), y el componente $\Delta G_{\text{no polar}}$ correspondiente a la energía libre no electrostática de solvatación (contribución no polar calculada por el modelo de área de superficial de acceso al solvente, SASA por sus siglas en inglés).

2.5. Resultados y discusión

2.5.1. Diseño basado en la estructura

De acuerdo con el modo de unión predicho por acoplamiento molecular para el compuesto **11** en las isoformas de AKT (Figura 2.3), esta molécula adopta una conformación en forma de “Y” donde la distribución de los sustituyentes en el anillo de piridina muestra ser apropiada para la interacción en el sitio de unión de ATP. El grupo 1,3-benzoxazol-2(3*H*)-ona ocupa la cavidad del sitio de unión a adenosina del ATP y presenta interacciones por puentes de hidrógeno con los residuos Thr211/213/209 y Thr291/292/288. Por otra parte, el grupo 2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-ona ocupa la cavidad adyacente en la región del bucle P (*loop P*) y muestra interacción por puente de hidrógeno con Asp292/293/289. Mientras que el sustituyente fenilo en la posición 4 del anillo de piridina presentan interacción aromática de tipo T con el residuo Phe442/443/439. Además de estas interacciones, otros residuos cercanos a la molécula **11** se identificaron, tales como residuos Glu234/236/232, Phe236/238/234, Phe237/239/235, Phe438/439/435, Asp439/440/438 y Phe442/443/439, los cuales son importantes ya que optimizando la estructura de **11** podrían formar interacciones con ellos con el objetivo de mejorar la afinidad por la enzima.

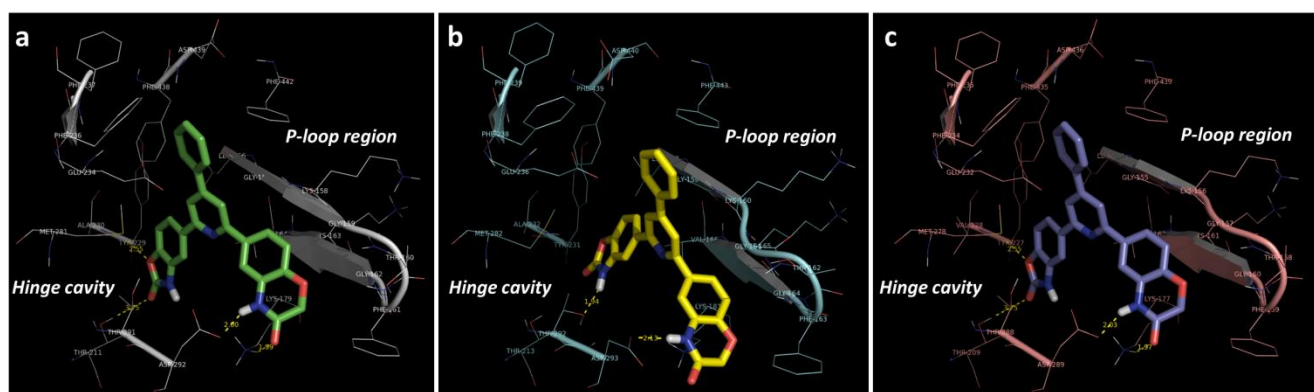


Figura 2.3. Modo de unión del compuesto **11** en AKT1 (a), AKT2 (b) y AKT3 (c). Los enlaces de hidrógeno se representan en líneas punteadas amarillas.

Con esta información, se decidió optimizar la estructura de la molécula **11** con el fin de mejorar las interacciones moleculares; en particular, en el sitio de unión de adenosina (conocida en inglés como *hinge cavity*), y con los residuos Glu234/236/232, Phe236/238/234, Phe237/239/235, Phe438/439/435, Asp439/440/438 y Phe442/443/439. Además de considerar esta información para el diseño, los cambios estructurales sugeridos se hicieron para tener moléculas sintéticamente accesibles. La estrategia del diseño de las nuevas piridinas 2,4,6-trisustituídas se muestra en la Figura 2.4. En primer lugar se decidió aumentar el tamaño del anillo reemplazando el anillo de 5 miembros de 1,3-benzoxazol-2(3*H*)-ona en la molécula **11** por un anillo de 6 miembros como 2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-ona, obteniendo de esta manera piridinas trisustituídas simétricas. Este cambio se realizó para mejorar la conformación de las moléculas dentro del sitio de adenosina y favorecer la interacción puente de H con el residuo Ala230/232/Val228. Posteriormente, se realizó una modificación en la posición 4 del anillo de piridina que originó dos principales series de compuestos. La **Serie 1** incorpora un anillo de fenilo o heterocíclico sustituido con diferentes grupos hidrofóbicos y polares, con el propósito de que el sistema aromático presente interacción con el residuo aromático Phe442/443/439, mientras que los sustituyentes se incorporaron para favorecer las interacciones con los residuos Phe236/238/234, Phe237/239/235, Phe438/439/435, Asp439/440/438 y Phe442/443/439. Para esta serie se diseñaron veinte compuestos (**S1-1–S1-21**), los cuales se muestran en la Tabla 2.1. La **Serie 2** incorpora un grupo carboxamida como un grupo donador/aceptor de puente de hidrógeno, esta incorporación se sugirió debido a que la molécula **11** mostró cercanía con los residuos polares Glu234/236/232 y Lys158/160/156. La **Serie 2** también incluye diferentes anillos de fenilo y heterocíclicos sustituidos en la porción *N*-carboxamida para mantener la interacción con el residuo aromático Phe442/443/439, mientras que los sustituyentes se incluyeron para favorecer las interacciones con los residuos Phe237/239/235, Phe438/439/435, Asp439/440/438 y Phe442/443/439. En esta serie se diseñaron veinte compuestos (**S2-1–S2-21**), los cuales se incluyen en la Tabla 2.1.

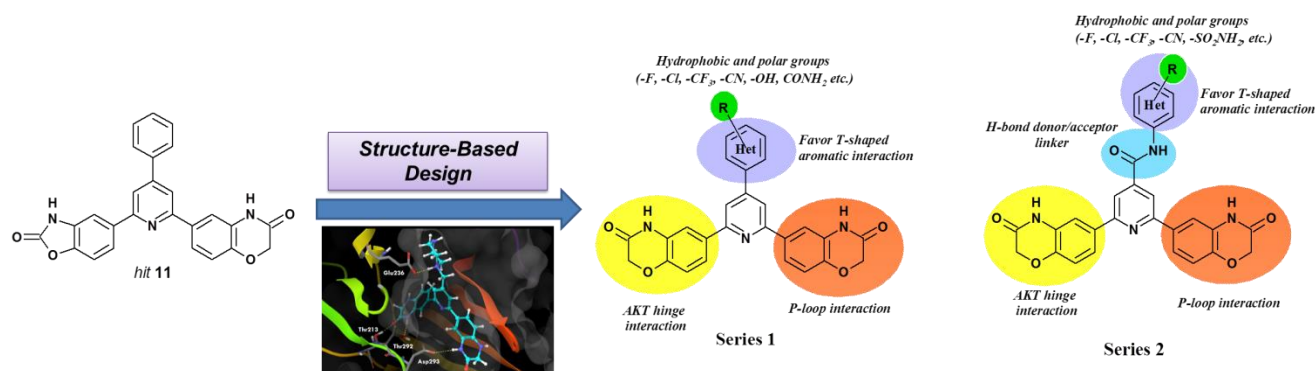


Figura 2.4. Modificaciones generales para el diseño de nuevas piridinas 2,4,6-trisustituidas como nuevos inhibidores de AKT.

2.5.2. Estudios de acoplamiento molecular

Con el fin de seleccionar los compuestos más prometedores como inhibidores de AKT, los estudios de acoplamiento molecular se realizaron utilizando la estrategia de acoplamiento molecular consenso (*docking consensus*). Considerando las limitaciones que presentan los cálculos de acoplamiento, en particular en los métodos simplificados en los que están basados (no hay presencia de moléculas de agua, sistemas proteicos rígidos en algunos casos, el factor entrópico no es considerado en los cálculos, por mencionar algunos), además de los métodos de búsqueda de conformaciones y la manera en que se categorizan a los ligandos varían entre cada programa ⁷². Los métodos consenso combinan los resultados de varios programas, independientemente de los métodos que usan cada uno, en un valor único de puntuación (*scoring*) para un ligando(s). El argumento de la puntuación consenso (*consensus scoring*) es que varias funciones de puntuación de diferentes programas que identifiquen a un ligando(s) como compuesto activo (o inactivo; en el sentido de unión con una macromolécula) más confiable es la predicción. Por lo tanto, es más probable que un compuesto que tenga una puntuación alta derivada de múltiples funciones de puntuación sea un buen inhibidor en un ensayo biológico, en comparación con un compuesto que tenga una puntuación alta de una sola función ⁷³. En este trabajo se utilizaron tres programas diferentes. Uno de ellos fue Glide, un software comercial que utiliza un algoritmo de búsqueda sistemática exhaustiva para evaluar diferentes conformaciones de los ligandos,

y utiliza una función de puntuación empírica para predecir la afinidad de unión⁷⁴. Los otros dos programas fueron AutoDock 4.2 y AutoDock Vina, que son programas de acoplamiento molecular de libre acceso. AutoDock 4.2 utiliza el algoritmo genético Lamarckiano para determinar las conformaciones del ligando, mientras que utiliza una función de puntuación semi-empírica para determinar la energía de unión. AutoDock Vina emplea el método de búsqueda local iterativa (*Iterative Local Search*) para las conformaciones de los ligandos, mientras que utiliza una combinación de función de evaluación empírica/basada en el conocimiento para determinar la energía unión^{60,61}.

Antes del estudio de acoplamiento molecular para los compuestos diseñados, el protocolo de acoplamiento molecular por el cual se hicieron los estudios se validó; esto mediante el acoplamiento molecular (*re-docking*) de ligandos co-cristalizados reportados en las isoformas de AKT. Para ello, los ligandos de estructuras co-cristalizadas con clave PDB ID 4GV1 (un inhibidor de AKT1 de tipo pirrolopirimidina)¹⁶, 2JDO (un inhibidor de AKT2 de tipo isoquinolin-5-sulfonamida)⁷⁵ y 2UW7 (un inhibidor de AKT2 de tipo pirazol-piperidina)⁴² se acoplaron en su isoforma AKT correspondiente utilizando los tres programas de acoplamiento antes mencionados. Como se ve en la Figura 2.5, los cálculos de acoplamiento predicen aceptablemente el modo de unión de los ligandos respecto a la estructura co-cristalizada de 4GV1 con valores de RMSD de 0,96 para Glide, 0,81 para AutoDock 4.2 y 0,88 para AutoDock Vina; y para el ligando 2UW7 con los valores de RMSD de 0,42 para Glide, 0,55 para AutoDock 4.2 y 0,54 para AutoDock Vina. Sin embargo, en el caso particular del ligando 2JDO (4c), el modo de unión predicho en los tres programas mostró una conformación invertida de 180° en comparación con la estructura de cristalizada, lo cual se explica debido a la flexibilidad de este ligando; esto es uno de los principales problemas en la predicción del modo de unión para moléculas muy flexibles.

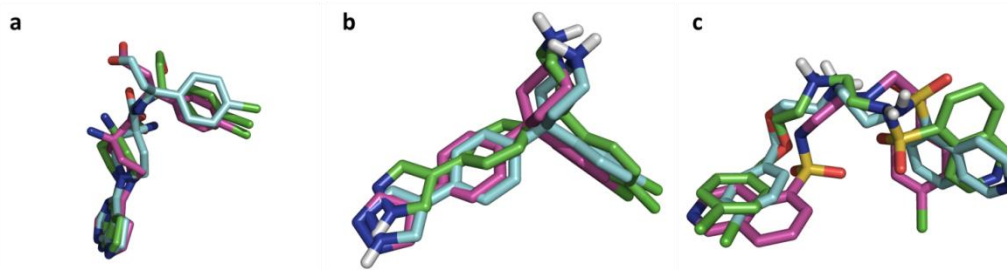


Figura 2.5. Comparación entre la estructura cristalográfica (morado) con el modo de unión predicho con Glide (azul) y AutoDock (verde) para la estructura de los ligandos 4GV1 en AKT1 (a), 2UW7 en AKT2 (b) y 2JDO en AKT2 (c).

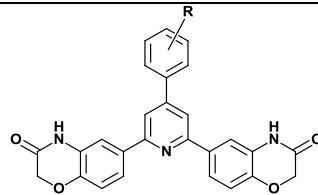
Al comparar la energía de unión calculadas con los tres programas, AutoDock 4.2 y AutoDock Vina tuvieron una buena correlación con la actividad biológica, ver Tabla 2.1. El inhibidor de tipo pirrolopirimidina en AKT1 mostró la mejor energía de unión y es el compuesto con mayor actividad (4GV1, $CI_{50}= 3 \text{ nM}$, $pCI_{50}= 8.52$)¹⁶, seguido del inhibidor pirazol-piperidina en AKT2 (2UW7, $CI_{50}= 18 \text{ nM}$, $pCI_{50}= 7.74$)⁴², mientras que el inhibidor isoquinolina-5-sulfonamida en AKT2 (2JDO, $CI_{50}= 230 \text{ nM}$, $pCI_{50}= 6,63$)⁷⁵ mostró la actividad más baja y fue el de menor predicción de unión, Tabla 2.1. Además de validar el método a través de la comparación de los datos experimentales con los modos de unión predichos, los inhibidores se estudiaron en el resto de las isoformas AKT utilizando los tres programas de acoplamiento, de modo que la energía de unión sirvió como referencia de puntuación para todas las isoformas para ser comparadas con los compuestos diseñados. Estos inhibidores mostraron modos de unión similares entre las isoformas debido a la alta homología en el sitio de unión a ATP. Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 2.1.

Las 42 piridinas trisustituidas diseñadas se acoplaron en las tres isoformas de AKT usando el mismo protocolo validado de acoplamiento molecular, los resultados se resumen en la Tabla 2.1. Las moléculas mostraron energías de unión favorables en las tres isoformas y en algunos casos superan en energía de unión a las estructuras de referencia en los tres programas. A pesar de la alta homología en el sitio de unión a ATP de las isoformas de AKT, en general las moléculas mostraron mejores energías de unión en las isoformas AKT1 y AKT3, este resultado fue interesante y se discutirá más adelante, ver

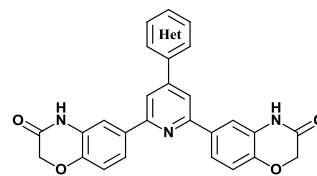
sección 2.5.3. Una representación esquemática de los valores de energía de unión obtenidos de los tres programas en las tres isoformas para todas las estructuras se muestra en la Figura 2.6. En la región III de estas representaciones se encuentran moléculas con los mejores valores de unión en los tres programas, estas moléculas son consideradas los más prometedores como inhibidores para cada isoforma de AKT. En el caso de AKT1 se encontraron 10 moléculas, 5 para la **Serie 1: S1-5, S1-6, S1-7, S1-14 y S1-20**; y 5 para la **Serie 2: S2-3, S2-6, S2-11, S2-13 y S2-15**. Para AKT2 se encontraron 10 moléculas, 4 para la **Serie 1: S1-4, S1-5, S1-15 y S1-20**; y 6 para la **Serie 2: S2-1, S2-5, S2-6, S2-7, S2-11 y S2-12**. Mientras que para AKT3 se identificaron 8 moléculas, 5 para la **Serie 1: S1-4, S1-7, S1-14, S1-15 y S1-20**; y 3 para la **Serie 2: S2-3, S2-8 y S2-15**.

Tabla 2.1. Resultados de energía de unión derivada del acoplamiento molecular de las estructuras de referencia y las piridinas trisustituidas diseñadas para las tres isoformas de AKT

Compuesto	AKT1				AKT2				AKT3			
	Glide XP	AutoDock 4.2	Clúster	AutoDock Vina	Glide XP	AutoDock 4.2	Clúster	AutoDock Vina	Glide XP	AutoDock 4.2	Clúster	AutoDock Vina
	$\Delta G_{unión}$ (kcal/mol)	$\Delta G_{unión}$ (kcal/mol)		$\Delta G_{unión}$ (kcal/mol)	$\Delta G_{unión}$ (kcal/mol)	$\Delta G_{unión}$ (kcal/mol)		$\Delta G_{unión}$ (kcal/mol)	$\Delta G_{unión}$ (kcal/mol)	$\Delta G_{unión}$ (kcal/mol)		$\Delta G_{unión}$ (kcal/mol)
2JDO	-9.75	-8.95	7	-8.78	-7.38	-9.75	4	-9.55	-10.23	-9.42	7	-8.92
2UW7	-9.42	-9.31	20	-9.11	-9.09	-9.41	11	-9.21	-9.30	-9.47	20	-9.21
4GV1	-8.94	-10.62	9	-10.02	-4.71	-10.52	5	-10.11	-9.22	-10.93	11	-10.02

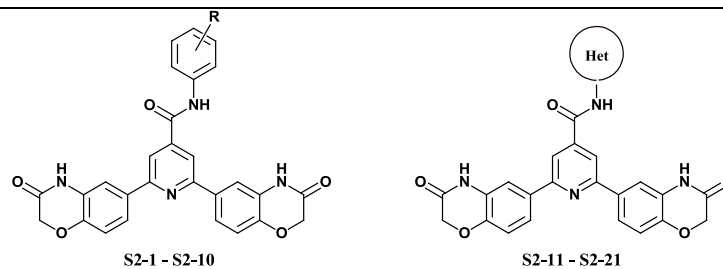


S1-1 - S1-17



S1-18 - S1-21

Comp.	R	$\Delta G_{unión}$ (kcal/mol)	$\Delta G_{unión}$ (kcal/mol)	Clúster	$\Delta G_{unión}$ (kcal/mol)	$\Delta G_{unión}$ (kcal/mol)	Clúster	$\Delta G_{unión}$ (kcal/mol)	$\Delta G_{unión}$ (kcal/mol)	$\Delta G_{unión}$ (kcal/mol)	Clúster	$\Delta G_{unión}$ (kcal/mol)
S1-1	H	-7.63	-11.62	14	-11.9	-4.95	-9.33	-12.5	-6.22	-11.77	15	-12
S1-2	4-NH ₂	-4.18	-11.38	14	-11.6	-4.07	-8.96	-12.2	-5.32	-11.53	13	-11.6
S1-3	4-NHCOCH ₃	-5.36	-12.51	20	-12.1	-0.99	-9.51	-12.4	-4.69	-12.67	20	-12.2
S1-4	4-NHSO ₂ CH ₃	-5.34	-12.93	16	-11.4	-3.14	-10.12	-12	-5.70	-13.05	15	-11.5
S1-5	4-NHSO ₂ CF ₃	-5.43	-12.82	15	-11.8	-6.57	-9.81	-12.2	-5.59	-12.98	11	-11.8
S1-6	4-SO ₂ NH ₂	-6.60	-12.95	11	-11.6	-3.06	-10.53	-12.2	-5.50	-13.08	11	-11.6
S1-7	4-CONH ₂	-6.09	-12.36	14	-11.9	-1.65	-10.14	-12.5	-6.97	-12.59	12	-12
S1-8	4-COOH	-5.65	-11.94	10	-12	-0.24	-9.73	-12.4	-5.53	-12.06	10	-12.1
S1-9	4-CF ₃	-5.34	-11.77	12	-12.3	-4.39	-9.31	-12.7	-5.48	-11.92	13	-12.4
S1-10	4-OCF ₃	-5.88	-11.92	14	-12	-5.19	-9.04	-12	-6.24	-12.09	17	-12
S1-11	3,5-CF ₃	-3.96	-12.11	16	-12.5	-0.59	-8.94	-12.8	-3.99	-12.27	18	-12.6
S1-12	3-CF ₃	-7.07	-12.14	16	-12.3	-3.15	-9.3	-12.8	-6.04	-12.28	13	-12.3
S1-13	3-OCF ₃	-3.98	-12.67	13	-12.2	-4.27	-8.97	-12.5	-2.07	-12.84	12	-12.3
S1-14	3-CONH ₂	-5.67	-12.98	15	-12.2	-1.60	-10.06	-12.9	-6.06	-13	12	-12.3
S1-15	4-CN	-5.17	-12.17	15	-12.1	-3.42	-9.96	-12.8	-6.01	-12.32	15	-12.2
S1-16	3-CN	-4.98	-12.97	13	-12.4	-0.80	-9.52	-12.9	-5.19	-12.29	8	-12.5
S1-17	4-OH	-4.28	-11.93	12	-11.6	-3.98	-9.14	-12.2	-3.23	-11.56	9	-11.7
S1-18	2-aminopirimidin-5-il	-6.19	-11.47	18	-11.5	-0.63	-11.06	-11.9	-6.75	-11.66	19	-11.6
S1-19	3-furil	-7.19	-11.32	20	-11.4	-0.59	-9.82	-12.1	-7.49	-11.48	19	-11.5
S1-20	1H-bencimidazol-6-il	-6.22	-12.4	15	-12.5	-3.37	-9.5	-12.8	-6.69	-12.54	12	-12.5
S1-21	Benzotiazol-5-il	-5.25	-12.9	18	-12.4	-1.21	-10.3	-12.9	-5.68	-13.05	17	-12.5



S2-1 - S2-10						S2-11 - S2-21							
S2-1	H	-5.87	-12.72	20	-12.9	-4.63	-11.04	17	-12.6	-5.61	-12.87	20	-12.9
S2-2	4-Cl	-5.96	-13.27	20	-12.9	-4.51	-11.22	20	-12.7	-5.25	-13.43	20	-13
S2-3	3,4-Cl	-7.92	-13.64	20	-12.9	-2.23	-11.33	20	-12.7	-6.57	-13.79	20	-13
S2-4	3,5-CF ₃	-4.94	-12.46	18	-13.6	-5.29	-9.93	20	-12.5	-5.36	-12.57	19	-13.6
S2-5	3-Cl	-6.24	-12.97	19	-12.8	-4.60	-11.23	19	-12.6	-5.08	-13.08	18	-12.9
S2-6	3-OCH ₃	-7.89	-12.57	19	-12.7	-6.28	-10.98	17	-12.2	-6.05	-12.75	18	-12.7
S2-7	4-CN	-6.56	-13.82	20	-13.1	-5.36	-11.26	20	-12.8	-5.51	-13.99	20	-13.3
S2-8	3-CF ₃	-7.54	-12.45	9	-13.7	-3.93	-10.96	16	-12.6	-6.58	-12.83	19	-13.7
S2-9	4-F	-5.82	-12.74	20	-13.1	-4.64	-11.02	20	-12.7	-5.79	-12.92	20	-13.1
S2-10	3,5-Cl	-5.31	-12.94	20	-12.9	-1.16	-10.74	19	-12.6	-6.01	-13.12	20	-13
S2-11	6-Cl-1H- benzimidazol-2-il	-8.35	-13.61	20	-13.4	-4.82	-13.08	20	-12.7	-7.34	-13.74	20	-13.4
S2-12	6-OCH ₃ - benzotiazol-2-il	-6.67	-14.23	19	-12.3	-5.85	-11.39	19	-12	-5.76	-14.41	20	-12.4
S2-13	6-NO ₂ -benzotiazol- 2-il	-7.30	-14.8	19	-13.1	-4.65	-9.74	12	-12	-4.35	-14.9	20	-13.1
S2-14	Tiazol-2-il	-6.43	-12.13	18	-11.8	-1.25	-10.69	18	-12	-6.82	-12.3	19	-11.8
S2-15	Pirimidin-2-il	-8.37	-12.53	20	-12.5	-4.44	-12.23	20	-12.3	-8.24	-12.71	20	-12.5
S2-16	Pirazine-2-il	-7.29	-12.3	20	-12.3	-3.30	-10.53	20	-12.1	-6.23	-12.49	18	-12.4
S2-17	Piperidino	-7.12	-11.19	12	-12.1	-4.06	-10.08	19	-12.3	-7.62	-11.47	7	-12.2
S2-18	Morfolino	-7.73	-11.77	18	-12	-5.44	-9.77	20	-12.2	-7.49	-11.91	16	-12
S2-19	4-CH ₃ -piperazino	-8.36	-11.35	16	-12	-2.59	-10.8	16	-12.5	-8.92	-11.54	17	-12
S2-20	4-COCH ₃ - piperazino	-8.44				-5.77				-8.89			
S2-21	4-CH ₃ -piperidino	-7.47	-11.49	16	-12.6		-10.71	18	-12.9		-11.61	16	-12.7
			-12.41	16	-12.3	-0.27	-10.25	19	-12.5	-6.88	-12.49	16	-12.4

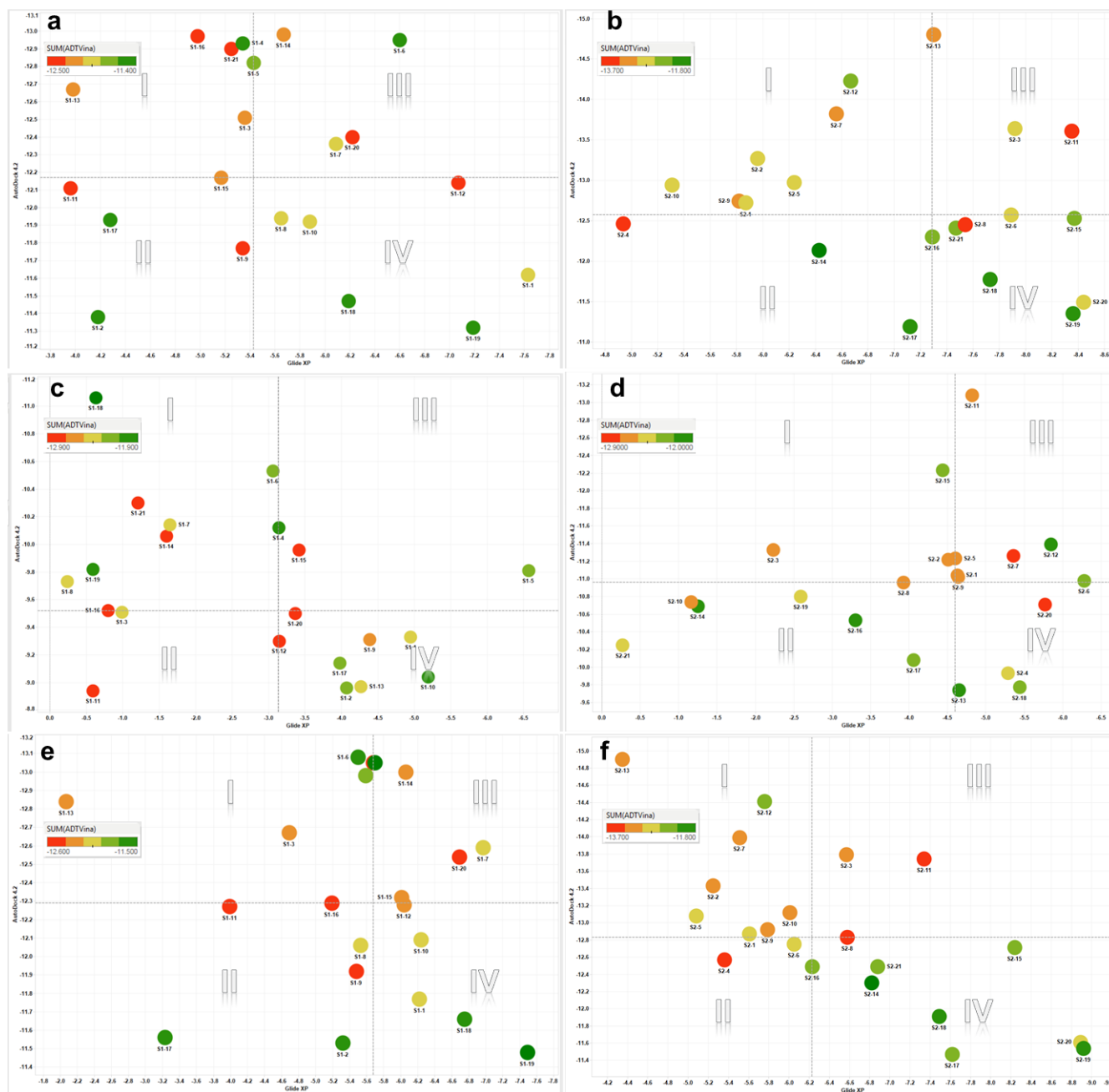


Figura 2.6. Gráficos de energía de unión consenso para los compuestos de las **Serie 1** (a) y **Serie 2** (b) en AKT1, **Serie 1** (c) y **Serie 2** (d) en AKT2 y **Serie 1** (e) y **Serie 2** (f) en AKT3. La región I contiene los datos de los compuestos con alta energía de unión sólo para AutoDock 4.2; la región II contiene los datos de los compuestos con baja energía de unión en los programas AutoDock 4.2 y Glide; la región III contiene los datos de los compuestos con alta energía de unión en los programas AutoDock 4.2 y Glide (inhibidores más prometedores); región IV contiene los datos de los compuestos con altas energía de unión sólo para el programa Glide. Los datos de energía de unión del programa AutoDock Vina se representan en escala de color.

Como se ve en la Figura 2.7, las moléculas muestran modos de unión similares en las isoformas de AKT como la molécula precursora **11**. La estructura modificada *2H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-ona

ocupa la cavidad del sitio de unión de ATP; el aumento del tamaño del anillo (de un anillo de 5 miembros a un anillo de 6 miembros) favorece las interacciones hidrofóbicas con los residuos Val164/166/162, Ala177/179/175, Ala230/232/Val228, Met281/282/278 y Phe438/439/435. En particular, los compuestos de ambas series en muestran más interacciones de puente de H con los residuos del sitio de unión a ATP en las isoformas AKT1 y AKT3 en comparación con AKT2. Como se observa en la Figura 2.7 para AKT1 y AKT3, el oxígeno de 2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-ona tiene interacción por puente de H con el NH de la cadena principal del residuo Ala230/Val228 (NH \cdots O, \sim 2.1 Å), también el grupo carbonilo forma un puente de H con la cadena lateral del residuo Thr211/209 y Thr291/288, respectivamente. El segundo grupo 2*H*-1,4-benzoxazin-3 (4*H*)-ona se une en la región conocida como bucle P (*loop P*) donde el NH de la benzoxazinona forma un puente de H con Asp292/289 y el grupo carbonilo forma un puente de H con Lys179/177. Por el contrario, en la isoforma AKT2 la mayoría de los compuestos no muestran interacción de puente de H en la cavidad del sitio de unión de adenosina en particular con el residuo Ala232 (*hinge residue*), y sólo exhiben interacciones de puente de H con la cadena lateral de los residuos Thr213 y Thr292, mientras que el segundo grupo 2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-ona solo forma una interacción de puente de H con el residuo Asp293. Por otra parte, la sustitución en la posición 4 del anillo de piridina favorece la estabilización con las tres isoformas. Para la **Serie 1**, el anillo de fenilo en esta posición hace una interacción aromática en forma de T con Phe442/443/439. En esta sustitución, los mejores ligandos de los resultados consenso tienen grupos hidrófobos y polares unidos a la posición *m/p* del anillo de fenilo, tales como sulfonamida (**S1-5**, **S1-6**), carboxamida (**S1-7**, **S1-14**), nitrilo (**S1-15**) o bencimidazol (**S1-20**), estos sustituyentes favorecen las interacciones por puentes de H con los residuos Glu278/279/275 y Asp439/440/436. En el caso de la **Serie 2**, la adición de un enlace carboxamida favorece la interacción por puente de H con la cadena principal del residuo Lys158/160/161 y con la cadena lateral del residuo Glu234/236/232, esta modificación mejora ligeramente la energía de unión. Para esta serie,

los mejores ligandos de los resultados consenso tienen grupos hidrofóbicos más diversos unidos a la porción carboxamida, tales como anilinas *m/p* sustituidas con halógenos (mono- y di- cloro o fluoro, **S2-3**, **S2-5**, **S2-6**), nitrilo (**S2-7**), trifluorometilo (**S2-8**), aminas heterocíclicas como 6-clorobencimidazol (**S2-11**), 6-metoxi o 6-nitrobenzotiazol (**S2-12**, **S2-13**) y pirimidina (**S2-15**). Estos grupos fenilo o heterocíclico mantiene la interacción en forma de T con Phe442/443/439, y los sustituyentes tienen interacciones con los residuos Phe236/238/234, Phe237/239/235 y Arg241/243/239. También se observa que los mejores compuestos tienen mejor interacción en la cavidad aromática formada por los residuos aromáticos mencionados anteriormente en las isoformas AKT1 y AKT3. Se observa también que los compuestos en AKT2 muestran un desplazamiento hacia afuera del sitio de unión a ATP evitando la interacción en esta porción aromática en esta isoforma. Para las mejores moléculas consenso de ambas series, la interacción con los residuos Phe236/238/234, Phe237/239/235, Arg241/243/239, Glu278/279/275 y Asp439/440/436 se ve favorecida por la presencia de un sustituyente fenilo o arilcarboxamida en la posición 4 del anillo de piridina, en particular para las isoformas AKT1 y AKT3. Esta interacción no está presente con los inhibidores de referencia reportados, por lo que esta interacción puede aumentar el potencial de los compuestos diseñados como inhibidores de AKT. El modo de unión de los compuestos más prometedores seleccionados por acoplamiento molecular se utilizó como punto de partida para estudios de dinámica molecular para verificar la estabilidad y comportamiento en el sitio de unión a lo largo del tiempo. Es importante mencionar que se encontró un modo de unión alternativo con el programa Glide, el cual mostró energía de unión similar al común encontrado en estos estudios. En este modo de unión alternativo el sustituyente de la posición 4 del anillo de piridina ocupa el bucle P o bien la cavidad del sitio de unión a adenosina, por lo que estas conformaciones alternativas también se consideraron en los estudios de dinámica molecular.

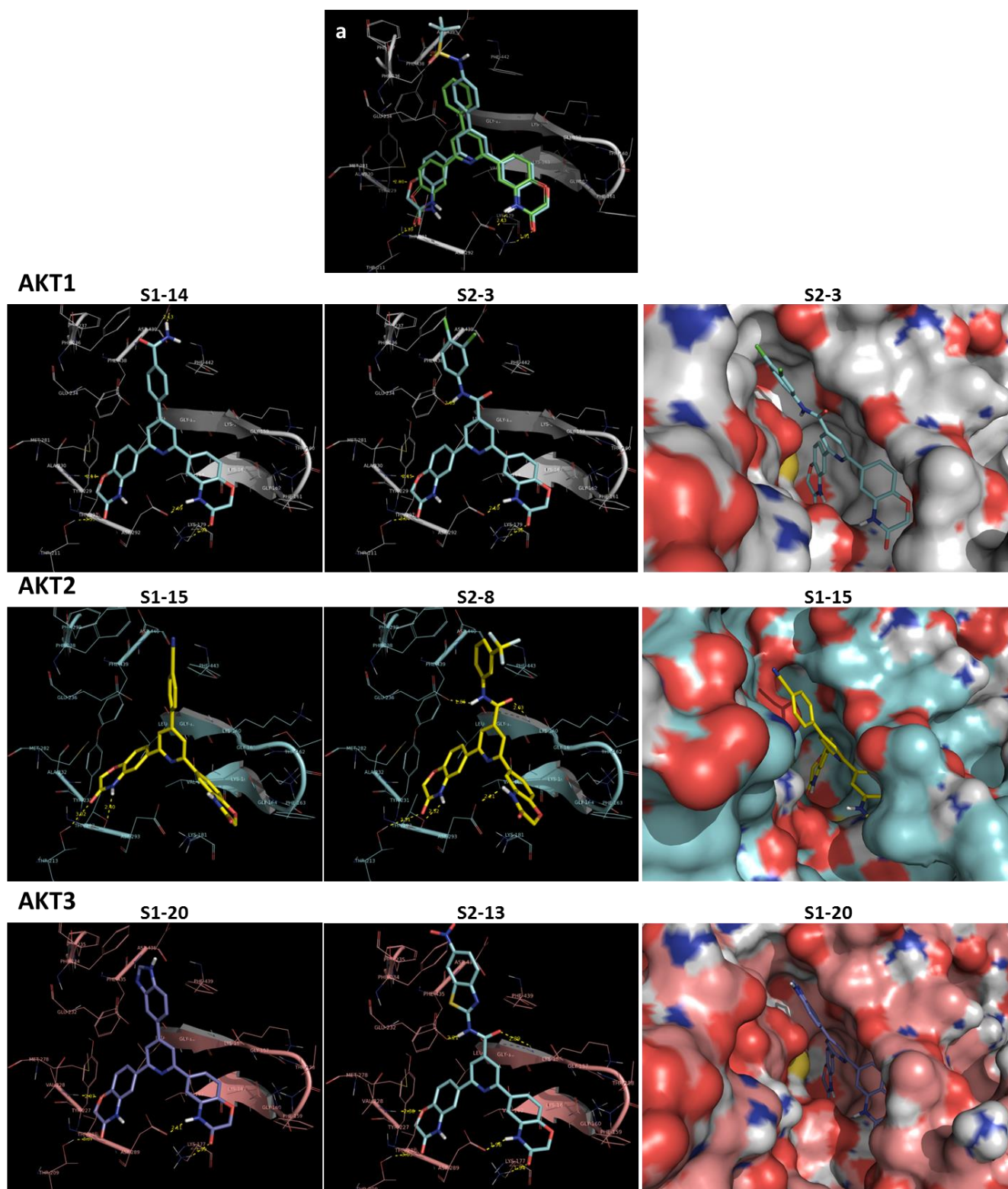


Figura 2.7. Modo de unión de los compuestos diseñados en las isoformas de AKT. Comparación del modo de unión del compuesto S1-5 y la molécula precursora 11 en AKT1. Compuestos S1-7 y S2-3 en AKT1. Compuestos S1-15 y S2-8 en AKT2. Compuestos S1-20 y S2-13 en AKT3. Las interacciones por puente de H se representan en líneas punteadas amarillas.

2.5.3. Dinámica molecular

Las interacciones observadas durante los estudios de acoplamiento molecular pueden cambiar en un entorno dinámico, por esta razón se recomienda verificar la estabilidad del complejo proteína-ligando mediante estudios de simulación de dinámica molecular. En este sentido, los mejores resultados consenso seleccionados del acoplamiento molecular se evaluaron en su correspondiente isoforma de AKT durante simulaciones de 10 ns de duración. Junto con las moléculas diseñadas, se simularon también las estructuras de referencia en las tres isoformas bajo las mismas condiciones con el fin de comparar su estabilidad y energía con las moléculas diseñadas. La estabilidad dinámica de cada complejo se evaluó utilizando el valor de RMSD. Como se observa en el gráfico de RMSD, las mejores moléculas diseñadas permanecieron en el sitio activo durante la simulación con valores bajos de RMSD. En particular para AKT1 donde las moléculas mostraron los valores más bajos 0.9–3.3 Å, seguido de AKT3 (1.2–3.5 Å). En el caso de AKT2 los compuestos mostraron más fluctuaciones durante la simulación (2.0–5.2 Å) incluso desde el inicio de la simulación, lo que indica una mala estabilidad de los complejos con esta isoforma.



Figura 2.8. Comportamiento de RMSD durante de 10 ns de simulación de los compuestos seleccionados de ambas series y los ligandos de referencias dentro del sitio de unión a ATP de AKT1 (a, b), AKT2 (c, d) y AKT3 (e, f).

Las interacciones observadas en los estudios de acoplamiento molecular de las moléculas diseñadas se conservaron en la mayoría de los casos durante las simulaciones; sin embargo, dependiendo de la isoforma algunos de las interacciones cambiaron durante la simulación, ver Figura 2.9. En particular, para las moléculas en las isoformas AKT1 y AKT3, el bucle P se cierra sobre el grupo 2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-ona, de modo que el ligando interactúa con la cadena principal del bucle P a través de puentes de H entre el NH de grupo benzoxazinona y el residuo Asp292/289 o mediante una nueva interacción observada en la simulación con el carbonilo de la benzoxazinona y el residuo Lys179/177, respectivamente. Este cambio conformacional favorece la introducción del otro

grupo 2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-ona en la cavidad del sitio de unión a adenosina, mostrando interacciones hidrofóbicas con los residuos Ala177/175, Ala230/Val228, Met281/278 y por puente de H con residuo Thr291/288 y Ala230/Val228 (*hinge residues*). Este efecto observado en ambas series de compuestos para estas isoformas explica la estabilidad de los complejos, observado en los valores bajos de RMSD. Además para la **Serie 1**, las moléculas con grupos como sulfonamida (**S1-4**, **S1-5**, **S1-6**) y carboxamida (**S1-7**, **S1-14**) mostraron la mejor estabilidad. La interacción en forma de T entre el anillo de fenilo y el residuo Phe442/439, descrito en los estudios de acoplamiento anteriores, permanece en las simulaciones mientras que los grupos polares tienen interacción por puente de H con Asp439/436. Para la **Serie 2**, particularmente carboxamidas con un grupo diclorofenilo (**S2-3**), 6-clorobencimidazol (**S2-11**), 6-nitrobenzotiazol (**S2-13**) y pirimidina (**S2-15**) mostraron mejor estabilidad. En este caso, el NH del grupo carboxamida muestra interacción por puente de H con el residuo Glu234/232, en cambio la interacción en forma de T entre el arilo y el residuo Phe442/439 observado en el acoplamiento molecular no permanece durante la simulación; sin embargo, se observa una interacción con los residuos Phe236/234 y Phe237/235. Por el contrario, un resultado interesante se observa para AKT2 donde la mayoría de las moléculas estudiadas mostraron una rotación del grupo 2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-ona (**S1-4**, **S1-6**, **S1-15**, **S1-20**, **S2- 5**, **S2-6**, **S2-7** y **S2-12**), este cambio conformacional aleja a este grupo que impide la interacción con el residuo Asp293, también se observa que la conformación del bucle P está ligeramente abierta, en comparación con los resultados de las otras isoformas. Ambos efectos hacen que las moléculas muestren un desplazamiento de la cavidad del sitio activo, este resultado explica los valores altos de RMSD observados para AKT2.

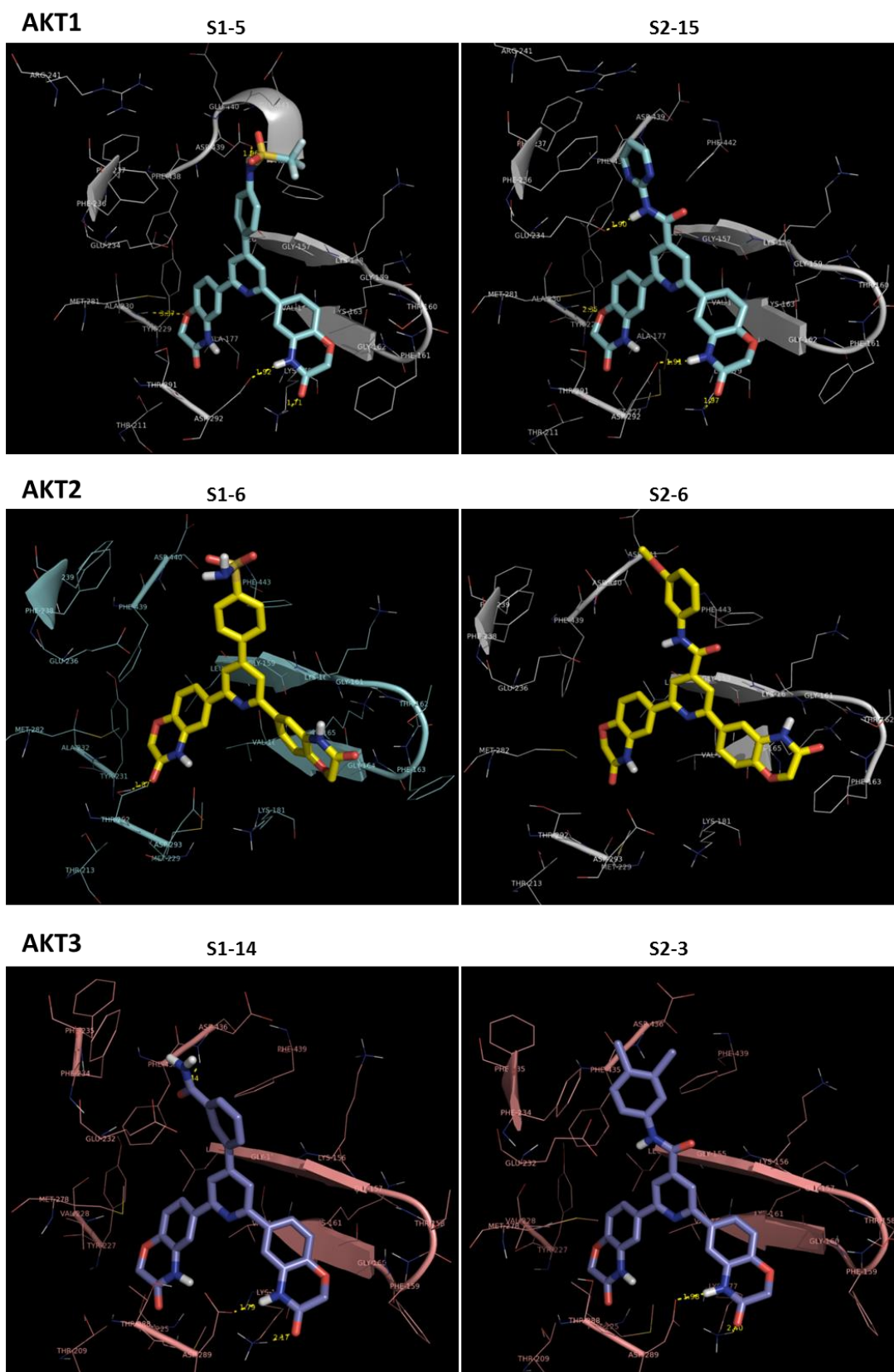


Figura 2.9. Modos de unión de los compuestos seleccionados en las isoformas de AKT. Cada estructura se tomó del último tiempo de simulación. Para una mejor visualización sólo se muestran los aminoácidos del sitio de unión. Las interacciones de puente de hidrógeno se representan en líneas punteadas amarillas.

Además, el análisis de la fluctuación de la desviación media cuadrática (*root-mean-square fluctuations*, RMSF), el cual es un indicador de la movilidad promedio de los residuos durante una simulación, muestra las mayores fluctuaciones en los aminoácidos externos que están en contacto con el disolvente. En particular, el análisis de los aminoácidos del bucle P en isoformas de AKT, Leu156/158/154, Gly157/159/155, Lys158/160/156, Gly159/161/157, Thr160/162/158, Phe161/163/159, Gly162/164/160, Lys163/165/161 y Val164/166/162, revela un comportamiento diferente de la proteína en presencia o ausencia del ligando. Este cambio de conformación, se observó especialmente en AKT2, donde la mayoría de los residuos en el bucle experimentan un cambio de hasta 1 Å en su posición, lo que se atribuye a la conformación abierta que adopta el bucle en presencia de un ligando y que se observa durante la simulación.

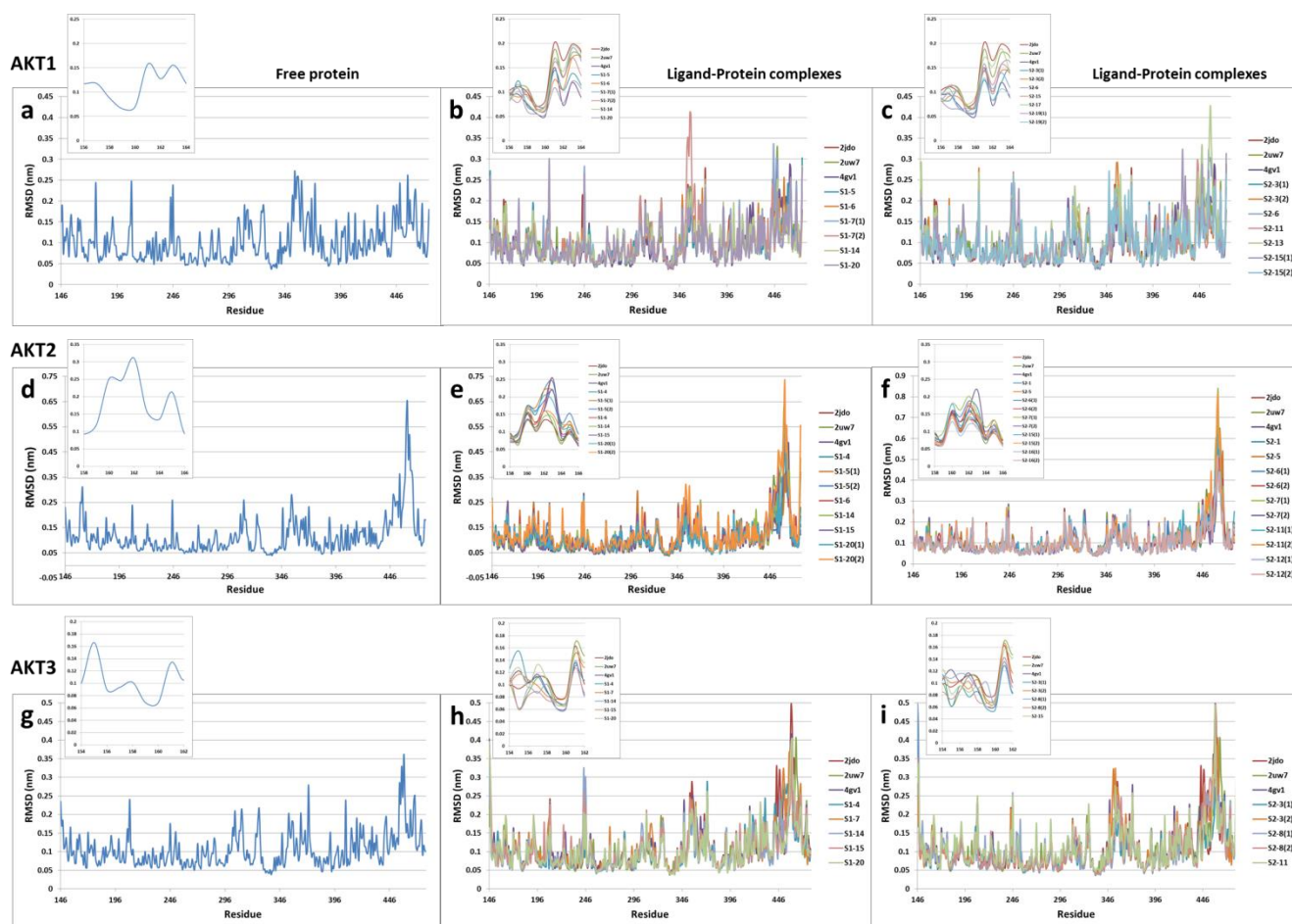


Figura 2.10. Evaluación de RMSF de cada residuo en la proteína libre y en complejo ligando-proteína para AKT1 (a-c), AKT2 (d-f) y AKT3 (g-i).

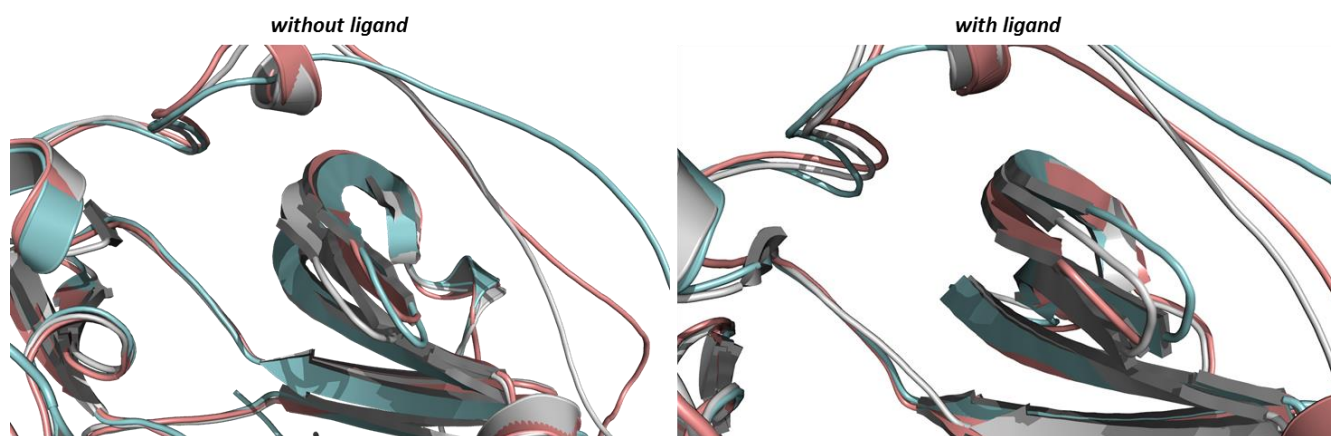


Figura 2.11. Cambio conformacional del bucle P en AKT1 (gris), AKT2 (azul) y AKT3 (rosa) durante la simulación en presencia o ausencia de ligando. Las estructuras se tomaron del último tiempo de simulación.

De las simulaciones de dinámica molecular también se analizó la energía libre de unión de los complejos AKT-ligando para los últimos 3 ns de simulación utilizando el método MM-PBSA. Los datos de los componentes de la energía libre de unión se resumen en la Tabla 2.2, mientras que el comportamiento energético de los complejos durante estos 3 ns se muestra en la Figura 2.12. Se observa que las moléculas diseñadas muestran una energía libre de unión favorable durante las simulaciones, en particular las energías de unión muestran ser más constantes para los complejos en AKT1 y AKT3, que para AKT2 en donde se observan más fluctuaciones en algunas moléculas. La principal contribución favorable a la energía libre de unión que tiene un papel principal en las interacciones entre ligando y proteína es el componente de van der Waals. Esto se confirma principalmente por las interacciones con los residuos de aminoácidos hidrofóbicos observados en los estudios de acoplamiento y dinámica molecular. Es importante señalar que el factor hidrofóbico es más relevante para la contribución en la energía libre de unión en las moléculas estudiadas para las isoformas AKT1 y AKT3, esto sugiere que la optimización de las interacciones de tipo van der Waals entre las moléculas puede favorecer la mayor selectividad a las isoformas AKT1 y AKT3. Respecto a las conformaciones alternativas encontradas en los estudios de acoplamiento molecular, los simulaciones muestran que los ligandos se mantienen estables durante las simulaciones con valores

similares o menores de RMSD y energía libre de unión favorable a los de la conformación común en todas las moléculas, en particular cuando el sustituyente arilo o arilcarboxamida ocupa la cavidad del bucle P. Dada la distribución de los sustituyentes que presentan las moléculas diseñadas, esta conformación alterna también puede presentar interacción con las isoformas e inhibir su función.

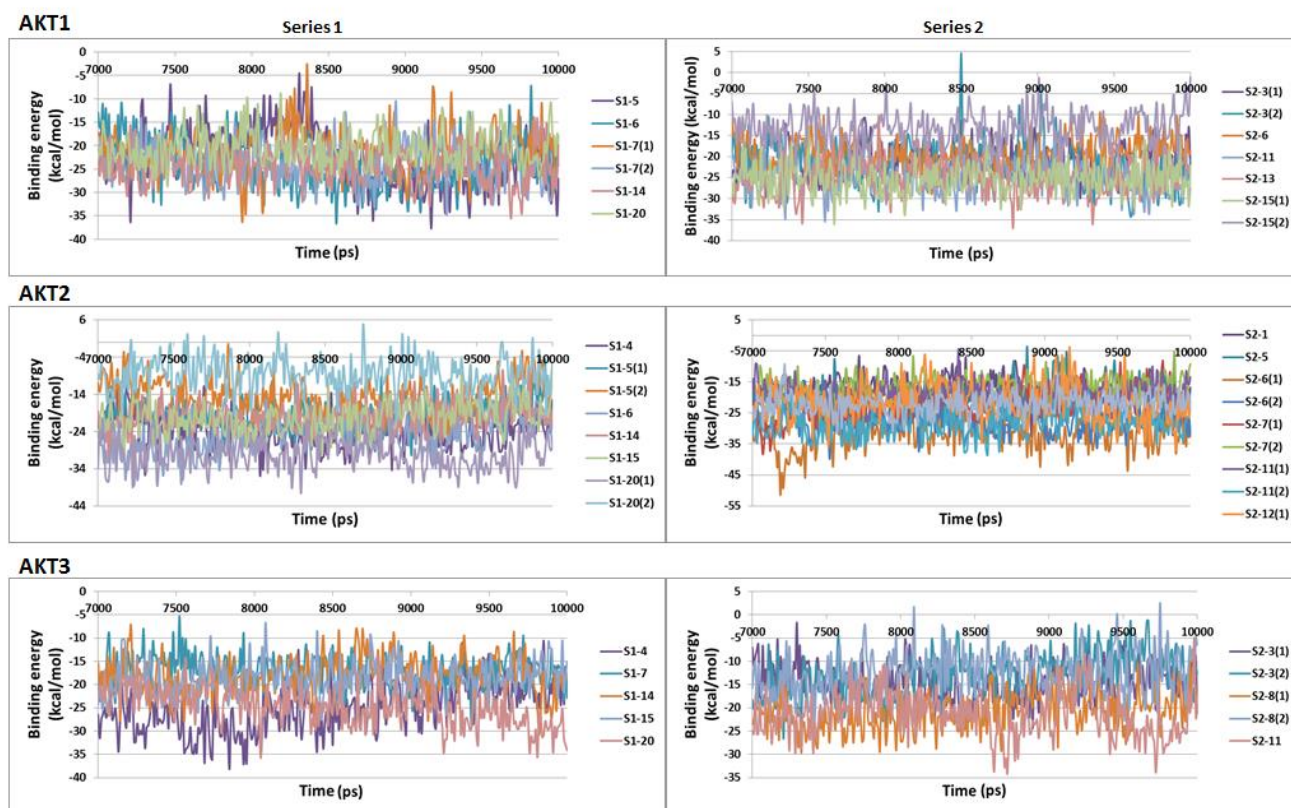


Figura 2.12. Comportamiento de la energía libre de unión de los compuestos en las isoformas de AKT.

En el caso de las estructuras de los ligandos de referencia 2UW7, 2JDO y 4GV1, el análisis de RMSD indica una alta estabilidad de los complejos durante las simulaciones. Para los ligandos 2UW7 y 4GV1, estos muestran alta estabilidad durante la simulación con los valores más bajos RMSD en las tres isoformas. En el caso del ligando 2JDO éste exhibió la menor estabilidad durante la simulación, lo que se atribuye a la flexibilidad del ligando, esto tiene relación ya que este ligando es el menos activo de los ligandos de referencia estudiados (CI_{50} = 230 nM, pCI_{50} = 6.63). El análisis de la energía libre de unión por el método MM-PBSA muestra consistencia entre la energía libre de unión y la actividad

experimental para el ligando 4GV1. El método MM-PBSA es un método popular para estimar la energía libre de unión de ligandos pequeños a macromoléculas biológicas. Este método se ha utilizado con éxito para reproducir y racionalizar los hallazgos experimentales y a su vez para mejorar los resultados de cribado virtual (*virtual screening*), en particular para ligandos neutros donde se ha observado que este método ofrece resultados de energías de unión más razonables con datos experimentales ⁷¹. En nuestro caso todas las piridinas trisustituidas diseñadas en este trabajo son estructuras neutras, por lo que comparando la energía de unión de la referencia 4GV1 (que en este trabajo es la referencia más potente incluida en el análisis y tomada como molécula neutra) con las mejores piridinas trisustituidas encontradas éstas presentan un perfil de energía similar o mejor. Estos resultados sugieren que los compuestos seleccionados después de un enfoque *in silico* podrían ser inhibidores prometedores de AKT, en particular contra isoformas AKT1 y AKT3. Cabe señalar que en el caso particular de los ligandos 2UW7 y 2JDO, la energía libre de unión no tiene correlación con las actividades experimentales. El método MM-PBSA muestra complicaciones para los ligandos protonados ya que sobreestima la energía libre de unión. En este método los ligandos protonados presentan una mayor contribución electrostática (ΔE_{elec}) que no es compensada por la energía de solvatación polar (ΔG_{pol}) lo que hace que la energía de unión se sobreestime ^{76,77}. Los ligandos 2UW7 y 2JDO se consideraron protonados en este estudio (tienen un grupo amino protonable), como se observa en la Tabla 2.2 estos tienen un valor alto de ΔE_{elec} sobreestimando su energía de unión, por lo que no se tomaron como referencia en los estudios de dinámica molecular con las de las moléculas diseñadas debido a las limitaciones del método.

Tabla 2.2. Componentes individuales y energías libres de unión predichas para los compuestos diseñados en las isoformas de AKT determinadas por el método MM-PBSA

Compuesto	ΔE_{vdw}	ΔE_{elec}	ΔG_{polar}	$\Delta G_{no\ polar}$	$\Delta G_{unión}$	RMSD (nm) ^a
AKT1						
S1-5	-61.30	-18.67	63.05	-5.73	-22.67	0.26
S1-6	-58.82	-12.11	51.97	-5.14	-24.10	0.29
S1-7 (1)^b	-59.48	-15.11	58.75	-5.35	-21.19	0.22
S1-7 (2)^c	-53.13	-23.44	57.83	-5.13	-23.88	0.25
S1-14	-55.98	-12.44	49.20	-5.12	-24.34	0.22
S1-20	-55.89	-13.86	54.46	-5.26	-20.57	0.09
S2-3 (1)	-63.33	-16.05	64.25	-5.79	-20.92	0.12
S2-3 (2)	-62.06	-22.68	68.87	-5.89	-21.77	0.09
S2-6	-60.81	-18.79	66.17	-5.92	-19.35	0.18
S2-11	-64.88	-27.83	73.51	-5.79	-25.00	0.28
S2-13	-65.77	-19.39	66.30	-5.97	-24.83	0.33
S2-15 (1)	-65.17	-7.07	52.60	-5.58	-25.23	0.22
S2-15 (2)	-52.49	-26.19	71.24	-5.54	-12.97	0.14
2JDO	-45.91	-107.90	111.32	-4.78	-45.28	0.59
2UW7	-41.81	-109.06	104.22	-4.22	-50.88	0.12
4GV1	-51.74	-16.16	58.87	-4.94	-13.97	0.13
AKT2						
S1-4	-53.18	-24.31	58.89	-5.30	-23.90	0.32
S1-5 (1)	-49.75	-13.10	48.24	-4.82	-19.43	0.49
S1-5 (2)	-60.38	-17.00	69.57	-6.47	-14.29	0.27
S1-15	-46.58	-10.52	41.28	-4.59	-20.42	0.31
S1-20 (1)	-50.49	-17.91	43.03	-4.88	-30.26	0.52
S1-20 (2)	-47.02	-6.84	50.61	-5.08	-8.33	0.30
S2-1	-39.5	-7.74	33.97	-4.62	-17.89	0.24
S2-5	-52.18	-16.36	53.68	-5.41	-20.28	0.24
S2-6 (1)	-53.34	-18.29	45.06	-4.98	-31.56	0.40
S2-6 (2)	-51.65	-4.70	34.04	-4.99	-27.30	0.40
S2-7 (1)	-54.76	-17.73	55.51	-5.24	-22.23	0.43
S2-7 (2)	-50.41	-14.60	54.10	-5.62	-16.54	0.20
S2-11 (1)	-62.11	-26.61	75.24	-5.86	-19.35	0.49
S2-11 (2)	-56.15	-13.35	46.43	-5.46	-28.52	0.29
S2-12 (1)	-58.73	-24.65	67.80	-5.73	-21.32	0.33
S2-12 (2)	-56.99	-9.98	50.40	-5.43	-22.01	0.31
2JDO	-45.09	-126.52	110.13	-4.41	-65.90	0.22
2UW7	-43.54	-130.67	107.75	-4.29	-70.76	0.09
4GV1	-43.19	-22.10	49.61	-4.57	-20.26	0.20
AKT3						
S1-4	-63.73	-16.48	60.77	-5.61	-25.05	0.26
S1-7	-54.72	-4.81	47.89	-5.32	-16.97	0.24
S1-14	-58.31	-21.45	67.25	-5.53	-18.04	0.12
S1-15	-56.54	-11.50	54.85	-5.43	-18.62	0.35
S1-20	-53.27	-12.99	46.51	-4.98	-24.74	0.26
S2-3 (1)	-60.67	-16.13	67.99	-5.79	-14.61	0.13
S2-3 (2)	-53.22	-18.58	64.30	-5.76	-13.04	0.19
S2-8 (1)	-62.35	-18.91	66.35	-5.89	-20.80	0.25
S2-8 (2)	-62.41	-20.80	77.15	-6.14	-12.20	0.13
S2-11	-60.96	-28.22	73.65	-5.88	-21.42	0.26
2JDO	-49.37	-106.78	109.56	-4.68	-51.29	0.19
2UW7	-40.42	-106.79	94.43	-4.21	-56.99	0.11
4GV1	-47.95	-24.67	50.30	-4.67	-26.99	0.17

^aLas determinaciones se tomaron de los últimos 3 ns simulación.

^bModo de unión común observado en los estudios de acoplamiento molecular.

^cModo de unión alternativo observado en los estudios de acoplamiento molecular.

Las isoformas de AKT comparten una alta homología en el sitio de unión a ATP; por lo tanto, de acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo la selectividad de las moléculas diseñadas se puede explicar por la arquitectura de cada dominio de acuerdo a la isoforma y a su vez por su comportamiento dinámico. Como se observa en la Figura 2.13, el comportamiento dinámico de cada isoformas de AKT sin ligando muestra una conformación cerrada en el sitio de unión de ATP, pero comparando diferentes estructuras tomadas de la simulación para las isoformas AKT1 y AKT3 muestran la exposición de una cavidad hidrofóbica próxima a la región del sitio de unión a adenosina (*hinge cavity*) formada por los residuos Phe236/234, Phe237/235, Phe438/435 y Phe442/439 respectivamente, mientras que para AKT2 los residuos Phe238, Phe239, Phe439 y Phe443 no forman tal cavidad. Cuando los ligandos se incluyen en la simulación, por ejemplo la molécula **S1-14** en la Figura 2.13, el anillo de fenilo sustituido en la posición 4 del núcleo de piridina ocupa y modula la apertura de la cavidad hidrofóbica favoreciendo a su vez la introducción del grupo 2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-ona en la cavidad del sitio de unión de ATP de AKT1 y AKT3. Por el contrario, en AKT2 la cavidad no está bien definida y el anillo de fenilo sustituido no se une a esta región, haciendo que las moléculas estudiadas se alejen del sitio de unión. Con los resultados del estudio de dinámica molecular se observa que la conformación del sitio de unión de ATP está definida por la estructura ternaria la cual expone una región hidrofóbica superficial, siendo importante para la unión selectiva de las moléculas diseñadas. Por lo tanto, la presencia de un grupo hidrofóbico o aromático sustituido en la posición 4 del anillo de piridina es fundamental para mostrar selectividad en las isoformas AKT1 y AKT3.

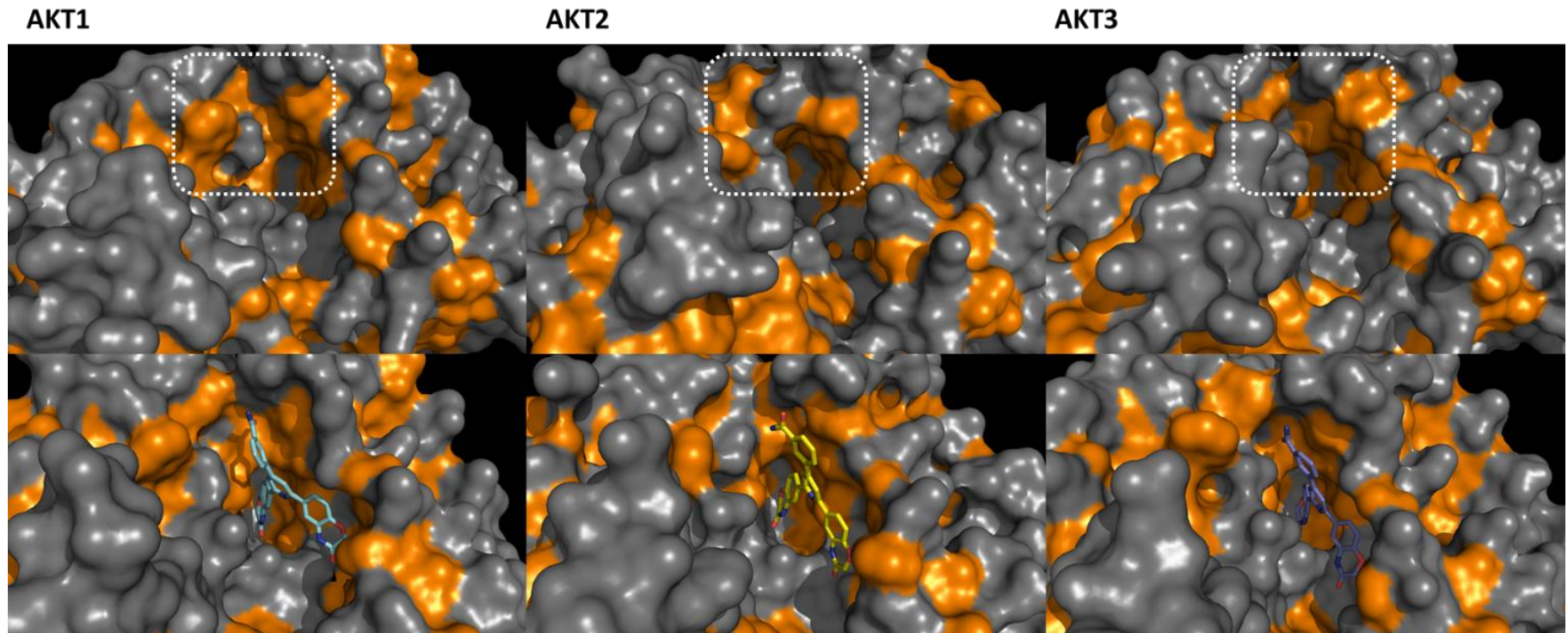


Figura 2.13. Comparación estructural de la cavidad hidrofóbica formada por los residuos Phe236/238/234, Phe237/239/235, Phe438/439/435 y Phe442/443/439 en las isoformas de AKT (libres y con ligando) después de la simulación. Las regiones hidrofóbicas de la proteína se destacan en color.

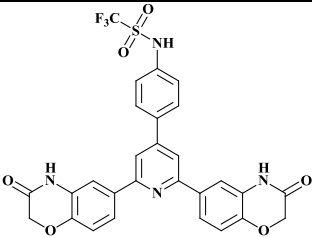
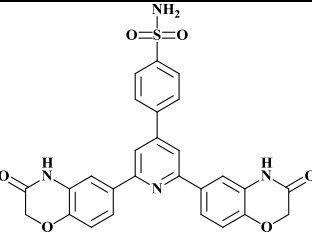
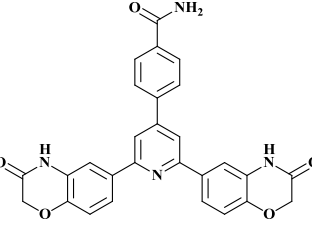
2.5.4. Relevancia de las isoformas de AKT

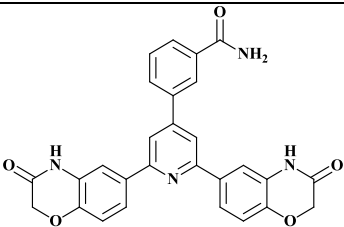
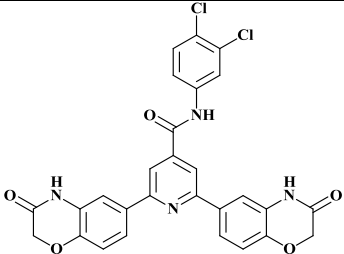
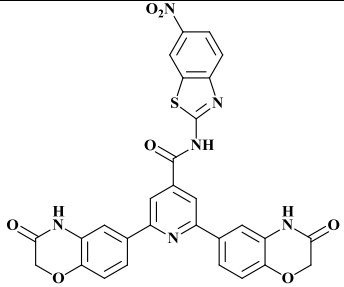
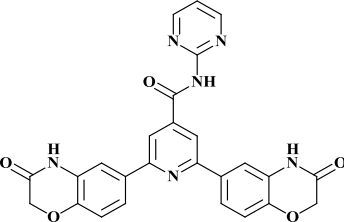
La familia de AKT cinasas es una de las más frecuentemente sobreexpresadas e hiperactivadas en los cánceres humanos y desempeña un papel crucial en la supervivencia, crecimiento y proliferación de las células cancerosas. Su activación confiere resistencia a muchos tipos de terapias para combatir el cáncer³⁸. Las isoformas de AKT comparten ~80% de identidad en su secuencia de aminoácidos. Aunque las tres isoformas, AKT1, AKT2 y AKT3, están estrechamente relacionadas y altamente conservadas, varios hallazgos indican que cada isoforma tiene específicas diferencias funcionales en cuanto a proliferación, apoptosis y migración en células cancerosas humanas, esto sugiere que las isoformas de AKT no son funcionalmente redundantes⁷⁸. Las observaciones recientes indican una expresión elevada de AKT1 en un porcentaje significativo de células tumorales de mama⁷⁹, pulmón⁸⁰, gástrico⁸¹ y cerebro⁸². En modelos murinos, la hiperactivación de AKT1 aceleró la progresión tumoral y metástasis⁷⁹, mientras que en modelos *in vivo* de melanoma y carcinoma pulmonar la expresión de AKT1 aceleró la tumorigénesis en ambos casos^{80,82}. También se ha establecido que la sobreexpresión de AKT3 favorece el crecimiento y migración celular invasiva en cáncer de mama triple negativo⁸³, mientras que en cáncer de ovario favorece la angiogénesis⁸⁴. Por otra parte, se ha encontrado que la deficiencia de AKT2 tiene poco o ningún efecto sobre la incidencia de cáncer de próstata, carcinoma endometrial, cánceres intestinales, ya que muestra menos expresión (frente a AKT1) en tejidos tales como próstata, útero e intestino; sin embargo, se ha reconocido que AKT2 tiene un papel importante en la señalización de la insulina tanto en células sanas como en células cancerosas^{85,86}. Por lo tanto, AKT1 y AKT3 muestran alta relevancia para la terapia del cáncer, en particular contra los cánceres de mama, ovario y pulmón, que son la principal causa de muerte en todo el mundo.

Tomando en cuenta esta información y de acuerdo al enfoque de diseño *in silico* de inhibidores de AKT utilizado en este trabajo, los resultados de acoplamiento y dinámica molecular sugieren que las piridinas trisustituidas **S1-5**, **S1-6**, **S1-7**, **S1-14**, **S2-3**, **S2-13** y **S2-15** se unen y forman complejos

estables preferentemente a AKT1. Además, algunas moléculas como **S1-6**, **S1-7** y **S2-3** también tienen preferencia por AKT3; lo que sugiere que estas moléculas podrían inhibir selectivamente estas isoformas, ver Tabla 2.3. Si bien las piridinas trisustituidas fueron diseñadas como inhibidores del sitio de unión de ATP, es de esperar que cuando se evalúen muestren actividad en todas las isoformas incluyendo AKT2, aunque en menor medida de acuerdo con el estudio teórico. Sin embargo, si los compuestos muestran selectividad y teniendo en cuenta la sobreexpresión e hiperactivación de las isoformas AKT1 y AKT3 en diferentes cánceres, este hecho hace que las piridinas trisustituidas diseñadas y seleccionadas como candidatos potenciales sean relevantes en el desarrollo de inhibidores AKT1/3 para el uso terapéutico contra el cáncer.

Tabla 2.3. Estructura y energía de unión derivada de los estudios *in silico* de los compuestos más prometedores como inhibidores de las isoformas AKT y AKT3

Compuesto	Estructura	Energía de unión (kcal/mol)		
		AKT1	AKT3	
S1-5		Glide	-5.43	-5.59
		AD4	-12.82	-12.98
		ADV	-11.8	-11.8
		MD	-22.7	--
S1-6		Glide	-6.60	-5.50
		AD4	-12.95	-13.08
		ADV	-11.6	-11.6
		MD	-24.4	--
S1-7		Glide	-6.09	-6.97
		AD4	-12.36	-12.59
		ADV	-11.9	-12.0
		MD	-21.2	-17.0

S1-14		Glide	-5.67	-6.06
		AD4	-12.98	-13.0
		ADV	-12.2	-12.3
		MD	-24.3	-18.0
S2-3		Glide	-7.92	-6.57
		AD4	-13.64	-13.79
		ADV	-12.9	-13.0
		MD	-20.9	-14.6
S2-13		Glide	-7.30	-4.35
		AD4	-14.8	-14.9
		ADV	-13.1	-13.1
		MD	-24.8	--
S2-15		Glide	-8.37	-8.24
		AD4	-12.53	12.71
		ADV	-12.5	-12.5
		MD	-25.2	--

2.6. Conclusiones

- A partir de la estructura del compuesto **11** y conociendo la forma del sitio de unión a ATP de las tres isoformas de AKT (AKT1, AKT2, AKT3) se diseñaron *in silico* 42 nuevos derivados de piridina 2,4,6-trisustituidas como inhibidores de AKT. Pese a que las isoformas de AKT comparten alta homología en los sitios de unión a ATP, de acuerdo a los estudios de acoplamiento molecular las moléculas diseñadas mostraron selectividad de unión a las isoformas AKT1 y AKT3, identificando como inhibidores prometedores en AKT1 a los compuestos de **S1-5**, **S1-6**, **S1-7**, **S1-14**, **S2-3**, **S2-13** y **S2-15**; y para AKT3 a los compuestos **S1-6**, **S1-7** y **S2-3**.
- De acuerdo a las simulaciones de dinámica molecular los complejos ligando-proteína de estas moléculas mostraron mejor estabilidad y perfil de energía en comparación con los complejos estudiados para AKT2. También, de acuerdo a las simulaciones, esta selectividad se explica por las interacciones de los ligandos en la región hidrofóbica cercana de al sitio de unión a ATP presente en AKT1 y AKT3, la cual está formada por los residuos Phe236/234, Phe237/235, Phe438/435 y Phe442/439. Además, esta cavidad hidrofóbica es modulada por la presencia del sustituyente aromático en la posición 4 del anillo de piridina, por lo que la presencia de un sustituyente aromático en esta posición es fundamental para observar selectividad *in silico* en las isoformas AKT1 y AKT3.
- Los compuestos seleccionados más prometedores tuvieron nuevas interacciones y un mejor perfil de energía en los estudios de acoplamiento y dinámica molecular que el compuesto precursor **11**, por lo que se espera que una serie de ellos tengan mejor actividad que el compuesto precursor, en particular sobre AKT1 y AKT3. Es importante mencionar que el presente estudio se limita a la familia de AKT cinasa, por lo que se necesita un análisis más amplio sobre diferentes cinasas para así poder realizar un diseño de inhibidores selectivos, esto

debido a la alta conservación en la familia de las cinasas. Con este nuevo diseño este tipo de moléculas da la oportunidad de explorar y expandir el espacio químico de estructuras que inhiben la función de las AKT cinasas, en particular, en la búsqueda de inhibidores selectivos y potentes que puedan ser buenos candidatos en las terapias contra el cáncer.

Capítulo III

Síntesis y evaluación de piridinas trisustituidas

3.1. Introducción

El núcleo de piridina es un heterociclo que existe abundantemente en la estructura de productos naturales y diversos compuestos biológicos, por lo que sus derivados son ampliamente usados para muchas aplicaciones en la medicina moderna, Figura 3.1⁸⁷. Por esta razón, el núcleo de piridina es considerada en Química Farmacéutica como una estructura privilegiada.

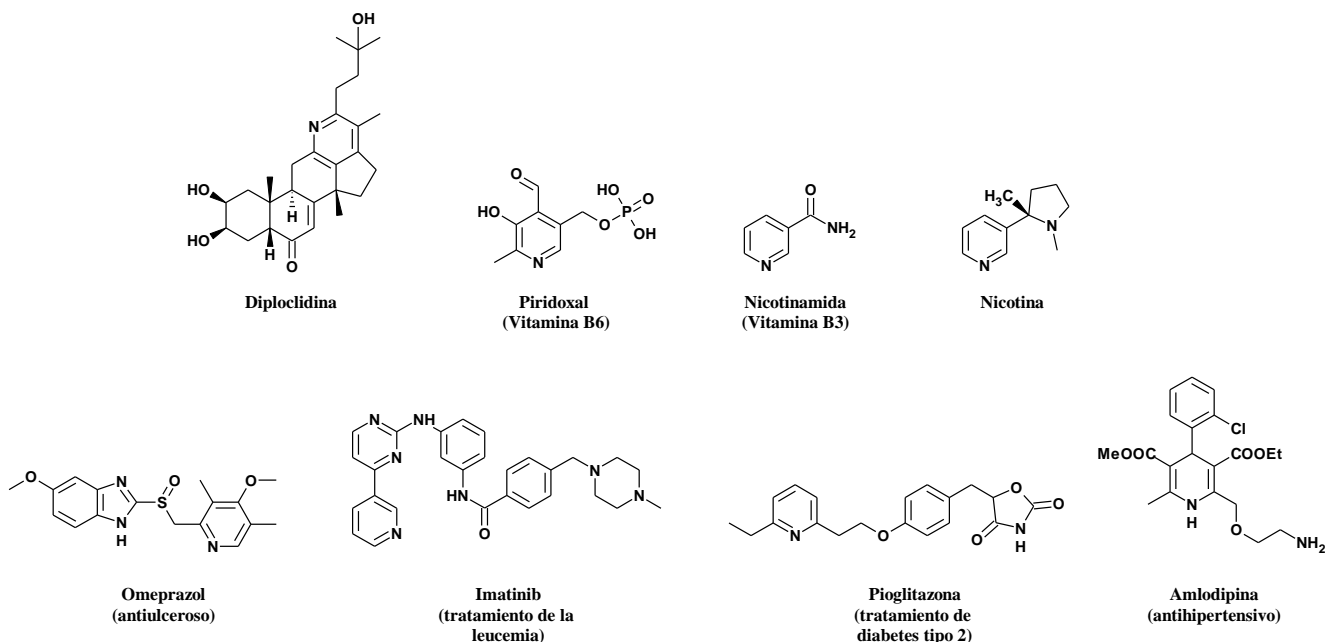


Figura 3.1. Ejemplos de moléculas que contienen en su estructura al núcleo de piridina.

Como se puede observar en la Figura 3.1, las piridinas polisustituidas/polifuncionalizadas están presentes en productos naturales y compuestos bioactivos, así como en diversos materiales funcionales. En particular, las piridinas aril o poliaryl sustituidas han atraído considerablemente la atención en la síntesis orgánica ya que se encuentran a menudo en una amplia gama de compuestos farmacéuticamente activos, Figura 3.2. Ejemplos de estas estructuras son etoricoxib, el cual es un inhibidor selectivo de COX-2 que contiene un sistema 2,3-diarilpiridina⁸⁸. También se encuentran derivados de 2,4,6-triarilpiridinas que presentan inhibición de topoisomerasa⁸⁹. Perampanel es una 1,3,5-triarilpiridina que actúa como antagonista de receptor AMPA⁹⁰. Derivados de 5,6-diheteroarilpiridin-2-carboxamida se han reportado como antagonistas selectivos del receptor A2B de

adenosina⁹¹. 2-amino-4,6-diarilpiridinas se ha encontrado que son potentes ligandos para el receptor de estrógeno⁹². De igual manera, se han encontrado un gran número de productos naturales bioactivos que contienen piridinas poliariladas. Ejemplos de esto son el nosiheptido que tiene en su estructura una 1,5,6-triaril-3-hidroxipiridina⁹³ y promothiocina A que tiene una 5,6-diarilpiridin-1-carboxamida⁹⁴, ambas moléculas tienen potente actividad como antibióticos. Finalmente, ésteres de 2,6-diarilpiridina ha sido útiles como quimiosensores fluorescentes⁹⁵, Figura 3.2.

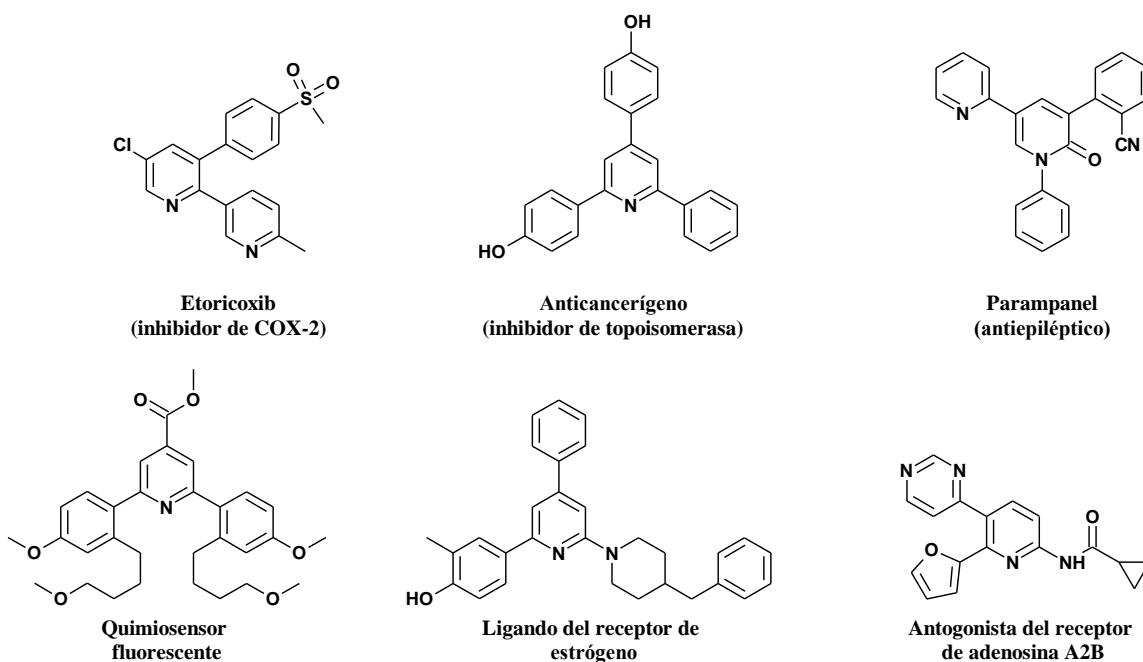


Figura 3.2. Ejemplos de algunos compuestos bioactivos que contienen en su estructura poliarilpiridinas.

En los últimos años numerosas estrategias de síntesis se han desarrollado para acceder a piridinas polifuncionalizadas. Estas estrategias involucran la formación del anillo de piridina a partir de precursores apropiadamente sustituidos o bien mediante la introducción secuencial de los sustituyentes a partir del anillo de piridina ya preformado. En la primera estrategia, las reacciones de condensación de multicomponentes como la reacción de condensación de Hantzsh y Kambe, y las reacciones de Krohnke y Chichibabin⁹⁶⁻⁹⁸ son opciones de síntesis de piridinas⁹⁹; sin embargo, estas reacciones están limitadas a la accesibilidad y labilidad de los precursores específicamente funcionalizados. Mientras que la segunda estrategia ha ganado interés, ya que mediante reacciones de metalación

directa, sustitución aromática y reacciones de acoplamiento catalizados por metales permiten introducir una amplia variedad de sustituyentes bajo condiciones suaves de reacción ¹⁰⁰. De estas opciones, las reacciones catalizadas por paladio ofrecen una estrategia versátil para introducir de manera regiocontrolada diferentes sustituyentes arilo en las cinco diferentes posiciones del anillo de piridina, resultando en una larga diversidad química. Ejemplo de estas reacciones catalizadas por paladio (Suzuki-Miyaura, Buchwald-Hartwig, Sonogashira) han sido utilizadas para la obtención de piridinas di y trisustituidas a partir de materias primas comerciales como 2,6-dicloro-4-yodopiridina ¹⁰¹ y 3,4,5-triyodopiridina ¹⁹. Más recientemente, se ha reportado la síntesis elegante de piridinas tetrasustituidas (2,3,4,5, 2,3,5,6, y 2,3,4,6) y pentasustituidas con diferentes arilos mediante reacciones secuenciales y regioselectivas de Suzuki-Miyaura a partir de materias primas sencillas y comerciales como 2-cloro-3-hidroxipiridina ¹⁰², pentacloropiridina ¹⁰³ o bien piridilfluorosulfatos ¹⁰⁴.

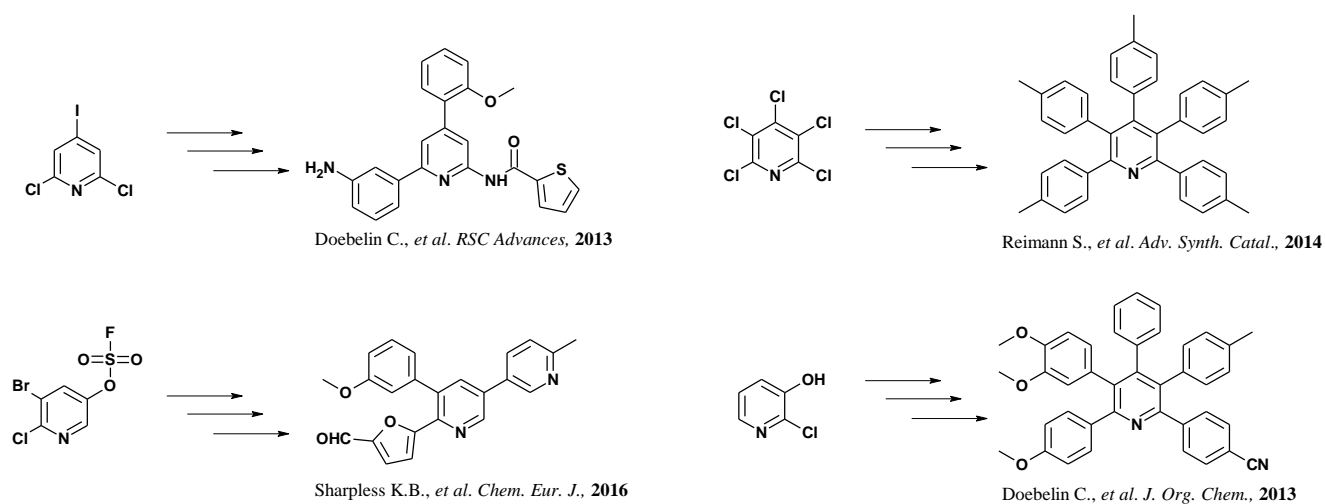


Figura 3.3. Ejemplos destacados de síntesis de poliarilpiridinas por reacciones de acoplamiento de Suzuki-Miyaura.

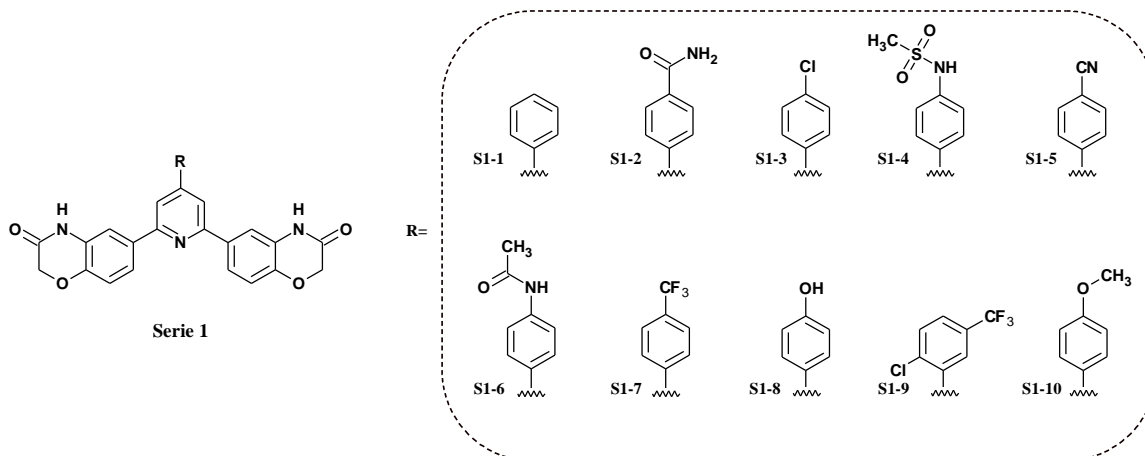
3.2. Justificación

El núcleo de piridina es uno de los más relevantes en Química Farmacéutica ya que se encuentra presente en diversas estructuras de productos naturales, compuestos biológicos y moléculas pequeñas con actividad biológica diversa. En particular, las piridinas polisustituidas han ganado relevancia en el diseño de fármacos debido a que son estructuras base (*scaffolds*) que permiten explorar el comportamiento de diversos grupos funcionales en la actividad biológica. En este sentido, se ha reportado que piridinas polisustituidas, particularmente piridinas 2,4,6-trisustituidas, han mostrado actividad como inhibidores de cinasas, uno de los blancos más exitosos en la búsqueda de moléculas para la terapia contra el cáncer.

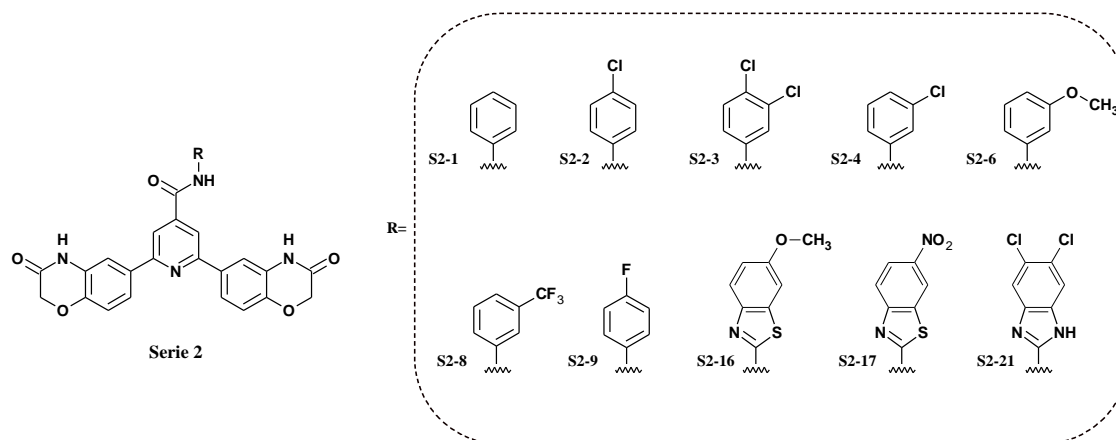
Como se discutió en el Capítulo II, utilizando la estructura cristalográfica de las isoformas de AKT y tomando como base la estructura del compuesto **11** se diseñó y se evaluó *in silico* una serie de nuevas piridinas trisustituidas simétricas, las cuales mostraron selectividad de unión a las isoformas AKT1 y AKT3. Estas nuevas moléculas poseen una estructura novedosa al de inhibidores reportados de estas cinasas, por lo que ofrecen una alternativa para explorar y encontrar nuevos inhibidores de AKT. Es por lo anterior que sintetizar un grupo de piridinas 2,4,6-trisustituidas que mostraron ser prometedores inhibidores de AKT podrá validar los resultados de los estudios computacionales y así también se podrán establecer futuras relaciones estructura-actividad para continuar con el diseño de inhibidores de AKT más potentes. Si bien esta estructura es novedosa para inhibir a las AKT cinasas, la síntesis de piridinas polisustituidas es actualmente un reto atractivo en la química orgánica moderna, por lo que también es importante proponer una ruta de síntesis novedosa, directa y accesible para la obtención de las moléculas a sintetizar.

3.3. Objetivos

1) Establecer una ruta de síntesis para la obtención de los compuestos de interés.



S1-1	6,6'-(4-Fenilpiridin-2,6-diil)bis(2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona)
S1-2	4-[2,6-Bis(3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-il]benzamida
S1-3	6,6'-[4-(4-Clorofenil)piridin-2,6-diil]bis(2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona)
S1-4	N-{4-[2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-il]fenil} metanosulfonamida
S1-5	4-[2,6-Bis(3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-il]benzonitrilo
S1-6	N-{4-[2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-il]fenil} acetamida
S1-7	6,6'-{4-[4-(Trifluorometil)fenil]piridin-2,6-diil} bis(2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona)
S1-8	6,6'-[4-(4-Hidroxifenil)piridin-2,6-diil]bis(2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona)
S1-9	6,6'-{4-[2-cloro-5-(trifluorometil)fenil]piridin-2,6-diil} bis(2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona)
S1-10	6,6'-[4-(4-Metoxifenil)piridin-2,6-diil]bis(2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona)



S2-1	2,6-Bis(3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-6-il)-N-fenilpiridin-4-carboxamida
S2-2	N-(4-clorofenil)-2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida
S2-3	N-(3,4-diclorofenil)-2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida
S2-4	N-(3-clorofenil)-2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida
S2-6	N-[3-(metiloxi)fenil]-2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida
S2-8	2,6-Bis(3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-6-il)-N-[3-(trifluorometil)fenil]piridin-4-carboxamida
S2-9	N-(4-fluorofenil)-2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida
S2-16	N-[6-(metiloxi)-1,3-benzotiazol-2-il]-2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida
S2-17	N-(6-nitro-1,3-benzotiazol-2-il)-2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida
S2-21	N-(5,6-dicloro-1H-bencimidazol-2-il)-2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida

2) Evaluar *in vitro* la actividad citotóxica de los compuestos en líneas celulares cancerosas donde se encuentran sobreexpresadas las isoformas de AKT, tales como de cáncer cérvico-uterino (HeLa), pulmón (SKLU-1) y colon (SW620).

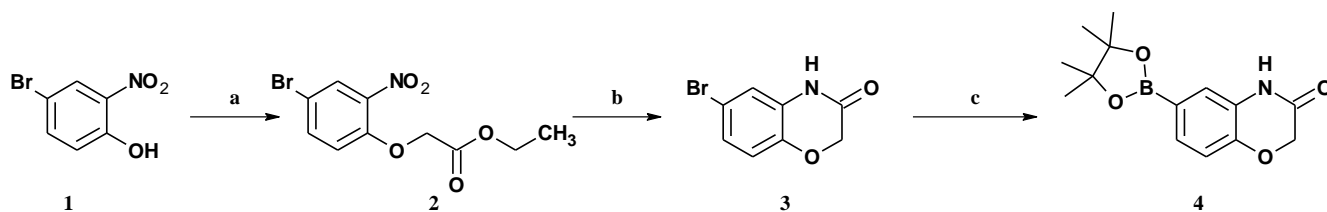
3.4. Metodología

3.4.1. Metodología parte química

Para mayor detalle de los procedimientos de síntesis consultar Anexo 3.

3.4.1.1. Síntesis del intermediario 6-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona (Int4)

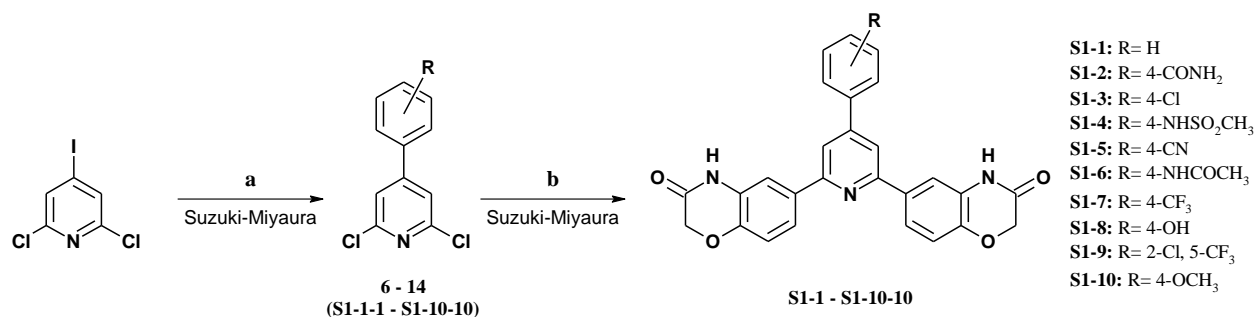
La preparación del intermediario éster borónico **4** se realizó siguiendo la ruta de síntesis que se muestra en el Esquema 3.1. Se partió del 4-bromo-2-nitrofenol comercial (**1**) el cual se hizo reaccionar por sustitución nucleofílica S_N2 con el α -bromoacetato de etilo en condiciones alcalinas. Después, el grupo nitro de **2** se redujo químicamente empleando hierro metálico en ácido acético; la posterior ciclación intramolecular *in situ* generó el producto 6-bromo-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona (**3**). La formación del éster borónico de **3** se efectuó mediante la reacción de borilación de Miyaura empleando dipinacoldiborano y el catalizador $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2 \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$ ¹⁰⁵. El producto 6-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona (**4**) se empleó en las reacciones subsecuentes de Suzuki-Miyaura.



Esquema 3.1. Ruta de síntesis para la obtención de los compuestos 6-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona (**4**). Reactivos y condiciones: a) α -bromoacetato de etilo, K_2CO_3 , acetona, reflujo; b) Fe, AcOH, 50 °C; c) dipinacoldiborano (Bpin_2), 5% mol $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2 \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$, AcOK, dioxano, 100 °C.

3.4.1.2. Síntesis de compuestos de la *Serie 1*

Para la obtención de los compuestos de las **Serie 1** se siguió la ruta de síntesis que se muestra en el Esquema 3.2. La preparación de los compuestos se inició a partir de la 2,6-dicloro-4-yodopiridina comercial (**6**)¹⁰⁶, la cual se sometió a una primera reacción de Suzuki-Miyaura en presencia de los ácidos arilborónicos correspondientes disponibles comercialmente empleando el catalizador de Pd(dppf)Cl₂•CH₂Cl₂, trietilamina como base, y usando TPGS-750 en agua como medio de reacción en agitación a temperatura ambiente. Esto permitió introducir de manera selectiva el sustituyente arilo en posición 4. Posteriormente, se efectuó una segunda reacción de Suzuki-Miyaura para introducir de manera simultánea los grupos benzoxazinilos en posiciones 2 y 6. En este paso se usó calentamiento por microondas a una temperatura de 175 °C por 45 min para favorecer la obtención de los productos.

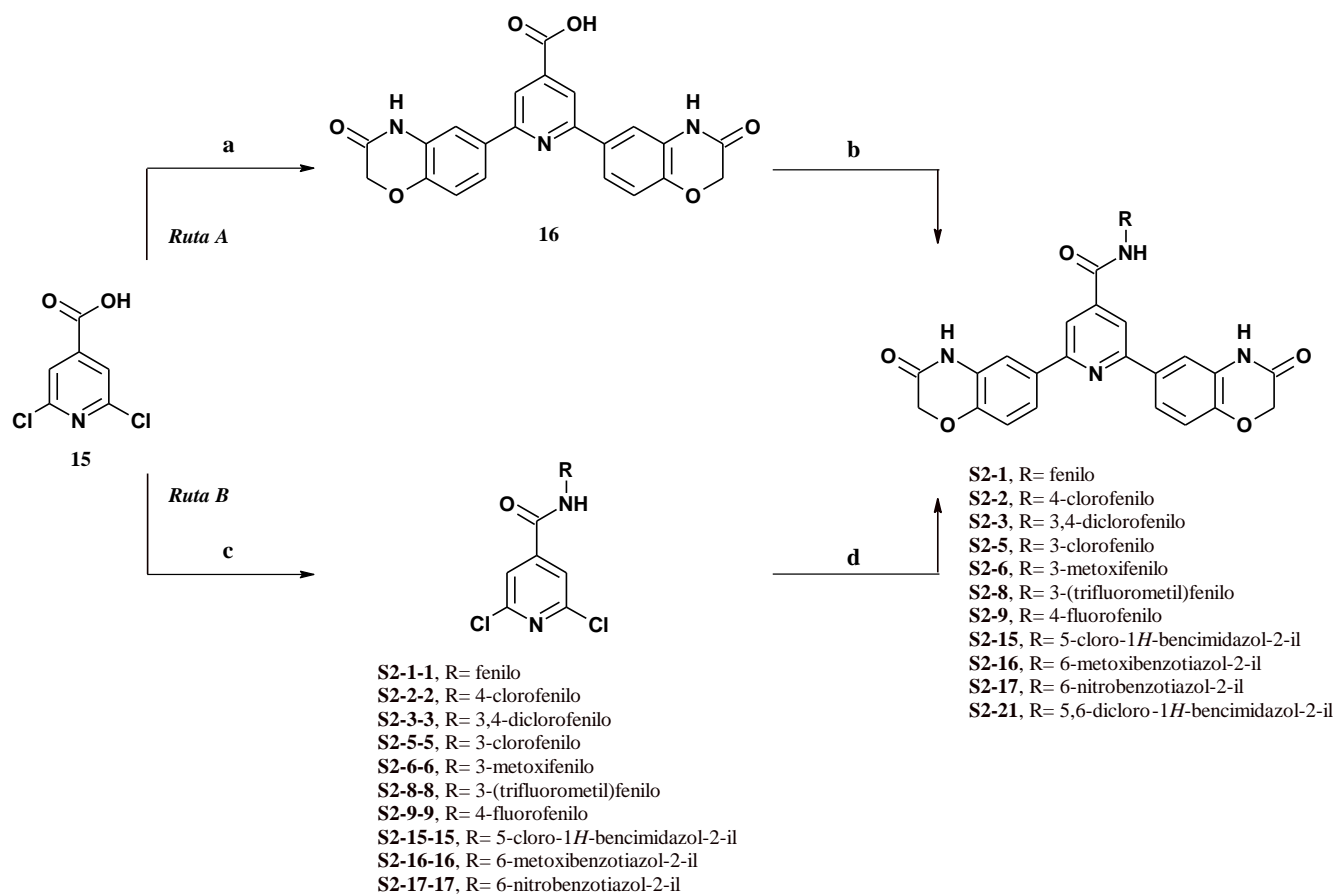


Esquema 3.2. Ruta de síntesis para la obtención de los compuestos de la **Serie 1**. Reactivos y condiciones: a) ácido arilborónico, 5% mol Pd(dppf)Cl₂•CH₂Cl₂, Et₃N, TPGS-750/H₂O [0.5 M], T. Amb., 24 h; b) éster borónico **4**, 10% mol Pd(PPh₃)₄, Na₂CO₃, MeCN/H₂O (4:1), MW 175 °C, 45 min.

3.4.1.3. Síntesis de compuestos de la *Serie 2*

Para la obtención de los compuestos de la **Serie 2** se abordaron dos rutas de síntesis las cuales se muestran en el Esquema 3.3. Para la Ruta A, se inició con el ácido 2,6-dicloropiridin-4-carboxílico comercial (**15**)¹⁰⁶, el cual se hizo reaccionar con el éster borónico **4** y el catalizador de Pd(PPh₃)₄ en una reacción de Suzuki-Miyaura. La reacción procedió a reflujo en la mezcla homogénea DME/EtOH/H₂O (7:2:3) por 24 h¹⁰⁷. Luego, el ácido **16** se activó con el agente acoplante PyBOP en presencia de la base NMM y DMF como disolvente, después de unos minutos el intermediario reactivo

sin aislamiento se trató con las arilaminas correspondientes para obtener los carboxamidas finales. En el caso de la Ruta B, se partió del ácido 2,6-dicloropiridin-4-carboxílico comercial (**15**), el cual primeramente se hizo reaccionar con el agente acoplante COMU en presencia de la base NMM y CH_2Cl_2 como disolvente ¹⁰⁸, después de unos minutos, el intermediario reactivo sin aislamiento se trató con las arilaminas correspondientes para obtener las carboxamidas intermediarias **S2-1-1–S2-21-21**. Posteriormente, cada una de éstas se hizo reaccionar con el éster borónico **4** y el catalizador de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ en una reacción de Suzuki-Miyaura. La reacción procedió en una mezcla heterogénea de $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$ (4:1) con calentamiento con microondas a 175 °C por 45 min.



Esquema 3.3. Ruta de síntesis para la obtención de los compuestos de la **Serie 2**. Reactivos y condiciones: a) éster borónico **4**, 10% mol $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, Na_2CO_3 , $\text{DME}/\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ (7:2:3), reflujo 24 h; b) Ar-NH_2 , PyBOP, NMM, DMF; c) Ar-NH_2 , COMU, NMM, CH_2Cl_2 ; d) éster borónico **4**, 10% mol $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, Na_2CO_3 , $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$ (4:1), MW 175 °C 45 min.

3.4.2. Metodología parte biológica

3.4.2.1. Determinación de citotoxicidad en líneas celulares cancerosas

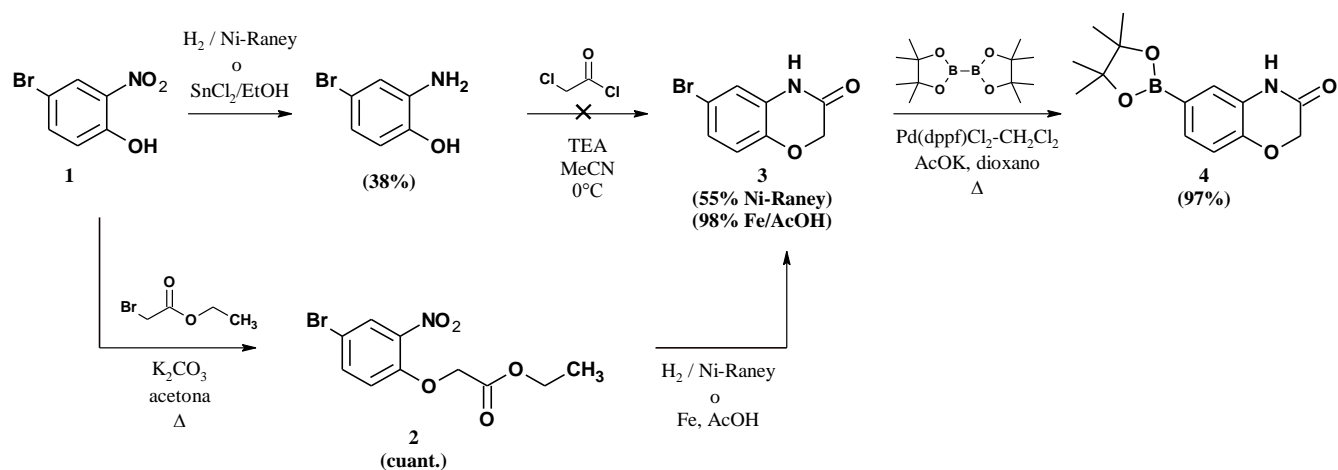
La viabilidad celular se determinó empleando el método colorimétrico con sales de tetrazolio, MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). Estas sales amarillas son reducidas por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa produciendo formazán, un compuesto morado que en medio acuoso es insoluble y por lo tanto forma cristales. La reducción ocurre solamente en células vivas, lo que permite evaluar la viabilidad celular tras la exposición a algún compuesto y que se compara con un control de células no expuestas.

La citotoxicidad se determinó en líneas celulares cancerosas, HeLa (cérvix), SW620 (colon), SKLU-1 (pulmón), MDA-MB-231 (mama) y PC3 (próstata) en medio DMEM. Las líneas celulares se trataron con diferentes concentraciones del compuesto a evaluar con DMSO como disolvente y se incubaron por un periodo determinado. La viabilidad celular se determinó colorimétricamente mediante MTT^{109,110}. Se determinó para cada compuesto la concentración que produce una disminución de la viabilidad celular al 50% (CI₅₀) respecto al control, mediante un análisis de regresión no lineal a partir de los datos de viabilidad celular relativos a cada dosis del compuesto respectivo, empleando el programa Origin Pro[®] 7.0. El valor final de CI₅₀ se obtuvo a partir del resultado del promedio de al menos tres experimentos independientes. Como control positivo GSK690693 (anticancerígeno en fase clínica, inhibidor de las isoformas de AKT cinasa) (Sigma-Aldrich, Cat. SML0428)¹¹¹.

3.5. Resultados y discusión

3.5.1. Parte química

Para la obtención de los productos finales, primeramente se abordó la síntesis del intermediario éster borónico **4**, ver Esquema 3.4. Inicialmente, se evaluó la reducción catalítica del grupo nitro del compuesto 4-bromo-2-nitrobenzoico (**1**) utilizando Ni-Raney como catalizador. Este catalizador se seleccionó ya que en trabajos previos en el grupo de trabajo no se observó hidrogenólisis en sustratos halogenados, particularmente en los compuestos clorados. No obstante, la ccf indicó la formación de dos productos en proporción similar. El aislamiento y análisis por RMN indicó la presencia del producto esperado 2-amino-4-bromofenol y de su producto de hidrogenólisis 2-aminofenol. Observando este resultado, se decidió evaluar la hidrogenación química usando cloruro estañoso, en este caso sólo se observó un único producto coincidente con el esperado; sin embargo, el producto se obtuvo en bajo rendimiento atribuido al proceso de aislamiento. Lo obtenido de 2-amino-4-bromofenol se hizo reaccionar con cloruro de cloroacetilo y trietilamina como base a bajas temperaturas. El análisis por ccf indicó la formación de diversos productos haciendo difícil el aislamiento del producto de interés. Con las dificultades y el bajo rendimiento que ofreció esta ruta de síntesis, se decidió replantear la obtención del éster borónico **4** (Esquema 3.4).



Nuevamente, partiendo de 4-bromo-2-nitrofenol éste se hizo reaccionar con α -bromoacetato de etilo utilizando carbonato de potasio como base en acetona, el producto de *O*-alquilación **2** se obtuvo en rendimientos cuantitativos. La reacción procedió en unas horas y sin la presencia de subproductos. La estructura del producto se confirmó por RMN ^1H , esto por la presencia de señales alifáticas a campo alto del espectro, en particular un triplete (*t*) a 1.123 ppm y un cuarteto (*q*) a 4.203 ppm correspondientes al grupo etilo del grupo éster. Luego, se evaluó la reducción catalítica y química del grupo nitro del (4-bromo-2-nitrofenoxi)acetato de etilo (**2**). Primeramente, la reducción catalítica de **2** utilizando Ni-Raney como catalizador mostró nuevamente la formación del producto de hidrogenólisis. Por otra parte, la reducción química utilizando en esta ocasión hierro metálico en ácido acético mostró la formación únicamente del producto de interés 6-bromo-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-ona (**3**) en excelentes rendimientos. El aislamiento de **3** fue muy sencillo, ya que el exceso de hierro y parte de las sales se retiraron por filtración, el disolvente se retiró por evaporación, y al residuo se le agregó agua. Las sales de hierro restantes son solubles en agua mientras que el producto precipitó, lo cual facilitó su aislamiento. Esta reacción resultó ser muy eficiente, por lo que el producto se sintetizó en mayores cantidades sin la necesidad de un tratamiento de purificación posterior. En esta reacción no hubo necesidad de hacer un tratamiento posterior ya que la ciclación intramolecular para la formación del anillo de benzoxazinona se llevó a cabo *in situ* sin la necesidad de activar el éster o la amina. Esta ciclación se ve favorecida por la cercanía de los grupos a reaccionar, el grupo etoxilo es un relativo buen grupo saliente y la reacción es exotérmica favoreciendo la ciclación. La formación del producto **3** se confirmó por RMN ^1H esto por la desaparición de las señales *t* a 1.123 ppm y *q* a 4.203 ppm, observando únicamente una señal simple en la región alifática a 4.578 ppm correspondiente al metileno del anillo de benzoxazinona, y además, por la aparición de una señal a 10.809 ppm que intercambió con D_2O correspondiente al hidrógeno del grupo amida.

Con el intermediario **3** se procedió con la reacción de borilación de Miyaura. Esta reacción es muy útil para la formación de ésteres borónicos a partir de halogenuros de arilo y vinilo, y dipinacoldiborano (Bpin₂)¹¹². Los boronatos son materias primas para reacciones de acoplamiento de Suzuki-Miyaura, estos son muy útiles y ofrecen ventajas comparados con otros derivados de boro, ya que son de fácil manejo, no son sensibles al aire y se hidrolizan con dificultad, permitiendo almacenarlos por un periodo prolongado de tiempo¹¹³. La reacción se llevó a cabo en presencia de Bpin₂ en condiciones suaves de reacción inicialmente a 80 °C por 24 h; sin embargo, se determinó que después de 8 h de reacción se tiene total conversión, Experimento 2 Tabla 3.1. Esta reacción procedió bien y con alto rendimiento en presencia del catalizador de Pd(dppf)Cl₂•CH₂Cl₂. Una prueba de borilación se efectuó con Pd(PPh₃)₄ pero el rendimiento fue menor (~50%). Este resultado es coincidente con lo reportado en la literatura para el uso de este catalizador.

Tabla 3.1. Condiciones de reacción evaluadas para la obtención del éster borónico **4**.

Experimento	Catalizador	Condiciones	Rendimiento
1	5% Pd(dppf)Cl ₂ •CH ₂ Cl ₂	80 °C, 24 h	95%
2	5% Pd(dppf)Cl ₂ •CH ₂ Cl ₂	80 °C, 8 h	97%
3	5% Pd(PPh ₃) ₄	80 °C, 8 h	48%

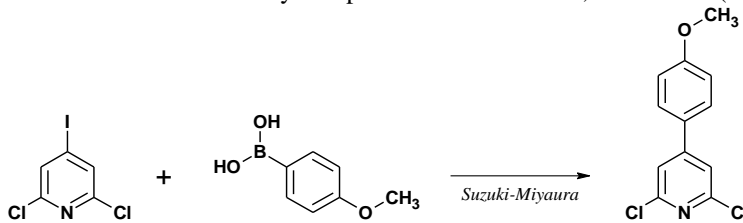
Es importante mencionar que el uso de una base suave, en este caso AcOK, es crucial para el éxito de la reacción. De acuerdo a lo reportado en la literatura, el uso de bases fuertes como K₂CO₃ o K₃PO₄ no aceleran la velocidad de la reacción; sin embargo, aumenta la competencia de la reacción de Suzuki-Miyaura favoreciendo la formación productos bifenílicos¹¹².

3.5.1.1. Síntesis *Serie 1*: síntesis de 4-aril-2,6-dicloropiridinas

Para la obtención de los intermediarios 4-aril-2,6-dicloropiridinas (**S1-1-1** – **S1-9-9**) se utilizó la 2,6-dicloro-4-yodopiridina como materia prima de inicio. En la reacción de Suzuki-Miyaura la reactividad relativa para los halogenuros de arilo es I > Br ~ OTf >> Cl, por lo que arilación se llevó a cabo de manera selectiva en la posición 4. Primeramente, se optimizó la reacción de Suzuki-Miyaura para la arilación en posición 4. Para ello, se utilizó como modelo la obtención de 2,6-dicloro-4-(4-

metoxifenil)piridina. Como se observa en la Tabla 3.2, se evaluó principalmente el efecto del tipo de catalizador y el disolvente. Se evaluaron catalizadores con ligantes de fosfina bidentados (ej. dppf), así como ligantes de fosfina monodentados (ej. PPh₃ y SPhos). Estos ligantes son ampliamente reportados en la literatura para llevar a cabo esta reacción¹¹⁴. Por otra parte, se evaluaron diversos medios de reacción. Usualmente, la reacción se lleva a cabo en tolueno, dioxano o THF y sus mezclas con agua, por lo que se decidió evaluar tolueno como disolvente, la mezcla heterogénea tolueno/agua, agua y agua con el surfactante TPGS-750 al 2% (Tabla 3.2). Para este último, trabajos reportados por el grupo de investigación del Dr. Bruce Lipshutz han demostrado el uso de agua como medio de reacción en las reacciones de Suzuki con buenos rendimientos^{115,116}, esto mediante el uso de surfactantes no tóxicos y en bajas cantidades, derivados de vitamina E o β-sitosterol, que forman sistemas micelares donde se llevan cabo la reacción^{117,118 119,120}.

Tabla 3.2. Optimización de la reacción de Suzuki-Miyaura para la obtención de 2,6-dicloro-4-(4-metoxifenil)piridina



Experimento	Catalizador	Base ^a	Disolvente ^b	Condiciones	Rendimiento (%) ^c
1	5% Pd(dppf)Cl ₂ •CH ₂ Cl ₂	Et ₃ N	2 wt % TPGS-750/H ₂ O	TA/24 h	89
2	5% Pd(dppf)Cl ₂ •CH ₂ Cl ₂	K ₂ CO ₃	2 wt % TPGS-750/H ₂ O	TA/24 h	93
3	5% Pd(dppf)Cl ₂ •CH ₂ Cl ₂	K ₂ CO ₃	H ₂ O	TA/24 h	74
4	5% Pd(dppf)Cl ₂ •CH ₂ Cl ₂	Et ₃ N	Tolueno	TA/24 h	78
5	5% Pd(dppf)Cl ₂ •CH ₂ Cl ₂	K ₂ CO ₃	Tolueno/H ₂ O (4:1)	TA/24 h	78
6	5% Pd(PPh ₃) ₄	K ₂ CO ₃	Tolueno/H ₂ O (4:1)	TA/24 h	Trazas
7	5% Pd(PPh ₃) ₄	Et ₃ N	Tolueno/H ₂ O (4:1)	TA/24 h	Trazas
8	1% Pd(AcO) ₂ /2% SPhos	Cs ₂ CO ₃	Tolueno/H ₂ O (4:1)	TA/24 h	54

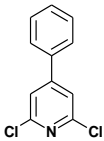
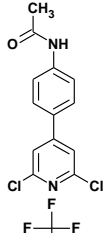
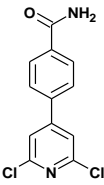
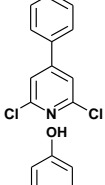
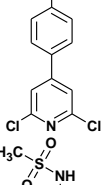
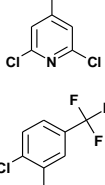
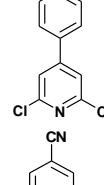
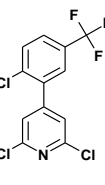
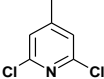
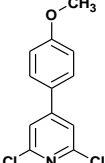
^a3 eq; ^b[0.5 M]+ 10% v/v THF; ^cProducto aislado

Como se muestra en la Tabla 3.2, el uso de un catalizador con un ligante bidentado (Pd(dppf)Cl₂) y usando TPGS-750 en agua como medio de reacción dio el mejor rendimiento (Experimentos 1 y 2). Este resultado es similar al reportado por el grupo de trabajo del Dr. Lipshutz utilizando el catalizador bidentado Pd(dtbpf)Cl₂¹¹⁹. Las reacciones que procedieron en tolueno o

tolueno/agua mostraron rendimientos de regulares a buenos, en particular usando el catalizador Pd(dppf)Cl₂ (Experimentos 3 y 4), mientras que en las reacciones donde se usaron ligantes monodentados el rendimiento disminuyo significativamente (Experimentos 6-8). Este análisis muestra el beneficio del uso de estos sistemas micelares como una alternativa viable y sustentable para este tipo de reacción. Esto se debe al ambiente hidrofóbico y la alta concentración de los componentes de la reacción dentro de la micela, consideradas también como “nanoreactores”, los cual permite una mayor interacción de los componentes y aumentando la velocidad de la reacción ¹¹⁶.

Las mejores condiciones (5% Pd(dppf)Cl₂•CH₂Cl₂, Et₃N, 2 wt % TPGS-750/H₂O, TA/24 h) se aplicaron a la obtención del resto de los intermediarios obteniéndolos en rendimientos de moderados a buenos (Tabla 3.3).

Tabla 3.3 Rendimientos de los intermediarios 4-aryl-2,6-dicloropiridina S1-1-1 a S1-10-10

Clave	Estructura	Rendimiento	Clave	Estructura	Rendimiento
S1-1-1		73%	S1-6-6		86%
S1-2-2		42%	S1-7-7		89%
S1-3-3		98%	S1-8-8		92%
S1-4-4		64%	S1-9-9		88%
S1-5-5		52%	S1-10-10		89%

El acoplamiento de los arilos sustituidos en la posición 4 del anillo de piridina se confirmó por espectroscopia de RMN ^1H donde se identificaron nuevas señales entre 7.298 a 8.114 ppm que corresponden a H's unidos al arilo de la posición 4. También se observó la presencia de una señal simple a 2.070 y 3.071 ppm para los derivados **S1-4-4** y **S1-6-6** que corresponde a los H's de los metilos correspondientes, así como la presencia de señales simples anchas a 10.144 y 10.199 ppm que desaparecen con D_2O que corresponden al H de la amida o sulfonamida (NH).

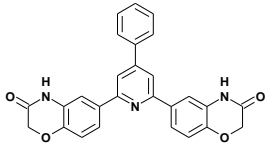
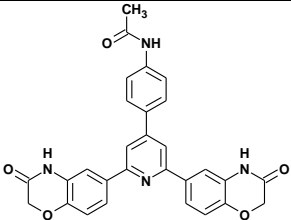
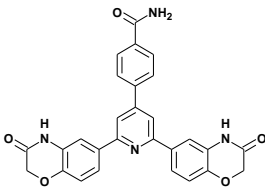
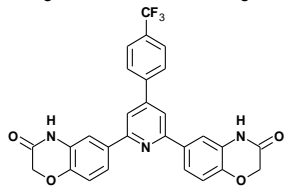
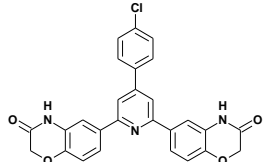
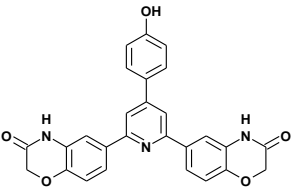
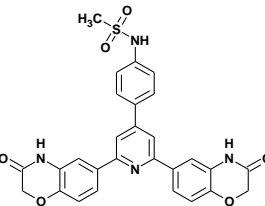
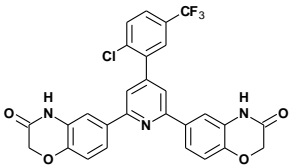
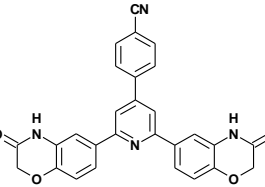
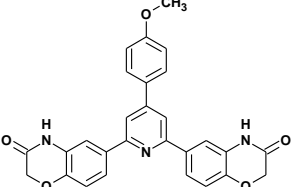
3.5.1.2. Síntesis Serie 1: síntesis de piridinas trisustituidas

Una vez aislados los intermediarios **S1-1-1** a **S1-10-10**, se procedió con la reacción de Suzuki-Miyaura para sustituir en las posiciones 2 y 6 del anillo de piridina los átomos de cloro e introducir simultáneamente el núcleo de benzoxazinona. Como se mencionó anteriormente en esta sección, la reacción de Suzuki procede de manera ineficiente con cloroarilos. Si bien la presencia del átomo de nitrógeno en el núcleo de piridina debilita el enlace C-Cl por efecto de electronegatividad, el paso de adición oxidativa en la reacción procede lentamente. Respecto a esto, actualmente para solucionar esta limitante se han reportado reacciones de Suzuki empleando ligantes de fosfina o *N*-heteroarilcarbenos (NHC) novedosos en sustratos de tipo cloroarilo con rendimientos buenos ^{114,121,122}. Por otra parte, se ha reportado el uso de microondas utilizando catalizadores con ligantes clásicos (PPh_3 , Xantphos, dppf) en cloroarilos, logrando rendimientos de moderados a buenos. Esto se debe a que se pueden alcanzar temperaturas altas, superiores a las de ebullición de los disolventes, que junto con el factor cinético de las microondas facilita el paso de adición oxidativa en sustratos poco activados ¹²³. En este trabajo se decidió abordar la estrategia de calentamiento por microondas para introducir el grupo benzoxazinona en posiciones 2 y 6.

Las reacciones se efectuaron en presencia de 10% mol de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, Na_2CO_3 como base, mezcla de disolvente MeCN/ H_2O (4:1) y calentamiento por microondas a 175 °C por 45 min. A pesar

del uso de microondas, la carga catalítica de la reacción se aumentó significativamente a 10% con el objetivo de facilitar la reacción de acoplamiento. En la Tabla 3.4 se muestran los rendimientos obtenidos de los productos finales.

Tabla 3.4. Rendimientos de los productos finales **S1-1** a **S1-10**

Clave	Estructura	Rendimiento	Clave	Estructura	Rendimiento
S1-1		77%	S1-6		61%
S1-2		44%	S1-7		82%
S1-3		78%	S1-8		41%
S1-4		46%	S1-9		51%
S1-5		63%	S1-10		31%

Como se muestra en la Tabla 3.5, la espectroscopia de RMN ^1H se observan diversas señales que confirman la incorporación del núcleo de benzoxazinona. En general, se identificaron nuevas señales correspondientes a este núcleo con la cantidad de H's para la incorporación de dos unidades. Particularmente, a campo alto una señal simple entre 4.64 a 4.65 ppm que integró para 4H correspondiente al metileno, mientras que a campo bajo una señal simple ancha entre 10.75 a 10.90 ppm la cual correspondió al hidrógeno de la amida (NH). En la región aromática del espectro se

identificó particularmente la señal doble entre 7.07 a 7.09 ppm que correspondió al H-8, mientras que los H-5 e H-7 se identificaron entre 7.80 a 7.88 ppm.

Tabla 3.5. Desplazamiento químico (δ , ppm), tipo de señal, constantes de acoplamiento y número de hidrógenos de las señales representativas de los compuestos **S1-1** a **S1-10**

	H-2	H-5	H-7	H-8	H-3', H-5'	H-4 (NH)	H-2'', H-6''	H-3'', H-5''	otros
	4.64 (s, 4H)	7.83 (d, $J=1.9$ Hz)	7.85 (dd, $J_1=8.3, J_2=2.1$ Hz)	7.08 (d, $J=8.3$ Hz)	7.97 (s, 2H)	10.76 (sa, 2H)	7.94-7.96 (m)	7.51-7.58 (m, H-4'')	--
	4.65 (s, 4H)	7.84 (d, $J=2.0$ Hz)	7.87 (dd, $J_1=8.3, J_2=2.1$ Hz)	7.09 (d, $J=8.3$ Hz)	8.03 (s, 2H)	10.77 (sa, 2H)	8.05 (s, 4H)		7.47 y 8.10 (sa, 2H, <u>NH</u>)
	4.64 (s, 4H)	7.82 (d, $J=1.8$ Hz)	7.85 (dd, $J_1=8.3, J_2=2.1$ Hz)	7.08 (d, $J=8.3$ Hz)	7.98 (s, 2H)	10.77 (s, 2H)	8.01 (d, $J=8.8$ Hz, 2H)	7.62 (d, $J=8.7$ Hz, 2H,	--
	4.64 (s, 4H)	7.81-7.84 (m, 4H)		7.08 (d, $J=8.0$ Hz)	7.94 (s, 2H)	10.77 (s, 2H)	7.95 (d, $J=8.8$ Hz, 2H)	7.36 (d, $J=8.8$ Hz, 2H)	3.06 (s, - <u>CH</u> ₃) 10.01 (sa, <u>NH</u>)
	4.64 (s, 4H)	7.84-7.88 (m, 4H)		7.08 (d, $J=8.0$ Hz)	8.05 (s, 2H)	10.90 (s, 2H)	8.03 (d, $J=8.8$ Hz, 2H,	8.19 (d, $J=8.8$ Hz, 2H)	--
	4.64 (s, 4H)	7.81-7.85 (m, 4H)		7.08 (d, $J=8.0$ Hz)	7.95 (s, 2H)	10.76 (s, 2H)	7.92 (d, $J=8.8$ Hz, 2H)	7.75 (d, $J=8.8$ Hz, 2H)	2.08 (s, - <u>CH</u> ₃) 10.13 (sa, <u>NH</u>)
	4.64 (s, 4H)	7.80-7.84 (m, 6H)		7.07 (d, $J=8.4$ Hz)	7.89 (s, 2H)	10.75 (s, 2H)	7.80-7.84 (m, 6H)	6.92 (d, $J=8.8$ Hz, 2H)	9.83 (s, - <u>OH</u>)
	4.64 (s, 4H)	7.78-7.80 (m, 4H)	7.86 (dd, $J_1=8.3, J_2=2.1$ Hz)	7.09 (d, $J=8.3$ Hz)	8.04 (s, 2H)	10.78 (s, 2H)	7.91 (d, $J=8.2$ Hz, 2H)	8.19 (d, $J=8.1$ Hz, 2H)	--
	4.64 (s, 4H)	7.78-7.80 (m, 4H)		7.07 (d, $J=8.4$ Hz)	7.83 (s, 2H)	10.79 (s, 2H)	7.83-7.92 (m, 2H, H-3'', H-4'')	8.02 (d, $J=1.6$ Hz, 1H, H-6'')	--
	4.64 (s, 4H)	7.83-7.85 (m, 4H)		7.07 (d, $J=8.8$ Hz)	7.92 (m 2H)	10.78 (s, 2H)	7.92 (m, 4H)	7.10 (d, $J=8.8$ Hz, 2H)	3.34 (s, - <u>CH</u> ₃)

3.5.1.3. Síntesis **Serie 2**: síntesis de piridinas trisustituidas

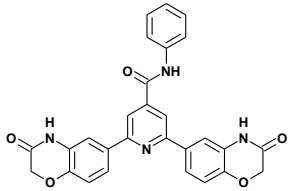
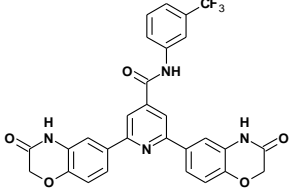
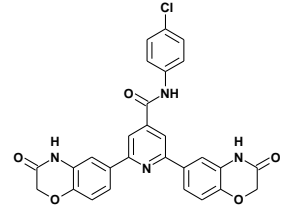
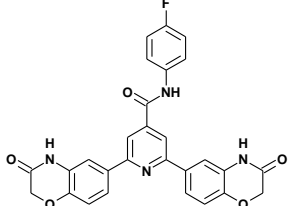
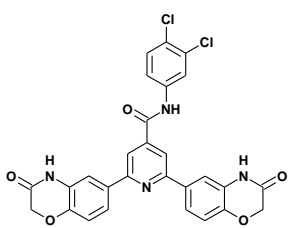
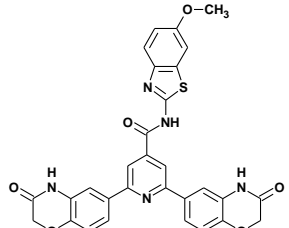
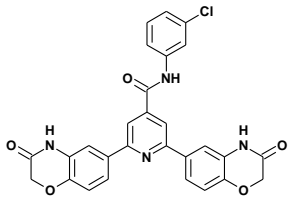
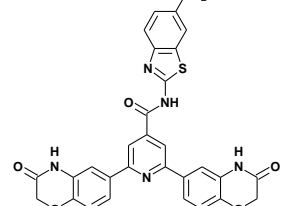
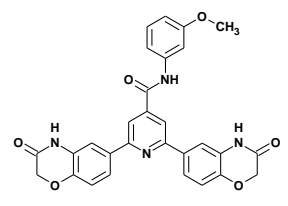
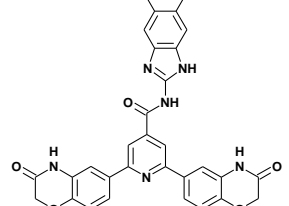
La obtención de los compuestos finales de esta serie se abordó a través de dos rutas de síntesis, ambas partiendo de la misma materia prima, el ácido 2,6-dicloropiridin-4-carboxílico (**15**).

En la ruta A, primeramente se abordó la incorporación de las dos unidades de benzoxazinona al núcleo de piridina. En este caso, en comparación con los compuestos finales de la **Serie 1**, no se requirió de microondas para la reacción de acoplamiento, ya que la reacción procedió con calentamiento a reflujo por 24 h en la mezcla homogénea DME/H₂O/EtOH (7:3:2) obteniendo el intermediario ácido **16** en un buen rendimiento (86%). De igual manera, se requirió de una carga catalítica de 10% mol para que la reacción procediera. Con otras mezclas de disolventes como MeCN/H₂O (4:1) y tolueno/H₂O (4:1) el rendimiento fue menor y con la presencia de subproductos. La formación del producto de doble acoplamiento se corroboró por espectroscopia de RMN ¹H, donde se observó una mayor cantidad de señales, como la señal simple a 4.633 ppm, una señal doble 7.052 ppm, una señal múltiple entre 7.742–7.77 ppm y una señal amplia a 10.909 ppm, todas ellas correspondientes al grupo benzoxazinona. Con el intermediario **16**, éste se hizo reaccionar en primera instancia con el agente acoplante PyBOP y *N*-metilmorfolina (NMM) como base para generar un intermediario reactivo *in situ*, y luego con las arilaminas apropiadas obteniendo los compuestos **S2-2–S2-5**, **S2-8** y **S2-9** en rendimientos que van de 26% a 80%.

Para la ruta B, se inició con la formación de las amidas correspondientes. Para ello, el ácido 2,6-dicloropiridin-4-carboxílico (**15**) se activó primeramente con el agente acoplante COMU y NMM como base y luego se hizo reaccionar con las arilaminas correspondientes obteniendo las amidas intermediarias **S2-1-1** a **S2-21-21** en rendimientos que van de 26% a 93%. Después, con las amidas intermediarias se incorporaron las dos unidades de benzoxazinona. Para introducir este grupo de decidió utilizar la metodología de calentamiento con microondas. Se aplicaron las condiciones para la

Serie 1, utilizando 10% mol de Pd(PPh₃)₄, Na₂CO₃ como base y mezcla de disolventes MeCN/H₂O (4:1) a una temperatura de 175 °C por 45 min. Los resultados de rendimientos obtenidos en cada ruta se muestran en la Tabla 3.6. En general, la Ruta B ofrece un mayor rendimiento global para la obtención de los compuestos finales. El análisis por RMN de ¹H de los compuestos sintetizados por ambas rutas muestra señales idénticas, como se ve en la Figura 3.4 para el compuesto **S2-5**, demostrando que ambas rutas sintéticas son viables para la obtención de los productos.

Tabla 3.6. Rendimientos de los productos finales **S1-1** a **S1-10**

Clave	Estructura	Rendimiento global	Clave	Estructura	Rendimiento global
S2-1		49% (Ruta B)	S2-8		37% (Ruta A) 32% (Ruta B)
S2-2		25% (Ruta A) 58% (Ruta B)	S2-9		42% (Ruta A) 26% (Ruta B)
S2-3		25% (Ruta A) 35% (Ruta B)	S2-16		58% (Ruta B)
S2-5		25% (Ruta A) 62% (Ruta B)	S2-17		61% (Ruta B)
S2-6		26% (Ruta B)	S2-21		27% (Ruta B)

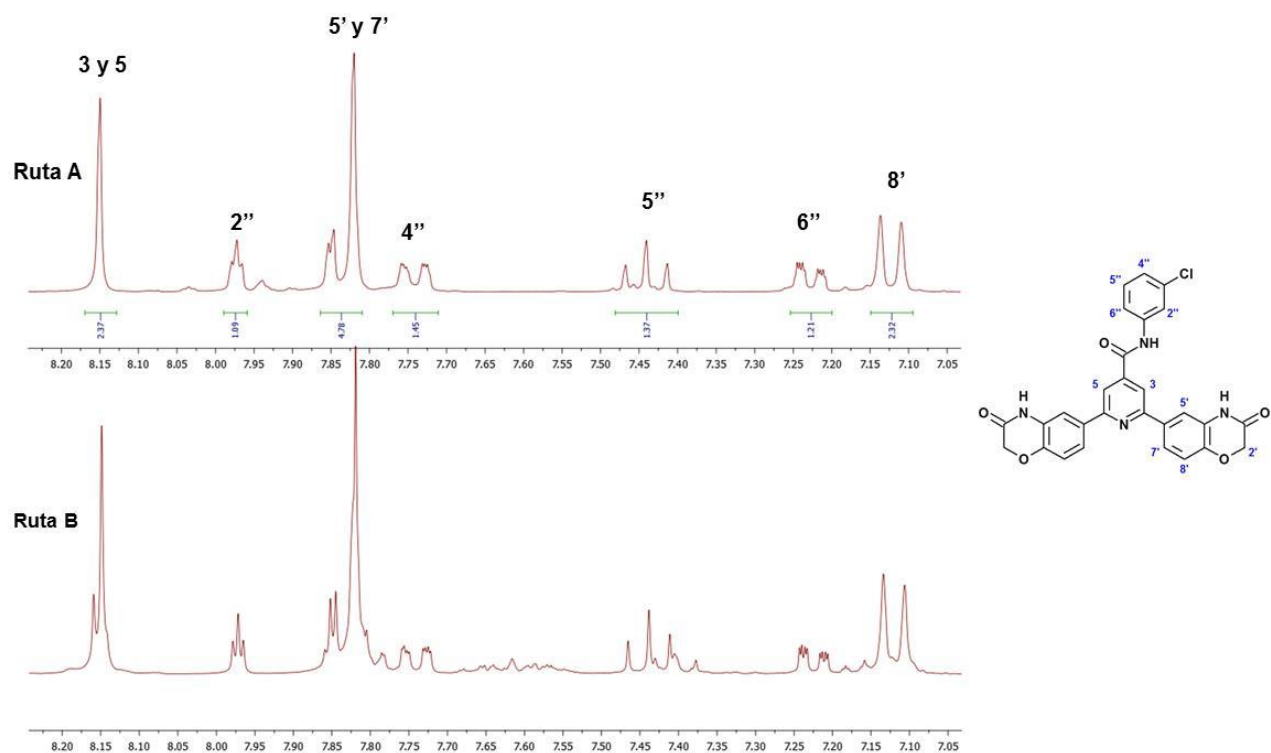
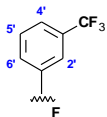
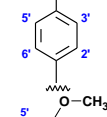
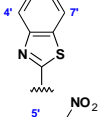
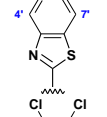
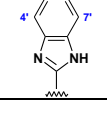


Figura 3.4. Comparación de los espectros de RMN ^1H para el compuesto **S2-5** obtenido por dos rutas síntesis diferentes.

Tabla 3.7. Desplazamiento químico (δ , ppm), tipo de señal, constantes de acoplamiento y número de hidrógenos de las señales representativas de los compuestos **S2-1** a **S2-21**

	H-2''	H-5''	H-7''	H-8''	H-3, H-5	H-4 (NH)	NH	otros
	4.66 (s, 4H)	7.82-7.85 (m, 4H)		7.12 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H)	8.16 (s, 2H)	10.82 (s, 2H)	10.60 (s, 1H)	--
	4.66 (s, 4H)	7.82-7.85 (m, 4H)		7.12 (dd, $J_1 = 8.0$, $J_2 = 0.7$ Hz, 2H)	8.14 (s, 2H)	10.81 (sa, 2H)	10.73 (sa, 1H)	--
	4.66 (s, 4H)	7.81-7.84 (m, 4H)		7.11 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H)	8.15 (s, 2H)	10.85 (sa, 2H)	10.85 (sa, 1H)	--
	4.66 (s, 4H)	7.82-7.85 (m, 4H)		7.12 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H)	8.15 (s, 2H)	10.82 (s, 2H)	10.74 (s, 1H)	--
	4.66 (s, 4H)	7.83-7.85 (m, 4H)		7.12 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H)	8.15 (s, 2H)	10.83 (s, 2H)	10.59 (s, 1H)	3.77 (s, 3H, O-CH ₃)

	4.66 (s, 4H)	7.82-7.85 (m, 4H)	7.12 (d, $J= 8.9$ Hz, 2H)	8.18 (s, 2H)	10.86 (s, H)	10.86 (s, H)	--
	4.66 (s, 4H)	7.79-7.85 (m, 6H)	7.12 (d, $J= 8.1$ Hz, 2H)	8.15 (s, 2H)	10.82 (s, 2H)	10.66 (s, 1H)	--
	4.66 (s, 4H)	7.83-7.94 (m, 4H)	7.12 (d, $J= 8.3$ Hz, 2H)	8.35 (s, 2H)	10.83 (s, 2H)	13.18 (sa, 1H)	3.83 (s, 3H, O-CH ₃)
	4.66 (s, 4H)	7.82-7.85 (m, 4H)	7.11 (d, $J= 8.3$ Hz, 2H)	8.35 (s, 2H)	10.83 (s, 2H)	13.63 (sa, 1H)	--
	4.66 (s, 4H)	7.83-7.85 (m, 4H)	7.12 (d, $J= 8.3$ Hz, 2H)	8.31 (s, 2H)	10.86 (s, 2H)	12.63 (sa, 1H)	7.72 (s, 2H, H-4', H-7')

Como se muestra en la Tabla 3.7, la espectroscopia de RMN ^1H ayudó a confirmar la obtención de los compuestos, donde se observan las señales que indican la presencia de los grupos benzoxazinona así como la presencia de las arilamidas. En general, se identificó la señal a 4.66 ppm correspondiente al metileno, y a 7.11-7.12 ppm para el H-8'' del grupo benzoxazinona, además también para este grupo se identificó la señal ancha entre 10.82 a 10.86 ppm que desapareció con D_2O , correspondiente a la amida del mismo grupo. En cuanto a la porción arilcarboxamida, se identificó la señal a campo bajo entre 10.60 a 10.86 ppm correspondiente al hidrógeno de las *N*-fenilcarboxamidas sustituidas, mientras que esta señal se desplazó más a campo bajo para las *N*-heteroarilcarboxamidas observándose entre 12.63 a 13.63 ppm.

3.5.2. Parte biológica

3.5.2.1. Evaluación de la actividad citotóxica de piridinas 2,4,6-trisustituidas

Se determinó el potencial citotóxico sobre células cancerosas de cérvix (HeLA), pulmón (SKLU-1) mama (MDA-MB-231), colon (SW620), y próstata (PC-3) a una concentración de 50 μM para los compuestos sintetizados, ver Tabla 3.8. Es importante mencionar que durante los ensayos los

compuestos mostraron poca solubilidad en los medios de ensayo lo que dificultó su evaluación, por los resultados que se muestran a continuación son de aquellos compuestos con los cuales se pudo efectuar el ensayo.

En la Figura 3.5 y 3.6 se muestra la viabilidad celular a las 48 y 72 h de exposición a los compuestos **S1-2–S1-9** a una concentración de 50 μM . Se observa en ambos tiempos de exposición que solo los compuestos **S1-3** y **S1-9** muestran una disminución en la viabilidad celular menor al 50%, en el caso de **S1-3** muestra un efecto citotóxico semejante en las cinco líneas evaluadas, mientras que **S1-9** tiene mayor efecto citotóxico en las líneas MDA-MB-231 y PC-3. A estos dos compuestos se les determinó su concentración inhibitoria 50 (CI_{50}), ver Tabla 3.8. El compuesto **S1-3** mostró ser el compuesto más activo, particularmente sobre la línea PC-3 ($\text{CI}_{50} = 6.2 \pm 0.9 \mu\text{M}$) y HeLa ($\text{CI}_{50} = 12.7 \pm 1.4 \mu\text{M}$), mientras que el compuesto **S1-9** mostró ser activo también en la línea PC-3 ($\text{CI}_{50} = 11.6 \pm 4.9 \mu\text{M}$) y HeLa ($\text{CI}_{50} = 26.2 \pm 1.6 \mu\text{M}$). Comparando estos resultados con el compuesto utilizado como referencia GSK690693, un inhibidor de las AKT cinasa, indican que el compuesto **S1-3** es un potencial candidato a seguir siendo estudiado y optimizado, particularmente para mejorar su actividad citotóxica en líneas de cáncer de próstata.

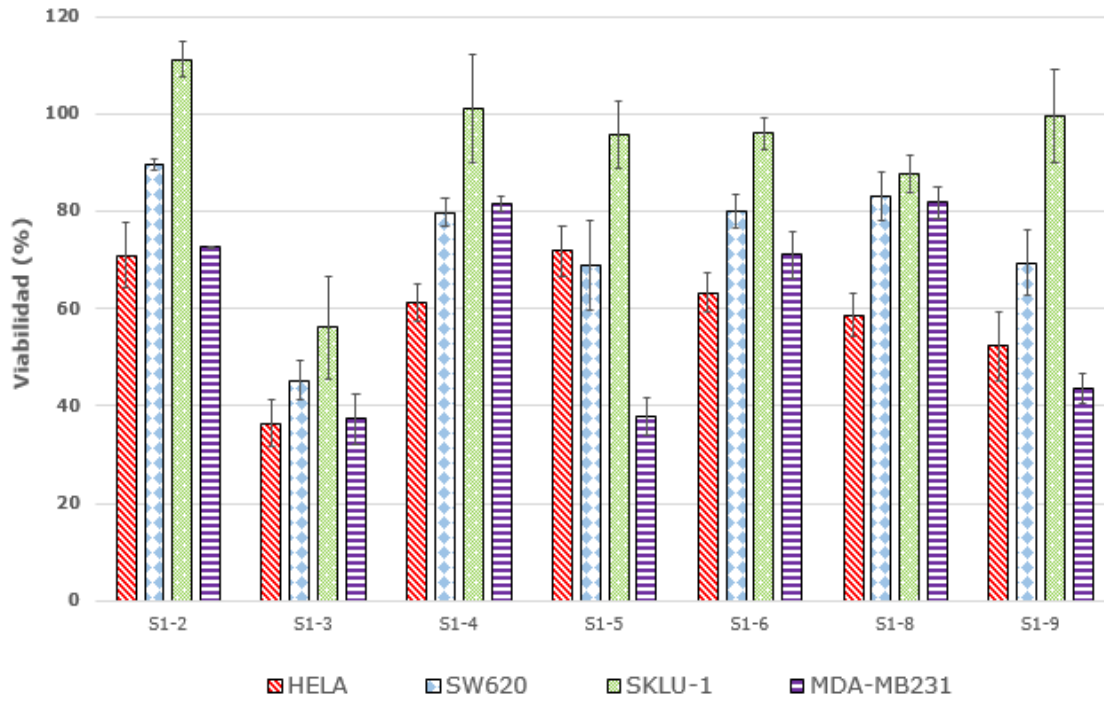


Figura 3.5. Viabilidad celular a las 48 h a una concentración de 50 μ M.

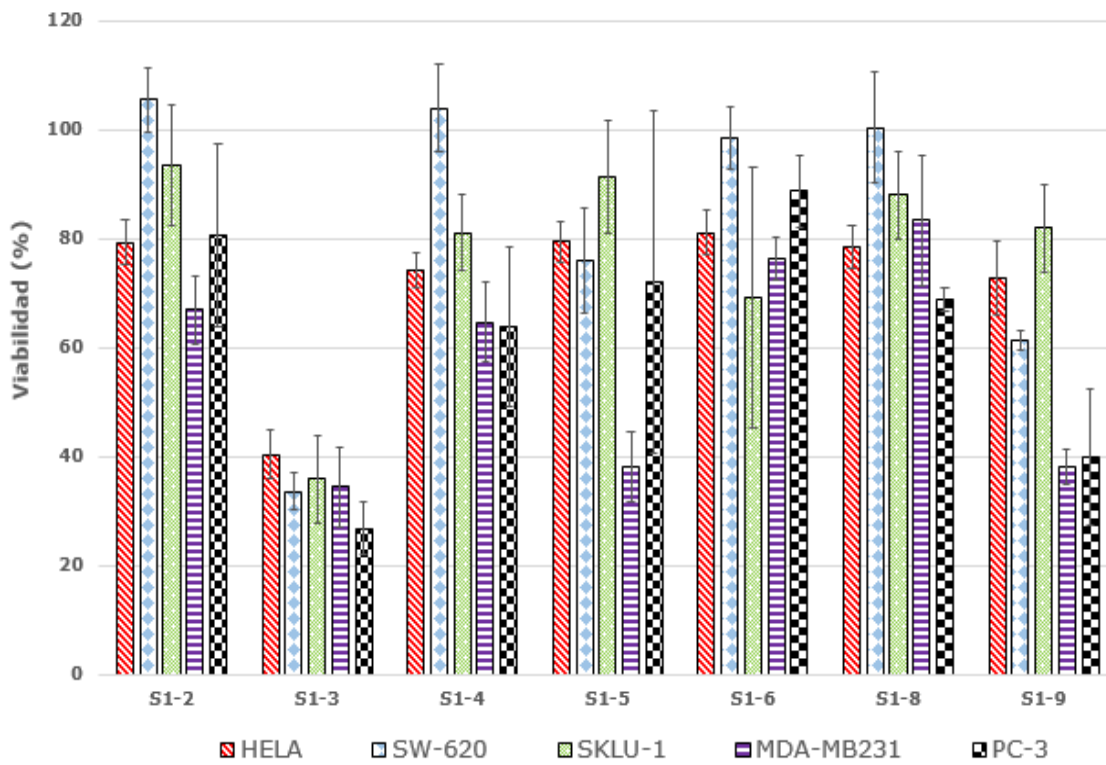


Figura 3.6. Viabilidad celular a las 72 h a una concentración de 50 μ M.

Tabla 3.8. Valores de CI_{50} de los compuestos **S1-3**, **S1-9** y GSK690693 en las líneas celulares HeLa, SKLU-1, SW620, MDA-MB-231 y PC-3.^a

Compuesto	CI_{50} (μ M)				
	SKLU-1	SW620	MDA-MB-231	HeLa	PC-3
S1-3	21.4 \pm 0.6 ^b	14.2 \pm 1.8 ^b	21.2 \pm 9.0 ^b	12.7 \pm 1.4 ^c	6.2 \pm 0.9 ^c
S1-9	ND	ND	32.4 \pm 1.6 ^c	26.2 \pm 1.6 ^c	11.6 \pm 4.9 ^c
GSK690693	5.3 \pm 0.8 ^c	8.8 \pm 0.1 ^c	6.5 \pm 1.2 ^c	5.7 \pm 0.1 ^c	ND

^aLos valores indican concentraciones micromolares. $n \geq 3 \pm$ EEM. ^bValores de CI_{50} a 48 h. ^cValores de CI_{50} a 72 h. ND = No Determinado.

Para la **Serie 2** de compuestos sintetizados solo 7 compuestos se evaluaron, ya que el resto mostró dificultades en los ensayos debido a su pobre solubilidad. De igual manera, para los compuestos **S2-1**, **S2-5**, **S2-6**, **S2-8**, **S2-9**, **S2-11** y **S2-16** se determinó la viabilidad celular a las 48 y 72 h a una concentración de 50 μ M, ver Figuras 3.7 y 3.8.

Los resultados mostraron que ningún compuesto evaluado redujo la viabilidad celular de las cinco líneas por debajo del 50%, ni al tiempo más prolongado (72 h). Lo cual indica que los compuestos de la **Serie 2** no tienen efecto citotóxico, al menos en estas líneas celulares evaluadas. Más estudios deben realizarse en otro tipo de líneas para poder descartar esta falta de actividad.

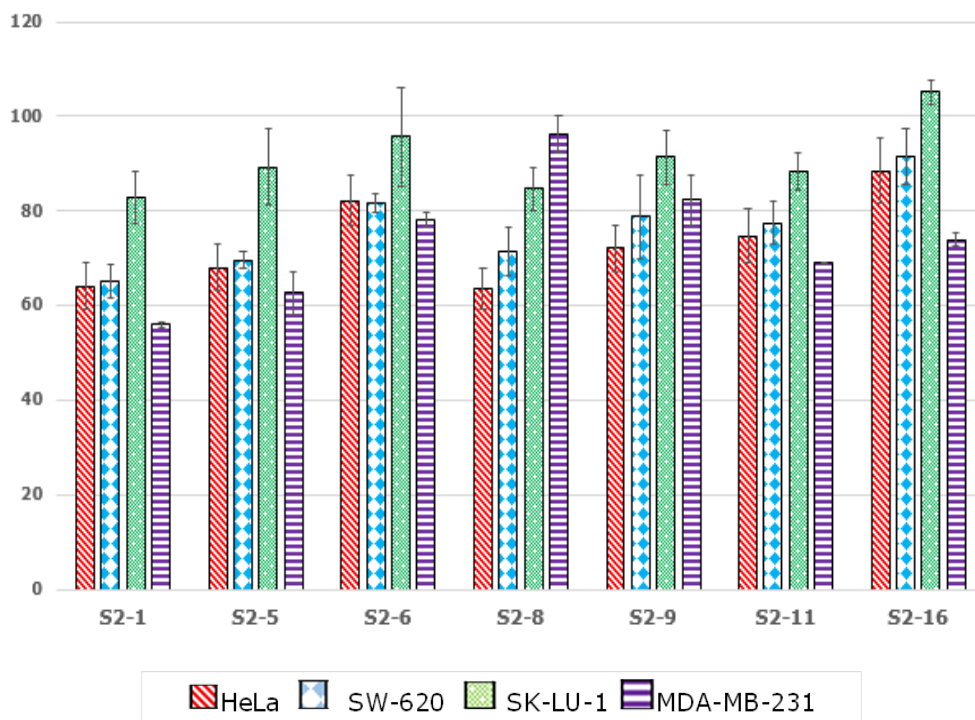


Figura 3.7. Viabilidad celular a las 48 h a una concentración de 50 μ M.

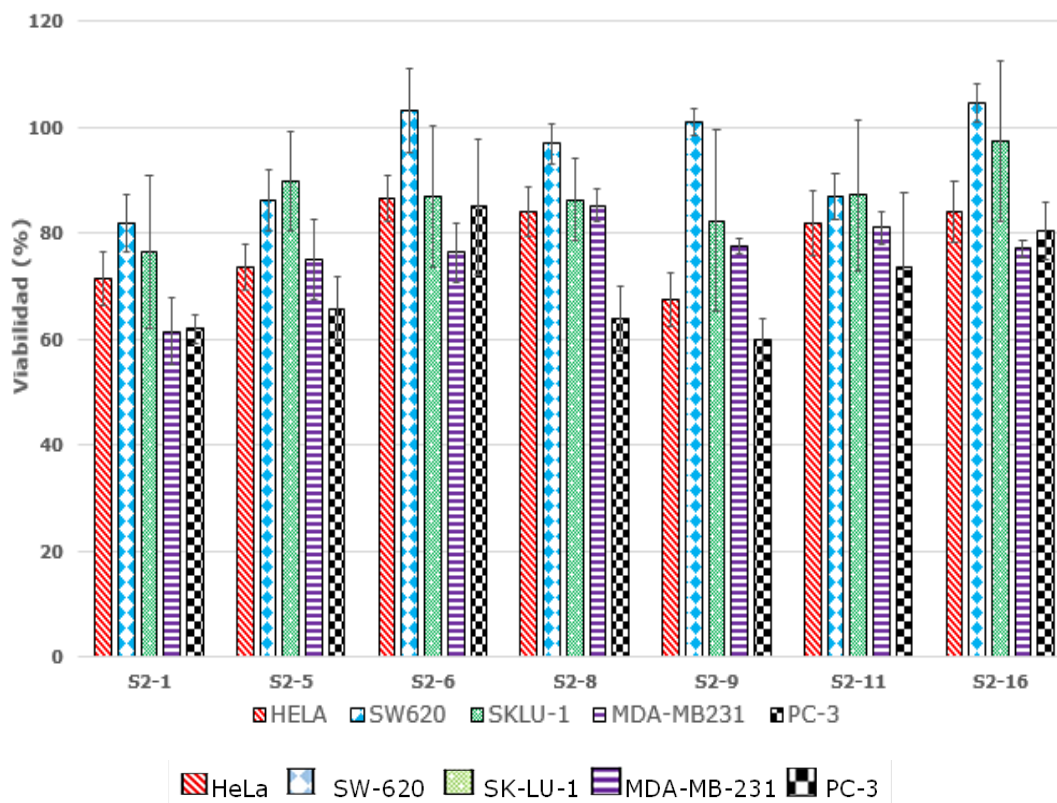


Figura 3.8. Viabilidad celular a las 72 h a una concentración de 50 μ M.

3.6. Conclusiones

- Se logró la síntesis de 20 piridinas 2,4,6-trisustituidas simétricas, 10 compuestos de la **Serie 1** y 10 compuestos de la **Serie 2**. La síntesis de los compuestos finales se realizó en tres pasos para ambas series con rendimientos de moderados a buenos.
- La ruta de síntesis planteada en este trabajo es una opción atractiva y factible para la preparación de piridinas poli-funcionalizadas. La reacción de Suzuki-Miyaura es una opción viable para preparar piridinas poli-funcionalizadas. 2,6-dicloro-4-yodopiridina y el ácido 2,6-dicloropiridina-4-carboxílico son opciones versátiles para ser utilizados como sustratos para preparar piridinas 2,4,6-trisustituidas usando reacciones de acoplamiento secuenciales y regioselectivas.
- El compuestos **S1-3** mostró ser el compuesto más activo, particularmente en líneas celulares de cáncer de próstata PC-3 ($CI_{50} = 6.2 \pm 0.9 \mu M$), por lo que se postula como un candidato a ser optimizado.
- La solubilidad es una limitante en los ensayos biológicos. Un nuevo diseño que mejora este aspecto está en progreso.

Bibliografía

1. Zuhlke, L. J., et. al. *Lancet* **2016**, 388, 1545–1602.
2. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> WHO - Cancer. *WHO* **2016**.
3. INEGI-Estadísticas del cáncer en México 2015.
4. Essential medicines selection.
5. Maggiora, G. M. *J. Chem. Inf. Model.* **2006**, 46, 60117.
6. Cherkasov, A.; Muratov, E. N.; Fourches, D.; Varnek, A.; Baskin, I. I.; Cronin, M.; Dearden, J. C.; Gramatica, P.; Martin, Y. C.; Todeschini, R.; Consonni, V.; Kuz, V. E.; Cramer, R. D.; Benigni, R.; Yang, C.; Rathman, J. F.; Terfloth, L.; Gasteiger, J.; Richard, A. M.; Tropsha, A. *J. Med. Chem.* **2014**.
7. Bajorath, J. *Expert Opin. Drug Discov.* **2012**, 7, 463–73.
8. Bajorath, J. *Expert Opin. Drug Discov.* **2017**, 12, 1–5.
9. Humbeck, L.; Koch, O. *ACS Chem. Biol.* **2017**, 12, 23–35.
10. Iyer, P.; Wawer, M.; Bajorath, J. *Medchemcomm* **2011**, 2, 113.
11. Stumpfe, D.; Bajorath, J. *RSC Adv.* **2012**, 2, 369–378.
12. Perez-Villanueva, J.; Santos, R.; Hernandez-Campos, A.; Giulianotti, M. A.; Castillo, R.; Medina-Franco, J. L. *Med. Chem. Comm.* **2011**, 2, 44–49.
13. Medina-Franco, J. L.; Yongye, A. B.; Pérez-Villanueva, J.; Houghten, R. A.; Martínez-Mayorga, K. *J. Chem. Inf. Model.* **2011**, 51, 2427–2439.
14. Liu, T.; Lin, Y.; Wen, X.; Jorissen, R. N.; Gilson, M. K. *Nucleic Acids Res.* **2007**, 35, 198–201.
15. 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.; Choudhry, A. E.; Schaber, M. D.; Heerding, D. A. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 1508–1511.
16. 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.; Leach, A.; Luke, R. W. A.; Morris, J.; Ogilvie, D.; Page, K.; Pass, M.; Pearson, S.; Ruston, L. *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 2059–2073.
17. 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.; Jong, R. de; Oltersdorf, T.; Luo, Y.; Rosenberg, S. H.; Giranda, V. L.; Li, Q. *Bioorganic Med. Chem.* **2006**, 14, 6832–6846.
18. Lin, H.; Yamashita, D. S.; Xie, R.; Zeng, J.; Wang, W.; Leber, J.; Safonov, I. G.; Verma, S.; Li, M.; LaFrance, L.; Venslavsky, J.; Takata, D.; Luengo, J. I.; Kahana, J. A.; Zhang, S.; Robell, K. A.; Levy, D.; Kumar, R.; Choudhry, A. E.; Schaber, M.; Lai, Z.; Brown, B. S.; Donovan, B. T.; Minthorn, E. A.; Brown, K. K.; Heerding, D. A. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2010**, 20, 684–688.
19. Lin, H.; Yamashita, D. S.; Zeng, J.; Xie, R.; Verma, S.; Luengo, J. I.; Rhodes, N.; Zhang, S.; Robell, K. A.; Choudhry, A. E.; Lai, Z.; Kumar, R.; Minthorn, E. A.; Brown, K. K.; Heerding, D. A. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2010**, 20, 679–683.
20. Sud, M. MayaChemTools.
21. Filimonov, D.; Poroikov, V.; Borodina, Y.; Glorizova, T. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1999**, 39, 666–670.
22. Hall, L. H.; Kier, L. B. *J. Chem. Inf. Model.* **1995**, 35, 1039–1045.
23. Rogers, D.; Hahn, M. *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, 742–754.
24. Durant, J. L.; Leland, B. A.; Henry, D. R.; Nourse, J. G. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2002**, 42, 1273–1280.
25. Carhart, R. E.; Smith, D. H.; Venkataraghavan, R. *J. Chem. Inf. Model.* **1985**, 25, 64–73.
26. Nilakantan, R.; Bauman, N.; Venkataraghavan, R.; Dixon, J. S. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1987**,

- 27, 82–85.
27. Longer, T.; Hoffmann, R. D. *Pharmacophores and Pharmacophore Searches*; Wiley-VCH GmbH KGaA, **2006**.
 28. Bonachéra, F.; Parent, B.; Barbosa, F.; Froloff, N.; Horvath, D. *J. Chem. Inf. Model.* **2006**, *46*, 2457–2477.
 29. Willett, P.; Barnard, J. M.; Downs, G. M. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1998**, *38*, 983–996.
 30. Méndez-Lucio, O.; Pérez-Villanueva, J.; Castillo, R.; Medina-Franco, J. L. *Bioorganic Med. Chem.* **2012**, *20*, 3523–3532.
 31. Medina-Franco, J. L. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52*, 2485–2493.
 32. Méndez-Lucio, O.; Pérez-Villanueva, J.; Castillo, R.; Medina-Franco, J. L. *Mol. Inform.* **2012**, *31*, 837–846.
 33. Flores-Carrillo, P.; Velázquez-López, J. M.; Aguayo-Ortiz, R.; Hernández-Campos, A.; Trejo-Soto, P. J.; Yépez-Mulia, L.; Castillo, R. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *137*, 211–220.
 34. Yongye, A. B.; Byler, K.; Santos, R.; Martínez-Mayorga, K.; Maggiora, G. M.; Medina-Franco, J. L. *J. Chem. Inf. Model.* **2011**, *51*, 1259–1270.
 35. Altomare, D. A.; Testa, J. R. *Oncogene* **2005**, *24*, 7455–7464.
 36. Fresno Vara, J. A.; Casado, E.; de Castro, J.; Cejas, P.; Belda-Iniesta, C.; González-Barón, M. *Cancer Treat. Rev.* **2004**, *30*, 193–204.
 37. Luo, J.; Manning, B. D.; Cantley, L. C. *Cancer Cell* **2003**, *4*, 257–262.
 38. Song, G.; Ouyang, G.; Bao, S. *J. Cell. Mol. Med.* **2005**, *9*, 59–71.
 39. Manning, B. D.; Cantley, L. C. *Cell* **2007**, *129*, 1261–1274.
 40. Sale, E. M.; Sale, G. J. *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, *65*, 113–127.
 41. Cheng, J. Q.; Lindsley, C. W.; Cheng, G. Z.; Yang, H.; Nicosia, S. V. *Oncogene* **2005**, *24*, 7482–7492.
 42. 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. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 2293–2296.
 43. Mattmann, M. E.; Stoops, S. L.; Lindsley, C. W. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2011**, *21*, 1309–38.
 44. Meuillet, E. J. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 2727–42.
 45. Kumar, C. C.; Madison, V. *Oncogene* **2005**, *24*, 7493–7501.
 46. Medina-Franco, J. L.; Giulianotti, M. a; Yu, Y.; Shen, L.; Yao, L.; Singh, N. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 4634–4638.
 47. Hernández-Campos, A.; Velázquez-Martínez, I.; Castillo, R.; López-Vallejo, F.; Jia, P.; Yu, Y.; Giulianotti, M. a; Medina-Franco, J. L. *Chem. Biol. Drug Des.* **2010**, *76*, 269–276.
 48. Brodbeck, D.; Cron, P.; Hemmings, B. A. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 9133–9136.
 49. Nakatani, K.; Sakaue, H.; Thompson, D. a; Weigel, R. J.; Roth, R. a. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *257*, 906–910.
 50. Schrödinger Release 2015-4: Prime version 4.2.
 51. Schrödinger Release 2015-4: Maestro version 10.4.
 52. Schrödinger Release 2015-4: Protein Preparation Wizard; Epik version 3.4.
 53. Arnold, K.; Bordoli, L.; Kopp, J.; Schwede, T. *Bioinformatics* **2006**, *22*, 195–201.
 54. Kopp, J.; Schwede, T. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, D315–D318.
 55. Chen, V. B.; Arendall, W. B.; Headd, J. J.; Keedy, D. A.; Immormino, R. M.; Kapral, G. J.; Murray, L. W.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 12–21.
 56. Wavefunction Inc Spartan version 10 **2010**, Irvine, CA 92612 USA.
 57. Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 235–242.
 58. Yang, J.; Cron, P.; Good, V. M.; Thompson, V.; Hemmings, B. a; Barford, D. *Nat. Struct. Biol.*

- 2002, 9, 940–944.
59. Schrödinger Release 2015-4: Glide version 6.9.
60. Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. *J. J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 2785–2791.
61. Trott, O.; Olson, A. *J. J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 455–461.
62. Gasteiger, J.; Marsili, M. *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19*, 3181–3184.
63. DeLano, W. L. The PyMOL Molecular Graphics System, DeLano Scientific, LLC **2007**.
64. Van Der Spoel, D.; Lindahl, E.; Hess, B.; Groenhof, G.; Mark, A. E.; Berendsen, H. J. C. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1701–1718.
65. Lindorff-Larsen, K.; Piana, S.; Palmo, K.; Maragakis, P.; Klepeis, J. L.; Dror, R. O.; Shaw, D. E. *Proteins* **2010**, *78*, 1950–1958.
66. Sousa, A. W.; Vranken, W. F. *BMC Res. Notes* **2012**, *5*, 1–8.
67. Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; DiNola, a; Haak, J. R. *J. Chem. Phys.* **1984**, *81*, 3684–3690.
68. Parrinello, M.; Rahman, A. *Phys. Rev. Lett.* **1980**, *45*, 1196–1199.
69. Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 10089–10092.
70. Kumari, R.; Kumar, R.; Lynn, A. *J. Chem. Inf. Model.* **2014**, *54*, 1951–1962.
71. Homeyer, N.; Gohlke, H. *Mol. Inform.* **2012**, *31*, 114–122.
72. Kroemer, R. T. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2007**, *8*, 312–328.
73. Charifson, P. S.; Corkery, J. J.; Murcko, M. A.; Walters, W. P. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 5100–5109.
74. Friesner; Shenkin *J. Med. Chem.* **2004**, 1739–1749.
75. Davies, T. G.; Verdonk, M. L.; Graham, B.; Saalau-Bethell, S.; Hamlett, C. C. F.; McHardy, T.; Collins, I.; Garrett, M. D.; Workman, P.; Woodhead, S. J.; Jhoti, H.; Barford, D. *J. Mol. Biol.* **2007**, *367*, 882–894.
76. Hou, T.; Wang, J.; Li, Y.; Wang, W. *J. Chem. Inf. Model* **2010**, *51*, 69–82.
77. Wang, C.; Nguyen, P. H.; Pham, K.; Huynh, D.; Le, T.-B. N.; Wang, H.; Ren, P.; Luo, R. *J. Comput. Chem.* **2016**.
78. Dummer, B.; Hemmings, B. a *Biochem. Soc. Trans.* **2007**, *35*, 231–235.
79. Hutchinson, J. N.; Jin, J.; Cardiff, R. D.; Woodgett, J. R.; Muller, W. J. **2004**, *1*, 3171–3178.
80. Grabinski, N.; Bartkowiak, K.; Grupp, K.; Brandt, B.; Pantel, K.; Jücker, M. *Cell. Signal.* **2011**, *23*, 1952–1960.
81. Han, Z.; Wu, K.; Shen, H.; Li, C.; Han, S.; Hong, L.; Shi, Y.; Liu, N.; Guo, C.; Xue, Y.; Qiao, T.; Fan, D. *Dig. Dis. Sci.* **2008**, *53*, 1801–1810.
82. Cho, J. H.; Robinson, J. P.; Arave, R. A.; Burnett, W. J.; Kircher, D. A.; Chen, G.; Davies, M. A.; Grossmann, A. H.; VanBrocklin, M. W.; McMahon, M.; Holmen, S. L. *Cell Rep.* **2015**, *13*, 898–905.
83. Chin, Y. R.; Yoshida, T.; Marusyk, A.; Beck, A. H.; Polyak, K.; Toker, A. *Cancer Res.* **2014**, *74*, 964–973.
84. Liby, T. A.; Spyropoulos, P.; Buff Lindner, H.; Eldridge, J.; Beeson, C.; Hsu, T.; Muise-Helmericks, R. C. *Int. J. Cancer* **2012**, *130*, 532–43.
85. Héron-Milhavet, L.; Franckhauser, C.; Rana, V.; Berthenet, C.; Fisher, D.; Hemmings, B. a; Fernandez, A.; Lamb, N. J. C. *Mol. Cell. Biol.* **2006**, *26*, 8267–80.
86. Xu, P.-Z.; Chen, M.-L.; Jeon, S.-M.; Peng, X.; Hay, N. *Oncogene* **2012**, *31*, 518–26.
87. Abramovitch, R. . In *The Chemistry of Heterocyclic Compounds*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, **2008**; pp. 99–591.
88. Riendeau, D.; Percival, M. D.; Brideau, C.; Charleson, S.; Dubé, D.; Ethier, D.; Falguyret, J. P.; Friesen, R. W.; Gordon, R.; Greig, G.; Guay, J.; Mancini, J.; Ouellet, M.; Wong, E.; Xu, L.;

- Boyce, S.; Visco, D.; Girard, Y.; Prasit, P.; Zamboni, R.; Rodger, I. W.; Gresser, M.; Ford-Hutchinson, a W.; Young, R. N.; Chan, C. C. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, *296*, 558–66.
89. Karki, R.; Thapa, P.; Yoo, H. Y.; Kadayat, T. M.; Park, P. H.; Na, Y.; Lee, E.; Jeon, K. H.; Cho, W. J.; Choi, H.; Kwon, Y.; Lee, E. S. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *49*, 219–228.
90. Hanada, T.; Hashizume, Y.; Tokuhara, N.; Takenaka, O.; Kohmura, N.; Ogasawara, A.; Hatakeyama, S.; Ohgoh, M.; Ueno, M.; Nishizawa, Y. *Epilepsia* **2011**, *52*, 1331–1340.
91. Eastwood, P.; Gonzalez, J.; Paredes, S.; Nueda, A.; Domenech, T.; Alberti, J.; Vidal, B. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 1697–1700.
92. Henke, B. R.; Drewry, D. H.; Jones, S. A.; Stewart, E. L.; Weaver, S. L.; Wiethe, R. W. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1939–1942.
93. Pascard, C.; Ducruix, A.; Lunel, J.; Prangc, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *6418*, 6418–6423.
94. Bagley, M. C.; Bashford, K. E.; Hesketh, C. L.; Moody, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3301–3313.
95. Fang, A. G.; Mello, J. V.; Finney, N. S. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 11075–11087.
96. Frank, R. L.; Seven, R. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *3482*, 2629–2635.
97. Weiss, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 200–2002.
98. Allais, C.; Grassot, J.; Rodriguez, J.; Constantieux, T. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 10829–10868.
99. Heller, B.; Hapke, M.; Heller, B. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1085–1094.
100. Suzuki, S.; Yamaguchi, J. *Chem. Commun. Chem. Commun* **2017**, *53*, 1568–1582.
101. Doebelin, C.; Wagner, P.; Bertin, I.; Simonin, F.; Schmitt, M.; Bihel, F.; Bourguignon, J.-J. *RSC Adv.* **2013**, *3*, 10296.
102. Doebelin, C.; Wagner, P.; Bihel, F.; Humbert, N.; Kenfack, C. A.; Mely, Y.; Bourguignon, J. J.; Schmitt, M. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 908–918.
103. Reimann, S.; Ehlers, P.; Petrosyan, A.; Kohse, S.; Spannenberg, A.; Surkus, A. E.; Ghochikyan, T. V.; Saghyan, A. S.; Lochbrunner, S.; Kühn, O.; Ludwig, R.; Langer, P. **2014**.
104. Zhang, E.; Tang, J.; Li, S.; Wu, P.; Moses, J. E.; Sharpless, K. B. *Chem. - A Eur. J.* **2016**, *22*, 5692–5697.
105. Powell, N. a.; Ciske, F. L.; Cai, C.; Holsworth, D. D.; Mennen, K.; Van Huis, C. a.; Jalaie, M.; Day, J.; Mastronardi, M.; McConnell, P.; Mochalkin, I.; Zhang, E.; Ryan, M. J.; Bryant, J.; Collard, W.; Ferreira, S.; Gu, C.; Collins, R.; Edmunds, J. J. *Bioorganic Med. Chem.* **2007**, *15*, 5912–5949.
106. Mello, J. V.; Finney, N. S. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 4263–4265.
107. Chonan, T.; Tanaka, H.; Yamamoto, D.; Yashiro, M.; Oi, T.; Wakasugi, D.; Ohoka-Sugita, A.; Io, F.; Koretsune, H.; Hiratate, A. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 3965–3968.
108. MacMillan, D. S.; Murray, J.; Sneddon, H. F.; Jamieson, C.; Watson, A. J. B. *Green Chem.* **2013**, *15*, 596.
109. Twentyman, P. R.; Luscombe, M. *Br. J. Cancer* **1987**, *56*, 279–285.
110. Carmichael, J.; Degraff, W. G.; Gazdar, A. F.; Minna, J. D.; Mitchell, J. B. *Am. Assoc. Cancer Res.* **1987**, *47*, 936–942.
111. Rhodes, N.; Heerding, D. A.; Duckett, D. R.; Eberwein, D. J.; Knick, V. B.; Lansing, T. J.; McConnell, R. T.; Gilmer, T. M.; Zhang, S. Y.; Robell, K.; Kahana, J. A.; Geske, R. S.; Kleymenova, E. V.; Choudhry, A. E.; Lai, Z.; Leber, J. D.; Minthorn, E. A.; Strum, S. L.; Wood, E. R.; Huang, P. S.; Copeland, R. A.; Kumar, R. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 2366–2374.
112. Ishiyama, T.; Murata, M.; Miyaura, N. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 7508–7510.
113. Lennox, A. J. J.; Lloyd-Jones, G. C. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 412–443.
114. Surry, D. S.; Buchwald, S. L. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2008**, *47*, 6338–6361.
115. Lipshutz, B. H. *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 2806–2816.
116. Lipshutz, B. H.; Gallou, F.; Handa, S. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2016**, *4*, 5838–5849.

117. Klumphu, P.; Lipshutz, B. H. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 888–900.
118. Lipshutz, B. H.; Ghorai, S.; Abela, A. R.; Moser, R.; Nishikata, T.; Duplais, C.; Krasovskiy, A.; Gaston, R. D.; Gadwood, R. C. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 4379–4391.
119. Gabriel, C. M.; Lee, N. R.; Bigorne, F.; Klumphu, P.; Parmentier, M.; Gallou, F.; Lipshutz, B. H. *Org. Lett.* **2016**, acs.orglett.6b03468.
120. Lipshutz, B. H.; Ghorai, S. *Green Chem.* **2014**, *16*, 3660–3679.
121. Marion, N.; Navarro, O.; Mei, J.; Stevens, E. D.; Scott, N. M.; Nolan, S. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4101.
122. Ingoglia, B. T.; Buchwald, S. L. *Org. Lett.* **2017**, *19*, 2853–2856.
123. Cohen, A.; Crozet, M. D.; Rathelot, P.; Vanelle, P. *Green Chem.* **2009**, *11*, 1736.
124. Xing, D.; Guan, B.; Cai, G.; Fang, Z.; Yang, L. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 693–696.
125. Lin, R.; Chen, F.; Jiao, N. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 4158–4161.
126. Gonzalez-de-castro, A.; Xiao, J. *Journal* **2015**, *137*, 8206–8218.
127. Lippincott, D. J.; Trejo-Soto, P. J.; Gallou, F.; Lipshutz, B. H. *Org. Lett.* **2018**, *20*, 5094–5097.

Anexo I

Ruptura oxidativa de éteres de enol en agua a temperatura ambiente

Introducción

Sistemas micelares como medios de reacción

El desarrollo de alternativas a los medios de reacción convencionales utilizados en síntesis orgánica, particularmente por el uso de disolventes orgánicos, ha cobrado gran interés en los últimos años. En este sentido, el uso de agua como disolvente surge como una alternativa interesante para abordar este enfoque. Uno de los problemas que ofrece el agua es que la gran mayoría de los reactivos, catalizadores, y demás aditivos son insolubles en agua, ya que las interacciones hidrofóbicas que presentan estas entidades impiden que se disuelvan en ella, lo cual es indispensable para que haya reacción. Para resolver este problema el grupo de investigación del Dr. Bruce Lipshutz es pionero en el diseño de surfactantes no iónicos, no tóxicos, utilizados en bajas concentraciones (2 a 3%) y reutilizables ^{115,116,120}. Estos surfactantes son derivados de coenzima Q10, vitamina E o β -sitosterol (PTS, TPGS-750-M o Nok) ^{117,118}, los cuales forman sistemas micelares que permiten llevar a cabo las reacciones en agua a temperatura ambiente y con altos rendimientos.

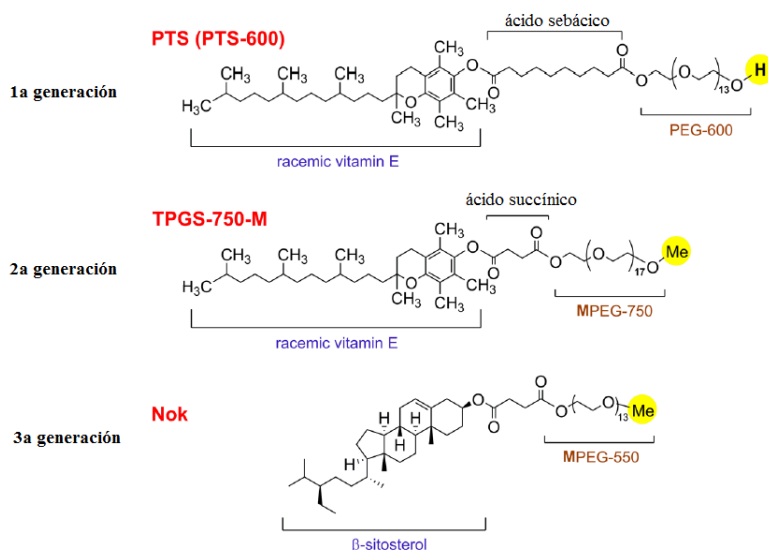


Figura 5.1. Estructura de los surfactantes diseñados empleados para reacciones químicas en agua.

La ventaja de las micelas es que ofrecen un interior lipofílico el cual sirve como medio de reacción que permite la interacción de los componentes de la reacción; además, debido a su tamaño (22-25 nm para PTS, 53-65 nm para TPGS-750-M) la concentración de los reactivos en el interior es muy alta, haciendo que la reacción se lleve a cabo a una velocidad razonable inclusive a temperatura ambiente ^{116,119}. Por estas características, estos sistemas micelares también se les identifica como “nanoreactores” ¹¹⁵.

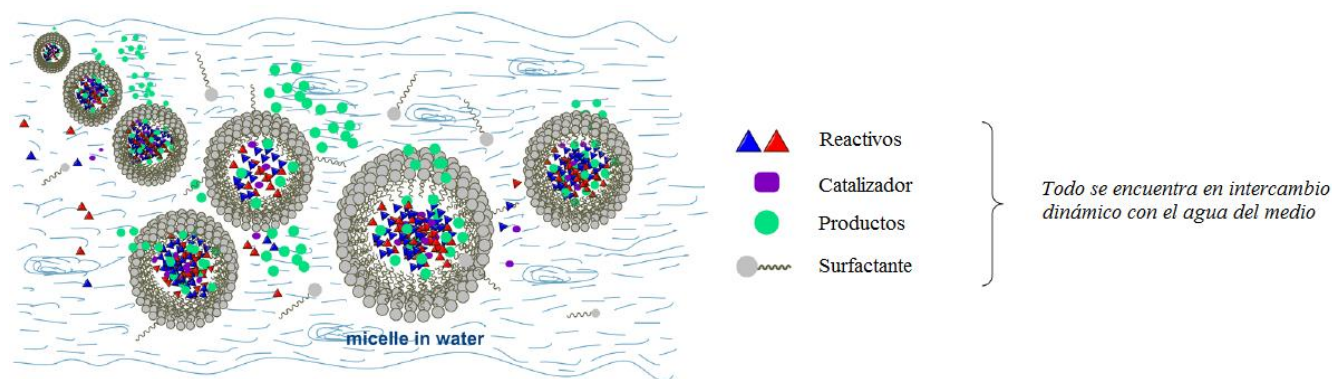


Figura 5.2. Ejemplificación de cómo las reacciones químicas ocurren en los sistemas micelares.

El diseño de estos surfactantes ha permitido hacer diferentes reacciones, ej. Suzuki-Miyaura, Sonogashira, metátesis, amidación, activación C-H, S_NAr, etc., todas ellas en agua a temperatura ambiente, con excelentes rendimientos y sin el uso de disolventes orgánicos. Estos resultados hacen ver la aplicación exitosa de este tipo de sistemas micelares y su potencial aplicación a otras reacciones químicas para ser efectuadas en agua ^{115,116}.

Alternativas de ozonolisis

El uso de ozono como reactivo para la generación de compuestos carbonílicos es una de las reacciones fundamentales y más conocidas en síntesis orgánica. Su uso es bien reconocido, ya que la reacciones proceden en tiempos cortos, limpias y con altos rendimientos. A pesar de esto, el ozono

requiere de manejo especial y equipo de laboratorio especializado para su uso, lo que dificulta su uso, en particular a escalas mayores. Por esta razón, se han reportado alternativas equivalentes basadas en catálisis que busca ser más prácticas, seguras y amigables con el medio ambiente.

En 2006, Shi y colaboradores describieron un método de catálisis con oro para la ruptura oxidativa de olefinas a sus correspondientes aldehídos o cetonas. Estas reacciones se efectuaron usando TBHP como oxidante en agua a 90 °C ¹²⁴. Otro reporte muestra el uso de organocatalizadores, como *N*-hidroxifitalimida (NHPI o PINO), en dimetilacetamida y oxígeno a 80 °C como otro enfoque ¹²⁵. Más recientemente, en 2015, Xiao describió una metodología elegante basada en triflato de hierro (III) en dicloroetano (DCE) y su aplicación en una amplia gama de sustratos; sin embargo, tiene como desventaja que el ligando utilizado (piridina bis-sulfonamida) es complejo y no es comercial ¹²⁶. Estos ejemplos muestran el potencial para continuar en la búsqueda de alternativas para la oxidación de olefinas. Sin embargo, aún hay retos para mejorar estas transformaciones, entre ellos, condiciones de reacción más suave, ej. reacciones a temperatura ambiente, evitar el uso de disolventes orgánicos, uso de catalizadores metálicos más abundantes y menos tóxicos y protocolos más simples y seguros.

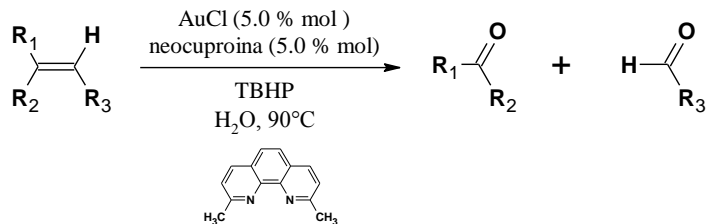
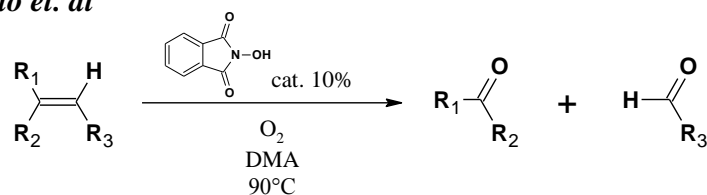
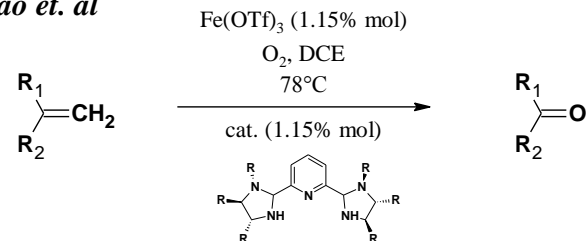
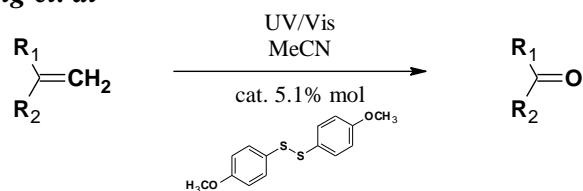
Xi et. al*Jiao et. al**Xiao et. al**Wang et. al*

Figura 5.3. Ejemplos de metodologías alternas de ruptura oxidativa de alquenos.

Objetivos particulares

- Conocer metodologías de síntesis con un enfoque de química verde a través del empleo de sistemas micelares en agua.
- Establecer una metodología de ruptura oxidativa de alquenos a través del uso de cobre como catalizador en agua a temperatura ambiente.

Resultados y Discusión

Inspirados en los resultados de Xi y colaboradores ¹²⁴, se decidió explorar la ruptura oxidativa de olefinas usando cobre como catalizador, TBHP como oxidante en agua a temperatura ambiente. Se decidió utilizar cobre ya que es un metal menos tóxico, más abundante y económico, en comparación con oro el cual reportó Xi en su trabajo. En el caso de cobre se ha reportado su uso en la oxidación de alcoholes a sus correspondientes aldehídos y cetonas, lo que llevó a anticipar su aplicación en la oxidación de olefinas.

Primeramente, se buscaron las mejores condiciones de reacción empleando como sustrato estireno (prop-1-en-2-ilbenceno). Se evaluaron diferentes sales de cobre y oro junto con neocuproina como ligante, diferentes oxidantes y empleando sistemas micelares. Como se observa en la Tabla 5.1, el uso de cobre como catálisis mostró significativamente un mejor rendimiento en comparación que con oro (Experimento 1 vs Experimento 2). Ambas reacciones procedieron en sistemas abiertos permitiendo la participación del oxígeno ambiental en la reacción. Una reacción análoga (Experimento 3) bajo atmósfera de argón no mostró conversión de las materias primas, indicando la participación del oxígeno ambiental en el proceso de la reacción. Cambiando la sal de Cu(I) a Cu(II) no tuvo efecto significativo en el rendimiento (Experimento 1 vs Experimento 4). De igual manera, la reacción en atmósfera de oxígeno no tuvo un efecto significativo en el rendimiento (Experimento 5). Por otra parte, la reacción efectuada en condiciones ambientales en ausencia de TBHP no mostró conversión de la materia prima (Experimento 8), mismo resultado que al no adicionar cobre a la reacción. Evaluaciones con otros peróxidos mostraron bajos rendimientos o nula transformación (Experimentos 12-15). Otras sales de cobre se probaron, de la cual hidróxido de cobre mostró los mejores resultados (Experimento 16).

Tabla 5.1. Condiciones de reacción estudiadas para la ruptura oxidativa de alquenos

Experimento	Catalizador / L	Oxidante	Rend (%) ^d
1	Cu(I)OAc	TBHP (2.00)	57
2	AuCl ₃	TBHP (2.00)	26
3 ^b	Cu(I)OAc	TBHP (2.00)	NR (47) ^c
4	Cu(OAc) ₂	TBHP (2.00)	59
5 ^d	Cu(OAc) ₂	TBHP (2.00)	48
6 ^e	Cu(OAc) ₂	TBHP (2.00)	16
7 ^f	Cu(OAc) ₂	TBHP (2.00)	13
8	Cu(OAc) ₂	--	NR
9	--	TBHP (2.00)	NR
10	Cu(MeCN) ₄ PF ₆	TBHP (2.00)	55
11	Cu(<i>i</i> -butirato) ₂	TBHP (2.00)	39
12	Cu(OAc) ₂	H ₂ O ₂ (3.00)	NR
13	Cu(OAc) ₂	Cumeno-OOH (2.00)	NR
14	Cu(OAc) ₂	TMS-OO-TMS (2.00)	NR
15	Cu(OAc) ₂	MCPBA (2.00)	NR
16	Cu(OH) ₂	TBHP (2.50)	65
17	CuO	TBHP (2.50)	48

^aProducto aislado. ^bReacción en atmósfera de Ar. ^cRendimiento después de la adición de TBHP con exposición al aire.

^dReacción en atmósfera de O₂. ^eConcentración [0.50 M]. ^fConcentración [1.00 M]. NR= no hay reacción.

Posteriormente, se abordaron las condiciones de reacción en la reactividad de alquenos, particularmente con diferentes sustituyentes en la posición -R₂. Para esto, se utilizó *p*-metoxi- y *p*-bromo- α -metilestireno como puntos de partida (Experimento 1 y 2, R₂=H). Se observó que al adicionar cadenas alquílicas (ej. metilo o *n*-pentilo) resultó en un alqueno más voluminoso lo que tuvo un impacto negativo en la eficiencia de la reacción. En el caso de sustituir por un grupo 4-metoxifenilo en la posición -R₂ se observó ausencia de transformación (Experimento 5). En el caso de sustituir por un grupo metil enol éter en -R₂ la reacción procedió con un incremento significativo de producto (Experimento 6 y 7). Tomando este sustituyente, la disminución de TBHP de 2.50 a 1.25 eq. no tuvo efecto significativo en el rendimiento (Experimento 7 vs Experimento 8). Por otra parte, experimentos usando 1.25 de TBHP sin ligante, únicamente la sal de cobre, mostraron ser igual o más efectivo. La sustitución de una sal de cobre más básica, como la de carbonato, en vez de acetato de cobre tuvo un mejor resultado (Experimento 11). Esto indicó que el estudio debía continuar con el uso de esta fuente de Cu(II). Disminuyendo la carga de catalizador de 1 a 2 % tuvo un ligero decremento en el

rendimiento, mientras que el aumento de 3 a 5 % no mostró un efecto benéfico (Experimento 11-14). Finalmente, cuando se sustituyó el disolvente a 1,2-dicloroetano o acetonitrilo, disolventes comunes en reportes previos para ruptura oxidativa de alquenos, las reacciones procedieron bien, sin embargo, con rendimientos ligeramente menores que al usar TPGS-750-M en agua (Experimento 11 vs Experimentos 15, 16).

Tabla 5.2. Aplicación de las condiciones de reacción a diferentes tipos de alquenos

Experimento	3% mol [Cu] / L	R ₁	R ₂	TBHP (eq.)	Rend (%) ^a
1	Cu(OH) ₂ / L	OMe	H	2.50	55
2	Cu(OH) ₂ / L	Br	H	2.50	48
3	Cu(OH) ₂ / L	OMe	Me	2.50	31
4	Cu(OH) ₂ / L	OMe	<i>n</i> -pentilo	2.50	36
5	Cu(OH) ₂ / L	Br	<i>p</i> -MeO-fenilo	2.50	NR
6	Cu(OH) ₂ / L	OMe	OMe	2.50	69
7	Cu(OH) ₂ / L	Br	OMe	2.50	66
8	Cu(OH) ₂ / L	Br	OMe	1.25	67
9 ^b	Cu(OH) ₂ / L	Br	OMe	1.25	70
10	Cu(OH) ₂	Br	OMe	1.25	73
11	Cu ₂ (OH) ₂ CO ₃	Br	OMe	1.25	84
12 ^c	Cu ₂ (OH) ₂ CO ₃	Br	OMe	1.25	62
13 ^d	Cu ₂ (OH) ₂ CO ₃	Br	OMe	1.25	67
14 ^b	Cu ₂ (OH) ₂ CO ₃	Br	OMe	1.25	84
15 ^e	Cu ₂ (OH) ₂ CO ₃	Br	OMe	1.25	70
16 ^f	Cu ₂ (OH) ₂ CO ₃	Br	OMe	1.25	79
17 ^g	Cu ₂ (OH) ₂ CO ₃	Br	OMe	1.25	78
18 ^g	Cu ₂ (OH) ₂ CO ₃	Br	OMe	--	NR

^aProducto aislado. ^bcat. 5% mol. ^ccat. 1% mol. ^dcat. 2% mol. ^eReacción en 1,2-dicloroetano. ^fReacción en acetonitrilo.

^gReacción en atmósfera de O₂.

Con las mejores condiciones de reacción encontradas, se decidió aplicarlas en diferentes sustratos de metil enol éter (como mezclas (*E/Z*), con diferentes grupos arilos con sustituyentes electroattractores y electrodonadores en posiciones *orto*-, *meta*- y *para*-. Así mismo, diferentes derivados herocíclicos que contenían tiofeno, pirazol, pirimidina, azaindole o quinolina se evaluaron, obteniendo las correspondientes cetonas en buenos rendimientos ¹²⁷.

Tabla 5.3. Oxidación con ruptura de diferentes éteres de enol

Comp	Sustrato	Producto	Rend (%) ^a	Comp	Sustrato	Producto	Rend (%) ^a
1			87 (82)^b	9			50
2			84 (70)	10			29
3			57	11			71
4			89^c (81)	12			41
5			76	13			44
6			83	14			61
7			80	15			80
8			66	16			73

^aProducto aislado

^bRendimiento usando 3 mol % Cu(OH)₂

^c10% de THF se agregó a la reacción para aumentar la solubilidad del sustrato

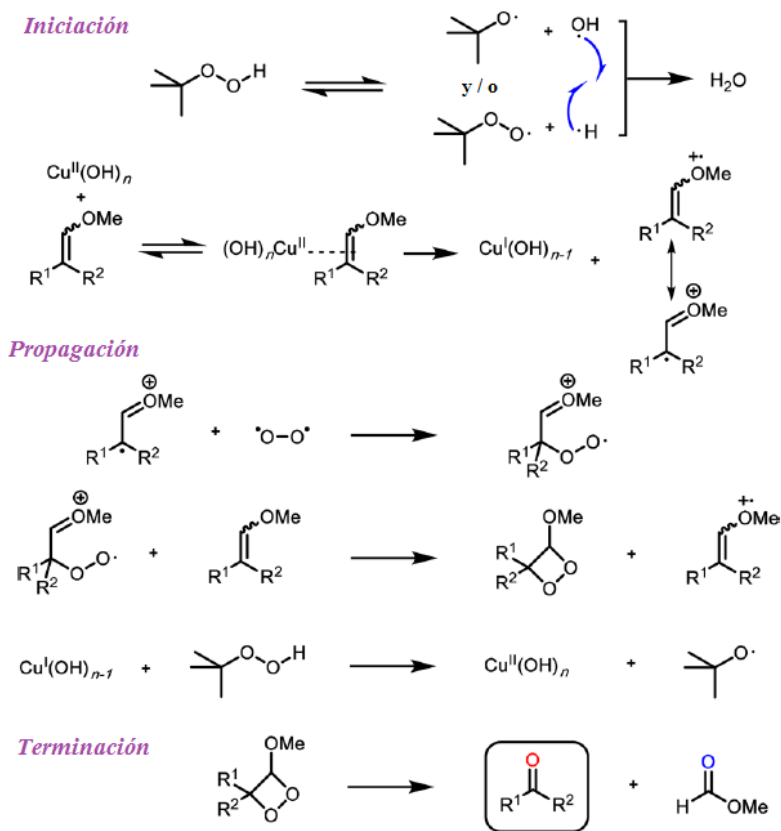


Figura 5.3. Propuesta mecanística para la ruptura oxidativa de éteres de enol utilizando Cu^{2+} , TBHP y oxígeno del ambiente.

En la Figura 5.3 se propone un posible mecanismo radicalario para la ruptura oxidativa de éteres de enol ¹²⁷.

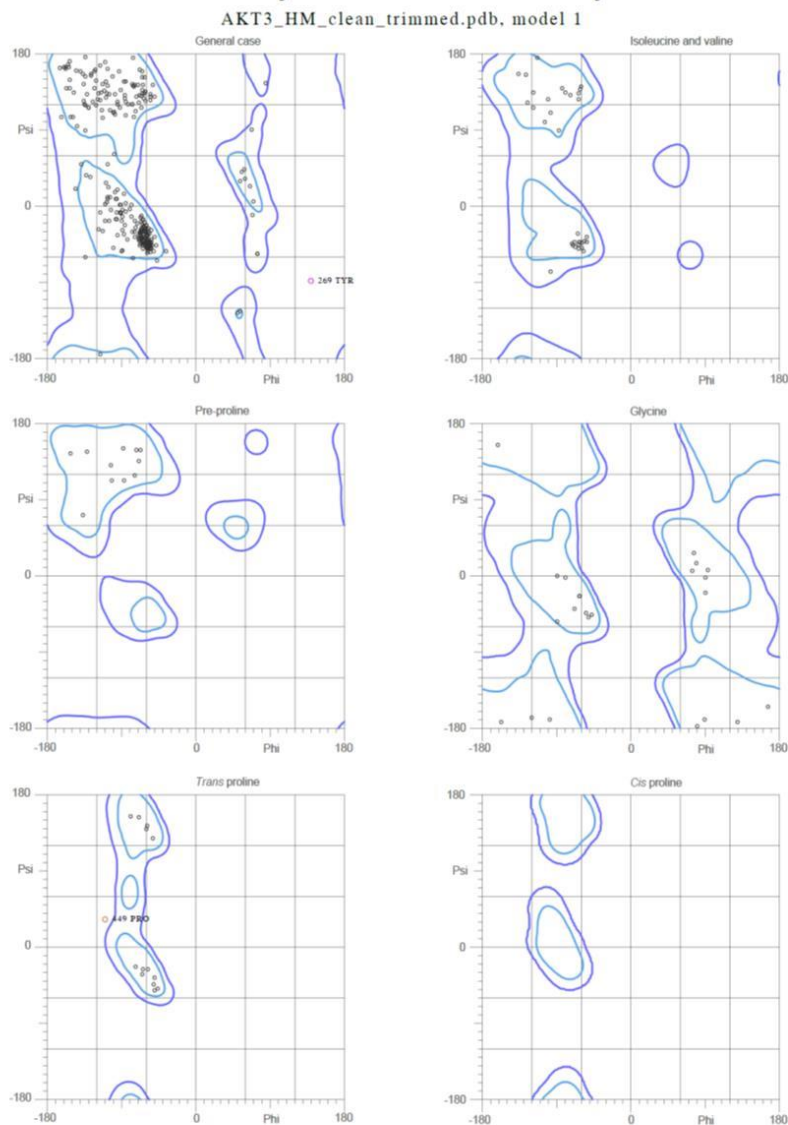
Conclusiones

En este trabajo se propone una metodología alterna de ruptura oxidativa de éteres de enol, la cual involucra bajas cantidades catalíticas de cobre y oxígeno del ambiente. Además la reacción procede con mejores rendimientos en agua y no es necesario el uso de disolventes orgánicos. En particular, los éteres de enol son sustratos más susceptibles a la ruptura oxidativa, obteniendo productos con buenos rendimientos. Las condiciones de reacción encontradas en este trabajo pueden ser empleadas en otro tipo de alquenos, como derivados de estireno y en alquenos di/trisustituídos, pero es necesario la adición de un ligando (ej. neocuproina). Los resultados de este trabajo muestran las posibilidades de la aplicación exitosa de agua como medio de reacción, por lo que su uso en otro tipo de reacciones es posible.

Anexo II

Homología de AKT3 y modo de unión de ligandos en las isoformas de AKT

MolProbity Ramachandran analysis



95.5% (337/353) of all residues were in favored (98%) regions.
 99.4% (351/353) of all residues were in allowed (>99.8%) regions.

There were 2 outliers (phi, psi):
 269 TYR (140.5, -88.2)
 449 PRO (-110.3, 33.5)

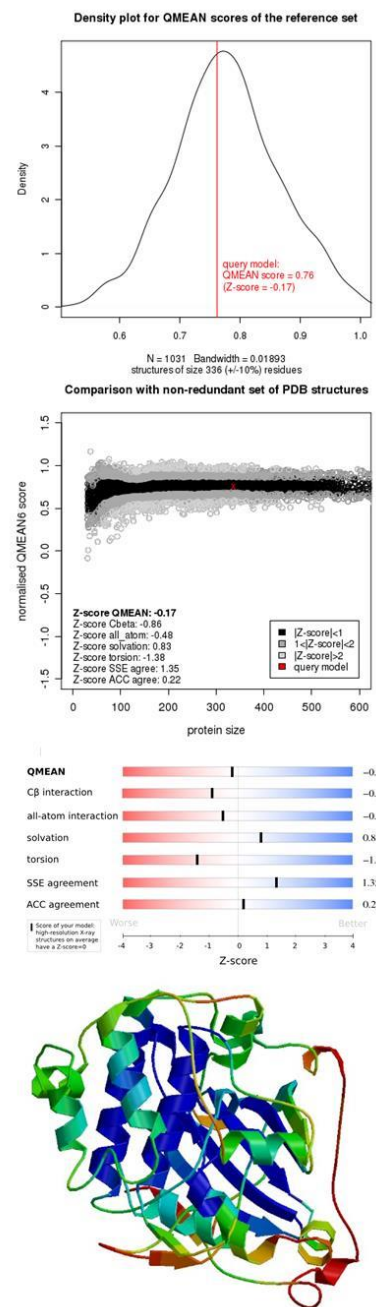


Figura 1. Esquemas de validación para el modelo por homología de la isoforma AKT3.

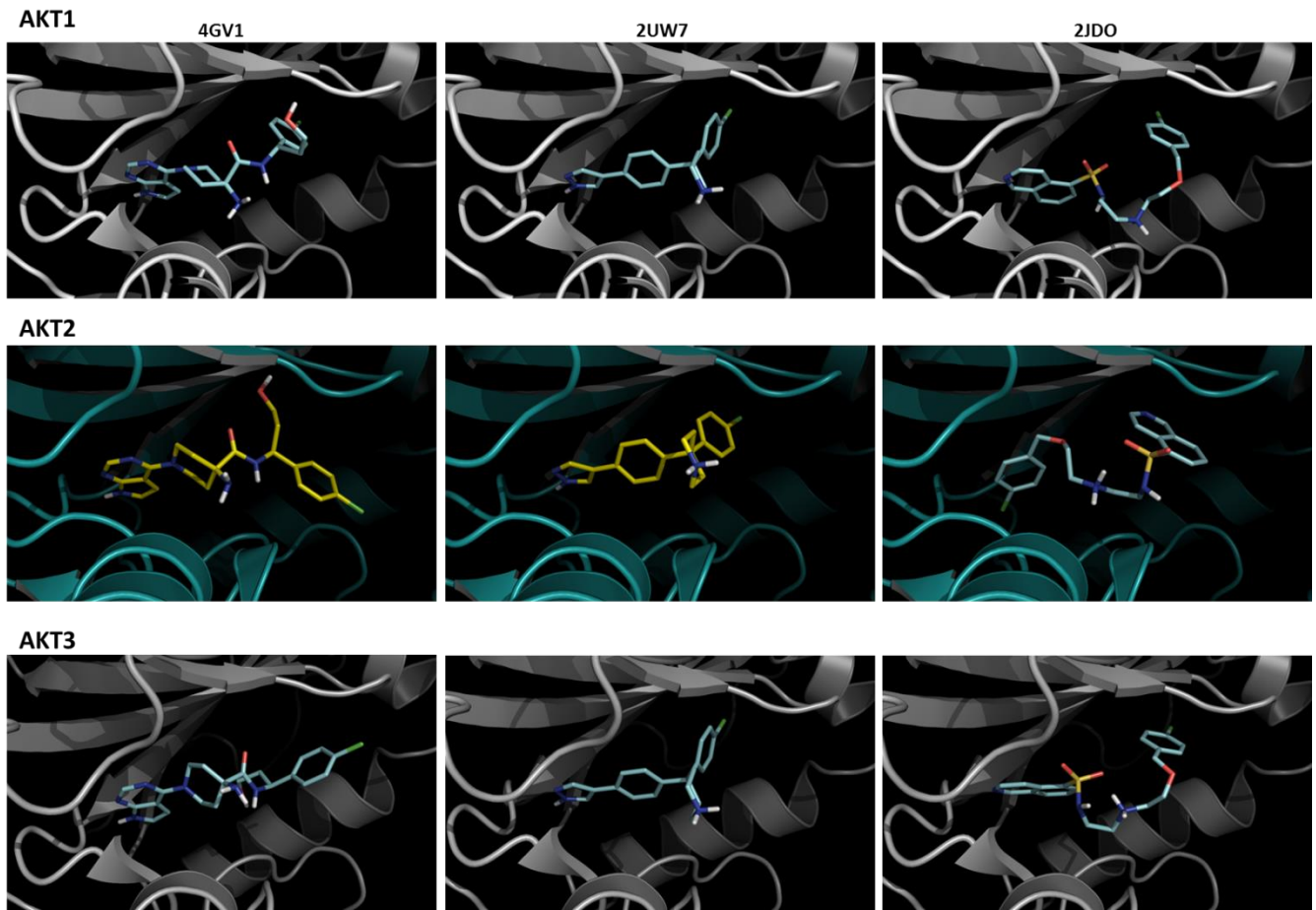
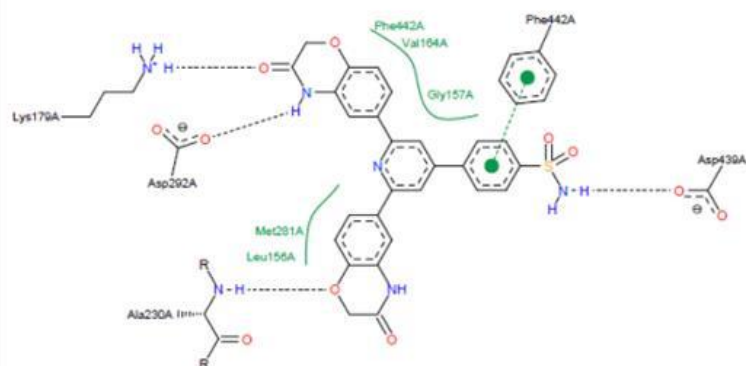
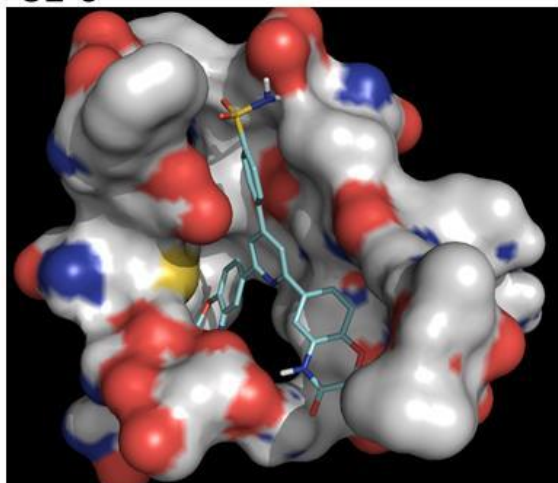


Figura 2. Modo de unión de los ligandos de referencia en las tres isoformas de AKT.

AKT1

S1-6



S2-3

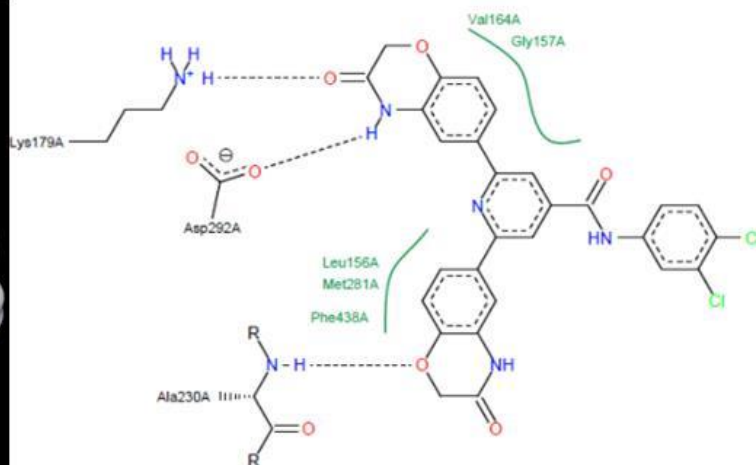
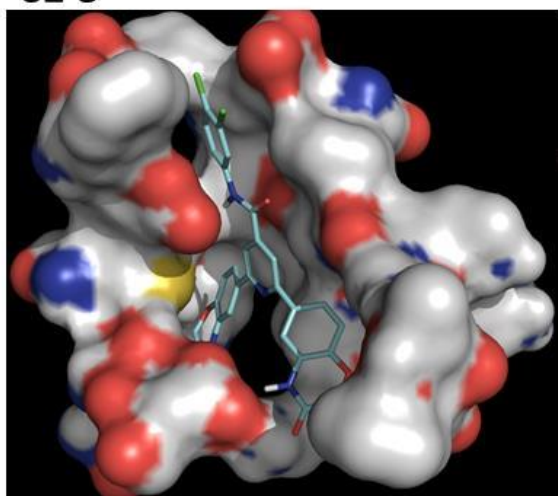
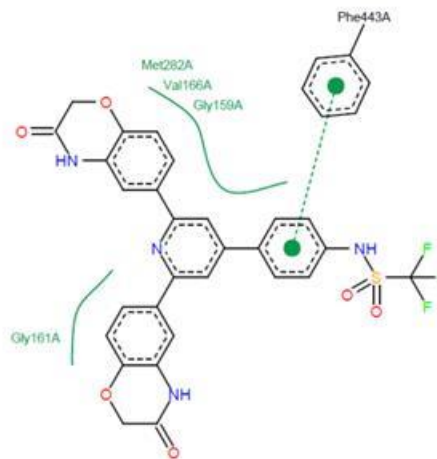
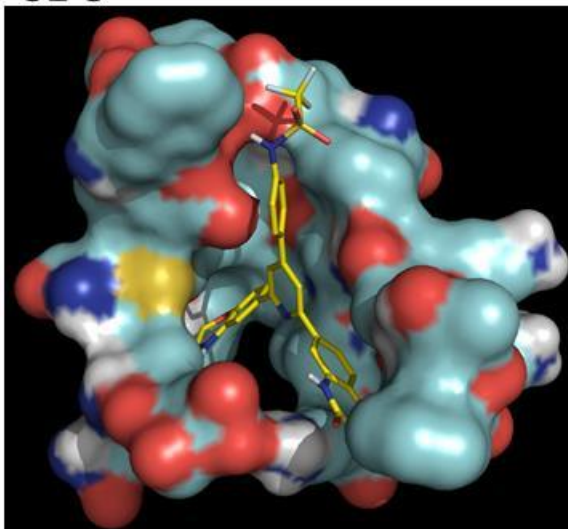


Figura 3. Modo de unión e interacciones que se obtuvieron del acoplamiento molecular para los compuestos S1-6 y S2-3 en AKT1.

AKT2

S1-5



S2-8

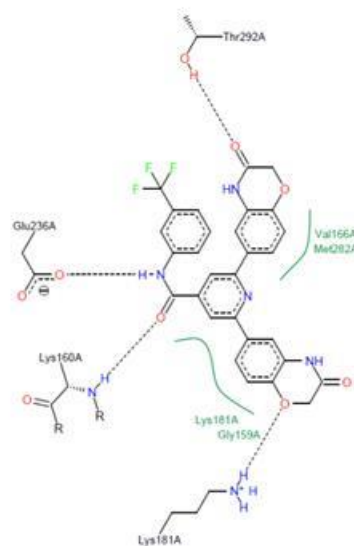
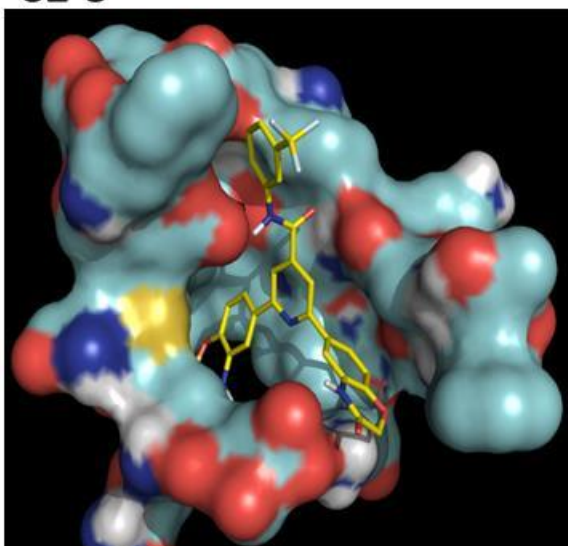
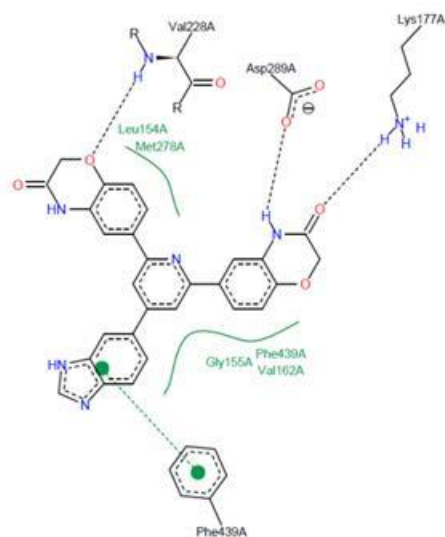
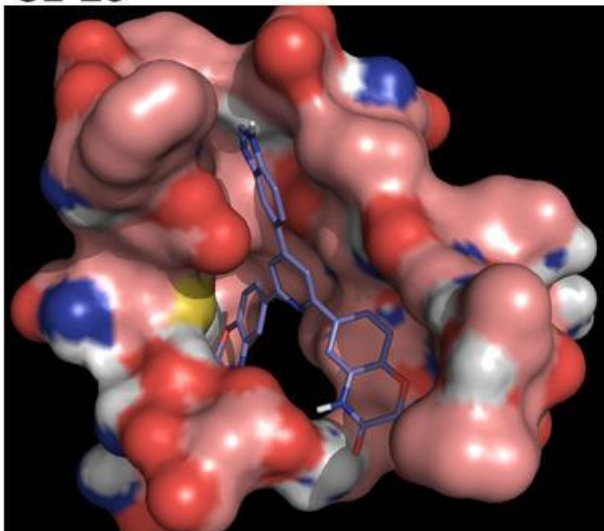


Figura 3 (continuación). Modo de unión e interacciones que se obtuvieron del acoplamiento molecular para los compuestos S1-5 y S2-8 en AKT2.

AKT3

S1-20



S2-13

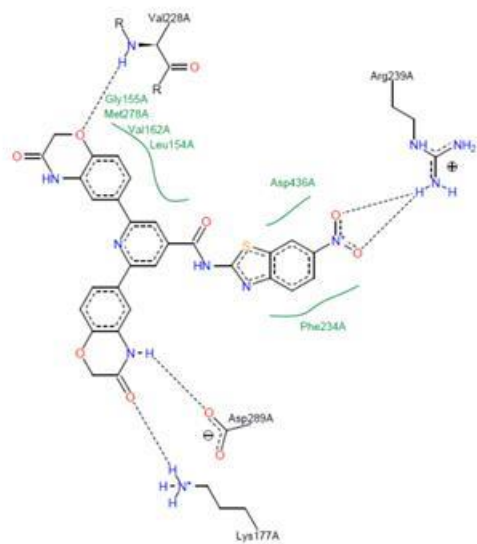
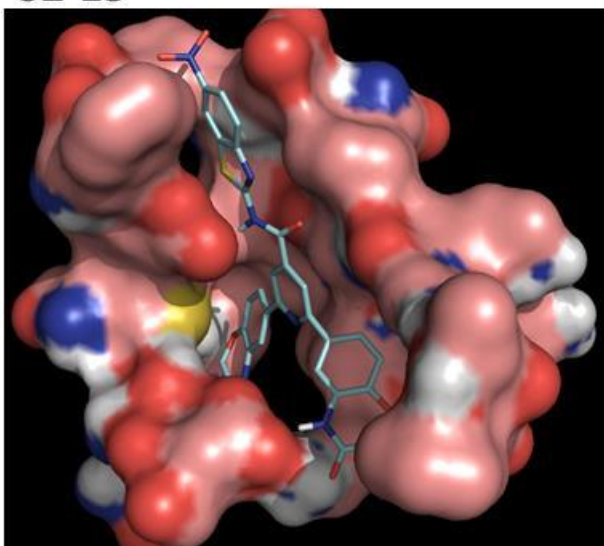


Figura 3 (continuación). Modo de unión e interacciones que se obtuvieron del acoplamiento molecular para los compuestos **S1-20** y **S2-13** en AKT3.

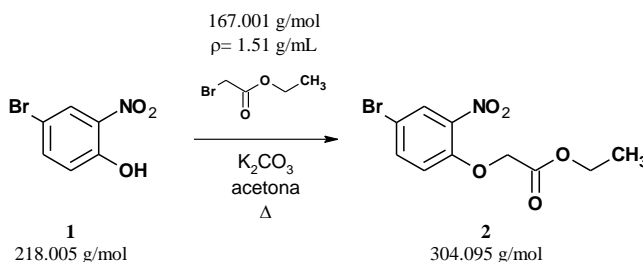
Anexo III

Procedimientos de síntesis y caracterización de los compuestos obtenidos

Procedimientos de síntesis

Síntesis del compuesto intermediario 6-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona (4)

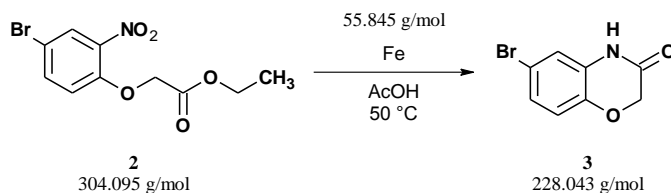
Síntesis de (4-bromo-2-nitrofenoxi)acetato de etilo (2)



En un matraz bola de una boca de 250 mL adaptado con agitación magnética, condensador en posición de reflujo y trampa para la humedad, se colocaron 11.53 g (0.0529 mol) de 4-bromo-2-nitrofenol (1), 10.97 g de carbonato de potasio (0.0794 mol, 1.5 eq) y 150 mL de acetona. La mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente por 15 min (formación de una suspensión naranja), luego se adicionó 8.77 mL (0.0794 mol, 1.5 eq) de α -bromoacetato de etilo y la mezcla se calentó a la temperatura de reflujo de la acetona por 6 h. Posteriormente, la acetona se retiró en el rotaevaporador y al sólido resultante se le adicionó agua fría. El producto sólido obtenido se separó por filtración al vacío, se lavó varias veces con agua y se dejó secar, obteniendo 16.08 g (rendimiento 99%) de un sólido amarillo puro.

P.f. 69.5-70.1 °C. RMN 1H (acetona- d_6 , 300 MHz): δ 1.234 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH_3); 4.203 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, $-CH_2-CH_3$); 4.986 (s, 2H, $-CH_2-CO$); 7.296 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, H-6); 7.774 (dd, $J_1 = 9.0$, $J_2 = 2.5$ Hz, 1H, H-5); 8.042 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, H-3). RMN ^{13}C (acetona- d_6 , 100 MHz): δ 24.42, 71.96, 76.75, 122.96, 128.19, 138.35, 147.22, 161.10, 178.32.

Síntesis de 6-bromo-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona (3)



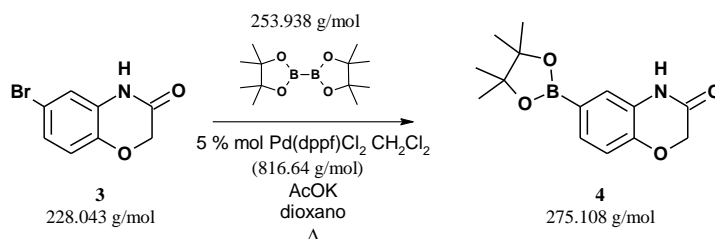
En vaso de precipitado de 250 mL adaptado con agitador mecánico, se colocaron 16 g de (4-bromo-2-nitrofenoxi)acetato de etilo (2) y 80 mL de ácido acético glacial (formación de una solución

café). Posteriormente, bajo agitación moderada a temperatura ambiente de adición 58.23 g de malla de hierro, luego la mezcla se calentó a 50-60°C (*CUIDADO: la reacción es exotérmica y puede proyectarse, por lo que se debe retirar del calor una vez que alcanza la temperatura indicada*) y después se dejó en agitación a temperatura ambiente por 8 h. Terminada la reacción, el exceso de hierro y sus sales se separaron por filtración y se lavaron múltiples veces con acetato de etilo. Del líquido filtrado se retiró el disolvente con rotaevaporador, al residuo resultante se le adicionó agua y el sólido formado se aisló por filtración, lavándolo sucesivas veces con agua y se dejó secar, obteniendo 6.3 g (rendimiento 52%) de un sólido beige puro.

P.f. 223.5-224.4 °C. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 4.578 (s, 2H, -CH₂-CO); 6.895 (d, *J*= 8.5 Hz, 1H, H-8); 7.002 (d, *J*= 2.3 Hz, 1H, H-5); 7.053 (dd, *J*₁= 8.5, *J*₂= 2.4 Hz, 1H, H-7). RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 67.42, 114.27, 118.84, 119.01, 126.44, 129.56, 143.40, 165.67.

Síntesis de 6-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona (4)

Borilación de Miyaura



En un matraz bola de dos bocas de 25 mL adaptado con agitación magnética, condensador en posición de reflujo y atmósfera de nitrógeno, se colocaron 0.5 g de (0.0022 mol) de 6-bromo-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona (**3**), 0.66 g (1.2 eq) de dipinacoldiborano, 0.65 g (5 eq) de acetato de sodio y 10 mL de dioxano anhidro. A la mezcla en agitación se le pasó un flujo de nitrógeno por 10 min, luego se adicionó 89 mg (5 % mol) de [1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio (II) en complejo con diclorometano y se dio flujo de nitrógeno nuevamente por 5 min, luego la mezcla en atmósfera de nitrógeno se calentó a 100 °C por 8 h. Al término de la reacción (suspensión negra) el disolvente se retiró con rotaevaporador, el residuo obtenido se resuspendió acetato de etilo y se filtró sobre alúmina para retirar los restos las sales. El producto obtenido se purificó por cromatografía en columna (hexano/AcOEt 1:1), obteniendo 0.425 g (rendimiento 73%) de un sólido blanco puro.

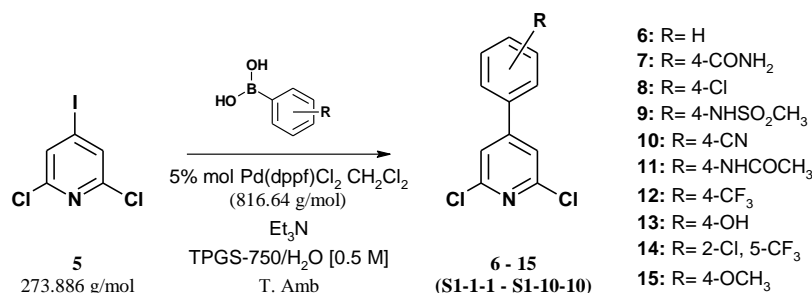
P.f. 195.1-196.0 °C. RMN ¹H (acetona-*d*₆, 300 MHz): δ 1.315 (s, 12H, -CH₃); 4.599 (s, 2H, -CH₂-CO); 6.932-6.960 (m, 1H, H-8); 7.331-7.360 (m, 1H, H-5, H-7); 9.564 (sa, 1H, NH). RMN ¹³C (DMSO-*d*₆,

100 MHz): δ 25.16, 67.88, 84.49, 116.69, 122.84, 131.06, 147.24, 165.16. EMAR (DART): calculado para $C_{14}H_{19}NO_4B$ 276.1407, encontrado 276.1401.

Síntesis de los compuestos de la Serie 1

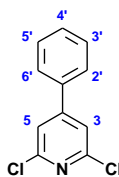
Método general de síntesis para la obtención de los intermediarios 6–15

Acoplamiento de Suzuki-Miyaura



En un vial de 2 mL adaptado con agitación magnética, tapón de hule y atmósfera de nitrógeno, se colocaron 137 mg (0.5 mmol) de 2,6-dicloro-4-yodopiridina, 1.2 eq de ácido arilborónico adecuadamente sustituido, 5% mol de Pd(dppf)Cl₂·CH₂Cl₂, 3 eq de trietilamina, 0.8 mL de solución TPGS-750 (2% wt) y 10% v/v de THF, posteriormente la mezcla en atmósfera de nitrógeno se agitó a temperatura ambiente por 24 h. Terminada la reacción, ésta se diluyó con acetato de etilo y se pasó a través de una cama de gel de sílice, posteriormente se lavó con acetato de etilo para recuperar el producto obtenido. El disolvente se retiró con rotaevaporador y los productos se purificaron por cromatografía en columna usando como eluyente mezcla hexano/éter (95:5), hexano/éter (80:20), hexano/éter (90:10), hexano/AcOEt (60:40) o hexano/EtOAc (90:10).

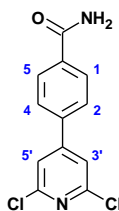
2,6-Dicloro-4-fenilpiridina (S1-1-1)



Purificado por cromatografía en columna (hexano/éter 95:5), sólido beige, rendimiento 73%, p.f. 51.4-52.6 °C. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 7.516-7.542 (m, 3H, H-3', H-4', H-5'); 7.879-7.903 (m, 2H, H-2', H-6'); 7.922 (s, 2H, H-3, H-5). RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 121.20, 127.86, 129.68,

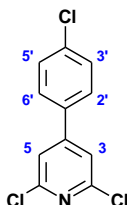
130.95, 132.09, 134.94, 149.71, 150.40, 154.01. EMAR (DART): calculado para $C_{11}H_8NCl_2$ 224.0034, encontrado 224.0034.

4-(2,6-Dicloropiridin-4-il)benzamida (S1-2-2)



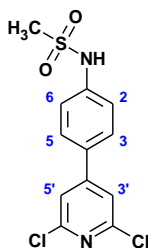
Purificado por cromatografía en columna (hexano/AcOEt 60:40), sólido blanco, rendimiento 42 %, p.f. 216.5-217.8 °C. RMN 1H (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 7.496 y 8.112 (sa, 2H, -NH $_2$); 7.990 (m, 2H, H-3', H-5'); 7.997 (d, J = 1.2 Hz, 4H, H-1, H-2, H-4, H-5). RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ 121.43, 127.84, 128.68, 136.13, 137.37, 150.48, 153.05, 167.40. EMAR (DART): calculado para $C_{12}H_9N_2OCl_2$ 267.0092, encontrado 267.0087.

2,6-Dicloro-4-(4-clorofenil)piridina (S1-3-3)



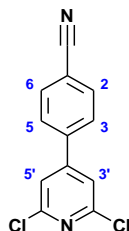
Purificado por cromatografía en columna (hexano/éter 90:10), sólido blanco, rendimiento 98 %, p.f. 150.9-152.5 °C. RMN 1H (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 7.588 (dd, J_1 = 8.8, J_2 = 2.4 Hz, 2H, H-3', H-5'); 7.922-7.944 (m, 4H, H-3, H-5, H-2', H-6'); 7.997 (d, J = 1.2 Hz, 4H, H-1, H-2, H-4, H-5). RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ 121.19, 129.64, 129.75, 133.77, 135.91, 150.46, 152.65. EMAR (DART): calculado para $C_{11}H_7NCl_3$ 257.9644, encontrado 257.9641.

N-[4-(2,6-dicloropiridin-4-il)fenil]metanosulfonamida (S1-4-4)



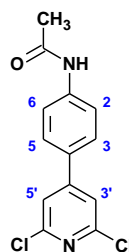
Purificado por cromatografía en columna (hexano/AcOEt 90:10), sólido beige, rendimiento 64 %, p.f. 181.1-182.0 °C. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 3.071 (s, 3H, -CH₃); 7.309 (d, *J*= 8.8, 2H, H-3, H-5); 7.880 (s, 2H, H-3', H-5'); 7.901 (d, *J*= 8.8 Hz, H-2, H-6); 10.144 (s, 1H, NH). RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 40.11, 119.28, 120.44, 129.04, 129.44, 141.19, 150.41, 153.22. EMAR (DART): calculado para C₁₂H₁₁N₂O₂SCl₂ 316.9918, encontrado 316.9916.

4-(2,6-Dicloropiridin-4-il)benzonitrilo (S1-5-5)



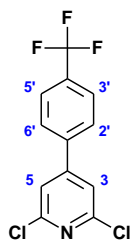
Purificado por cromatografía en columna (hexano/éter 90:10), sólido blanco, rendimiento 52 %, p.f. 220.6-221.6 °C. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 7.991-8.013 (m, 4H, H-2, H-6, H-3', H-5'); 8.074-8.105 (m, 2H, H-3, H-5). RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 113.28, 118.72, 121.79, 128.90, 133.44, 139.36, 150.53, 152.11. EMAR (DART): calculado para C₁₂H₇N₂Cl₂ 248.9986, encontrado 248.9983.

N-[4-(2,6-dicloropiridin-4-il)fenil]acetamida (S1-6-6)



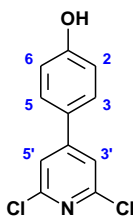
Purificado por cromatografía en columna (hexano/AcOEt 90:10), sólido blanco, rendimiento 86 %, p.f. 202.8-203.6 °C. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 7.716 (d, *J*= 8.8 Hz, 2H, H-2, H-6); 7.859-7.881 (m, 4H, H-3, H-5, H-3', H-5'); 10.199 (sa, 1H, NH). RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 24.56, 119.48, 120.29, 128.44, 128.88, 141.99, 150.41, 153.38, 169.18. EMAR (DART): calculado para C₁₃H₁₁N₂OCl₂ 281.0248, encontrado 281.0251.

2,6-Dicloro-4-[4-(trifluorometil)fenil]piridina (S1-7-7)



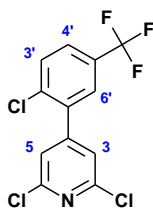
Purificado por cromatografía en columna (hexano/éter 95:5), sólido blanco, rendimiento 89 %, p.f. 109.8-110.5 °C. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 7.882 (d, *J*= 8.4 Hz, 2H, H-2', H-6'); 8.004 (s, 2H, H-3, H-5); 8.104 (d, *J*= 8.0 Hz, 2H, H-2, H-3', H-5'); 10.199 (sa, 1H, NH). RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 121.81, 124.35 (q, *J*_{C-F}= 271 Hz, -CF₃), 126.39, 126.43, 128.93, 130.78 (q, *J*_{C-C-F}= 32 Hz, -C-CF₃), 139.03, 150.50, 152.45. RMN ¹⁹F (DMSO-*d*₆, 376.5 MHz): δ -59.40. EMAR (DART): calculado para C₁₂H₇NCl₂F₃ 291.9908, encontrado 291.9910.

4-(2,6-Dicloropiridin-4-il)fenol (S1-8-8)



Purificado por cromatografía en columna (hexano/AcOEt 90:10), sólido blanco, rendimiento 92 %, p.f. 155.8-156.4 °C. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 6.868 (d, *J*= 8.4 Hz, 2H, H-2, H-6); 7.776 (d, *J*= 8.4 Hz, 2H, H-3, H-5); 7.820 (s, 2H, H-3', H-5'); 10.110 (sa, 1H, OH). RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 116.07, 119.48, 124.88, 129.05, 149.96, 153.44, 159.99.

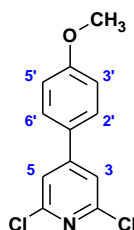
2,6-Dicloro-4-[2-cloro-5-(trifluorometil)fenil]piridina (S1-9-9)



Purificado por cromatografía en columna (hexano/éter 90:10), sólido blanco, rendimiento 88 %, p.f. 121.5-122.5 °C. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 7.793 (s, 2H, H-3, H-5); 7.883-7.888 (m, 2H, H-3',

H-4'); 7.947-7.955 (m, 1H, H-6'). RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ 111.91, 123.94 (q, $J_{\text{C-F}} = 271$ Hz, $-\text{CF}_3$), 124.59, 128.17, 128.21, 128.61, 128.65, 129.22, 131.88 (q, $J_{\text{C-C-F}} = 13$ Hz, $-\text{C-CF}_3$), 131.53, 132.10, 133.74, 136.39, 149.64, 149.72, 151.46. RMN ^{19}F (DMSO- d_6 , 376.5 MHz): δ -59.10. EMAR (DART): calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_6\text{NCl}_3\text{F}_3$ 325.9518, encontrado 325.9511.

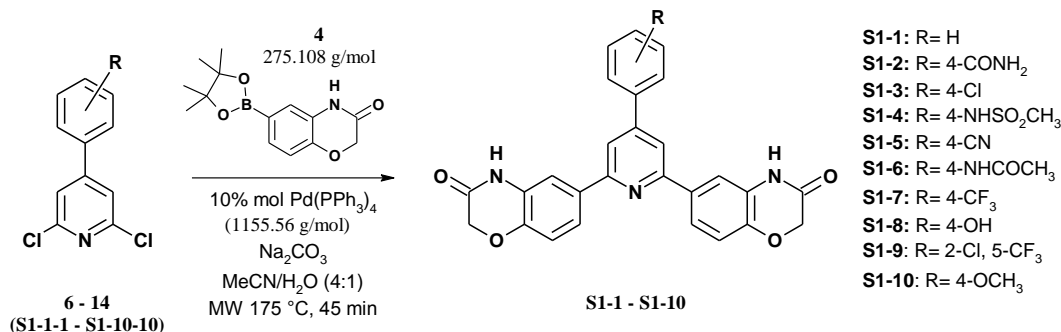
2,6-Dicloro-4-(4-metoxifenil)piridina (S1-10-10)



Purificado por cromatografía en columna (hexano/éter 90:10), sólido blanco, rendimiento 88 %, p.f. 79.9-80.7 °C. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 3.820 (s, 3H, O- CH_3); 7.036-7.074 (m, 2H, H-2', H-6'); 7.859 (s, 2H, H-3, H-5); 7.863-7.898 (m, 2H, H-3', H-5'). RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ 55.79, 115.02, 120.16, 126.68, 129.29, 150.32, 153.45, 161.63.

Método general de síntesis para la obtención de los compuestos finales S1-1–S1-9

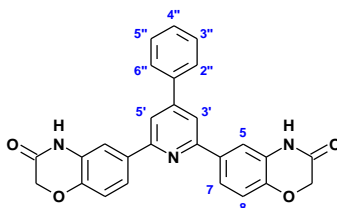
Doble acoplamiento de Suzuki-Miyaura



En un vial de microondas de 10 mL se colocó 0.1 g de 4-aryl-2,6-dicloropiridina, 2.1 eq de 6-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona (**4**), 5 eq de carbonato de potasio y 5 mL de mezcla MeCN/ H_2O (4:1) (recién preparada y desgasificada). A la mezcla en agitación se le paso un flujo de nitrógeno por 10 min, luego se adicionó 10% mol de (tetraquitrifenilfosfina)paladio (0) y se dio flujo de nitrógeno nuevamente por 5 min, posteriormente la reacción en atmósfera de nitrógeno se calentó por irradiación con microondas a 175 °C por 45 min

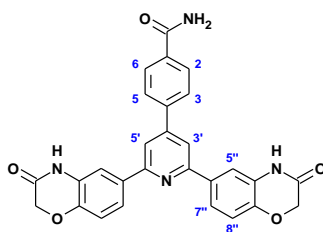
(rampa con calentamiento gradual por 5 min). Terminada la reacción, el sólido obtenido se aisló por filtración y se lavó con acetonitrilo frío. Los productos se purificaron por lavados de metanol, o bien disolviendo el producto en dimetilformamida y posterior filtración para eliminar restos de sales y catalizador.

6,6'-(4-Fenilpiridin-2,6-diil)bis(2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona) (S1-1)



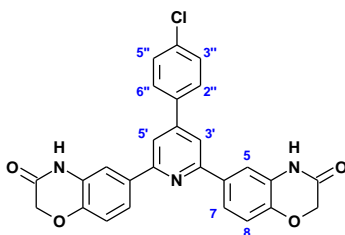
Rendimiento 77 %, p.f. 286 °C con descomposición. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 4.649 (s, 4H, -CH₂-); 7.086 (d, *J*= 8.3 Hz, 2H, H-8); 7.511-7.588 (m, 3H, H-3'', H-4'', H-5''); 7.833 (d, *J*= 1.9 Hz, 2H, H-5); 7.855 (dd, *J*₁= 8.3, *J*₂= 2.1 Hz, 2H, H-7); 7.942-7.966 (m, 2H, H-2'', H-6''); 7.976 (s, 2H, H-3', H-5'); 10.767 (sa, 2H, NH). RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 67.23, 114.91, 116.12, 116.62, 122.27, 127.56, 127.89, 129.50, 129.68, 133.64, 138.16, 144.72, 149.85, 156.26, 164.97. EM-AR (IE⁺): calculado para C₂₇H₁₉N₃O₄ 449.1376, encontrado 449.1387.

4-[2,6-Bis(3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-il]benzamida (S1-2)



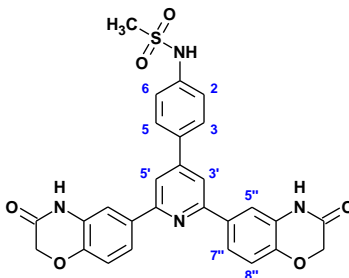
Rendimiento 44 %, p.f. 330.3 °C con descomposición. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 4.652 (s, 4H, -CH₂-); 7.091 (d, *J*= 8.3 Hz, 2H, H-8''); 7.473 (sa, 1H, NH₂); 7.846 (d, *J*= 2.0 Hz, 2H, H-5''); 7.872 (dd, *J*₁= 8.3, *J*₂= 2.1 Hz, 2H, H-7''); 8.037 (s, 2H, H-3', H-5'); 8.057 (s, 4H, H-2, H-3, H-5, H-6); 8.109 (sa, 1H, NH₂); 10.777 (sa, 2H, NH). RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 67.24, 114.95, 116.19, 116.62, 122.33, 127.47, 127.91, 128.59, 133.57, 135.12, 140.65, 144.77, 148.90, 156.36, 164.97, 167.66. EM-AR (IE⁺): calculado para C₂₇H₁₉N₃O₄ 492.1434, encontrado 492.1430.

6,6'-[4-(4-Clorofenil)piridin-2,6-diil]bis(2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona) (S1-3)



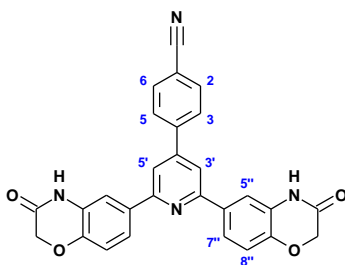
Rendimiento 78 %, p.f. 315.2 °C con descomposición. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 4.647 (s, 4H, -CH₂-); 7.083 (d, *J*= 8.3 Hz, 2H, H-8); 7.620 (d, *J*= 8.7 Hz, 2H, H-3'', H-5''); 7.829 (d, *J*= 1.8 Hz, 2H, H-5); 7.852 (dd, *J*₁= 8.3, *J*₂= 2.1 Hz, 2H, H-7); 7.984 (s, 2H, H-3', H-5'); 8.009 (d, *J*= 8.8 Hz, 2H, H-2'', H-6''); 10.775 (s, 2H, NH). RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 67.23, 114.93, 115.99, 116.61, 122.31, 127.90, 129.44, 133.55, 134.59, 136.94, 144.77, 148.49, 156.35, 164.96. EM-AR (IE⁺): calculado para C₂₇H₁₈N₃O₄Cl 483.0986, encontrado 483.0981.

N-{4-[2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-il]fenil}metanosulfonamida (S1-4)



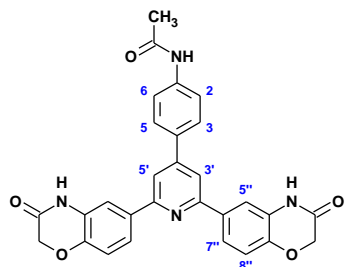
Rendimiento 46 %, p.f. 311.7 °C con descomposición. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 3.067 (s, 3H, -CH₃); 4.647 (s, 4H, -CH₂-); 7.086 (d, *J*= 8.0 Hz, 2H, H-8''); 7.368 (d, *J*= 8.8 Hz, 2H, H-2, H-6); 7.814-7.843 (m, 4H, H-5'', H-7''); 7.953 (d, *J*= 8.8 Hz, 2H, H-3, H-5); 7.946 (s, 2H, H-3', H-5'); 10.012 (sa, 1H, NH-SO₂); 10.773 (s, 2H, NH). RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 67.23, 114.91, 115.68, 116.61, 119.87, 122.24, 127.88, 133.11, 133.72, 139.98, 144.70, 149.12, 156.26, 162.66, 164.98. EM-AR (IE⁺): calculado para C₂₈H₂₂N₄O₆S 542.1260, encontrado 542.1262.

4-[2,6-Bis(3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-il]benzocitrilo (S1-5)



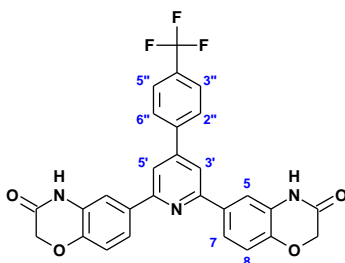
Rendimiento 63 %, p.f. 295.7 °C con descomposición. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 4.646 (s, 4H, - CH_2 -); 7.086 (d, $J= 8.0$ Hz, 2H, H-8''); 7.842-7.883 (m, 4H, H-2, H-5'', H-7''); 8.032 (d, $J= 8.8$ Hz, 2H, H-3, H-5); 8.052 (s, 2H, H-3', H-5'); 8.190 (d, $J= 8.8$ Hz, 2H, H-2, H-6); 10.901 (s, 2H, NH). RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ 67.23, 112.17, 115.04, 116.29, 116.58, 119.01, 122.29, 128.02, 128.64, 129.06, 129.10, 129.17, 129.35, 131.79, 131.89, 133.32, 133.37, 133.51, 133.70, 142.67, 144.85, 148.01, 156.44, 164.95. EM-AR (IE^+): calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_4$ 474.1328, encontrado 474.1322.

N-[4-[2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-il]fenil]acetamida (S1-6)



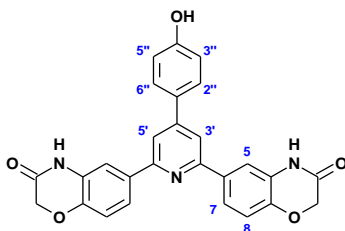
Rendimiento 61 %, p.f. 305 °C con descomposición. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 2.081 (s, 3H, - CH_3); 4.646 (s, 4H, - CH_2 -); 7.082 (d, $J= 8.0$ Hz, 2H, H-8''); 7.842-7.758 (d, $J= 8.8$ Hz, 2H, H-2, H-6); 7.819-7.850 (m, 4H, H-5'', H-7''); 7.926 (d, $J= 8.8$ Hz, 2H, H-3, H-5); 7.951 (s, 2H, H-3', H-5'); 10.136 (s, 1H, NH-COCH_3); 10.763 (s, 2H, NH). RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ 24.48, 67.23, 114.90, 115.50, 116.60, 119.58, 122.23, 127.87, 127.95, 132.28, 133.76, 140.86, 144.68, 149.24, 156.22, 164.98, 168.93. EM-AR (IE^+): calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_5$ 506.1590, encontrado 506.1599.

6,6'-[4-[4-(Trifluorometil)fenil]piridin-2,6-diil]bis(2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona) (S1-7)



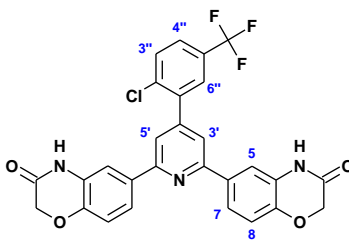
Rendimiento 82 %, p.f. 294.9 °C con descomposición. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 4.652 (s, 4H, $-\underline{\text{CH}}_2-$); 7.094 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H-8); 7.838 (d, $J = 2.0$ Hz, 2H, H-5); 7.863 (dd, $J_1 = 8.3$, $J_2 = 2.1$ Hz, 2H, H-7); 7.917 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H-2'', H-6''); 8.042 (s, 2H, H-3', H-5'); 8.190 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H-3'', H-5''); 10.784 (s, 2H, NH). RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ 67.23, 114.95, 116.43, 116.64, 122.35, 127.25 (d, $J_{\text{C-F}} = 266$ Hz, $-\underline{\text{CF}}_3$), 126.25, 126.29, 127.93, 128.58, 129.82 (d, $J_{\text{C-F}} = 32$ Hz, $-\underline{\text{C}}-\text{CF}_3$), 133.46, 142.25, 144.83, 148.36, 156.46, 164.96. EM-AR (IE^+): calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_4\text{F}_3$ 517.1249, encontrado 517.1264.

6,6'-[4-(4-Hidroxifenil)piridin-2,6-diil]bis(2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona) (S1-8)



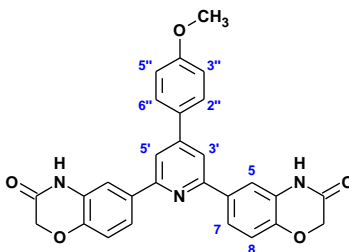
Rendimiento 41 %, p.f. 311.1 °C con descomposición. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 4.644 (s, 4H, $-\underline{\text{CH}}_2-$); 6.927 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H-3'', H-5''); 7.076 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-8); 7.803-7.841 (m, 6H, H-5, H-7, H-2'', H-6''); 7.895 (s, 2H, H-3', H-5'); 9.838 (s, 1H, $-\underline{\text{OH}}$); 10.752 (s, 2H, NH). RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ 67.23, 114.87, 115.23, 116.27, 116.58, 122.19, 127.85, 128.56, 128.82, 133.85, 144.62, 149.63, 156.10, 159.16, 164.98. EM-AR (IE^+): calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_5$ 465.1325, encontrado 465.1341.

6,6'-[4-[2-Cloro-5-(trifluorometil)fenil]piridin-2,6-diil]bis(2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona) (S1-9)



Rendimiento 51 %, p.f. 299.6 °C con descomposición. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 4.648 (s, 4H, $-\text{CH}_2-$); 7.077 (d, $J= 8.4$ Hz, 2H, H-8); 7.783-7.809 (m, 4H, H-5, H-7); 7.836 (s, 2H, H-3', H-5'); 7.836-7.925 (m, 2H, H-3'', H-4''); 8.025 (d, $J= 1.6$ Hz, 1H, H-6''); 10.796 (s, 2H, NH). RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ 67.21, 114.82, 116.70, 118.80, 122.24, 127.96, 127.92 (q, $J_{\text{C-F}} = 205$ Hz, $-\text{CF}_3$), 131.55, 133.21, 136.07, 139.10, 144.84, 147.27, 155.73, 164.93. EM-AR (DART): calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_4\text{F}_3\text{Cl}$ 552.0938, encontrado 552.0928.

6,6'-[4-(4-Metoxifenil)piridin-2,6-diil]bis(2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona) (S1-10)



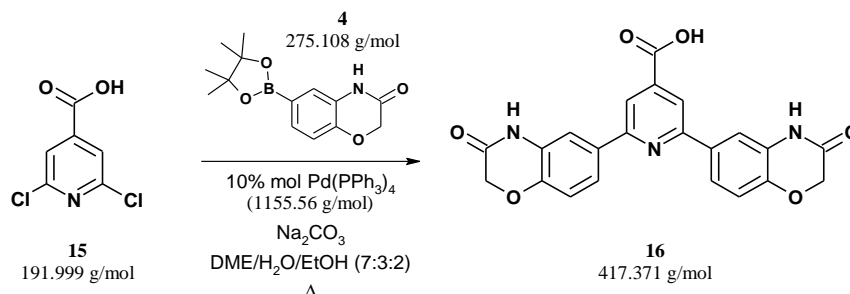
Rendimiento 31 %. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 3.836 (s, 3H, O-CH_3); 4.644 (s, 4H, $-\text{CH}_2-$); 7.064 (d, $J= 8.8$ Hz, 2H, H-8); 7.102 (d, $J= 8.8$ Hz, 2H, H-3'', H-5''); 7.825-7.847 (m, 4H, H-5, H-7); 7.922 (m, 4H, H-3', H-5', H-2'', H-6''); 10.782 (sa, int. D_2O , 2H, NH). RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ 55.75, 67.26, 114.93, 114.95, 115.50, 116.52, 122.26, 127.90, 128.90, 130.24, 133.79, 144.68, 149.35, 156.16, 160.74, 165.03.

Síntesis de los compuestos de la Serie 2

Síntesis del ácido 2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxílico (**16**)

(Ruta A)

Doble acoplamiento de Suzuki-Miyaura

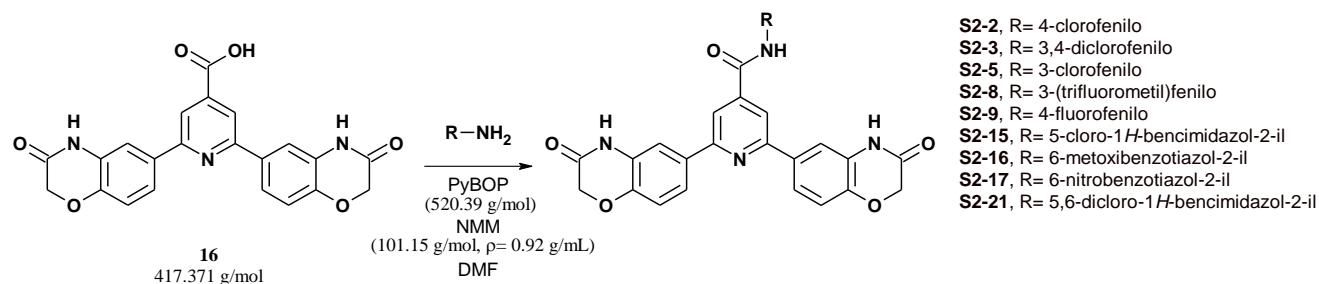


En un matraz bola de dos bocas de 25 mL adaptado con agitación magnética, condensador en posición de reflujo y atmósfera de nitrógeno, se colocaron 0.1 g (0.001095 mol) de ácido 2,6-dicloropiridin-4-carboxílico, 2.1 eq de 6-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona (**4**), 3 eq de carbonato de sodio y 10 mL de mezcla DME/H₂O/EtOH (7:3:2) (recién preparada y desgasificada). A la mezcla en agitación se le paso un flujo de nitrógeno por 10 min, luego se adicionó 10% mol de (tetraquistrifenilfosfina)paladio (0) y se dio flujo de nitrógeno nuevamente por 5 min, posteriormente la reacción en atmósfera de nitrógeno se calentó a temperatura de reflujo de la mezcla por 24 h. Pasado este tiempo, a la reacción se le adicionó 5 mL de agua fría y se agitó por 10 min, el sólido formado se aisló por filtración, se lavó primeramente con acetato de etilo (retirar restos de catalizador y del éster borónico **4**) y finalmente con agua fría, obteniendo 0.173 g (rendimiento de 83%) de un sólido amarillo claro.

Purificado por lavados de MeOH. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 4.633 (s, 4H, -CH₂-); 7.053 (d, *J*=8.1 Hz, 2H, H-8'); 7.742-7.777 (m, 4H, H-5', H-7'); 8.063 (s, 2H, H-3, H-5); 10.909 (sa, int. D₂O, 1H, COOH). RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 67.18, 114.49, 117.04, 117.94, 121.80, 122.25, 128.16, 130.90, 132.68, 143.65, 145.45, 151.23, 156.41, 157.44, 164.81, 165.37.

Método general de síntesis para la obtención de los compuestos finales **S2-1–S2-21**

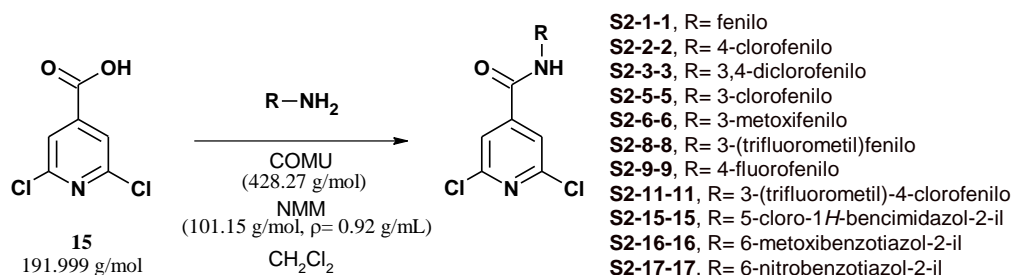
(Ruta A)



En un matraz bola de una boca de 20 mL adaptado con agitador magnético, columna Vigreux y trampa anhidra, se mezclaron 0.3 g de ácido 2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxílico (**16**), 0.45 g (1.2 eq) de PyBOP, 0.12 mL (1.5 eq) de NMM y 10 mL de dimetilformadida anhidra. La mezcla se agitó a temperatura ambiente por 10 min, luego se adicionó 0.95 eq de la correspondiente arilamina y se dejó en agitación cubierta de la luz a temperatura ambiente por un periodo de 24 a 48 h. Pasado este tiempo, el sólido formado (correspondiente al producto) se aisló por filtración, se lavó con acetato de etilo y luego con agua. Las reacciones que no mostraron sólido, primeramente el disolvente se retiró con rotaevaporador, al residuo se agregó agua y el sólido formado se aisló por filtración. Debido a la insolubilidad de los productos, éstos se purificaron por lavados de MeOH/DMF (4:1).

Método general de síntesis para la obtención de los intermediarios **S2-1-1–S2-21-21**

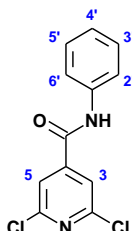
(Ruta B)



En un matraz bola de una boca de 25 mL adaptado con agitador magnético, columna Vigreux y trampa anhidra, se mezclaron 0.3 g de ácido 2,6-dicloropiridin-4-carboxílico, 1.2 eq de COMU, 2 eq de NMM y 10 mL de diclorometano anhidro. La mezcla se agitó a temperatura ambiente por 10 min, luego se adicionó 0.95 eq de la correspondiente arilamina y se dejó en agitación cubierta de la luz a temperatura ambiente por 12 h. Al término de la reacción se agregó 10 mL de diclorometano, la fase

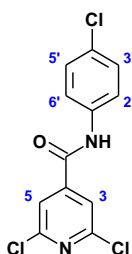
orgánica se lavó con salmuera (4 veces), posteriormente con agua, y finalmente se secó con sulfato de sodio. Los productos se purificaron por cromatografía en columna usando mezcla $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (90:10) como eluyente.

2,6-Dicloro-*N*-fenilpiridin-4-carboxamida (S2-1-1)



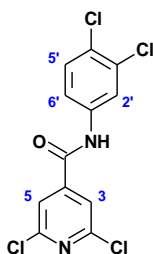
Rendimiento 93 %, p.f. 165.7-170 °C. RMN ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz): δ 7.155 (t, $J= 7.2$ Hz, 1H, H-4'); 7.383 (td, $J_1= 7.6$, $J_2= 1.6$ Hz, 2H, H-3', H-5'); 7.734 (dd, $J_1= 7.6$, $J_2= 1.2$ Hz, 2H, H-2', H-6'); 8.004 (s, 2H, H-3, H-5); 10.591 (sa, 1H, NH). RMN ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz): δ 120.82, 122.31, 124.99, 138.57, 148.67, 150.20, 161.60. EMAR (DART): calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{N}_2\text{OCl}_2$ 267.0092, encontrado 267.0091.

2,6-Dicloro-*N*-(4-clorofenil)piridin-4-carboxamida (S2-2-2)



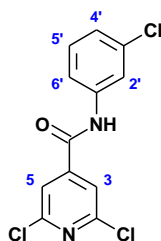
Rendimiento 70 %, p.f. 181.5-183.4 °C. RMN ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz): δ 7.446 (dd, $J_1= 8.8$, $J_2= 2$ Hz, 2H, H-3', H-5'); 7.767 (dd, $J_1= 9.0$, $J_2= 2.4$ Hz, 2H, H-2', H-6'); 7.996 (s, 2H, H-3, H-5); 10.708 (sa, 1H, NH). RMN ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz): δ 122.31, 122.37, 128.63, 129.18, 137.55, 148.41, 150.22, 161.73. EMAR (DART): encontrado para $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2\text{OCl}_3$ 300.9702, encontrado 300.9699.

2,6-Dicloro-*N*-(3,4-diclorofenil)piridin-4-carboxamida (S2-3-3)



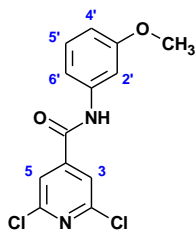
Rendimiento 62 %, p.f. 213.4-214.2 °C. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 7.638-7.711 (m, 2H, H-5', H-6'); 7.992 (s, 2H, H-3, H-5); 8.077 (d, $J= 2.4$ Hz, 1H, H-2'); 10.821 (sa, 1H, NH). RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ 114.42, 114.85, 120.80, 122.00, 122.31, 126.53, 130.88, 131.24, 131.43, 138.67, 148.02, 149.54, 150.27, 161.96.

2,6-Dicloro-*N*-(3-clorofenil)piridin-4-carboxamida (S2-5-5)



Rendimiento 76 %, p.f. 187.9-189.1 °C. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 7.221 (ddd, $J_1= 8.0$, $J_2= 2.1$, $J_3= 1.0$ Hz, 1H, H-4'); 7.416 (t, $J= 8.1$ Hz, 1H, H-5'); 7.654 (ddd, $J_1= 8.3$, $J_2= 1.9$, $J_3= 0.9$ Hz, 1H, H-6'); 7.900 (t, $J= 2.0$ Hz, 1H, H-2'); 7.996 (s, 2H, H-3, H-5); 10.732 (sa, 1H, NH). RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ 119.18, 120.26, 122.32, 124.70, 130.98, 133.46, 140.01, 148.26, 150.24, 161.90. EMAR (DART): calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2\text{OCl}_3$ 300.9702, encontrado 300.9701.

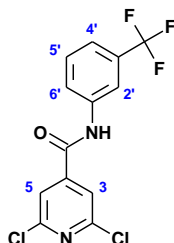
2,6-Dicloro-*N*-(3-metoxifenil)piridin-4-carboxamida (S2-6-6)



Rendimiento 37 %, p.f. 155.3-156.4 °C. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 3.750 (s, 3H, -CH₃); 6.739 (ddd, $J_1= 7.9$, $J_2= 2.5$, $J_3= 1.3$ Hz, 1H, H-4'); 7.280 (t, $J= 7.9$ Hz, 1H, H-5'); 7.300-7.340 (m, 1H, H-

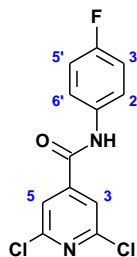
6'); 7.397 (t, $J = 2.0$ Hz, 1H, H-2'); 7.995 (s, 2H, H-3, H-5); 10.556 (sa, 1H, NH). RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ 55.48, 106.53, 110.46, 113.01, 122.29, 130.05, 139.73, 148.61, 150.20, 159.84, 161.61, 164.15. EMAR (DART): calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_2\text{Cl}_2$ 297.0198, encontrado 297.0203.

2,6-Dicloro-*N*-[3-(trifluorometil)fenil]piridin-4-carboxamida (S2-8-8)



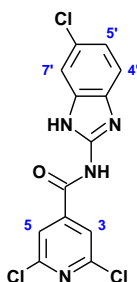
Rendimiento 68 %, p.f. 162.8-163.6 °C. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 7.507-7.533 (m, 1H, H-4'); 7.638 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-5'); 7.992-8.018 (m, 1H, H-6'); 8.025 (s, 2H, H-3, H-5); 8.174 (sa, 1H, H-2'); 10.872 (sa, 1H, NH). RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ 116.90, 116.94, 121.30, 121.34, 122.34, 124.34, 124.42 (q, $J_{\text{C-F}} = 270$ Hz, $-\underline{\text{C}}\text{F}_3$), 129.87 (q, $J_{\text{C-C-F}} = 32$ Hz, $-\underline{\text{C}}\text{-CF}_3$), 130.58, 139.37, 148.17, 150.27, 162.06. RMN ^{19}F (DMSO- d_6 , 376.5 MHz): δ -59.44. EMAR (DART): calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{N}_2\text{OCl}_2\text{F}_3$ 334.9966, encontrado 334.9959.

2,6-Dicloro-*N*-(4-fluorofenil)piridin-4-carboxamida (S2-9-9)



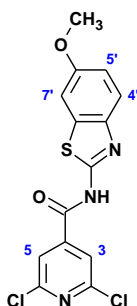
Rendimiento 58 %, p.f. 229.4-230.5 °C. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 7.203-7.248 (m, 1H, H-3', H-5'); 7.733-7.769 (m, 2H, H-2', H-6'); 7.994 (s, 2H, H-3, H-5); 10.647 (sa, 1H, NH). RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ 115.88 (d, $J_{\text{C-C-F}} = 22$ Hz, $-\underline{\text{C}}3'\underline{\text{C}}5'\text{-CF}$), 122.28, 122.75 (d, $J_{\text{C-C-F}} = 8$ Hz, $-\underline{\text{C}}2'\underline{\text{C}}6'\text{-CF}$), 134.91, 134.94, 148.50, 150.22, 159.13 (d, $J_{\text{C-F}} = 240$ Hz, $-\underline{\text{C}}\text{-F}$), 161.51. RMN ^{19}F (DMSO- d_6 , 376.5 MHz): δ -115.69. EMAR (DART): calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2\text{OCl}_2\text{F}$ 284.9998, encontrado 284.9998.

2,6-Dicloro-N-(6-cloro-1H-benzimidazol-2-il)piridin-4-carboxamida (S2-15-15)



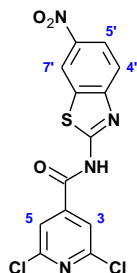
Rendimiento 26 %, p.f. 264.1-265.8 °C. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 7.240 (dd, *J*₁= 8.5, *J*₂= 2.1 Hz, 1H, H-5'); 7.438 (dd, *J*₁= 8.8, *J*₂= 0.4 Hz, 2H, H-4'); 7.476 (dd, *J*₁= 2.0, *J*₂= 0.4 Hz, 1H, H-6'); 8.004 (s, 2H, H-3, H-5); 12.747 (sa, 2H, NH). RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 112.52, 113.96, 122.64, 123.19, 127.23, 127.37, 130.04, 132.16, 150.12, 150.96, 152.48, 167.78. EMAR (DART): C₁₃H₈N₄OCl₃ 340.9764, encontrado 340.9764.

2,6-Dicloro-N-(6-metoxi-1,3-benzotiazol-2-il)piridin-4-carboxamida (S2-16-16)



Rendimiento 73 %, p.f. 242.7-243.9 °C. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 3.810 (s, 3H, -CH₃); 7.067 (d, *J*= 7.0 Hz, 1H, H-4'); 7.596 (s, 1H, H-5'); 7.657 (d, *J*= 8.5 Hz, 1H, H-7'); 8.104 (s, 2H, H-3, H-5); 13.238 (sa, 1H, NH). RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 56.05, 115.82, 122.60, 150.28, 156.90. EMAR (DART): calculado para C₁₄H₁₀N₃O₂SCl₂ 353.9871, encontrado 353.9867.

2,6-Dicloro-N-(6-nitro-1,3-benzotiazol-2-il)piridin-4-carboxamida (S2-17-17)

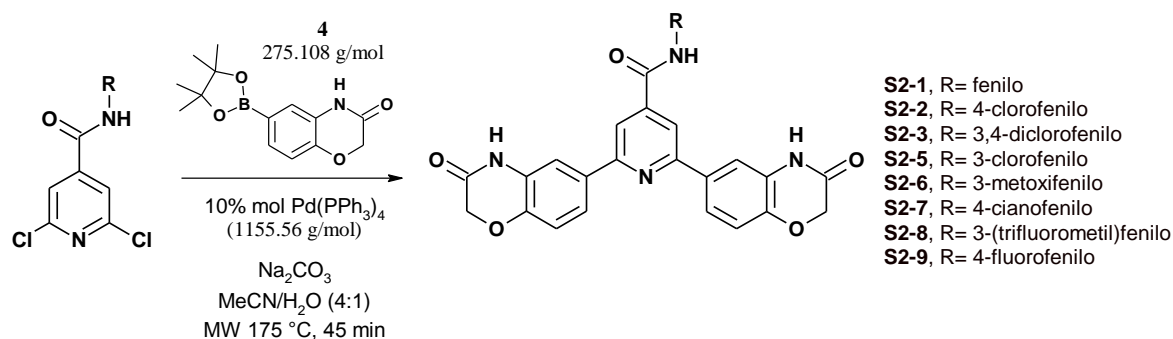


Rendimiento 83 %, p.f. 329.1-330.6 °C. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 7.928-7.950 (m, 1H, H-4'); 8.146 (s, 2H, H-3, H-5); 8.310 (dd, *J*₁= 8.9, *J*₂= 2.2 Hz, 1H, H-5'); 9.094 (d, *J*= 2.0 Hz, 1H, H-7'); 13.656 (sa, 2H, NH). RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 119.72, 120.81, 122.42, 122.79, 132.41, 143.69, 146.01, 150.35, 162.70. EMAR (DART): calculado para C₁₃H₇N₄O₃SCl₂ 368.9616, encontrado 368.9618.

Método general de síntesis para la obtención de los compuestos finales **S2-1–S2-11**

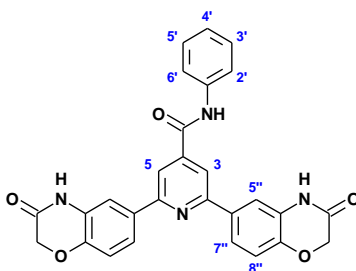
(Ruta B)

Doble acoplamiento de Suzuki-Miyaura



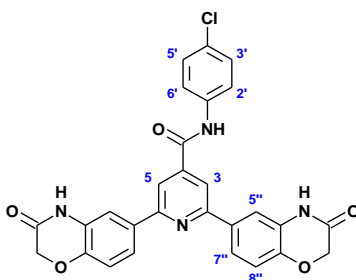
En un vial de microondas de 10 mL se colocó 0.1 g del intermediario **S2-1-1–S2-21-21**, 2.1 eq de 6-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-ona (**4**), 5 eq de carbonato de potasio y 5 mL de mezcla MeCN/H₂O (4:1) (recién preparada y desgasificada). A la mezcla en agitación se le paso un flujo de nitrógeno por 10 min, luego se adicionó 10% mol de (tetraquitrifenilfosfina)paladio (0) y se dio flujo de nitrógeno nuevamente por 5 min, posteriormente la reacción en atmósfera de nitrógeno se calentó por irradiación con microondas a 175 °C por 45 min (rampa con calentamiento gradual por 5 min). Terminada la reacción, el sólido obtenido se aisló por filtración y se lavó con acetonitrilo frío. Los productos se purificaron por lavados de metanol, o bien disolviendo el producto en dimetilformamida y posterior filtración para eliminar restos de sales y catalizador.

2,6-Bis(3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-6-il)-N-fenilpiridin-4-carboxamida (S2-1)



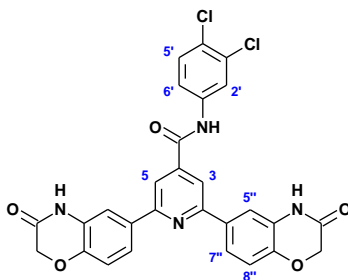
Rendimiento 49 %, p.f. 334.4 °C con descomposición. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 4.662 (s, 4H, -CH₂-); 7.119 (d, *J*= 8.4 Hz, 2H, H-8''); 7.129-7.181 (m, 1H, H-4'); 7.404 (td, *J*₁= 8.4 Hz, *J*₂= 1.6 Hz, 2H, H-3', H-5'); 7.798 (dd, *J*₁= 8.7, *J*₂= 1.1 Hz, 2H, H-2', H-5''); 7.821-7.854 (m, 4H, H-5'', H-7''); 8.158 (s, 2H, H-3, H-5); 10.603 (s, 1H, NH-Ar); 10.818 (s, 2H, NH). RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 67.22, 114.71, 116.09, 116.81, 120.97, 122.22, 124.66, 128.04, 129.15, 132.99, 138.96, 144.71, 144.97, 155.79, 156.16, 162.67, 164.46, 164.94. EM-AR (IE⁺): calculado para C₂₈H₂₀N₄O₅ 492.1434, encontrado 492.1438.

N-(4-clorofenil)-2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (S2-2)



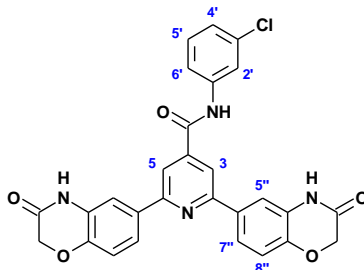
Rendimiento 58 %, p.f. 295.5 °C con descomposición. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 4.661 (s, 4H, -CH₂-); 7.117 (dd, *J*₁= 8.0, *J*₂= 0.7 Hz, 2H, H-8''); 7.467 (d, *J*= 9.0 Hz, 2H, H-3', H-5'); 7.821-7.846 (m, 6H, H-2', H-6', H-5'', H-7''); 8.144 (s, 2H, H-3, H-5); 10.731 (sa, 1H, NH-Ar); 10.811 (sa, 2H, NH). RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 67.22, 114.70, 116.06, 116.81, 122.20, 122.46, 128.04, 128.28, 129.09, 132.93, 137.96, 144.48, 144.99, 156.18, 164.61, 164.93. EM-AR (IE⁺): calculado para C₂₈H₁₉N₄O₅Cl 526.1044, encontrado 526.1041.

***N*-(3,4-diclorofenil)-2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (S2-3)**



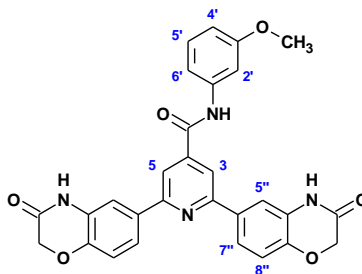
Rendimiento 35 %, p.f. 323.7 °C con descomposición. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 4.659 (s, 4H, -CH₂-); 7.112 (d, *J*= 8.8 Hz, 2H, H-8''); 7.653 (d, *J*= 8.8 Hz, 1H, H-5'); 7.775 (dd, *J*₁= 8.8, *J*₂= 2.4 Hz, 1H, H-6'); 7.810-7.837 (m, 4H, H-5'', H-7''); 8.160 (s, 2H, H-3, H-5); 8.160 (s, 1H, H-2'); 10.848 (sa, 3H, NH-Ar, NH). RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 67.21, 114.71, 116.06, 116.79, 120.98, 122.15, 122.20, 125.84, 128.08, 129.10, 129.17, 129.35, 131.06, 131.31, 132.91, 133.51, 133.70, 144.46, 144.48, 156.16, 164.92. EM-AR (IE⁺): calculado para C₂₈H₁₈N₄O₅Cl₂ 560.0654, encontrado 560.0639.

***N*-(3-clorofenil)-2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (S2-5)**



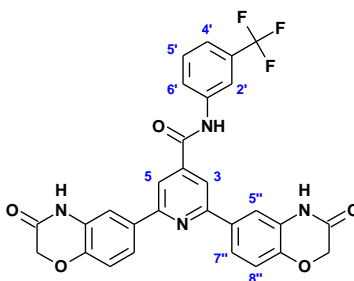
Rendimiento 62 %, p.f. 317.8 °C con descomposición. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 4.663 (s, 4H, -CH₂-); 7.119 (d, *J*= 8.0 Hz, 2H, H-8''); 7.224 (ddd, *J*₁= 8.8, *J*₂= 2.1, *J*₃= 0.9 Hz, 1H, H-4'); 7.438 (t, *J*= 8.1 Hz, 1H, H-5'); 7.741 (ddd, *J*₁= 8.3, *J*₂= 1.9, *J*₃= 0.9 Hz, 1H, H-6'); 7.818-7.847 (m, 4H, H-5'', H-7''); 7.970 (t, *J*= 2.0 Hz, 1H, H-2'); 8.148 (s, 2H, H-3, H-5); 10.745 (s, 1H, NH-Ar); 10.822 (s, 2H, NH). RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 67.22, 114.70, 116.06, 116.81, 119.22, 120.35, 122.21, 124.35, 128.05, 130.89, 132.91, 140.45, 144.34, 145.00, 156.21, 164.77, 164.93. EM-AR (IE⁺): calculado para C₂₈H₁₉N₄O₅Cl 526.1044, encontrado 526.1051.

N-[3-(metiloxi)fenil]-2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (S2-6)



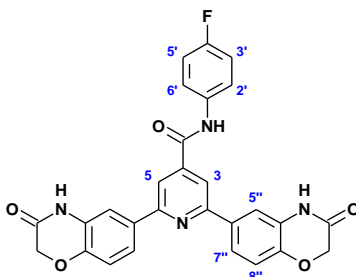
Rendimiento 26 %, p.f. 310.8 °C con descomposición. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 3.772 (s, 3H, O- $\underline{\text{CH}}_3$); 4.662 (s, 4H, - $\underline{\text{CH}}_2$ -); 6.743 (ddd, $J_1=8.2$, $J_2=2.5$, $J_3=0.9$ Hz, 1H, H-4'); 7.117 (d, $J=8.7$ Hz, 2H, H-8''); 7.302 (t, $J=8.1$ Hz, 1H, H-5'); 7.393 (ddd, $J_1=8.1$, $J_2=1.8$, $J_3=0.9$ Hz, 1H, H-6'); 7.479 (t, $J=2.2$ Hz, 1H, H-2'); 7.828-7.853 (m, 4H, H-5'', H-7''); 8.152 (s, 2H, H-3, H-5); 10.588 (s, 1H, $\underline{\text{NH}}$ -Ar); 10.830 (s, 2H, $\underline{\text{NH}}$). RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ 55.46, 67.22, 106.66, 110.14, 113.14, 114.71, 116.06, 116.80, 122.20, 128.04, 129.94, 132.97, 140.15, 144.66, 144.97, 156.15, 159.86, 164.48, 164.93. EM-AR (IE^+): calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_6$ 522.1539, encontrado 522.1530.

2,6-Bis(3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-6-il)-N-[3-(trifluorometil)fenil]piridin-4-carboxamida (S2-8)



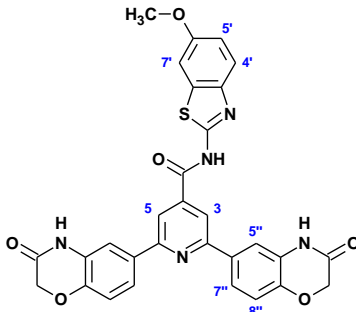
Rendimiento 32 %, p.f. 322.8 °C con descomposición. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 4.663 (s, 4H, - $\underline{\text{CH}}_2$ -); 7.121 (d, $J=8.9$ Hz, 2H, H-8''); 7.517 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, H-4'); 7.656 (t, $J=8.0$ Hz, 1H, H-5'); 7.822-7.850 (m, 4H, H-5'', H-7''); 8.103 (d, $J=8.7$ Hz, 1H, H-6'); 8.181 (s, 2H, H-3, H-5); 8.239 (s, 1H, H-2'); 10.861 (s, 3H, $\underline{\text{NH}}$ -Ar, $\underline{\text{NH}}$). RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ 67.22, 114.72, 116.07, 116.81, 120.92, 120.96, 122.20, 124.39, 124.48 (q, $J_{\text{C-F}}=270$ Hz, - $\underline{\text{C}}\text{F}_3$), 128.07, 129.85 (d, $J_{\text{C-C-F}}=71$ Hz, - $\underline{\text{C}}\text{-CF}_3$), 130.46, 132.90, 139.81, 144.23, 145.01, 156.24, 164.93. EM-AR (IE^+): calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_5\text{F}_3$ 560.1308, encontrado 560.1300.

***N*-(4-fluorofenil)-2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (S2-9)**



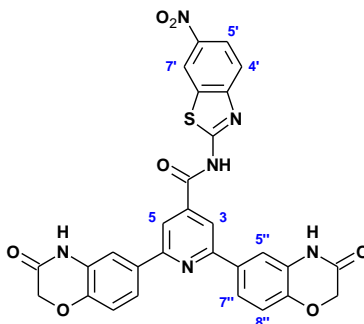
Rendimiento 26 %, p.f. ND. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 4.661 (s, 4H, $-\underline{\text{CH}}_2-$); 7.118 (d, $J= 8.1$ Hz, 2H, H-8''); 7.249 (t, $J= 8.9$ Hz, 2H, H-3', H-5'); 7.794-7.847 (m, 6H, H-2', H-6', H-5'', H-7''); 8.150 (s, 2H, H-3, H-5); 10.657 (s, 1H, $\underline{\text{NH}}$ -Ar); 10.816 (s, 2H, $\underline{\text{NH}}$). RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ 67.22, 114.70, 115.79 (d, $J_{\text{C-C-F}} = 23$ Hz, $-\underline{\text{C}}3'\underline{\text{C}}5'-\text{CF}$), 116.05, 116.81, 120.20, 122.85 (d, $J_{\text{C-C-F}} = 7$ Hz, $-\underline{\text{C}}2'\underline{\text{C}}6'-\text{CF}$), 128.04, 132.96, 135.30, 135.33, 144.57, 144.98, 156.18, 158.99 (d, $J_{\text{C-F}} = 240$ Hz, $-\underline{\text{C}}-\text{F}$), 164.40, 164.94. EM-AR (IE^+): calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_5\text{F}$ 510.1339, encontrado 510.1326.

***N*-[6-(metiloxi)-1,3-benzotiazol-2-il]-2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (S2-16)**



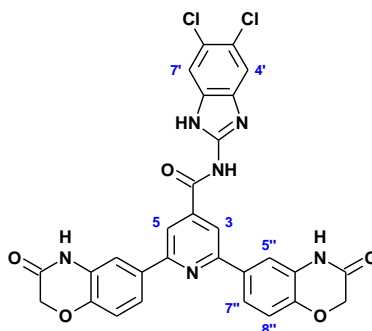
Rendimiento 80 %, p.f. 316.8 °C con descomposición. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 3.827 (s, 3H, $\text{O}-\underline{\text{CH}}_3$); 4.664 (s, 4H, $-\underline{\text{CH}}_2-$); 7.084 (d, $J= 9.0$ Hz, 1H, H-5'); 7.119 (d, $J= 8.3$ Hz, 2H, H-8''); 7.635 (s, 1H, H-7'); 7.705 (d, $J= 8.7$ Hz, 1H, H-5'); 7.834-7.939 (m, 4H, H-5'', H-7''); 8.355 (s, 2H, H-3, H-5); 10.828 (s, 2H, $\underline{\text{NH}}$); 13.182 (sa, 1H, $\underline{\text{NH}}$ -Ar). RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ 56.05, 67.22, 105.14, 114.73, 115.63, 116.81, 121.49, 122.26, 128.04, 132.89, 141.84, 145.06, 156.39, 156.80, 157.79, 162.67, 164.95. EM-AR (IE^+): calculado para $\text{C}_{30}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_6\text{S}$ 552.0938, encontrado 552.0928.

***N*-(6-nitro-1,3-benzotiazol-2-il)-2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (S2-17)**



Rendimiento 73 %, p.f. 313.6 °C con descomposición. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 4.661 (s, 4H, -CH₂-); 7.112 (d, *J*= 8.3 Hz, 2H, H-8''); 7.815-7.854 (m, 4H, H-5'', H-7''); 7.940 (d, *J*= 8.9 Hz, 1H, H-4'); 8.310 (dd, *J*₁= 8.9, *J*₂= 2.4 Hz, 1H, H-5'); 8.350 (s, 2H, H-3, H-5); 9.090 (d, *J*= 2.4 Hz, 1H, H-7'); 10.829 (s, 2H, NH); 13.628 (sa, 1H, NH-Ar). RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 67.21, 114.70, 116.31, 116.79, 119.53, 120.98, 122.25, 128.03, 132.68, 132.77, 141.30, 143.55, 145.07, 156.42, 162.66, 164.93. EM-AR (IE⁺): calculado para C₂₉H₁₈N₆O₇S 552.0938, encontrado 552.0928.

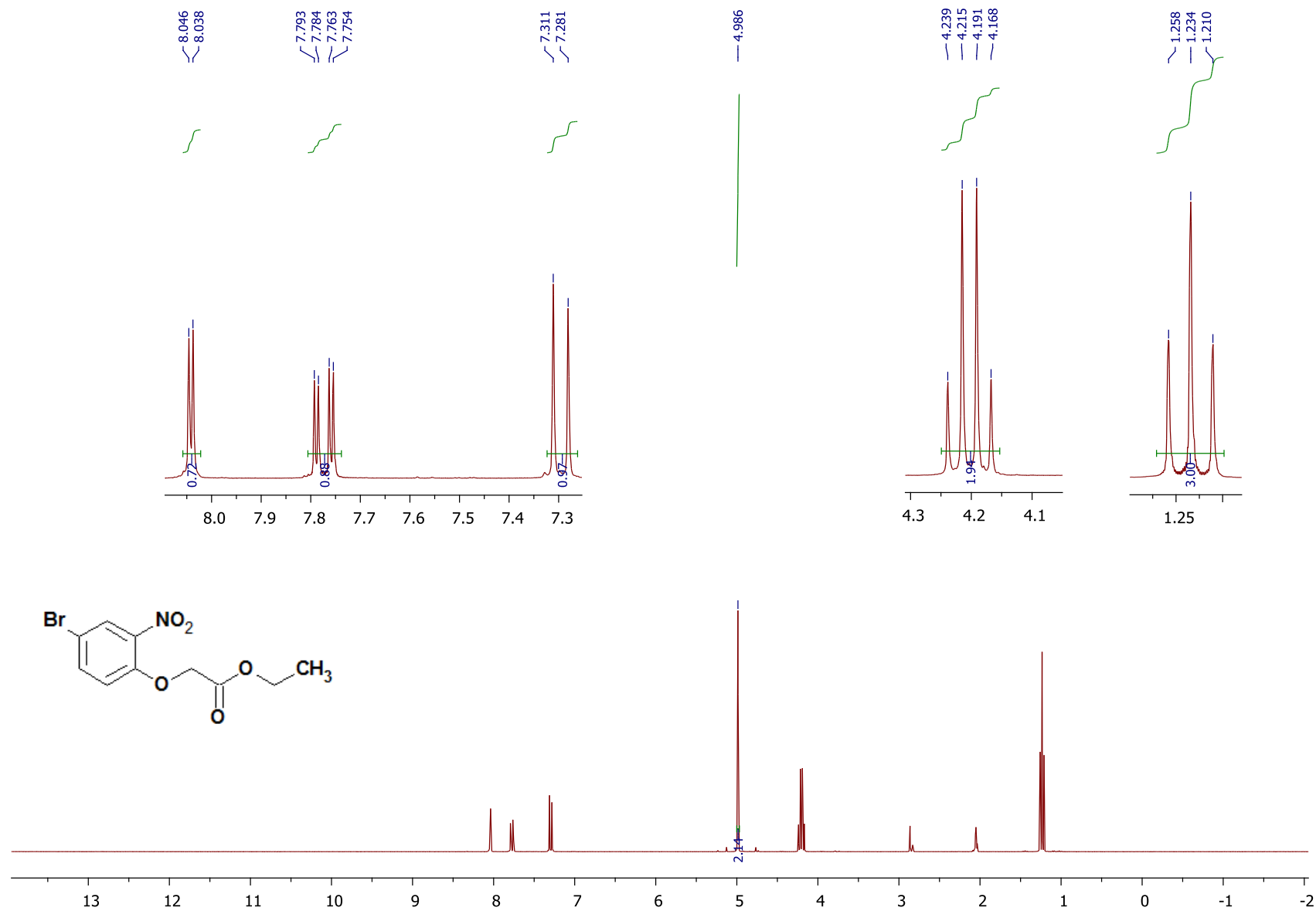
***N*-(5,6-dicloro-1*H*-bencimidazol-2-il)-2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (S2-21)**

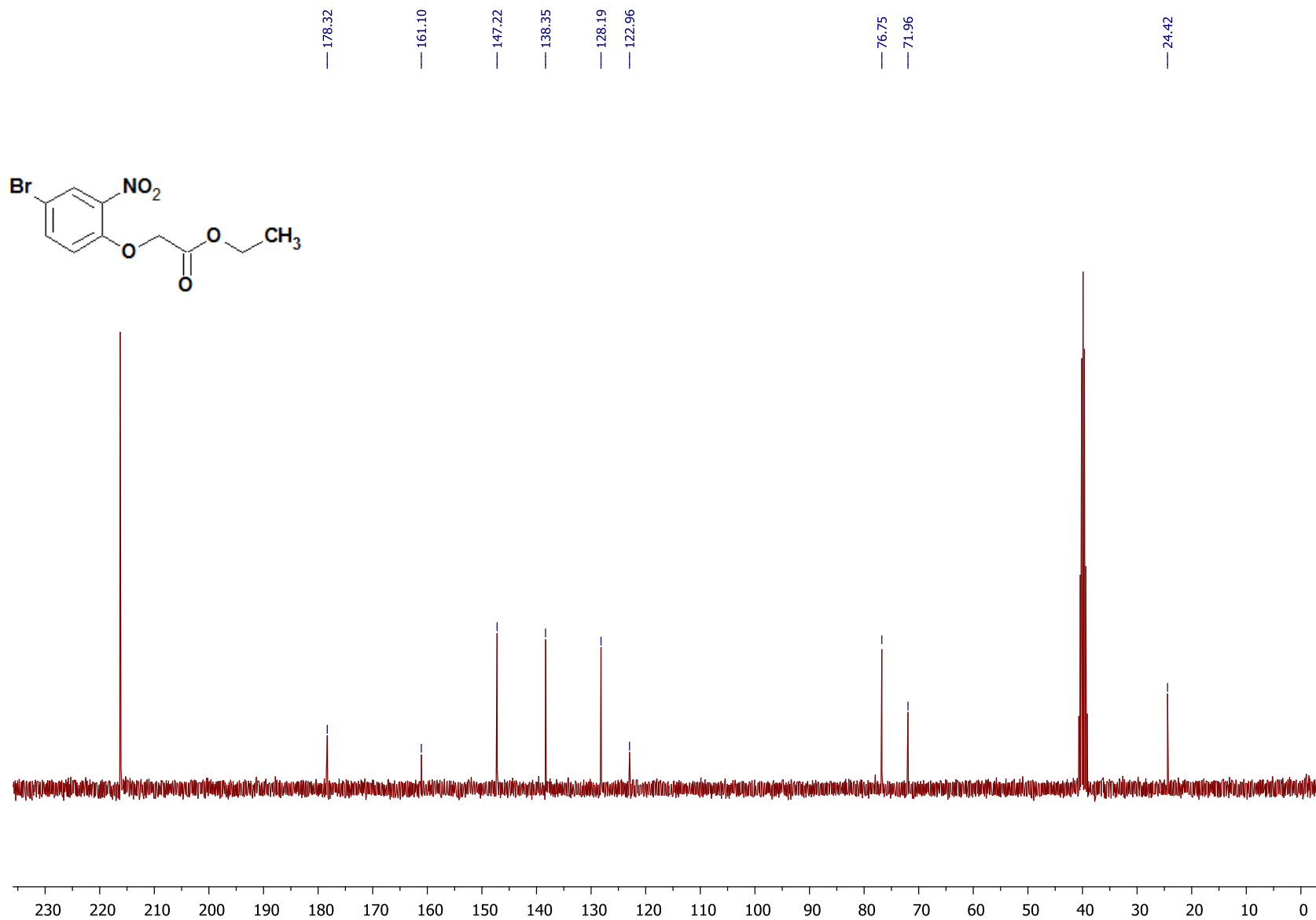


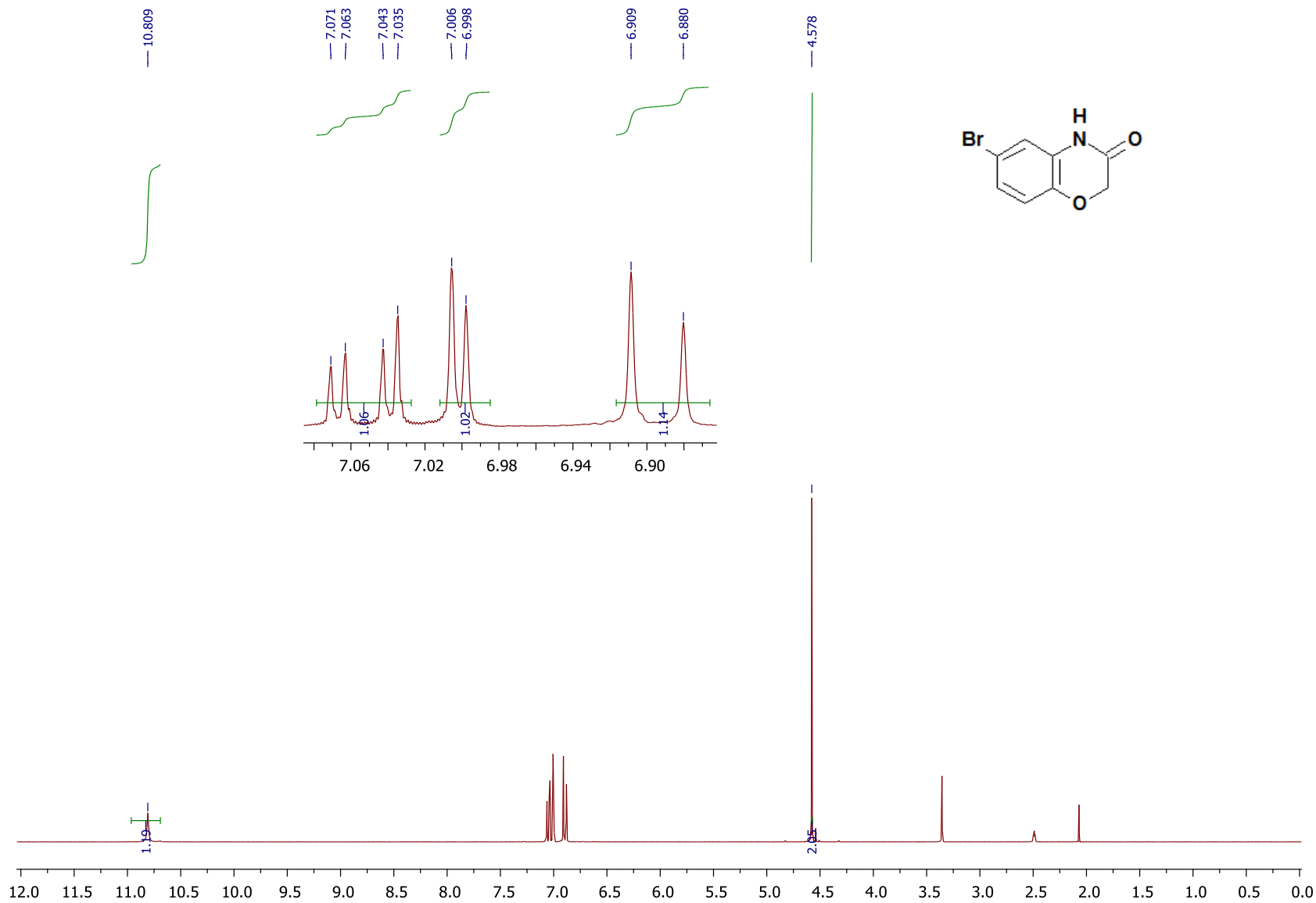
Rendimiento 38 %, p.f. 293.5 °C con descomposición. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 4.665 (s, 4H, -CH₂-); 7.124 (d, *J*= 8.3 Hz, 2H, H-8''); 7.723 (s, 2H, H-4', H-7'); 7.826-7.852 (m, 4H, H-5'', H-7''); 8.314 (s, 2H, H-3, H-5); 10.857 (s, 2H, NH); 12.627 (sa, 1H, NH-Ar). RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 67.22, 113.87, 114.69, 116.34, 116.82, 116.96, 121.30, 122.20, 124.03, 128.05, 132.95, 134.43, 143.05, 145.02, 156.30, 164.96, 165.20. EM-AR (IE⁺): calculado para C₂₉H₁₈N₆O₅Cl₂ 552.0938, encontrado 552.0928.

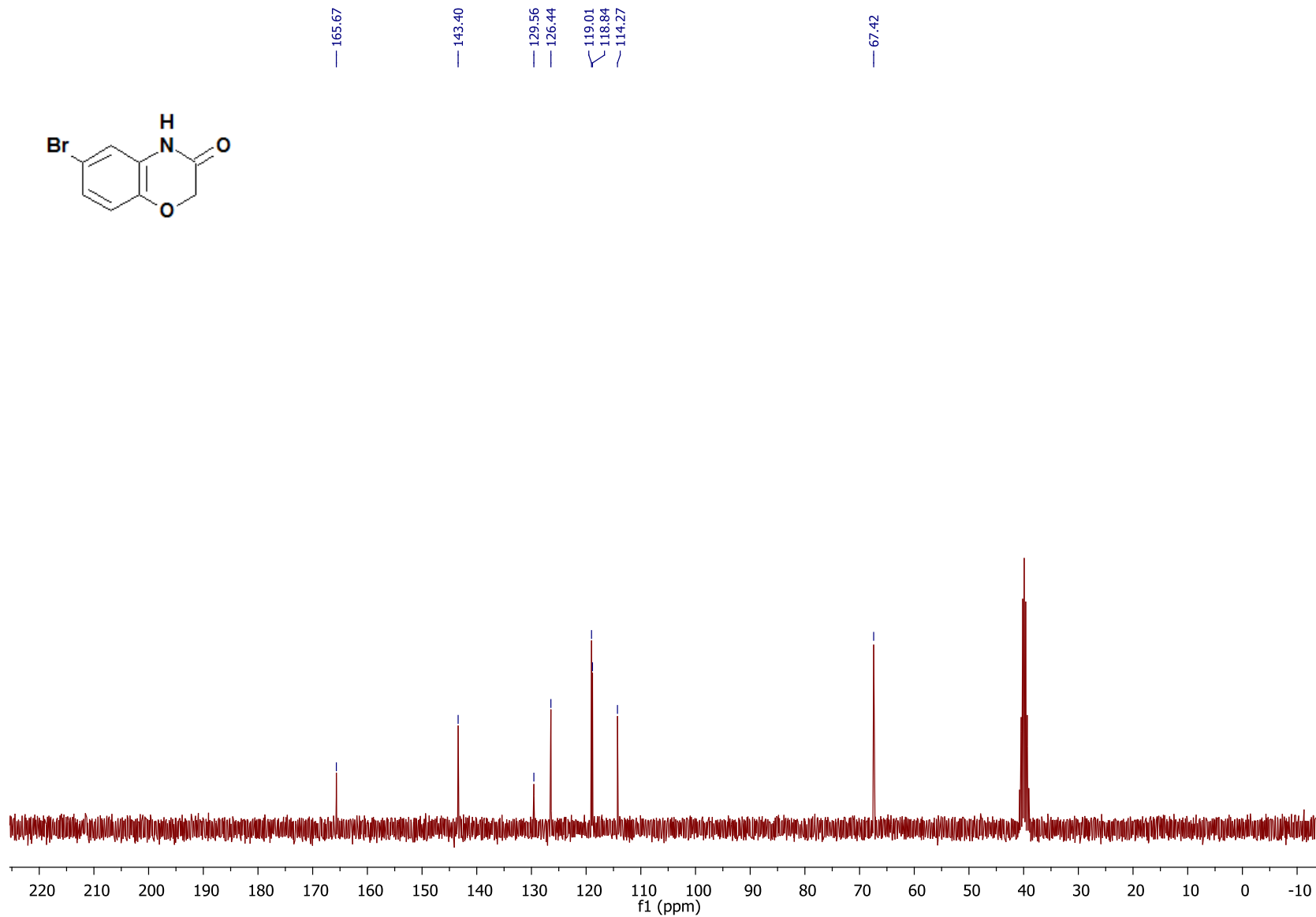
Anexo IV

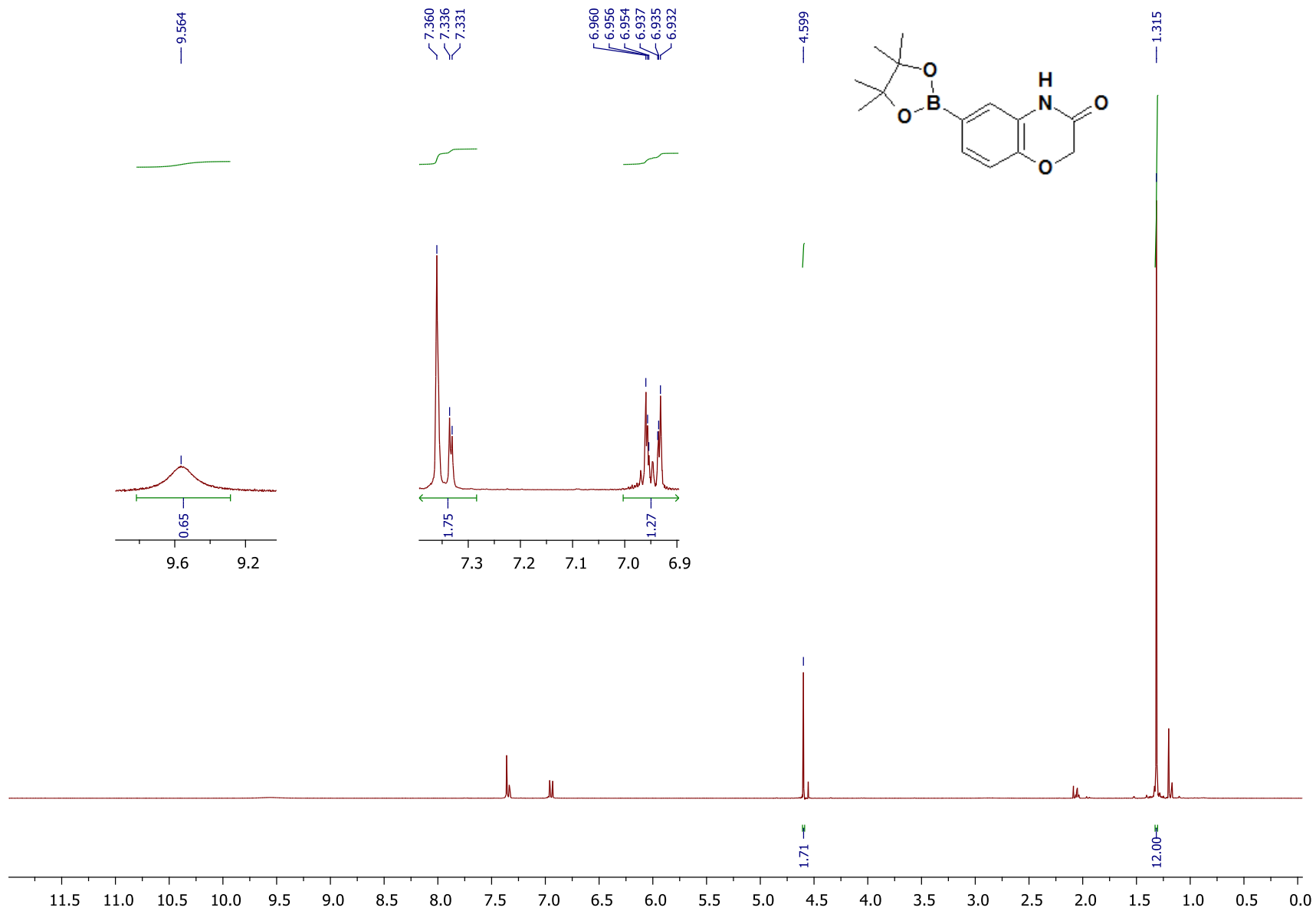
Espectros

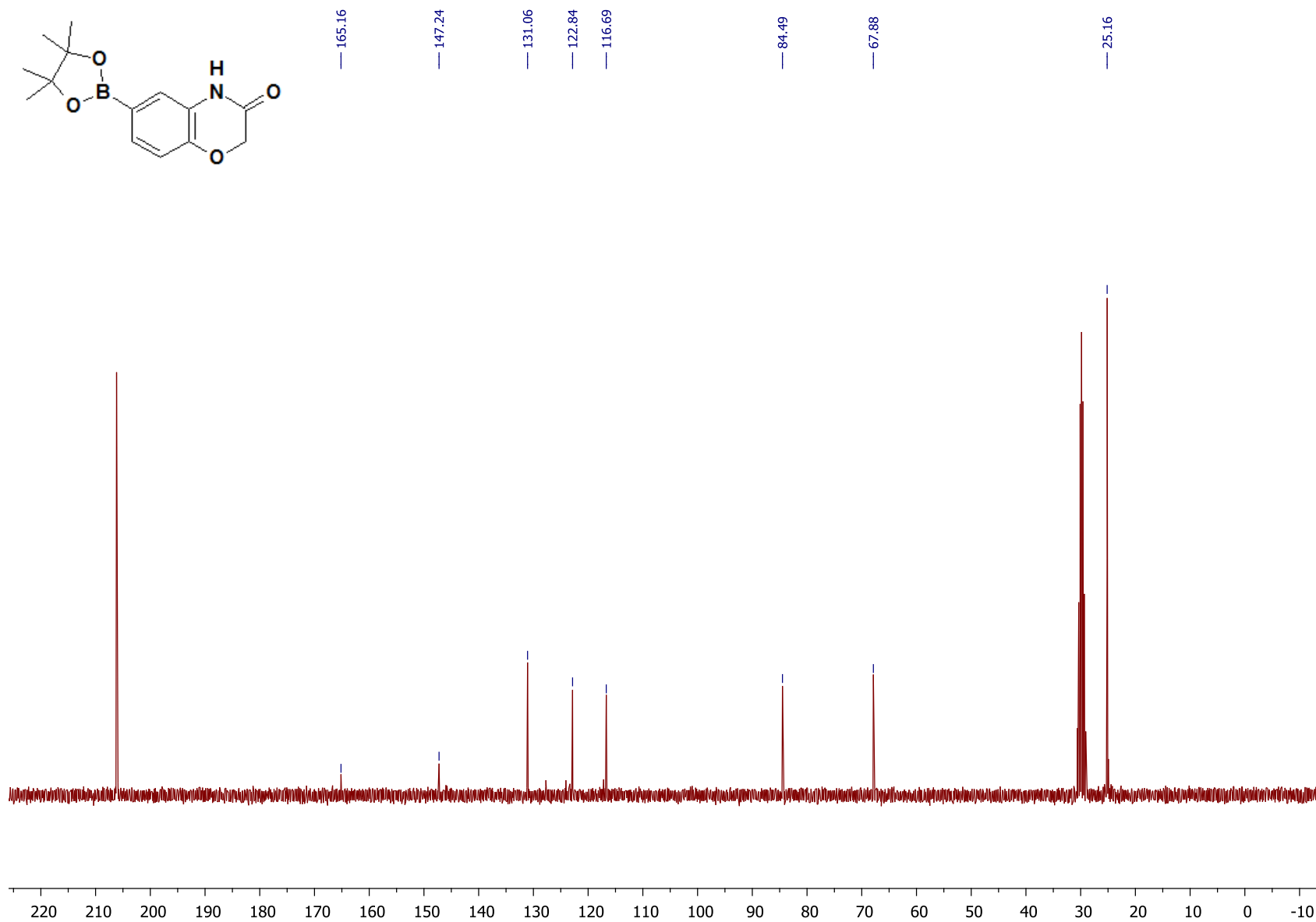
Espectro 1. RMN ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) de (4-bromo-2-nitrofenoxi)acetato de etilo (**2**).

Espectro 2. RMN ^{13}C (acetona- d_6 , 75 MHz) de (4-bromo-2-nitrofenoxi)acetato de etilo (2).

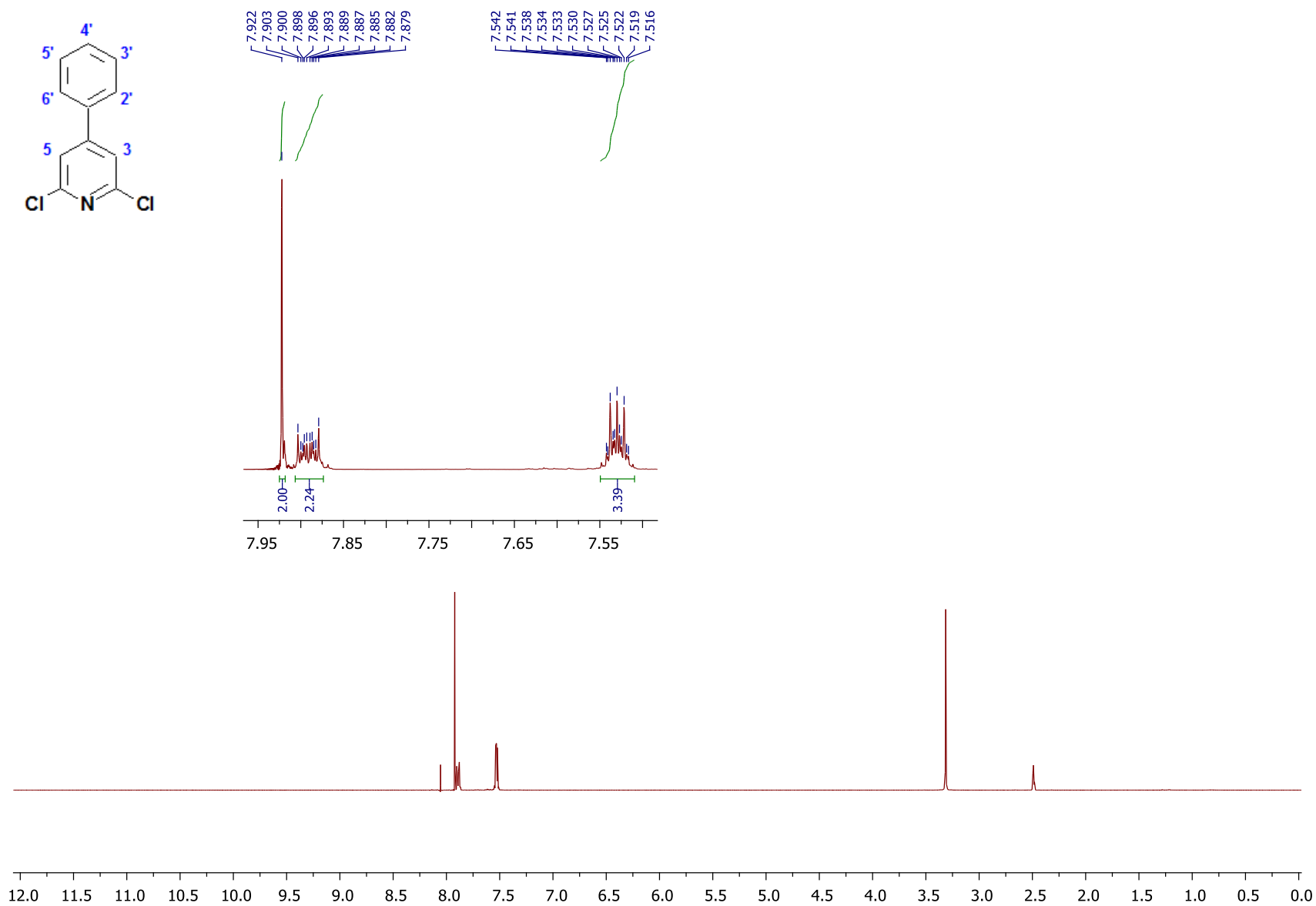
Espectro 3. RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 300 MHz) de 6-bromo-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona (3).

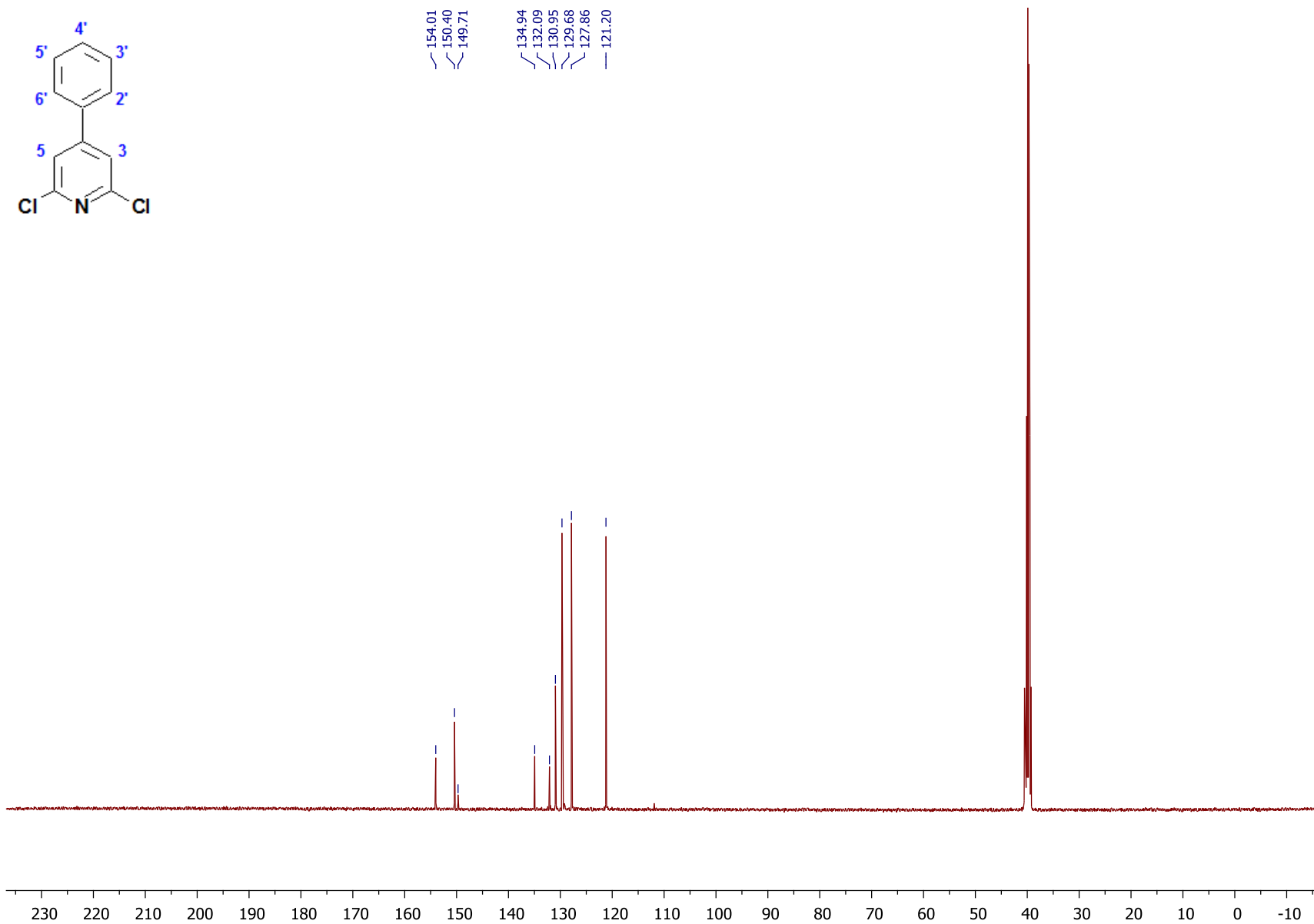
Espectro 4. RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 75 MHz) de 6-bromo-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-ona (**3**).

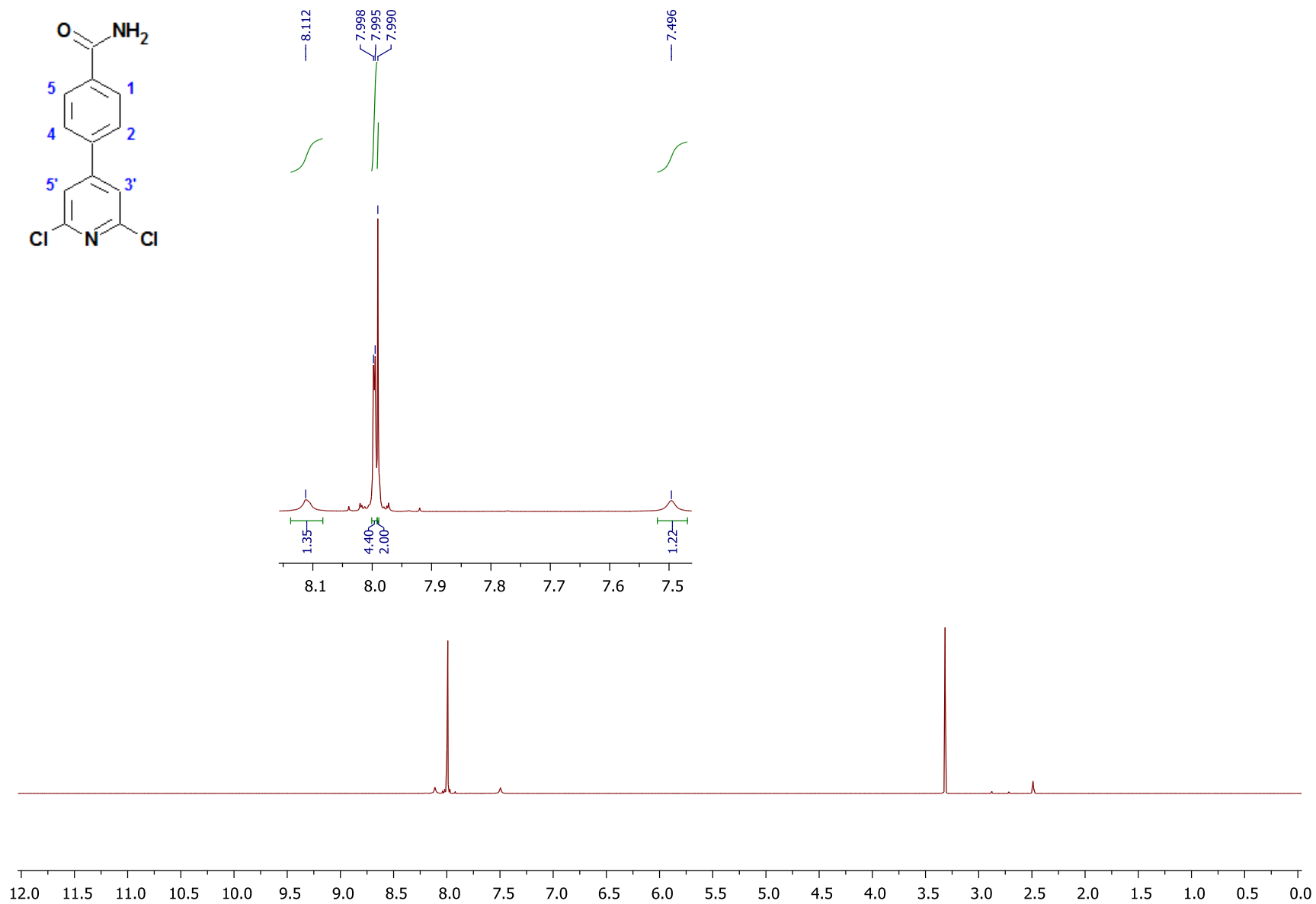
Espectro 5. RMN ^1H (acetona- d_6 , 300 MHz) de 6-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona (**4**).

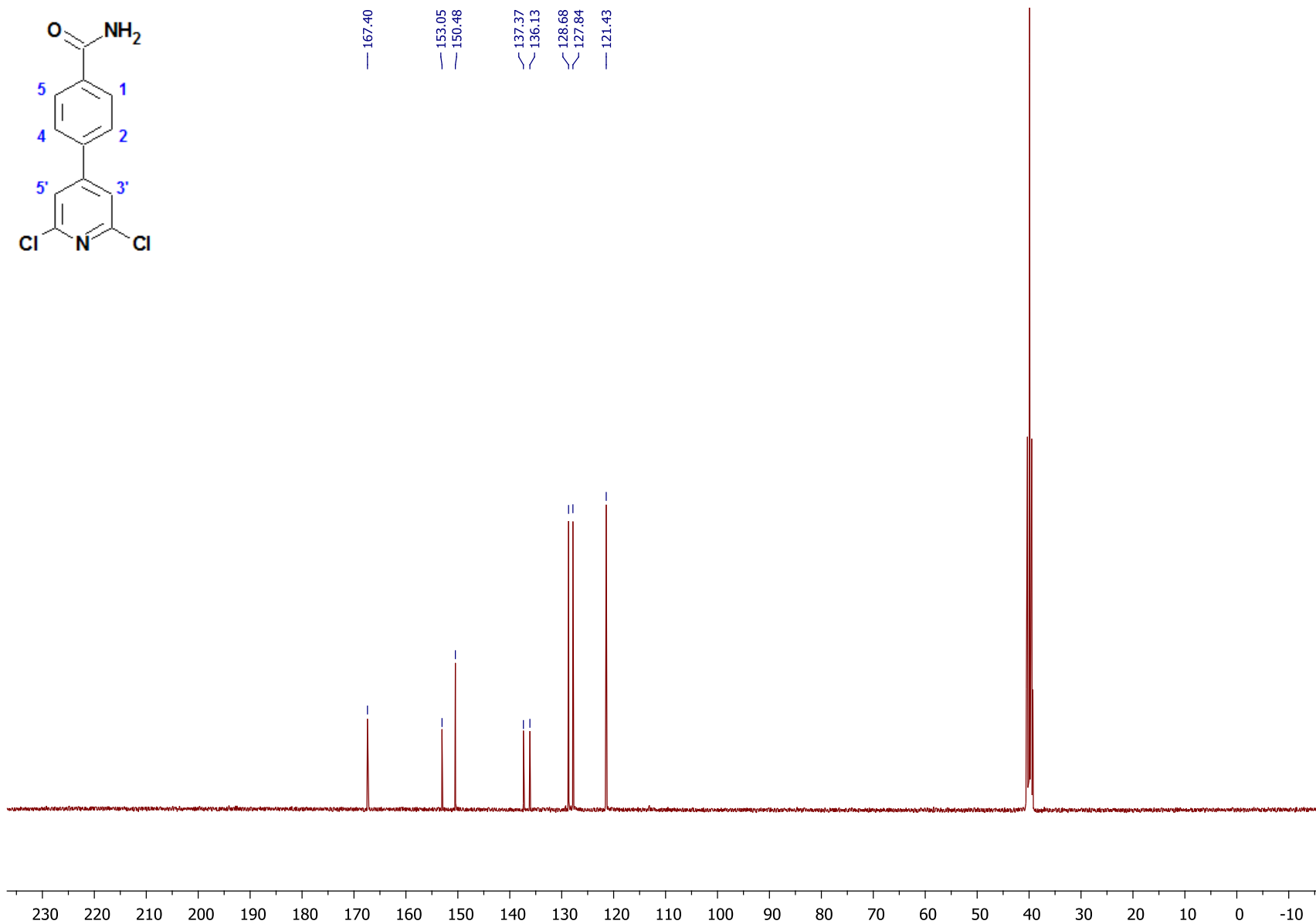


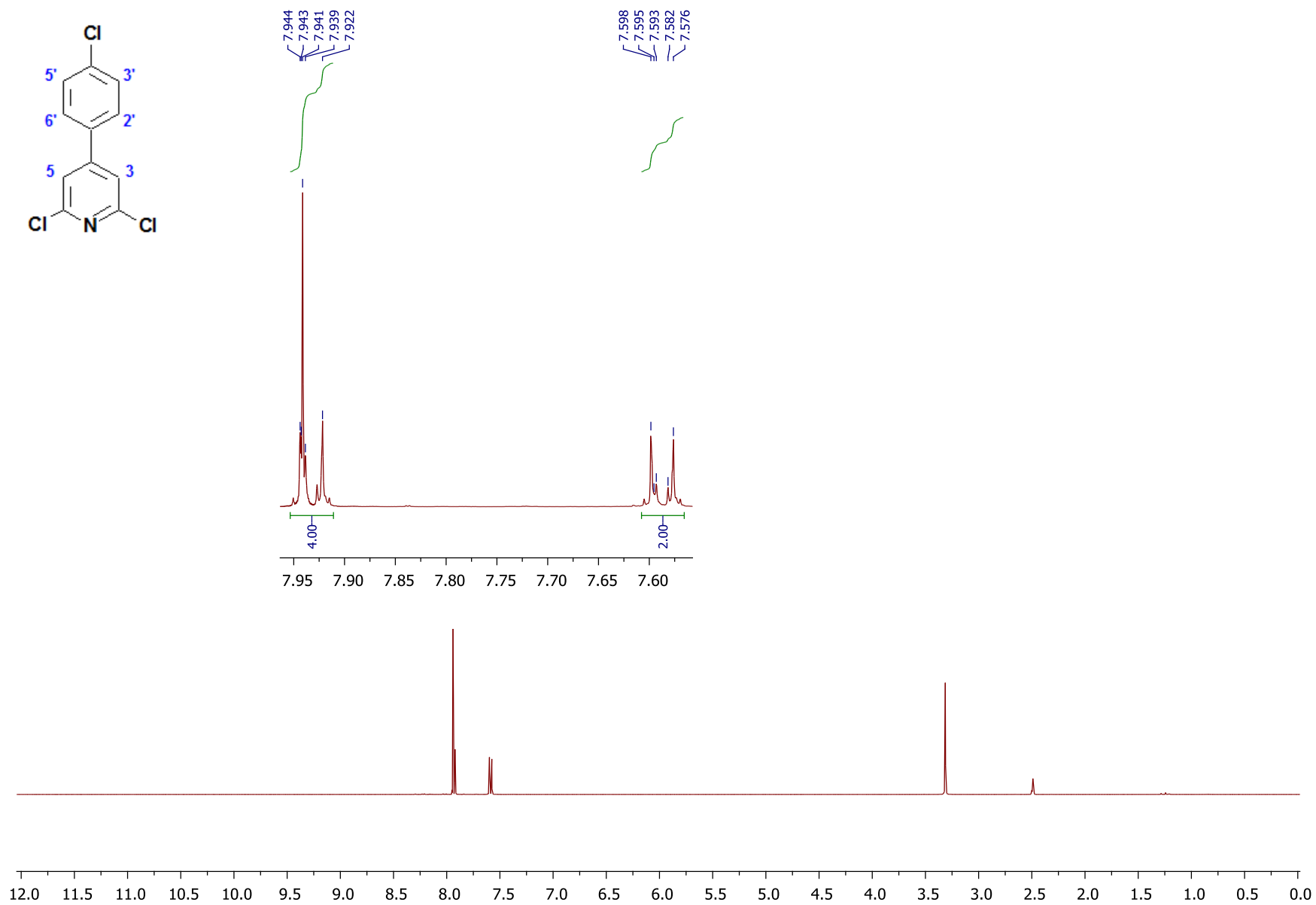
Espectro 6. RMN ^{13}C (acetona- d_6 , 75 MHz) de 6-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona (**4**).

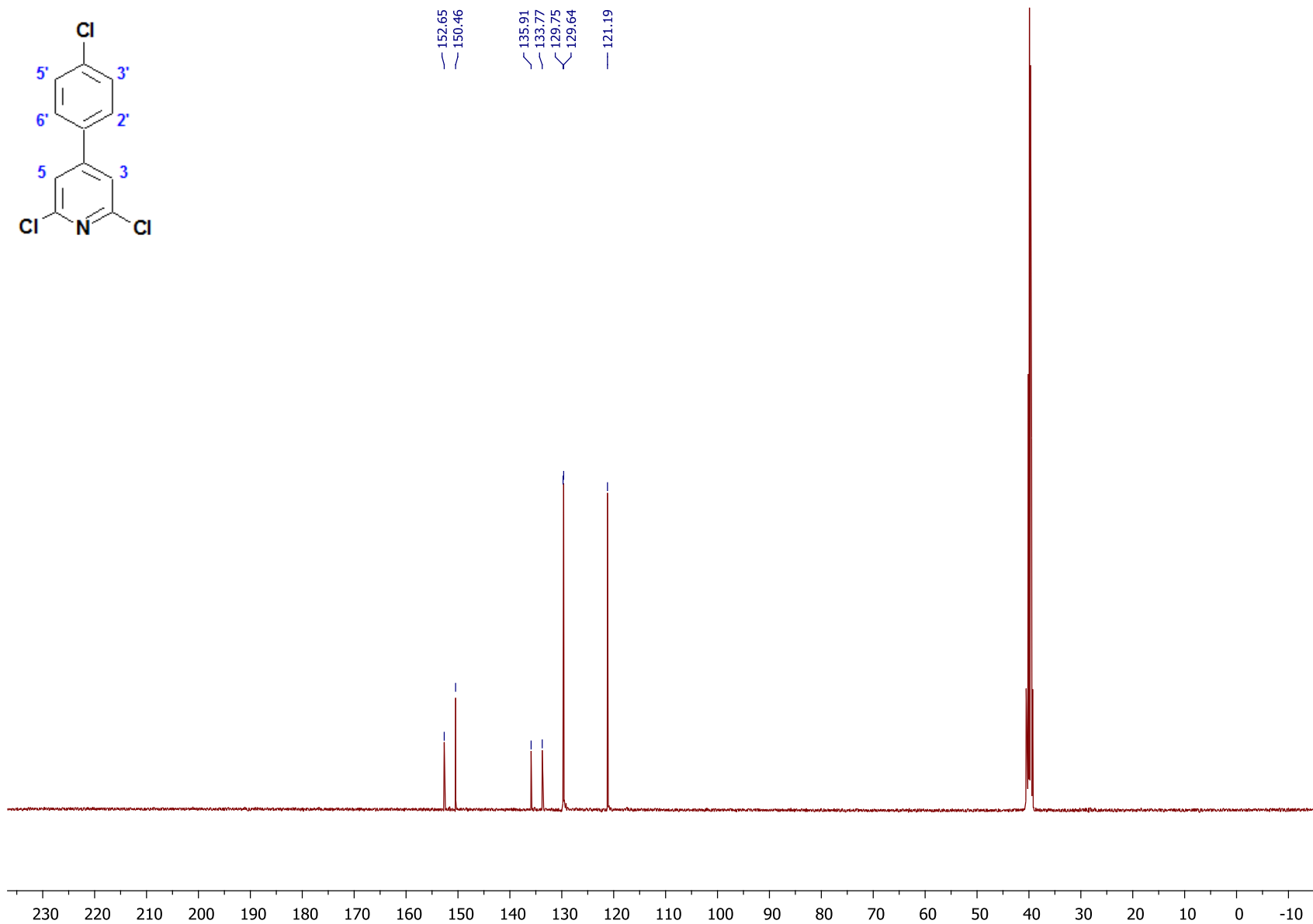
Espectro 7. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) de 2,6-dicloro-4-fenilpiridina (S1-1-1).

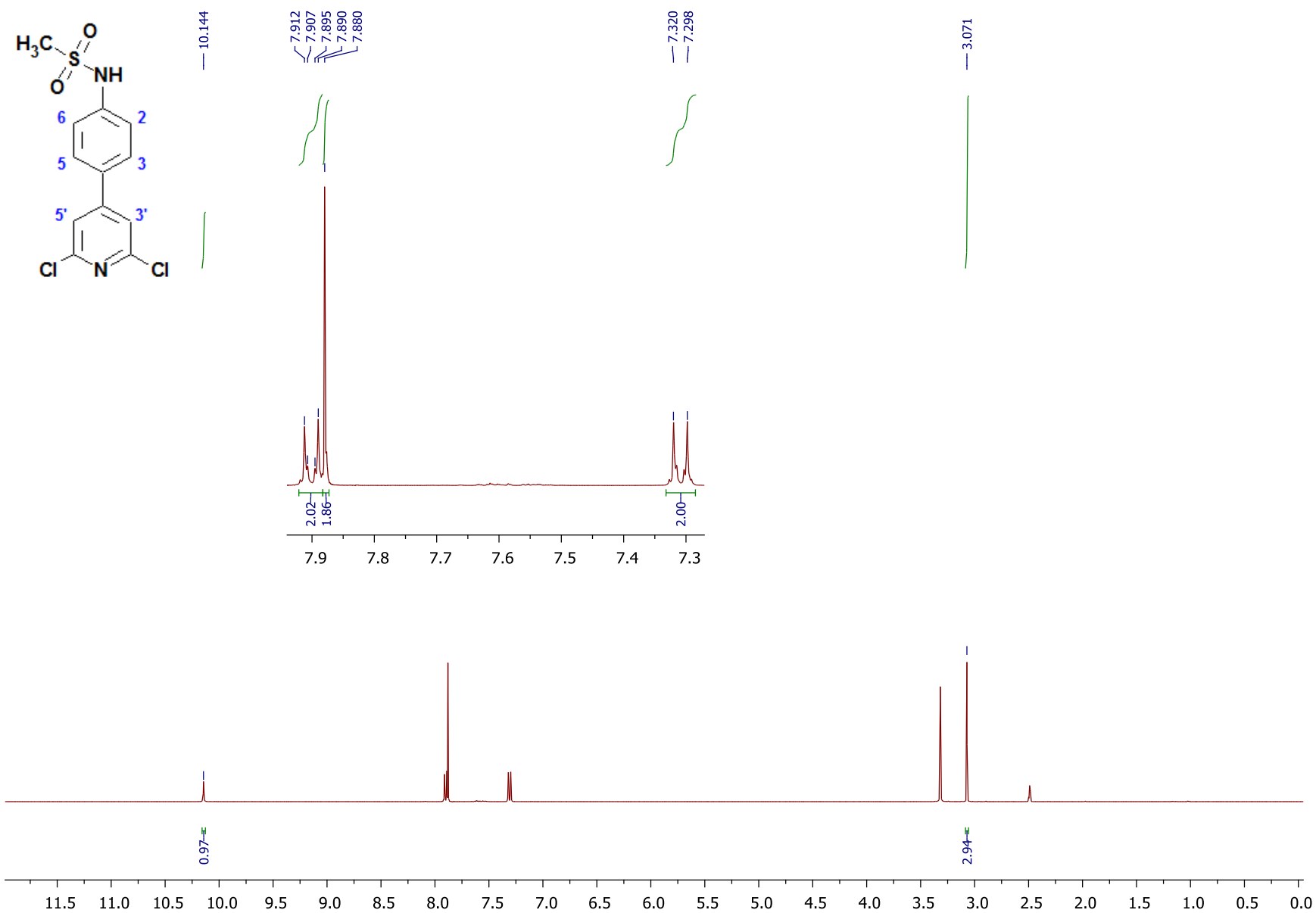
Espectro 8. RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) de 2,6-dicloro-4-fenilpiridina (**S1-1-1**).

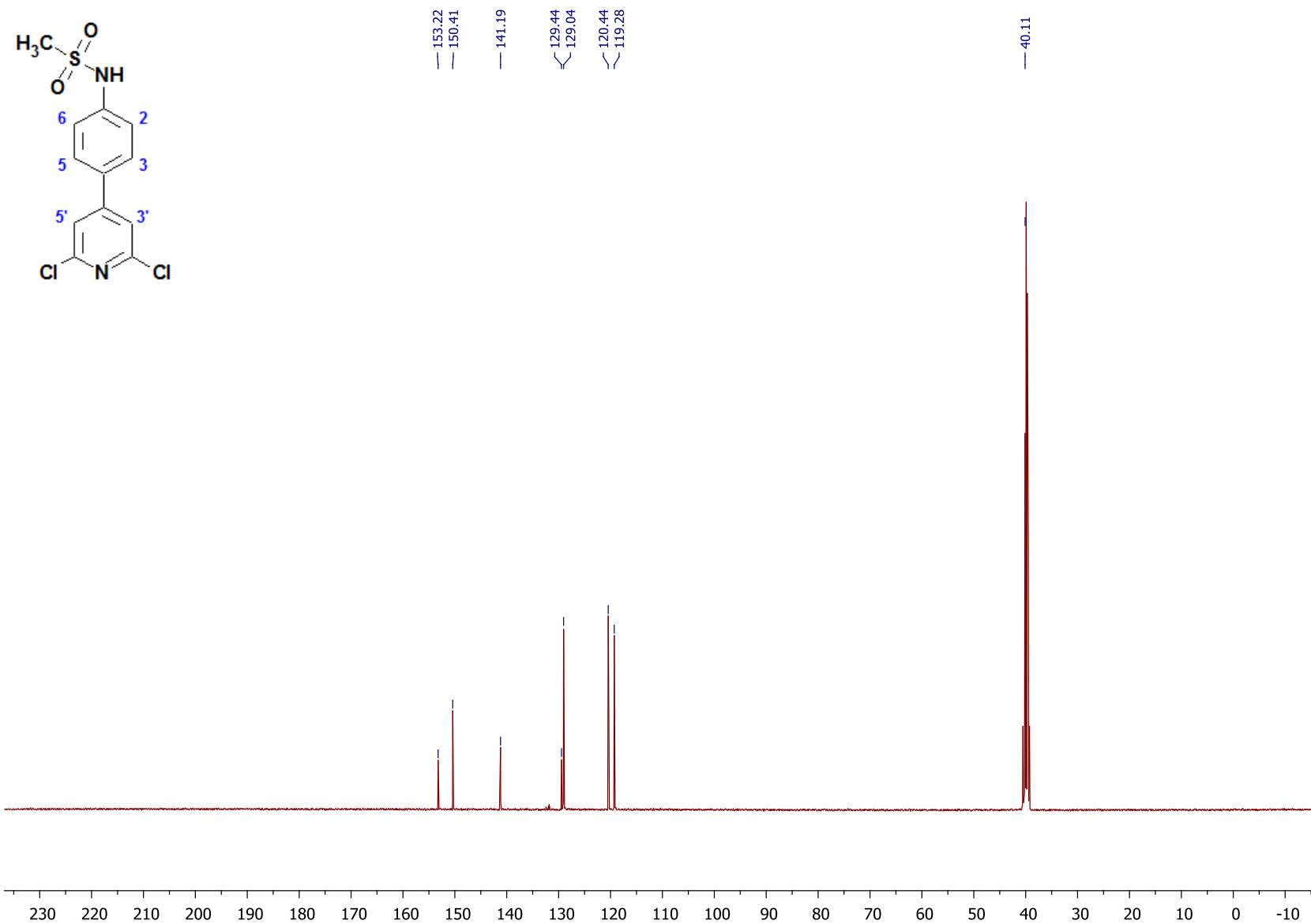
Espectro 9. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 100 MHz) de 4-(2,6-dicloropiridin-4-il)benzamida (S1-2-2).

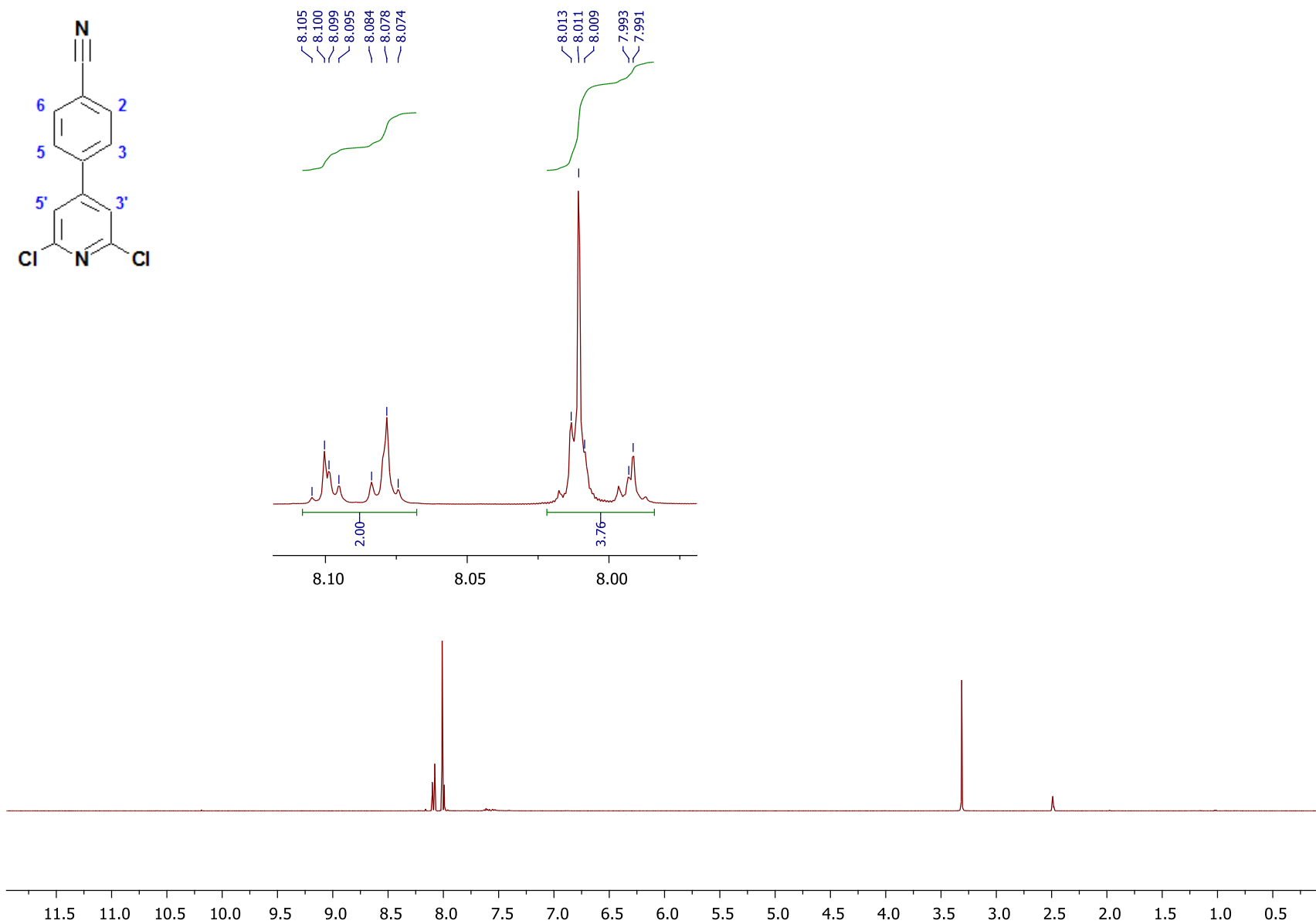
Espectro 10. RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) de 4-(2,6-dicloropiridin-4-il)benzamida (S1-2-2).

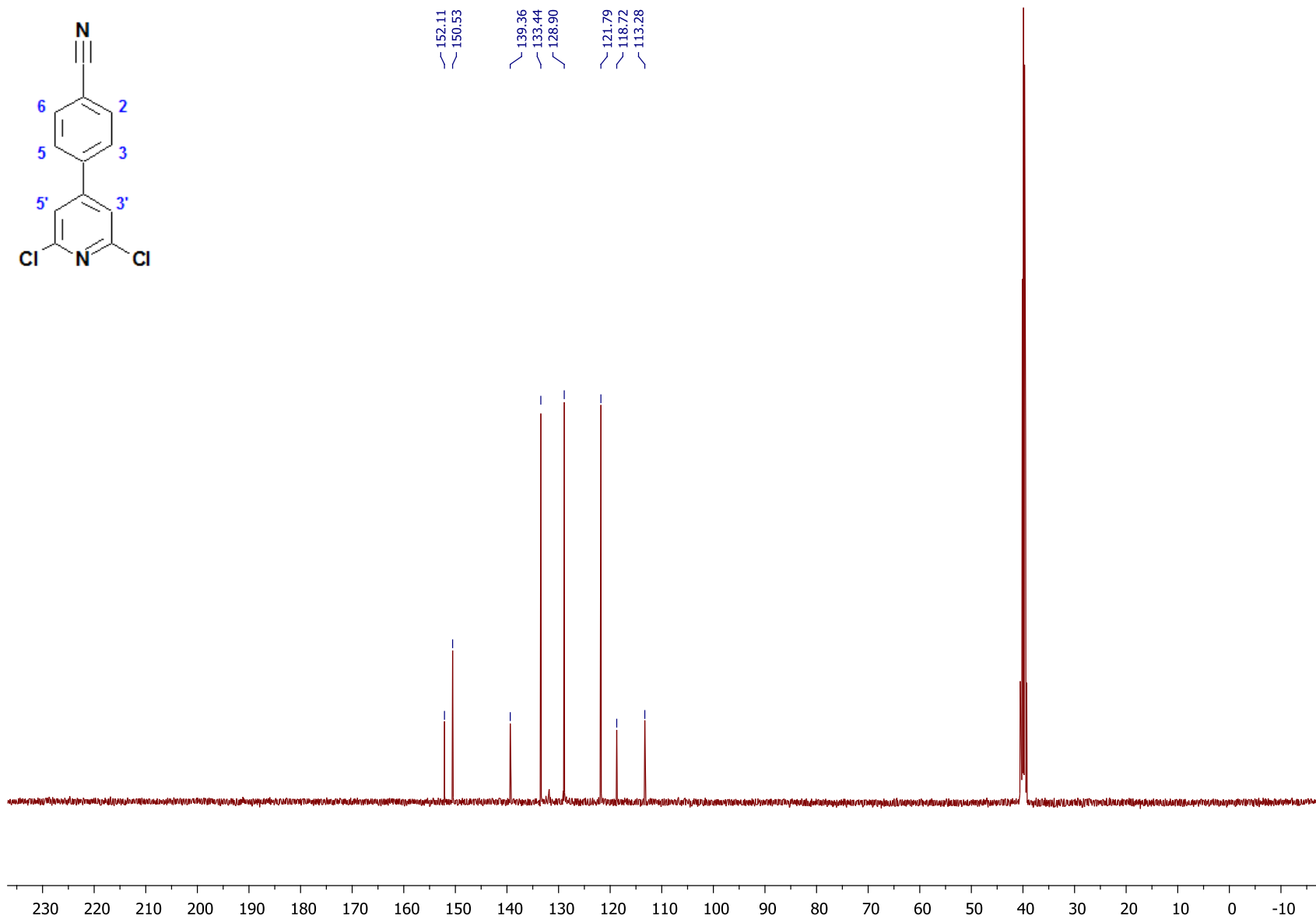
Espectro 11. RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) de 2,6-dicloro-4-(4-clorofenil)piridina (S1-3-3).

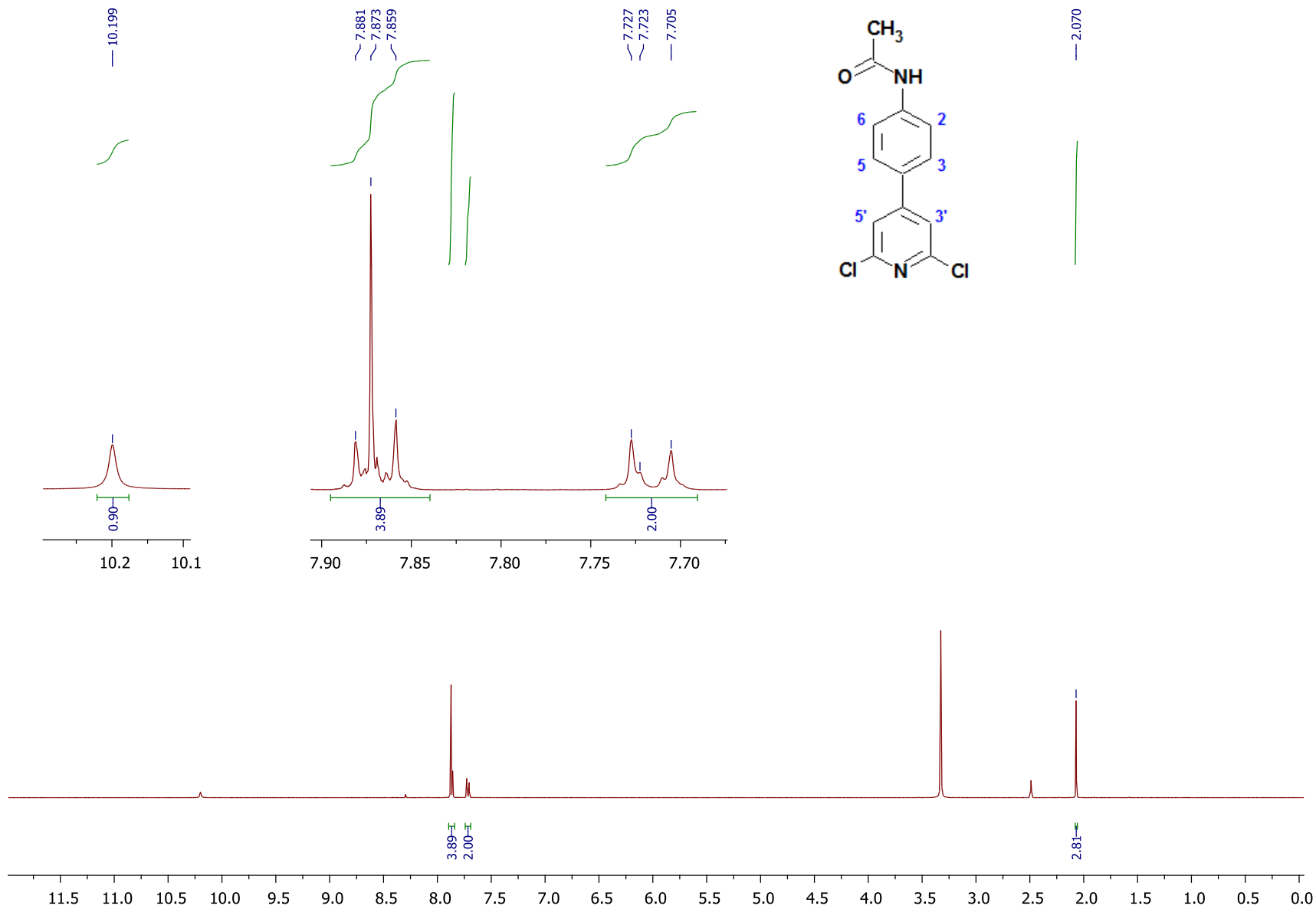
Espectro 12. RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) de 2,6-dicloro-4-(4-clorofenil)piridina (**S1-3-3**).

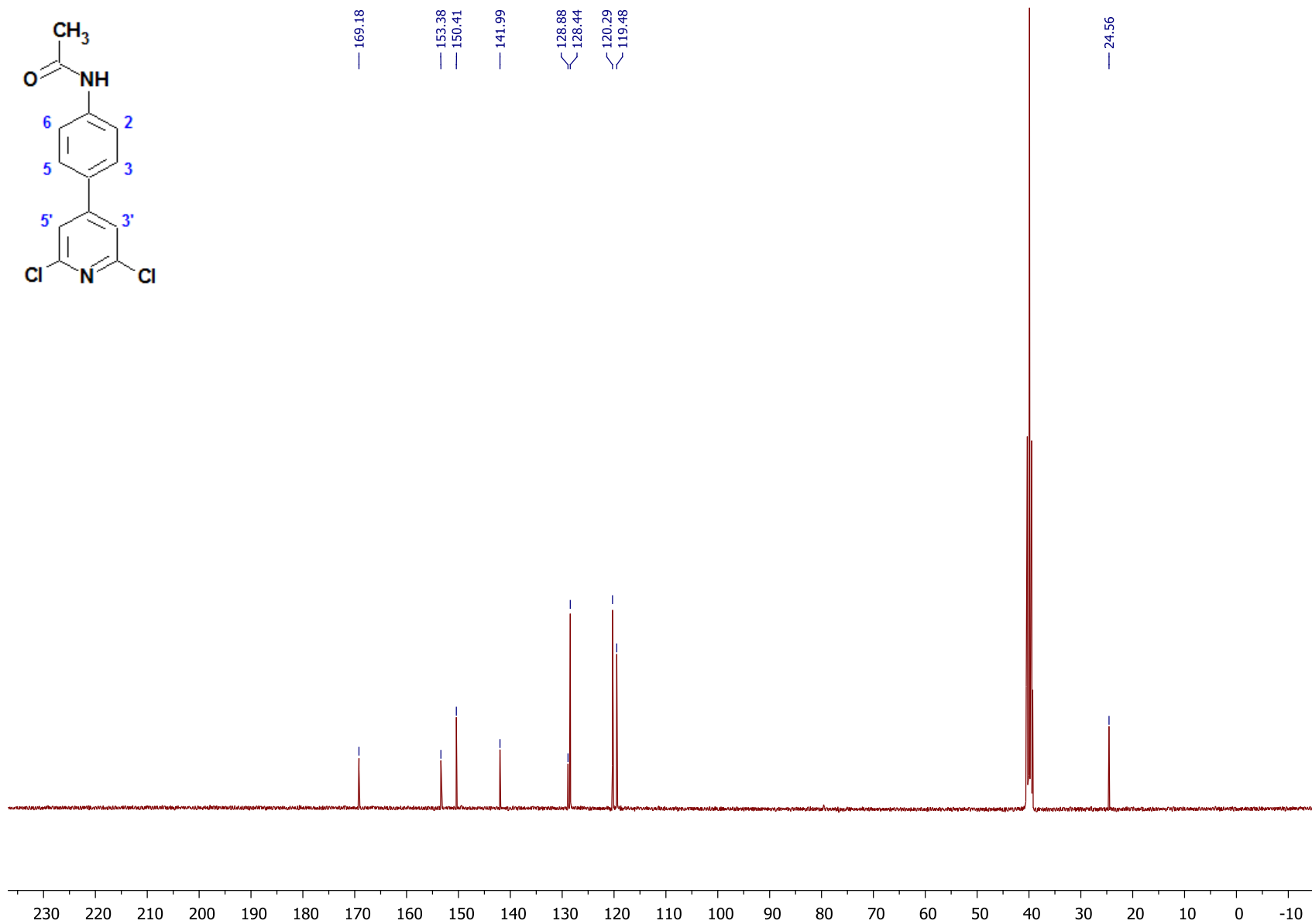
Espectro 13. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz) de *N*-[4-(2,6-dicloropiridin-4-il)fenil]metanosulfonamida (S1-4-4).

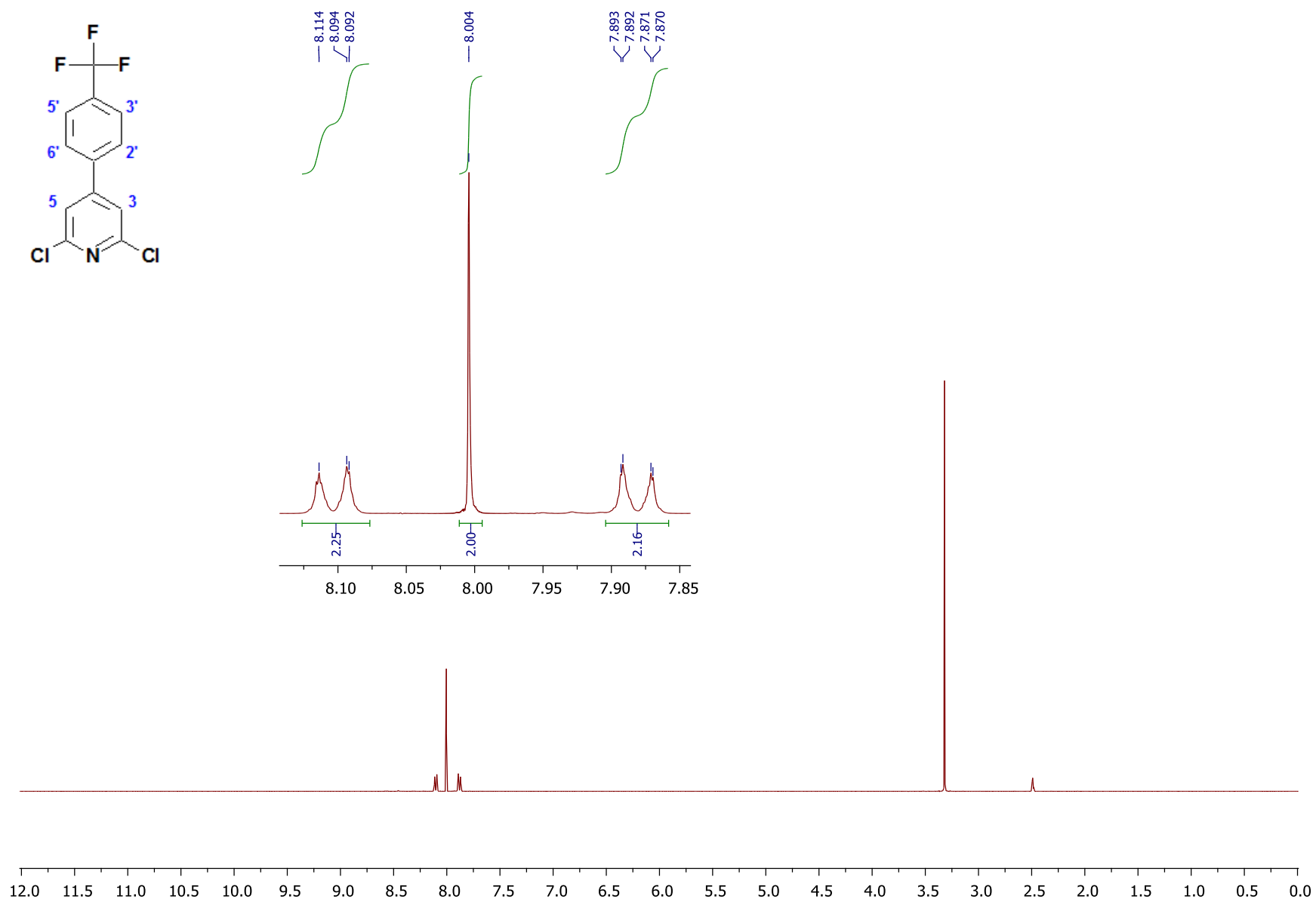
Espectro 14. RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz) de *N*-[4-(2,6-dicloropiridin-4-il)fenil]metanosulfonamida (S1-4-4).

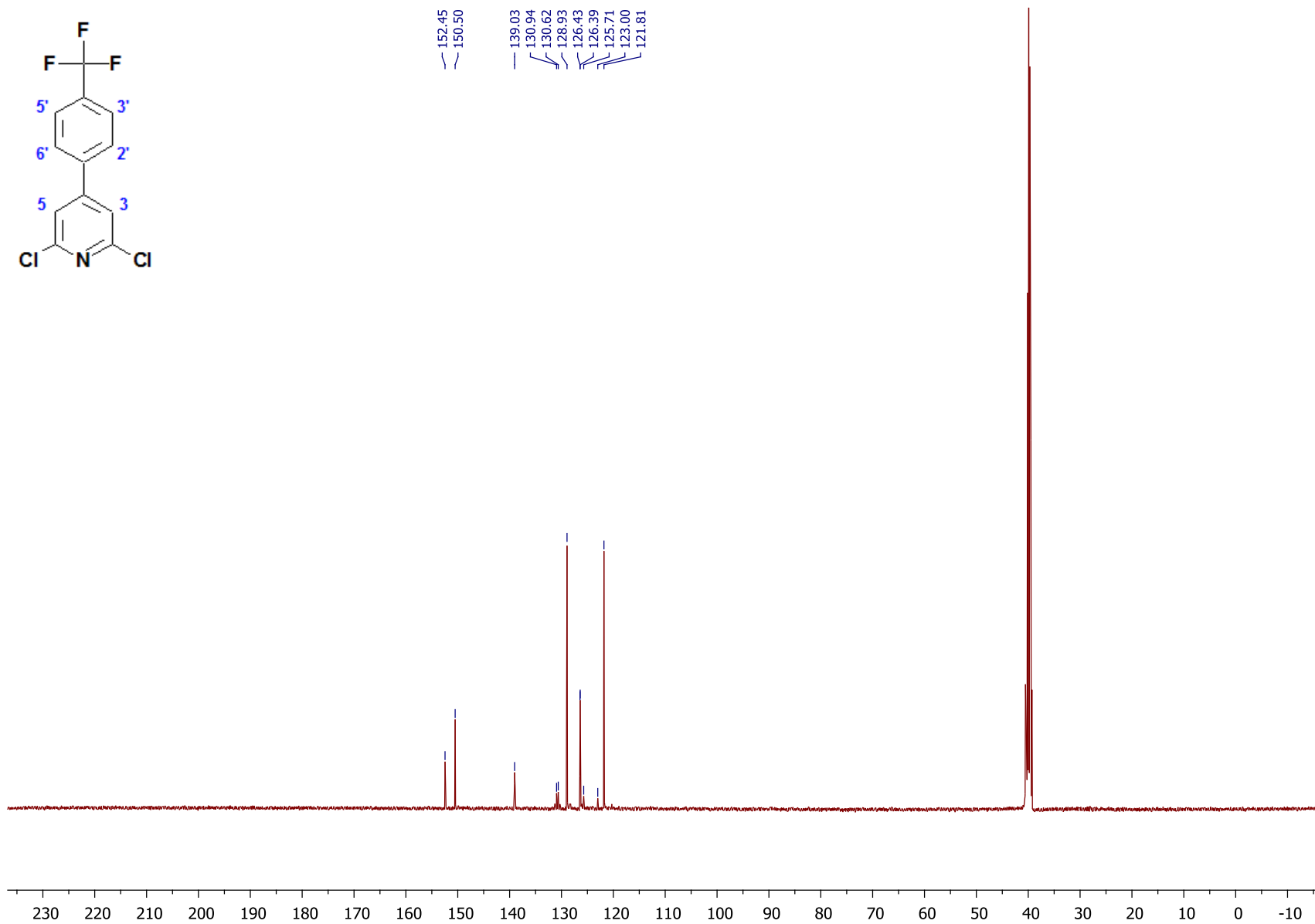
Espectro 15. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) de 4-(2,6-dicloropiridin-4-il)benzonitrilo (**S1-5-5**).

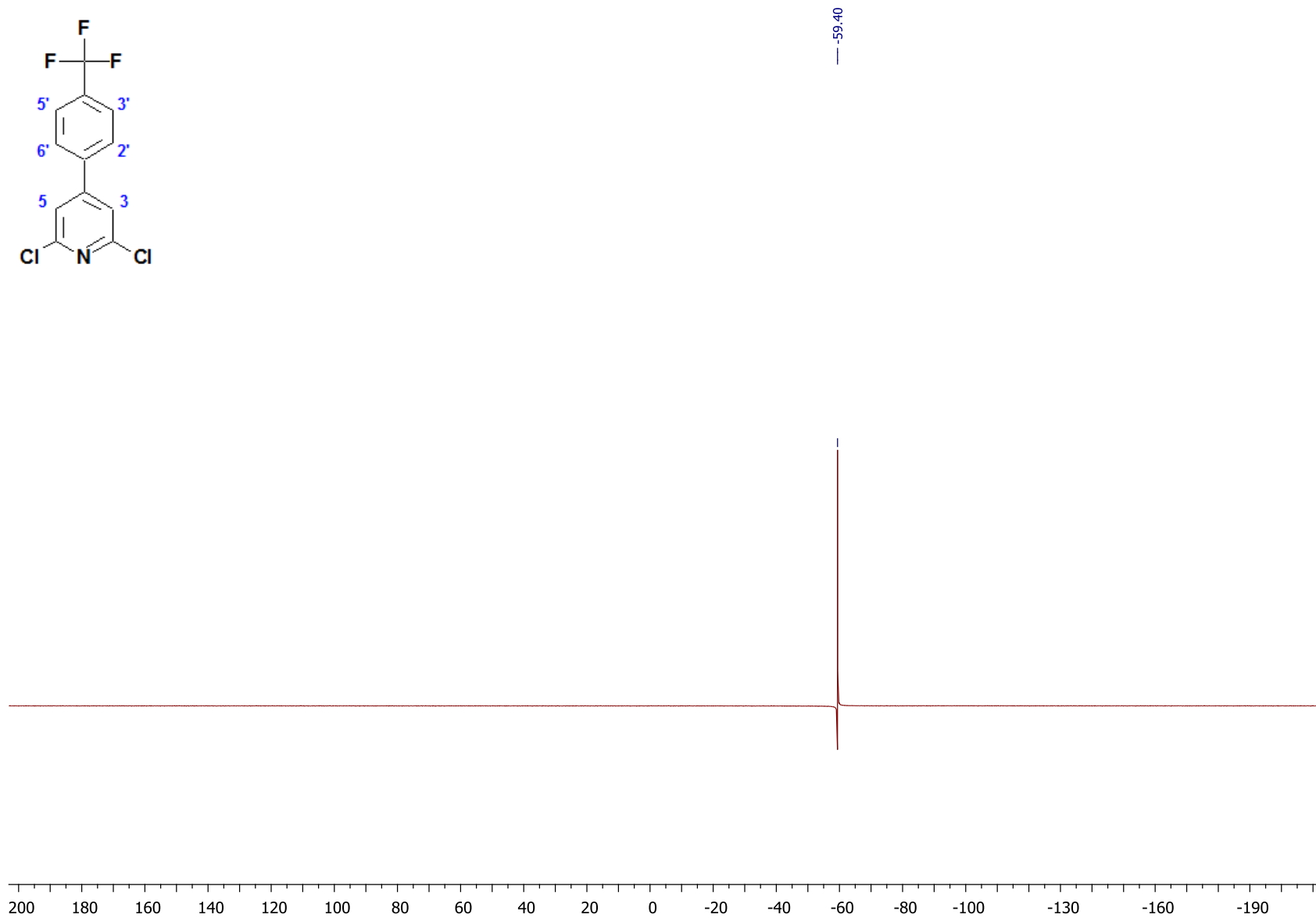
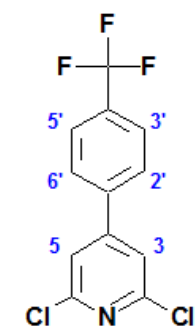
Espectro 16. RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz) de 4-(2,6-dicloropiridin-4-il)benzotrilo (**S1-5-5**).

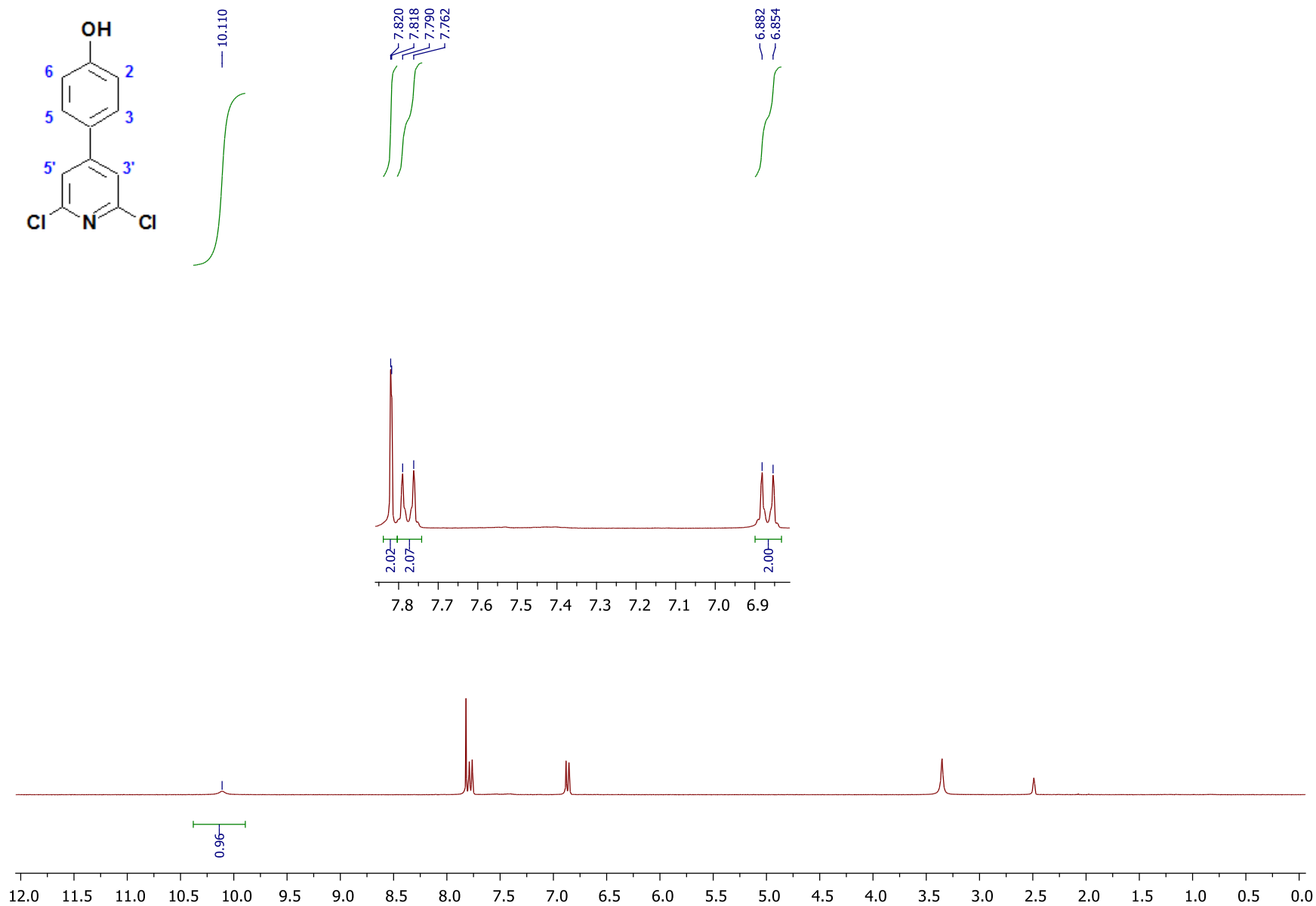
Espectro 17. RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) de *N*-[4-(2,6-dicloropiridin-4-il)fenil]acetamida (S1-6-6).

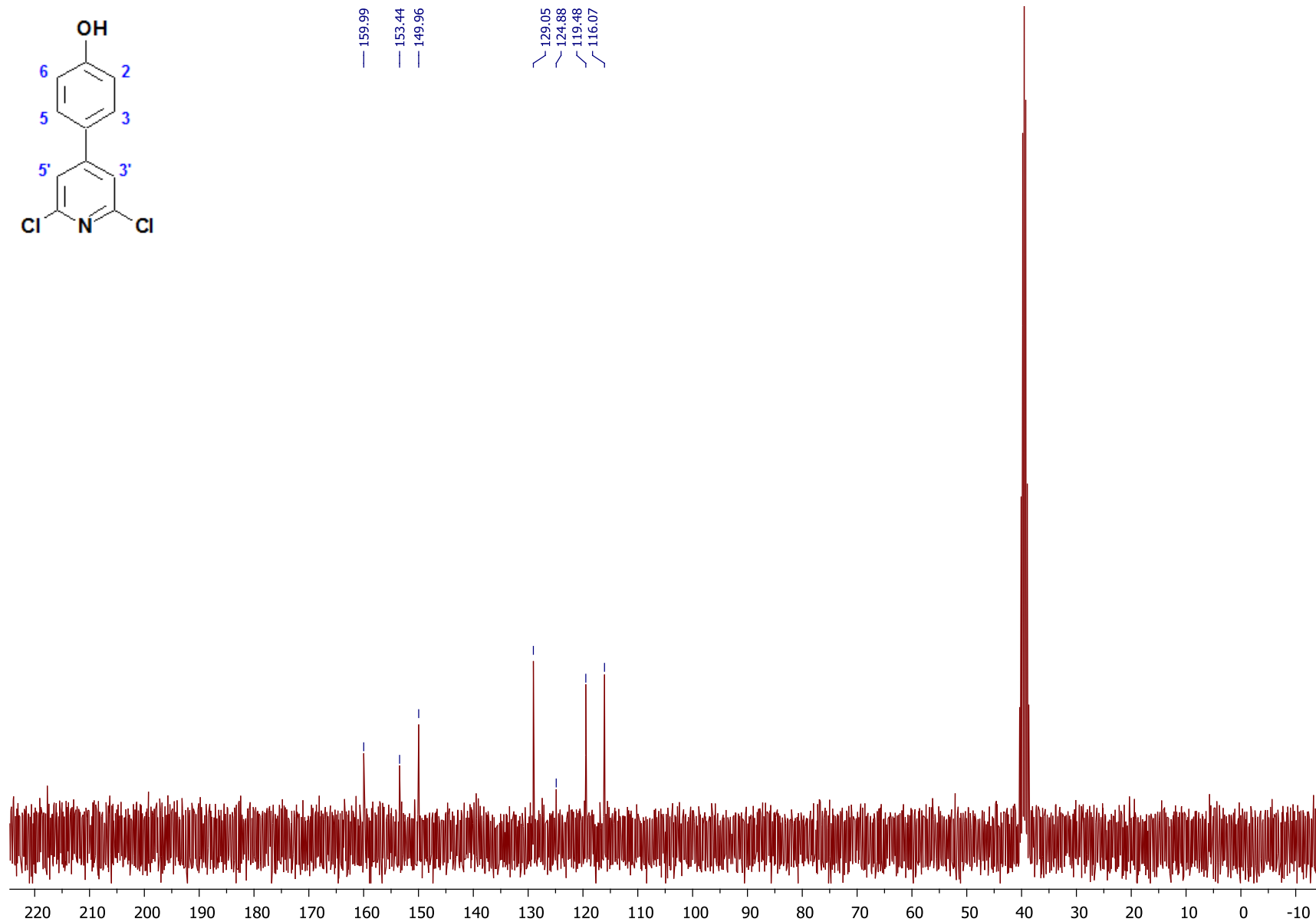
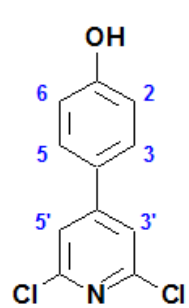
Espectro 18. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 100 MHz) de *N*-[4-(2,6-dicloropiridin-4-il)fenil]acetamida (S1-6-6).

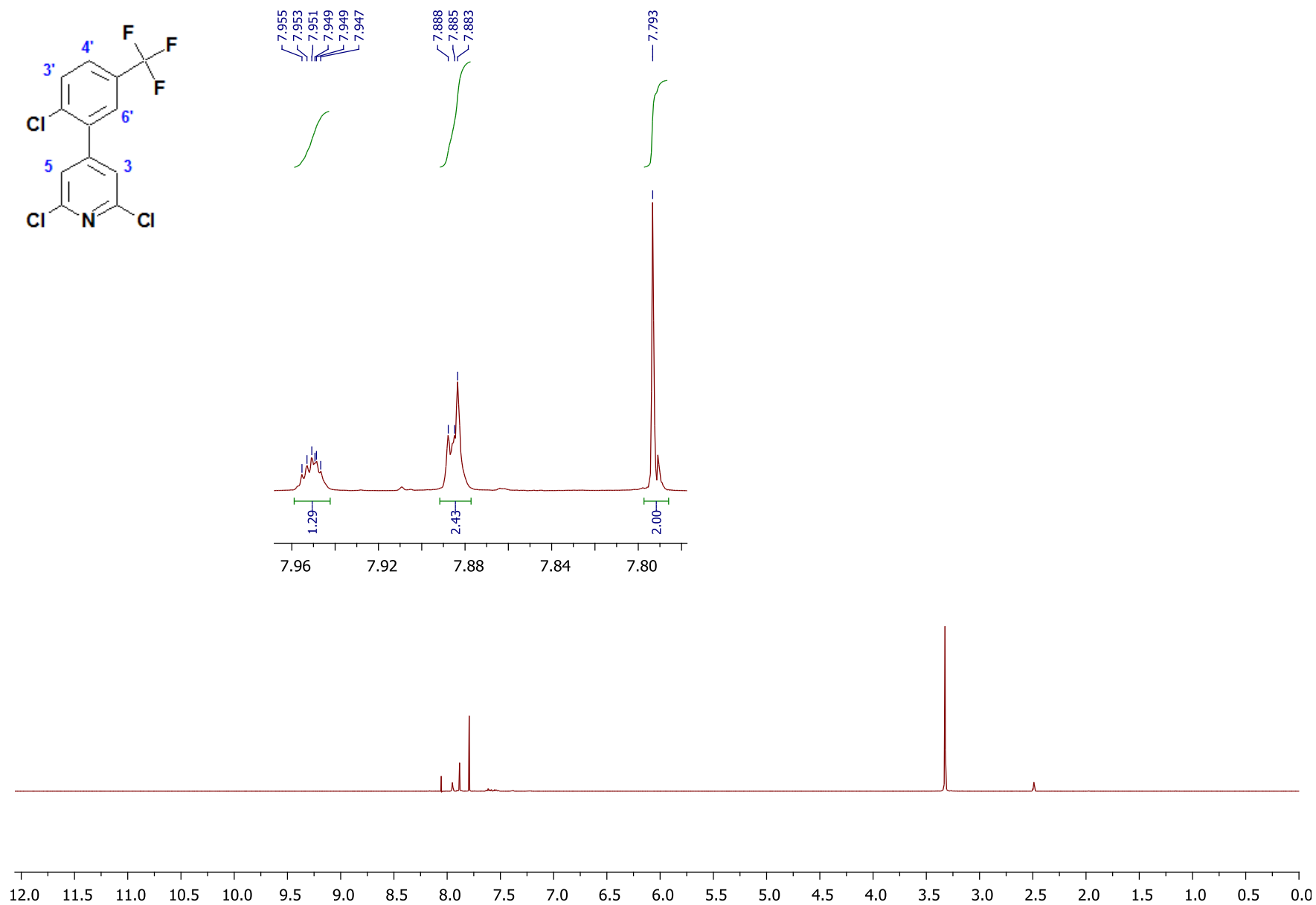
Espectro 19. RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) de 2,6-dicloro-4-[4-(trifluorometil)fenil]piridina (S1-7-7).

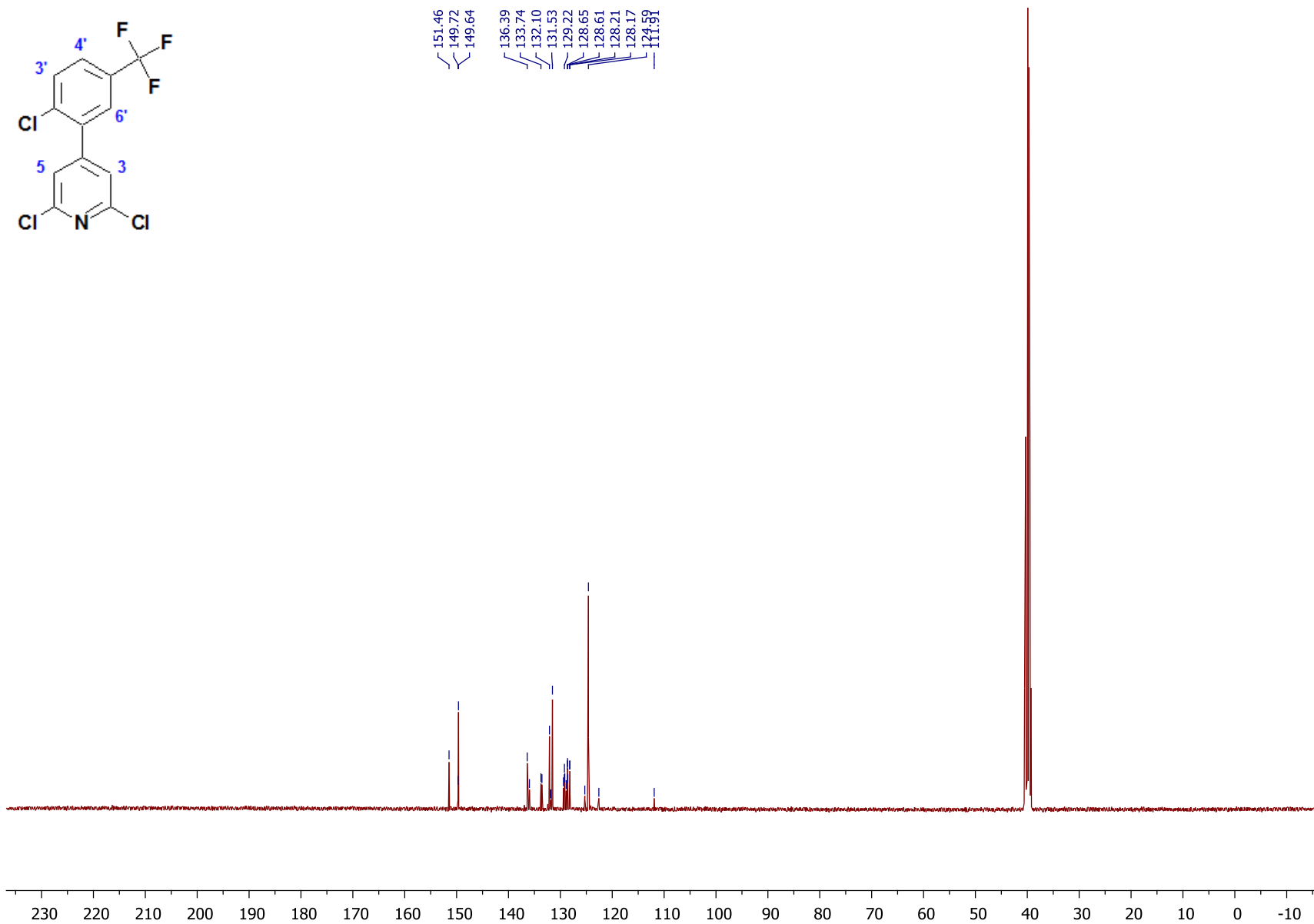
Espectro 20. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 100 MHz) de 2,6-dicloro-4-[4-(trifluorometil)fenil]piridina (S1-7-7).

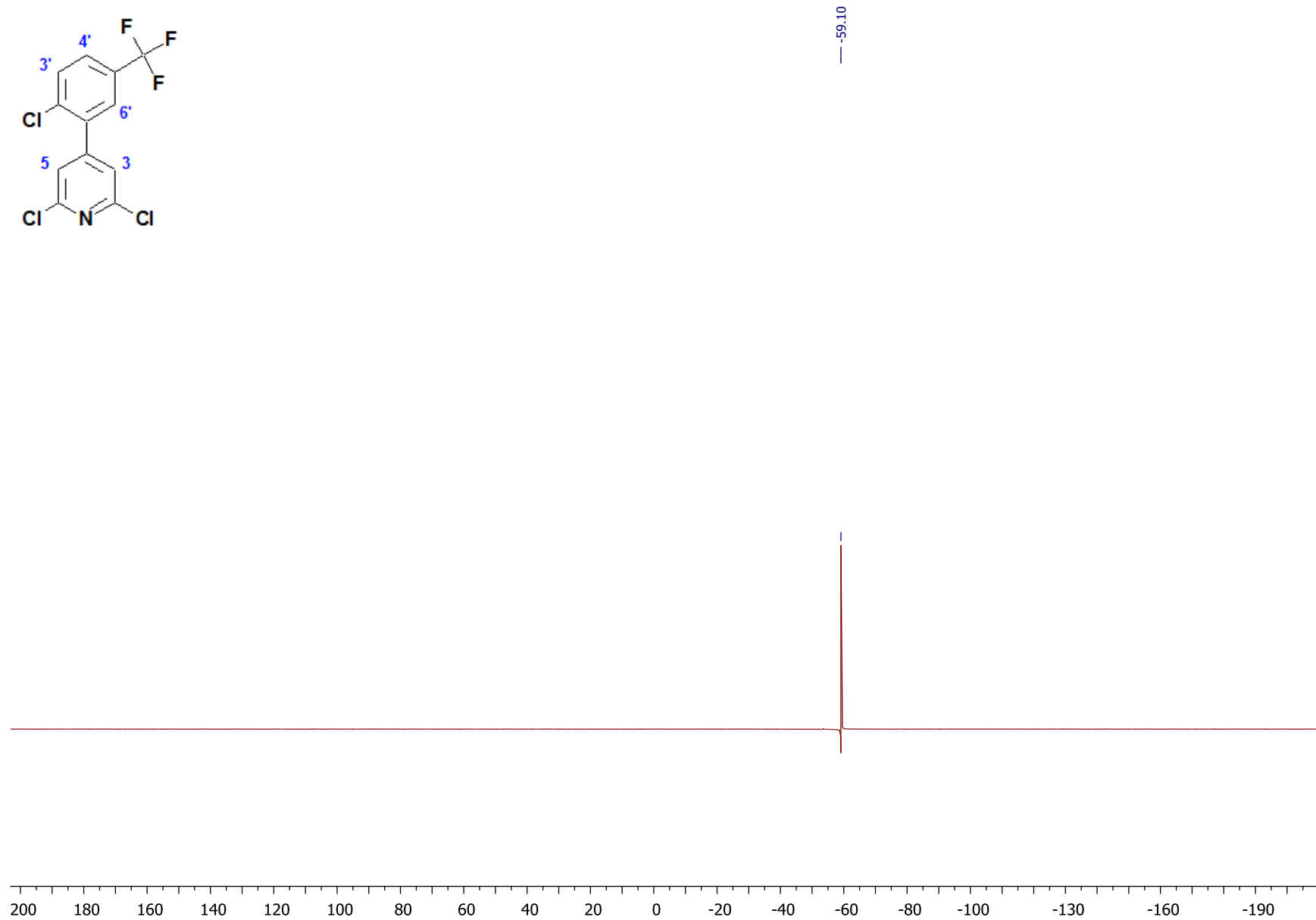
Espectro 21. RMN ^{19}F (DMSO- d_6 , 376.5 MHz) de 2,6-dicloro-4-[4-(trifluorometil)fenil]piridina (**S1-7-7**).

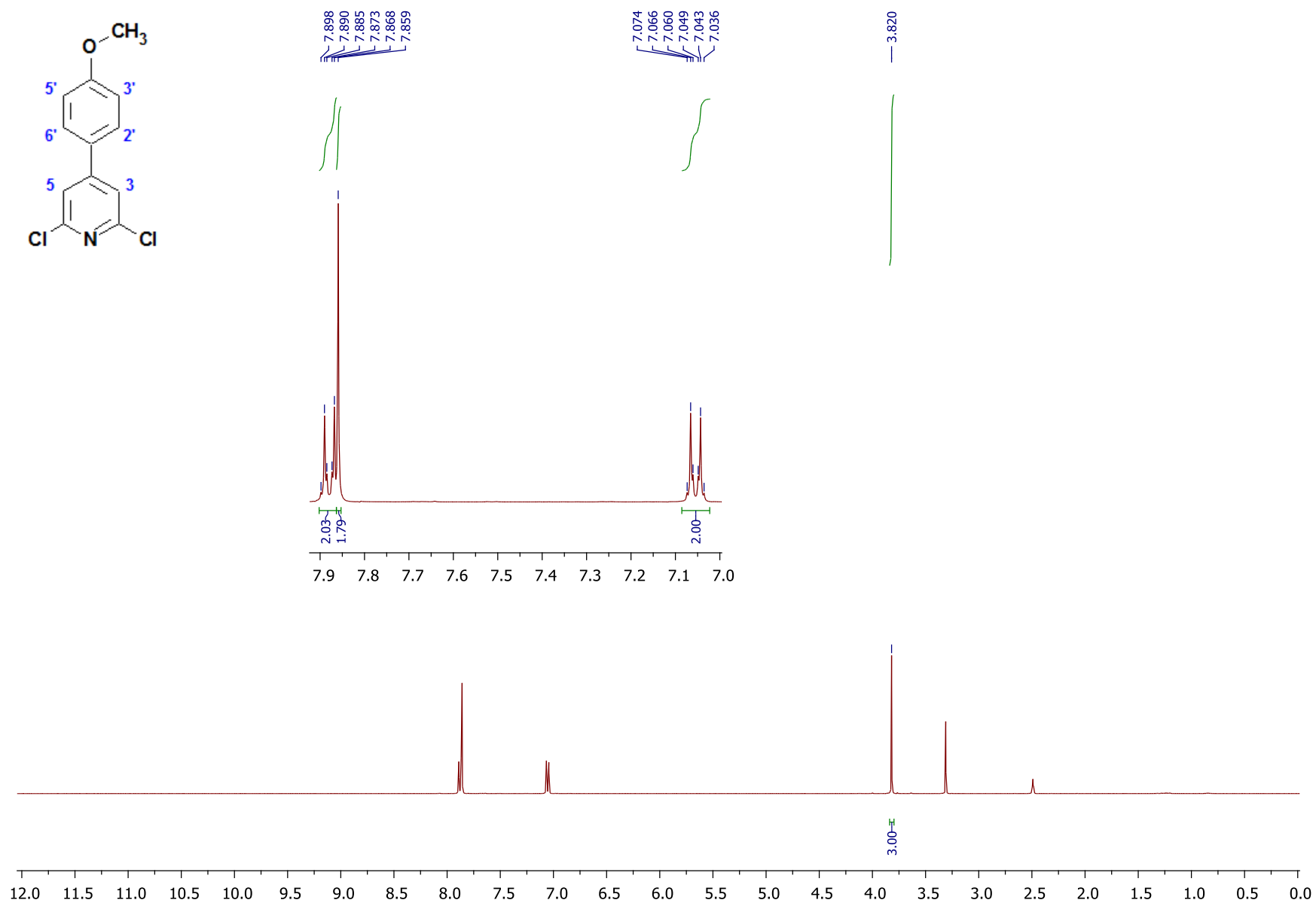
Espectro 22. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) de 4-(2,6-dicloropiridin-4-il)fenol (**S1-8-8**).

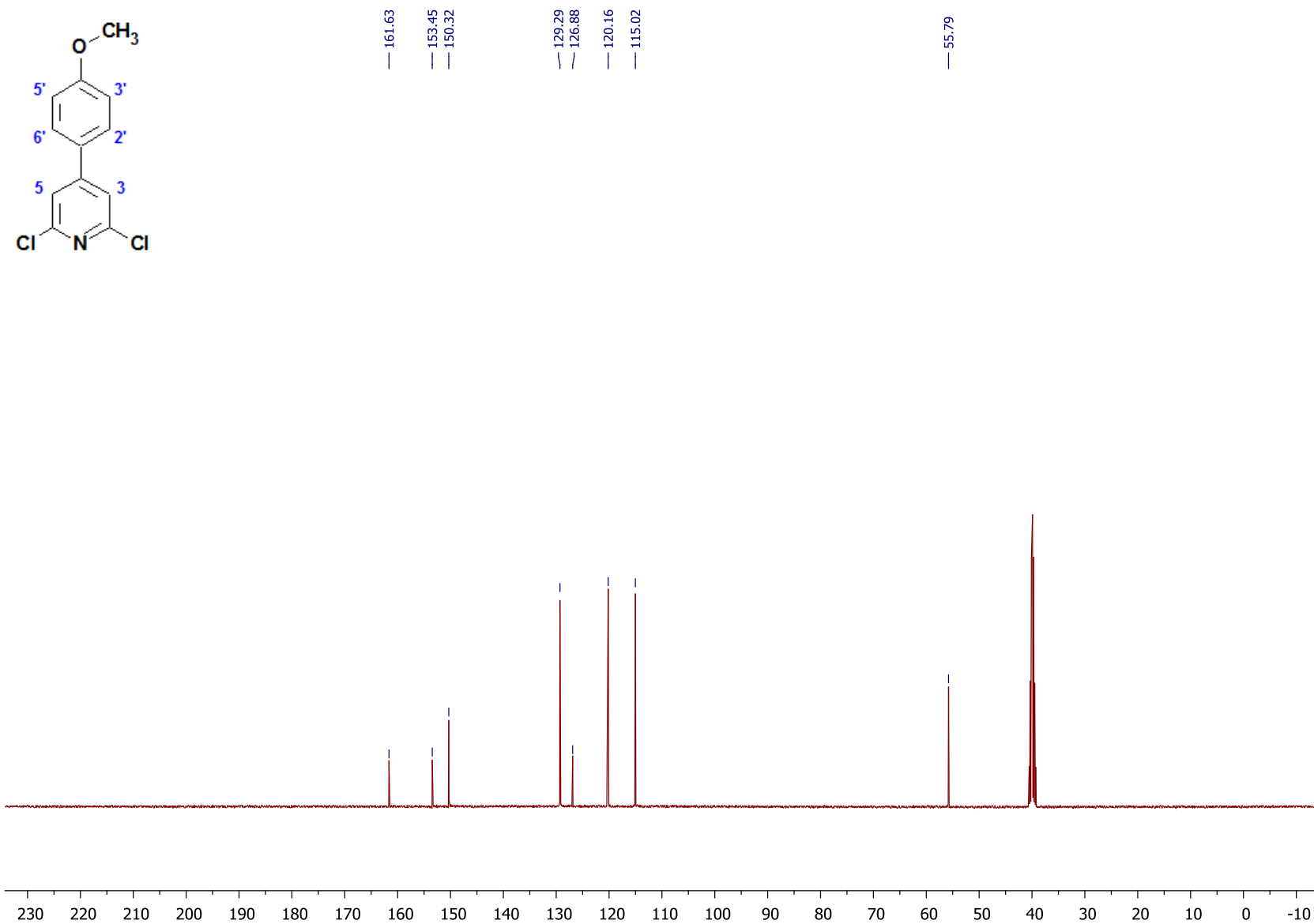
Espectro 23. RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) de 4-(2,6-dicloropiridin-4-il)fenol (**S1-8-8**).

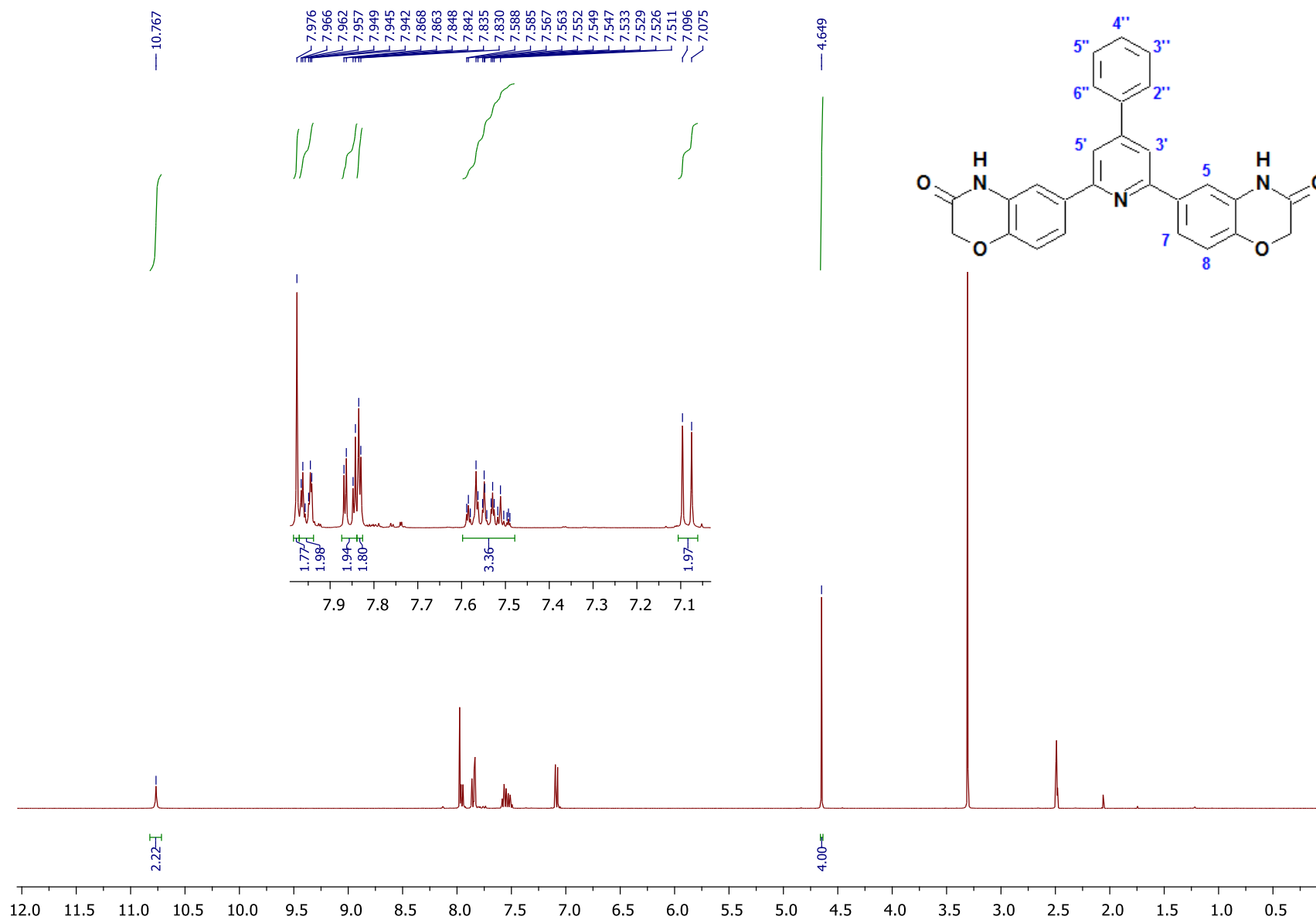
Espectro 24. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) de 2,6-dicloro-4-[2-cloro-5-(trifluorometil)fenil]piridina (**S1-9-9**).

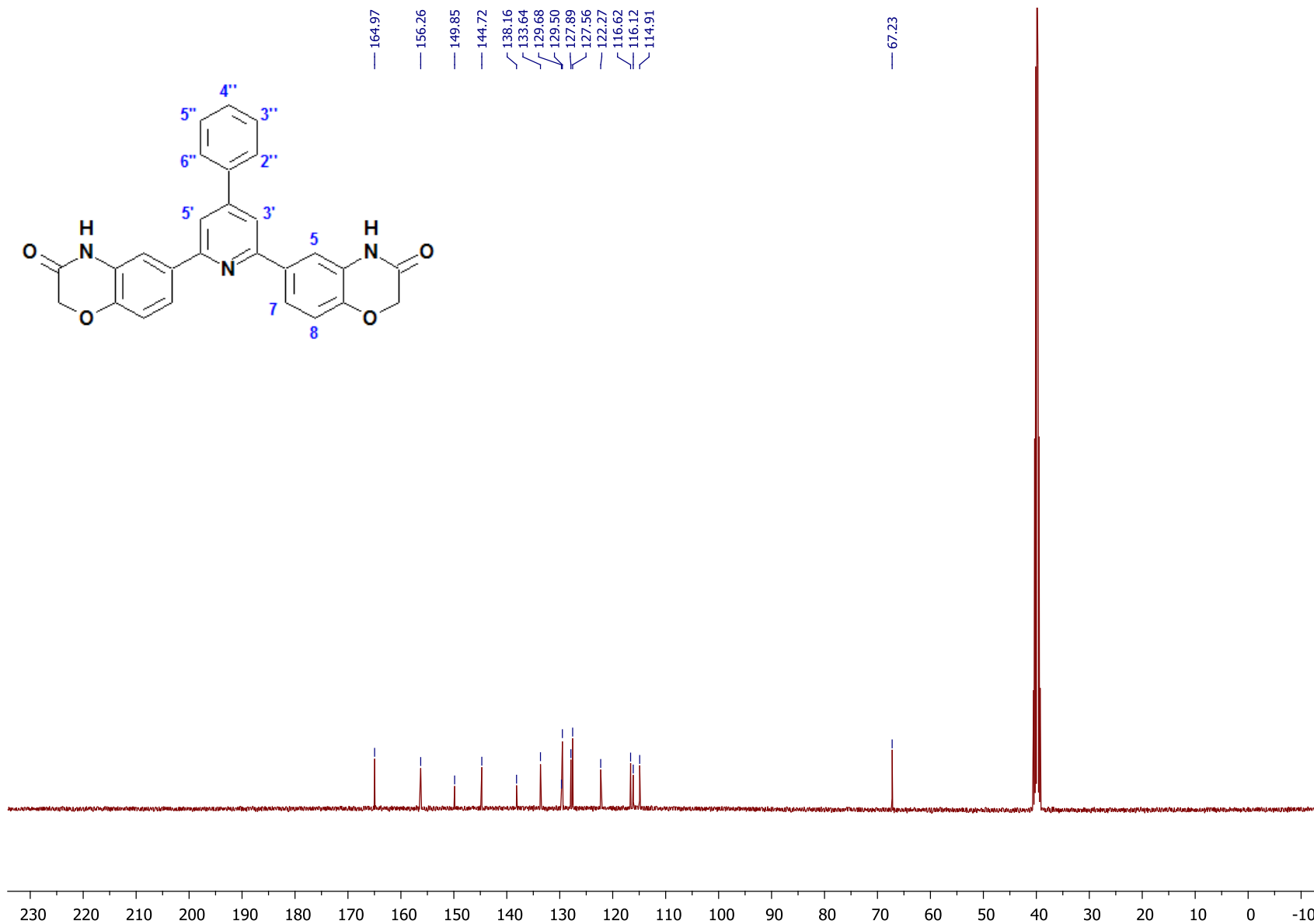
Espectro 25. RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) de 2,6-dicloro-4-[2-cloro-5-(trifluorometil)fenil]piridina (S1-9-9).

Espectro 26. RMN ^{19}F (DMSO- d_6 , 376.5 MHz) de 2,6-dicloro-4-[2-cloro-5-(trifluorometil)fenil]piridina (**S1-9-9**).

Espectro 27. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz) de 2,6-dicloro-4-(4-metoxifenil)piridina (**S1-10-10**).

Espectro 28. RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 400 MHz) de 2,6-dicloro-4-(4-metoxifenil)piridina (S1-10-10).

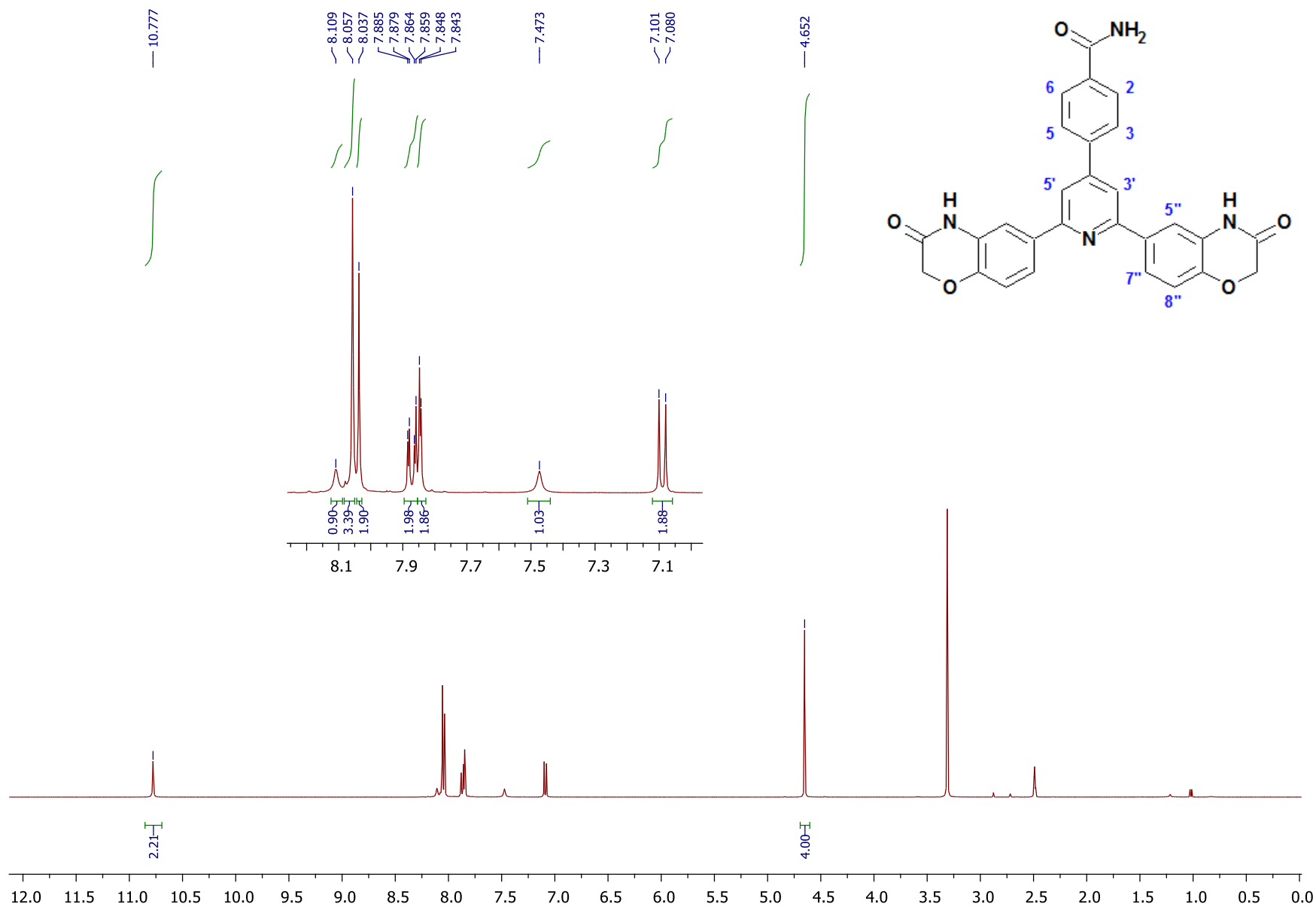
Espectro 29. RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) de 6,6'-(4-fenilpiridin-2,6-diil)bis(2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-ona) (**S1-1**).

Espectro 30. RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) de 6,6'-(4-fenilpiridin-2,6-diil)bis(2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona) (**S1-1**).

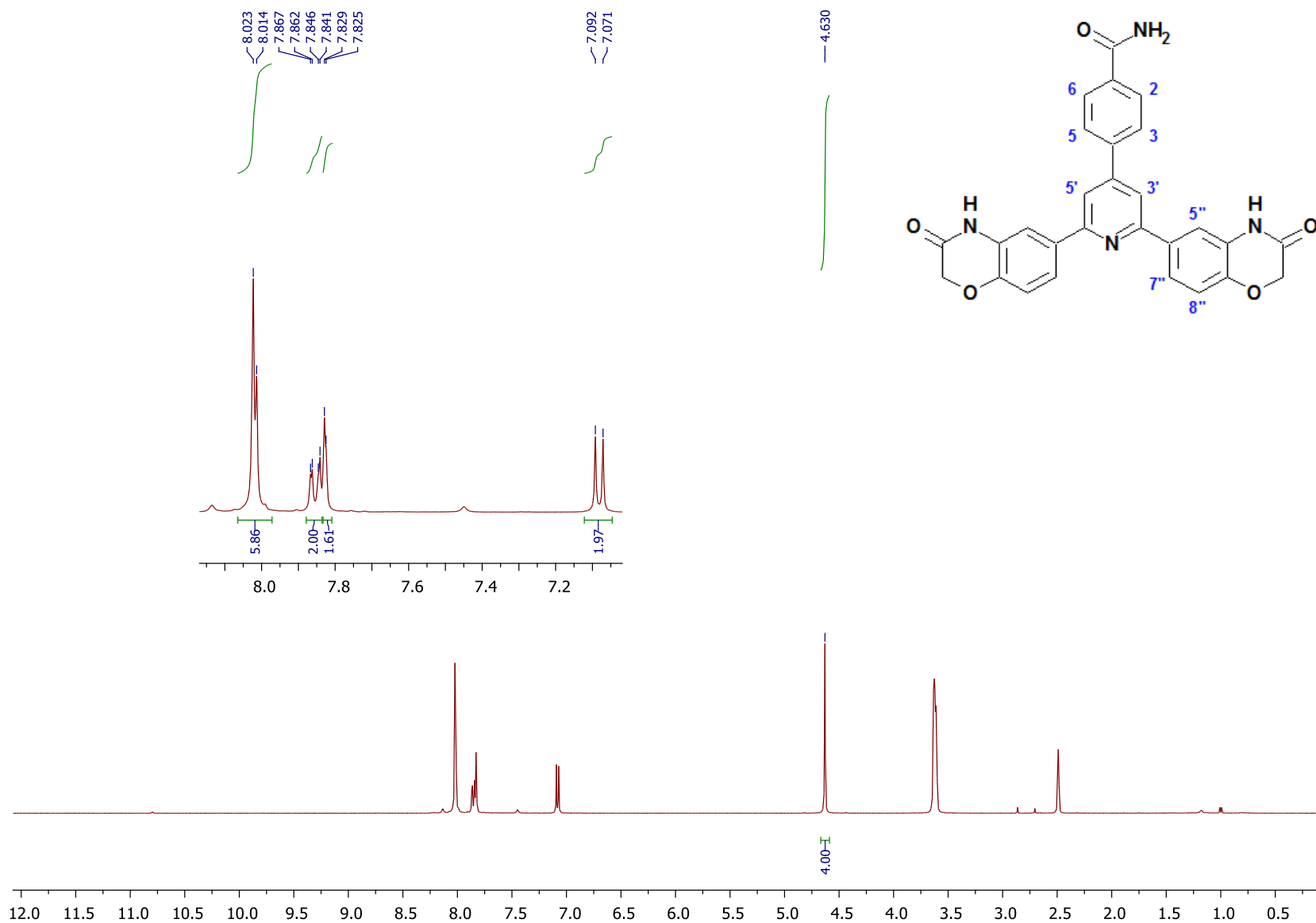
Data : Dr Castillo Rafael012 Date : 04-Oct-2016 13:24
Instrument : MStation
Sample : 318 STE-6531 S1-1
Note : Operador: Carmen Garcia-Javier Perez
Inlet : Direct Ion Mode : EI+
RT : 4.67 min Scan# : (69,98)
Elements : C 40/0, H 60/0, N 4/1, O 5/2
Mass Tolerance : 3ppm, 2mmu if m/z < 667, 50mmu if m/z > 16667
Unsaturation (U.S.) : -0.5 - 26.0

	Observed m/z	Int%					
	449.1387	100.00					
	Estimated m/z	Err [ppm / mmu]	U.S.	C	H	N	O
1	449.1376	+2.5 / +1.1	20.0	27	19	3	4

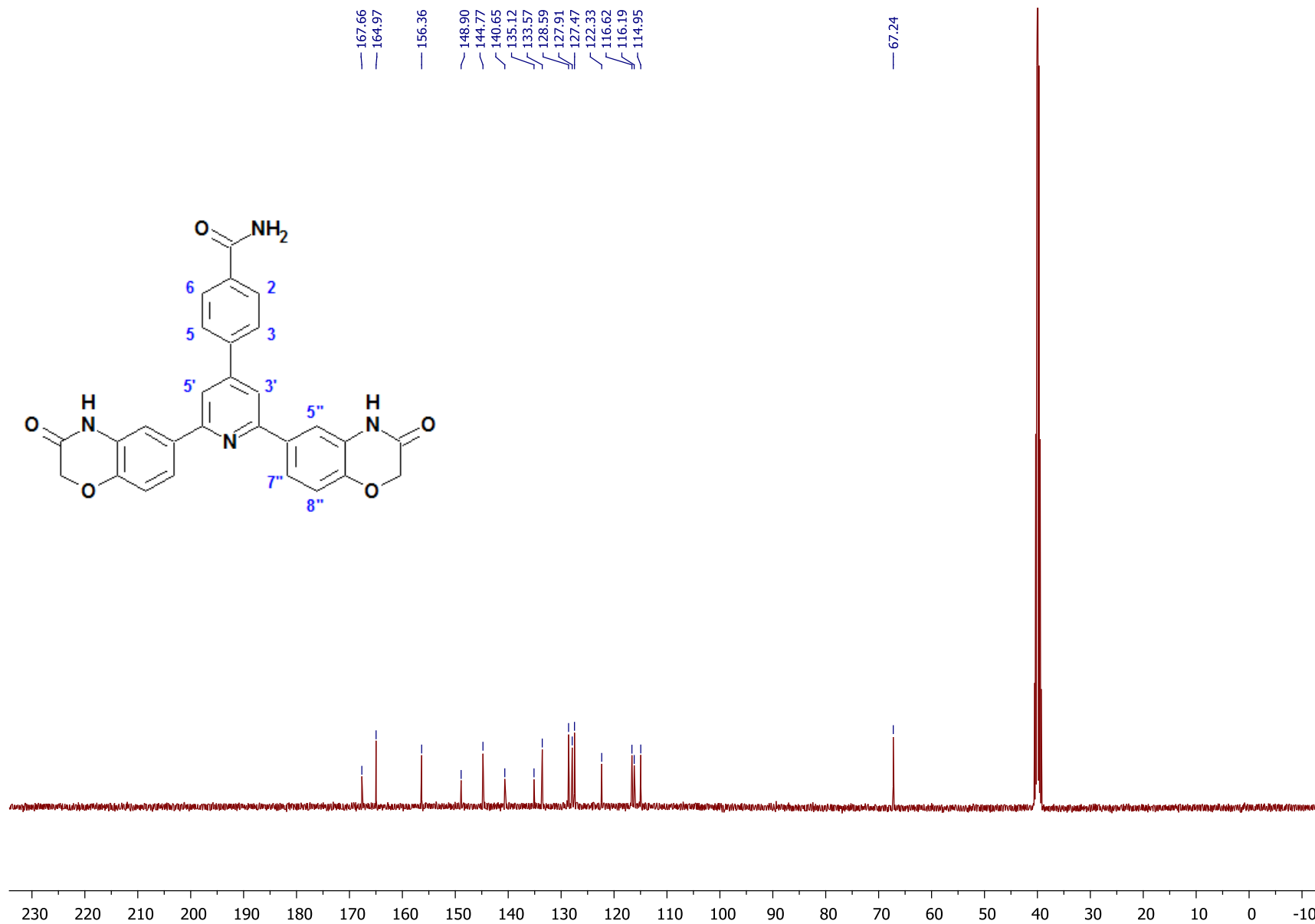
Espectro 31. EM-AR (IE^+) de 6,6'-(4-fenilpiridin-2,6-diil)bis(2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-ona) (**S1-1**).



Espectro 32. RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) de 4-[2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-il]benzamida (**S1-2**).



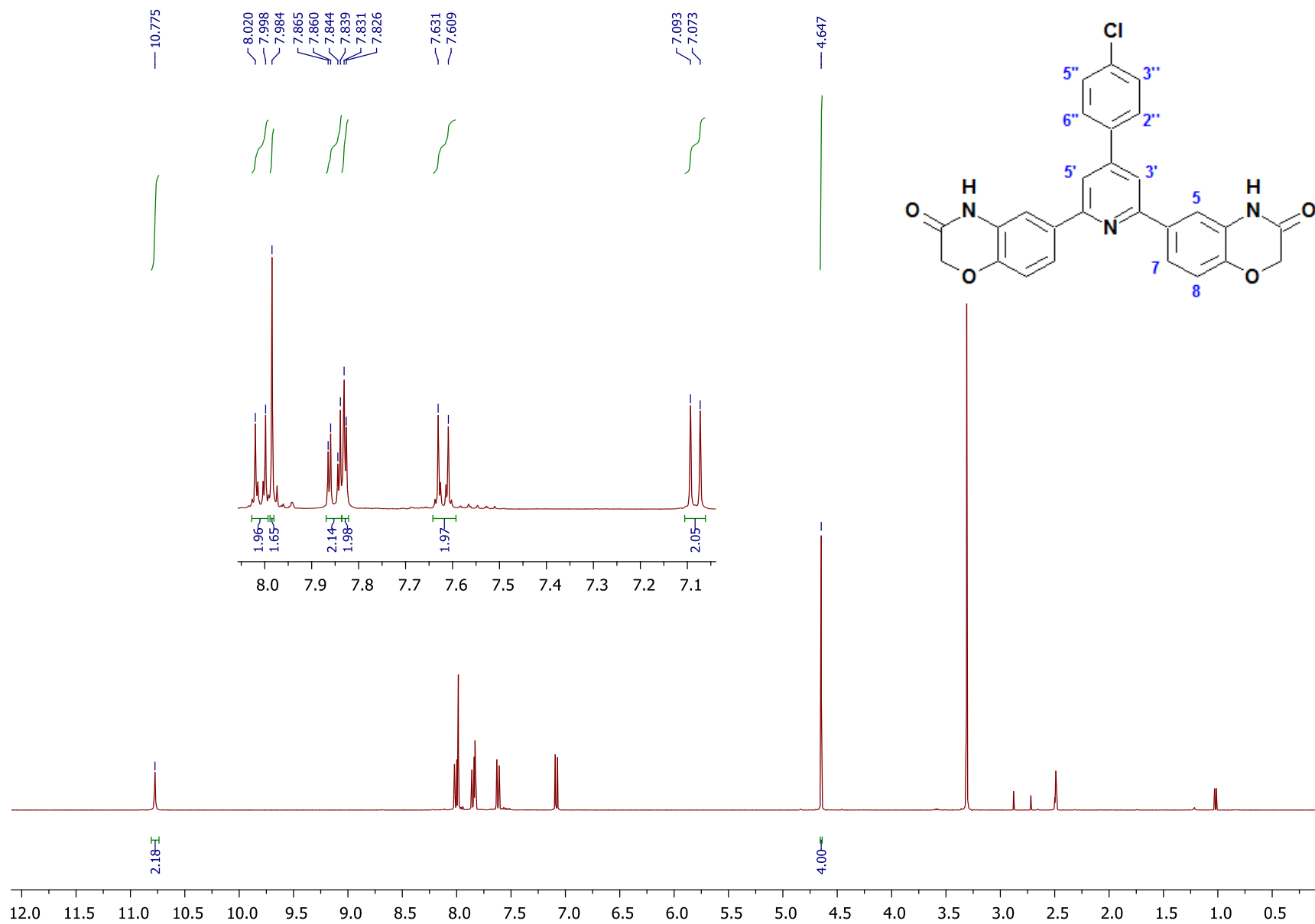
Espectro 33. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) int. con D_2O de 4-[2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-il]benzamida (S1-2).

Espectro 34. RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) de 4-[2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-il]benzamida (S1-2).

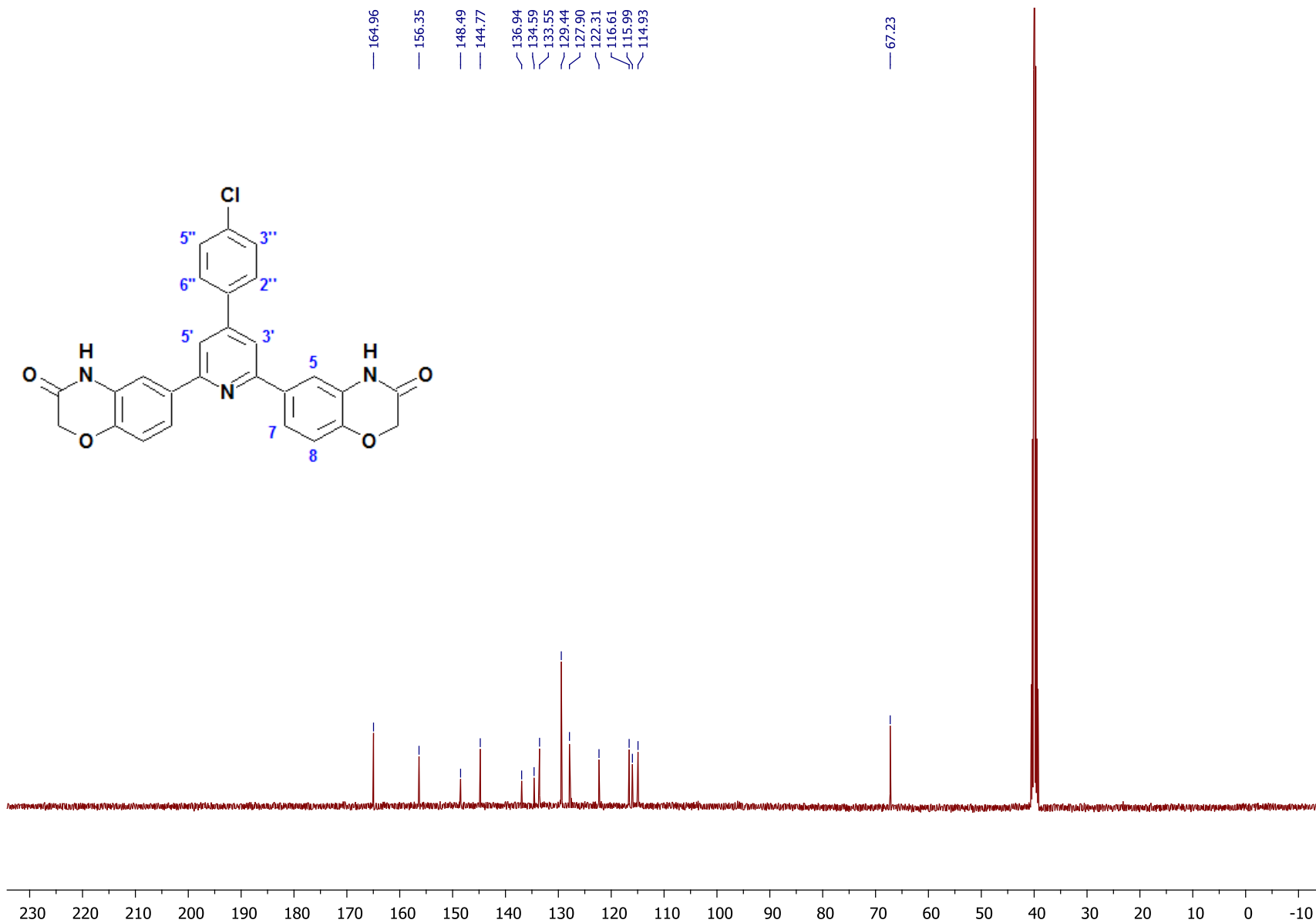
Data : Dr Castillo Rafael013 Date : 04-Oct-2016 13:37
Instrument : MStation
Sample : 319 STE-6532 S1-2
Note : Operador: Carmen Garcia-Javier Perez
Inlet : Direct Ion Mode : EI+
RT : 3.73 min Scan# : (55,87)
Elements : C 40/0, H 60/0, N 6/2, O 6/3
Mass Tolerance : 5ppm, 4mmu if m/z < 800, 50mmu if m/z > 10000
Unsaturation (U.S.) : -0.5 - 25.0

	Observed m/z	Int%				
	492.1430	12.56				
	Estimated m/z	Err [ppm / mmu] U.S.	C	H	N	O
1	492.1434	-0.8 / -0.4 21.0	28	20	4	5

Espectro 35. EM-AR (IE⁺) de 4-[2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-il]benzamida (**S1-2**).



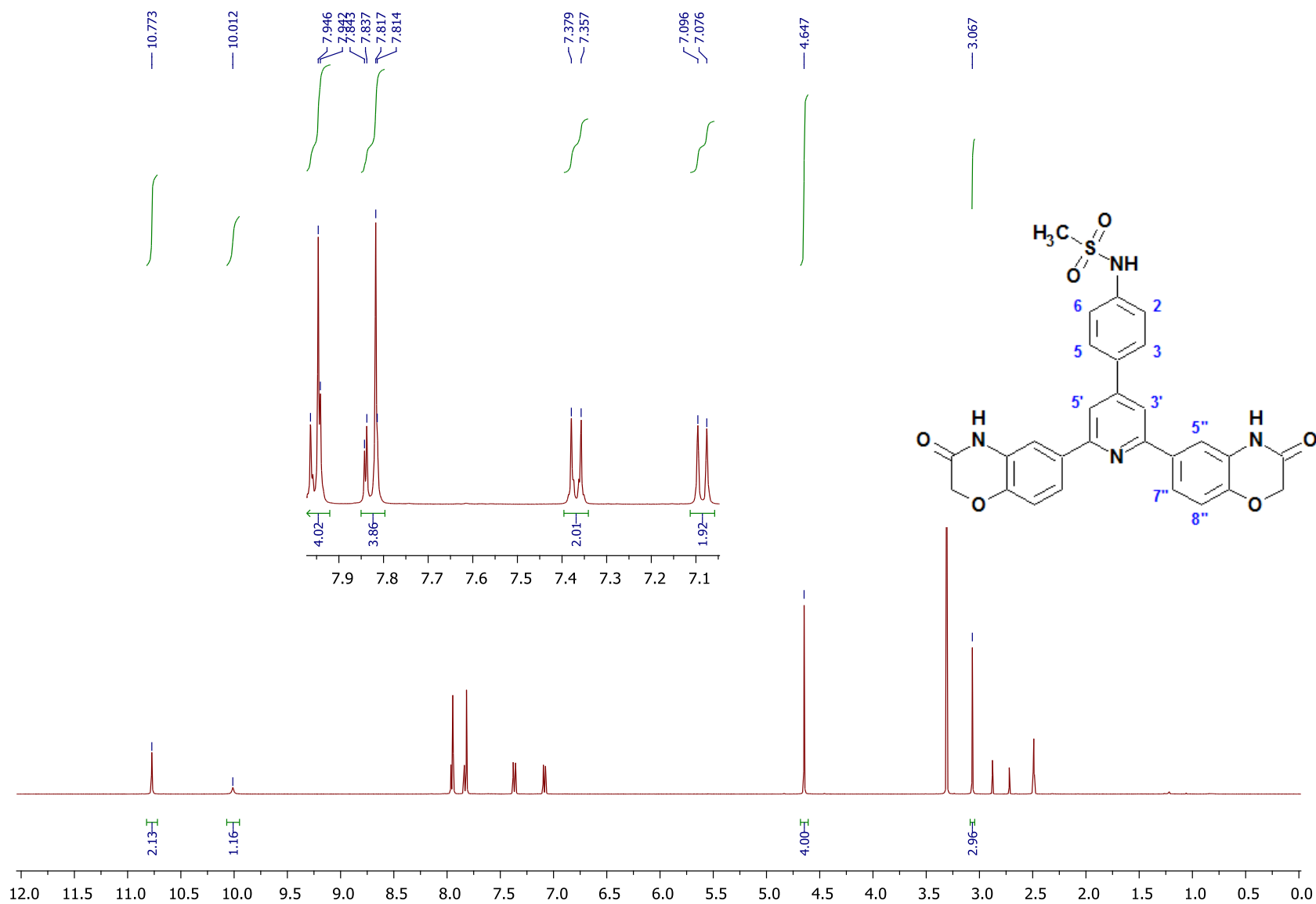
Espectro 36. RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) de 6,6'-[4-(4-clorofenil)piridin-2,6-diil]bis(2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-ona) (**S1-3**).

Espectro 37. RMN ^{13}C (DMSO- D_6 , 100 MHz) de 6,6'-[4-(4-clorofenil)piridin-2,6-diil]bis(2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona) (S1-3).

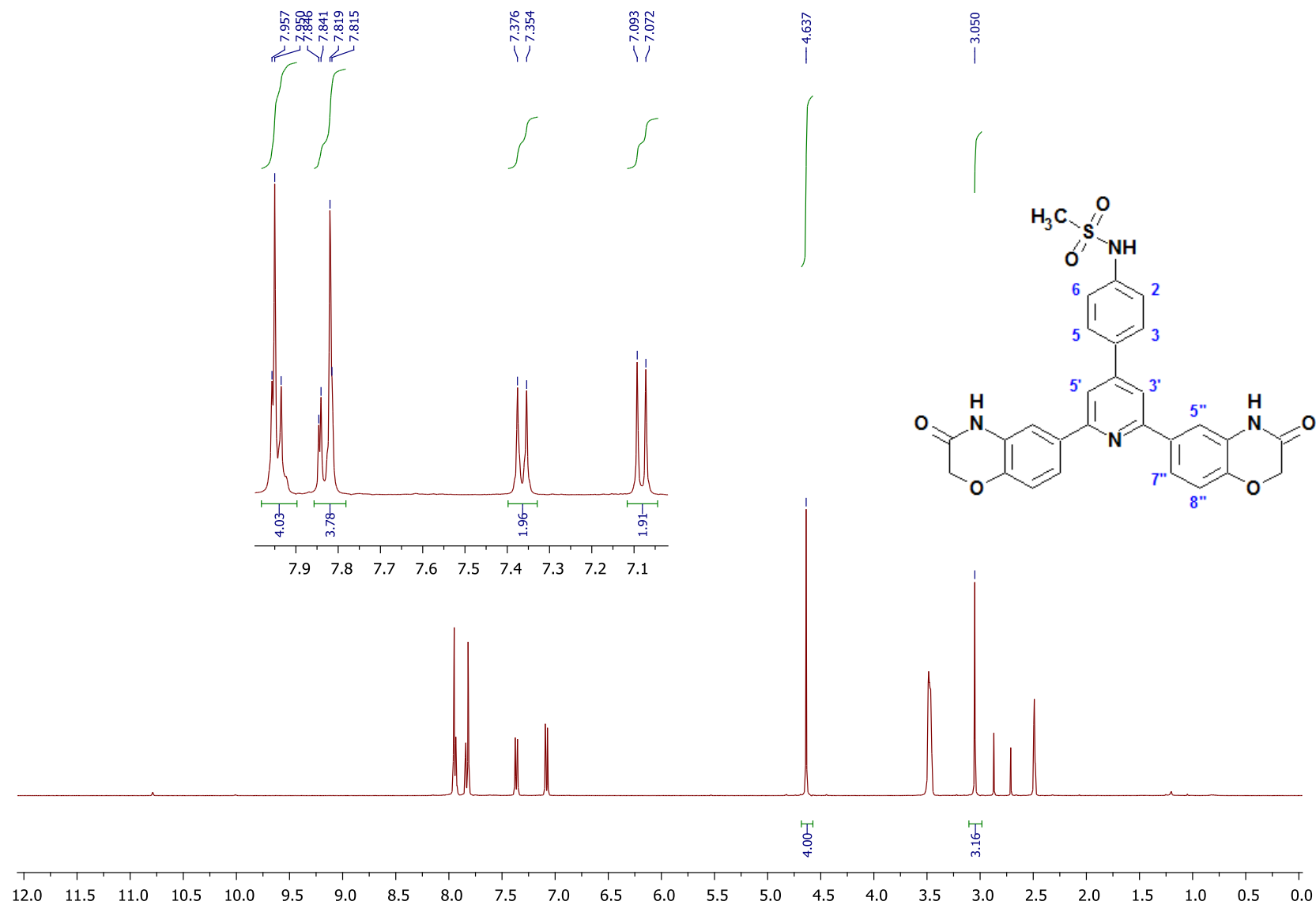
Data : Dr Castillo Rafael016 Date : 04-Oct-2016 16:28
Instrument : MStation
Sample : 323 STE-6536 S1-3
Note : Operador: Carmen Garcia-Javier Perez
Inlet : Direct Ion Mode : EI+
RT : 2.97 min Scan# : (44,48)
Elements : C 27/27, H 18/0, 35Cl 1/0, 37Cl 1/0, N 3/0, O 4/0
Mass Tolerance : 1000ppm, 5mmu if m/z < 5, 50mmu if m/z > 50
Unsaturation (U.S.) : -0.5 - 20.0

Observed m/z	Int%	Err[ppm / mmu]	U.S. Composition
1 483.0981	100.00	-1.0 / -0.5	20.0 C27 H18 35Cl N3 O4

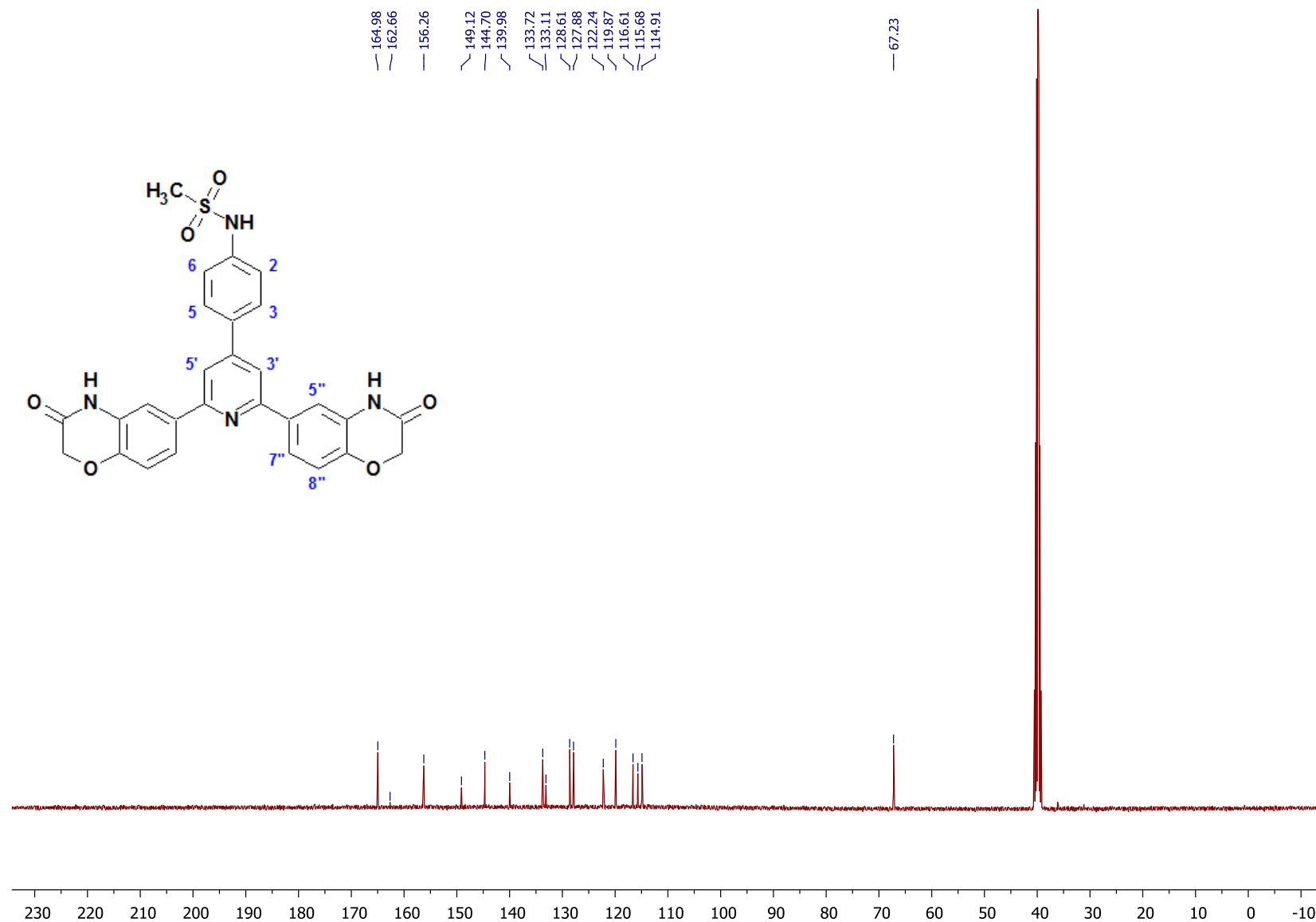
Espectro 38. EM-AR (IE⁺) de 6,6'-[4-(4-clorofenil)piridin-2,6-diil]bis(2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona) (S1-3).



Espectro 39. RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) de *N*-{4-[2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-il]fenil}metanosulfonamida (S1-4).



Espectro 40. RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) int. con D_2O de *N*-{4-[2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-il]fenil}metanosulfonamida (**S1-4**).

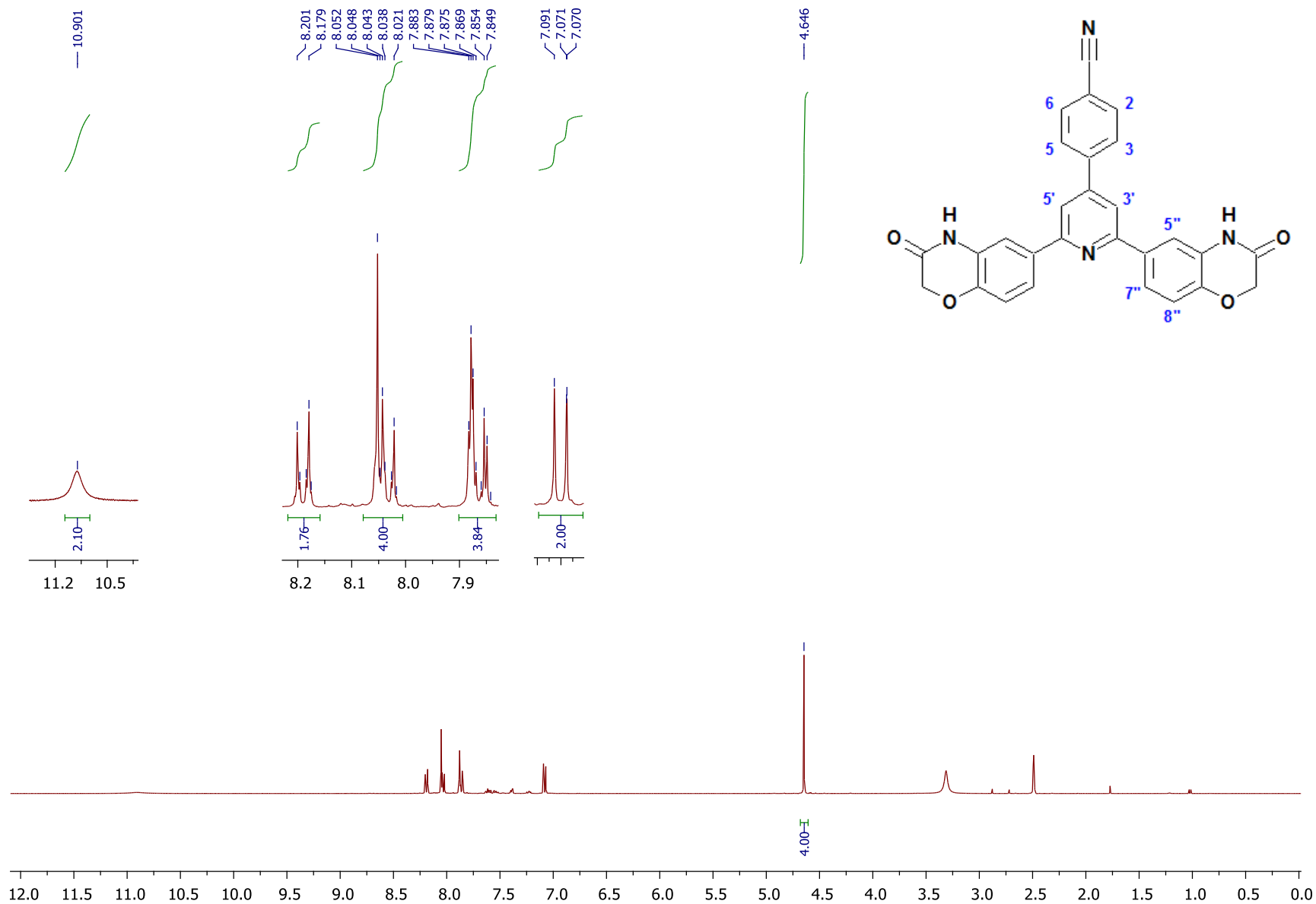


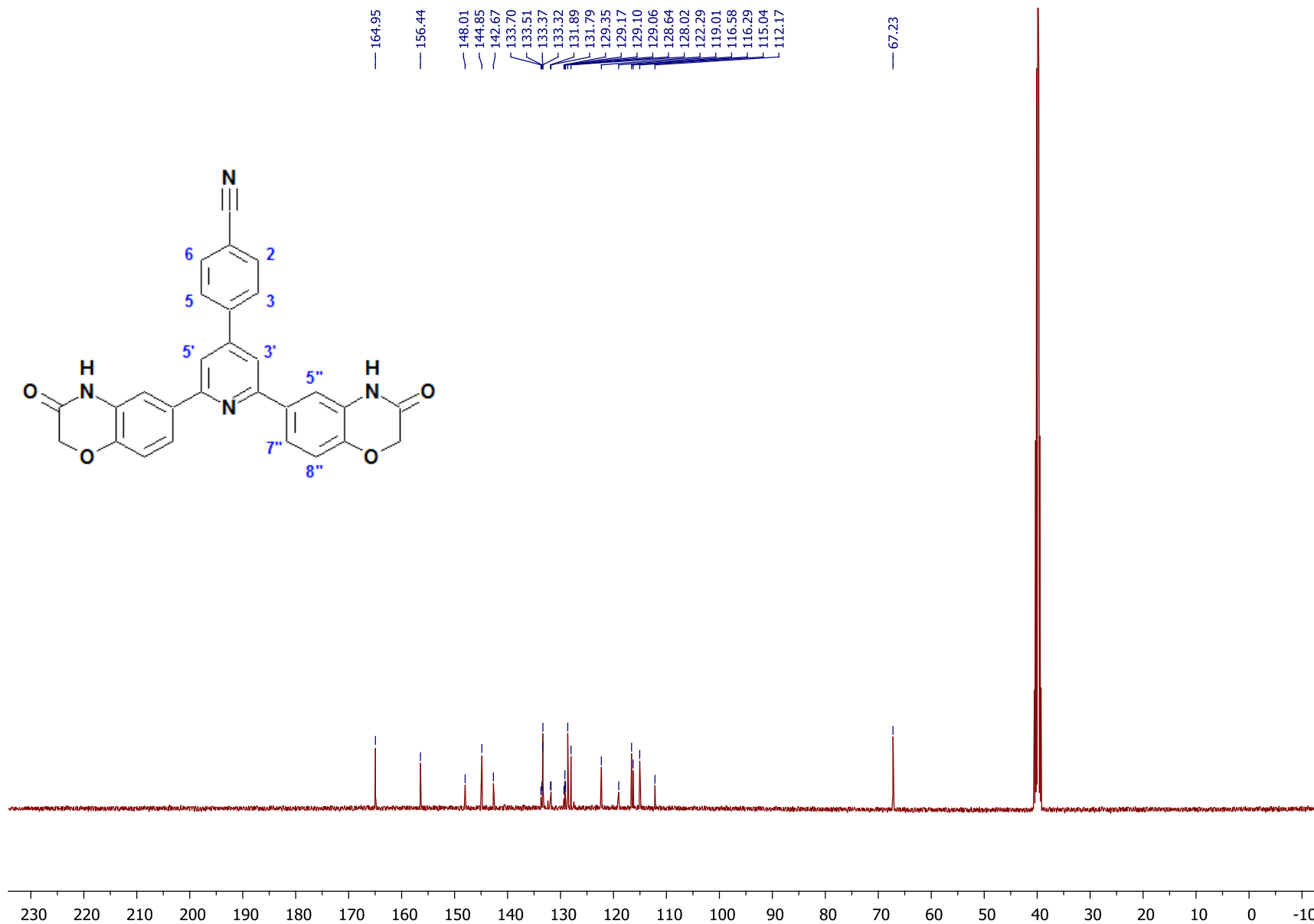
Espectro 41. RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz) de *N*-{4-[2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-il]fenil}metanosulfonamida (**S1-4**).

Data : Dr Castillo Rafael018 Date : 04-Oct-2016 17:20
Instrument : MStation
Sample : 324 STE-6537 S1-4
Note : Operador: Carmen Garcia-Javier Perez
Inlet : Direct Ion Mode : EI+
RT : 2.90 min Scan# : (55,57)
Elements : C 28/0, H 25/0, N 4/0, O 6/0, S 1/0
Mass Tolerance : 1000ppm, 5mmu if m/z < 5, 50mmu if m/z > 50
Unsaturation (U.S.) : -0.5 - 30.0

	Observed m/z	Int%						
	542.1262	100.00						
	Estimated m/z	Err [ppm / mmu]	U.S.	C	H	N	O	S
1	542.1260	+0.4 / +0.2	21.0	28	22	4	6	1

Espectro 42. EM-AR (IE⁺) de *N*-{4-[2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-il]fenil} metanosulfonamida (**S1-4**).

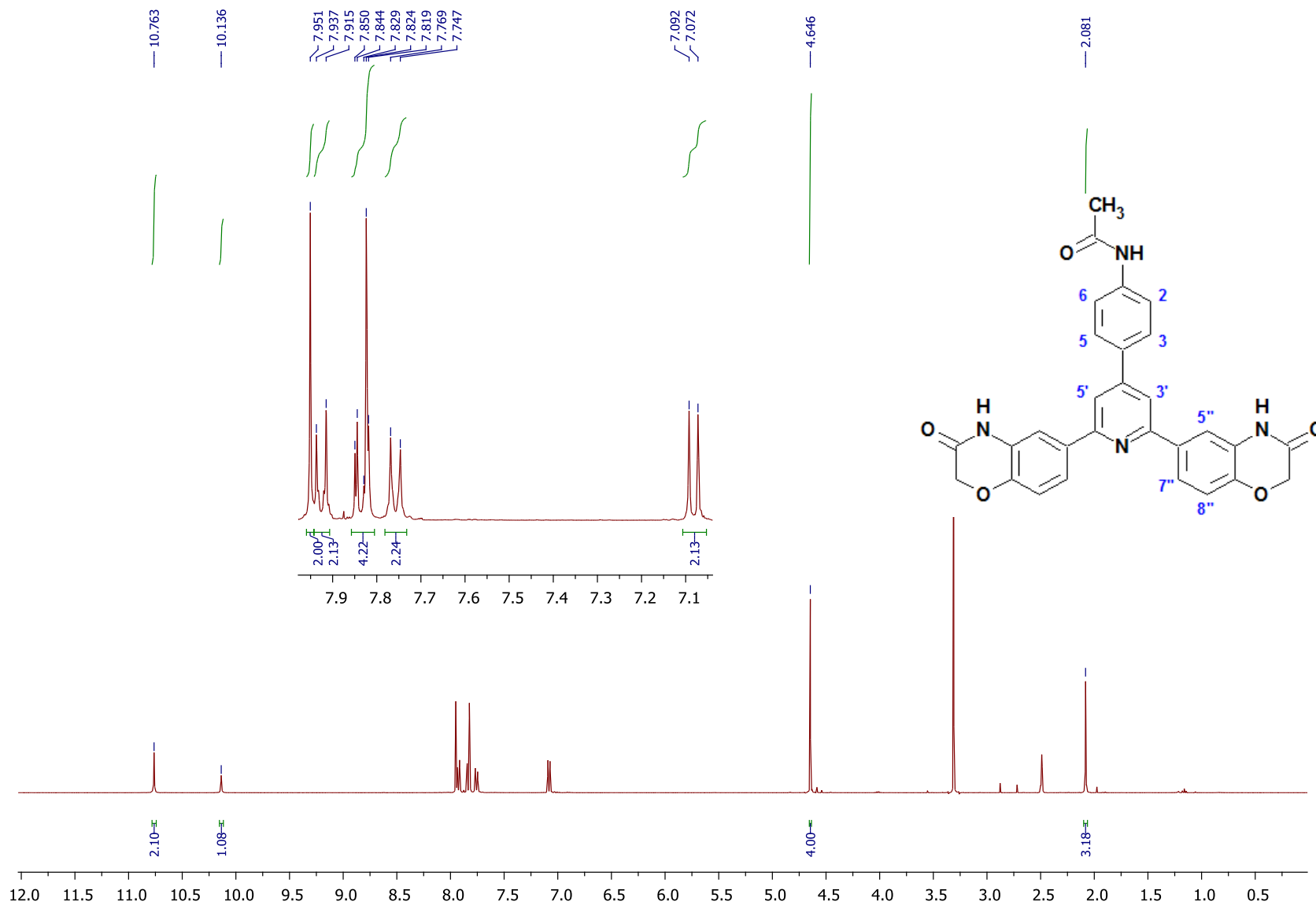
Espectro 43. RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) de 4-[2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-il]benzoniitrilo (**S1-5**).

Espectro 44. RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) de 4-[2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-il]benzoniitrilo (**S1-5**).

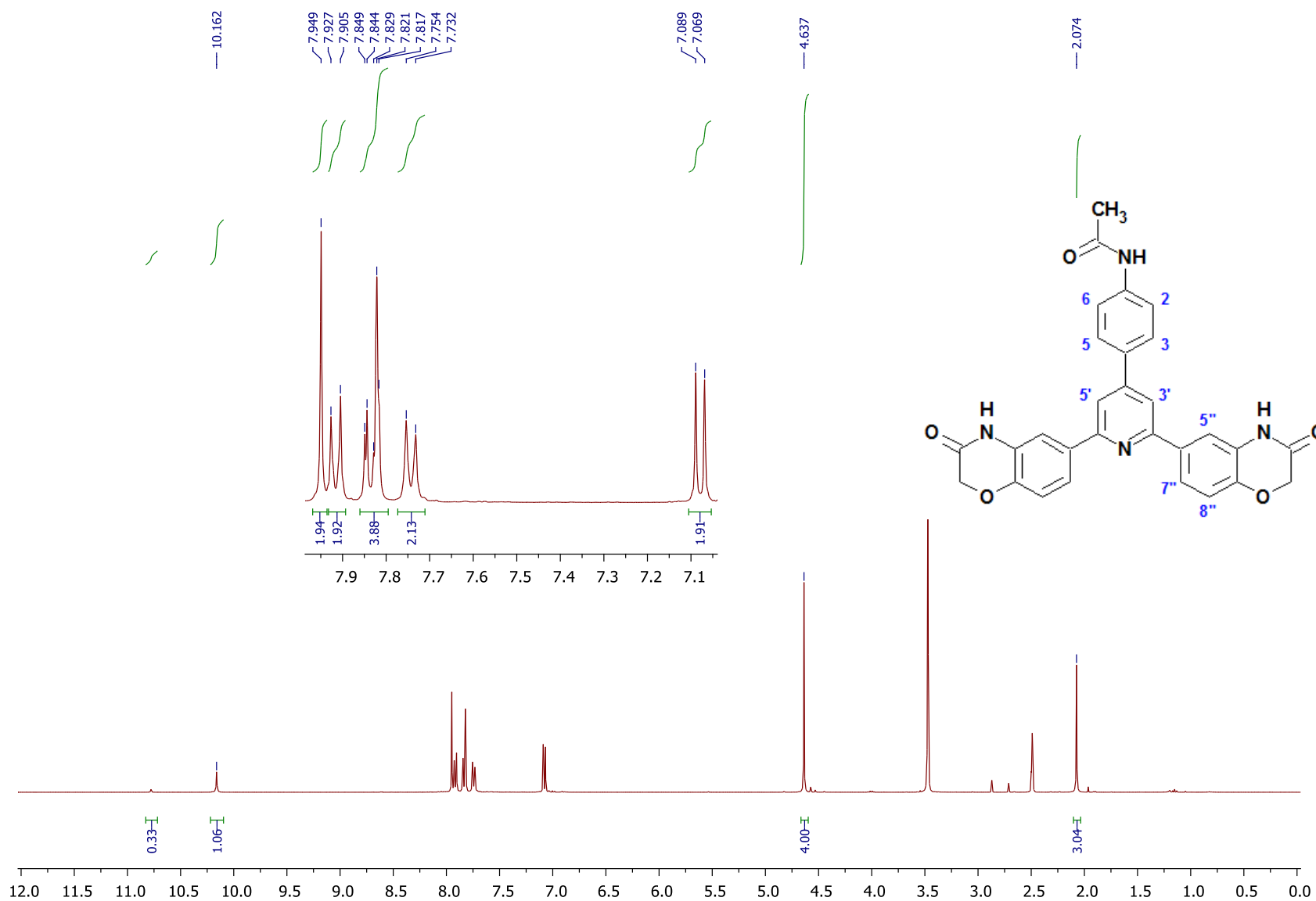
Data : Dr Castillo Rafael015 Date : 04-Oct-2016 16:57
Instrument : MStation
Sample : 320 STE-6533 S1-5
Note : Operador: Carmen Garcia-Javier Perez
Inlet : Direct Ion Mode : EI+
RT : 1.13 min Scan# : (19,21)
Elements : C 28/0, H 19/0, N 4/0, O 4/0
Mass Tolerance : 1000ppm, 5mmu if m/z < 5, 50mmu if m/z > 50
Unsaturation (U.S.) : -0.5 - 30.0

	Observed m/z	Int%					
	474.1322	100.00					
	Estimated m/z	Err [ppm / mmu]	U.S.	C	H	N	O
1	474.1328	-1.3 / -0.6	22.0	28	18	4	4

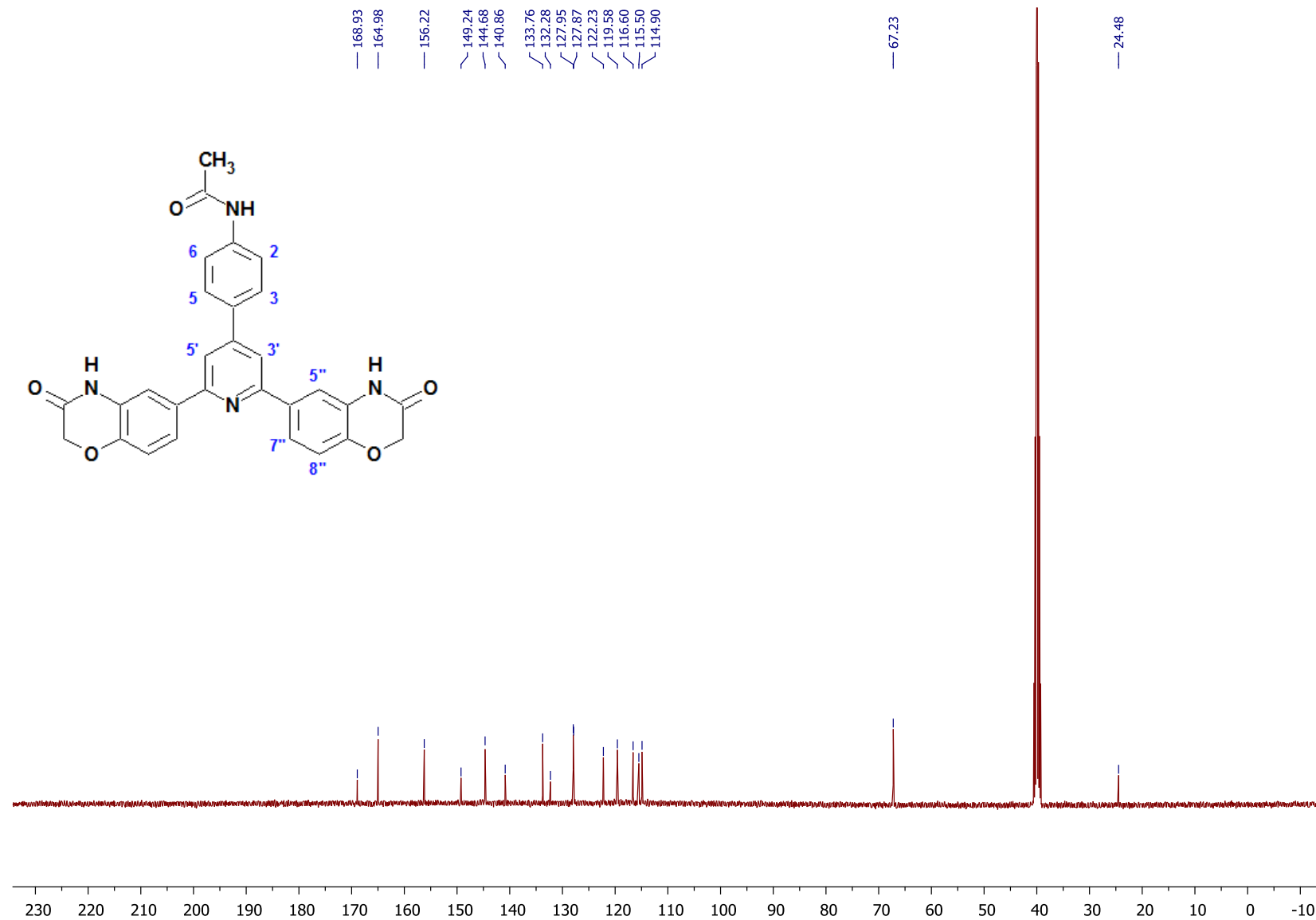
Espectro 45. EM-AR (IE^+) de 4-[2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-il]benzoniitrilo (**S1-5**).



Espectro 46. RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) de *N*-{4-[2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-il]fenil}acetamida (S1-6).



Espectro 47. RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) int. con D_2O de *N*-{4-[2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-il]fenil}acetamida (**S1-6**).

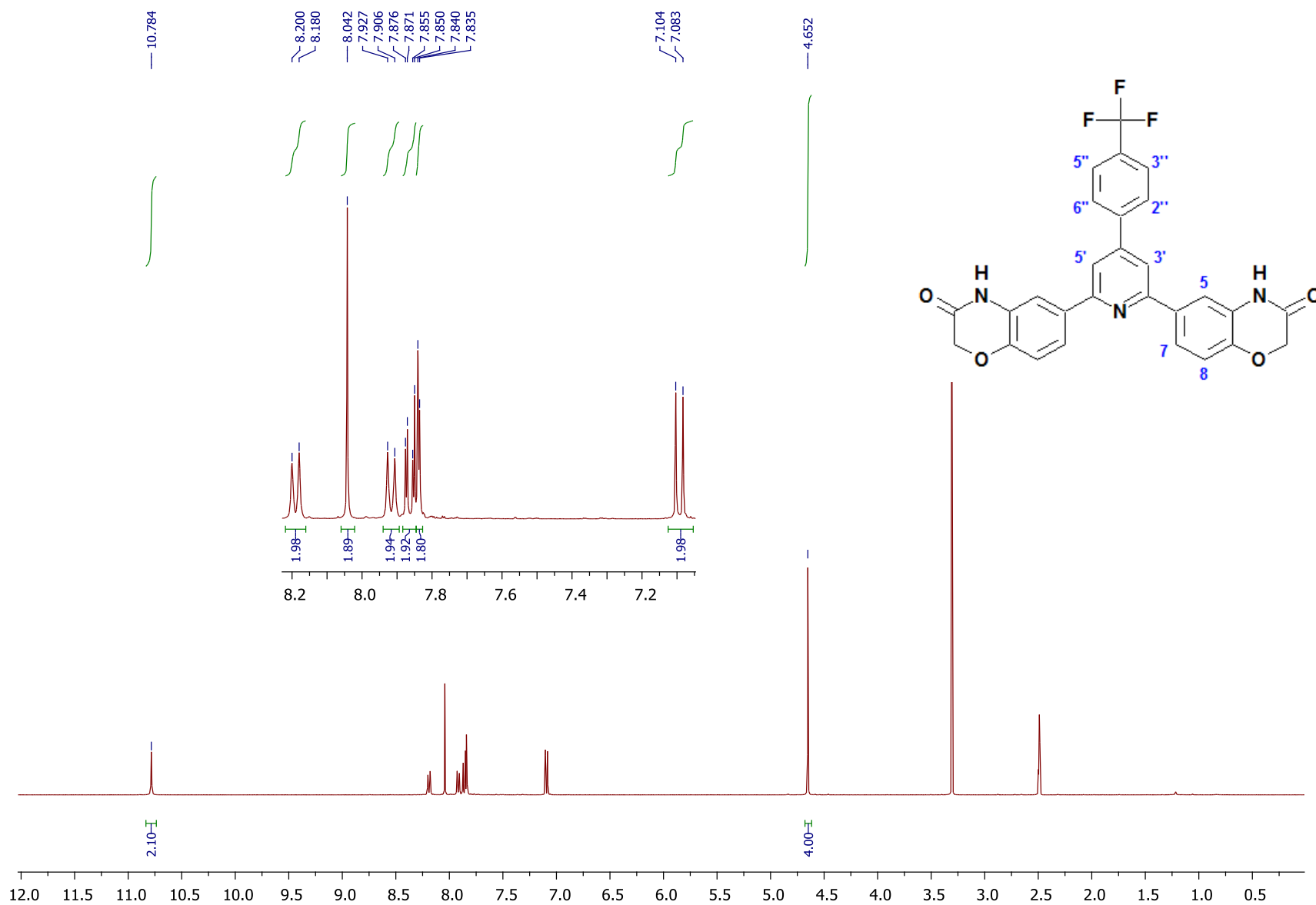


Espectro 48. RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz) de *N*-{4-[2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-il]fenil}acetamida (S1-6).

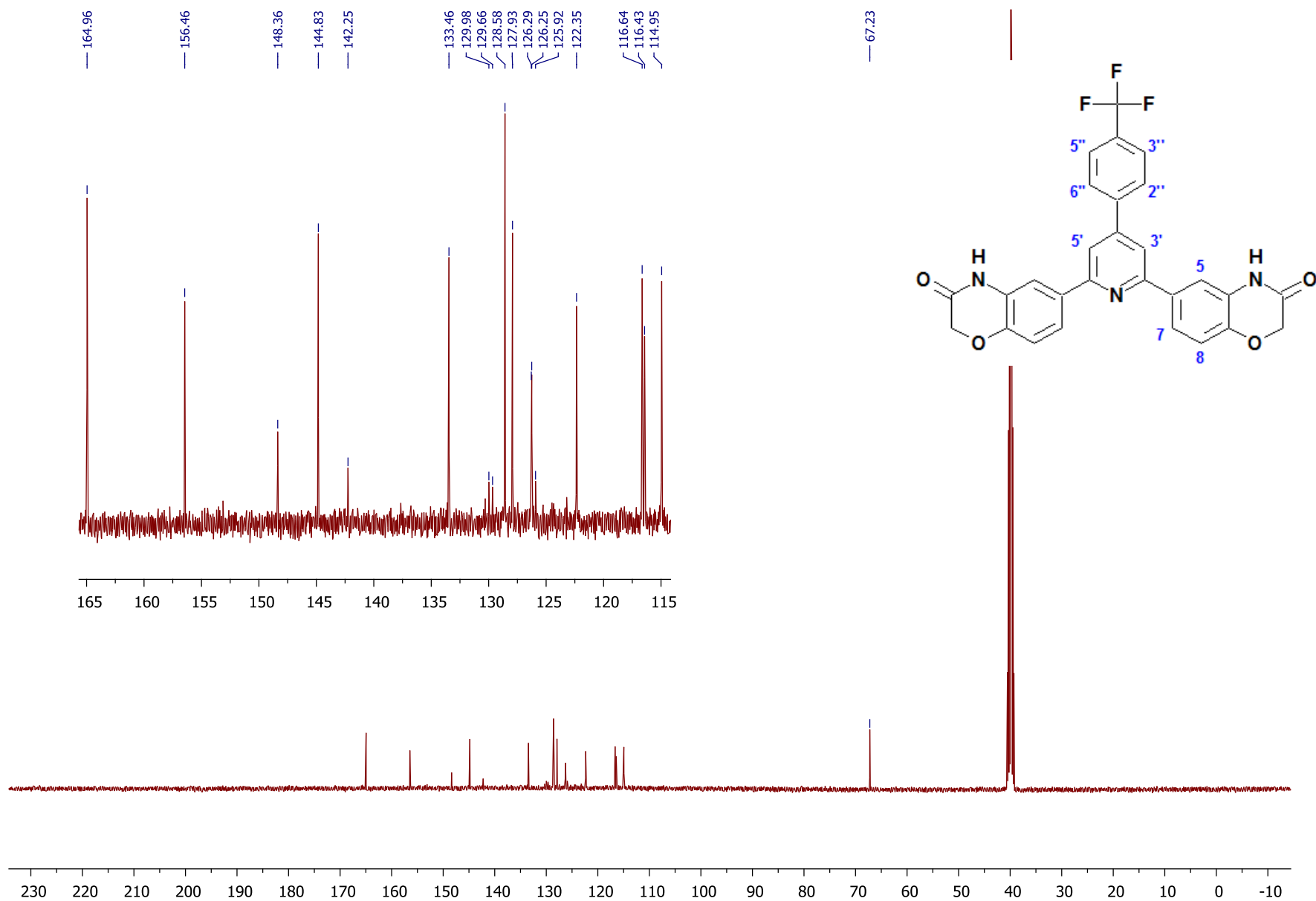
Data : Dr Castillo Rafael017 Date : 04-Oct-2016 17:05
 Instrument : MStation
 Sample : 322 STE-6535 S1-6
 Note : Operador: Carmen Garcia-Javier Perez
 Inlet : Direct Ion Mode : EI+
 RT : 2.06 min Scan# : (34,40)
 Elements : C 29/0, H 23/0, N 4/0, O 5/0
 Mass Tolerance : 1000ppm, 5mmu if m/z < 5, 50mmu if m/z > 50
 Unsaturation (U.S.) : -0.5 - 30.0

Observed m/z	Int%	Estimated m/z	Err [ppm / mmu]	U.S.	C	H	N	O
506.1599	100.00							
1 506.1590			+1.7 / +0.9	21.0	29	22	4	5

Espectro 49. EM-AR (IE⁺) de *N*-{4-[2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-il]fenil}acetamida (**S1-6**).



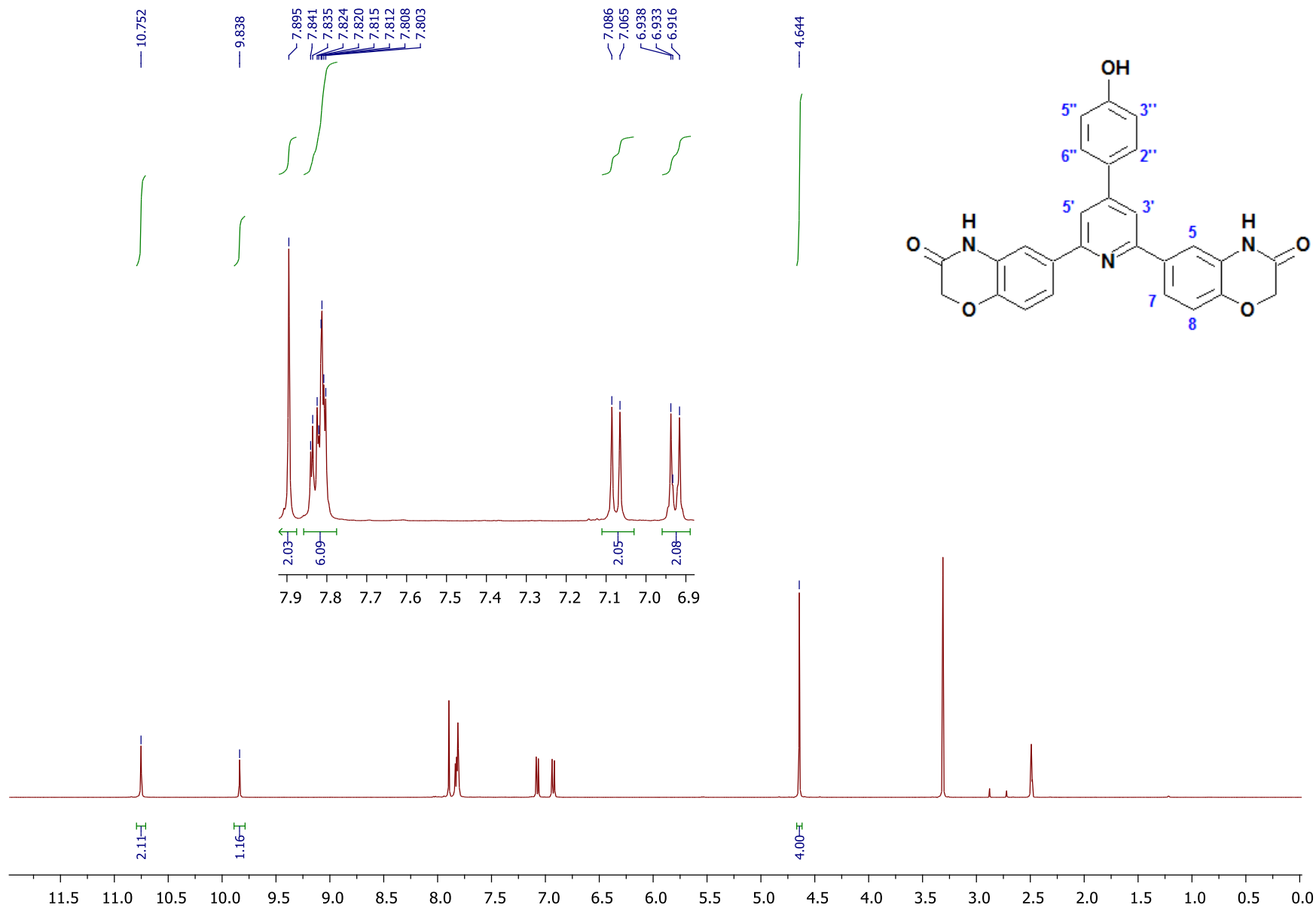
Espectro 50. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz) de 6,6'-{4-[4-(trifluorometil)fenil]piridin-2,6-diil}bis(2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-ona) (**S1-7**).

Espectro 51. RMN ^{13}C ($\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz) de 6,6'-{4-[4-(trifluorometil)fenil]piridin-2,6-diil}bis(2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-ona) (**S1-7**).

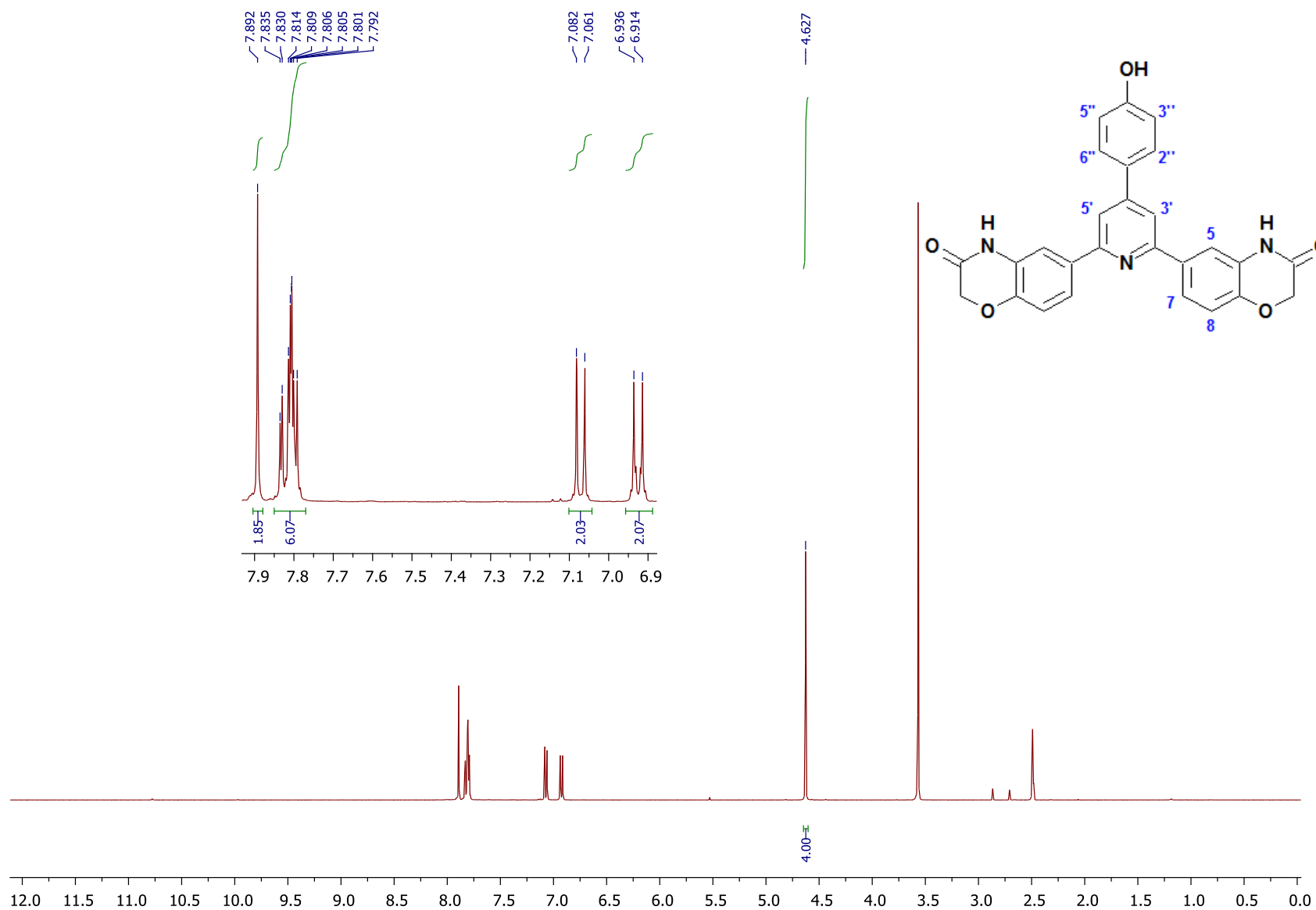
Data : Dr Castillo Rafael014 Date : 04-Oct-2016 16:07
Instrument : MStation
Sample : 321 STE-6534 S1-7
Note : Operador: Carmen Garcia-Javier Perez
Inlet : Direct Ion Mode : EI+
RT : 2.28 min Scan# : (34,54)
Elements : C 40/0, H 60/0, F 3/2, N 4/1, O 6/2
Mass Tolerance : 2ppm, 2mmu if m/z < 1000, 10mmu if m/z > 5000
Unsaturation (U.S.) : -0.5 - 26.0

	Observed m/z	Int%						
	517.1264	100.00						
	Estimated m/z	Err [ppm / mmu] U.S.	C	H	F	N	O	
1	517.1249	+2.8 / +1.5 20.0	28	18	3	3	4	

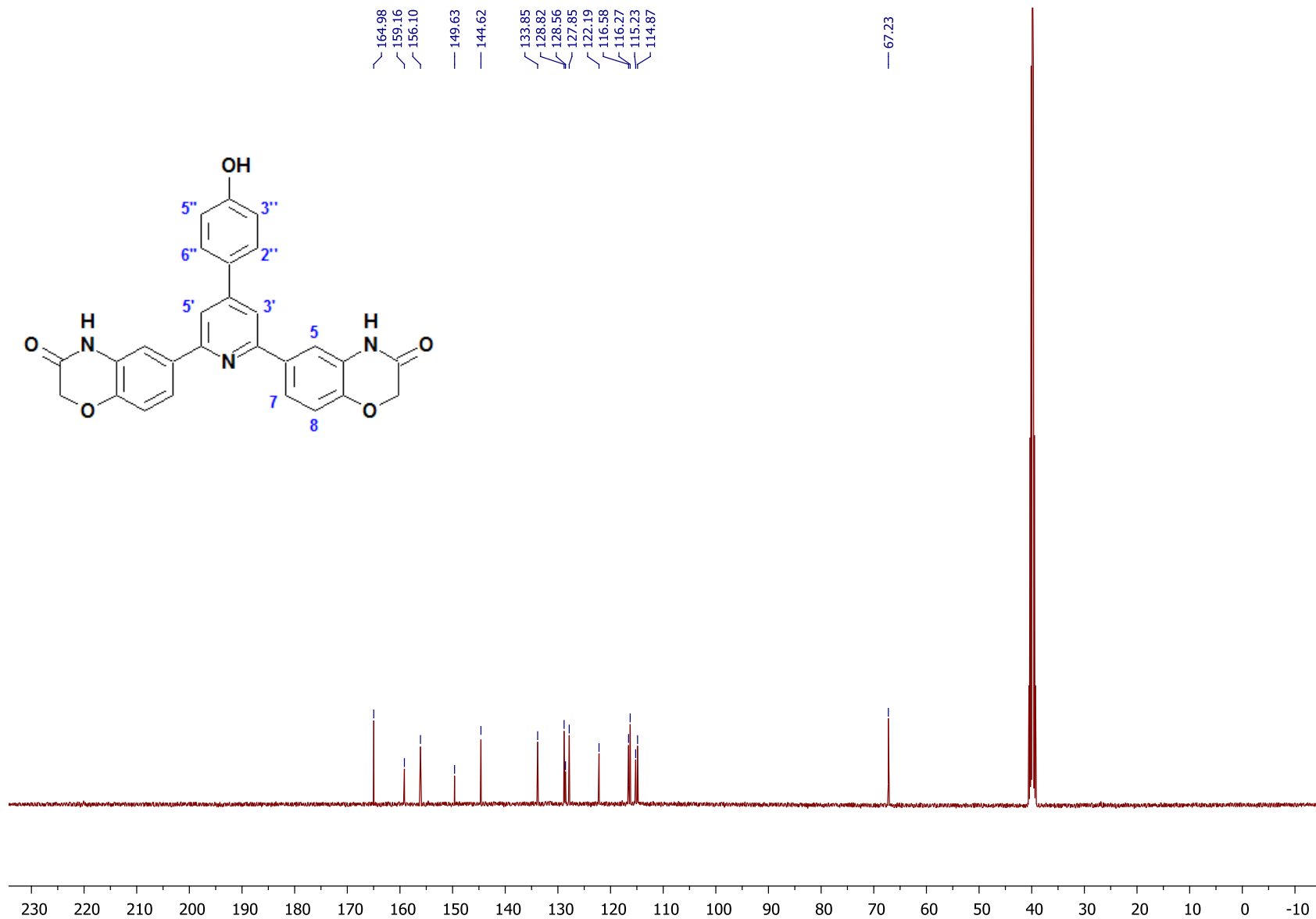
Espectro 52. EM-AR (IE^+) de 6,6'-{4-[4-(trifluorometil)fenil]piridin-2,6-diil}bis(2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-ona) (**S1-7**).



Espectro 53. RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) de 6,6'-[4-(4-hidroxifenil)piridin-2,6-diil]bis(2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-ona) (**S1-8**).



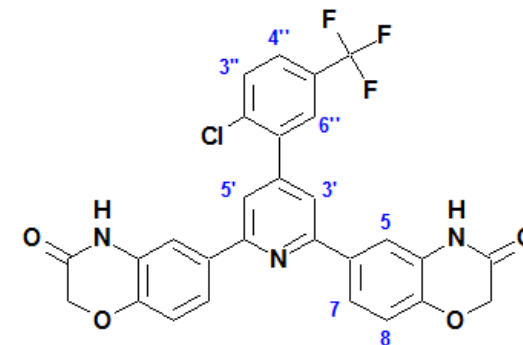
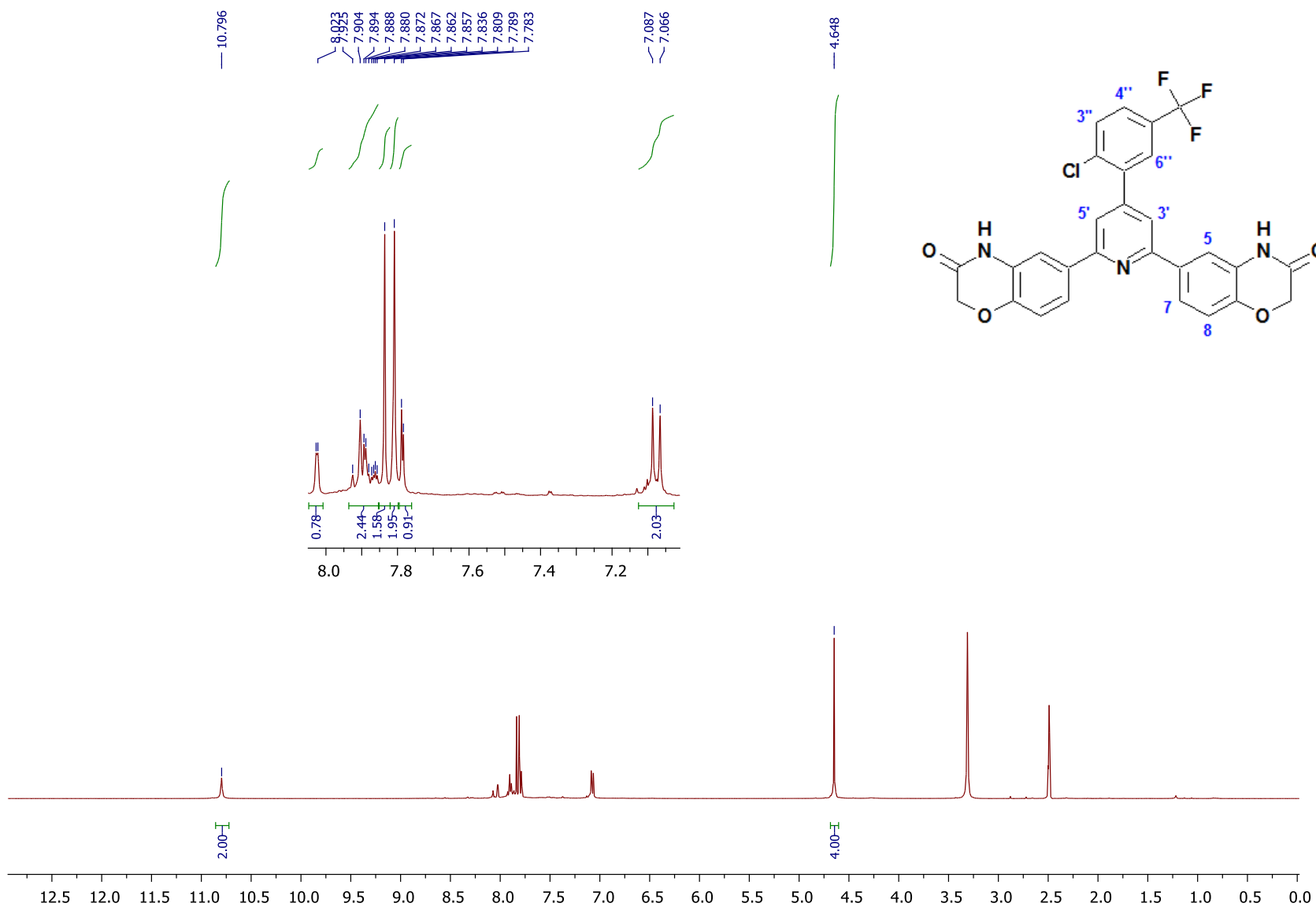
Espectro 54. RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) int. con D_2O de 6,6'-[4-(4-hidroxifenil)piridin-2,6-diil]bis(2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona) (**S1-8**).

Espectro 55. RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) de 6,6'-[4-(4-hidroxifenil)piridin-2,6-diil]bis(2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona) (S1-8).

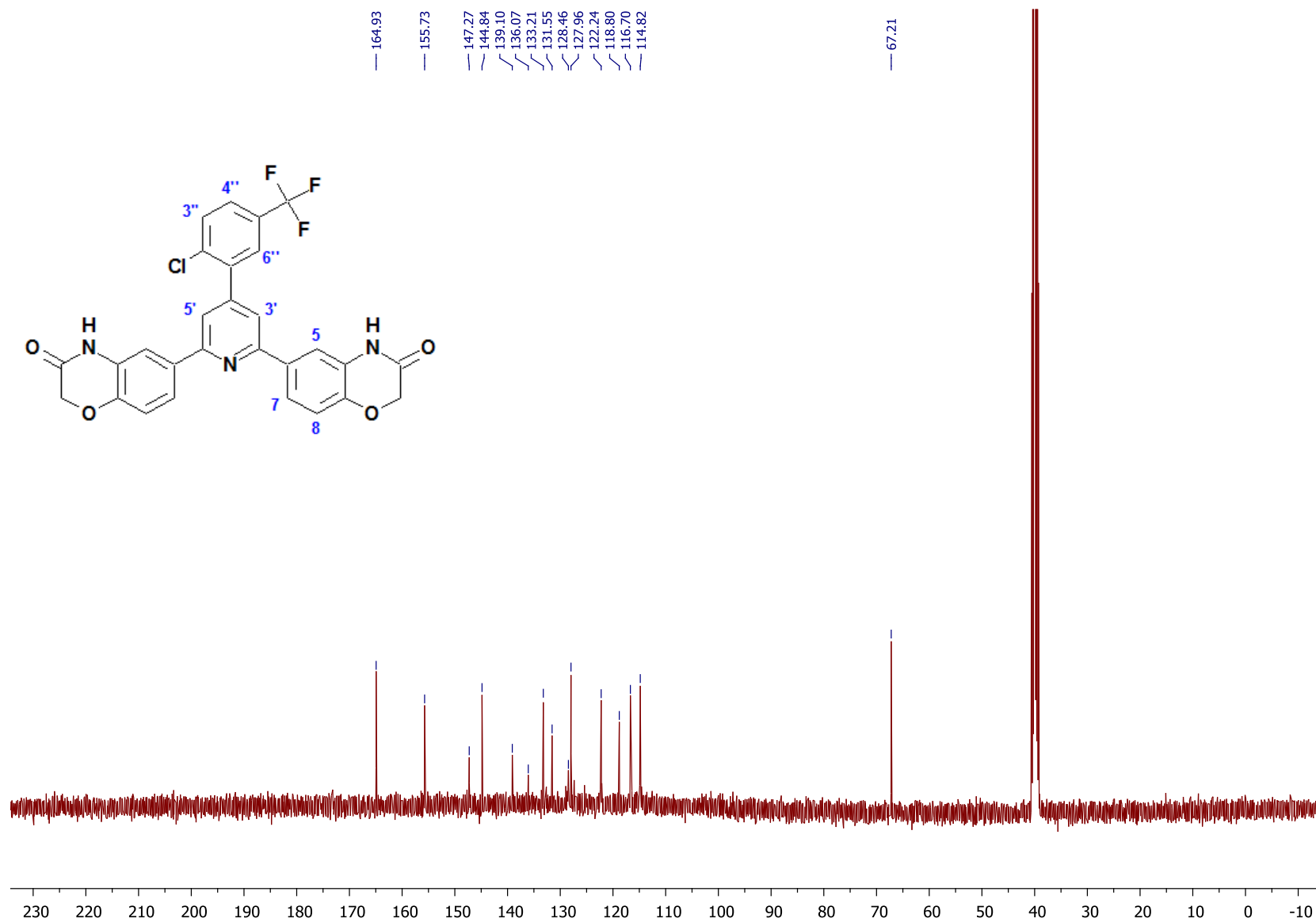
Data : Dr Castillo Rafael020 Date : 04-Oct-2016 17:41
Instrument : MStation
Sample : 325 STE-6538 S1-8
Note : Operador: Carmen Garcia-Javier Perez
Inlet : Direct Ion Mode : EI+
RT : 3.14 min Scan# : (58,61)
Elements : C 27/0, H 20/0, N 3/0, O 5/0
Mass Tolerance : 1000ppm, 5mmu if m/z < 5, 50mmu if m/z > 50
Unsaturation (U.S.) : -0.5 - 20.0

	Observed m/z	Int%					
	465.1341	70.20					
	Estimated m/z	Err [ppm / mmu]	U.S.	C	H	N	O
1	465.1325	+3.5 / +1.6	20.0	27	19	3	5

Espectro 56. EM-AR (IE^+) de 6,6'-[4-(4-hidroxifenil)piridin-2,6-diil]bis(2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona) (**S1-8**).



Espectro 57. RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) de 6,6'-{4-[2-cloro-5-(trifluorometil)fenil]piridin-2,6-diil}bis(2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-ona) (S1-9).



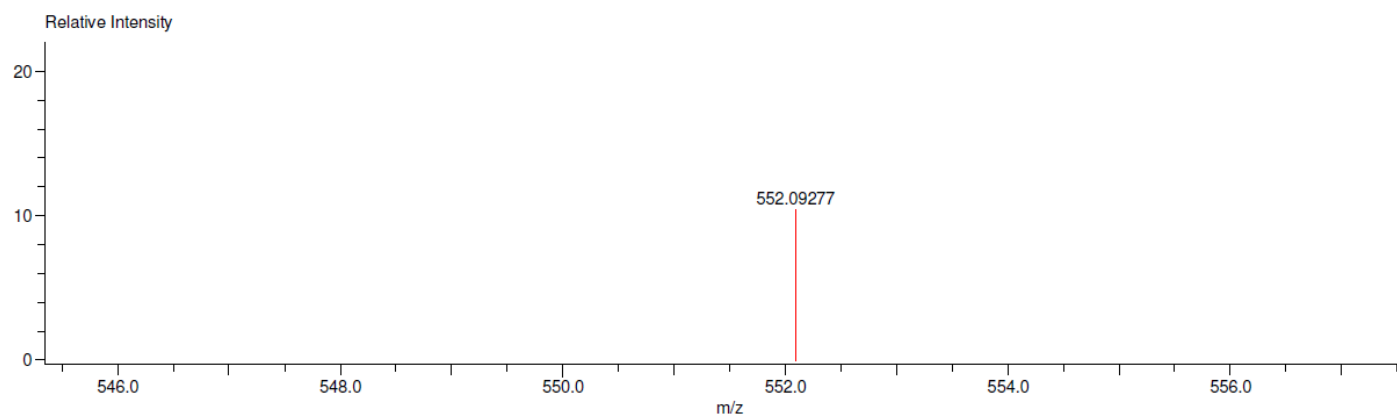
Espectro 58. RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) de 6,6'-{4-[2-cloro-5-(trifluorometil)fenil]piridin-2,6-diil}bis(2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona) (S1-9).

Data:S1-9
 Sample Name:DR Castillo Rafael/Operador:Carmen garcia-Javier Perez
 Description:
 Ionization Mode:ESI+
 History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,50,Area];Correct Base[50.0%]];Correct Base[5.0%];Average(MS[1] 2....

Acquired:10/13/2016 12:27:07 PM
 Operator:AccuTOF
 Mass Calibration data:Cal PEG 600
 Created:10/13/2016 1:25:16 PM
 Created by:AccuTOF

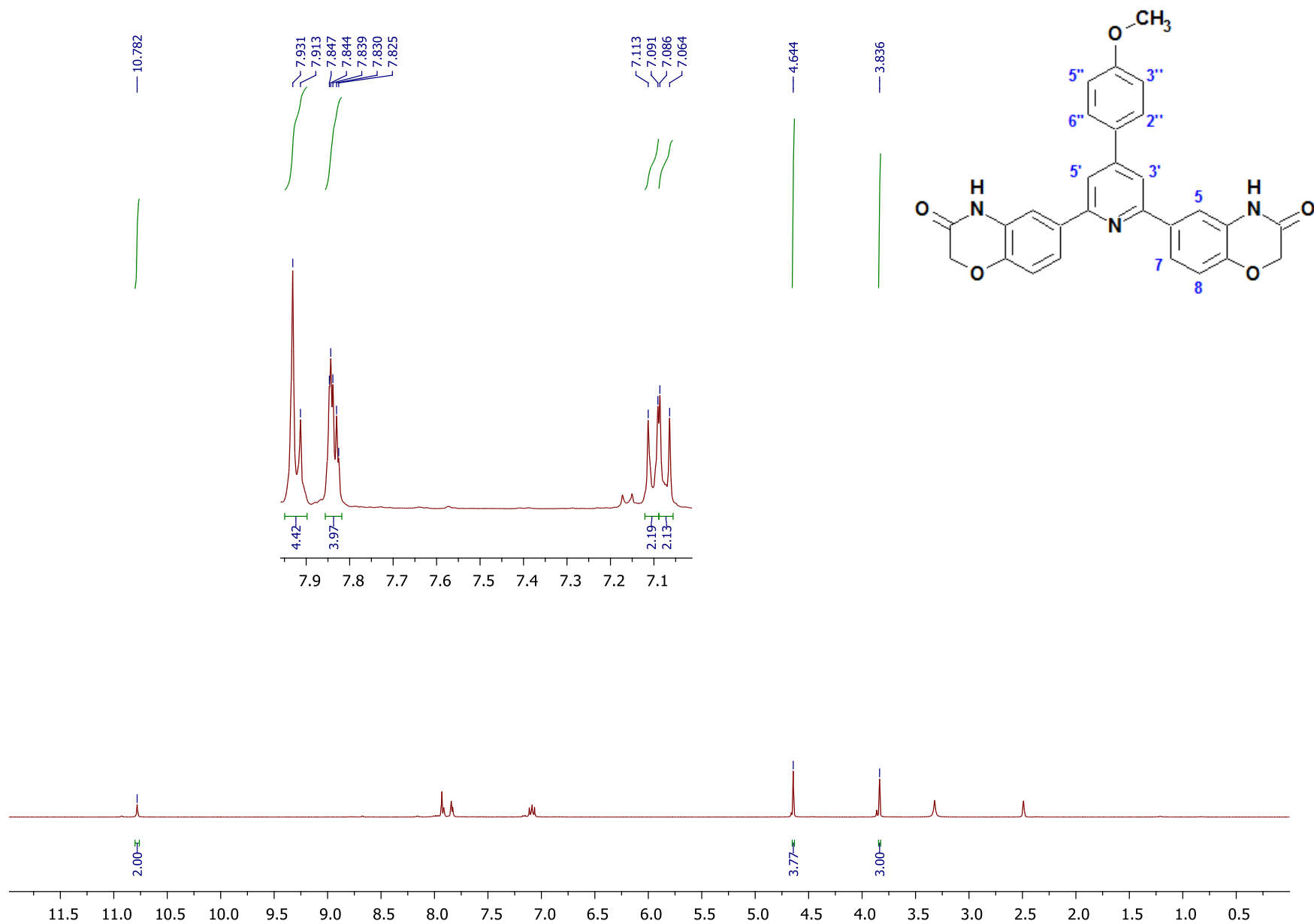
Charge number:1 Tolerance:3.00(mmu)
 Element:¹²C:0 .. 62, ¹H:0 .. 100, ³⁵Cl:0 .. 2, ¹⁹F:2 .. 3, ¹⁴N:3 .. 4, ¹⁶O:3 .. 4

Unsaturation Number:15.5 .. 23.0 (Fraction:Both)

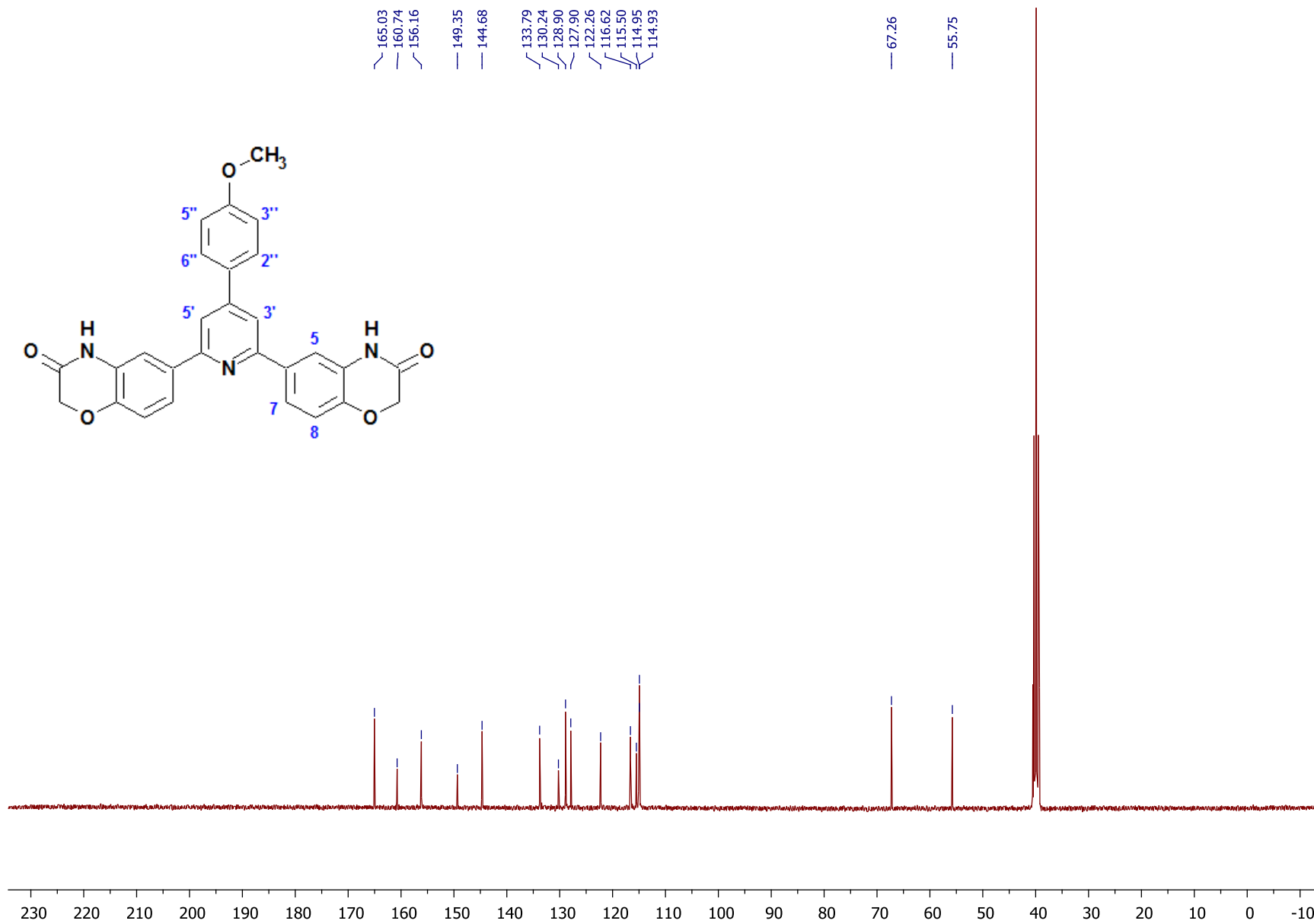


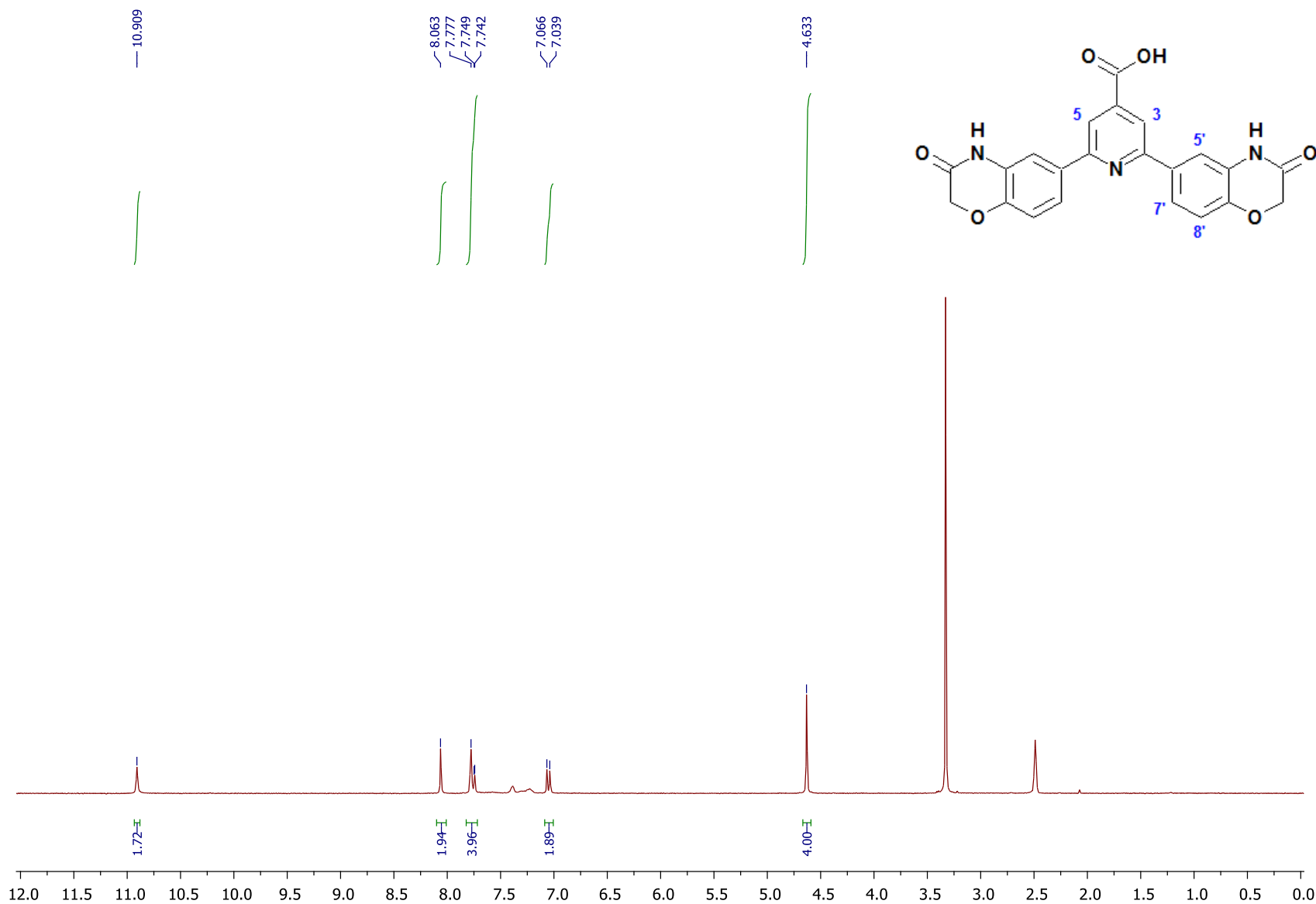
Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
552.09277	8910.44	552.09379	-1.03	-1.86	¹² C ₂₈ ¹ H ₁₈ ³⁵ Cl ₁ ¹⁹ F ₃ ¹⁴ N ₃ ¹⁶ O ₄	19.5

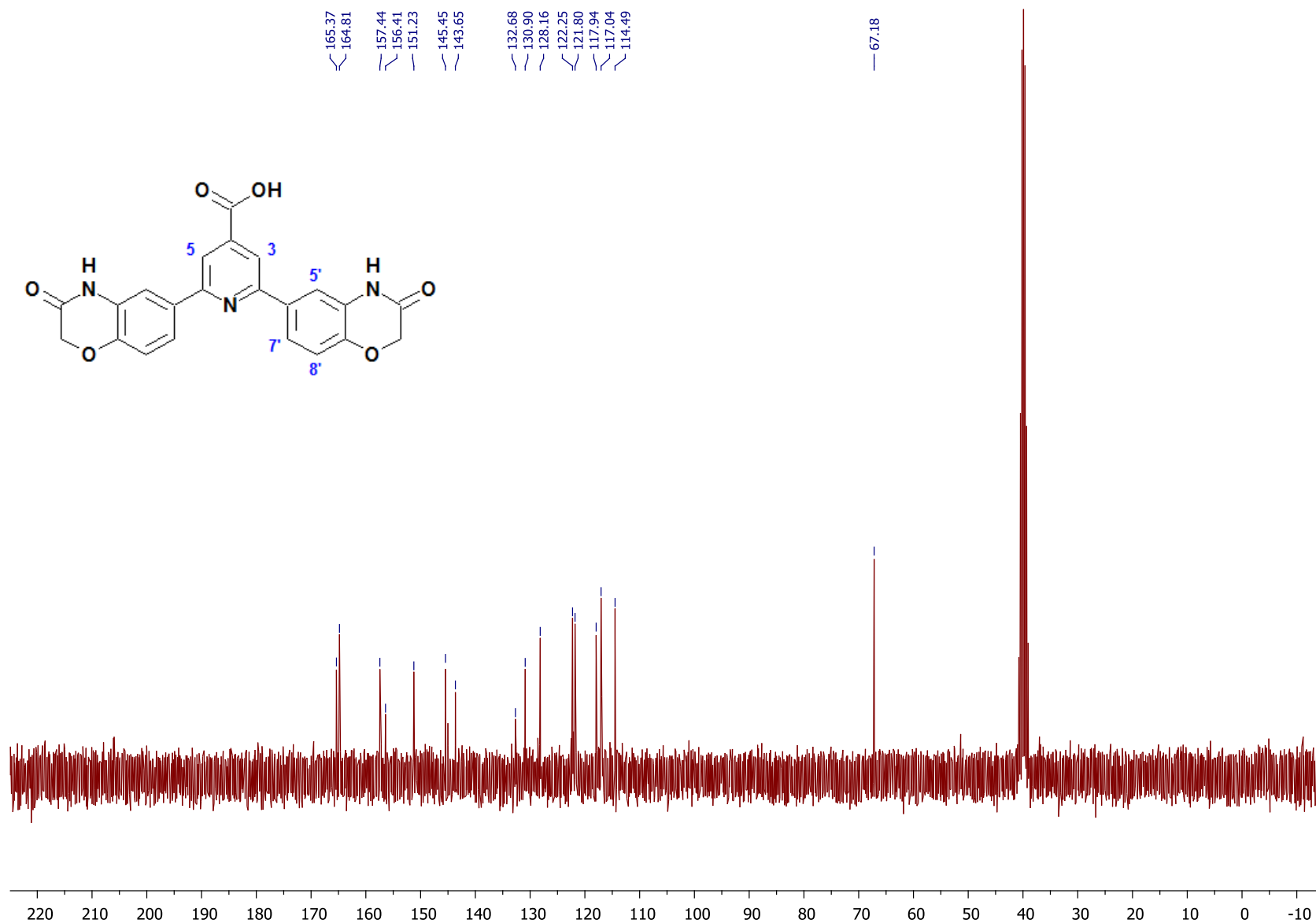
Espectro 59. EM-AR (DART) de 6,6'-{4-[2-cloro-5-(trifluorometil)fenil]piridin-2,6-diil}bis(2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-ona) (**S1-9**).

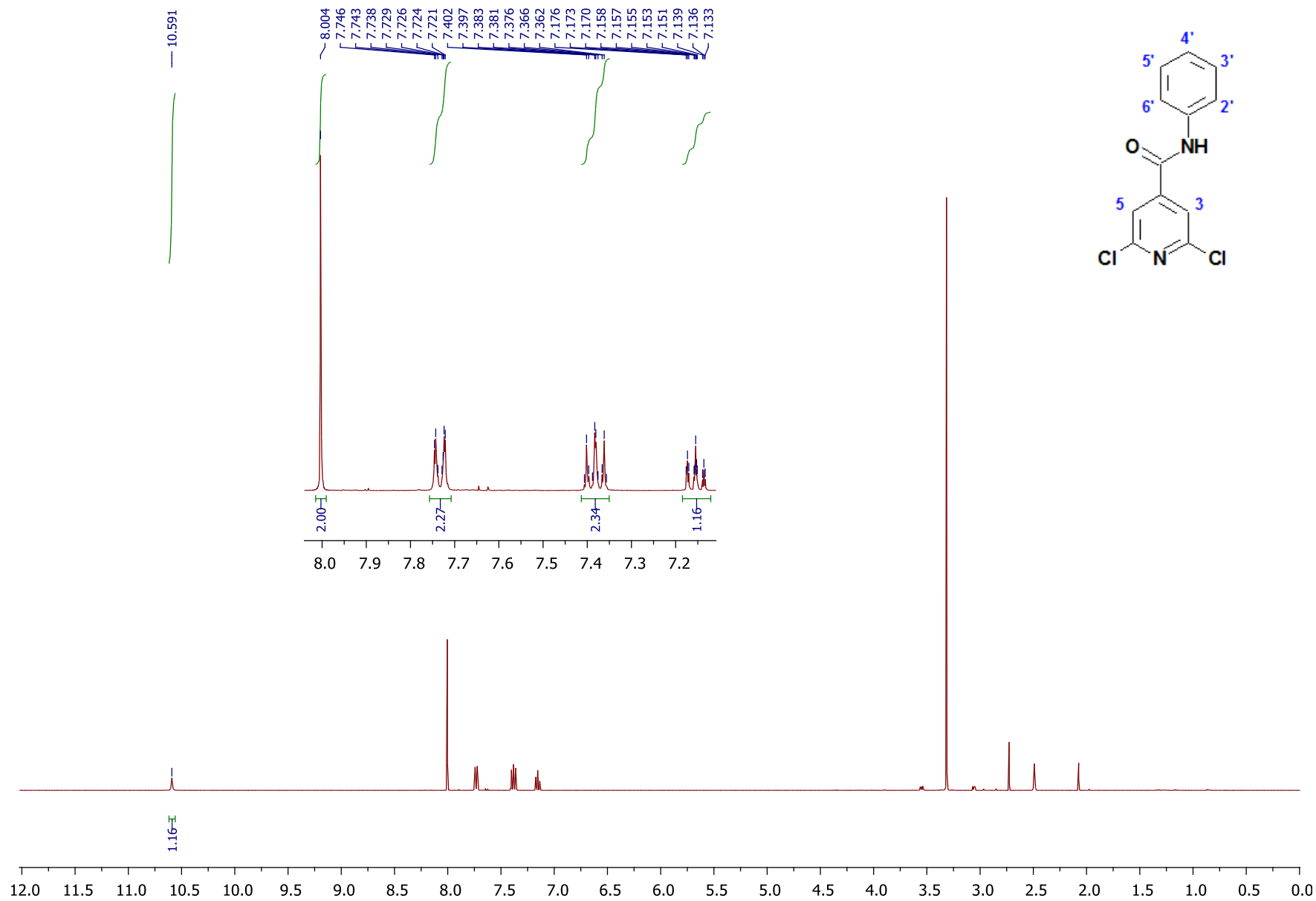


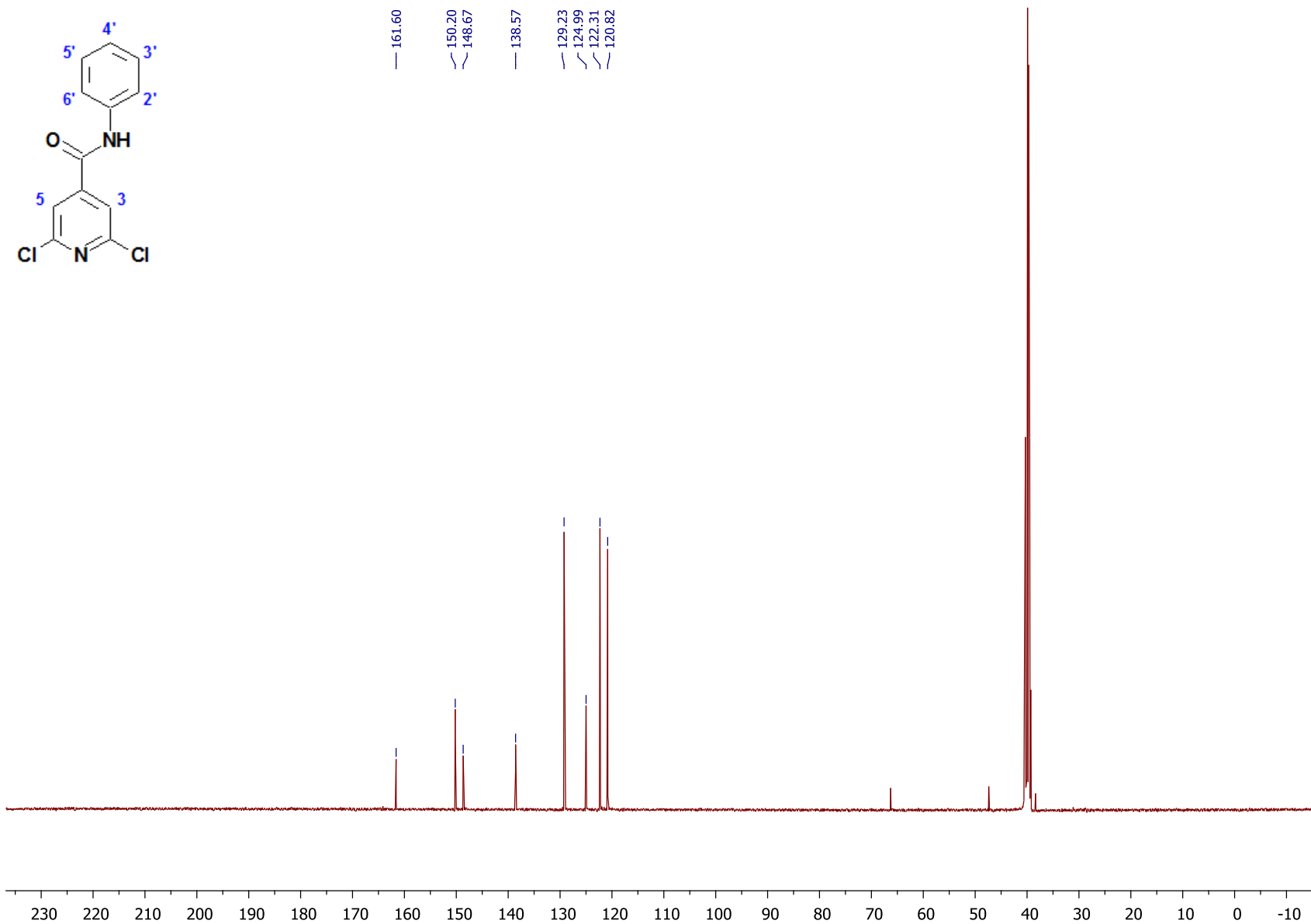
Espectro 60. RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) de 6,6'-[4-(4-metoxifenil)piridin-2,6-diil]bis(2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-ona) (**S1-10**).

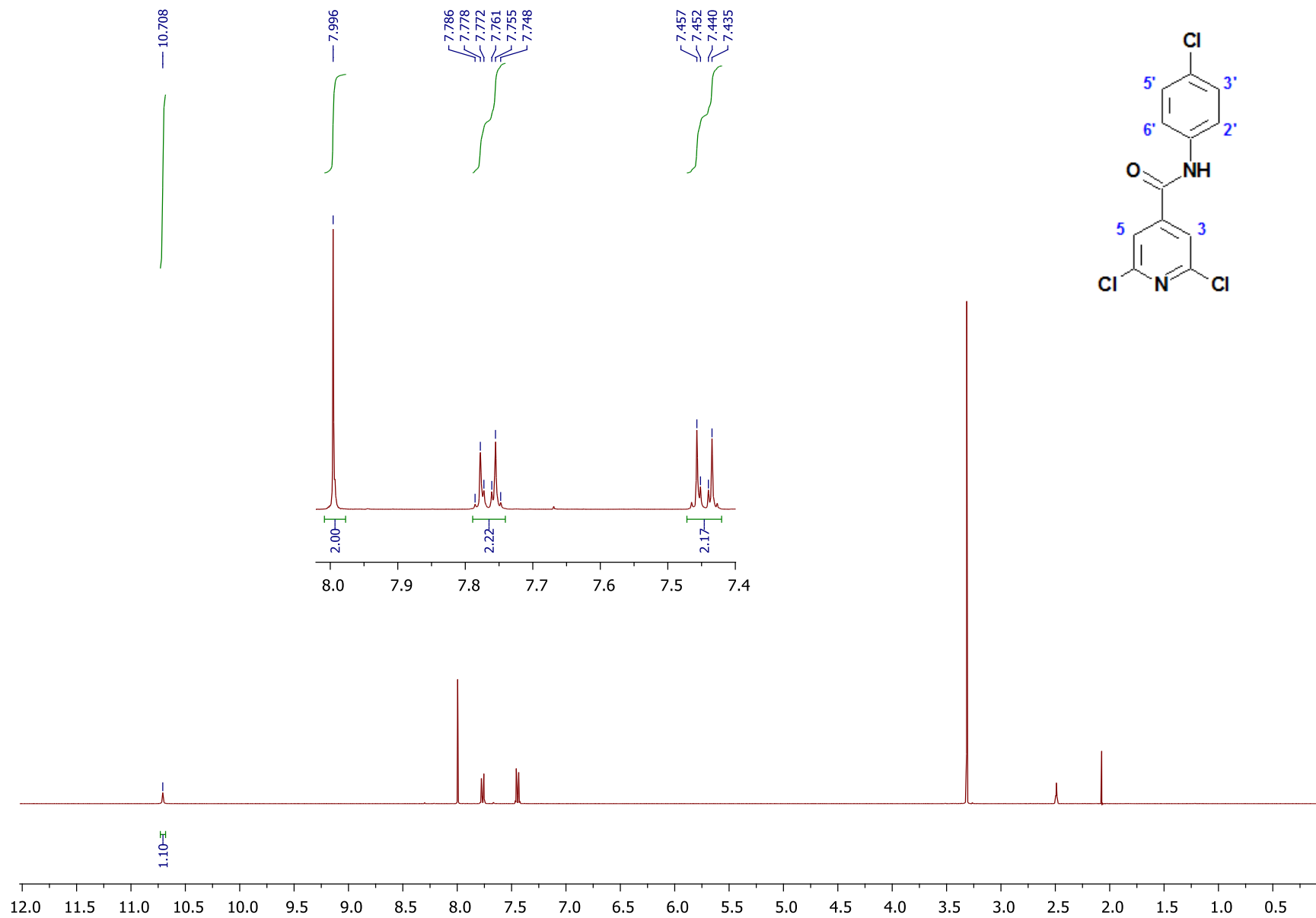
Espectro 61. RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) de 6,6'-[4-(4-metoxifenil)piridin-2,6-diil]bis(2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona) (S1-10).

Espectro 62. RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 300 MHz) del ácido 2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-6-il)isonicotínico (**16**).

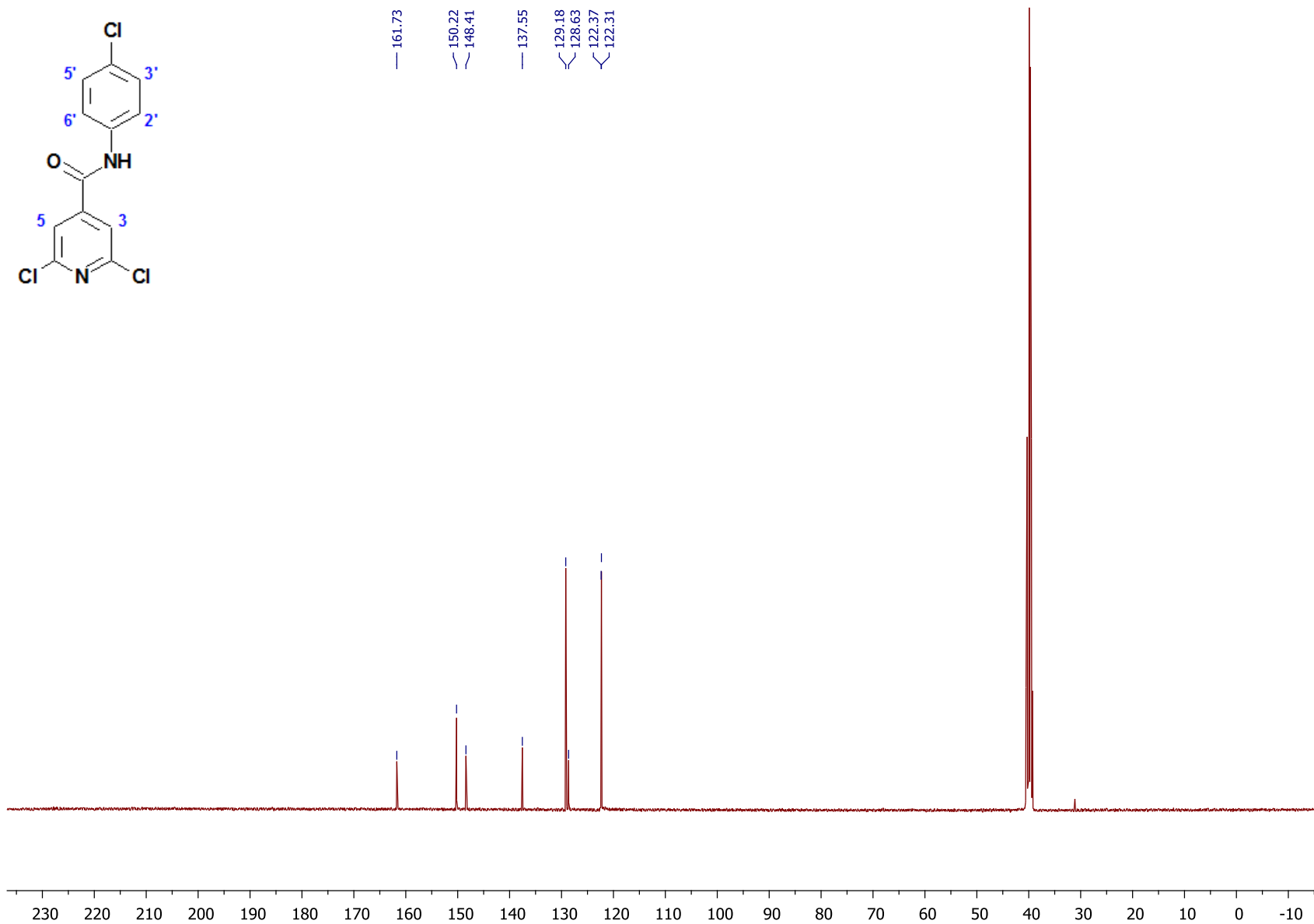
Espectro 63. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 75 MHz) del ácido 2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-6-il)isonicotínico (**16**).

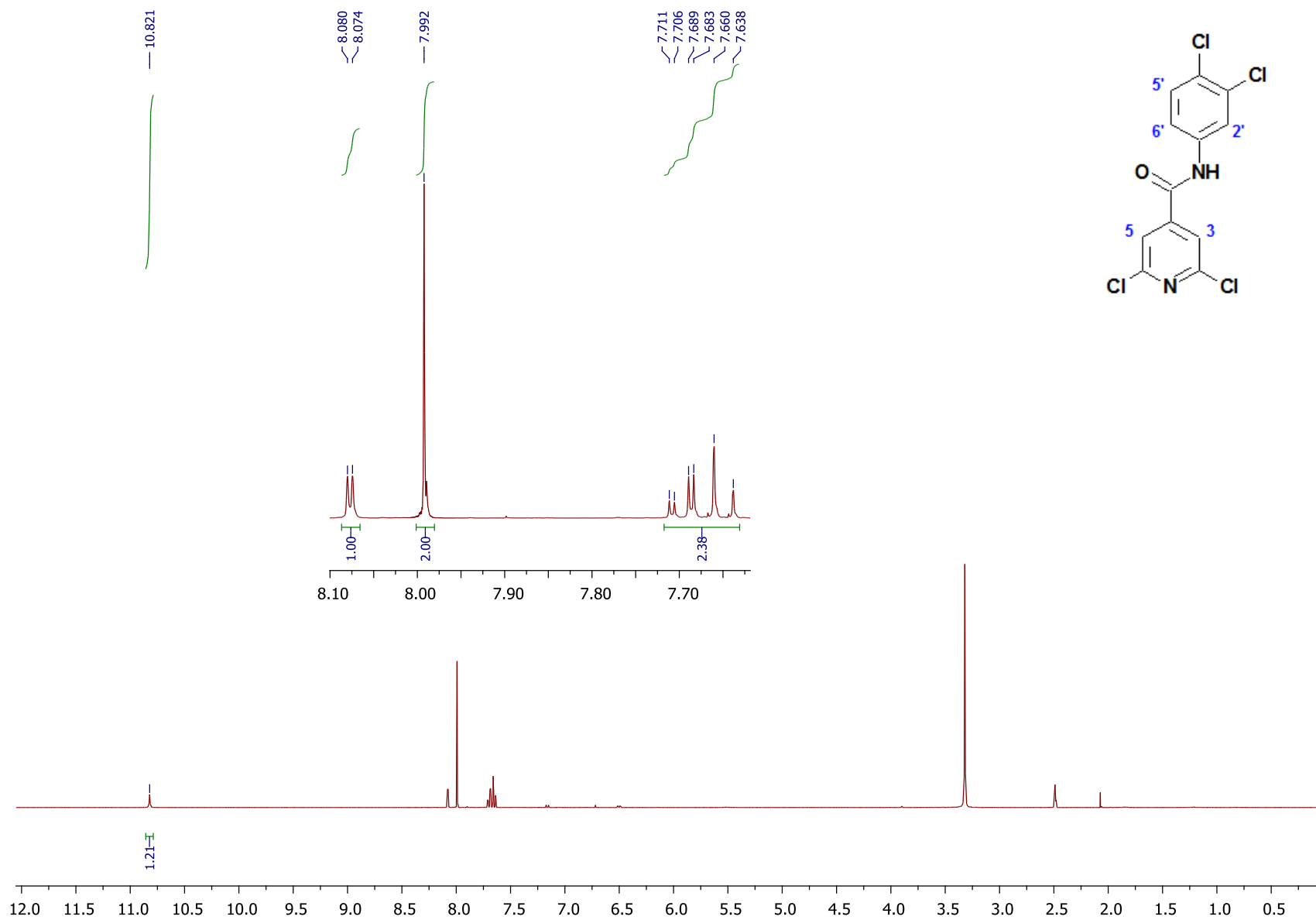
Espectro 64. RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) de 2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-6-il)-N-fenilpiridin-4-carboxamida (**S2-1**).

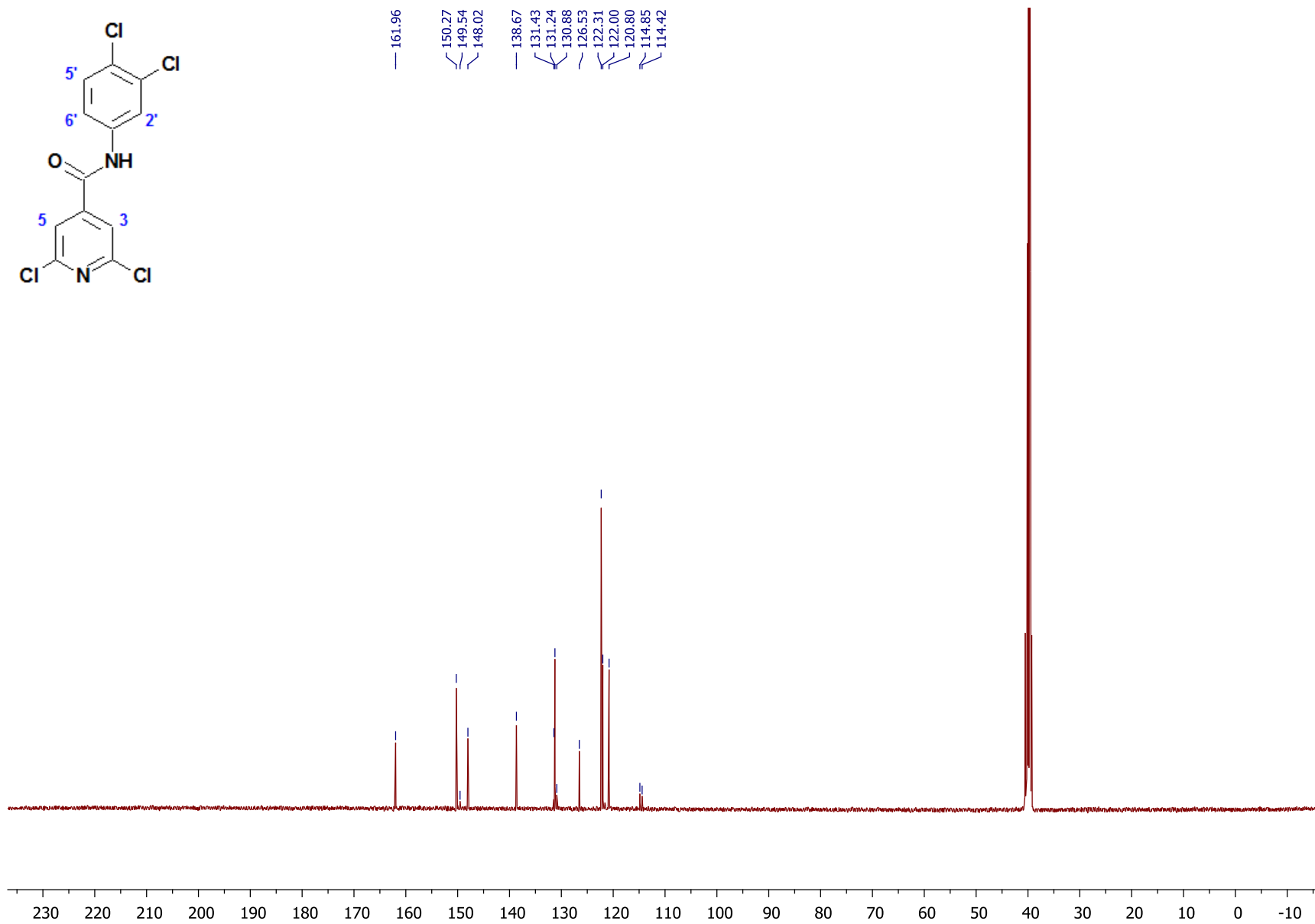
Espectro 65. RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) de 2,6-dicloro-*N*-fenilpiridin-4-carboxamida (S2-1-1).

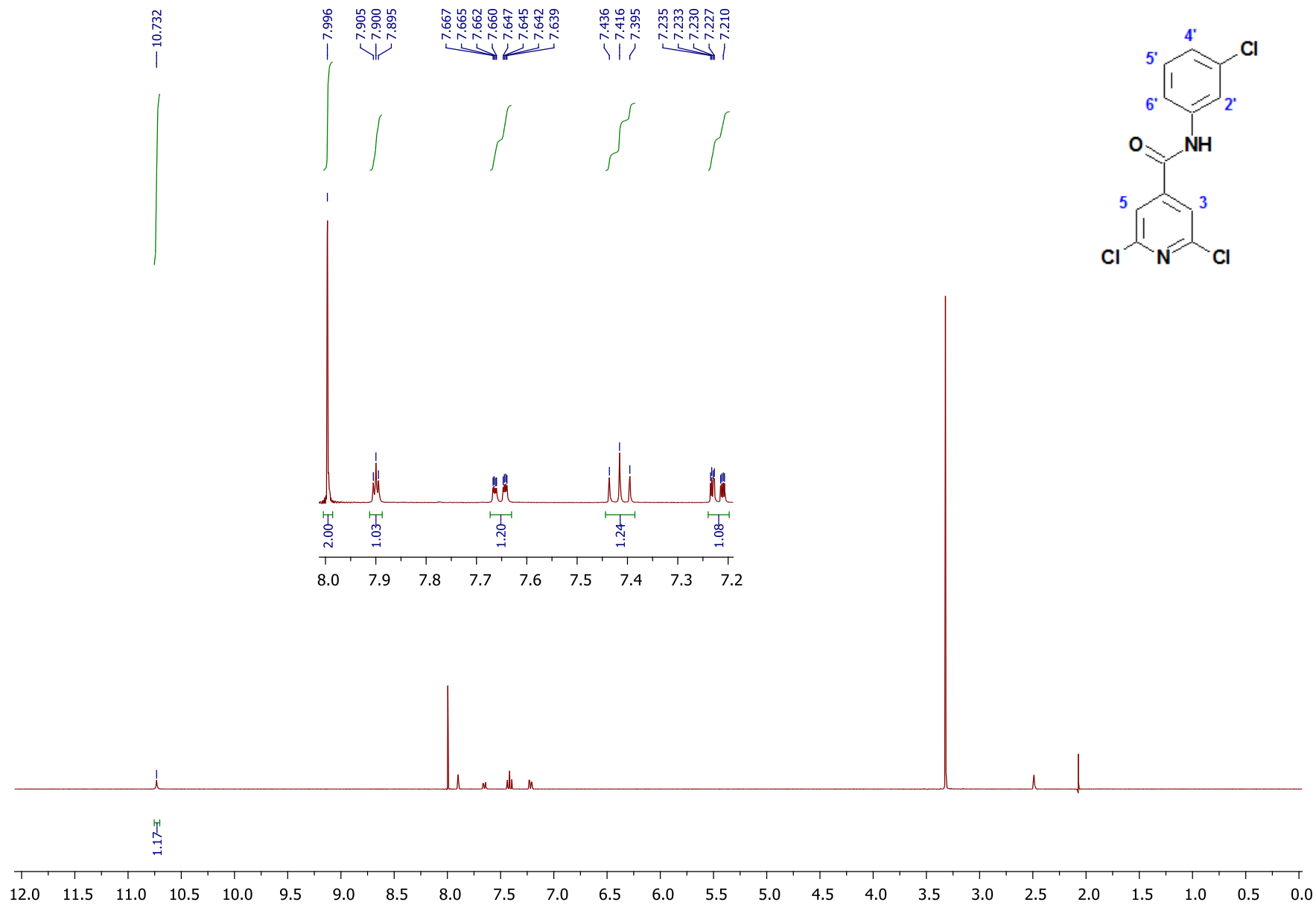


Espectro 66. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz) de 2,6-dicloro-*N*-(4-clorofenil)piridin-4-carboxamida (S2-2-2).

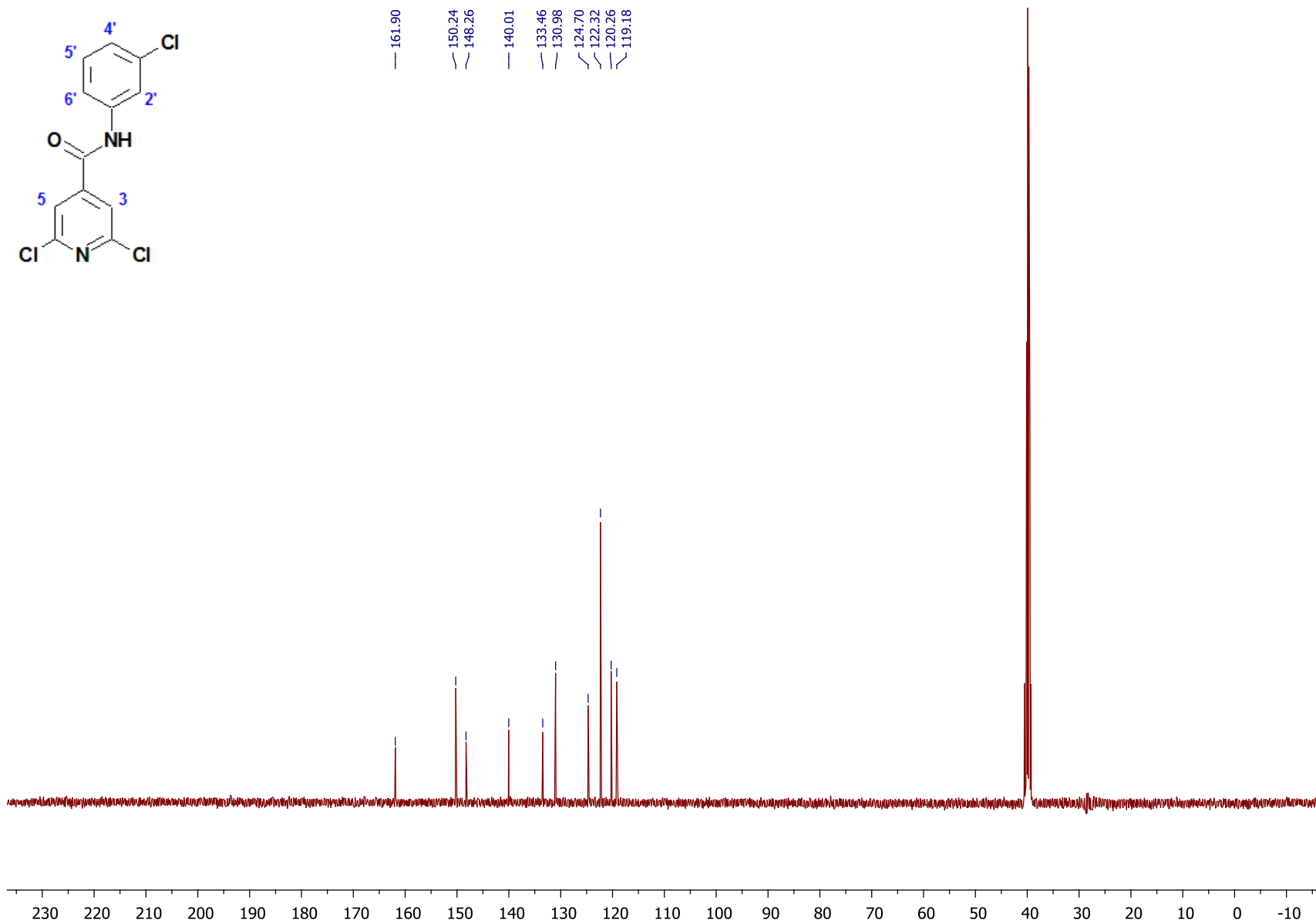
Espectro 67. RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) de 2,6-dicloro-*N*-(4-clorofenil)piridin-4-carboxamida (S2-2-2).

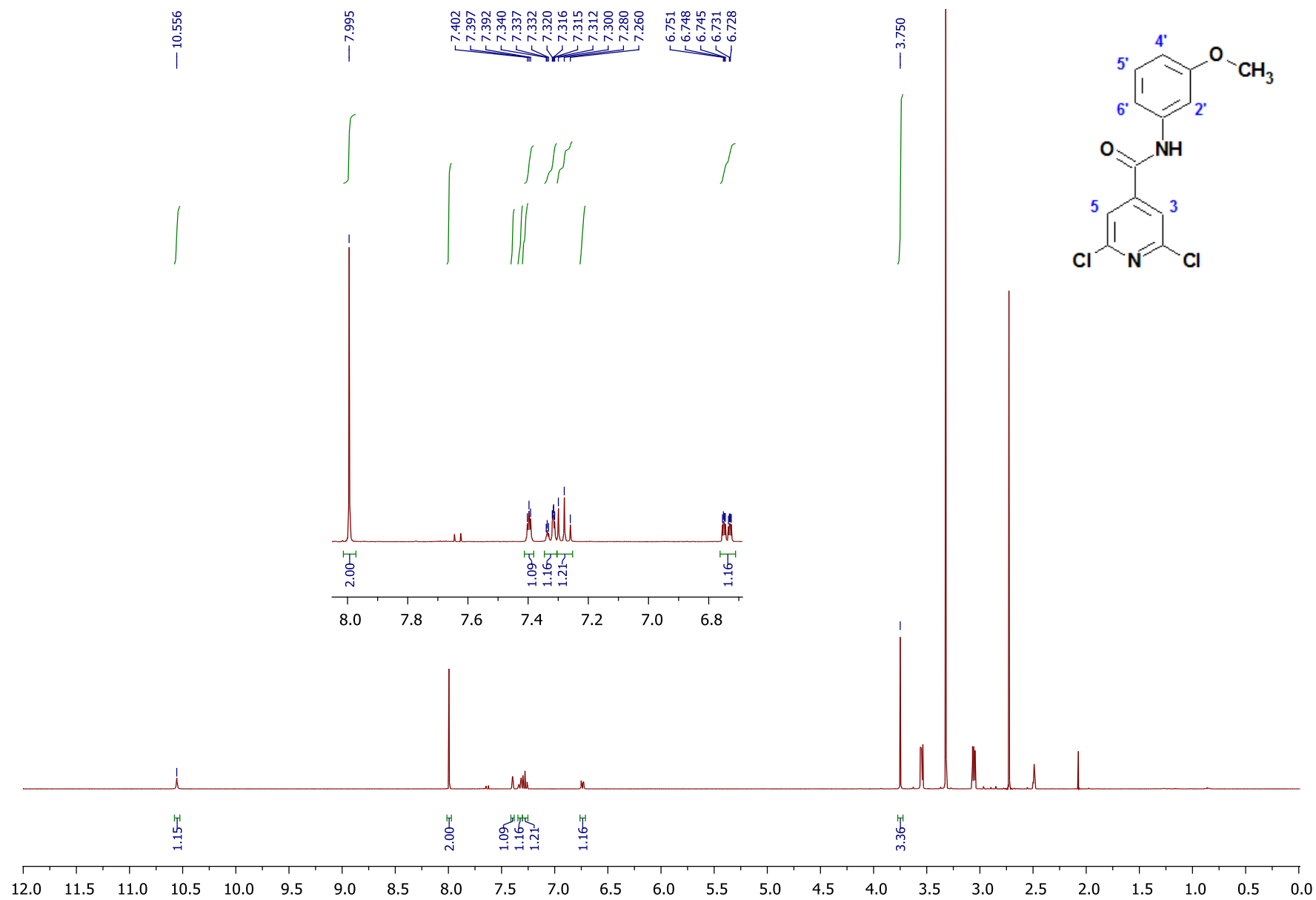
Espectro 68. RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) de 2,6-dicloro-*N*-(3,4-diclorofenil)piridin-4-carboxamida (S2-3-3).

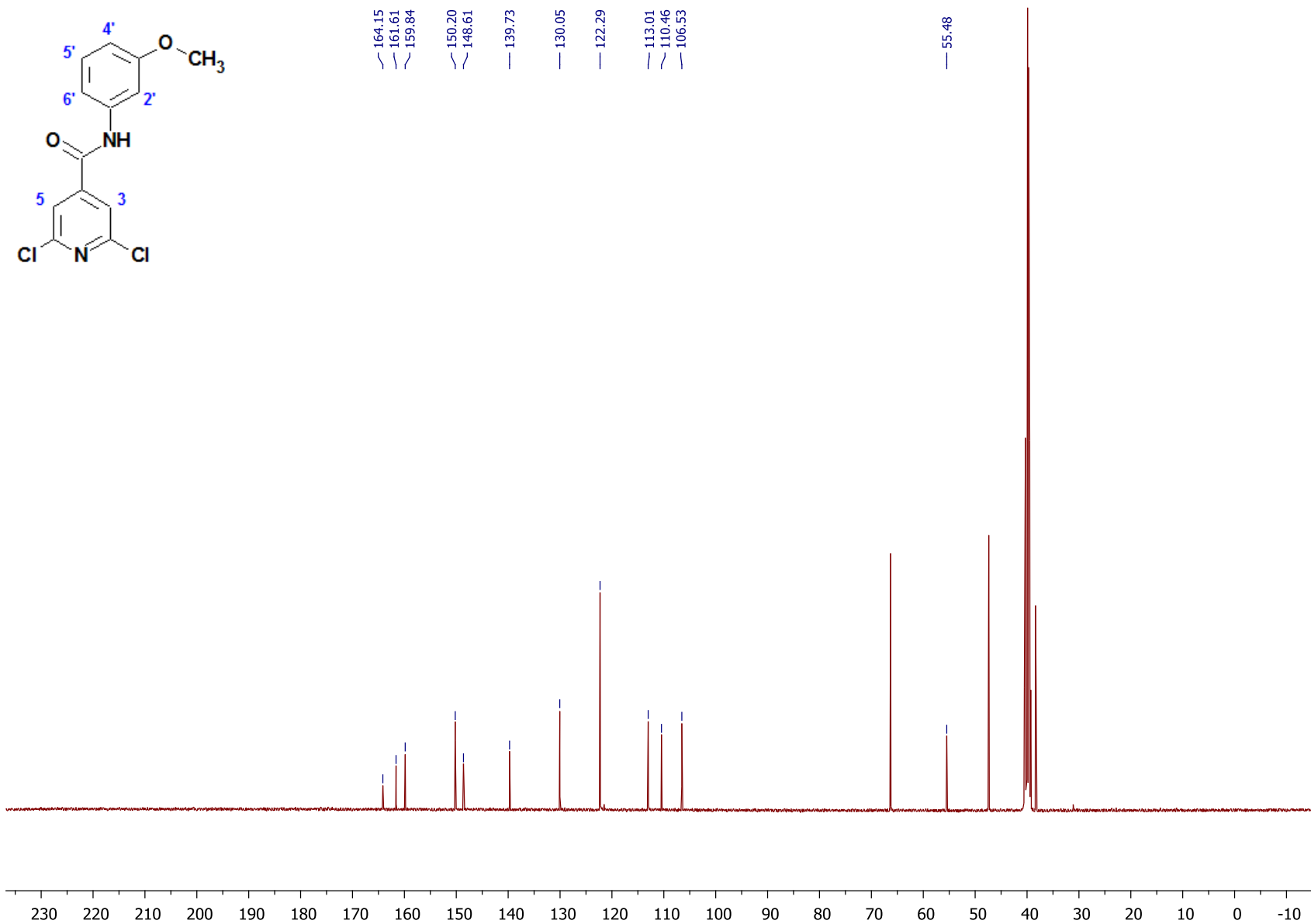
Espectro 69. RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) de 2,6-dicloro-*N*-(3,4-diclorofenil)piridin-4-carboxamida (S2-3-3).

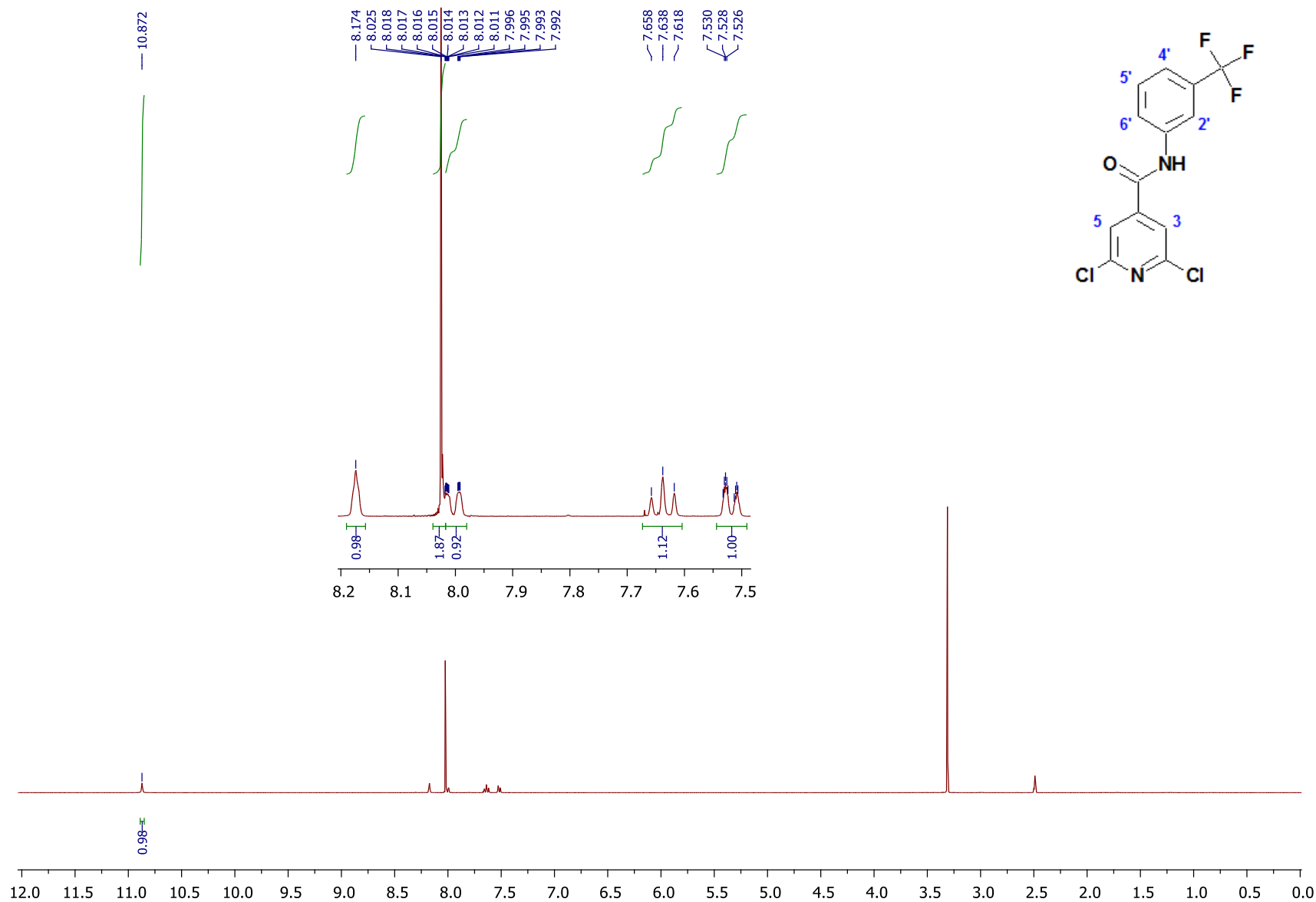


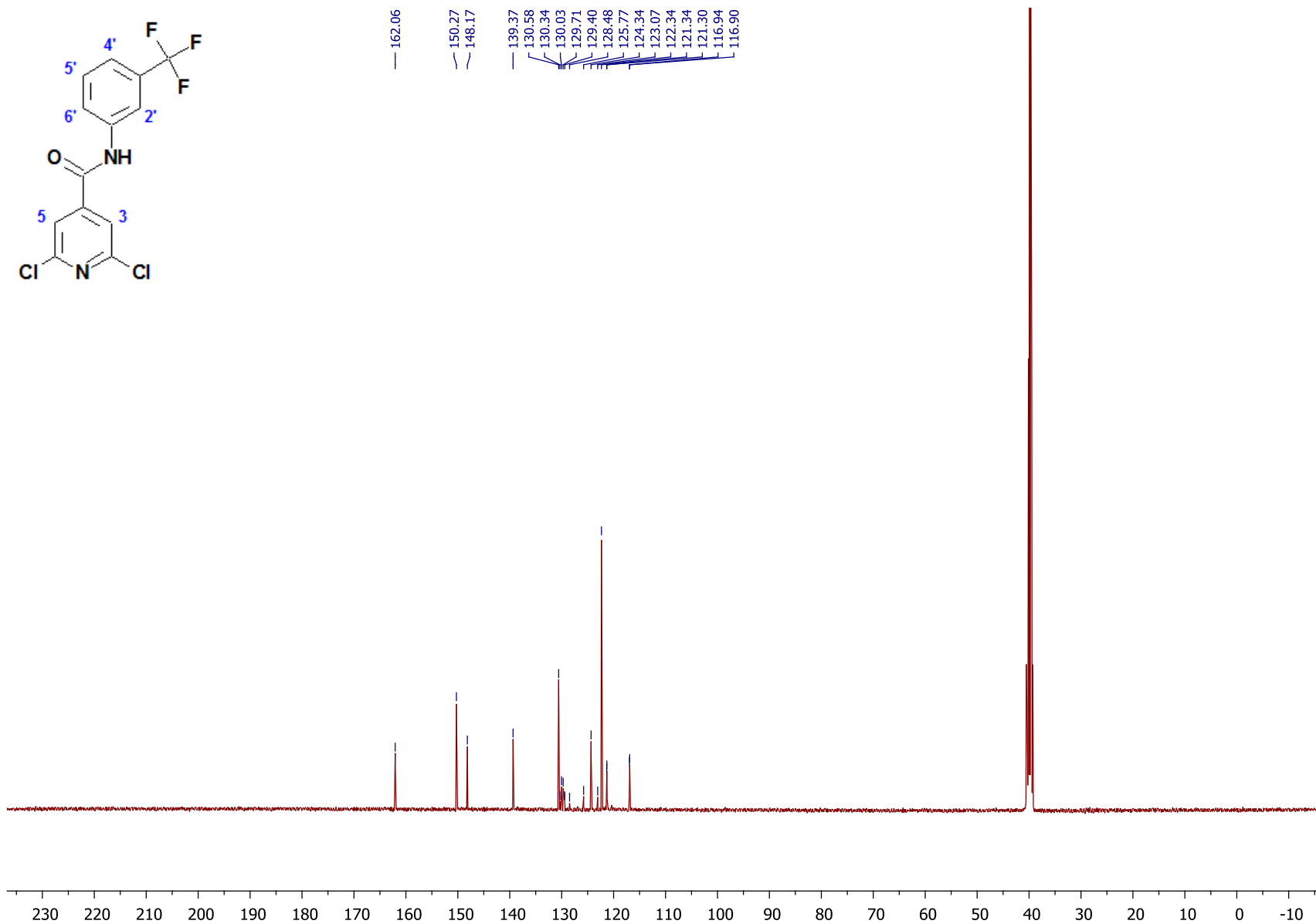
Espectro 70. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz) de 2,6-dicloro-*N*-(3-clorofenil)piridin-4-carboxamida (S2-5-5).

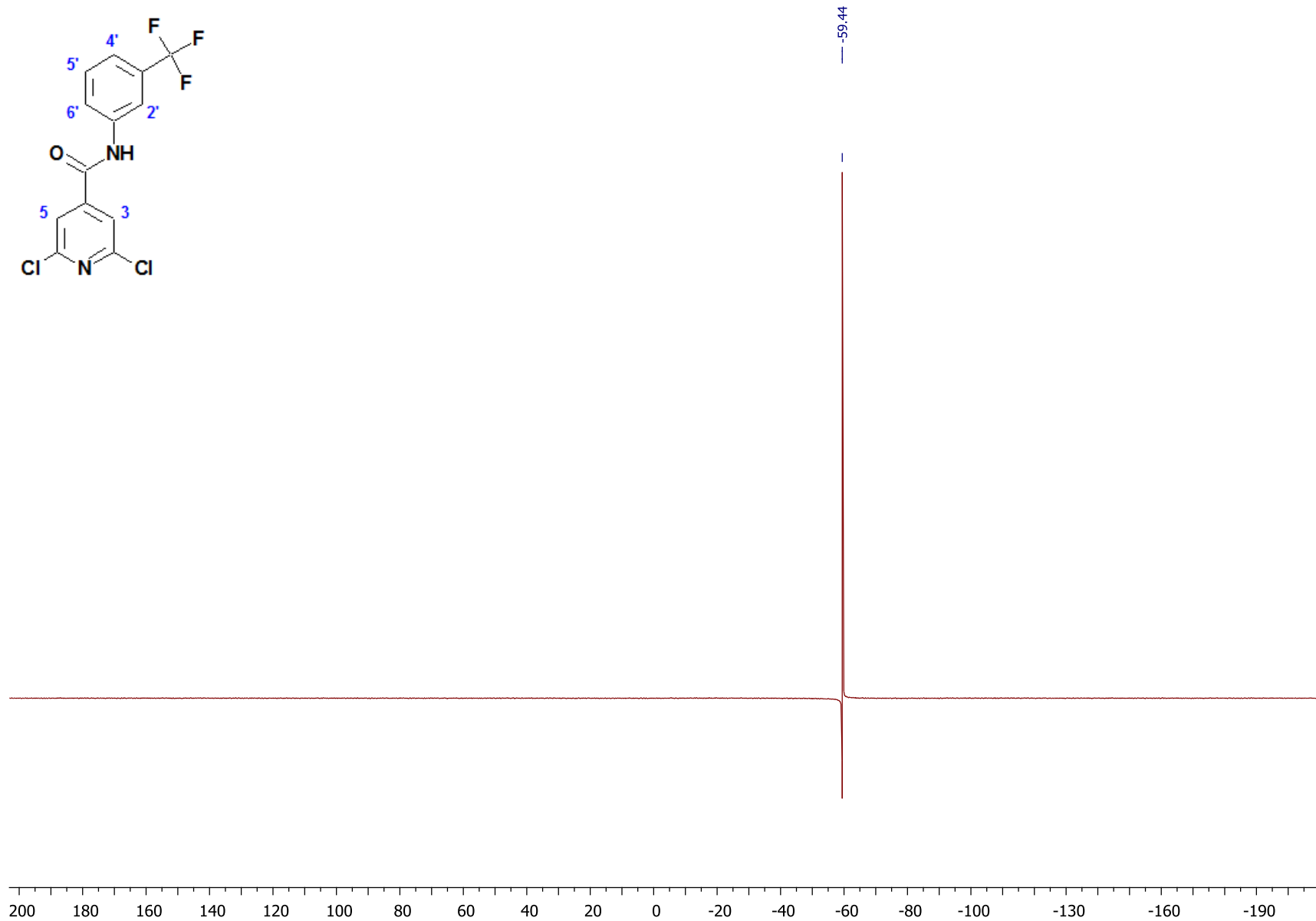
Espectro 71. RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) de 2,6-dicloro-*N*-(3-clorofenil)piridin-4-carboxamida (S2-5-5).

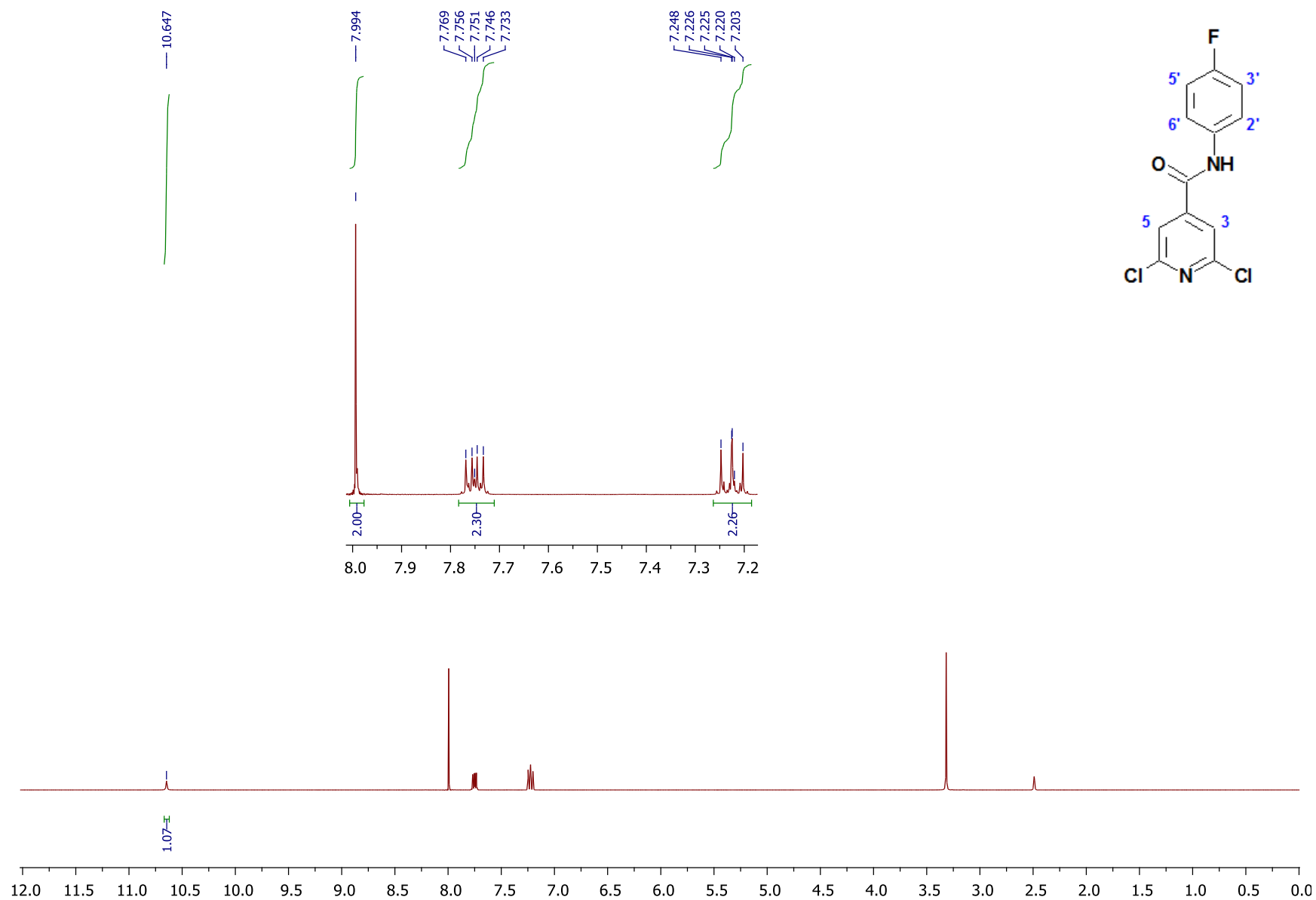
Espectro 72. RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) de 2,6-dicloro-*N*-(3-metoxifenil)piridin-4-carboxamida (S2-6-6).

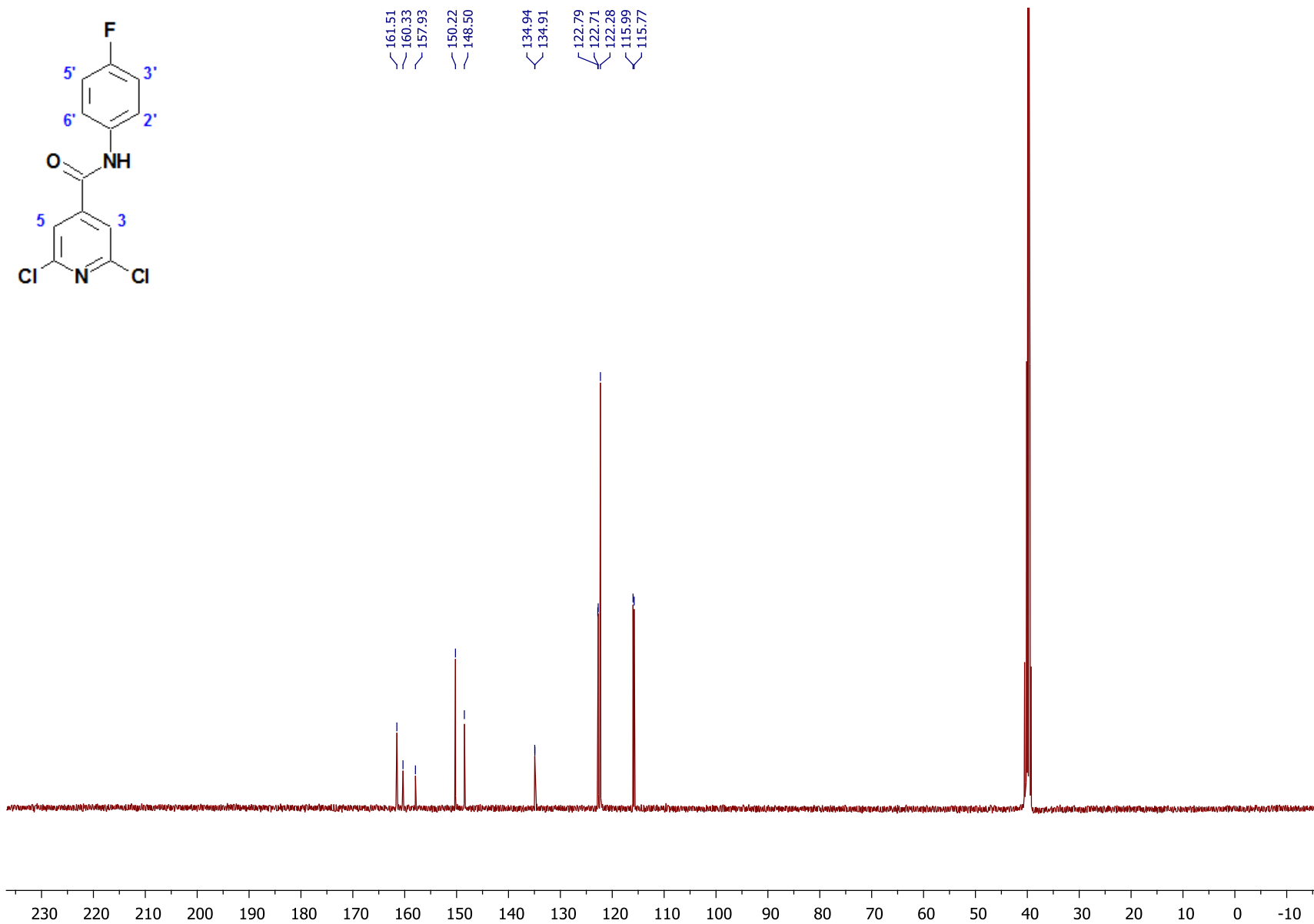
Espectro 73. RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) de 2,6-dicloro-*N*-(3-metoxifenil)piridin-4-carboxamida (**S2-6-6**).

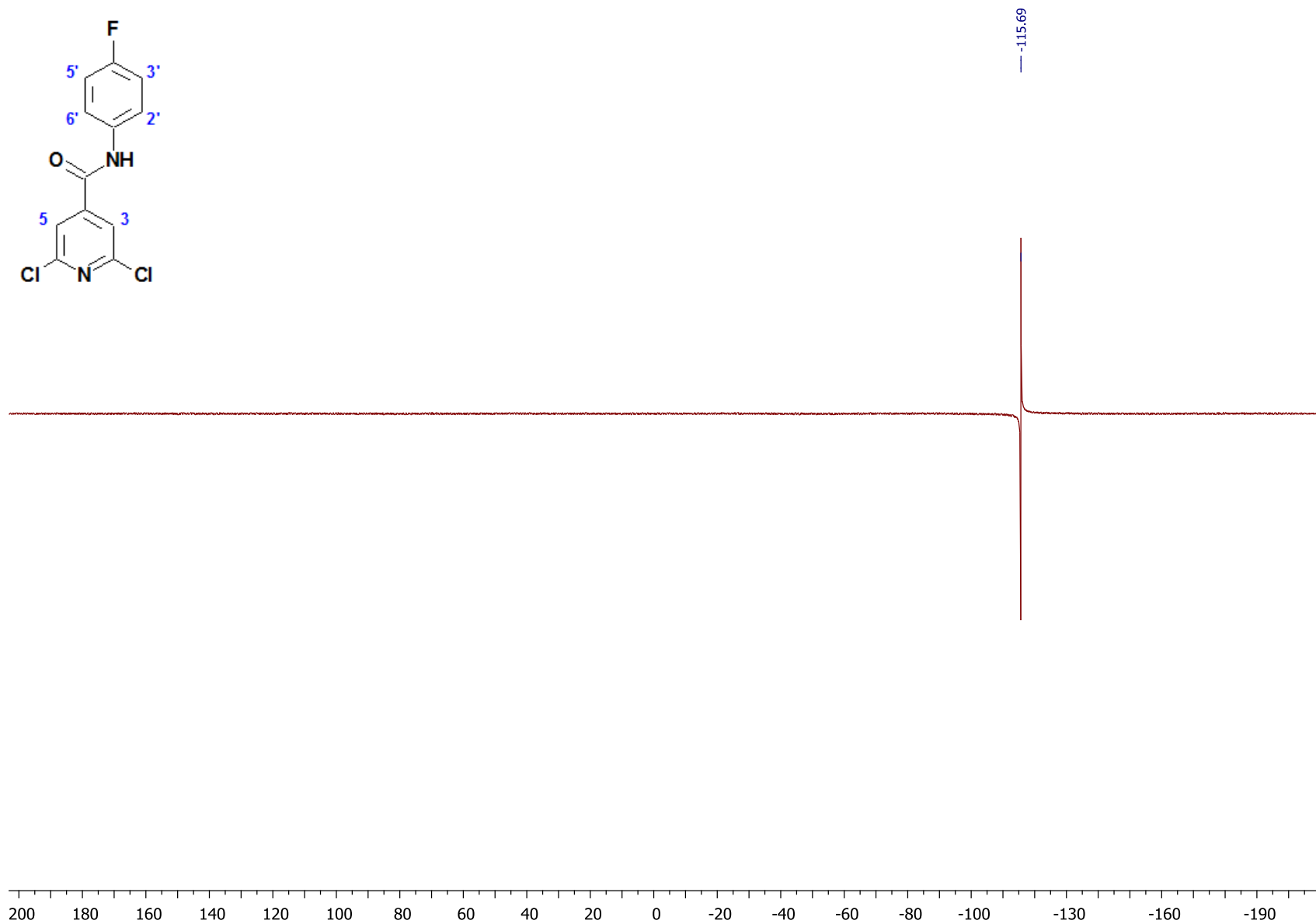
Espectro 74. RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) de 2,6-dicloro-*N*-[3-(trifluorometil)fenil]piridin-4-carboxamida (S2-8-8).

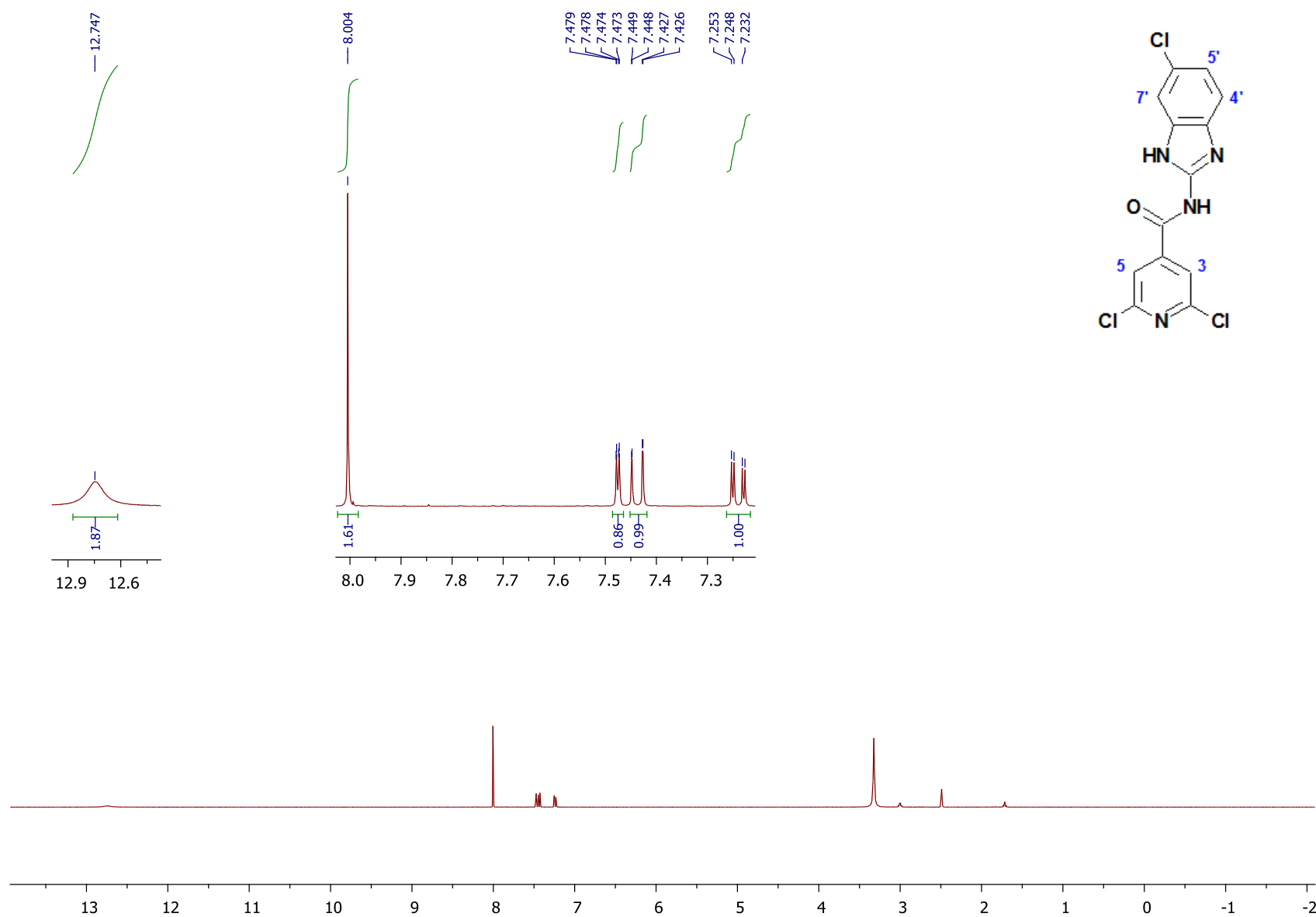
Espectro 75. RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) de 2,6-dicloro-*N*-[3-(trifluorometil)fenil]piridin-4-carboxamida (S2-8-8).

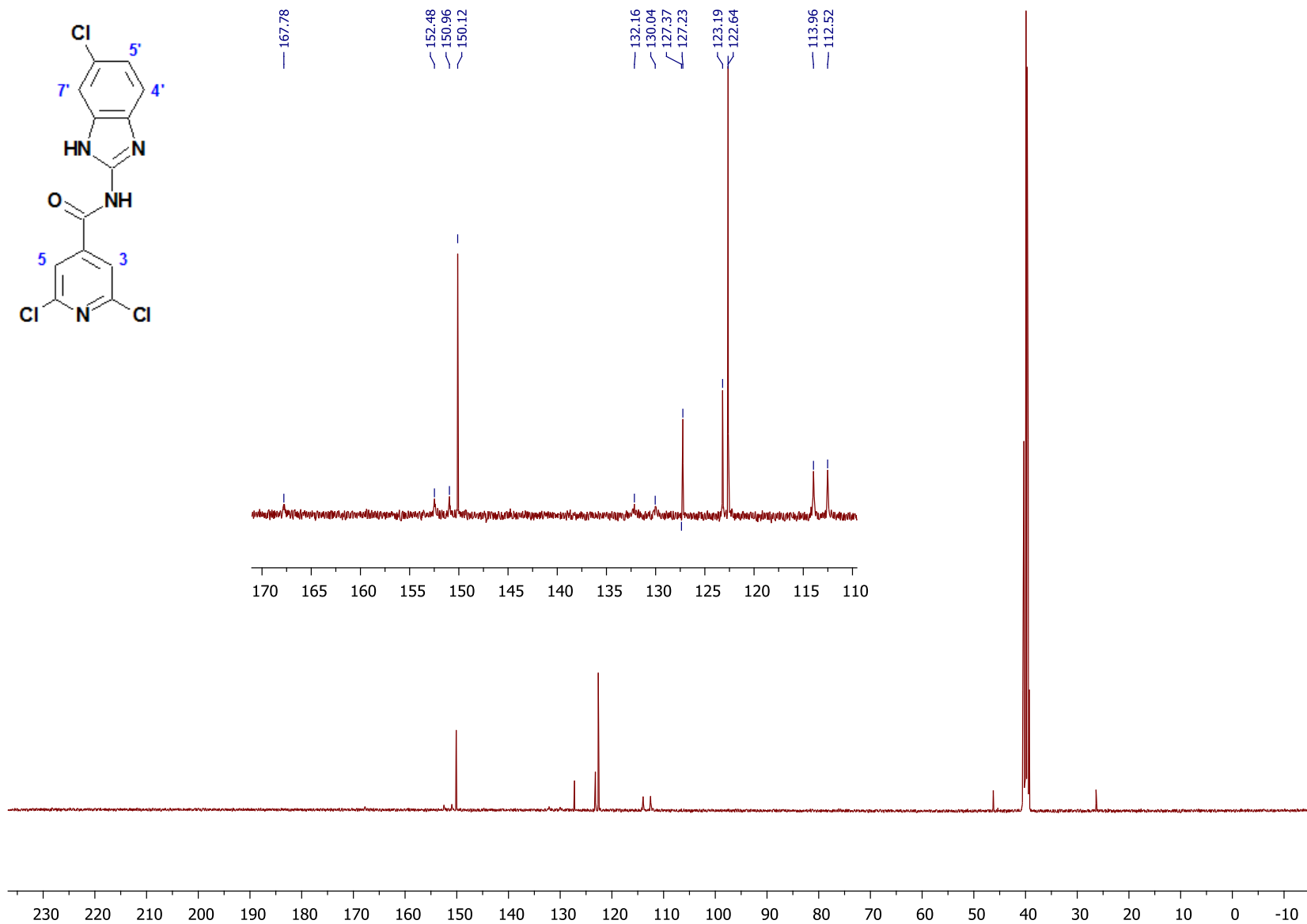
Espectro 76. RMN ^{19}F (DMSO- d_6 , 376.5 MHz) de 2,6-dicloro-*N*-[3-(trifluorometil)fenil]piridin-4-carboxamida (**S2-8-8**).

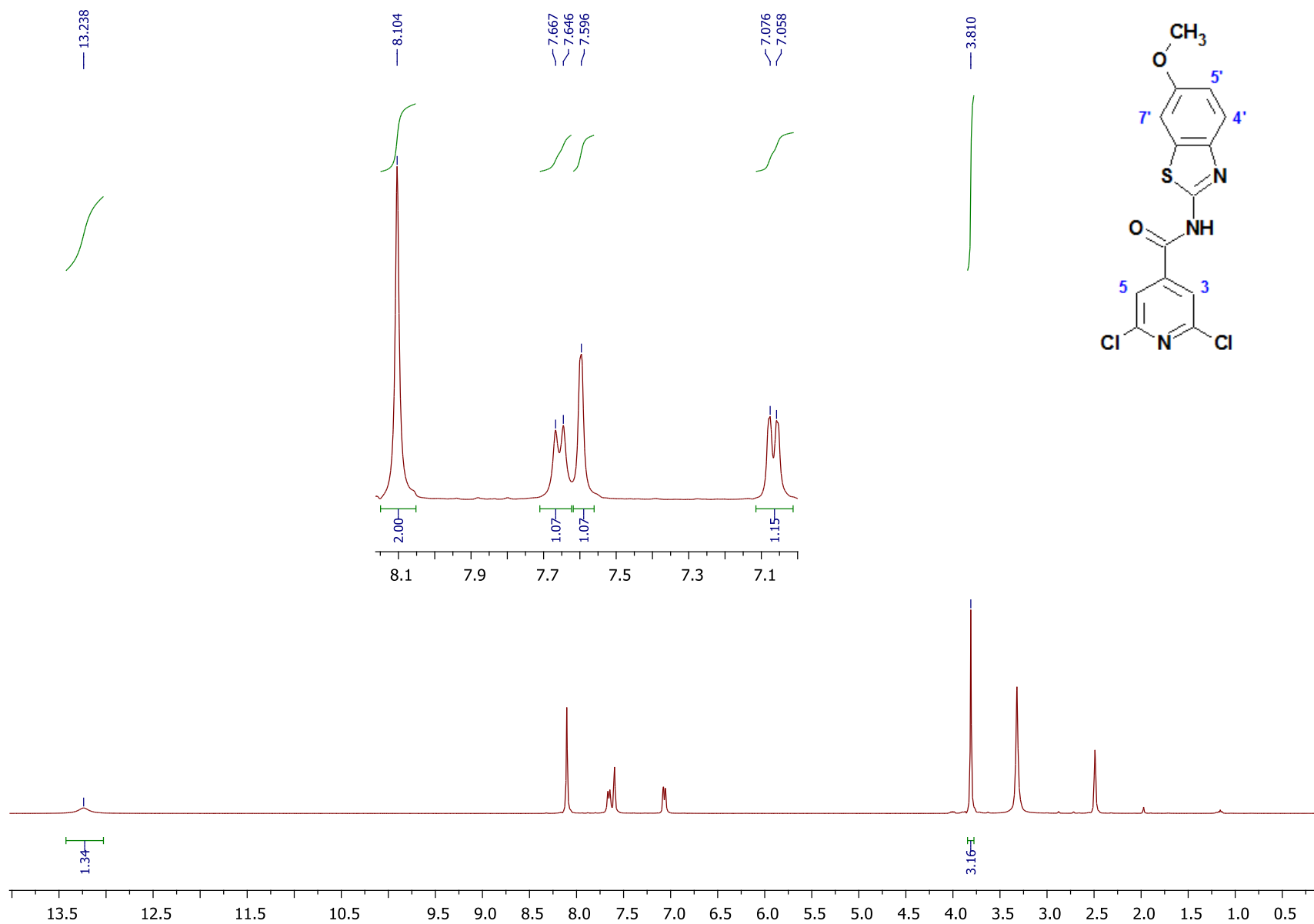
Espectro 77. RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) de 2,6-dicloro-*N*-(4-fluorofenil)piridin-4-carboxamida (S2-9-9).

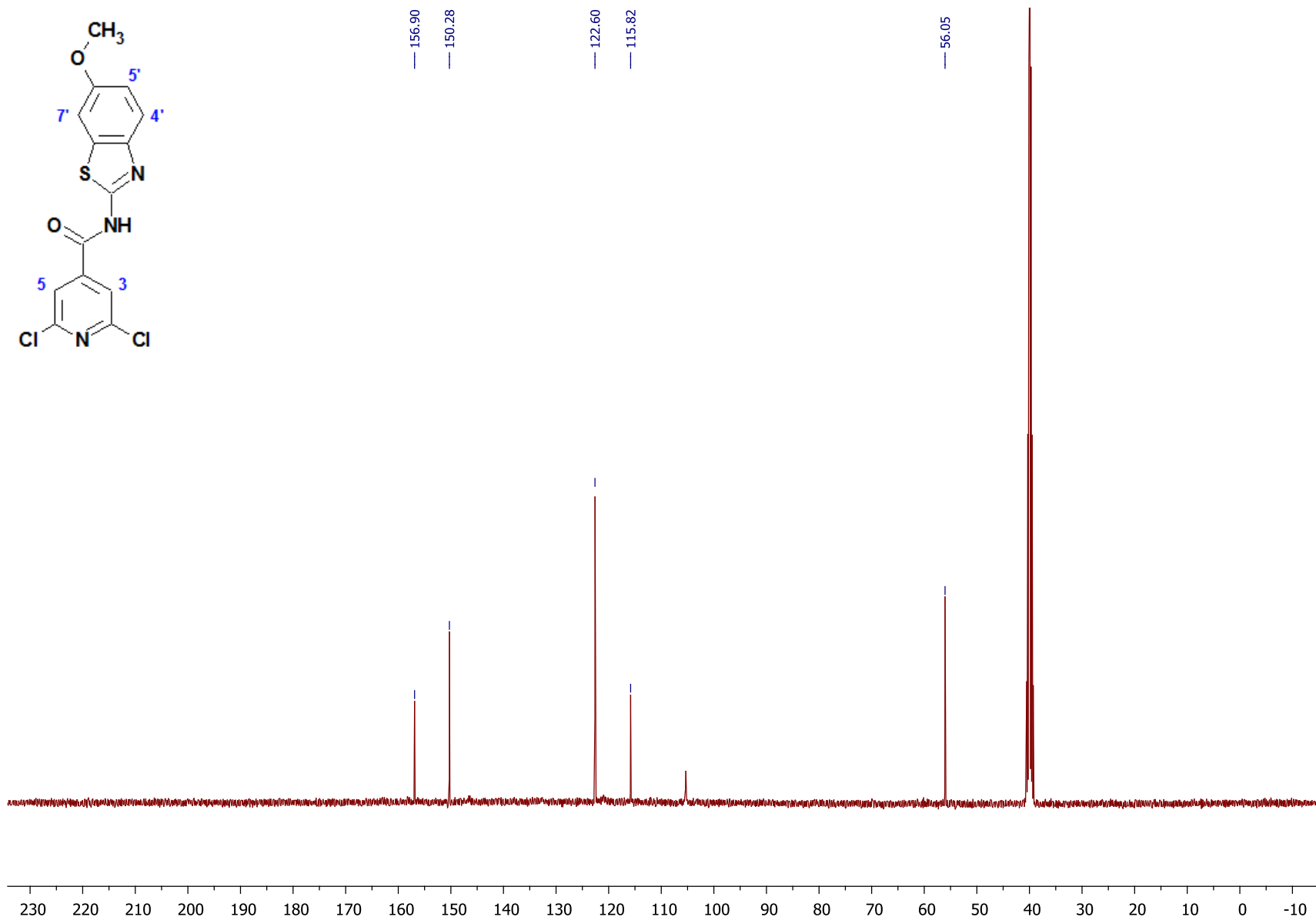
Espectro 78. RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) de 2,6-dicloro-*N*-(4-fluorofenil)piridin-4-carboxamida (S2-9-9).

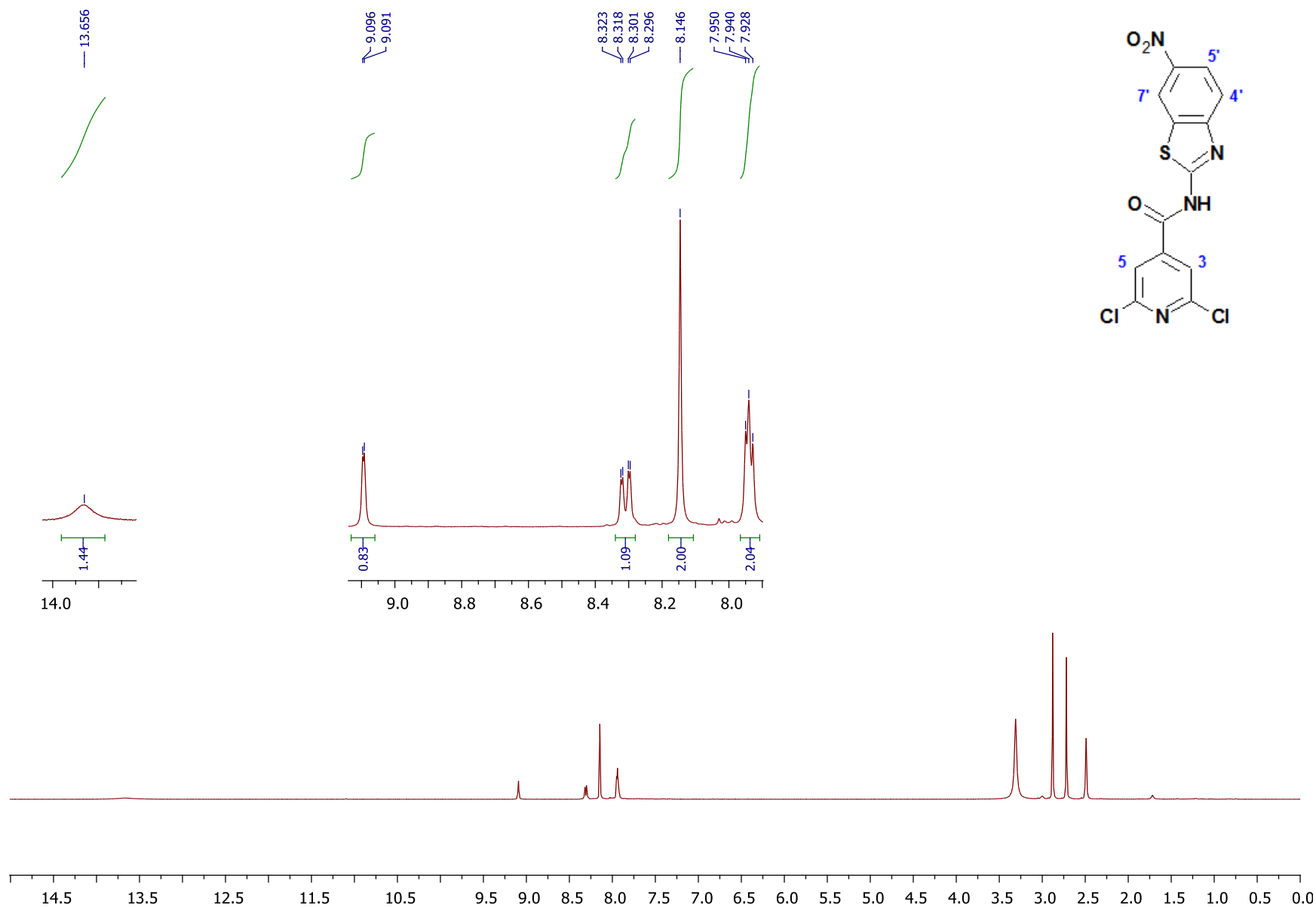
Espectro 79. RMN ^{19}F (DMSO- d_6 , 376.5 MHz) de 2,6-dicloro-*N*-(4-fluorofenil)piridin-4-carboxamida (**S2-9-9**).

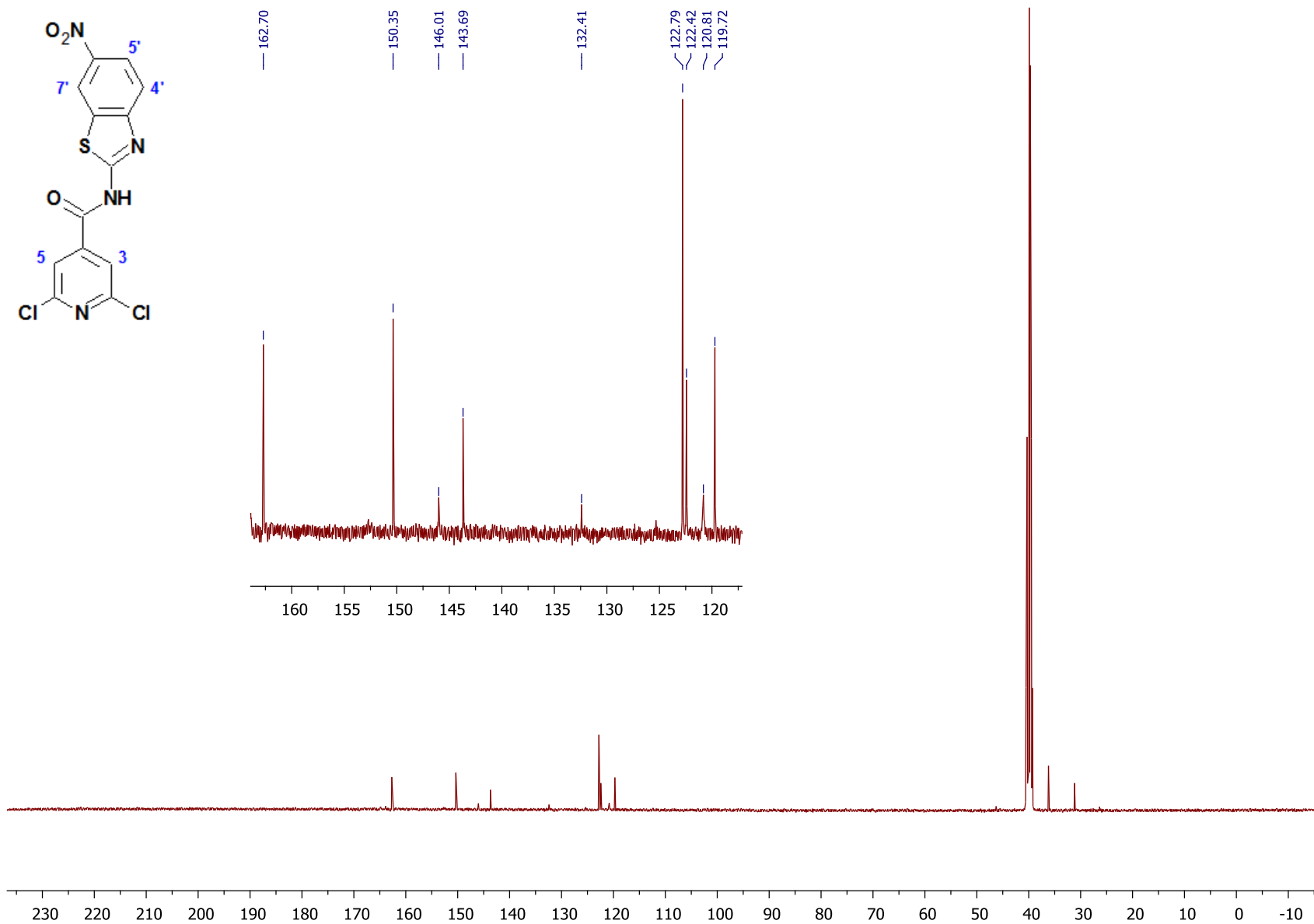
Espectro 80. RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) de 2,6-dicloro-*N*-(6-cloro-1*H*-bencimidazol-2-il)piridin-4-carboxamida (S2-15-15).

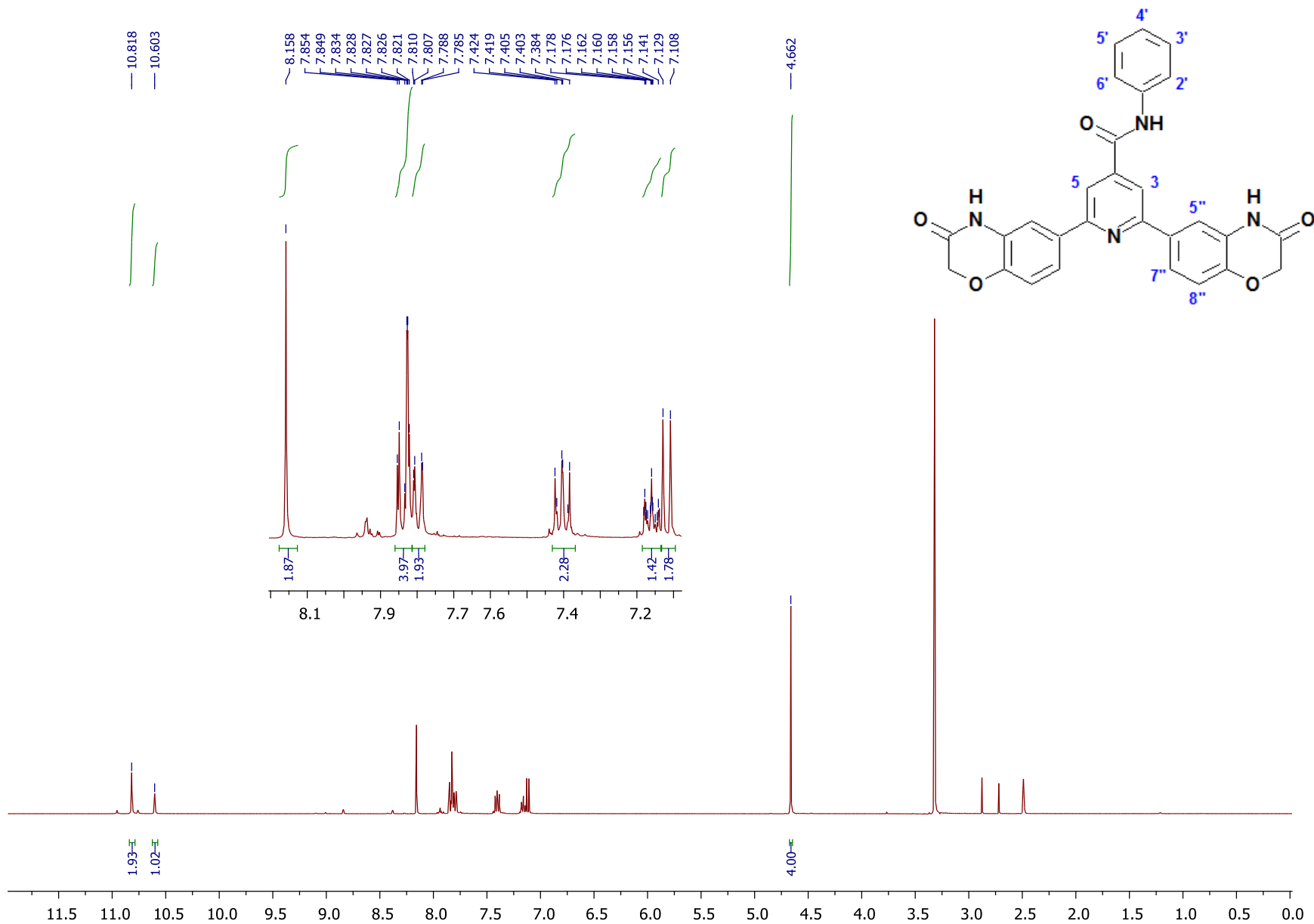
Espectro 81. RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) de 2,6-dicloro-*N*-(6-cloro-1*H*-bencimidazol-2-il)piridin-4-carboxamida (S2-15-15).

Espectro 82. RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) de 2,6-dicloro-*N*-(6-metoxi-1,3-benzotiazol-2-il)piridin-4-carboxamida (S2-16-16).

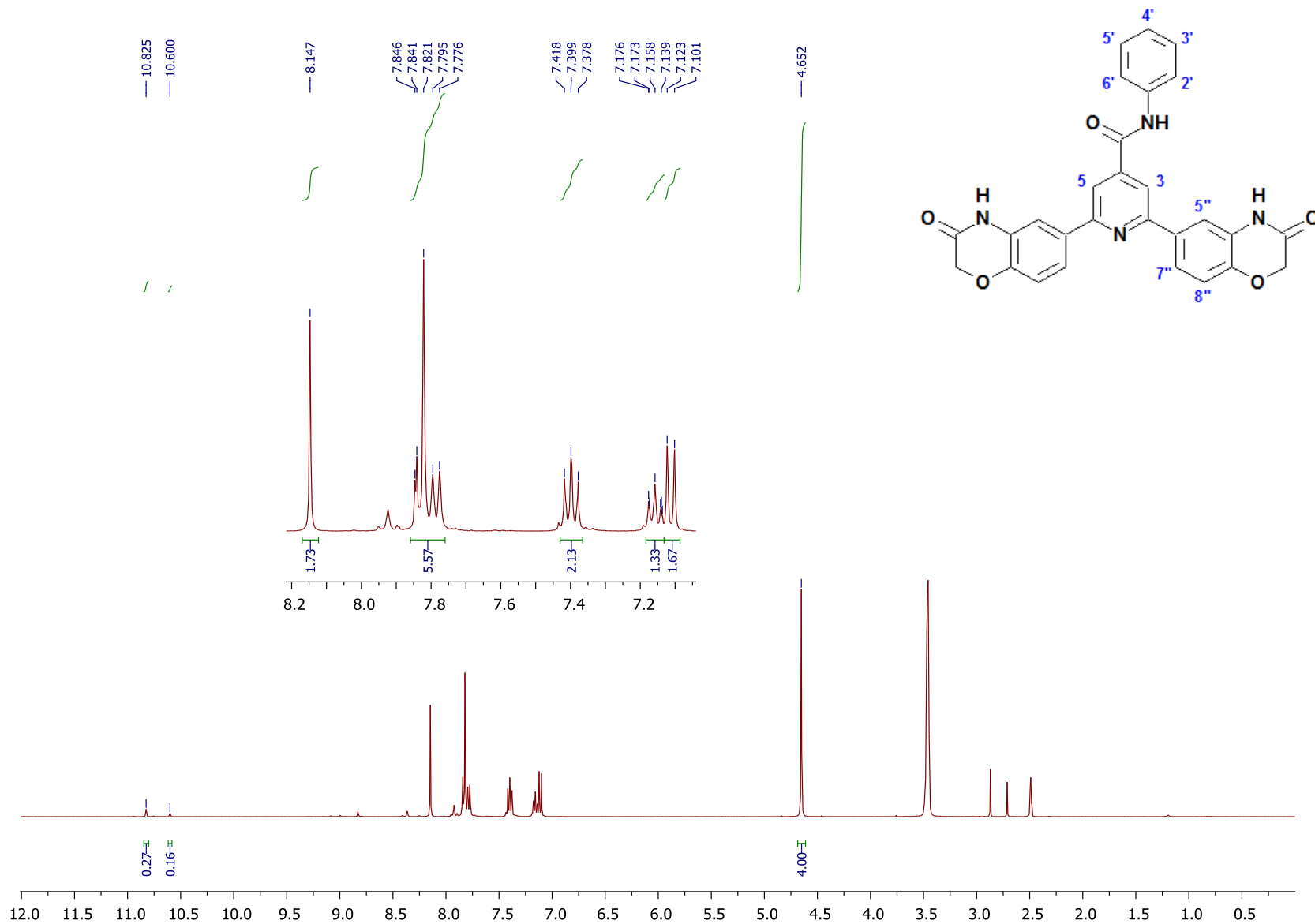
Espectro 83. RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) de 2,6-dicloro-*N*-(6-metoxi-1,3-benzotiazol-2-il)piridin-4-carboxamida (**S2-16-16**).

Espectro 84. RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) de 2,6-dicloro-*N*-(6-nitro-1,3-benzotiazol-2-il)piridin-4-carboxamida (S2-17-17).

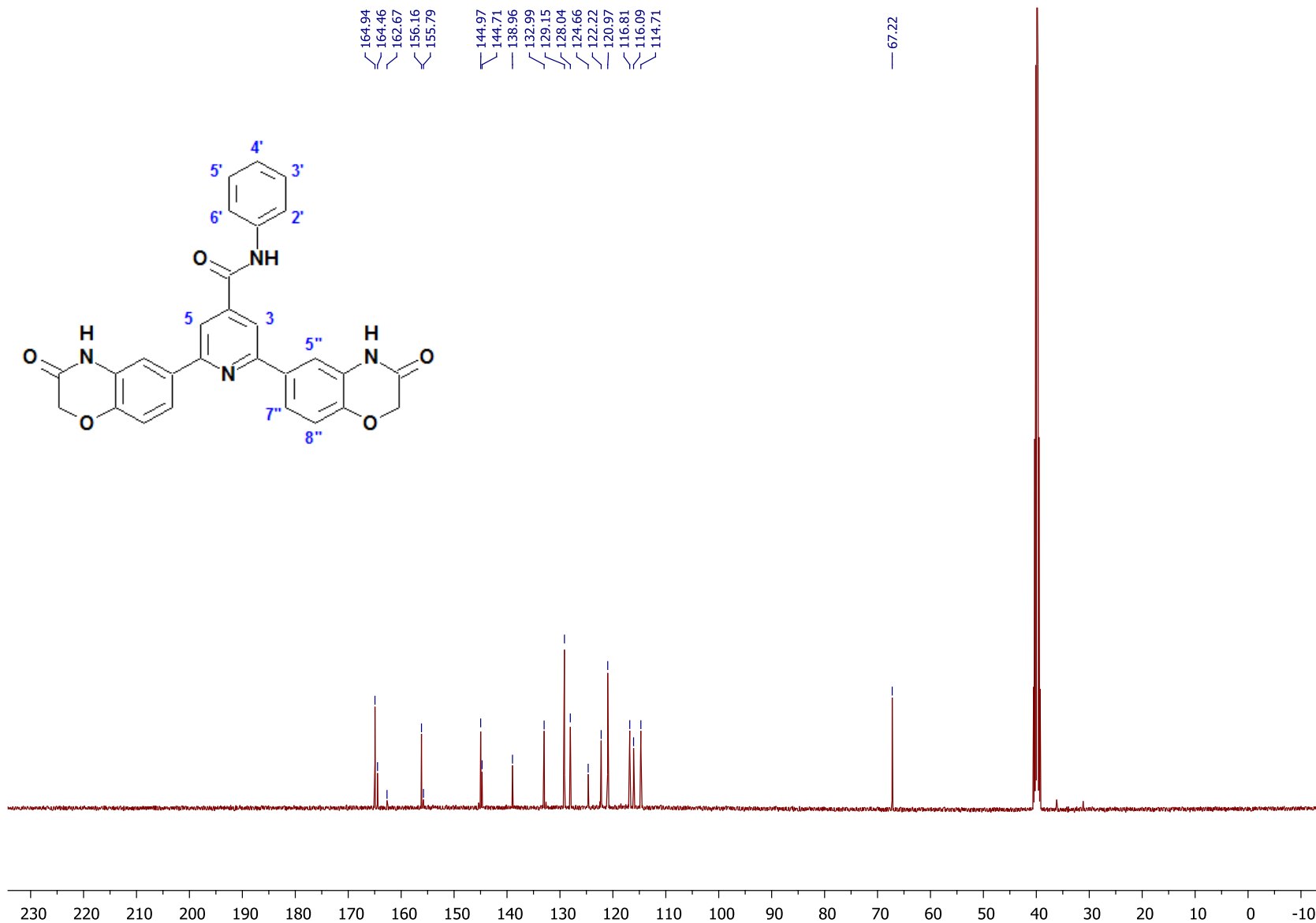
Espectro 85. RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) de 2,6-dicloro-*N*-(6-nitro-1,3-benzotiazol-2-il)piridin-4-carboxamida (S2-17-17).

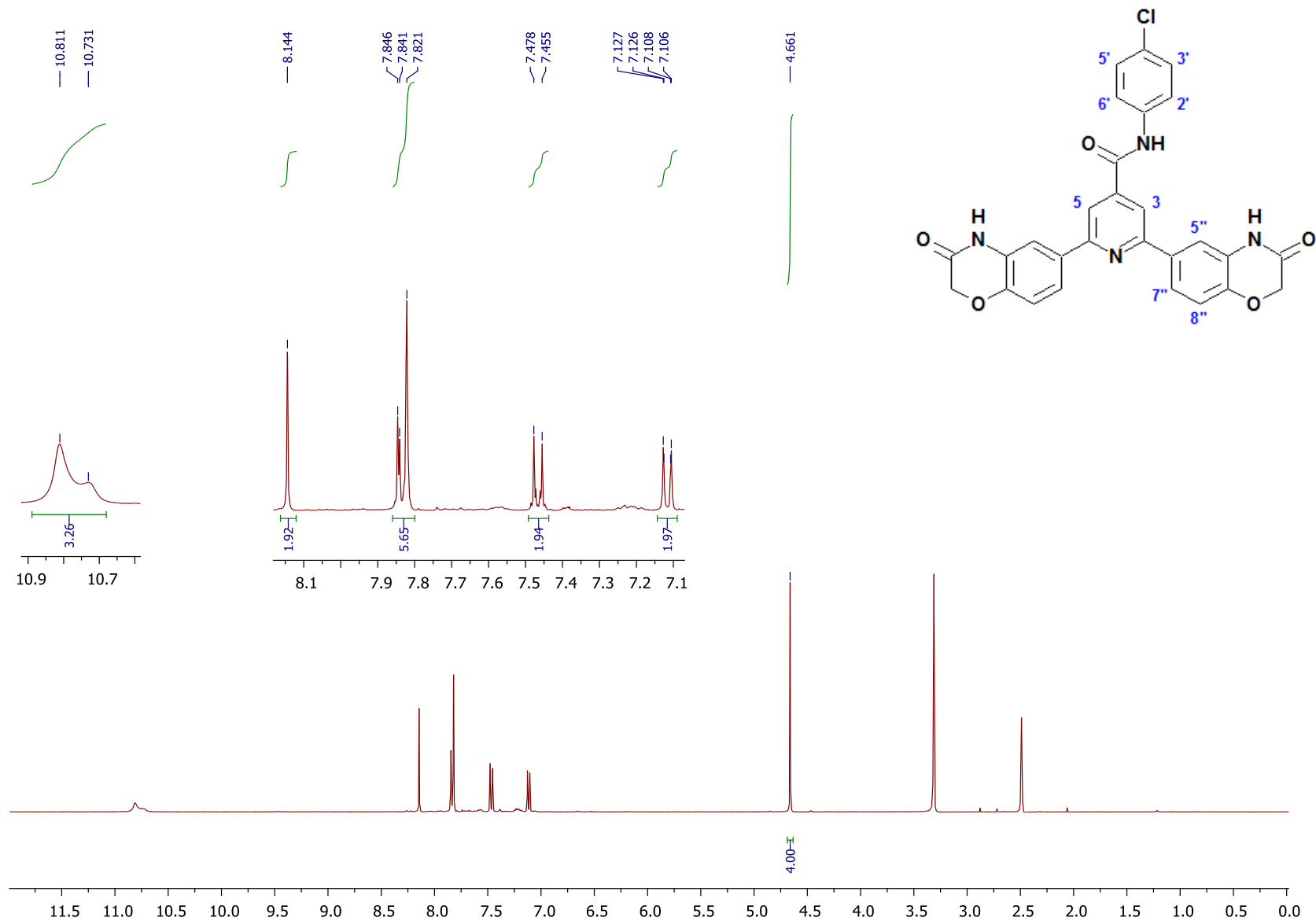


Espectro 86. RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) de 2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-6-il)-N-fenilpiridin-4-carboxamida (**S2-1**).

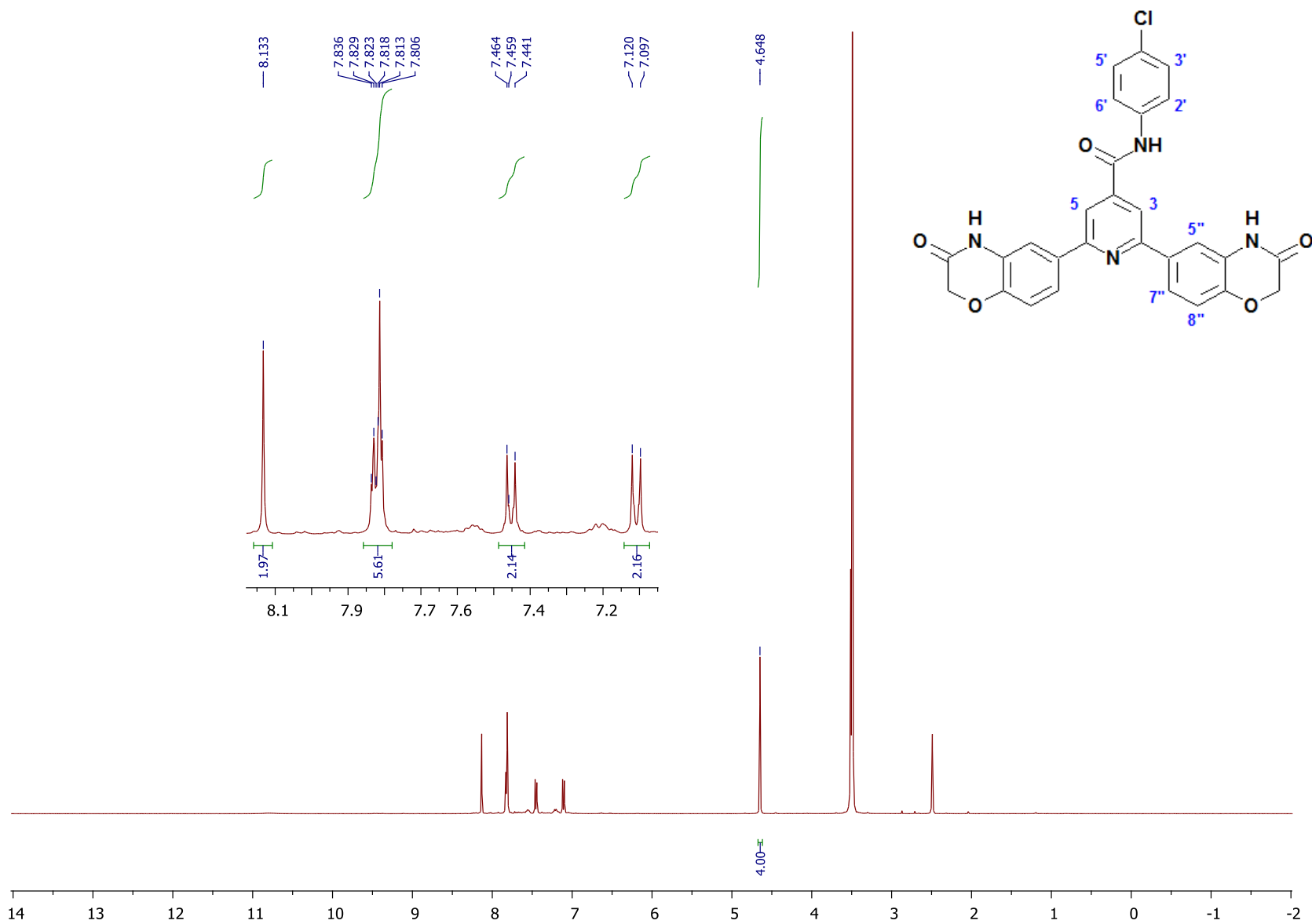


Espectro 87. RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) int. con D_2O de 2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-6-il)-N-fenilpiridin-4-carboxamida (**S2-1**).

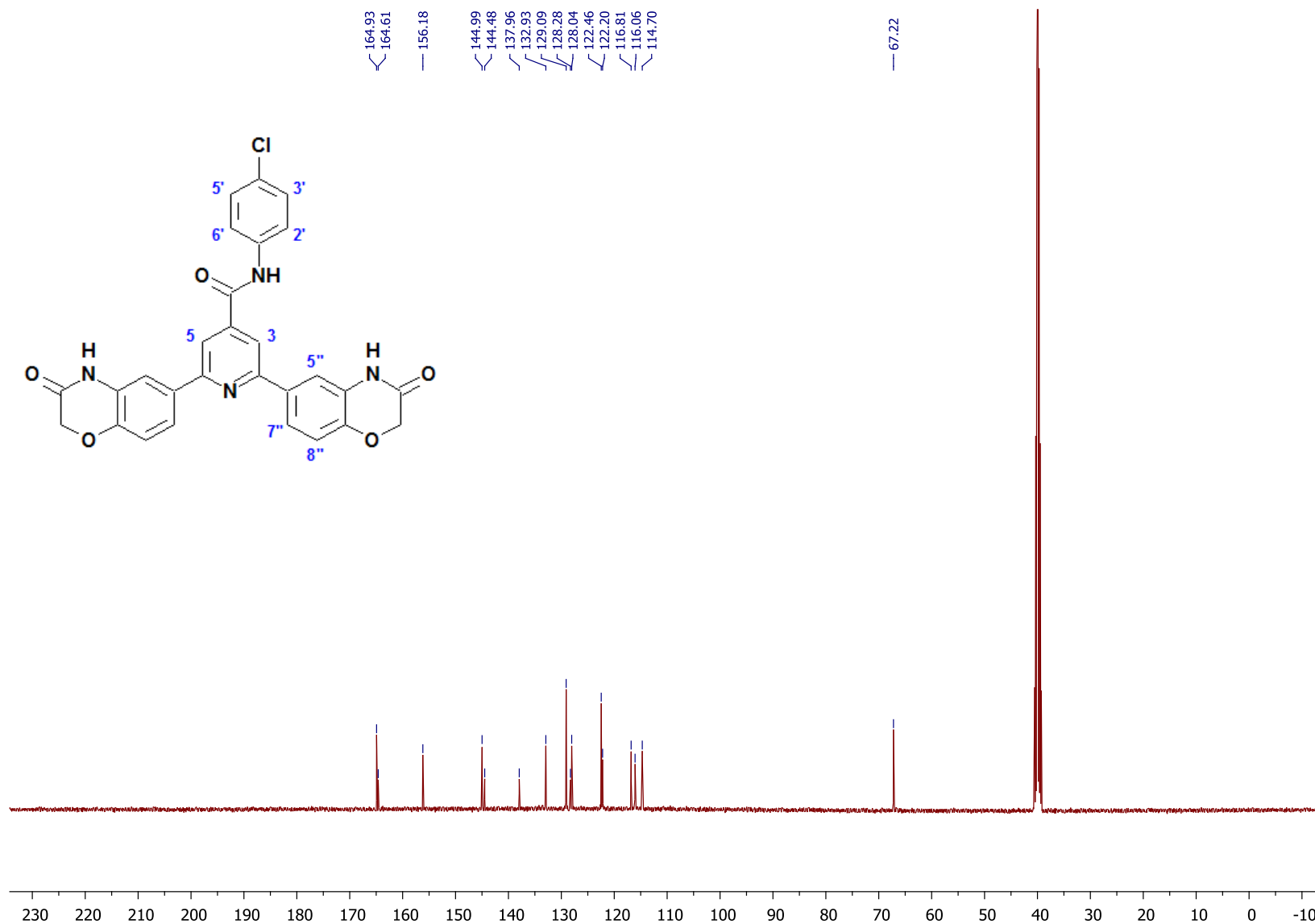
Espectro 88. RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) de 2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-6-il)-N-fenilpiridin-4-carboxamida (S2-1).



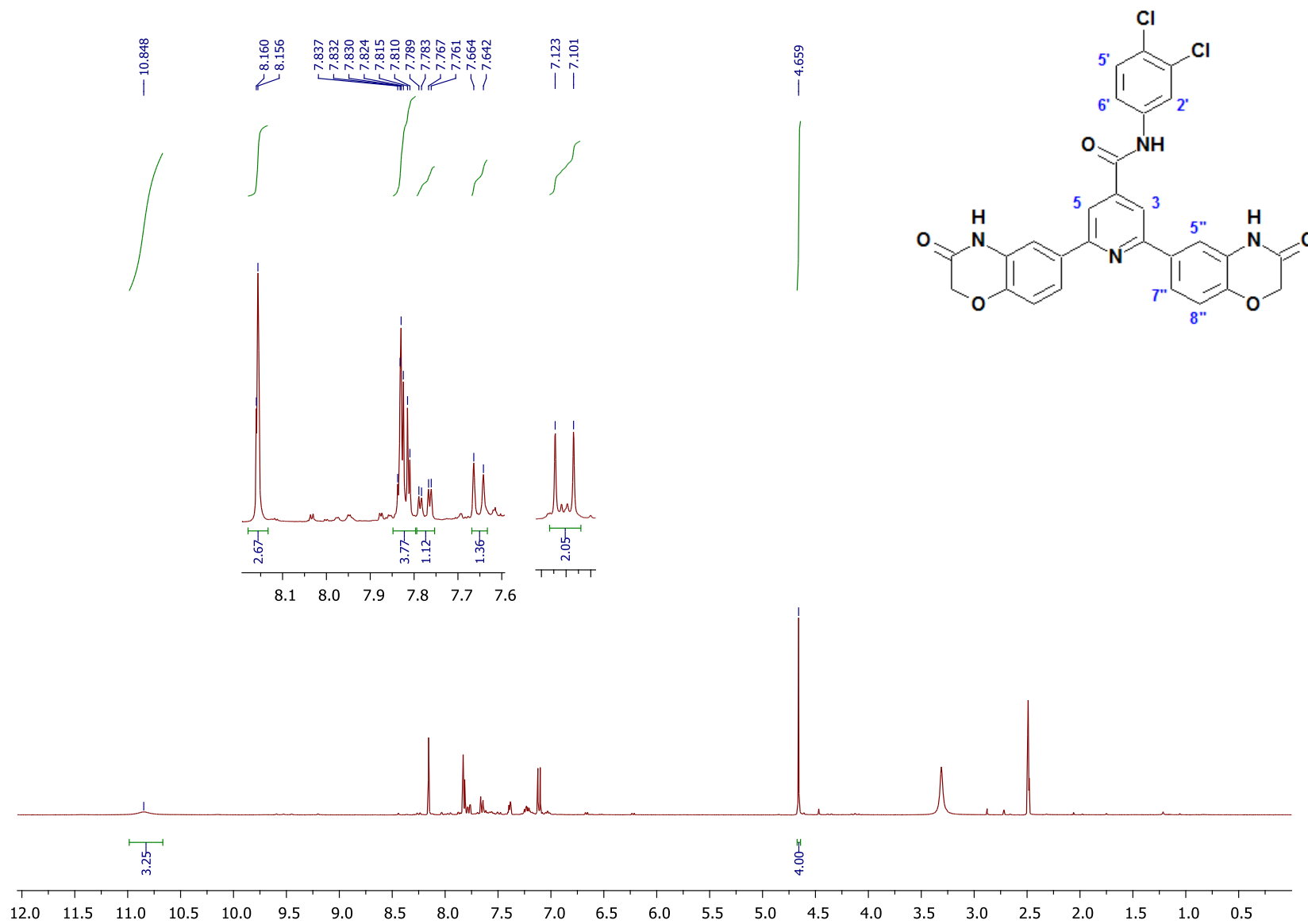
Espectro 89. RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) de *N*-(4-clorofenil)-2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (**S2-2**).



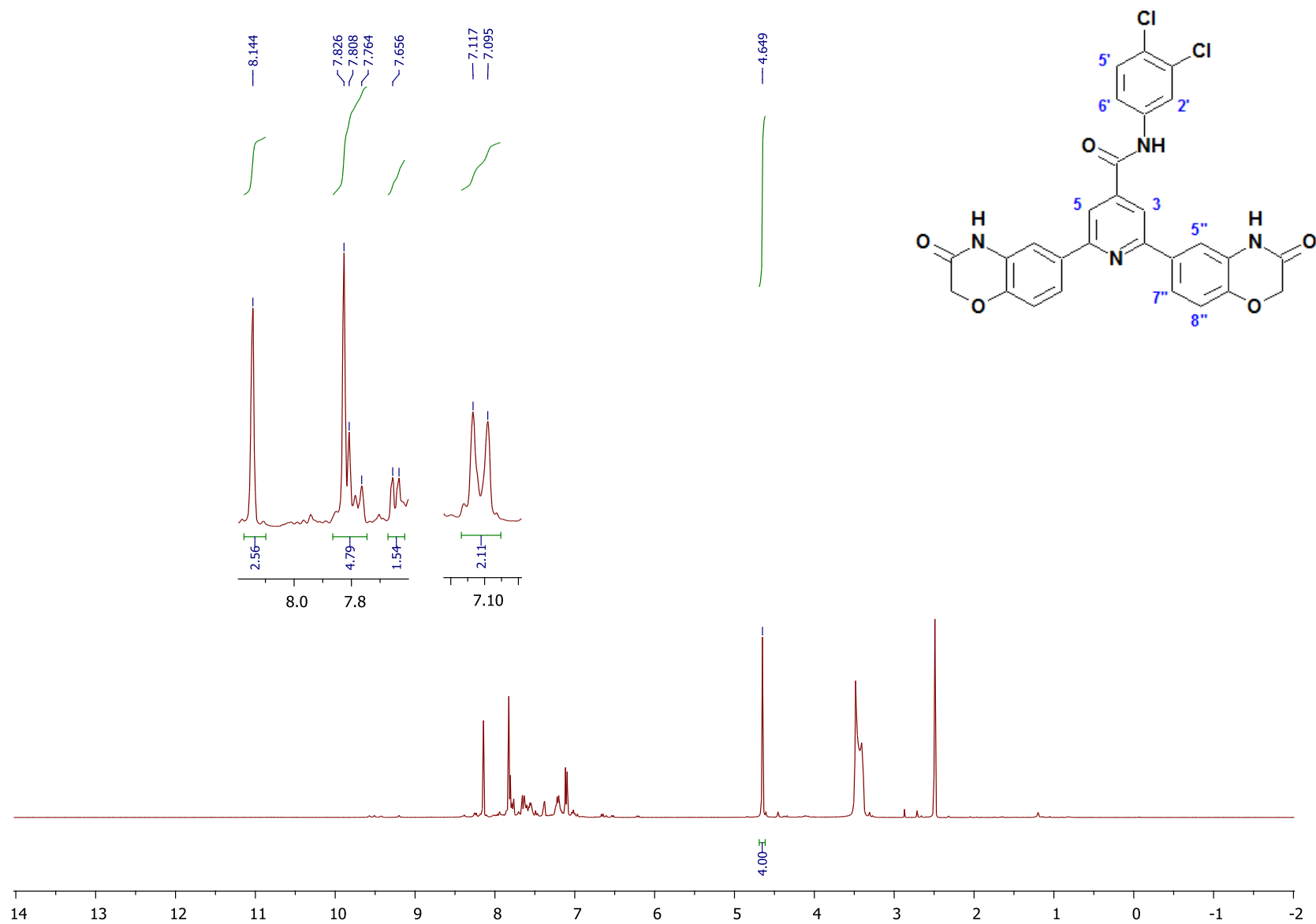
Espectro 90. RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) int. con D_2O de *N*-(4-clorofenil)-2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (S2-2).



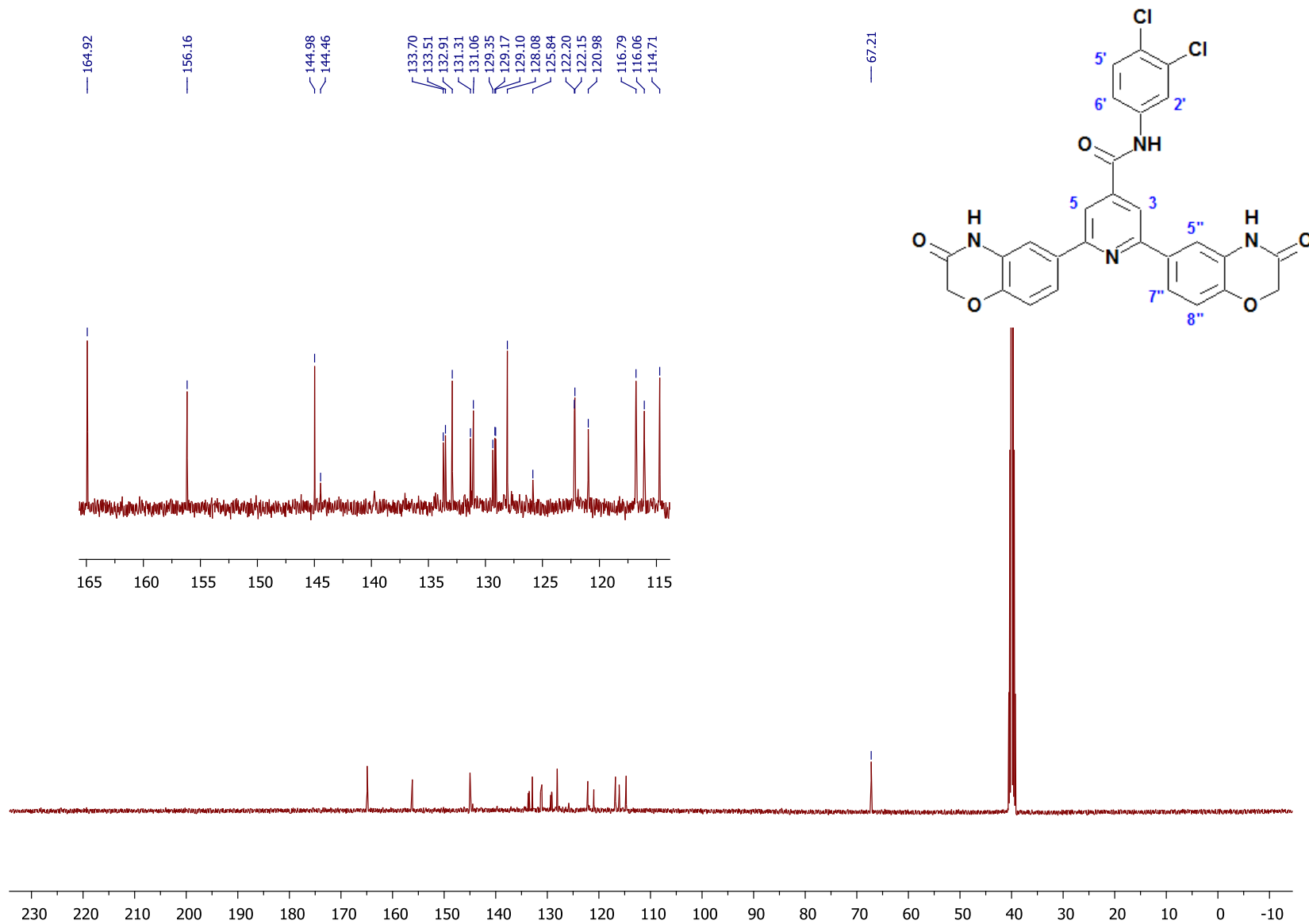
Espectro 91. RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) de *N*-(4-clorofenil)-2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (**S2-2**).



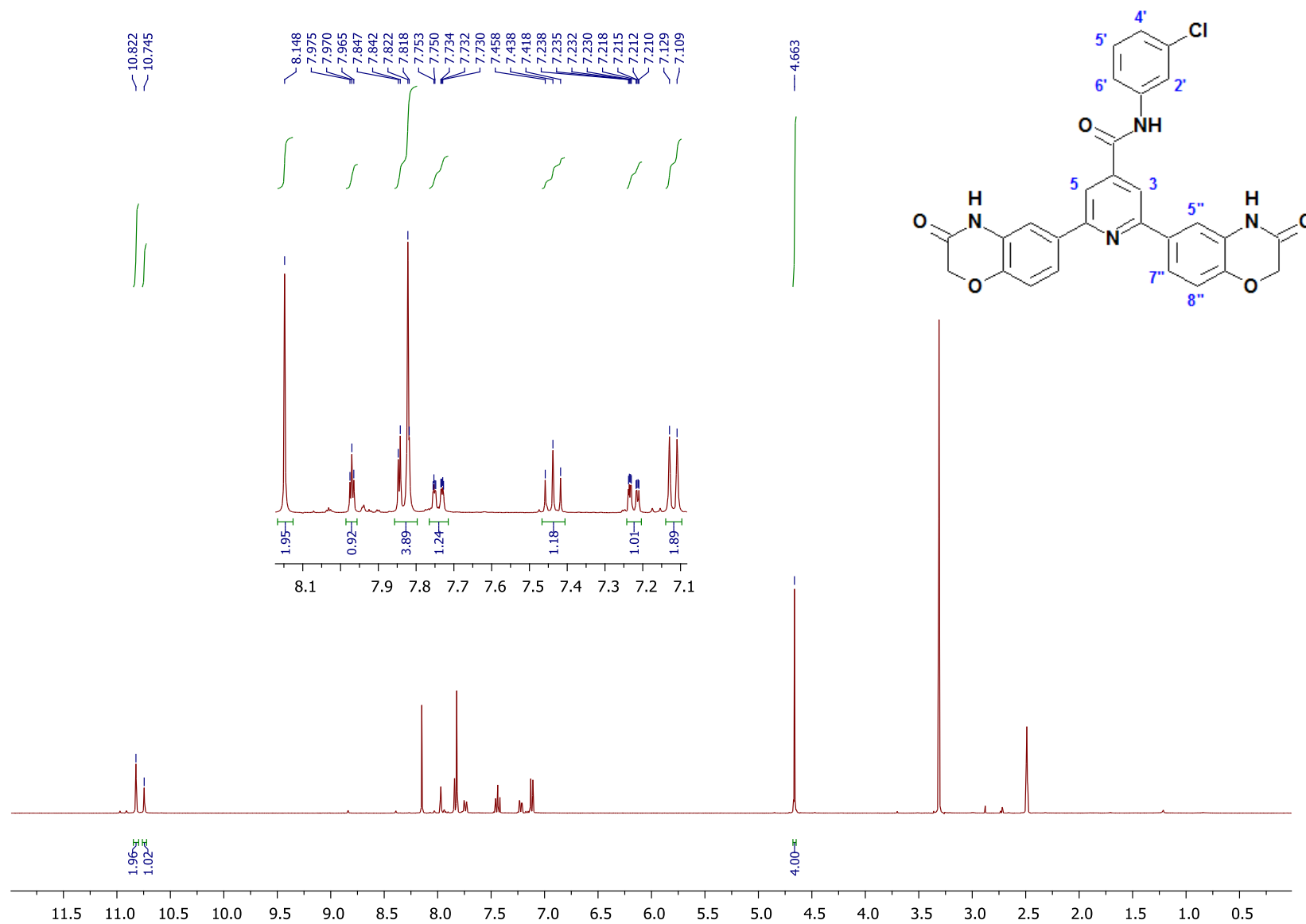
Espectro 92. RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) de *N*-(3,4-diclorofenil)-2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (**S2-3**).



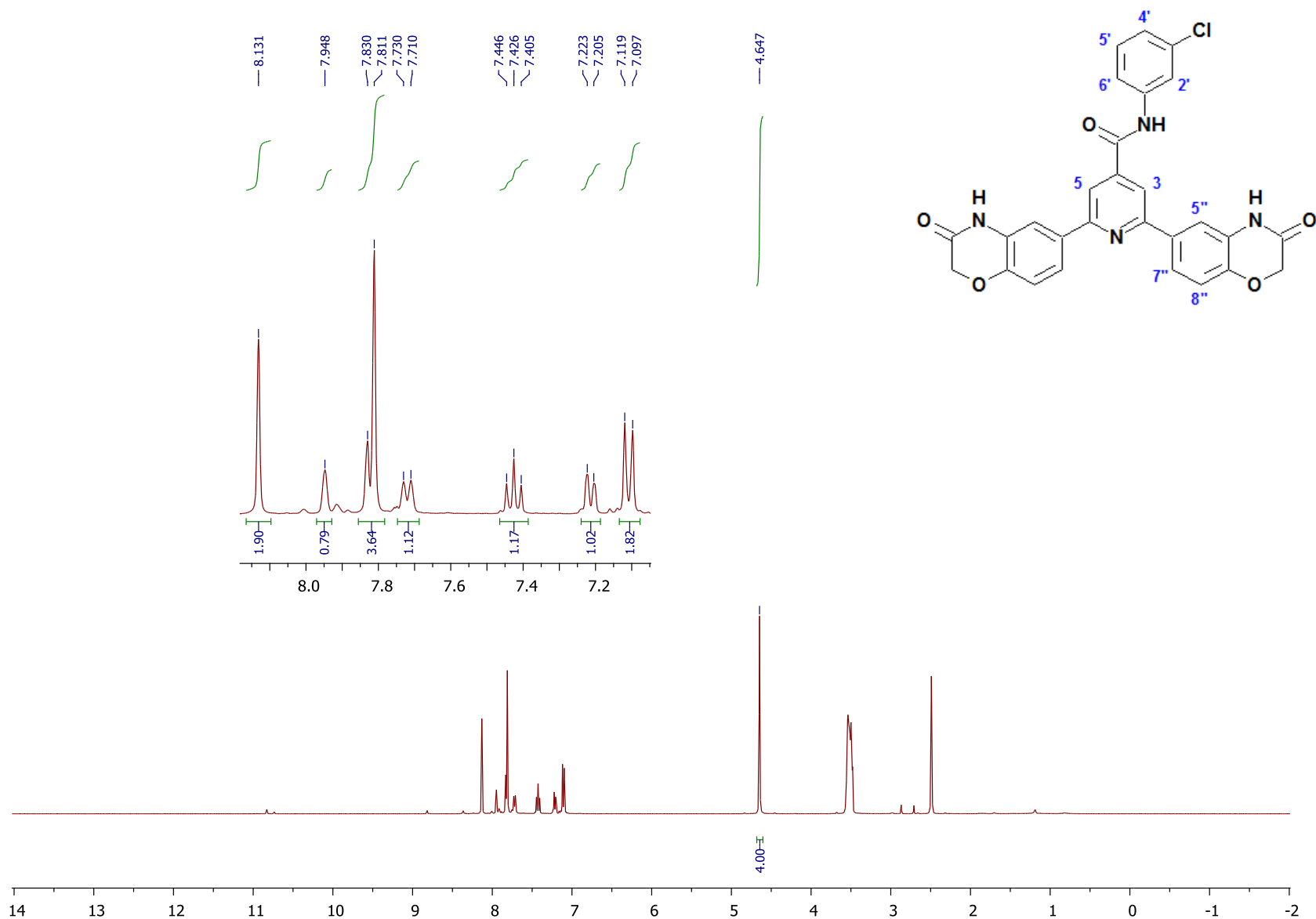
Espectro 93. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) int. con D_2O de *N*-(3,4-diclorofenil)-2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (**S2-3**).



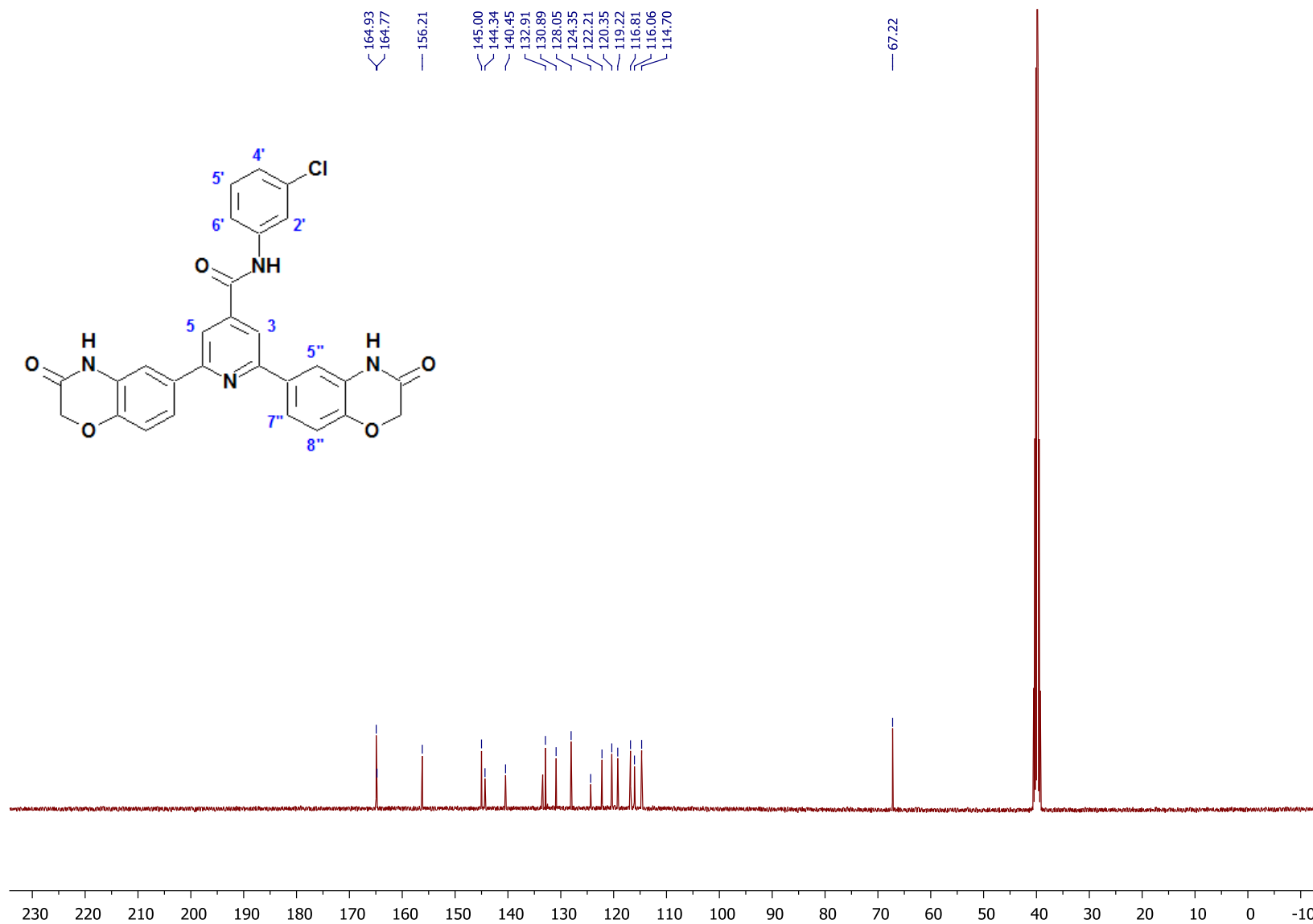
Espectro 94. RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) de *N*-(3,4-diclorofenil)-2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (**S2-3**).



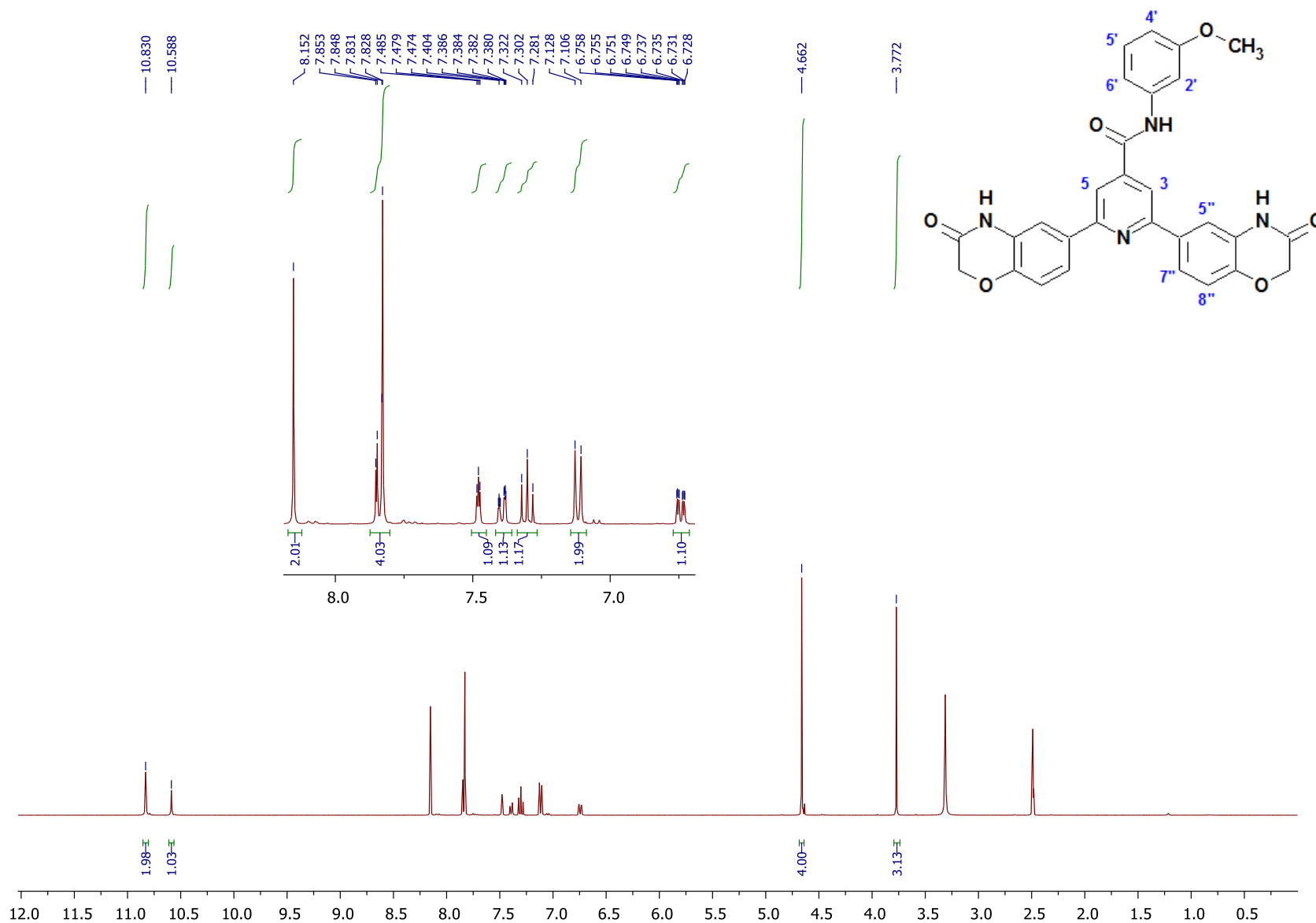
Espectro 95. RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) de *N*-(3-clorofenil)-2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (**S2-5**).



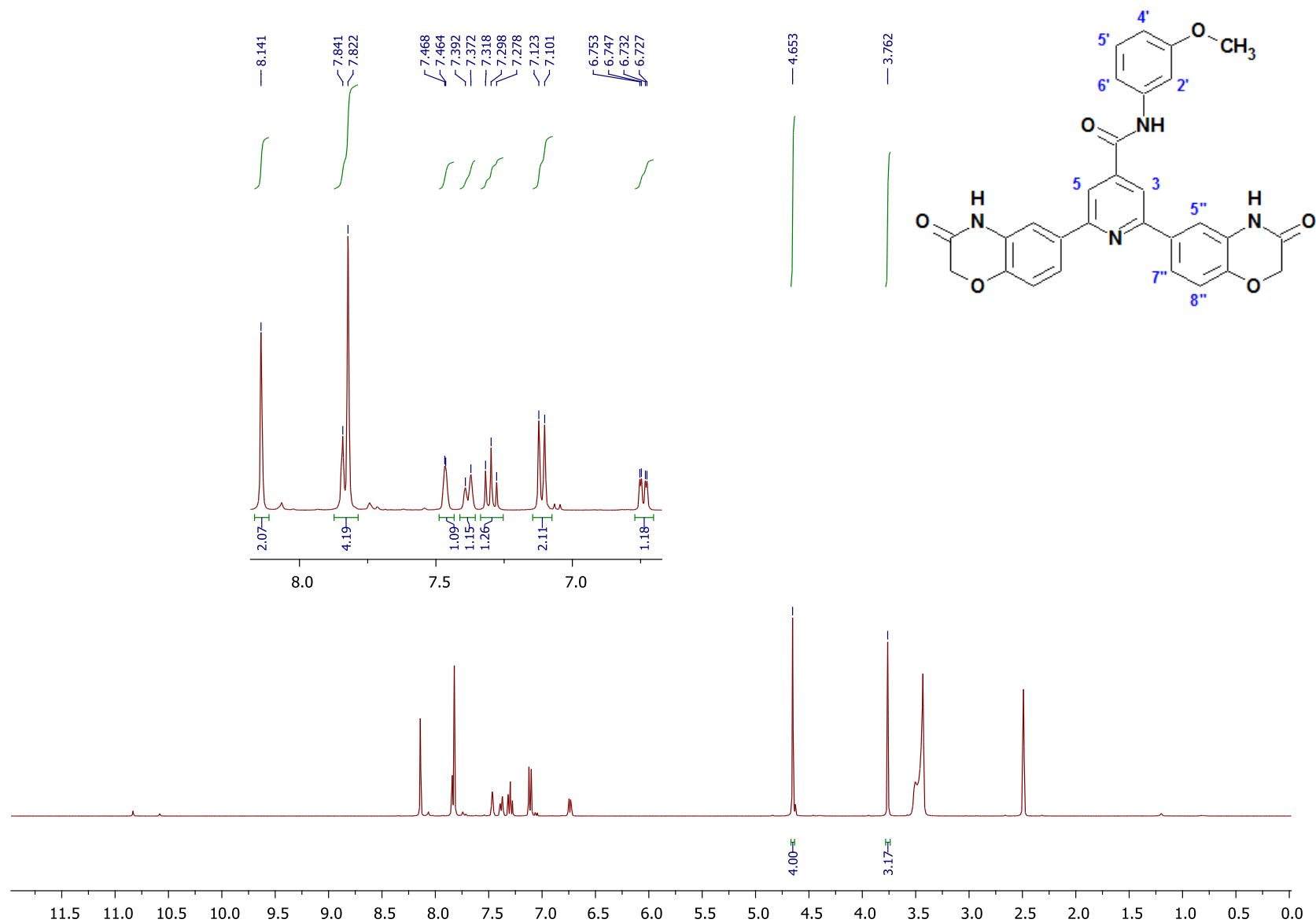
Espectro 96. RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) int. con D_2O de *N*-(3-clorofenil)-2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (S2-5).



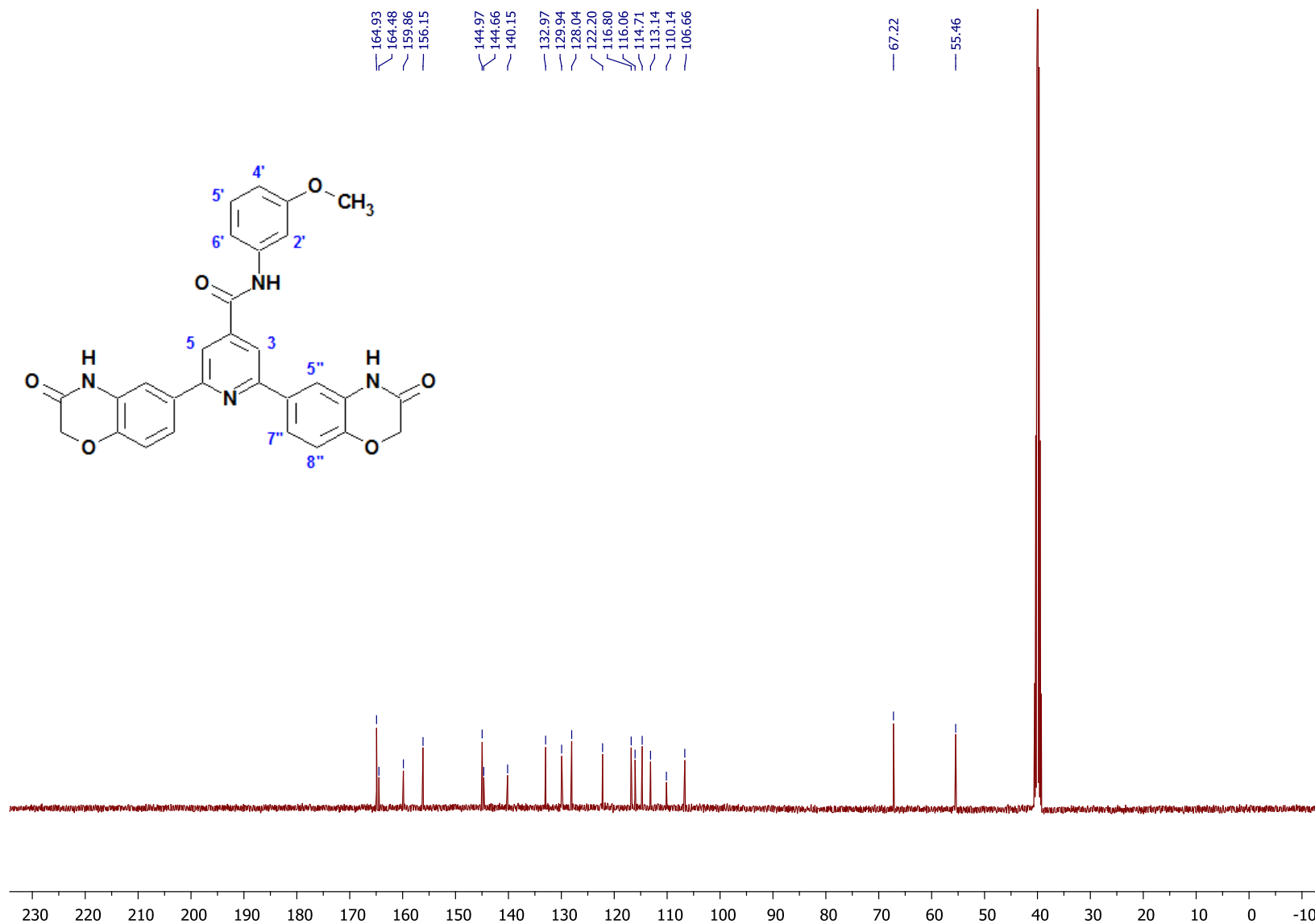
Espectro 97. RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz) de *N*-(3-clorofenil)-2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (S2-5).



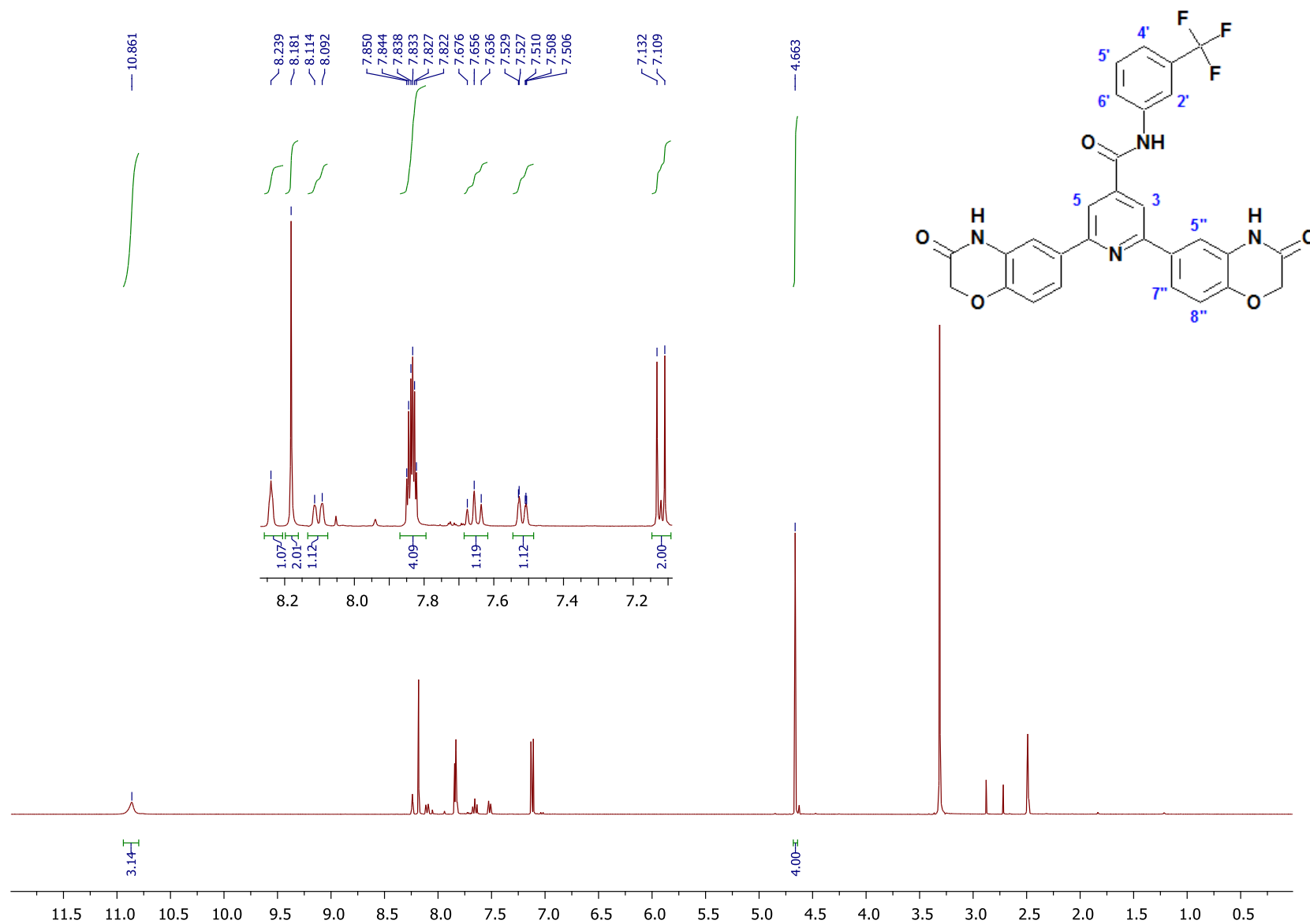
Espectro 98. RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) de *N*-[3-(metiloxi)fenil]-2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (**S2-6**).



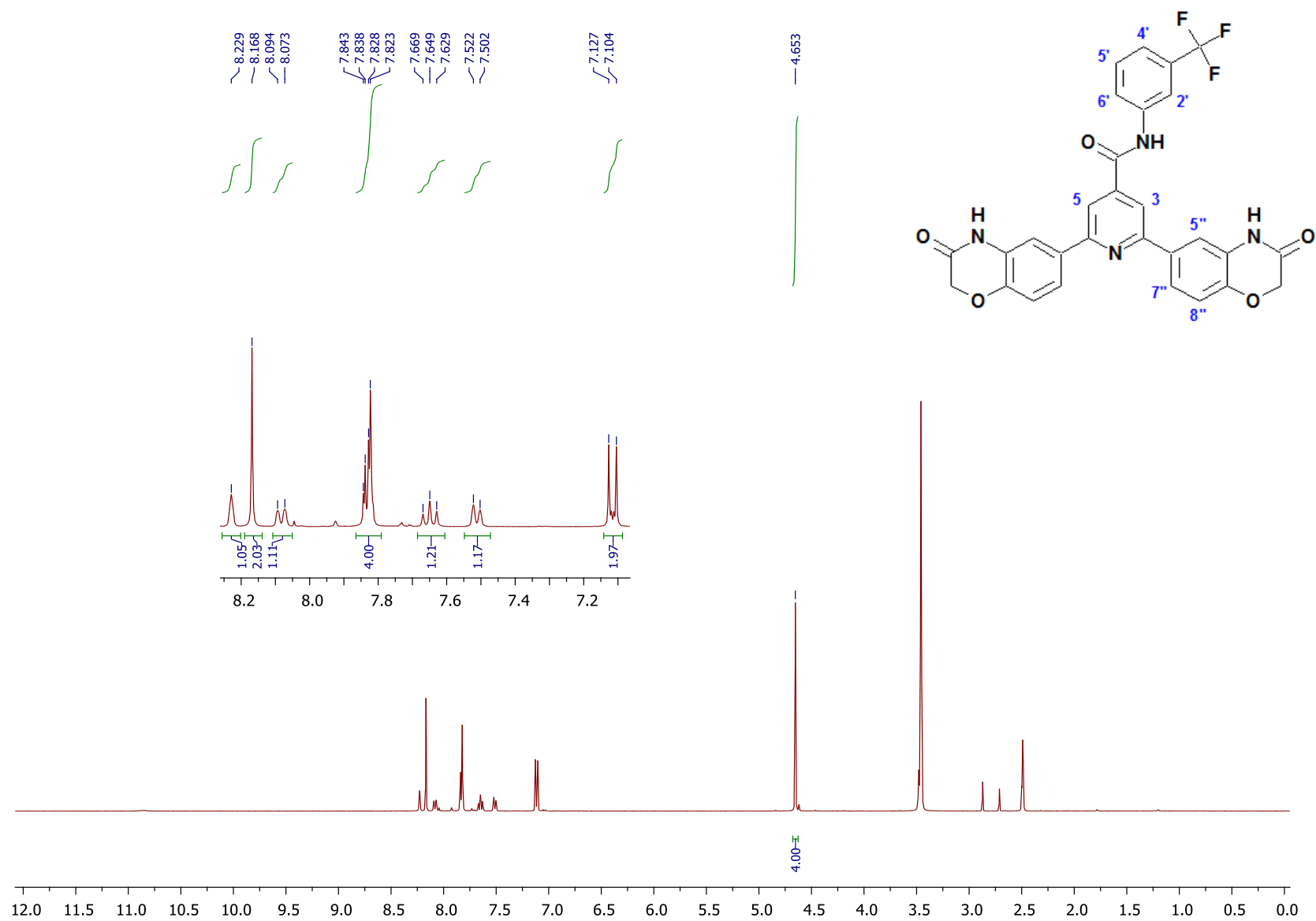
Espectro 99. RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) int. con D_2O de *N*-[3-(metiloxi)fenil]-2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (**S2-6**).



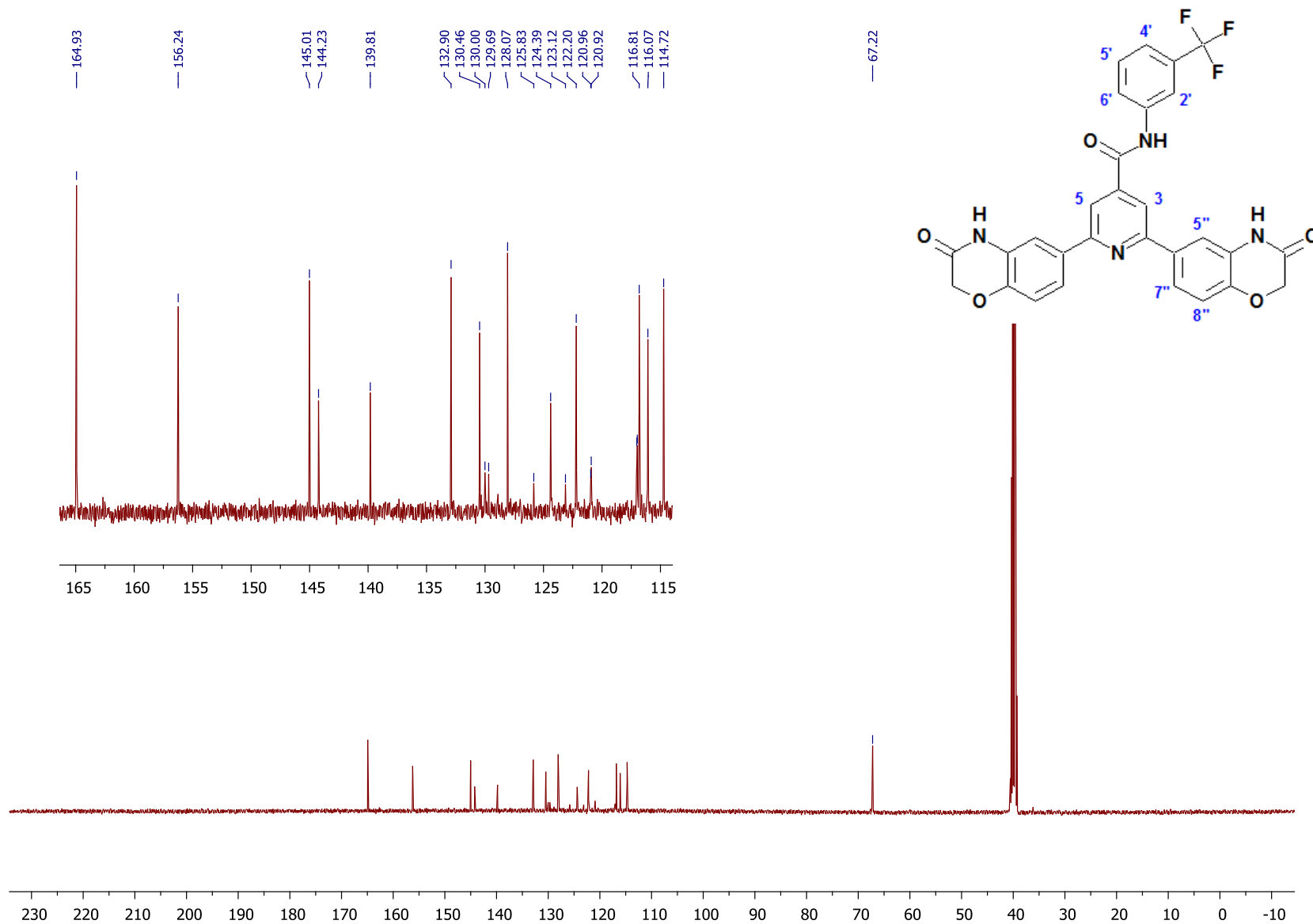
Espectro 100. RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz) de *N*-[3-(metiloxi)fenil]-2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (**S2-6**).



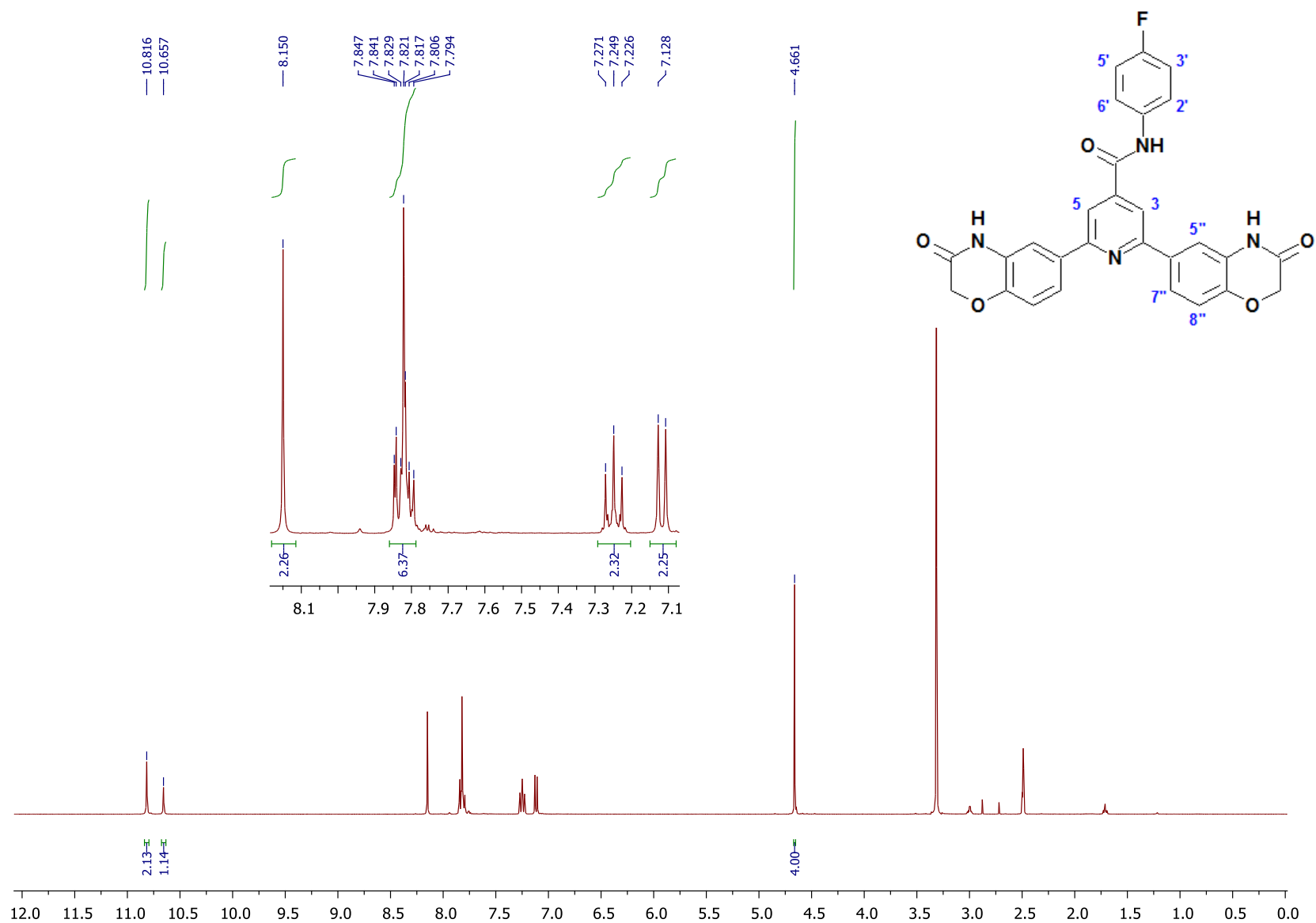
Espectro 101. RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) de 2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-6-il)-N-[3-(trifluorometil)fenil]piridin-4-carboxamida (**S2-8**).



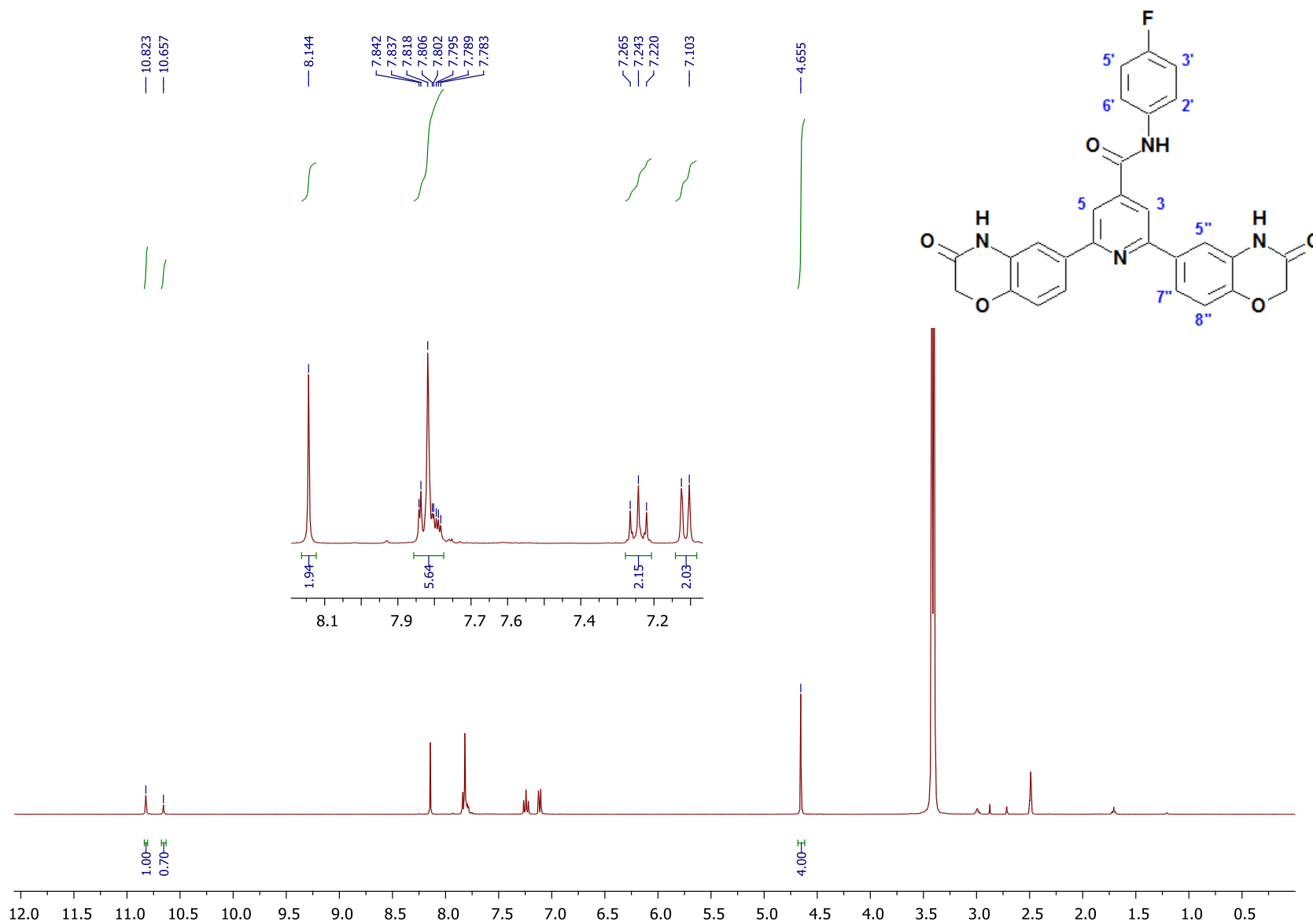
Espectro 102. RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) int. con D_2O de 2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-6-il)-N-[3-(trifluorometil)fenil]piridin-4-carboxamida (**S2-8**).



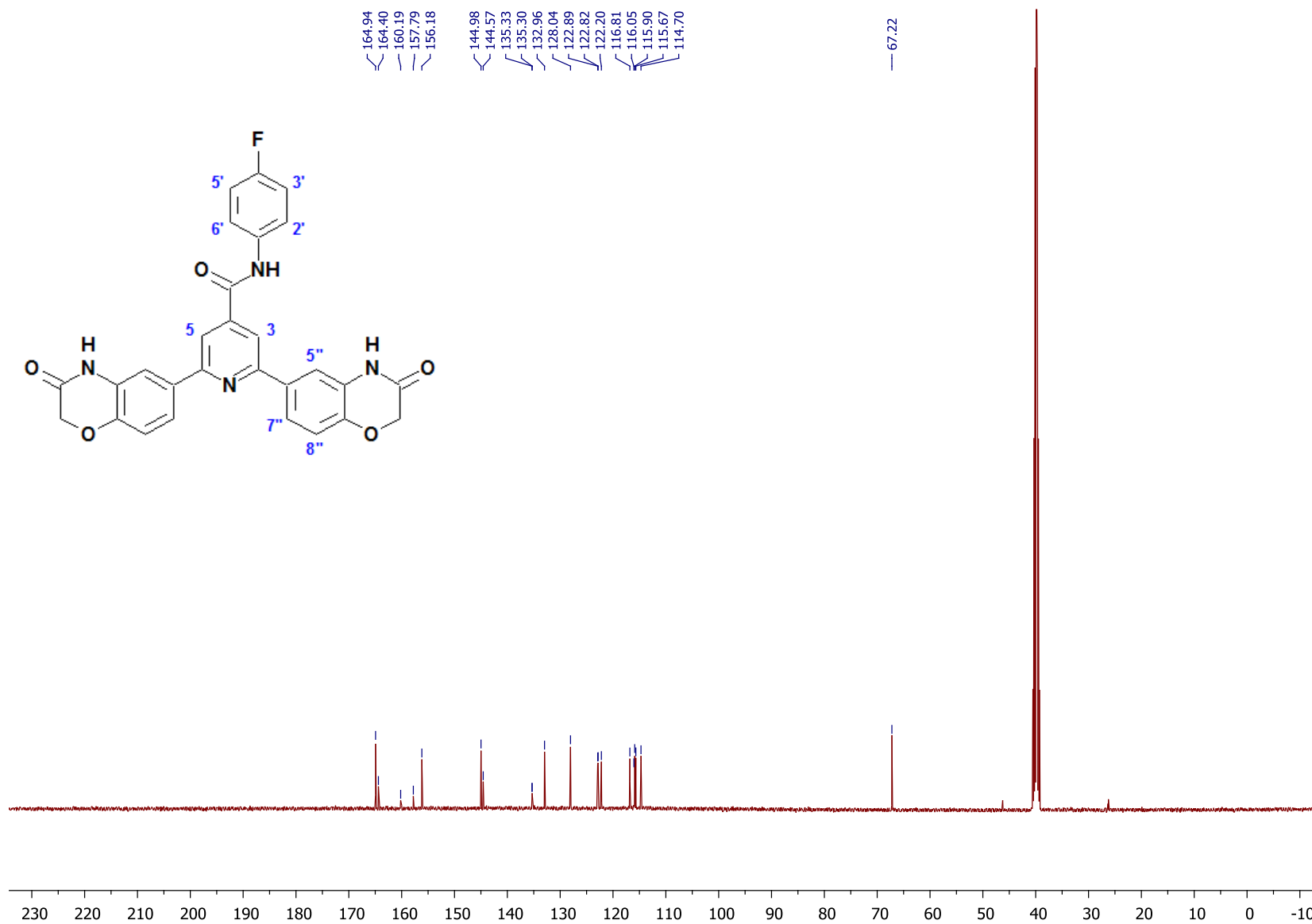
Espectro 103. RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz) de 2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-6-il)-N-[3-(trifluorometil)fenil]piridin-4-carboxamida (**S2-8**).



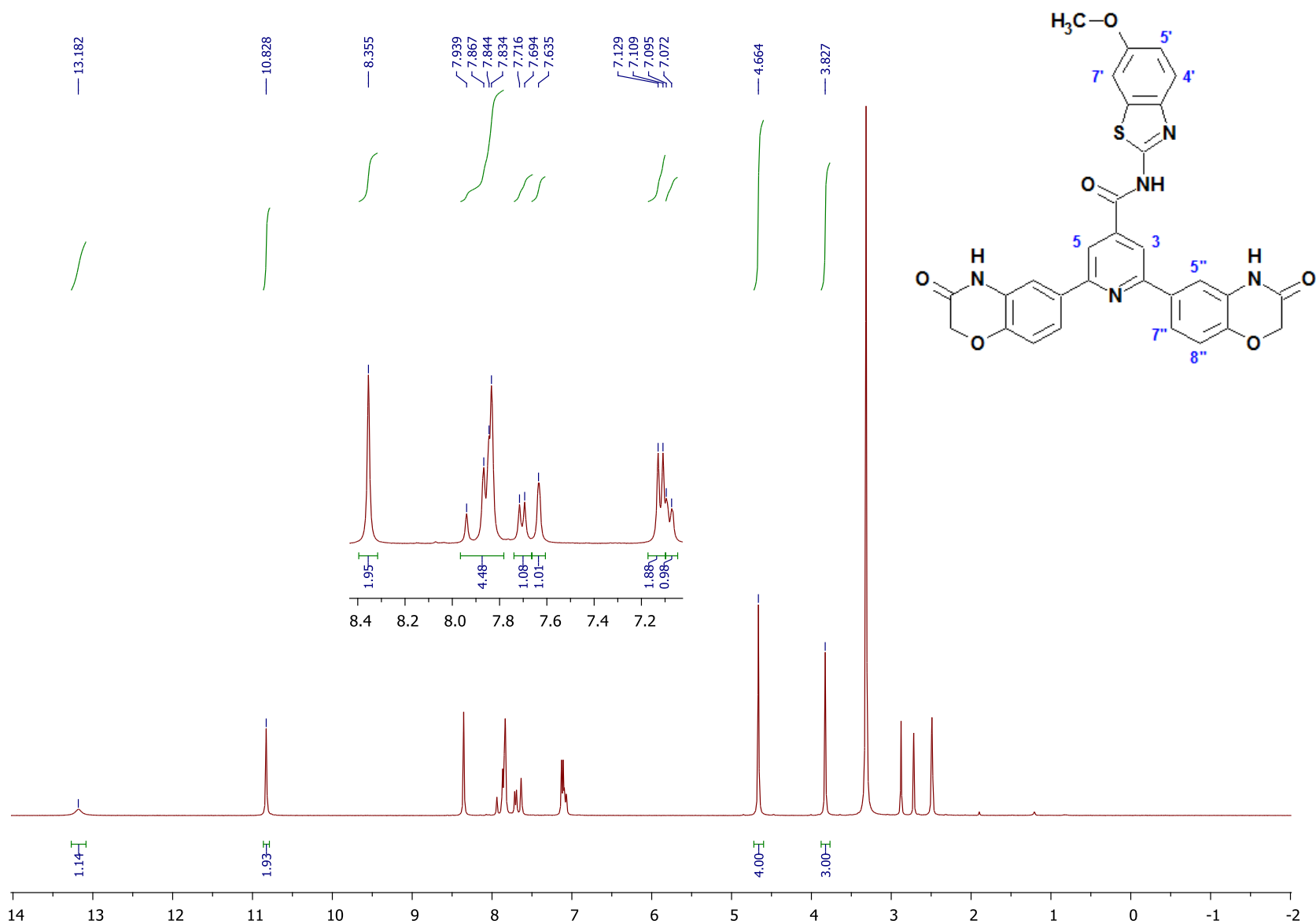
Espectro 104. RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) de *N*-(4-fluorofenil)-2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (S2-9).



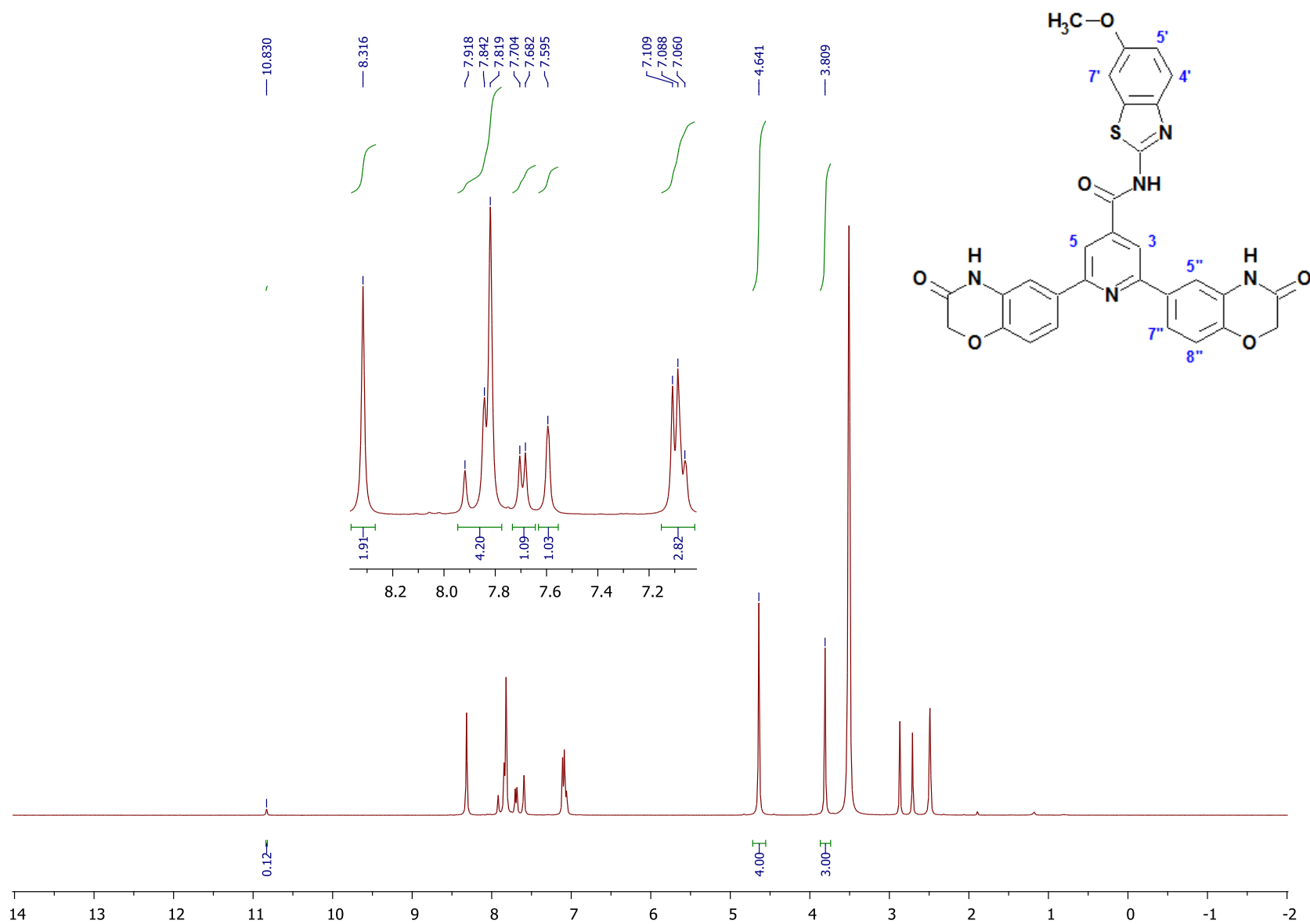
Espectro 105. RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) int. con D_2O de *N*-(4-fluorofenil)-2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (**S2-9**).



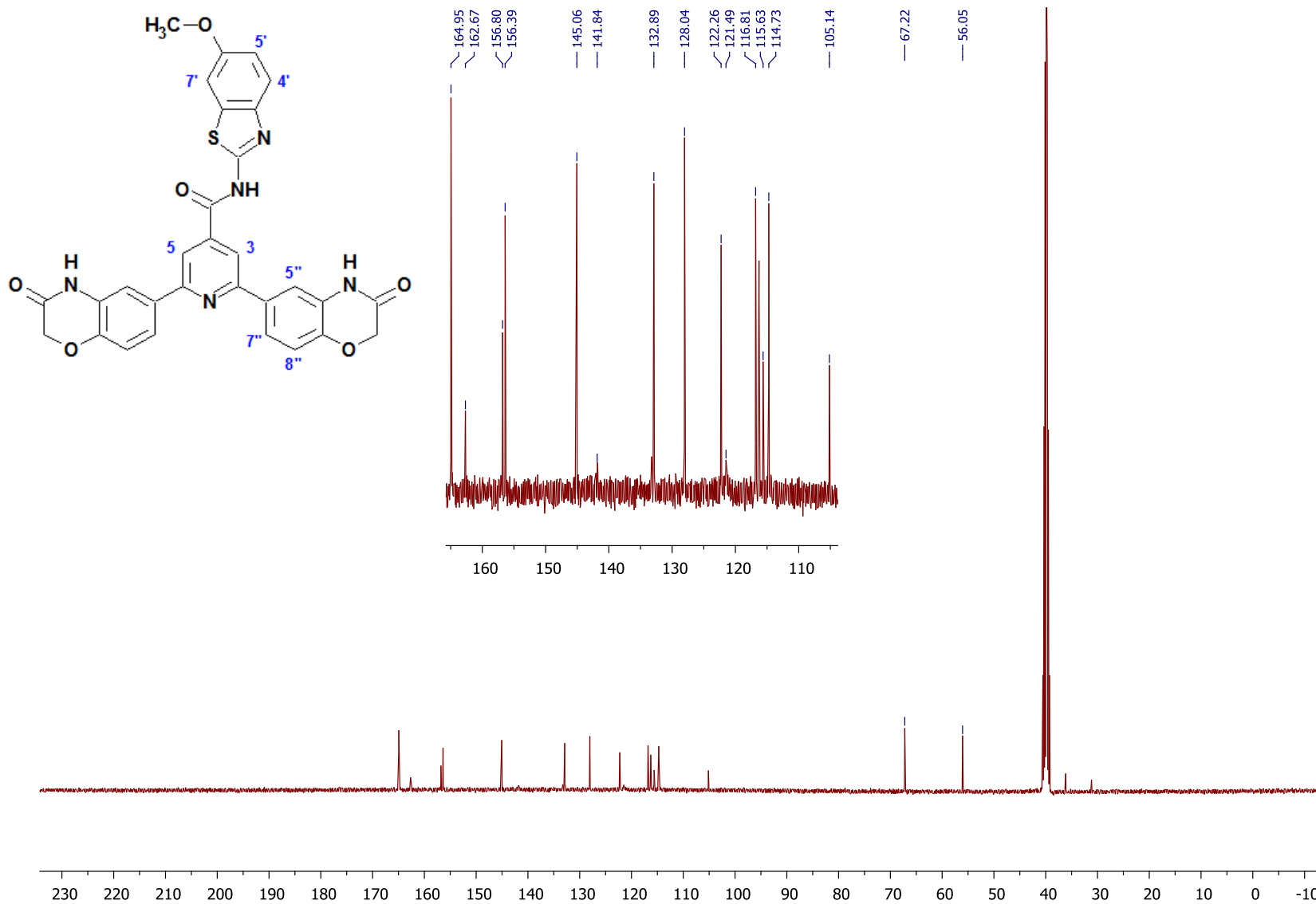
Espectro 106. RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz) de *N*-(4-fluorofenil)-2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (S2-9).



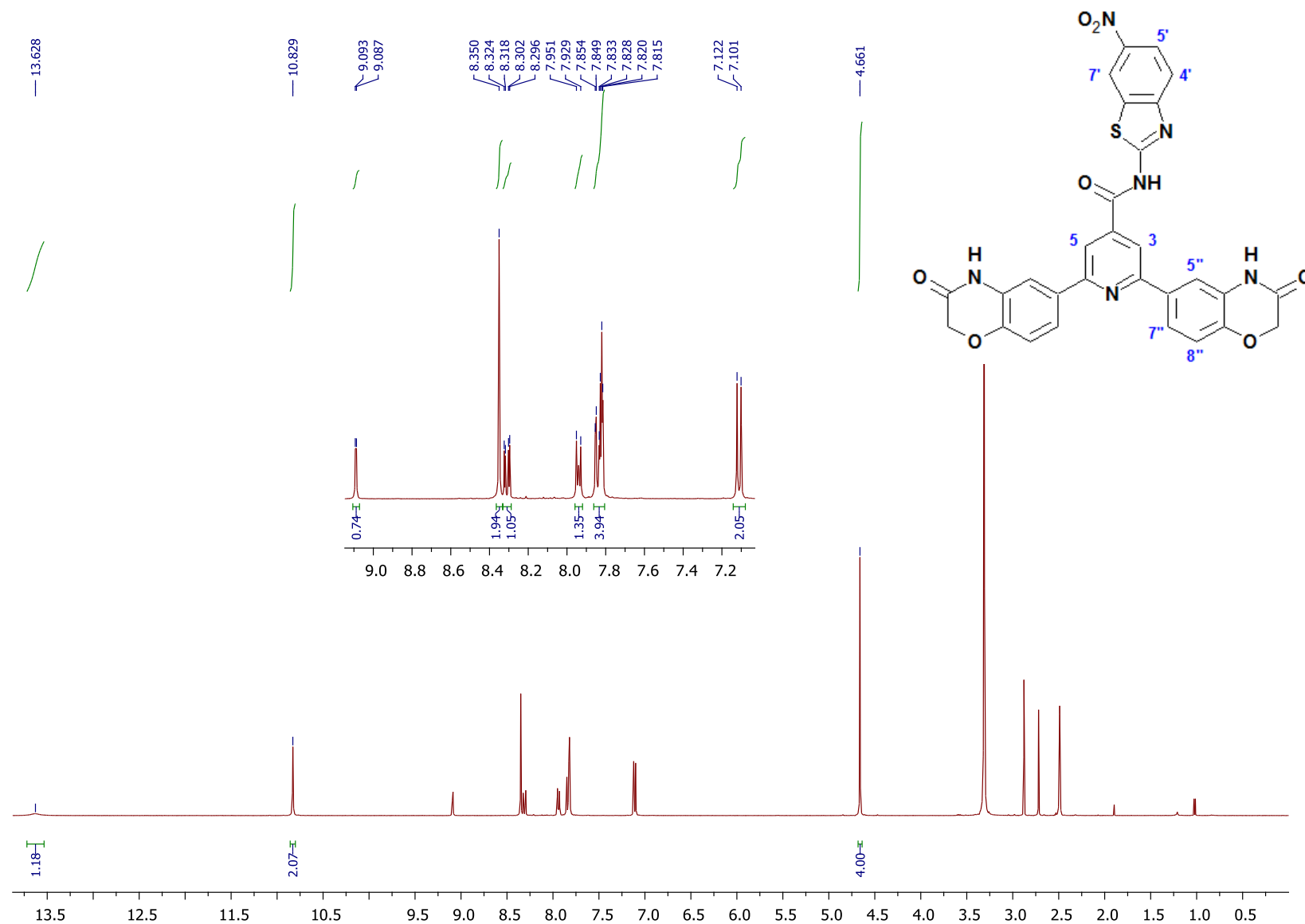
Espectro 107. RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) de *N*-[6-(metiloxi)-1,3-benzotiazol-2-il]-2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (**S2-16**).



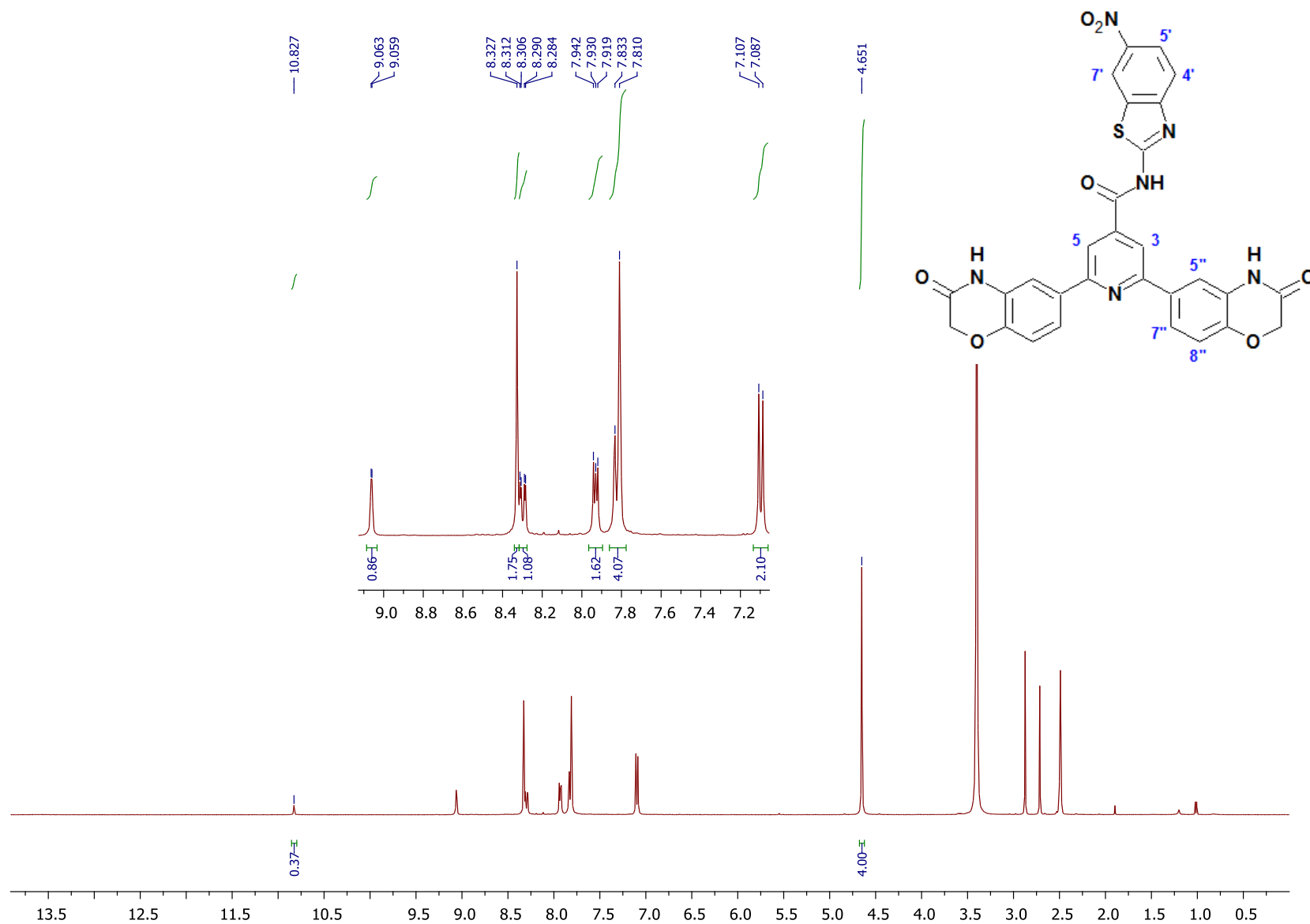
Espectro 108. RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) int. con D_2O de *N*-[6-(metiloxi)-1,3-benzotiazol-2-il]-2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (**S2-16**).



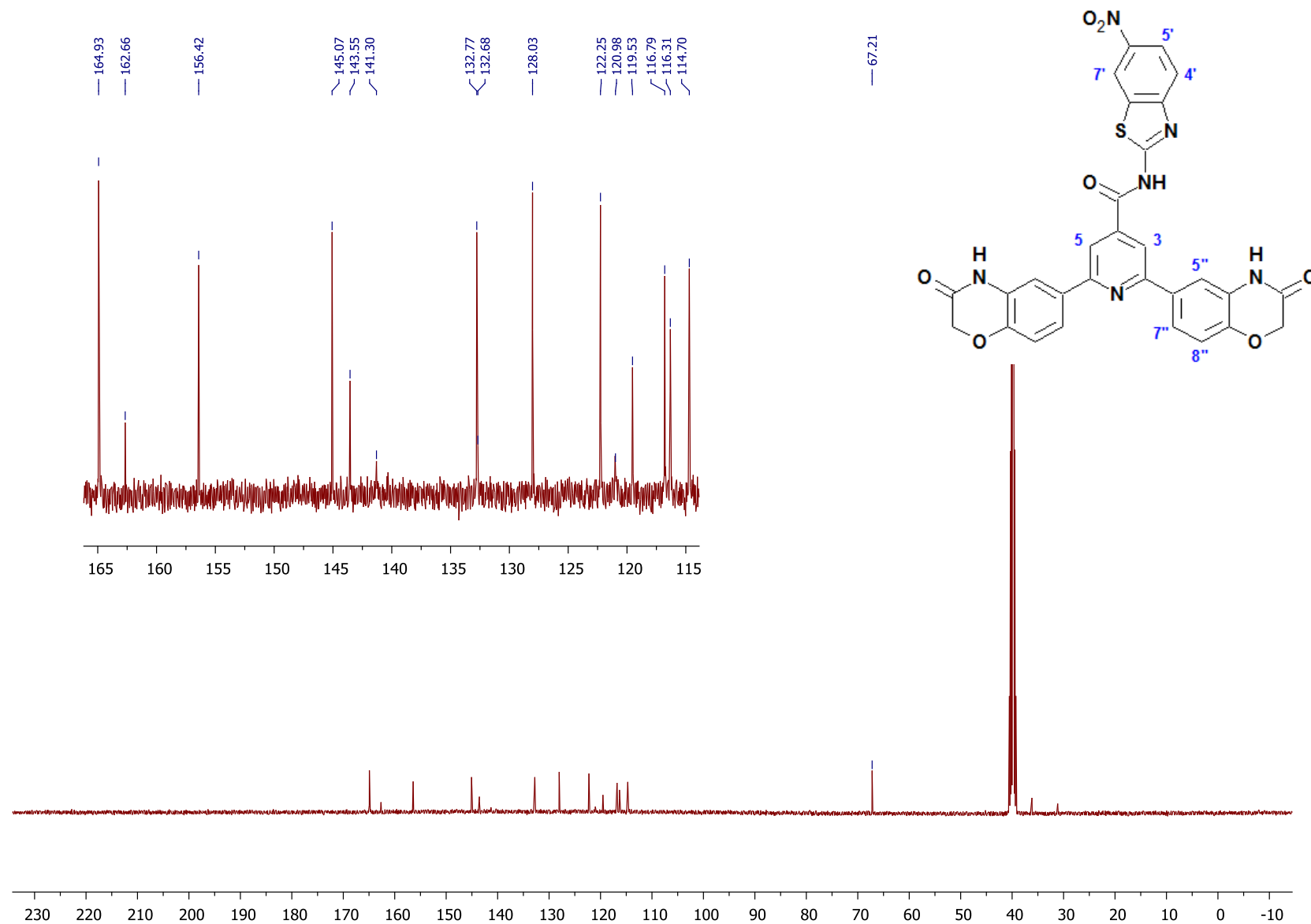
Espectro 109. RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) de *N*-[6-(metiloxi)-1,3-benzotiazol-2-il]-2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (**S2-16**).



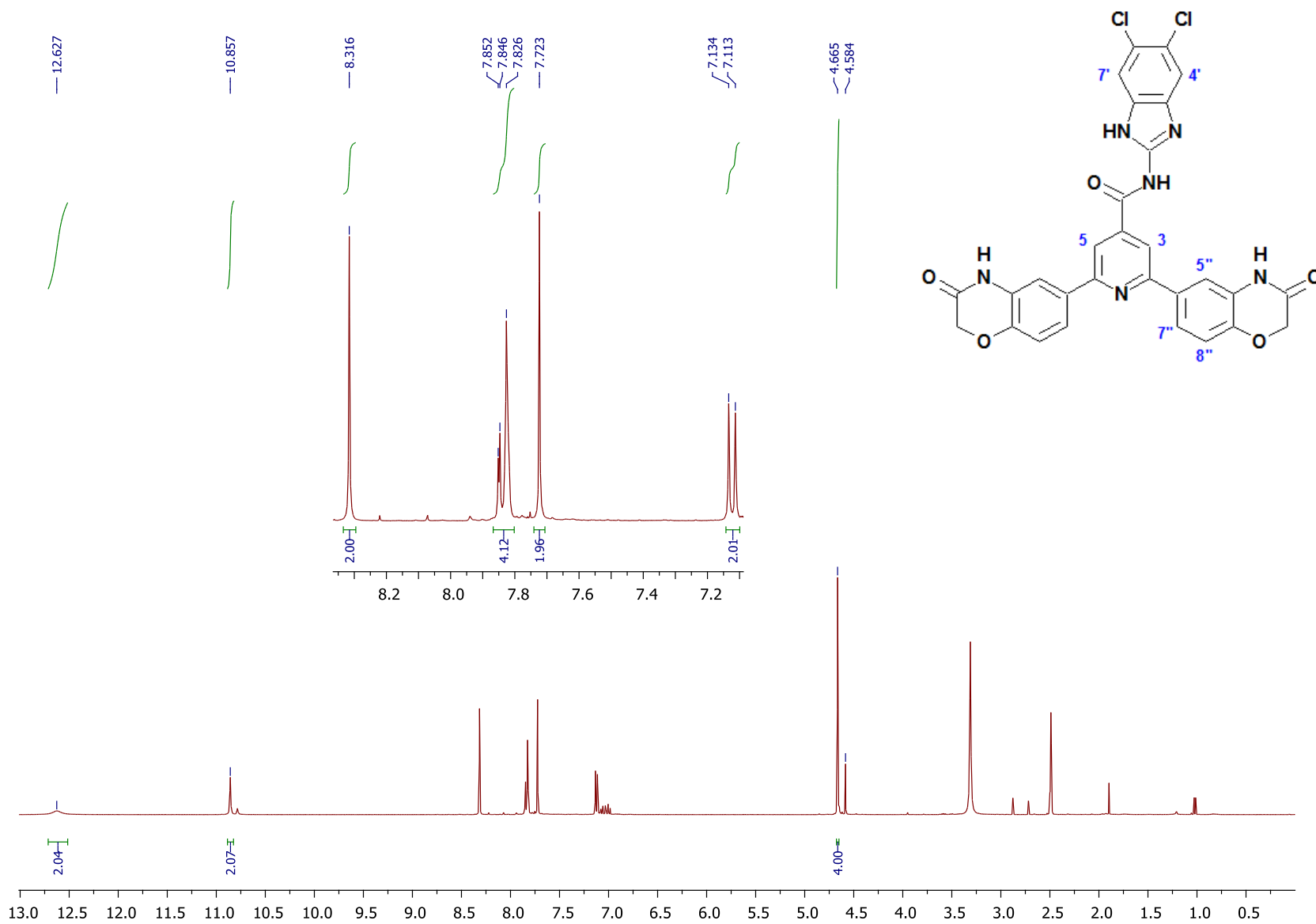
Espectro 110. RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) de *N*-(6-nitro-1,3-benzotiazol-2-il)-2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (**S2-17**).



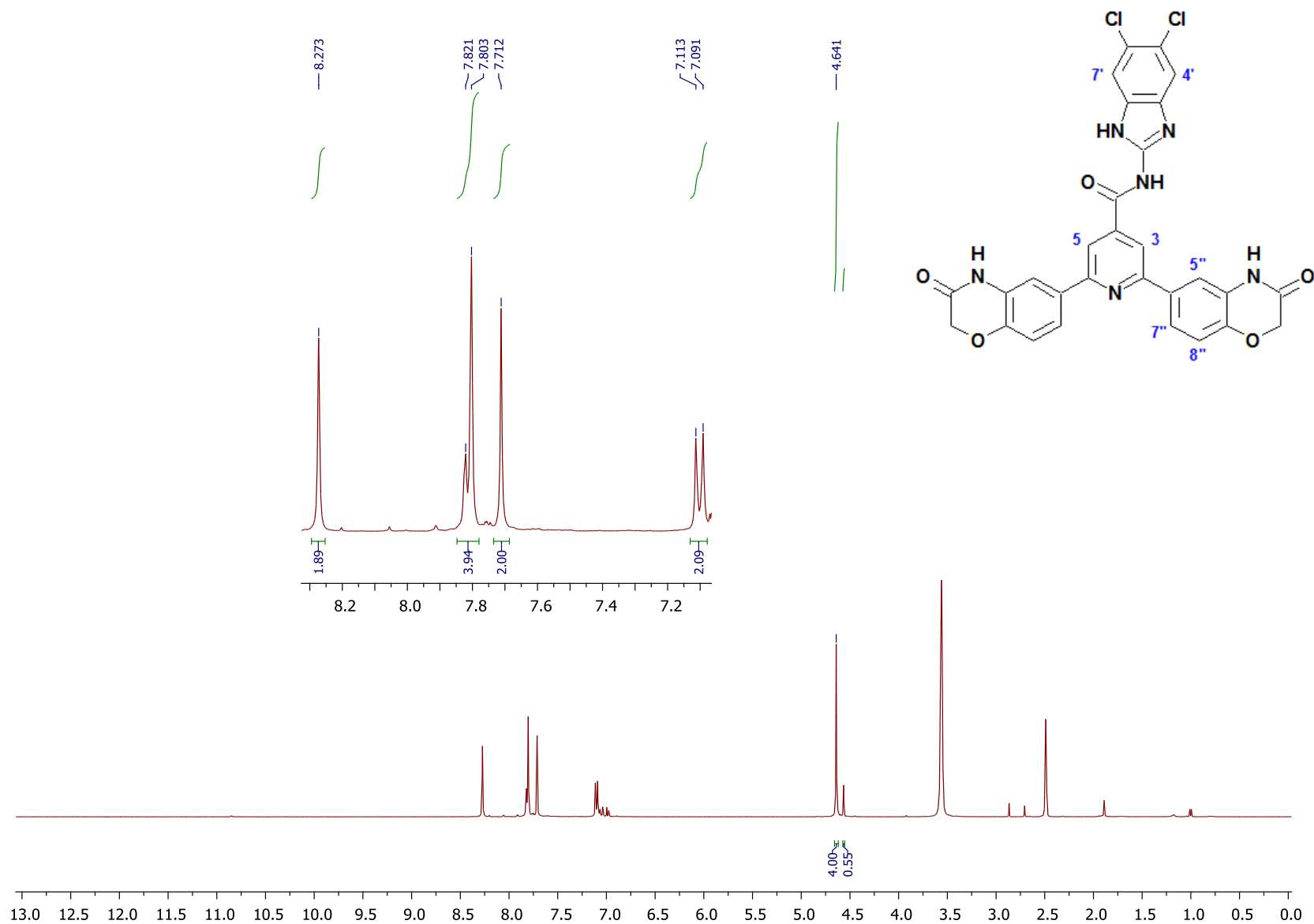
Espectro 111. RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) int. con D_2O de *N*-(6-nitro-1,3-benzotiazol-2-il)-2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (**S2-17**).



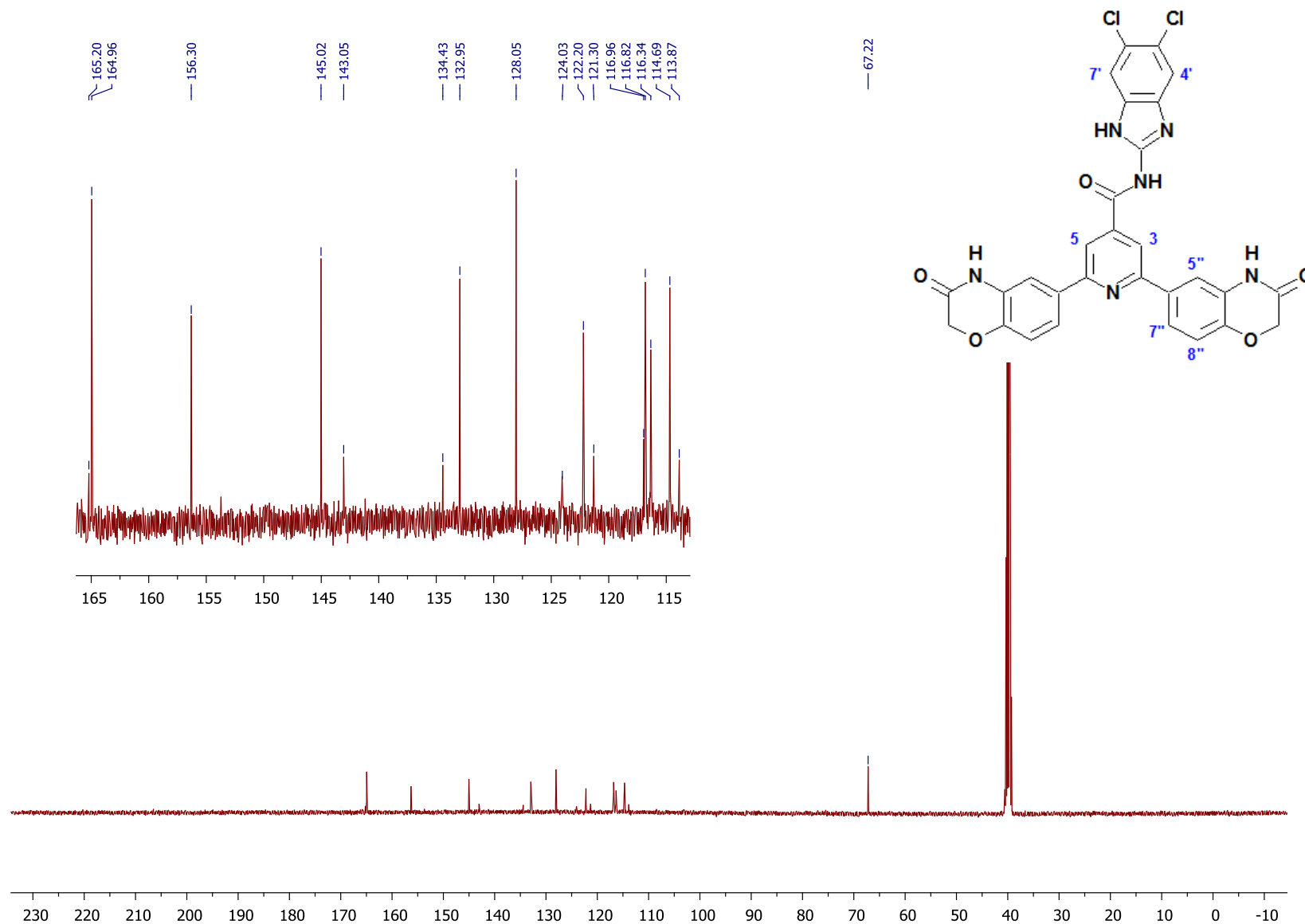
Espectro 112. RMN ^{13}C ($\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz) de *N*-(6-nitro-1,3-benzotiazol-2-il)-2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (**S2-17**).



Espectro 113. RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) de *N*-(5,6-dicloro-1*H*-bencimidazol-2-il)-2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (**S2-21**).



Espectro 114. RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) int. con D_2O de *N*-(5,6-dicloro-1*H*-bencimidazol-2-il)-2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (**S2-21**).




Espectro 115. RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz) de *N*-(5,6-dicloro-1*H*-bencimidazol-2-il)-2,6-bis(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (**S2-21**).

Anexo V

Publicaciones

In search of AKT kinase inhibitors as anticancer agents: structure-based design, docking, and molecular dynamics studies of 2,4,6-trisubstituted pyridines

Pedro Josué Trejo-Soto^a, Alicia Hernández-Campos^a, Antonio Romo-Mancillas^b , José L. Medina-Franco^a and Rafael Castillo^{a*}

^aFacultad de Química, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, Mexico;

^bFacultad de Química, División de Estudios de Posgrado, Universidad Autónoma de Querétaro, Santiago de Querétaro 07610, Mexico

Communicated by Ramaswamy H. Sarma

(Received 23 November 2016; accepted 11 January 2017)

The AKT isoforms are a group of key kinases that play a critical role in tumorigenesis. These enzymes are overexpressed in different types of cancers, such as breast, colon, prostate, ovarian, and lung. Because of its relevance the AKT isoforms are attractive targets for the design of anticancer molecules. However, it has been found that AKT1 and AKT3 isoforms have a main role in tumor progression and metastasis; thus, the identification of AKT isoforms specific inhibitors seems to be a challenge. Previously, we identified an ATP binding pocket pan-AKT inhibitor, this compound is a 2,4,6-trisubstituted pyridine (compound **11**), which represents a new interesting scaffold for the developing of AKT inhibitors. Starting from the 2,4,6-trisubstituted pyridine scaffold, and guided by structure-based design technique, 42 new inhibitors were designed and further evaluated in the three AKT isoforms by multiple docking approach and molecular dynamics. Results showed that seven compounds presented binding selectivity for AKT1 and AKT3, better than for AKT2. The binding affinities of these seven compounds on AKT1 and AKT3 isoforms were mainly determined by hydrophobic contributions between the aromatic portion at position 4 of the pyridine ring with residues Phe236/234, Phe237/235, Phe438/435, and Phe442/439 in the ATP binding pocket. Results presented in this work provide an addition knowledge leading to promising selective AKT inhibitors.

Keywords: cancer; serine-threonine kinase B; AKT; 2,4,6-trisubstituted pyridines; molecular dynamics

1. Introduction

Cancer is one of the major chronic degenerative diseases (CDD) and a leading cause of death throughout the world. The World Health Organization (WHO) estimates 12.7 million cancer cases arise annually, killing 8.2 million people and making this CDD the second leading cause of death worldwide, and by 2030 this number will raise to 11.5 million (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>, 2016). Cancers with the highest incidence are lung, prostate, colorectal, breast, uterine, and stomach (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>, 2016; Siegel, Miller, & Jemal, 2016). Despite advances in cancer treatment, there continues to be a great necessity for the development of new and more effective therapeutic alternatives. Several research groups have centered their work on finding, at the molecular level, the factors involved in the development of this disease. In this process, multiple molecular targets have been identified to decrease or inhibit the biological function of tumor cells, several of these targets being macromolecular structures with structural functions and signaling (Bianco, Melisi, Ciardiello, & Tortora, 2006;

Fife, McCarroll, & Kavallaris, 2014; Jordan & Wilson, 2004; Levitzki & Klein, 2010).

In normal cells, protein kinases play an important role in signaling pathways that are essential for regulating metabolism, growth, proliferation, and apoptosis (Manning, Whyte, Martinez, Hunter, & Sudarsanam, 2002). In contrast, in cancer cells the expression of different kinases is increased and their function is deregulated whereby cell growth and proliferation become uncontrollable. This makes kinases one of the most important targets in the search for molecules for cancer therapy (Workman, Al-Lazikani, & Clarke, 2013; Zhang, Yang, & Gray, 2009). One of the most important signaling pathways upregulated in cancer cells is the pathway involving PI3K/AKT/mTOR kinases, which promotes cell survival and resistance in cancer chemotherapy (Burris, 2013; Polivka & Janku, 2014; Porta, Paglino, & Mosca, 2014).

The serine-threonine kinase B (AKT or also PKB) is a key kinase in tumorigenesis, since it is a central node involved in the signaling of growth factors, cytokines, and other downstream external stimuli; in addition, it

*Corresponding author. Email: rafaelc@unam.mx

favors tumor progression by increasing cell proliferation, angiogenesis, and apoptosis prevention (Altomare & Testa, 2005; Fresno Vara et al., 2004; Manning & Cantley, 2007; Song, Ouyang, & Bao, 2005). There are three AKT isoforms reported: AKT1, AKT2, and AKT3. These isoforms are overexpressed in different types of cancer cells: AKT1 in breast, colorectal, and ovarian cancer; AKT2, in pancreatic, breast and ovarian cancer; and AKT3 in prostate and breast cancer (Manning & Cantley, 2007; Sale & Sale, 2008). Since the role of AKT is as a central node that controls several processes in cancer cells, it has been proposed that AKT kinase isoforms are attractive targets for the design of anticancer molecules (Cheng, Lindsley, Cheng, Yang, & Nicosia, 2005; Luo, Manning, & Cantley, 2003).

In the literature there are reports of ATP competitive inhibitors of AKT with good inhibitory activity against the three isoforms, see Figure 1. Structurally, these molecules include pyrazoles (Saxty et al., 2007), indazoles (Woods et al., 2006), and aminofurazans (Rouse et al., 2009), among others (Mattmann, Stoops, & Lindsley, 2011; Meuillet, 2011). Likewise, since the crystallographic structure of AKT1 and AKT2 isoforms have already been reported, new inhibitors have been developed through structure-based drug design (Kumar &

Madison, 2005). However, since the ATP-binding site show high homology in the AKT isoforms, as observed among the more than 500 members of the kinase family, the design of selective inhibitors seems to be a challenge (Lindsley, Barnett, Yaroschak, Bilodeau, & Layton, 2007), specially due to the fact that some AKT isoforms have shown to be more relevant in cancer progression.

In order to contribute to the discovery of more AKT inhibitors, our research group recently identified a competitive inhibitor (compound **11**, Figure 1) using structure-based virtual screening methodology (Medina-Franco et al., 2009). The molecule is a 2,4,6-trisubstituted pyridine with moderate activity on all three AKT isoforms. Compound **11** is a molecule with a new scaffold that differs from those already reported, revealing the starting point for an optimization program. In a previous work, through docking studies, we compared the binding mode and docking scores of compound **11** with other AKT2 inhibitors reported; it showed a similar predicted binding mode to the co-crystallized inhibitors (Hernández-Campos et al., 2010).

As a continuation of our optimization program, herein we present a structure-based design of 2,4,6-trisubstituted pyridines inspired by compound **11**. Through a consensus docking study, the binding mode

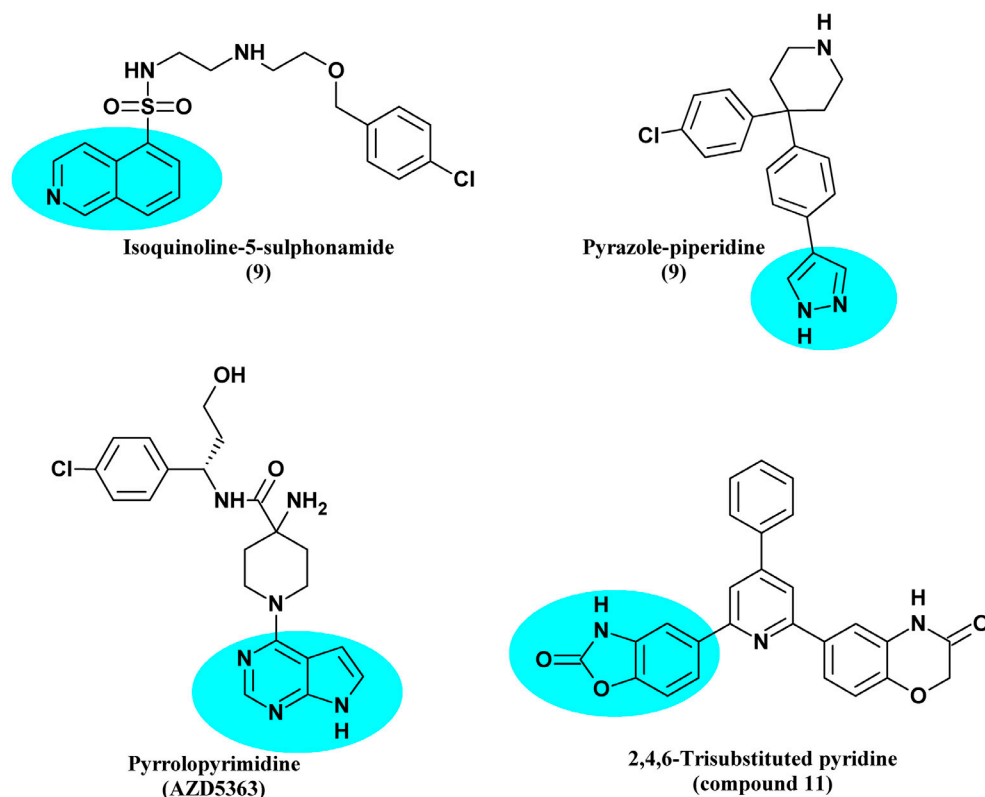


Figure 1. Structure and activity of some reported AKT inhibitors. The substructure that interacts with the kinase hinge region of the ATP-binding pocket is highlighted.

and docking scores of the newly designed molecules were analyzed in the three AKT isoforms and these were compared with docking results of other reported AKT inhibitors. Furthermore, molecular dynamics simulations of the molecules with the best docking scores were studied in order to determine the stability of their ligand–enzyme complexes, searching selectivity towards more relevant AKT isoforms. Results show interesting ligand–enzyme complex behaviors, important in the optimization and design of selective inhibitors of AKT that will aid in the designing of better therapies for cancer.

2. Methodology

2.1. AKT3 homology modeling

AKT3 homology modeling was performed using the crystallographic structure of AKT1 as a template (PDB ID: 4GV1) (Addie et al., 2013). The AKT3 amino acid sequence was obtained from the NCBI (GenBank: CAB53537.1) (Brodbeck, Cron, & Hemmings, 1999; Nakatani, Sakaue, Thompson, Weigel, & Roth, 1999). The model was constructed using the Prime module (Schrödinger Release 2015-4: Prime version 4.2, 2015) present in Maestro (Schrödinger Release 2015-4: Maestro version 10.4, 2015). The AKT3 model was then optimized with the Protein Preparation Wizard module (Schrödinger Release 2015-4: Protein Preparation Wizard; Epik version 3.4, 2015), using default parameters and an OPLS 2005 force field. The stereochemical quality of the homology model was evaluated using MolProbity (Chen et al., 2010) and SwissModel (Arnold, Bordoli, Kopp, & Schwede, 2006; Kopp & Schwede, 2006) servers. Validation parameters are summarized in Supplementary Information Figure S1.

2.2. Molecular docking

The 2,4,6-trisubstituted pyridines were built and optimized through energy minimization in Spartan 10 (Wavefunction Inc, 2010) using a PM6 semi-empirical method. Molecules were then docked in the AKT1 (PDB ID: 4GV1) (Addie et al., 2013), AKT2 (PDB ID: 1O6K) (Yang et al., 2002) and AKT3 model using Glide (Schrödinger Release 2015-4: Glide version 6.9, 2015), AutoDock 4.2 (Morris et al., 2009), and AutoDock Vina (Trott & Olson, 2010) programs. During protein preparation, water molecules and the peptide substrate (GSK-3 β) were deleted from the proteins that were obtained from the PDB (Berman et al., 2000). For Glide, proteins were optimized with the Protein Preparation Wizard module and the grid box was centered for each protein around the residue Asp292/293/289, which is present in the ATP binding site. A flexible docking with default parameters was used. Glide XP (extra precision) was employed for

all docking calculations. In AutoDock 4.2 and Vina, MGLTools 1.5.6 was used to merge all non-polar hydrogens and assign Gasteiger charges to each of the atoms in the proteins. Polar hydrogens, rotatable bonds, and Gasteiger-Marsilli atomic charges (Gasteiger & Marsilli, 1978) were also computed for the ligands. A grid box of $50 \times 50 \times 50$ points with a grid spacing of .375 Å was calculated for the proper atom type and centered on the residue Asp292/293/289. The Lamarckian genetic algorithm and default parameters were used for both programs. The clusters were ranked by the lowest energy representative of each cluster. Tableau Public 8.1 was used for the visual analysis of consensus docking, and the molecules with docking score values of Glide XP and AutoDock 4.2 above the median were selected. All molecular graphics were prepared with PyMOL 0.99 version (DeLano, 2007).

2.3. Molecular dynamics

Molecular dynamics (MD) studies of the ligand–protein complex were performed with GROMACS 4.5.5 software (Van Der Spoel et al., 2005) using the AMBER99SB-ILDN force field (Lindorff-Larsen et al., 2010). The ligand parameters were calculated with the ACPYPE interface in the AMBER force field framework (Sousa & Vranken, 2012). The complex was solvated with water in a periodic cubic box large enough to contain 1.0 nm of water in all sides using a three-point model for water (TIP3P). Additionally, Na⁺ and Cl⁻ atoms were added randomly in order to neutralize the charge of the system and to achieve a concentration of .15 M. In the first step, an energy minimization of the system was carried out using the steepest-descent algorithm to reduce undesirable van der Waals contacts. This was followed by an energy minimization in NVT ensemble using the Berendsen thermostat (Berendsen, Postma, van Gunsteren, DiNola, & Haak, 1984). Subsequently, the system was submitted to 1000 ps under NPT ensemble conditions at 1 bar using the Parrinello-Rahman barostat (Parrinello & Rahman, 1980). Electrostatic forces were calculated with the PME implementation of the Ewald summation method (Darden, York, & Pedersen, 1993). Finally, a 10 ns MD was performed for the ligand–enzyme complex using a time step of 1 ps. Parameters as RMSD, RMSF and the binding free energy of the complex were analyzed during the molecular dynamics study. Using the *g_mmpbsa* package (Kumari, Kumar, & Lynn, 2014) installed in GROMACS, the binding free energy was calculated based on the Molecular Mechanics/Poisson–Boltzmann Surface Area (MM-PBSA) approach (Homeyer & Gohlke, 2012). In general terms, the binding free energy of ligand–protein complexes in solvent is calculated using the following equations:

$$\begin{aligned}\Delta G_{\text{binding}} &= \Delta E_{\text{MM}} - \Delta G_{\text{sol}} \\ \Delta E_{\text{MM}} &= \Delta E_{\text{internal}} + \Delta E_{\text{electrostatic}} + \Delta E_{\text{vdW}} \\ \Delta G_{\text{sol}} &= \Delta G_{\text{polar}} + \Delta G_{\text{nonpolar}}\end{aligned}$$

where ΔE_{MM} is the interaction energy between protein and the inhibitor and ΔG_{sol} is the solvation energy. The molecular mechanical (MM) free energy (ΔE_{MM}) is the sum of internal energy ($\Delta E_{\text{internal}}$), the electrostatic interaction energy ($\Delta E_{\text{electrostatic}}$), van der Waals interaction energy (ΔE_{vdW}), and internal energy of bonds, angles and torsion interactions. ΔG_{sol} is the change of the solvation free energy upon binding, and includes the electrostatic solvation free energy ΔG_{polar} (polar contribution calculated using generalized Born model), and the non-electrostatic solvation component $\Delta G_{\text{nonpolar}}$ (nonpolar contribution estimated by solvent accessible surface area model).

3. Results and discussion

3.1. Structure-based design

According to the binding mode for compound **11** in AKT isoforms, this molecule adopts a Y-shape conformation where the distribution of the substituents on the

pyridine ring seems appropriate for the interaction with the ATP binding site, see Figure 2. The 1,3-benzoxazol-2(3*H*)-one moiety occupies the binding site of the adenosine portion and present hydrogen bond (H-bond) interactions with Thr211/213/209 and Thr291/292/288. On the other hand, the 2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one moiety occupies an adjacent pocket in the P-loop region of the kinase and shows a hydrogen bond interaction with Asp292/293/289, while the phenyl substituent at position 4 of the pyridine ring present a T-shaped aromatic interaction with residue Phe442/443/439. Moreover, other residues in the neighborhood near molecule **11** where identified, such as residues Glu234/236/232, Phe236/238/234, Phe237/239/235, Phe438/439/435, Asp439/440/438, and Phe442/443/439, which could form interactions with the new designed molecules.

Guided with this information, we decided to optimize molecule **11** structure in order to improve the molecular interactions; in particular, in the hinge pocket and the neighborhood residues before mentioned. Also, these changes were made to have synthetically accessible molecules. The designed strategy for these novel 2,4,6-trisubstituted pyridines is outlined in Figure 3. First, the 1,3-benzoxazol-2(3*H*)-one moiety in **11** was

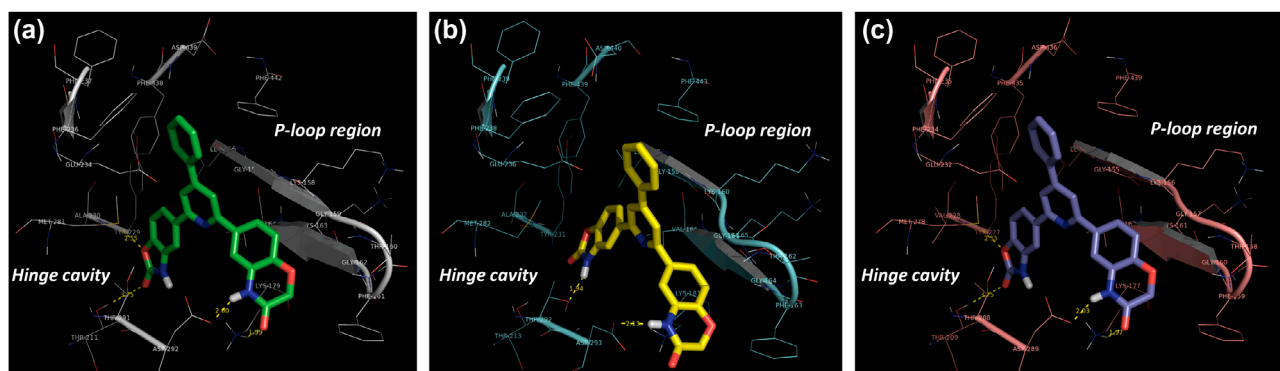


Figure 2. Mode of binding of **11** in AKT1 (a), AKT2 (b) and AKT3 (c). Hydrogen bonds are represented in yellow dotted lines.

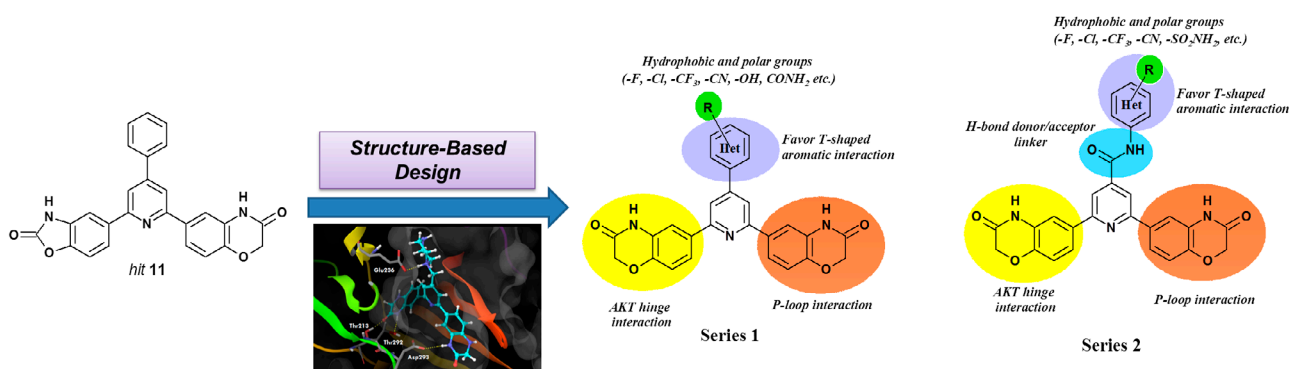
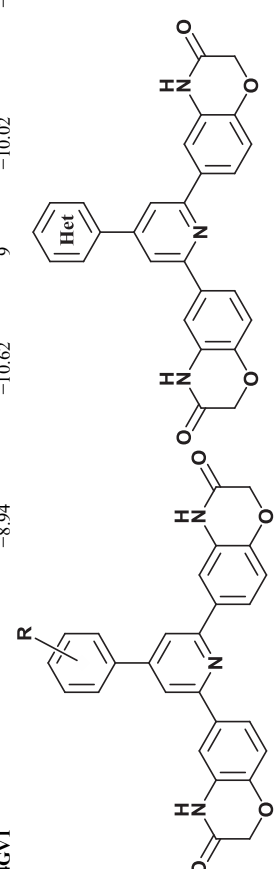


Figure 3. General considerations in the design of novel 2,4,6-trisubstituted pyridines as new AKT inhibitors.

Table 1. Docking scores of the reference structures and the designed trisubstituted pyridines with the three AKT isoforms.

Compound	$\Delta G_{\text{binding}}$ (kcal/mol)	AKT1			AKT2			AKT3				
		Glide XP $\Delta G_{\text{binding}}$ (kcal/mol)	AutoDock 4.2 $\Delta G_{\text{binding}}$ (kcal/mol)	Cluster	AutoDock Vina $\Delta G_{\text{binding}}$ (kcal/mol)	Glide XP $\Delta G_{\text{binding}}$ (kcal/mol)	AutoDock 4.2 $\Delta G_{\text{binding}}$ (kcal/mol)	Cluster	AutoDock Vina $\Delta G_{\text{binding}}$ (kcal/mol)	Glide XP $\Delta G_{\text{binding}}$ (kcal/mol)	AutoDock 4.2 $\Delta G_{\text{binding}}$ (kcal/mol)	Cluster
2JDO	-9.75	-8.95	-8.78	7	-8.78	-7.38	4	-9.55	-10.23	-9.42	7	-8.92
2UW7	-9.42	-9.31	-9.11	20	-9.11	-9.09	11	-9.21	-9.30	-9.47	20	-9.21
4GV1	-8.94	-10.62	-10.02	9	-10.02	-4.71	5	-10.11	-9.22	-10.93	11	-10.02
												
Comp. <i>R</i>												
SI-1 H	-7.63	-11.62	-11.9	14	-11.9	-4.95	13	-12.5	-6.22	-11.77	15	-12
SI-2 4-NH ₂	-4.18	-11.38	-11.6	14	-11.6	-4.07	17	-12.2	-5.32	-11.53	13	-11.6
SI-3 4-NHCOCH ₃	-5.36	-12.51	-12.1	20	-12.1	-0.99	20	-12.4	-4.69	-12.67	20	-12.2
SI-4 4-NHSO ₂ CH ₃	-5.34	-12.93	-11.4	16	-11.4	-3.14	10	-12	-5.70	-13.05	15	-11.5
SI-5 4-NHSO ₂ CF ₃	-5.43	-12.82	-11.8	15	-11.8	-6.57	9	-12.2	-5.59	-12.98	11	-11.8
SI-6 4-SO ₂ NH ₂	-6.60	-12.95	-11.6	11	-11.6	-3.06	15	-12.2	-5.50	-13.08	11	-11.6
SI-7 4-CONH ₂	-6.09	-12.36	-11.9	14	-11.9	-1.65	20	-12.5	-6.97	-12.59	11	-12
SI-8 4-COOH	-5.65	-11.94	-12	10	-12	-2.4	18	-12.4	-5.53	-12.06	12	-12.1
SI-9 4-CF ₃	-5.34	-11.77	-12.3	12	-12.3	-4.39	18	-12.7	-5.48	-11.92	10	-12.4
SI-10 4-OCF ₃	-5.88	-11.92	-12	14	-12	-5.19	13	-12	-6.24	-12.09	13	-12
SI-11 35-CF ₃	-3.96	-12.11	-12.5	16	-12.5	-5.9	15	-12.8	-3.99	-12.27	17	-12.6
SI-12 3-CF ₃	-7.07	-12.14	-12.3	16	-12.3	-3.15	14	-12.8	-6.04	-12.28	18	-12.3
SI-13 3-OCF ₃	-3.98	-12.67	-12.2	13	-12.2	-4.27	7	-12.5	-2.07	-12.84	13	-12.3
SI-14 3-CONH ₂	-5.67	-12.98	-12.2	15	-12.2	-1.60	18	-12.9	-6.06	-13	12	-12.3
SI-15 4-CN	-5.17	-12.17	-12.1	15	-12.1	-3.42	13	-12.8	-6.01	-12.32	12	-12.2
SI-16 3-CN	-4.98	-12.97	-12.4	13	-12.4	-8.0	10	-12.9	-5.19	-12.29	15	-12.5

(Continued)

Table 1. (Continued).

Compound	$\Delta G_{\text{binding}}$ (kcal/mol)	AKT1			AKT2			AKT3		
		Glide XP $\Delta G_{\text{binding}}$ (kcal/mol)	AutoDock 4.2 $\Delta G_{\text{binding}}$ (kcal/mol)	AutoDock Vina $\Delta G_{\text{binding}}$ (kcal/mol)	Glide XP $\Delta G_{\text{binding}}$ (kcal/mol)	AutoDock 4.2 $\Delta G_{\text{binding}}$ (kcal/mol)	AutoDock Vina $\Delta G_{\text{binding}}$ (kcal/mol)	Glide XP $\Delta G_{\text{binding}}$ (kcal/mol)	AutoDock 4.2 $\Delta G_{\text{binding}}$ (kcal/mol)	AutoDock Vina (kcal/mol)
S1-17 4-OH		-4.28	-11.93	-11.6	-3.98	-9.14	-12.2	-3.23	-11.56	-11.7
S1-18 2-aminopyrimidine-5-yl		-6.19	-11.47	-11.5	-6.3	-11.06	-11.9	-6.75	-11.66	-11.6
S1-19 3-furyl		-7.19	-11.32	-11.4	-5.9	-9.82	-12.1	-7.49	-11.48	-11.5
S1-20 1 <i>H</i> -benzimidazole-6-yl		-6.22	-12.4	-12.5	-3.37	-9.5	-12.8	-6.69	-12.54	-12.5
S1-21 Benzothiazole-5-yl		-5.25	-12.9	-12.4	-1.21	-10.3	-12.9	-5.68	-13.05	-12.5
S2-1 H										
S2-2 4-Cl										
S2-3 34-Cl										
S2-4 35-CF ₃										
S2-5 3-Cl										
S2-6 3-OCH ₃										
S2-7 4-CN										
S2-8 3-CF ₃										
S2-9 4-F										
S2-10 35-Cl										

S2-1 - S2-10

S2-11 - S2-21

S2-11	6-Cl-1 <i>H</i> -benzimidazole-2-yl	-8.35	-13.61	20	-13.4	-4.82	-13.08	20	-12.7	-7.34	-13.74	20	-13.4
S2-12	6-OCH ₃ -benzothiazole-2-yl	-6.67	-14.23	19	-12.3	-5.85	-11.39	19	-12	-5.76	-14.41	20	-12.4
S2-13	6-NO ₂ -benzothiazole-2-yl	-7.30	-14.8	19	-13.1	-4.65	-9.74	12	-12	-4.35	-14.9	20	-13.1
S2-14	Thiazole-2-yl	-6.43	-12.13	18	-11.8	-1.25	-10.69	18	-12	-6.82	-12.3	19	-11.8
S2-15	Pyrimidine-2-yl	-8.37	-12.53	20	-12.5	-4.44	-12.23	20	-12.3	-8.24	-12.71	20	-12.5
S2-16	Pyrazine-2-yl	-7.29	-12.3	20	-12.3	-3.30	-10.53	20	-12.1	-6.23	-12.49	18	-12.4
S2-17	Piperidine	-7.12	-11.19	12	-12.1	-4.06	-10.08	19	-12.3	-7.62	-11.47	7	-12.2
S2-18	Morpholine	-7.73	-11.77	18	-12	-5.44	-9.77	20	-12.2	-7.49	-11.91	16	-12
S2-19	4-CH ₃ -piperazine	-8.36	-11.35	16	-12	-2.59	-10.8	16	-12.5	-8.92	-11.54	17	-12
S2-20	4-COCH ₃ -piperazine	-8.44	-11.49	16	-12.6	-5.77	-10.71	18	-12.9	-8.89	-11.61	16	-12.7
S2-21	4-CH ₃ -piperidine	-7.47	-12.41	16	-12.3	-0.27	-10.25	19	-12.5	-6.88	-12.49	16	-12.4

replaced for a 2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one, so as to obtain symmetrical trisubstituted pyridines. This change was done to obtain a better conformation favoring the H-bond interaction with hinge residue Ala230/232/Val228 and to occupy a large portion in the pocket. Then, a further modification was done at position 4 of the pyridine ring that originated two main series. Series 1 incorporates a substituted phenyl or heterocyclic ring, which contains different hydrophobic and polar groups, with the purpose that the former keep interaction with Phe442/443/439 and the latter show interactions with residues Phe236/238/234, Phe237/239/235, Phe438/439/435, Asp439/440/438 and Phe442/443/439. For this series 21 compounds (**S1-1-S1-21**) shown in Table 1 were designed. Series 2 incorporates a carboxamide linker as a hydrogen bond donor/acceptor group near the proximity of residues Glu234/236/232 and Lys158/160/156. Series 2 also includes different substituted phenyl and heterocyclic rings to keep the interaction with Phe442/443/439 and favor the interactions with Phe237/239/235, Phe438/439/435, Asp439/440/438, and Phe442/443/439 too. In this series 21 compounds (**S2-1-S2-21**) shown in Table 1 were designed.

3.2. Docking studies

In order to select the most promising compounds as AKT inhibitors, docking calculations were performed using a consensus docking/scoring strategy. Considering the limitations of docking calculations in which different binding modes may give similar docking scores, and the fact that the accuracy of docking method determines the accuracy of predicted docking poses, it is of great importance to use strategies that increase docking accuracy (Kroemer, 2007). Consensus methods combine the results of various single scoring functions. The argument of consensus scoring is that the more scoring functions

agree that a compound is active (or inactive), the more reliable the prediction is. So, a compound that has a high score from multiple scoring functions is more likely to be a good inhibitor in a biological assay than a compound that has a high score from only a single function (Charifson, Corkery, Murcko, & Walters, 1999). In this work, we used three different programs; one of them was Glide, a commercial software that uses an exhaustive systematic search algorithm to evaluate different ligand conformations, and empirically scoring function to predict the binding affinity (Friesner et al., 2004). The other two programs were AutoDock 4.2 and AutoDock Vina that are freely available docking programs. The former employs Lamarckian Genetic Algorithm to determine the ligand conformations, while semi-empirical scoring function is used to determine the binding energy. The latter employs Iterative Local Search for the ligand conformations, while a combination of knowledge-based/empirical scoring function evaluation is used to determine the binding energy (Morris et al., 2009; Trott & Olson, 2010).

Before docking of the designed compounds with AKT isoforms, the docking protocol was validated. For this, the ligand of co-crystal structures with PDB ID 4GV1 (a pyrrolopyrimidine inhibitor of AKT1) (Addie et al., 2013), 2JDO (an isoquinoline-5-sulfonamide inhibitor of AKT2) (Davies et al., 2007) and 2UW7 (a pyrazole-piperidine inhibitor of AKT2) (Saxty et al., 2007) were re-docked in their AKT isoform using the three docking programs. As seen in Figure 4(a) and (b), docking calculations predicted acceptably the binding mode of ligand for co-crystal structure 4GV1; with RMSD values of .96, for Glide; .81, for AutoDock 4.2; and .88 for AutoDock Vina. For the ligand 2UW7, the RMSD values were .42, for Glide; .55, for AutoDock 4.2; and .54, for AutoDock Vina. However, in the particular case of ligand 2JDO (4c), the predicted binding mode in the three programs showed a 180° flipped conformation

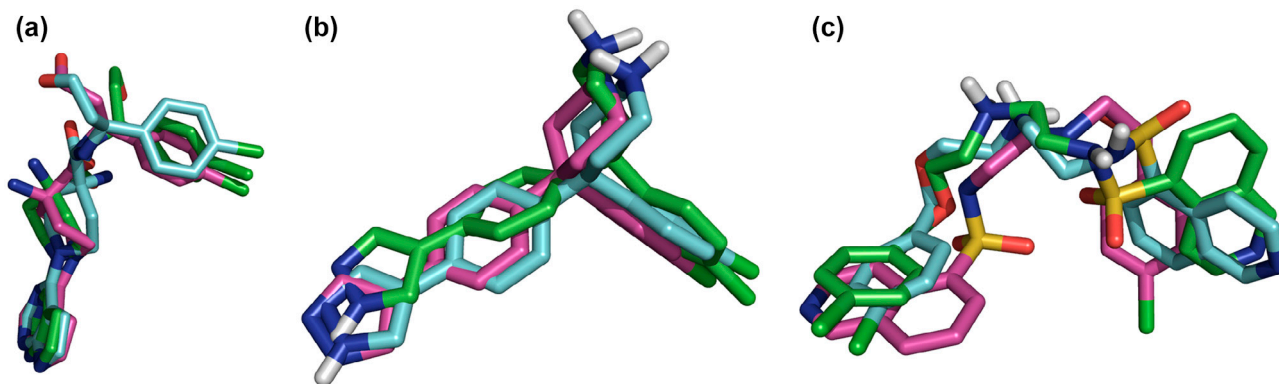


Figure 4. Comparison between crystal structure (magenta) with the predicted binding mode in Glide (cyan) and AutoDock (green) for ligand structure references 4GV1 in AKT1 (a), 2UW7 in AKT2 (b) and 2JDO in AKT2 (c).

compared to co-crystal structure, this could be explain due to ligand flexibility, that is the principal failure of docking predictions for very flexible molecules.

Comparing the docking scores calculated with three programs, AutoDock 4.2 and AutoDock Vina had a good correlation with the biological activity (Table 1). The pyrrolopyrimidine inhibitor in AKT1 is the compound with the highest activity (4GV1, $IC_{50} = 3$ nM,

$pIC_{50} = 8.52$) (Addie et al., 2013), followed by the pyrazole-piperidine inhibitor in AKT2 (2UW7, $IC_{50} = 18$ nM, $pIC_{50} = 7.74$) (Saxty et al., 2007), and the isoquinoline-5-sulfonamide inhibitor in AKT2 (2JDO, $IC_{50} = 230$ nM, $pIC_{50} = 6.63$) (Davies et al., 2007) showed the lowest activity. Additionally, the ligand of co-crystal structures were docked in the rest of the AKT isoforms using the three docking programs, so that the binding energy



Figure 5. Consensus score graphics for compounds of Series 1 (a) and Series 2 (b) in AKT1, Series 1 (c) and Series 2 (d) in AKT2, and Series 1 (e) and Series 2 (f) in AKT3. Region I contains compounds with high scores only for AutoDock 4.2, Region II contains compounds with low scores in both programs AutoDock 4.2 and Glide, Region III contains compounds with high scores in both programs AutoDock 4.2 and Glide (most promising inhibitors), and Region IV contains compounds with high scores only for Glide. Docking scores of AutoDock Vina are represented in color scale.

could serve as score reference in all isoforms and then compared with the designed compounds, the data obtained is shown in Table 1. References showed similar

binding modes as predicted by the corresponding isoforms, as expected due to the high homology in the ATP binding site (Supplementary Information Figure S2).

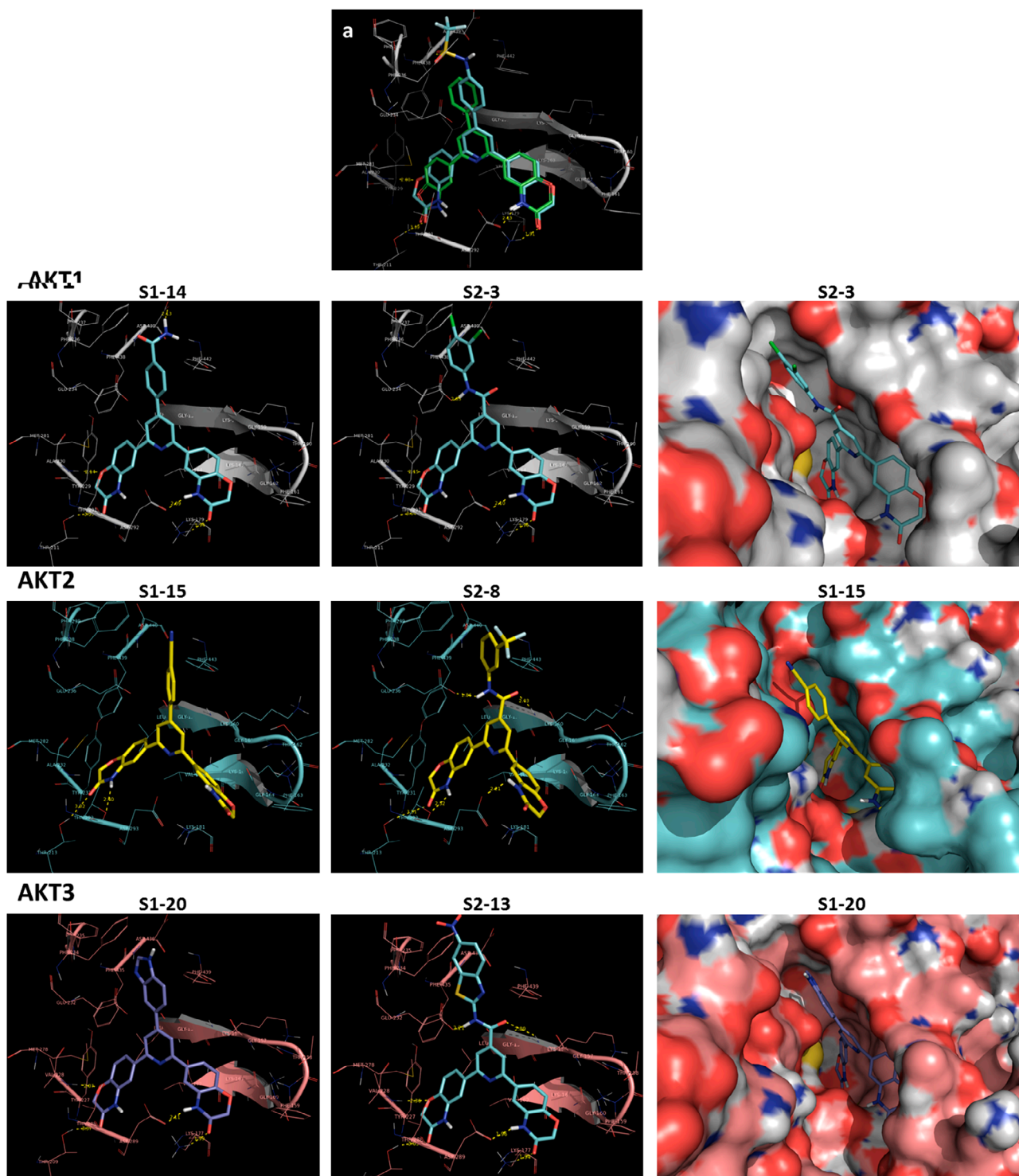


Figure 6. Binding mode of the designed compounds in the AKT isoforms. (a) Compounds (S1-5) and the precursor molecule 11 in the AKT pocket of AKT1. Compounds S1-7 and S2-3 in AKT1. Compounds S1-15 and S2-8 in AKT2. Compounds S1-20 and S2-13 in AKT3. H-bond interactions are represented in yellow dotted lines.

The 42 designed trisubstituted pyridines were docked in the three AKT isoforms using the same validated protocol, results are summarized in Table 1. Molecules have favorable binding energies on the three isoforms, and in some cases exceeding the reference structures in the three programs. Despite the high homology in the ATP binding site of the isoforms, in general the molecules showed preference on AKT1 and AKT3, this is important and will be discussed below. A schematic representation of energy values obtained from the programs for all structures is shown in Figure 5. In region III of the plot are found molecules with the best docking scoring values in the three programs, these are considered the most promising AKT inhibitors for each isoform. In case of AKT1 10 molecules were found, 5 for Series 1: **S1-5**, **S1-6**, **S1-7**, **S1-14**, and **S1-20**; and 5 for Series 2: **S2-3**, **S2-6**, **S2-11**, **S2-13**, and **S2-15**. For AKT2 10 molecules were found, 4 for Series 1: **S1-4**, **S1-5**, **S1-15**, and **S1-20**; and 6 for Series 2: **S2-1**, **S2-5**, **S2-6**, **S2-7**, **S2-11**, and **S2-12**. While for AKT3 8 molecules were identified, 5 for Series 1: **S1-4**, **S1-7**, **S1-14**, **S1-15**, and **S1-20**; and 3 for Series 2: **S2-3**, **S2-8**, and **S2-15**.

As seen in Figure 6, molecules show similar binding modes in AKT isoforms as the precursor molecule **11**. The new portion 2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one moiety occupies the deep cavity of the ATP binding site; the increase of the ring size (from a five-member ring to a six-member ring) favors the hydrophobic interactions with residues Val164/166/162, Ala177/179/175, Ala230/232/Val228, Met281/282/278, and Phe438/439/435. However, compounds of both series in AKT1 and AKT3 show more H-bond interactions with the hinge residues compared with AKT2. As seen in Figure 6 for AKT1 and AKT3, the oxygen of 2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one has H-bond interaction with the NH of the main chain of the hinge residue Ala230/Val228 (N–H···O, ~2.1 Å), also, the carbonyl group forms an H-bond with the side chain of Thr211/209 and Thr291/288, respectively. The second 2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one moiety binds on the P-loop region where the NH of the benzoxazinone forms an H-bond with Asp292/289, and the carbonyl group forms an H-bond with Lys179/177. In contrast, in AKT2 most of the compounds do not show H-bond interaction with the hinge residue Ala232, and only exhibit H-bond interactions with the side chain of Thr213 and Thr292, while the second 2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one moiety just forms an H-bond interaction with Asp293. On the other hand, the modified portion at position 4 of the pyridine ring favors the stabilization with the three isoforms. For Series 1, the phenyl ring at this position makes a T-shaped aromatic interaction with Phe442/443/439 as expected. Meanwhile the ligands from the consensus results have hydrophobic and polar groups attached at position *m/p* of the phenyl ring, such as sulfonamide (**S1-5**, **S1-6**), carboxamide (**S1-7**, **S1-14**),

nitrile (**S1-15**), or a benzimidazole (**S1-20**), which favor the interactions by H-bond with residues Glu278/279/275 and Asp439/440/436. In case of Series 2, the addition of a carboxamide linker favor the interaction by H-bond with the main chain of residue Lys158/160/161 and the side chain of residue Glu234/236/232, this modification slightly improves the binding energy. For this series, the best ligands consensus results show more diverse hydrophobic groups attached to the carboxamide portion, such as *m/p* substituted anilines with halogens (mono- and di- chloro or fluoro, **S2-3**, **S2-5**, **S2-6**), nitrile (**S2-7**), trifluoromethyl (**S2-8**); or heterocyclic amines as 6-chlorobenzimidazole (**S2-11**), 6-methoxy or 6-nitrobenzothiazole (**S2-12**, **S2-13**) and pyrimidine (**S2-15**). The phenyl or heterocyclic moiety maintains the T-shaped interaction with Phe442/443/439, and the groups have interactions with residues Phe236/238/234, Phe237/239/235, and Arg241/243/239. It is also observed that compounds in AKT1 and AKT3 have better interaction in the aromatic pocket formed by the aromatic residues mentioned before. Compounds in AKT2 show a slightly outward displacement avoiding good aromatic interactions with the aromatic hole. More details about interactions in AKT isoforms are found in the Supplementary Information Figure S3. For the best consensus hits molecules of both series, the interaction with residues Phe236/238/234, Phe237/239/235, Arg241/243/239, Glu278/279/275, and Asp439/440/436, is favored by the presence of a phenyl or arylcarboxamide substituent at position 4, in particular for AKT1 and AKT3. This interaction is not present with the reference inhibitors studied, and therefore, for the designed compounds it might increase their potential as AKT inhibitors. The most promising compounds selected by docking were used as starting point of a molecular dynamics simulation to verify their stability and behavior in the kinase binding site. It is worth to mention that an alternative binding mode was found, which had good binding energy by Glide program, in which the substituent at position 4 of pyridine occupied the P-loop or the hinge cavity, see Supplementary Information Figure S4; so these alternative conformations were also considered in the MD studies.

3.3. Molecular dynamics

The interactions observed during the docking study might change in the dynamic environment, for this reason the stability of docked complex and the binding pose obtained in docking studies are recommended be verified by molecular dynamics simulation studies. In this sense, the best consensus hits selected from docking were evaluated under 10 ns MD simulation in their corresponding AKT isoform. In addition, the reference structures were also simulated under the same conditions in the three isoforms in order to compare their stability and energy

with the designed molecules. The dynamic stability of each complex was evaluated using RMSD values, Figure 7. As seen in the RMSD plots, the consensus designed molecules remained in the ATP pocket during the simulation with low RMSD values, in particular for AKT1 where molecules showed the lowest values (0.9–3.3 Å) followed by AKT3 (1.2–3.5 Å). In case of AKT2, compounds showed more fluctuations during the simulation (2.0–5.2 Å), even since the beginning, indicating poor stability of complexes with this isoform.

Binding interactions of the designed molecules were conserved as observed from docking; however, depending on the isoform, some of them changed during the simulation, Figure 8. In particular, for molecules in AKT1 and AKT3, the P-loop closes over the second *2H*-1,4-benzoxazin-3(*4H*)-one moiety keeping it in the cavity, so that the ligand interacts closely with the main chain of the P-loop through H-bond between the NH of benzoxazinone and Asp292/289, or through a new interaction with the carbonyl of the benzoxazinone and

Lys179/177, respectively. This conformational change favors the introduction of the other *2H*-1,4-benzoxazin-3(*4H*)-one moiety in the deep cavity, which shows hydrophobic interactions with residues Ala177/175, Ala230/Val228, Met281/278, and H-bond interactions with Thr291/288 and with the hinge residue Ala230/Val228. This effect, observed in both series of compound for these isoforms, explains the stability of the complexes, this derived from the low RMSD values. In addition for Series 1, molecules with groups such as sulfonamide (**S1-4**, **S1-5**, **S1-6**), and carboxamide (**S1-7**, **S1-14**) showed the best stability. The T-shaped interaction between the phenyl ring and the residue Phe442/439, described in the docking studies before, remains in the simulations while polar groups have H-bond interaction with Asp439/436. For Series 2, particularly carboxamides, with a dichlorophenyl group (**S2-3**), 6-chlorobenzimidazole (**S2-11**), 6-nitrobenzothiazole (**S2-13**) and with a pyrimidine (**S2-15**) showed better stability. In this case, the NH of the carboxamide had

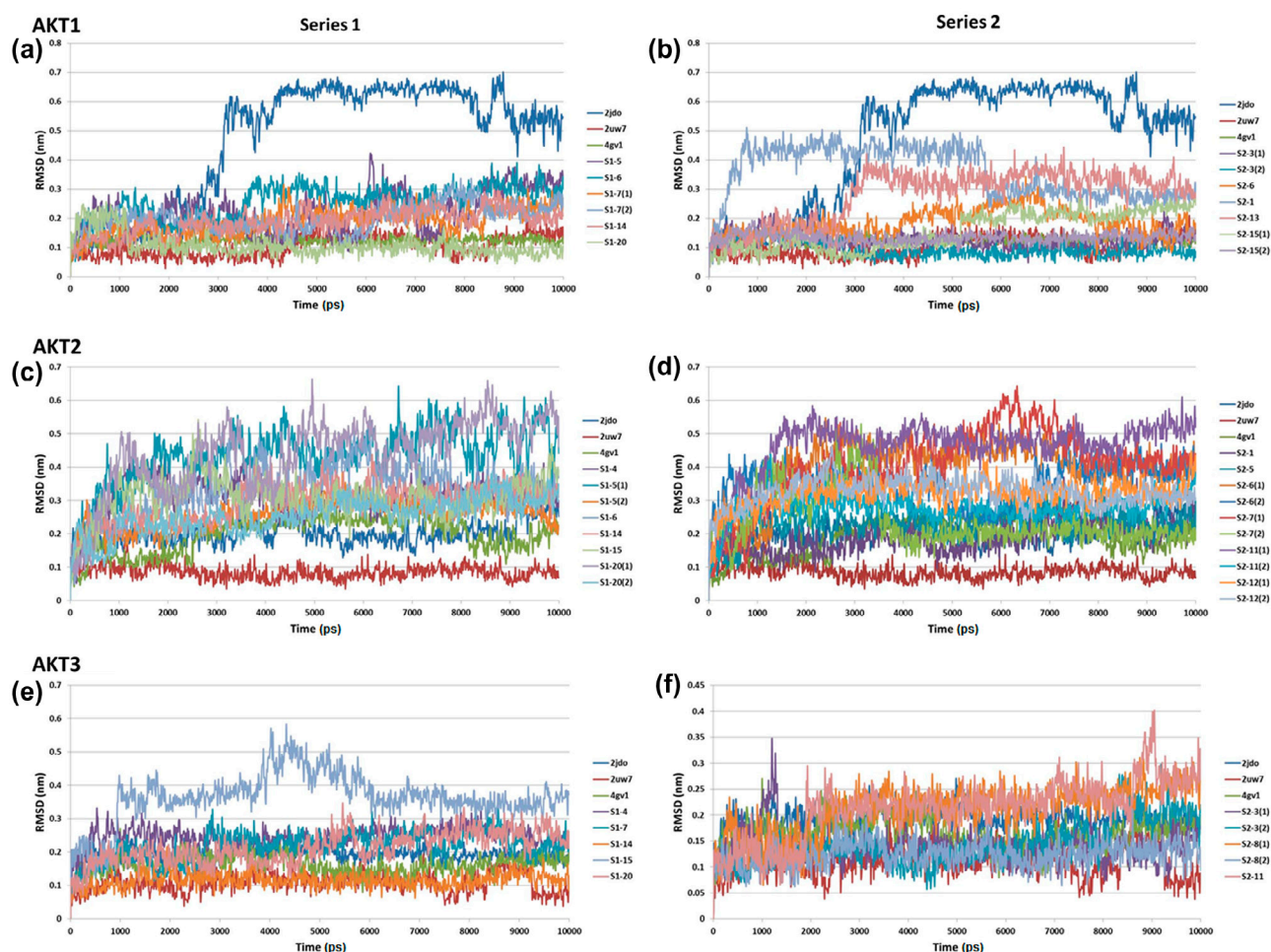


Figure 7. Ligand positional RMSD of selected compounds of both series and references inside the ATP pocket of AKT1 (a, b), AKT2 (c, d) and AKT3 (e, f) through 10 ns of simulation.

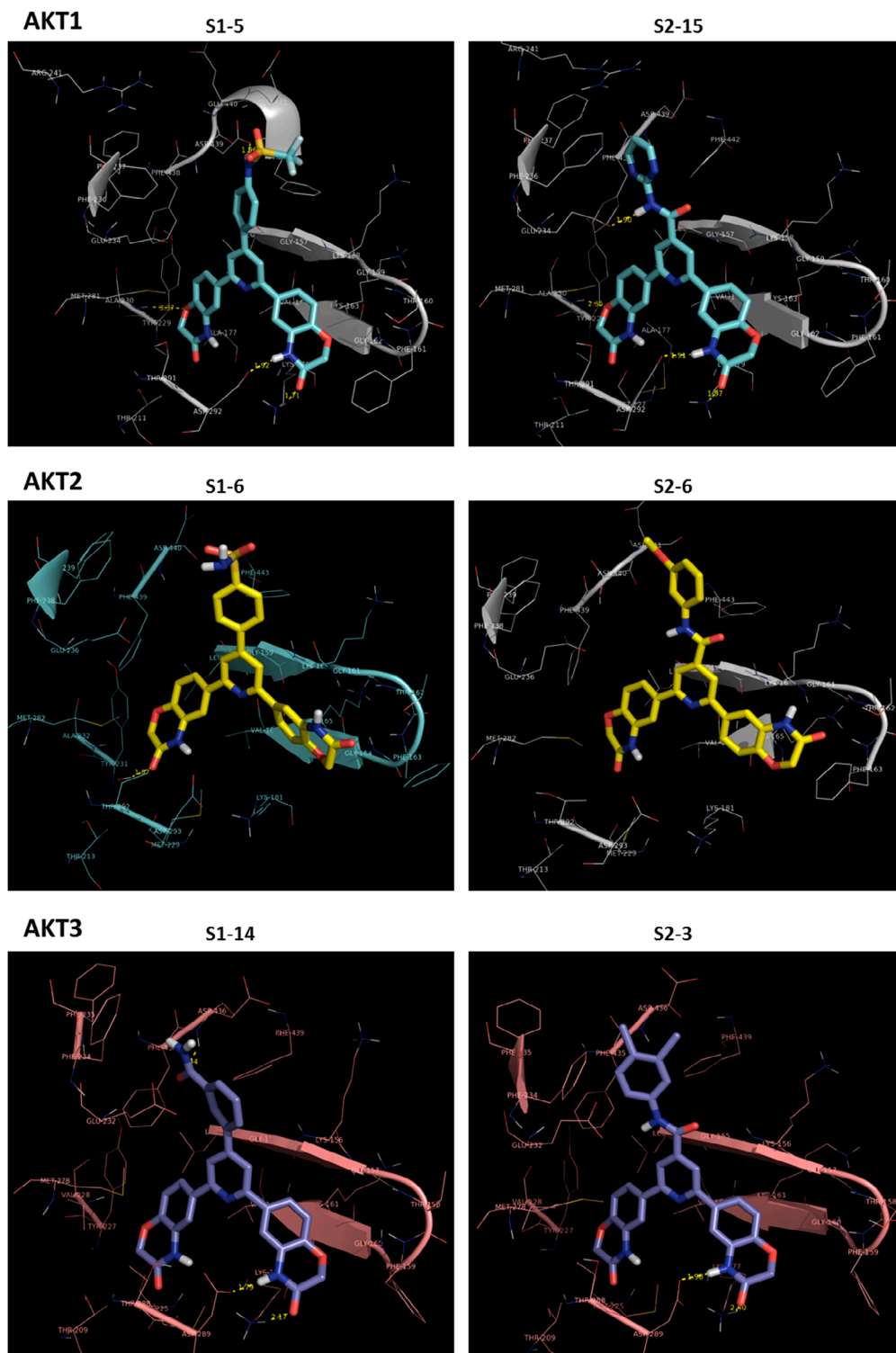


Figure 8. Binding modes of selected compounds in AKT isoforms. Each complex structure is last snapshot from the molecular dynamics simulations. For better visualization, only the amino acids of the binding site are displayed. H-bond interactions are represented in yellow dotted lines.

H-bond interaction with Glu234/232, but the T-shaped interaction between the aryl ring and Phe442/439 observed in docking does not remain during the

simulation; nevertheless, an interaction with residues Phe236/234 and Phe237/235 is observed. In contrast, most of the molecules studied in AKT2 showed a

rotation of the second 2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one moiety (S1-4, S1-6, S1-15, S1-20, S2-5, S2-6, S2-7, and S2-12) turning away for the interaction with Asp293, also, it is observed that the conformation of the P-loop is slightly open. Both effects make these molecules show a displacement from the deep cavity, thus preventing the interaction with the hinge residues; as expressed by their high RMSD values.

Moreover, the Root Mean Square Fluctuation (RMSF) analysis displays the highest fluctuations in external amino acids, which are in contact with the solvent, see Supplementary Information Figure S5. In particular, the analysis of the amino acids of the P-loop in AKT isoforms, Leu156/158/154, Gly157/159/155, Lys158/160/156, Gly159/161/157, Thr160/162/158, Phe161/163/159, Gly162/164/160, Lys163/165/161 and Val164/166/162, reveals different behavior from the free protein or in the presence of the ligand. This change in conformation, especially in AKT2, where most of the residues in the loop undergo a change of up to 1 Å, is attributable to the slightly open conformation, see Figure 9.

The binding free energy of AKT-ligand complexes was calculated for the last 3 ns of simulation using the MM-PBSA method. The binding free energy components are summarized in Table 2, while the energy behavior of the complexes during these 3 ns is shown in Supplementary Information Figure S6. It is seen that the designed molecules show favored binding free energy during the simulations, and that the binding energies seem to be more constant for AKT1 and AKT3, than for AKT2 that shows more fluctuations in some molecules. The major favorable contributor to the binding free energy is van der Waals component, which has a main role in the ligand binding interactions. This is mainly confirmed by the interactions with the hydrophobic amino acid residues observed in the docking and MD studies. It is

important to note that the hydrophobic factor is more relevant for the binding free energy contribution in molecules studied in AKT1 and AKT3, this suggests that optimization of van der Waals interactions between molecules and AKT1/AKT3 may lead to the selectivity. Regarding the alternative conformations, they remained stable during the simulations with similar or lower RMSD values, and favorable binding free energy, particularly when the substituent aryl or arylcarboxamide occupied the P-loop pocket. Therefore, this conformation can also exist and have interaction with the isoforms.

Moreover, for reference ligand structures 2UW7, 2JDO, and 4GV1 the MD analysis shows high stability of the complexes during the simulations. 2UW7 and 4GV1 display similar distributions and trends of dynamics properties with the lowest RMSD values in the three isoforms, while 2JDO exhibits less stability, which is attributed to the flexibility of the ligand. The estimated binding free energy indicates high affinity of the inhibitors to AKT isoforms. The analysis by MM-PBSA shows consistency between the binding free energy and the experimental activity for the 4GV1 ligand. The MM-PBSA method is a popular approach to estimate the free energy of the binding of small ligands to biological macromolecules. This method has been used successfully to reproduce and rationalize experimental findings, and to improve the results of virtual screening and docking, in particular for neutral ligands, where it has been noted that this approach produces more reasonable binding energies (Homeyer & Gohlke, 2012). All trisubstituted pyridines designed in this work are neutral structures, so comparing the binding energy with the reference structure 4GV1, the most potent reference structure included in the analysis and taken as neutral molecule, some of the trisubstituted pyridines have similar or best binding energy profile. These results suggest that the compounds selected after a multistep *in silico* approach might be promising AKT

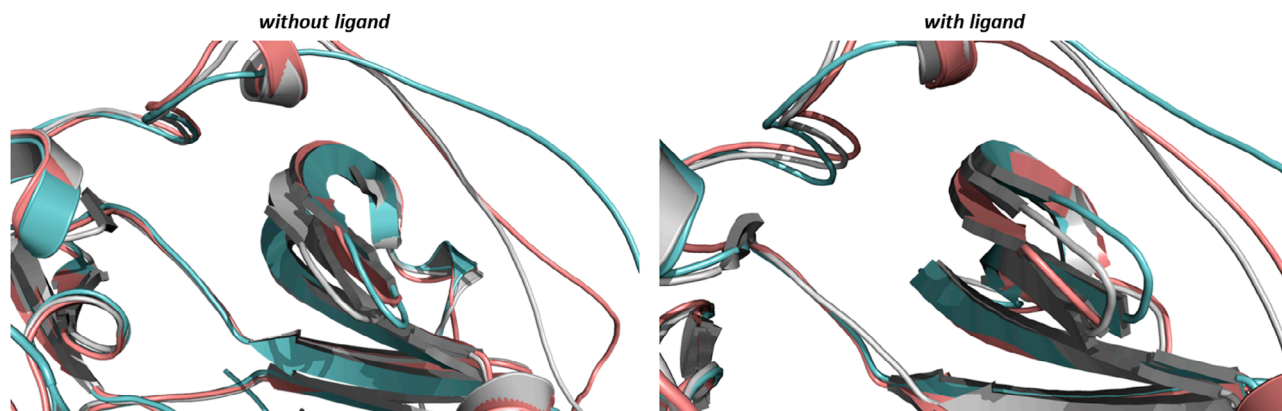


Figure 9. Conformational change in the P-loop of AKT1 (gray), AKT2 (cyan), and AKT3 (pink) during the simulation in the presence or absence of ligand. Structures were taken from the last time of simulation.

Table 2. Predicted binding free energies and individual energy components for the designed compounds in AKT isoforms determined by the MM-PBSA method.

Compound	ΔE_{vdw}	ΔE_{elec}	ΔG_{polar}	$\Delta G_{nonpolar}$	ΔG_{bind}	RMSD (nm) ^a
AKT1						
S1-5	-61.30	-18.67	63.05	-5.73	-22.67	.26
S1-6	-58.82	-12.11	51.97	-5.14	-24.10	.29
S1-7 (1) ^b	-59.48	-15.11	58.75	-5.35	-21.19	.22
S1-7 (2) ^c	-53.13	-23.44	57.83	-5.13	-23.88	.25
S1-14	-55.98	-12.44	49.20	-5.12	-24.34	.22
S1-20	-55.89	-13.86	54.46	-5.26	-20.57	.09
S2-3 (1)	-63.33	-16.05	64.25	-5.79	-20.92	.12
S2-3 (2)	-62.06	-22.68	68.87	-5.89	-21.77	.09
S2-6	-60.81	-18.79	66.17	-5.92	-19.35	.18
S2-11	-64.88	-27.83	73.51	-5.79	-25.00	.28
S2-13	-65.77	-19.39	66.30	-5.97	-24.83	.33
S2-15 (1)	-65.17	-7.07	52.60	-5.58	-25.23	.22
S2-15 (2)	-52.49	-26.19	71.24	-5.54	-12.97	.14
2JDO	-45.91	-107.90	111.32	-4.78	-45.28	.59
2UW7	-41.81	-109.06	104.22	-4.22	-50.88	.12
4GV1	-51.74	-16.16	58.87	-4.94	-13.97	.13
AKT2						
S1-4	-53.18	-24.31	58.89	-5.30	-23.90	.32
S1-5 (1)	-49.75	-13.10	48.24	-4.82	-19.43	.49
S1-5 (2)	-60.38	-17.00	69.57	-6.47	-14.29	.27
S1-15	-46.58	-10.52	41.28	-4.59	-20.42	.31
S1-20 (1)	-50.49	-17.91	43.03	-4.88	-30.26	.52
S1-20 (2)	-47.02	-6.84	50.61	-5.08	-8.33	.30
S2-1	-39.5	-7.74	33.97	-4.62	-17.89	.24
S2-5	-52.18	-16.36	53.68	-5.41	-20.28	.24
S2-6 (1)	-53.34	-18.29	45.06	-4.98	-31.56	.40
S2-6 (2)	-51.65	-4.70	34.04	-4.99	-27.30	.40
S2-7 (1)	-54.76	-17.73	55.51	-5.24	-22.23	.43
S2-7 (2)	-50.41	-14.60	54.10	-5.62	-16.54	.20
S2-11 (1)	-62.11	-26.61	75.24	-5.86	-19.35	.49
S2-11 (2)	-56.15	-13.35	46.43	-5.46	-28.52	.29
S2-12 (1)	-58.73	-24.65	67.80	-5.73	-21.32	.33
S2-12 (2)	-56.99	-9.98	50.40	-5.43	-22.01	.31
2JDO	-45.09	-126.52	110.13	-4.41	-65.90	.22
2UW7	-43.54	-130.67	107.75	-4.29	-70.76	.09
4GV1	-43.19	-22.10	49.61	-4.57	-20.26	.20
AKT3						
S1-4	-63.73	-16.48	60.77	-5.61	-25.05	.26
S1-7	-54.72	-4.81	47.89	-5.32	-16.97	.24
S1-14	-58.31	-21.45	67.25	-5.53	-18.04	.12
S1-15	-56.54	-11.50	54.85	-5.43	-18.62	.35
S1-20	-53.27	-12.99	46.51	-4.98	-24.74	.26
S2-3 (1)	-60.67	-16.13	67.99	-5.79	-14.61	.13
S2-3 (2)	-53.22	-18.58	64.30	-5.76	-13.04	.19
S2-8 (1)	-62.35	-18.91	66.35	-5.89	-20.80	.25
S2-8 (2)	-62.41	-20.80	77.15	-6.14	-12.20	.13
S2-11	-60.96	-28.22	73.65	-5.88	-21.42	.26
2JDO	-49.37	-106.78	109.56	-4.68	-51.29	.19
2UW7	-40.42	-106.79	94.43	-4.21	-56.99	.11
4GV1	-47.95	-24.67	50.30	-4.67	-26.99	.17

^aDeterminations were taken from the last 3 ns of simulation.^bCommon binding mode observed in docking calculations.^cAlternative binding mode presented in docking calculations.

inhibitors, in particular against AKT1 and AKT3 isoforms. In the particular case of 2UW7 and 2JDO ligands, the binding free energy is not in agreement with the

experimental activities. The MM-PBSA method shows complications for protonated ligands, since it overestimates the binding free energy. Therefore, in this method

the binding energy increases from a large electrostatic contribution (ΔE_{elec}) that is not compensated by the polar solvation energy (ΔG_{pol}) (Hou, Wang, Li, & Wang, 2010; Wang et al., 2016). In the 2UW7 and 2JDO ligands, which are considered protonated (they have a protonated amino group) in this study, have a large ΔE_{elec} values and hence their binding energy is overestimated, so they were not taken as reference to compare the free binding energy with those of the molecules designed due to the limitations of the method.

AKT isoforms share high homology in the ATP binding; therefore, the selectivity of the design molecules showed in this work can be explained by each isoform domain architectures and dynamic behavior. As seen in Figure 10, the MD simulations for AKT isoforms without ligand, a close conformation at the ATP binding site is observed, but comparing different snapshot of each isoform, AKT1 and AKT3 show the exposition of a hydrophobic cavity near to the hinge region formed by residues Phe236/234, Phe237/235, Phe438/435, and Phe442/439, respectively, while the residues Phe238, Phe239, Phe439, and Phe443 in AKT2 do not exhibit this cavity. When ligands are included in the simulation, for example in S1-14 in Figure 10, the substituted phenyl ring at position 4 of the pyridine scaffold occupies the hydrophobic cavity and favors the introduction of the 2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one moiety in the hinge pocket of AKT1 and AKT3. In contrast, in AKT2, the cavity is not well defined and the substituted phenyl ring does not bind to this region, making that the molecules studied move away from the binding site. Given the common domain architecture of the AKT family members, for AKT1 and AKT3 during MD study it is observed that

the ATP binding site conformation is defined by the tertiary structure, exposing the surface-hydrophobic region, which is important for the selective binding of the design molecules. In this regard, the presence of a hydrophobic or aromatic group at position 4 of the pyridine scaffold, in particular substituted *m/p* aromatic ring, is fundamental to give selectivity in AKT1 and AKT3 isoforms.

3.4. AKT isoforms relevance

AKT kinase is one the most frequently overexpressed and hyperactivated kinases in human cancers and plays a crucial role in cancer cell survival, growth, and proliferation. Its activation confers resistance to many types of cancer therapy (Song et al., 2005). The AKT isoforms share ~80% amino acids sequence identity. Although the three isoforms, AKT1, AKT2, and AKT3, are closely related and highly conserved, several findings point to functional isoform specific differences concerning proliferation, apoptosis and migration in human cancer cells, this suggests that AKT isoforms are not functionally redundant (Dummler & Hemmings, 2007). Recent observations indicate elevated expression of AKT1 in a significant percentage of breast (Hutchinson, Jin, Cardiff, Woodgett, & Muller, 2004), gastric (Han et al., 2008), brain (Cho et al., 2015), and lung cancers (Grabinski et al., 2011). In mammary mice models, the hyperactivation of AKT1 accelerated tumor progression and metastasis (Hutchinson et al., 2004), while *in vivo* models of melanoma and lung carcinoma, the expression of AKT1 accelerates tumorigenesis in both cases (Cho et al., 2015; Grabinski et al., 2011). It has also been established that overexpression of AKT3 favor growth and cell invasive

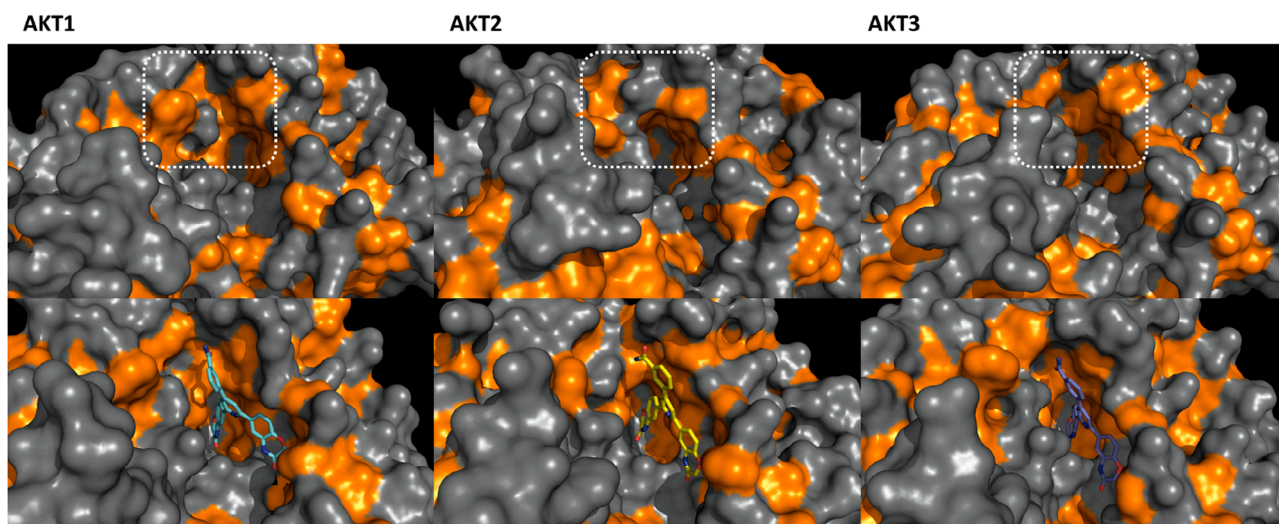
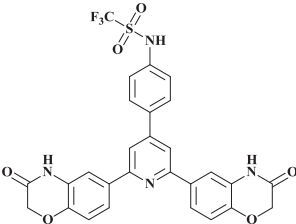
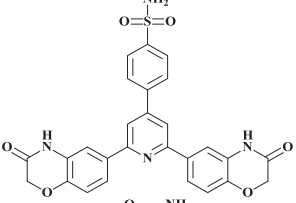
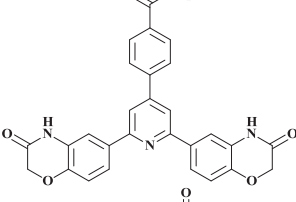
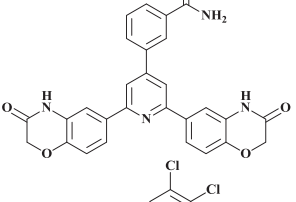
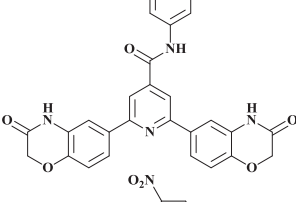
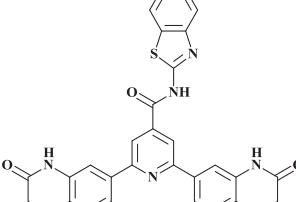
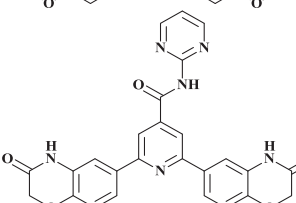


Figure 10. Structural comparison of the hydrophobic cavity (dotted box) formed by Phe236/238/234, Phe237/239/235, Phe438/439/435 and Phe442/443/439 in AKT isoforms (free and with ligand) after MD simulations. Hydrophobic regions in the protein are highlighted in color.

Table 3. Structure and predicted binding energy scores for the promising AKT1 and AKT3 inhibitors.

Compound	Structure	Binding energy (kcal/mol)		
		AKT1	AKT3	
S1-5		Glide	-5.43	-5.59
		AD4	-12.82	-12.98
		ADV	-11.8	-11.8
		MD	-22.7	-
S1-6		Glide	-6.60	-5.50
		AD4	-12.95	-13.08
		ADV	-11.6	-11.6
		MD	-24.4	-
S1-7		Glide	-6.09	-6.97
		AD4	-12.36	-12.59
		ADV	-11.9	-12.0
		MD	-21.2	-17.0
S1-14		Glide	-5.67	-6.06
		AD4	-12.98	-13.0
		ADV	-12.2	-12.3
		MD	-24.3	-18.0
S2-3		Glide	-7.92	-6.57
		AD4	-13.64	-13.79
		ADV	-12.9	-13.0
		MD	-20.9	-14.6
S2-13		Glide	-7.30	-4.35
		AD4	-14.8	-14.9
		ADV	-13.1	-13.1
		MD	-24.8	-
S2-15		Glide	-8.37	-8.24
		AD4	-12.53	12.71
		ADV	-12.5	-12.5
		MD	-25.2	-

migration in triple-negative breast cancer (Chin et al., 2014), and also favor angiogenesis in ovarian cancer (Liby et al., 2012). On the other hand, it has been found that AKT2 deficiency has little-to-no effect on the incidence of prostate neoplasia, endometrial carcinoma, intestinal cancers, since it shows less expression (vs. AKT1) in tissues such as prostate, uterus and intestine; however, AKT2 has an important role for insulin signaling (Héron-Milhavet et al., 2006; Xu, Chen, Jeon, Peng, & Hay, 2012). Therefore, AKT1 and AKT3 show high relevance for cancer therapy, particularly against breast, ovarian and lung cancers, that are the major cause of death worldwide.

Taken together and according to our *in silico* approach, the most promising designed compounds bind to AKT isoforms, notwithstanding docking and molecular dynamics results show that trisubstituted pyridines **S1-5**, **S1-6**, **S1-7**, **S1-14**, **S2-3**, **S2-13**, and **S2-15** remain stable and bind preferentially to AKT1. In addition, some molecules as **S1-6**, **S1-7**, and **S2-3** also have preference for AKT3; suggesting that these molecules might selectively inhibit this isoforms, see Table 3. Although the trisubstituted pyridines were designed targeting the ATP binding site, so that when they are evaluated will show activity in all isoforms including AKT2. However, if compounds exhibit selectivity and taking into consideration the overexpression and hyperactivation of AKT1 and AKT3 isoforms in different cancers, this fact makes of trisubstituted pyridines relevant in the development of AKT1/3 inhibitors for the therapeutic use against cancer.

4. Conclusion

Based on the structure of compound **11**, and the ATP binding site of the three AKT isoforms (AKT1, AKT2, AKT3) it was possible to design *in silico* 42 novel 2,4,6-trisubstituted pyridine derivatives as AKT kinase inhibitors. Although AKT isoforms share high homology in the ATP binding sites, the designed molecules in docking studies showed selectivity binding on AKT1 and AKT3, identifying as promising AKT1 inhibitors compounds **S1-5**, **S1-6**, **S1-7**, **S1-14**, **S2-3**, **S2-13**, and **S2-15**; and for AKT3, compounds **S1-6**, **S1-7**, and **S2-3**. In addition, MD simulations of ligand–protein complexes in AKT1 and AKT3 showed better stability and energy profile compared with AKT2 complexes. This can be explain due to interactions of the ligands with a well-defined hydrophobic region near to the ATP pocket in AKT1 and AKT3, which is formed by residues Phe236/234, Phe237/235, Phe438/435, and Phe442/439. The presence of the aromatic hole is also modulated in particular by the presence of the aromatic portion at position 4 of the pyridine ring. Therefore, the presence of an aromatic

portion is fundamental for the ligand in order to have selectivity in the isoforms. The most promising selected compounds had new interactions and better profile in docking and MD studies than the parent compound **11** used in this work. So it is expected that a number of them will have better activity than the parent compound against AKT1 and AKT3 preferably. It is worth to mention that the present study is limited to the AKT kinase family and a deeper analysis is needed to have selective inhibitors, due to the high conservation of the kinases. Currently, we are working on the synthesis and biological evaluation of the new compounds in order to validate what is herein discussed. This type of molecules gives the opportunity to explore and expand the chemical space of structures that inhibit the function of these kinases, in particular, in the search for selective and potent inhibitors that could be good candidates in the therapies for cancer.

Acknowledgments

We thank CONACyT for the financial support granted to the project CB-251807. We acknowledge DGSCA, UNAM for the support we received in the use of the HP Cluster Platform 3000SL supercomputer (Miztli). P.J. Trejo-Soto is also grateful to CONACyT for the fellowship granted (No. 409406/318775).

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

This work was supported by CONACyT for the fellowship granted [No. 409406/318775].

Supplemental data

The supplementary material for this article is available online at <http://dx.doi.org/10.1080/07391102.2017.1285724>

ORCID

Antonio Romo-Mancillas  <http://orcid.org/0000-0003-2869-588X>

References

- Addie, M., Ballard, P., Buttar, D., Crafter, C., Currie, G., Davies, B. R., ... Ruston, L. (2013). 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. *Journal of Medicinal Chemistry*, *56*, 2059–2073.
- Altomare, D. A., & Testa, J. R. (2005). Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene*, *24*, 7455–7464.
- Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., & Schwede, T. (2006). The SWISS-MODEL workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, *22*, 195–201.

- Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., van Gunsteren, W. F., DiNola, A., & Haak, J. R. (1984). Molecular dynamics with coupling to an external bath. *The Journal of Chemical Physics*, *81*, 3684–3690.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., ... Bourne, P. E. (2000). The protein data bank. *Nucleic Acids Research*, *28*, 235–242.
- Bianco, R., Melisi, D., Ciardiello, F., & Tortora, G. (2006). Key cancer cell signal transduction pathways as therapeutic targets. *European Journal of Cancer*, *42*, 290–294.
- Brodbeck, D., Cron, P., & Hemmings, B. A. (1999). A human protein kinase Bgamma with regulatory phosphorylation sites in the activation loop and in the C-terminal hydrophobic domain. *Journal of Biological Chemistry*, *274*, 9133–9136.
- Burris, H. A. (2013). Overcoming acquired resistance to anti-cancer therapy: Focus on the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, *71*, 829–842.
- Charifson, P. S., Corkery, J. J., Murcko, M. A., & Walters, W. P. (1999). Consensus scoring: A method for obtaining improved hit rates from docking databases of three-dimensional structures into proteins. *Journal of Medicinal Chemistry*, *42*, 5100–5109.
- Chen, V. B., Arendall, W. B., Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., ... Richardson, D. C. (2010). MolProbity: All-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, *66*, 12–21.
- Cheng, J. Q., Lindsley, C. W., Cheng, G. Z., Yang, H., & Nicosia, S. V. (2005). The Akt/PKB pathway: Molecular target for cancer drug discovery. *Oncogene*, *24*, 7482–7492.
- Chin, Y. R., Yoshida, T., Marusyk, A., Beck, A. H., Polyak, K., & Tokier, A. (2014). Targeting Akt3 signaling in triple-negative breast cancer. *Cancer Research*, *74*, 964–973.
- Cho, J. H., Robinson, J. P., Arave, R. A., Burnett, W. J., Kircher, D. A., Chen, G., ... Holmen, S. L. (2015). AKT1 activation promotes development of melanoma metastases. *Cell Reports*, *13*, 898–905.
- Darden, T., York, D., & Pedersen, L. (1993). Particle mesh Ewald: An Nlog(N) method for Ewald sums in large systems. *The Journal of Chemical Physics*, *98*, 10089–10092.
- Davies, T. G., Verdonk, M. L., Graham, B., Saalau-Bethell, S., Hamlett, C. C. F., McHardy, T., ... Barford, D. (2007). A structural comparison of inhibitor binding to PKB, PKA and PKA-PKB chimera. *Journal of Molecular Biology*, *367*, 882–894.
- DeLano, W. L. (2007). *The PyMOL molecular graphics system, delano scientific*. Palo Alto, CA: LLC.
- Dummler, B., & Hemmings, B. A. (2007). Physiological roles of PKB/Akt isoforms in development and disease. *Biochemical Society Transactions*, *35*, 231–235.
- Fife, C. M., McCarroll, J. A., & Kavallaris, M. (2014). Movers and shakers: Cell cytoskeleton in cancer metastasis. *British Journal of Pharmacology*, *171*, 5507–5523.
- Fresno Vara, J. A., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C., & González-Barón, M. (2004). PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treatment Reviews*, *30*, 193–204.
- Friesner, R. A., Banks, J. L., Murphy, R. B., Halgren, T. A., Klicic, J. J., Mainz, D. T., ... Shenkin, P. S. (2004). Glide—a new approach for rapid, accurate docking and scoring. *Journal of Medicinal Chemistry*, *47*, 1739–1749.
- Gasteiger, J., & Marsili, M. (1978). A new model for calculating atomic charges in molecules. *Tetrahedron Letters*, *19*, 3181–3184.
- Grabinski, N., Bartkowiak, K., Grupp, K., Brandt, B., Pantel, K., & Jücker, M. (2011). Distinct functional roles of Akt isoforms for proliferation, survival, migration and EGF-mediated signalling in lung cancer derived disseminated tumor cells. *Cellular Signalling*, *23*, 1952–1960.
- Han, Z., Wu, K., Shen, H., Li, C., Han, S., Hong, L., ... Fan, D. (2008). Akt1/protein kinase Bα is involved in gastric cancer progression and cell proliferation. *Digestive Diseases and Sciences*, *53*, 1801–1810.
- Hernández-Campos, A., Velázquez-Martínez, I., Castillo, R., López-Vallejo, F., Jia, P., Yu, Y., ... Medina-Franco, J. L. (2010). Docking of protein kinase B inhibitors: Implications in the structure-based optimization of a novel scaffold. *Chemical Biology and Drug Design*, *76*, 269–276.
- Héron-Milhavet, L., Franckhauser, C., Rana, V., Berthenet, C., Fisher, D., Hemmings, B. A., ... Lamb, N. J. C. (2006). Only Akt1 is required for proliferation, while Akt2 promotes cell cycle exit through p21 binding. *Molecular and Cellular Biology*, *26*, 8267–8280.
- Homeyer, N., & Gohlke, H. (2012). Free energy calculations by the molecular mechanics Poisson–Boltzmann surface area method. *Molecular Informatics*, *31*, 114–122.
- Hou, T., Wang, J., Li, Y., & Wang, W. (2010). Assessing the performance of the MM/PBSA and MM/GBSA methods. 1. The accuracy of binding free energy calculations based on molecular dynamics simulations. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *51*, 69–82.
- Hutchinson, J. N., Jin, J., Cardiff, R. D., Woodgett, J. R., & Muller, W. J. (2004). Activation of Akt-1 (PKB-alpha) can accelerate ErbB-2-mediated mammary tumorigenesis but suppresses tumor invasion. *Cancer Research*, *64*, 3171–3178.
- Jordan, M. A., & Wilson, L. (2004). Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature Reviews. Cancer*, *4*, 253–265.
- Kopp, J., & Schwede, T. (2006). The SWISS-MODEL repository: New features and functionalities. *Nucleic Acids Research*, *34*, D315–D318.
- Kroemer, R. T. (2007). Structure-based drug design: Docking and scoring. *Current Protein and Peptide Science*, *8*, 312–328.
- Kumar, C. C., & Madison, V. (2005). AKT crystal structure and AKT-specific inhibitors. *Oncogene*, *24*, 7493–7501.
- Kumari, R., Kumar, R., & Lynn, A. (2014). g-mmpbsa -A GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *54*, 1951–1962.
- Levitzi, A., & Klein, S. (2010). Signal transduction therapy of cancer. *Molecular Aspects of Medicine*, *31*, 287–329.
- Liby, T. A., Spyropoulos, P., Buff Lindner, H., Eldridge, J., Beeson, C., Hsu, T., & Muise-Helmericks, R. C. (2012). Akt3 controls vascular endothelial growth factor secretion and angiogenesis in ovarian cancer cells. *International Journal of Cancer*, *130*, 532–543.
- Lindorff-Larsen, K., Piana, S., Palmo, K., Maragakis, P., Klepeis, J. L., Dror, R. O., & Shaw, D. E. (2010). Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins*, *78*, 1950–1958.
- Lindsley, C. W., Barnett, S. F., Yaroschak, M., Bilodeau, M. T., & Layton, M. E. (2007). Recent progress in the development of ATP-competitive and allosteric Akt kinase inhibitors. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, *7*, 1349–1363.
- Luo, J., Manning, B. D., & Cantley, L. C. (2003). Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: Rationale and promise. *Cancer Cell*, *4*, 257–262.

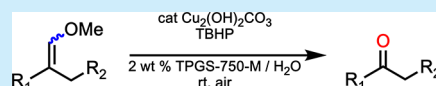
- Manning, B. D., & Cantley, L. C. (2007). AKT/PKB signaling: Navigating downstream. *Cell*, 129, 1261–1274.
- Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., & Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science*, 298, 1912–1934.
- Mattmann, M. E., Stoops, S. L., & Lindsley, C. W. (2011). Inhibition of Akt with small molecules and biologics: Historical perspective and current status of the patent landscape. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 21, 1309–1338.
- Medina-Franco, J. L., Giulianotti, M. A., Yu, Y., Shen, L., Yao, L., & Singh, N. (2009). Discovery of a novel protein kinase B inhibitor by structure-based virtual screening. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19, 4634–4638.
- Meuillet, E. J. (2011). Novel inhibitors of AKT: Assessment of a different approach targeting the pleckstrin homology domain. *Current Medicinal Chemistry*, 18, 2727–2742.
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AUTODOCKTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30, 2785–2791.
- Nakatani, K., Sakaue, H., Thompson, D. A., Weigel, R. J., & Roth, R. A. (1999). Identification of a human Akt3 (protein kinase B gamma) which contains the regulatory serine phosphorylation site. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 257, 906–910.
- Parrinello, M., & Rahman, A. (1980). Crystal structure and pair potentials: A molecular-dynamics study. *Physical Review Letters*, 45, 1196–1199.
- Polivka, J., & Janku, F. (2014). Molecular targets for cancer therapy in the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Pharmacology & Therapeutics*, 142, 164–175.
- Porta, C., Paglino, C., & Mosca, A. (2014). Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer. *Frontiers in Oncology*, 4, 1–11.
- Rouse, M. B., Seefeld, M. A., Leber, J. D., McNulty, K. C., Sun, L., Miller, W. H., ... Heerding, D. A. (2009). Amino-furazans as potent inhibitors of AKT kinase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 19, 1508–1511.
- Sale, E. M., & Sale, G. J. (2008). Protein kinase B: Signalling roles and therapeutic targeting. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65, 113–127.
- Saxty, G., Woodhead, S. J., Berdini, V., Davies, T. G., Verdonk, M. L., Wyatt, P. G., ... Carr, R. A. (2007). Identification of inhibitors of protein kinase B using fragment-based lead discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*, 50, 2293–2296.
- Schrödinger Release 2015-4: Glide version 6.9. (2015). New York, NY: Schrödinger, LLC.
- Schrödinger Release 2015-4: Maestro version 10.4. (2015). New York, NY: Schrödinger, LLC.
- Schrödinger Release 2015-4: Protein Preparation Wizard; Epik version 3.4. (2015). New York, NY: Schrödinger, LLC.
- Schrödinger Release 2015-4: Prime version 4.2. (2015). New York, NY: Schrödinger, LLC.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2016). Cancer statistics. *CA Cancer Journal for Clinicians*, 66, 7–30.
- Song, G., Ouyang, G., & Bao, S. (2005). The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 9, 59–71.
- Sousa, A. W., & Vranken, W. F. (2012). ACPYPE – AnteChamber PYthon parser interface. *BMC Research Notes*, 5, 1–8.
- Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31, 455–461.
- Van Der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A. E., & Berendsen, H. J. C. (2005). GROMACS: Fast, flexible, and free. *Journal of Computational Chemistry*, 26, 1701–1718.
- Wang, C., Nguyen, P. H., Pham, K., Huynh, D., Le, T.-B. N., Wang, H., ... Luo, R. (2016). Calculating protein-ligand binding affinities with MMPBSA: Method and error analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 37, 2436–2446.
- Wavefunction Inc. (2010). Spartan version 10. Irvine, CA: Author.
- Woods, K. W., Fischer, J. P., Claiborne, A., Li, T., Thomas, S. A., Zhu, G. D., ... Li, Q. (2006). Synthesis and SAR of indazole-pyridine based protein kinase B/Akt inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 14, 6832–6846.
- Workman, P., Al-Lazikani, B., & Clarke, P. A. (2013). Genome-based cancer therapeutics: Targets, kinase drug resistance and future strategies for precision oncology. *Current Opinion in Pharmacology*, 13, 486–496.
- Xu, P.-Z., Chen, M.-L., Jeon, S.-M., Peng, X., & Hay, N. (2012). The effect Akt2 deletion on tumor development in Pten(+/-) mice. *Oncogene*, 31, 518–526.
- WHO – Cancer. (2016). Retrieved November 8, 2016, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>; <http://www.who.int/cancer/en/>
- Yang, J., Cron, P., Good, V. M., Thompson, V., Hemmings, B. A., & Barford, D. (2002). Crystal structure of an activated Akt/protein kinase B ternary complex with GSK3-peptide and AMP-PNP. *Nature Structural Biology*, 9, 940–944.
- Zhang, J., Yang, P. L., & Gray, N. S. (2009). Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nature Reviews Cancer*, 9, 28–39.

Copper-Catalyzed Oxidative Cleavage of Electron-Rich Olefins in Water at Room Temperature

Daniel J. Lippincott,[†] Pedro J. Trejo-Soto,^{†,‡} Fabrice Gallou,[§] and Bruce H. Lipshutz^{*,†}[†]Department of Chemistry and Biochemistry, University of California, Santa Barbara, California 93106, United States[‡]Facultad de Química, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX, Mexico City 04510, México[§]Novartis Pharma AG, CH-4057 Basel, Switzerland

Supporting Information

ABSTRACT: A copper-catalyzed oxidative cleavage of electron-rich olefins into their corresponding carbonyl derivatives is described as an alternative to ozonolysis. The scope includes various precursors to aryl ketone derivatives, as well as oxidations of enol ethers bearing atypical alkyl and dialkyl substitution, the first of their kind among such metal catalyzed alkene cleavage reactions. The use of an inexpensive copper salt, room temperature conditions, an aerobic atmosphere, and water as the global reaction medium highlight the green features of this new method. Associated mechanistic investigations are also presented.



The use of ozone as a stoichiometric reagent for the generation of a carbonyl group is a fundamental reaction with valuable applications to organic synthesis. Olefin oxidation reactions in numerous total synthesis campaigns, past and present, attest to the impact of this simple, yet powerful transformation. Notwithstanding its time-honored status in the community, safety and handling issues that necessitate specific operational needs (e.g., including specialized laboratory equipment for its formation at low temperatures) present a less than ideal situation. An equivalent based on catalysis, however, might obviate these shortcomings, allowing for a more practical, safe, and user-friendly approach to this important reaction. Up until recently,¹ there were no reports on methodologies directed specifically to achieve this conversion. Only within the past few years have such reports been successfully conducted under catalytic conditions.

In 2006, Shi and co-workers described a gold-catalyzed oxidative cleavage of simple benzophenone precursors in water, albeit at 90 °C.² Later, an organocatalytic approach was reported utilizing *N*-hydroxyphthalimide (NHPI or PINO) in dimethylacetamide at 80 °C, with molecular oxygen as the oxidant, again providing mainly benzophenone derivatives.³ More recently, in 2015, Xiao et al. disclosed an elegant methodology based on iron(III) triflate, in hot DCE.⁴ This report described a broad scope of substrates leading to benzaldehyde, acetophenone, and benzophenone derivatives, although it relied upon the activity of a noncommercially available pyridine bis-sulfonamide ligand. Moreover, the conditions appeared not to be compatible with nitrogen within the chosen substrates. Lastly, in 2016, a photocatalytic approach employing an aromatic disulfide as catalyst was described, nearly exclusively leading to benzaldehyde products.⁵ Thus, a more general methodology that offers room temperature conditions, avoids use of waste-generating organic

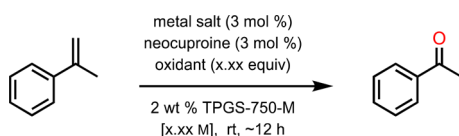
solvents,⁶ relies upon a readily available and earth abundant metal,⁷ and involves a simple and safe protocol is still desirable.

Past documentation of many radical processes both promoted by, and catalytic in, copper suggested its potential as a mediator of this transformation. It was anticipated to be an attractive alternative when compared to those metals used previously (vide supra) due to copper's low toxicity, controllable oxidation states, relative abundance, and cost.⁸ Since copper has been previously utilized with substantial success in oxidations of alcohols to aldehydes and/or ketones,⁹ it was reasonable to anticipate its participation in an oxidative cleavage of alkenes using a peroxide as the stoichiometric oxidant. Initial experiments, inspired by Shi's prior report,² suggested that our micellar catalysis technology (i.e., using water at rt) might be amenable.

As shown in Table 1, use of either ligated gold or copper salts, together with a peroxide under micellar catalysis conditions, led to varying amounts of the desired ketone in which copper was found to significantly out-perform gold as the metal (entries 1 vs 2). These reactions were run "open-flask", thereby allowing atmospheric oxygen to participate as needed in the process. Conversely, when the analogous reaction was run under argon, no conversion of the starting α -methylstyrene was observed. However, upon addition of more peroxide (2.00 equiv) and further stirring while open to air, the same reaction began to produce the expected oxidation product (entry 3). Switching from a copper(I) to (II) salt was of little consequence (entries 1 vs 4). Running the reaction with TBHP under 1 atm of molecular oxygen, likewise, showed no benefit, and in fact, led to inferior results (entry 5). A control reaction run exposed to air, but in the absence of TBHP afforded no reaction (entry 8), while no reaction was

Received: June 17, 2018

Published: August 13, 2018

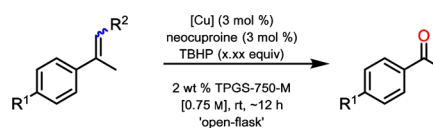
Table 1. Initial Optimization Screening of Reaction Parameters with α -Methylstyrene

entry	metal/L	oxidant (equiv)	yield ^a (%)
1	Cu(I)OAc	TBHP (2.00)	57
2	AuCl ₃	TBHP (2.00)	26
3 ^b	Cu(I)OAc	TBHP (2.00)	NR (47) ^c
4	Cu(OAc) ₂	TBHP (2.00)	59
5 ^d	Cu(OAc) ₂	TBHP (2.00)	48
6 ^e	Cu(OAc) ₂	TBHP (2.00)	16
7 ^f	Cu(OAc) ₂	TBHP (2.00)	13
8	Cu(OAc) ₂	none	NR
9	none	TBHP (2.00)	NR
10	Cu(MeCN) ₄ PF ₆	TBHP (2.00)	55
11	Cu(<i>i</i> -butyrate) ₂	TBHP (2.00)	39
12	Cu(OAc) ₂	H ₂ O ₂ (3.00)	NR
13	Cu(OAc) ₂	cumene-OOH (2.00)	NR
14	Cu(OAc) ₂	TMS-O-O-TMS (2.00)	NR
15	Cu(OAc) ₂	MCPBA (2.00)	NR
16	Cu(OH) ₂	TBHP (2.50)	65
17	CuO	TBHP (2.50)	48

^aYield of isolated products, after column chromatography. ^bReaction initially run under Ar. ^cReaction yield after additional TBHP with exposure to air. ^dReaction run under an 1 atm of O₂. ^eConcentration of [0.50 M]. ^fConcentration of [1.00 M]. NR = no reaction.

observed in the absence of copper (entry 9). Taken together, these data suggest a curious necessity for both an internal stoichiometric oxidant, as well as atmospheric (oxygen) conditions in the presence of a copper salt. From the data in entries 4, 6 and 7, a concentration of 0.75 M was determined to be optimal. Evaluation of several other sources of peroxide surprisingly led to no product formation (entries 12–15). Other copper salts were also screened, with copper hydroxide providing the best results (entry 16). Noteworthy is the role of the surfactant to safely enable this process (**Caution! Explosion risk: deploy a blast shield if uncertain of safety**) as in the absence of TPGS-750-M (i.e., the corresponding “on-water” reaction), discontinuation of stirring concentrated the peroxide together with the organic substrate, which quickly led to detonation of the reaction.

To further study the reactivity of alkenes toward a presumed electrophilic oxygen source, various substitutions at the $-R^2$ position were made (Table 2). Thus, utilizing *p*-methoxy- and *p*-bromo- α -methylstyrene as baseline cases (entries 1, 2; R² = H), the addition of alkyl chains (either methyl or *n*-pentyl groups) resulting in more bulky trisubstituted alkenes (entries 3 and 4; respectively) had a negative impact on reaction efficiency. Surprisingly, placement of a 4-methoxyphenyl group, again, at the activating $-R^2$ position completely shut down the reaction (entry 5). This is in line with the observation that simple, monoalkenyl-substituted styrenes also do not undergo oxidation under these conditions, suggesting the potential for an orthogonal strategy toward selective ketone formation. Gratifyingly, use of the corresponding methyl enol ether provided a marked improvement (entries 6 and 7).¹⁰ Decreasing the amount of TBHP by half (to 1.25 equiv) did not effect the overall extent of reaction (entries 7 vs 8). The control experiment without ligand was particularly

Table 2. Screening of Basic Copper Salts and Effect of Olefin-Activating Group

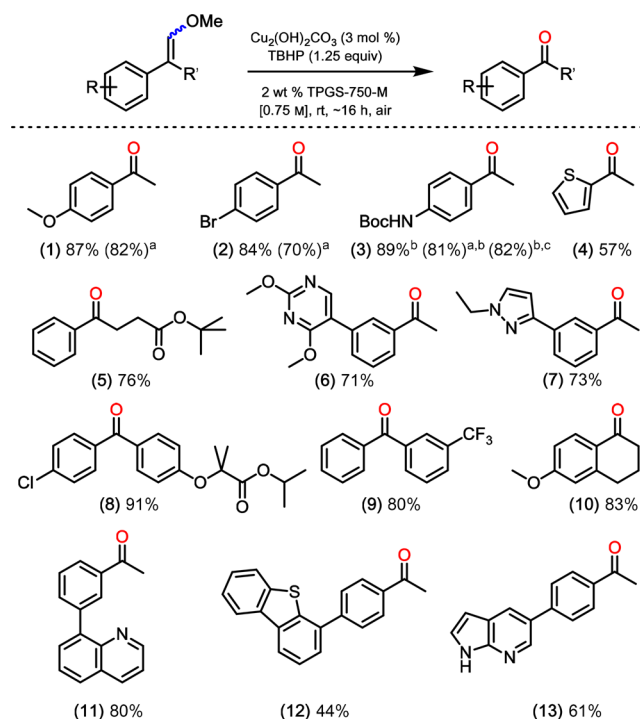
entry	3 mol % [Cu]/L	R ¹	R ²	TBHP (equiv)	yield ^a (%)
1	Cu(OH) ₂ /L	OMe	H	2.50	55
2	Cu(OH) ₂ /L	Br	H	2.50	48
3	Cu(OH) ₂ /L	OMe	Me	2.50	31
4	Cu(OH) ₂ /L	OMe	-C ₅ H ₁₁	2.50	36
5	Cu(OH) ₂ /L	Br	<i>p</i> -MeO-C ₆ H ₄	2.50	NR
6	Cu(OH) ₂ /L	OMe	OMe	2.50	69
7	Cu(OH) ₂ /L	Br	OMe	2.50	66
8	Cu(OH) ₂ /L	Br	OMe	1.25	67
9 ^b	Cu(OH) ₂ /L	Br	OMe	1.25	70
10	Cu(OH) ₂	Br	OMe	1.25	73
11	Cu ₂ (OH) ₂ CO ₃	Br	OMe	1.25	84
12 ^c	Cu ₂ (OH) ₂ CO ₃	Br	OMe	1.25	62
13 ^d	Cu ₂ (OH) ₂ CO ₃	Br	OMe	1.25	67
14 ^b	Cu ₂ (OH) ₂ CO ₃	Br	OMe	1.25	84
15 ^e	Cu ₂ (OH) ₂ CO ₃	Br	OMe	1.25	70
16 ^f	Cu ₂ (OH) ₂ CO ₃	Br	OMe	1.25	79
17 ^g	Cu ₂ (OH) ₂ CO ₃	Br	OMe	1.25	78
18 ^g	Cu ₂ (OH) ₂ CO ₃	Br	OMe	none	NR

^aYield of isolated products, after column chromatography. ^b5 mol % catalyst. ^c1 mol % catalyst. ^d2 mol % catalyst. ^eReaction run in 1,2-dichloroethane. ^fReaction run in acetonitrile. ^gReaction run under 1 atm of O₂.

informative, as use of the cupric salt alone was shown to be equally or even more effective than its use in ligated form. On the basis of the results using the more basic copper hydroxide relative to copper acetate (65% vs 59%; Table 1, entries 16 vs 4), the carbonate salt of intermediate basicity¹¹ was then assessed (Table 2, entry 11). These results indicated that the study should be continued using this source of copper(II). Lowering the catalyst loading to either 1 or 2 mol % gave slightly diminished yields, whereas increasing the loading from 3 to 5 mol % showed no observed benefit (entries 11–14). When the solvent was changed to either 1,2-dichloroethane or acetonitrile, common organic solvents for this type of transformation,^{4,5} the reactions proceeded reasonably well; however; they led to somewhat lower levels of conversion than those observed in TPGS-750-M/water (entries 11 vs 15, 16). Lastly, experiments utilizing 1 atm of oxygen, with or without TBHP, afforded inferior results (entries 17 and 18, respectively).

On the basis of these optimized conditions, the generality of the catalyst system was assessed on an array of aryl/alkyl methyl enol ethers (Scheme 1). *E/Z*-Mixtures of α -methyl-substituted educts with aryl groups containing either electron-donating or -withdrawing substituents were found to readily participate (e.g., 1–3) with substitution at the ortho-, meta-, or para- positions (e.g., 10, 6, 13, respectively). Several heterocyclic derivatives reacted without incident under these conditions, including those containing a thiophene, pyrazole, pyrimidine, azaindole, or quinoline moiety, without compromising the (nonligated) copper catalyst. Furthermore, substrates containing extended alkyl chains (e.g., leading to

Scheme 1. Scope of Aryl/Alkyl Enol Ether Oxidations

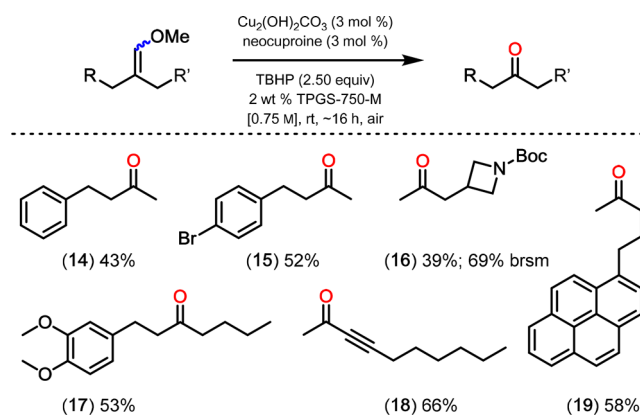


^aIsolated yield of reaction run with 3 mol % $\text{Cu}(\text{OH})_2$. ^b10% v/v THF added to increase homogeneity. ^cIsolated yield of reaction run at 1.00 mmol scale.

product 5), as well as cyclic arrays (e.g., 10) gave the desired ketones in good yields, each representing a substitution pattern that has not been found in prior reports.^{1f,2-5} 1,1-Diarylalkenyl enol ethers also smoothly formed several benzophenone derivatives in good yields, as in products 8 and 9. The former, fenofibrate (8), is used for treatment of hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia.¹² It is noteworthy that under the aqueous conditions employed, the methyl enol ether group did not undergo hydrolysis to the corresponding aldehyde.

Extension to more challenging and previously unreported catalytic oxidative cleavage reactions of dialkyl olefins was next pursued (Scheme 2). By applying conditions similar to those shown in Table 2, only low yields of product ketone were initially observed. For this class of substrate increasing the amount of oxidant from 1.25 to 2.50 equiv provided a more

Scheme 2. Preliminary Scope of Alkyl/Alkyl Oxidations



effective combination. In most cases, although full consumption of starting materials was observed, isolated yields were consistently in the moderate category. Benzylacetone derivatives 14 and 15 were readily formed under these mild conditions. Extending the distance of the alkyl chain in pyrene-derivative 19 proceeded smoothly, likewise increasing the alkyl chain length, e.g., from methyl to *n*-butyl (leading to product 17), gave comparable yields. The presence of nitrogen, protected as its Boc derivative, in azetidine-containing product 16 was also tolerated, although the level of conversion was lower leading to a diminished isolated yield. Interestingly, the use of an unsaturated precursor ultimately affording a conjugated ketone (as in 18) led to a somewhat improved outcome.

Nonproductive pathways leading to undesired intermediates include a Kharasch-type mechanism, where allylic oxidation with a *t*-butoxy or *t*-butylperoxy radical could trap the intermediate olefinic radical prior to addition of molecular oxygen.¹³ Indeed, this type of byproduct formation was observed in initial studies with 4-methoxy- α -methylstyrene (Figure 1). Such an alternative, and competitive pathway, is

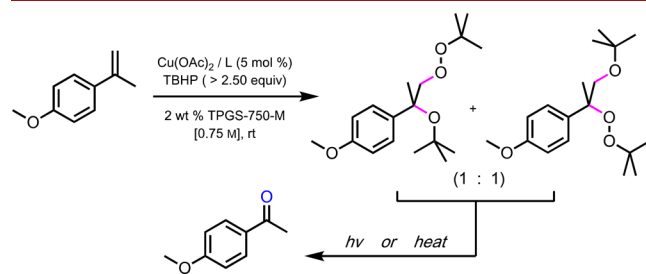


Figure 1. Competitive potential Kharasch-type allylic oxidation.

similar to that seen long ago by Kochi,¹⁴ and to some extent, more recently by Wang and co-workers.⁵ When the pure “byproduct” was isolated and then, as a mixture with authentic material, analyzed by GC–MS, the chromatograms showed a single peak with an *m/z* corresponding to the desired ketone. Moreover, heating this byproduct neat for 30 s led to a rapid reaction, with subsequent proton NMR analysis now showing a roughly 1:1 mixture of both product ketone and peroxy byproduct.¹⁵ Thus, this presumed double Kharasch intermediate undergoes either electrochemical (GC filament ionization) or thermal (heat-gun) collapse to the desired ketone. Collectively, the experimental data suggest a plausible mechanism for radical-based cooperativity, akin to that described decades ago for enamine’s engaging molecular oxygen (Figure 2).¹⁶

In summary, a mild, safe, and green protocol for converting methyl enol ethers into their corresponding ketone adducts that avoids low temperature ozonolysis has been developed. The technology avoids precious metal catalysis, utilizing an inexpensive Cu(II) salt enabled by micellar catalysis in water at room temperature. This methodology compares very favorably with existing catalytic oxidative cleavage reactions in terms of generality, and aids in further extending the substrate scope beyond prior art that was limited to formation of products in the acetophenone and benzophenone series. In the composite, these preliminary results offer considerable promise for further developments, aimed at addressing this textbook reaction in organic synthesis.

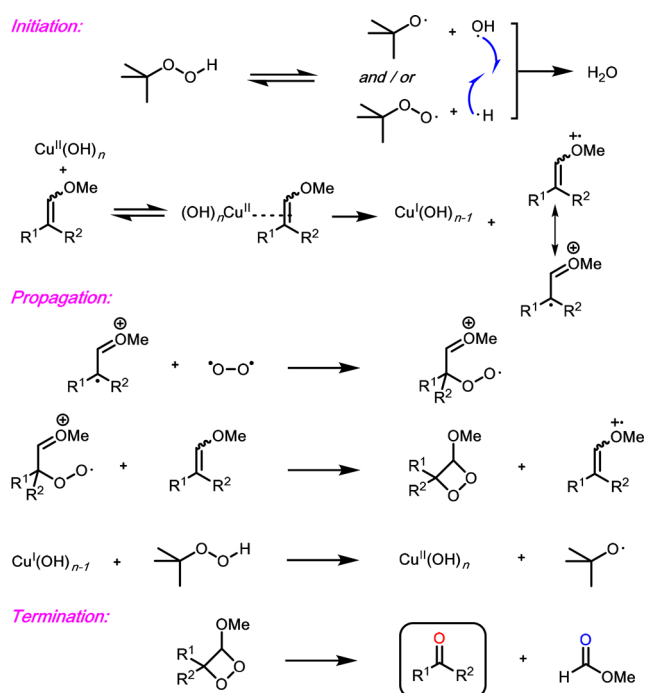


Figure 2. Proposed mechanistic radical pathways: initiation, propagation, and termination.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: [10.1021/acs.orglett.8b01883](https://doi.org/10.1021/acs.orglett.8b01883).

Reaction optimization, details of control-experiments, analytical data of all new compounds (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: lipshutz@chem.ucsb.edu.

ORCID

Bruce H. Lipshutz: [0000-0001-9116-7049](https://orcid.org/0000-0001-9116-7049)

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We warmly acknowledge Novartis and the NSF (SusChEM 1561158) for financial support. P. J. T.-S. acknowledges CONACyT (No. 409406/No. 258048) and Posgrado en Ciencias Químicas for a fellowship in support of this research.

■ REFERENCES

- (1) (a) Bailey, P. S. *Chem. Rev.* **1958**, *58*, 925. (b) Murray, R. W. *Acc. Chem. Res.* **1968**, *1*, 313. (c) Criegee, R. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1975**, *14*, 745. (d) Van Ornum, S. G.; Champeau, R. M.; Pariza, R. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 2990. (e) Ozone. In *e-ROS Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*; Wiley: New York, 2006; DOI: [10.1002/047084289X.ro030.pub2](https://doi.org/10.1002/047084289X.ro030.pub2) (accessed May 25, 2018). (f) Urgoitia, G.; SanMartin, R.; Herrero, M. T.; Domínguez, E. *ACS Catal.* **2017**, *7*, 3050.
- (2) Xing, D.; Guan, B.; Cai, G.; Fang, Z.; Yang, L.; Shi, Z. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 693.
- (3) Lin, R.; Chen, F.; Jiao, N. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 4158.

(4) Gonzalez-de-Castro, A.; Xiao, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 8206.

(5) Deng, Y.; Wei, X.-J.; Wang, H.; Sun, Y.; Noël, T.; Wang, X. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2017**, *56*, 832.

(6) (a) Lipshutz, B. H.; Isley, N. A.; Fennewald, J. C.; Slack, E. D. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 10952. (b) Lipshutz, B. H.; Ghorai, S. *Green Chem.* **2014**, *16*, 3660.

(7) (a) Fleischer, M. Recent estimates of the abundances of the elements in the earth's crust. *U.S. Geol. Surv. Circ.* **1953**, 285. (b) Fleischer, M. *J. Chem. Educ.* **1954**, *31*, 446. (c) Kooroshy, J.; Meindersma, C.; Podkolinski, R.; Rademaker, M.; Sweijts, T.; Diederer, A.; Beerthuisen, M.; de Goede, S. *Scarcity of Minerals: A Strategic Security Issue*; The Hague Center for Strategic Studies: The Hague, Netherlands, 2009. (d) Zweig, J. E.; Kim, D. E.; Newhouse, T. R. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 11680.

(8) Elwell, C. E.; Gagnon, N. L.; Neisen, B. D.; Dhar, D.; Spaeth, A. D.; Yee, G. M.; Tolman, W. B. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 2059.

(9) (a) McCann, S. D.; Stahl, S. S. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 1756. (b) Zultanski, S. L.; Zhao, J.; Stahl, S. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 6416. (c) McCann, S. D.; Stahl, S. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 199. (d) Nutting, J. E.; Rafiee, M.; Stahl, S. S. *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 4834. (e) Lipshutz, B. H.; Hageman, M.; Fennewald, J. C.; Linstadt, R. T. H.; Slack, E.; Voigtritter, K. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 11378.

(10) For an example of orthogonal ozone activation of an enol-ether over an aliphatic carbon-substituted olefin, see: Coulthard, G.; Erb, W.; Aggarwal, V. K. *Nature* **2012**, *489*, 278.

(11) Hepburn, J. R. I. *J. Chem. Soc.* **1927**, *0*, 2883.

(12) Keating, G. M. *Am. J. Cardiovasc. Drugs* **2011**, *11*, 227.

(13) (a) Kharasch, M. S.; Sosnovsky, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 756. (b) Walling, C.; Zavitsas, A. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2084. (c) Kochi, J. K.; Mains, H. E. *J. Org. Chem.* **1965**, *30*, 1862. (d) Kochi, J. K.; Bemis, A. *Tetrahedron* **1968**, *24*, 5099. (e) Beckwith, A. L. J.; Zavitsas, A. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 8230.

(14) Kochi, J. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 3271.

(15) See SI for ¹H NMR overlay spectra of "heat-gun" experiment.

(16) Kaneda, K.; Itoh, T.; Kii, N.; Jitsukawa, K.; Teranishi, S. *J. Mol. Catal.* **1982**, *15*, 34.