



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**SÍNTESIS Y EVALUACIÓN ANTICANCERÍGENA DE PIRIDINAS 2,4,6-
TRISUSTITUIDAS DISEÑADAS COMO INHIBIDORES DE LA SERINA-TREONINA
CINASA B (AKT)**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

QFB. JORGE VICTORIA MIGUEL

TUTOR

Dr. Rafael Castillo Bocanegra

Facultad de Química, UNAM

Ciudad de México, enero 2019.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**SÍNTESIS Y EVALUACIÓN ANTICANCERÍGENA DE PIRIDINAS 2,4,6-
TRISUSTITUIDAS DISEÑADAS COMO INHIBIDORES DE LA SERINA-
TREONINA CINASA B (AKT)**

T E S I S
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A
QFB. JORGE VICTORIA MIGUEL



Ciudad de México, 2019

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: M. EN C. JOSÉ MANUEL MÉNDEZ STIVALET	FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM
VOCAL: DRA. LILIÁN YÉPEZ MULIA	IMSS-CENTRO MÉDICO SIGLO XXI
VOCAL: DR. FRANCISCO HERNÁNDEZ LUIS	FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM
VOCAL: DR. LUIS DEMETRIO MIRANDA GUTIÉRREZ	INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM
SECRETARIO: DR. ALFONSO SEBASTIÁN LIRA ROCHA	FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

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

Parte de este trabajo se presentó en las siguientes actividades académicas:

- “Síntesis de piridinas 2,4,6-trisustituidas con sustituyentes heteroarilo en la posición 4, diseñados como anticancerígenos”, presentado en la XIV Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica celebrada los días 22 y 23 de marzo de 2018 en la Ciudad de Mérida, Yucatán.
- “Síntesis y evaluación anticancerígena de piridinas 2,4,6-trisustituidas diseñadas como inhibidores de la serina-treonina cinasa B (AKT)”, presentado en el QUIMIUNAM celebrado el día 7 de agosto de 2018 en la Facultad de Química, UNAM, en la Ciudad de México.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, particularmente a la Facultad de Química por otorgarme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado y por brindarme las herramientas necesarias para mi formación profesional y personal.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría (No. de becario **620797**). Así mismo al Posgrado en Ciencias Químicas por el apoyo otorgado durante mi estancia en el programa.

Al Dr. Rafael Castillo Bocanegra y a la Dra. María Alicia Hernández Campos por permitirme ser parte de su grupo de investigación, así como por sus observaciones que me permitieron desarrollarme profesionalmente.

A los proyectos CONACyT 251807, CONACyT 251726 y DGAPA PAPIIT IN221416 por los financiamientos concedidos para la realización de diversos trabajos de investigación.

Al personal de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI): Nayeli López Balbiaux, Maricela Gutiérrez Franco y Georgina Duarte Lisci por el apoyo proporcionado en la obtención de los espectros de resonancia magnética nuclear, espectroscopía de infrarrojo y espectrometría de masas.

A María Teresa Obdulia Ramírez Apan del Instituto de Química de la UNAM del Laboratorio de Pruebas Biológicas (LSA), por la determinación de citotoxicidad en líneas celulares cancerosas. De igual forma al personal del laboratorio de espectrometría de masas: Javier Pérez y Carmen García por la determinación de los espectros de alta resolución.

A mis amigos y compañeros del laboratorio 122: Elkin Sanabria, Pedro Trejo, Miguel Flores, Diana Prado, José Luis Zavala, Francisco Barrera, Gustavo Rico, Sebastián Huerta y Lucía Cano por compartir todos aquellos momentos buenos y malos que surgen en el camino de la investigación.

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

Dedicada con mucho cariño a...

Mis padres **Eduardo** y **Epifania**, a quienes admiro mucho. Su esfuerzo y perseverancia siempre serán un ejemplo por seguir. Gracias por motivarme a realizar mis sueños.

Mis hermanos **Eduardo** y **Alejandro**, con quienes he compartido tantos momentos extraordinarios durante toda mi vida. En las buenas y en las malas siempre apoyándonos.

A **Diana Prado** por toda su compañía, apoyo y cariño. Por iluminarme en los momentos más oscuros. Sin duda, "ha sido una idea maravillosa..."

RESUMEN

En el presente trabajo se reporta la síntesis, caracterización, evaluación biológica y estudios de acoplamiento molecular de nueve piridinas novedosas 2,4,6-trisustituidas con sustituyentes aminoheterociclo en la posición 4 del *scaffold* (compuestos **JVM1-9**, **Figura A**), diseñados como inhibidores de la serina treonina cinasa B. El ensayo biológico consistió en la determinación del porcentaje de inhibición de cinco líneas celulares cancerosas (**DU-145**, **PC-3**, **MCF-7**, **MDA-MB-231**, **HCT-15**) y una línea celular sana (**COS-7**).

Los compuestos **JVM1-9** presentaron diversos valores de porcentaje de inhibición en las líneas celulares evaluadas. Particularmente los compuestos **JVM1**, **JVM3**, **JVM4**, **JVM5** y **JVM6** exhibieron selectividad frente a las líneas **MDA-MB-231** y **DU-145** con valores moderados de inhibición, sin afectar a la línea celular sana. Estos resultados dan pauta a establecer un punto de partida para diversos procesos de optimización de las estructuras anteriormente mencionadas, con la finalidad de encontrar mejores moléculas con potencial anticancerígeno.

En lo que respecta a las moléculas **JVM2**, **JVM7**, **JVM8** y **JVM9**, se observó un gran potencial inhibitorio en las diversas líneas cancerosas. Desafortunadamente presentaron gran porcentaje de inhibición en la línea sana, lo cual es un indicativo de citotoxicidad.

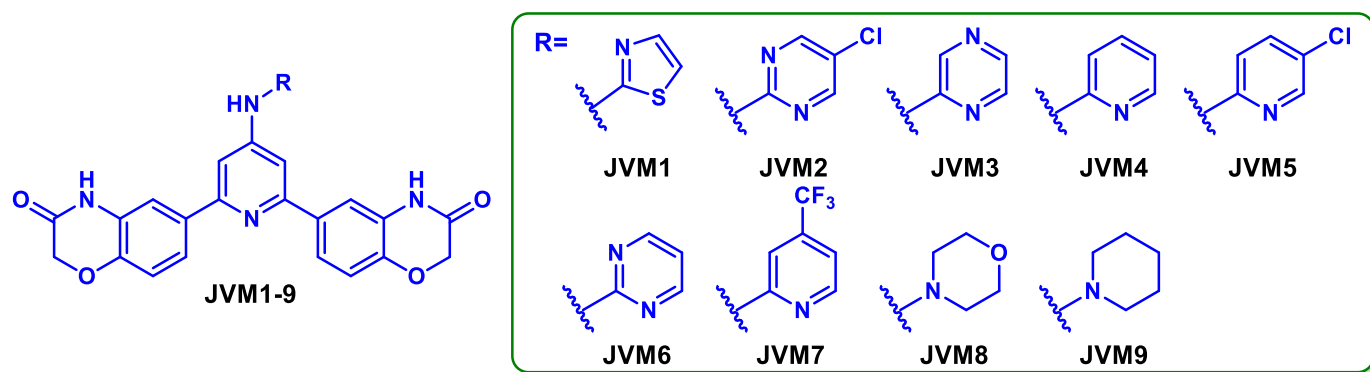


Figura A. Compuestos sintetizados y evaluados en el presente trabajo.

ABREVIATURAS GENERALES Y SÍMBOLOS

%	Porcentaje
[M]⁻	Ion molecular negativo
[M]⁺	Ion molecular positivo
°C	Grado Celsius
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µm	Micrómetros
µM	Micromolar
µmol	Micromol
AcOEt	Acetato de etilo
AcOH	Ácido acético
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosín difosfato
AGC	Grupo AGC
AKT	Serina treonina cinasa B
APCI	<i>Atmospheric pressure chemical ionization</i> / Ionización química a presión atmosférica
Ar	Aromático
ARN	Ácido ribonucleico
Atm	Atmósfera
ATP	Adenosín trifosfato
B₂Pin₂	Diborobis(pinacolato)
BrettPhos	2-(Diciclohexilfosfino)-3,6-dimetoxi-2',4',6'-triiisopropil-1,1'-bifenilo
BXN	Benzoxazinona
c	Señal cuádruple
CAMK	Proteína cinasa dependiente de Ca ²⁺ /calmodulina
CAT	Dominio central catalítico de serina/treonina

cat.	Catalítico
CCF	Cromatografía en capa fina
CDCl₃	Cloroformo deuterado
CH₂Cl₂	Diclorometano
CI₅₀	Concentración Inhibitoria 50
CK1	Caseína cinasas
CMGC	Grupo CMGC
Cs₂CO₃	Carbonato de cesio
CX31	[1,3-Bis(2,6-diisopropilfenil)imidazol-2-ilideno]cloro[3-fenilalilo]paladio(II)
d	Señal doble
D₂O	Óxido de deuterio
dd	Señal doble de dobles
DFG	Motivo Asp-Phe-Gly
DiFAC	Diseño de fármacos asistido por computadora
DMF	Dimetilformamida
DMSO-d₆	Dimetilsulfóxido hexadeuterado
dt	Doble de triples
EM	Espectrometría de masas
EMAR	Espectrometría de masas de alta resolución
eq	Equivalentes
Et	Etilo
EtOH	Etanol
EXT	Dominio regulatorio C-terminal
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> / Administración de alimentos y medicamentos
FRET	<i>Fluorescence resonance energy transfer</i> / Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia
FT-IR	Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier
g	Gramo

GSK	<i>GlaxoSmithKline</i>
GSK3	Cinasa 3 de la síntesis de glucógeno
h	Horas
HM	Motivo hidrofóbico
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond coherence</i> / Correlación heteronuclear a múltiples enlaces de distancia
HSQC	<i>Heteronuclear simple quantum coherence</i> / Correlación heteronuclear a un enlace de distancia
Hz	<i>Hertz</i> / Hercio
IE⁺	Impacto electrónico en modo positivo
J	Constante de acoplamiento
K₂CO₃	Carbonato de potasio
kDa	Kilodalton
Kg	Kilogramo
KHF₂	Hidrofluoruro de potasio
LHRH	Hormona liberadora de la hormona luteinizante
m	Señal múltiple
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
Me	Metilo
MeCN	Acetonitrilo
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
MHz	Megahertz / Megahercio
mL	Mililitro
mm	Milímetros
mmol	Milimol
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i> / Diana de rapamicina en mamífero
MTX	Metotrexato

MW	Microondas
Na₂SO₄	Sulfato de sodio
ND	No determinado
NFD	Motivo de región de unión de adenina
Ni-Raney	Níquel Raney
nm	Nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
Pd(dba)₂	(Dibencilidenacetona)paladio(0)
Pd(dppf)Cl₂ • CH₂Cl₂	[1,1'Bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio(II) acomplejado con diclorometano
Pd(PPh₃)₄	Tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0)
pf	Punto de fusión
pH	Logaritmo negativo de la concentración de iones hidronio
Ph	Fenilo
PH	Dominio amino-terminal de homología <i>Pleckstrina</i>
PIP₂	Fosfatidilinositol(4,5)-difosfato
PIP₃	Fosfatidilinositol(3-5)-trifosfato
pKa	Logaritmo negativo de la constante de acidez
PKA	Proteína cinasa 1 dependiente de cAMP
PKB	Proteína cinasa dependiente de cGMP
PKC	Proteína cinasa C
ppm	Partes por millon
QSAR	<i>Quantitative structure activity relationship</i> / Relación cuantitativa estructura actividad
Rf	Factor de retención
RGC	Receptor guanilato ciclasa
RMN ¹³C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
RMN ¹H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto

s	Señal simple
sa	Señal ancha
SAR	<i>Structure activity relationship</i> / Relación estructura actividad
S_N2	Sustitución nucleofílica bimolecular
SPhos Pd G2	Cloro(2-diciclohexilfosfino-2',6'-dimetoxi-1,1'-bifenilo)[2-(2'-amino-1,1'-bifenilo)]paladio(II) de segunda generación
STE	Grupo STE
t	Señal triple
T	Temperatura
THF	Tetrahidrofurano
TK	Tirosina cinasas
TKL	Tirosina cinasas- <i>like</i>
TMS	Tetrametilsilano
UV	Luz ultravioleta
XantPhos	4,5-Bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilxanteno
XPhos Pd G3	Metanosulfonato de (2-diciclohexilfosfino-2',4',6'-triisopropil-1,1'-bifenilo)[2-(2'-amino-1,1'-bifenilo)]paladio(II) de tercera generación
δ	Desplazamiento químico
λ	Longitud de onda

ABREVIATURAS DE AMINOÁCIDOS

Código 3 letras	Aminoácido
Ala	Alanina
Cys	Cisteína
Asp	Ácido aspártico
Glu	Ácido glutámico
Phe	Fenilalanina
Gly	Glicina
His	Histidina
Ile	Isoleucina
Lys	Lisina
Leu	Leucina
Met	Metionina
Asn	Asparagina
Pro	Prolina
Gln	Glutamina
Arg	Arginina
Ser	Serina
Thr	Treonina
Val	Valina
Trp	Triptófano
Tyr	Tirosina

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	ANTECEDENTES	2
	2.1. Aspectos fundamentales del cáncer.....	2
	2.2. Distribución y tipos de cáncer.....	3
	2.3. Diagnóstico y tratamiento	6
	2.4. Proteínas cinasas.....	11
	2.5. AKT como diana terapéutica	19
	2.6. Inhibidores de AKT	22
	2.7. Piridinas 2,4,6-trisustituidas como inhibidores potenciales de AKT.....	24
	2.8. Reacciones de acoplamiento cruzado catalizadas por Pd	27
3.	JUSTIFICACIÓN	31
4.	HIPÓTESIS	32
5.	OBJETIVOS.....	33
	5.1. Objetivo general	33
	5.2. Objetivos particulares	33
6.	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	34
	6.1. Parte química.....	34
	6.2. Parte biológica.....	38
	6.3. Parte computacional.....	40
	6.2.1. Acoplamiento molecular efectuado con AutoDock	40
	6.2.2. Acoplamiento molecular efectuado con Maestro	40

7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
7.1.	PARTE QUÍMICA	42
7.1.1.	Síntesis de los intermediarios BXN2 a BXN5	42
7.1.2.	Síntesis de los intermediarios INT1-9.....	46
7.1.3.	Síntesis de los compuestos finales JVM1-9	53
7.2.	PARTE BIOLÓGICA	72
7.2.1.	Ensayos en líneas celulares.....	72
7.3.	PARTE COMPUTACIONAL	76
7.3.1.	Acoplamiento molecular efectuado con AutoDock	76
7.3.2.	Acoplamiento molecular efectuado con Maestro	82
8.	CONCLUSIONES	89
9.	PERSPECTIVAS.....	90
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
11.	ANEXO I - PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES: PARTE QUÍMICA	97
11.2.	Técnicas para la síntesis de los compuestos	100
11.2.1.	(4-Bromo-2-nitrofenoxi)acetato de etilo (BXN2)	100
11.2.2.	6-Bromo-2 <i>H</i> -1,4-benzo[<i>b</i>][1,4]oxazin-3(4 <i>H</i>)-ona (BXN3)	101
11.2.3.	6-(4,4,5,5-Tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-2 <i>H</i> -benzo[<i>b</i>][1,4]oxazin-3(4 <i>H</i>)-ona (BXN4) 102	
11.2.4.	Trifluoro(3-oxo-3,4-dihidro-2 <i>H</i> -benzo[<i>b</i>][1,4]oxazin-6-il)borato de potasio (BXN5) 103	
11.2.5.	4-Amino- <i>N</i> -(heteroarilo)-2,6-dicloropiridinas (INT1-6, INT8-9)	104
11.2.6.	4-Amino- <i>N</i> -(1,3-tiazol-2-il)-2,6-dicloropiridina (INT1).....	105

11.2.7. 2-Amino- <i>N</i> -(2,6-dicloropiridin-4-il)-5-cloropirimidina (INT2)	106
11.2.8. 2-Amino- <i>N</i> -(2,6-dicloropiridin-4-il)pirazina (INT3)	107
11.2.9. 4-Amino- <i>N</i> -(2-piridinil)-2,6-dicloropiridina (INT4)	108
11.2.10. 2-Amino- <i>N</i> -(2,6-dicloropiridin-4-il)-5-cloropiridina (INT5)	109
11.2.11. 2-Amino- <i>N</i> -(2,6-dicloropiridin-4-il)piridimina (INT6)	110
11.2.12. 4-Amino- <i>N</i> -(morfolin-4-il)-2,6-dicloropiridina (INT8)	111
11.2.13. 4-Amino- <i>N</i> -(piperidin-1-il)-2,6-dicloropiridina (INT9)	112
11.2.14. 4-Amino- <i>N</i> -(heteroaril)-2,6-dicloropiridina (INT7)	113
11.2.15. 2-Amino- <i>N</i> -(2,6-dicloropiridin-4-il)-4-(trifluorometil)piridina (INT7)	114
11.2.16. Piridinas 2,4,6-trisustituidas (JVM1-9)	115
11.2.17. 6,6'-[4-Amino- <i>N</i> -(1,3-tiazol-2-il)piridin-2,6-diil]bis(2 <i>H</i> -benzo[<i>b</i>][1,4]oxazin-3(4 <i>H</i>)-ona) (JVM1)	116
11.2.18. 6,6'-[4-Amino- <i>N</i> -(5-cloropirimidin-2-il)piridin-2,6-diil]bis(2 <i>H</i> -benzo[<i>b</i>][1,4]oxazin-3(4 <i>H</i>)-ona) (JVM2)	117
11.2.19. 6,6'-[4-Amino- <i>N</i> -(pirazin-2-il)piridin-2,6-diil]bis(2 <i>H</i> -benzo[<i>b</i>][1,4]oxazin-3(4 <i>H</i>)-ona) (JVM3)	118
11.2.20. 6,6'-[4-Amino- <i>N</i> -(2-piridinil)-2,6-diil]bis(2 <i>H</i> -benzo[<i>b</i>][1,4]oxazin-3(4 <i>H</i>)-ona) (JVM4)	119
11.2.21. 6,6'-[4-Amino- <i>N</i> -(5-cloropiridin-2-il)piridin-2,6-diil]bis(2 <i>H</i> -benzo[<i>b</i>][1,4]oxazin-3(4 <i>H</i>)-ona) (JVM5)	120
11.2.22. 6,6'-[4-Amino- <i>N</i> -(pirimidin-2-il)piridin-2,6-diil]bis(2 <i>H</i> -benzo[<i>b</i>][1,4]oxazin-3(4 <i>H</i>)-ona) (JVM6)	121
11.2.23. 6,6'-[4-Amino- <i>N</i> -(4-trifluorometilpiridin-2-il)piridin-2,6-diil]bis(2 <i>H</i> -benzo[<i>b</i>][1,4]oxazin-3(4 <i>H</i>)-ona) (JVM7)	122
11.2.24. 6,6'-[4-Amino- <i>N</i> -(morfolin-4-il)piridin-2,6-diil]bis(2 <i>H</i> -benzo[<i>b</i>][1,4]oxazin-3(4 <i>H</i>)-ona) (JVM8)	123
11.2.25. 6,6'-[4-Amino- <i>N</i> -(piperidin-1-il)piridin-2,6-diil]bis(2 <i>H</i> -benzo[<i>b</i>][1,4]oxazin-3(4 <i>H</i>)-ona) (JVM9)	124
12. ANEXO II - PARTE COMPUTACIONAL	125

13.1 Diagramas 2D de interacciones en acoplamiento molecular efectuado con AutoDock.....	126
13.2 Diagramas 2D de interacciones en acoplamiento molecular efectuado con Glide 141	
13. ANEXO III – ESPECTROS	156

1. INTRODUCCIÓN

El conjunto de enfermedades con características propias, relacionadas con el término cáncer, son consideradas actualmente una problemática a nivel mundial. Entre los principales tipos de cáncer que afectan actualmente a la población se encuentran los de mama, próstata y pulmón. Aunque se han desarrollado diversas opciones terapéuticas para tales problemáticas, no todas han resultado viables en el sentido de que resultan altamente invasivas o presentan efectos adversos severos.

Gracias a los recientes avances en la biología molecular y en múltiples técnicas computacionales, ha sido posible el desarrollo de nuevas terapias dirigidas a determinadas proteínas relacionadas con aspectos fisiológicos desregulados en las células cancerosas, obteniendo así a una nueva generación de compuestos que presentan mayor selectividad y por lo tanto menos efectos adversos.

Nuestro grupo de investigación recientemente encontró, mediante técnicas computacionales, una estructura del tipo piridina 2,4,6-trisustituida con gran potencial de inhibición de la serina treonina cinasa B (AKT), la cual se ha visualizado en años recientes como un blanco terapéutico viable para el tratamiento de diversos tipos de cáncer. El patrón de sustitución del *scaffold* piridina 2,4,6-trisustituida se ha modificado de múltiples maneras con la finalidad de explorar los requerimientos estructurales particulares para una elevada actividad biológica; sin embargo, el espacio químico explorado aún es limitado.

Por tal razón, en el presente trabajo se propuso la síntesis de nueve piridinas 2,4,6-trisustituidas, las cuales presentan de manera novedosa para nuestro grupo, sustituyentes aminoheteroarilo en la posición 4. Posteriormente, con los compuestos sintetizados y caracterizados, se efectuaron ensayos biológicos de inhibición del crecimiento de diversas líneas celulares con la finalidad de evaluar el potencial anticancerígeno de los compuestos. Complementariamente se realizaron estudios de acoplamiento molecular de las moléculas preparadas con las tres isoformas de AKT.

2. ANTECEDENTES

2.1. Aspectos fundamentales del cáncer

El término cáncer está relacionado a un conjunto de enfermedades con características propias, las cuales tienen en común un crecimiento celular descontrolado, el cual tiene como consecuencia la generación de tumores. En algunos casos, las células cancerosas adquieren la capacidad de diseminarse a otros tejidos u órganos ocasionando tumores secundarios en otras partes del cuerpo. La propagación de células cancerosas se denomina metástasis.^{1,2}

En un organismo sano, las células envejecen o se dañan por diversos factores; sin embargo, estas células son reparadas o eliminadas mediante múltiples procesos fisiológicos y eventualmente son reemplazadas por células nuevas. En el caso de un organismo con células cancerosas, los procesos fisiológicos de reparación o muerte celular se encuentran alterados, lo que ocasiona un crecimiento anormal y descontrolado de estas células.²

En células cancerosas se han encontrado diversas alteraciones, por ejemplo, evasión de la apoptosis, insensibilidad a factores reguladores de crecimiento, angiogénesis potenciada y pérdida de la diferenciación que ocasionan la evasión del sistema inmune. Las células cancerosas proliferan rápidamente debido a que utilizan nutrientes como glucosa y glutamina para producir ATP, así como metabolitos particulares que favorecen su crecimiento.^{3,4}

La evolución de la biología molecular en los últimos 30 años ha permitido establecer la teoría de que las lesiones genéticas, a través de activación de oncogenes, pérdida de genes supresores de tumores o daño a genes reparadores de ADN, conducen a la progresión del cáncer.³ Las lesiones genéticas pueden tener orígenes muy diversos; como factores ambientales (ocupacionales, dieta, compuestos carcinógenos, contaminantes, radiaciones, enfermedades particulares causadas por virus) o predisposición genética (que también puede interactuar con factores ambientales).⁴

El proceso mediante el cual las células sanas se transforman en células cancerígenas se denomina carcinogénesis. El proceso de carcinogénesis puede ser dividido en 4 etapas principales: iniciación, promoción, conversión y progresión.⁵

- La iniciación hace referencia a alteraciones genéticas irreversibles que son transmitidas de la célula madre a las células progenie. Actualmente se incluyen los cambios epigenéticos en esta categoría.
- La promoción comprende la expansión clonal de células iniciadas.
- La conversión hace referencia al cambio de fenotipo de benigno a maligno en una célula preneoplásica. Este proceso requiere cambios genéticos adicionales.
- La progresión denota la tendencia de las células malignas a adquirir nuevos rasgos más agresivos conforme pasa el tiempo. Es importante aclarar que, en este punto, las células malignas pueden adquirir nuevos cambios genéticos y epigenéticos.

Como se mencionó anteriormente, el proceso mediante el cual células tumorales se desplazan y establecen en sitios distintos a donde se originaron, se denomina metástasis. Dicho proceso ocasiona la aparición de un tumor secundario. Funcionalmente, las células tumorales comienzan el proceso de metástasis en los tejidos adyacentes al tumor primario. Eventualmente las células cancerosas pueden entrar en circulación sanguínea y diseminarse a otros sitios distantes.⁶

El proceso metastásico puede requerir décadas hasta completarse, siendo la inestabilidad genómica la principal causa aparente de dicho proceso.⁷ Cuando las terminaciones nerviosas son afectadas por células tumorales, la incomodidad general y el dolor se vuelven muy severos. Además, es importante mencionar que muchos de los pacientes que fallecen por algún tipo de cáncer, es debido al proceso de metástasis en los órganos vitales y no por causa del tumor primario.⁸

2.2. Distribución y tipos de cáncer

Es importante mencionar que el cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo, ocasionando aproximadamente una de cada seis defunciones. En estadísticas del año 2012 se ha registrado que la incidencia de dicha enfermedad a nivel mundial ha aumentado, registrándose alrededor de 14.1 millones de nuevos casos y 8.2 millones de defunciones **[Figura 1]**.^{2,9} Para el año 2030 se prevé que la cifra de nuevos casos ascenderá a 21.7 millones y la cifra de defunciones a 13 millones.¹⁰

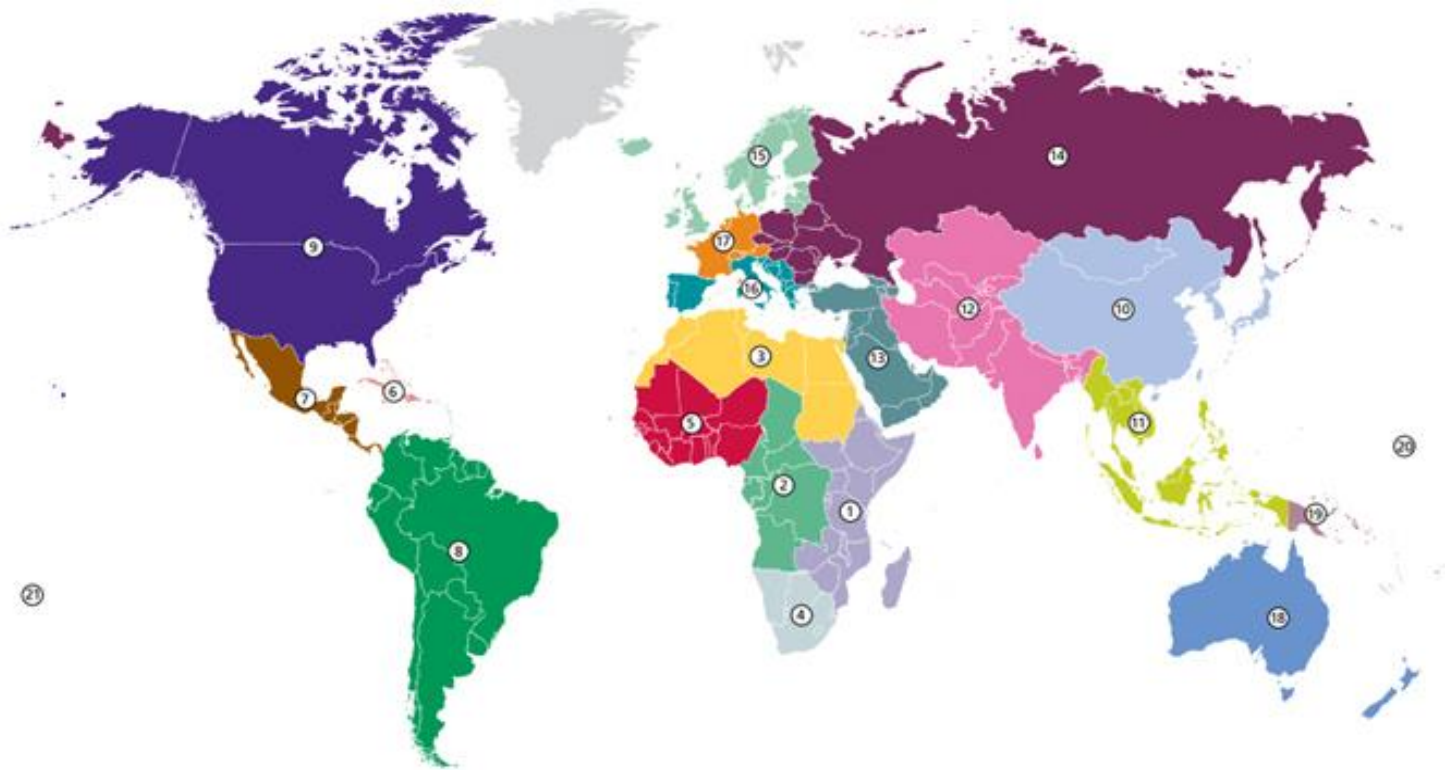
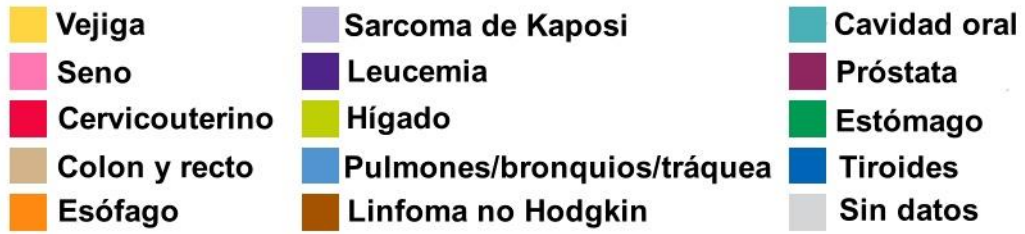
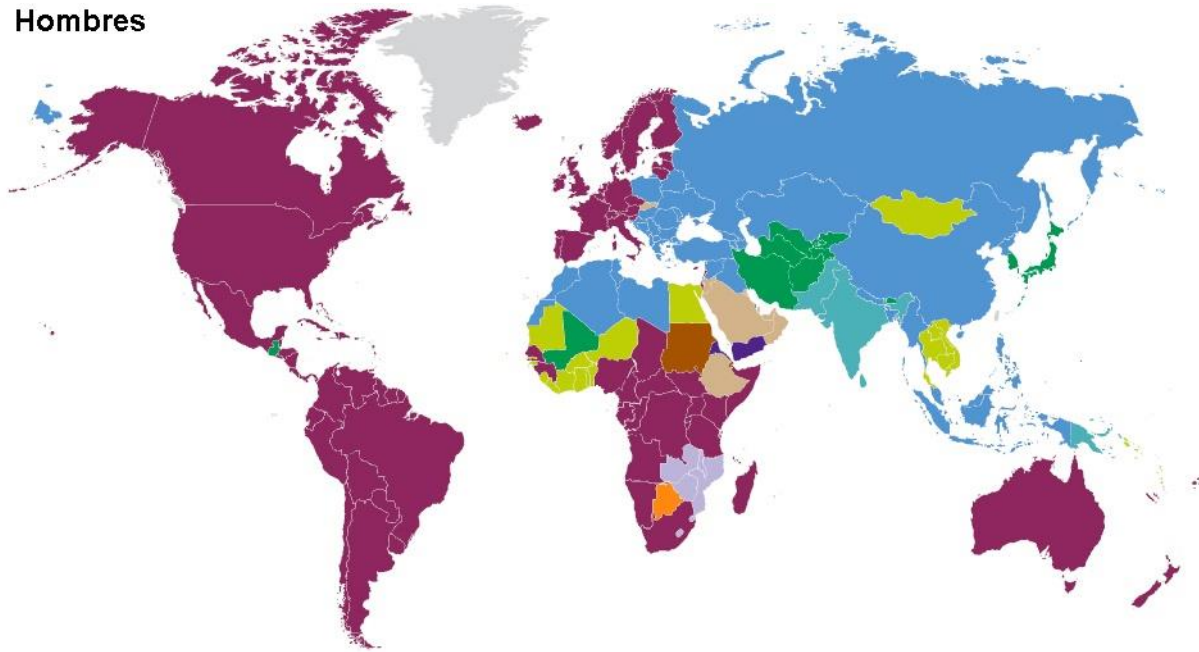


Figura 1. Incidencia mundial del cáncer. Ubicación y casos reportados en 2012: 1. África oriental (287300), 2. África central (74100), 3. África septentrional (220600), 4. África meridional (82900), 5. África occidental (182100), 6. Caribe (90800), 7. América Central (197600), 8. América del Sur (807700), 9. América del Norte (1786400), 10. Asia del Este (4145000), 11. Asia sudoriental (786400), 12. Asia meridional y central (1514000), 13. Asia occidental (317600), 14. Europa central y oriental (1036900), 15. Europa septentrional (525900), 16. Europa meridional (769200), 17. Europa occidental (1110300), 18. Australia / Nueva Zelandia (143400), 19. Melanesia (10000), 20. Micronesia (800), 21. Polinesia (1200).⁹

En la actualidad se conocen más de 100 diferentes tipos de cáncer. Por lo general, éstos reciben el nombre de los órganos o tejidos en donde se forman. También pueden describirse según el tipo de célula que los forma. De la gran diversidad de tipos de cáncer, los más comunes en la actualidad son: cáncer de seno, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de colón, melanoma de piel, cáncer de vejiga, linfoma de no Hodgkin, cáncer de riñón, cáncer de endometrio, leucemia, cáncer de páncreas, cáncer de tiroides y cáncer de hígado.²

Hombres



Mujeres

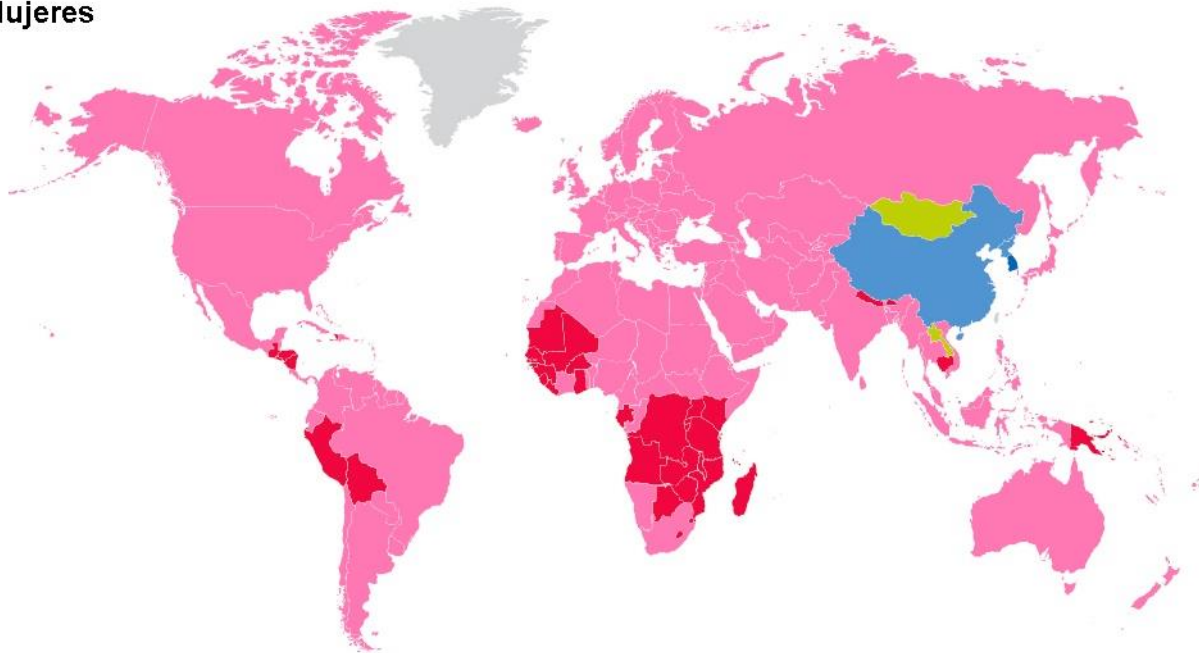


Figura 2. Distribución mundial de algunos tipos de cáncer comunes en hombres y mujeres. Datos del año 2012.⁹

Como se puede apreciar en la **Figura 2**, la prevalencia de los tipos de cáncer en hombres y mujeres varía en diversas regiones a nivel mundial. En el caso de los hombres la mayor incidencia corresponde a cáncer de próstata, así como cáncer de pulmones, bronquios o tráquea, mientras que en las mujeres la mayor incidencia corresponde al cáncer de mama y cáncer cervicouterino.⁹

Particularmente en México, el cáncer ocupa el tercer puesto de causa de muerte. Los tumores malignos más frecuentes en la población mayor a 20 años son: cáncer de mama, próstata, cervicouterino, colón y pulmón.¹¹ Además, con estadísticas del año 2014, se ha evidenciado que el cáncer de órganos hematopoyéticos es el de mayor presencia en hombres y mujeres con menos de 20 años.¹⁰

Los costos del cáncer pueden ser divididos en directos e indirectos, donde los primeros incluyen gastos para el tratamiento y rehabilitación, mientras que los segundos incluyen la pérdida de la producción económica relacionada al trabajo no realizado por los individuos enfermos (costos de morbilidad) y muerte prematura (costos de mortalidad). Los costos exactos del cáncer a nivel mundial son desconocidos; sin embargo, de acuerdo con algunos datos estadísticos, el costo estimado relacionado a la pérdida de la productividad por cáncer en Europa en el año de 2008 fue de 75 millones de euros. Otro ejemplo corresponde a Estados Unidos, donde el costo estimado del cáncer en el año de 2011 fue de 88.7 billones de dólares.⁹

2.3. Diagnóstico y tratamiento

Por desgracia, frecuentemente el cáncer es detectado únicamente cuando un tumor primario de gran tamaño es localizado debido a una molestia o determinada sintomatología en el individuo enfermo. En casos más lamentables se detectan los tumores secundarios, lo que representa un estadio muy avanzado de la enfermedad en la mayoría de las ocasiones. En tales situaciones los tratamientos suelen tener tasas de éxito muy bajas.⁸

El diagnóstico del cáncer ha tenido un enfoque particular en cáncer de: mama, cervical, colorrectal, pulmón y próstata debido a su alta incidencia en la población; sin embargo, existen diversos procedimientos para otros tipos de cáncer menos frecuentes. El diagnóstico puede realizarse mediante monitorización física con la detección de alteraciones fisiológicas perceptibles, análisis histológicos y citológicos que permiten evaluar cambios en tejidos o

células, resonancia magnética nuclear que detecta cuerpos anormales en determinadas regiones, ensayos bioquímicos que detectan incrementos de marcadores específicos o bien ensayos inmunológicos que detectan antígenos particulares en el paciente.¹²⁻¹⁴

En lo que respecta al tratamiento, la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia son los principales métodos de elección, destacando que en la mayoría de las ocasiones se utilizan en conjunto dichos métodos con la finalidad de tener una mayor tasa de éxito. La cirugía es más efectiva en el tratamiento de tumores primarios localizados y debido a esta razón, en una cirugía bien efectuada se pueden eliminar hasta el 100% de las células cancerosas. En contraste con la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia sólo son capaces de matar una fracción de las células cancerosas ya sea de tumores primarios o secundarios, aunque en muchas ocasiones se usan ambos como procesos complementarios.¹⁵

En los otros métodos de tratamiento se pueden mencionar la terapia fotodinámica, enfoques de vacunas y anticuerpos o bien terapia génica. Aunque estos métodos se encuentran, en su mayoría en fases experimentales y son utilizables bajo determinadas circunstancias o bien únicamente en determinados pacientes.⁸

De los principales métodos de tratamiento, la quimioterapia ha recibido una mayor atención y en los últimos años ha logrado un avance significativo en la terapéutica. Históricamente, las mostazas nitrogenadas fueron los primeros agentes quimioterapéuticos utilizados, encontrando su utilidad contra leucemias mediante serendipia.^{4,8} El segundo compuesto anticancerígeno significativo fue el metotrexato (MTX), el cual remonta sus orígenes a la investigación nutricional. Alrededor de los años 50, dicho compuesto demostró ser la primera cura a un tumor sólido, aunque se requirieron algunos años para comprender su mecanismo de acción.^{16,17} Algunos de los fármacos citotóxicos emblemáticos descubiertos en la segunda mitad del siglo pasado son mostrados en la **Figura 3** y la **Tabla 1**.⁴

El enfoque en torno a los fármacos citotóxicos cambió, de farmacológico a bioquímico, con el descubrimiento del 5-fluorouracilo, ya que se buscó alterar la síntesis de bases nitrogenadas y por lo tanto alterar la síntesis de ARN o ADN. Por otra parte, con el paso de los años, se lograron encontrar fármacos citotóxicos mediante el estudio y extracción de compuestos de origen natural, como es el caso de la doxorubicina o el paclitaxel [**Figura 3**].

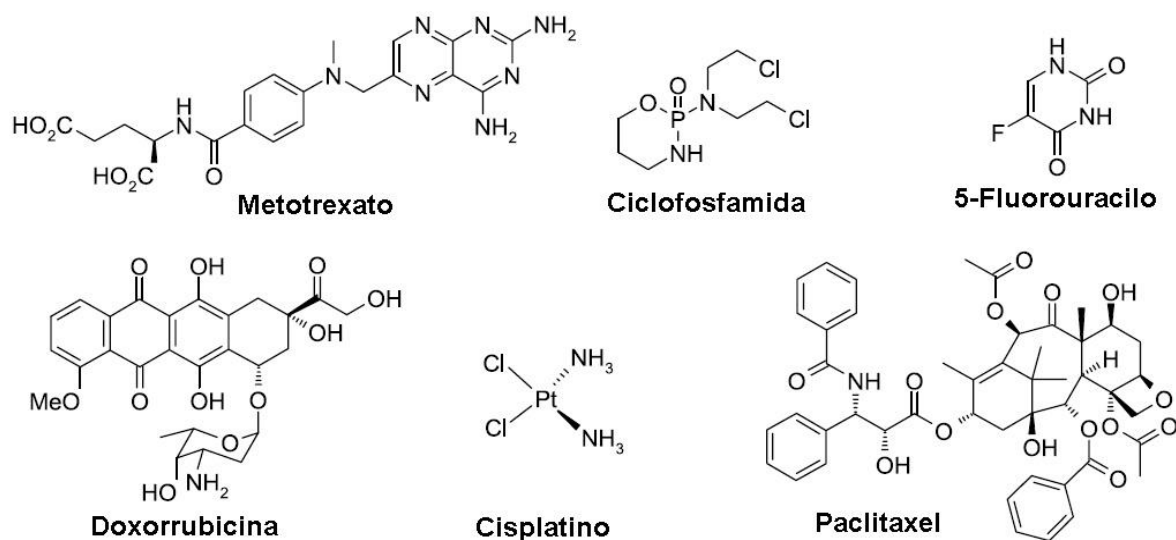


Figura 3. Estructuras de los fármacos citotóxicos emblemáticos.⁴

Tabla 1. Fármacos citotóxicos emblemáticos.⁴

Fármaco	Aprobación por la FDA	Utilidad clínica	Mecanismo de acción principal
Metotrexato	1953	Leucemia linfocítica aguda	Inhibidor de la síntesis de un precursor de ADN
Ciclofosfamida	1959	Linfoma no Hodgkiniano	Agente alquilante del ADN
5-Fluorouracilo	1962	Cáncer colorrectal y gástrico	Inhibidor de la síntesis de un precursor de ADN
Doxorubicina	1974	Osteosarcoma, enfermedad de Hodgkin, leucemia mieloide crónica, sarcoma de tejido blando	Inhibidor de la replicación, transcripción y reparación de ADN
Cisplatino	1978	Cáncer de ovario, cuello/cabeza, pulmón y testicular	Agente alquilante del ADN
Paclitaxel	1992	Cáncer de ovario, mama y de pulmón de células pequeñas	Inhibidor de ensamblaje de microtúbulos

Los efectos de los fármacos citotóxicos en células normales son responsables de diversos efectos adversos que pueden comprometer de manera seria a los órganos del cuerpo. Por tal razón, la búsqueda de agentes citotóxicos selectivos y con mayor eficacia continúa siendo de gran importancia.

Simultáneamente, con el reconocimiento de que el cáncer de mama y próstata se encuentran relacionados con la regulación hormonal, se encontró la oportunidad de realizar una terapia más dirigida contra esos tipos de cáncer mediante el uso de fármacos antihormonales.¹⁸ En la **Figura 4** y **Tabla 2** se enlistan algunos fármacos representativos de dicha terapéutica.

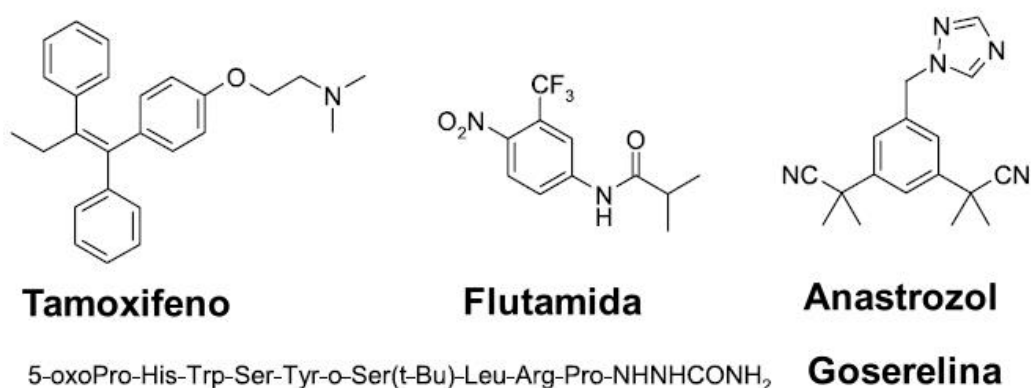


Figura 4. Estructuras de los fármacos anti-hormonales emblemáticos.⁴

Tabla 2. Fármacos antihormonales emblemáticos.^{4,18}

Fármaco	Aprobación por la FDA	Utilidad clínica	Mecanismo de acción principal
Tamoxifeno	1977	Cáncer de mama	Antagonista de estrógeno
Flutamida	1989	Cáncer de próstata	Antagonista de andrógeno
Anastrozol	1995	Cáncer de mama	Inhibidor de aromatasa
Goserelina	1995	Cáncer de mama y próstata	Agonista de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH)

Durante los años 80 existió un incremento en el conocimiento de las rutas regulatorias en células normales gracias a la biología molecular. Los aspectos de vascularización, crecimiento y proliferación se estudiaron a fondo y se encontró que tales procesos se encontraban potenciados en células cancerosas.¹⁹ Para el año 2000 ya se contaba con algunos estudios que sugerían algunas características fundamentales responsables de transformar una célula humana sana a una cancerosa. Como se observa en la **Figura 5**, las células cancerosas adquieren una serie de características denominadas “los sellos del cáncer”, las cuales colectivamente promueven el crecimiento celular.²⁰

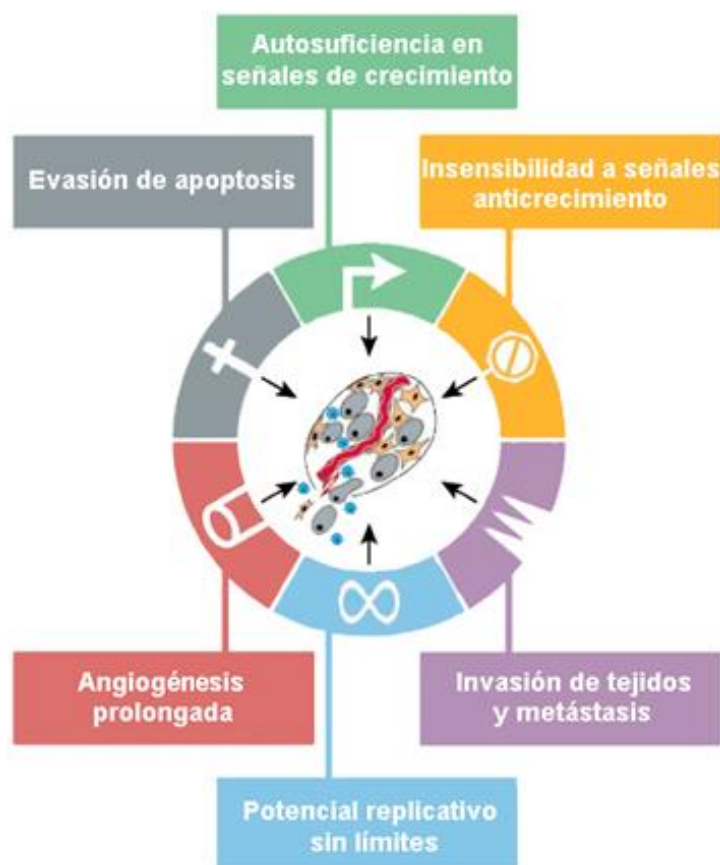


Figura 5. Capacidades adquiridas en células cancerosas.²⁰

Estos hallazgos proporcionaron algunas bases para la búsqueda de inhibidores de blancos macromoleculares específicos en células cancerosas. Dicho enfoque tuvo como finalidad el descubrimiento de nuevas moléculas con un mayor índice de selectividad respecto a los fármacos citotóxicos utilizados hasta el momento. Por fortuna, los avances en el entendimiento de la biología de los tumores coincidieron con el desarrollo de nuevas metodologías sintéticas orgánicas, así como con el desarrollo de nuevas metodologías para

los ensayos biológicos que permitieron la obtención y evaluación de novedosas moléculas contra nuevos blancos potencialmente terapéuticos.²¹ Dicho cambio de enfoque en la búsqueda de nuevas moléculas es denominado en la literatura como “terapia dirigida”.²²

Dentro de las cascadas de señalización y control de los procesos celulares, frecuentemente se ha encontrado que diversas proteínas cinasas se encuentran alteradas o desreguladas, lo cual en últimos años ha sido objeto de estudio por gran parte de las industrias y centros de investigación a nivel mundial.²³ A continuación se describen algunas características de las proteínas cinasas y eventualmente se mencionan peculiaridades que han despertado el interés de los investigadores y han dado pauta a la consideración de dichas proteínas como factibles blancos terapéuticos en diversos tipos de cáncer.

2.4. Proteínas cinasas

La fosforilación de proteínas ha sido descrita como una forma de regulación en las funciones celulares, así como de transmisión de información entre estas células. Las proteínas cinasas fungen un papel fundamental en dicho proceso de activación o desactivación mediante la fosforilación. De manera simplificada se puede observar en la **Figura 6** la función catalítica de las proteínas cinasas, donde se lleva a cabo la transferencia del grupo fosfato del ATP a un sustrato que, siendo un péptido o una proteína, da lugar a dicha entidad fosforilada y ADP como productos.²³

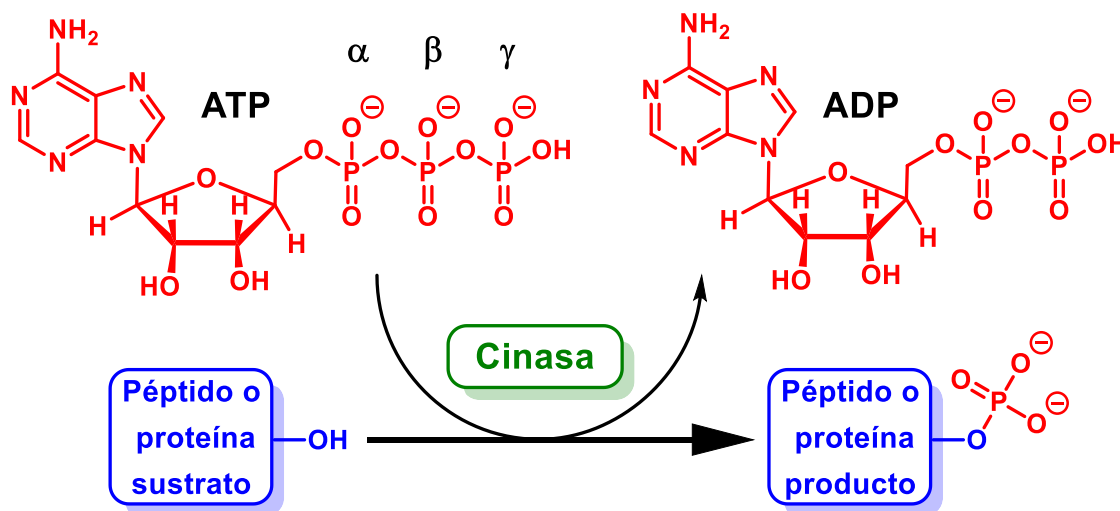


Figura 6. Reacción de fosfotransferencia por una proteína cinasa. La figura ejemplifica la reacción de fosforilación de un determinado residuo de un sustrato. El residuo por fosforilar puede ser tirosina, serina o treonina.²³

La importancia de las proteínas cinasas en organismos eucariontes es reflejada por la abundancia de los genes que codifican para tales proteínas. Estos genes representan el 1.7% del genoma humano (codificando para 518 proteínas cinasas), 4% del genoma de la planta *Arabidopsis thaliana* (codificando para 369 proteínas cinasas), 2% del genoma de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (codificando para 112 proteínas cinasas), 1.6% del genoma del parásito *Plasmodium falciparum* (codificando para 65 proteínas cinasas) y 2% del genoma de *Phytophthora infestans* (codificando para 354 proteínas cinasas).²⁴

Como se mencionó anteriormente, en el humano se han identificado 518 proteínas cinasas gracias a un estudio realizado por el grupo de Manning en el año 2002.²⁵ De las 518 cinasas, 478 se pueden clasificar en 9 grupos principales denominados como: TK (Tirosina cinasas), TKL (Tirosina cinasas-*like*), STE (grupo STE), CK1 (Caseína cinasas), AGC (grupo AGC), CAMK (proteínas cinasa dependiente de Ca²⁺/calmodulina), CMGC (grupo CMGC), RGC (Receptor guanilato ciclasa) y otras. Dentro de las 9 divisiones existen subdivisiones particulares en algunos casos. En lo que respecta a las 40 cinasas restantes se puede mencionar que son significativamente divergentes en secuencia y forman un grupo atípico de cinasas.²³

Las alteraciones en la actividad de las proteínas cinasas han sido relacionadas con una gran variedad de enfermedades humanas. Por lo tanto, dichas cinasas han sido objeto de estudio, alcanzando valores de hasta 30% de los programas de desarrollo de nuevos fármacos en los últimos 15 años.²⁶ Hasta el año 2018 se tiene la cifra de 40 inhibidores de proteínas cinasas aprobados por la *FDA*, de los cuales 36 moléculas son utilizadas para el tratamiento de al menos, algún tipo de cáncer. Estos compuestos se encuentran ordenados por año de aprobación en la **Tabla 3**, además se mencionan las cinasas blanco, las enfermedades para las cuales son de utilidad y la compañía responsable del fármaco.^{27,28}

Los inhibidores de cinasas de la **Tabla 3** se describen como de gran utilidad en la terapéutica, aunque algunos presentan diversos efectos adversos debido a problemas de selectividad frente a las múltiples cinasas.²⁷⁻²⁹ Además de los fármacos ya aprobados, se han reportado una gran cantidad de compuestos inhibidores de cinasas, los cuales se encuentran en fases clínicas, algunos en fase III.²⁹ Estos resultados han dado pauta a los grupos de investigación a continuar con la búsqueda de nuevas moléculas con mejores perfiles farmacológicos.

Tabla 3. Inhibidores de proteínas cinasas aprobados por la FDA hasta el año 2018.^{27,28}

Fármaco	Cinasas blanco	Enfermedad (es)	Año de aprobación	Compañía
Sirolimus	mTOR	Linfangioliomiomatosis	1999	Wyeth
Imatinib	Bcr–Abl, PDGFR, Kit, Ret, Src	Leucemia linfóide aguda, tumores del estroma gastrointestinal	2001	Novartis
Gefitinib	EGFR, Gak	Cáncer de pulmón	2003 - 2005, 2015	Astra Zeneca
Erlotinib	EGFR, SIk, ILK	Cáncer de pulmón, cáncer de páncreas	2004	Genentech
Sorafenib	VEGFR, EGFR, PDGFR, Raf, Kit, Ret	Cáncer de tiroides, carcinoma hepatocelular.	2005	Onyx
Dasatinib	Bcr–Abl, Src	Leucemia mieloide crónica	2006	Bristol-Myers Squibb
Sunitinib	VEGFR, PDGFR, Kit, Flt, Ret	Carcinoma renal, tumor pancreático neuroendócrino	2006	Pfizer
Lapatinib	EGFR, ErbB2	Cáncer de mama	2007	GSK
Nilotinib	Bcr–Abl, PDGFR, Kit, Src	Leucemia mieloide crónica	2007	Novartis
Temsirolimus	mTOR	Carcinoma renal	2007	Wyeth
Everolimus	mTORC1	Cáncer de mama HER2 ⁻ negativo, carcinoma renal, angiomiolipoma renal, astrocitoma de células gigantes	2009	Novartis
Pazopanib	VEGFR, PDGFR, Kit, EGFR	Carcinoma renal, sarcoma de tejido blando	2009	GSK
Crizotinib	ALK, c-Met	Cáncer de pulmón de células no pequeñas	2011	Pfizer
Ruxolitinib	JAK1, JAK2	Mielofibrosis; policitemia vera	2011	Incyte
Vandetanib	VEGFR, EGFR	Cáncer de tiroides	2011	Astra-Zeneca
Vemurafenib	B-Raf	Melanoma con mutación <i>BRAF</i> ^{V600E}	2011	Genentech
Axitinib	VEGFR, KIT, PDGFR	Carcinoma renal	2012	Pfizer
Bosutinib	Bcr–Abl, Src, Lyn, Hck, CDK, MEK	Leucemia mieloide crónica	2012	Pfizer
Cabozantinib	VEGFR2, Met, Ret, Flt, Axl, TIE	Cáncer de tiroides, carcinoma renal	2012	Excelixis
Ponatinib	Bcr–Abl, FGFR, Src, VEGFR, PDGFR	Leucemia mieloide crónica, leucemia linfóide aguda	2012	Ariad

Tabla 3. Inhibidores de proteínas cinasas aprobados por la FDA hasta el año 2018 (continuación).^{27,28}

Fármaco	Cinasas blanco	Enfermedad (es)	Año de aprobación	Compañía
Regorafenib	VEGFR, PDGFR, FGFR, Raf, Kit, Ret	Cáncer colorrectal	2012	Bayer
Tofacitinib	JAK1, JAK2, JAK3	Artritis reumatoide	2012	Pfizer
Afatinib	EGFR, ErbB2, ErbB4	Cáncer de pulmón de células no pequeñas	2013	Boehringer Ingelheim
Dabrafenib	B-Raf	Melanoma y cáncer de pulmón de células no pequeñas	2013	GSK
Ibrutinib	BTK	Linfomas de células del manto, leucemia linfoide aguda, macroglobulinemia de Waldenström	2013	Pharmaceuticals and J&J
Trametinib	MEK1/2	Melanoma	2013	GSK
Ceritinib	ALK	Cáncer de pulmón de células no pequeñas	2014	Novartis
Nintedanib	VEGFR, EGFR, PDGFR	Fibrosis pulmonar	2014	Boehringer Ingelheim
Alectinib	ALK y RET	Cáncer de pulmón de células no pequeñas	2015	Hoffman-LaRoche
Cobimetinib	MEK1, MEK2	Melanoma con mutaciones BRAF	2015	Genentech
Lenvatinib	VEGFR2, VEGFR3	Cáncer de tiroides	2015	Easai
Osimertinib	MEK1, MEK2	Cáncer de pulmón de células no pequeñas	2015	AstraZeneca
Palbociclib	CDK4, CDK6	Cáncer de mama ER ⁺ y HER2 ⁺	2015	Park Davis
Abemaciclib	CDK4/6	Cáncer de mama HER2 ⁻	2017	Lilly
Acalabrutinib	Tirosina cinasa de Bruton	Linfomas de células del manto	2017	Acerta Pharma
Brigatinib	ALK, ROS1, IGF-1R, Flt3, EGFR	Cáncer de pulmón de células no pequeñas	2017	Ariad
Midostaurin	Flt3, PDGFR, VEGFR2, PKC	Leucemia mieloide aguda; mastocitosis, leucemia de mastocitos	2017	Novartis
Neratinib	ErbB2/HER2	Cáncer de mama HER ⁺	2017	Puma
Ribociclib	CDK4/6	Cáncer de mama HER2 ⁻	2017	Novartis
Fostamatinib	Syk	Trombocitopenia	2018	Rigel

Nota: Los compuestos resaltados en color rojo son utilizados en padecimientos distintos a algún tipo de cáncer.

Recientemente, se ha reportado que la tasa de aberraciones genómicas es mayor en los grupos de cinasas TK, TLK y STE; sin embargo, otros grupos como AGC han sido estudiados en los últimos años encontrando novedosos blancos terapéuticos.³⁰ Los miembros del grupo de cinasas AGC se encuentran relacionados con diferentes patologías tales como: cáncer, enfermedades metabólicas, enfermedades cardiovasculares, desórdenes inmunológicos e incluso enfermedades neurológicas.²⁴

El grupo AGC deriva su nombre de tres de las familias que constituyen al grupo; PKA (proteína cinasa 1 dependiente de cAMP), PKB (proteína cinasa dependiente de cGMP) y PKC (proteína cinasa C). En el genoma humano existen 63 genes que codifican para dichas cinasas que son divididas en 14 familias y 21 subfamilias [Figura 7].²⁶

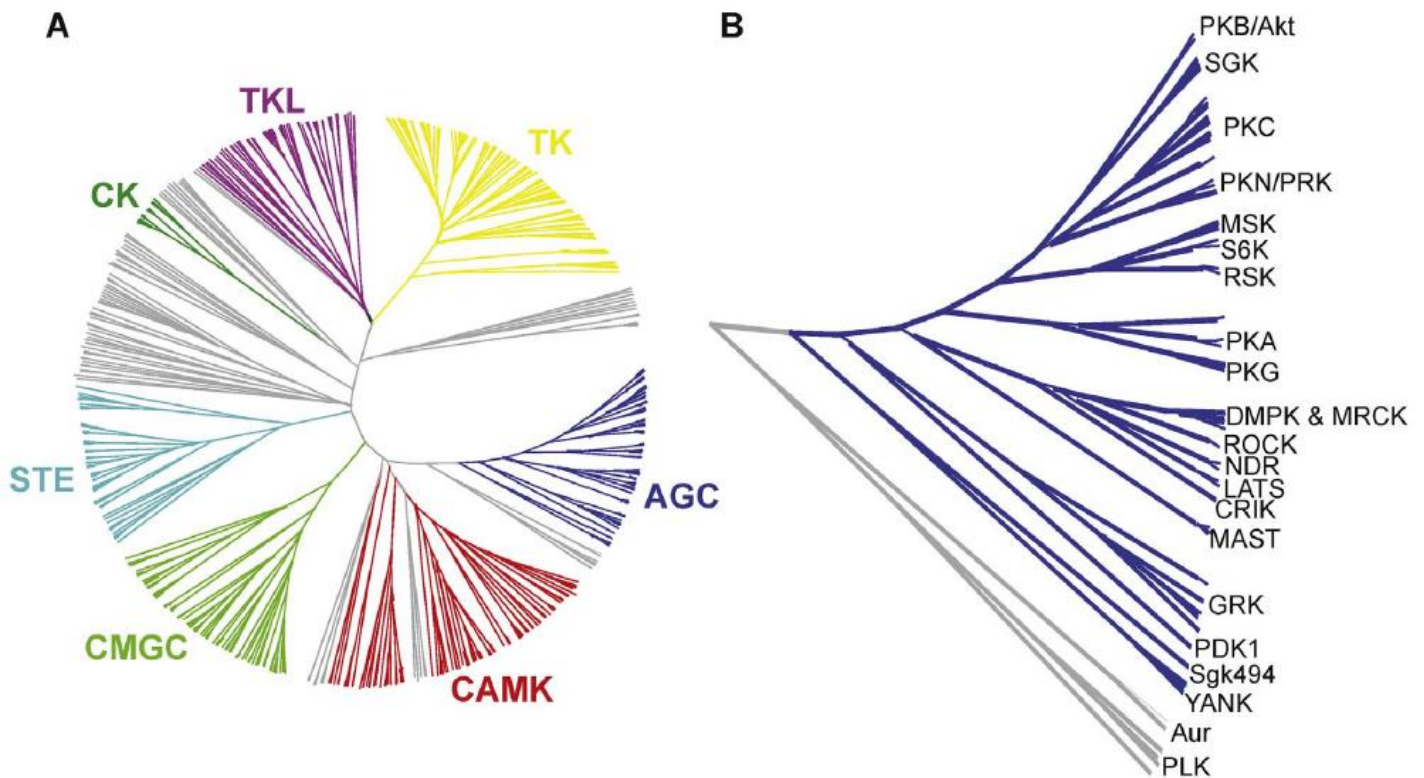


Figura 7. Representación del “Kinoma Humano”. **A:** Se observa la relación evolutiva de los dominios catalíticos entre las cinasas del grupo AGC y otras proteínas cinasas humanas. **B:** Familias y subfamilias de las cinasas del grupo AGC. **Nota:** Las cinasas Aur y PLK no pertenecen al grupo AGC; no obstante, presentan una relación muy estrecha.²⁶

Los miembros del grupo AGC comparten el plegamiento del sitio catalítico como sucede en otras proteínas cinasas. El dominio catalítico consiste en un lóbulo pequeño N-terminal y en un lóbulo grande C-terminal. El lóbulo pequeño consiste en 5 láminas β entrelazadas y una α -hélice αC mientras que el lóbulo grande es principalmente α -helicoidal. Las cinasas AGC frecuentemente presentan una segunda hélice αB contigua, la hélice αC . Entre los dos lóbulos en una cavidad profunda y en contacto con ambos lóbulos, se encuentra el sitio de unión de ATP. El péptido sustrato se une en una conformación extendida en la superficie entre los dos lóbulos. Es importante visualizar a las cinasas como sistemas dinámicos debido a la región conocida como bisagra (*hinge*) entre ambos lóbulos y además en muchas cinasas las hélices αB y αC son responsables de regulación mediante efectos alostéricos en el sitio catalítico. En las cinasas del grupo AGC existe la presencia de un motivo hidrofóbico (HM) el cual está compuesto de 50 a 60 aminoácidos C-terminales al sitio catalítico [Figura 8].²⁶

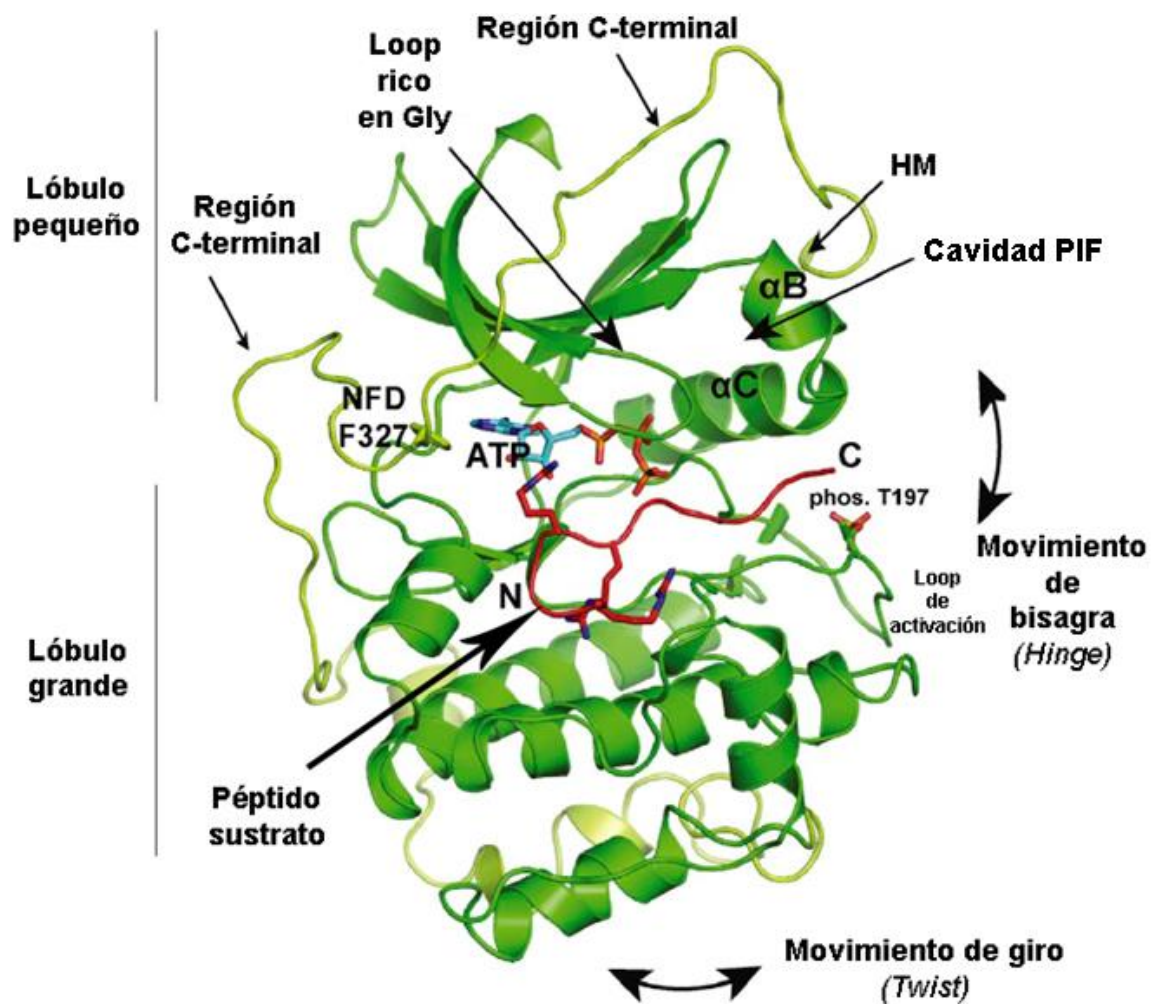


Figura 8. Características estructurales generales de las proteínas cinasas del grupo AGC.²⁶

De manera ilustrativa, en la **Figura 8** se observa la estructura de la PKA en donde se resaltan propiedades comunes de las cinasas como: el lóbulo grande y el pequeño, sitio de unión de ATP, sitio de unión del péptido, *loop* de activación y *loop* rico en Gly. Otras características clave en las cinasas se muestran en verde claro como: la región C-terminal, el sitio NFD que interacciona con el ATP, el motivo hidrofóbico (HM) que se une a la cavidad PIF. Finalmente, se muestran algunas regiones clave que proporcionan regulación alostérica en las cinasas como: flexibilidad de las hélices αB y αC y los dos lóbulos caracterizados por los movimientos de giro y bisagra.²⁶

Además, se ha descrito en la literatura la presencia de un residuo en la cavidad de unión de ATP localizado entre la región bisagra entre los lóbulos N y C, el cual separa la región de unión de adenina (NFD) del sitio hidrofóbico adyacente y controla el acceso a la cavidad hidrofóbica. Dicho residuo es denominado como “*gatekeeper*” y se ha observado que mutaciones en dicho residuo pueden ser relacionadas con resistencia a fármacos anticancerígenos.³¹

La región C-terminal contiene un *loop* flexible de activación, típicamente compuesto de 20 a 30 aminoácidos y caracterizado por la presencia de una región conservada de Asp-Phe-Gly (DFG) al inicio de dicha región. En años recientes se ha demostrado que la región DFG puede adoptar dos conformaciones en las cuales el residuo de aspartato cambia de disposición en la proteína cinasa y esto ocasiona un estado activo o inactivo en dicha proteína. En la conformación activa se ha observado que dicho aspartato se orienta hacia el sitio de ATP, lo cual es denominado DFG-*in*, mientras que en la conformación inactiva el aspartato se orienta lejos del sitio de ATP por aproximadamente 5 Å y dicha conformación es dominada DFG-*out*.³¹

Las características mencionadas con anterioridad han sido observadas y recolectadas en un gran número de cinasas co-cristalizadas con una diversidad de inhibidores. Gracias a estos resultados ha sido posible establecer un sistema de clasificación de los inhibidores, donde los grupos engloban a compuestos de acuerdo con su interacción con la proteína blanco. Es importante destacar que la clasificación de inhibidores no se encuentra limitada a las cinasas del grupo AGC, por lo que es válida para todos los grupos de cinasas. La **Tabla 4** resume los modos de interacción y además se menciona un ejemplo representativo de un inhibidor de cinasa.^{32,33}

La clasificación de inhibidores de los grupos I a IV ha sido aceptada ampliamente, separando los compuestos que actúan sobre la cinasa activa (I), la cinasa inactiva (II), si interactúan en algún sitio alostérico de la cinasa (III) o sobre algún dominio superficial (IV).³² Sin embargo, en algunos otros trabajos y sitios de dominio público se ha propuesto la implementación de dos grupos adicionales, donde el grupo (V) incluye a los compuestos capaces de interactuar en dos sitios diferentes de la cinasa y el grupo (VI) donde se enlistan a los inhibidores irreversibles.^{28,34}

Tabla 4. Tipos de inhibidores de cinasas y algunos ejemplos representativos^{28,32,34,35}

Tipo	Características del grupo	Ejemplo de un inhibidor y su cinasa blanco
I	Inhibidores que se unen en el estado activo de la cinasa, en el sitio de ATP.	Tofacitinib – JAK3
II	Inhibidores que se unen en el estado inactivo de la cinasa, interaccionando con una cavidad adyacente a la de ATP.	Imatinib - SRC
III	Inhibidores o activadores alostéricos.	Trametinib - MEK
IV	Compuestos que interactúan con dominios superficiales de la cinasa, causando interferencia entre la proteína y el sitio con el que interacciona.	Everolimus - mTOR
V	Compuestos que se unen en dos regiones diferentes de la cinasa (también conocidos como inhibidores bivalentes).	ARC1028 - PKA
VI	Compuestos que se unen covalentemente con la cinasa blanco.*	Afatinib - EGFR

* Las categorías I a V contemplan inhibidores reversibles. La categoría VI es la única que contempla a los inhibidores irreversibles.³⁴

En la literatura se puede encontrar una extensa lista de inhibidores que se clasifican en alguno de los grupos anteriormente mencionados.^{28,34} De tal forma la investigación en el campo de las proteínas cinasas ha sido exhaustiva y día a día se obtienen nuevas moléculas con potencial terapéutico.

2.5. AKT como diana terapéutica

Como se mencionó anteriormente, las cinasas del grupo AGC han sido identificadas como novedosos blancos terapéuticos. Recientemente, se ha demostrado que del grupo AGC de cinasas, las PKB (proteínas cinasas B o también conocidas como AKT) se encuentran implicadas en procesos desregulados, afectando a la cascada de señalización PI3K/AKT/mTOR (fosfatidilinositol-3 cinasa/proteína cinasas B/receptor mamífero de rapamicina, respectivamente). Dicha ruta alterada ha sido identificada como de alta incidencia en diversos tipos de cáncer en humanos.³⁶⁻³⁹

La proteína cinasa B (AKT) es un nodo cardinal de diversas cascadas de señalización en células sanas y en varias patologías. La cinasa AKT regula la supervivencia, proliferación celular, metabolismo de glucosa, movilidad celular y angiogénesis [Figura 9].⁴⁰ Regulaciones aberrantes de estos procesos resultan en perturbaciones consideradas como marcas características del cáncer, donde además estudios recientes han correlacionado la hiperactivación de AKT con tales perturbaciones.⁴¹

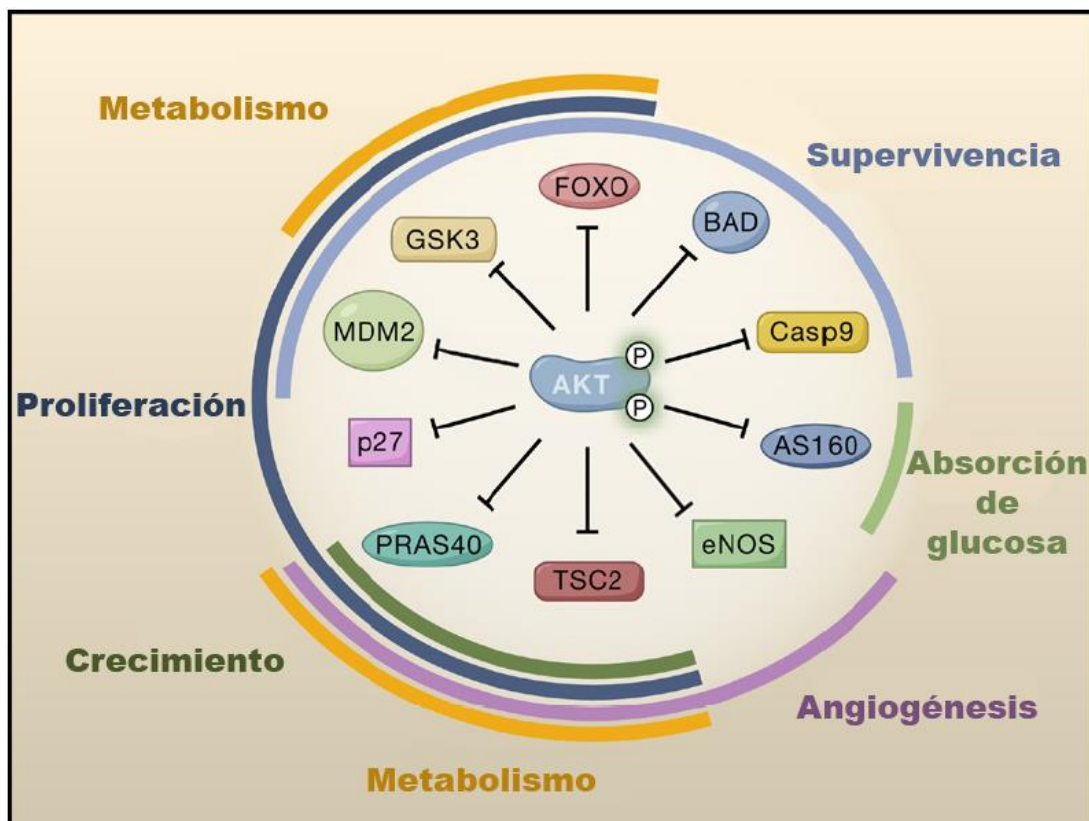


Figura 9. Funciones celulares de diez proteínas relacionadas con AKT. La regulación de estas proteínas por AKT contribuye a la activación de varios procesos celulares.⁴⁰

AKT es una serina/treonina cinasa de 57 kDa y se ha reportado que las células humanas expresan tres isoformas homólogas (AKT1, AKT2 y AKT3) codificadas por genes separados; sin embargo, comparten cerca del 80% de la secuencia de aminoácidos.^{42,43} Las tres isoformas comparten una estructura similar: un dominio amino-terminal de Homología Pleckstrina (PH), un dominio central catalítico de serina/treonina (CAT) y un dominio regulatorio C-terminal (EXT), que contiene el motivo hidrofóbico regulatorio (HM). El dominio catalítico se encuentra unido con el dominio PH mediante una región conectora (Linker) [Figura 10].⁴⁴

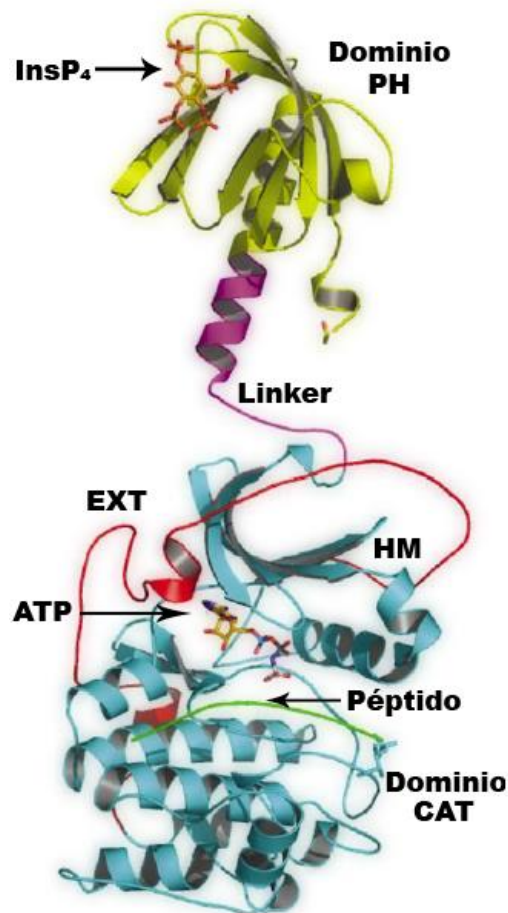


Figura 10. Estructura cristalina de AKT1 (PDB: 1UNQ). Se observan los diversos dominios de la cinasa. El dominio PH se posicionó arbitrariamente con relación al dominio CAT debido a fines demostrativos de la imagen.⁴⁴

Las cinasas AKT son activadas por fosforilación en el residuo de Thr en el “*T-loop*” de activación (Thr308 en AKT1, Thr309 en AKT2 y Thr305 en AKT3) y en el residuo Ser en el

dominio C-terminal (Ser473 en AKT1, Ser474 en AKT2 y Ser472 en AKT3). La fosforilación de ambos sitios aumenta la actividad catalítica de la cinasa en 1000 veces.⁴⁴

La cascada de señalización PI3K-AKT-mTOR comienza con la activación de PI3K a causa de factores de crecimiento, citocinas o insulina. Dicha activación induce la fosforilación del fosfolípido de membrana PIP2 (fosfatidilinositol(4,5)-difosfato) a PIP3 (fosfatidilinositol(3-5)-trifosfato). Eventualmente, PIP3 se une al dominio PH de la cinasa AKT e induce su translocación a la membrana celular en donde interacciona con PDK1, proteína que activa parcialmente a AKT mediante una primera fosforilación (denominada la fosforilación de Thr en el “T-Loop”). Posteriormente, AKT es fosforilada por segunda ocasión por mTORC2 (fosforilación de Ser en C-terminal) originando la forma totalmente activa de la cinasa.⁴⁵⁻⁴⁷

Una vez activada AKT, la cinasa es encargada de fosforilar e inhibir proteínas de señalización “downstream” como la cinasa 3 de la síntesis de glucógeno (GSK3), factores de transcripción FOXO y BAD, los cuales se consideran señales pro-apoptóticas. Además, AKT activa de manera indirecta a mTORC1, un regulador maestro del crecimiento celular y del metabolismo. También es capaz de regular el ciclo celular y la proliferación cuando tiene como blanco a las CDKs p21 y p27. **[Figura 11].**⁴⁵⁻⁴⁷

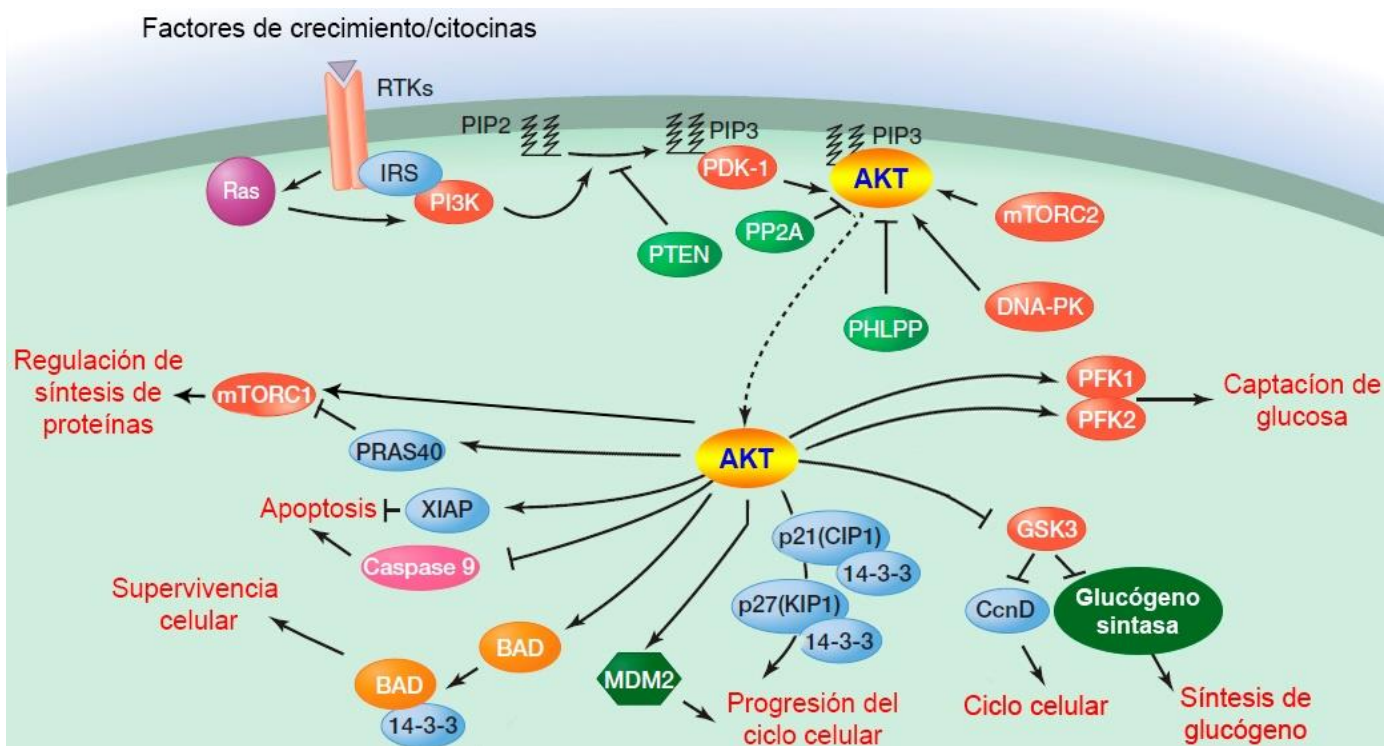


Figura 11. Cascada de señalización PI3K/AKT/mTOR simplificada.⁴⁷

Debido a la participación en la tumorigénesis de la cascada de señalización PI3K/AKT/mTOR, los reguladores “*upstream*” y efectores “*downstream*” de AKT han sido visualizados como blancos de interés para el desarrollo de nuevos fármacos. En ese sentido se han realizado múltiples investigaciones para identificar inhibidores específicos de AKT los cuales presenten un potencial farmacológico favorable.⁴⁸

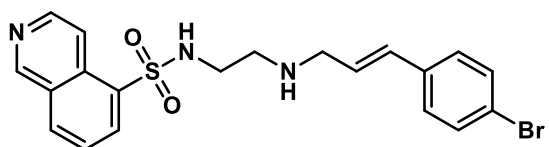
2.6. Inhibidores de AKT

La búsqueda de compuestos inhibidores (moléculas pequeñas) de AKT comenzó alrededor del año 2000. Desde entonces se han buscado nuevos compuestos con mejores perfiles farmacológicos. Dentro de las pequeñas moléculas, los inhibidores competitivos de ATP son las más comunes; no obstante, existe una gran diversidad de inhibidores alostéricos de diversas regiones de la cinasa (como el dominio PH o dominio CAT).⁴⁹

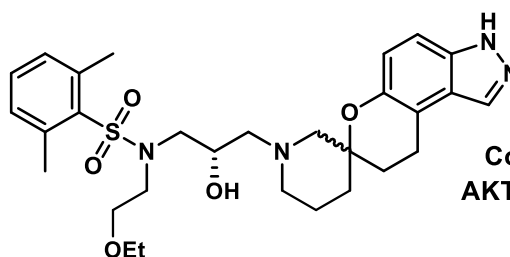
Los niveles de las isoformas de AKT suelen sobreexpresarse diferente en diversos tipos de cáncer, siendo AKT1 predominante en cáncer de: estómago, próstata, ovario y mamá. AKT2 presenta mayor sobreexpresión en cáncer de: ovario y páncreas, mientras que AKT3 es sobreexpresado en melanomas y en cáncer de mama.^{50,51} Estas diferencias han sido de gran interés para la búsqueda de moléculas específicas contra una isoforma particular de AKT, aunque esto ha representado un gran reto debido a la alta homología entre las isoformas.

En la **Figura 12** se muestran diversos ejemplos de inhibidores de AKT junto con sus valores de concentración inhibitoria para una o varias isoformas. Estructuralmente, las moléculas incluyen como *scaffold*: quinoxalinas, aminofurazanos, pirrolopirimidinas, espirocromanos, entre otros.⁵²⁻⁵⁹ Es posible observar en algunos compuestos la especificidad sobre determinada isoforma de AKT. Esto ha resultado de gran interés en la búsqueda de compuestos con menos efectos adversos. Particularmente, los compuestos que interaccionan en menor medida con AKT2 presentan mejores perfiles farmacológicos, debido a la relación de AKT2 con el metabolismo de la glucosa.⁶⁰

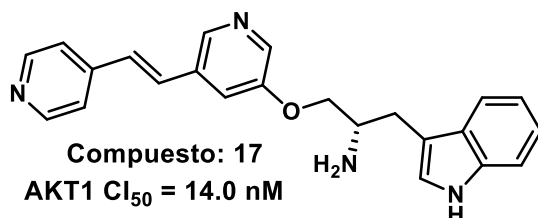
Así mismo, la estructura cristalográfica de las isoformas AKT1 y AKT2 se ha reportado ampliamente por diversos grupos, mientras que la estructura de AKT3 no ha sido determinada experimentalmente. No obstante, debido a la alta homología de las isoformas se han realizado modelados por homología con lo que ha sido posible desarrollar nuevos inhibidores empleando técnicas de diseño basado en la estructura.⁶¹



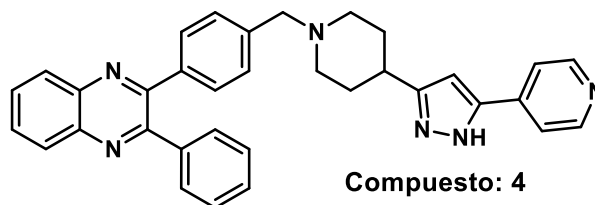
Compuesto: H-89
AKT1 Cl_{50} = 2.5 μ M



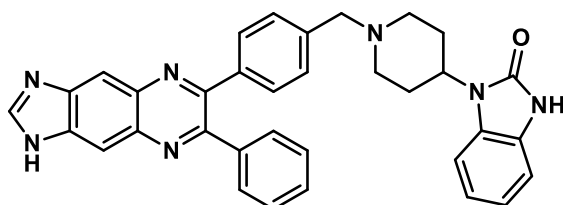
Compuesto: 38
AKT1 Cl_{50} = 9.0 nM



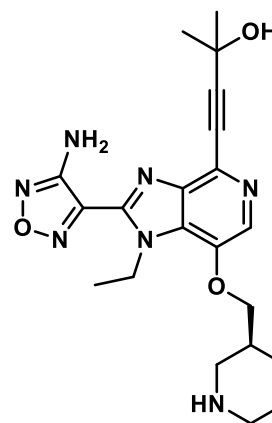
Compuesto: 17
AKT1 Cl_{50} = 14.0 nM
AKT2 Cl_{50} = 257.0 nM
AKT3 Cl_{50} = 354.0 nM



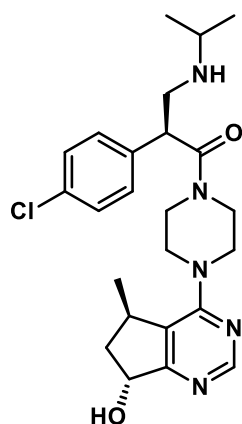
Compuesto: 4
AKT1 Cl_{50} = 75.0 nM
AKT2 Cl_{50} = 1075.0 nM
AKT3 Cl_{50} = 11282.0 nM



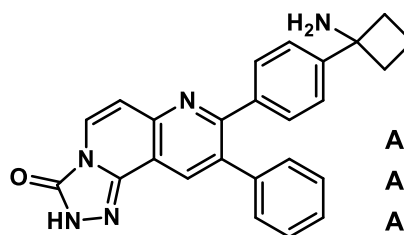
Compuesto: 2
AKT1 Cl_{50} = 58.0 nM
AKT2 Cl_{50} = 210.0 nM
AKT3 Cl_{50} > 2119.0 nM



Compuesto:
GSK690693
AKT1 Cl_{50} = 2.0 nM
AKT2 Cl_{50} = 13.0 nM
AKT3 Cl_{50} = 9.0 nM



Compuesto:
GDC-0068
AKT1 Cl_{50} = 5.0 nM
AKT2 Cl_{50} = 18.0 nM
AKT3 Cl_{50} = 8.0 nM



Compuesto:
MK-2206
AKT1 Cl_{50} = 8.0 nM
AKT2 Cl_{50} = 12.0 nM
AKT3 Cl_{50} = 65.0 nM

Figura 12. Estructuras químicas de diversos inhibidores de AKT. Se muestran sus valores de Cl_{50} para una o varias isoformas. El compuesto **GSK690693** se encuentra en fase clínica 1, mientras que los compuestos **GDC-0068** y **MK-2206** se encuentran en fase clínica 2.⁵²⁻⁵⁹

2.7. Piridinas 2,4,6-trisustituidas como inhibidores potenciales de AKT

Tomando en cuenta la sobreexpresión de AKT en diversos tipos de cáncer y la importancia de la ruta fisiológica de dicha cinasa, nuestro grupo de investigación recientemente incursionó en la búsqueda de inhibidores de cinasas como potenciales anticancerígenos. En ese sentido, nuestro grupo realizó un estudio computacional con la finalidad de encontrar novedosos inhibidores de AKT [Figura 13].⁶²

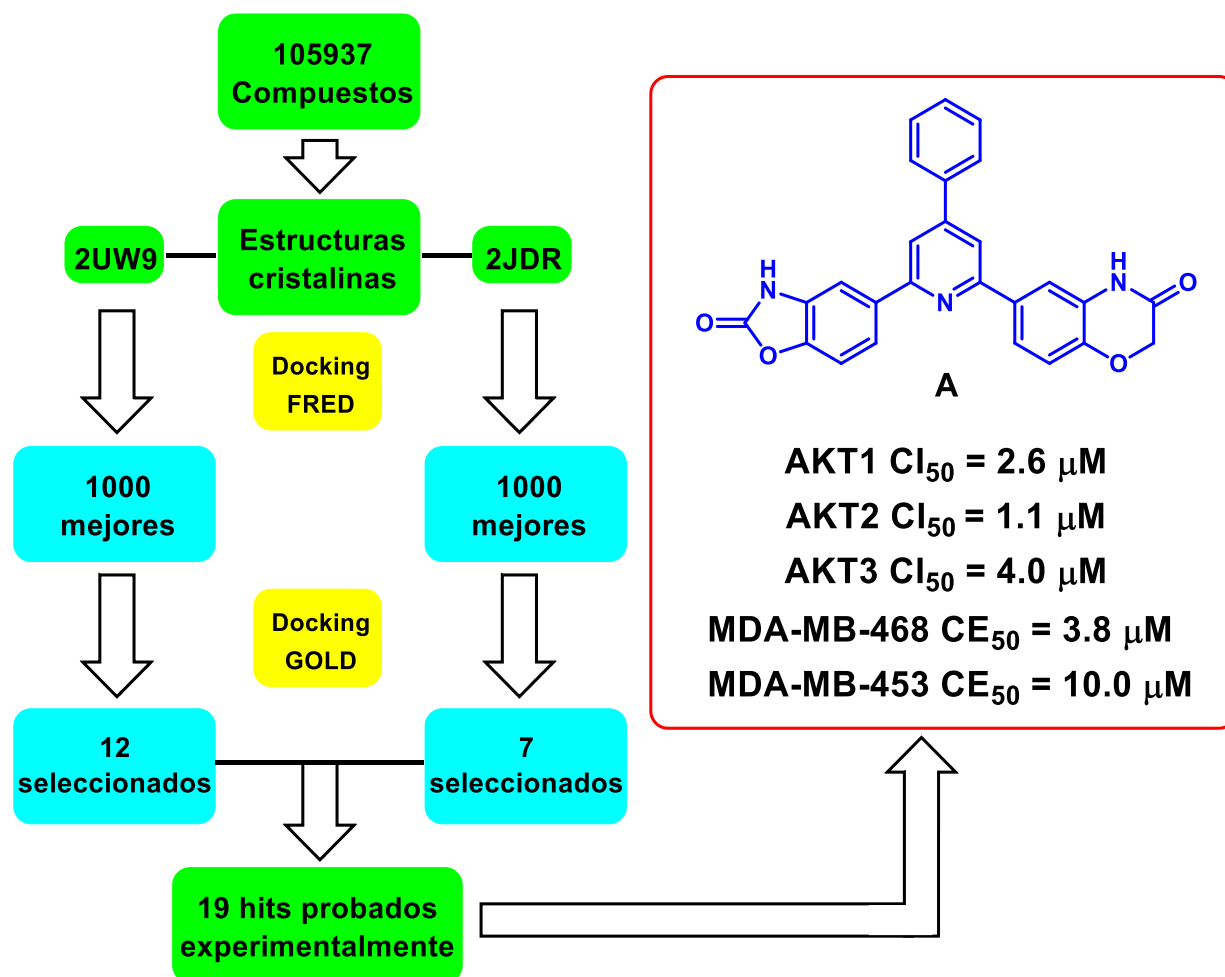


Figura 13. Esquema del cribado virtual realizado por nuestro grupo de investigación.

En la **Figura 13** se puede observar el procedimiento elaborado para el cribado virtual. En dicho estudio se partió de una base de datos con 105937 compuestos, los cuales fueron discriminados por estudios de acoplamiento molecular (*docking*) en dos etapas, utilizando además dos estructuras cristalográficas de AKT2 (PDB: 2UW9 y 2JDR). En la primera etapa se realizaron estudios rápidos de *docking* (FRED) en donde se recuperaron los 2000 compuestos que presentaran la mejor puntuación (1000 por cada estructura cristalográfica).

Posteriormente, se efectuó un segundo estudio de *docking* utilizando criterios más rigurosos (GOLD). De tal forma que se obtuvieron computacionalmente 19 moléculas hit las cuales se adquirieron a diversas empresas y se evaluaron en un ensayo de inhibición de AKT utilizando un kit de ensayo bioquímico Z'-LYTE con la metodología *FRET* (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia). De los 19 compuestos sobresalió el compuesto **A** mostrando una actividad modesta sobre las tres isoformas de AKT, así como determinada actividad anticancerígena contra las líneas celulares MDA-MB-453 y MDA-MB-468.⁶²

El compuesto **A** destacó particularmente por su estructura novedosa en el campo de inhibidores de cinasas, puesto que a pesar de presentar un *scaffold* de piridina ya existente en otros inhibidores [Figura 12], el patrón de sustitución (2, 4 y 6) en dicho heterociclo se concibió como un punto de partida para realizar diversos procesos de optimización en la búsqueda de potenciales y novedosos inhibidores de AKT. En ese sentido nuestro grupo efectuó modificaciones estructurales al compuesto **A** utilizando estudios de acoplamiento molecular, basándose en interacciones observadas de otros inhibidores de AKT reportados como es el caso del pirazol sustituido **9** y a la isoquinolina-5-sulfonamida **H-89** [Figura 14]. Es importante destacar que el compuesto **9** se co-cristalizó con la isoforma de AKT2 previamente por otro grupo de investigación, lo que fue de gran utilidad al momento de realizar validaciones teóricas en el modo de unión de las nuevas moléculas optimizadas por nuestro grupo.^{61,63,64}

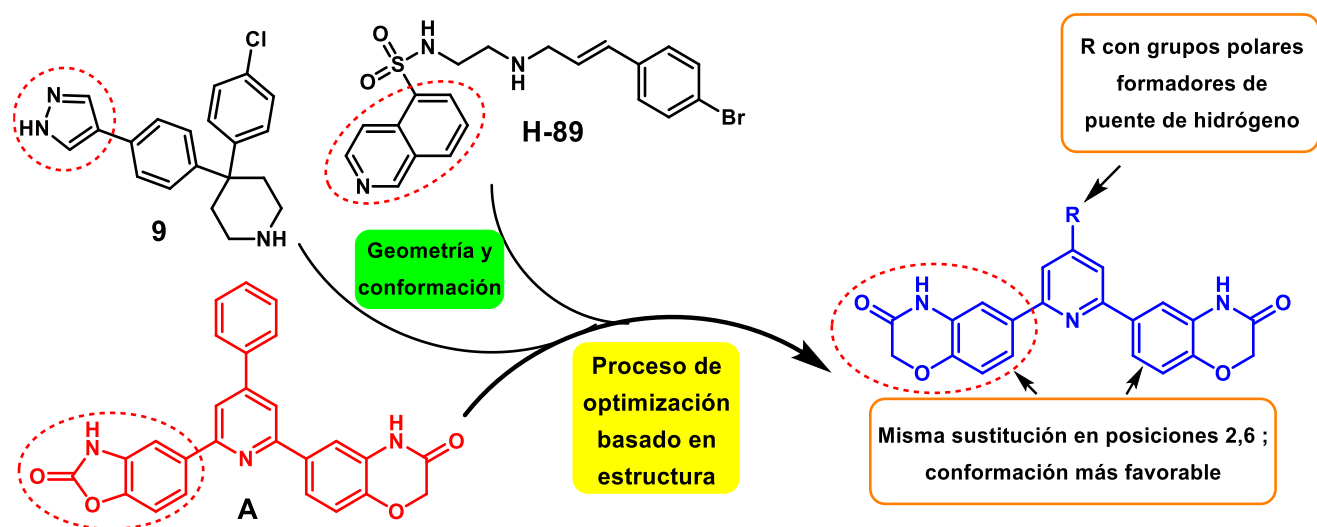


Figura 14. Proceso de optimización de la molécula **A**. El fragmento de los compuestos que interacciona con la región *hinge* de la cinasa se encuentra encerrado en rojo.^{61,63,64}

De tal forma que se propuso una serie de compuestos basados en el proceso de optimización mostrado en la **Figura 14**. Los patrones 2,6 se mantuvieron de forma similar en las moléculas propuestas; sin embargo, en la posición 4 se implementaron grupos NH y amidas con diferentes patrones de sustitución con la finalidad favorecer interacciones por puente de hidrógeno con el sitio activo de AKT [**Figura 15**].⁶⁴

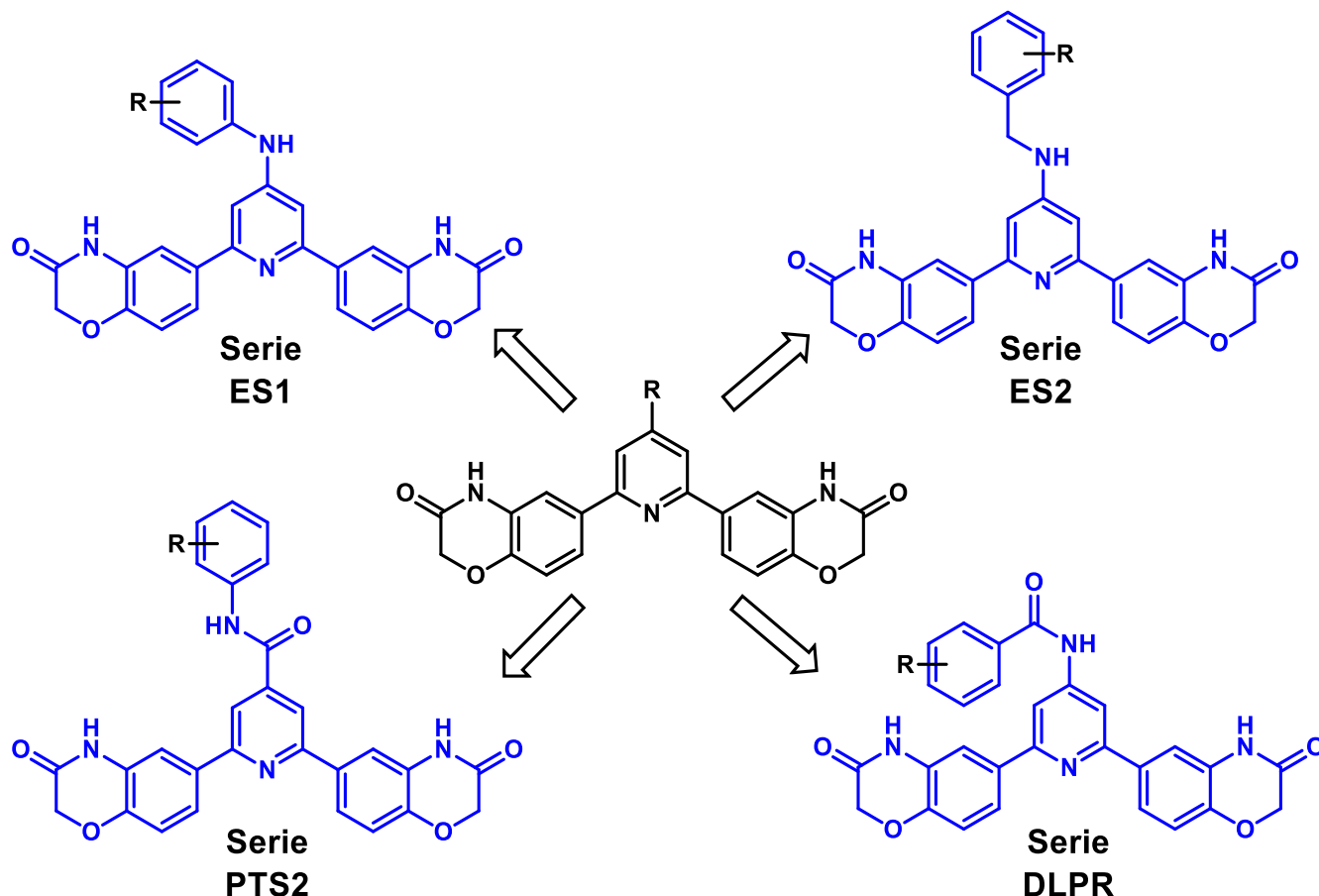


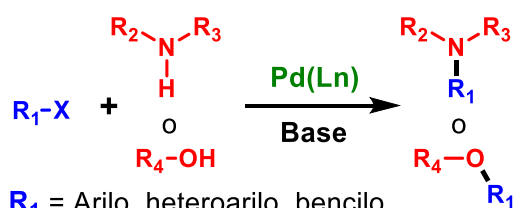
Figura 15. Compuestos propuestos y preparados en nuestro grupo de investigación.^{61,64,65}

Como se puede observar en la **Figura 15**, los compuestos propuestos de las diversas series continúan siendo limitados en patrones de sustitución, de tal forma que el espacio químico explorado es relativamente pequeño. Esto dio pauta a la exportación de otros sustituyentes en la posición 4, particularmente, como es el caso de heterociclos saturados y no saturados, los cuales podrían presentar diversas propiedades fisicoquímicas y biológicas de interés en la búsqueda de nuevos inhibidores de cinasas. Además, con la preparación de estos compuestos se podría expandir la actual base de datos de moléculas y con esto dar pauta a estudios QSAR que serían de utilidad en la búsqueda de inhibidores de cinasas con mejores propiedades farmacológicas.

2.8. Reacciones de acoplamiento cruzado catalizadas por Pd

En los últimos años la catálisis con metales de transición ha tomado gran importancia en la síntesis orgánica. Esto es debido a la versatilidad y utilidad de los catalizadores frente a diversas transformaciones químicas. El paladio ha sido uno de los metales que ha sobresalido en diversos aspectos prácticos al grado de que en el año 2010 se otorgó el premio Nobel de Química a Richard Heck, Eiichi Negishi y Akira Suzuki por su estudio de las reacciones de acoplamiento cruzado catalizadas por paladio en síntesis orgánica.⁶⁶ En ese sentido se han desarrollado una gran variedad de reacciones de acoplamiento catalizadas por paladio [Figura 16].⁶⁷

Buchwald-Hartwig (C-N y/o C-O)



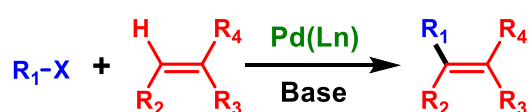
R_1 = Arilo, heteroarilo, bencilo

X = Cl, Br, I, OTf

R_2, R_3 = Aromático o alifático 1° o 2°

R_4 = Aromático o alifático 1°, 2° o 3°

Heck (C-C)

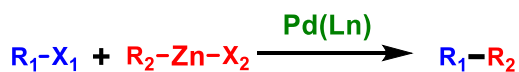


R_1 = Arilo, heteroarilo, bencilo, vinilo, alquilo

X = Cl, Br, I, OTf, OTs, N_2^+

R_2, R_3, R_4 = Alquilo, arilo, alquenilo

Negishi (C-C)



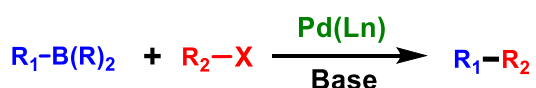
R_1 = Arilo, alquenilo, alquinilo, acilo

X_1 = Cl, Br, I, OTf, OAc

R_2 = Arilo, alquenilo, alilo, bencilo, homoalilo, homopropargilo

X_2 = Cl, Br, I

Suzuki-Miyaura (C-C)



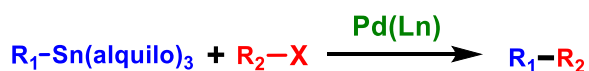
R_1 = alquilo, alilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo

R = alquilo, OH, O-alquilo

R_2 = Alquenilo, arilo, heteroarilo, aquilo

X = Cl, Br, I, OTf, OPO(OR)₂

Stille (C-C)



R_1 = Alilo, alquenilo, arilo, heteroarilo

R_2 = Alquenilo, arilo, acilo

X = Cl, Br, I, OTf, OPO(OR)₂

Sonogashira (C-C)



R_1 = Arilo, heteroarilo, alquenilo

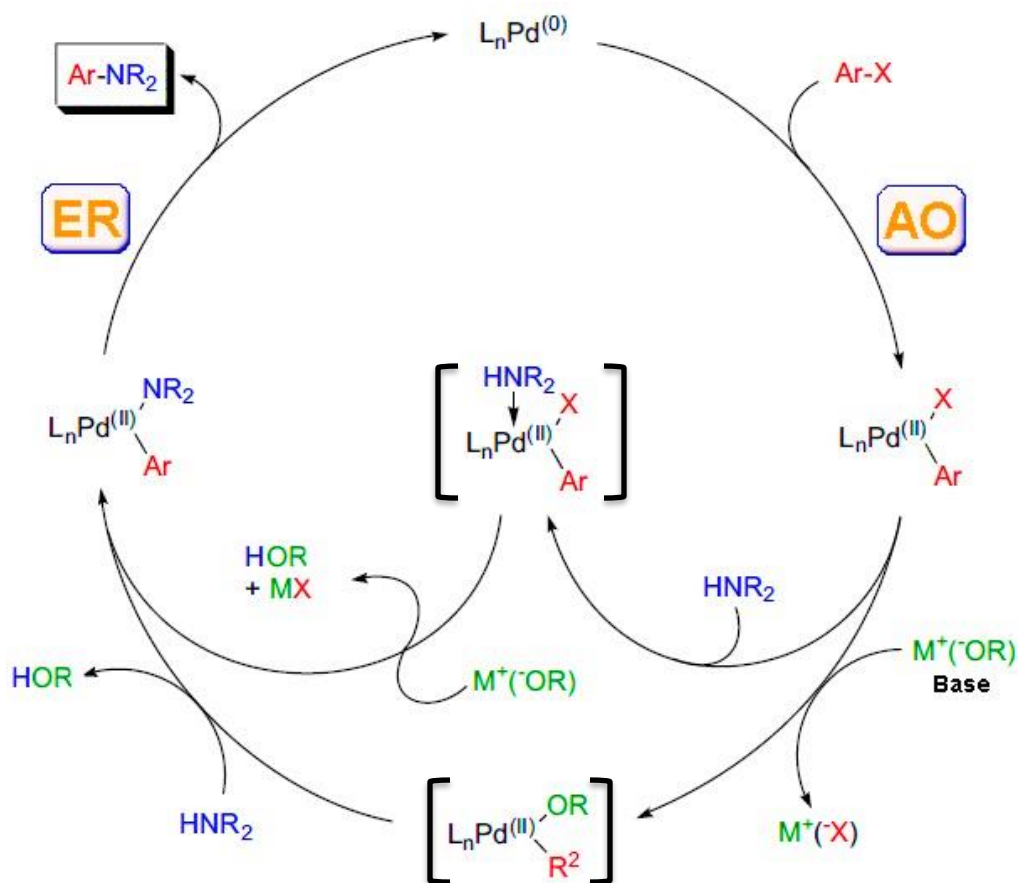
X_1 = Cl, Br, I, OTf

R_2 = H, alquilo, arilo, alquenilo, SiR₃

Figura 16. Resumen de reacciones comunes de acoplamiento cruzado catalizadas por paladio en síntesis orgánica (sustratos clásicos reportados en la literatura).⁶⁷

En la **Figura 16** se muestra un breve resumen de diversas reacciones catalizadas por paladio con los sustratos clásicos y condiciones de reacción clásicas para la formación de enlaces carbono-carbono o carbono-heteroátomo. Es importante denotar que en la actualidad se han desarrollado una gran cantidad de variantes en las condiciones de reacción mostradas, por lo que día a día se expande la versatilidad de la catálisis de paladio. En los **Esquemas 1** y **2** se muestran los mecanismos de reacción de los acoplamientos de Buchwald-Hartwig y Suzuki-Miyaura, ya que tales reacciones se abordan en el presente trabajo; sin embargo, existen similitudes mecánísticas entre diversos acoplamientos con Pd.

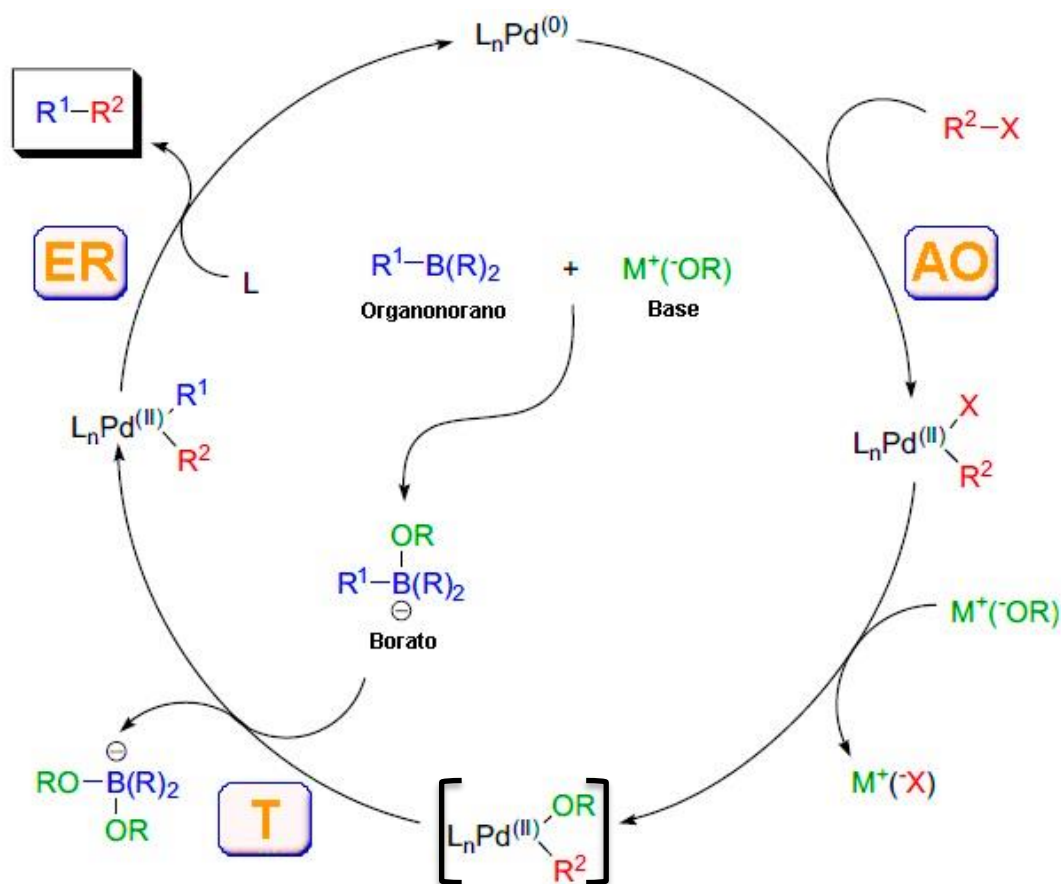
En el primer paso del ciclo catalítico del acoplamiento Buchwald-Hartwig, el haluro de arilo se inserta en el paladio ocasionando un cambio de estado de oxidación de Pd(0) a Pd(II) (AO: adición oxidante). La formación del intermediario $\text{Ar-Pd(II)L}_n\text{-NR}_2$ se genera mediante un desplazamiento del haluro por la base (intermediarios en corchetes) y posterior desplazamiento de la base por la amina. Finalmente, la formación del enlace C-N es efectuada por una eliminación reductora (ER), regenerando al Pd(0) en el medio de reacción.



Esquema 1. Mecanismo del acoplamiento Buchwald-Hartwig.⁶⁷

Los pasos de AO y ER son considerados clave en la reacción. En el **Esquema 1**, los ligantes son representados por L_n ya que, dependiendo de la naturaleza de los compuestos usados para este fin, pueden modificarse el número de especies coordinadas al centro metálico. Los ligantes juegan un papel fundamental en los acoplamientos cruzados ya que modulan los factores estéricos y electrónicos del centro metálico, lo que a su vez modifica significativamente la reactividad del catalizador en una reacción dada.

En lo que respecta al mecanismo de acoplamiento de Suzuki-Miyaura [**Esquema 2**], en primera instancia se produce la AO del haluro de arilo sobre el centro metálico (cambio de estado de oxidación de Pd(0) a Pd(II)); posteriormente, se produce un intercambio del anión unido al Pd por la base. Después se lleva a cabo la transmetalación (T) entre R_2 -Pd(II) L_n -OR y el borato (generado de la reacción del compuesto de organoboro y la base) lo que da lugar a la especie R_2 -Pd(II) L_n -R₁. Finalmente se lleva a cabo una ER en el centro metálico que genera al enlace C-C y libera Pd(0) en el medio de reacción. Los pasos clave de la reacción son AO, ER y T.



Esquema 2. Mecanismo del acoplamiento Suzuki-Miyaura.⁶⁷

De las reacciones mostradas en el resumen **[Figura 16]**, Buchwald-Hartwig, Heck y Suzuki-Miyaura han tenido un impacto muy significativo en la síntesis de compuestos con actividad biológica en diversos ámbitos de investigación e incluso a nivel industria en la síntesis de fármacos.⁶⁸⁻⁷¹ Con estas transformaciones ha sido posible reducir el número de pasos sintéticos para diversas materias primas o intermediarios de interés. Esto se debe a la gran tolerancia de grupos funcionales, buenos rendimientos, materias primas generalmente poco tóxicas y en ocasiones condiciones de reacción muy suaves.⁶⁸

Para nuestro grupo de investigación resultó imperante la implementación de reacciones de acoplamiento cruzado catalizadas con paladio para la obtención de las moléculas propuestas debido al patrón de sustitución del heterociclo de piridina, el cual sería complicado de obtener por otras rutas sintéticas mediante química convencional. En general, los resultados obtenidos en trabajos previos resultaron positivos y atractivos por lo que en el presente trabajo se abordó el uso de reacciones de acoplamiento catalizadas por paladio para la síntesis de las moléculas objetivo.^{61,65}

3. JUSTIFICACIÓN

El cáncer es una enfermedad de gran prevalencia a nivel mundial y se estima que dentro de pocos años la tasa de morbilidad y mortalidad incrementa drásticamente, respecto a las estadísticas actuales. Debido a esto el cáncer es considerado un problema de salud pública.

A pesar de existir una extensa gama de compuestos para el tratamiento de diversos tipos de cáncer, aquellos por lo general ocasionan efectos adversos significativos y poca selectividad. Además, en años recientes se han documentado casos de pacientes en los cuales los tratamientos convencionales no son eficaces.

Debido a lo anterior resulta imperante la investigación de nuevas moléculas con potencial anticancerígeno, las cuales sean más eficaces y seguras. En ese sentido la búsqueda de moléculas ha sido abordada por diversas vías y recientemente se ha observado que los fármacos diseñados contra un blanco específico presentan una menor incidencia de efectos adversos y mejores perfiles farmacológicos.

Dentro de los blancos específicos en la problemática del cáncer, las cinasas han demostrado ser de gran relevancia para el control y metabolismo celular. Por tales razones durante años recientes los centros de investigación y las industrias han destinado presupuestos importantes para la investigación en el campo de dichas proteínas. Dentro de las diversas cinasas, la proteína serina treonina cinasa B (AKT) se ha visualizado como un blanco potencial para la búsqueda de nuevas moléculas anticancerígenas, por lo que el diseño de nuevos inhibidores de esta proteína podría aportar información relevante que sería de provecho para tratar la problemática del cáncer.

En el presente trabajo se plantea la síntesis de nueve piridinas 2,4,6-trisustituidas para evaluar su potencial actividad anticancerígena, de acuerdo con lo estudiado previamente por nuestro grupo de investigación. Con ello se pretende expandir el espacio químico explorado por nuestro grupo en lo que respecta a este novedoso *scaffold* y por otra parte se pretende contribuir con moléculas que podrían aportar información valiosa en el campo de inhibidores de cinasas.

4. HIPÓTESIS

Modificando la sustitución de la posición 4 del *scaffold* de piridina, estudiado previamente por nuestro grupo de investigación, con sustituyentes heterocíclicos no saturados se favorecerán interacciones tipo π - π y puente de H en el sitio de unión, por lo que se accederá a nuevos compuestos más activos sobre diversas líneas celulares cancerígenas que sobreexpresen AKT.

En lo que respecta a los compuestos sustituidos en posición 4 con un heterociclo saturado se mejorarán las propiedades fisicoquímicas como la solubilidad debido a un aumento de grados de libertad de la molécula potenciando su actividad sobre diversas líneas celulares cancerígenas que expresen en gran medida AKT.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Sintetizar y evaluar *in vitro* e *in silico* el potencial anticancerígeno de nueve derivados novedosos de piridina 2,4,6-trisustituida con sustituyentes aminoheterociclo en la posición 4, diseñados como inhibidores de la cinasa AKT.

5.2. Objetivos particulares

- Establecer una ruta de síntesis, caracterizar espectroscópicamente-espectrométricamente y determinar las constantes físicas (*pf*, *Rf*) de nueve compuestos diseñados como inhibidores AKT [Figura 17].

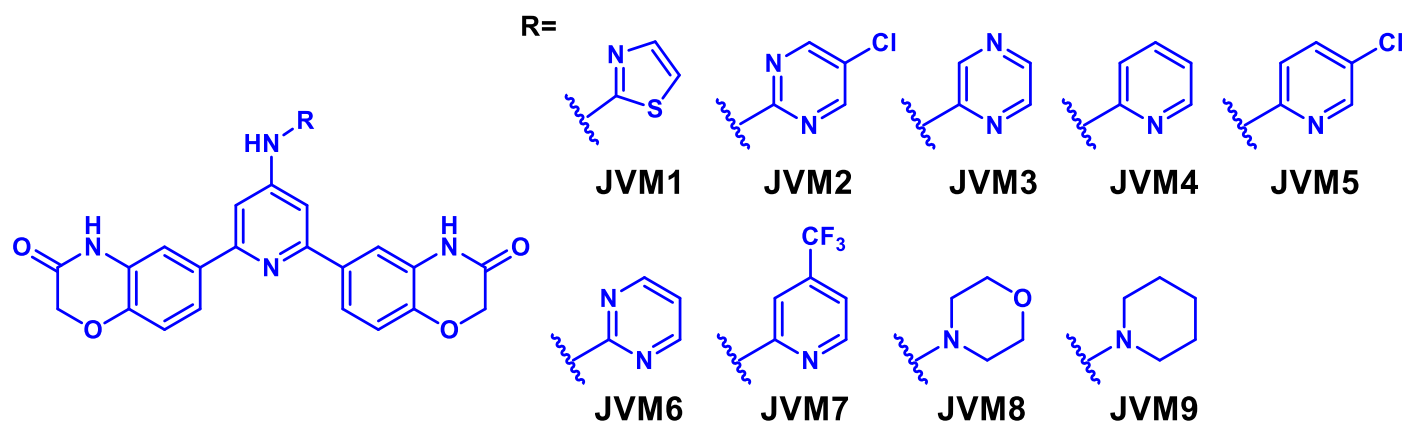


Figura 17. Piridinas 2,4,6-trisustituidas propuestas como inhibidores de AKT.

- Evaluar la actividad citotóxica de los compuestos obtenidos mediante la inhibición de cinco líneas celulares cancerosas (DU-145, PC-3, MCF-7, MDA-MB-231 y HCT-15) y una sana (COS-7).
- Efectuar estudios computacionales de acoplamiento molecular de las nueve piridinas 2,4,6-trisustituidas propuestas con las tres isoformas de AKT.

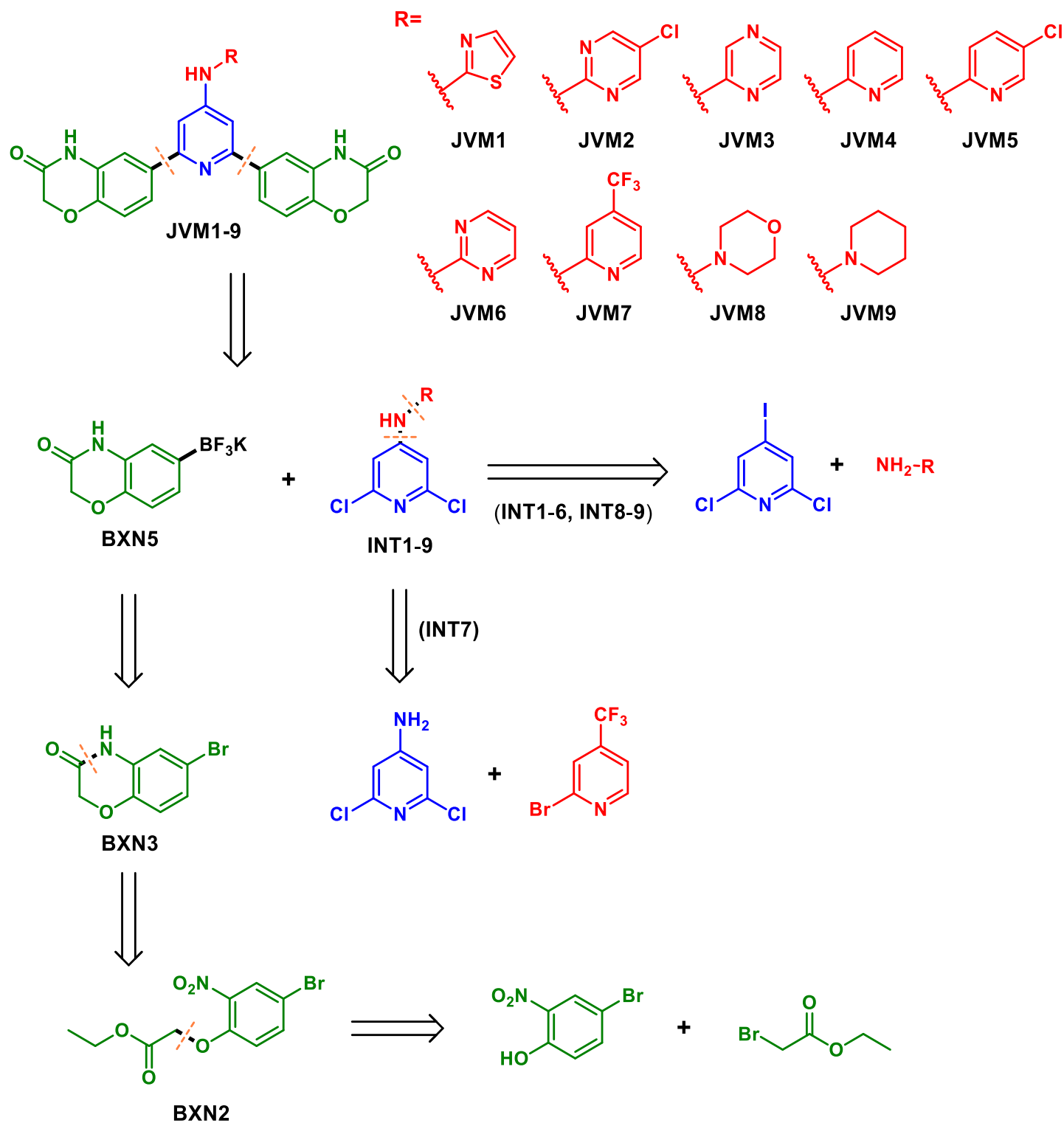
6. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La metodología experimental se presenta dividida en tres secciones, comenzando con la descripción de la parte química, en donde se abordan las metodologías sintéticas para la obtención de los compuestos. Posteriormente, se introduce la parte biológica con el procedimiento realizado para determinar la actividad citotóxica sobre líneas celulares. Finalmente, se muestra la parte computacional que detalla los estudios de acoplamiento molecular de las moléculas preparadas.

6.1. Parte química

La síntesis de las moléculas objetivo se propone utilizando una aproximación de acuerdo con trabajos previos realizados por nuestro grupo de investigación, aunque efectuando algunas modificaciones particulares.^{61,65} De acuerdo con el análisis retrosintético propuesto para la obtención de los compuestos [Esquema 1], es posible observar que la desconexión en las posiciones 2,6 del *scaffold* de piridina da origen a la serie de intermediarios 4-amino-*N*-(heteroarilo)-2,6-dicloropiridinas denominadas **INT1-9** y el correspondiente reactante derivado de boro, encontrando a la sal de trifluoroborato de potasio de la benzoxazinona (**BXN5**) como el reactante más adecuado y eficaz. De tal forma los compuestos finales se obtendrían mediante un acoplamiento doble de Suzuki-Miyaura.

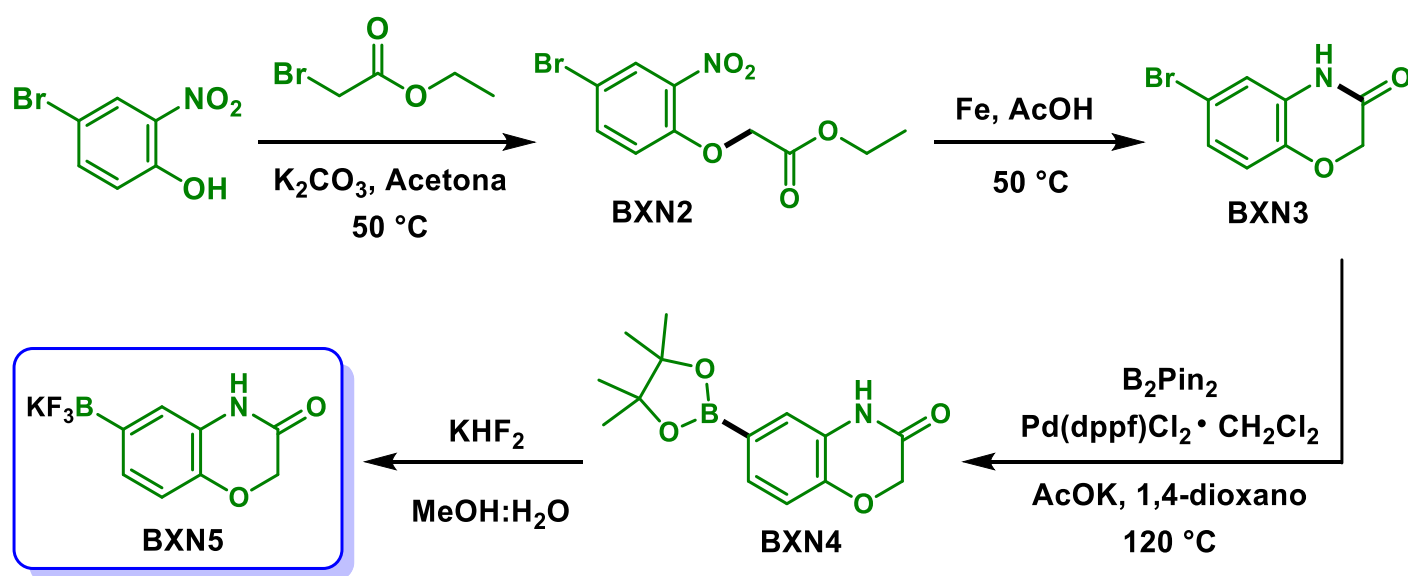
Los intermediarios **INT1-6**, **8** y **9** se desconectaron en la posición 4 dando origen a la 2,6-dicloro-4-yodopiridina y los correspondientes aminoheterociclos debido a su disponibilidad comercial. Mientras que para el compuesto **INT7** se plantea el uso de 4-amino-2,6-dicloropiridina y la 2-bromo-4-trifluorometilpiridina como materias primas, debido a la baja disponibilidad comercial de la 2-amino-4-trifluorometilpiridina. Tales materias primas se proponen para efectuar un acoplamiento Buchwald-Hartwig. En lo que respecta a la sal de trifluoroborato de potasio de la benzoxazinona (**BXN5**), la desconexión del enlace B-C da origen al núcleo de 6-bromobenzoxazinona (**BXN3**), la cual proviene de una reducción y ciclocondensación en tándem del (4-bromo-2-nitrofenoxi)acetato de etilo (**BXN2**) en condiciones reductivas. Finalmente, el intermediario **BXN2** se origina de una reacción entre 4-bromo-2-nitrofenol y α -bromoacetato de etilo.



Esquema 3. Análisis retrosintético propuesto para la síntesis de los compuestos **JVM1-9**.

De acuerdo con lo propuesto en el análisis retrosintético mostrado en el **Esquema 3**, todo se reduce a materias primas sencillas de adquirir comercialmente, con las cuales es posible construir la serie 4-aminoheterociclo de piridinas 2,4,6-trisustituidas.

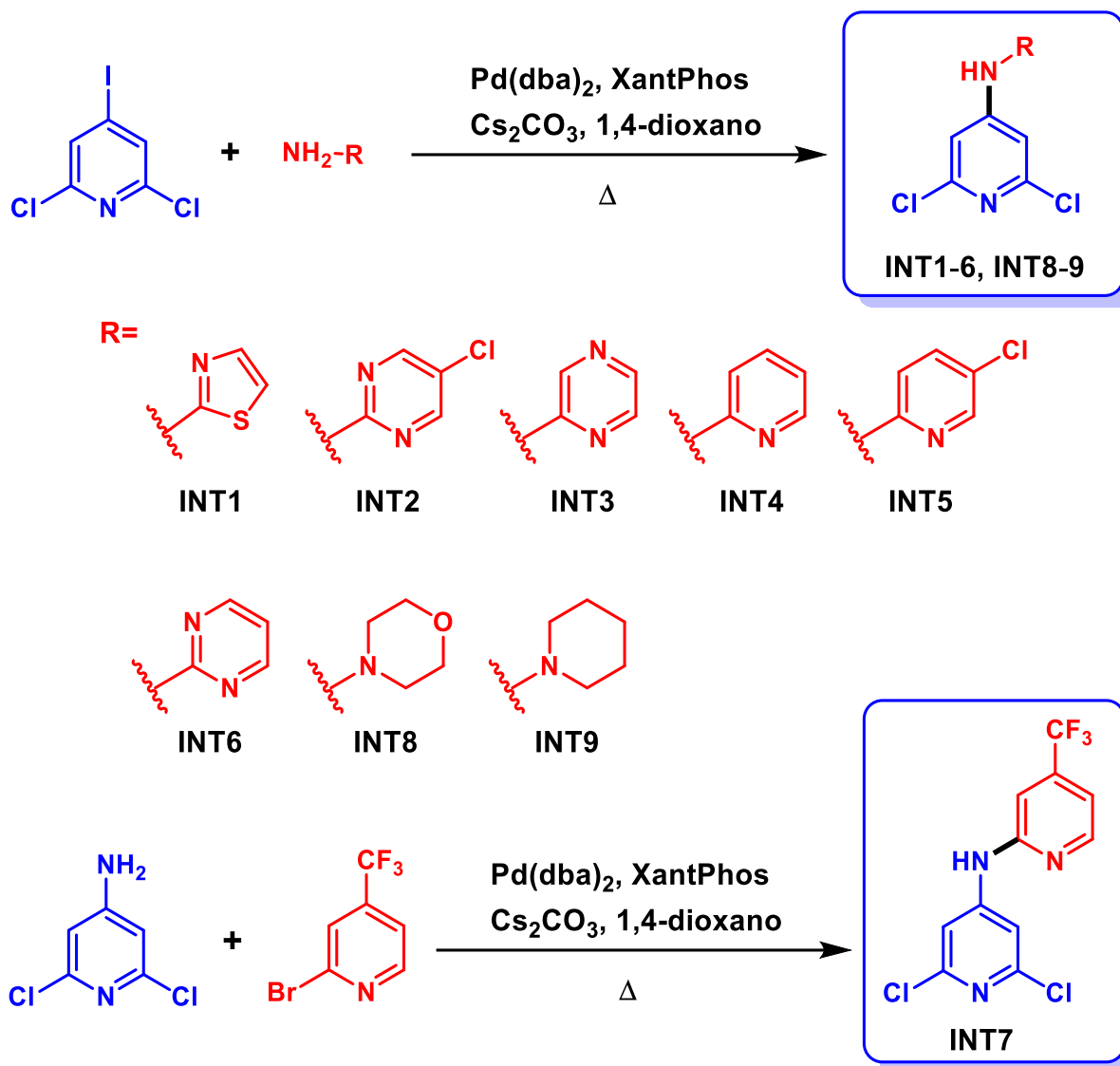
La ruta sintética [Esquema 4] partió del 4-bromo-2-nitrofenol y α -bromoacetato de etilo que mediante una reacción de S_N2 se hicieron reaccionar en medio básico dando así al (4-bromo-2-nitrofenoxi)acetato de etilo (**BXN2**). Después se efectuó una reacción en tándem, donde en un primer paso se llevó a cabo la reducción del grupo nitro de **BXN2** a un grupo amino debido a la presencia de Fe en exceso y medio ácido. Posteriormente, se efectuó *in situ* una ciclocondensación originando así a la 6-bromo-2*H*-1,4-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona (**BXN3**). El compuesto **BXN3** se sometió a una borilación de Miyaura bajo condiciones estándar con diborobis(pinacolato) (B_2Pin_2), $Pd(dppf)Cl_2 \cdot CH_2Cl_2$ y medio básico dando origen a la 6-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona (**BXN4**). Finalmente, el compuesto **BXN4** se transformó en la sal de trifluoro(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-6-il)borato de potasio (**BXN5**) mediante el tratamiento con un exceso de bifluoruro de potasio (KHF_2) en medio acuoso-metanólico.



Esquema 4. Ruta sintética para la obtención de la sal de trifluoro(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-6-il)borato de potasio (**BXN5**).

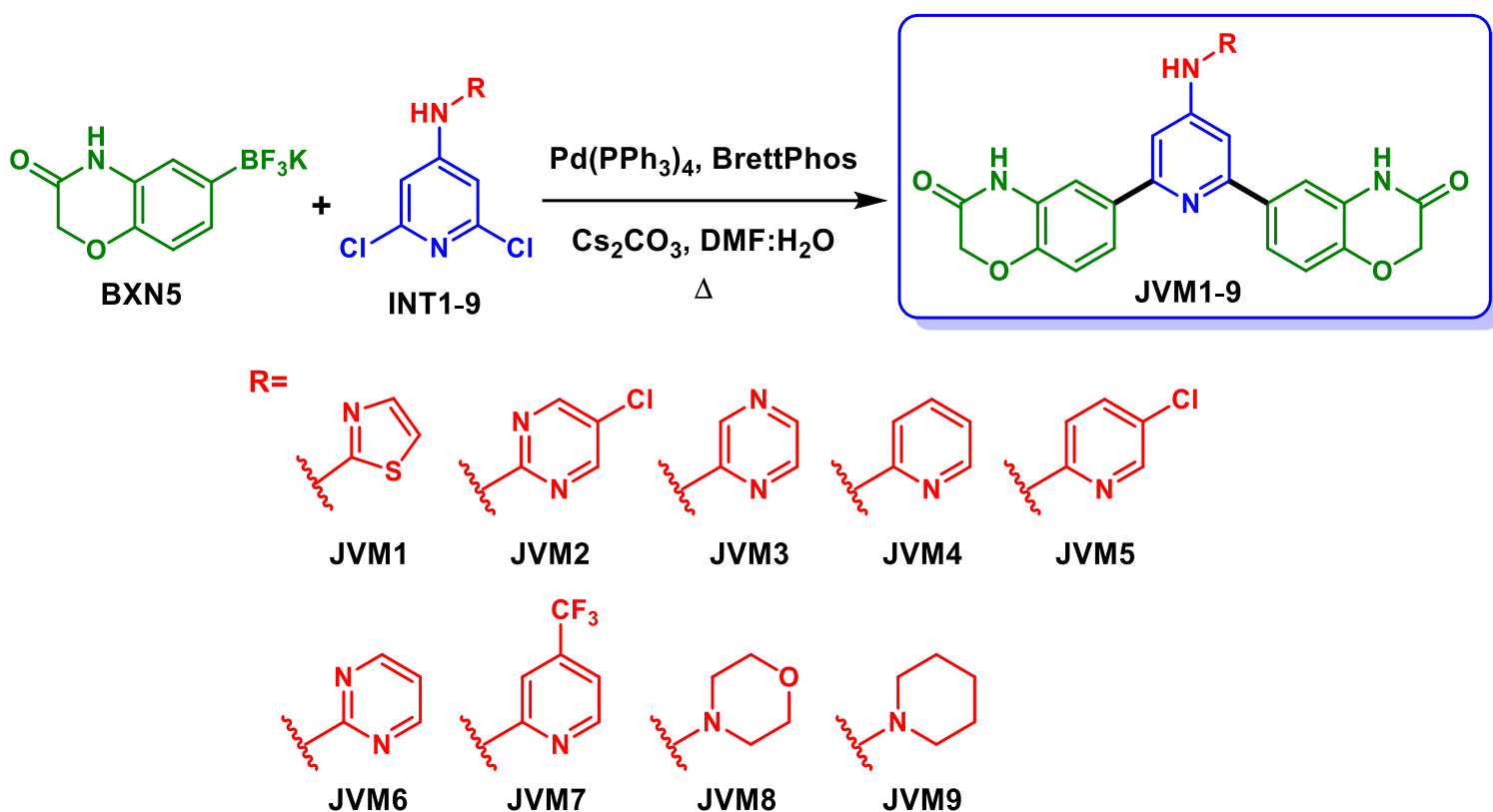
En lo que respecta a la síntesis de los intermediarios **INT1-6, 8 y 9** se partió de la 2,6-dicloro-4-yodopiridina y se efectuaron acoplamiento cruzados de Buchwald-Hartwig, utilizando para ello la correspondiente heteroarilamina, $Pd(dba)_2$ como fuente de paladio, XantPhos como ligante auxiliar, Cs_2CO_3 como base y 1,4-dioxano como disolvente, bajo condiciones de calentamiento convencional. Mientras que para el intermediario **INT7** se utilizó 4-amino-2,6-

dicloropiridina como materia de partida, 2-bromo-4-trifluorometilpiridina como reactivo complementario al acoplamiento y semejantes condiciones de reactivos (paladio, ligante, base, disolvente) a los anteriormente descritos [Esquema 5].



Esquema 5. Acoplamientos cruzados de Buchwald-Hartwig, para la obtención de los intermediarios **INT1-9**.

Finalmente, se efectuaron acoplamientos Suzuki-Miyaura partiendo de los intermediarios **INT1-9**, la sal de trifluoroborato de potasio de la benzoxazinona (**BXN5**), $\text{Pd(PPh}_3)_4$ como fuente de paladio, BrettPhos como ligante auxiliar, Cs_2CO_3 como base y una mezcla de DMF:H₂O como disolvente, bajo condiciones de calentamiento [Esquema 6].



Esquema 6. Acoplamiento cruzado de Suzuki-Miyaura, para la obtención de los compuestos finales **JVM1-9**.

6.2. Parte biológica

6.2.1. Ensayos en líneas celulares

Los ensayos de inhibición del crecimiento en líneas celulares se realizaron en el Laboratorio de Pruebas Biológicas (LSA) del Instituto de Química, UNAM, utilizando la metodología de Sulforodamina B. Las líneas celulares empleadas fueron las siguientes, mostrando entre paréntesis su procedencia:

- **DU-145:** Cáncer de próstata (ATTC).
- **PC-3:** Cáncer de próstata (NCI).
- **MCF-7:** Cáncer de mama ER⁺ (NCI).
- **MDA-MB-231:** Cáncer de mama triple negativo (ATTC).
- **HCT-15:** Cáncer de colon.
- **COS-7:** Línea celular de riñón de mono no cancerosa (Centro Médico Nacional Siglo XXI).

Las líneas celulares, anteriormente mencionadas, se cultivaron en el medio RPMI-1640, mediante la adición de suero fetal bovino (10%) y una mezcla de antibióticos-antimicótico. Posteriormente, en cada microplaca de 96 pozos se depositaron dos líneas celulares por triplicado en un volumen de 100 µL/pozo y se incubaron durante 24 h a 37 °C bajo una atmósfera de 5% de CO₂ para favorecer estabilidad.

Para efectuar el análisis primario, los compuestos a evaluar (**JVM1-9**, **Gefitinib**) se solubilizaron en DMSO a una concentración de 20 µM. Después se tomó una alícuota de la disolución de prueba y se diluyó en medio de cultivo suplementado para alcanzar la concentración de 0.05 (**JVM1-8**, **Gefitinib**) o 0.025 mM (**JVM9**, **Gefitinib**). Subsecuentemente, se adicionaron 100 µL de la solución preparada con anterioridad a la microplaca, para después incubar dicha placa durante 48 h bajo las condiciones previamente mencionadas.

Al finalizar el periodo de incubación, las células se fijaron *in situ* añadiendo 50 µL de una solución de CF₃COOH frío al 50% y se incubaron a 4 °C durante 60 min. Después se desechó el sobrenadante y se realizaron 5 lavados con agua fría para finalmente dejar secar a temperatura ambiente.

Para efectuar el teñido de las células fijadas al pozo, se añadió 100 µL de una solución al 0.4% de sulforrodamina B (SRB) y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. La SRB no unida se removió con lavados de CH₃COOH al 1% y se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 100 µL de solución amortiguadora Tris y se agitó durante 10 min para favorecer la disolución del complejo. Luego se midió la densidad óptica (DO) en un lector de microplacas a una λ= 515 nm.

Los datos se procesaron obteniendo el promedio de la DO de los 3 pozos/línea tratados con el compuesto (DO_t), los tres pozos tratados con DMSO (DO_c) y 2 pozos testigos (DO_b; aquellos que no presentan células, pero sí compuesto). El % de inhibición del crecimiento (%IC) se calculó con la siguiente operación:

$$\%IC = 100 - \left(\frac{DO_t - DO_b}{DO_c - DO_b} \right) * (100)$$

6.3. Parte computacional

6.2.1. Acoplamiento molecular efectuado con AutoDock

Para la preparación de los ligandos (**JVM1-9**), éstos se construyeron en el software Spartan 10, optimizando su geometría mediante el método semi-empírico PM6.⁷² Posteriormente, mediante el programa AutoDock 4.2 y su interfaz gráfica AutoDock 1.5.4, se fusionaron los átomos de hidrógeno no polares con sus correspondientes carbonos, se detectaron los centros de torsión y los enlaces rotables de la molécula.⁶¹

Posteriormente se realizó el acoplamiento molecular con la metodología rígido-flexible, con las tres isoformas de AKT (PDB AKT1: 4GV1, AKT2: 1O6L y el modelo de AKT3 construido por homología previamente por nuestro grupo de investigación)⁶¹ con el programa AutoDock 4.2, su interfaz gráfica AutoDock 1.5.4 y el programa complementario Autogrid4. La caja de búsqueda se centró en las coordenadas (x,y,z) -21.505, 0.360, 12.009 para AKT1, para AKT2 37.062, 29.854, 110.522 y para AKT3 -21.778, 0.465, 11.822; todos utilizando 60x60x60 puntos de tamaño y un espaciado de 0.375 Å. Las moléculas de agua y el sustrato GSK-3 β fueron removidas de las proteínas obtenidas del PDB durante la preparación de éstas.

La búsqueda de los complejos de unión más favorables se realizó con el programa AutoDock 4.2, utilizando el algoritmo genético Lamarckiano como método de búsqueda conformacional, con un total de 20 corridas, un tamaño de población de 150 conformeros, un número máximo de 2 500 000 evaluaciones energéticas y 27 000 generaciones.⁷³ Se seleccionaron los modos de interacción con menor energía de unión y el mayor tamaño de clúster.

6.2.2. Acoplamiento molecular efectuado con Maestro

Para realizar la preparación de los ligandos (**JVM1-9**) se utilizó el módulo “*LigPrep*” acoplado al complemento “*Epik*” del software Maestro 11.6 (*Schrödinger Release 2018-2*).⁷⁴ Las moléculas se minimizaron con un campo de fuerza OPLS_2005 bajo condiciones estándar del programa. Las conformaciones más favorables se seleccionaron con el criterio de menor valor en el estado de penalización del software. El acoplamiento molecular se efectuó mediante el módulo “*Glide*”, utilizando en primera instancia el módulo “*Protein Preparation Wizard*” para preparar las tres isoformas de la enzima (PDB AKT1: 4GV1, AKT2: 1O6L y el modelo de AKT3 construido por homología previamente por nuestro grupo de investigación)⁶¹ mediante una minimización con un campo fuerza OPLS_2005. Posteriormente, se

construyeron las cajas de búsqueda utilizando cubos de 10x10x10 Å en las coordenadas (x,y,z) -21.505, 0.360, 12.009 (AKT1), 37.062, 29.854, 110.522 (AKT2) y -21.778, 0.465, 11.822 (AKT3), respectivamente.

Finalmente, para realizar el acoplamiento molecular se utilizó el modo “*Flexible*” con la precisión *XP (Extra Precision)* bajo condiciones estándar. Se seleccionaron los modos de interacción con menor energía de unión y el menor valor en el estado de penalización del software.

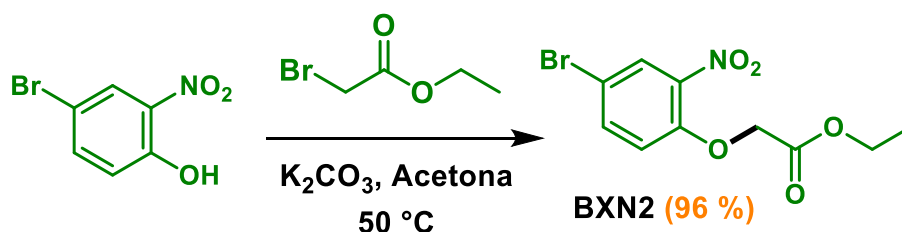
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Esta sección se encuentra dividida en tres partes. La primera parte describe los resultados de la síntesis química, en donde se exponen las particularidades de las metodologías empleadas, la caracterización física, espectroscópica y espectrométrica de los compuestos obtenidos. Posteriormente, se muestran los resultados de los ensayos biológicos en líneas celulares y finalmente se abordan los resultados de los estudios computacionales de acoplamiento molecular.

7.1. Parte química

7.1.1. Síntesis de los intermediarios BXN2 a BXN5

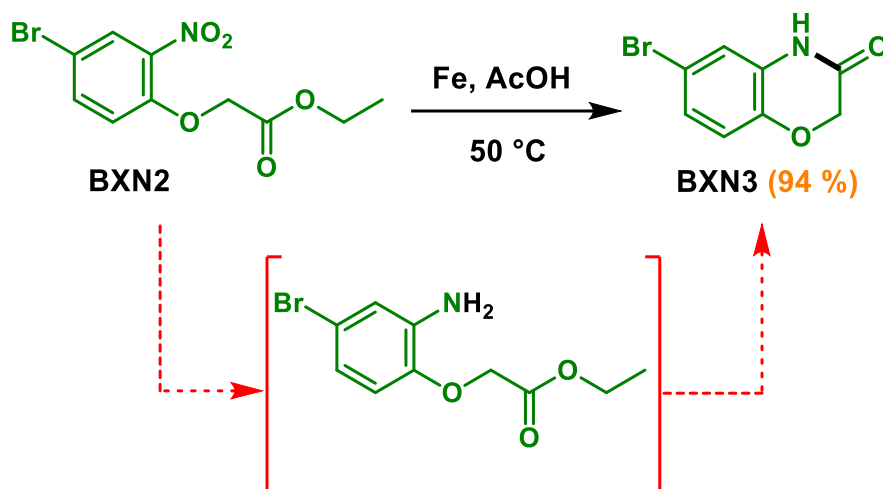
La síntesis del intermediario **BXN5** partió del 4-bromo-2-nitrofenol, el cual se sometió a una reacción de S_N2 con 1.5 eq de α -bromoacetato de etilo en medio básico (1.5 eq de K_2CO_3) y acetona como disolvente para formar al (4-bromo-2-nitrofenoxi)acetato de etilo (**BXN2**) [Esquema 7].



Esquema 7. Reacción de S_N2 efectuada para la obtención de **BXN2**.

La metodología empleada resultó altamente eficiente debido a que se obtuvo un rendimiento del 96% con alta pureza. La identificación estructural de **BXN2** se llevó a cabo mediante RMN, donde en el espectro de RMN 1H (**Espectro 1**) se observaron dos señales características del etilo del éster; una señal triple en 1.19 ppm que integró para 3H (CH_3 -) y una señal cuádruple en 4.16 ppm que integró para 2H ($-CH_2-$). Además, en 5.03 ppm se observó una señal simple que integró para 2H, correspondiente al metileno adyacente al grupo carbonilo. En RMN ^{13}C (**Espectro 2**) se observaron las señales correspondientes a los fragmentos anteriormente mencionados en 14.07, 61.04, y 65.72 ppm, respectivamente. En IR (**Espectro 3**) se observó la banda característica del grupo carbonilo de éster ($\nu_{C=O}$ éster) en 1747.60 cm^{-1} .

Posteriormente, el compuesto **BXN2** se sometió a una reducción y posterior ciclación en tándem. En la primera etapa el compuesto se hizo reaccionar con 11 eq de Fe metálico en medio ácido (exceso de AcOH) con la finalidad de reducir el grupo nitro a amino. Después, el grupo amino reaccionó con el grupo éster de manera intramolecular, ocasionando la formación del anillo y con ello originando a la 6-bromo-2*H*-1,4-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona (**BXN3**) con un rendimiento global del 94% [Esquema 8].

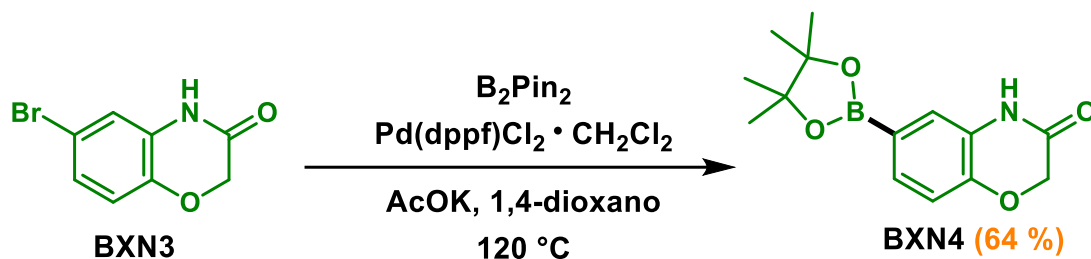


Esquema 8. Reacción de reducción y ciclación en tándem para la obtención de **BXN3**. Se muestra el intermediario no acilado, producto de la reducción del grupo nitro.

La reacción efectuada para la obtención de **BXN3** proporcionó excelentes resultados debido al buen rendimiento obtenido (95%). El uso de Fe metálico frente a otras metodologías disponibles para la reducción de grupos nitro, tales como Pd/C o Ni-Raney, resultó fundamental debido a que las últimas metodologías mencionadas son capaces de efectuar reacciones de hidrogenólisis en haluros de arilo, lo que comprometería al bromo presente en la molécula de partida y en el producto de la reacción. El espectro de RMN ^1H (**Espectro 5**) del compuesto **BXN3** evidenció la desaparición de la señal de etilo, así como la aparición de una señal ancha en 10.78 ppm que integró para 1H, correspondiente al grupo NH de la lactama. En RMN ^{13}C (**Espectro 6**) se observó de igual forma la desaparición de las señales del etilo del grupo éster. En IR (**Espectro 7**) se observó la banda de grupo carbonilo de amida en 1678.46 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=O amida}}$).

En un paso siguiente se efectuó una borilación de Miyaura, la cual se realizó mediante el uso de 1 eq de diborobis(pinacolato) (B_2Pin_2), 5% mol de $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2 \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$

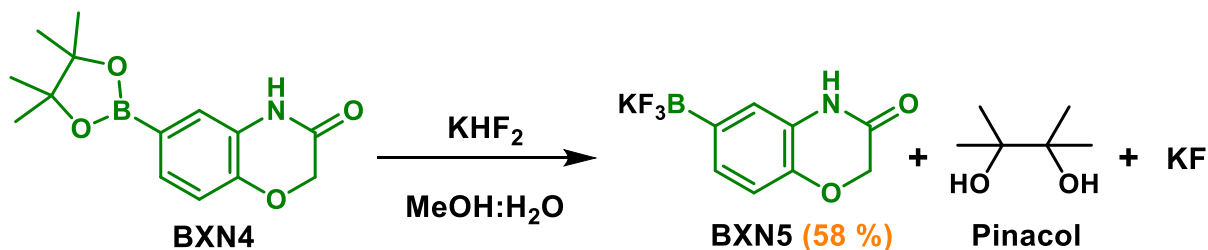
([1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio (II) acomplejado con diclorometano) como fuente de paladio y 3 eq de AcOK bajo atmósfera de N₂ [Esquema 9].



Esquema 9. Reacción de borilación de Miyaura utilizada para la obtención de **BXN4**.

Después de efectuar la borilación de Miyaura y realizar la correspondiente purificación, se obtuvo el compuesto **BXN4** con un rendimiento del 64%. En el espectro de RMN ¹H (**Espectro 9**) se observó una señal simple en 1.27 ppm que integró para 12H, correspondiente a los cuatro metilos del éster borónico introducidos en la molécula. En RMN ¹³C (**Espectro 10**) se visualizó una señal en región alifática (25.08 ppm) de los grupos metilo y otra señal de carbono unido a heteroátomo en 84.02 ppm correspondiente a los carbonos cuaternarios adyacentes a los metilos. En IR (**Espectro 11**) se visualizaron las bandas principales en 3362.35, 2978.91, 1690.49 y 1349.33 cm⁻¹ correspondientes a las vibraciones de los enlaces N-H, C-H sp³, C=O de amida y C-B respectivamente. En EMAR (**Espectro 12**) se visualizó el ion correspondiente al [M + H]⁺ en 276.1408 *m/z* lo que confirmó la presencia del compuesto **BXN4**.

Finalmente, el compuesto **BXN4** se sometió a una reacción de fluoración mediante la adición de un exceso de bifluoruro de potasio (KHF₂) en una mezcla 1:1 de MeOH:H₂O utilizada como disolvente [Esquema 10].



Esquema 10. Reacción de fluoración del éster borónico para la obtención de **BXN5**.

Es importante mencionar que para efectuar el tratamiento de la sal de trifluoroborato **BXN5** se siguió la metodología descrita por el grupo de Aggarwal, quienes demostraron la interferencia del grupo pinacol en el proceso de purificación de este tipo de sales de organoboro. Es destacable que en su trabajo se encontró que el pinacol puede formar un azeótropo con el agua y mediante un vacío moderado (alcanzado con un rotaevaporador) puede ser removido mediante destilación. También observaron que las sales de trifluoroborato pueden someterse al proceso descrito anteriormente en repetidas ocasiones en un medio metanólico-acuoso (1:1) sin notable descomposición de los compuestos mediante protodeboronación.⁷⁵ En ese sentido se efectuó la destilación azeotrópica de la mezcla de pinacol-agua-metanol de manera satisfactoria.

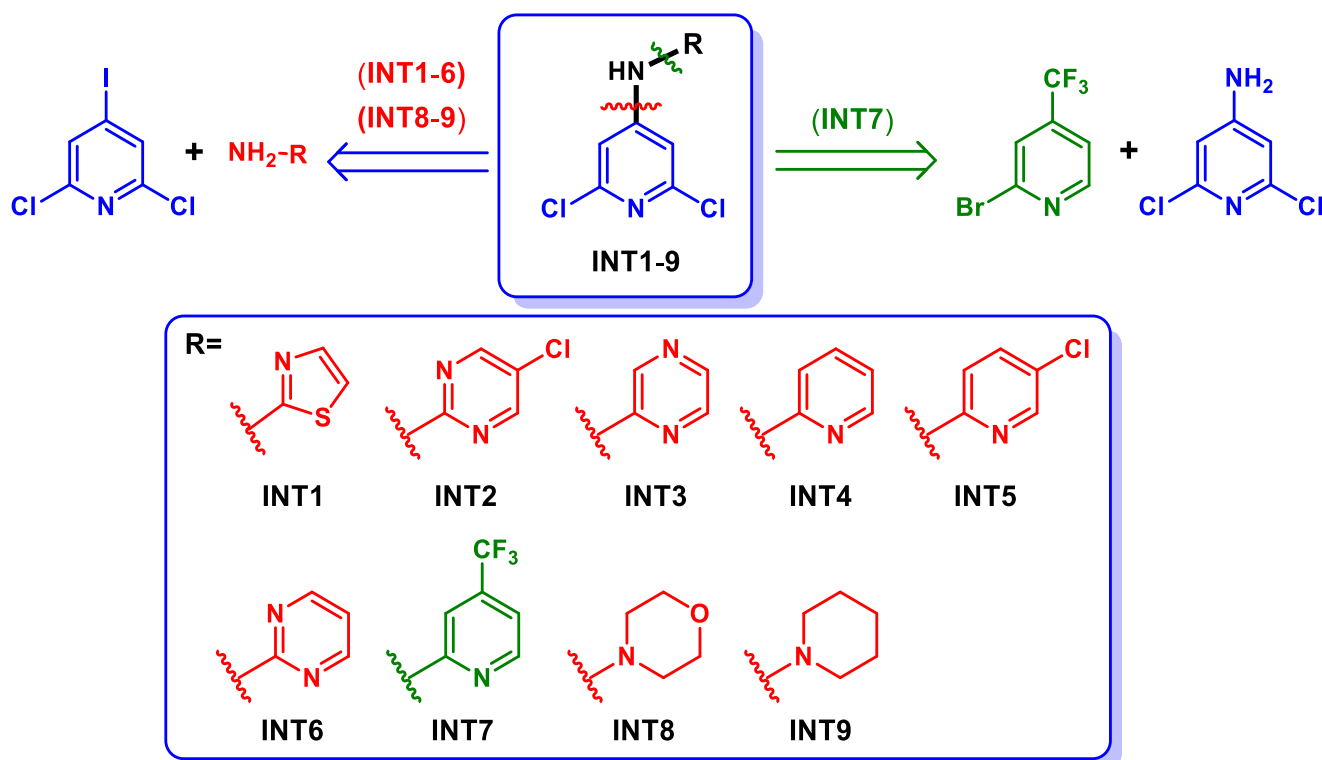
Posteriormente se procedió a purificar el sólido obtenido de la destilación azeotrópica, mediante la metodología descrita por Aggarwal, la cual consiste en calentar el sólido obtenido en acetona caliente repetidas veces, filtrando el sólido suspendido y recuperando el disolvente para después concentrarlo a sequedad. De esta forma se ha reportado que se puede eliminar el exceso de KHF_2 o bien el KF producido en la reacción de fluoración.⁷⁵ Sin embargo, el compuesto **BXN5** mostró una baja solubilidad en acetona caliente por lo que dicho proceso se repitió una gran cantidad de veces para recuperar una cantidad significativa de compuesto. El mismo proceso se intentó con otros disolventes como metanol o etanol sin obtener resultados más favorables que los obtenidos con acetona. Finalmente, se intentó la purificación mediante la metodología de extracción en Soxhlet, pero los resultados tampoco fueron favorables debido a la baja solubilidad del compuesto.

De tal forma que se obtuvo el compuesto **BXN5** con un rendimiento del 58%, contemplando la purificación. En el espectro de RMN ^1H (**Espectro 13**) se observaron exclusivamente las señales de la entidad de la benzoxazinona en región aromática (dos señales dobles en 6.85 y 7.07 ppm, una señal simple en 6.95 ppm) y una señal simple en 4.50 ppm correspondientes al metileno. En RMN ^{13}C (**Espectro 14**) se verificaron las señales observadas en RMN ^1H . En RMN ^{11}B (**Espectro 15**) se observó una señal única cuádruple en -1.12 ppm con una $J(^{11}\text{B}-^{19}\text{F})$ de 15 Hz, mientras que en RMN ^{19}F (**Espectro 16**) se observó una señal ancha en -143.21 ppm conformando así la presencia de un grupo trifluoroborato en la molécula, como es reportado por Oliveira *et al.*⁷⁶ En lo que respecta al espectro de IR (**Espectro 17**) se

observaron las bandas características de un grupo N-H en 3352.80 cm^{-1} ($\nu_{\text{N-H}}$) y de un grupo carbonilo de amida en 1672.03 ($\nu_{\text{C=O amida}}$).

7.1.2. Síntesis de los intermediarios INT1-9

Para la síntesis de las 4-amino-*N*-(heteroarilo)-2,6-dicloropiridinas (**INT1-9**) se planteó un acoplamiento Buchwald-Hartwig partiendo en primera instancia para la síntesis de todos los compuestos de la 2,6-dicloro-4-yodopiridina y el correspondiente aminoheteroarilo bajo condiciones catalíticas de Pd. La elección de realizar la desconexión de tal forma se debió a la buena disponibilidad comercial de las materias primas (aminoheteroarilos) con excepción de la 2-amino-4-trifluorometilpiridina, necesaria para la preparación de la molécula **INT7**. Dicha materia prima presentó poca disponibilidad comercial y elevados costos por lo que se decidió efectuar la desconexión de forma inversa, dando como reactantes a la 2-bromo-4-trifluorometilpiridina y la 4-amino-2,6-dicloropiridina [**Esquema 11**].



Esquema 11. Desconexiones efectuadas para la preparación de los intermediarios **INT1-9**.

Las condiciones de reacción para efectuar los acoplamientos Buchwald-Hartwig se basaron en las descritas por el grupo de Buchwald *et al.*, exceptuando el uso de tolueno como disolvente y sustituyéndolo por 1,4-dioxano, debido a cuestiones de mayor solubilidad de los reactantes en este último disolvente mencionado.⁷⁷

Tabla 5. Condiciones experimentales para la síntesis de los compuestos INT1-9.

Reactante 1	Reactante 2	Producto	%mol de Pd(dba) ₂	Temperatura (°C)	Tiempo de reacción (h)	Rendimiento (%)*
		INT1	5	65	10	91.8
		INT2	5	60	18	85.6
		INT3	5	60	16	96.0
		INT4	5	65	15	81.0
		INT5	5	65	18	83.0
		INT6	5	65	12	82.4
		INT8	10	75	24	64.7
		INT9	10	75	24	51.6
		INT7	10	90	24	52.4

Condiciones de las reacciones: 10% mol de XantPhos y 2.5 eq de Cs₂CO₃. *Rendimiento considerando el proceso de purificación mediante cromatografía en columna con gel de sílice utilizando diversas fases móviles (ver Anexo I: Procedimientos experimentales).

En la **Tabla 5** se resumen las condiciones experimentales de los acoplamientos de Buchwald-Hartwig realizados y se muestran los rendimientos obtenidos considerando el proceso de purificación.

En primer lugar, es importante mencionar que el tipo de haluro de arilo utilizado en un acoplamiento cruzado catalizado por paladio, puede tener un impacto muy significativo en cuestiones de reactividad y selectividad. Se tiene perfectamente estudiado que la distancia y fuerza del enlace C-X (a mayor distancia, menor fuerza del enlace) ocasiona un gran impacto en cuestiones de reactividad en este tipo de reacciones. De tal forma que la reactividad de los haluros de arilo corresponde a $I > Br >> Cl$, en las reacciones de acoplamiento cruzado.⁶⁷ Por tal razón los acoplamientos efectuados con la 2,6-dicloro-4-yodopiridina y el correspondiente aminoheterociclo presentaron tiempos de reacción relativamente cortos, requirieron temperaturas menores y tuvieron mejores rendimientos, con excepción de los compuestos **INT8** e **INT9** que presentaron un factor adicional que se explicará en breve. Por otra parte, en todos los experimentos efectuados no se observaron probables acoplamientos en las posiciones 2,6 de la piridina con los aminoheterociclos, ni se observaron subproductos de homoacoplamiento en los heterociclos que presentan un haluro (2-amino-5-cloropirimidina y 2-amino-5-cloropiridina), debido, una vez más, a la menor reactividad del cloro frente al yodo.

En lo que respecta a los compuestos **INT8** e **INT9** se observaron menores rendimientos de reacción, lo cual se deba probablemente a las diversas conformaciones que pueden adoptar las materias primas *N*-4-aminomorfolina y *N*-1-aminopiperidina, dando lugar a una menor cantidad de colisiones efectivas y por ende una reactividad disminuida. Una de las estrategias empleadas para mejorar los rendimientos en la preparación de tales intermediarios consistió en aumentar el % mol de paladio, la temperatura y los tiempos de reacción. Dicha estrategia fue efectiva significativamente alcanzando rendimientos de más del 50% [**Tabla 5**]. En la síntesis de los compuestos **INT1-7** se observó que aumentar los tiempos de reacción o bien las temperaturas tuvo efectos negativos ya que se originaban diversas impurezas. Debido a la polaridad en CCF de algunas impurezas, podría plantearse la presencia de subproductos de homoacoplamiento o reducción del haluro de arilo, los cuales son ampliamente reportados en la literatura en las reacciones de acoplamiento cruzado catalizadas por paladio.⁷⁸

En lo que respecta al acoplamiento efectuado entre la 4-amino-2,6-dicloropiridina y la 2-bromo-4-trifluorometilpiridina se puede destacar que se requirió un aumento en el %mol de Pd usado, la temperatura y el tiempo de reacción. Esto es debido a la baja nucleofilia del aminoheteroarilo por cuestiones de resonancia del par libre de electrones del grupo amino con el sistema aromático π -deficiente como lo es la piridina, además de que presenta dos sustituyentes atractores de densidad electrónica en las posiciones 2 y 6.

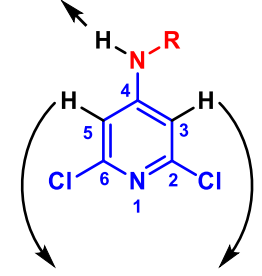
Finalmente, el uso de los ligantes resulta de gran importancia en la catálisis utilizando química de metales de transición debido a que estabilizan al centro metálico y son capaces de modular las propiedades estéricas y electrónicas de éste. Existe una gran diversidad de ligantes, en donde se destacan las fosfinas, aminas y, en fechas recientes, los carbenos de imidazol. Es importante mencionar que los sistemas catalíticos pueden proporcionar diferentes resultados dependiendo de los sustratos utilizados y las condiciones de reacción, lo cual puede dificultar la elección de las condiciones más óptimas. En el caso particular de los acoplamientos efectuados se utilizó el ligante XantPhos, el cual proporcionó buenos resultados con todos los sustratos desde su primer uso, por lo que no se realizaron experimentos adicionales para explorar el uso de otros ligantes. Dicho ligante ha sido reportado ampliamente en reacciones de aminación de diversos sustratos por el grupo de Buchwald.⁷⁷

La caracterización espectroscópica se encuentra dividida en primera instancia con los patrones comunes observados en los espectros de ^1H y ^{13}C de los nueve intermediarios. Posteriormente, se muestran las señales particulares de la sustitución en la posición 4 de la piridina. En el caso particular de todos los espectros de ^1H de los intermediarios **INT1-7** (**Espectros 19, 23, 27, 31, 36, 40 y 44**) se observó una señal simple en el intervalo de 7.66 hasta 7.88 ppm, la cual integró para 2H y corresponde a los hidrógenos presentes en la estructura base de la piridina en posiciones 3 y 5. Además, se observó otra señal en común en tales espectros, correspondiente al grupo NH en posición 4 de la piridina, en una región de 10.07 a 11.16 ppm, la cual se caracterizó por integrar para 1H y desaparecer mediante intercambio con óxido de deuterio. En lo que respecta a los compuestos **INT8** y **9**, las mismas señales mencionadas anteriormente aparecieron en otras regiones debido al uso de otro disolvente. En el caso de las señales de los hidrógenos de la piridina, éstas se observaron en 6.68 ppm para **INT8** y 6.64 ppm para **INT9**, mientras que la influencia

electrónica del enlace N-N desplazó la señal del grupo NH a campo alto (5.23 ppm para **INT8** y 5.20 ppm para **INT9**) (**Espectros 48 y 52**) [Tabla 6].

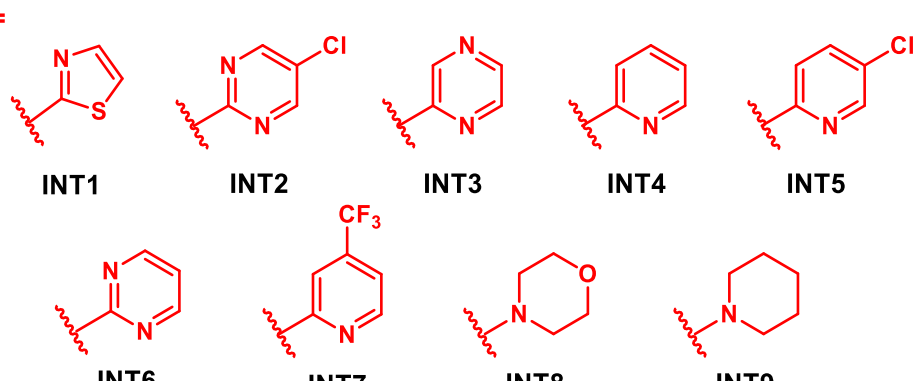
Tabla 6. Caracterización espectroscópica mediante RMN de ^1H de los compuestos **INT1-9**.

INT1-7: 10.07 - 11.16 ppm
INT8 y 9: 5.23 y 5.20 ppm



INT1-7: 7.66 - 7.88 ppm
INT8 y 9: 6.68 y 6.64 ppm

R=



Compuesto	Señales de H3 y H5 en la piridina base (ppm)	Señal del grupo NH (ppm)	Señales de los sustituyentes en posición 4 de la piridina base (ppm)
INT1	7.66	11.16	7.18 (d, 1H, $J= 3.6$ Hz), 7.34 (d, 1H, $J= 3.6$ Hz).
INT2	7.80	10.80	8.74 (s, 2H).
INT3	7.75	10.47	8.20 (d, 1H, $J= 2.7$ Hz), 8.32 (d, 1H, $J= 1.4$ Hz), 8.34 (dd, 1H, $J= 2.7, 1.4$ Hz).
INT4	7.78	10.07	6.95 (d, 1H, $J= 8.3$ Hz), 7.01 (dd, 1H, $J= 6.8, 5.1$ Hz), 7.72 – 7.77 (m, 1H), 8.34 (d, 1H, $J= 3.4$ Hz).
INT5	7.70	10.21	6.97 (d, 1H, $J= 8.9$ Hz), 7.82 (d, 1H, $J= 8.8, 2.7$ Hz), 8.37 (d, 1H, $J= 2.3$ Hz).
INT6	7.88	10.62	7.11 (t, 1H, $J= 4.8$ Hz), 8.67 (d, 2H, $J= 4.8$ Hz).
INT7	7.75	10.39	7.19 (s, 1H), 7.31 (d, 1H, $J= 5.3$ Hz), 8.58 (d, 1H, $J= 5.3$ Hz).
INT8	6.68	5.23	2.76 (sa, 4H), 3.81 (sa, 4H).
INT9	6.64	5.20	1.41 (sa, 2H), 1.67 – 1.72 (m, 4H), 2.65 (sa, 4H).

Nota: Los espectros de RMN de los compuestos **INT1-7** se determinaron en DMSO y los de los compuestos **INT8 y 9** en CDCl_3 .

Tabla 7. Caracterización espectroscópica mediante RMN de ^{13}C e IR y espectrométrica (EMAR) de los compuestos **INT1-9**.

Compuesto	Señales de RMN ^{13}C (ppm)	Bandas características de IR (cm^{-1})
INT1	109.42, 112.09, 139.26, 149.69, 151.12, 161.72.	3245.21 ($\nu_{\text{N-H}}$), 2918.16 ($\nu_{\text{Ar-H}}$), 1578.29 ($\nu_{\text{N=C}}$).
INT2	110.76, 122.61, 149.50, 151.17, 156.64, 157.07.	3290.70 ($\nu_{\text{N-H}}$), 3033.21 ($\nu_{\text{Ar-H}}$), 1546.49 ($\nu_{\text{N=C}}$).
INT3	110.26, 135.96, 136.84, 141.24, 149.55, 150.56, 151.54.	3397.41 ($\nu_{\text{N-H}}$), 2984.21 ($\nu_{\text{Ar-H}}$), 1592.84 ($\nu_{\text{N=C}}$).
INT4	109.66, 112.71, 117.39, 138.33, 147.39, 149.33, 152.09, 153.83.	3298.84 ($\nu_{\text{N-H}}$), 3116.68 ($\nu_{\text{Ar-H}}$), 1556.59 ($\nu_{\text{N=C}}$).
INT5	109.85, 114.17, 123.46, 138.17, 145.59, 149.44, 151.69, 152.45.	3299.02 ($\nu_{\text{N-H}}$), 3145.19 ($\nu_{\text{Ar-H}}$), 1548.74 ($\nu_{\text{N=C}}$).
INT6	110.64, 115.14, 149.43, 151.58, 158.46, 158.84.	3299.02 ($\nu_{\text{N-H}}$), 3077.68 ($\nu_{\text{Ar-H}}$), 1561.79 ($\nu_{\text{N=C}}$).
INT7	108.26, 110.27, 112.08, 122.73, 138.34, 149.53, 151.41, 154.59.	3301.06 ($\nu_{\text{N-H}}$), 3077.68 ($\nu_{\text{Ar-H}}$), 1557.64 ($\nu_{\text{N=C}}$).
INT8	56.27, 66.79, 105.60, 151.09, 156.39.	3097.91 ($\nu_{\text{Ar-H}}$), 2834.82 (ν_{CH_2}), 1595.47 ($\nu_{\text{N=C}}$), 1428.50 ($\nu_{\text{N-R}}$), 1392.65 ($\nu_{\text{N-R}}$).
INT9	23.29, 25.85, 57.26, 105.41, 150.87, 156.72.	3107.28 ($\nu_{\text{Ar-H}}$), 2933.38 (ν_{CH_2}), 1560.07 ($\nu_{\text{N=C}}$), 1430.58 ($\nu_{\text{N-R}}$), 1397.19 ($\nu_{\text{N-R}}$).

Nota: Los espectros de RMN de los compuestos **INT1-7** se determinaron en DMSO y los de los compuestos **INT8** y **9** en CDCl_3 .

En lo que respecta a la caracterización mediante RMN ^{13}C [**Tabla 7**] de los compuestos **INT1-7** se observaron múltiples señales en la región aromática (108.26 – 161.72 ppm), las cuales corresponden adecuadamente con el número de señales esperadas en las moléculas. En el caso de los intermediarios **INT8** e **INT9** se observaron señales de carbonos alifáticos correspondientes a los sustituyentes morfolina (56.27 y 66.79 ppm) y piperidina (23.29, 25.85 y 58.26 ppm), además de las señales en la región aromática del núcleo de piridina (105.41 – 156.72 ppm).

En la **Tabla 7** también se muestran las bandas características de IR correspondientes a los intermediarios. En los compuestos **INT1-7** se observó la banda de vibración característica del enlace N-H dentro de la región de 3397.41 - 3245.21 cm^{-1} , dependiendo el compuesto. Posteriormente, dentro de la región de 3145.19 - 2984.21 cm^{-1} se observó la banda característica de vibración del enlace Ar-H en todos los intermediarios preparados. De igual forma la banda del enlace N=C apareció dentro de la región de 1595.47 – 1546.49 cm^{-1} . Finalmente, en el caso de los intermediarios **INT8** y **9** se observaron bandas adicionales en las regiones 2834.32 y 2933.38 cm^{-1} (respectivamente), correspondientes a los metilenos de los heteroarilos saturados presentes en la posición 4 de la piridina. Además, se observaron bandas confirmatorias dentro de la región de 1430.58 – 1392.65 cm^{-1} , las cuales corresponden a los metilenos descritos previamente [**Espectros 21, 25, 29, 34, 38, 42, 46, 50 y 54**].

La caracterización espectrométrica se realizó mediante EMAR con la técnica APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*), la cual es considerada de ionización suave frente a otras técnicas existentes, por lo que la fragmentación es muy baja y por lo tanto es posible identificar a los iones moleculares de las especies de interés de forma $[\text{M} + \text{H}]^+$ o bien $[\text{M} + \text{Na}]^+$. En la **Tabla 8** se muestran los resultados obtenidos, donde se destaca la adecuada visualización de todos los iones moleculares correspondientes $[\text{M} + \text{H}]^+$ [**Espectros 22, 26, 30, 35, 39, 43, 47, 51 y 55**].

Otro aspecto que destacar en los espectros obtenidos, es la visualización de la fragmentación lógica de un átomo de cloro de las moléculas **INT1-7**, ya que en tales espectros es posible observar la especie $[\text{M} + \text{H} - \text{Cl}]^+$ con una abundancia considerable en algunos casos y en otros con una abundancia baja. Sin embargo, dicha fragmentación de un átomo de cloro no se observó con las moléculas **INT8** y **9**.

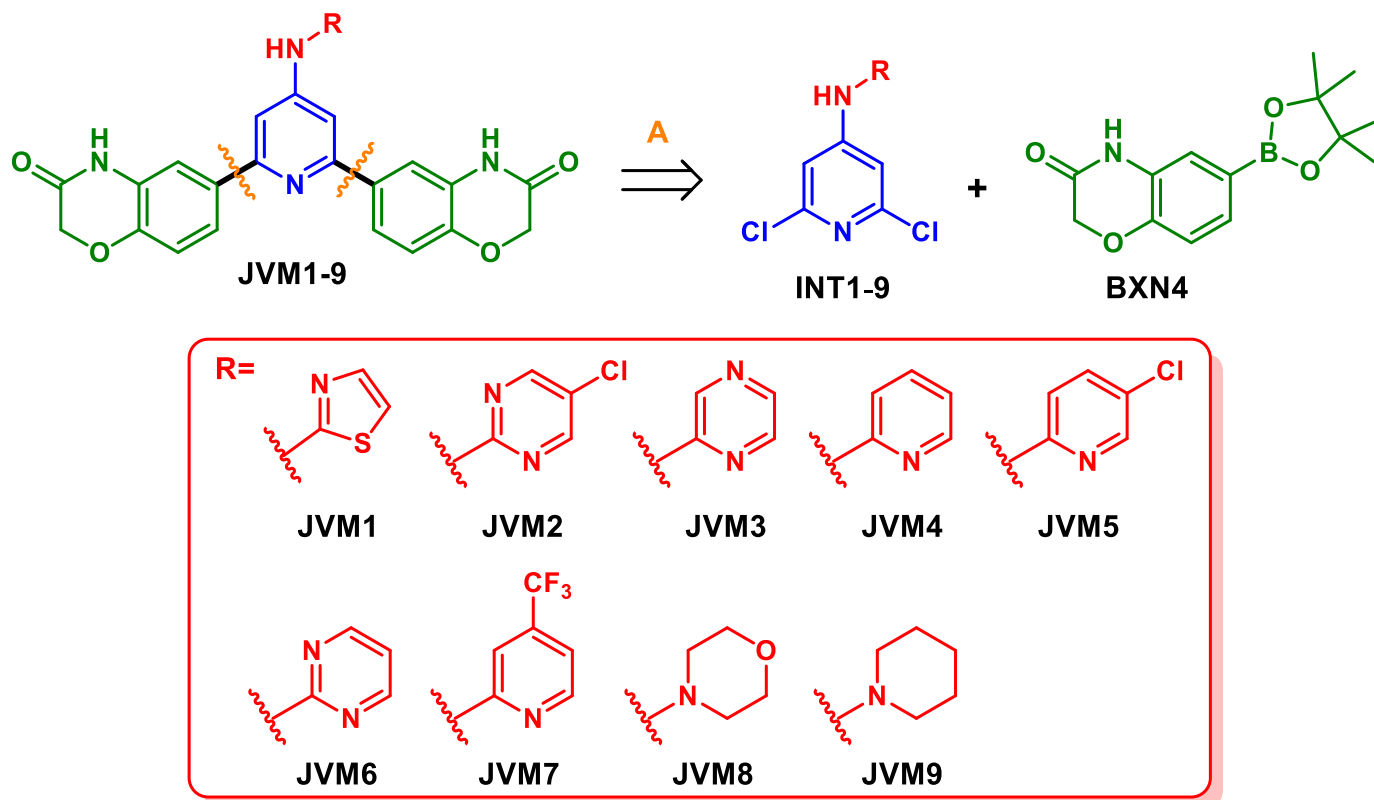
Tabla 8. Caracterización espectrométrica (EMAR) y fragmentación común observada en algunos compuestos (INT1-7).

Compuesto	Masa teórica [M + H] ⁺ (m/z)	EMAR experimental [M + H] ⁺ (m/z)	EMAR experimental [M + H - Cl] ⁺ (m/z)
INT1	245.9654	245.9725	209.9938
INT2	274.9653	274.9661	238.9892
INT3	241.0042	241.0045	205.0267
INT4	240.0090	240.0096	204.0319
INT5	273.9700	273.9705	237.9948
INT6	241.0042	241.0066	205.0292
INT7	307.9964	307.9990	272.0272
INT8	248.0352	248.0392	No observado
INT9	246.0559	246.0587	No observado

7.1.3. Síntesis de los compuestos finales JVM1-9

Para sintetizar los compuestos finales se planteó un acoplamiento Suzuki-Miyaura partiendo de los intermediarios **INT1-9** previamente obtenidos y el éster borónico de la benzoxazinona **BXN4** (Esquema 12). Inicialmente se propuso dicha síntesis mediante las condiciones descritas anteriormente por nuestro grupo, las cuales consistían en el uso del éster borónico **BXN4**, Pd(PPh₃)₄ como fuente de paladio, K₂CO₃ como base y un sistema de MeCN:H₂O 4:1 como disolvente bajo condiciones de calentamiento asistido por microondas (MW, 170 °C durante 40 min).⁶¹

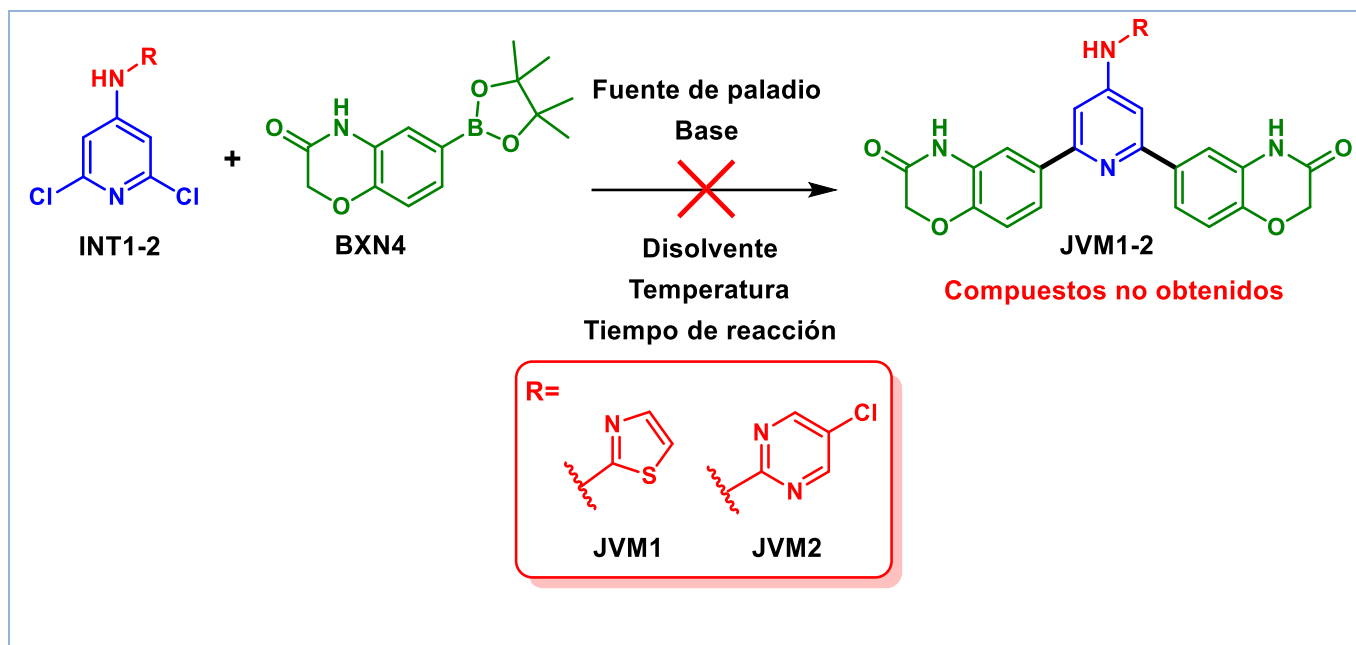
Tales condiciones se probaron con los compuestos **INT1-2** debido a la gran disponibilidad de las materias primas con la finalidad de evaluar la viabilidad de la reacción planteada.



Esquema 12. Desconexión efectuada inicialmente para la preparación de los compuestos finales **JVM1-9**.

Otra razón por la que se utilizaron los intermediarios **INT1-2** correspondió a la naturaleza propia de los compuestos. Respecto al **INT1**, no se tenían reportes previos, en nuestro grupo de trabajo, del acoplamiento Suzuki-Miyaura efectuado con la piridina 2,6-diclorada con sustituyentes de naturaleza heterocíclica aromática en la posición 4 de dicho *scaffold*. Esto es importante ya que en la literatura existe información de que los sustratos con grupos heterocíclicos pueden interferir en los acoplamientos cruzados catalizados por Pd, debido a la presencia de pares de electrones (propios de los heteroátomos como N, O, S), los cuales se coordinan al centro metálico y modifican sus propiedades estéricas y/o electrónicas, ocasionando la disminución o pérdida de la actividad catalítica del metal.^{79,80} En lo que respecta al **INT2**, evaluó la regioselectividad del acoplamiento cruzado, debido a la presencia de otro átomo de Cl el cual podría reaccionar originando al probable producto triacoplado.

Tabla 9. Condiciones experimentales probadas para la preparación de los compuestos finales JVM1 y 2.



Condiciones	Fuente de Pd	Base	Disolvente	Temperatura (°C)	Tiempo
A	Pd(PPh ₃) ₄	K ₂ CO ₃	MeCN:H ₂ O (4:1)	170 (MW)	45 min
B	Pd(dppf)Cl ₂ ·CH ₂ Cl ₂	K ₂ CO ₃	MeCN:H ₂ O (4:1)	170 (MW)	45 min
C	Pd(PPh ₃) ₄ + BrettPhos	K ₂ CO ₃	MeCN:H ₂ O (4:1)	120	24 h
D	Pd(PPh ₃) ₄ + BrettPhos	K ₂ CO ₃	DMF:H ₂ O (1:1)	120	24 h
E	SPhos Pd G2	Cs ₂ CO ₃	DMF:H ₂ O (1:1)	90	24 h
F	XPhos Pd G3	Cs ₂ CO ₃	DMF:H ₂ O (1:1)	90	24 h
G	CX31	Cs ₂ CO ₃	DMF:H ₂ O (1:1)	90	24 h

Nota: En las condiciones **C** y **D** se utilizó el ligante auxiliar BrettPhos al 1%.

Desafortunadamente las condiciones iniciales no resultaron favorables para la preparación de los compuestos. Bajo tales condiciones se obtuvieron lotes con diversas proporciones de productos de complicada purificación. Por lo que se efectuaron una serie de variaciones en diversos puntos como la fuente de paladio, la base, los disolventes, la temperatura y los tiempos de reacción [**Tabla 9**]. En la segunda serie de experimentos (condiciones **B**) se cambió la fuente de paladio de Pd(PPh₃)₄ por 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio (II) acomplejado con diclorometano, catalizador reportado como de gran utilidad en algunos acoplamientos de Suzuki-Miyaura.⁶⁷ Los resultados obtenidos no variaron significativamente respecto a las condiciones **A**.

Las condiciones **C** contemplaron la posibilidad de que la radiación por microondas (MW) ocasionara la formación de muchos subproductos debido a las drásticas presiones y temperaturas alcanzadas durante la reacción, por lo que se planteó el uso de calentamiento convencional y el ligante privilegiado BrettPhos. Los tiempos de reacción se prolongaron considerablemente, pero se observó la aparición significativa del probable producto de monoacoplamiento (debido a cuestiones de polaridad respecto a la materia prima, detectada por CCF). A pesar de tal observación, estas condiciones no favorecieron la formación de los productos finales, bajo la sospecha de problemas de solubilidad de los reactantes.

Por tales razones se plantearon las condiciones **D**, las cuales introdujeron un sistema de mayor polaridad (DMF:H₂O) bajo calentamiento convencional. Los resultados evidenciaron un mayor consumo de la materia prima **INT1-2**; sin embargo, la cantidad de probable producto de interés (**JVM1-2**) resultó muy escasa y complicada de purificar debido a la elevada polaridad, baja solubilidad de los compuestos blanco y presencia de otro subproducto de un brillo característico en CCF que no se logró remover mediante cromatografía en columna utilizando diversas fases móviles ni con recristalización en varios sistemas.

Posteriormente en las condiciones **E** y **F** se introdujo un paladaciclo como fuente de paladio. Un paladaciclo es un compuesto que presenta al menos un enlace paladio-carbono intramolecular estabilizado por un átomo donador. Estos compuestos han destacado significativamente en los acoplamientos cruzados de gran dificultad, particularmente en aquellos donde el componente electrofílico del acoplamiento es un cloruro de arilo o heteroarilo. Otras ventajas de los paladaciclos son: estabilidad térmica y estabilidad en

atmósferas no inertes [Figura 18 - I].⁸¹ Por otra parte se realizó el cambio de base a Cs₂CO₃ debido a que presenta una mayor basicidad como consecuencia del “efecto cesio” (elevada solubilidad en solventes polares apróticos como DMF/DMSO y completa disociación de la sal en dichos disolventes).⁸² Estas propiedades han sido explotadas ampliamente en los acoplamientos cruzados y en algunos casos han resultado de gran utilidad. A pesar de todas estas modificaciones, mediante las condiciones **E** y **F** tampoco se logró la obtención de los productos de interés debido a las bajas tasas de conversión de sustratos a productos.

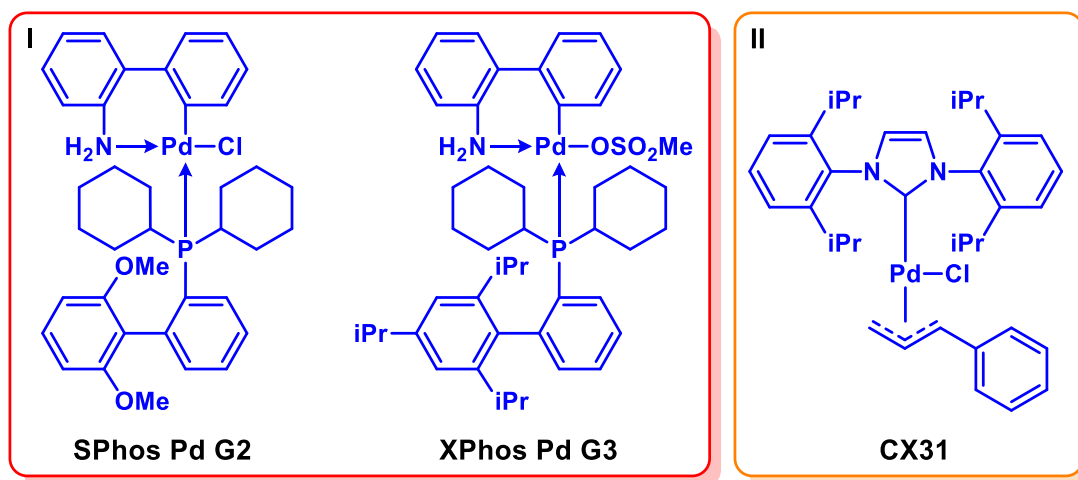
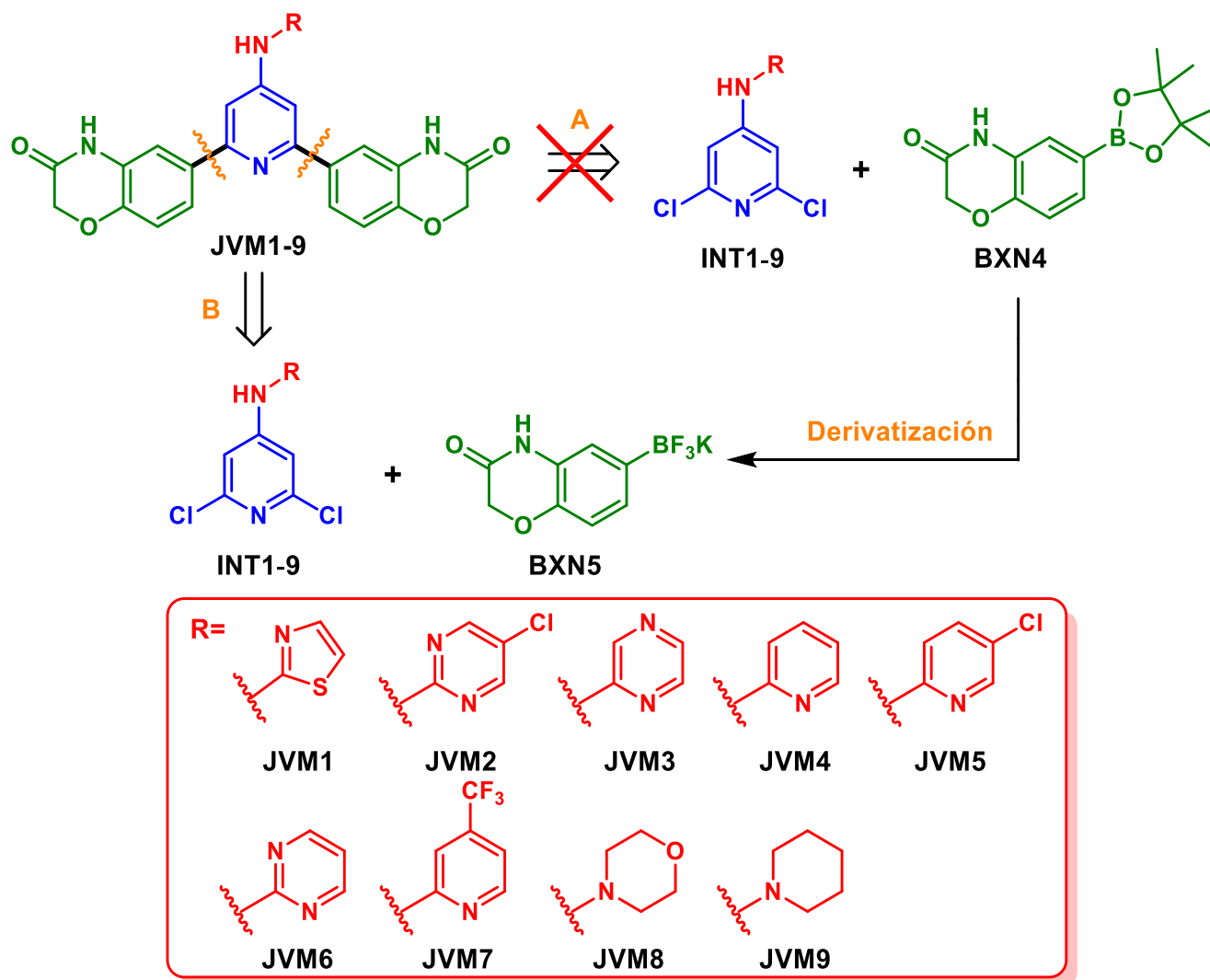


Figura 18. Catalizadores novedosos de paladio. **I:** Paladaciclos utilizados en los experimentos con las condiciones **E** y **F**. **II:** Complejo (NHC)Pd(alilo)Cl mejor conocido como CX31 utilizado en las condiciones de reacción **G**.

Con las condiciones de reacción **G** se trató de explorar el uso del complejo (NHC)Pd(alilo)Cl mejor conocido como CX31, compuesto que ha sido reportado como de gran utilidad para sustratos muy complicados en las reacciones de acoplamiento cruzado. En algunos textos se ha reportado su elevada actividad catalítica en concentraciones de 10 ppm a temperatura ambiente, sobre cloruros de heteroarilo. Utilizando las condiciones semejantes de base, temperatura y tiempo a los anteriores, se efectuaron experimentos, aunque no se obtuvieron resultados favorables. A pesar de que el compuesto CX31 se diseñó con el objetivo de minimizar la precipitación de paladio en las reacciones (fenómeno conocido como formación de paladio negro), se observó la coloración característica de dicho fenómeno, lo que concuerda con la nula transformación de materia prima a producto.⁸³

En ese sentido, las condiciones de reacción **D** fueron las únicas que resultaron favorables para la formación de los compuestos; sin embargo, la purificación de las reacciones resultó muy complicada. Teniendo en cuenta los problemas de solubilidad y elevada polaridad del éster borónico **BXN4**, se planificó el uso de otro reactivo más sencillo de remover de los productos finales, ya que las condiciones efectivas de acoplamiento de Suzuki-Miyaura generalmente involucran un exceso del compuesto de organoboro. De esta manera se llegó al planteamiento de la ruta B mostrada en el **Esquema 13**, donde se ilustra la derivatización del compuesto **BXN4** a la sal de trifluoroborato de la benzoxazinona **BXN5**. Dicha transformación se describió en la **Sección 7.1.1.** del presente documento, donde se expuso la formación del compuesto **BXN5** con un rendimiento del 58%.



Esquema 13. Desconexión efectuada para la preparación de los compuestos finales **JVM1-9**. La ruta A resultó poco eficaz por lo que se planteó la ruta B.

Con las condiciones expuestas anteriormente se efectuaron los acoplamientos de Suzuki-Miyaura utilizando inicialmente 2 eq del compuesto **BXN5**, 5% mol Pd(PPh₃)₄, 1% mol BrettPhos y 2.5 eq de Cs₂CO₃. A pesar de que tales condiciones fueron viables para la preparación de algunos compuestos finales (**JVM1** y **JVM2**), se observó que en las reacciones en proceso quedaba sin reaccionar una cantidad considerable de sustrato (**INT1** e **INT2**, respectivamente).

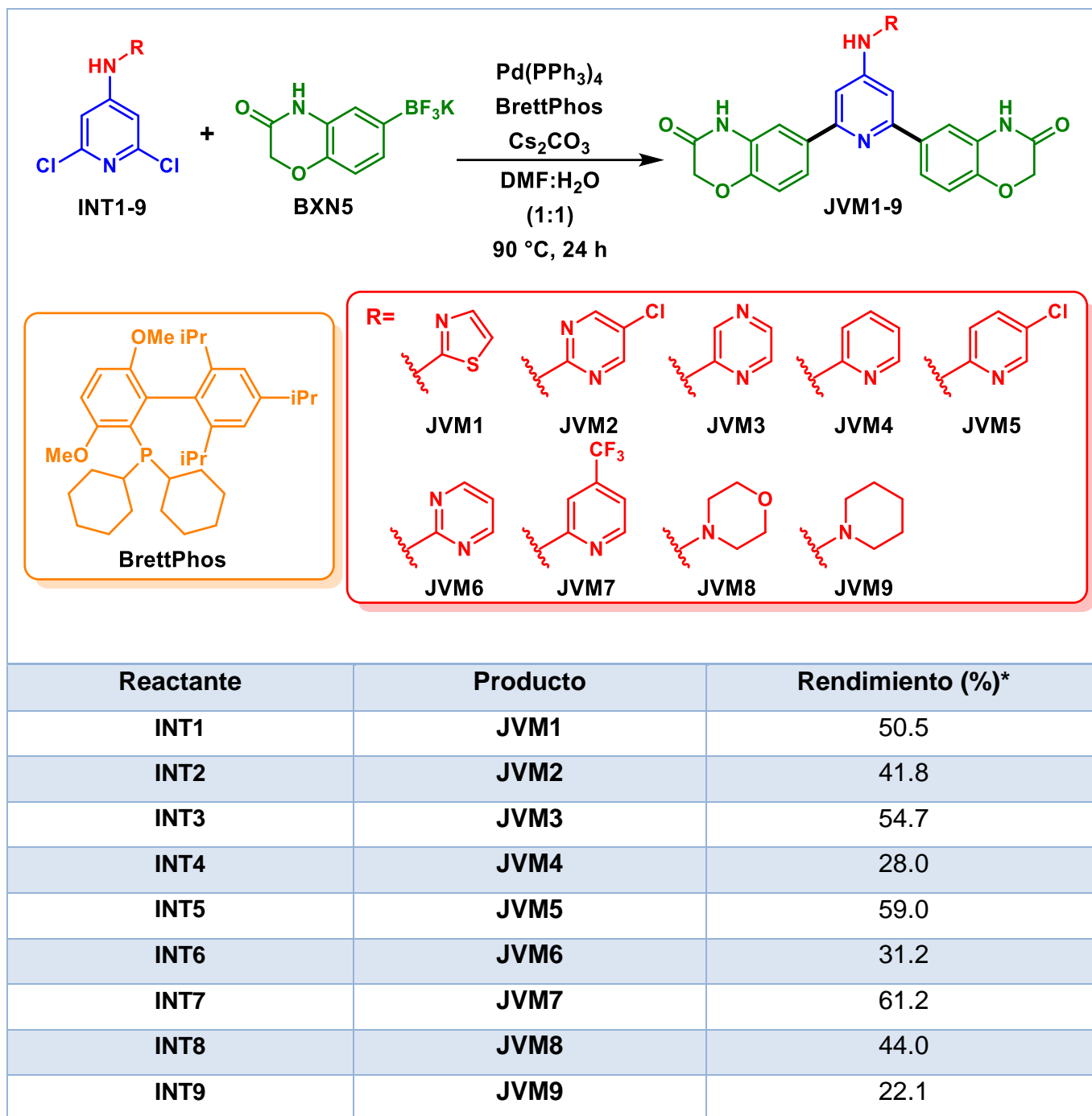
Por tales razones se incrementó la cantidad de compuesto **BXN5** a 3 eq bajo la expectativa de aumentar los rendimientos obtenidos. De tal forma se establecieron condiciones más adecuadas para la formación del resto de los intermediarios. Posteriormente, se buscó incrementar la temperatura de reacción, aunque los resultados no evidenciaron mejoría alguna por lo que se optó por no realizar ninguna modificación en las condiciones mostradas en la **Tabla 10**.

Es importante mencionar que los intermediarios que presentaban un átomo de Cl adicional en su estructura (**INT2** e **INT5**) no resultaron afectados por un triple acoplamiento, por lo que se comprobó la regioselectividad de la reacción sobre las posiciones 2,6 de la piridina, incluso en presencia de un exceso (3 eq) del compuesto de organoboro **BXN5**.

En lo que respecta a los rendimientos obtenidos, estos variaron del 22 al 62%, observando una vez más una reactividad reducida en los compuestos que presentan en su estructura a una morfolina o una piperidina (**JVM8-9**) debido, muy probablemente, a las diferentes conformaciones adquiridas por las moléculas durante las reacciones. Los rendimientos mencionados contemplan el proceso de purificación descrito en la sección de procedimientos experimentales, parte química (**Anexo I**).

En este aspecto, se encontró que los compuestos **JVM1-7** poseen limitada solubilidad en disolventes como MeOH y acetona, pero son altamente solubles en DMF y DMSO. Por lo tanto, la purificación de estos compuestos mediante cromatografía en columna resultó poco viable. En lo que respecta a los compuestos **JVM8-9**, se observó que su solubilidad fue muy buena en acetona, metanol y diclorometano. Esto podría deberse al aumento de grados de libertad de las moléculas, una vez más, por el heterociclo saturado en posición 4 de la piridina.

Tabla 10. Condiciones experimentales efectivas para la síntesis de los compuestos finales JVM1-9.



Condiciones de reacción: 3 eq del compuesto **BXN5**, 5% mol Pd(PPh₃)₄, 1% mol BrettPhos y 2.5 eq de Cs₂CO₃. *Nota: Rendimiento calculado considerando el proceso de purificación correspondiente (ver **Anexo I: Procedimientos experimentales**).

La caracterización espectroscópica y espectrométrica de los compuestos finales **JVM1-9** se resume en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Resumen de la caracterización de los compuestos sintetizados.

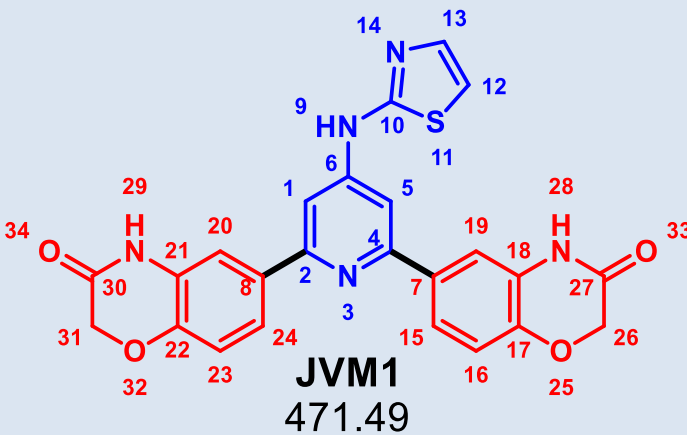
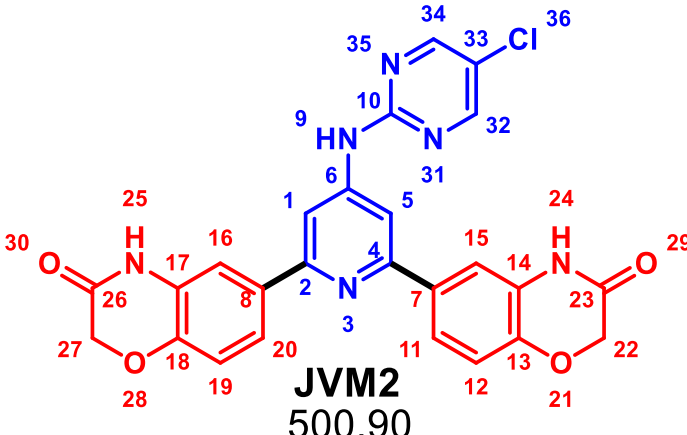
Compuesto	Caracterización
 <p style="text-align: center;">JVM1 471.49</p>	<p>RMN ¹H (DMSO-<i>d</i>₆, 400 MHz, δ ppm): 4.65 (s, 4H, -CH₂- 26 y 31), 7.09 (d, 2H, <i>J</i>= 8.2 Hz, <i>H</i> 16 y 23), 7.12 (d, 1H, <i>J</i>= 3.7 Hz, <i>H</i> 12), 7.44 (s, 1H, <i>J</i>= 3.6 Hz, <i>H</i> 13), 7.62 – 7.70 (m, 4H, <i>H</i> 15, 19, 20 y 24), 7.96 (s, 2H, <i>H</i> 1 y 5), 10.85 (sa, 1H, -D₂O, <i>H</i> 9), 10.86 (sa, 2H, -D₂O, <i>H</i> 28 y 29).</p> <p>RMN ¹³C (DMSO-<i>d</i>₆, 100 MHz, δ ppm): 66.84 (C 26 y 31), 105.17 (C 1 y 5), 110.61 (C 12), 114.09 (C 19 y 20), 116.34 (C 16 y 23), 121.39 (C 15 y 24), 127.49 (C 18 y 21), 133.65 (C 7 y 8), 139.18 (C 13), 144.18 (C 17 y 22), 149.14 (C 6), 155.97 (C 2 y 4), 162.81 (C 10), 164.71 (C 27 y 30).</p> <p>IR (FTIR por reflectancia ATR, cm⁻¹): 3451.79 (ν_{N-H}), 3166.91 (ν_{Ar-H}), 1671.60 (ν_{C=O} amida), 1592.58 (ν_{N=C}).</p> <p>EMAR (IE⁺, <i>m/z</i>): 471.0985 (teórico: 471.1001, error: -3.5 ppm).</p>
 <p style="text-align: center;">JVM2 500.90</p>	<p>RMN ¹H (DMSO-<i>d</i>₆, 400 MHz, δ ppm): 4.65 (s, 4H, -CH₂- 22 y 27), 7.08 (d, 2H, <i>J</i>= 8.4 Hz, <i>H</i> 12 y 19), 7.60 – 7.72 (m, 4H, <i>H</i> 11, 15, 16 y 20), 8.13 (s, 2H, <i>H</i> 1 y 5), 8.72 (s, 2H, <i>H</i> 32 y 34), 10.47 (sa, 1H, -D₂O, <i>H</i> 9), 10.85 (sa, 2H, -D₂O, <i>H</i> 24 y 25).</p> <p>RMN ¹³C (DMSO-<i>d</i>₆, 100 MHz, δ ppm): 66.84 (C 22 y 27), 106.93 (C 1 y 5), 114.16 (C 15 y 16), 116.29 (C 12 y 19), 121.30 (C 33), 121.36 (C 11 y 20), 127.48 (C 14 y 17), 133.71 (C 7 y 8), 144.14 (C 13 y 18), 148.64 (C 6), 155.72 (C 2 y 4), 156.43 (C 32 y 34), 157.95 (C 10), 164.71 (C 23 y 26).</p> <p>IR (FTIR por reflectancia ATR, cm⁻¹): 3357.99 (ν_{N-H}), 3096.09 (ν_{Ar-H}), 1685.32 (ν_{C=O} amida), 1573.30 (ν_{N=C}).</p> <p>EMAR (IE⁺, <i>m/z</i>): 500.1018 (teórico: 500.1000, error: +3.6 ppm).</p>

Tabla 11. Resumen de la caracterización de los compuestos sintetizados (continuación).

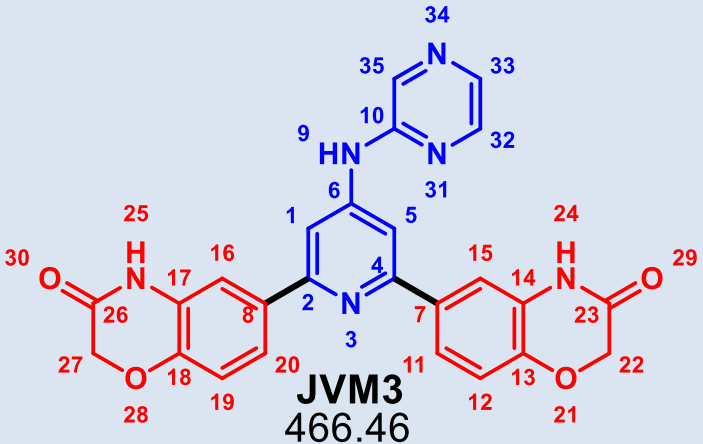
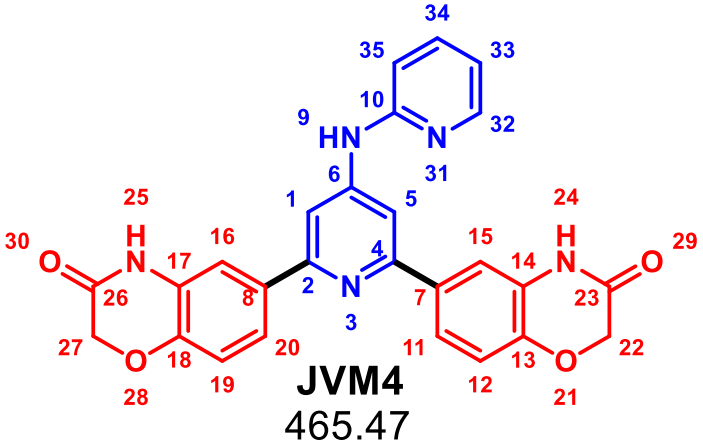
Compuesto	Caracterización
 <p style="text-align: center;">JVM3 466.46</p>	<p>RMN ¹H (DMSO-<i>d</i>₆, 400 MHz, δ ppm): 4.65 (s, 4H, -CH₂- 22 y 27), 7.09 (d, 2H, <i>J</i>= 8.8 Hz, <i>H</i> 12 y 19), 7.66 – 7.68 (m, 4H, <i>H</i> 11, 15, 16 y 20), 8.06 (s, 2H, <i>H</i> 1 y 5), 8.12 (d, 1H, <i>J</i>= 2.7 Hz, <i>H</i> 33), 8.32 (dd, 1H, <i>J</i>= 2.7, 1,4 Hz, <i>H</i> 32), 8.37 (d, 1H, <i>J</i>= 1.2 Hz, <i>H</i> 35), 10.16 (sa, 1H, -D₂O, <i>H</i> 9), 10.86 (sa, 2H, -D₂O, <i>H</i> 24 y 25).</p> <p>RMN ¹³C (DMSO-<i>d</i>₆, 100 MHz, δ ppm): 66.84 (C 22 y 27), 106.25 (C 1 y 5), 114.09 (C 15 y 16), 116.33 (C 12 y 19), 121.38 (C 11 y 20), 127.48 (C 14 y 17), 133.71 (C 7 y 8), 135.41 (C 33), 135.79 (C 35), 141.18 (C 32), 144.14 (C 13 y 18), 149.17 (C 6), 151.72 (C 10), 155.79 (C 2 y 4), 164.72 (C 23 y 26).</p> <p>IR (FTIR por reflectancia ATR, cm⁻¹): 3097.99 (ν_{Ar-H}), 1688.25 (ν_{C=O} amida), 1577.59 (ν_{N=C}).</p> <p>EMAR (IE⁺, <i>m/z</i>): 466.1367 (teórico: 466.1390, error: -4.8 ppm).</p>
 <p style="text-align: center;">JVM4 465.47</p>	<p>RMN ¹H (DMSO-<i>d</i>₆, 400 MHz, δ ppm): 4.01 (s, 4H, -CH₂- 22 y 27), 6.91 – 6.96 (m, <i>H</i> 33), 6.99 (d, 1H, <i>J</i>= 8.3 Hz, <i>H</i> 35), 7.08 (d, 2H, <i>J</i>= 9.0 Hz, <i>H</i> 12 y 19), 7.65 – 7.73 (m, 5H, <i>H</i> 11, 15, 16, 20 y 34), 8.09 (s, 2H, <i>H</i> 1 y 5), 8.34 (d, 1H, <i>J</i>= 3.6 Hz, <i>H</i> 32), 9.73 (sa, 1H, -D₂O, <i>H</i> 9), 10.86 (sa, 2H, -D₂O, <i>H</i> 24 y 25).</p> <p>RMN ¹³C (DMSO-<i>d</i>₆, 100 MHz, δ ppm): 66.83 (C 22 y 27), 105.92 (C 1 y 5), 112.19 (C 35), 114.04 (C 15 y 16), 116.05 (C 33), 116.25 (C 12 y 19), 121.30 (C 11 y 20), 127.41 (C 14 y 16), 133.96 (C 7 y 8), 137.87 (C 24), 147.38 (C 32), 149.89 (C 6), 155.08 (C 10), 155.53 (C 2 y 4), 164.71 (C 23 y 26).</p> <p>IR (FTIR por reflectancia ATR, cm⁻¹): 3452.19 (ν_{N-H}), 2980.59 (ν_{Ar-H}), 1671.60 (ν_{C=O} amida), 1584.85 (ν_{N=C}).</p> <p>EMAR (IE⁺, <i>m/z</i>): 465.1462 (teórico: 465.1437, error: +5.4 ppm).</p>

Tabla 11. Resumen de la caracterización de los compuestos sintetizados (continuación).

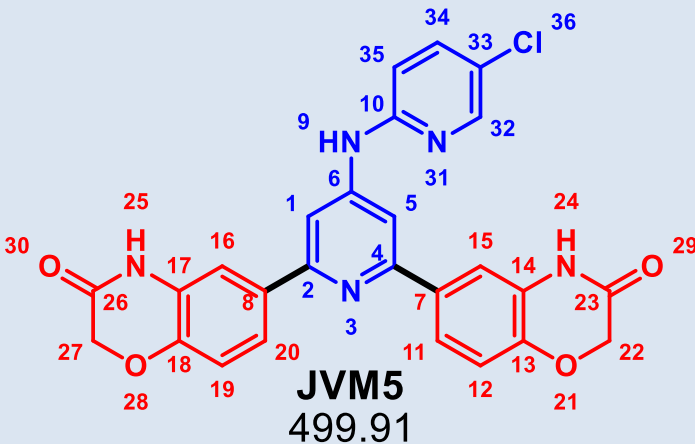
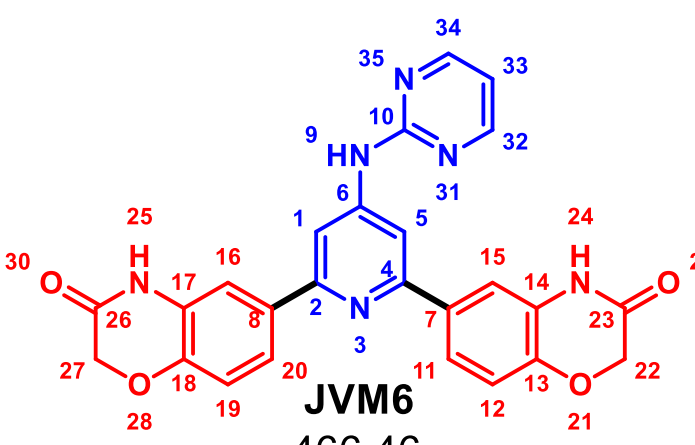
Compuesto	Caracterización
 <p style="text-align: center;">JVM5 499.91</p>	<p>RMN ¹H (DMSO-<i>d</i>₆, 600 MHz, δ ppm): 4.65 (s, 4H, -CH₂- 22 y 27), 7.02 (d, 2H, <i>J</i>= 8.9 Hz, <i>H</i> 35), 7.08 (d, 2H, <i>J</i>= 8.9 Hz, <i>H</i> 12 y 19), 7.66 – 7.68 (m, 4H, <i>H</i> 11, 15, 16 y 20), 7.79 (dd, 1H, <i>J</i>= 6.12, 2.7 Hz, <i>H</i> 34), 8.02 (s, 2H, <i>H</i> 1 y 5), 8.36 (d, 1H, <i>J</i>= 2.7 Hz, <i>H</i> 32), 9.92 (sa, 1H, -D₂O, <i>H</i> 9), 10.84 (sa, 2H, -D₂O, <i>H</i> 24 y 25).</p> <p>RMN ¹³C (DMSO-<i>d</i>₆, 150 MHz, δ ppm): 66.84 (C 22 y 27), 106.01 (C 1 y 5), 113.68 (C 35), 114.07 (C 15 y 16), 116.28 (C 12 y 19), 121.35 (C 11 y 20), 122.01 (C 33), 127.43 (C 14 y 17), 133.81 (C 7 y 8), 137.75 (C 34), 144.08 (C 13 y 19), 145.42 (C 32), 149.47 (C 6), 153.67 (C 10), 155.64 (C 2 y 4), 164.73 (C 23 y 26).</p> <p>IR (FTIR por reflectancia ATR, cm⁻¹): 3484.05 (ν_{N-H}), 3110.42 (ν_{Ar-H}), 1685.42 (ν_{C=O} amida), 1578.88 (ν_{N=C}).</p> <p>EMAR (IE⁺, <i>m/z</i>): 499.1077 (teórico: 499.1047, error: +5.9 ppm).</p>
 <p style="text-align: center;">JVM6 466.46</p>	<p>RMN ¹H (DMSO-<i>d</i>₆, 600 MHz, δ ppm): 4.64 (s, 4H, -CH₂- 22 y 27), 7.06 (s, 1H, <i>H</i> 33), 7.07 (d, 2H, <i>J</i>= 6.0 Hz, <i>H</i> 12 y 19), 7.47 (dd, 2H, <i>J</i>= 8.4, 2.1 Hz, <i>H</i> 11 y 20), 7.61 (d, 2H, <i>J</i>= 2.1 Hz, <i>H</i> 15 y 16), 8.13 (s, 2H, <i>H</i> 1 y 5), 8.66 (d, 2H, <i>J</i>= 4.8 Hz, <i>H</i> 32 y 34), 10.43 (sa, 1H, -D₂O, <i>H</i> 9), 10.84 (s, 2H, -D₂O, <i>H</i> 24 y 25).</p> <p>RMN ¹³C (DMSO-<i>d</i>₆, 150 MHz, δ ppm): 66.79 (C 2 y 27), 107.31 (C 1 y 5), 109.61 (C 34), 114.57 (C 15 y 16), 116.49 (C 12 y 19), 121.14 (C 11 y 20), 127.61 (C 14 y 17), 131.89 (C 7 y 8), 144.50 (C 13 y 19), 150.75 (C 6), 155.97 (C 2 y 4), 158.37 (C 32 y 34), 159.27 (C 10), 164.58 (C 23 y 26).</p> <p>IR (FTIR por reflectancia ATR, cm⁻¹): 3296.70 (ν_{N-H}), 3092.06 (ν_{Ar-H}), 1678.99 (ν_{C=O} amida), 1576.92 (ν_{N=C}).</p> <p>EMAR (IE⁺, <i>m/z</i>): 466.1372 (teórico: 466.1390, error: -3.8 ppm).</p>

Tabla 11. Resumen de la caracterización de los compuestos sintetizados (continuación).

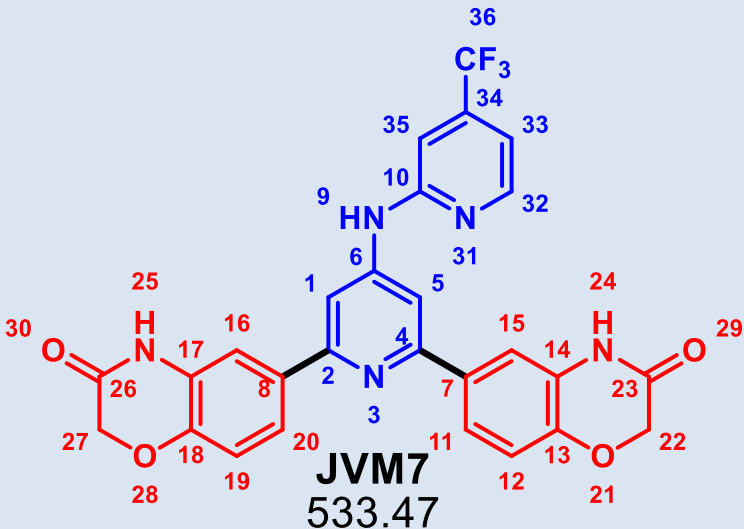
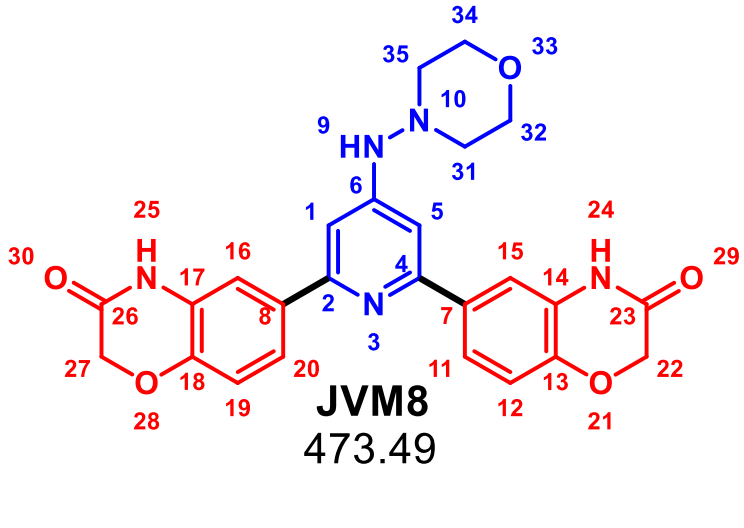
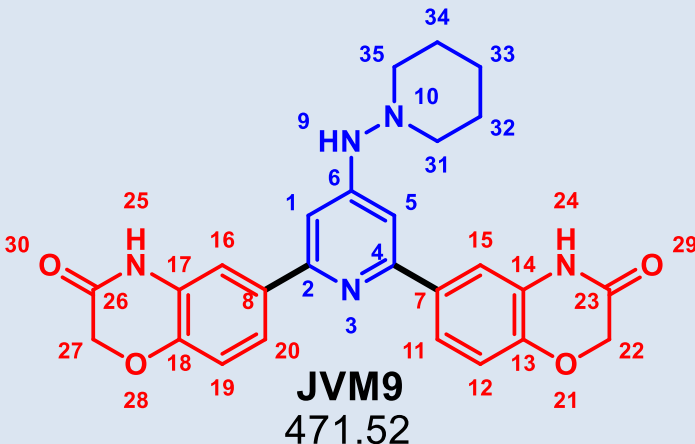
Compuesto	Caracterización
 <p style="text-align: center;">JVM7 533.47</p>	<p>RMN ¹H (DMSO-<i>d</i>₆, 600 MHz, δ ppm): 4.65 (s, 4H, -CH₂- 22 y 27), 7.09 (d, 2H, <i>J</i>= 8.80 Hz, <i>H</i> 12 y 19), 7.25 (sa, 2H, <i>H</i> 33 y 35), 7.67 – 7.68 (m, 4H, <i>H</i> 11, 15, 16 y 20), 8.08 (s, 2H, <i>H</i> 1 y 5), 8.59 (d, 1H, <i>J</i>= 4.8 Hz <i>H</i> 32), 10.14 (sa, 1H, -D₂O, <i>H</i> 9), 10.87 (sa, 2H, -D₂O, <i>H</i> 24 y 25).</p> <p>RMN ¹³C (DMSO-<i>d</i>₆, 150 MHz, δ ppm): 67.37 (C 22 y 27), 106.88 (C 1 y 5), 108.30 (C 35), 111.17 (C 33), 114.61 (C 15 y 16), 116.86 (C 12 y 19), 121.92 (C 11 y 20), 123.44 (d, <i>J</i>= 272.0 Hz, C 36), 128.00 (C 14 y 17), 134.24 (C 7 y 8), 138.61 (c, <i>J</i>= 34.0 Hz, C 34), 144.67 (C 13 y 18), 149.13 (C 6), 149.70 (C 32), 150.01 (C 10), 156.30 (C 2 y 4), 165.25 (C 23 y 26).</p> <p>IR (FTIR por reflectancia ATR, cm⁻¹): 3332.13 (ν_{N-H}), 3102.88 (ν_{Ar-H}), 1683.05 (ν_{C=O} amida), 1591.69 (ν_{N=C}), 1122.58 (ν_{R-CF₃}).</p> <p>EMAR (IE⁺, <i>m/z</i>): 533.1321 (teórico: 533.1311, error: +1.9 ppm).</p>
 <p style="text-align: center;">JVM8 473.49</p>	<p>RMN ¹H (DMSO-<i>d</i>₆, 400 MHz, δ ppm): 2.77 (sa, 4H, C 31 y 35), 3.74 (sa, 4H, -CH₂- 32 y 34), 4 (s, 4H, -CH₂- 22 y 27), 7.03 (s, 2H, <i>H</i> 1 y 5), 7.05 (s, 2H, <i>H</i> 12 y 19), 7.60 – 7.62 (m, 4H, <i>H</i> 11, 15, 16 y 20), 7.75 (sa, 1H, -D₂O, <i>H</i> 9), 10.79 (sa, 2H, -D₂O, <i>H</i> 24 y 25).</p> <p>RMN ¹³C (DMSO-<i>d</i>₆, 100 MHz, δ ppm): 55.18 (-CH₂- 31 y 35), 66.22 (-CH₂- 32 y 24), 66.82 (C 22 y 27), 100.89 (C 1 y 5), 113.99 (C 15 y 16), 116.08 (C 12 y 19), 121.24 (C 11 y 20), 127.25 (C 14 y 17), 134.12 (C 7 y 8), 143.81 (C 13 y 18), 154.96 (C 2 y 4), 155.39 (C 6), 164.67 (C 23 y 26).</p> <p>IR (FTIR por reflectancia ATR, cm⁻¹): 3627.67 (ν_{N-H}), 3093.31 (ν_{Ar-H}), 2853.21 (ν_{CH₂}) 1690.13 (ν_{C=O} amida), 1591.71 (ν_{N=C}).</p> <p>EMAR (IE⁺, <i>m/z</i>): 473.1689 (teórico: 473.1699, error: -2.2 ppm).</p>

Tabla 11. Resumen de la caracterización de los compuestos sintetizados (continuación).

Compuesto	Caracterización
 <p style="text-align: center;">JVM9 471.52</p>	<p>RMN ¹H (DMSO-<i>d</i>₆, 400 MHz, δ ppm): 1.42 (sa, 2H, -CH₂- 33), 1.67 (sa, 4H, -CH₂- 32 y 34), 2.73 (sa, 4H, -CH₂- 31 y 35), 4.62 (s, 4H, -CH₂- 22 y 27), 7.03 (s, 2H, H 1 y 5), 7.04 (s, 2H, H 12 y 19), 7.60 – 7.61 (m, 4H, H 11, 15, 16 y 20), 7.63 (sa, 1H, -D₂O, H 9), 10.79 (sa, 2H, -D₂O, H 24 y 25).</p> <p>RMN ¹³C (DMSO-<i>d</i>₆, 100 MHz, δ ppm): 23.12 (C 33), 25.54 (C 32 y 34), 55.90 (C 31 y 35), 66.81 (C 22 y 27), 100.74 (C 1 y 5), 113.96 (C 15 y 16), 116.07 (C 12 y 19), 121.21 (C 11 y 20), 127.24 (C 14 y 17), 134.23 (C 7 y 8), 143.77 (C 13 y 18), 155.14 (C 6), 164.69 (C 23 y 26).</p> <p>IR (FTIR por reflectancia ATR, cm⁻¹): 3264.73 (ν_{N-H}), 3092.86 (ν_{Ar-H}), 2937.41 (ν_{CH₂}) 1687.12 (ν_{C=O} amida), 1592.55 (ν_{N=C}).</p> <p>EMAR (IE⁺, <i>m/z</i>): 471.1909 (teórico: 471.1907, error: +0.5 ppm).</p>

Nota I: Las moléculas se encuentran numeradas de forma arbitraria y tal numeración no tiene relación con la numeración convencional. **Nota II:** Los espectros correspondientes abarcan desde el número 56 hasta el 110.

La asignación de señales de RMN de ¹H y ¹³C mostrada en la **Tabla 14** se realizó con la ayuda de los experimentos de RMN en dos dimensiones (2D RMN): *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (HSQC) y *Heteronuclear Multiple Bond Coherence* (HMBC). A continuación, se muestra de manera representativa la elucidación de uno de los compuestos finales (**JVM3**).

En primer lugar, en RMN ¹H [**Espectro 68**] se observó en 4.65 ppm una señal simple que integró para 4H, la cual correspondió a los dos hidrógenos de los metilenos presentes en la molécula. Posteriormente, se observó una señal doble en 7.09 ppm que integró para 2H, correspondiente a los hidrógenos aromáticos de la benzoxazinona. De 7.66 a 7.68 ppm se identificó una señal múltiple que de igual forma pertenece a la benzoxazinona. Esto en base, a la integral obtenida (4H). En 8.06 ppm se observó una señal simple que integró para 2H, característica de los hidrógenos del núcleo principal de piridina. En 8.12, 8.32 y 8.37 ppm se

observaron señales de tipo doble, doble de doble y doble (respectivamente), las cuales correspondieron al sustituyente pirazina ya que cada señal integró para 1H. Finalmente, los hidrógenos de los heteroátomos (amina y amida) aparecieron en 10.16 y 10.86 ppm, con integrales de 1H y 2H (respectivamente). La identidad de estas señales se verificó mediante intercambio con óxido de deuterio ($-D_2O$), lo cual ocasionó su desaparición del espectro. [Figura 19].

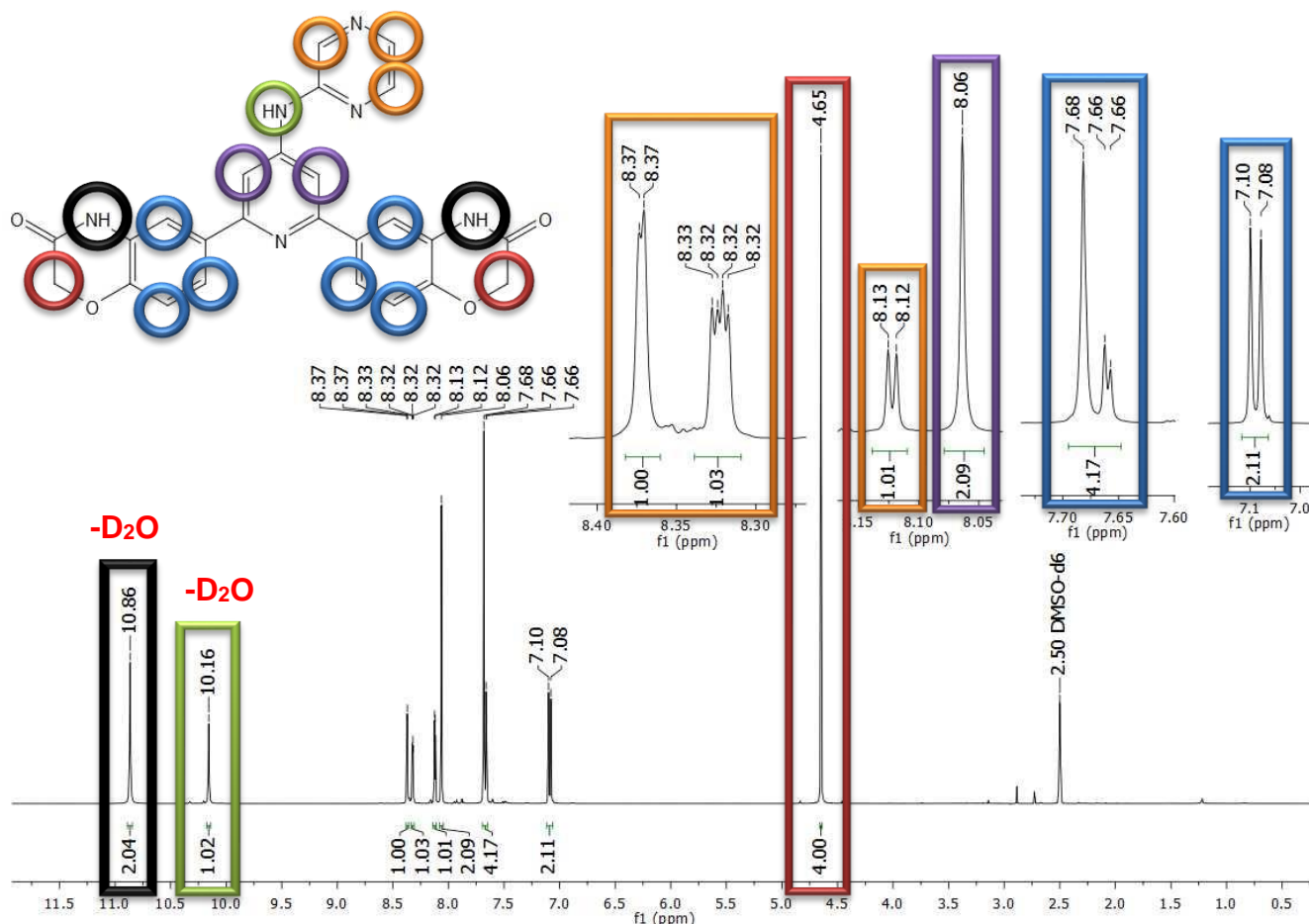


Figura 19. Espectro de 1H RMN del compuesto **JVM3**. Las señales correspondientes a los hidrógenos presentes en la molécula se muestran encerrados de determinado color.

Posteriormente, se analizó el espectro de RMN ^{13}C [Espectro 69], observando una señal característica en 66.84 ppm correspondiente a los metilenos, trece señales distribuidas en la región aromática de 106.25 a 155.79 ppm y una señal en 164.72 ppm correspondiente a los grupos carbonilo de amida. La suma total de las señales en ^{13}C correspondió a lo esperado (15 señales en totales) [Figura 20].

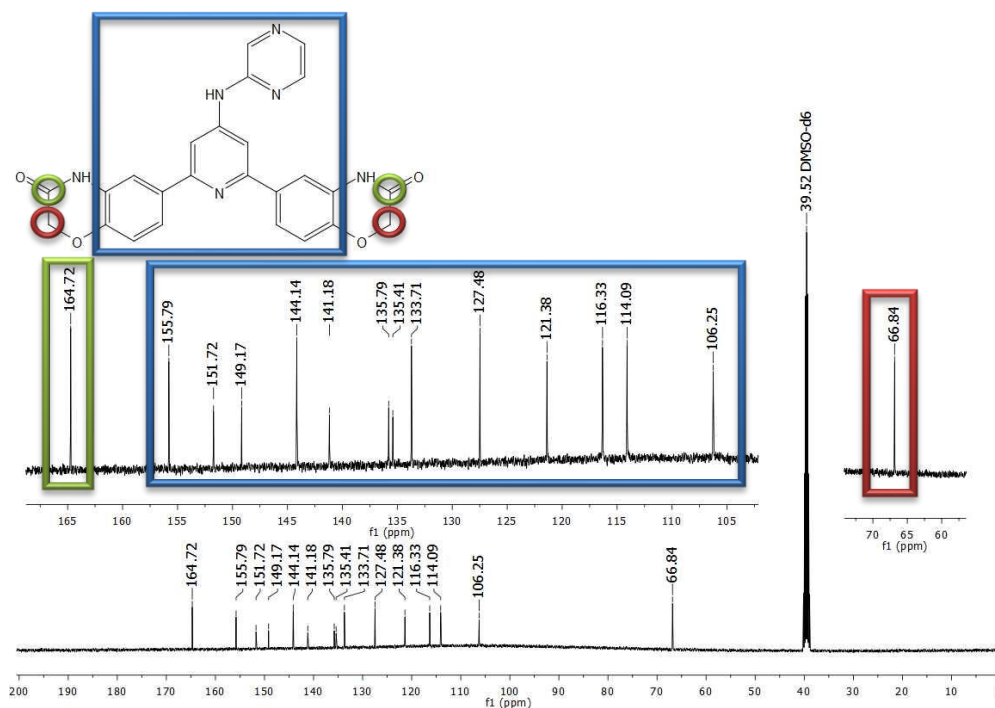


Figura 20. Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **JVM3**. Las señales correspondientes a los carbonos presentes en la molécula se muestran encerrados de determinado color.

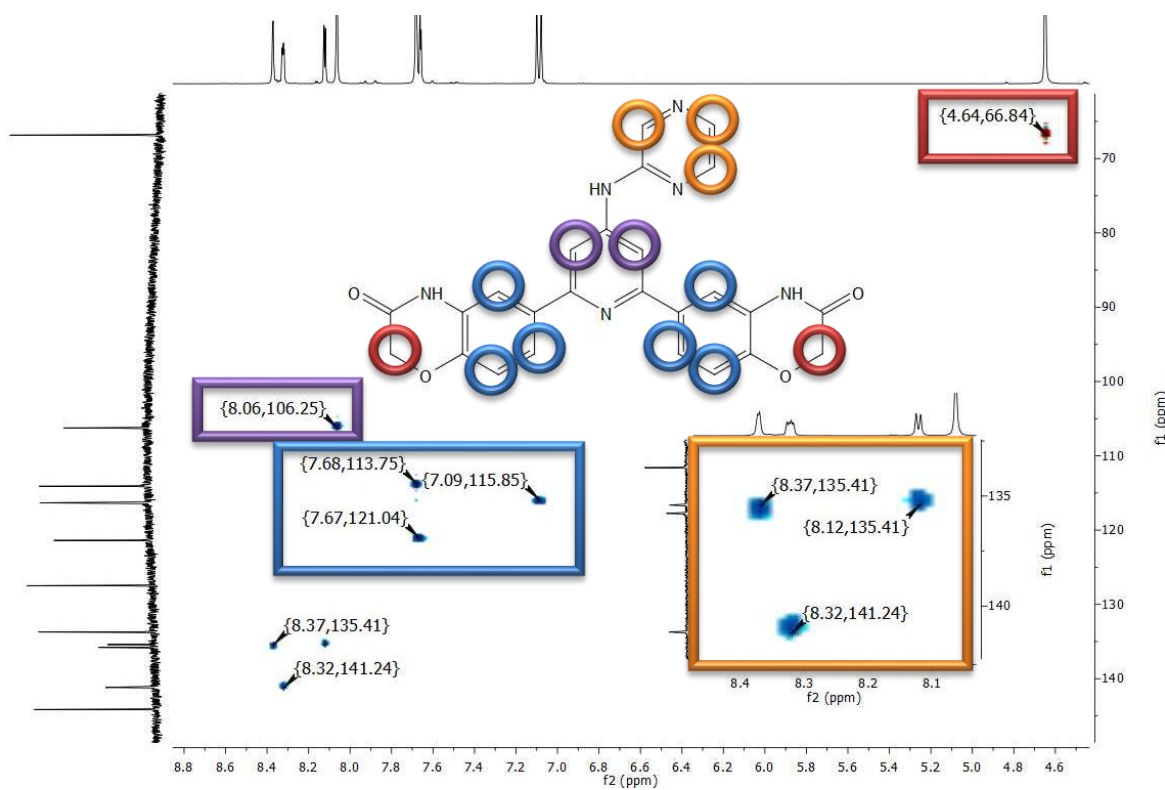


Figura 21. Espectro HSQC del compuesto **JVM3**. La asignación de señales H-C se distingue de acuerdo con los colores mostrados tanto en la molécula como en el espectro.

El experimento HSQC [Espectro 70] permitió observar la correlación heteronuclear a 1 enlace de distancia, por lo que se efectuaron las asignaciones de las señales de los hidrógenos unidos a sus correspondientes carbonos [Figura 21]. Se puede observar que la región aromática de la piridina y de la pirazina se muestran de manera general; debido a que la asignación particular de cada átomo se efectuó complementariamente con el experimento HMBC [Espectro 71].

El experimento HMBC permitió observar la correlación heteronuclear a 2 y 3 enlaces de distancia. En la Figura 22 se observa la correlación de los hidrógenos del metileno con el carbono puente y con el carbono del grupo carbonilo en la benzoxazinona. Estas interacciones fungieron como punto de partida, en conjunto con las interacciones del hidrógeno del grupo amida con los carbonos a 2 y 3 enlaces [Figura 23], para la asignación del resto de las señales de los sustituyentes benzoxazinona.

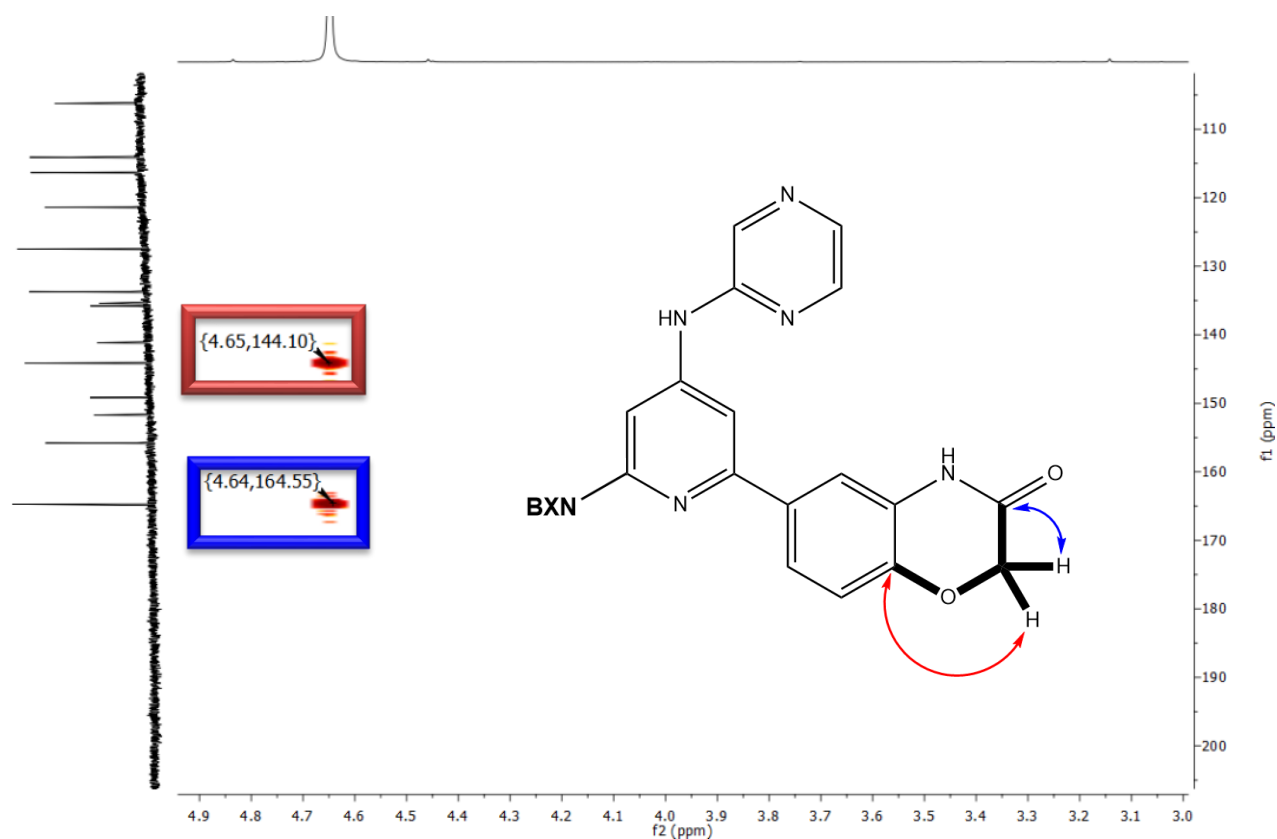


Figura 22. Espectro HSQC del compuesto **JVM3**. Asignación elemental del carbono cuaternario que permitió la elucidación del sustituyente de benzoxazinona.

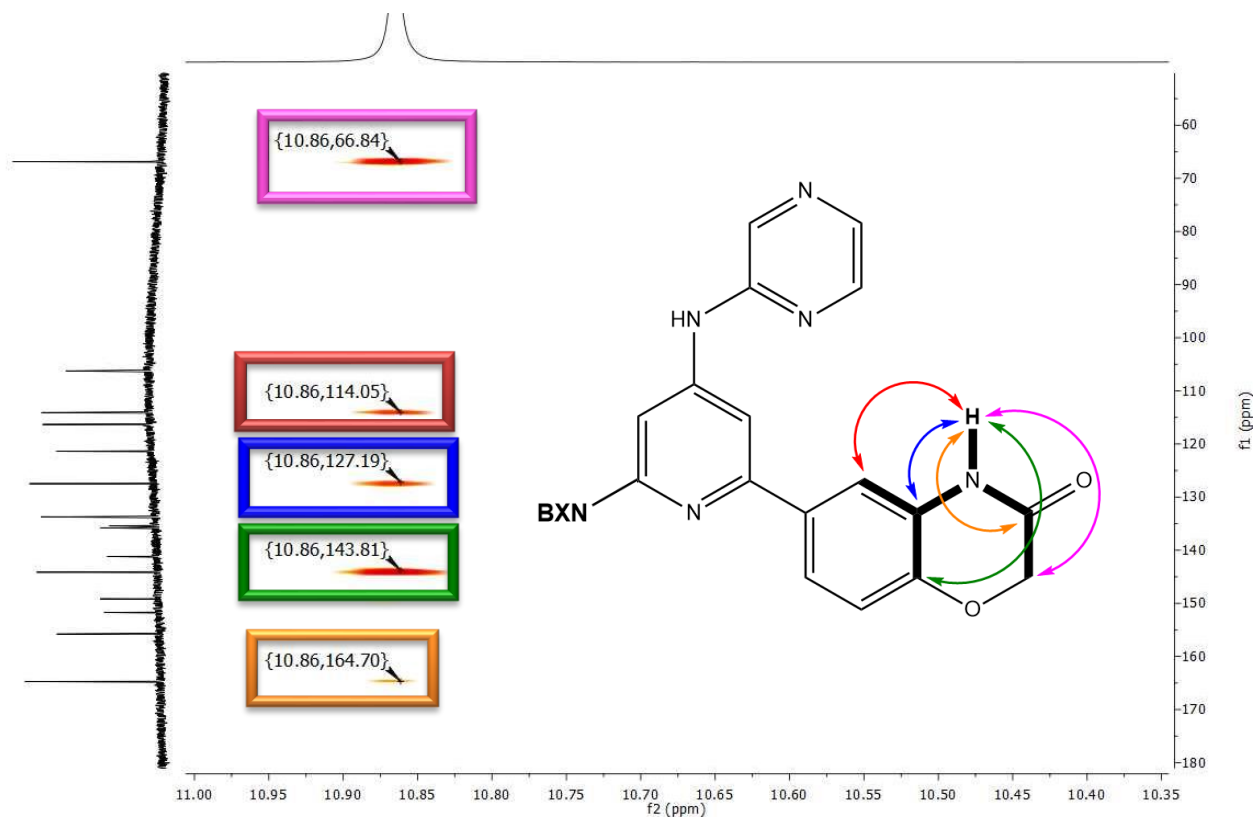


Figura 23. Espectro HSQC del compuesto **JVM3**. Se observan las correlaciones a 2 y 3 enlaces de distancia entre el hidrógeno del grupo amida y los correspondientes carbonos.

Para concluir la asignación de señales de los sustituyentes benzoxazinonas, se observaron las interacciones del hidrógeno Ha (7.68 ppm) con los carbonos adyacentes **[Figura 24]**. Gracias a tal hidrógeno se logró identificar de manera directa la señal correspondiente a Hb en 7.66 ppm (en complemento con el espectro de HSQC) y debido a la ausencia de correlación, identificar de manera indirecta a Hc en 7.09 ppm.

En lo que respecta al sustituyente de pirazina **[Figura 25]** se observaron fundamentalmente las correlaciones de los hidrógenos Ha y Hc con el carbono cuaternario que presenta el enlace C-NH (carbono 2 de la pirazina). Esta correlación (H-C) no se observó con el hidrógeno Hb debido a la distancia entre los átomos y gracias a esto fue posible confirmar la identidad de la señal en 8.12 ppm. De igual forma, se confirmó la identidad de la señal en 8.37 ppm ya que el hidrógeno Ha no es capaz de interactuar con Hc pero sí con Hb.

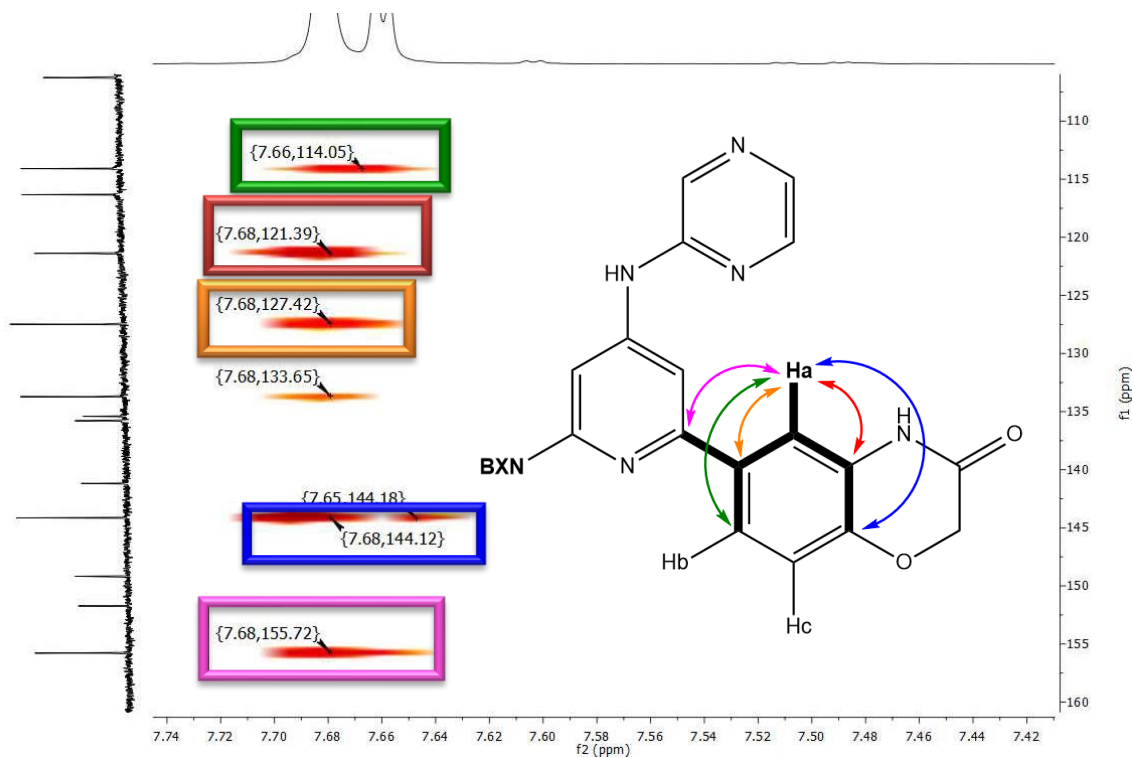


Figura 24. Espectro HSQC del compuesto **JVM3**. Se observan las interacciones a 2 y 3 enlaces de distancia entre el hidrógeno Ha y los correspondientes carbonos en región aromática.

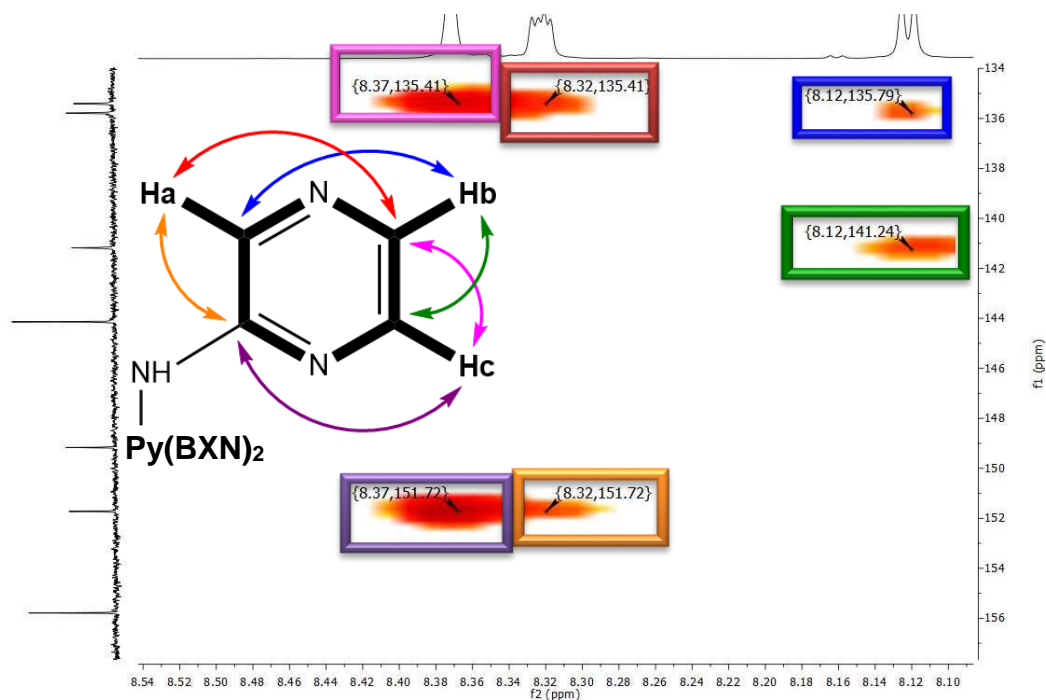


Figura 25. Espectro HSQC del compuesto **JVM3**. Se observan las correlaciones a 2 y 3 enlaces de distancia de los hidrógenos con los carbonos del sustituyente pirazina.

Debido a la presencia del mismo núcleo de piridina sustituida con dos benzoxazinonas en posiciones 2,6, en todos los compuestos preparados (**JVM1-9**), las señales observadas en los espectros de RMN ^1H y ^{13}C resultaron muy similares [Tabla 14]. Gracias a esto se logró asignar con relativa facilidad las señales de los sustituyentes en la posición 4 de la piridina. Dicha asignación se realizó de manera análoga a la mostrada en el ejemplo de **JVM3**.

En lo que respecta a la caracterización de los compuestos **JVM1-9** mediante IR [Espectros 60, 66, 72, 79, 85, 91, 97, 103 y 109], se observaron las bandas características de estiramiento de un grupo amina $\nu_{\text{N-H}}$ en una región de 3627.67 a 3097.99 cm^{-1} . Otra banda característica observada correspondió al grupo carbonilo de amida dentro de la región de 1690.13 a 1671.60 cm^{-1} . Finalmente, la banda correspondiente al estiramiento $\nu_{\text{N=C}}$ se observó dentro de la región de 1592.55 a 1573.30 cm^{-1} [Figura 26].

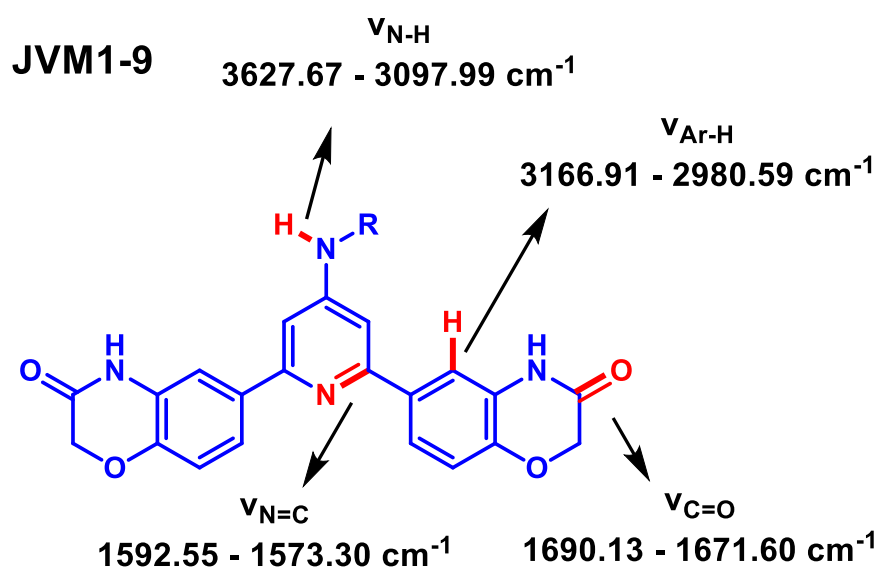


Figura 26. Regiones de las bandas características observadas en los espectros de IR de los compuestos **JVM1-9**.

Finalmente, se realizó la confirmación de los compuestos **JVM1-9** mediante espectrometría de masas de alta resolución, utilizando la técnica de impacto electrónico (EI), observando correspondencia de las masas obtenidas con las predichas [Espectros 61, 67, 73, 80, 86, 92, 98, 104 y 110].

7.2. Parte biológica

7.2.1. Ensayos en líneas celulares

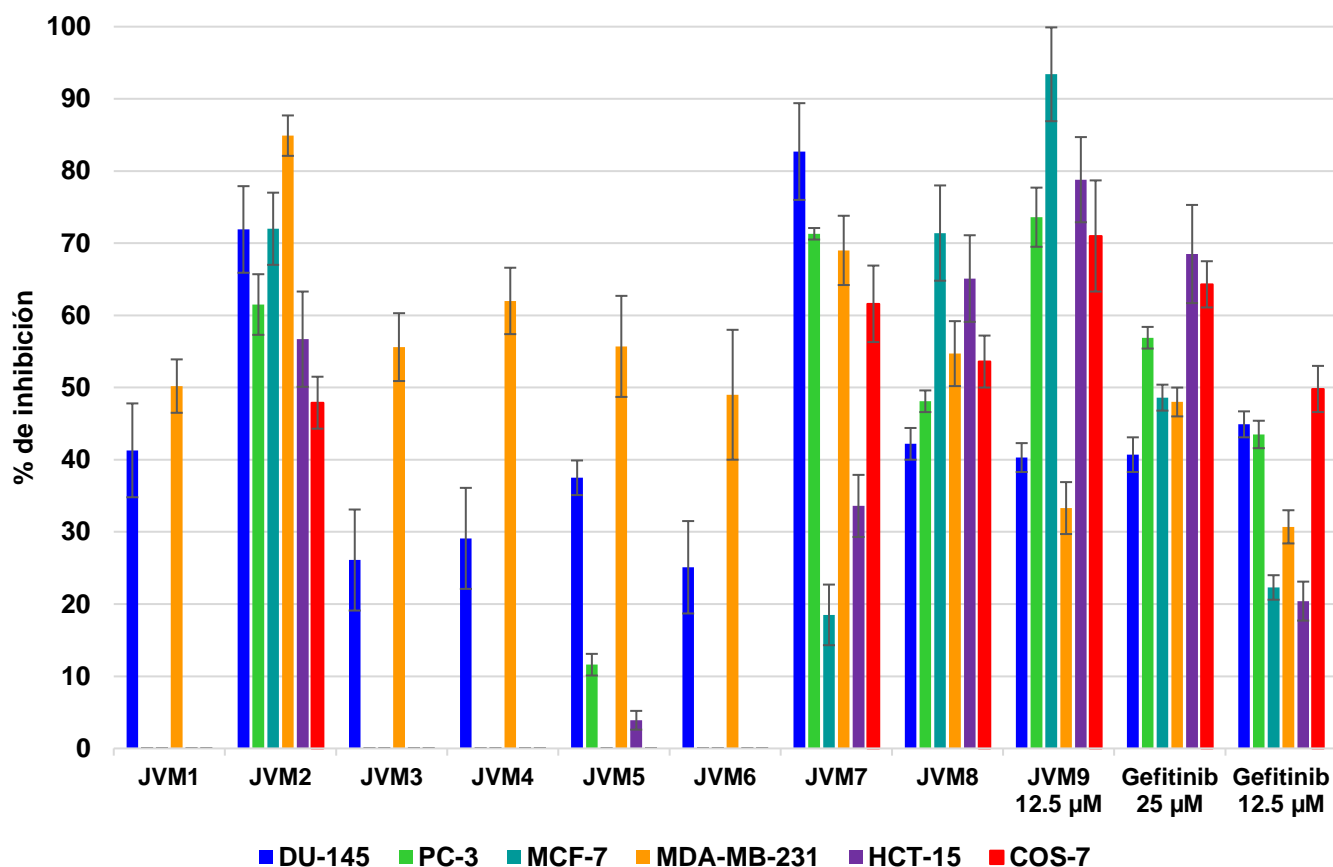
La evaluación de los compuestos sintetizados se efectuó mediante un protocolo establecido por el *National Cancer Institute*.^{84,85} Inicialmente, se realizó la evaluación de la sensibilidad de las líneas celulares malignas a los compuestos **JVM1-9** y **Gefitinib**, utilizando una concentración de 25 µM. Posteriormente, se disminuyó la concentración del compuesto **JVM9** y el correspondiente control a 12.5 µM, debido a su elevada actividad inhibitoria en la concentración inicial. Los resultados son mostrados en la **Tabla 12** y en la **Gráfica 1**.

Tabla 12. Resultados de porcentaje de inhibición de crecimiento celular de los compuestos **JVM1-9** y el control **Gefitinib**

Compuesto*	% de inhibición del crecimiento celular					
	DU-145	PC-3	MCF-7	MDA-MB-231	HCT-15	COS-7
JVM1 (25 µM)	41.3±6.5	NC	NC	50.2±3.7	NC	NC
JVM2 (25 µM)	71.9±6.0	61.5±4.2	72.0±5.0	84.9±2.8	56.7±6.6	47.9±3.6
JVM3 (25 µM)	26.1±7.0	NC	NC	55.6±4.7	NC	NC
JVM4 (25 µM)	29.1±7.0	NC	NC	62.0±4.6	NC	NC
JVM5 (25 µM)	37.5±2.4	11.6±1.5	NC	55.7±7.0	3.9±1.3	NC
JVM6 (25 µM)	25.1±6.4	NC	NC	49.0±9.0	NC	NC
JVM7 (25 µM)	82.7±6.7	71.3±0.8	18.5±4.2	69.0±4.8	33.6±4.3	61.6±5.3
JVM8 (25 µM)	42.2±2.2	48.1±1.5	71.4±6.6	54.7±4.5	65.1±6.0	53.6±3.6
JVM9 (12.5 µM)	40.3±2.0	73.6±4.1	93.4±6.5	33.3±3.6	78.8±5.9	71.0±7.7
Gefitinib (25 µM)	40.7±2.4	56.9±1.5	48.6±1.8	48.0±2.0	68.5±6.8	64.3±3.2
Gefitinib (12.5 µM)	44.9±1.8	43.5±1.9	22.3±1.7	30.7±2.3	20.41±2.7	49.8±3.2

NC: no citotóxico, **DU-145:** células cancerosas de próstata, **PC-3:** Células cancerosas de próstata, **MCF-7:** células cancerosas de mama receptor positivo, **MDA-MB-231:** células cancerosas de mama triple negativa, **HCT-15:** células cancerosas de colon, **COS-7:** células de riñón de mono no cancerosas. ***Nota:** los resultados mostrados para los compuestos **JVM1-8** corresponden a una concentración de evaluación de 25 µM, mientras que para **JVM9** se muestra a una concentración de 12.5 µM.

% de inhibición de crecimiento celular



Gráfica 1. Porcentaje de inhibición de crecimiento celular de los compuestos **JVM1-9** y el control **Gefitinib**.

Al observar los resultados obtenidos se puede mencionar que los compuestos **JVM1-9** presentaron actividad inhibitoria sobre al menos dos líneas celulares, con diferentes porcentajes de inhibición. Resalta a la vista que los compuestos **JVM1**, **JVM3**, **JVM4**, **JVM5** y **JVM6** presentaron gran selectividad sobre las líneas de próstata **DU-145** y sobre la línea de cáncer de mama **MDA-MB-231**. Además, estos compuestos no presentaron actividad sobre la línea celular sana (**COS-7**), lo cual es de gran importancia en la búsqueda de nuevas sustancias para el tratamiento quimioterapéutico de algún tipo de cáncer.

En lo que respecta a los compuestos restantes con sustituyentes aromáticos en la posición 4 del núcleo de piridina (**JVM2** y **JVM7**), se observó gran actividad inhibitoria en las líneas **MDA-MB-231** y **DU-145** respectivamente, con valores cercanos al 80% de inhibición. Sin embargo, estos compuestos presentaron valores moderados de porcentaje de inhibición, de

alrededor del 50%, sobre la línea celular sana **COS-7**, por lo que su toxicidad podría ser considerada como moderada.

Finalmente, los compuestos **JVM8** y **JVM9** con sustituyentes aromáticos saturados en posición 4, resultaron altamente citotóxicos en la mayoría de las líneas celulares. Particularmente, el compuesto **JVM9** inhibió totalmente las líneas celulares a una concentración de 25 μM , por lo que se debió disminuir la concentración de evaluación a 12.5 μM , encontrando aún valores de inhibición muy grandes en las líneas **MCF-7**, **HCT-15** y **COS-7** de alrededor del 90, 80 y 75%, respectivamente. Estos resultados son un indicativo de que la inserción de un sustituyente con mayores grados de libertad, como la morfolina o piperidina, aumentan la potencia significativamente, pero a su vez disminuye la selectividad del compuesto. Un estudio de inhibición sobre diferentes cinasas de diversas familias sería de gran utilidad para comprobar tal hipótesis.

Por otra parte, la diferencia de actividad también puede relacionarse con el grado de sobreexpresión de las isoformas de AKT en las líneas celulares y una posible selectividad de las moléculas evaluadas frente a determinada isoforma de la cinasa. En la actualidad existen múltiples trabajos de sobreexpresión de AKT en las líneas celulares cancerosas evaluadas en el presente trabajo; no obstante, la mayoría de los experimentos no hacen distinción en el grado de sobreexpresión de las diferentes isoformas.⁸⁶⁻⁸⁹

Un factor adicional que podría estar relacionado con los resultados observados es la diferencia de solubilidad de cada compuesto en las condiciones experimentales del ensayo biológico. Por otra parte, se podría pensar que la diferencia de permeabilidad de los compuestos frente a las líneas celulares utilizadas podría tener determinada influencia en los resultados observados. Para comprobar este último punto se determinaron las propiedades moleculares de los compuestos **JVM1-9** utilizando la plataforma en línea SwissADME [Tabla 13].

Las propiedades predichas para cada compuesto fueron las siguientes: peso molecular (PM), donadores de puente de hidrógeno (DPH), aceptores de puente de hidrógeno (APH), enlaces rotables (ER), área polar superficial topológica (tPSA) y logaritmo del coeficiente de partición (logP).

Tabla 13. Propiedades moleculares de los compuestos **JVM1-9** predichas con la plataforma SwissADME.

Clave	PM	logP	tPSA	DPH	APH	ER
JVM1	471.90	2.99	142.71	3	9	4
JVM2	500.89	2.86	127.36	3	10	4
JVM3	466.45	1.82	127.36	3	10	4
JVM4	465.46	2.89	114.47	3	9	4
JVM5	499.91	3.51	114.47	3	9	4
JVM6	466.45	2.24	127.36	3	10	4
JVM7	533.46	3.77	114.47	3	9	5
JVM8	473.48	1.92	114.05	3	10	4
JVM9	471.51	3.14	104.82	3	9	4

Observando los resultados enlistados en la **Tabla 13**, es posible mencionar que no existe una tendencia clara entre los valores de logP predichos y los resultados biológicos observados. De igual forma, el resto de las propiedades moleculares no presentaron tendencia alguna con los resultados de citotoxicidad en líneas celulares. Sin embargo, es importante no perder de vista que tales valores mostrados en la **Tabla 13** son meramente predicciones y pudieran diferir significativamente con sus valores exactos.

Otro aspecto que considerar podría relacionarse a una diferencia de selectividad por parte de los compuestos a diversas cinasas diferentes a AKT. En tal panorama planteado, se puede sugerir que no todos los compuestos presentan la misma selectividad sobre la cinasa blanco. Debido a esto, resulta imperante efectuar estudios de inhibición enzimática de AKT y de otras cinasas que pudieran ser inhibidas colateralmente por acción de los compuestos **JVM1-9**.

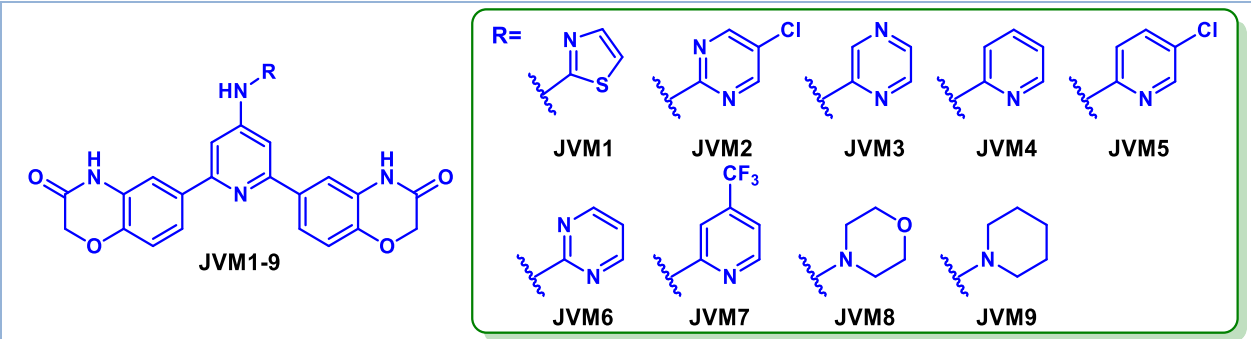
7.3. Parte computacional

Como parte complementaria del presente trabajo se efectuaron los estudios de acoplamiento molecular de las moléculas **JVM1-9** en dos programas diferentes con la intención de realizar un comparativo en los modos de interacción y energías de unión predichas. A continuación, se presentan los resultados obtenidos.

7.3.1. Acoplamiento molecular efectuado con AutoDock

En la **Tabla 14** se presentan los valores de energía de unión más favorables de cada uno de los compuestos preparados (**JVM1-9**), así como el tamaño de clúster obtenido. En tales estudios se incluyó el compuesto **GKS690693** como control [**Figura 27**].

Tabla 14. Valores de energías de unión de los compuestos evaluados en las tres isoformas de AKT con AutoDock4.2. Se incluyen el tamaño de clúster encontrado.



Clave	AKT1		AKT2		AKT3	
	$\Delta G_{\text{unión}}$ (Kcal/mol)	Tamaño clúster	$\Delta G_{\text{unión}}$ (Kcal/mol)	Tamaño clúster	$\Delta G_{\text{unión}}$ (Kcal/mol)	Tamaño clúster
JVM1	-10.37	16	-9.55	14	-9.37	10
JVM2	-11.31	15	-11.09	16	-10.46	14
JVM3	-10.71	14	-9.88	12	-9.52	15
JVM4	-10.68	11	-9.59	9	-9.63	13
JVM5	-10.42	14	-9.69	14	-9.40	10
JVM6	-11.75	17	-10.90	17	-10.79	10
JVM7	-10.39	15	-9.96	9	-9.97	11
JVM8	-10.16	16	-9.41	15	-8.90	11
JVM9	-10.42	8	-9.81	9	-9.18	12
GSK690693	-8.14	3	-8.81	7	-8.04	5

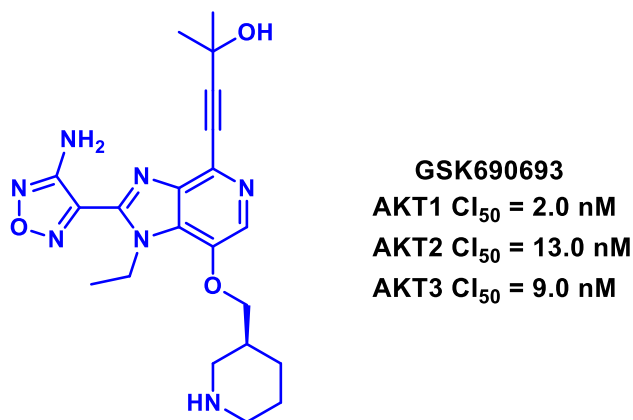


Figura 27. Estructura química del inhibidor de pAKT **GSK690693** utilizado como control.

Comparando entre sí los resultados obtenidos del acoplamiento molecular [Tabla 14], es posible observar una tendencia de interacción más favorable de los compuestos **JVM1-9** con AKT1, seguido de AKT2 y finalmente AKT3, ya que las energías de unión son más negativas. Estos resultados sugieren que los compuestos podrían presentar determinada selectividad frente a las diferentes isoformas de la cinasa en cuestión.

En lo que respecta al compuesto **GSK690693**, se observaron valores muy similares de energía de unión, situación que puede correlacionarse de manera aproximada con sus valores de CI_{50} determinados experimentalmente, ya que el compuesto presenta poca selectividad frente a las isoformas de AKT [Figura 27].

Por otra parte, se observó que el tamaño de clúster (número de conformaciones presentes en el clúster seleccionado) es elevado en los compuestos **JVM1-9**, situación que puede ser correlacionada con una alta probabilidad de que la conformación seleccionada sea viable. Las interacciones lógicas de las moléculas con las tres isoformas de AKT se encuentran resumidas en la **Tabla 15**. En dicha tabla se muestra el residuo que interaccionó, posteriormente el grupo funcional o entidad química que estableció la interacción y entre paréntesis se indica la región del grupo funcional o la entidad química en la molécula.

De la **Tabla 15**, refiriéndose a AKT1, se destacó que los compuestos **JVM1-9** presentaron interacciones similares con los residuos de Lys179 y Asp292 mediante puente de hidrógeno con el grupo carbonilo y el NH de la amida en la benzoxaxinona, respectivamente.

Tabla 15. Resumen de las interacciones observadas con AutoDock4.2

Compuesto	Interacciones observadas		
	AKT1	AKT2	AKT3
JVM1	Lys179 – O=C (BXN) Asp292 – NH (BXN)	Glu236 – S (Tiazol) Glu236 – NH (Py) Thr292 - NH (BXN) Lys181 – O=C (BXN) Asp293 – NH (BXN)	Lys179 – O=C (BXN) Asp292 – NH (BXN)
JVM2	Lys179 – O=C (BXN) Asp292 – NH (BXN)	Lys181 – O=C (BXN) Thr292 – NH (BXN)	Lys179 – O=C (BXN) Asp292 – NH (BXN)
JVM3	Lys179 – O=C (BXN) Asp292 – NH (BXN)	Glu236 – NH (Py) Lys181 – O=C (BXN) Thr292 - NH (BXN)	Lys179 – O=C (BXN) Asp292 – NH (BXN)
JVM4	Lys179 – O=C (BXN) Asp292 – NH (BXN)	Lys181 – O=C (BXN) Thr292 - NH (BXN)	Lys179 – O=C (BXN) Asp292 – NH (BXN)
JVM5	Lys179 – O=C (BXN) Asp292 – NH (BXN)	Lys181 – O=C (BXN) Thr292 - NH (BXN)	Lys179 – O=C (BXN) Asp292 – NH (BXN) Lys158 – NH (Py)
JVM6	Lys179 – O=C (BXN) Asp292 – NH (BXN) Thr211 – O=C (BXN)	Lys181 – O=C (BXN) Thr292 - NH (BXN) Asp293 – NH (BXN) Glu236 – NH (Py)	Lys179 – O=C (BXN) Asp292 – NH (BXN)
JVM7	Lys179 – O=C (BXN) Asp292 – NH (BXN)	Lys181 – O=C (BXN) Thr292 - NH (BXN) Asp293 – NH (BXN) Glu236 – NH (Py) Lys277 – F (Py)	Lys179 – O=C (BXN) Asp292 – NH (BXN) Glu234 – NH (Py)
JVM8	Lys179 – O=C (BXN) Asp292 – NH (BXN)	Lys181 – O=C (BXN) Thr292 - NH (BXN) Asp293 – NH (BXN) Glu236 – NH (Py)	Lys179 – O=C (BXN) Lys158 – NH (BXN)
JVM9	Lys179 – O=C (BXN) Asp292 – NH (BXN)	Lys181 – O=C (BXN) Thr292 - NH (BXN) Asp293 – NH (BXN) Glu236 – NH (Py)	Lys179 – O=C (BXN) Lys158 – NH (BXN)
GSK690693	Asp274 – OH Asn279 – OH Glu234 - NH ₂ ⁺	Lys277 – Py Thr313 – OH Glu236 - NH ₂ ⁺ Glu279 - NH ₂ ⁺ Asp293 - Oxadiazol	Glu191 – NH ₂ Asp274 – OH Lys276 – Py Glu278 – NH ₂ ⁺ Asp292 – NH ₂ ⁺

Abreviaturas: BXN: benzoxazinona, Py: piridina.

En el caso del compuesto **JVM6** se observó una interacción adicional de Thr211 con el otro grupo carbonilo presente en la molécula [Figura 28]. Tal interacción podría justificar su mayor valor de energía de unión predicho por el programa ($\Delta G_{\text{unión}}$: -11.75 Kcal/mol) [Tabla 14].

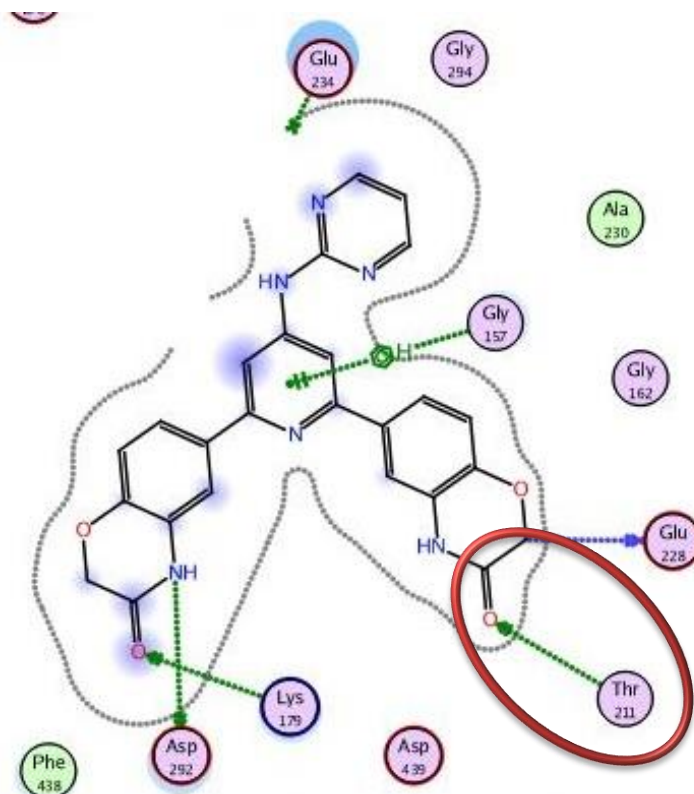


Figura 28. Interacciones observadas de **JVM6** con ATK1. Se muestra en rojo la interacción adicional de la molécula con Thr211.

En lo que respecta a AKT2, las únicas interacciones constantes con los compuestos **JVM1-9** correspondieron a Lys181 con un grupo carbonilo y Thr292 con un NH del grupo amida. El resto de las interacciones observadas fueron con diversos residuos de aminoácidos y no correlacionaron con los valores energéticos de unión de manera directa.

Finalmente, en AKT3 se observaron dos interacciones frecuentes con las moléculas **JVM1-7**, correspondientes a Lys179 y Asp292 (con el grupo carbonilo y con el NH de amida respectivamente). En los compuestos **JVM8** y **JVM9** las interacciones observadas fueron Lys158 con el grupo amino conector y Lys179 con el grupo carbonilo [Figura 28]. Una vez más los valores energéticos de unión no correlacionaron de manera directa con las interacciones observadas.

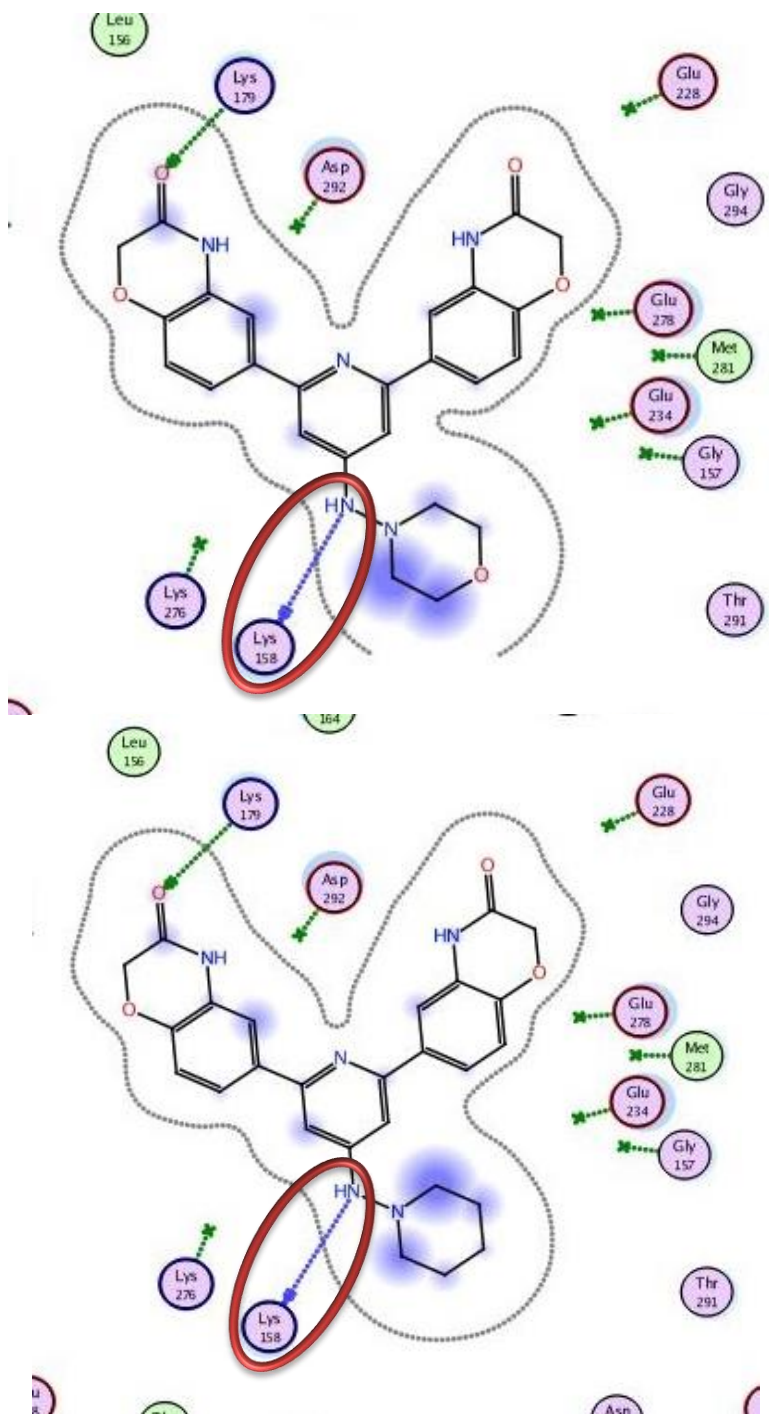


Figura 29. Interacciones observadas de los compuestos **JVM8** y **JVM9** con AKT3. Se muestra en rojo las interacciones de las moléculas con Lys158.

El inhibidor pAKT **GSK690693** presentó múltiples interacciones, de las cuales destacaron Glu234, Glu236 y Glu278 con el grupo NH de la piperidina en AKT1, AKT2 y AKT3 respectivamente. El resto de las interacciones resultó muy diverso con respecto a las presentadas por los compuestos **JVM1-9**.

Con respecto a la conformación predicha de las moléculas en las tres isoformas de AKT, se observaron acomodos similares de los compuestos **JVM1-9**. Como se observa en la **Figura 30**, las moléculas sintetizadas muestran una mejor distribución en el sitio catalítico de la cinasa, ocupando una mayor área superficial que abarca una cavidad posterior. Esto se debe en principio a los sustituyentes benzoxazinona presentes en las moléculas. Por otra parte, el inhibidor **GSK690693** presentó una distribución mayoritariamente favorecida en la región frontal del sitio catalítico. La situación antes mencionada evidencia la razón de que los valores energéticos resultaran mayores en los compuestos **JVM1-9** respecto a **GSK690693**.

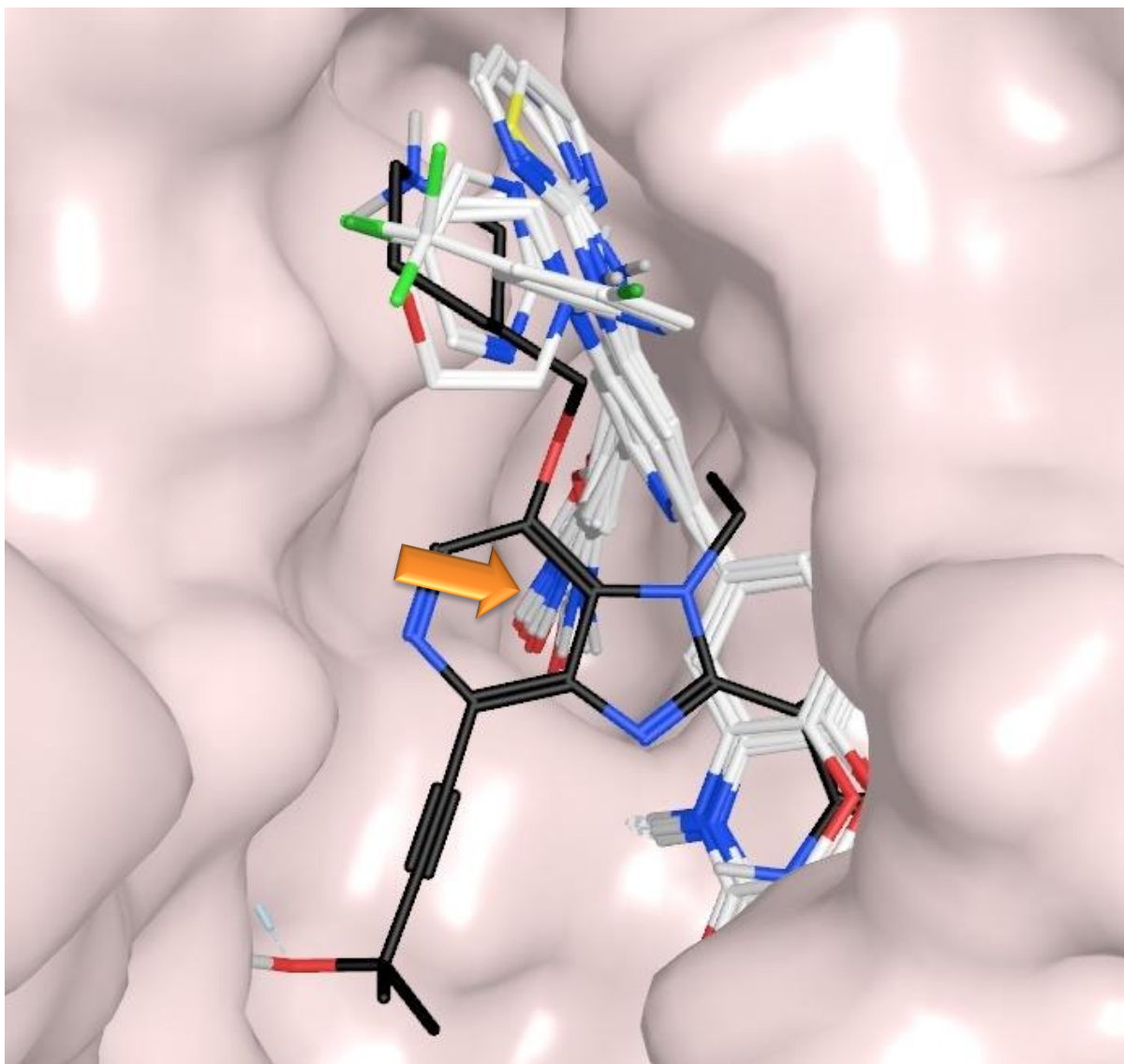


Figura 30. Superposición de los compuestos **JVM1-9** con el inhibidor **GSK690693** (compuesto negro) en el sitio catalítico de AKT1. Se señala en naranja la cavidad posterior ocupada por los sustituyentes de benzoxazinona presentes en las moléculas sintetizadas.

Como se puede apreciar en los diagramas 2D de interacciones de los compuestos con las isoformas de AKT (**Anexo III, Figuras 37 a 66**), los heterociclos presentes en la posición 4 de la piridina *scaffold* no generaron interacciones adicionales de tipo puente de hidrógeno o π - π , con excepción de **JVM1** en AKT2 en donde el azufre del 2-aminotiazolo interactuó con Glu236 mediante puente de hidrógeno [**Figura 31**]. Sin embargo, esta interacción no correlacionó con los valores energéticos ni con los resultados biológicos.

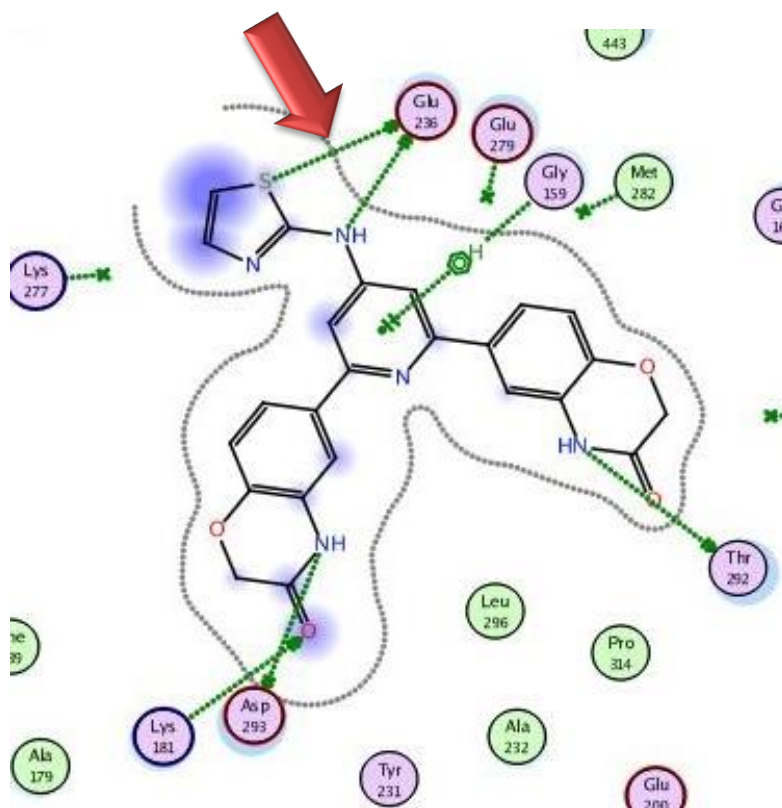


Figura 31. Interacciones observadas en el compuesto **JVM1** con AKT2. Se muestra en rojo la interacción de Glu236 con el azufre del 2-aminotiazolo sustituyente en posición 4 de la piridina.

7.3.2. Acoplamiento molecular efectuado con Maestro

A continuación, se presentan los valores de energía de unión más favorables con los compuestos **JVM1-9** y con el inhibidor **GSK690693** [**Tabla 16**]. Es importante destacar que las conformaciones obtenidas con el software Maestro se eligieron mediante la observación de los estados de penalización más bajos. Un valor de penalización bajo es relacionado a una estructura más viable ya que la conformación adoptada presenta menos interacciones intramoleculares desfavorables.

Tabla 16. Valores de energías de unión de los compuestos evaluados en las tres isoformas de AKT con el módulo Glide de Maestro 11.6.

Clave	AKT1	AKT2	AKT3
	$\Delta G_{\text{unión}}$ (Kcal/mol)	$\Delta G_{\text{unión}}$ (Kcal/mol)	$\Delta G_{\text{unión}}$ (Kcal/mol)
JVM1	-7.72	-3.16	-3.85
JVM2	-3.18	-3.50	-4.90
JVM3	-6.53	-3.36	-4.14
JVM4	-5.77	-5.61	-4.32
JVM5	-5.81	-5.77	-5.07
JVM6	-6.74	-3.59	-3.50
JVM7	-5.88	-4.80	-5.03
JVM8	-5.77	-3.95	-3.71
JVM9	-5.61	-3.99	-4.22
GSK690693	-3.55	-5.70	-4.61

Como se puede observar en la **Tabla 16**, los valores energéticos de unión presentaron una diferencia considerable con respecto a los obtenidos con el software AutoDock4.2. Este fenómeno es considerado normal ya que los algoritmos utilizados por cada software son distintos. Por tales razones las interacciones favorecidas variaron considerablemente. En el caso de Maestro 11.6 se observaron energías de unión menos favorables respecto a los obtenidos con AutoDock4.2 (valores más altos). A pesar de la diferencia en magnitud observada, una vez más se obtuvieron valores que sugirieron mayor selectividad de los compuestos sintetizados sobre AKT1. Asimismo, no se observaron diferencias significativas que predijeran selectividad sobre AKT2 o AKT3.

En la **Tabla 17** se resumen las interacciones lógicas observadas para las tres isoformas de la cinasa en cuestión. En el caso de AKT1, la única interacción que prevaleció en los compuestos **JVM1,3-9** fue Ala230 con el grupo carbonilo de la benzoxazinona. En lo que respecta a las otras isoformas se presentaron interacciones con residuos muy diversos sin correlación aparente con los valores energéticos de unión.

Tabla 17. Resumen de las interacciones observadas con Maestro

Compuesto	Interacciones observadas		
	AKT1	AKT2	AKT3
JVM1	Lys276 – O=C (BXN) Ala230 – O=C (BXN) Leu156 – NH (Py) Phe442 – Py (π)	Ninguna	Lys276 - N Tiazol Asp292 – NH (BXN) Phe442 – BXN (π) Glu234 – NH (BXN)
JVM2	Phe442 – Pirimidina (π) Glu234 – NH (Py) Asp292 – NH (BXN)	Lys181 – N (Py)	Glu234 – NH (BXN) Phe442 – BXN (π) Asp292 – NH (Py)
JVM3	Leu156 – NH (Py) Ala230 – O=C (BXN)	Phe163 – Pirimidina (π) Asp293 – NH (Py) Lys277 – BXN (π)	Asn279 – NH (Py) Lys158 – NH (BXN)
JVM4	Phe442 – Py (π) Glu234 – NH (Py) Ala230 – O=C (BXN)	Phe443 – Py (π) Glu236 – NH Ala232 – O=C (BXN) Lys181 – BXN (π)	Phe442 – BXN (π) Lys158 – NH (BXN)
JVM5	Phe442 – Py (π) Glu234 – NH (Py) Ala230 – O=C (BXN)	Lys277 – Py (π) Phe443 – Py (π) Glu236 – NH (Py) Lys181 – BXN (π)	Lys1587 – NH (BXN) Phe442 – BXN (π)
JVM6	Leu156 – NH (Py) Phe442 – Py (π) Ala230 – O=C (BXN)	Ninguna	Asn279 – Pirimidina Asn279 – NH (Py) Glu234 – NH (BXN)
JVM7	Phe442 – Py (π) Glu234 – NH (Py) Ala230 – O=C (BXN)	Lys277 – Py (π) Phe443 – Py (π) Glu236 – NH (Py) Lys181 – BXN (π)	Asp292 – NH (Py) Lys276 – BXN (π) Lys158 – NH (BXN)
JVM8	Glu234 – NH (Py) Ala230 – O=C (BXN)	Lys160 – NH y O=C (BXN)	Asn279 – NH (Py) Glu234 – NH (BXN)
JVM9	Ala230 – O=C (BXN) Glu234 – NH (Py)	Lys277 – BXN (π) Gly312 – O=C (BXN)	Glu234 – NH (BXN) Asn279 – NH (Py)
GSK690693	Glu198 – OH Thr160 – N (oxadiazol) Glu234 - NH ₂ ⁺ Phe161 - oxadiazol	Asp293 – NH ₂ ⁺ Asp293 – NH ₂ Asp275 – NH ₂ Lys181 – Py (π)	Asp292 – NH ₂ ⁺ Val164 – NH ₂ ⁺ Asn279 – OH Asp274 – OH

Abreviaturas: BXN: benzoxazinona, Py: piridina.

Comparando las conformaciones adoptadas por las moléculas **JVM1-9** se observó que resultaron muy variadas entre sí, caso contrario de lo que se observó con el software AutoDock4.2 en donde todas las moléculas presentaron conformaciones muy similares [Figura 32].

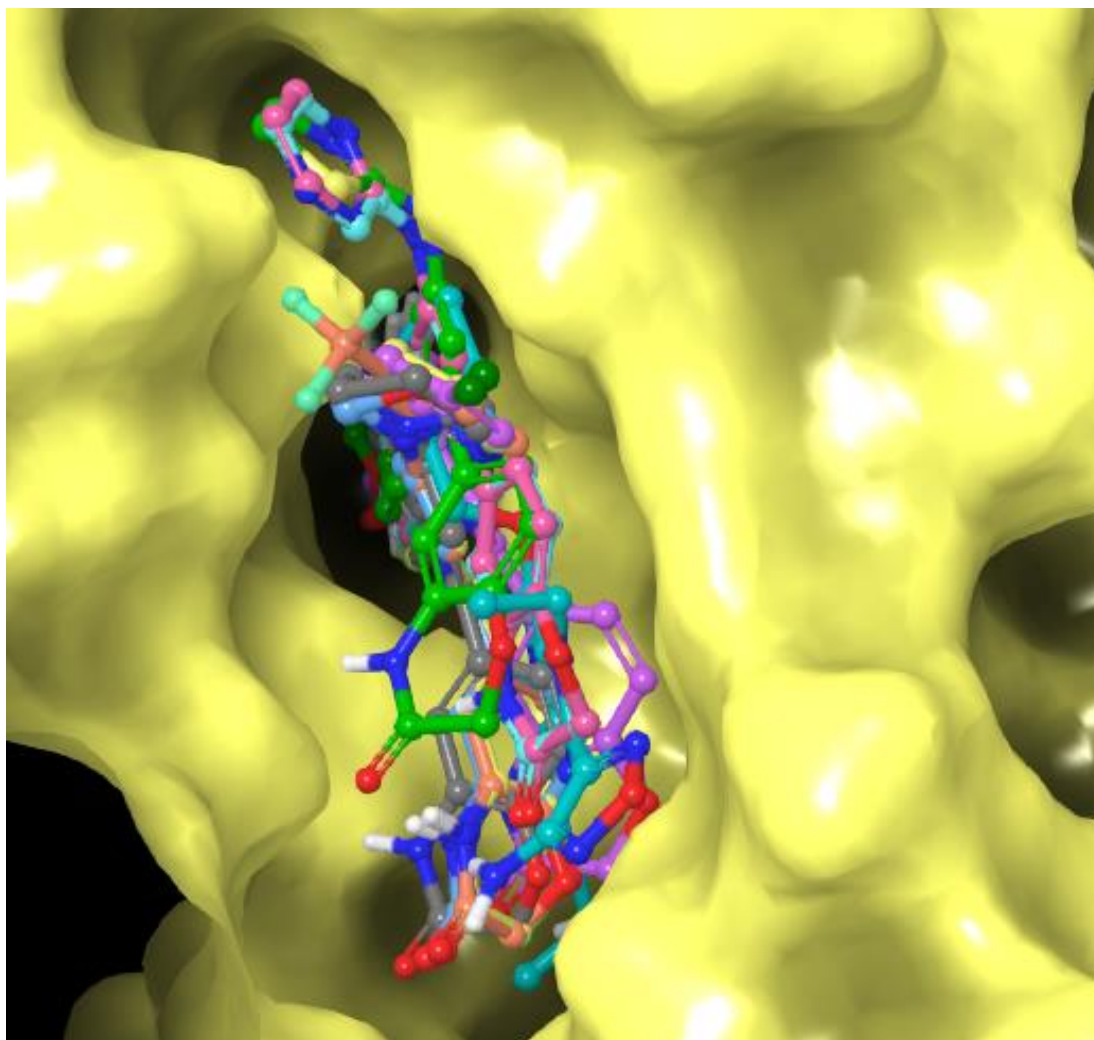


Figura 32. Superposición de los compuestos **JVM1-9** con el inhibidor **GSK690693** en el sitio catalítico de AKT1.

Observando los diagramas 2D de interacciones de los compuestos **JVM1-9** en las tres isoformas de AKT (**Anexo II, Figuras 67 a 96**), las interacciones generadas por los heterociclos sustituyentes en la posición 4 de la piridina *scaffold* fueron más significativos respecto a los observados con AutoDock4.

En primer lugar, se observó una interacción π - π entre el residuo Phe442 y el sustituyente 5-cloropirimidinilo del compuesto **JVM2** en AKT1 [Figura 33].

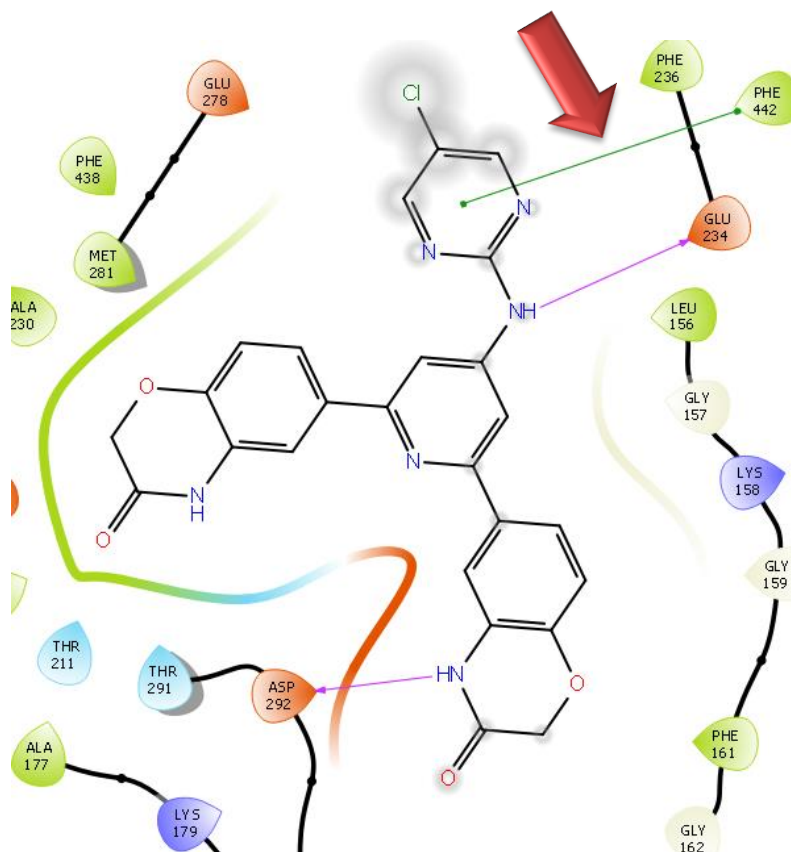


Figura 33. Interacciones observadas en el compuesto **JVM2** con AKT1. Se muestra en rojo la interacción π - π del residuo Phe442 con el sustituyente 5-cloropirimidinilo.

Con AKT2 se observó otra interacción de naturaleza π - π entre el residuo Phe163 y el sustituyente pirazinilo del compuesto **JVM3** [Figura 34]. Finalmente, AKT3 presentó dos compuestos (**JVM1** y **JVM6**) que exhibieron interacciones con los sustituyentes de la piridina en posición 4. El compuesto **JVM1** interaccionó con el residuo de Lys276 mediante puente de hidrógeno con el nitrógeno del sustituyente tiazolilo [Figura 35]. Mientras que **JVM6** interaccionó con la Asn279 mediante puente de hidrógeno con el nitrógeno del sustituyente pirimidinilo [Figura 36].

A pesar de que mediante el software Maestro se observaron más interacciones por parte de los sustituyentes heterocíclicos, estas no correlacionaron con los valores energéticos de manera directa.

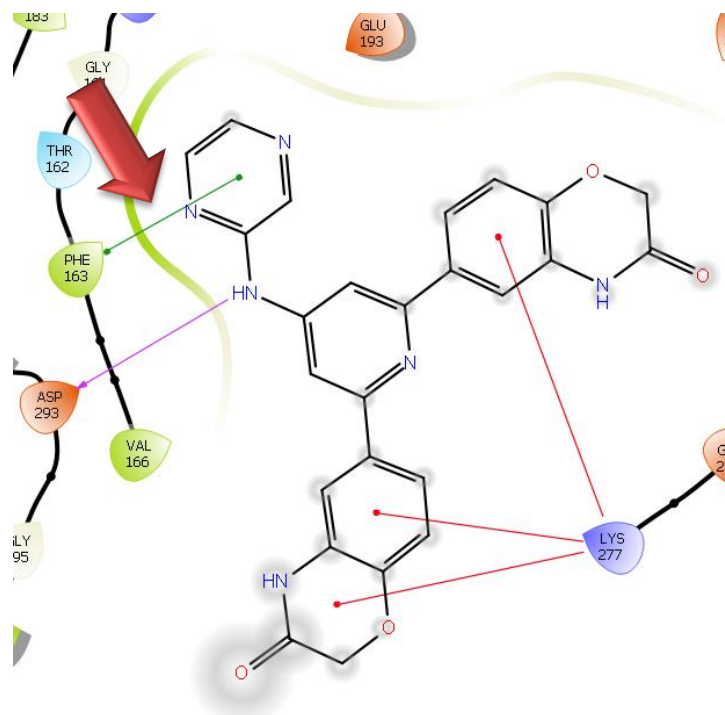


Figura 34. Interacciones observadas en el compuesto **JVM3** con AKT2. Se muestra en rojo la interacción π - π del residuo Phe163 con el sustituyente pirazinilo.

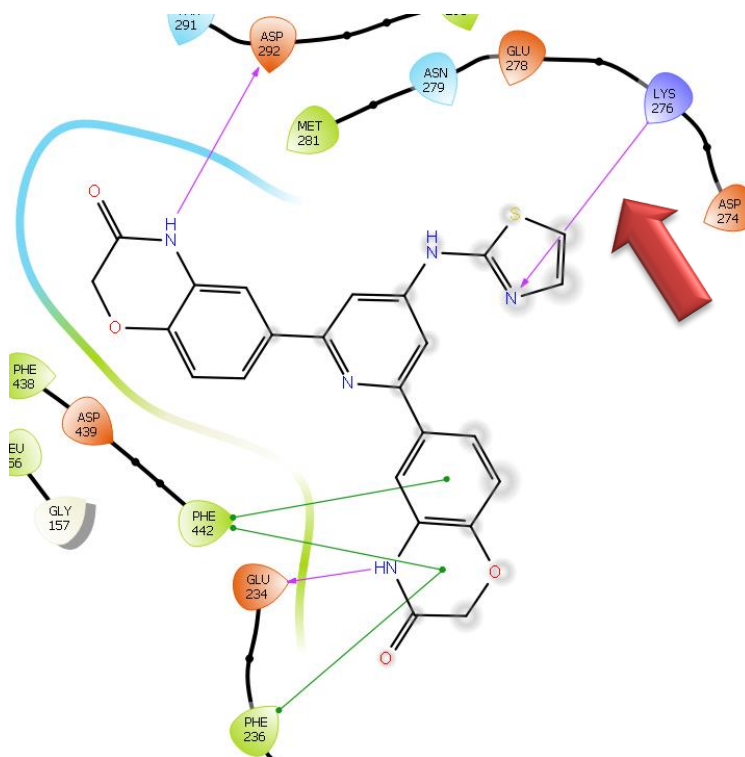


Figura 35. Interacciones observadas en el compuesto **JVM1** con AKT3. Se muestra en rojo la interacción del residuo Lys276 con el nitrógeno del sustituyente tiazolilo.

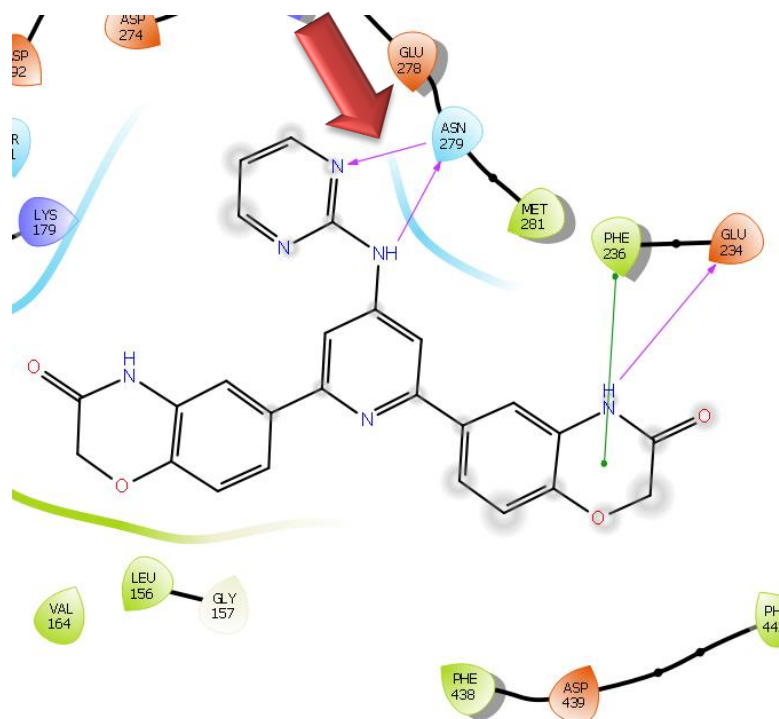


Figura 36. Interacciones observadas en el compuesto **JVM6** con AKT3. Se muestra en rojo la interacción del residuo Asn279 con el nitrógeno del sustituyente pirimidinilo.

8. CONCLUSIONES

Con base en los objetivos planteados, se lograron sintetizar exitosamente nueve piridinas 2,4,6-trisustituidas (**JVM1-9**) mediante la metodología propuesta, utilizando acoplamientos cruzados catalizados por paladio. Tales compuestos se caracterizaron mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

Los compuestos **JVM1-7** presentaron moderada-baja solubilidad en una serie de disolventes orgánicos, mientras que los compuestos **JVM8-9** mostraron alta solubilidad en disolventes orgánicos comunes, lo cual facilitó su purificación.

Los compuestos **JVM1-9** se sometieron a ensayos de inhibición de líneas celulares cancerosas (**DU-145**, **PC-3**, **MCF-7**, **MDA-MB-231**, **HCT-15**) y una línea celular sana (**COS-7**) a una concentración de 25 μM (12.5 μM en el caso de **JVM9**). De estos experimentos, se observó que:

- Los compuestos **JVM1**, **JVM3**, **JVM4**, **JVM5** y **JVM6** resultaron selectivos contra las líneas cancerosas **MDA-MB-231** y **DU-145** con un porcentaje de inhibición moderado (50 – 60% y 25 – 41%, respectivamente), sin afectar a la línea celular sana. Estos resultados dan pauta a establecer un punto de partida para diversos procesos de optimización de las estructuras anteriormente mencionadas, con la finalidad de encontrar mejores moléculas con potencial anticancerígeno.
- El compuesto **JVM2** presentó gran potencial inhibitorio sobre las líneas cancerosas, en particular **MDA-MB-231** (85%), presentando un considerable porcentaje de inhibición sobre la línea celular sana (50%).
- Los compuestos **JVM7**, **JVM8** y **JVM9** presentaron un elevado potencial inhibitorio sobre las líneas celulares cancerosas, pero resultaron muy citotóxicos en la línea celular sana.

Los estudios de acoplamiento molecular mostraron valores energéticos favorables de las moléculas con las tres isoformas de AKT, particularmente con AKT1, aunque pocos compuestos evaluados presentaron interacciones particulares de los heterociclos en posición 4 de la piridina con el sitio catalítico de la cinasa. Resulta imperante realizar estudios enzimáticos en AKT para correlacionar experimentalmente los resultados de acoplamiento molecular.

9. PERSPECTIVAS

- Determinar la CI_{50} de los compuestos **JVM1**, **JVM2**, **JVM3**, **JVM4**, **JVM5** y **JVM6** en las líneas celulares cancerosas **DU-145** y **MDA-MB-231**.
- Efectuar estudios de dinámica molecular de los compuestos **JVM1-9** en las tres isoformas de AKT, con la finalidad de evaluar la estabilidad de los complejos proteína-ligando predichos.
- Realizar los estudios de inhibición en las tres isoformas de AKT con los compuestos **JVM1-9**, mediante un kit comercial, utilizando las condiciones adecuadas. Adicionalmente, determinar la CI_{50} sobre la determinada isoforma, de los compuestos que presenten mejores resultados.
- Con los compuestos más prometedores, realizar estudios de selectividad utilizando una batería robusta de diversas cinasas.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. American Cancer Society. Consultada el 31 de agosto del 2018. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/aspectos-basicos-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer.html>
2. Instituto Nacional del Cáncer. Consultada el 31 de agosto del 2018. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>
3. Jones, R. G. & Thompson, C. B. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Cell Death Dis.* **3**(1), 537–548 (2009).
4. Bradbury, R. *Cancer*. 1a ed., Springer-Verlag, 2007, Berlin.
5. Weston, A., H. *Multistage Carcinogenesis. Cancer Medicine*. 6 ed., DC Decker, 2003, EUA.
6. Steeg, P. S. Targeting metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 201–218 (2016).
7. Hüsemann, Y. *et al.* Systemic Spread Is an Early Step in Breast Cancer. *Cancer Cell* **13**, 58–68 (2008).
8. David E., T. *Chemistry and Pharmacology of Anticancer Drugs*. 1 ed., CRC Press, 2007, EUA.
9. Torre, L. Global Cancer Facts & Figures 3rd Edition. *Am. Cancer Soc.* 1–64 (2015).
10. INEGI. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. Datos Nacionales. Consultado el 31 de agosto del 2018. Disponible en: www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2017/cancer2017_Nal.pdf
11. Cáncer, tercera causa de muerte en México. Consultada el 31 de agosto del 2018. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/prensa/318-cancer-tercera-causa-de-muerte-en-mexico>
12. Parmeshwar, R. *et al.* Principles of cancer screening. *Surg. (United Kingdom)* **36**, 134–138 (2018).
13. Thigpen, S. Cancer Screening 2016. *Am. J. Med. Sci.* **352**, 493–501 (2016).
14. Lee, K. T. *et al.* Individualized Approach to Cancer Screening in Older Adults. *Clin. Geriatr. Med.* **34**, 11–23 (2018).
15. Urruticoechea, A. *et al.* Recent Advances in Cancer Therapy: An Overview. *Curr. Pharm. Des.* **16**, 3–10 (2010).
16. Chui Li., M. *et al.* Therapy of choriocarcinoma and related trophoblastic tumors with folic acid and purine antagonists. *N. Engl. J. Med.* **321**, 794–799 (1958).
17. Jacques, J. *et al.* The pharmacology and clinical use of methotrexate. *N. Engl. J. Med.* **3**, 1094–1104 (1983).
18. Jordan, V. C. *Hormone Therapy in Breast and Prostate Cancer*. 1 ed., Humana Press, 2009, EUA.

19. Weston, A., H. *Multistage Carcinogenesis. Cancer Medicine*. 6 ed., DC Decker, 2003, EUA.
20. Hanahan, D. *et al.* The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
21. Lombardino, J. *et al.* The role of the medicinal chemist in drug discovery - Then and now. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 853–862 (2004).
22. DeVita, V. T. *et al.* A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res.* **68**, 8643–8653 (2008).
23. Matthews, D. J. *Targeting Protein Kinases for Cancer Therapy*. 1 ed., Wiley, 2010, EUA.
24. Arencibia, J. M., *et al.* AGC protein kinases: From structural mechanism of regulation to allosteric drug development for the treatment of human diseases. *Biochim. Biophys. Acta.* **834**, 1302–1321 (2013).
25. Manning, G. *et al.* The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Sciencemag.Org* **298**, 1912–1934 (2002).
26. Leroux, A., E. *et al.* AGC kinases, mechanisms of regulation and innovative drug development. *Semin. Cancer Biol.* **48**, 1–17 (2018).
27. FDA-approved protein kinase inhibitors compiled by Robert Roskoski Jr. Consultada el 31 de agosto del 2018. Disponible en: <http://www.brimr.org/PKI/PKIs.htm>
28. Fischer J. *et al.* *Successful Drug Discovery*. Vol. 3., Wiley, 2018, Alemania.
29. Ferguson, F. M. *et al.* Kinase inhibitors: The road ahead. *Nat. Rev. Drug Discov.* **17**, 353–376 (2018).
30. Prêtre, V. *et al.* Inhibition of Akt and other AGC kinases: A target for clinical cancer therapy? *Seminars in Cancer Biology* **48**, 70–77 (2018).
31. Vijayan, R., S. *et al.* Conformational analysis of the DFG-out kinase motif and biochemical profiling of structurally validated type II inhibitors. *J. Med. Chem.* **58**, 466–479 (2015).
32. Müller, S. *et al.* The ins and outs of selective kinase inhibitor development. *Nat. Chem. Biol.* **11**, 818–821 (2015).
33. Zhao, Z. *et al.* Exploration of type II binding mode: A privileged approach for kinase inhibitor focused drug discovery? *ACS Chem. Biol.* **9**, 1230–1241 (2014).
34. Roskoski, R. Classification of small molecule protein kinase inhibitors based upon the structures of their drug-enzyme complexes. *Pharmacol. Res.* **103**, 26–48 (2016).
35. Lamba, V. *et al.* New Directions in Targeting Protein Kinases: Focusing Upon True Allosteric and Bivalent Inhibitors. *Curr. Pharm. Des.* **18**, 2936–2945 (2012).
36. Janku, F. *et al.* Targeting the PI3K pathway in cancer: Are we making headway? *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **15**, 273–291 (2018).
37. Hennessey, B. *et al.* Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**, 988–1004 (2005).

38. Woo, S. U. *et al.* Vertical inhibition of the PI3K/Akt/mTOR pathway is synergistic in breast cancer. *Oncogenesis* **6**, e385 (2017).
39. Le Grand, M. *et al.* Akt targeting as a strategy to boost chemotherapy efficacy in non-small cell lung cancer through metabolism suppression. *Sci. Rep.* **7**, 1–13 (2017).
40. Manning, B. D. *et al.* AKT / PKB Signaling : Navigating Downstream. *Cell* **129**, 1261–1274 (2007).
41. Testa, J. R. *et al.* AKT signaling in normal and malignant cells. *Oncogene* **24**, 7391–7393 (2005).
42. Robey, R. B. *et al.* Is Akt the "Warburg kinase"?— Akt-energy metabolism interactions and oncogenesis. *Seminars in Cancer Biology* **19**, 25–31 (2009).
43. Zhu, J. *et al.* Targeting the Phosphatidylinositol 3-Kinase / AKT Pathway for the Treatment of Multiple Myeloma. *Curr. Med. Chem.* **21**, 3173–3187 (2014).
44. Kumar, C. *et al.* AKT crystal structure and AKT-specific inhibitors. *Oncogene* **24**, 7493–7501 (2005).
45. Houédé, N. *et al.* Targeting the genetic alterations of the PI3K-AKT-mTOR pathway: Its potential use in the treatment of bladder cancers. *Pharmacol. Ther.* **145**, 1–18 (2015).
46. Fumarola, C. *et al.* Targeting PI3K/AKT/mTOR pathway in non small cell lung cancer. *Biochem Pharmacol* **90**, 197–207 (2014).
47. Hemmings, B. *et al.* PI3k-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**, 2012–2015 (2015).
48. Zhang, X. *et al.* Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochim. Biophys Acta - Mol. Cell Res.* **1813**, 1978–1986 (2011).
49. Mattmann, M. E. *et al.* Inhibition of Akt with small molecules and biologics: historical perspective and current status of the patent landscape. *Expert Opin The. Pat.* **21**, 1309–1338 (2011).
50. Sun, M. *et al.* Cancers and Its Constitutive Activation Is Required for Oncogenic Transformation in NIH3T3 Cells. *Cancer* **159**, 431–437 (2001).
51. Gonzalez, E. *et al.* The Akt kinases: Isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell Cycle* **8**, 2502–2508 (2009).
52. Wu, Z. *et al.* Rapid assembly of diverse and potent allosteric Akt inhibitors. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **18**, 2211–2214 (2008).
53. Bilodeau, M. T. *et al.* Allosteric inhibitors of Akt1 and Akt2: A naphthyridinone with efficacy in an A2780 tumor xenograft model. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **18**, 3178–3182 (2008).
54. Rouse, M. B. *et al.* Aminofurazans as potent inhibitors of AKT kinase. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **19**, 1508–1511 (2009).
55. Addie, M. *et al.* Discovery of 4-amino-N-[(1S)-1-(4-chlorophenyl)-3-hydroxypropyl]-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidine-4-carboxamide (AZD5363), an orally

- bioavailable, potent inhibitor of Akt kinases. *J. Med. Chem.* **56**, 2059–2073 (2013).
56. Nitulescu, G., M. *et al.* Akt inhibitors in cancer treatment: The long journey from drug discovery to clinical use (Review). *Int. J. Oncol.* **48**, 869–885 (2016).
57. Woods, K., W. *et al.* Synthesis and SAR of indazole-pyridine based protein kinase B/Akt inhibitors. *Bioorganic Med. Chem.* **14**, 6832–6846 (2006).
58. Kallan, N. C. *et al.* Discovery and SAR of spirochromane Akt inhibitors. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **21**, 2410–2414 (2011).
59. Lin, J. *et al.* Targeting activated Akt with GDC-0068, a novel selective Akt inhibitor that is efficacious in multiple tumor models. *Clin. Cancer Res.* **19**, 1760–1772 (2013).
60. Wang, Q. *et al.* Akt as a target for cancer therapy: More is not always better (lessons from studies in mice). *Br. J. Cancer* **117**, 159–163 (2017).
61. Prado Romero, D., L. Tesis de licenciatura. Diseño de piridinas 2,4,6-trisustituidas como anticancerígenos inhibidores de la AKT cinasa y estudio sobre su síntesis. 2018, Facultad de Química, UNAM, México.
62. Medina-Franco, J. L. *et al.* Discovery of a novel protein kinase B inhibitor by structure-based virtual screening. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **19**, 4634–4638 (2009).
63. Hernández-Campos, A. *et al.* Docking of protein kinase B inhibitors: implications in the structure-based optimization of a novel scaffold. *Chem. Biol. Drug Des.* **76**, 269–276 (2010).
64. Trejo-Soto, P. J. *et al.* In search of AKT kinase inhibitors as anticancer agents: Structure-based design, docking, and molecular dynamics studies of 2,4,6-trisubstituted pyridines. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **36**, 423–442 (2018).
65. Sanabria Chanaga, E., E. Tesis de doctorado. Diseño, síntesis y evaluación biológica de piridinas 2,4,6-trisustituidas como inhibidores de la AKT cinasa. 2019, Facultad de Química, UNAM, México.
66. Bäckvall, J., E. Palladium-Catalyzed Cross Couplings in Organic Synthesis - Scientific Background on the Nobel Prize in Chemistry 2010. *Sci. Backgr. Nobel Prize Chem.* **50005**, 1–12 (2010).
67. Kürti, L & Czako B. *Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis*. 1a ed., Elsevier, 2005, UK.
68. Torborg, C. *et al.* Recent applications of palladium-catalyzed coupling reactions in the pharmaceutical, agrochemical, and fine chemical industries. *Adv. Synth. Catal.* **351**, 3027–3043 (2009).
69. Ruiz-Castillo, P. *et al.* Applications of Palladium-Catalyzed C-N Cross-Coupling Reactions. *Chem. Rev.* **116**, 12564–12649 (2016).
70. Israr, H. *et al.* Metal Catalyzed Suzuki-Miyaura Cross-Coupling – Efficient Methodology for Synthesis the Natural and non-Natural biological active Molecules. *Preprints* 1–31 (2017).

71. Li, J. *et al.* Palladium in Heterocyclic Chemistry - A Guide for the Synthetic Chemist. 2a ed., Elsevier, 2006, EUA.
72. Spartan, version 10; Wavefunction Inc. Irvine, CA: Author, 2010.
73. Morris, G. *et al.* AutoDock4 and AUTODOCKTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **30**, 2785-2791 (2009).
74. *Schrödinger Release 2018-2: Maestro*, version 11.; New York, NY: Schrödinger LCC.
75. Bagutski, V., *et al.* Improved method for the conversion of pinacolboronic esters into trifluoroborate salts: facile synthesis of chiral secondary and tertiary trifluoroborates. *Tetrahedron* **65**, 9956–9960 (2009).
76. Oliveira, R., A. *et al.* ^1H , ^{13}C , ^{19}F and ^{11}B NMR spectral reference data of some potassium organotrifluoroborates. *Magn. Reson. Chem.* **47**, 873–878 (2009).
77. Harris, M., C. *et al.* Sequential N-arylation of primary amines as a route to alkyldiarylamines. *J. Org. Chem.* **64**, 6019–6022 (1999).
78. Joule, J. *et al.* *Heterocyclic Chemistry*. 5a ed., Wiley, 2010, UK.
79. Düfert, M. A., Billingsley, K. L. & Buchwald, S. L. Suzuki-miyaura cross-coupling of unprotected, nitrogen-rich heterocycles: Substrate scope and mechanistic investigation. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 12877–12885 (2013).
80. Feuerstein, M. *et al.* Efficient coupling of heteroaryl halides with arylboronic acids in the presence of a palladium-tetraphosphine catalyst. *J. Organomet. Chem.* **687**, 327–336 (2003).
81. Dupont, J. *et al.* *Palladacycles: Synthesis, Characterization and Applications*. 1 ed., Wiley, 2008, Alemania.
82. Thornton, H. M. Tesis de maestría. *Cesium effect: a mild and efficient synthesis of secondary and tertiary phosphines. The faculty of the department of chemistry*. 2004, Western Kentucky University, USA.
83. Marion, N. *et al.* Modified (NHC)Pd(allyl)Cl (NHC = N-Heterocyclic Carbene) Complexes for Room-Temperature Suzuki - Miyaura and Buchwald - Hartwig Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 4101 (2006).
84. Vichai, V. & Kirtikara, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat. Protoc.* **1**, 1112–1116 (2006).
85. Voigt, W. Sulforhodamine B Assay and Chemosensitivity. *Chemosensitivity* **110**, 039–048
86. Shin, D. Y. *et al.* Apoptosis induction of human prostate carcinoma DU145 cells by diallyl disulfide via modulation of JNK and PI3K/AKT signaling pathways. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 14158–14171 (2012).
87. Gunadharini, D. N. *et al.* Induction of apoptosis and inhibition of PI3K/Akt pathway in PC-3 and LNCaP prostate cancer cells by ethanolic neem leaf extract. *J. Ethnopharmacol.* **134**, 644–650 (2011).

88. Jia, T. *et al.* The differential susceptibilities of MCF-7 and MDA-MB-231 cells to the cytotoxic effects of curcumin are associated with the PI3K/Akt-SKP2-Cip/Kips pathway. *Cancer Cell Int.* **14**, 1–14 (2014).
89. Umesalma, S. *et al.* Ellagic acid inhibits proliferation and induced apoptosis via the Akt signaling pathway in HCT-15 colon adenocarcinoma cells. *Mol. Cell. Biochem.* **399**, 303–313 (2015).

11. ANEXO I - PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES: PARTE QUÍMICA

11.1. Instrumentación y materiales

Los reactivos y disolventes utilizados corresponden a las casas J.T. Baker[®], Sigma Aldrich[®], Merck[®], Umicore[®], Johnson Matthey[®] y Química Pura[®]. Tales materiales se usaron directamente de los recipientes contenedores y no se sometieron a procesos adicionales de purificación a menos que se indique lo contrario.

El peso de las sustancias se determinó en una balanza analítica Sartorius[®] A210P o bien en una balanza granataria Scientech[®] SL600.

Para efectuar las reacciones a temperatura constante se empleó una parrilla automática IKA[®] RET BasicS001 con sensor de temperatura IKATRON ETS-D4 fuzzy.

Los acoplamiento de Suzuki-Miyaura mencionados se llevaron a cabo en un microondas Anton Paar[®] Monowave 400, utilizando viales de 10 mL. El microondas se equipó con un automuestreador Paar[®] MAS 24 y un compresor Sprayit[®] SP9402.

Para la evaporación de los disolventes se utilizó el Rotaevaporador Büchi[®] R-215, provisto de un baño de agua Büchi[®] B-490, acoplado a una bomba de vacío Vacuubrand[®] MD 4C y un enfriador Thermo[®] IP20 o bien se utilizó el Rotaevaporador IKA[®] RV 10, provisto de un baño de agua IKA[®] HB 10, acoplado a una bomba de vacío Vacuubrand[®] MD 4C NT+AK+IK y un enfriador Brinkmann[®] IC-30.

Los puntos de fusión (*pf*) de los compuestos se determinaron en un aparato Büchi[®] B-540, utilizando capilares de vidrio y no están corregidos.

A los compuestos finales se le eliminaron las trazas de agua con un equipo Kugelrohr Büchi[®] B-580 adaptado a una bomba de vacío Büchi[®] V-800.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN ¹H, ¹³C, HMBC, HSQC, NOESY) se realizaron en espectrómetros Varian[®] Unity Inova de 400 MHz o bien de 600 MHz, usando tetrametilsilano como referencia interna.

Los espectros de IR se determinaron en un espectrofotómetro de transformada de Fourier marca y modelo Perkin Elmer[®] FT-IR 1600, utilizando la técnica ATR. Las frecuencias de las bandas resultantes se representan en cm⁻¹.

La espectrometría de masas se realizó en un equipo Perkin Elmer AxION[®] 2 TOF acoplado a un módulo AxION[®] DSA mediante la técnica de ionización APCI. En lo que respecta a la técnica IE, se utilizó un equipo The MStation[®] JMS-700.

Los disolventes deuterados empleados fueron dimetilsulfóxido, cloroformo y agua. Los desplazamientos químicos (δ) se reportan en ppm. Las constantes de acoplamiento J se reportan en Hertz. La simbología empleada es: s = señal simple, d = señal doble, t = señal triple, c = señal cuádruple, m = señal múltiple, dd= señal doble de dobles, dt= señal doble de triples, sa = señal simple y ancha, -D₂O = desaparece por intercambio con agua deuterada.

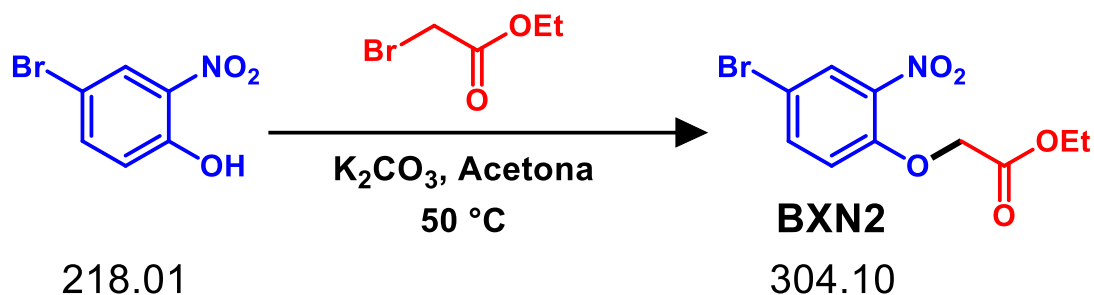
Las cromatografías en capa fina (CCF) para el monitoreo de reacciones se hicieron en placas cromatográficas de gel de sílice 60 Merck[®] GF-254. La visualización de los compuestos se realizó con una lámpara UVP[®] UVGL-25 Mineralight[®]. Las cromatografías en columna se llevaron a cabo usando como fase estacionaria gel de sílice 60 Å Sigma Aldrich[®] con una distribución de tamaño de partícula de 63-200 μm (malla 70-230). Los sistemas de elución utilizados fueron los mostrados en la **Tabla 18**.

Tabla 18. Sistemas cromatográficos utilizados

Sistema	Disolventes	Proporción
I	Hex:AcOEt	60:40
II	Hex:AcOEt	70:30
III	Hex:AcOEt	80:20
IV	Hex:AcOEt	90:10
V	AcOEt:Hex	90:10
VI	AcOEt:Hex	95:05
VII	CHCl ₃ :MeOH	90:10

11.2. Técnicas para la síntesis de los compuestos

11.2.1. (4-Bromo-2-nitrofenoxi)acetato de etilo (BXN2)



En un matraz bola de 50 mL, equipado con agitador magnético y condensador en posición de reflujo, se disolvieron 10.0 g (45.87 mmol) de 4-bromo-2-nitrofenol en 30 mL de acetona. Posteriormente se adicionaron 4.62 g (33.42 mmol, 1.5 eq) de carbonato de potasio y se dejó en agitación vigorosa durante 20 minutos para posteriormente adicionar 7.5 mL (1.5 eq) de α -bromoacetato de etilo. Después se calentó la mezcla de reacción a 50 °C durante 2 horas. Concluida la reacción se destiló el disolvente a presión reducida hasta obtener una resina a la cual se le adicionó agua helada, observando la precipitación de un sólido amarillo claro, el cual se lavó con abundante agua fría y se secó a vacío. Se recuperaron 13.45 g (96.5%) del compuesto **BXN2** el cual mostró un *R_f* de 0.38 (**Sistema I**) y un *p_f* de 67.0 - 68.0 °C. Compuesto soluble en acetona y MeOH.

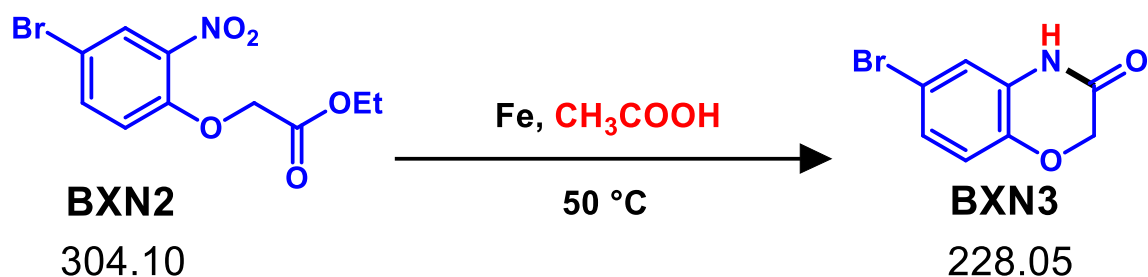
RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz, δ ppm): 1.19 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz), 4.16 (c, 2H, *J* = 7.1 Hz), 5.03 (s, 2H), 7.29 (d, 1H, *J* = 9.1 Hz), 7.81 (dd, 1H, *J* = 9.0, 2.5 Hz), 8.13 (d, 1H, *J* = 2.5 Hz).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz, δ ppm): 14.07, 61.04, 65.72, 111.91, 117.51, 127.17, 136.47, 140.46, 149.51, 167.73.

IR (FTIR por reflectancia ATR, cm^{-1}): 2993.30 ($\nu_{\text{Ar-H}}$), 1747.60 ($\nu_{\text{C=O}}$ éster), 1519.25 (ν_{NO_2}), 1345.45 (ν_{NO_2}), 1204.35 ($\nu_{\text{Ar-O}}$).

Anexo IV – **Espectros 1, 2, 3 y 4.**

11.2.2. 6-Bromo-2H-1,4-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona (BXN3)



En un vaso de precipitados de 300 mL, equipado con agitación magnética, se adicionaron 13.63 g (44.82 mmol) del compuesto **BXN2**, 27.9 g de Fe metálico en hojuelas (11.1 eq, 0.49 mol) y 60 mL de ácido acético glacial. La mezcla de reacción se dejó en agitación mecánica durante 3 horas a una temperatura de 50 °C. Concluida la reacción se procedió a coleccionar la mezcla de reacción en un matraz bola y se eliminó el ácido acético a presión reducida hasta sequedad, obteniendo un sólido gris. El sólido recuperado se suspendió en 30 mL de acetato de etilo y se procedió a filtrar a vacío. Se realizaron 4x30 mL lavados de acetato de etilo, para posteriormente concentrar el disolvente a presión reducida. Finalmente, se adicionó 100 mL de agua helada al producto concentrando, observando la precipitación de un sólido beige. Se obtuvieron 9.67 g (94.9%) del producto **BXN3** el cual mostró un *R_f* de 0.29 (**Sistema I**) y un *pf* de 223.9 – 224.3 °C. Compuesto soluble en acetona y AcOEt.

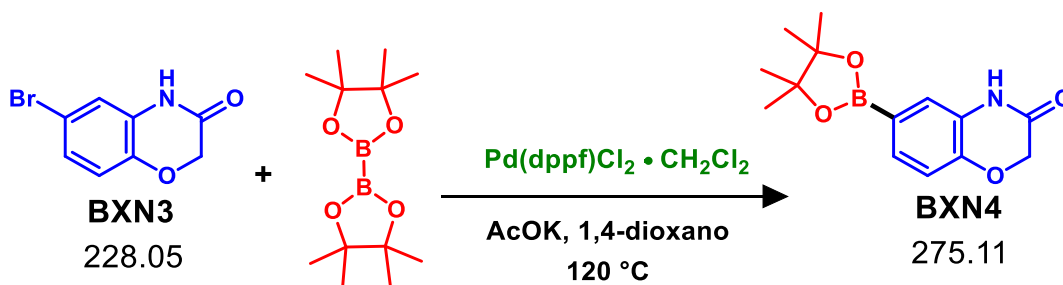
RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz, δ ppm): 4.58 (s, 2H), 6.91 (d, 1H, *J*= 8.5 Hz), 7.02 (d, 1H, *J*= 2.3 Hz), 7.06 (dd, 1H, *J*= 8.5, 2.4 Hz), 10.78 (sa, 1H, -D₂O).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz, δ ppm): 66.67, 113.30, 117.99, 118.12, 125.35, 129.08, 142.63, 164.70.

IR (FTIR por reflectancia ATR, cm⁻¹): 3328.88 (ν_{N-H}), 2958.88 (ν_{Ar-H}), 1678.46 (ν_{C=O} amida), 1598.52 (ν_{Ar-N}), 1211.35 (ν_{Ar-O}).

Anexo IV – **Espectros 5, 6, 7 y 8.**

11.2.3. 6-(4,4,5,5-Tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona (BXN4)



En un matraz bola de 50 mL, equipado con agitador magnético, condensador en posición de reflujo y adaptado a una llave de tres vías equipada con nitrógeno, se adicionaron 2.71 g (11.88 mmol) del compuesto **BXN3**, 3.05 g (1 eq, 11.89 mmol) de diborobis(pinacolato) (B_2Pin_2), 0.48 g (5% mol) de [1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio (II) acomplexado con diclorometano y 3.62 g (3.1 eq, 36.8891 mmol) de acetato de potasio. Posteriormente se adicionaron 25 mL de 1,4-dioxano y se realizaron 5 purgas con N_2 . La mezcla de reacción se calentó durante 6 horas a 120 °C. Concluido el tiempo de reacción se procedió a destilar el disolvente a presión reducida. El sólido obtenido se eluyó en una columna de alúmina neutra, usando como fase móvil AcOEt. Las fases colectadas se concentraron a presión reducida hasta obtener un sólido beige el cual se dejó en agitación con 30 mL de un sistema hexano/ CH_2Cl_2 (80:20) en frío durante 1 hora. Concluido el tiempo se procedió separar el sólido por filtración con vacío. El sólido obtenido se empacó en gel de sílice y se sometió a una columna cromatográfica, usando como fase móvil hexano/AcOEt 60:40. Las fracciones con el compuesto de interés se concentraron a presión reducida, obteniendo así 2.09 g (63.9%) del compuesto **BXN4** como un sólido blanco, el cual presentó un R_f de 0.28 (**Sistema I**) y un p_f de 190.6-192.7 °C. Compuesto soluble en acetona, moderadamente soluble en AcOEt.

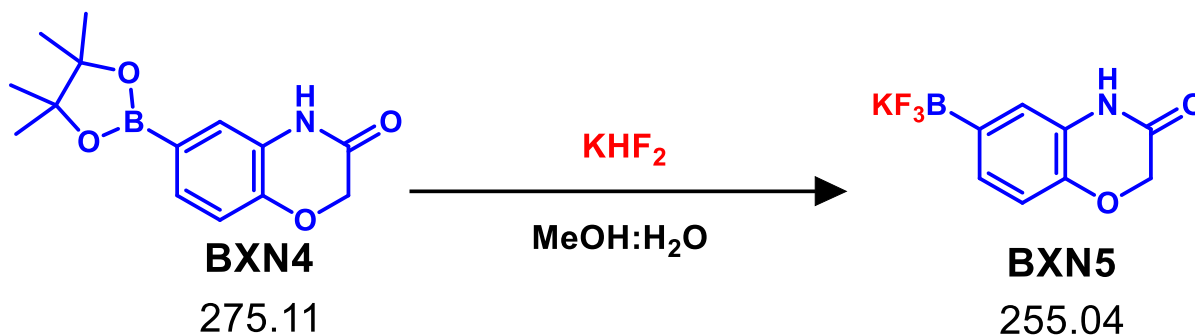
RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ ppm): 1.27 (s, 12H), 4.59 (s, 2H), 6.92 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 7.22 (s, 1H), 7.24 (d, 1H, $J = 1.5$ Hz), 10.67 (sa, 1H, $-\text{D}_2\text{O}$).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz, δ ppm): 25.08, 67.11, 84.03, 116.23, 122.17, 127.13, 130.26, 146.34, 164.94.

IR (FTIR por reflectancia ATR, cm^{-1}): 3362.35 ($\nu_{\text{N-H}}$), 3042.97 ($\nu_{\text{Ar-H}}$), 2978.91 (ν_{Me}), 1690.49 ($\nu_{\text{C=O amida}}$), 1487.30 (ν_{Me}), 1349.33 ($\nu_{\text{C-B}}$), 1209.66 ($\nu_{\text{Ar-O}}$), 1125.01 ($\nu_{\text{CH}_2\text{-O}}$).

EMAR (APCI, $[\text{M} + \text{H}]^+$, m/z): 276.1408 (teórico $[\text{M} + \text{H}]$: 276.1405).

Anexo IV – **Espectros 9, 10, 11 y 12.**

11.2.4. Trifluoro(3-oxo-3,4-dihidro-2H-benzo[*b*][1,4]oxazin-6-il)borato de potasio (BXN5)

En un matraz bola de 100 mL, equipado con agitador magnético, se colocaron 3 g (10.91 mmol) del compuesto **BXN4**. Posteriormente se adicionaron 55 mL de MeOH y 11 mL de una solución acuosa 4.5 M de hidruro de potasio (KHF_2) y se dejó en agitación vigorosa durante 4 h. Concluido el tiempo, se observó la precipitación de un sólido blanco en el medio de reacción, por lo que se procedió a concentrar los disolventes a presión reducida. Posteriormente se adicionaron 50 mL de una mezcla de MeOH/ H_2O (1:1) y se destilaron los disolventes a presión reducida, hasta sequedad. Dicho proceso se repitió en dos ocasiones. Finalmente se realizaron 20x50 mL extracciones con acetona hirviendo, recuperando los lavados y concentrándolos a sequedad. Se recuperaron 1.75 g (58.3%) del compuesto **BXN5**, como un sólido beige, el cual presentó un *pf* de 288.1 - 290.0 °C con descomposición. Compuesto soluble en agua, moderadamente soluble en acetona.

RMN ^1H (D_2O , 400 MHz, δ ppm): 4.51 (s, 2H), 6.85 (d, 1H, $J=7.9$ Hz), 6.95 (s, 1H), 7.07 (d, 1H, $J=7.9$ Hz).

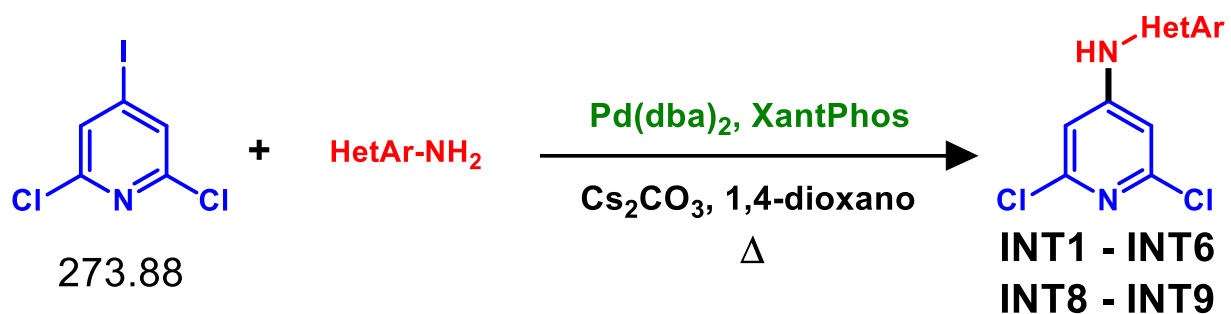
RMN ^{13}C (D_2O , 100 MHz, δ ppm): 69.05, 118.15, 121.54, 127.42, 129.89, 145.15, 170.54.

RMN ^{11}B (D_2O , 96 MHz, δ ppm): -1.12 (c, $J=15$ Hz).

RMN ^{19}F (D_2O , 282 MHz, δ ppm): -143.21 (sa).

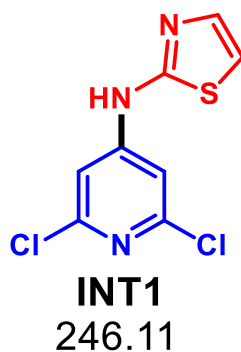
IR (FTIR por reflectancia ATR, cm^{-1}): 3352.80 ($\nu_{\text{N-H}}$), 2978.67 ($\nu_{\text{Ar-H}}$), 1672.03 ($\nu_{\text{C=O}}$ amida), 1599.83 ($\nu_{\text{Ar-N}}$), 1164.18 ($\nu_{\text{Ar-O}}$).

Anexo IV – **Espectros 13, 14, 15, 16, 17 y 18.**

11.2.5. 4-Amino-*N*-(heteroarilo)-2,6-dicloropiridinas (INT1-6, INT8-9)

En un matraz bola de 10 mL, equipado con agitador magnético y adaptado a una llave de tres vías equipada con nitrógeno, se colocaron 200 mg (0.70 mmol) de la 2,6-dicloro-4-yodopiridina, 1.1 eq de la correspondiente heteroarilamina, 20.80 mg (5% mol) de Pd(dba)₂, 42.24 mg (10% mol) del ligante XantPhos, 0.5884 g (2.5 eq) de carbonato de cesio y 5 mL de 1,4-dioxano. Posteriormente se realizaron 5 purgas con nitrógeno y se sometió la mezcla de reacción a calentamiento a una determinada temperatura durante un tiempo determinado. Concluido el tiempo de reacción, se verificó la ausencia o presencia ligera de la 2,6-dicloro-4-yodopiridina, por lo que se concentró el disolvente hasta sequedad.

Después, el sólido obtenido se disolvió en AcOEt y se efectuó una filtración de tal solución en un embudo de filtro poroso, utilizando una pequeña porción de gel de sílice. Al terminar dicho proceso se realizó una purificación cromatográfica mediante una columna con gel de sílice, usando una determinada fase móvil para cada compuesto. Las fracciones que contenían al compuesto de interés se colectaron y concentraron a presión reducida hasta obtener sólidos los cuales se sometieron a un lavado en frío con una mezcla de hexano-CH₂Cl₂ (90:10). Finalmente se filtraron y secaron los compuestos de interés. De tal forma se obtuvieron sólidos con diversas características (listadas a continuación).

11.2.6. 4-Amino-*N*-(1,3-tiazol-2-il)-2,6-dicloropiridina (INT1)

Heteroarilamina utilizada: 2-aminotiazol (PM: 100.14 g/mol).

Temperatura y tiempo de reacción: 65 °C durante 10 h.

Fase móvil utilizada para la purificación cromatográfica: Hexano/AcOEt (80:20).

Características físicas: Sólido amarillo claro con un *R_f* de 0.32 (**Sistema I**) y un *pf* de 213.7 - 214.6 °C. Compuesto soluble en acetona, AcOEt y CH₂Cl₂.

Rendimiento obtenido: 91.8%.

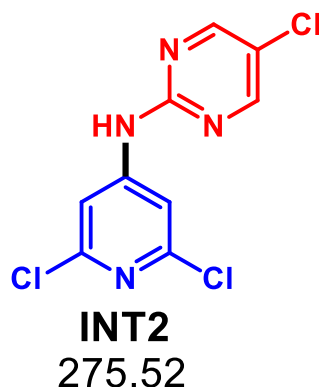
RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz, δ ppm): 7.18 (d, 1H, *J*= 3.6 Hz), 7.34 (d, 1H, *J*= 3.6 Hz), 7.66 (s, 2H), 11.16 (sa, 1H, -D₂O).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz, δ ppm): 109.42, 112.09, 139.26, 149.69, 151.12, 161.72.

IR (FTIR por reflectancia ATR, cm⁻¹): 3245.21 (ν_{N-H}), 2918.16 (ν_{Ar-H}), 1578.29 (ν_{N=C}).

EMAR (APCI, [M + H]⁺, *m/z*): 245.9725 (teórico [M + H]: 245.9654).

Anexo IV – **Espectros 19, 20, 21 y 22.**

11.2.7. 2-Amino-*N*-(2,6-dicloropiridin-4-il)-5-cloropirimidina (INT2)

Heteroarilamina utilizada: 2-amino-5-cloropirimidina (PM: 129.55 g/mol).

Temperatura y tiempo de reacción: 60 °C durante 18 h.

Fase móvil utilizada para la purificación cromatográfica: Hexano/AcOEt (80:20).

Características físicas: Sólido blanco con un *R_f* de 0.67 (**Sistema I**) y un *pf* de 217.9 – 218.7 °C. Compuesto soluble en acetona, AcOEt y CH₂Cl₂.

Rendimiento obtenido: 85.6%.

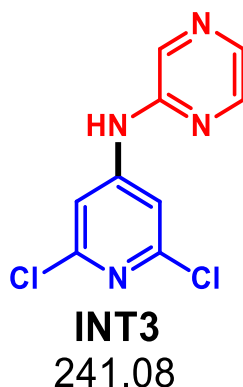
RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz, δ ppm): 7.80 (s, 2H), 8.74 (s, 2H), 10.80 (sa, 1H, -D₂O).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz, δ ppm): 110.76, 122.61, 149.50, 151.17, 156.64, 157.07.

IR (FTIR por reflectancia ATR, cm⁻¹): 3290.70 (ν_{N-H}), 3033.21 (ν_{Ar-H}), 1546.49 (ν_{N=C}).

EMAR (APCI, [M + H]⁺, *m/z*): 274.9661 (teórico [M + H]: 274.9653).

Anexo IV – **Espectros 23, 24, 25 y 26.**

11.2.8. 2-Amino-*N*-(2,6-dicloropiridin-4-il)pirazina (INT3)

Heteroarilamina utilizada: 2-aminopirazina (PM: 95.10 g/mol).

Temperatura y tiempo de reacción: 60 °C durante 16 h.

Fase móvil utilizada para la purificación cromatográfica: Hexano/AcOEt (60:40).

Características físicas: Sólido café claro con un *R_f* de 0.26 (**Sistema I**) y un *p_f* de 211.2 – 212.3 °C. Compuesto soluble en acetona, AcOEt y CH₂Cl₂.

Rendimiento obtenido: 96.0%.

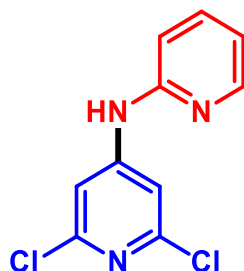
RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz, δ ppm): 7.75 (s, 2H), 8.20 (d, 1H, *J*= 2.7 Hz), 8.32 (d, 1H, *J*= 1.4 Hz), 8.34 (dd, 1H, *J*= 2.7, 1.4 Hz), 10.47 (sa, 1H, -D₂O).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz, δ ppm): 110.26, 135.96, 136.84, 141.24, 149.55, 150.56, 151.54.

IR (FTIR por reflectancia ATR, cm⁻¹): 3397.41 (ν_{N-H}), 2984.21 (ν_{Ar-H}), 1592.84 (ν_{N=C}).

EMAR (APCI, [M + H]⁺, *m/z*): 241.0045 (teórico [M + H]: 241.0042).

Anexo IV – **Espectros 27, 28, 29 y 30.**

11.2.9. 4-Amino-*N*-(2-piridinil)-2,6-dicloropiridina (INT4)**INT4**

240.09

Heteroarilamina utilizada: 2-aminopiridina (PM: 94.12 g/mol).

Temperatura y tiempo de reacción: 65 °C durante 15 h.

Fase móvil utilizada para la purificación cromatográfica: Hexano/AcOEt (85:15).

Características físicas: Sólido blanco con un *Rf* de 0.40 (**Sistema I**) y un *pf* de 199.0 – 200.0 °C. Compuesto soluble en acetona, AcOEt y CH₂Cl₂.

Rendimiento obtenido: 81.0%.

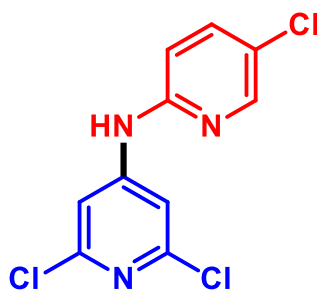
RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz, δ ppm): 6.95 (d, 1H, *J*= 8.3 Hz), 7.01 (dd, 1H, *J*= 6.8, 5.1 Hz), 7.72 – 7.77 (m, 1H), 7.78 (s, 2H), 8.34 (d, 1H, *J*= 3.4 Hz), 10.07 (sa, 1H, -D₂O).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz, δ ppm): 109.66, 112.71, 117.39, 138.33, 147.39, 149.33, 152.09, 153.83.

IR (FTIR por reflectancia ATR, cm⁻¹): 3298.84 (ν_{N-H}), 3116.68 (ν_{Ar-H}), 1556.59 (ν_{N=C}).

EMAR (APCI, [M + H]⁺, *m/z*): 240.0096 (teórico [M + H]: 240.0090).

Anexo IV – **Espectros 31, 32, 33, 34 y 35.**

11.2.10. 2-Amino-*N*-(2,6-dicloropiridin-4-il)-5-cloropiridina (INT5)

INT5

274.53

Heteroarilamina utilizada: 2-amino-5-cloropiridina (PM: 128.56 g/mol).

Temperatura y tiempo de reacción: 65 °C durante 18 h.

Fase móvil utilizada para la purificación cromatográfica: Hexano/AcOEt (80:20).

Características físicas: Sólido amarillo con un *R_f* de 0.47 (**Sistema I**) y un *pf* de 223.6 – 224.6 °C. Compuesto soluble en acetona, AcOEt y CH₂Cl₂.

Rendimiento obtenido: 83.0%.

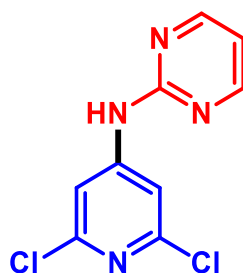
RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz, δ ppm): 6.97 (d, 1H, *J*= 8.9 Hz), 7.70 (s, 2H), 7.82 (d, 1H, *J*= 8.8, 2.7 Hz), 8.37 (d, 1H, *J*= 2.3 Hz), 10.21 (sa, 1H, -D₂O).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz, δ ppm): 109.85, 114.17, 123.46, 138.17, 145.59, 149.44, 151.69, 152.45.

IR (FTIR por reflectancia ATR, cm⁻¹): 3299.02 (ν_{N-H}), 3145.19 (ν_{Ar-H}), 1548.74 (ν_{N=C}).

EMAR (APCI, [M + H]⁺, *m/z*): 273.9705 (teórico [M + H]: 273.9700).

Anexo IV – **Espectros 36, 37, 38 y 39.**

11.2.11. 2-Amino-*N*-(2,6-dicloropiridin-4-il)piridimina (INT6)**INT6**

241.08

Heteroarilamina utilizada: 2-aminopirimidina (PM: 95.10 g/mol).

Temperatura y tiempo de reacción: 65 °C durante 12 h.

Fase móvil utilizada para la purificación cromatográfica: Hexano/AcOEt (80:20).

Características físicas: Sólido blanco con un *R_f* de 0.41 (**Sistema I**) y un *pf* de 217.7 – 219.9 °C. Compuesto soluble en acetona, AcOEt y CH₂Cl₂.

Rendimiento obtenido: 82.4%.

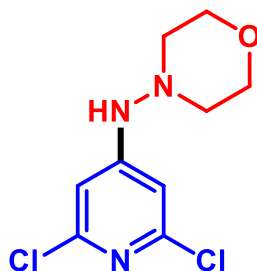
RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz, δ ppm): 7.11 (t, 1H, *J*=4.8 Hz), 7.88 (s, 2H), 8.67 (d, 2H, *J*= 4.8 Hz), 10.62 (sa, 1H, -D₂O).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz, δ ppm): 110.64, 115.14, 149.43, 151.58, 158.46, 158.84.

IR (FTIR por reflectancia ATR, cm⁻¹): 3299.02 (ν_{N-H}), 3077.68 (ν_{Ar-H}), 1561.79 (ν_{N=C}).

EMAR (APCI, [M + H]⁺, *m/z*): 241.0066 (teórico [M + H]: 241.0042).

Anexo IV – **Espectros 40, 41, 42 y 43.**

11.2.12. 4-Amino-*N*-(morfolin-4-il)-2,6-dicloropiridina (INT8)**INT8**

248.11

Heteroarilamina utilizada: 4-aminomorfolina (PM: 102.14 g/mol; ρ = 1.059 g/mL).

Temperatura y tiempo de reacción: 75 °C durante 24 h.

Condiciones particulares de reacción: 10% de Pd(dba)₂.

Fase móvil utilizada para la purificación cromatográfica: Hexano/AcOEt (60:40).

Características físicas: Sólido cristalino blanco con un *Rf* de 0.30 (**Sistema I**) y un *pf* de 109.1 – 110.1 °C. Compuesto soluble en acetona, MeOH, AcOEt y CH₂Cl₂.

Rendimiento obtenido: 64.7%.

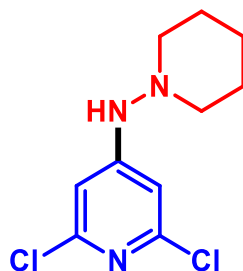
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz, δ ppm): 2.76 (sa, 4H), 3.81 (sa, 4H), 5.23 (sa, 1H, -D₂O), 6.68 (s, 2H).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz, δ ppm): 56.27, 66.79, 105.60, 151.09, 156.39.

IR (FTIR por reflectancia ATR, cm⁻¹): 3097.91 ($\nu_{\text{Ar-H}}$), 2834.82 (ν_{CH_2}), 1595.47 ($\nu_{\text{N=C}}$), 1428.50 ($\nu_{\text{N-R}}$), 1392.65 ($\nu_{\text{N-R}}$).

EMAR (APCI, [M + H]⁺, *m/z*): 248.0392 (teórico [M + H]: 248.0352).

Anexo IV – **Espectros 48, 49, 50 y 51.**

11.2.13. 4-Amino-*N*-(piperidin-1-il)-2,6-dicloropiridina (INT9)**INT9**

246.14

Heteroarilamina utilizada: 1-aminopiperidina (PM: 100.16 g/mol; ρ = 0.928 g/mL).

Temperatura y tiempo de reacción: 75 °C durante 24 h.

Condiciones particulares de reacción: 10% de Pd(dba)₂.

Fase móvil utilizada para la purificación cromatográfica: Hexano/AcOEt (60:40).

Características físicas: Sólido amarillo claro con un *R_f* de 0.58 (**Sistema I**) y un *p_f* de 106.3 – 107.7 °C. Compuesto soluble en acetona, MeOH, AcOEt y CH₂Cl₂.

Rendimiento obtenido: 51.6%.

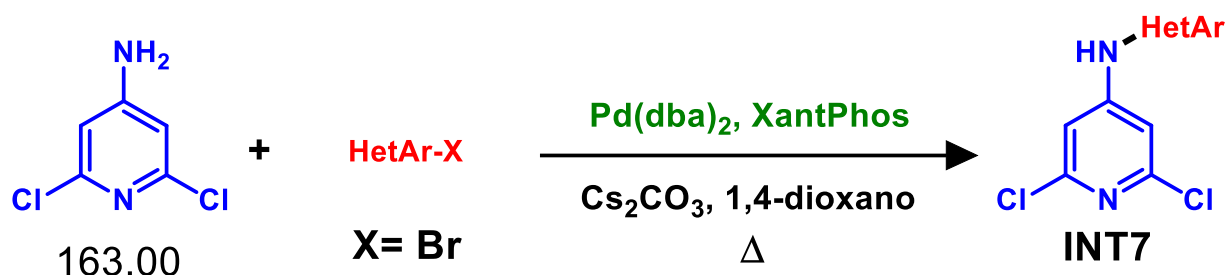
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz, δ ppm): 1.41 (sa, 2H), 1.67 – 1.72 (m, 4H), 2.65 (sa, 4H), 5.20 (sa, 1H, -D₂O), 6.64 (s, 2H).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz, δ ppm): 23.29, 25.85, 57.26, 105.41, 150.87, 156.72.

IR (FTIR por reflectancia ATR, cm⁻¹): 3107.28 ($\nu_{\text{Ar-H}}$), 2933.38 (ν_{CH_2}), 1560.07 ($\nu_{\text{N=C}}$), 1430.58 ($\nu_{\text{N-R}}$), 1397.19 ($\nu_{\text{N-R}}$).

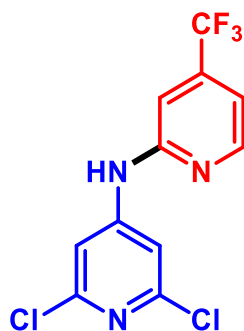
EMAR (APCI, [M + H]⁺, *m/z*): 246.0587 (teórico [M + H]: 246.0559).

Anexo IV – **Espectros 52, 53, 54 y 55.**

11.2.14. 4-Amino-*N*-(heteroaril)-2,6-dicloropiridina (INT7)

En un matraz bola de 10 mL, equipado con agitador magnético y condensador en posición de reflujo, adaptado a una llave de tres vías y equipado con nitrógeno, se colocaron 200 mg (1.19 mmol) de la 4-amino-2,6-dicloropiridina, 1.1 eq del correspondiente haluro de heteroarilo, 34.4 mg (5% mol) de Pd(dba)₂, 71 mg (10% mol) del ligante XantPhos, 0.9788 g (2.5 eq) de carbonato de cesio y 5 mL de 1,4-dioxano. Posteriormente se realizaron 5 purgas con nitrógeno y se sometió la mezcla de reacción a calentamiento a una determinada temperatura durante un tiempo determinado. Concluido el tiempo de reacción, se verificó la presencia ligera de la 4-amino-2,6-dicloropiridina, por lo que se procedió a concentrar el disolvente hasta sequedad.

Después se efectuó una filtración del crudo de reacción en un embudo de filtro poroso, utilizando una pequeña porción de gel de sílice y acetato de etilo como fase móvil. Al terminar dicho proceso se realizó una purificación cromatográfica mediante una columna con gel de sílice, usando una determinada fase móvil para cada compuesto. Las fracciones que contenían al compuesto de interés se colectaron y concentraron a presión reducida hasta obtener un sólido el cuál se sometió a un lavado en frío con una mezcla hexano-CH₂Cl₂ (90:10). Finalmente se filtró el compuesto y se secó a vacío obteniendo un sólido con determinadas características (listadas a continuación).

11.2.15. 2-Amino-*N*-(2,6-dicloropiridin-4-il)-4-(trifluorometil)piridina (INT7)

INT7
308.09

Haluro de arilo utilizado: 2-bromo-4-(trifluorometil)piridina (PM:225.99 g/mol).

Temperatura y tiempo de reacción: 90 °C durante 24 h.

Condiciones particulares de reacción: 10% de Pd(dba)₂.

Fase móvil utilizada para la purificación cromatográfica: Hexano/AcOEt (80:20).

Características físicas: Sólido blanco con un *R_f* de 0.66 (**Sistema I**) y un *pf* de 209.8 – 210.5 °C. Compuesto soluble en acetona, AcOEt y CH₂Cl₂.

Rendimiento obtenido: 52.4%.

RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz, δ ppm): 7.19 (s, 1H), 7.31 (d, 1H, *J*= 5.3 Hz), 7.75 (s, 2H), 8.58 (d, 1H, *J*= 5.3 Hz), 10.39 (sa, 1H, -D₂O).

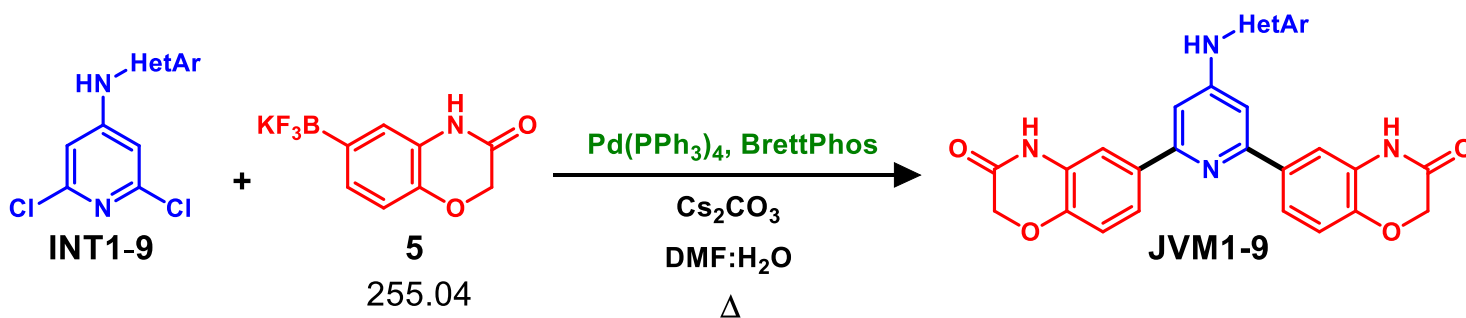
RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz, δ ppm): 108.26, 110.27, 112.08, 122.73, 138.34, 149.53, 151.41, 154.59.

IR (FTIR por reflectancia ATR, cm⁻¹): 3301.06 (ν_{N-H}), 3077.68 (ν_{Ar-H}), 1557.64 (ν_{N=C}).

EMAR (APCI, [M + H]⁺, *m/z*): 307.9990 (teórico [M + H]: 307.9964).

Anexo IV – **Espectros 44, 45, 46 y 47.**

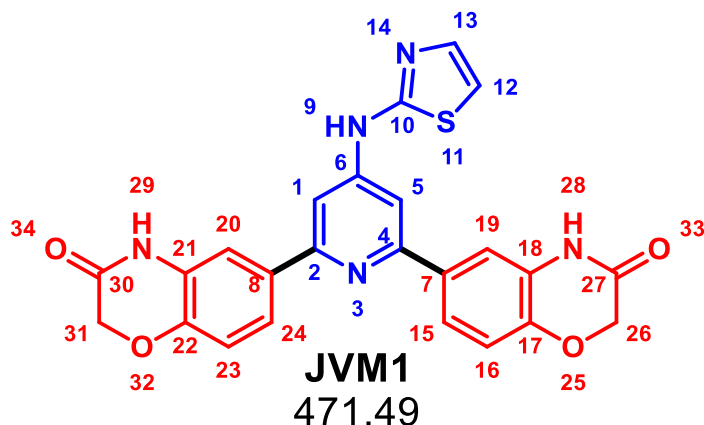
11.2.16. Piridinas 2,4,6-trisustituidas (JVM1-9)



En un matraz bola de 10 mL, equipado con agitador magnético y condensador en posición de reflujo, adaptado a una llave de tres vías y equipada con nitrógeno, se colocaron 50 mg de la correspondiente 4-amino-*N*-(heteroaril)-2,6-dicloropiridina (**Int1-10**), 3.1 eq de trifluoro(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)borato de potasio (**BXN5**), 5% mol de tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0), 1% mol del ligante BrettPhos, 4 eq de carbonato de cesio y 5 mL de una mezcla (1:1) de DMF:H₂O previamente desgasificada. Posteriormente se realizaron 5 purgas con nitrógeno y se sometió la mezcla de reacción a calentamiento a 90 °C durante un determinado tiempo. Concluido el tiempo de reacción, se verificó la presencia ligera o nula de la 2,6-dicloro-4-amino-*N*-(heteroarilo)piridina correspondiente, por lo que se procedió a adicionar 20 mL de agua helada, observando la precipitación de un sólido, el cual se filtró al vacío y se lavó con 3x10 mL de agua helada.

En el caso de los compuestos **JVM1-7** se realizaron lavados con 3x10 mL de CH₂Cl₂, 3x10 mL de acetona y se dejó secando a vacío. Finalmente, el sólido se disolvió en DMF caliente y se filtró en un papel de poro fino, recuperando la solución. Después se adicionó MeOH frío a la solución anteriormente recuperada con la finalidad de precipitar a los compuestos. Los compuestos se recuperaron mediante filtración a vacío. Se obtuvieron sólidos con diversas características (listadas a continuación).

Con los compuestos **JVM8** y **JVM9** se realizó una columna cromatográfica con gel de sílice utilizando distintas fases móviles, obteniendo compuestos con diversas características. A todos los compuestos se les retiraron las trazas de agua con un equipo Kugelrohr a una temperatura de 70 °C y una presión de 1-10 mbar durante 8 h.

11.2.17. 6,6'-[4-Amino-*N*-(1,3-tiazol-2-il)piridin-2,6-diil]bis(2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona) (JVM1)

Nota: La molécula se encuentra numerada de forma arbitraria y tal numeración no tiene relación con la numeración convencional.

Intermediario utilizado: 4-Amino-*N*-(1,3-tiazol-2-il)-2,6-dicloropiridina (**INT1**).

Características físicas: Sólido café claro con un *R_f* de 0.34 (**Sistema VII**) y un *pf* de 361.2 – 362.5 °C. Compuesto soluble en DMF y DMSO.

Rendimiento obtenido: 50.5%.

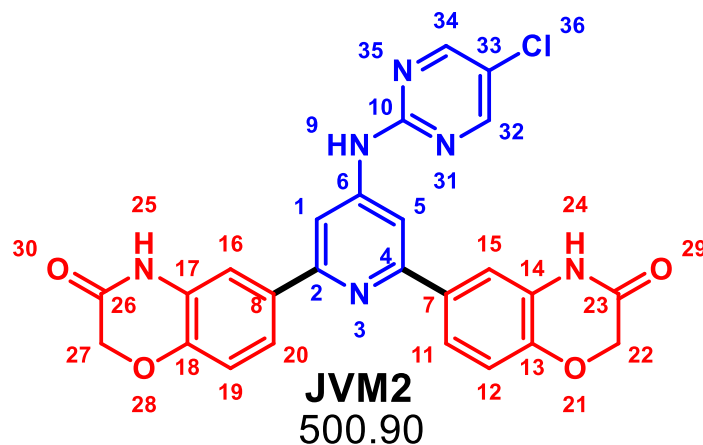
RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz, δ ppm): 4.65 (s, 4H, -CH₂- 26 y 31), 7.09 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz, *H* 16 y 23), 7.12 (d, 1H, *J* = 3.7 Hz, *H* 12), 7.44 (s, 1H, *J* = 3.6 Hz, *H* 13), 7.62 – 7.70 (m, 4H, *H* 15, 19, 20 y 24), 7.96 (s, 2H, *H* 1 y 5), 10.85 (sa, 1H, -D₂O, *H* 9), 10.86 (sa, 2H, -D₂O, *H* 28 y 29).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz, δ ppm): 66.84 (C 26 y 31), 105.17 (C 1 y 5), 110.61 (C 12), 114.09 (C 19 y 20), 116.34 (C 16 y 23), 121.39 (C 15 y 24), 127.49 (C 18 y 21), 133.65 (C 7 y 8), 139.18 (C 13), 144.18 (C 17 y 22), 149.14 (C 6), 155.97 (C 2 y 4), 162.81 (C 10), 164.71 (C 27 y 30).

IR (FTIR por reflectancia ATR, cm⁻¹): 3451.79 (ν_{N-H}), 3166.91 (ν_{Ar-H}), 1671.60 (ν_{C=O} amida), 1592.58 (ν_{N=C}).

EMAR (IE⁺, *m/z*): 471.0985 (teórico: 471.1001).

Anexo IV – **Espectros 56, 57, 58, 59, 60 y 61.**

11.2.18. 6,6'-[4-Amino-*N*-(5-cloropirimidin-2-il)piridin-2,6-diil]bis(2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona) (JVM2)

Nota: La molécula se encuentra numerada de forma arbitraria y tal numeración no tiene relación con la numeración convencional.

Intermediario utilizado: 2,6-dicloro-4-amino-*N*-(5-cloro-pirimidin-2-il)piridina (**INT2**).

Características físicas: Sólido amarillo claro con un *R_f* de 0.44 (**Sistema VII**) y un *pf* de 350.0 – 352.1 °C. Compuesto soluble en DMF y DMSO.

Rendimiento obtenido: 41.8%.

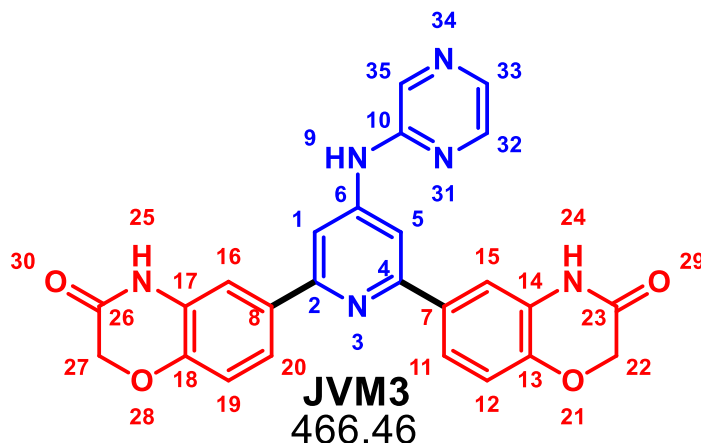
RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz, δ ppm): 4.65 (s, 4H, -CH₂- 22 y 27), 7.08 (d, 2H, *J*= 8.4 Hz, *H* 12 y 19), 7.60 – 7.72 (m, 4H, *H* 11, 15, 16 y 20), 8.13 (s, 2H, *H* 1 y 5), 8.72 (s, 2H, *H* 32 y 34), 10.47 (sa, 1H, -D₂O, *H* 9), 10.85 (sa, 2H, -D₂O, *H* 24 y 25).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz, δ ppm): 66.84 (C 22 y 27), 106.93 (C 1 y 5), 114.16 (C 15 y 16), 116.29 (C 12 y 19), 121.30 (C 33), 121.36 (C 11 y 20), 127.48 (C 14 y 17), 133.71 (C 7 y 8), 144.14 (C 13 y 18), 148.64 (C 6), 155.72 (C 2 y 4), 156.43 (C 32 y 34), 157.95 (C 10), 164.71 (C 23 y 26).

IR (FTIR por reflectancia ATR, cm⁻¹): 3357.99 (ν_{N-H}), 3096.09 (ν_{Ar-H}), 1685.32 (ν_{C=O} amida), 1573.30 (ν_{N=C}).

EMAR (IE⁺, *m/z*): 500.1018 (teórico: 500.1000).

Anexo IV – **Espectros 62, 63, 64, 65, 66 y 67.**

11.2.19. 6,6'-[4-Amino-*N*-(pirazin-2-il)piridin-2,6-diil]bis(2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona) (JVM3)

Nota: La molécula se encuentra numerada de forma arbitraria y tal numeración no tiene relación con la numeración convencional.

Intermediario utilizado: 2,6-dicloro-4-amino-*N*-(pirazin-2-il)piridina (**INT3**).

Características físicas: Sólido amarillo oscuro con un *R_f* de 0.26 (**Sistema VII**) y un *pf* de 321.3 – 322.4 °C. Compuesto soluble en DMF y DMSO.

Rendimiento obtenido: 54.7%.

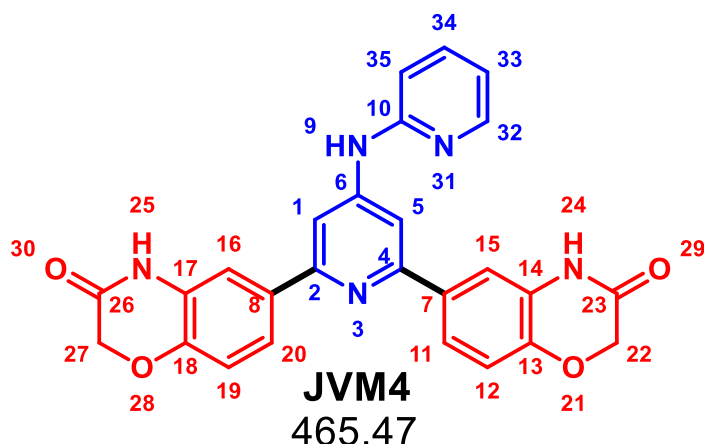
RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz, δ ppm): 4.65 (s, 4H, -CH₂- 22 y 27), 7.09 (d, 2H, *J*= 8.8 Hz, *H* 12 y 19), 7.66 – 7.68 (m, 4H, *H* 11, 15, 16 y 20), 8.06 (s, 2H, *H* 1 y 5), 8.12 (d, 1H, *J*= 2.7 Hz, *H* 33), 8.32 (dd, 1H, *J*= 2.7, 1,4 Hz, *H* 32), 8.37 (d, 1H, *J*= 1.2 Hz, *H* 35), 10.16 (sa, 1H, -D₂O, *H* 9), 10.86 (sa, 2H, -D₂O, *H* 24 y 25).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz, δ ppm): 66.84 (C 22 y 27), 106.25 (C 1 y 5), 114.09 (C 15 y 16), 116.33 (C 12 y 19), 121.38 (C 11 y 20), 127.48 (C 14 y 17), 133.71 (C 7 y 8), 135.41 (C 33), 135.79 (C 35), 141.18 (C 32), 144.14 (C 13 y 18), 149.17 (C 6), 151.72 (C 10), 155.79 (C 2 y 4), 164.72 (C 23 y 26).

IR (FTIR por reflectancia ATR, cm⁻¹): 3097.99 (ν_{Ar-H}), 1688.25 (ν_{C=O} amida), 1577.59 (ν_{N=C}).

EMAR (IE⁺, *m/z*): 466.1367 (teórico: 466.1390).

Anexo IV – **Espectros 68, 69, 70, 71, 72 y 73.**

11.2.20. 6,6'-[4-Amino-*N*-(2-piridinil)-2,6-diil]bis(2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona) (JVM4)

Nota: La molécula se encuentra numerada de forma arbitraria y tal numeración no tiene relación con la numeración convencional.

Intermediario utilizado: 4-Amino-*N*-(2-piridinil)-2,6-dicloropiridina (**INT4**)

Características físicas: Sólido beige con un *R_f* de 0.30 (**Sistema VII**) y un *pf* de 325.0 – 326.3 °C. Compuesto soluble en DMF y DMSO.

Rendimiento obtenido: 28.0%.

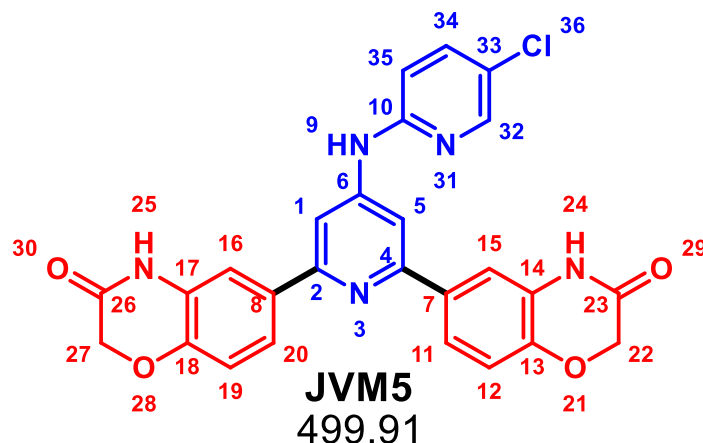
RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz, δ ppm): 4.01 (s, 4H, -CH₂- 22 y 27), 6.91 – 6.96 (m, H 33), 6.99 (d, 1H, *J*= 8.3 Hz, H 35), 7.08 (d, 2H, *J*= 9.0 Hz, H 12 y 19), 7.65 – 7.73 (m, 5H, H 11, 15, 16, 20 y 34), 8.09 (s, 2H, H 1 y 5), 8.34 (d, 1H, *J*= 3.6 Hz, H 32), 9.73 (sa, 1H, -D₂O, H 9), 10.86 (sa, 2H, -D₂O, H 24 y 25).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz, δ ppm): 66.83 (C 22 y 27), 105.92 (C 1 y 5), 112.19 (C 35), 114.04 (C 15 y 16), 116.05 (C 33), 116.25 (C 12 y 19), 121.30 (C 11 y 20), 127.41 (C 14 y 16), 133.96 (C 7 y 8), 137.87 (C 24), 147.38 (C 32), 149.89 (C 6), 155.08 (C 10), 155.53 (C 2 y 4), 164.71 (C 23 y 26).

IR (FTIR por reflectancia ATR, cm⁻¹): 3452.19 (ν_{N-H}), 2980.59 (ν_{Ar-H}), 1671.6 (ν_{C=O} amida), 1584.85 (ν_{N=C}).

EMAR (IE⁺, *m/z*): 465.1462 (teórico: 465.1437).

Anexo IV – **Espectros 74, 75, 76, 77, 78, 79 y 80.**

11.2.21. 6,6'-[4-Amino-*N*-(5-cloropiridin-2-il)piridin-2,6-diil]bis(2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona) (JVM5)

Nota: La molécula se encuentra numerada de forma arbitraria y tal numeración no tiene relación con la numeración convencional.

Intermediario utilizado: 2,6-dicloro-4-amino-*N*-(5-cloro-piridin-2-il)piridina (**INT5**).

Características físicas: Sólido beige con un *R_f* de 0.38 (**Sistema VII**) y un *pf* de 340.0 – 341.7 °C. Compuesto soluble en DMF y DMSO.

Rendimiento obtenido: 59.0%

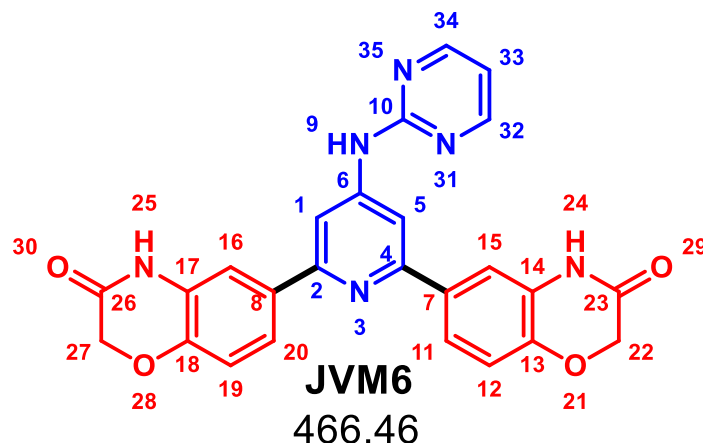
RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 600 MHz, δ ppm): 4.65 (s, 4H, -CH₂- 22 y 27), 7.02 (d, 2H, *J*= 8.9 Hz, *H* 35), 7.08 (d, 2H, *J*= 8.9 Hz, *H* 12 y 19), 7.66 – 7.68 (m, 4H, *H* 11, 15, 16 y 20), 7.79 (dd, 1H, *J*= 6.12, 2.7 Hz, *H* 34), 8.02 (s, 2H, *H* 1 y 5), 8.36 (d, 1H, *J*= 2.7 Hz, *H* 32), 9.92 (sa, 1H, -D₂O, *H* 9), 10.84 (sa, 2H, -D₂O, *H* 24 y 25).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 150 MHz, δ ppm): 66.84 (C 22 y 27), 106.01 (C 1 y 5), 113.68 (C 35), 114.07 (C 15 y 16), 116.28 (C 12 y 19), 121.35 (C 11 y 20), 122.01 (C 33), 127.43 (C 14 y 17), 133.81 (C 7 y 8), 137.75 (C 34), 144.08 (C 13 y 19), 145.42 (C 32), 149.47 (C 6), 153.67 (C 10), 155.64 (C 2 y 4), 164.73 (C 23 y 26).

IR (FTIR por reflectancia ATR, cm⁻¹): 3484.05 (ν_{N-H}), 3110.42 (ν_{Ar-H}), 1685.42 (ν_{C=O} amida), 1578.88 (ν_{N=C}).

EMAR (IE⁺, *m/z*): 499.1077 (teórico: 499.1047).

Anexo IV – **Espectros 81, 82, 83, 84, 85 y 86.**

11.2.22. 6,6'-[4-Amino-*N*-(pirimidin-2-il)piridin-2,6-diil]bis(2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona) (JVM6)

Nota: La molécula se encuentra numerada de forma arbitraria y tal numeración no tiene relación con la numeración convencional.

Intermediario utilizado: 2,6-dicloro-4-amino-*N*-(pirimidin-2-il)piridina (**INT6**).

Características físicas: Sólido blanco con un *R_f* de 0.40 (**Sistema VII**) y un *pf* de 355.0 – 356.6 °C. Compuesto soluble en DMF y DMSO.

Rendimiento obtenido: 31.2%.

RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 600 MHz, δ ppm): 4.64 (s, 4H, -CH₂- 22 y 27), 7.06 (s, 1H, *H* 33), 7.07 (d, 2H, *J*= 6.0 Hz, *H* 12 y 19), 7.47 (dd, 2H, *J*= 8.4, 2.1 Hz, *H* 11 y 20), 7.61 (d, 2H, *J*= 2.1 Hz, *H* 15 y 16), 8.13 (s, 2H, *H* 1 y 5), 8.66 (d, 2H, *J*= 4.8 Hz, *H* 32 y 34), 10.43 (sa, 1H, -D₂O, *H* 9), 10.84 (s, 2H, -D₂O, *H* 24 y 25).

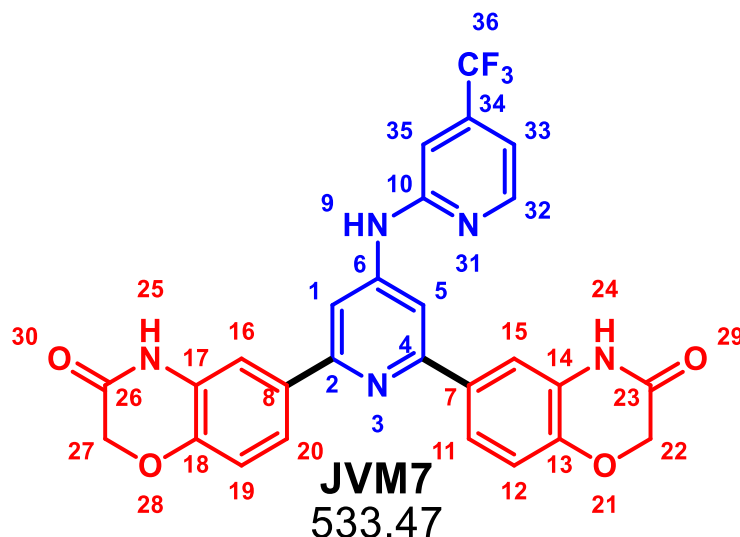
RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 150 MHz, δ ppm): 66.79 (C 2 y 27), 107.31 (C 1 y 5), 109.61 (C 34), 114.57 (C 15 y 16), 116.49 (C 12 y 19), 121.14 (C 11 y 20), 127.61 (C 14 y 17), 131.89 (C 7 y 8), 144.50 (C 13 y 19), 150.75 (C 6), 155.97 (C 2 y 4), 158.37 (C 32 y 34), 159.27 (C 10), 164.58 (C 23 y 26).

IR (FTIR por reflectancia ATR, cm⁻¹): 3296.70 (ν_{N-H}), 3092.06 (ν_{Ar-H}), 1678.99 (ν_{C=O} amida), 1576.92 (ν_{N=C}).

EMAR (IE⁺, *m/z*): 466.1372 (teórico: 466.1390).

Anexo IV – **Espectros 87, 88, 89, 90, 91 y 92.**

11.2.23. 6,6'-[4-Amino-N-(4-trifluorometilpiridin-2-il)piridin-2,6-diil]bis(2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona) (JVM7)



Nota: La molécula se encuentra numerada de forma arbitraria y tal numeración no tiene relación con la numeración convencional.

Intermediario utilizado: 2,6-dicloro-4-amino-*N*-(4-trifluoro-pirimidin-2-il)piridina (**INT7**).

Características físicas: Sólido blanco con un *R_f* de 0.37 (**Sistema VII**) y un *pf* de 328.0 – 329.0 °C. Compuesto soluble en DMF y DMSO.

Rendimiento obtenido: 61.2%.

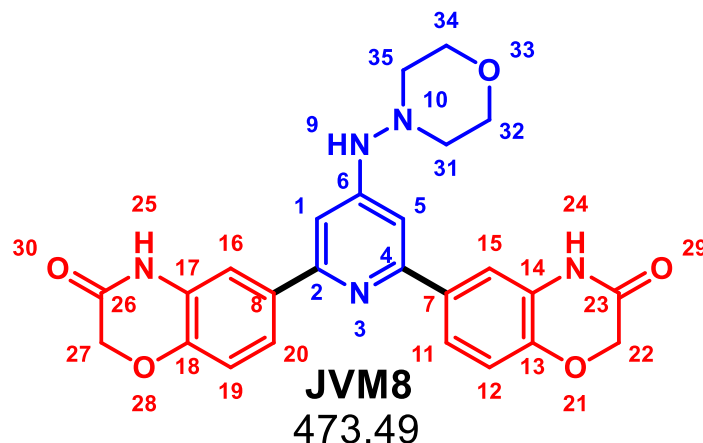
RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 600 MHz, δ ppm): 4.65 (s, 4H, -CH₂- 22 y 27), 7.09 (d, 2H, *J*= 8.80 Hz, *H* 12 y 19), 7.25 (sa, 2H, *H* 33 y 35), 7.67 – 7.68 (m, 4H, *H* 11, 15, 16 y 20), 8.08 (s, 2H, *H* 1 y 5), 8.59 (d, 1H, *J*= 4.8 Hz *H* 32), 10.14 (sa, 1H, -D₂O, *H* 9), 10.87 (sa, 2H, -D₂O, *H* 24 y 25).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 150 MHz, δ ppm): 67.37 (C 22 y 27), 106.88 (C 1 y 5), 108.30 (C 35), 111.17 (C 33), 114.61 (C 15 y 16), 116.86 (C 12 y 19), 121.92 (C 11 y 20), 123.44 (d, *J*= 272.0 Hz, C 36), 128.00 (C 14 y 17), 134.24 (C 7 y 8), 138.61 (c, *J*= 34.0 Hz, C 34), 144.67 (C 13 y 18), 149.13 (C 6), 149.70 (C 32), 150.01 (C 10), 156.30 (C 2 y 4), 165.25 (C 23 y 26).

IR (FTIR por reflectancia ATR, cm⁻¹): 3332.13 (ν_{N-H}), 3102.88 (ν_{Ar-H}), 1683.05 (ν_{C=O} amida), 1591.69 (ν_{N=C}), 1122.58 (ν_{R-CF₃}).

EMAR (IE⁺, *m/z*): 533.1321 (teórico: 533.1311).

Anexo IV – Espectros 93, 94, 95, 96, 97 y 98.

11.2.24. 6,6'-[4-Amino-*N*-(morfolin-4-il)piridin-2,6-diil]bis(2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona) (JVM8)

Nota: La molécula se encuentra numerada de forma arbitraria y tal numeración no tiene relación con la numeración convencional.

Intermediario utilizado: 2,6-dicloro-4-amino-*N*-(morfolin)piridina (**INT8**).

Características físicas: Sólido beige con un *R_f* de 0.31 (**Sistema VI**) y un *p_f* de 201.2 – 202.0 °C. Compuesto soluble en acetona, MeOH, AcOEt y CH₂Cl₂.

Rendimiento obtenido: 44.0% (purificado por cromatografía en columna con **Sistema VI**).

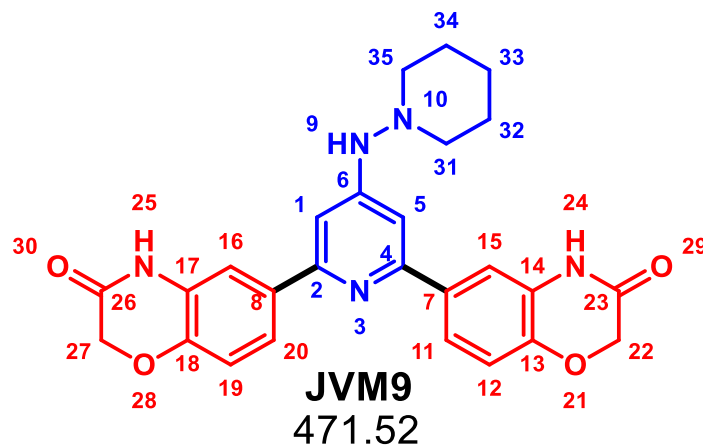
RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz, δ ppm): 2.77 (sa, 4H, C 31 y 35), 3.74 (sa, 4H, -CH₂- 32 y 34), 4 (s, 4H, -CH₂- 22 y 27), 7.03 (s, 2H, H 1 y 5), 7.05 (s, 2H, H 12 y 19), 7.60 – 7.62 (m, 4H, H 11, 15, 16 y 20), 7.75 (sa, 1H, -D₂O, H 9), 10.79 (sa, 2H, -D₂O, H 24 y 25).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz, δ ppm): 55.18 (-CH₂- 31 y 35), 66.22 (-CH₂- 32 y 24), 66.82 (C 22 y 27), 100.89 (C 1 y 5), 113.99 (C 15 y 16), 116.08 (C 12 y 19), 121.24 (C 11 y 20), 127.25 (C 14 y 17), 134.12 (C 7 y 8), 143.81 (C 13 y 18), 154.96 (C 2 y 4), 155.39 (C 6), 164.67 (C 23 y 26).

IR (FTIR por reflectancia ATR, cm⁻¹): 3627.67 (ν_{N-H}), 3093.31 (ν_{Ar-H}), 2853.21 (ν_{CH₂}) 1690.13 (ν_{C=O amida}), 1591.71 (ν_{N=C}).

EMAR (IE⁺, *m/z*): 473.1689 (teórico: 473.1699).

Anexo IV – **Espectros 99, 100, 101, 102, 103 y 104.**

11.2.25. 6,6'-[4-Amino-*N*-(piperidin-1-il)piridin-2,6-diil]bis(2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona) (JVM9)

Nota: La molécula se encuentra numerada de forma arbitraria y tal numeración no tiene relación con la numeración convencional.

Intermediario utilizado: 2,6-dicloro-4-amino-*N*-(piperidin)piridina (**INT9**).

Características físicas: Sólido beige con un *R_f* de 0.36 (**Sistema V**) y un *pf* de 193.1 – 194.2 °C. Compuesto soluble en acetona, MeOH, AcOEt y CH₂Cl₂.

Rendimiento obtenido: 22.1% (purificado por cromatografía en columna con **Sistema V**).

RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz, δ ppm): 1.42 (sa, 2H, -CH₂- 33), 1.67 (sa, 4H, -CH₂- 32 y 34), 2.73 (sa, 4H, -CH₂- 31 y 35), 4.62 (s, 4H, -CH₂- 22 y 27), 7.03 (s, 2H, *H* 1 y 5), 7.04 (s, 2H, *H* 12 y 19), 7.60 – 7.61 (m, 4H, *H* 11, 15, 16 y 20), 7.63 (sa, 1H, -D₂O, *H* 9), 10.79 (sa, 2H, -D₂O, *H* 24 y 25).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz, δ ppm): 23.12 (C 33), 25.54 (C 32 y 34), 55.90 (C 31 y 35), 66.81 (C 22 y 27), 100.74 (C 1 y 5), 113.96 (C 15 y 16), 116.07 (C 12 y 19), 121.21 (C 11 y 20), 127.24 (C 14 y 17), 134.23 (C 7 y 8), 143.77 (C 13 y 18), 155.14 (C 6), 164.69 (C 23 y 26).

IR (FTIR por reflectancia ATR, cm⁻¹): 3264.73 (ν_{N-H}), 3092.86 (ν_{Ar-H}), 2937.41 (ν_{CH₂}) 1687.12 (ν_{C=O amida}), 1592.55 (ν_{N=C}).

EMAR (IE⁺, *m/z*): 471.1909 (teórico: 471.1907).

Anexo IV – **Espectros 105, 106, 107, 108, 109 y 110.**

12. ANEXO II - PARTE COMPUTACIONAL

13.1 Diagramas 2D de interacciones en acoplamiento molecular efectuado con AutoDock

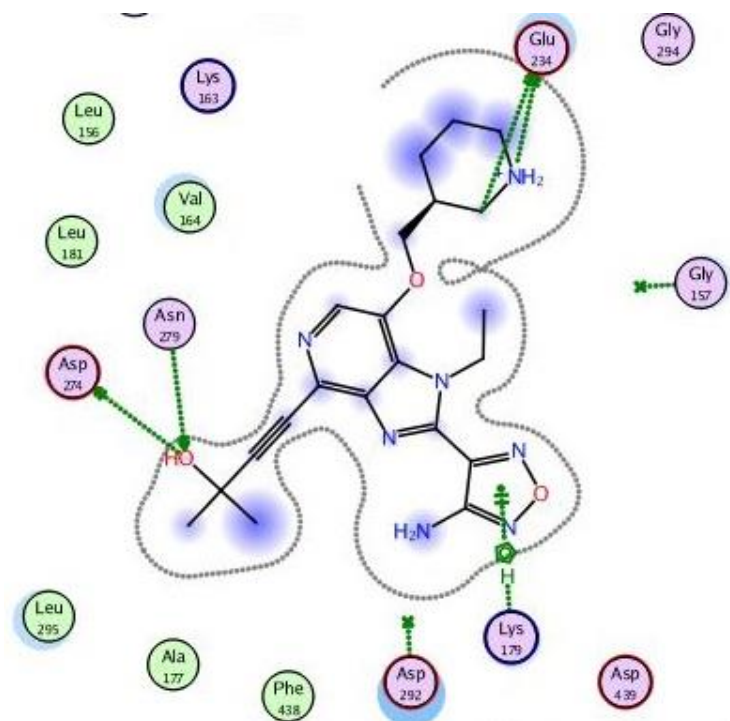


Figura 37. Diagrama 2D de interacciones de **GSK690693** con AKT1.

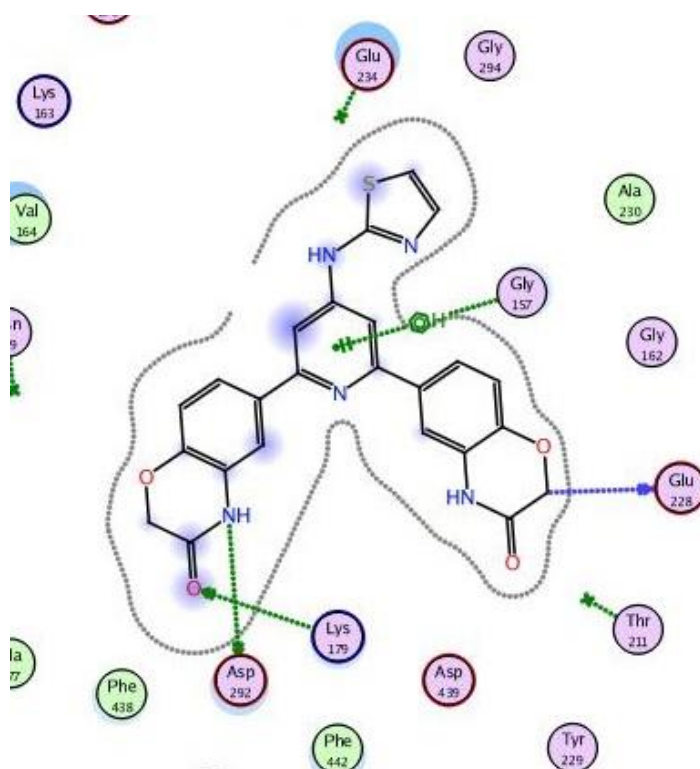


Figura 38. Diagrama 2D de interacciones de **JVM1** con AKT1.

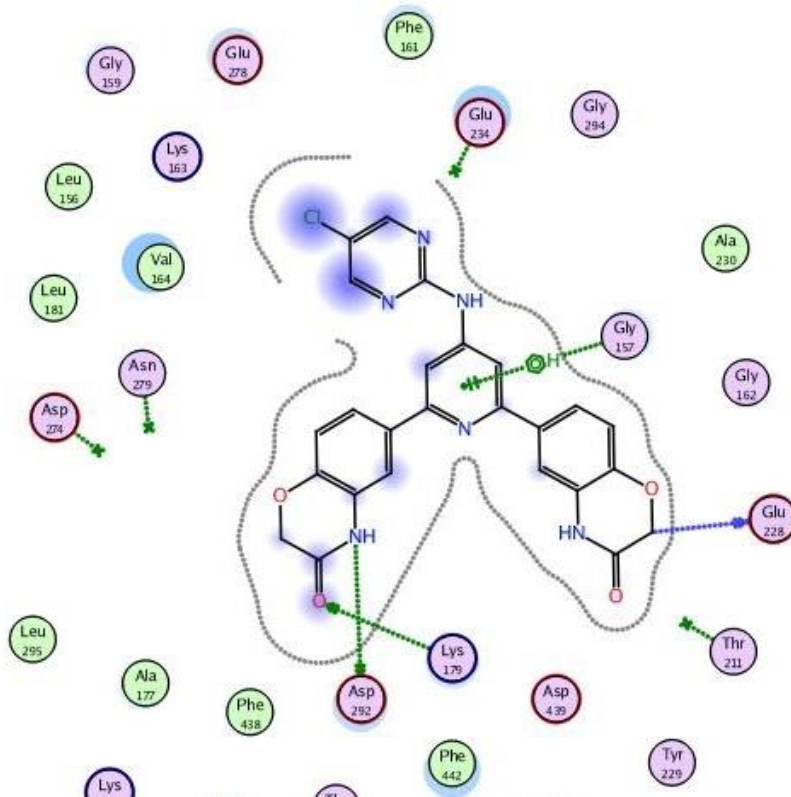


Figura 39. Diagrama 2D de interacciones de **JVM2** con AKT1.

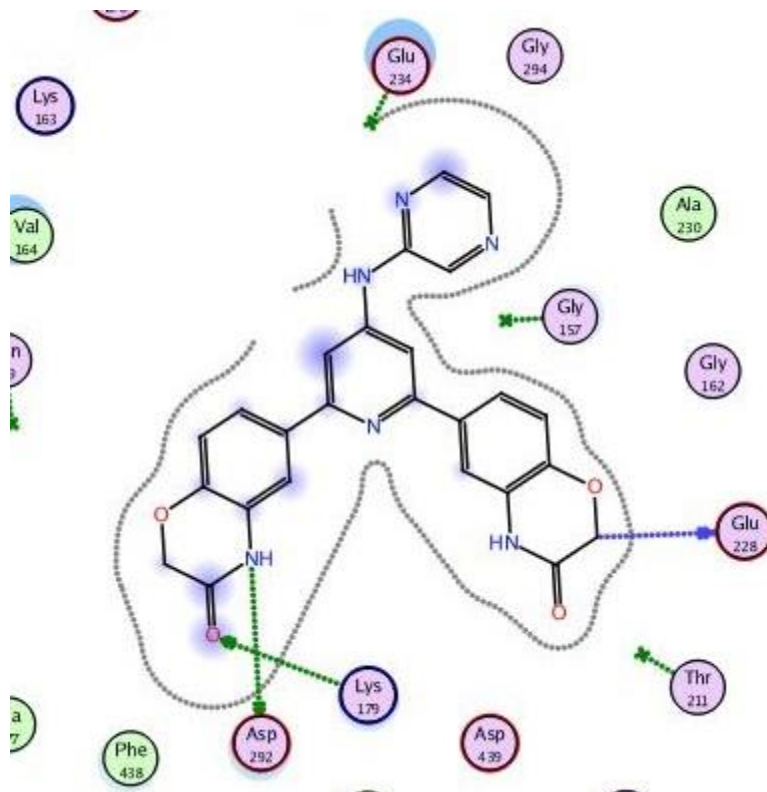


Figura 40. Diagrama 2D de interacciones de **JVM3** con AKT1.

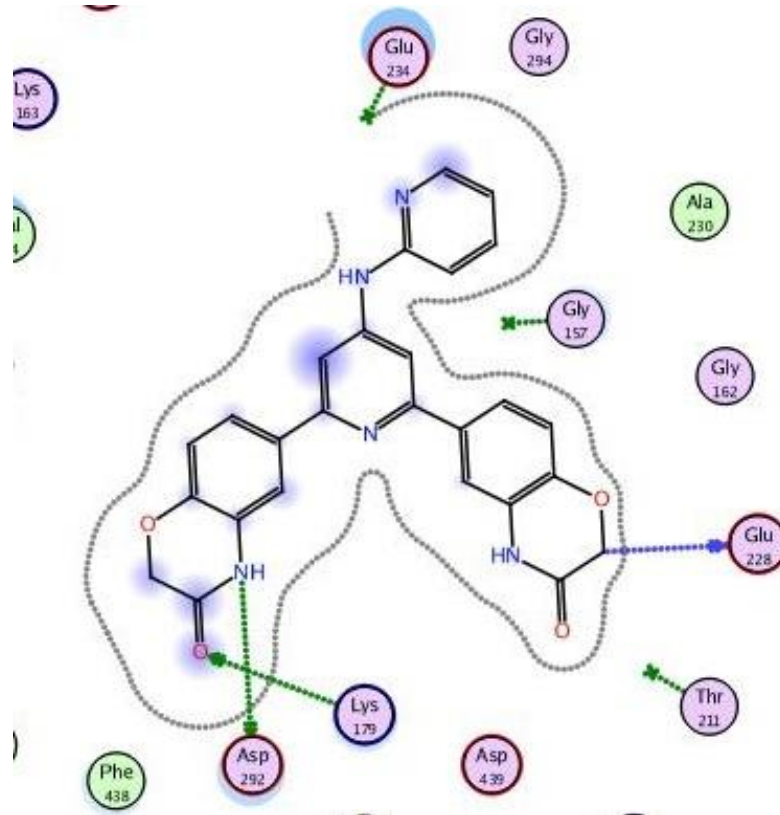


Figura 41. Diagrama 2D de interacciones de JVM4 con AKT1.

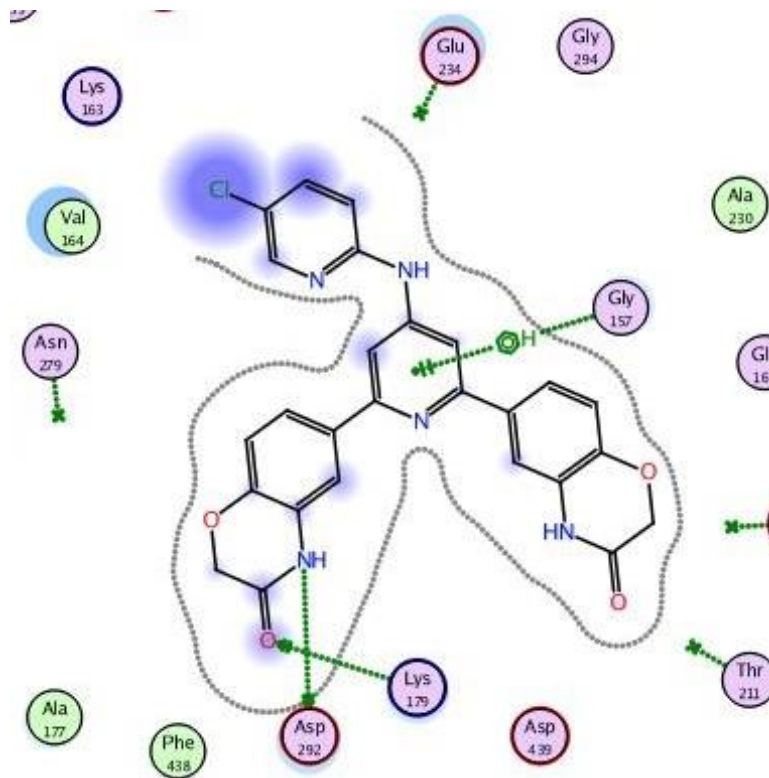


Figura 42. Diagrama 2D de interacciones de JVM5 con AKT1.

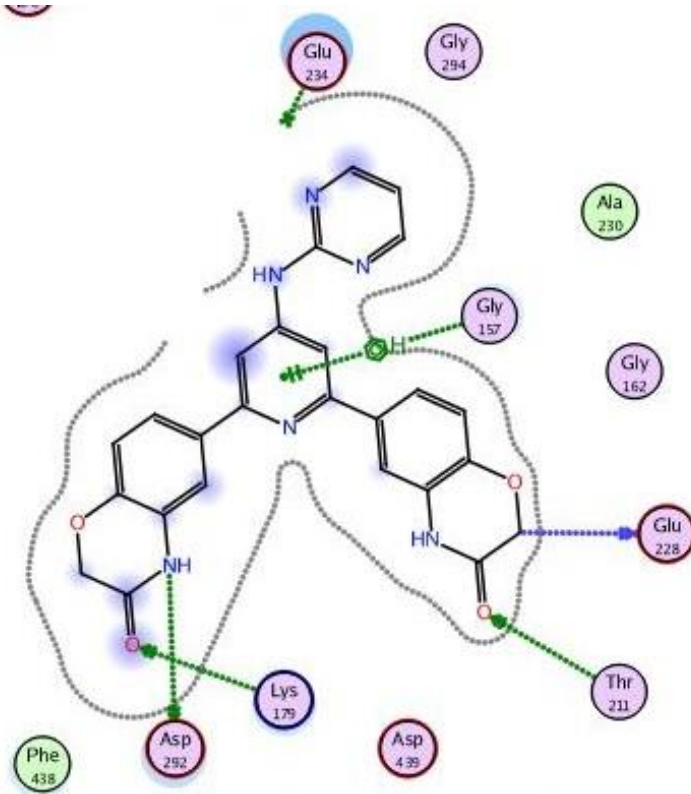


Figura 43. Diagrama 2D de interacciones de **JVM6** con AKT1.

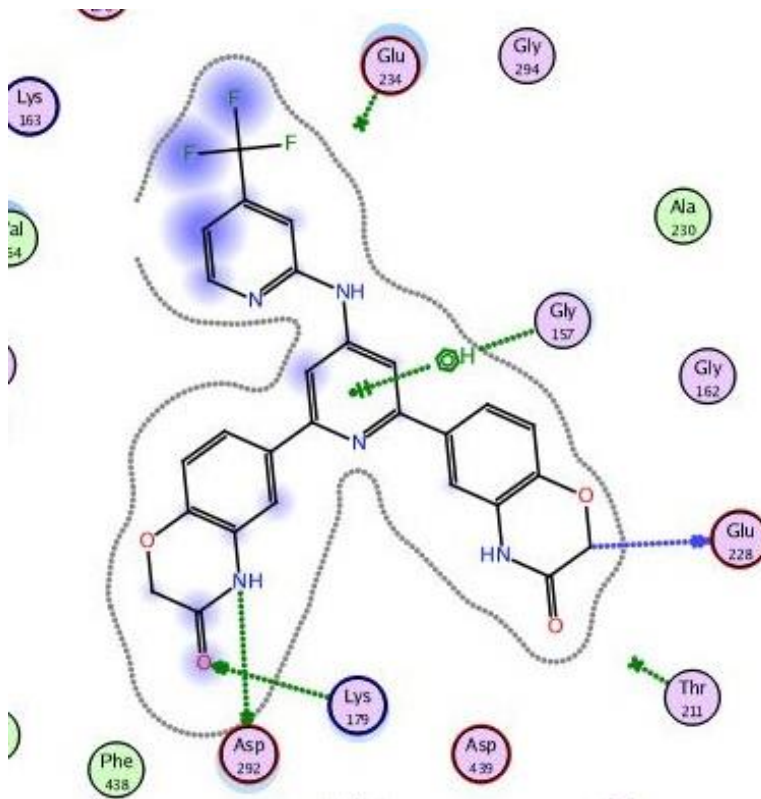


Figura 44. Diagrama 2D de interacciones de **JVM7** con AKT1.

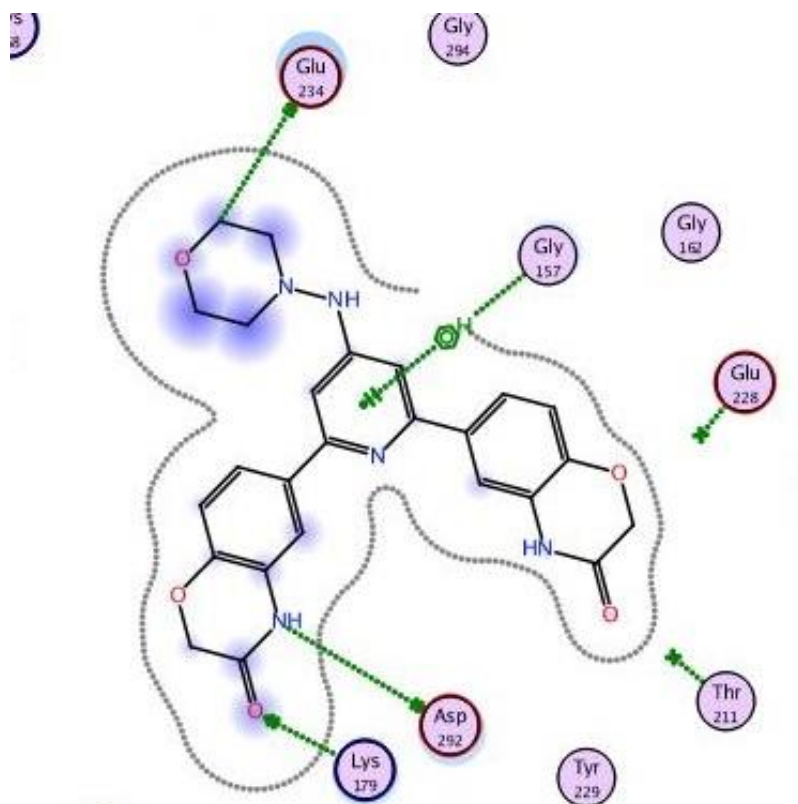


Figura 45. Diagrama 2D de interacciones de **JVM8** con AKT1.

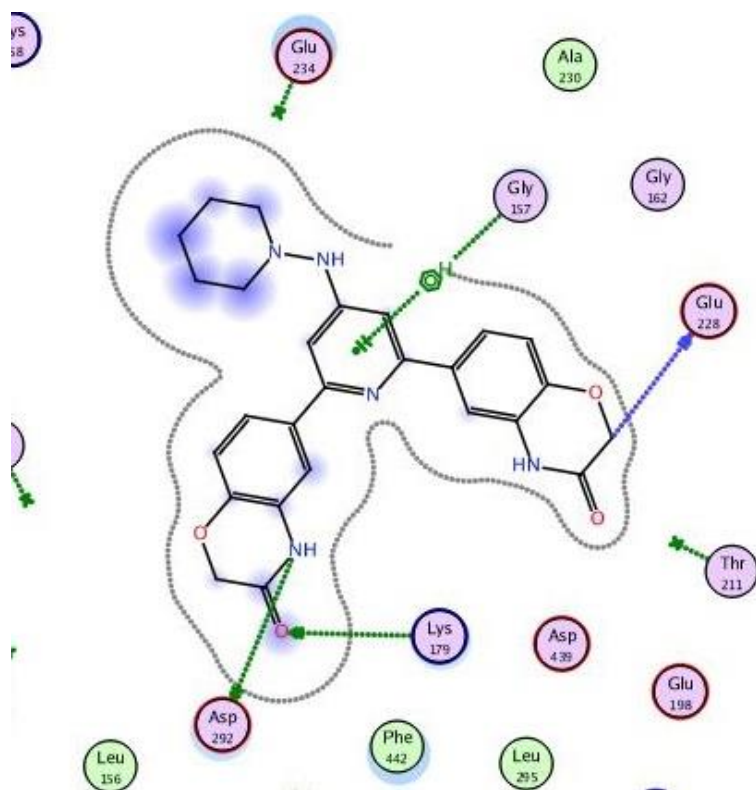


Figura 46. Diagrama 2D de interacciones de **JVM9** con AKT1.

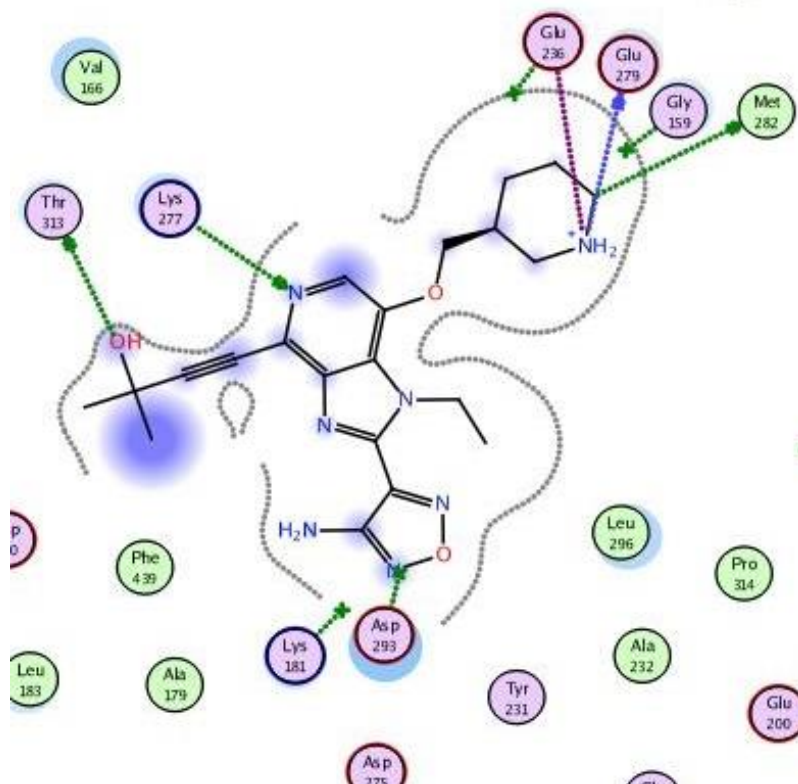


Figura 47. Diagrama 2D de interacciones de **GSK690693** con AKT2.

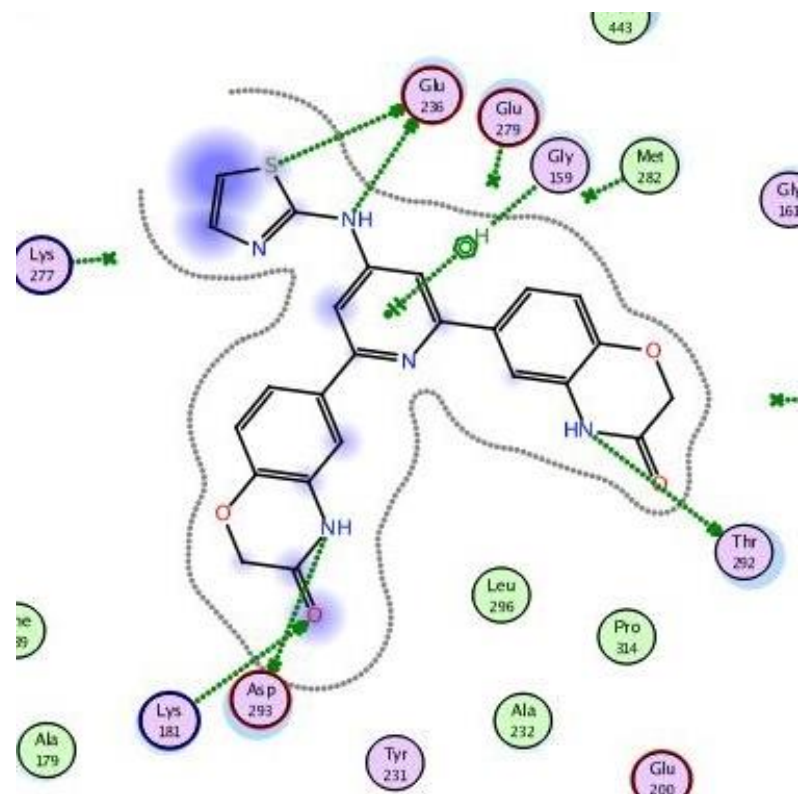


Figura 48. Diagrama 2D de interacciones de **JVM1** con AKT2.

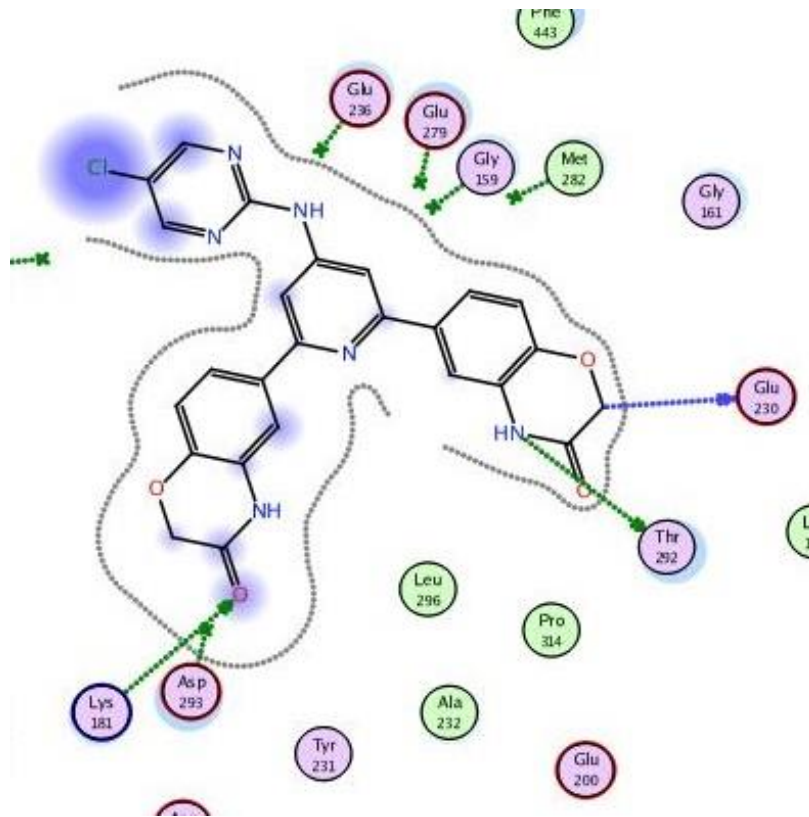


Figura 49. Diagrama 2D de interacciones de **JVM2** con AKT2.

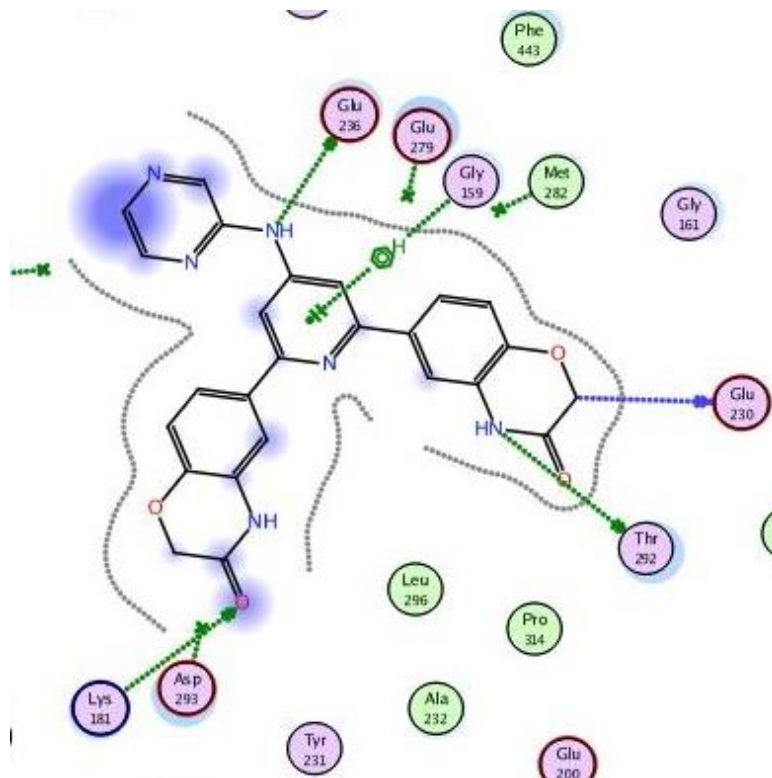


Figura 50. Diagrama 2D de interacciones de **JVM3** con AKT2.

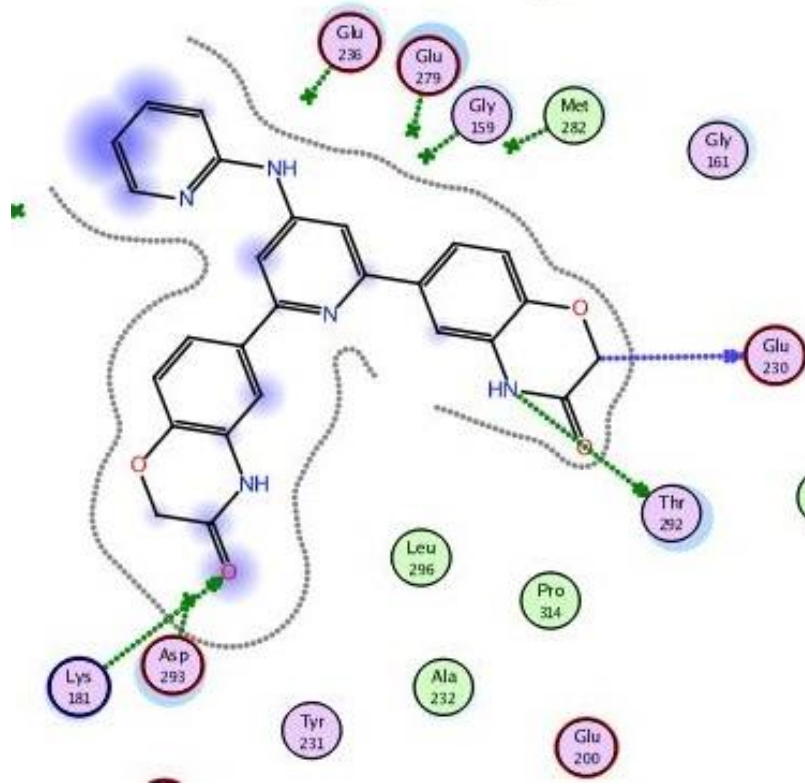


Figura 51. Diagrama 2D de interacciones de **JVM4** con AKT2.

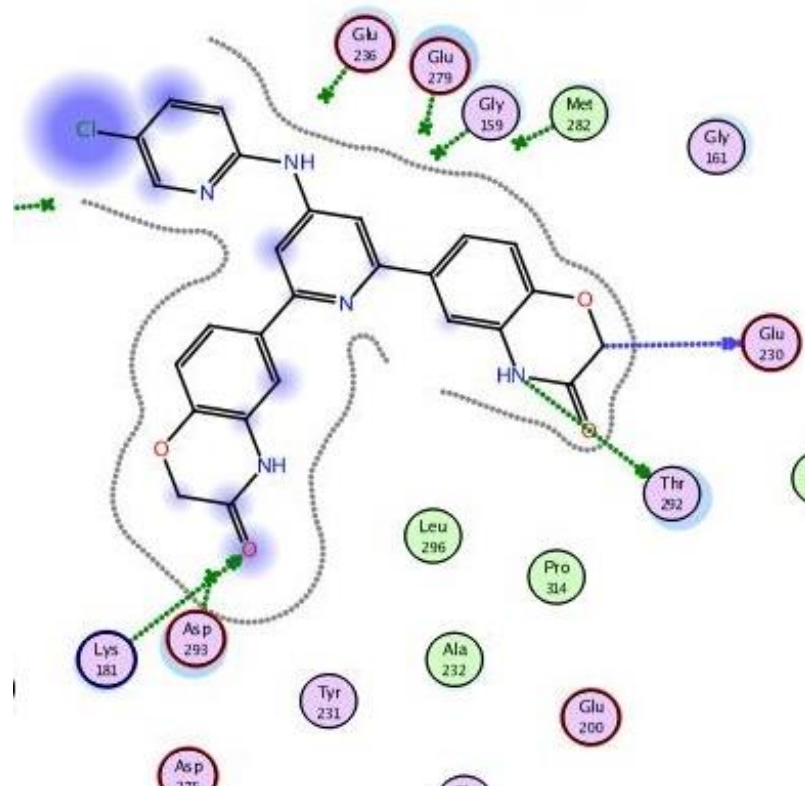


Figura 52. Diagrama 2D de interacciones de **JVM5** con AKT2.

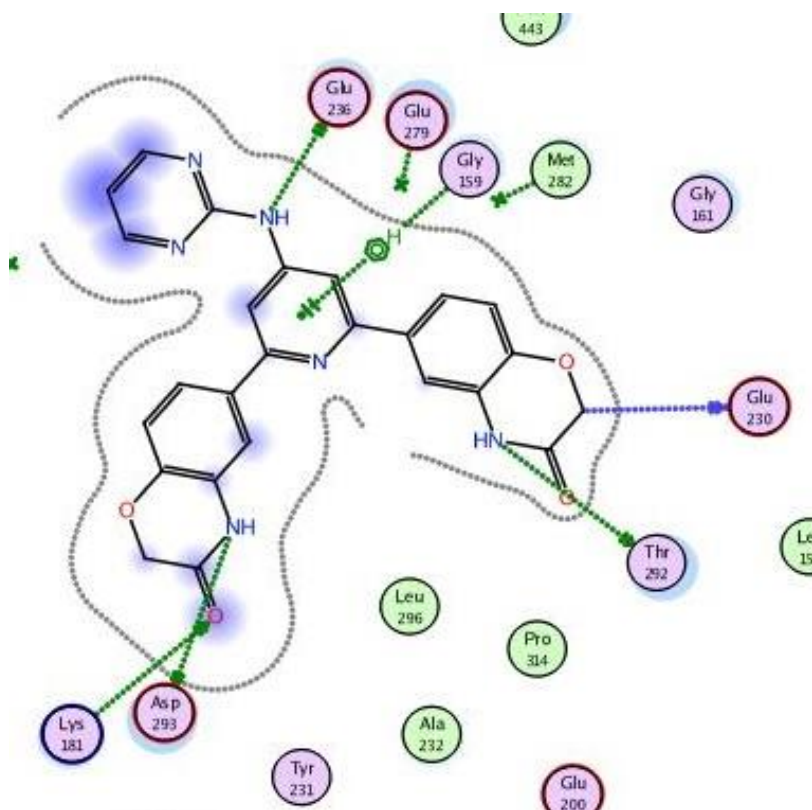


Figura 53. Diagrama 2D de interacciones de **JVM6** con AKT2.

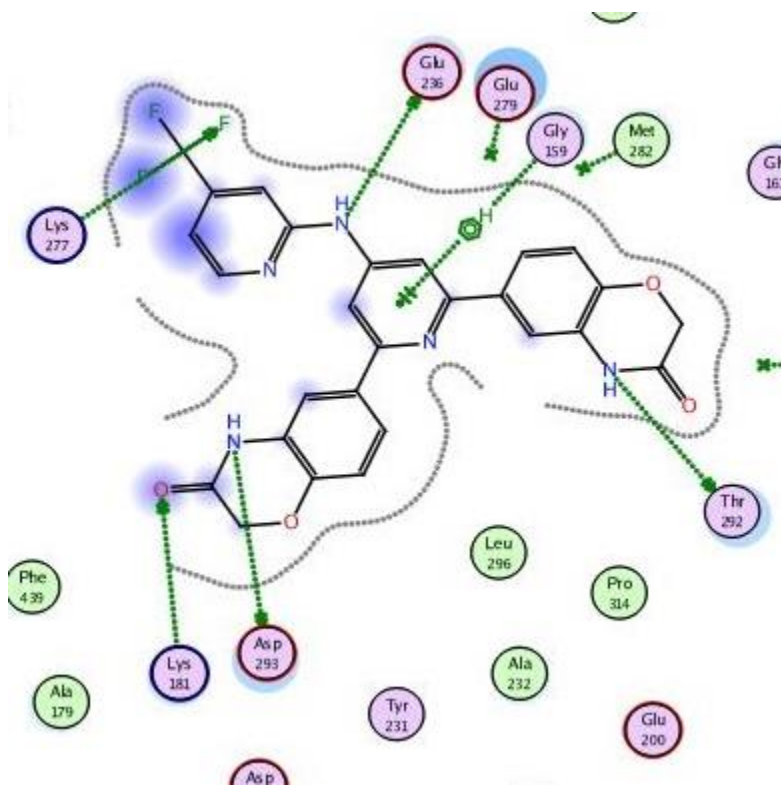


Figura 54. Diagrama 2D de interacciones de **JVM7** con AKT2.

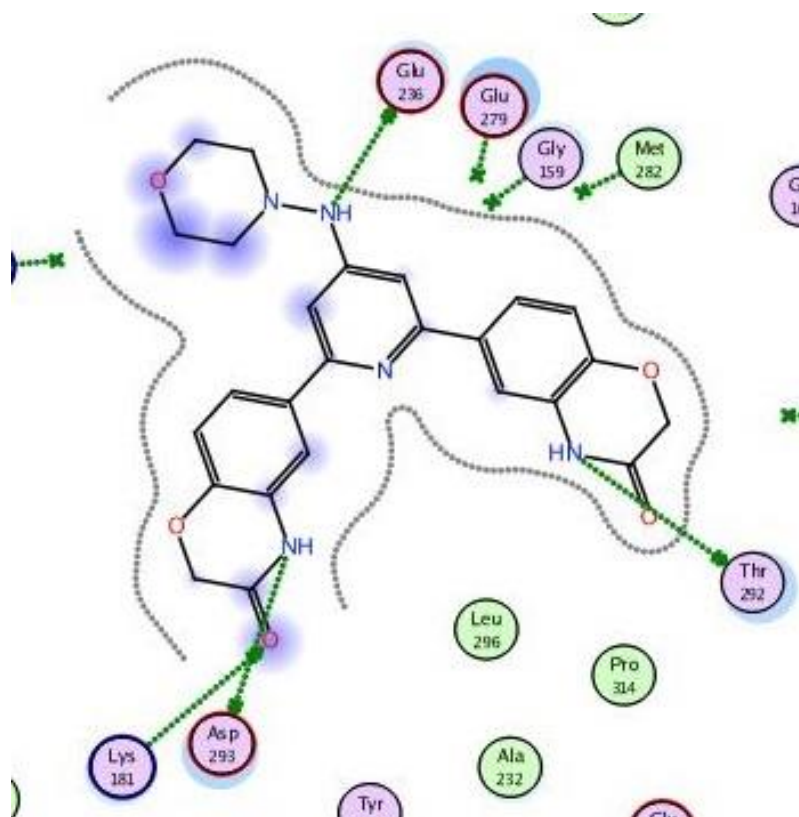


Figura 55. Diagrama 2D de interacciones de **JVM8** con AKT2.

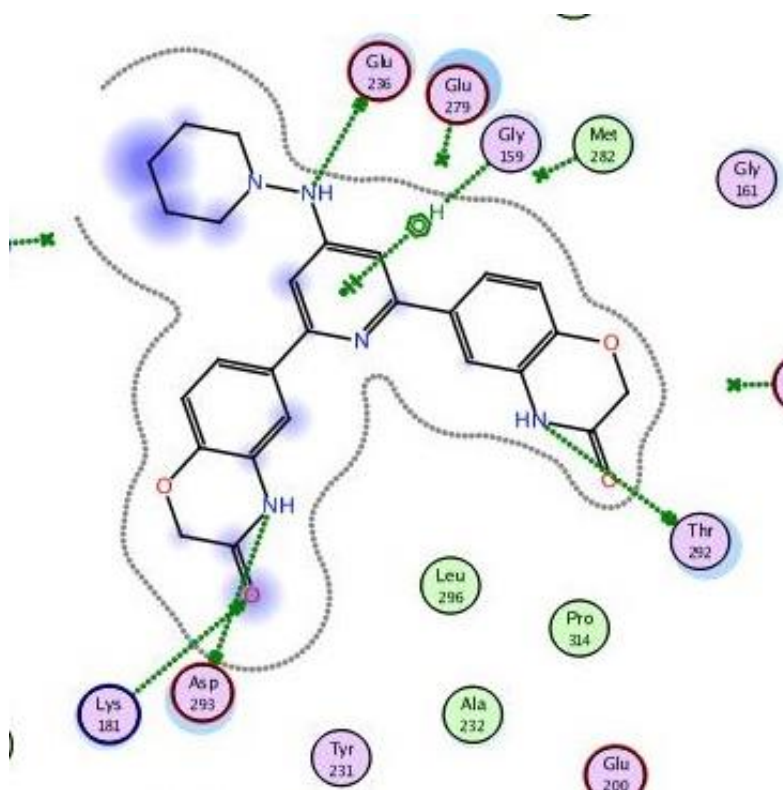


Figura 56. Diagrama 2D de interacciones de **JVM9** con AKT2.

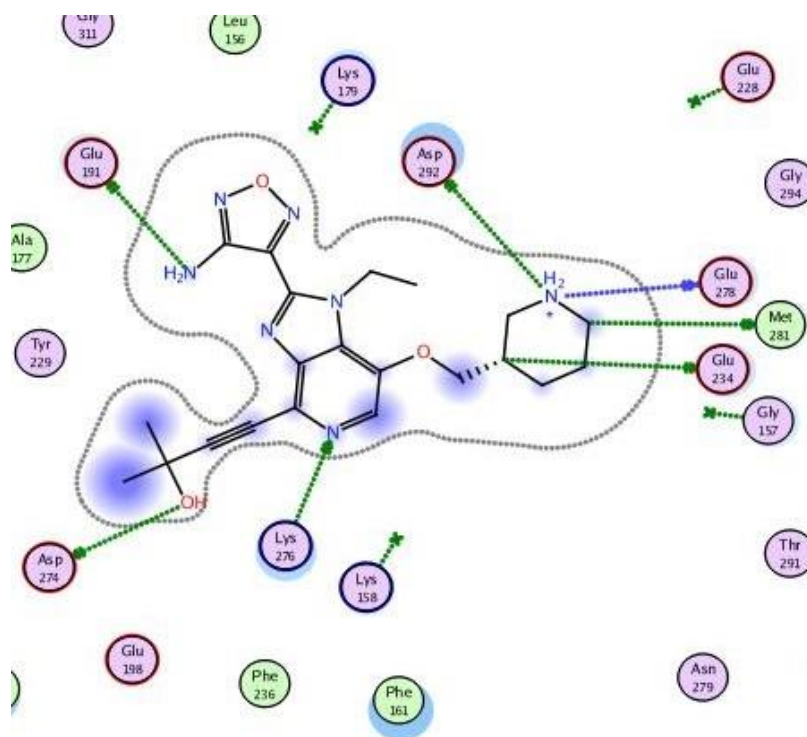


Figura 57. Diagrama 2D de interacciones de **GSK690693** con AKT3.

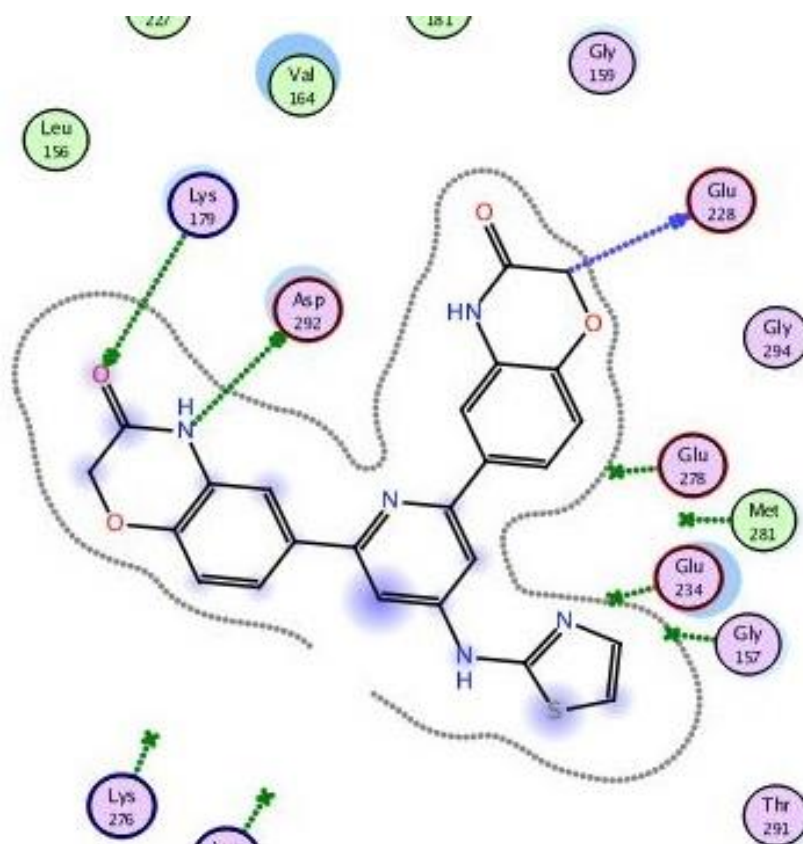


Figura 58. Diagrama 2D de interacciones de **JVM1** con AKT3.

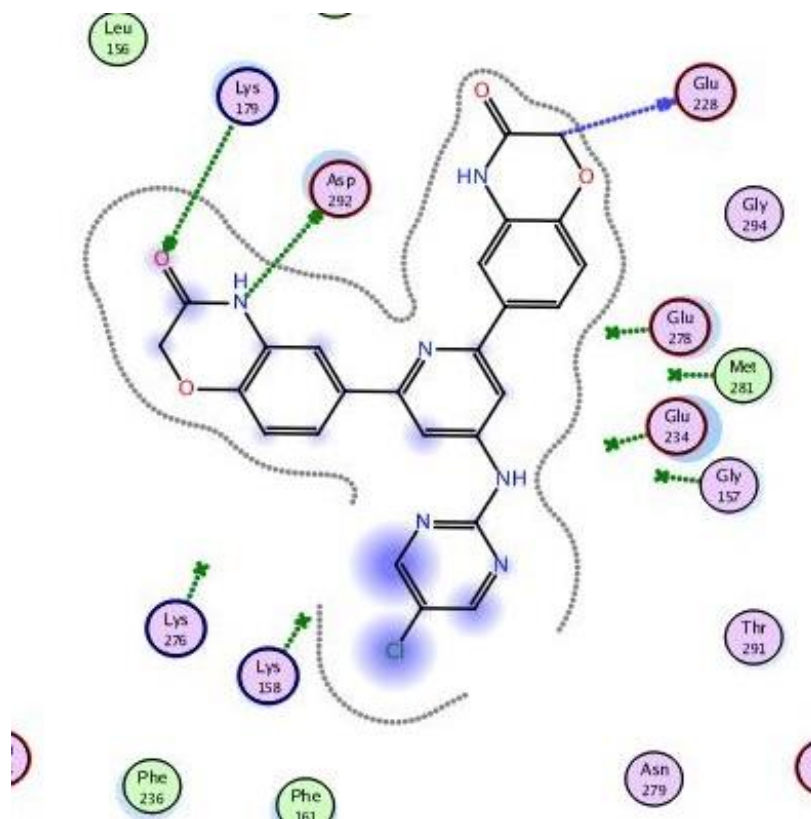


Figura 59. Diagrama 2D de interacciones de **JVM2** con AKT3.

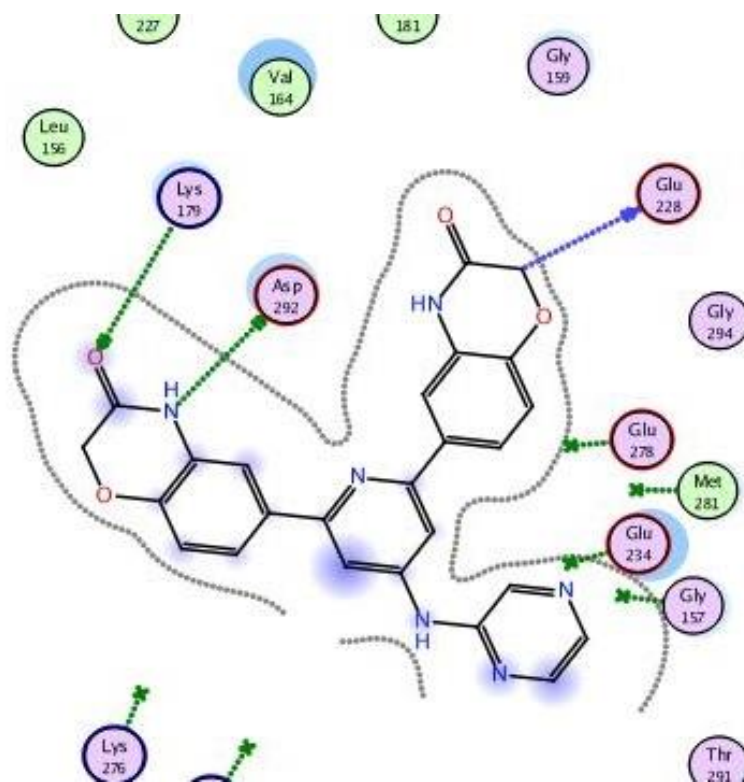


Figura 60. Diagrama 2D de interacciones de **JVM3** con AKT3.

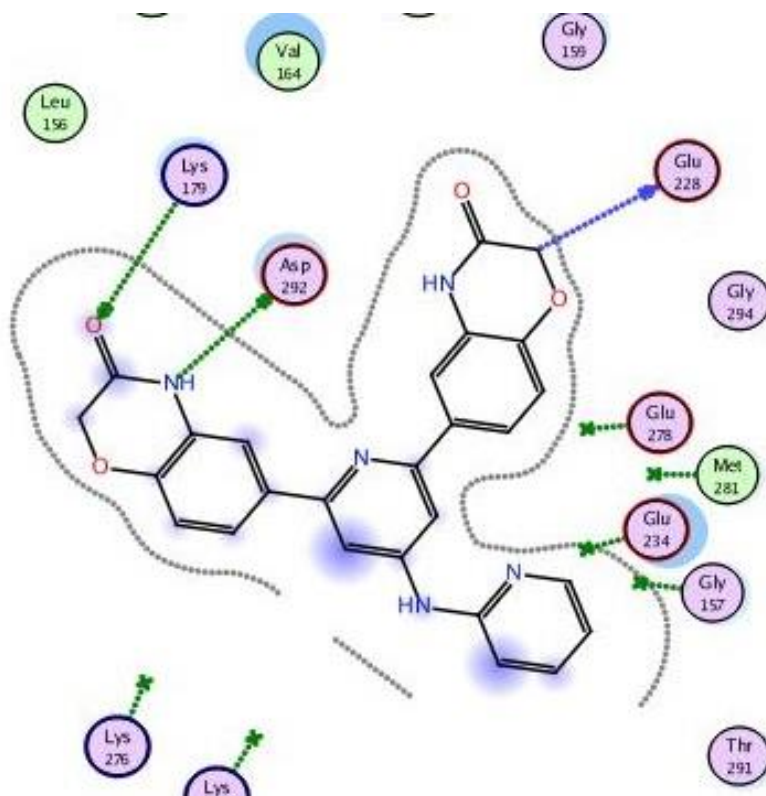


Figura 61. Diagrama 2D de interacciones de **JVM4** con AKT3.

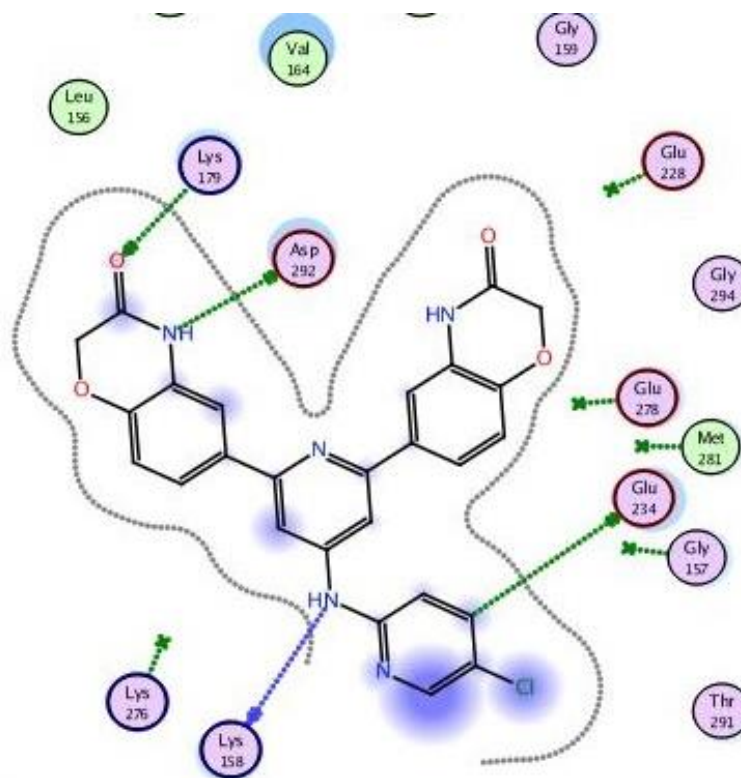


Figura 62. Diagrama 2D de interacciones de **JVM5** con AKT3.

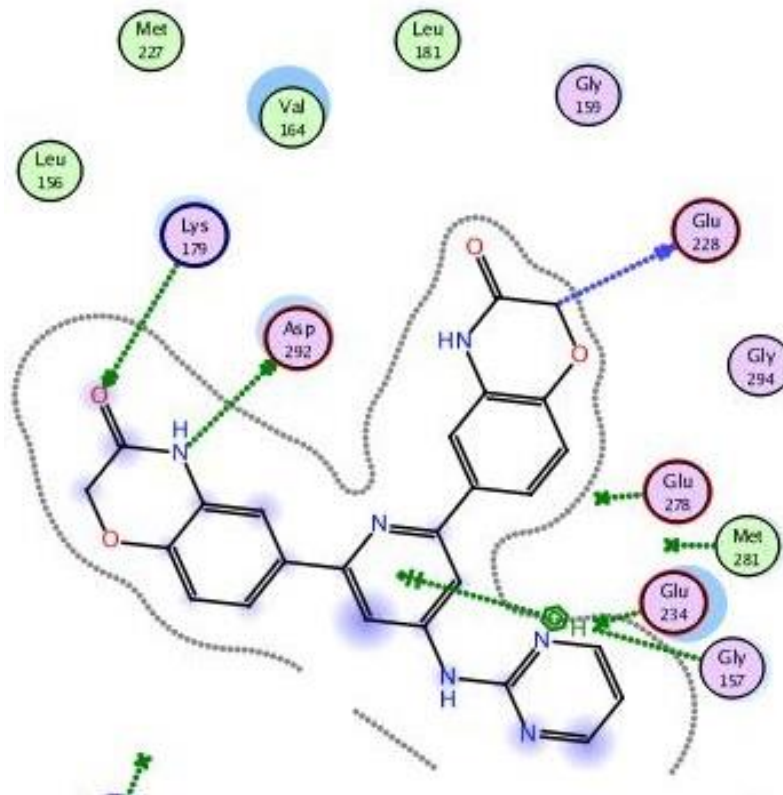


Figura 63. Diagrama 2D de interacciones de **JVM6** con AKT3.

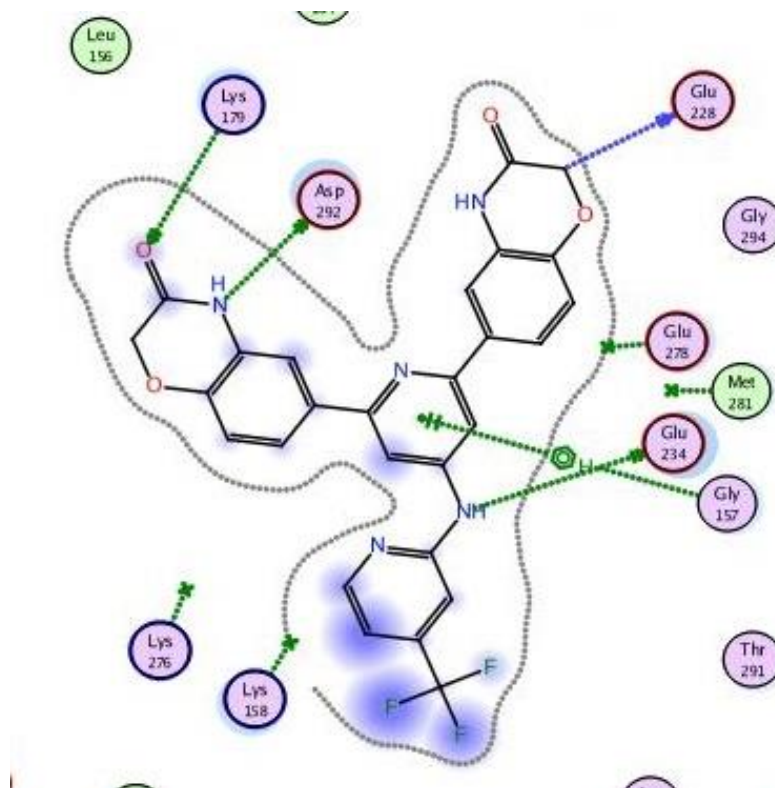


Figura 64. Diagrama 2D de interacciones de **JVM7** con AKT3.

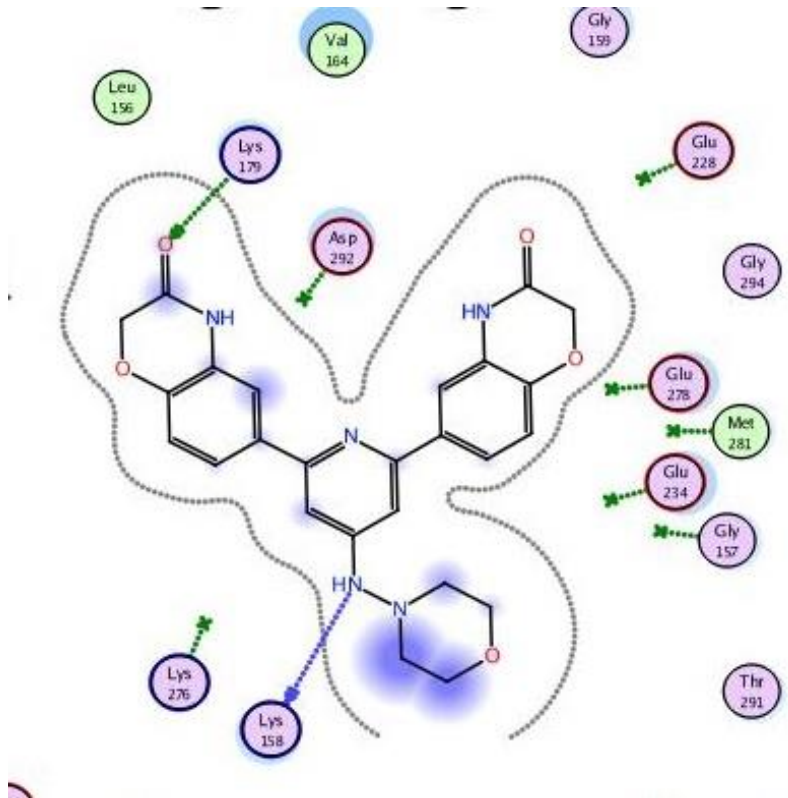


Figura 65. Diagrama 2D de interacciones de **JVM8** con AKT3.

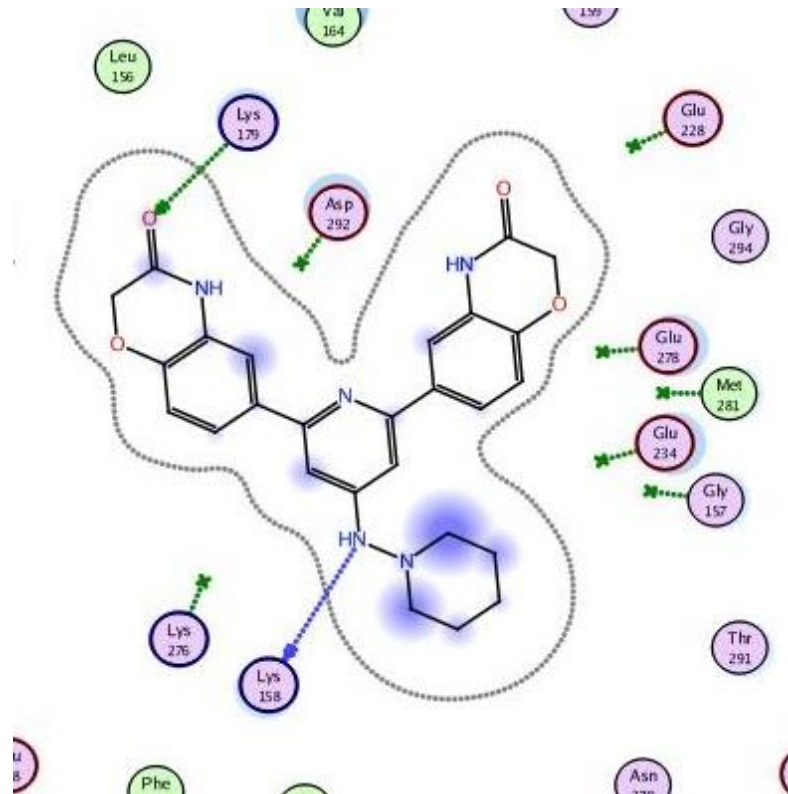
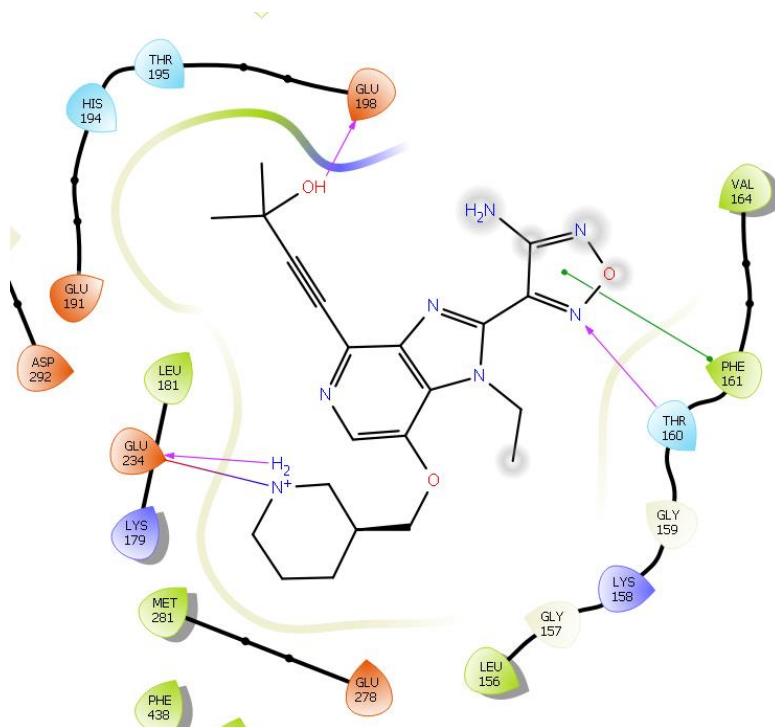
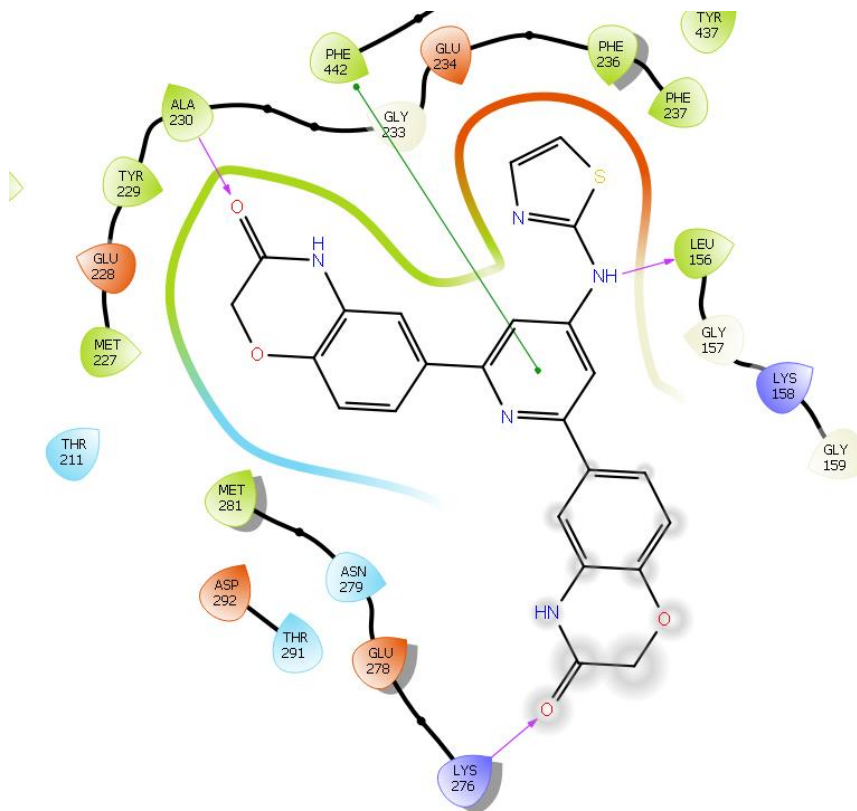


Figura 66. Diagrama 2D de interacciones de **JVM9** con AKT3.

13.2 Diagramas 2D de interacciones en acoplamiento molecular efectuado con Glide

Figura 67. Diagrama 2D de interacciones de **GSK690693** con AKT1.Figura 68. Diagrama 2D de interacciones de **JVM1** con AKT1.

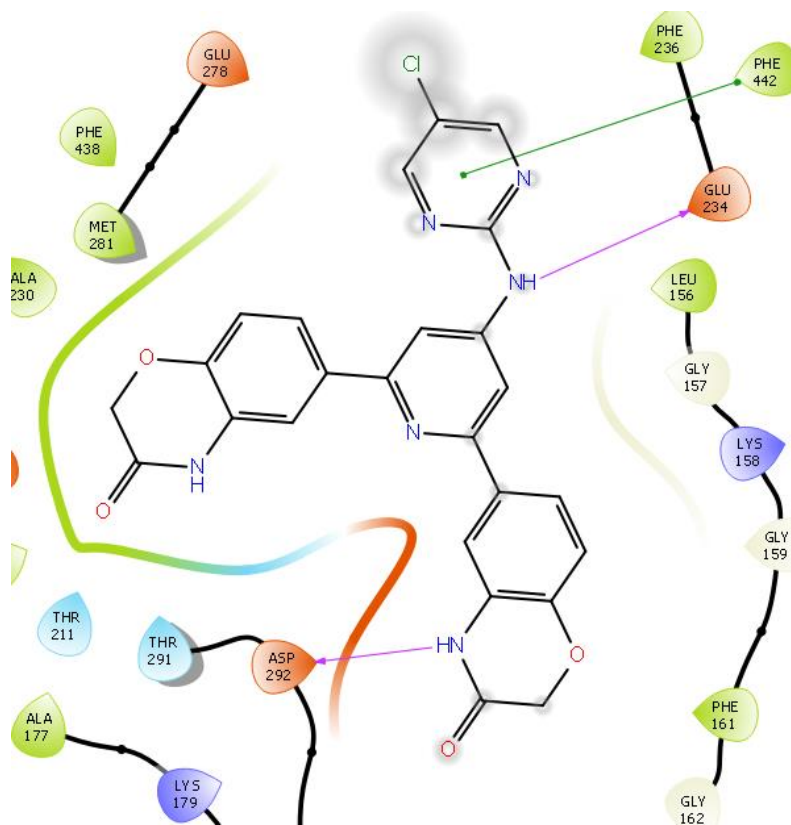


Figura 69. Diagrama 2D de interacciones de **JVM2** con AKT1.

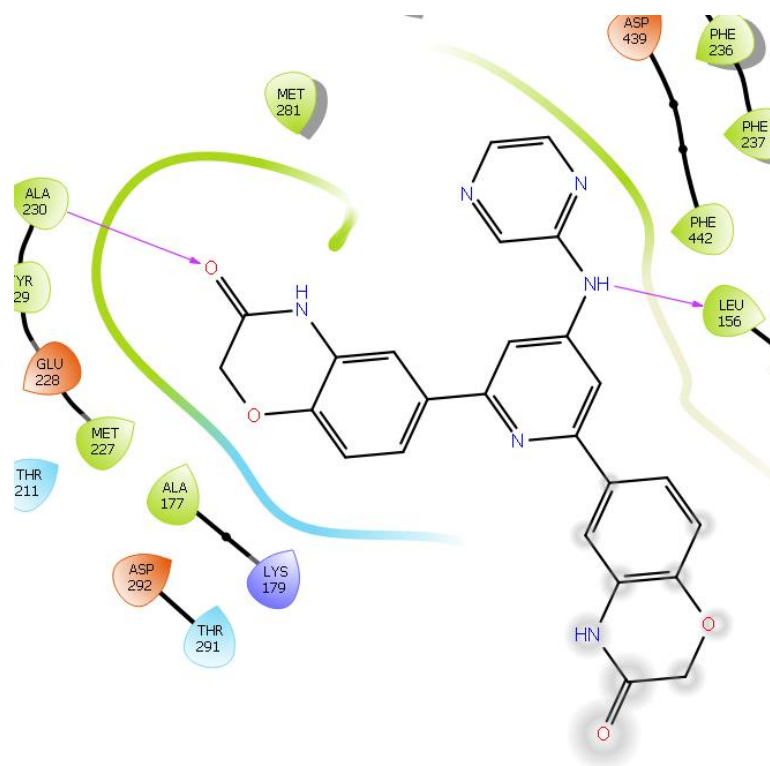


Figura 70. Diagrama 2D de interacciones de **JVM3** con AKT1.

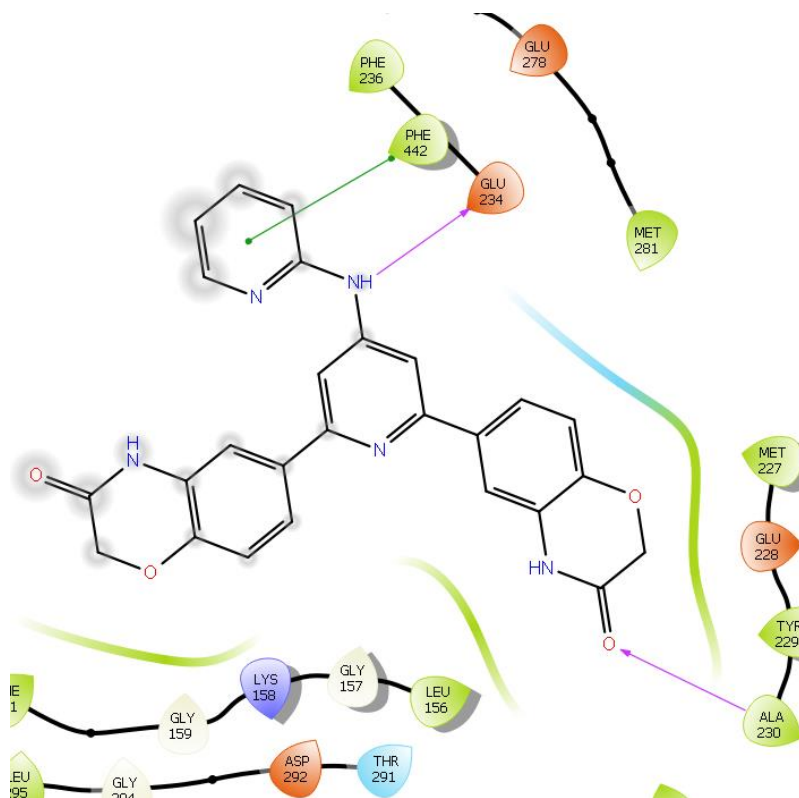


Figura 71. Diagrama 2D de interacciones de **JVM4** con AKT1.

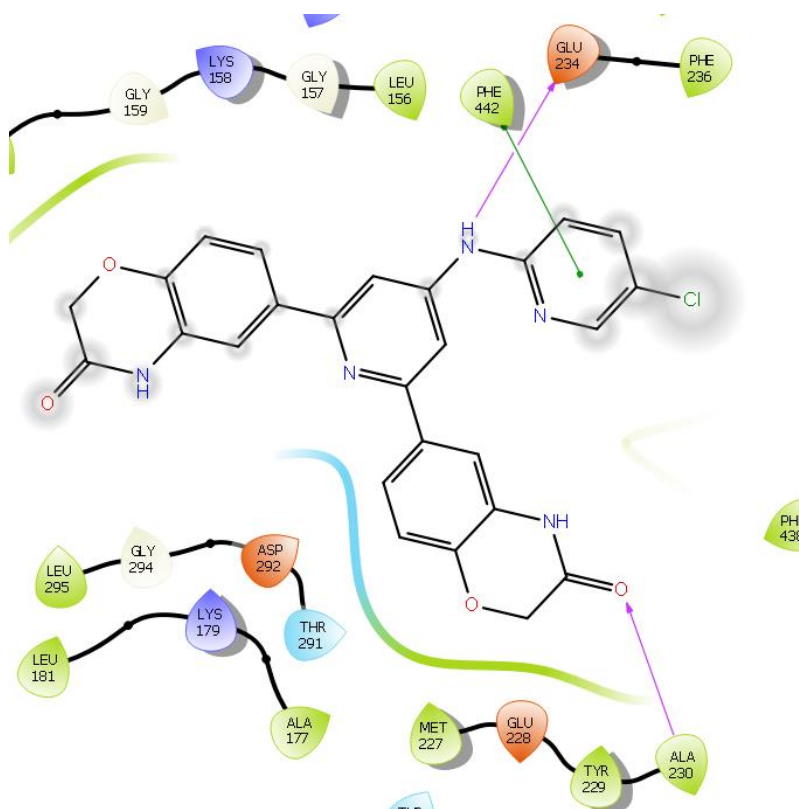


Figura 72. Diagrama 2D de interacciones de **JVM5** con AKT1.

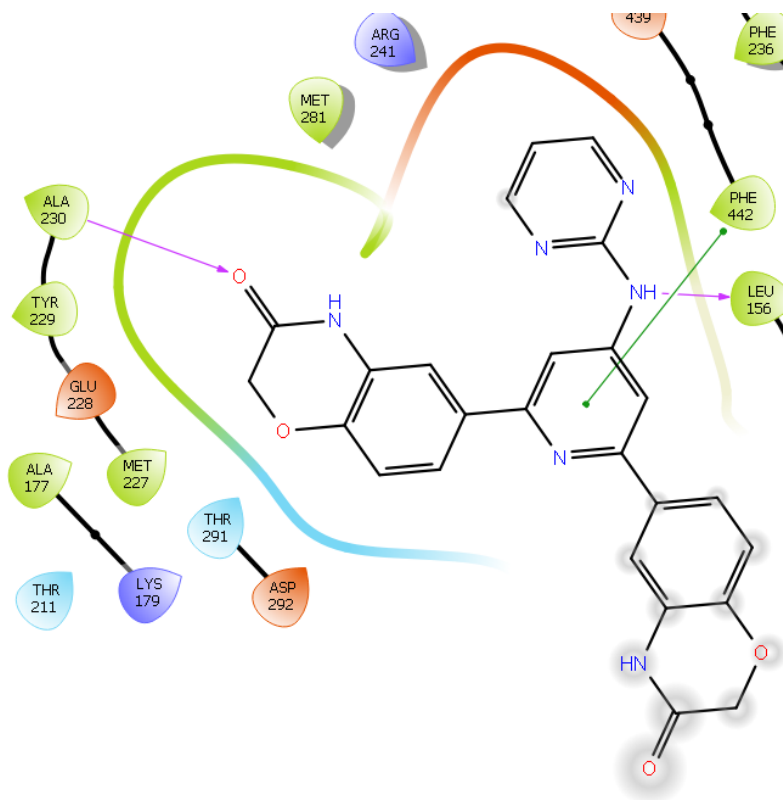


Figura 73. Diagrama 2D de interacciones de **JVM6** con AKT1.

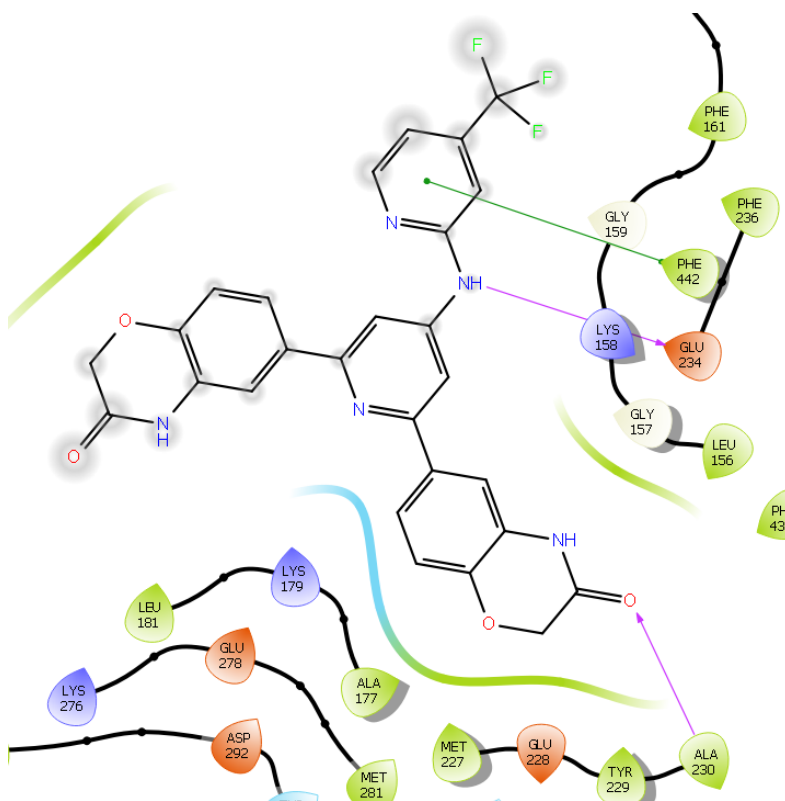


Figura 74. Diagrama 2D de interacciones de **JVM7** con AKT1.

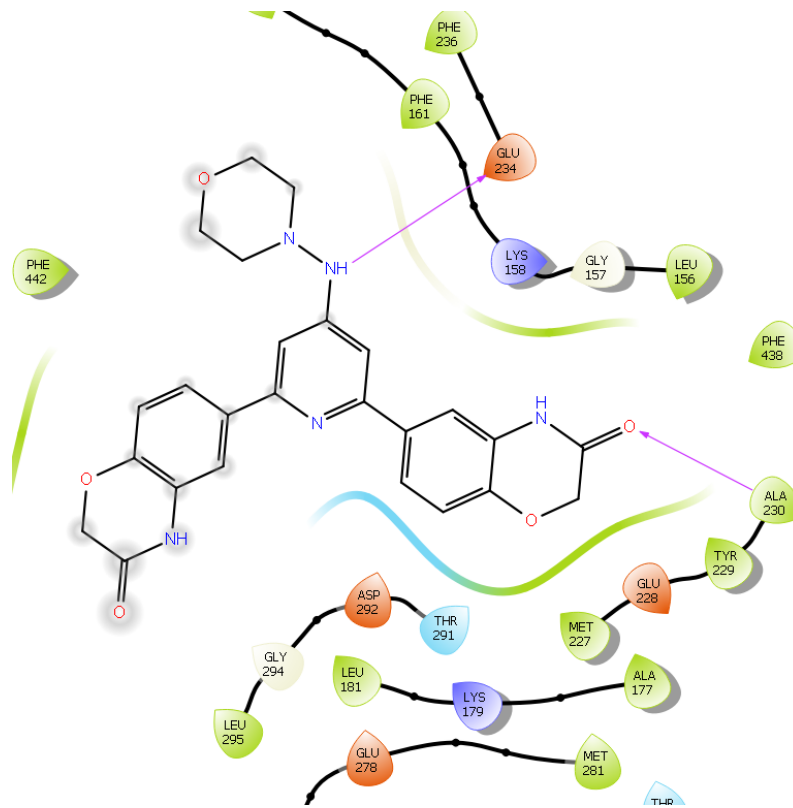


Figura 75. Diagrama 2D de interacciones de **JVM8** con AKT1.

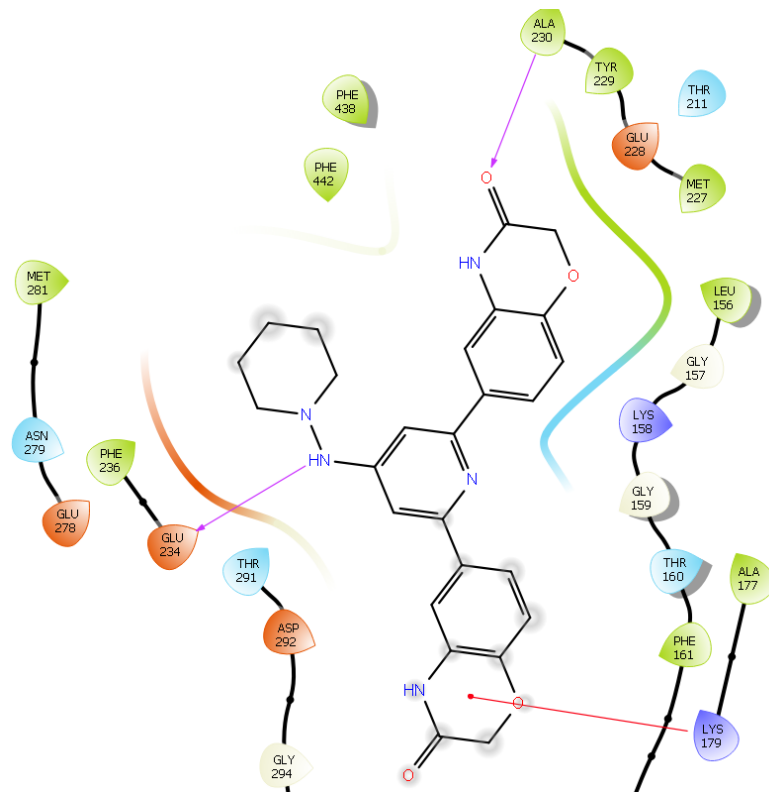


Figura 76. Diagrama 2D de interacciones de **JVM9** con AKT1.

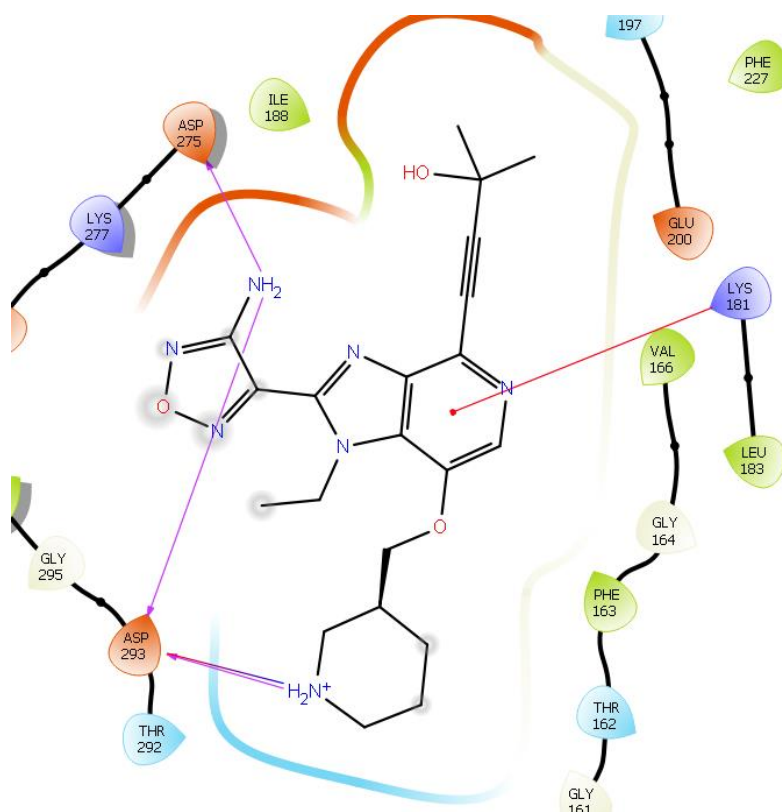


Figura 77. Diagrama 2D de interacciones de **GSK690693** con AKT2.

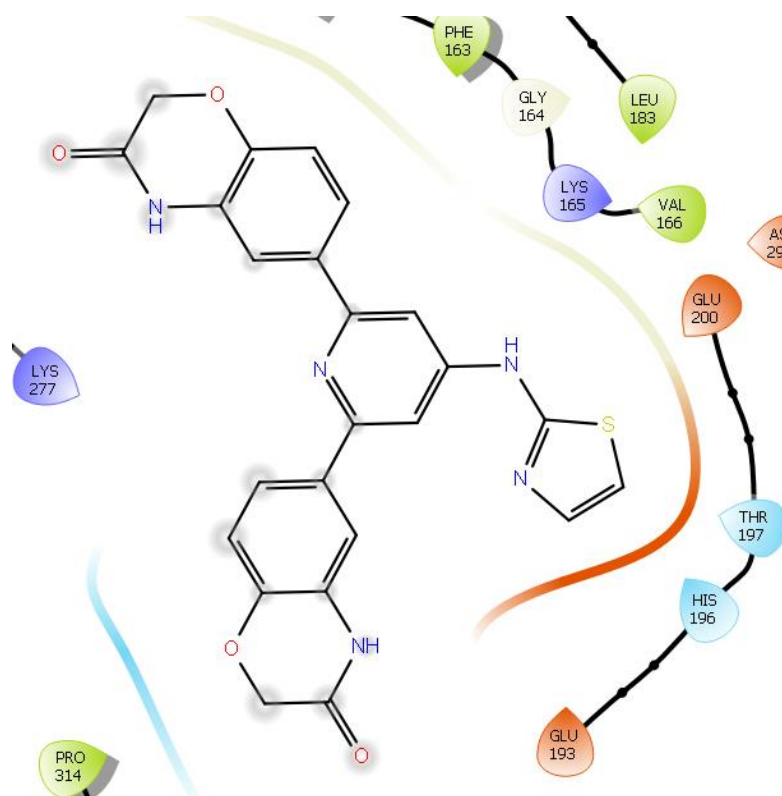


Figura 78. Diagrama 2D de interacciones de **JVM1** con AKT2.

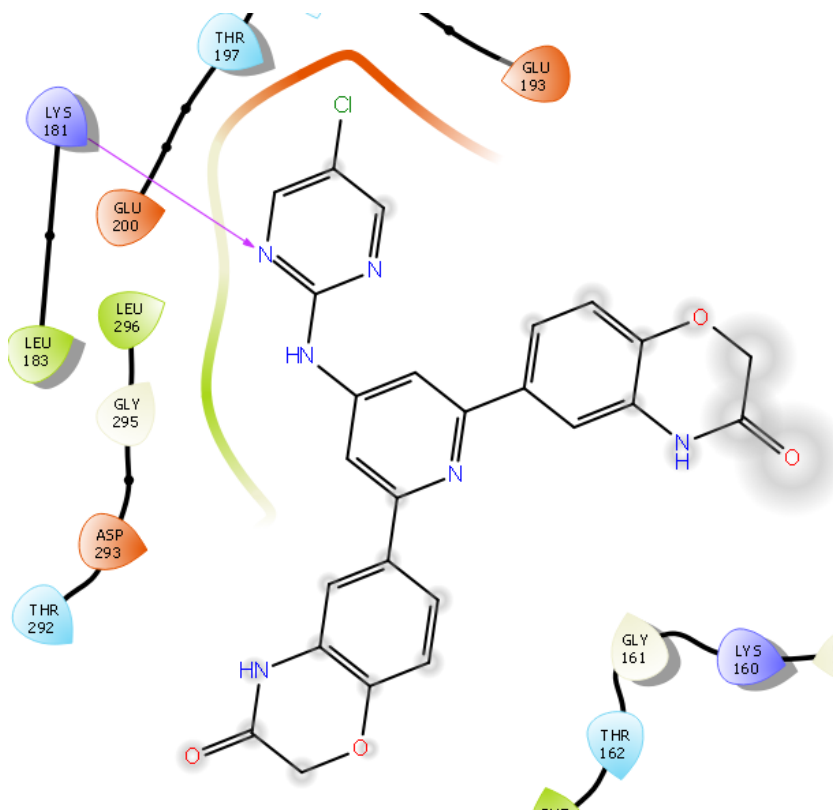


Figura 79. Diagrama 2D de interacciones de **JVM2** con AKT2.

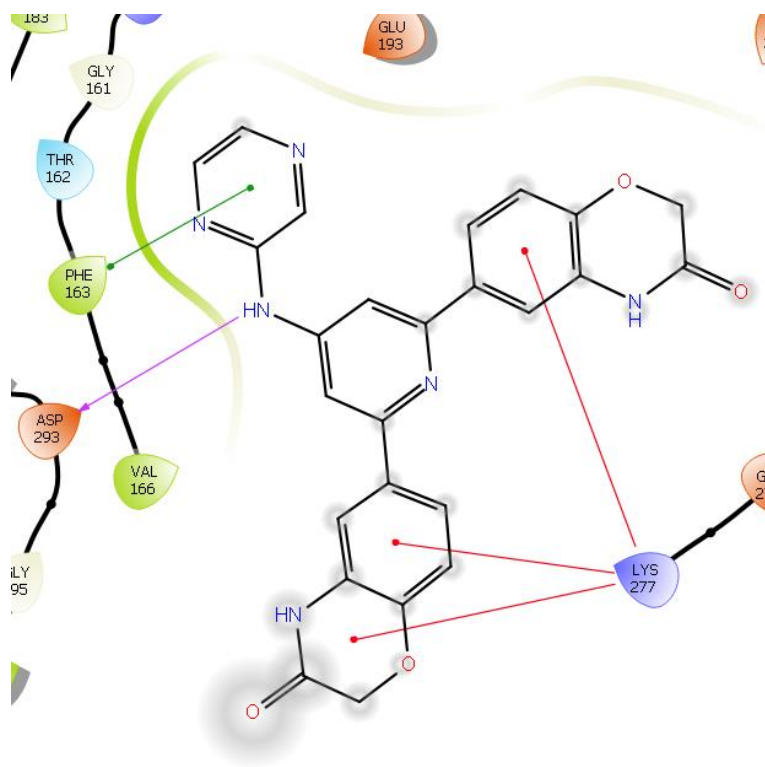


Figura 80. Diagrama 2D de interacciones de **JVM3** con AKT2.

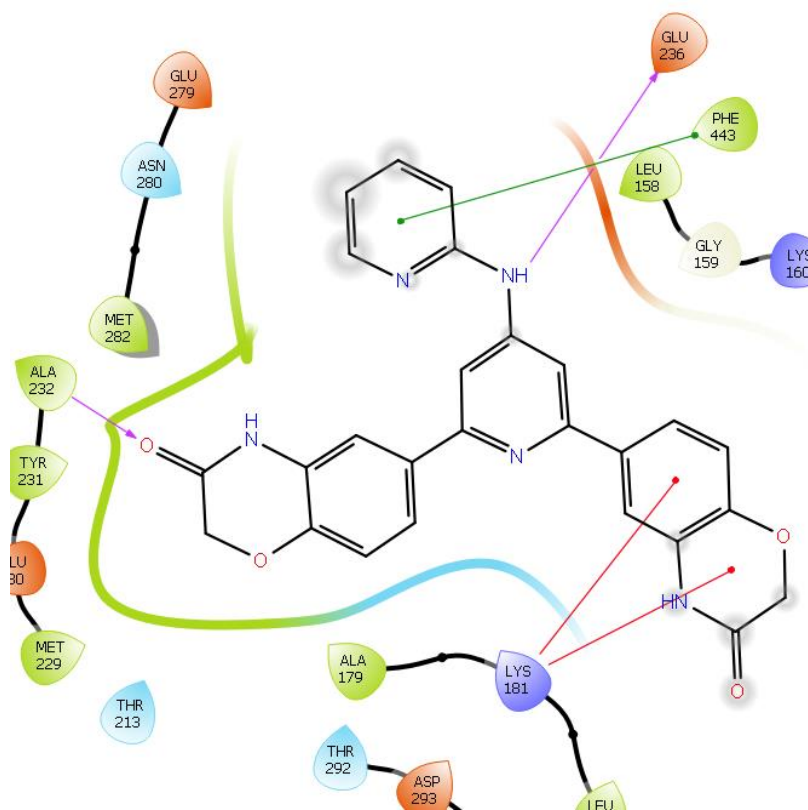


Figura 81. Diagrama 2D de interacciones de **JVM4** con AKT2.

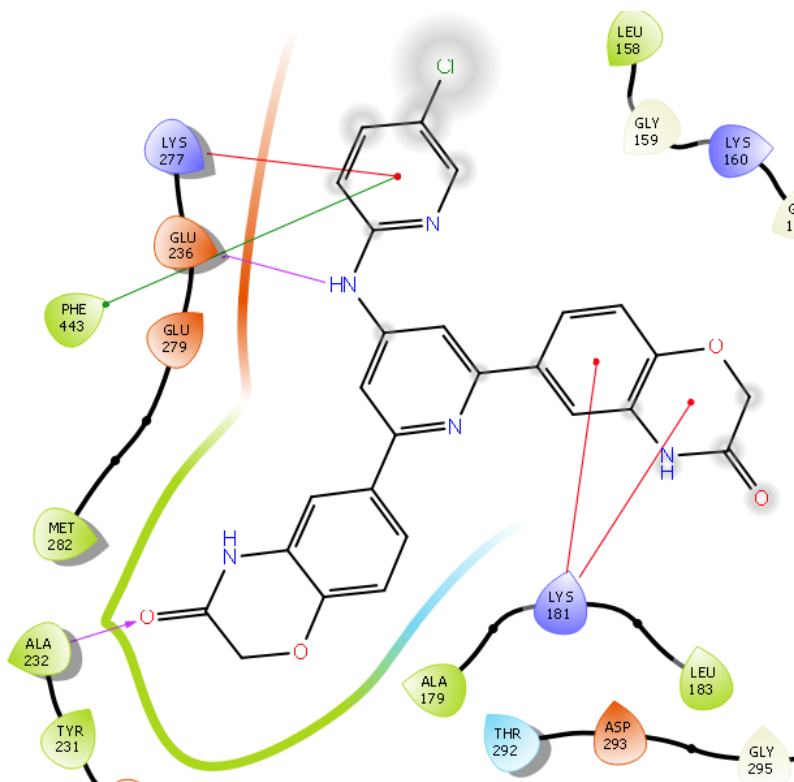


Figura 82. Diagrama 2D de interacciones de **JVM5** con AKT2.

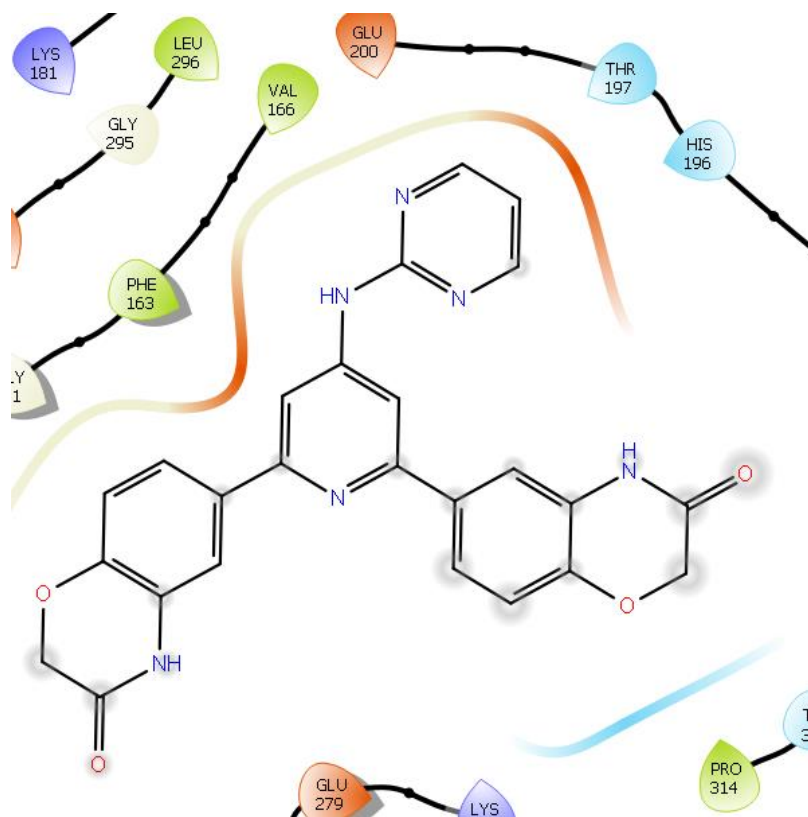


Figura 83. Diagrama 2D de interacciones de **JVM6** con AKT2.

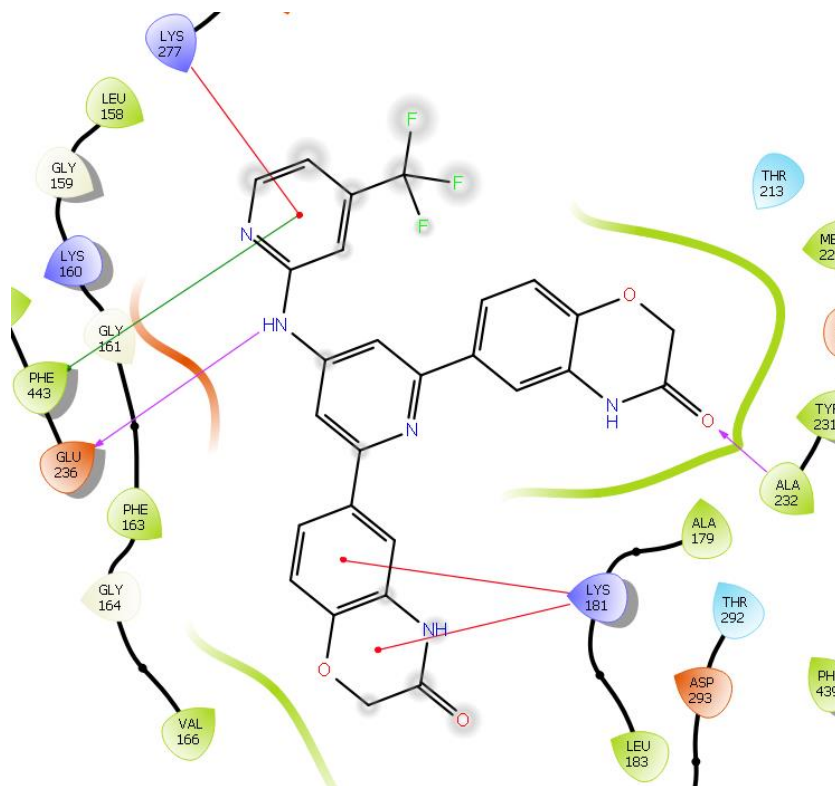


Figura 84. Diagrama 2D de interacciones de **JVM7** con AKT2.

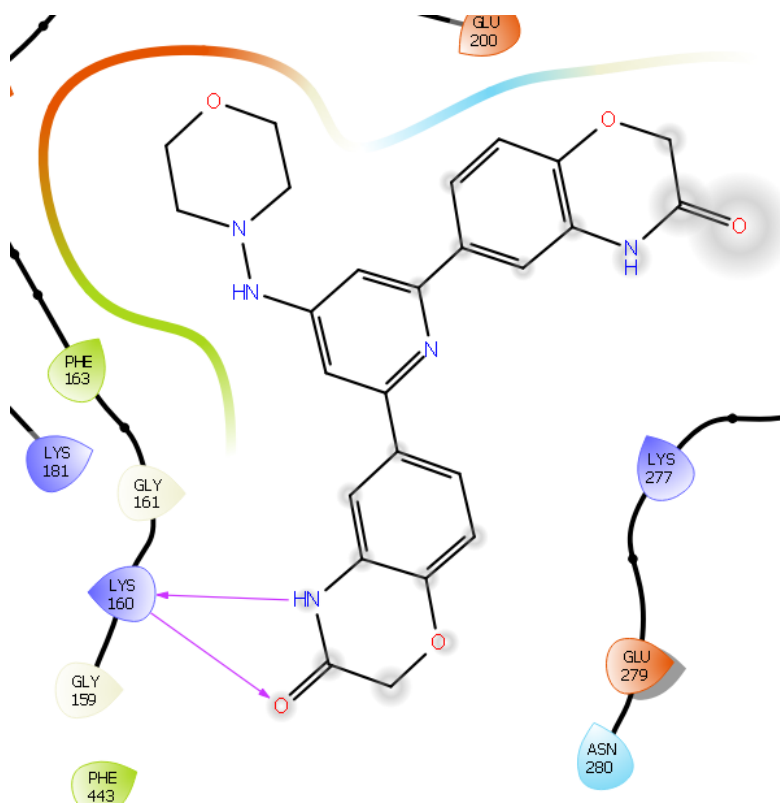


Figura 85. Diagrama 2D de interacciones de **JVM8** con AKT2.

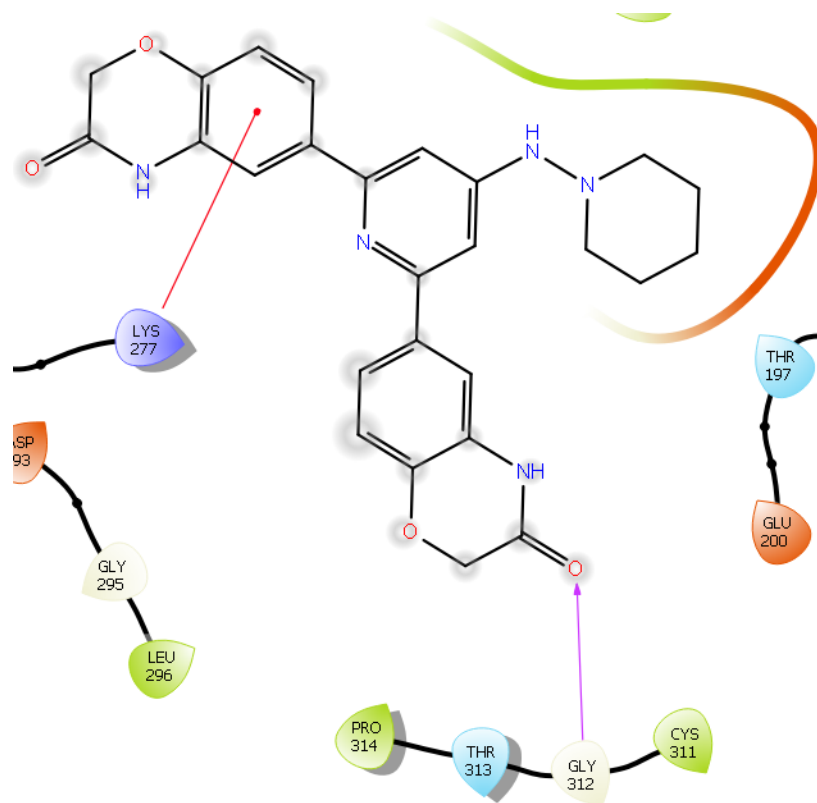


Figura 86. Diagrama 2D de interacciones de **JVM9** con AKT2.

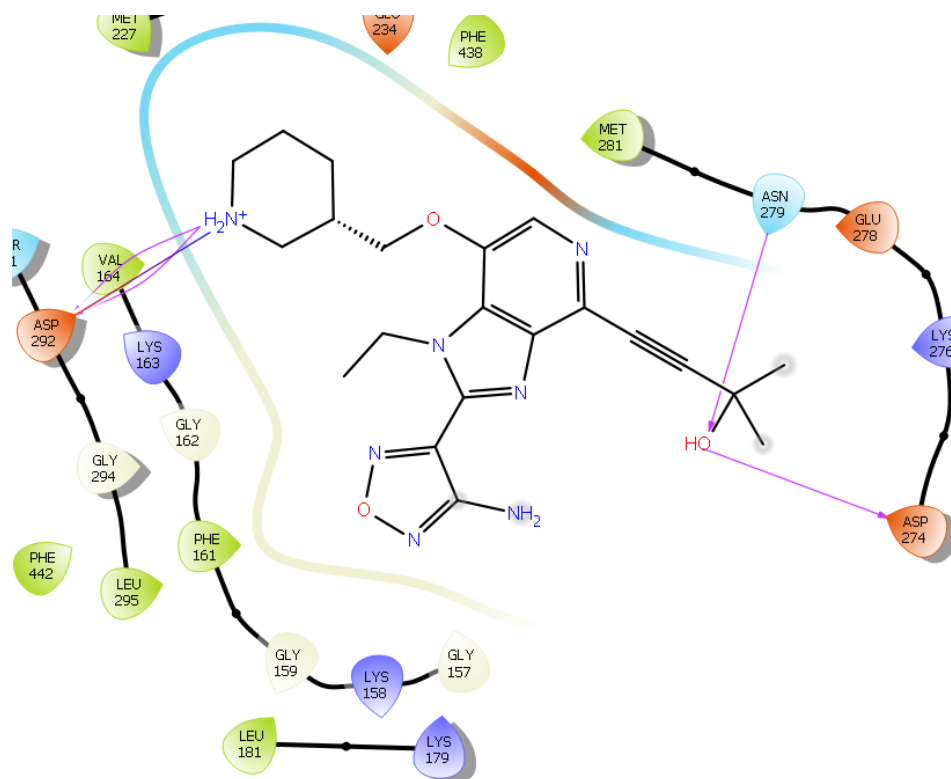


Figura 87. Diagrama 2D de interacciones de **GSK690693** con AKT3.

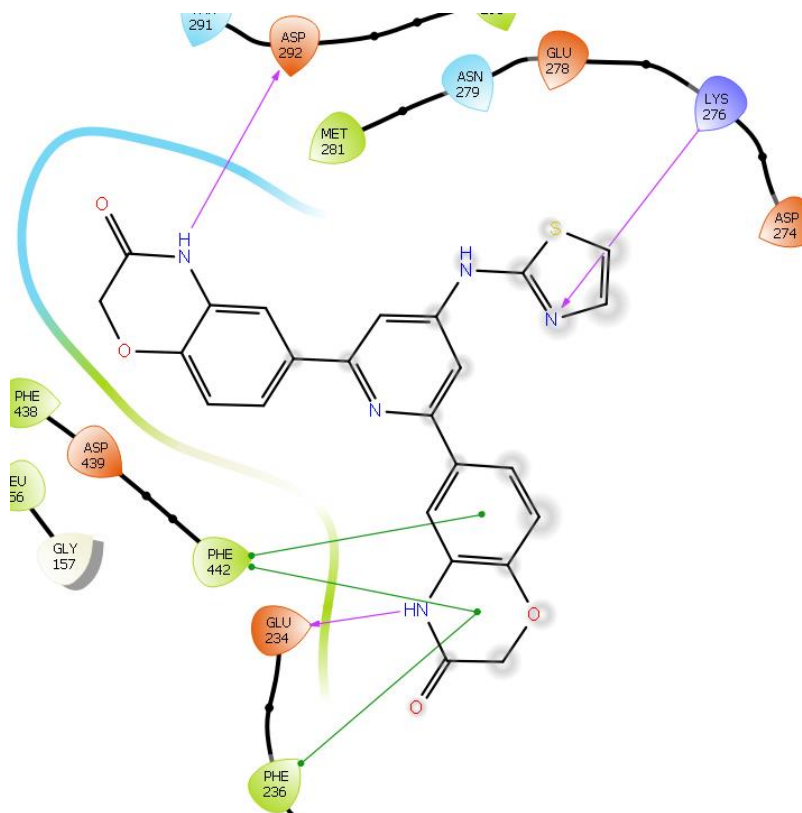


Figura 88. Diagrama 2D de interacciones de **JVM1** con AKT3.

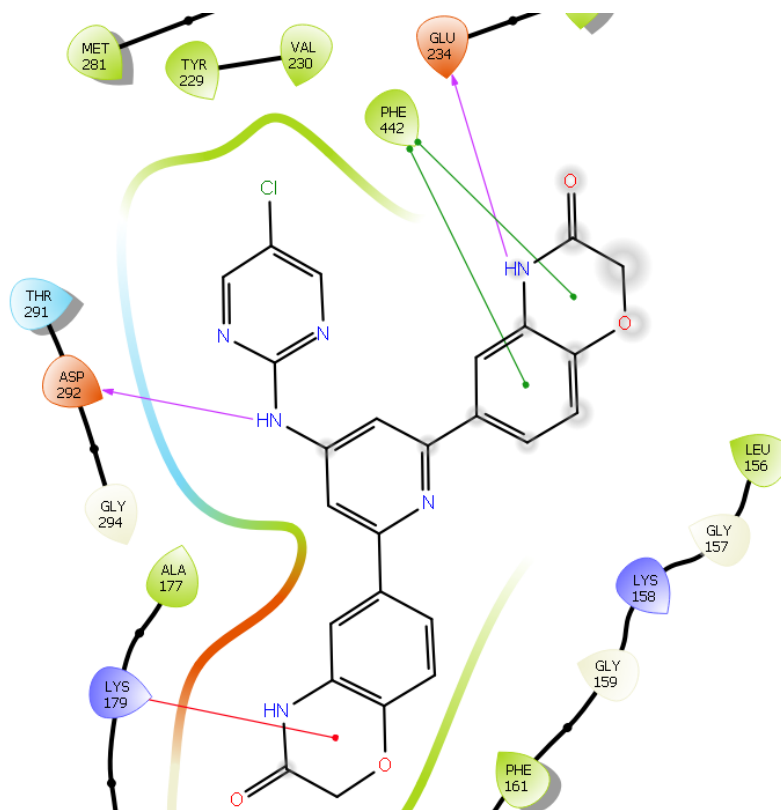


Figura 89. Diagrama 2D de interacciones de **JVM2** con AKT3.

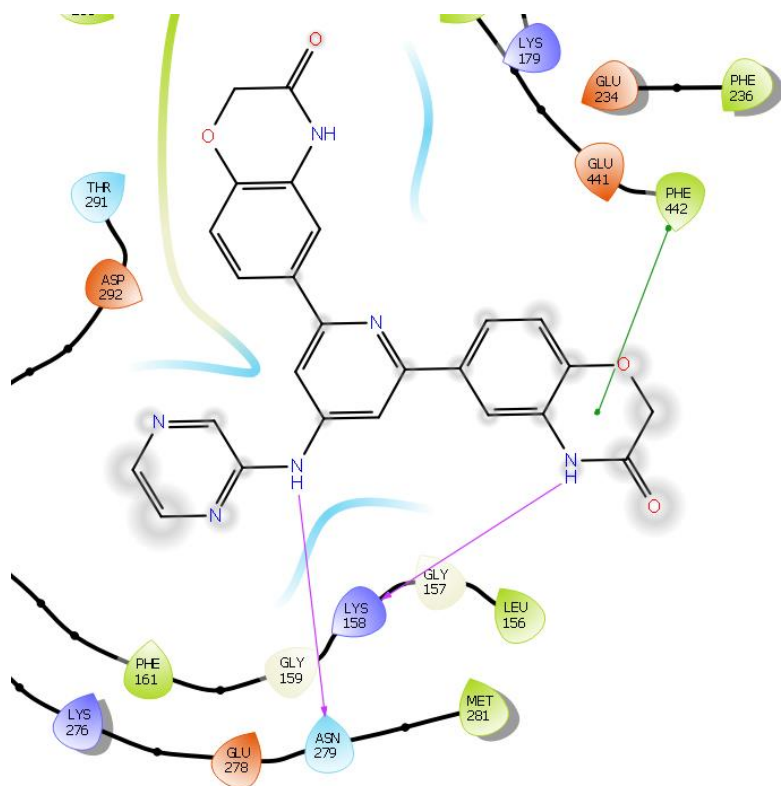


Figura 90. Diagrama 2D de interacciones de **JVM3** con AKT3.

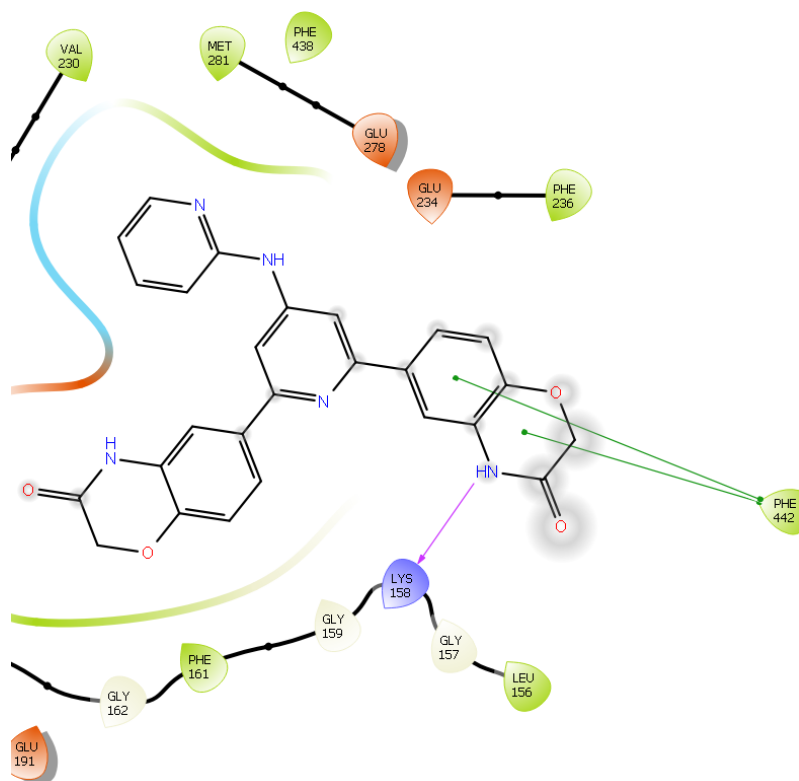


Figura 91. Diagrama 2D de interacciones de **JVM4** con AKT3.

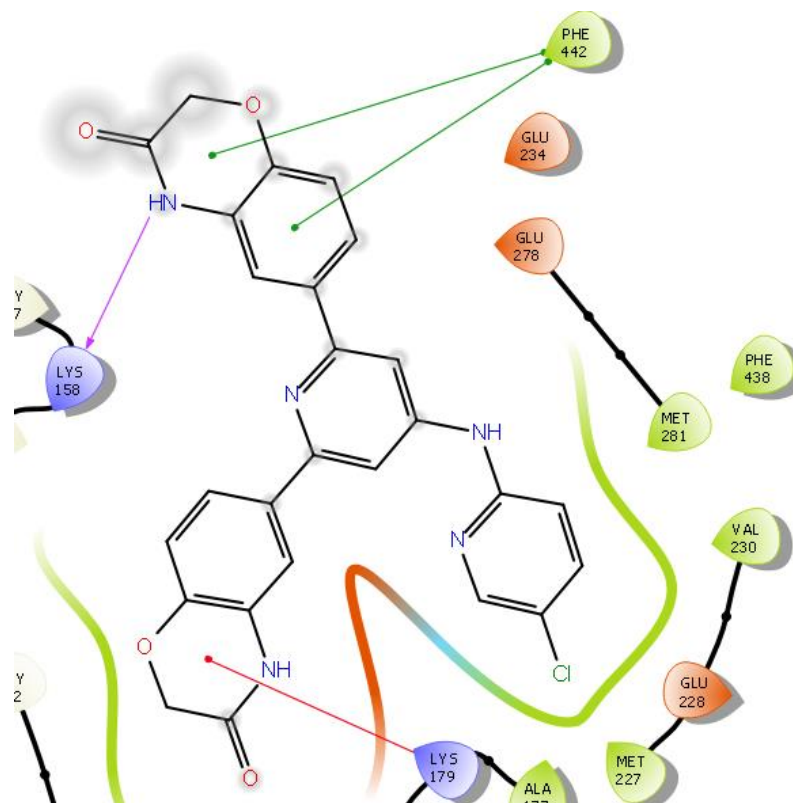


Figura 92. Diagrama 2D de interacciones de **JVM5** con AKT3.

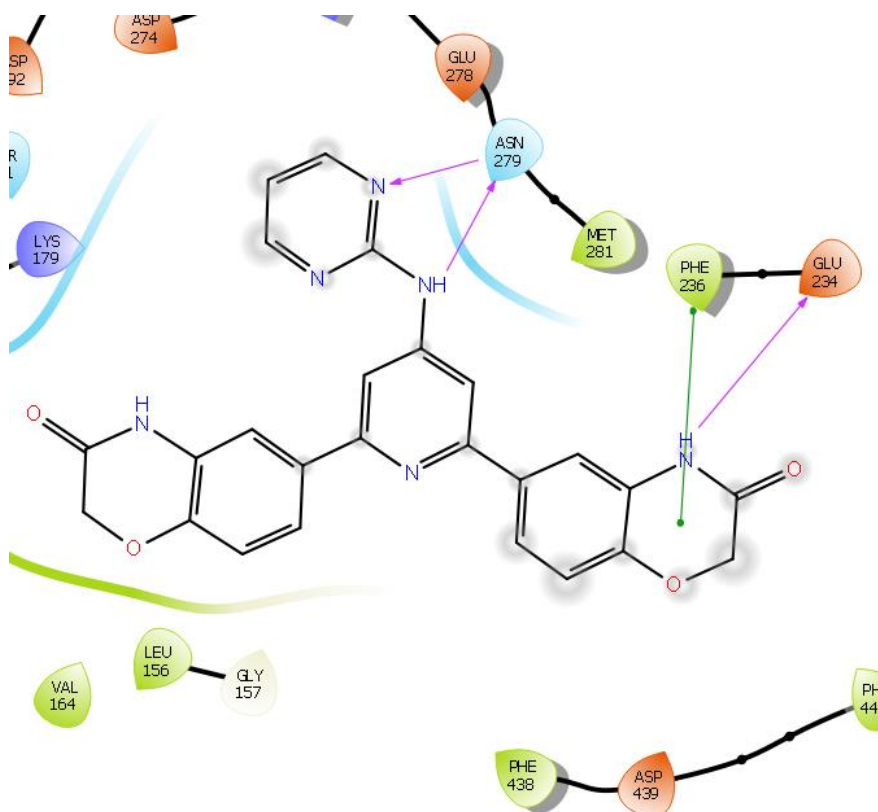


Figura 93. Diagrama 2D de interacciones de **JVM6** con AKT3.

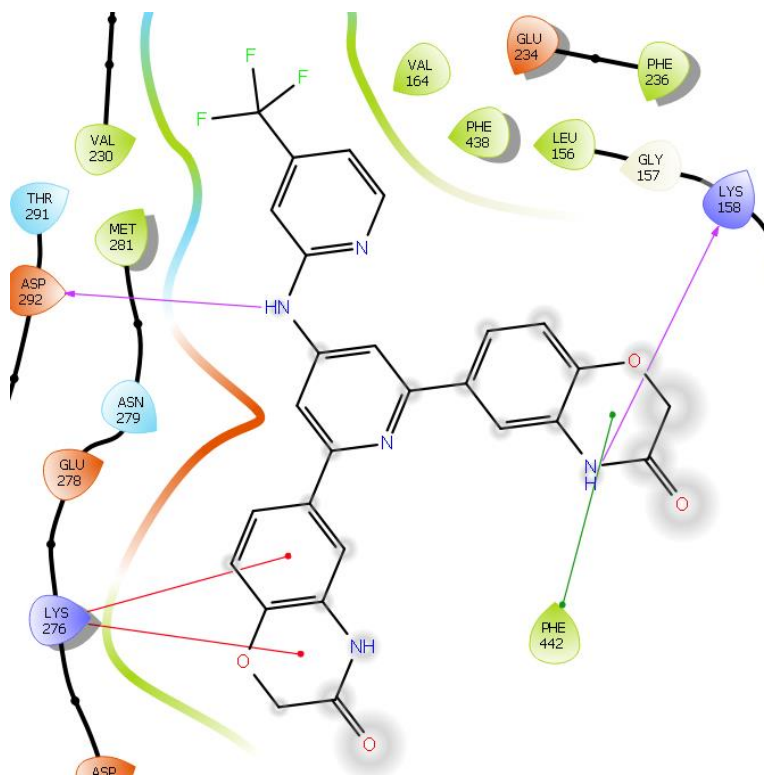


Figura 94. Diagrama 2D de interacciones de **JVM7** con AKT3.

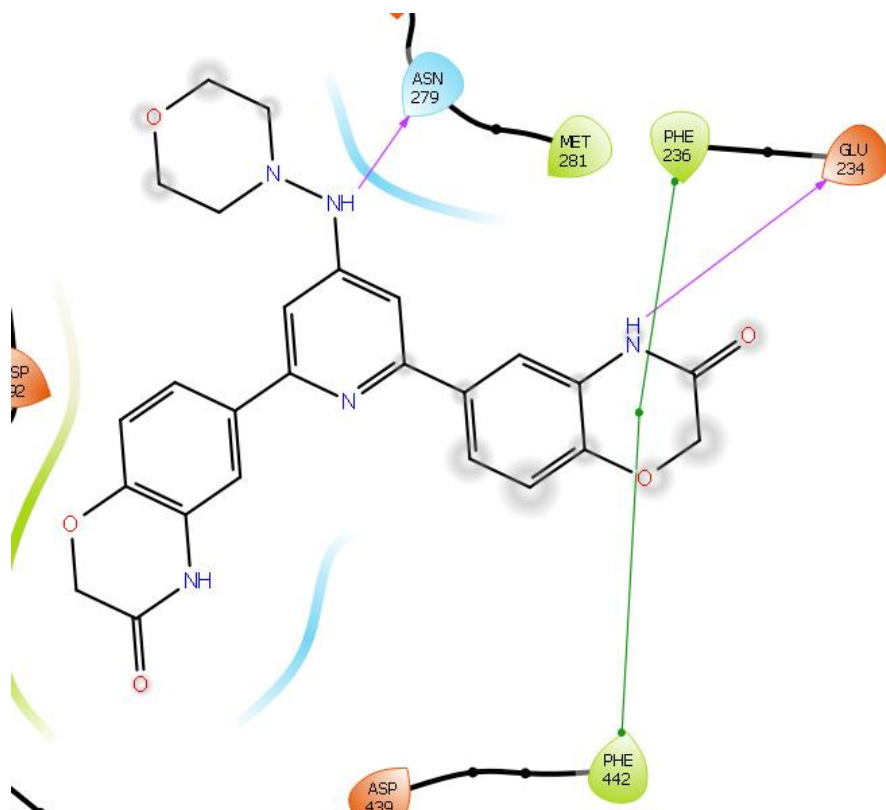


Figura 95. Diagrama 2D de interacciones de **JVM8** con AKT3.

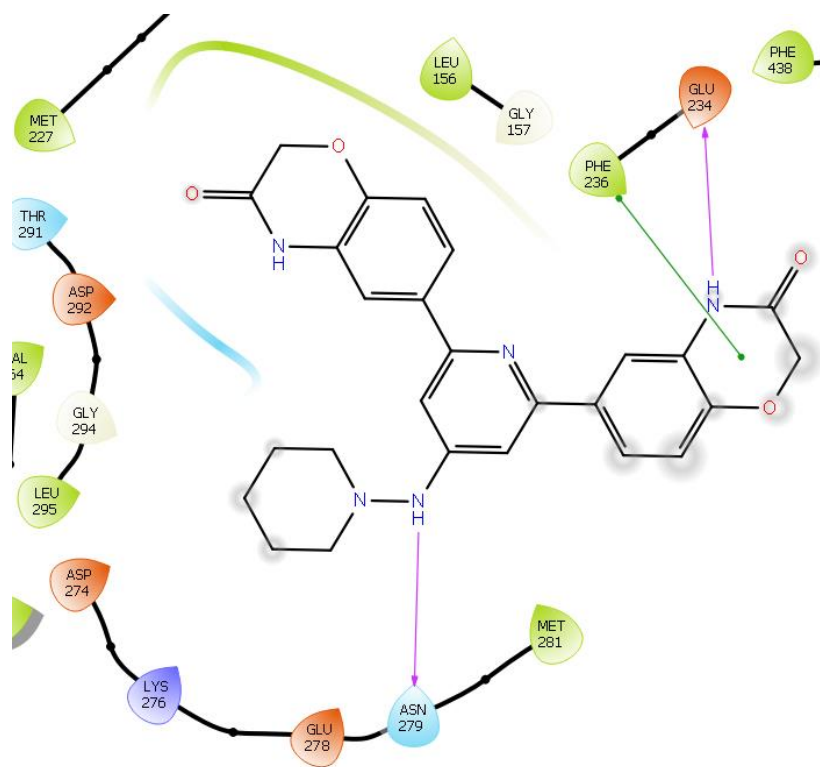
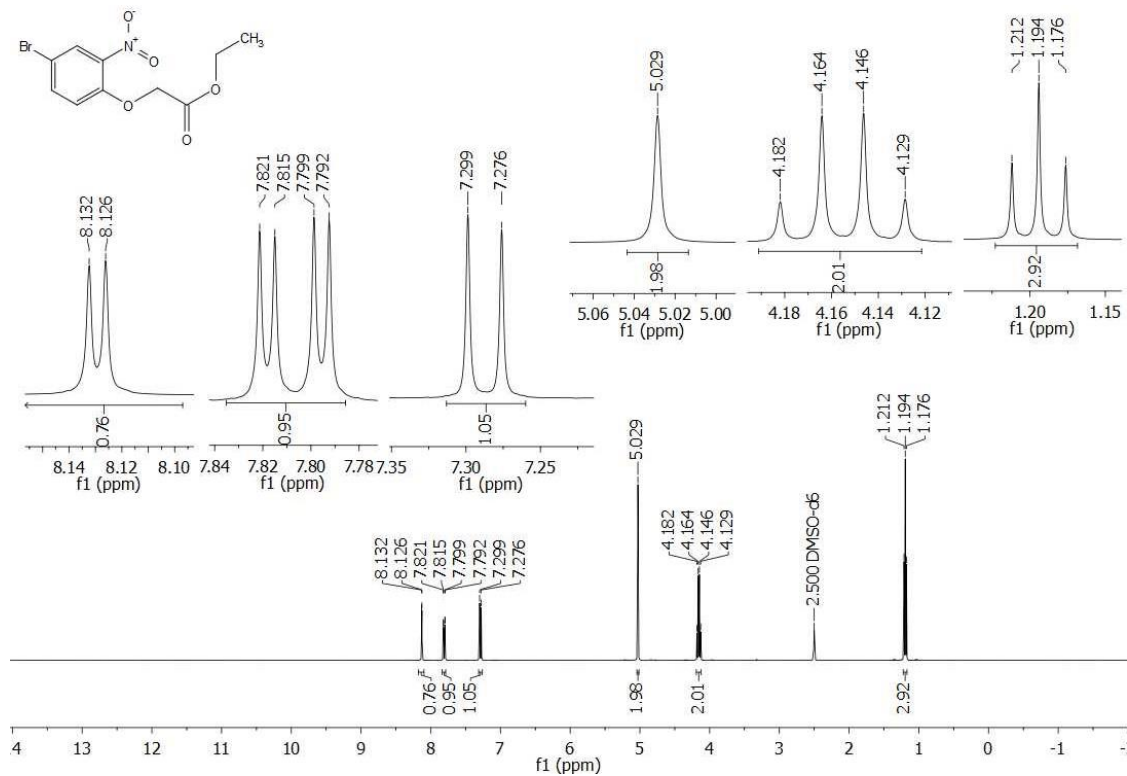
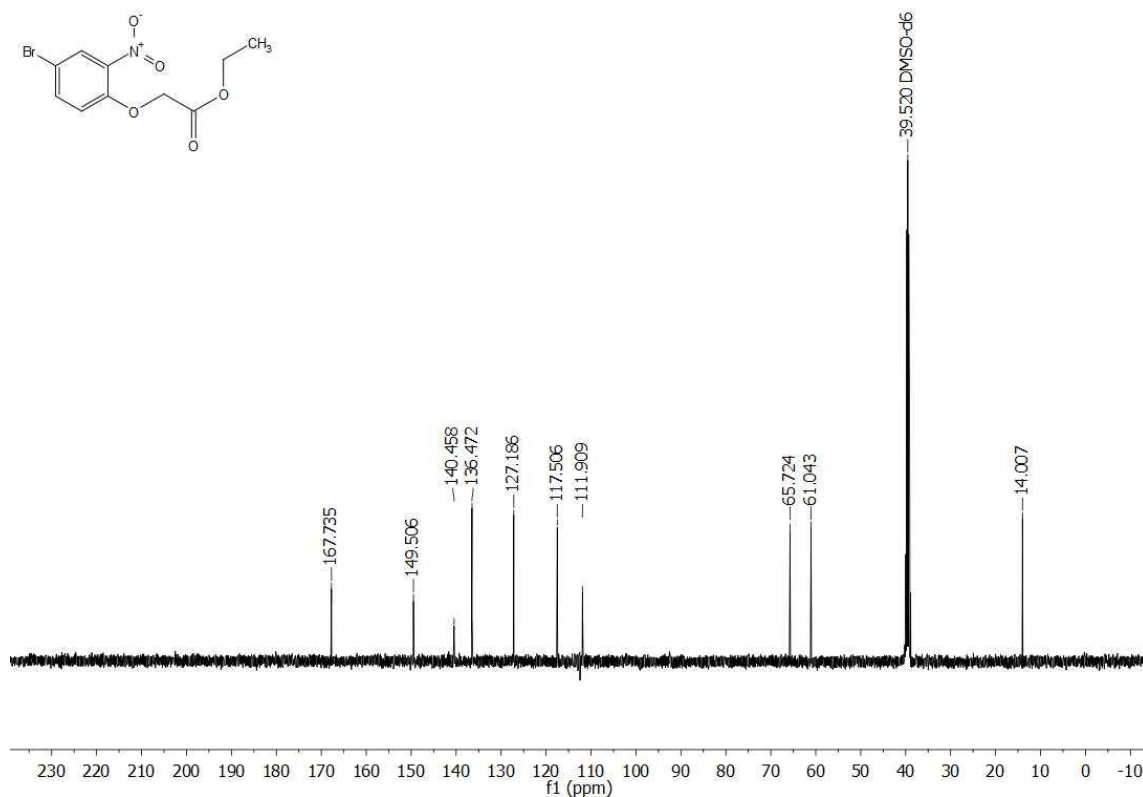


Figura 96. Diagrama 2D de interacciones de **JVM9** con AKT3.

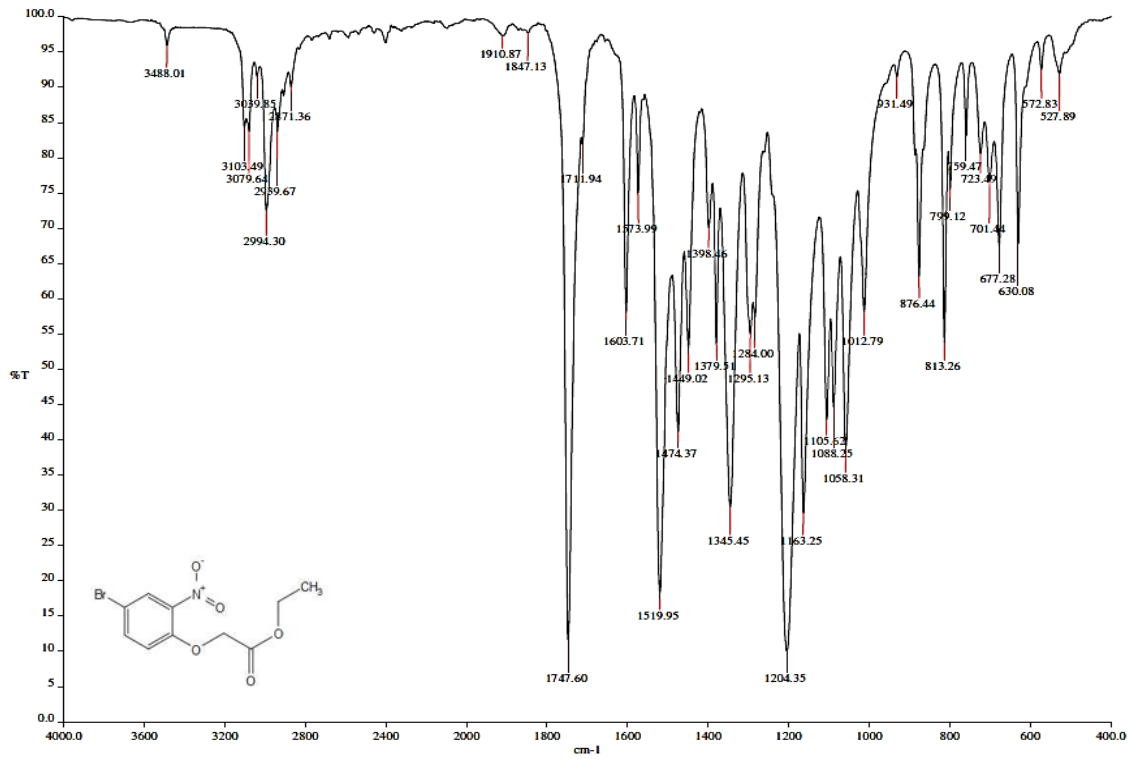
13. ANEXO III – ESPECTROS



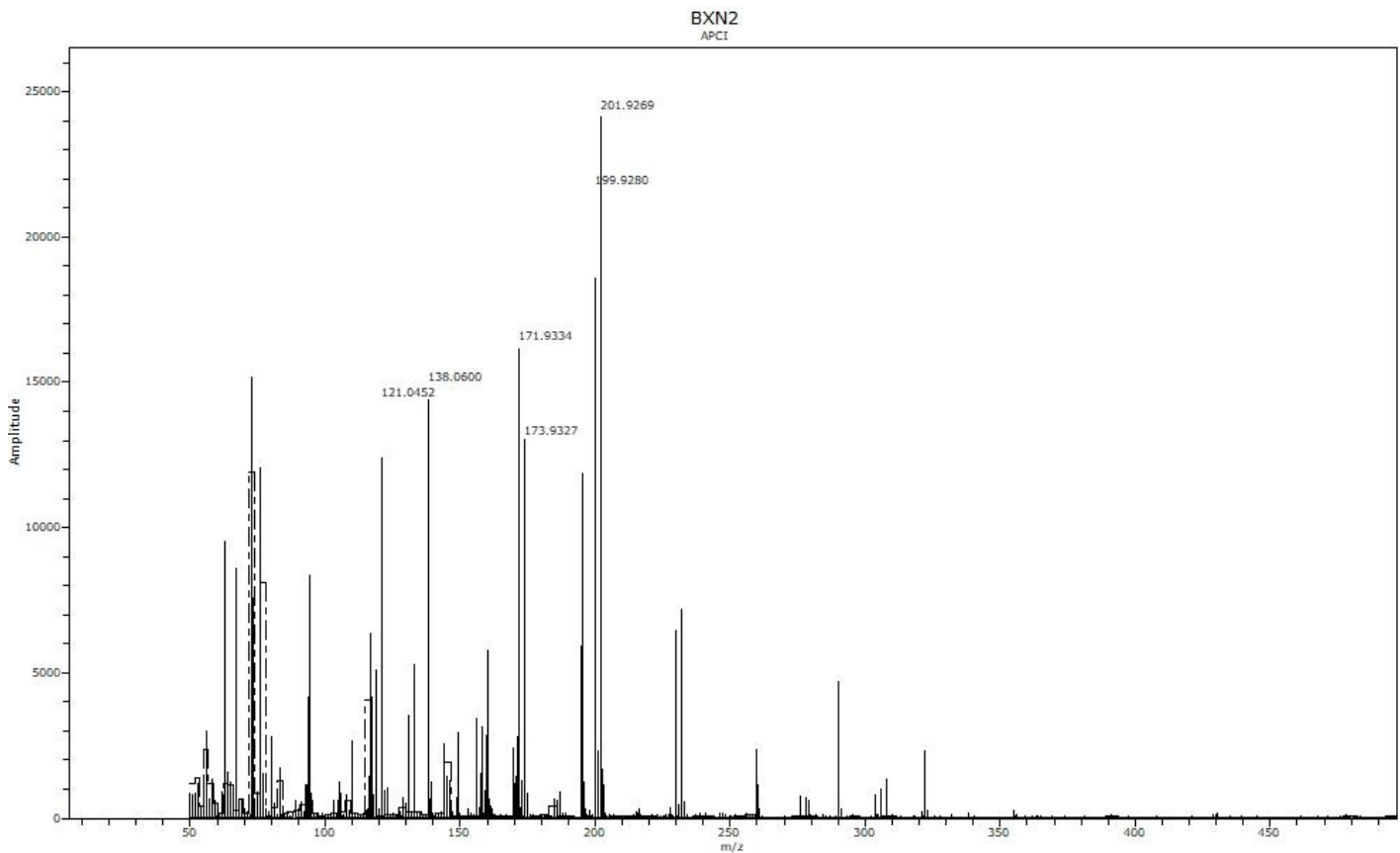
Espectro 1. RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆, 400 MHz, δ en ppm) del compuesto (4-bromo-2-nitrofenoxi)acetato de etilo (BXN2).



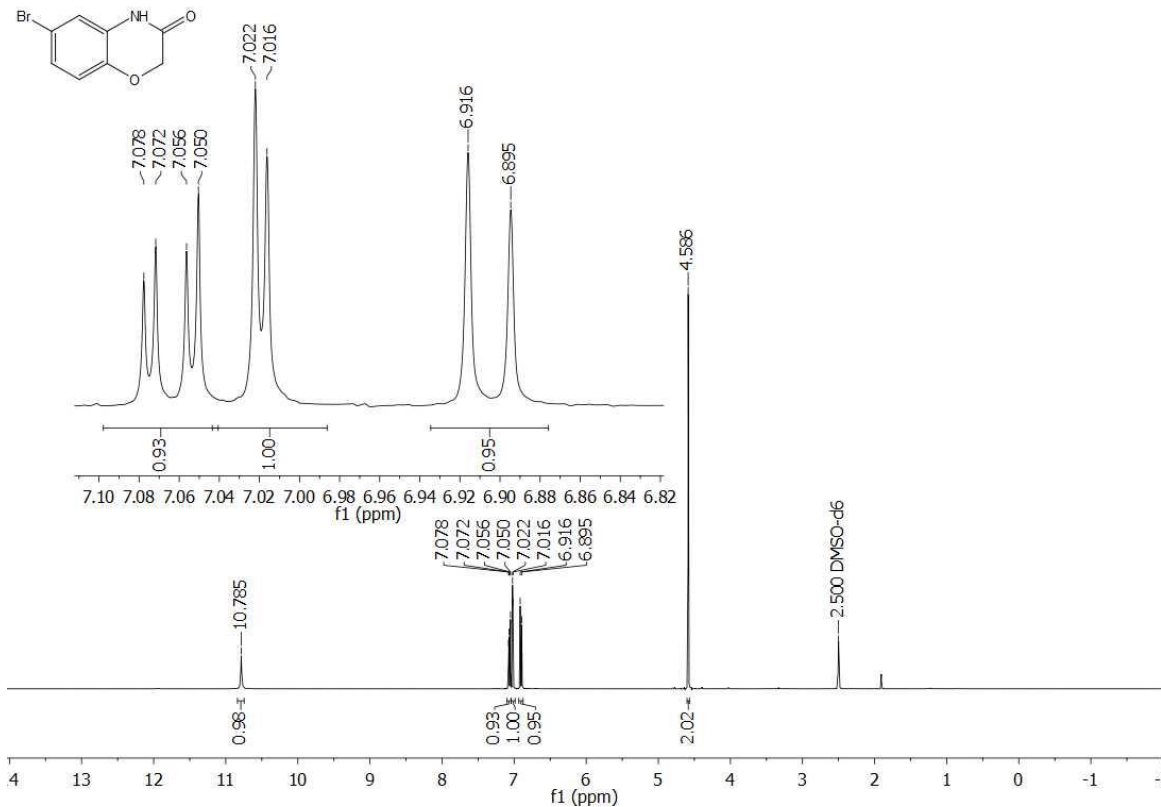
Espectro 2. RMN ¹³C (TMS, DMSO-d₆, 100 MHz, δ en ppm) del compuesto (4-bromo-2-nitrofenoxi)acetato de etilo (BXN2).



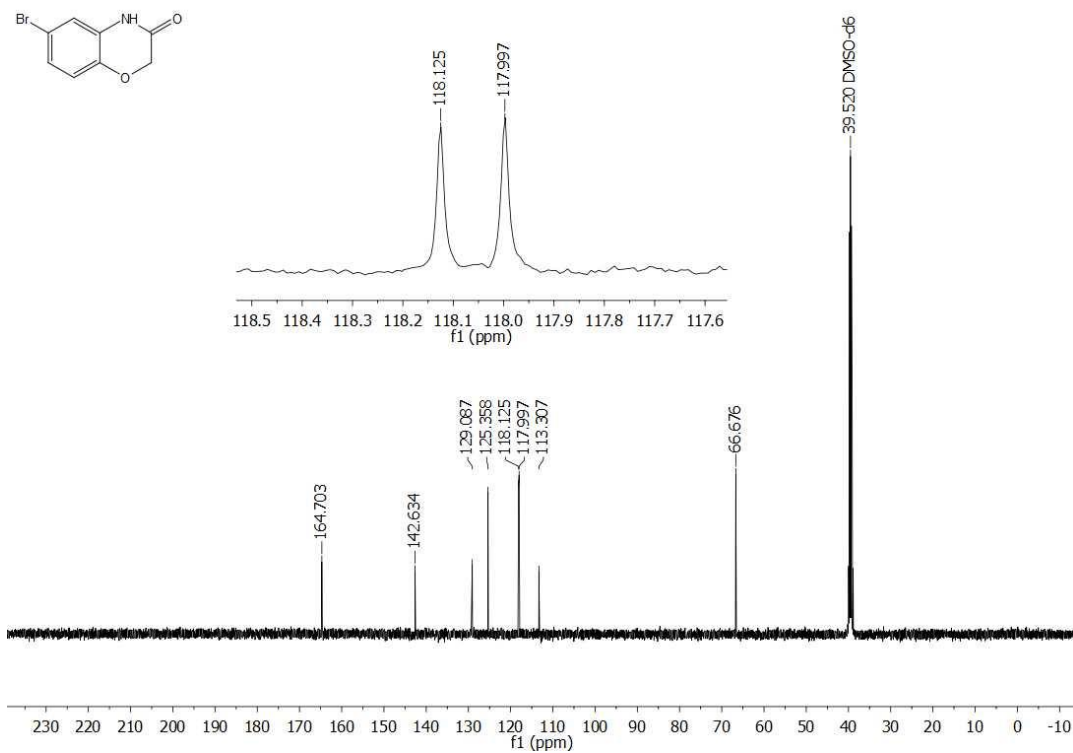
Espectro 3. IR (FTIR por reflectancia ATR, cm^{-1}) del compuesto (4-bromo-2-nitrofenoxi)acetato de etilo (**BXN2**).



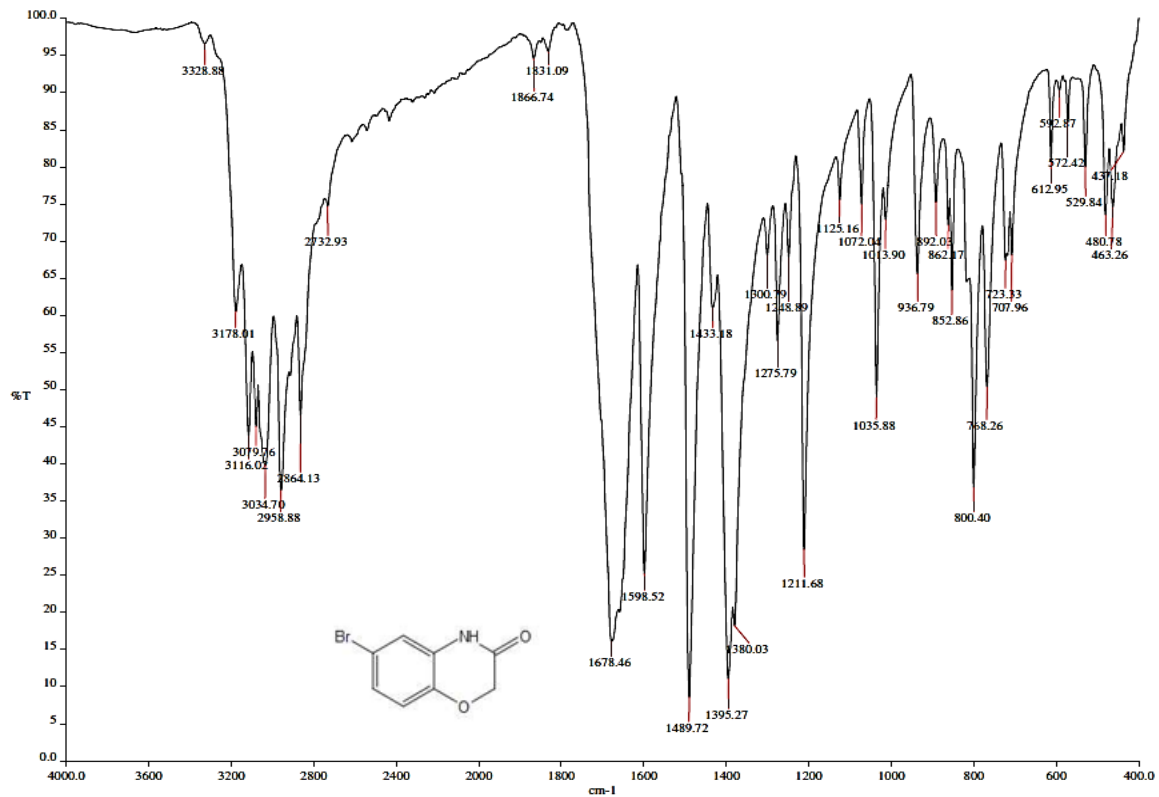
Espectro 4. EMAR (APCI, $[\text{M} + \text{H}]^+$, m/z) del compuesto (4-bromo-2-nitrofenoxi)acetato de etilo (**BXN2**).



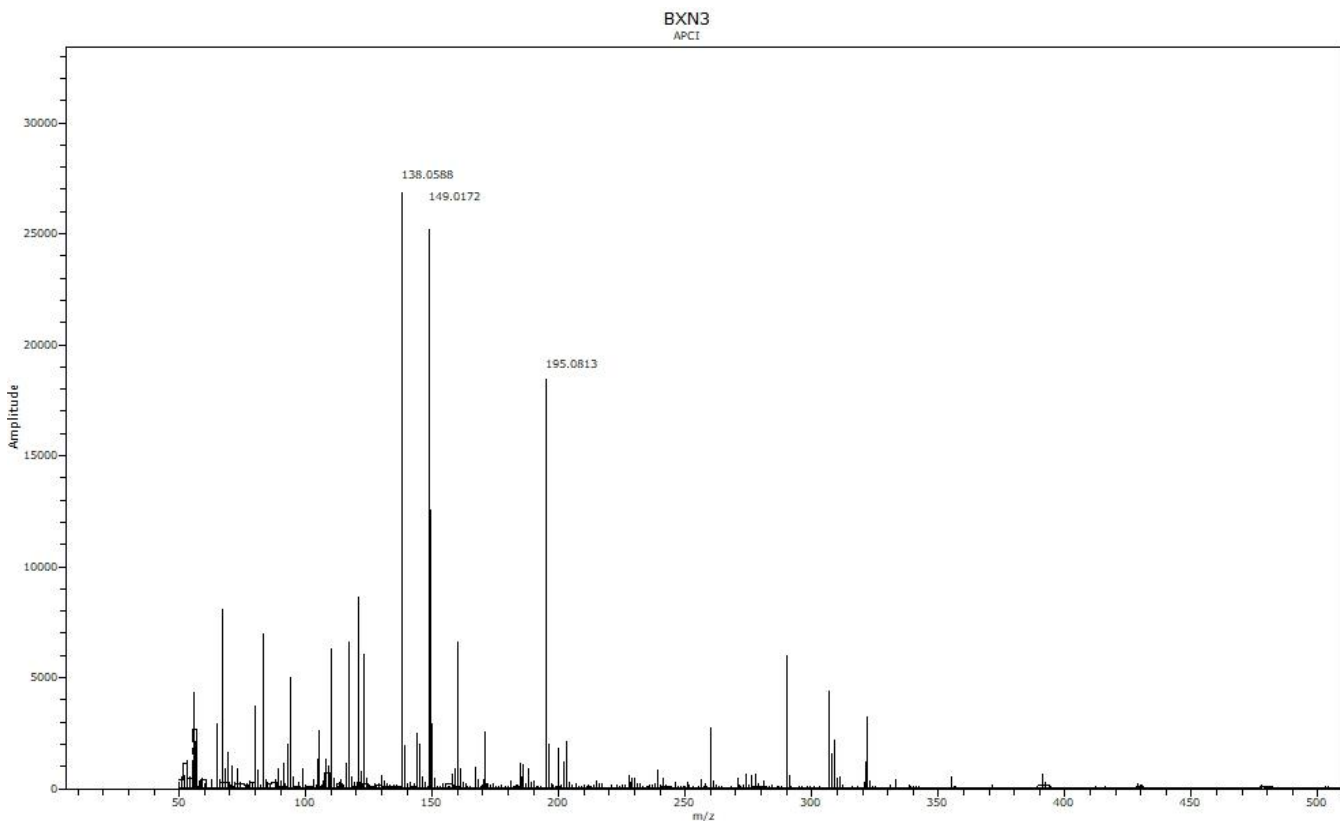
Espectro 5. RMN ¹H (TMS, DMSO-*d*₆, 400 MHz, δ en ppm) del compuesto 6-bromo-2H-1,4-benzoxazin-3-(4H)-ona (BXN3).



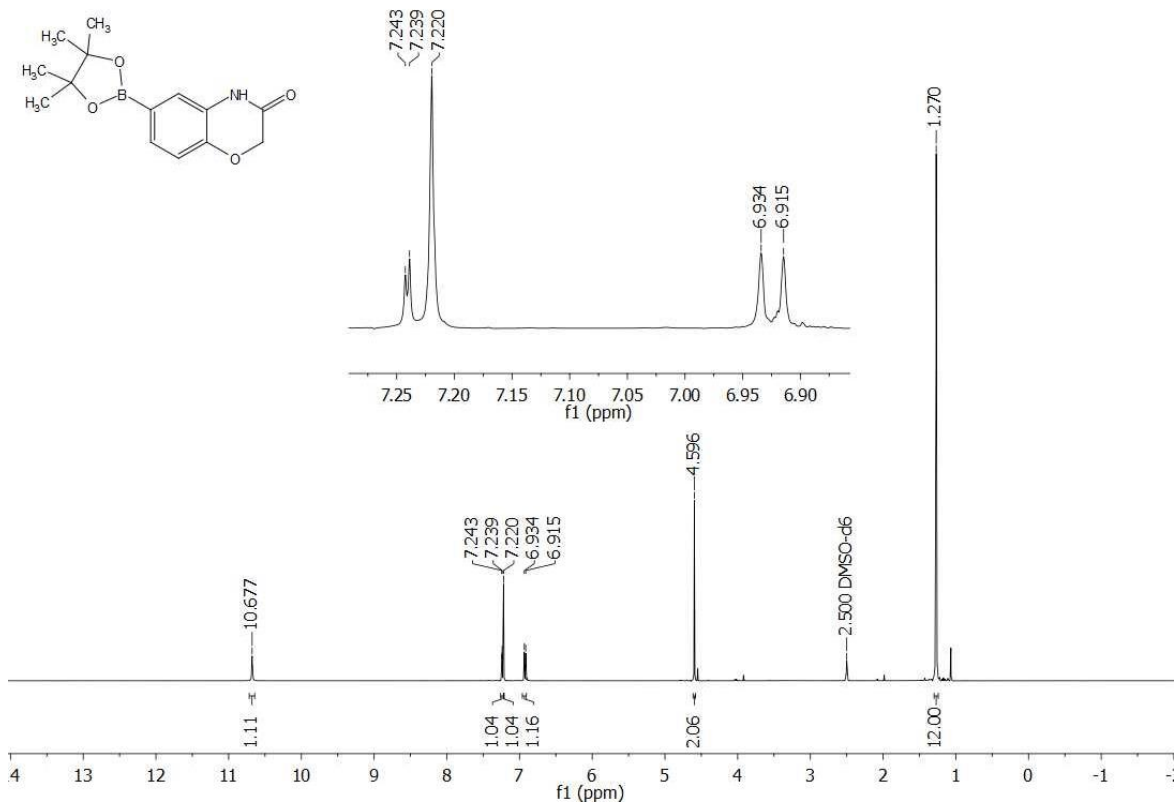
Espectro 6. RMN ¹³C (TMS, DMSO-*d*₆, 100 MHz, δ en ppm) del compuesto 6-bromo-2H-1,4-benzoxazin-3-(4H)-ona (BXN3).



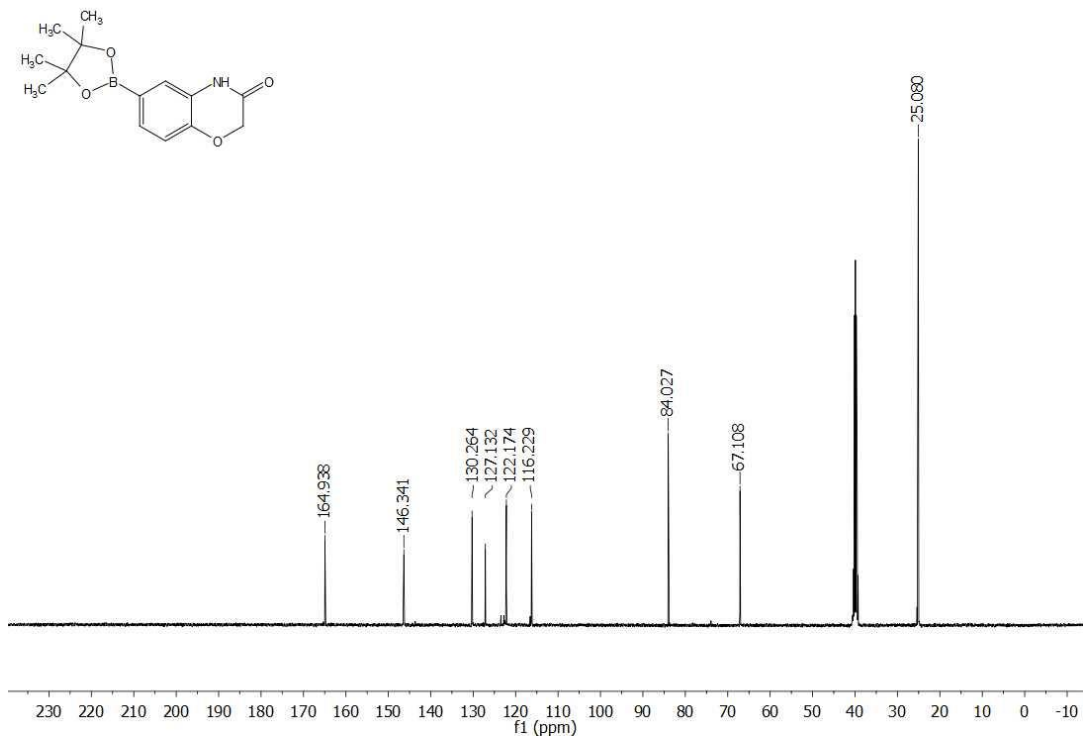
Espectro 7. IR (FTIR por reflectancia ATR, cm^{-1}) del compuesto 6-bromo-2H-1,4-benzoxazin-3-(4H)-ona (BXN3).



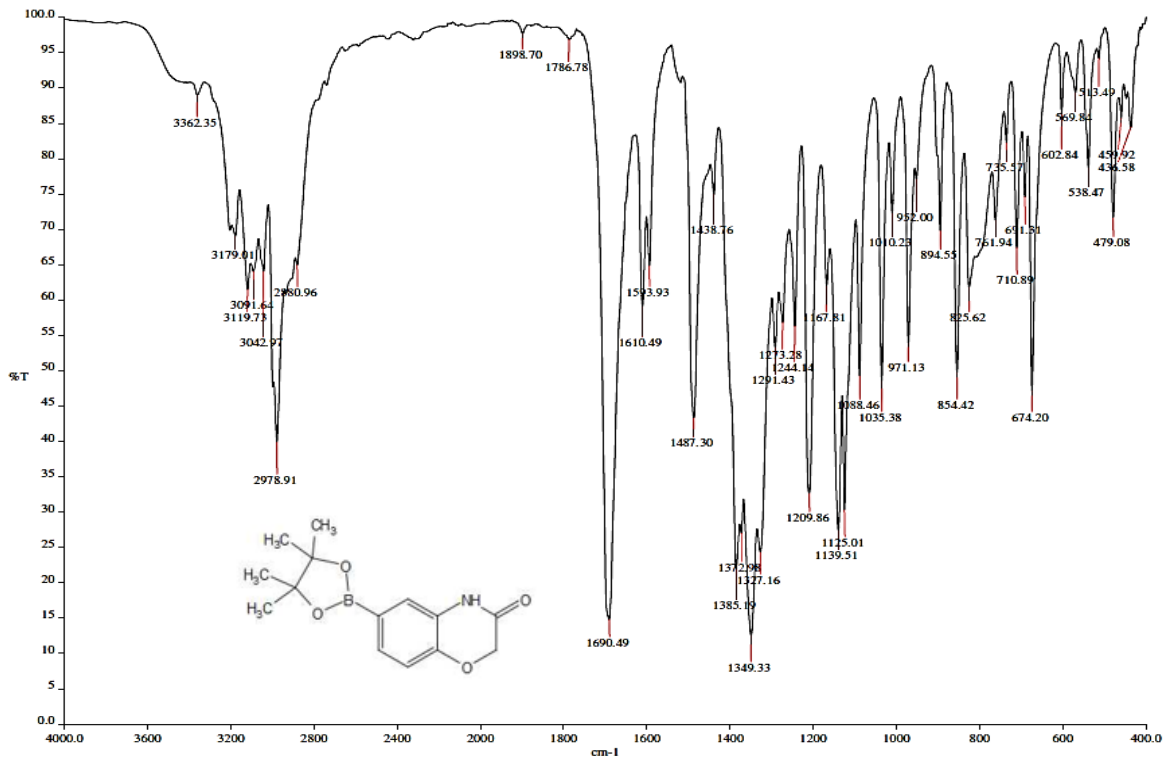
Espectro 8. EMAR (APCI, $[\text{M} + \text{H}]^+$, m/z) del compuesto 6-bromo-2H-1,4-benzoxazin-3-(4H)-ona (BXN3).



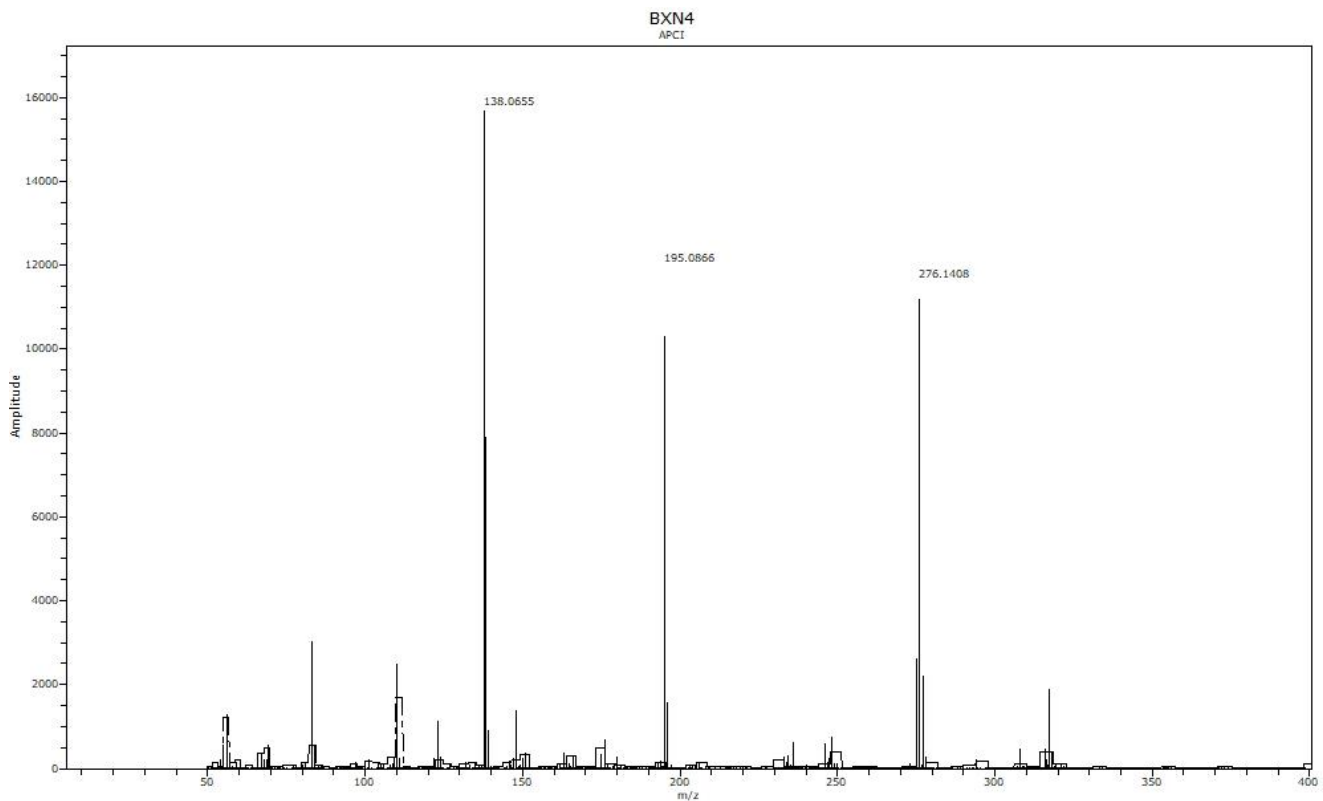
Espectro 9. RMN ¹H (TMS, DMSO-*d*₆, 400 MHz, δ en ppm) del compuesto 6-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona (**BXN4**).



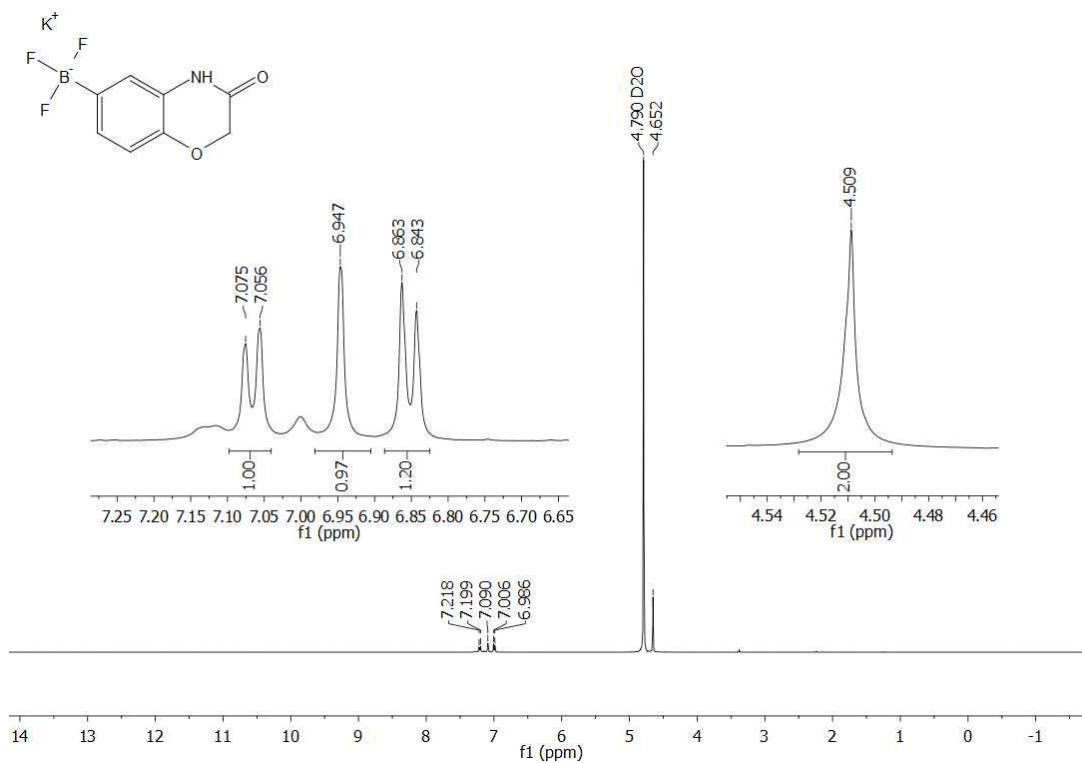
Espectro 10. RMN ¹³C (TMS, DMSO-*d*₆, 100 MHz, δ en ppm) del compuesto 6-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona (**BXN4**).



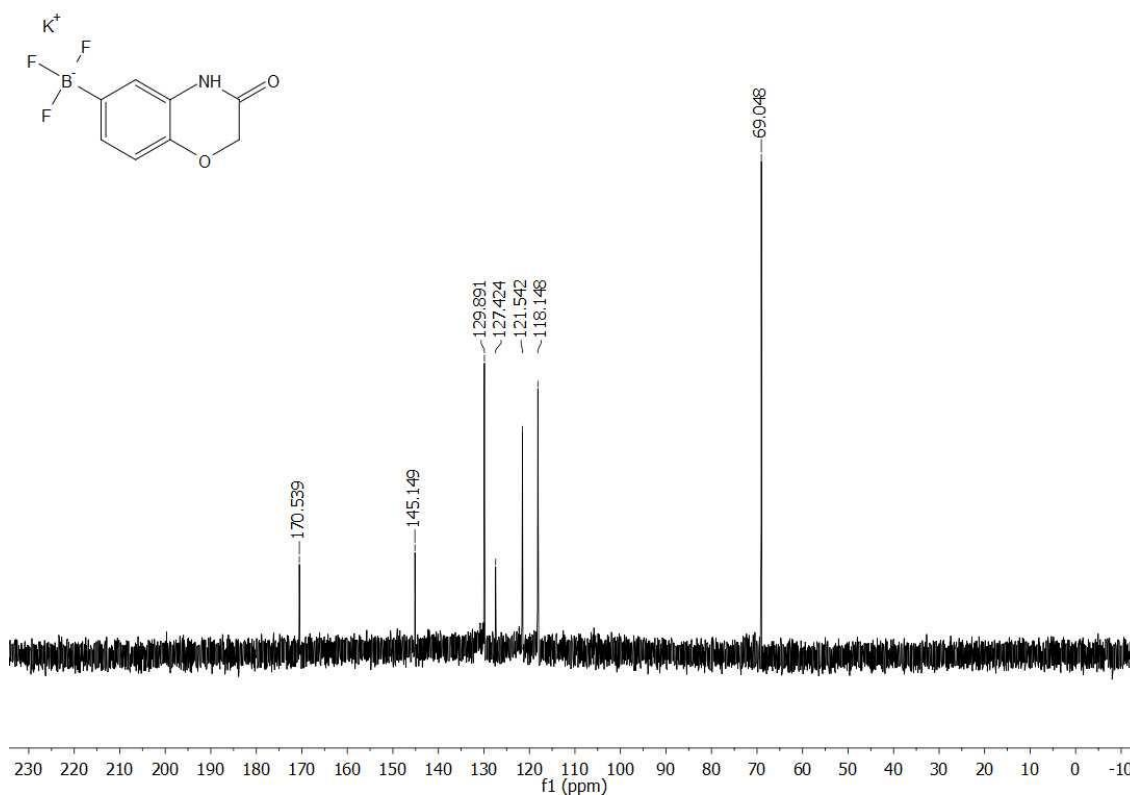
Espectro 11. IR (FTIR por reflectancia ATR, cm⁻¹) del compuesto 6-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona (**BXN4**).



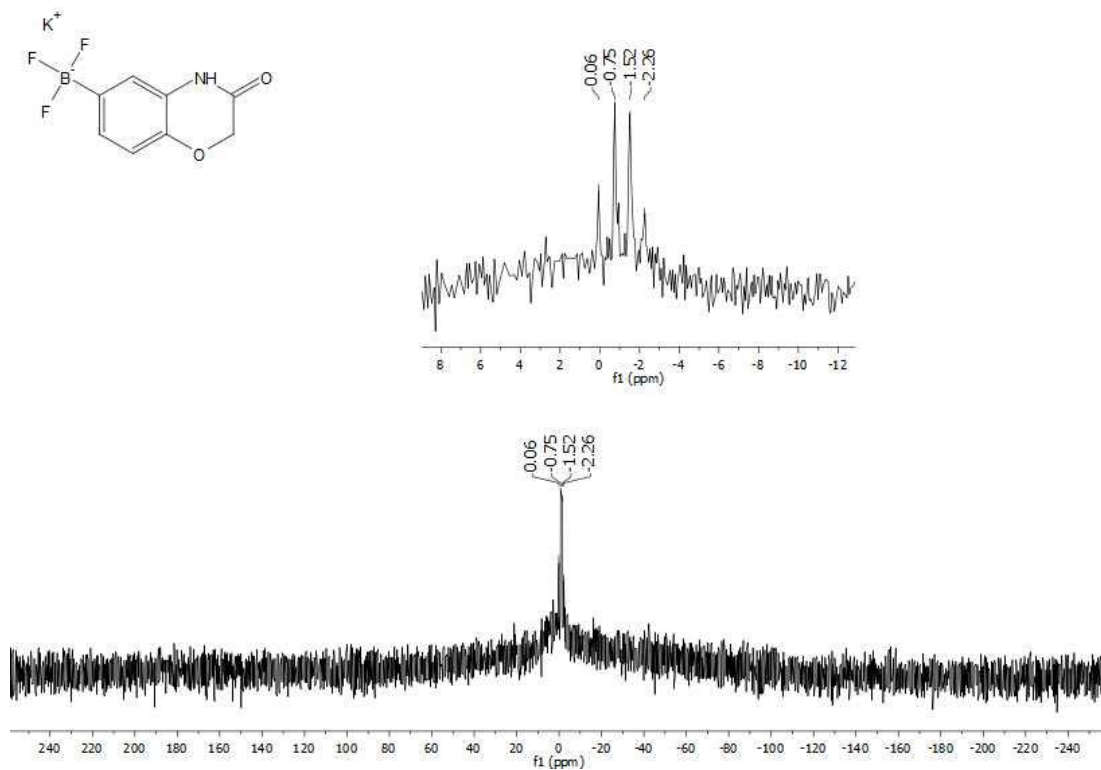
Espectro 12. EMAR (APCI, [M + H]⁺, m/z) del compuesto 6-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona (**BXN4**).



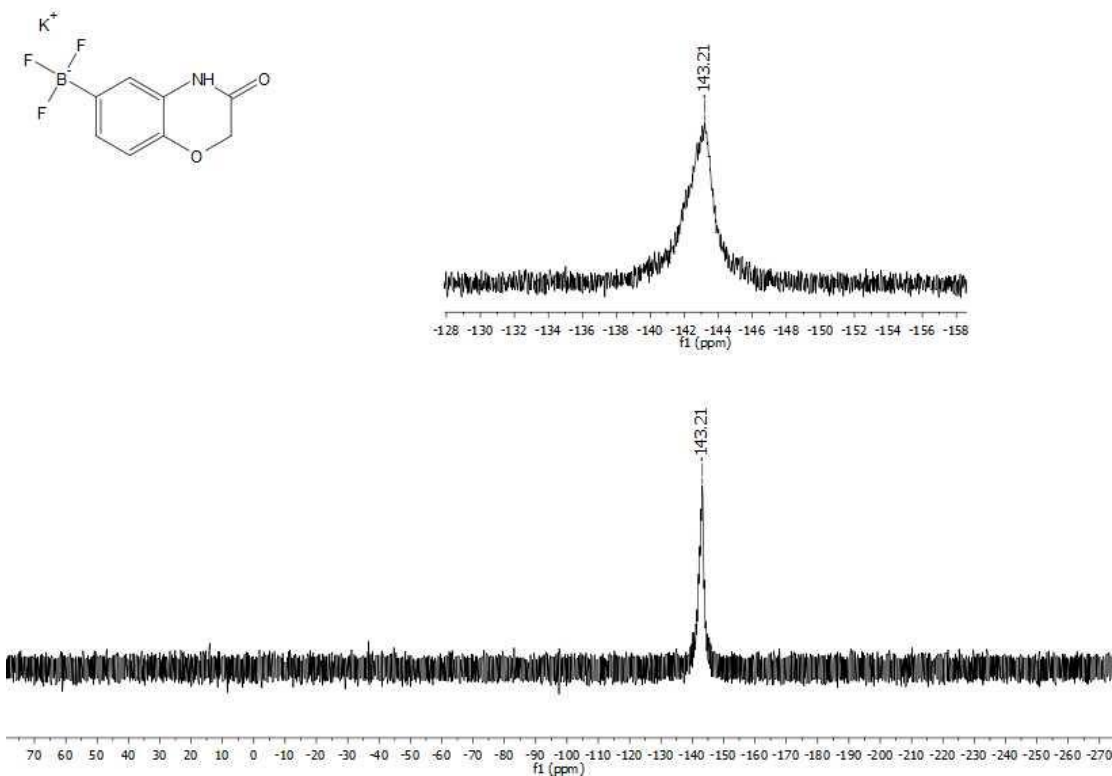
Espectro 13. RMN ¹H (TMS, D₂O, 400 MHz, δ en ppm) del compuesto trifluoro(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)borato de potasio (**BXN5**).



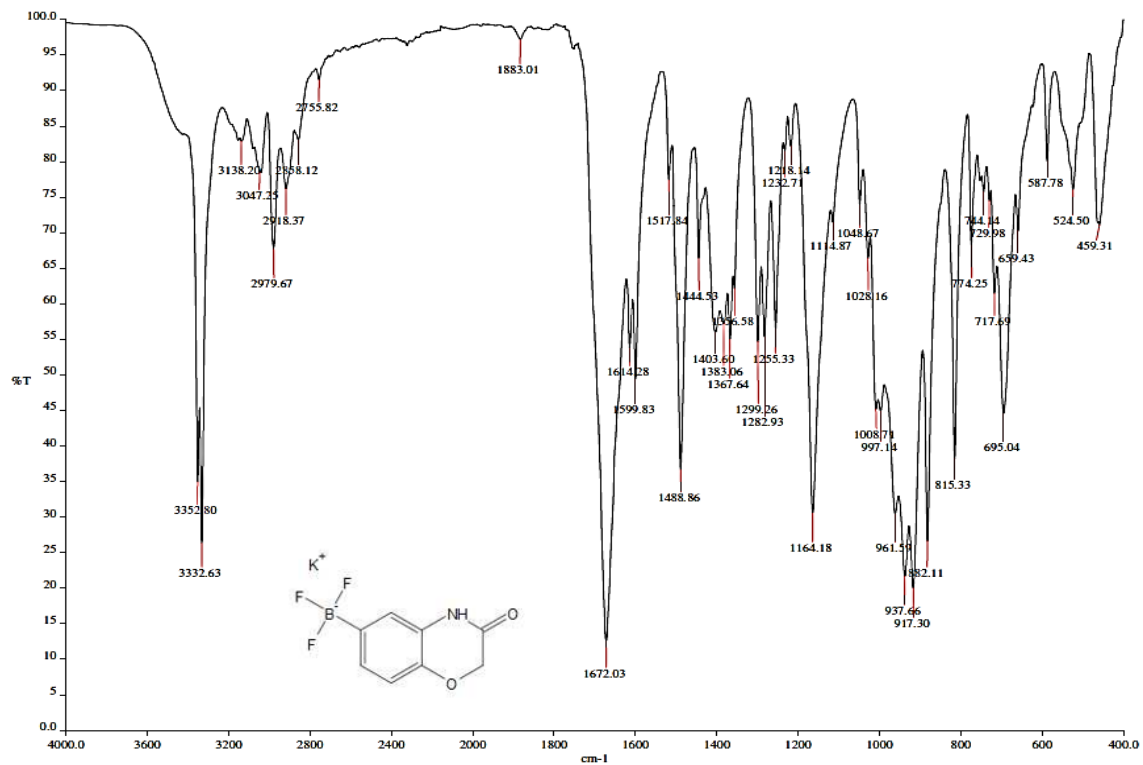
Espectro 14. RMN ¹³C (TMS, D₂O, 100 MHz, δ en ppm) del compuesto trifluoro(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)borato de potasio (**BXN5**).



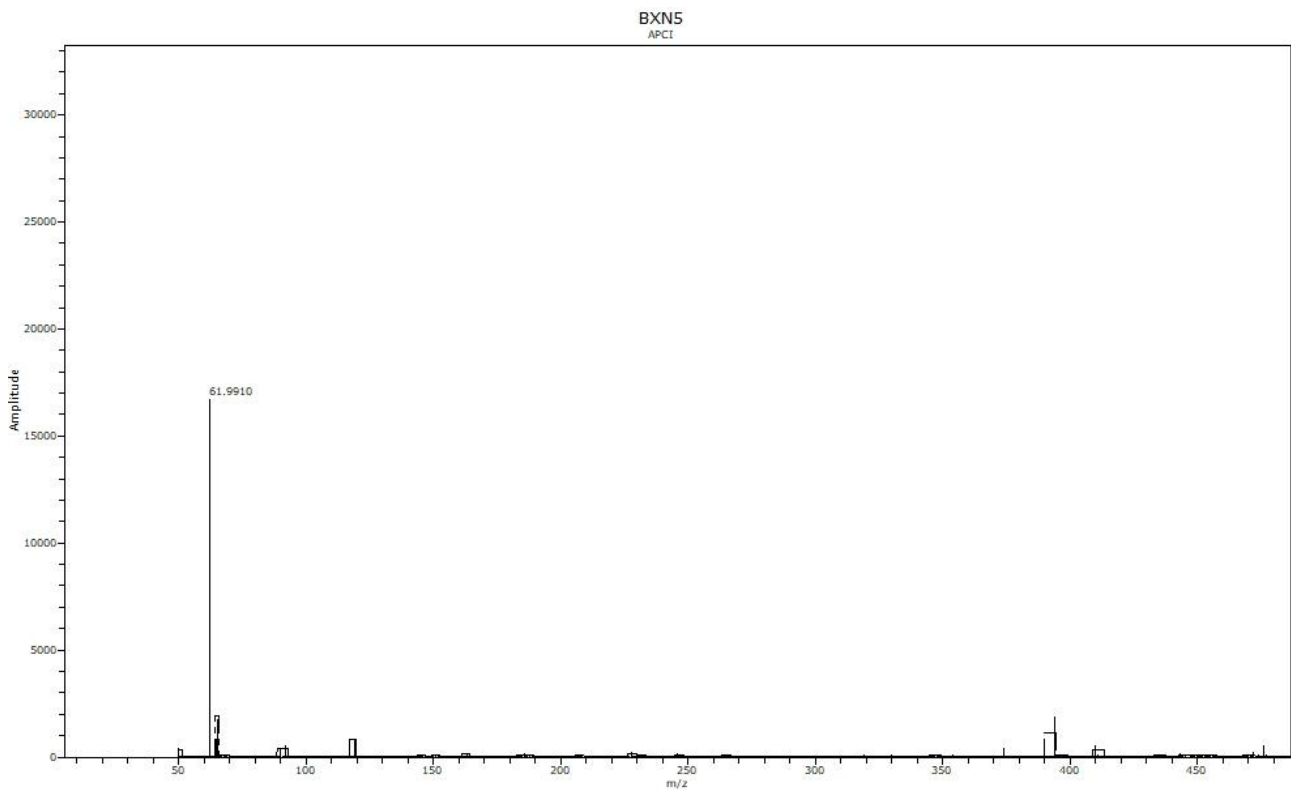
Espectro 15. RMN ^{11}B (D_2O , 96 MHz, δ en ppm) del compuesto trifluoro(3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-6-il)borato de potasio (**BXN5**).



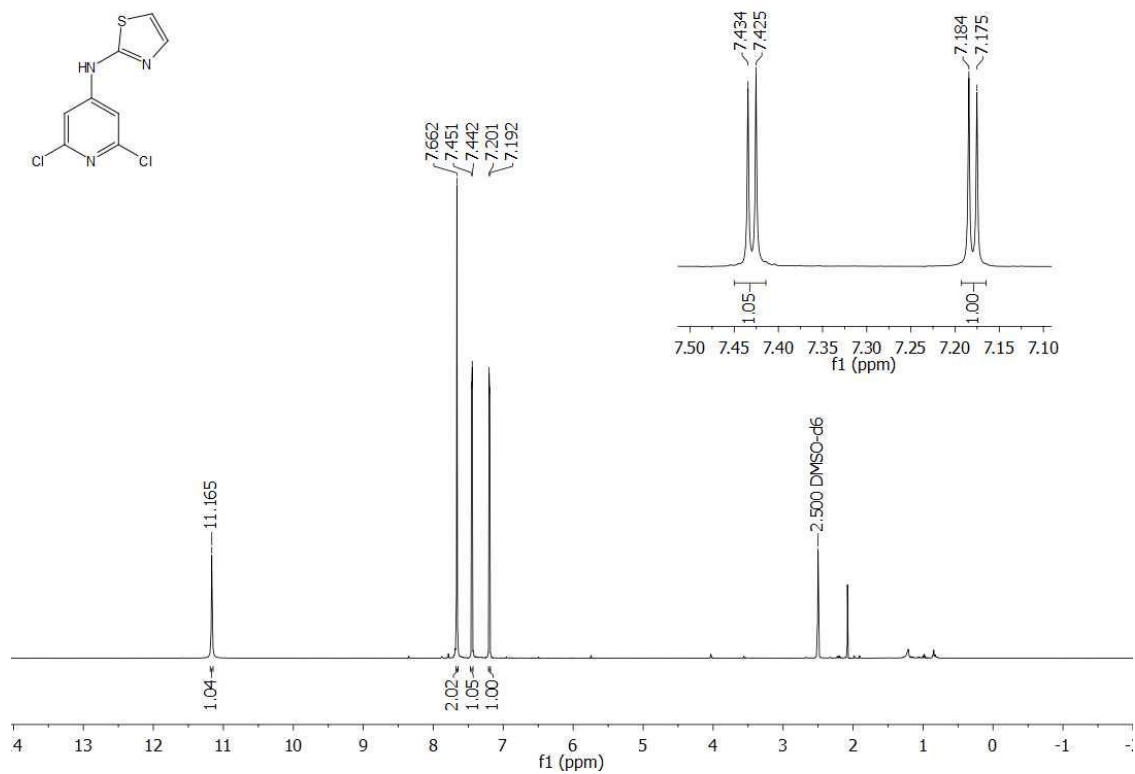
Espectro 16. RMN ^{19}F (D_2O , 282 MHz, δ en ppm) del compuesto trifluoro(3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-6-il)borato de potasio (**BXN5**).



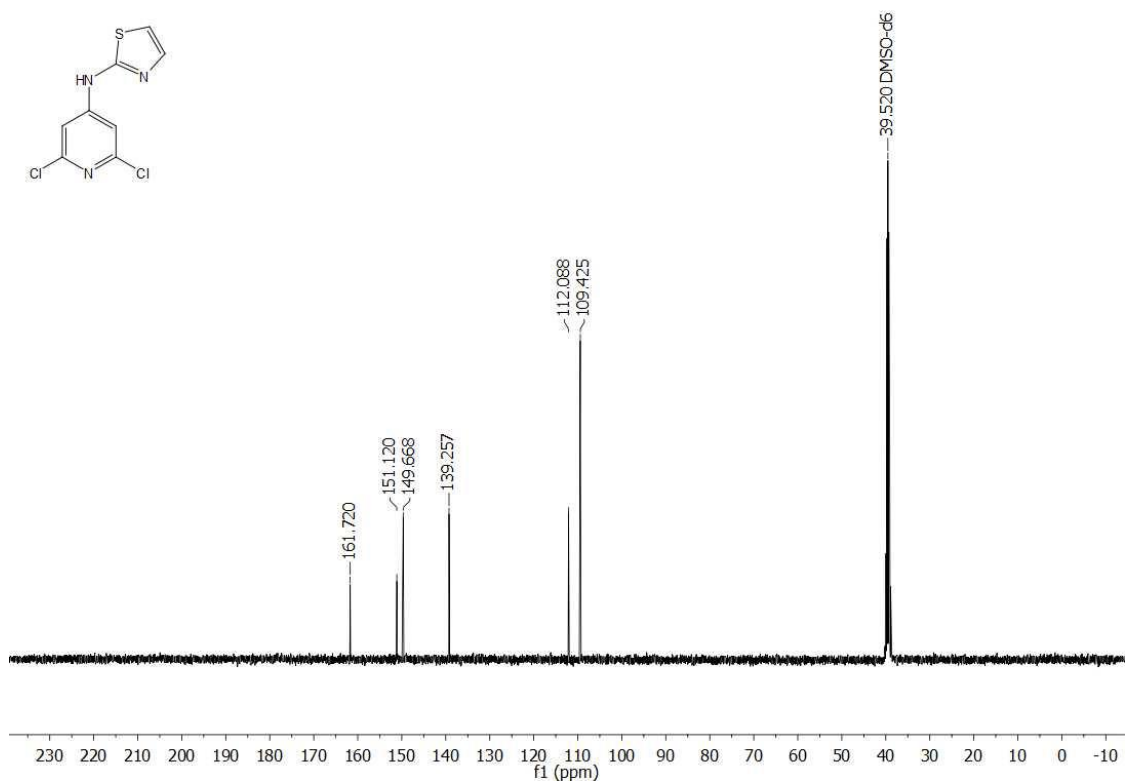
Espectro 17. IR (FTIR por reflectancia ATR, cm⁻¹) del compuesto trifluoro(3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-6-il)borato de potasio (**BXN5**).



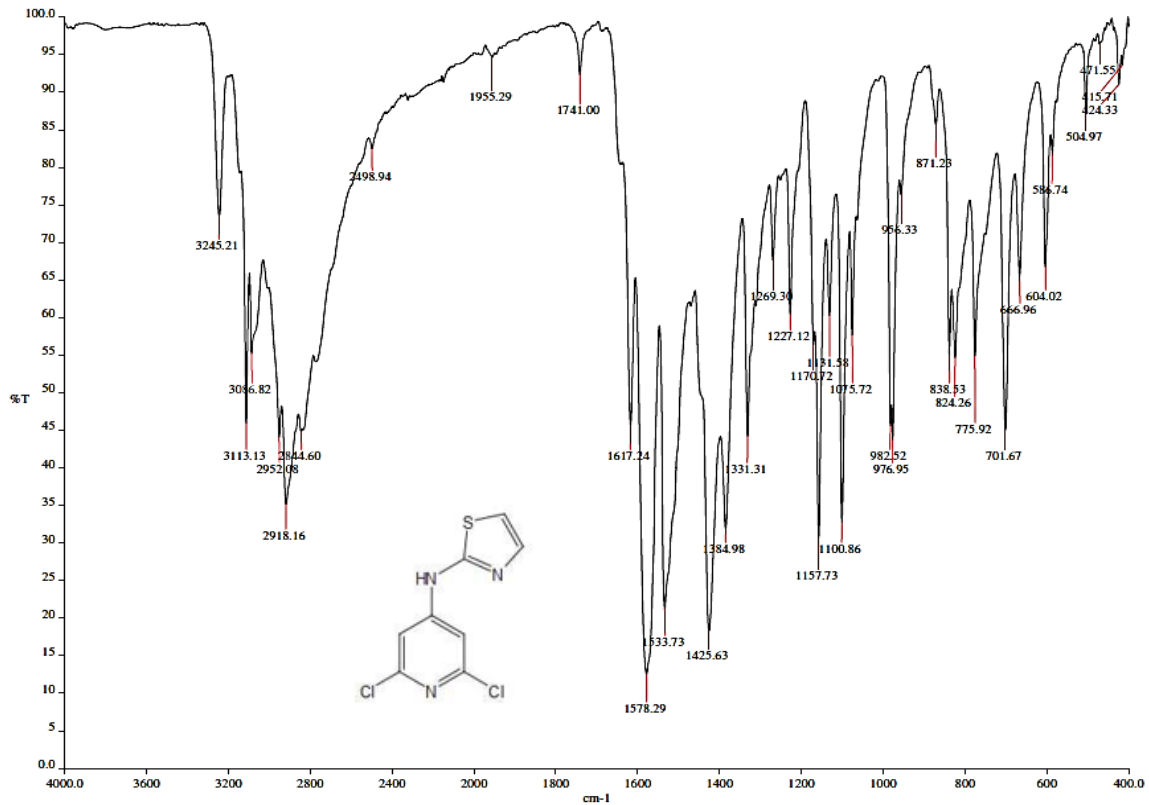
Espectro 18. EMAR (APCI, [M - K]⁺; m/z) del compuesto trifluoro(3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-6-il)borato de potasio (**BXN5**).



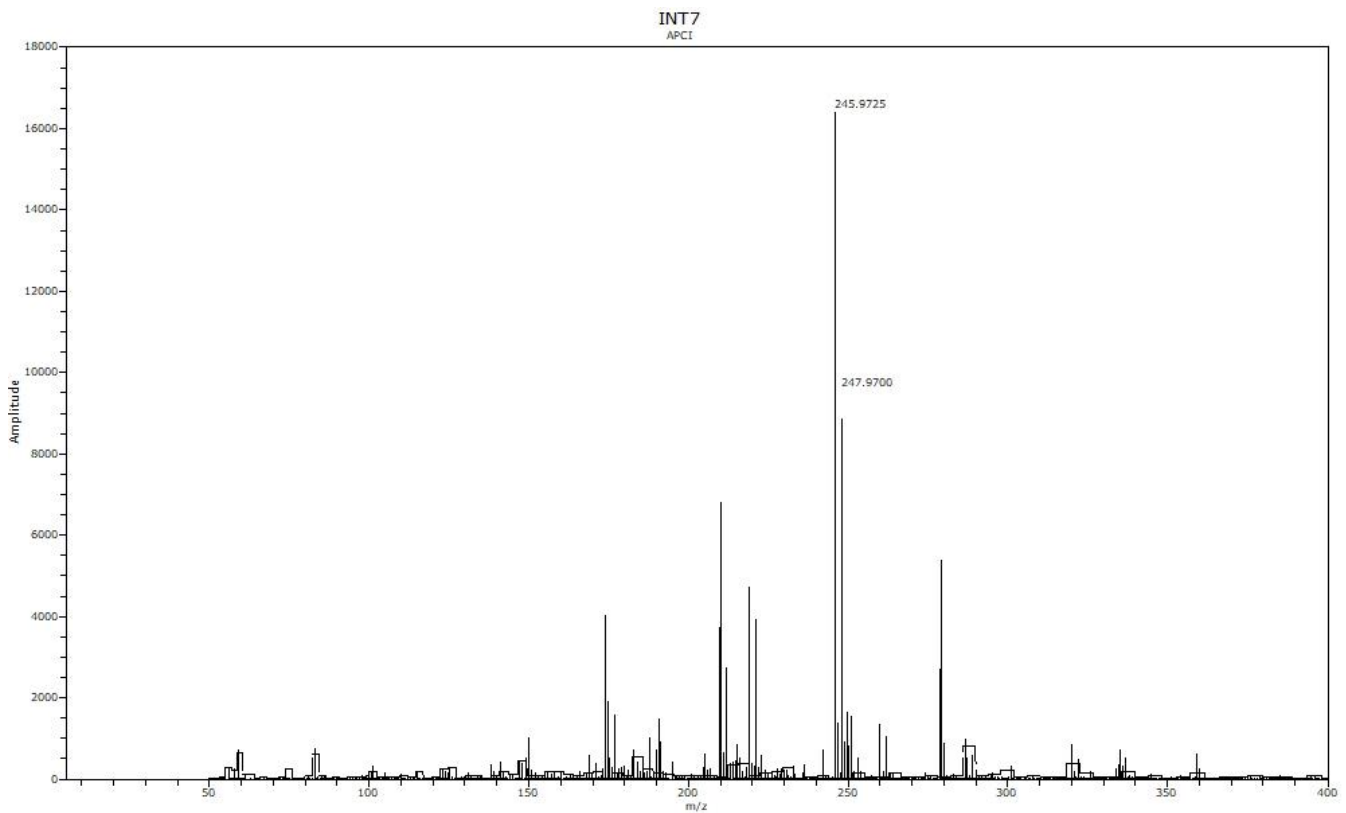
Espectro 19. RMN ¹H (TMS, DMSO-*d*₆, 400 MHz, δ en ppm) del compuesto 4-amino-*N*-(1,3-tiazol-2-il)-2,6-dicloropiridina (INT1).



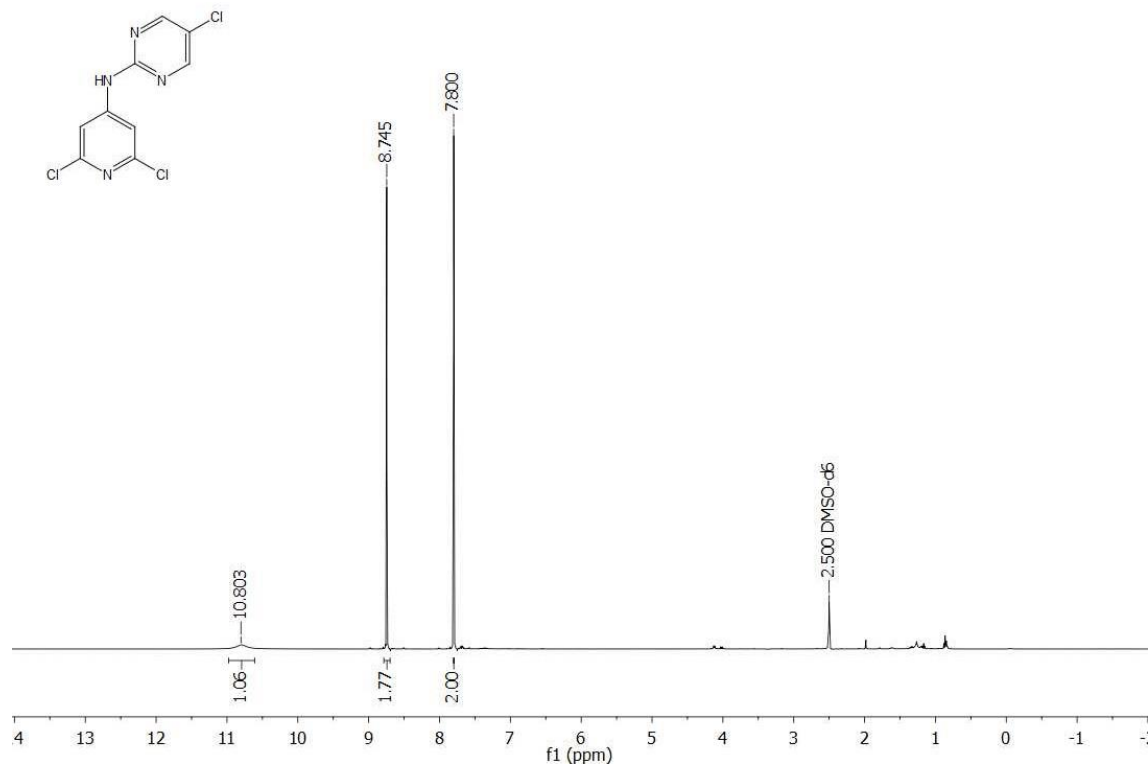
Espectro 20. RMN ¹³C (TMS, DMSO-*d*₆, 100 MHz, δ en ppm) del compuesto 4-amino-*N*-(1,3-tiazol-2-il)-2,6-dicloropiridina (INT1).



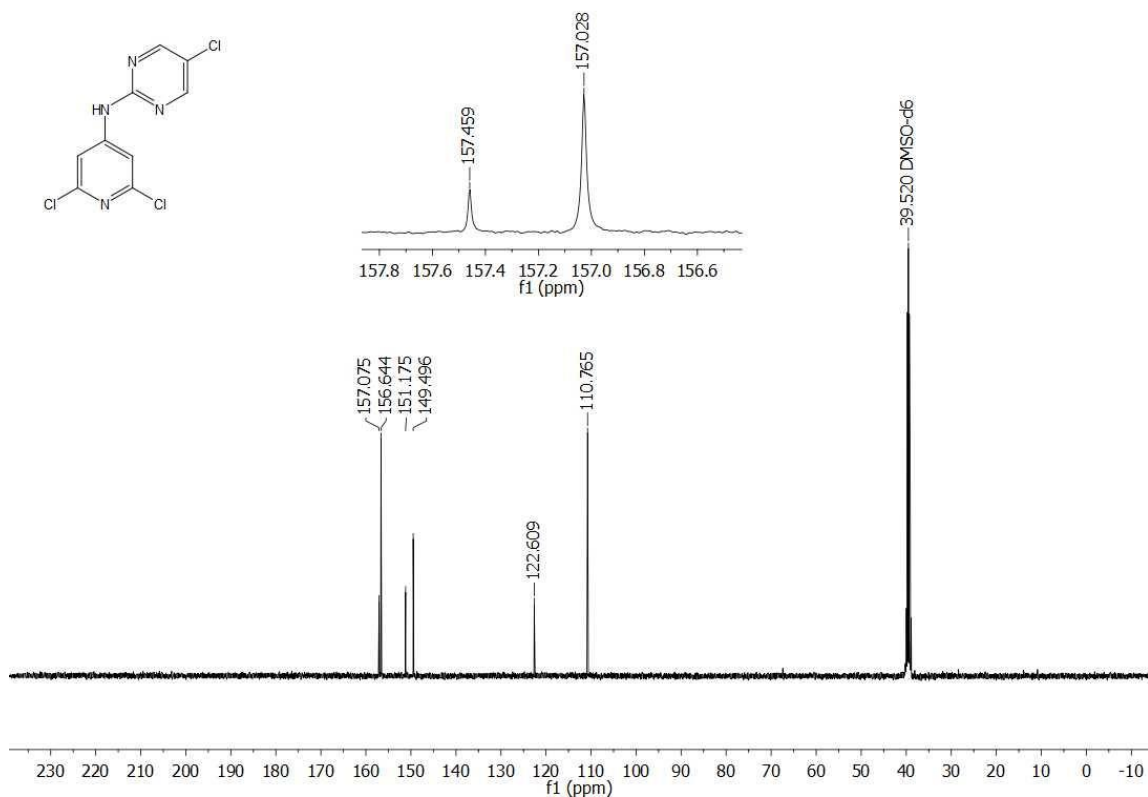
Espectro 21. IR (FTIR por reflectancia ATR, cm⁻¹) del compuesto 4-amino-*N*-(1,3-tiazol-2-il)-2,6-dicloropiridina (**INT1**).



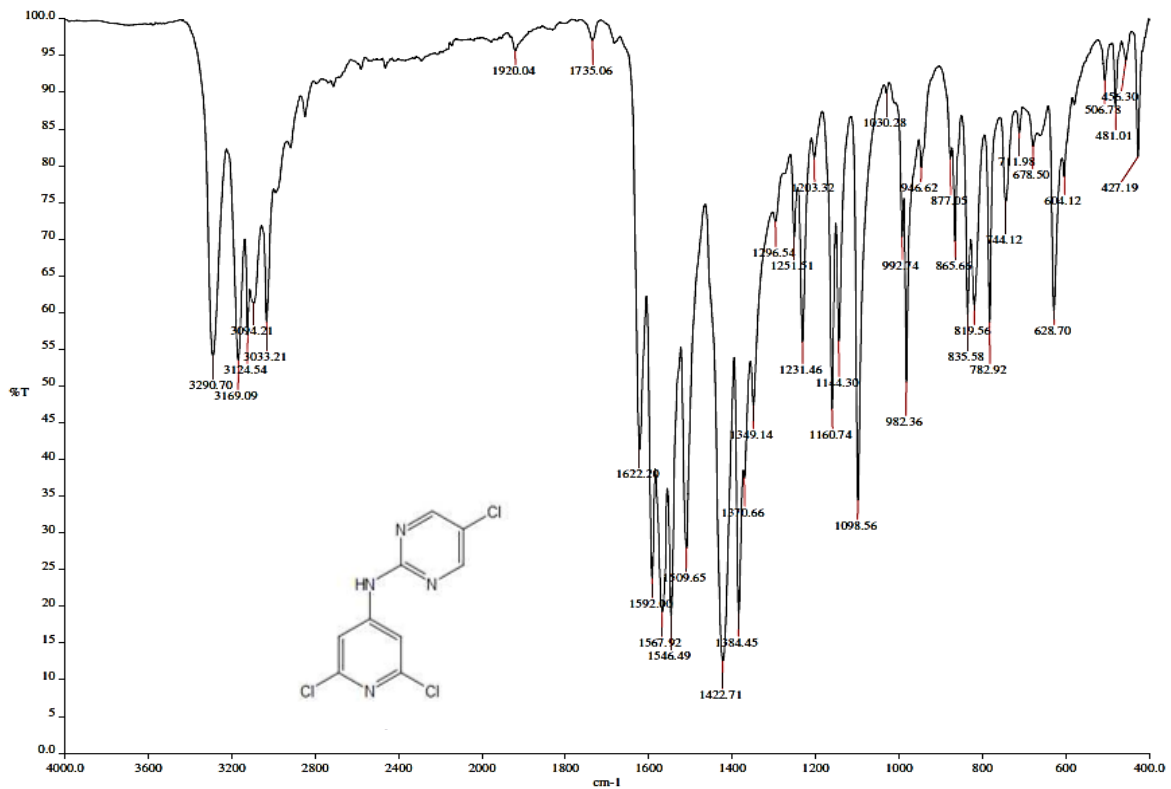
Espectro 23. EMAR (APCI, [M + H]⁺, *m/z*) del compuesto 4-amino-*N*-(1,3-tiazol-2-il)-2,6-dicloropiridina (**INT1**).



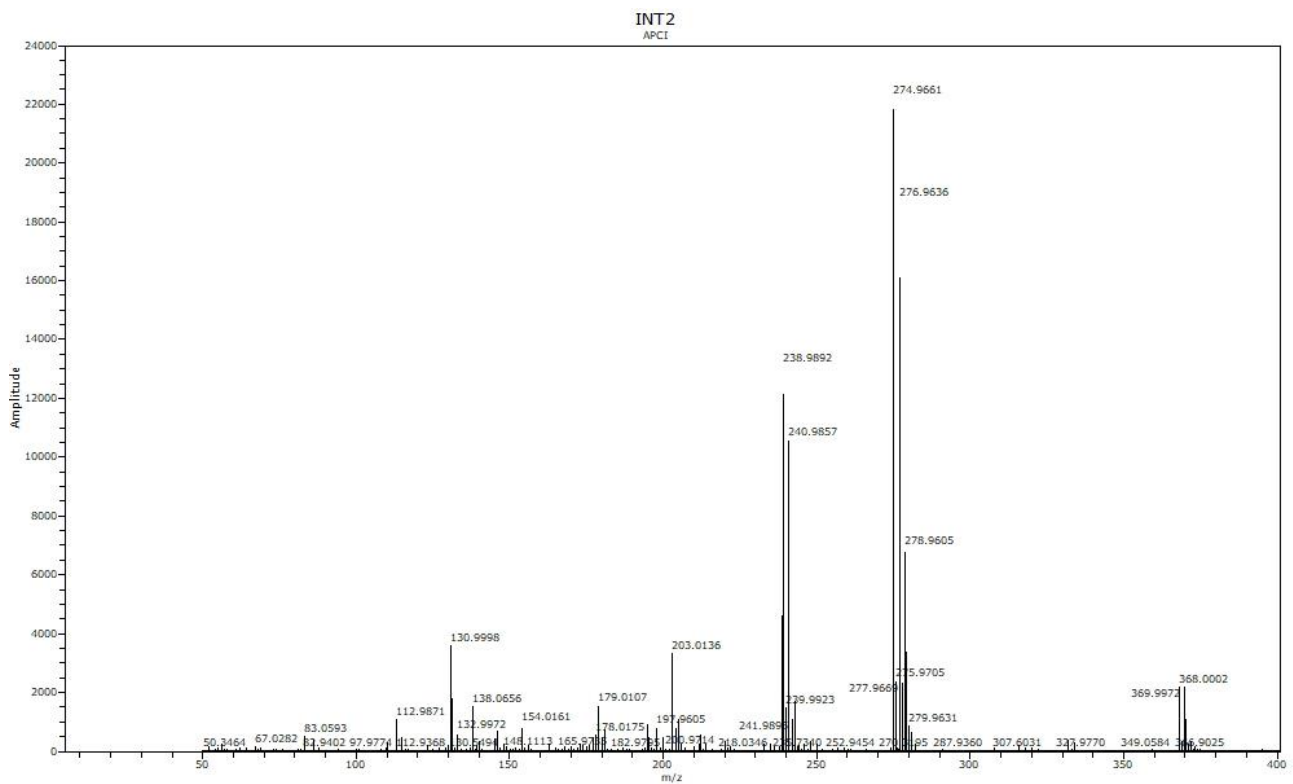
Espectro 23. RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆, 400 MHz, δ en ppm) del compuesto 2-amino-N-(2,6-dicloropiridin-4-il)-5-cloropirimidina (**INT2**).



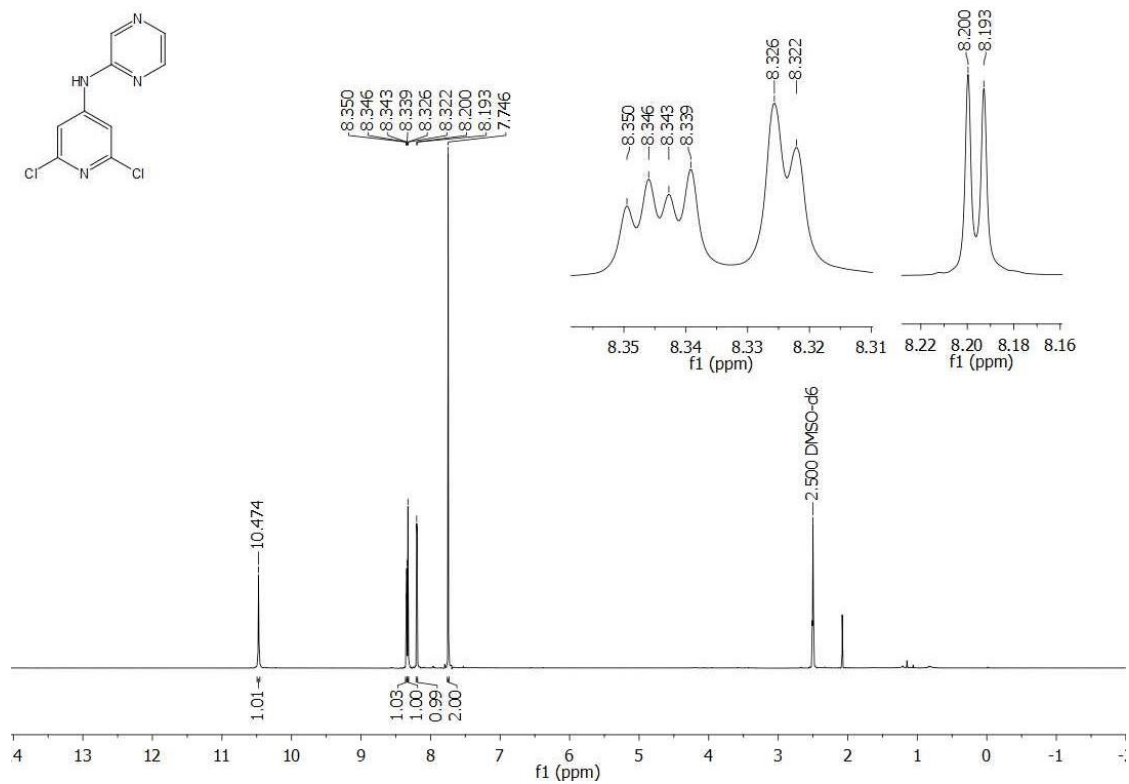
Espectro 24. RMN ¹³C (TMS, DMSO-d₆, 100 MHz, δ en ppm) del compuesto 2-amino-N-(2,6-dicloropiridin-4-il)-5-cloropirimidina (**INT2**).



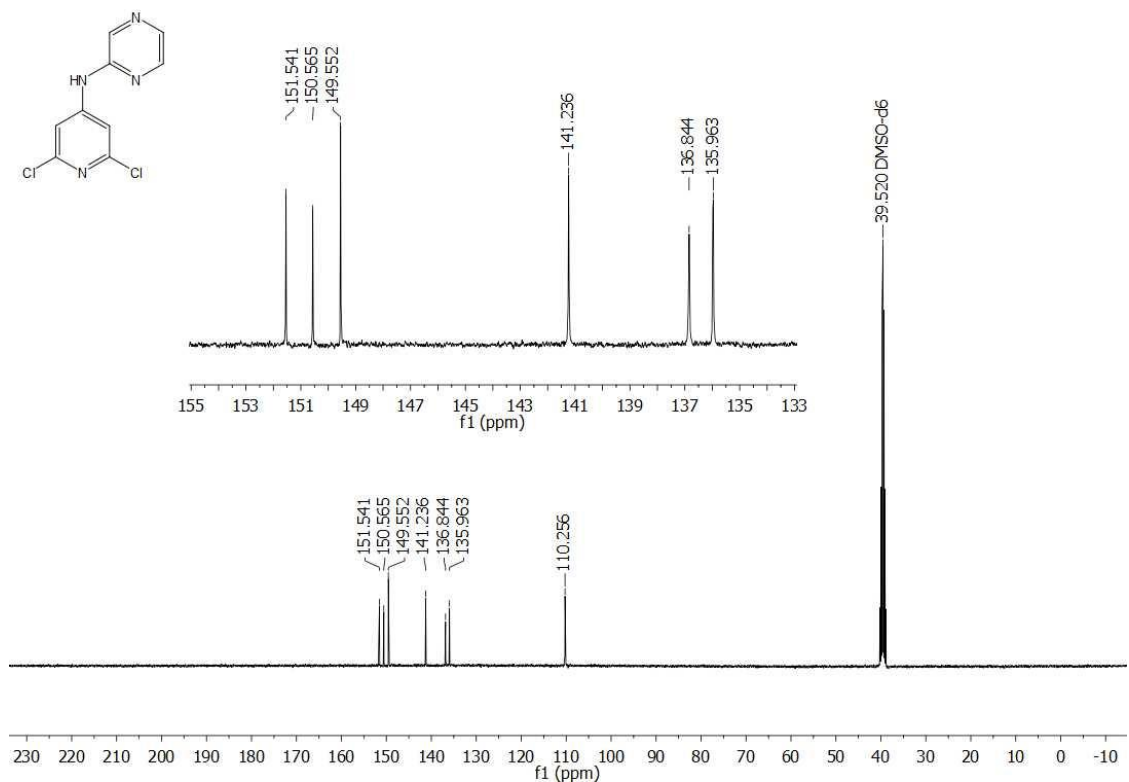
Espectro 25. IR (FTIR por reflectancia ATR, cm⁻¹) del compuesto 2-amino-*N*-(2,6-dicloropiridin-4-il)-5-cloropirimidina (INT2).



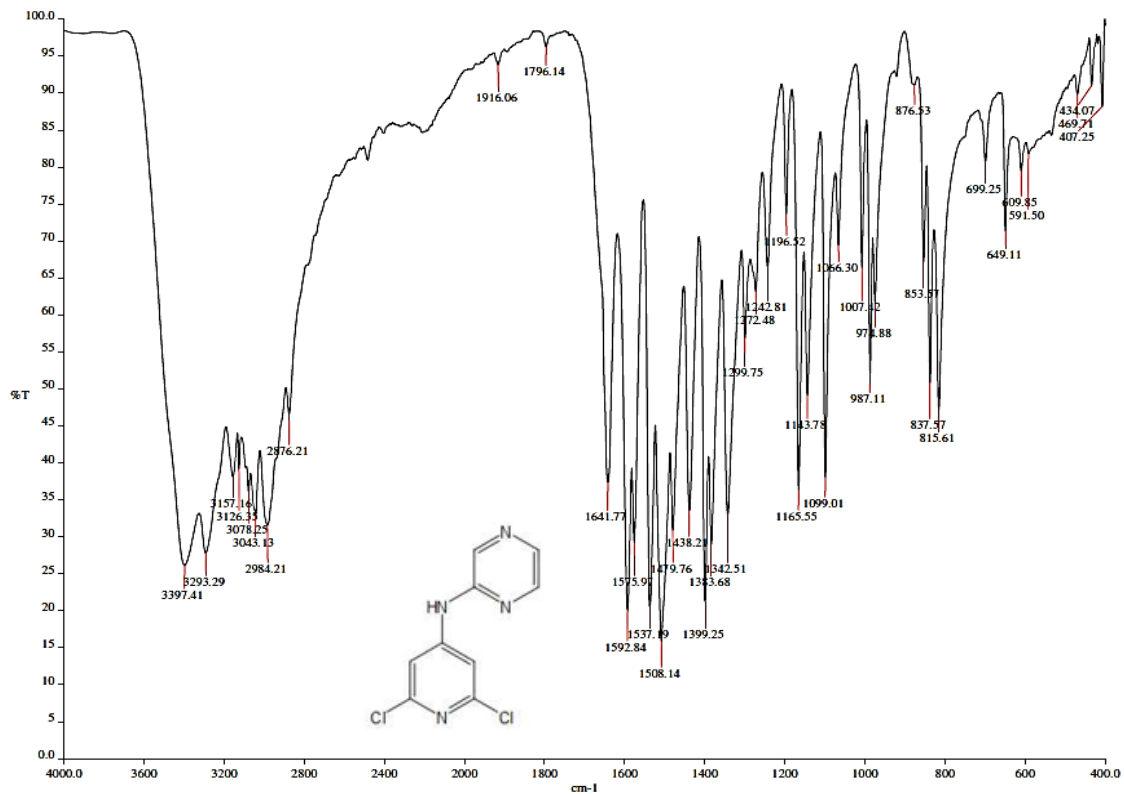
Espectro 26. EMAR (APCI, [M + H]⁺, *m/z*) del compuesto 2-amino-*N*-(2,6-dicloropiridin-4-il)-5-cloropirimidina (INT2).



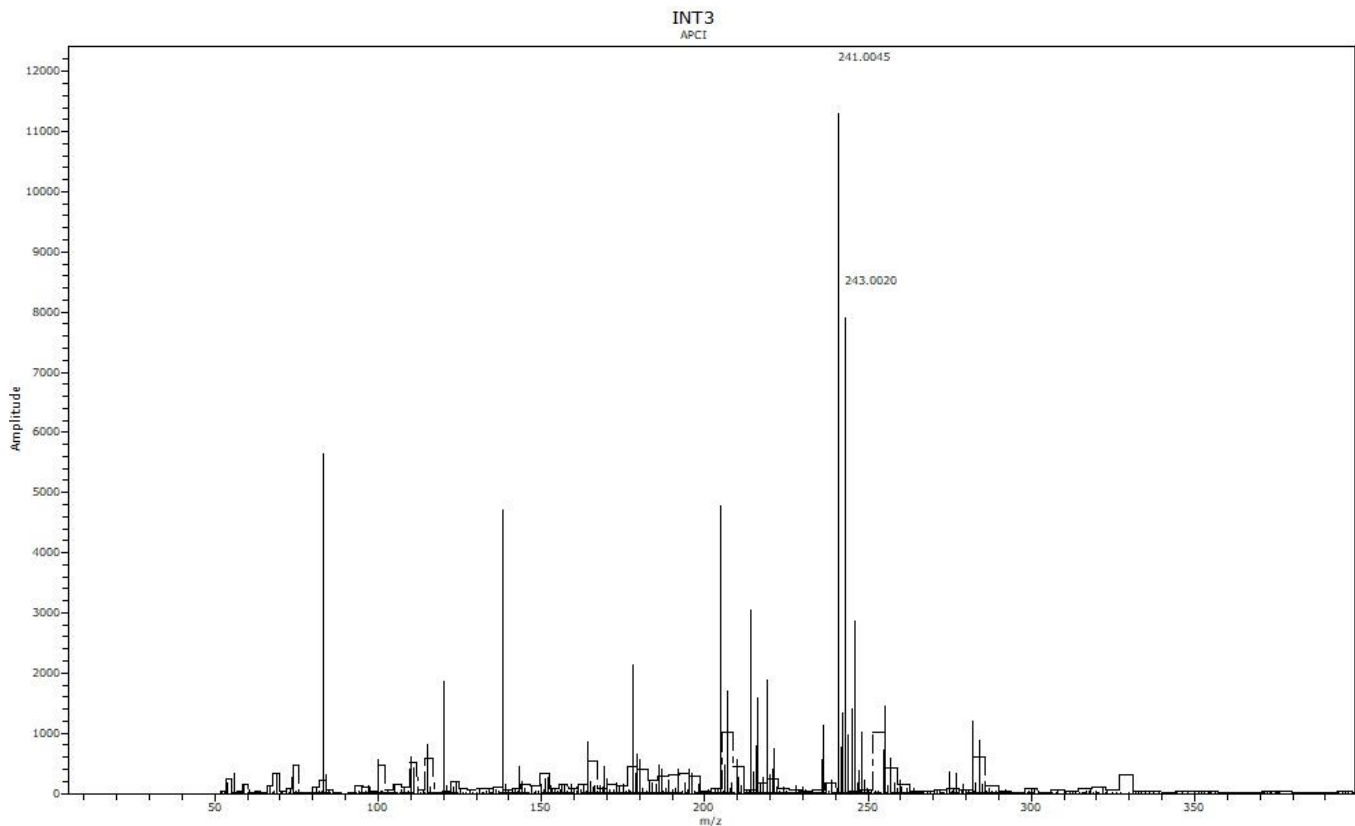
Espectro 27. RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆, 400 MHz, δ en ppm) del compuesto 2-amino-*N*-(2,6-dicloropiridin-4-il)pirazina (INT3).



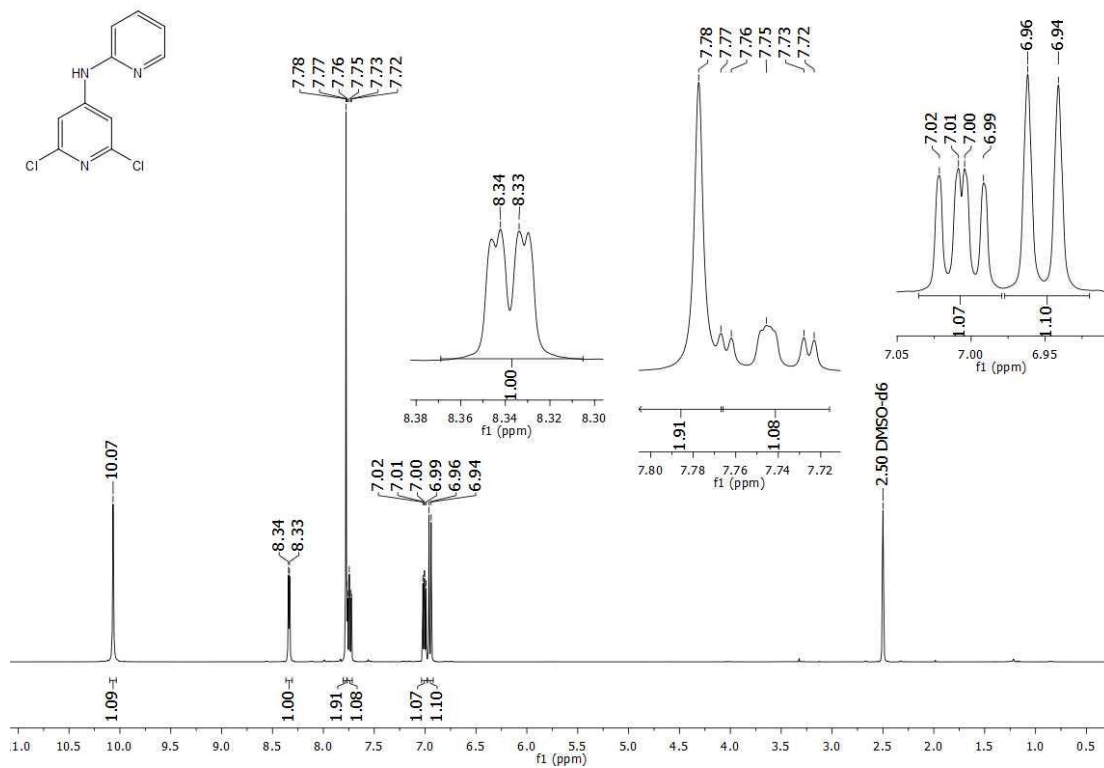
Espectro 28. RMN ¹³C (TMS, DMSO-d₆, 100 MHz, δ en ppm) del compuesto 2-amino-*N*-(2,6-dicloropiridin-4-il)pirazina (INT3).



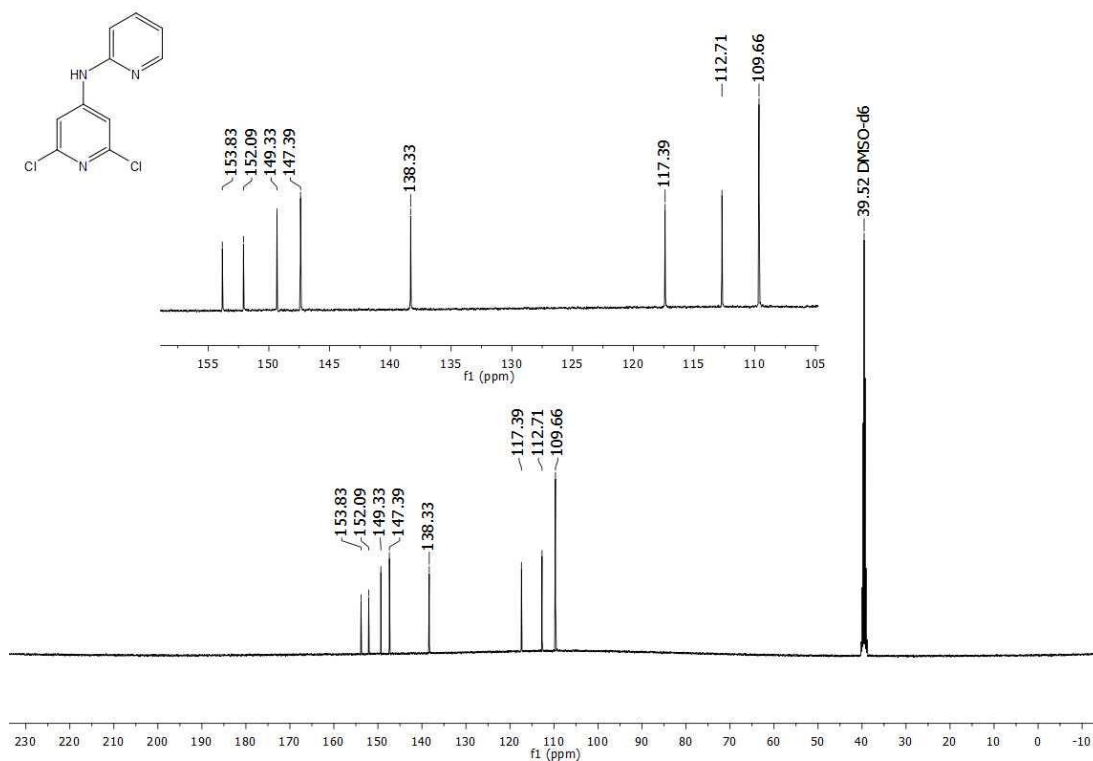
Espectro 29. IR (FTIR por reflectancia ATR, cm⁻¹) del compuesto 2-amino-*N*-(2,6-dicloropiridin-4-il)pirazina (**INT3**).



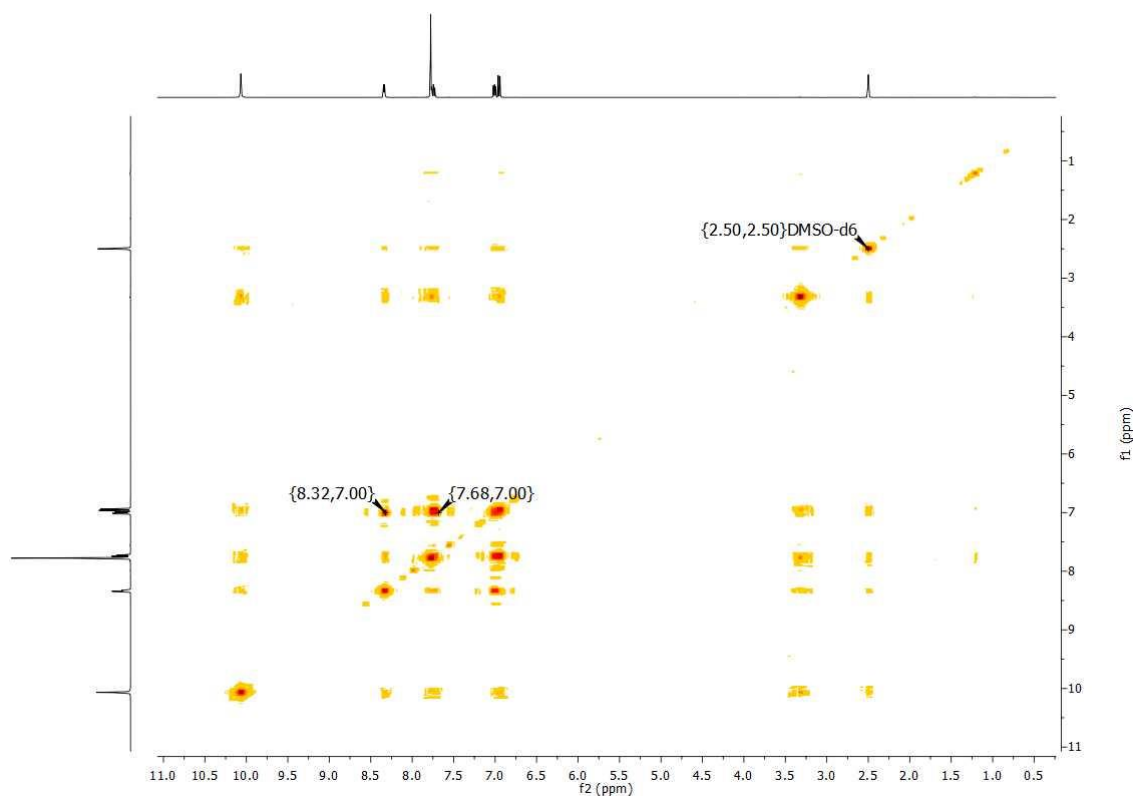
Espectro 30. EMAR (APCI, [M + H]⁺, *m/z*) del compuesto 2-amino-*N*-(2,6-dicloropiridin-4-il)pirazina (**INT3**).



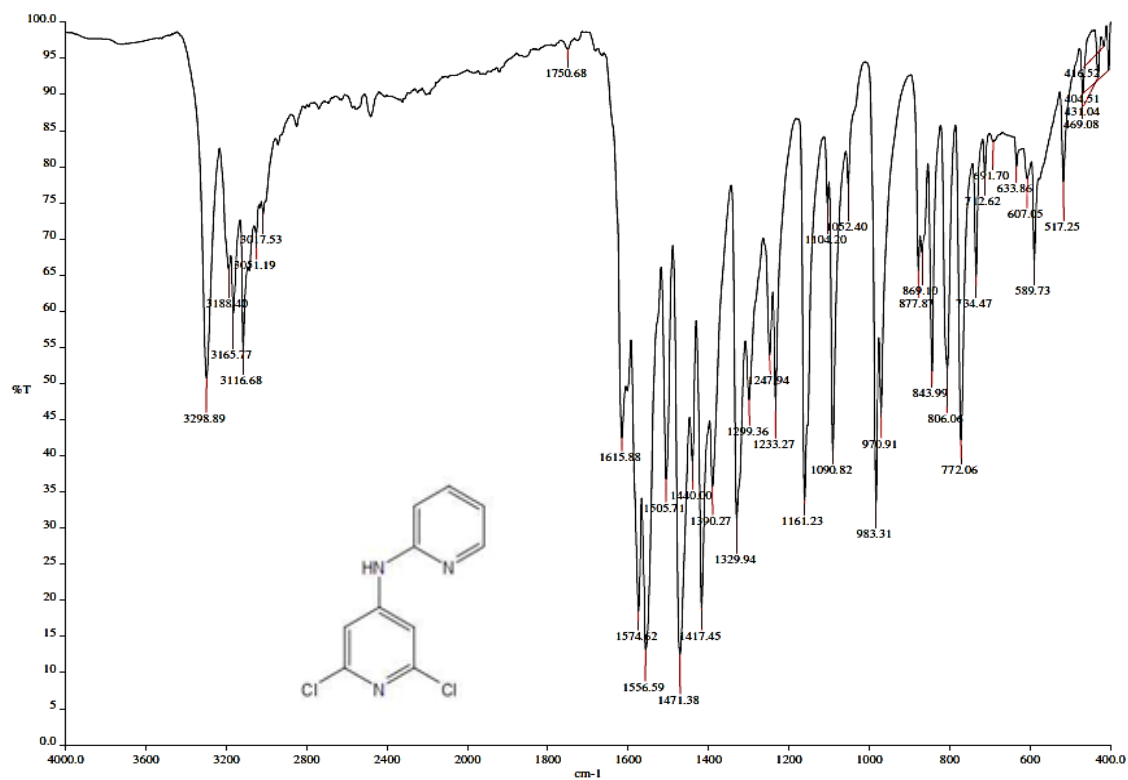
Espectro 31. RMN ^1H (TMS, DMSO-d_6 , 400 MHz, δ en ppm) del compuesto 4-amino-*N*-(2-piridinil)-2,6-dicloropiridina (INT4).



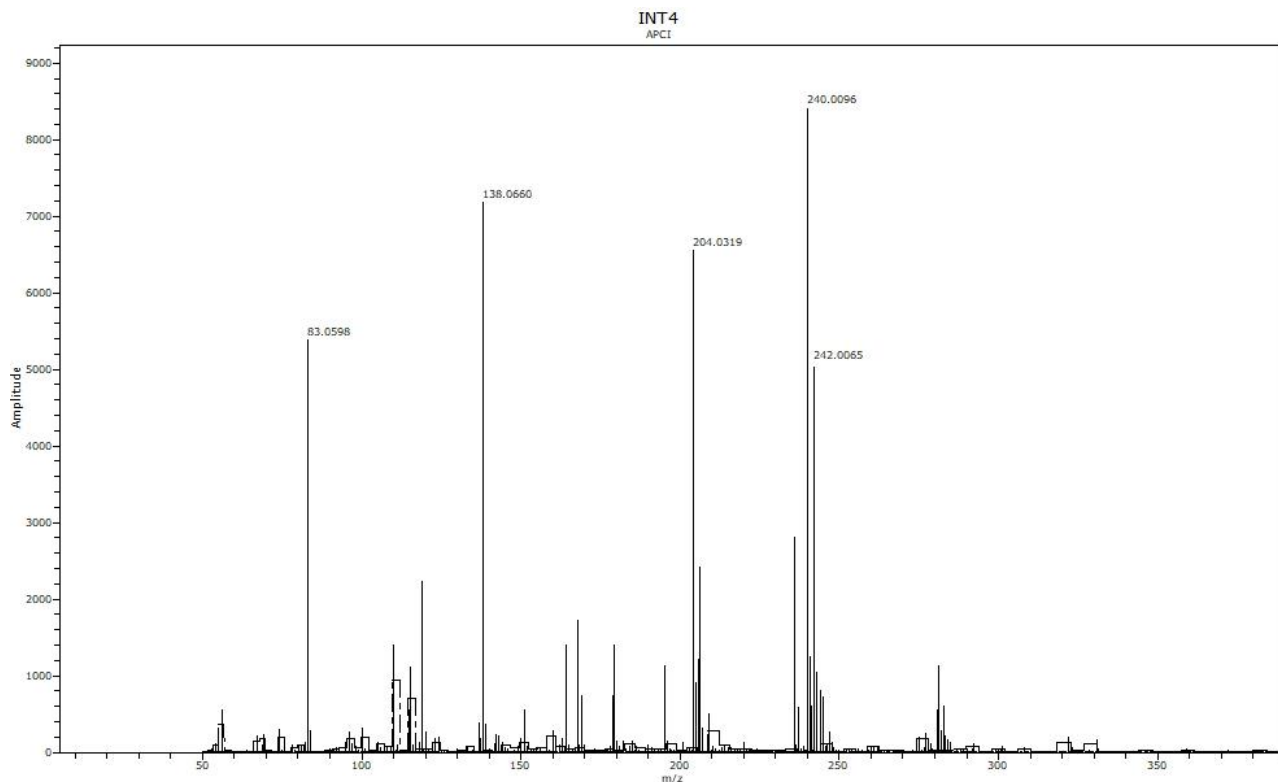
Espectro 32. RMN ^{13}C (TMS, DMSO-d_6 , 100 MHz, δ en ppm) del compuesto 4-amino-*N*-(2-piridinil)-2,6-dicloropiridina (INT4).



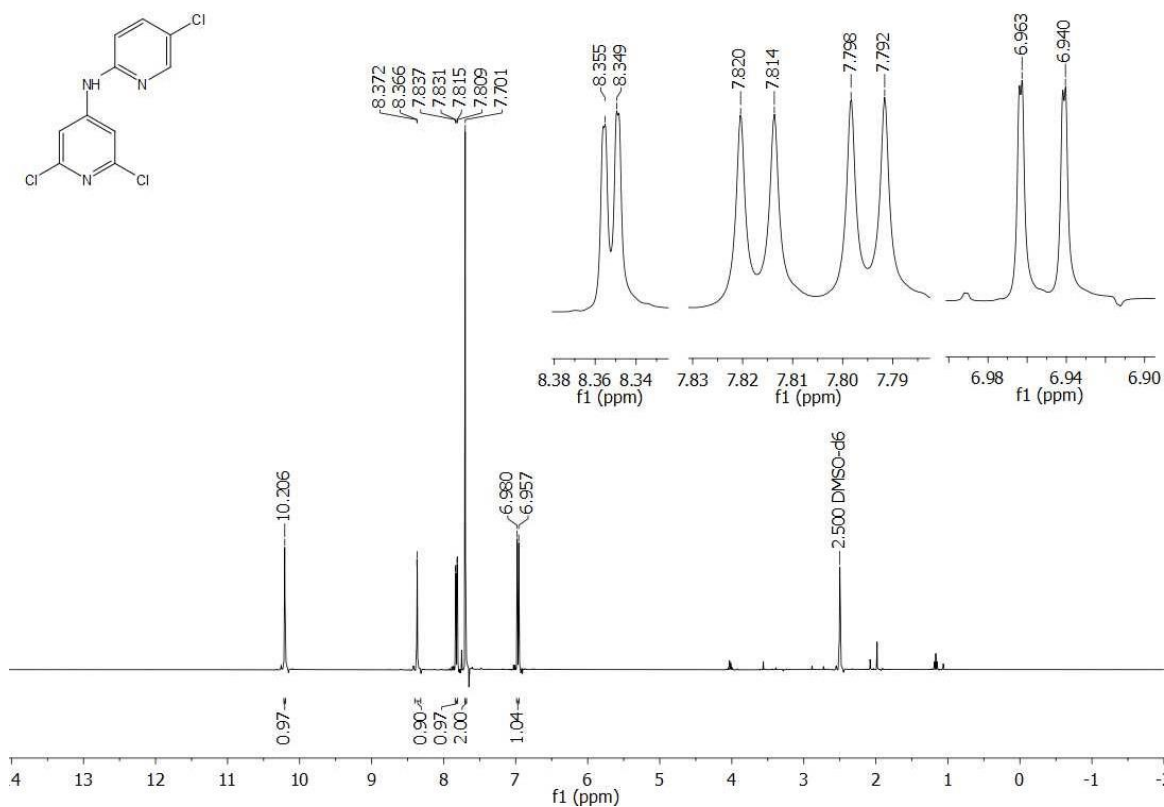
Espectro 33. RMN ^1H (TMS, DMSO- d_6 , 400 MHz, δ en ppm). Experimento COSY del compuesto 4-amino-*N*-(2-piridinil)-2,6-dicloropiridina (**INT4**).



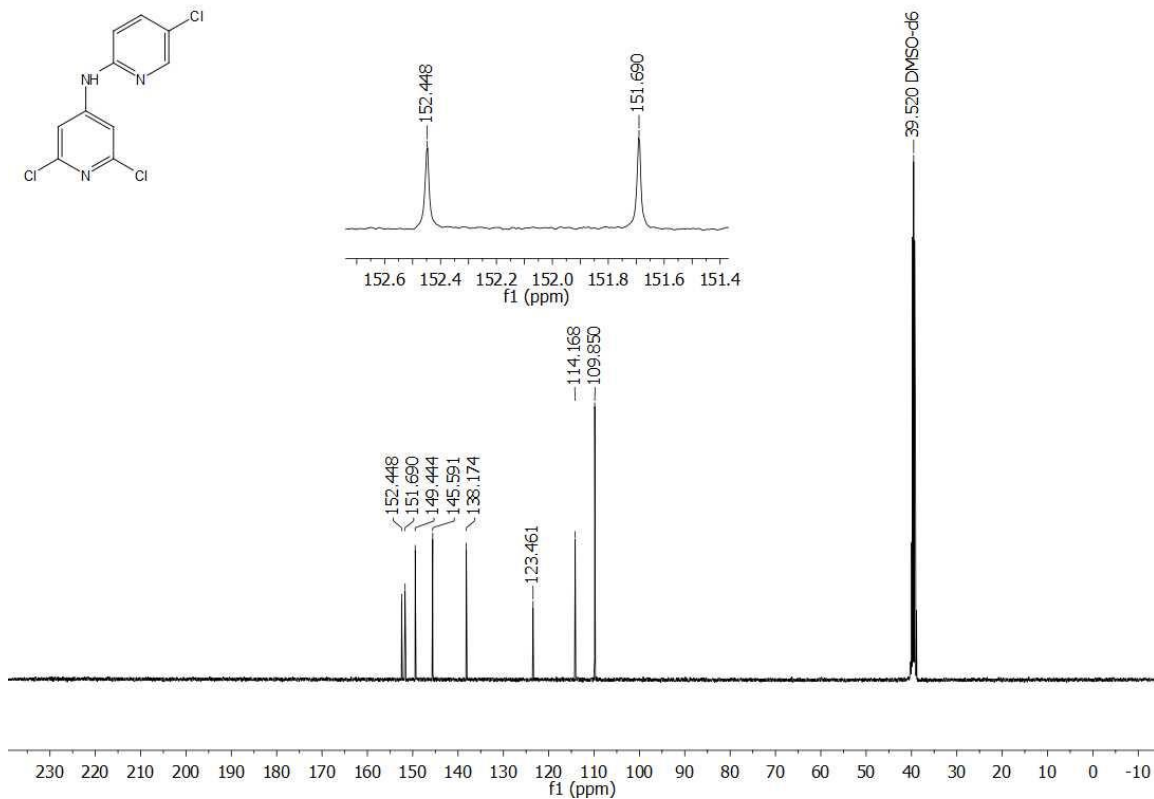
Espectro 34. IR (FTIR por reflectancia ATR, cm^{-1}) del compuesto 4-amino-*N*-(2-piridinil)-2,6-dicloropiridina (**INT4**).



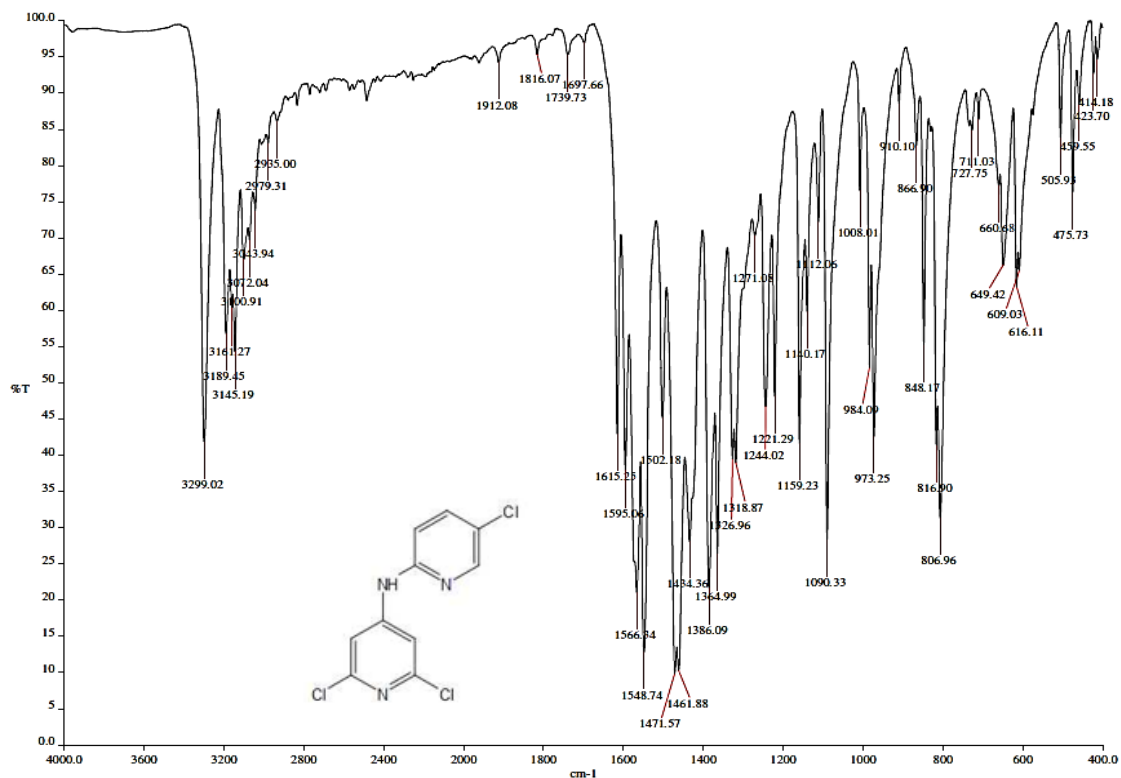
Espectro 35. EMAR (APCI, $[M + H]^+$, m/z) del compuesto 4-amino-*N*-(2-piridinil)-2,6-dicloropiridina (**INT4**).



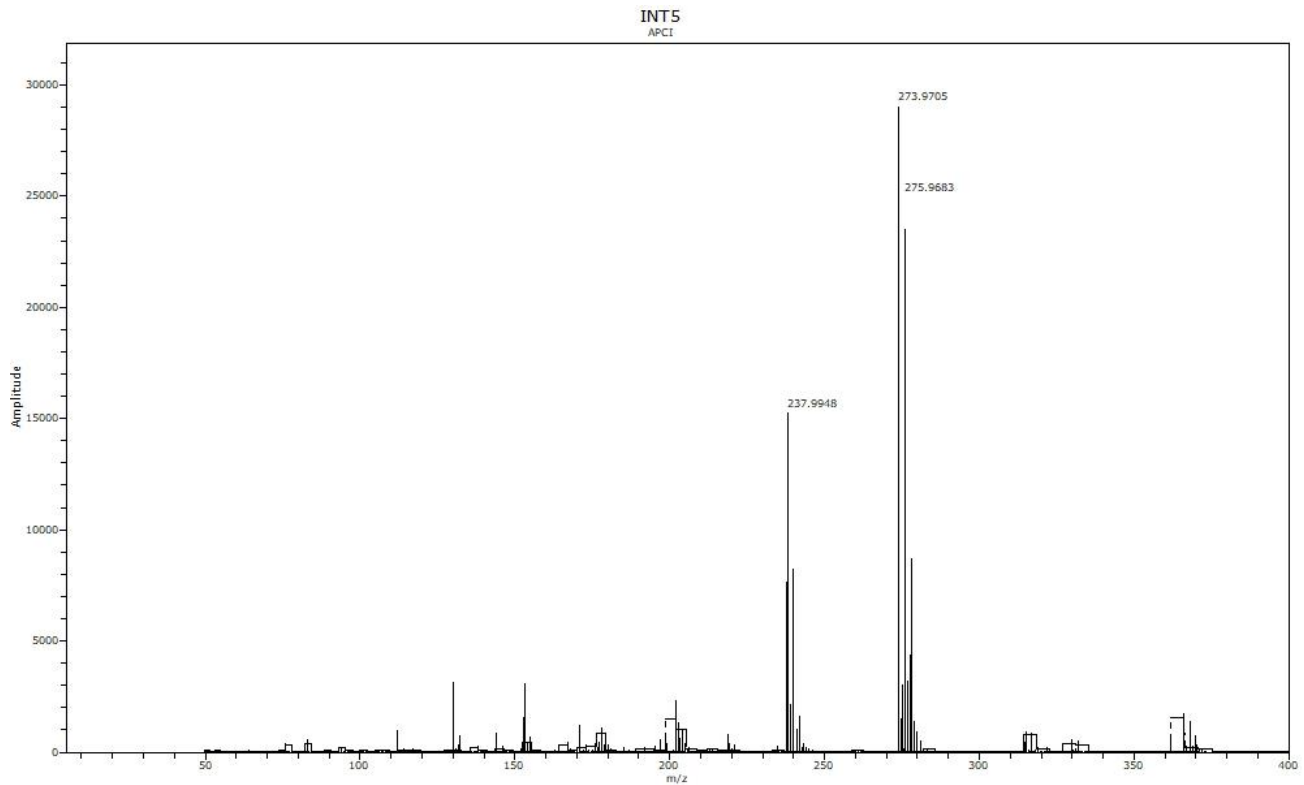
Espectro 36. RMN 1H (TMS, $DMSO-d_6$, 400 MHz, δ en ppm) del compuesto 2-amino-*N*-(2,6-dicloropiridin-4-il)-5-cloropiridina (**INT5**).



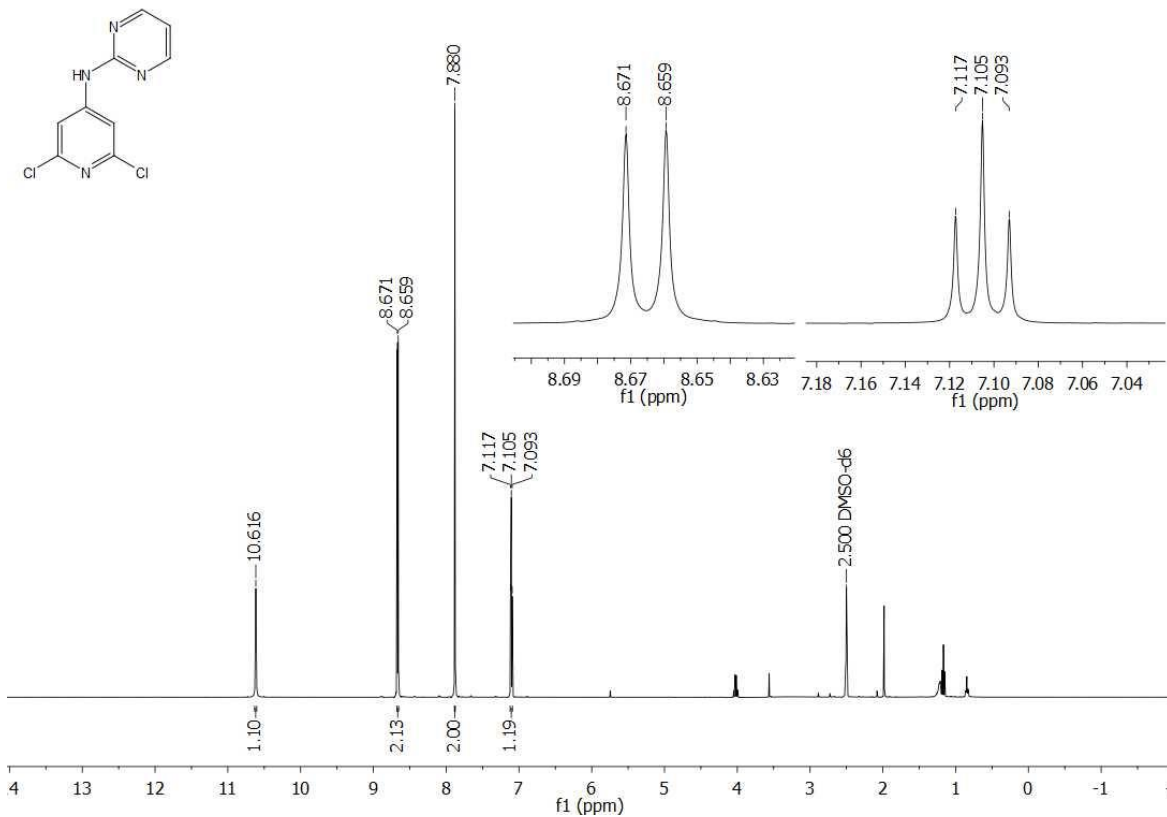
Espectro 37. RMN ^{13}C (TMS, DMSO- d_6 , 100 MHz, δ en ppm) del compuesto 2-amino-*N*-(2,6-dicloropiridin-4-il)-5-cloropiridina (**INT5**).



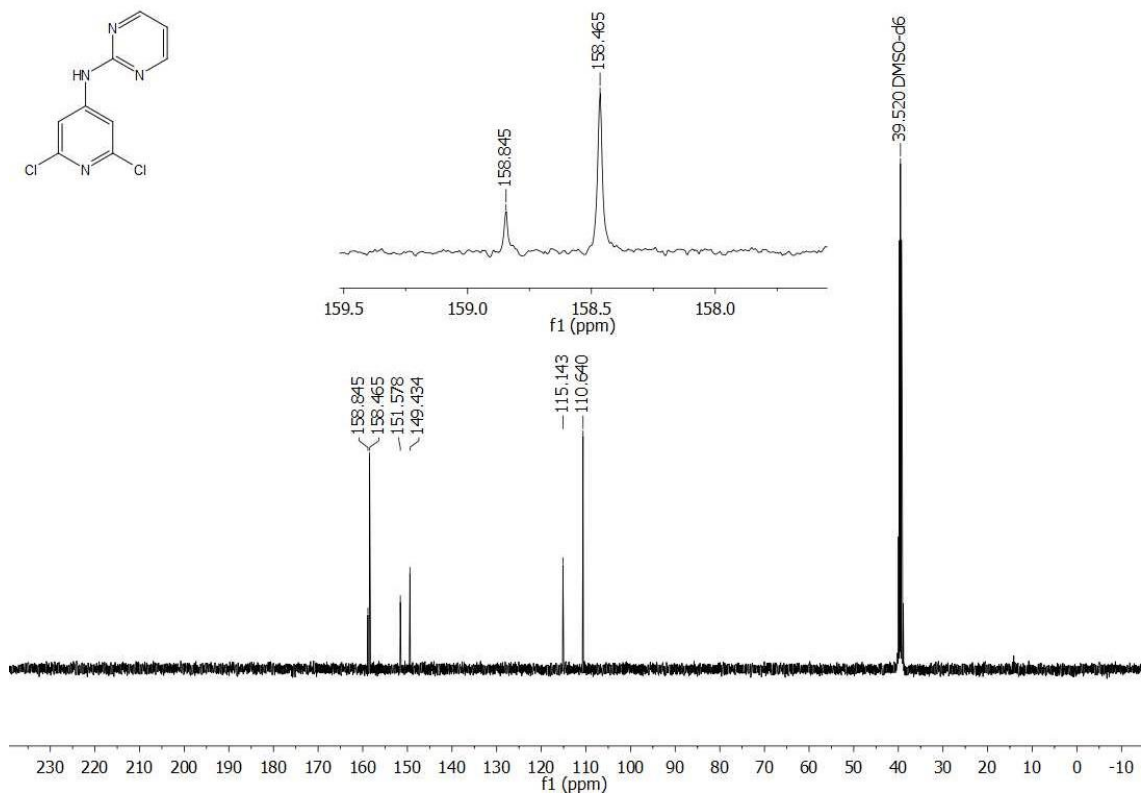
Espectro 38. IR (FTIR por reflectancia ATR, cm^{-1}) del compuesto 2-amino-*N*-(2,6-dicloropiridin-4-il)-5-cloropiridina (**INT5**).



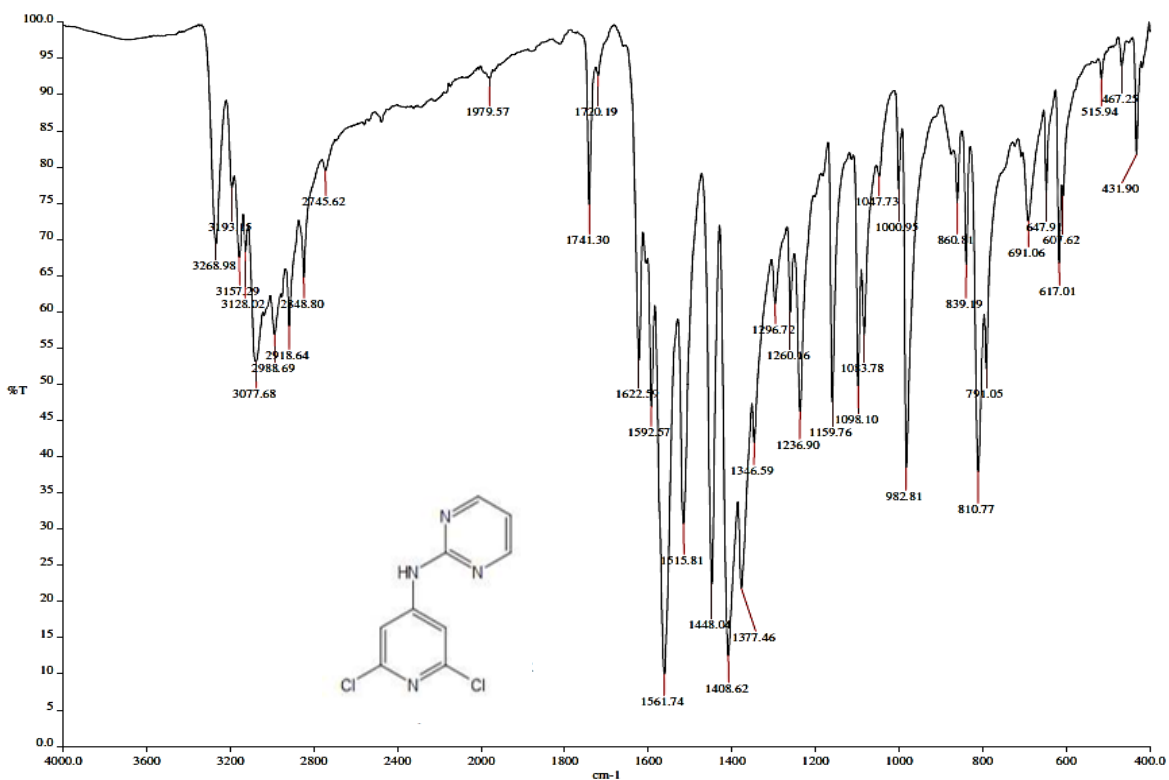
Espectro 39. EMAR (APCI, $[M + H]^+$, m/z) del compuesto 2-amino-*N*-(2,6-dicloropiridin-4-il)-5-cloropiridina (**INT5**).



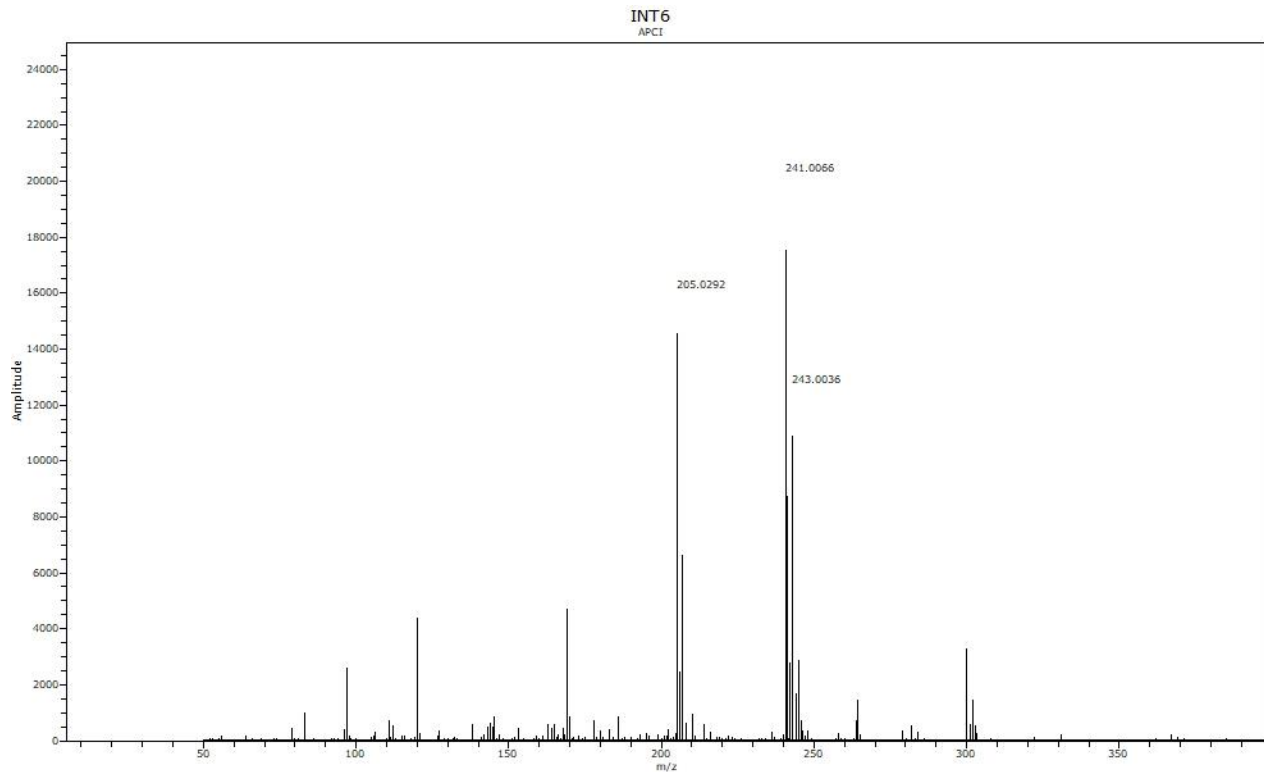
Espectro 40. RMN 1H (TMS, DMSO- d_6 , 400 MHz, δ en ppm) del compuesto 2-amino-*N*-(2,6-dicloropiridin-4-il)piridimina (**INT6**).



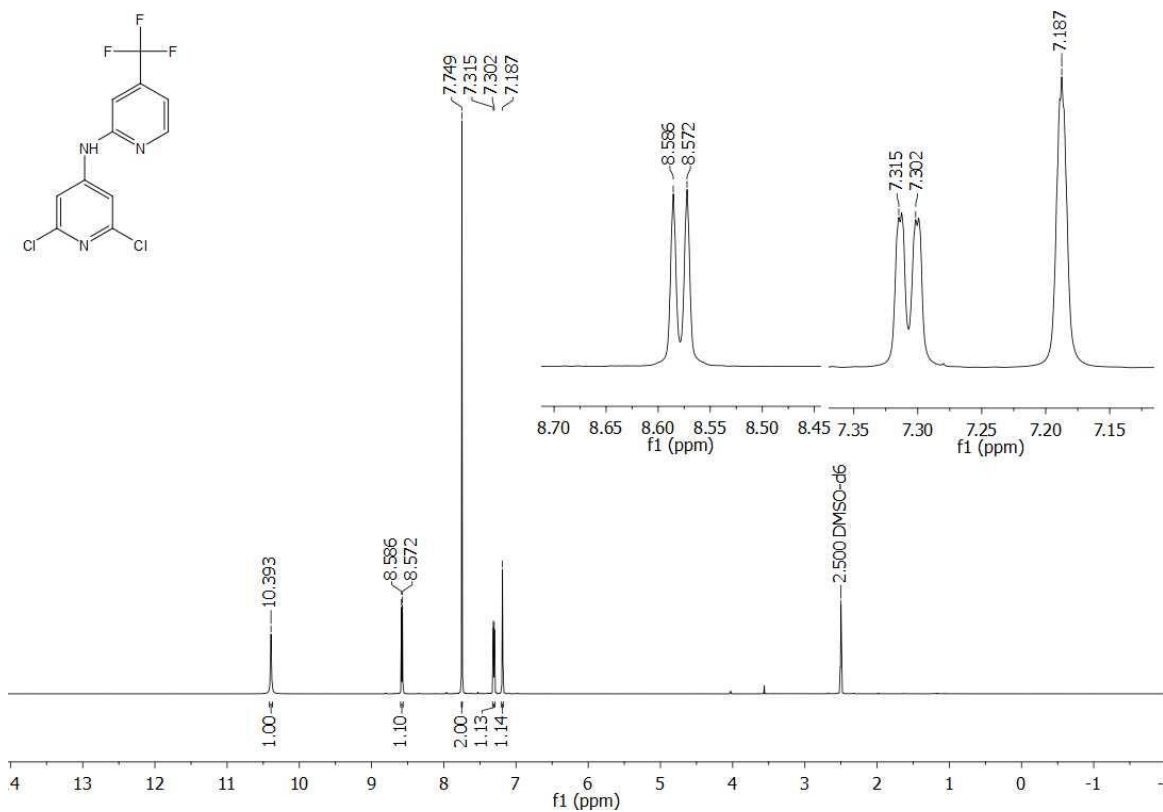
Espectro 41. RMN ^{13}C (TMS, DMSO- d_6 , 100 MHz, δ en ppm) del compuesto 2-amino-*N*-(2,6-dicloropiridin-4-il)piridimina (INT6).



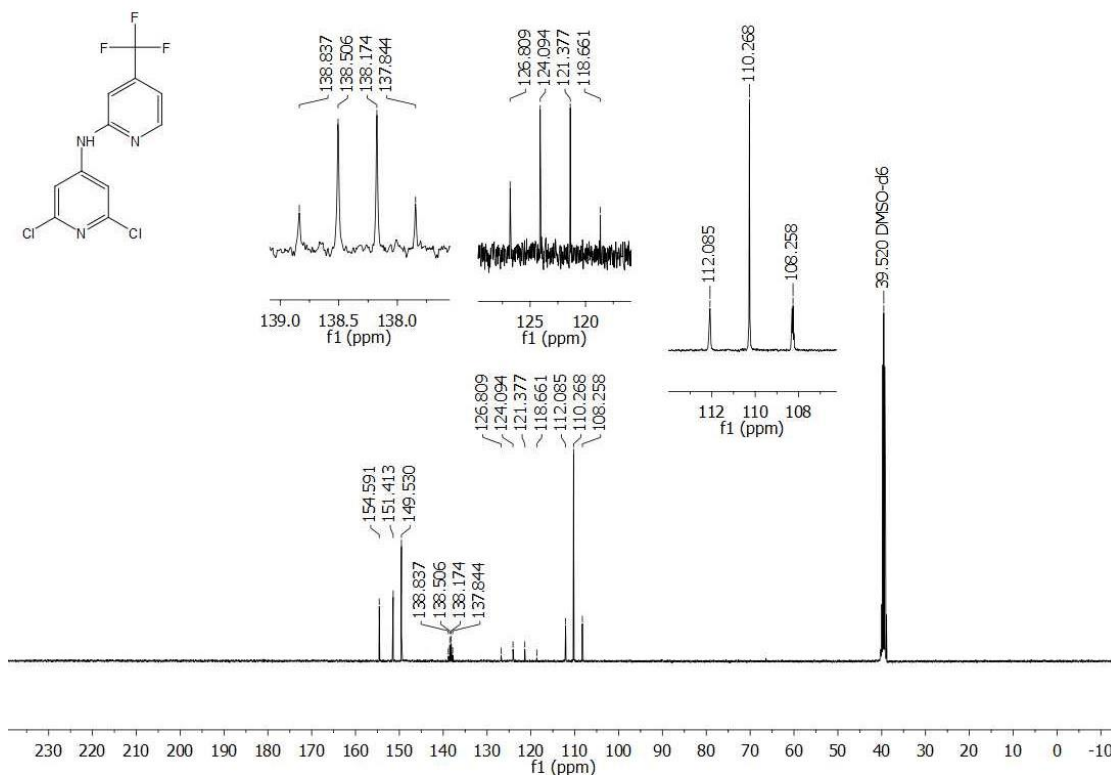
Espectro 42. IR (FTIR por reflectancia ATR, cm^{-1}) del compuesto 2-amino-*N*-(2,6-dicloropiridin-4-il)piridimina (INT6).



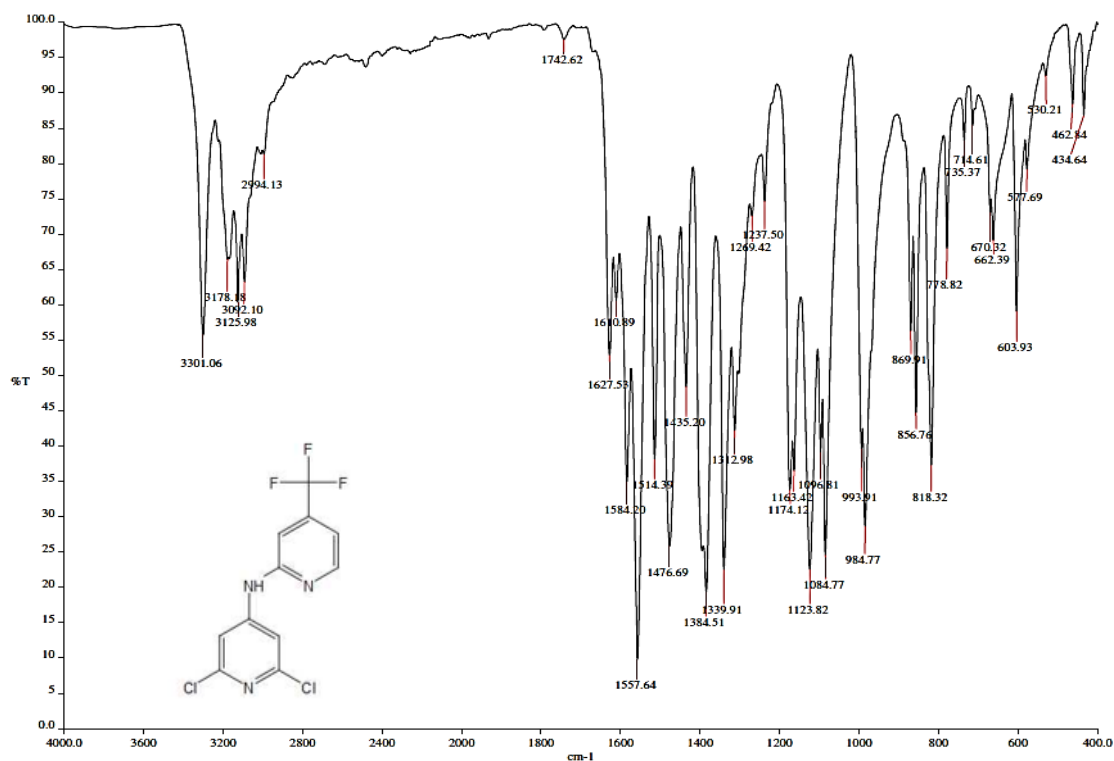
Espectro 43. EMAR (APCI, $[M + H]^+$, m/z) del compuesto 2-amino-*N*-(2,6-dicloropiridin-4-il)piridimina (**INT6**).



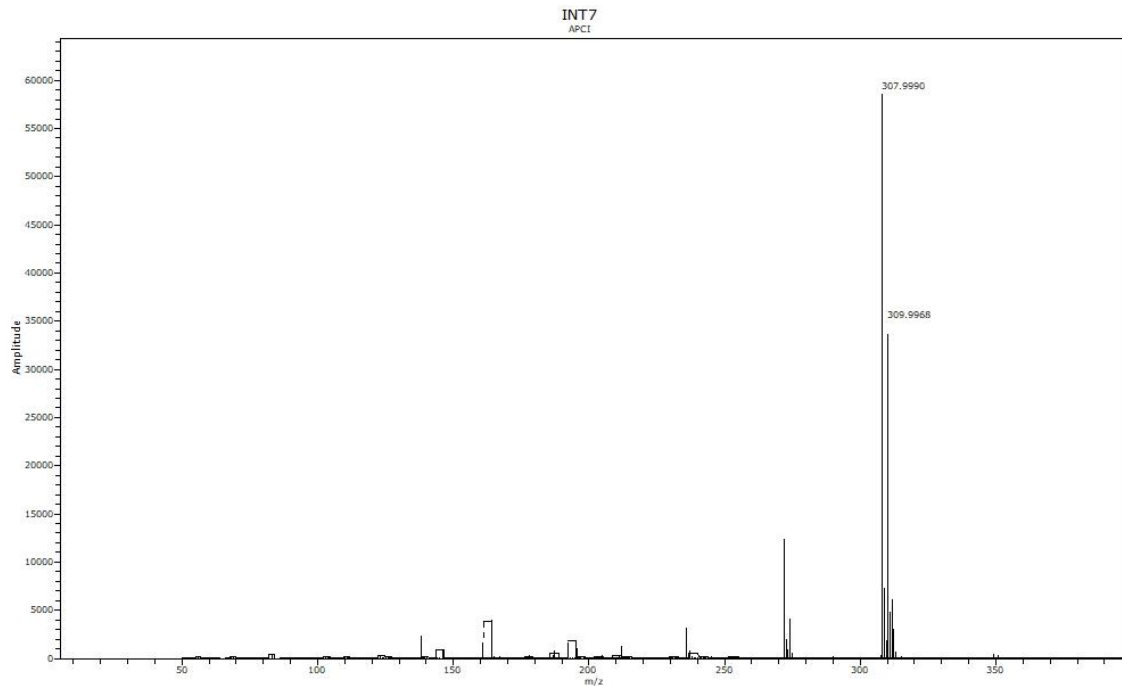
Espectro 44. RMN ^1H (TMS, DMSO- d_6 , 400 MHz, δ en ppm) del compuesto 2-amino-*N*-(2,6-dicloropiridin-4-il)-4-(trifluorometil)piridina (**INT7**).



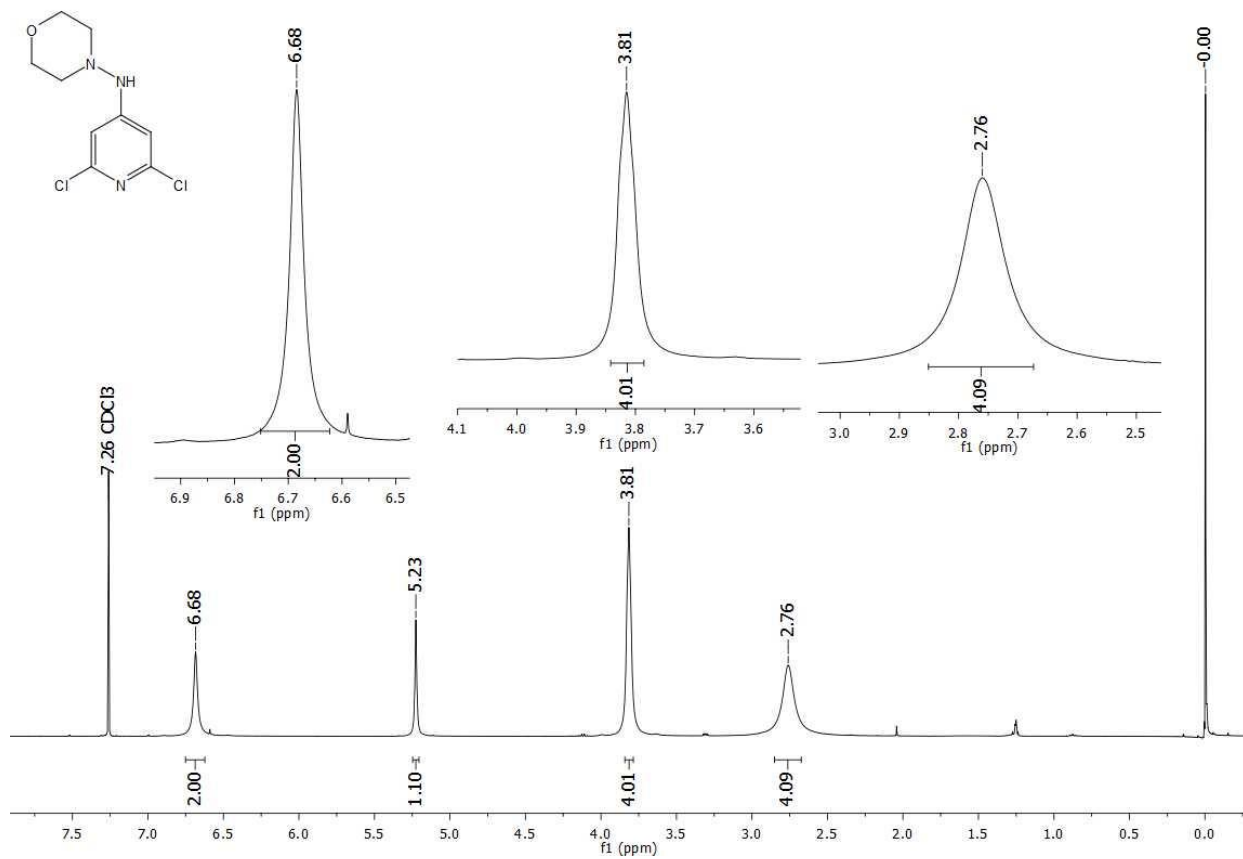
Espectro 45. RMN ^{13}C (TMS, DMSO- d_6 , 100 MHz, δ en ppm) del compuesto 2-amino-*N*-(2,6-dicloropiridin-4-il)-4-(trifluorometil)piridina (INT7).



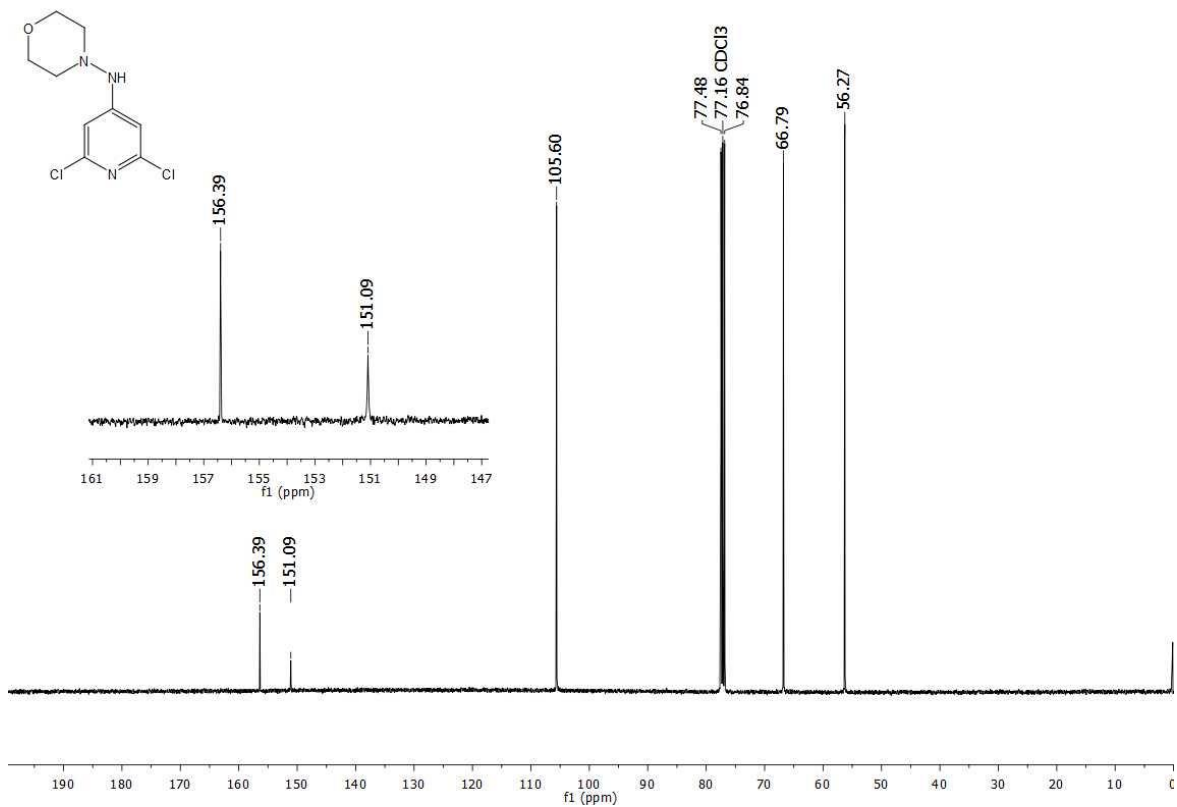
Espectro 46. IR (FTIR por reflectancia ATR, cm⁻¹) del compuesto 2-amino-*N*-(2,6-dicloropiridin-4-il)-4-(trifluorometil)piridina (INT7).



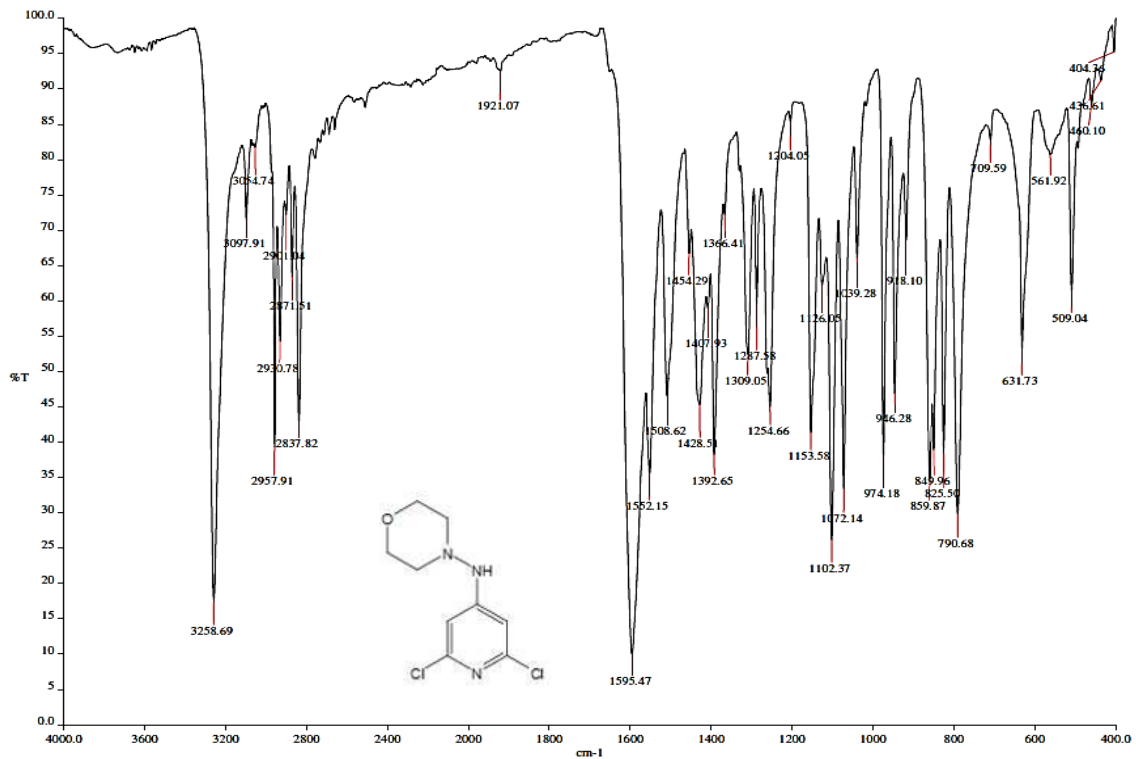
Espectro 47. EMAR (APCI, $[M + H]^+$, m/z) del compuesto 2-amino-*N*-(2,6-dicloropiridin-4-il)-4-(trifluorometil)piridina (INT7).



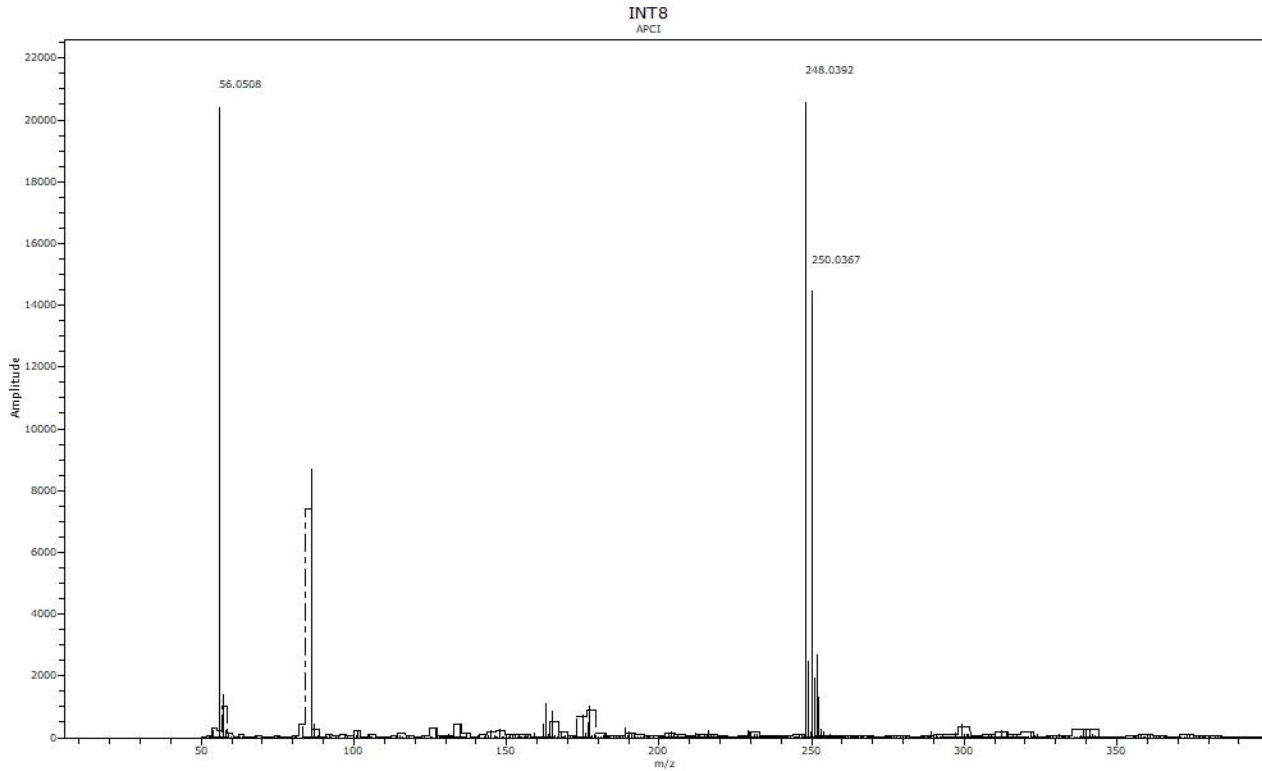
Espectro 48. RMN ^1H (TMS, CDCl_3 , 400 MHz, δ en ppm) del compuesto 4-amino-*N*-(morfolin-4-il)-2,6-dicloropiridina (INT8).



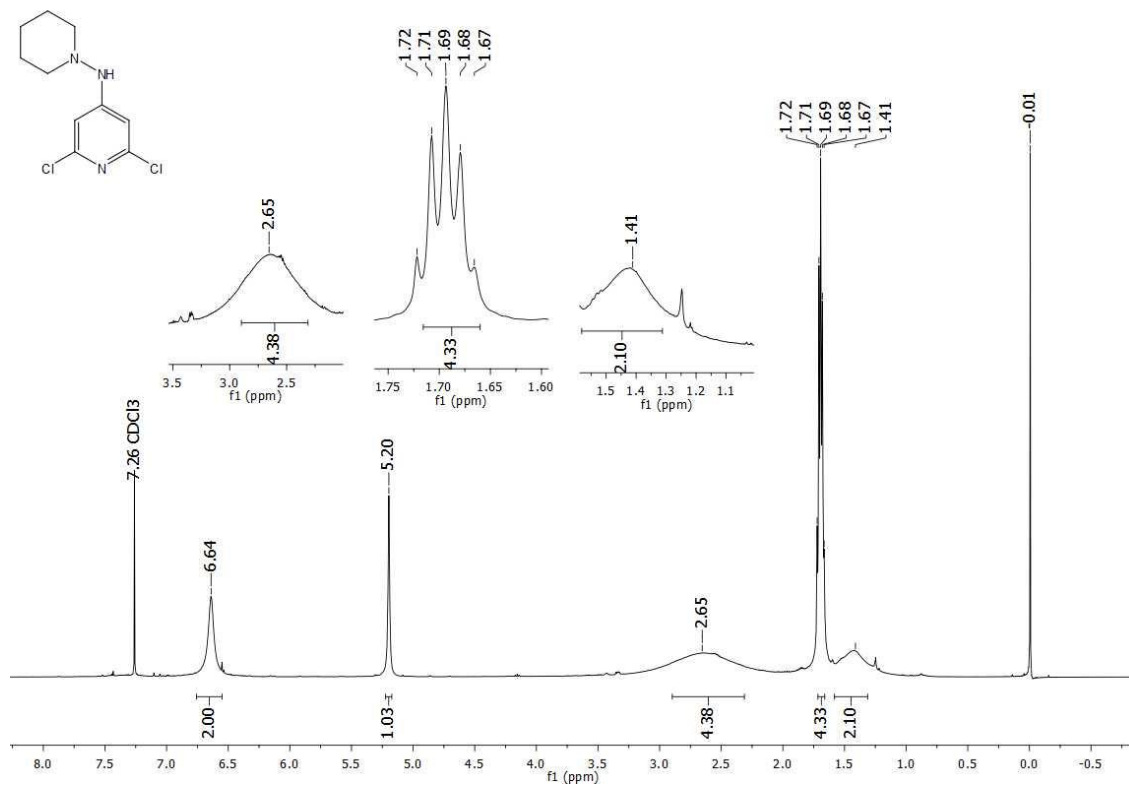
Espectro 49. RMN ^{13}C (TMS, CDCl_3 , 100 MHz, δ en ppm) del compuesto 4-amino-*N*-(morfolin-4-il)-2,6-dicloropiridina (INT8).



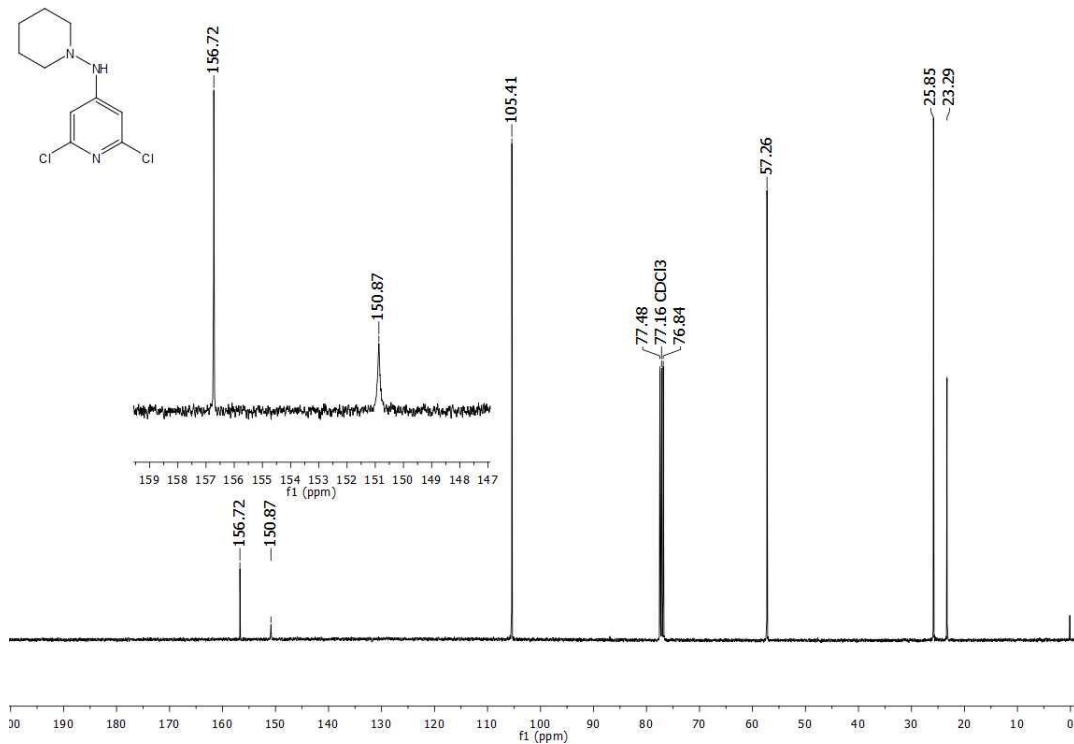
Espectro 50. IR (FTIR por reflectancia ATR, cm^{-1}) del compuesto 4-amino-*N*-(morfolin-4-il)-2,6-dicloropiridina (INT8).



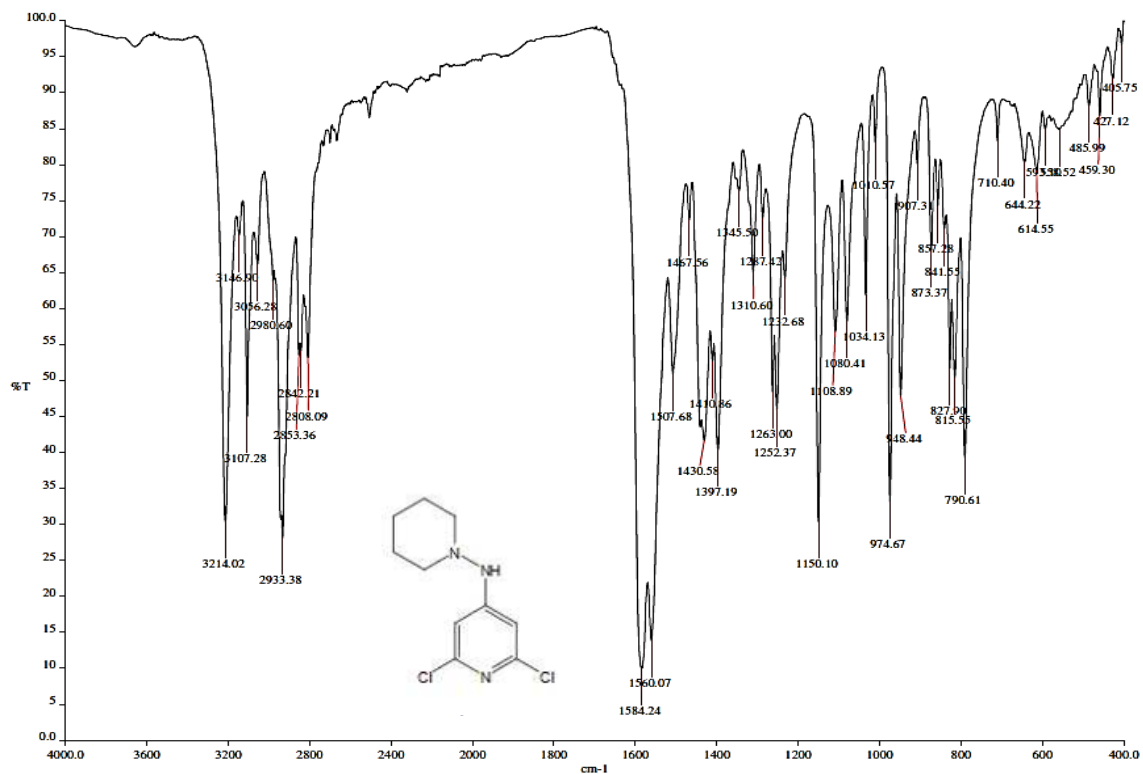
Espectro 51. EMAR (APCI, $[M + H]^+$, m/z) del compuesto 4-amino-*N*-(morfolin-4-il)-2,6-dicloropiridina (**INT8**).



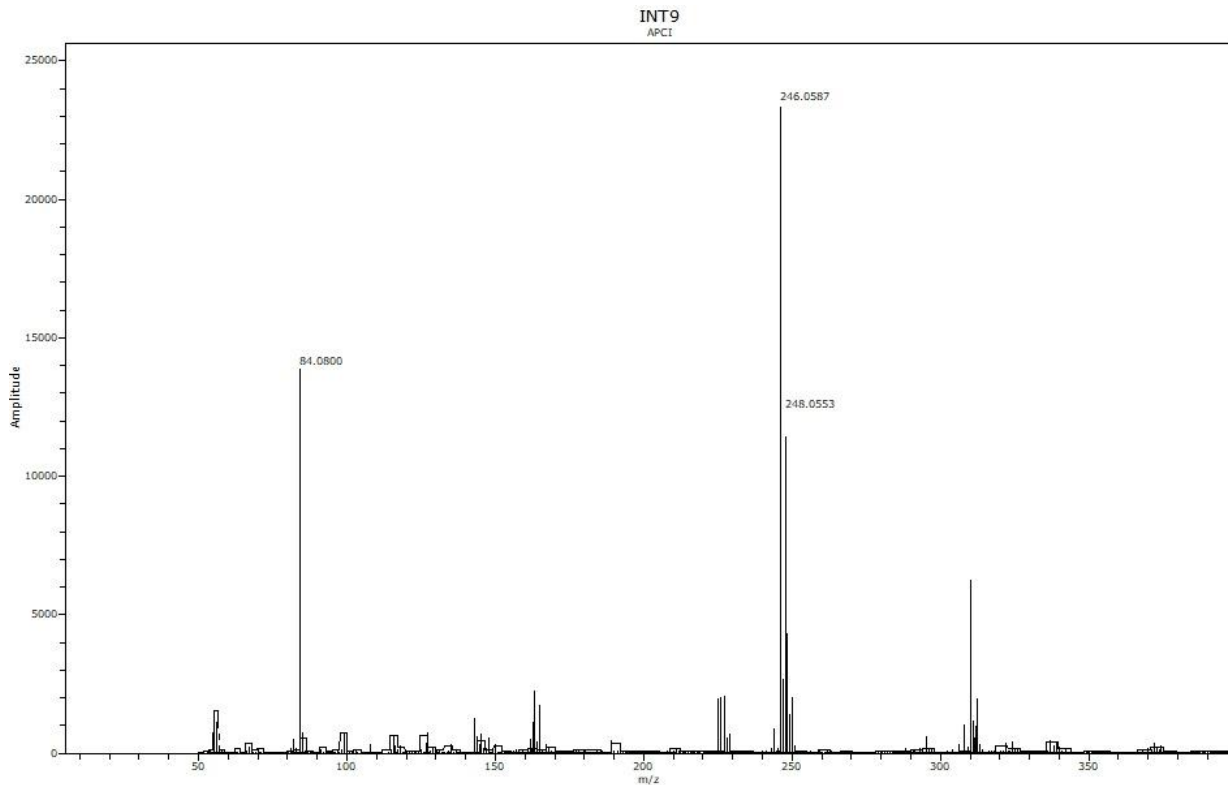
Espectro 52. RMN ¹H (TMS, CDCl₃, 400 MHz, δ en ppm) del compuesto 4-amino-*N*-(piperidin-1-il)-2,6-dicloropiridina (**INT9**).



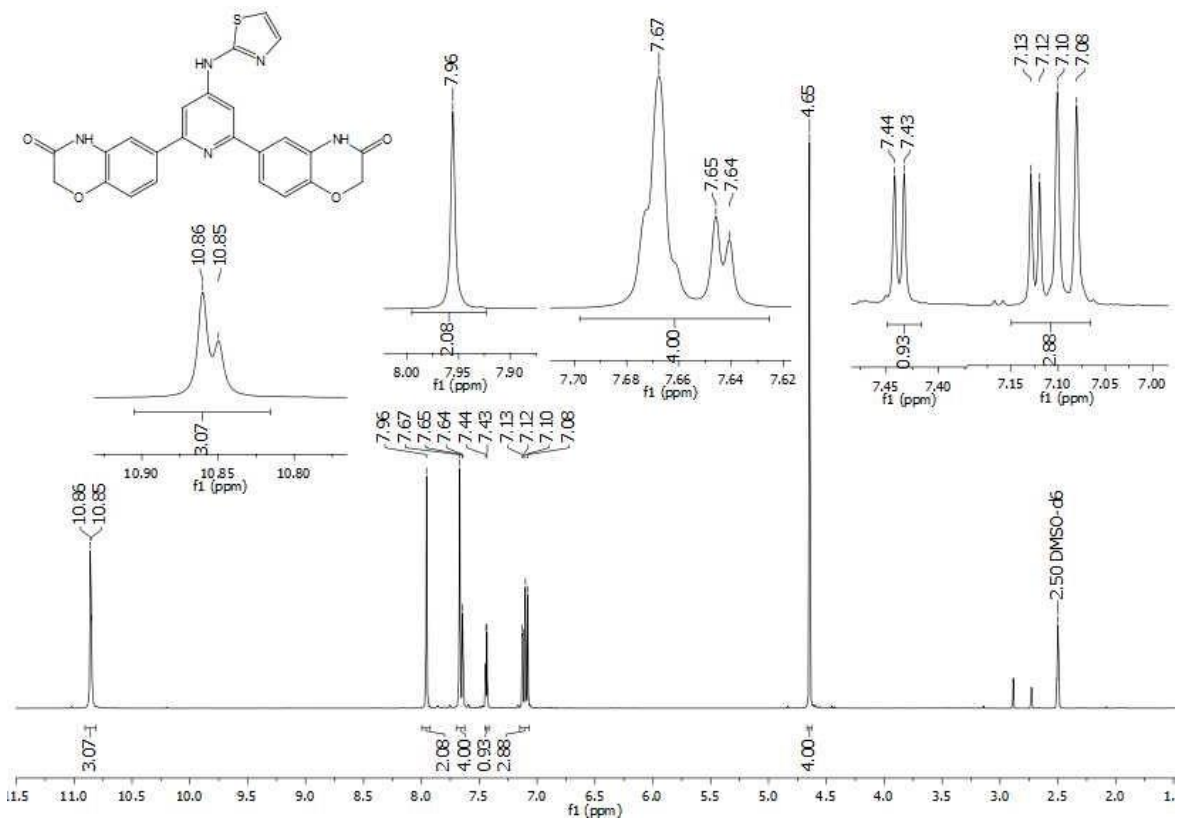
Espectro 53. RMN ^{13}C (TMS, CDCl₃, 100 MHz, δ en ppm) del compuesto 4-amino-*N*-(piperidin-1-il)-2,6-dicloropiridina (INT9).



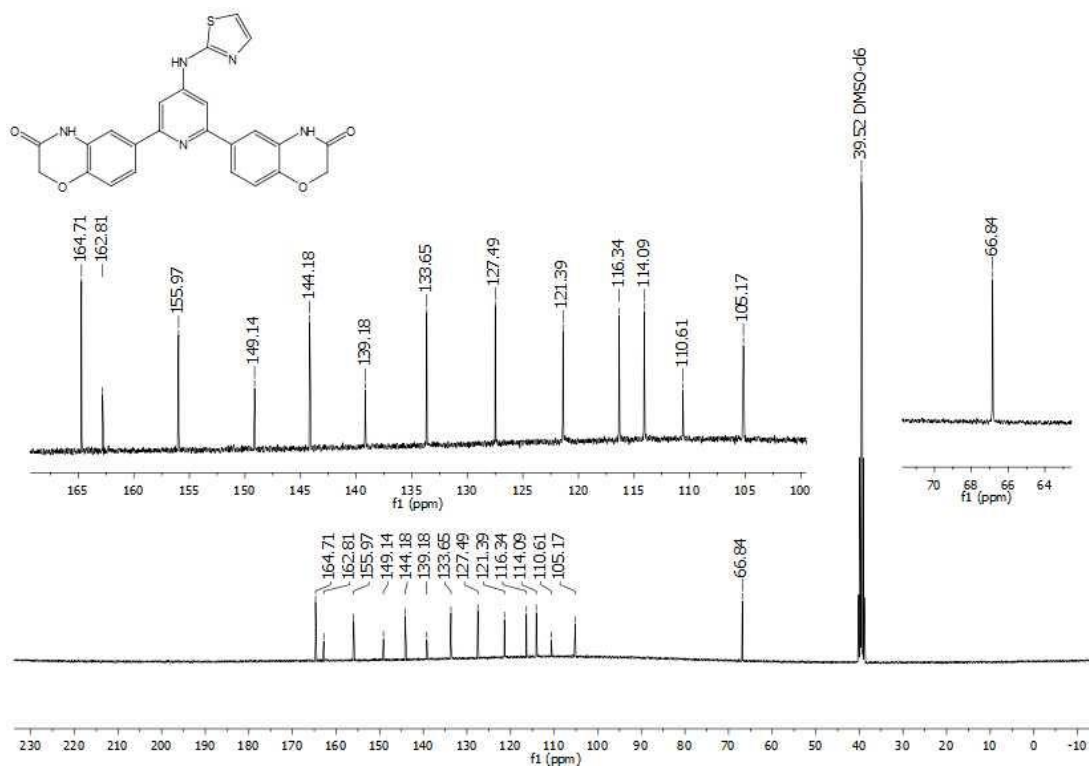
Espectro 54. IR (FTIR por reflectancia ATR, cm⁻¹) del compuesto 4-amino-*N*-(piperidin-1-il)-2,6-dicloropiridina (INT9).



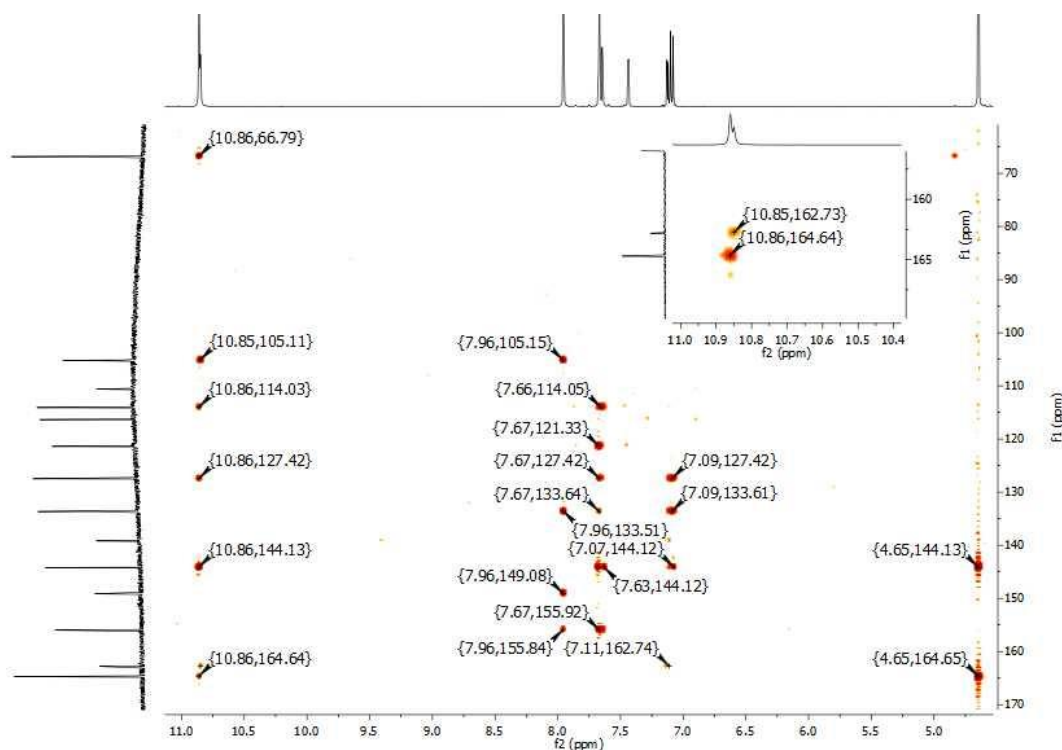
Espectro 55. EMAR (APCI, $[M + H]^+$, m/z) del compuesto 4-amino-*N*-(piperidin-1-il)-2,6-dicloropiridina (**INT9**).



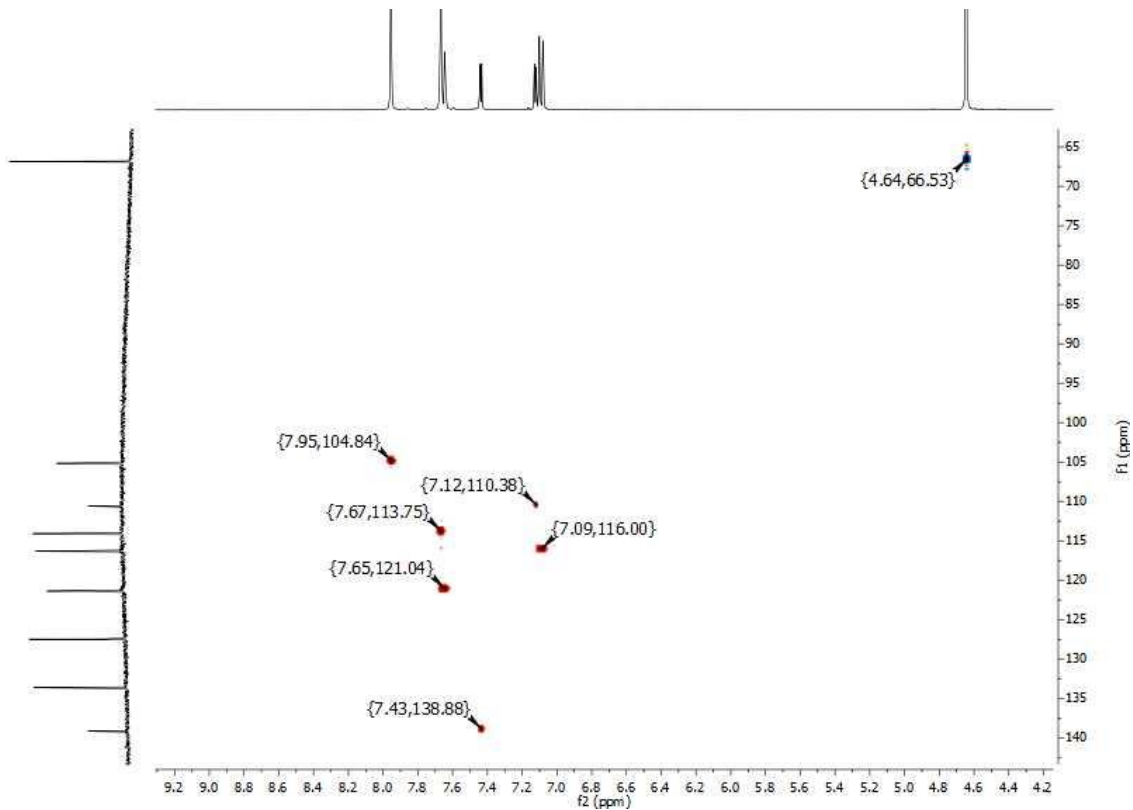
Espectro 56. RMN 1H (TMS, DMSO- d_6 , 400 MHz, δ en ppm) del compuesto 6,6'-[4-amino-*N*-(1,3-tiazol-2-il)piridin-2,6-diil]bis(2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona) (**JVM1**).



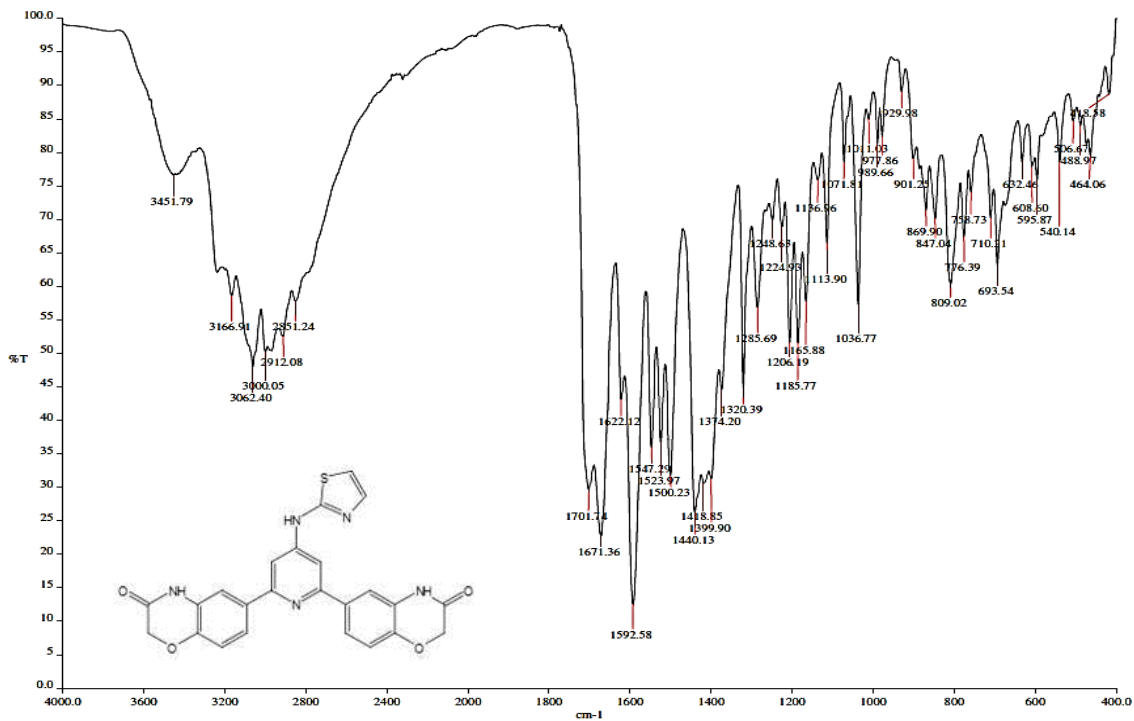
Espectro 57. RMN ^{13}C (TMS, DMSO- d_6 , 100 MHz, δ en ppm) del compuesto 6,6'-[4-amino-*N*-(1,3-tiazol-2-il)piridin-2,6-diil]bis(2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona) (**JVM1**).



Espectro 58. RMN ^1H (TMS, DMSO- d_6 , 400 MHz, δ en ppm), RMN ^{13}C (TMS, DMSO- d_6 , 100 MHz, δ en ppm). Experimento HMBC del compuesto 6,6'-[4-amino-*N*-(1,3-tiazol-2-il)piridin-2,6-diil]bis(2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona) (**JVM1**).



Espectro 59. RMN ^1H (TMS, $\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz, δ en ppm), RMN ^{13}C (TMS, $\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz, δ en ppm). Experimento HSQC del compuesto 6,6'-[4-amino-*N*-(1,3-tiazol-2-il)piridin-2,6-diil]bis(2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona) (JVM1).

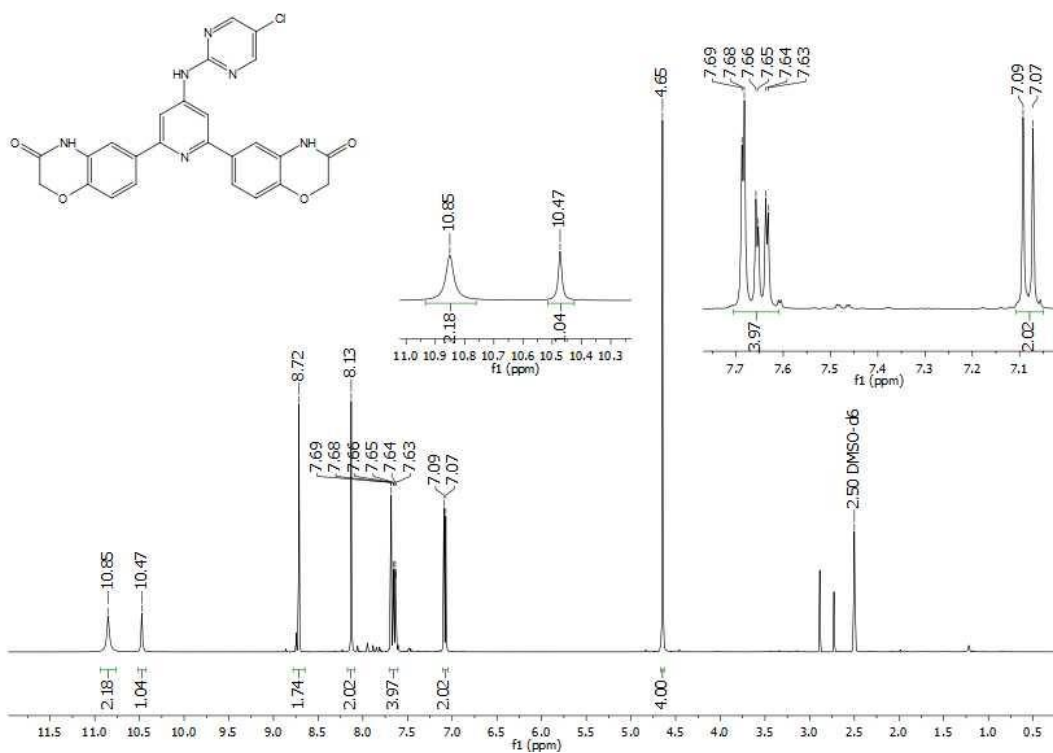


Espectro 60. IR (FTIR por reflectancia ATR, cm^{-1}) del compuesto 6,6'-[4-amino-*N*-(1,3-tiazol-2-il)piridin-2,6-diil]bis(2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona) (JVM1).

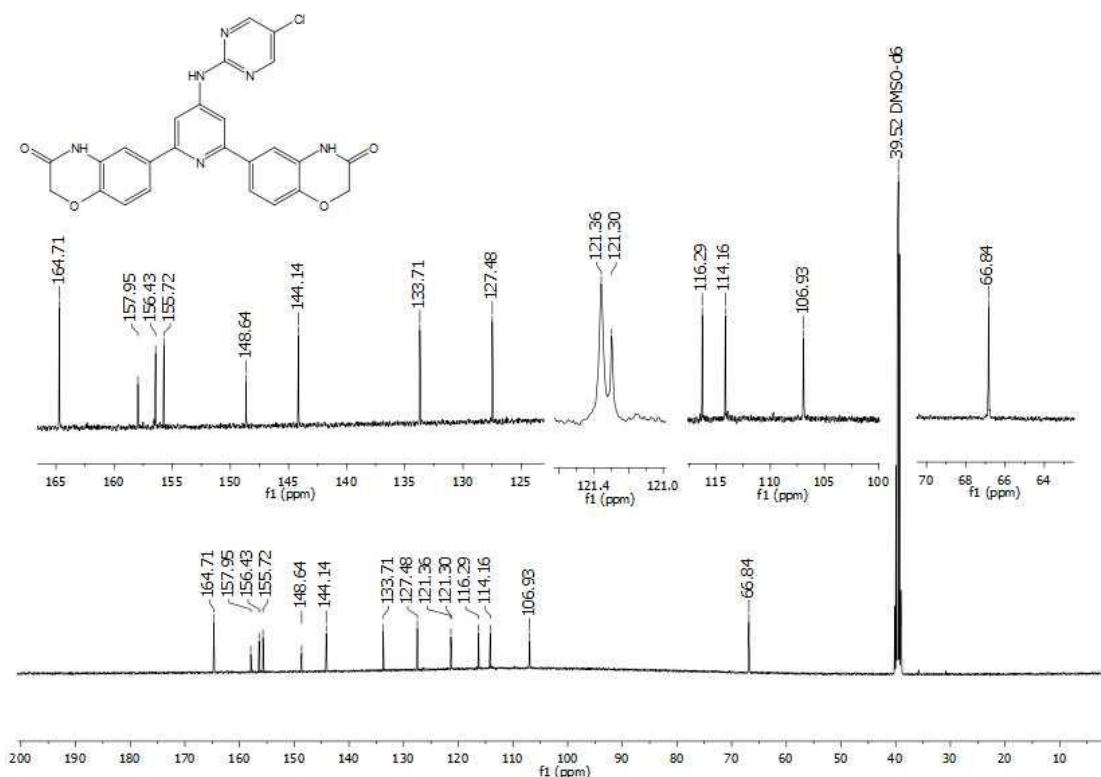
Data : Dr Cartillo Rafael041 Date : 26-Sep-2018 10:48
 Instrument : MStation
 Sample : 143 STE-7807 JVM1
 Note : Operadores Javier Perez-Carmen Garcia
 Inlet : Direct Ion Mode : EI+
 RT : 1.48 min Scan# : (12,13)
 Elements : C 24/0, H 30/0, N 6/0, O 5/0, S 1/0
 Mass Tolerance : 1000ppm, 10mmu if m/z > 10
 Unsaturation (U.S.) : -0.5 - 30.0

Observed m/z	Int%	Estimated m/z	Err [ppm / mmu]	U.S.	C	H	N	O	S
471.0985	100.00	471.1001	-3.5 / -1.6	20.0	24	17	5	4	1

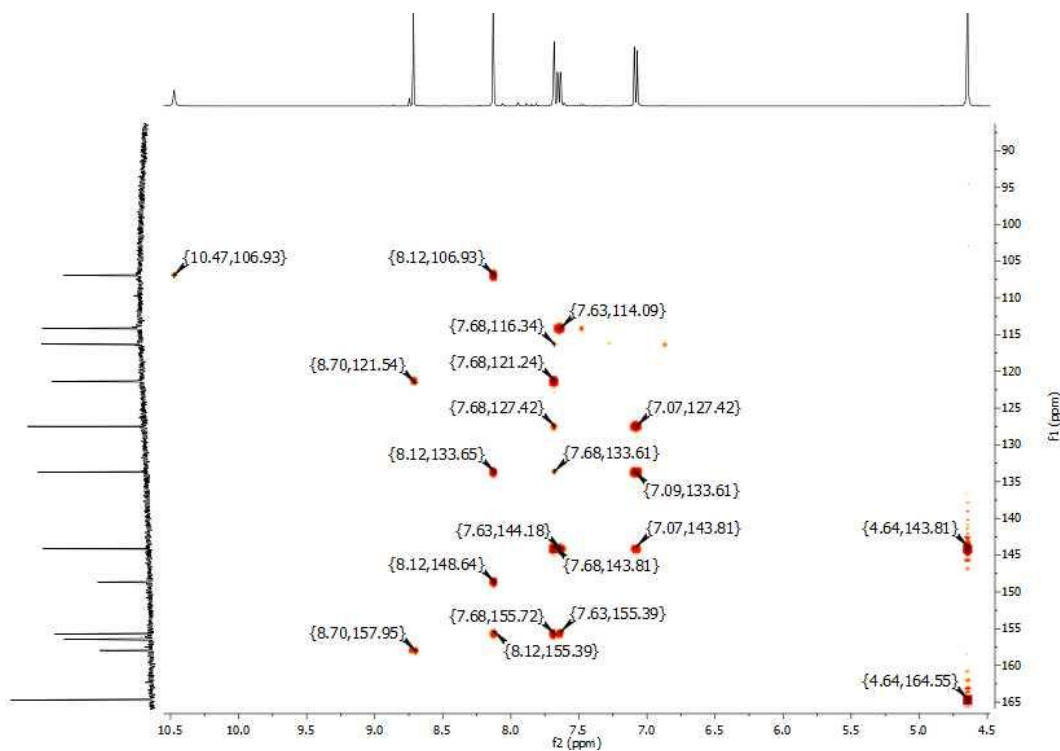
Espectro 61. EMAR (IE⁺, m/z) del compuesto 6,6'-[4-amino-N-(1,3-tiazol-2-il)piridin-2,6-diil]bis(2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona) (**JVM1**).



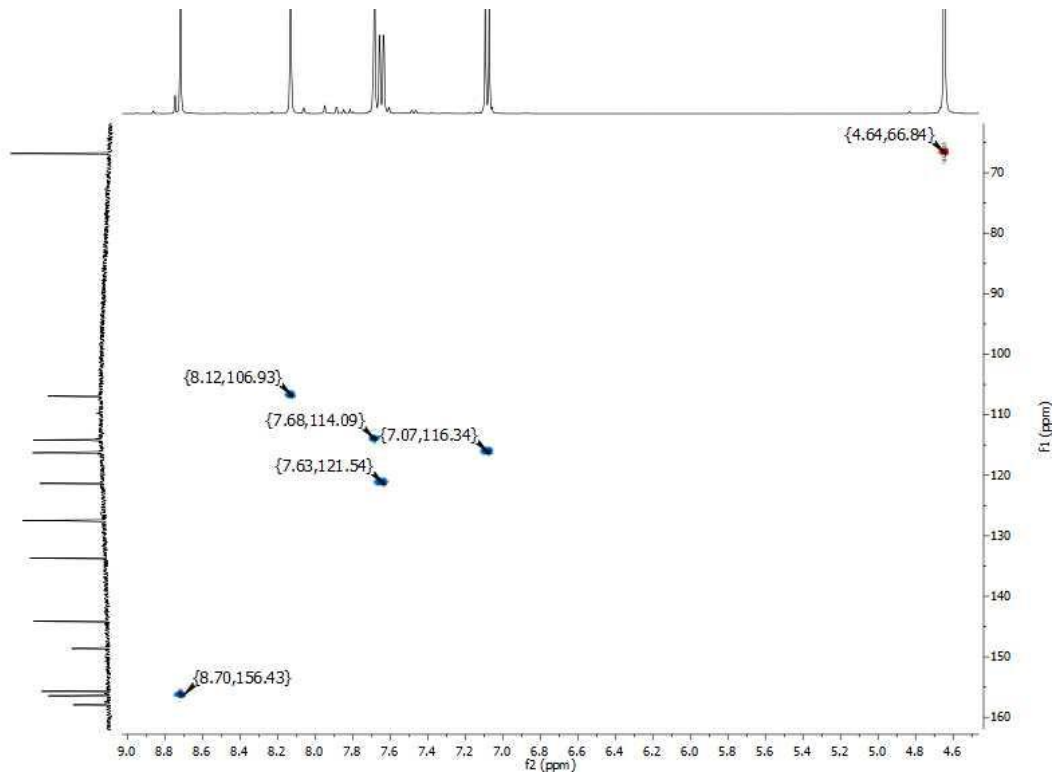
Espectro 62. RMN ¹H (TMS, DMSO-*d*₆, 400 MHz, δ en ppm) del compuesto 6,6'-[4-amino-N-(5-cloropirimidin-2-il)piridin-2,6-diil]bis(2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona) (**JVM2**).



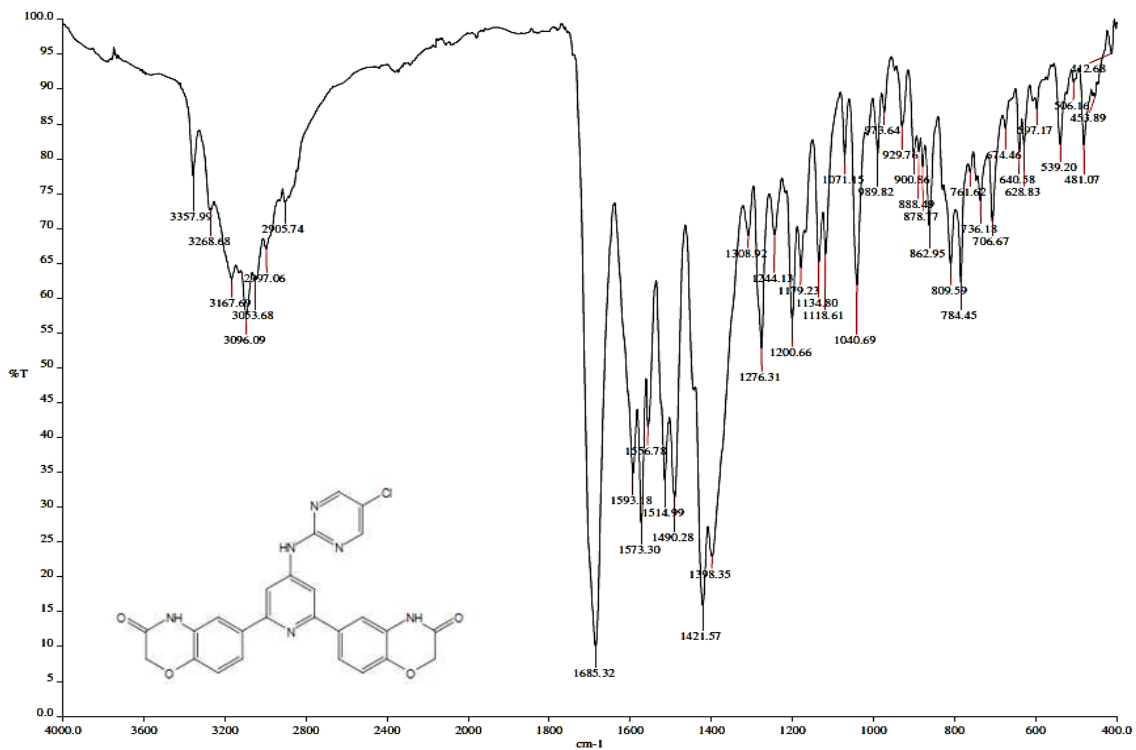
Espectro 63. RMN ¹³C (TMS, DMSO-*d*₆, 100 MHz, δ en ppm) del compuesto 6,6'-[4-amino-*N*-(5-cloropirimidin-2-il)piridin-2,6-diil]bis(2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona) (JVM2).



Espectro 64. RMN ¹H (TMS, DMSO-*d*₆, 400 MHz, δ en ppm), RMN ¹³C (TMS, DMSO-*d*₆, 100 MHz, δ en ppm). Experimento HMBC del compuesto 6,6'-[4-amino-*N*-(5-cloropirimidin-2-il)piridin-2,6-diil]bis(2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona) (JVM2).



Espectro 65. RMN ^1H (TMS, $\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz, δ en ppm), RMN ^{13}C (TMS, $\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz, δ en ppm). Experimento HSQC del compuesto 6,6'-[4-amino-*N*-(5-cloropirimidin-2-il)piridin-2,6-diil]bis(2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona) (JVM2).

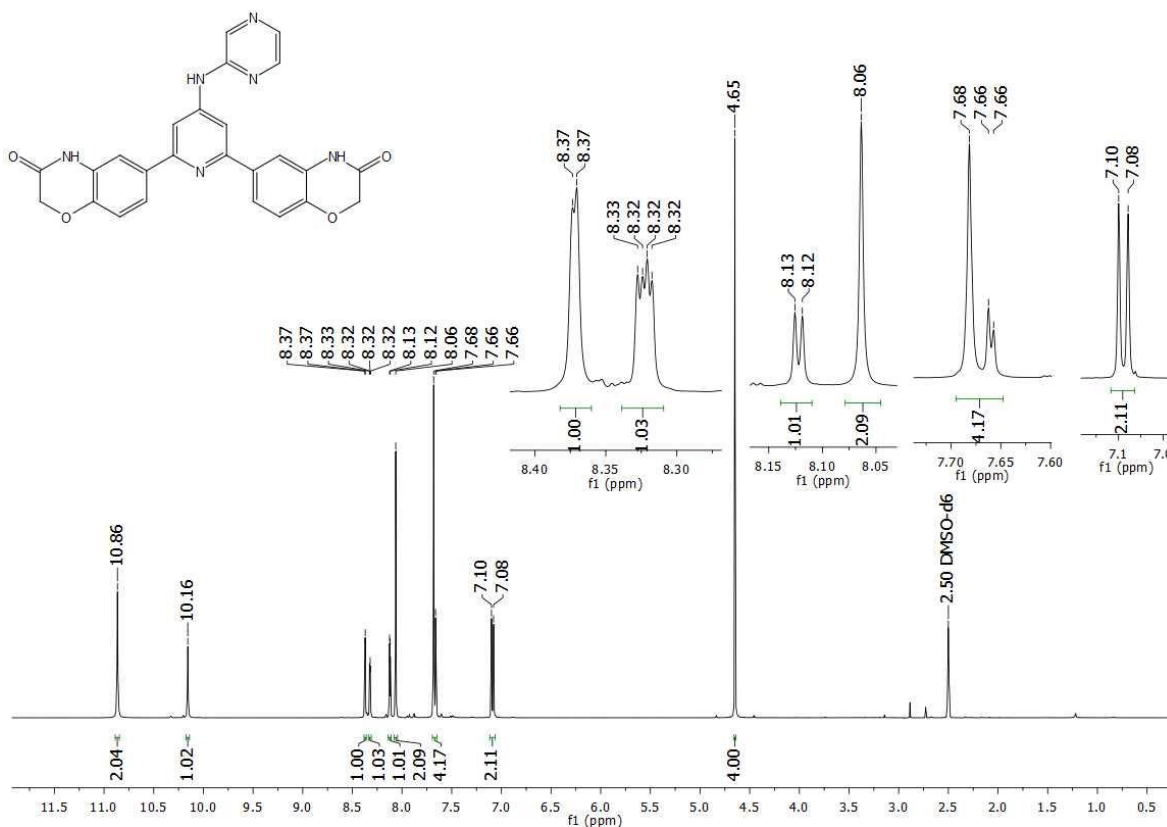


Espectro 66. IR (FTIR por reflectancia ATR, cm^{-1}) del compuesto 6,6'-[4-amino-*N*-(5-cloropirimidin-2-il)piridin-2,6-diil]bis(2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona) (JVM2).

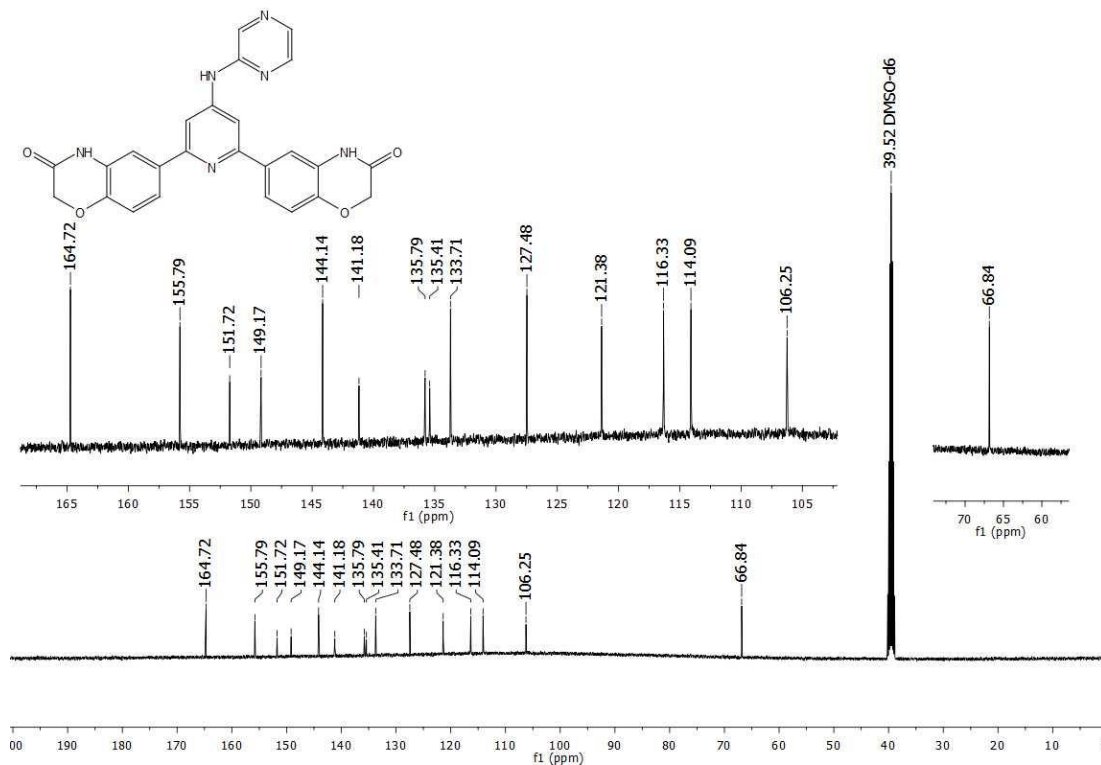
Data : Dr Cartillo Rafael042 Date : 26-Sep-2018 10:54
Instrument : MStation
Sample : 144 STE-7808 JVM2
Note : Operadores Javier Perez-Carmen Garcia
Inlet : Direct Ion Mode : EI+
RT : 0.94 min Scan# : (8,10)
Elements : C 25/0, H 20/0, Cl 1/0, N 6/0, O 4/0
Mass Tolerance : 1000ppm, 10mmu if m/z > 10
Unsaturation (U.S.) : -0.5 - 30.0

Observed m/z	Int%	Estimated m/z	Err [ppm / mmu]	U.S.	C	H	Cl	N	O
500.1018	59.16	500.1000	+3.6 / +1.8	20.0	25	17	1	6	4

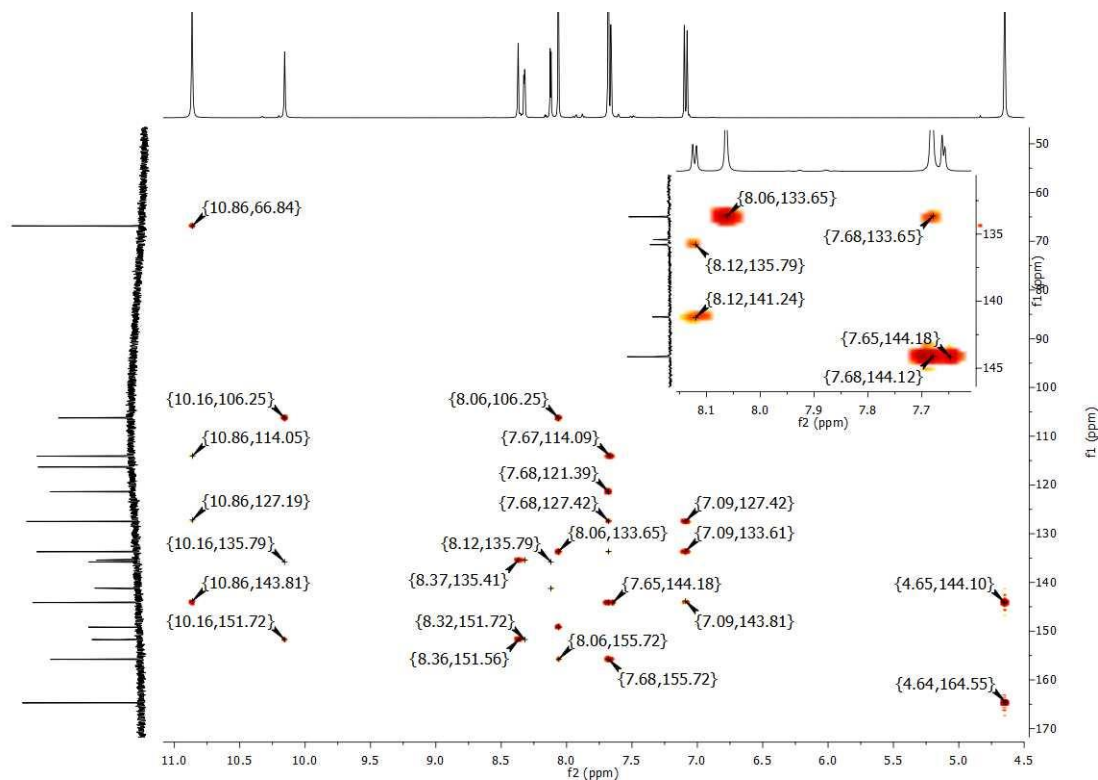
Espectro 67. EMAR (IE⁺, m/z) del compuesto 6,6'-[4-amino-N-(5-cloropirimidin-2-il)piridin-2,6-diil]bis(2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona) (**JVM2**).



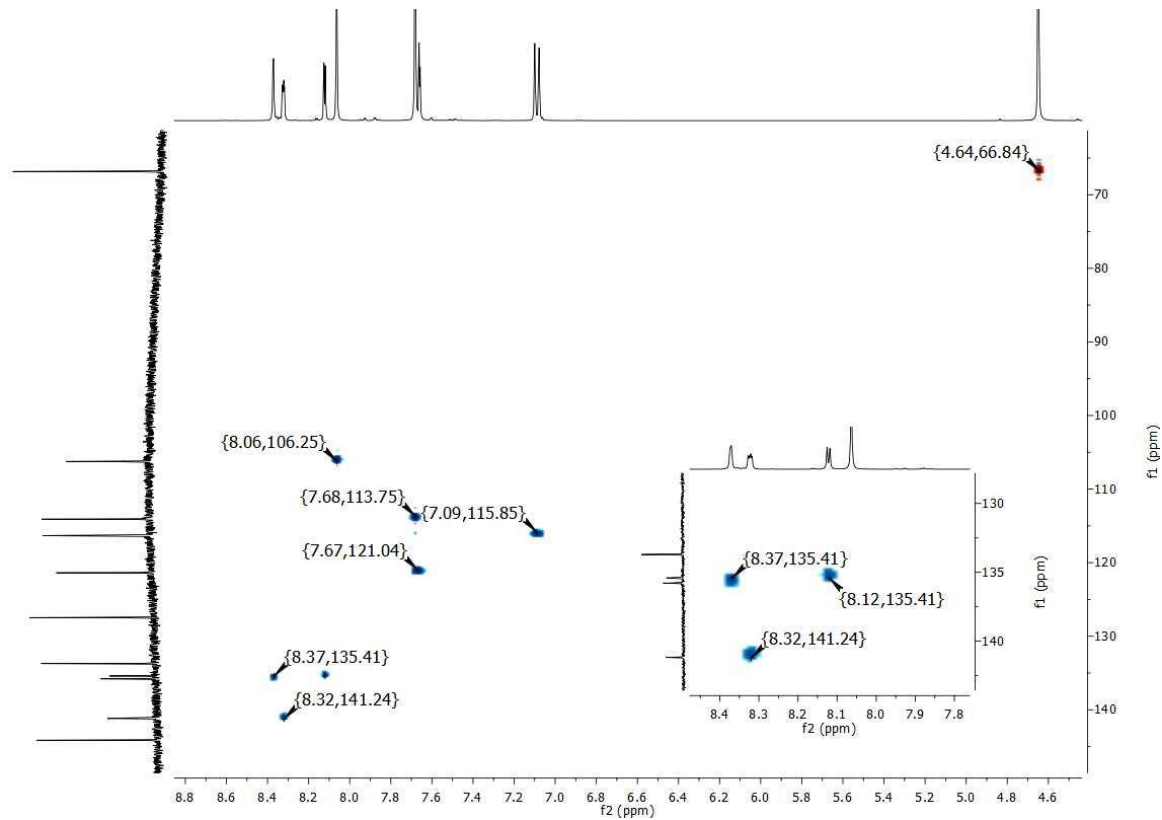
Espectro 68. RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆, 400 MHz, δ en ppm) del compuesto 6,6'-[4-amino-N-(pirazin-2-il)piridin-2,6-diil]bis(2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona) (**JVM3**).



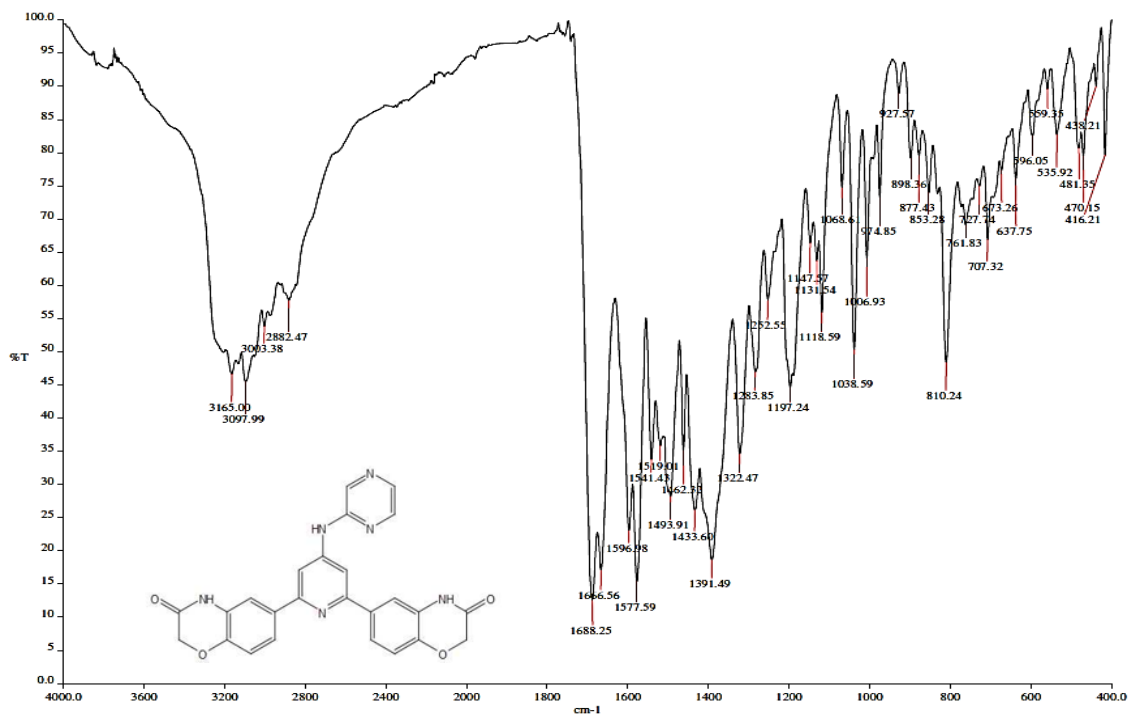
Espectro 69. RMN ^{13}C (TMS, DMSO- d_6 , 100 MHz, δ en ppm) del compuesto 6,6'-[4-amino-*N*-(pirazin-2-il)piridin-2,6-diil]bis(2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona) (JVM3).



Espectro 70. RMN ^1H (TMS, DMSO- d_6 , 400 MHz, δ en ppm), RMN ^{13}C (TMS, DMSO- d_6 , 100 MHz, δ en ppm). Experimento HMBC del compuesto 6,6'-[4-amino-*N*-(pirazin-2-il)piridin-2,6-diil]bis(2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona) (JVM3).



Espectro 71. RMN ^1H (TMS, $\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz, δ en ppm), RMN ^{13}C (TMS, $\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz, δ en ppm). Experimento HSQC del compuesto 6,6'-[4-amino-*N*-(pirazin-2-il)piridin-2,6-diil]bis(2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona) (JVM3).

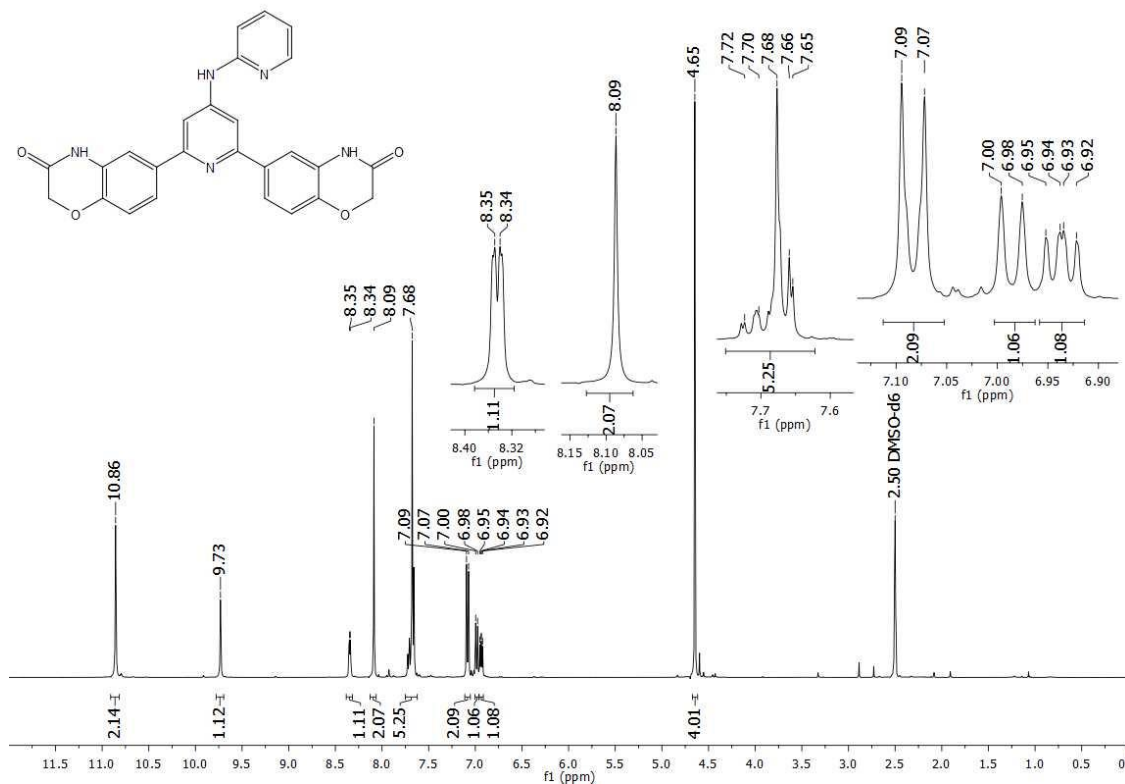


Espectro 72. IR (FTIR por reflectancia ATR, cm^{-1}) del compuesto 6,6'-[4-amino-*N*-(pirazin-2-il)piridin-2,6-diil]bis(2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona) (JVM3).

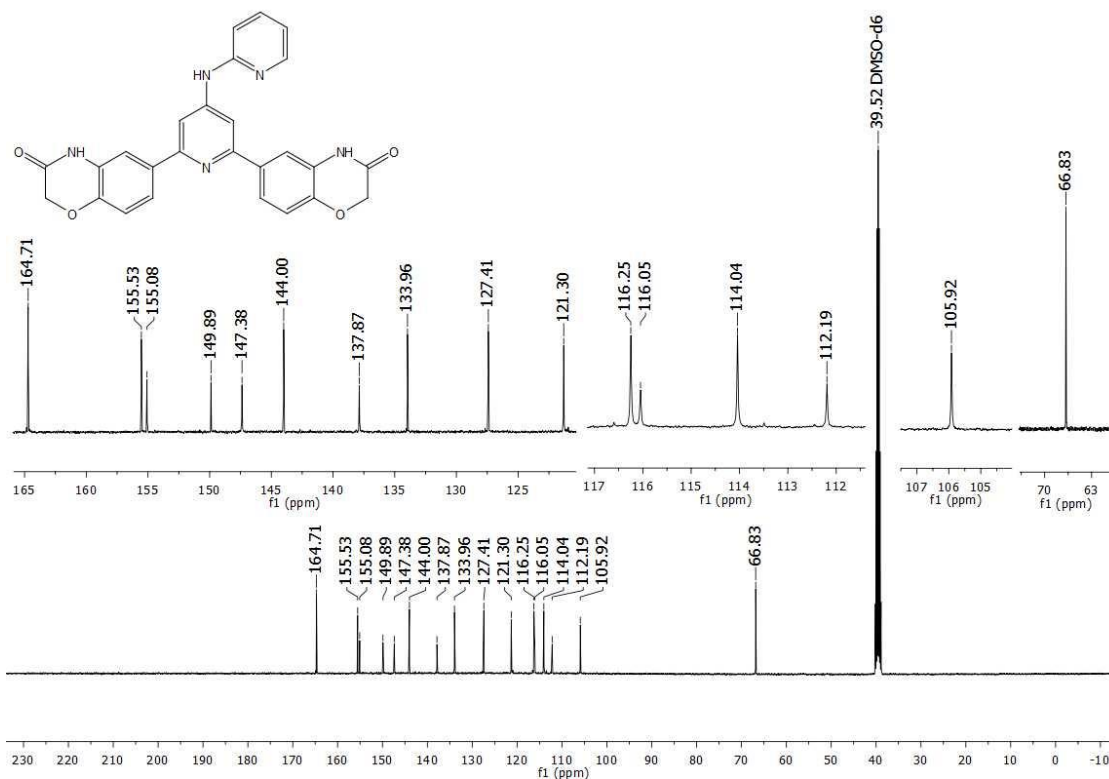
Data : Dr Castillo Rafael044 Date : 26-Sep-2018 11:02
 Instrument : MStation
 Sample : 145 STE-7809 JVM3
 Note : Operadores Javier Perez-Carmen Garcia
 Inlet : Direct Ion Mode : EI+
 RT : 7.24 min Scan# : (55,61)
 Elements : C 25/0, H 20/0, N 6/0, O 4/0
 Mass Tolerance : 1000ppm, 20mmu if m/z > 20
 Unsaturation (U.S.) : -0.5 - 30.0

Observed m/z	Int%	Estimated m/z	Err [ppm / mmu]	U.S.	C	H	N	O
466.1367	28.90	466.1390	-4.8 / -2.3	20.0	25	18	6	4

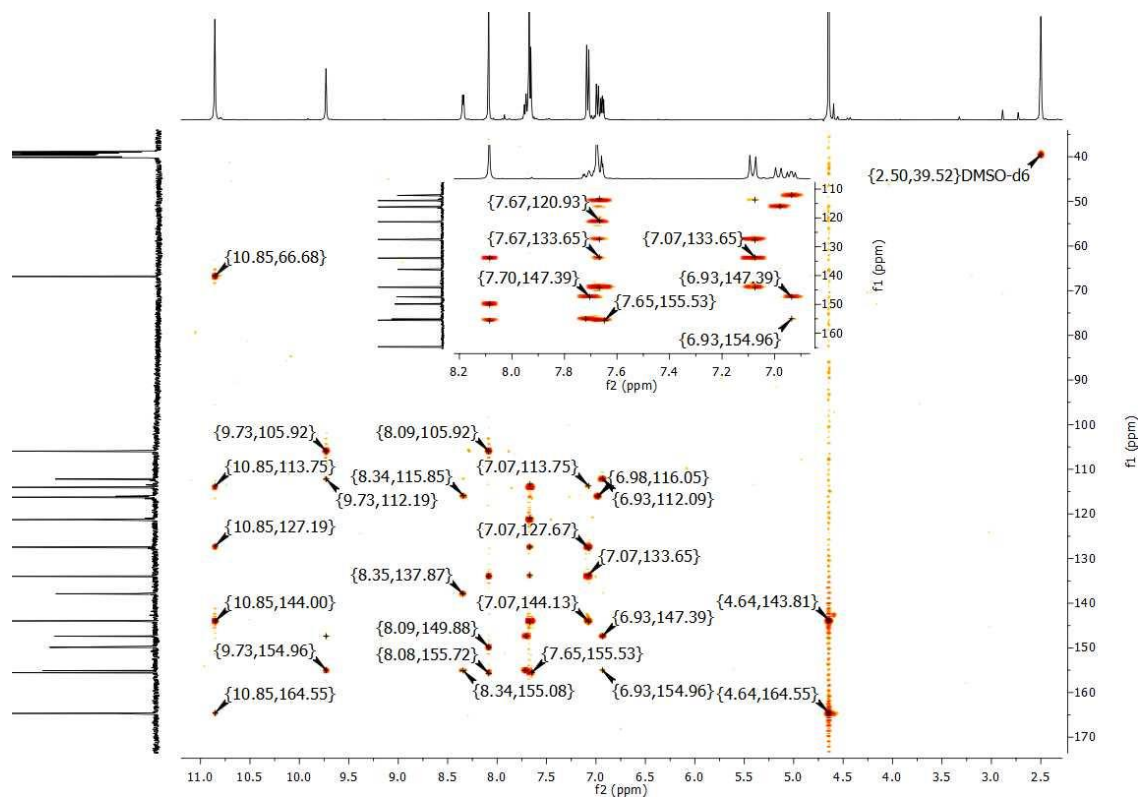
Espectro 73. EMAR (IE⁺, m/z) del compuesto 6,6'-[4-amino-N-(pirazin-2-il)piridin-2,6-diil]bis(2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona) (**JVM3**).



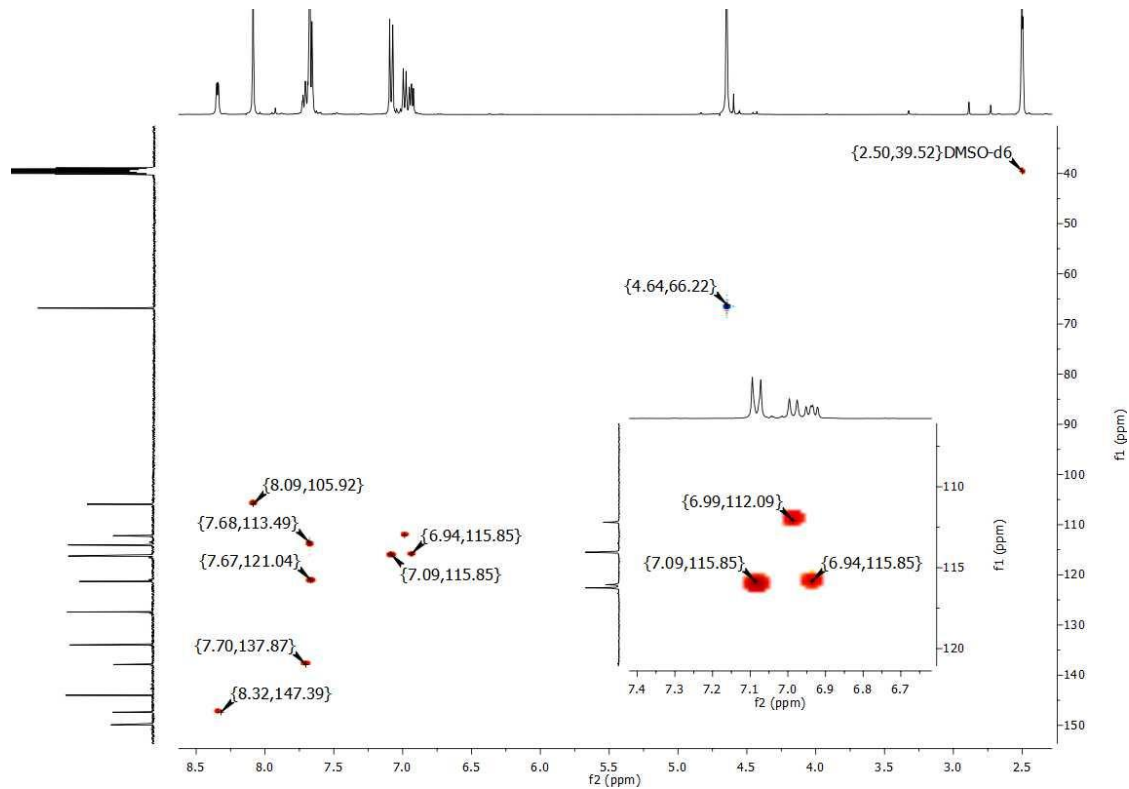
Espectro 74. RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆, 400 MHz, δ en ppm) del compuesto 6,6'-[4-amino-N-(2-piridinil)-2,6-diil]bis(2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona) (**JVM4**).



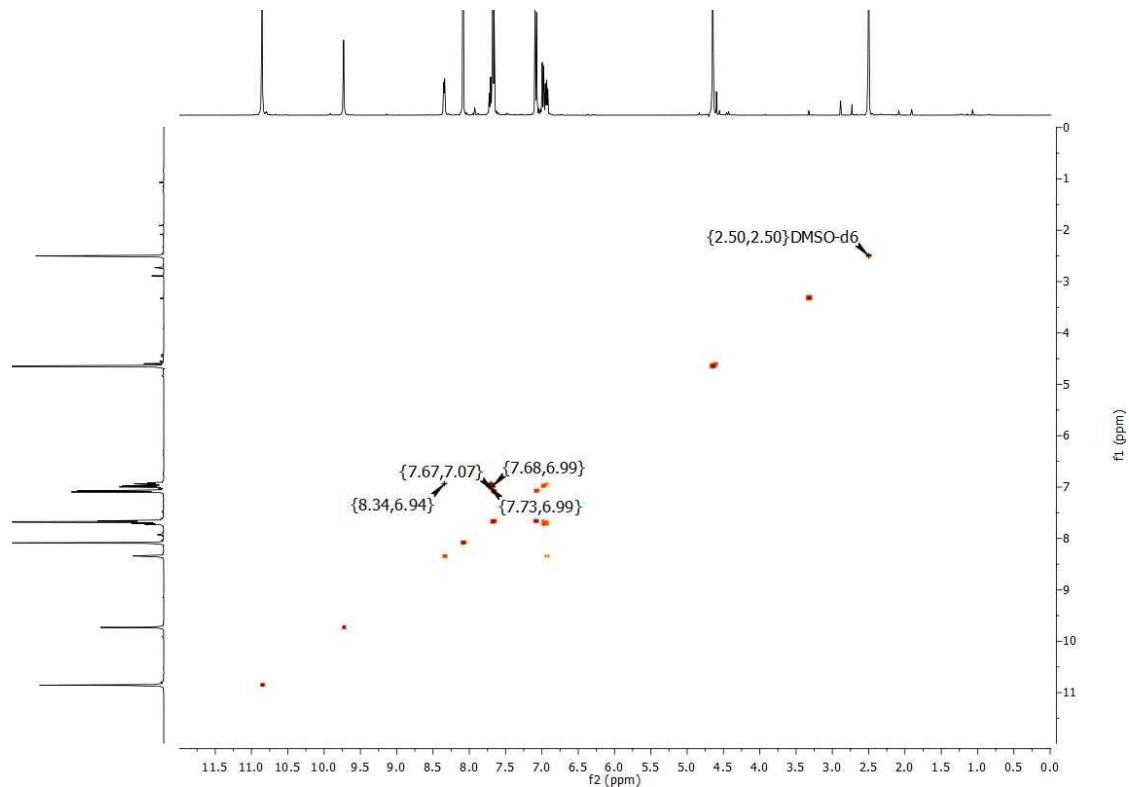
Espectro 75. RMN ^{13}C (TMS, DMSO- d_6 , 100 MHz, δ en ppm) del compuesto 6,6'-[4-amino-*N*-(2-piridinil)-2,6-diil]bis(2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona) (**JVM4**).



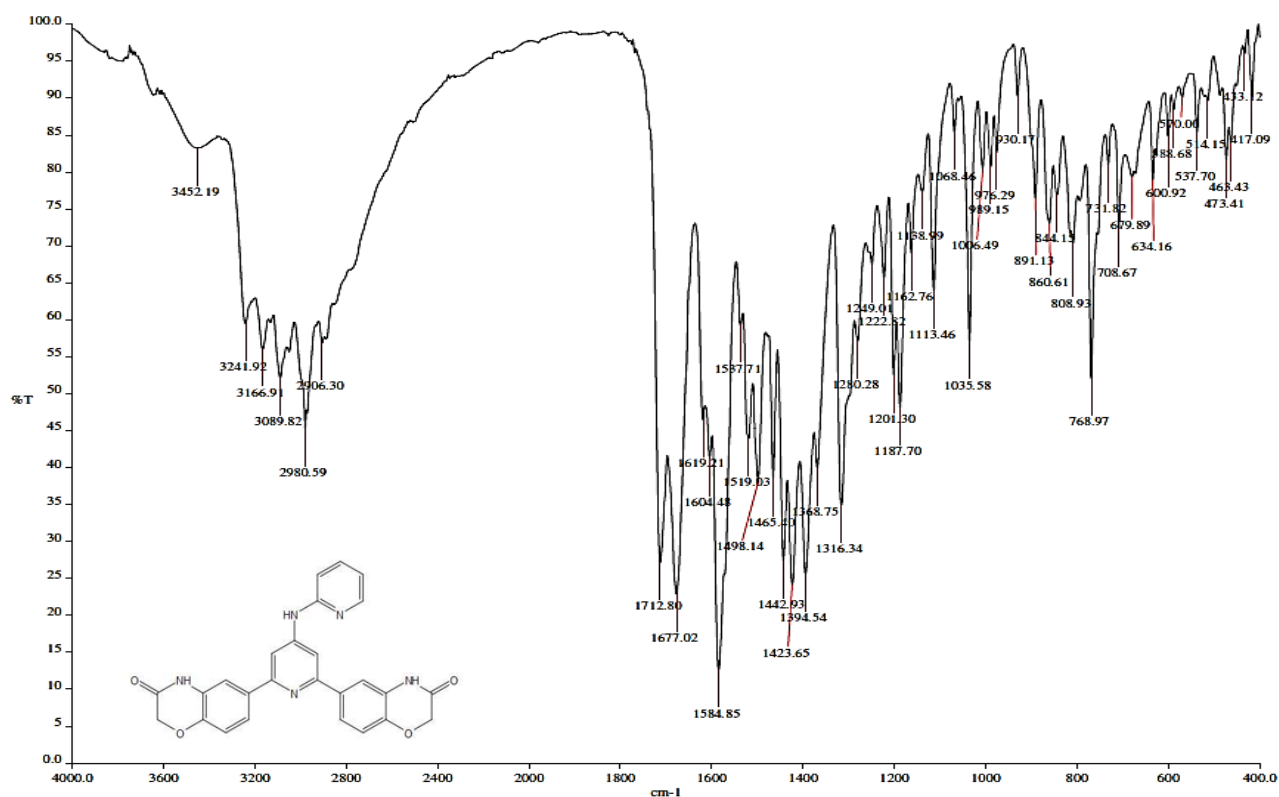
Espectro 76. RMN ^1H (TMS, DMSO- d_6 , 400 MHz, δ en ppm), RMN ^{13}C (TMS, DMSO- d_6 , 100 MHz, δ en ppm). Experimento HMBC del compuesto 6,6'-[4-amino-*N*-(2-piridinil)-2,6-diil]bis(2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona) (**JVM4**).



Espectro 77. RMN ^1H (TMS, DMSO- d_6 , 400 MHz, δ en ppm), RMN ^{13}C (TMS, DMSO- d_6 , 100 MHz, δ en ppm). Experimento HSQC del compuesto 6,6'-[4-amino-*N*-(2-piridinil)-2,6-diil]bis(2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona) (**JVM4**).



Espectro 78. RMN ^1H (TMS, DMSO- d_6 , 400 MHz, δ en ppm). Experimento COSY del compuesto 6,6'-[4-amino-*N*-(2-piridinil)-2,6-diil]bis(2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona) (**JVM4**).



Espectro 79. IR (FTIR por reflectancia ATR, cm^{-1}) del compuesto 6,6'-[4-amino-*N*-(2-piridinil)-2,6-diil]bis(2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona) (JVM4).

Data : Dr Castillo Rafael045 Date : 26-Sep-2018 11:16

Instrument : MStation

Sample : 146 STE-7810 JVM4

Note : Operadores Javier Perez-Carmen Garcia

Inlet : Direct Ion Mode : EI+

RT : 3.22 min Scan# : (25,28)

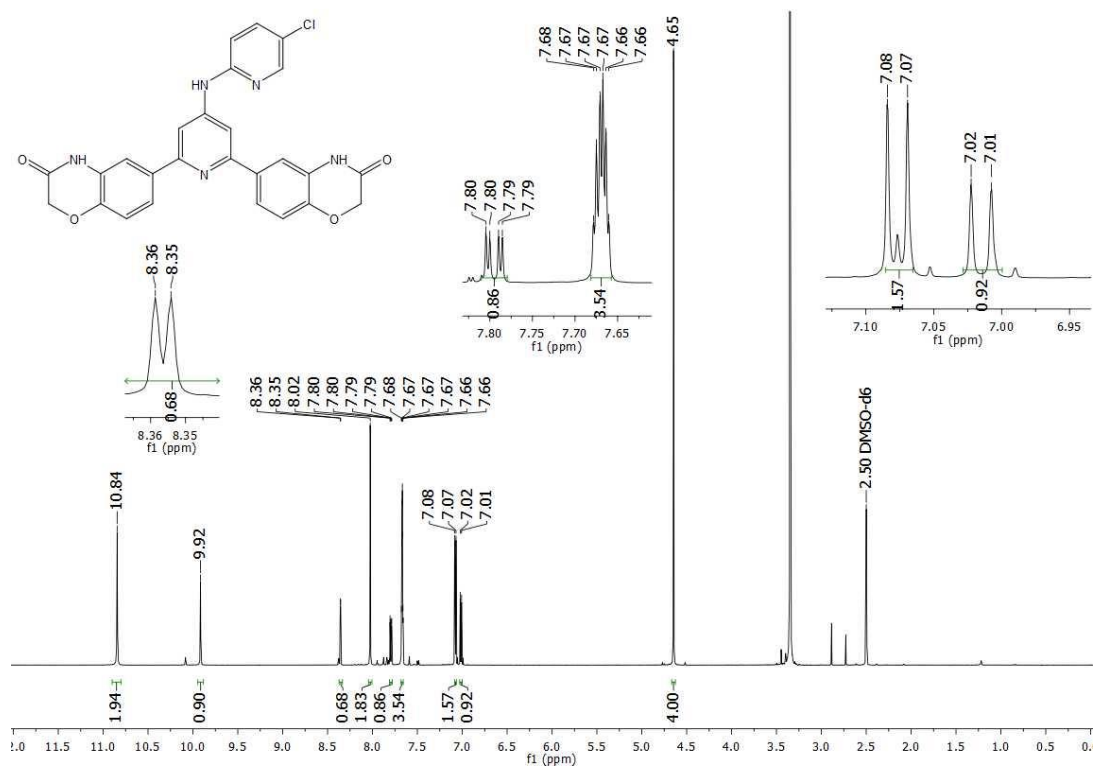
Elements : C 26/0, H 21/0, N 6/0, O 5/0

Mass Tolerance : 1000ppm, 5mmu if $m/z > 5$

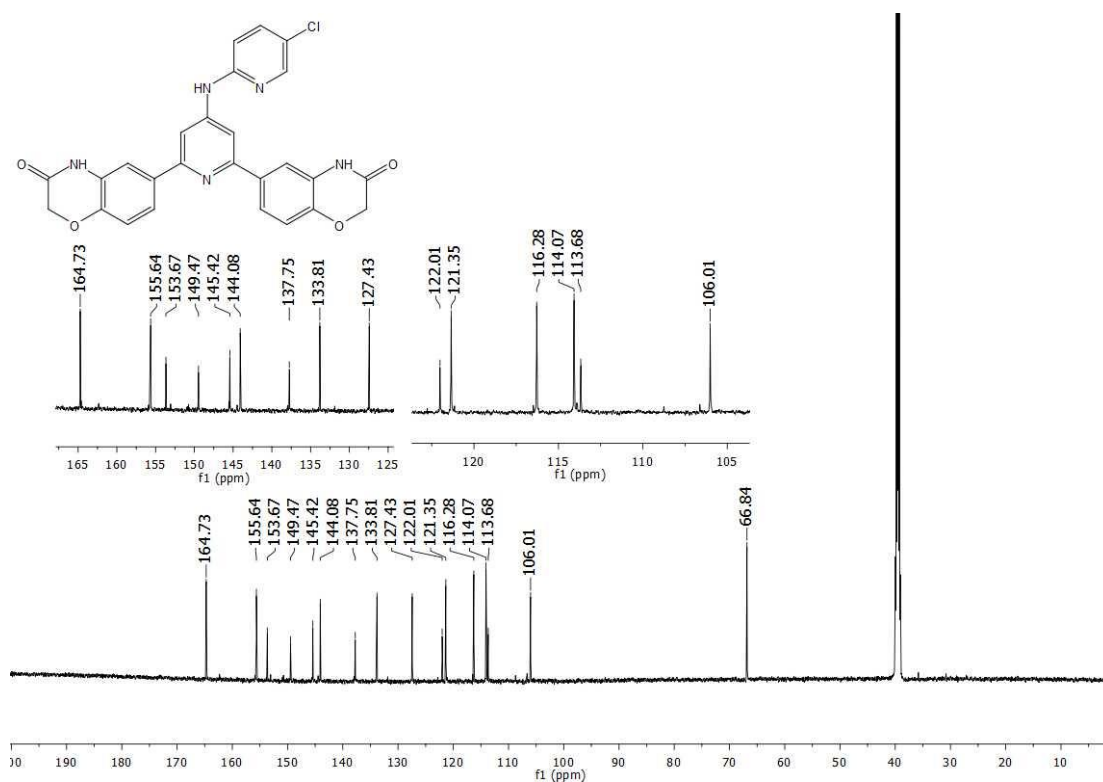
Unsaturation (U.S.) : -0.5 - 30.0

Observed m/z	Int%	Estimated m/z	Err [ppm / mmu]	U.S.	C	H	N	O
465.1462	20.13	465.1437	+5.4 / +2.5	20.0	26	19	5	4

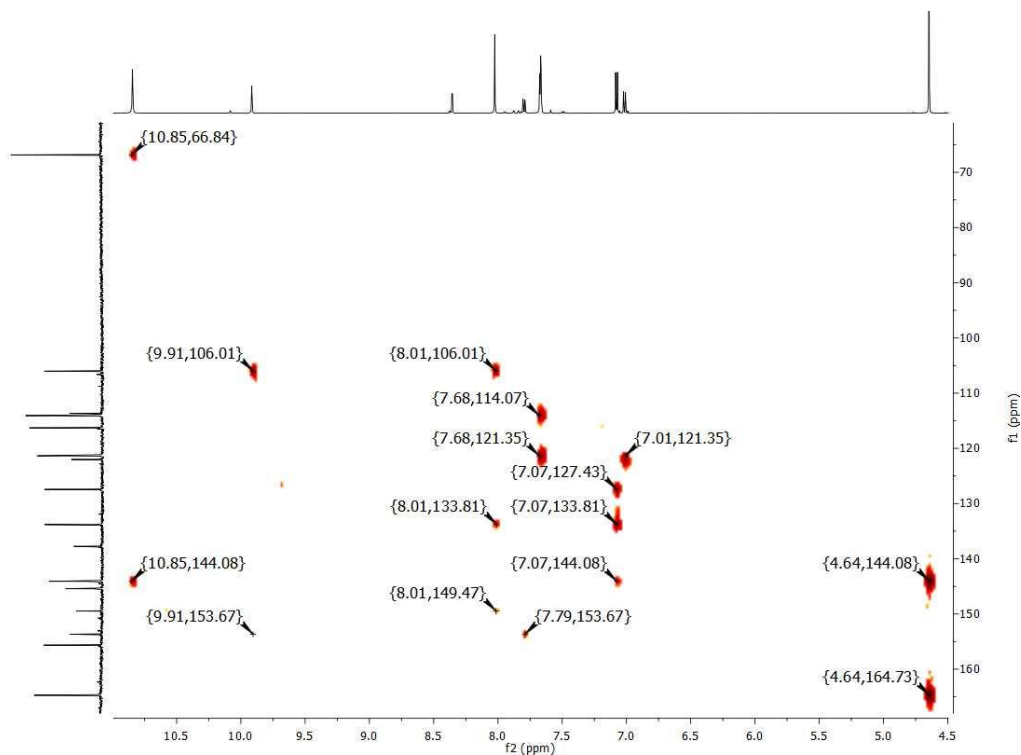
Espectro 80. EMAR (IE⁺, m/z) del compuesto 6,6'-[4-amino-*N*-(2-piridinil)-2,6-diil]bis(2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona) (JVM4).



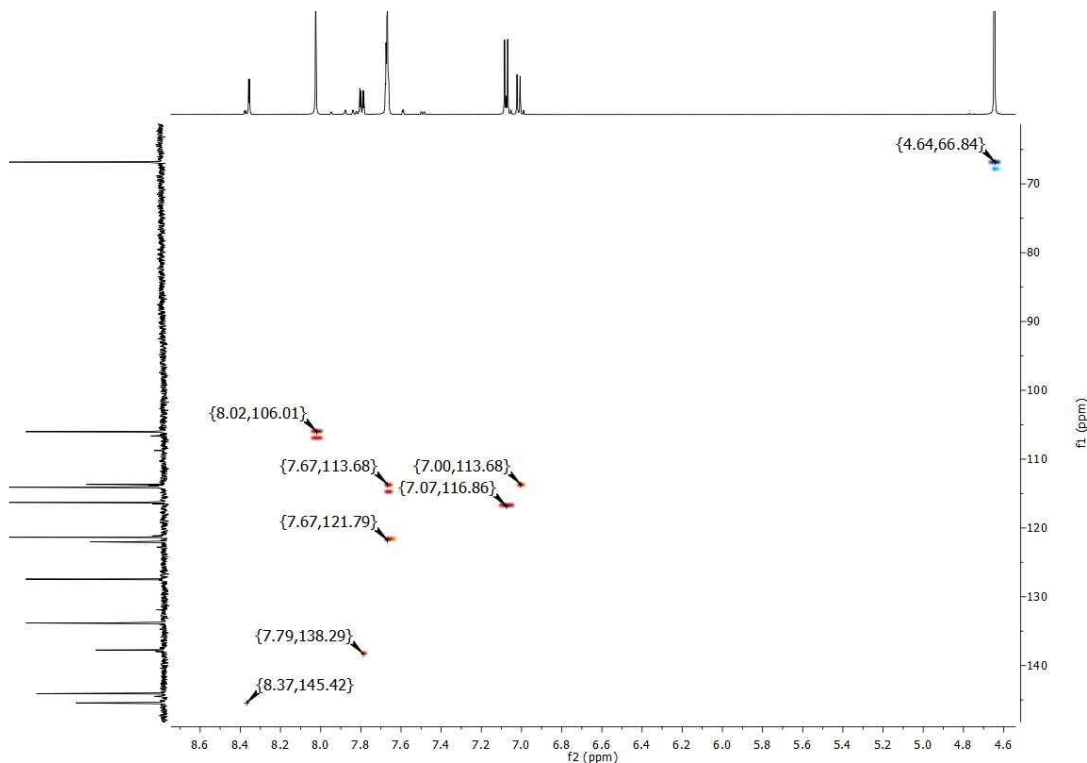
Espectro 81. RMN ¹H (TMS, DMSO-*d*₆, 400 MHz, δ en ppm) del compuesto 6,6'-[4-amino-*N*-(5-cloropiridin-2-il)piridin-2,6-diil]bis(2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona) (**JVM5**).



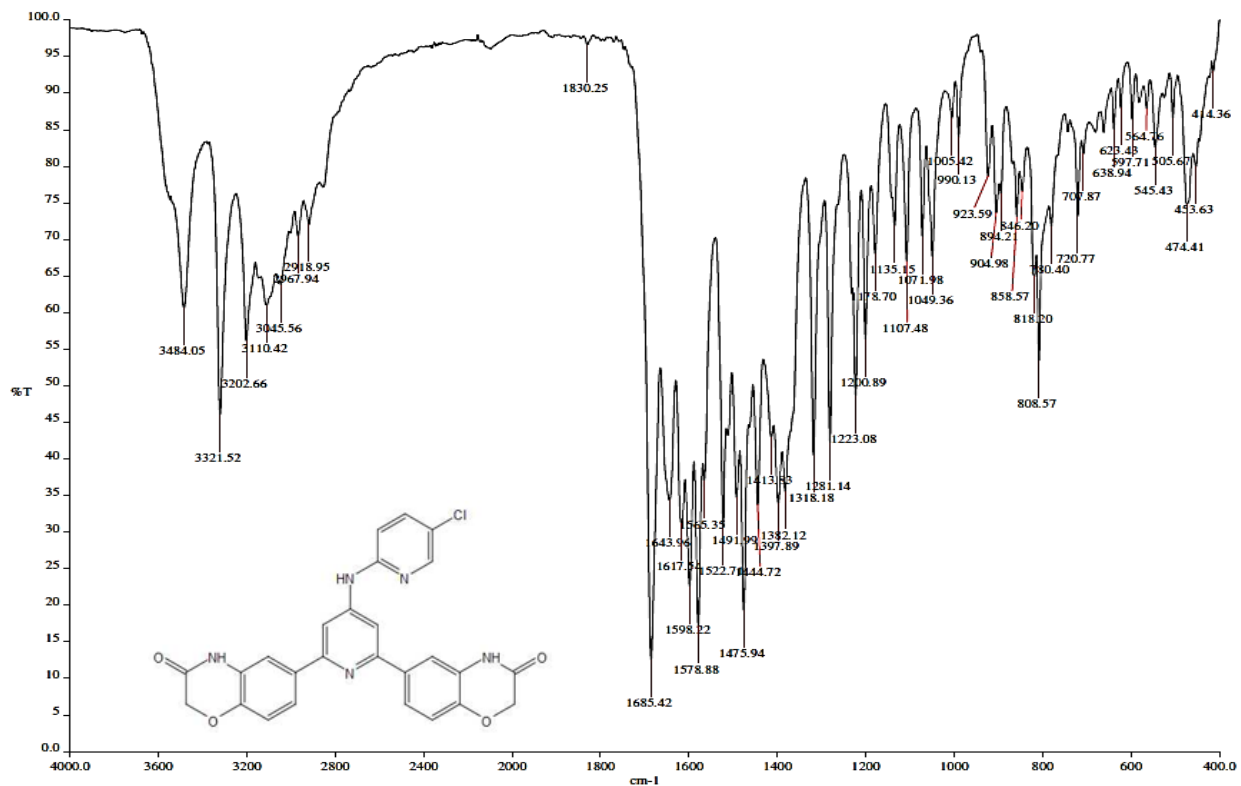
Espectro 82. RMN ¹³C (TMS, DMSO-*d*₆, 100 MHz, δ en ppm) del compuesto 6,6'-[4-amino-*N*-(5-cloropiridin-2-il)piridin-2,6-diil]bis(2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona) (**JVM5**).



Espectro 83. RMN ^1H (TMS, DMSO- d_6 , 400 MHz, δ en ppm), RMN ^{13}C (TMS, DMSO- d_6 , 100 MHz, δ en ppm). Experimento HMBC del compuesto 6,6'-[4-amino-*N*-(5-cloropiridin-2-il)piridin-2,6-diil]bis(2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona) (JVM5).



Espectro 84. RMN ^1H (TMS, DMSO- d_6 , 400 MHz, δ en ppm), RMN ^{13}C (TMS, DMSO- d_6 , 100 MHz, δ en ppm). Experimento HSQC del compuesto 6,6'-[4-amino-*N*-(5-cloropiridin-2-il)piridin-2,6-diil]bis(2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona) (JVM5).



Espectro 85. IR (FTIR por reflectancia ATR, cm^{-1}) del compuesto 6,6'-[4-amino-*N*-(5-cloropiridin-2-il)piridin-2,6-diil]bis(2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona) (JVM5).

Data : Dr Castillo Rafael046 Date : 26-Sep-2018 11:21

Instrument : MStation

Sample : 147 STE-7811 JVM5

Note : Operadores Javier Perez-Carmen Garcia

Inlet : Direct Ion Mode : EI+

RT : 3.62 min Scan# : (28,31)

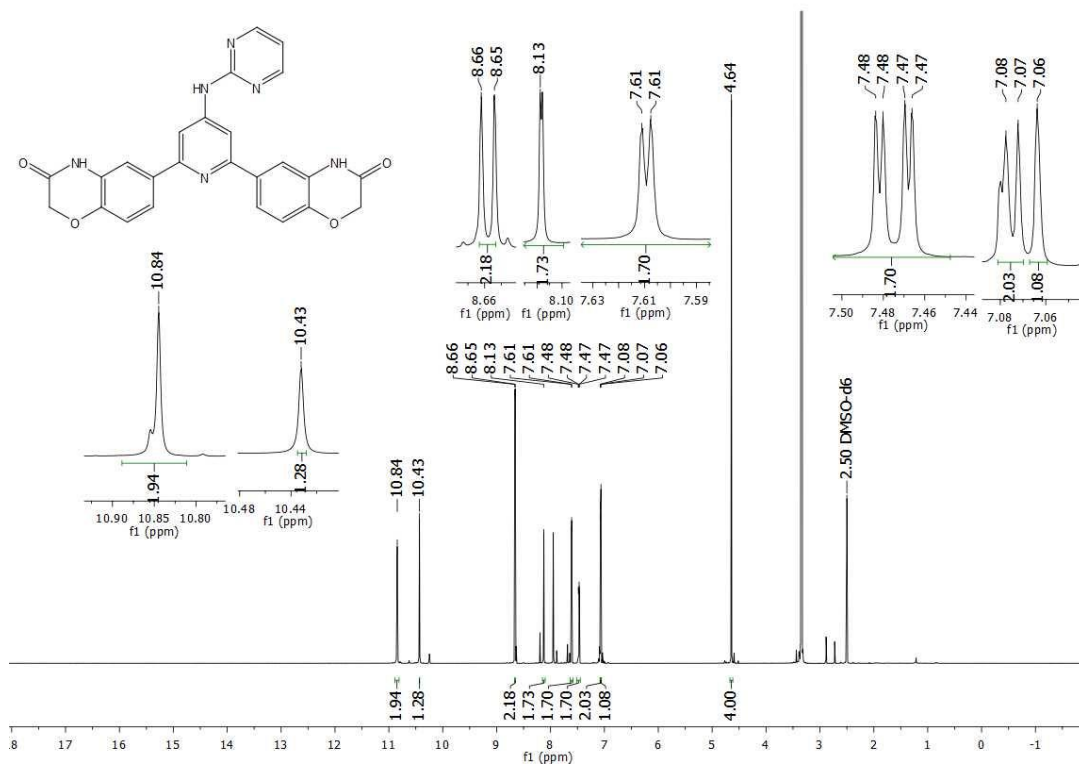
Elements : C 30/0, H 27/0, Cl 1/0, N 5/0, O 4/0

Mass Tolerance : 1000ppm, 4mmu if $m/z > 4$

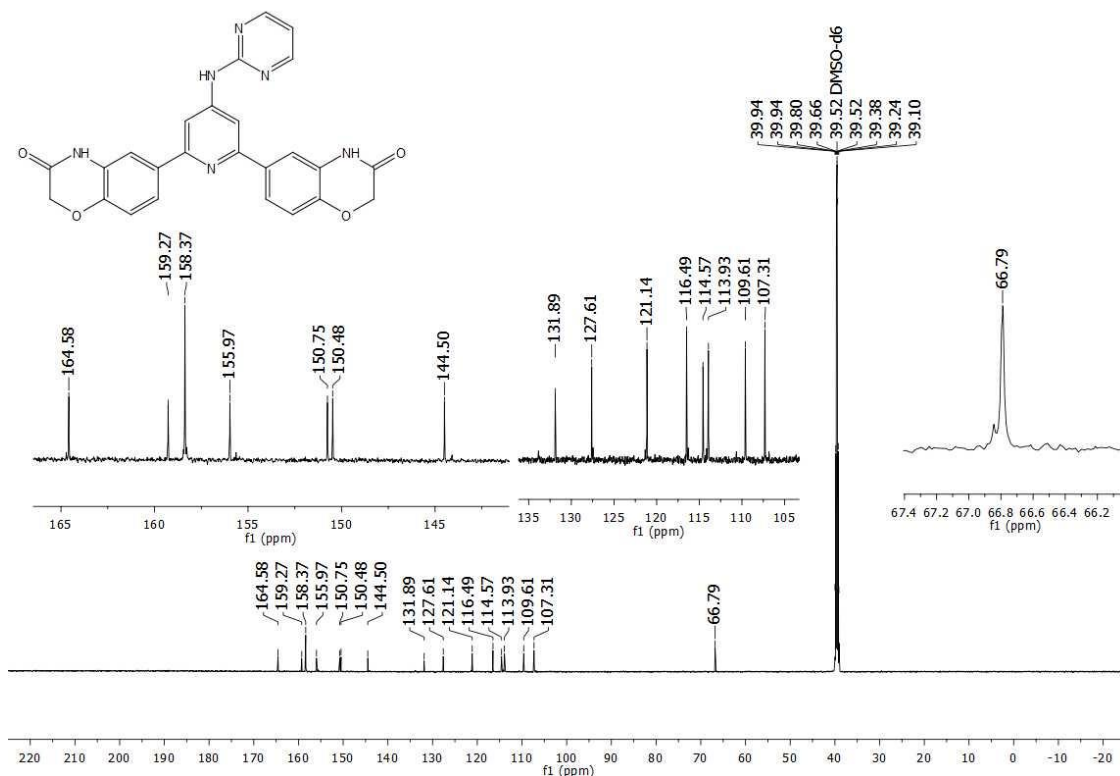
Unsaturation (U.S.) : -0.5 - 30.0

Observed m/z	Int%	Estimated m/z	Err [ppm / mmu]	U.S.	C	H	Cl	N	O
499.1077	100.00								
1	499.1047	+5.9 / +3.0	20.0	26	18	1	5	4	

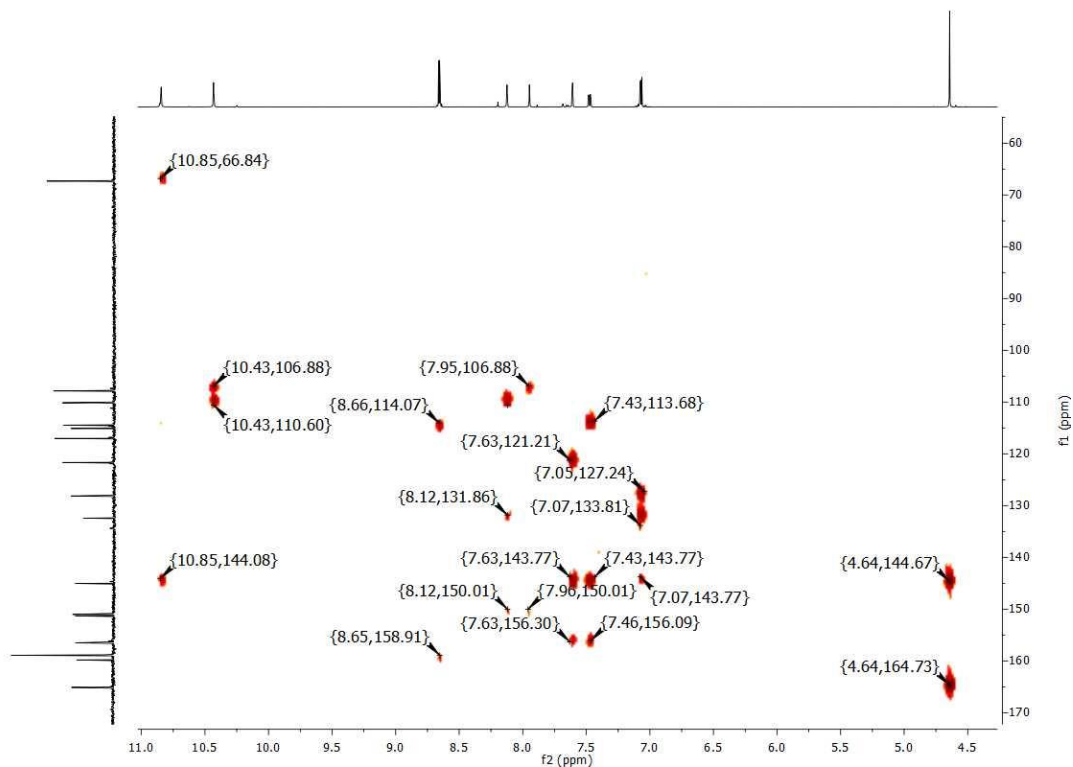
Espectro 86. EMAR (IE^+ , m/z) del compuesto 6,6'-[4-amino-*N*-(5-cloropiridin-2-il)piridin-2,6-diil]bis(2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona) (JVM5).



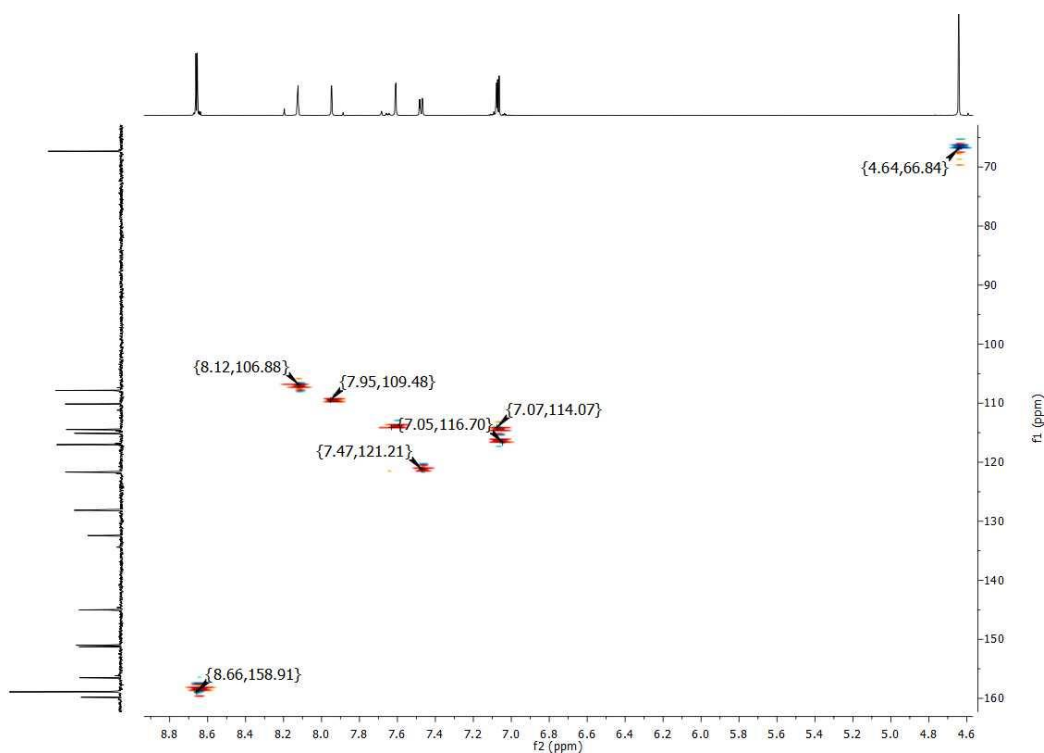
Espectro 87. RMN ¹H (TMS, DMSO-*d*₆, 400 MHz, δ en ppm) del compuesto 6,6'-[4-amino-*N*-(pirimidin-2-il)piridin-2,6-diil]bis(2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona) (JVM6).



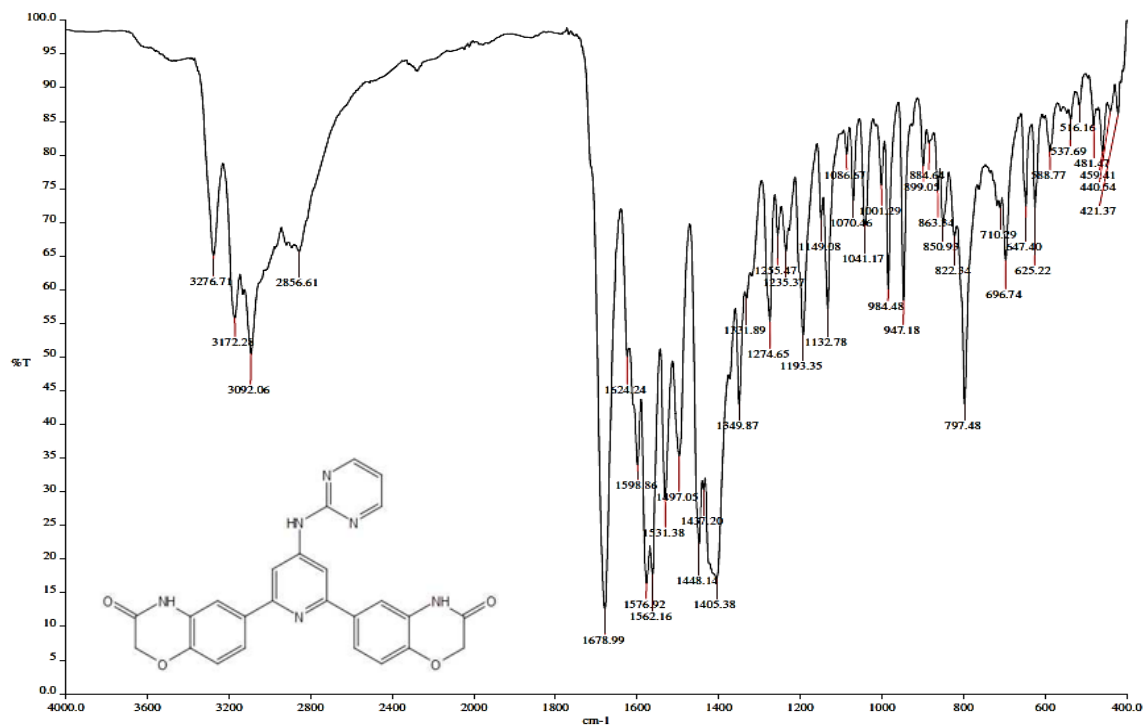
Espectro 88. RMN ¹³C (TMS, DMSO-*d*₆, 100 MHz, δ en ppm) del compuesto 6,6'-[4-amino-*N*-(pirimidin-2-il)piridin-2,6-diil]bis(2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona) (JVM6).



Espectro 89. RMN ^1H (TMS, DMSO- d_6 , 400 MHz, δ en ppm), RMN ^{13}C (TMS, DMSO- d_6 , 100 MHz, δ en ppm). Experimento HMBC del compuesto 6,6'-[4-amino-*N*-(pirimidin-2-il)piridin-2,6-diil]bis(2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona) (JVM6).



Espectro 90. RMN ^1H (TMS, DMSO- d_6 , 400 MHz, δ en ppm), RMN ^{13}C (TMS, DMSO- d_6 , 100 MHz, δ en ppm). Experimento HSQC del compuesto 6,6'-[4-amino-*N*-(pirimidin-2-il)piridin-2,6-diil]bis(2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona) (JVM6).



Espectro 91. IR (FTIR por reflectancia ATR, cm^{-1}) del compuesto 6,6'-[4-amino-*N*-(pirimidin-2-il)piridin-2,6-diil]bis(2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona) (**JVM6**).

Data : Dr Castillo Rafael047 Date : 26-Sep-2018 11:30

Instrument : MStation

Sample : 148 STE-7812 JVM6

Note : Operadores Javier Perez-Carmen Garcia

Inlet : Direct Ion Mode : EI+

RT : 3.09 min Scan# : (24,28)

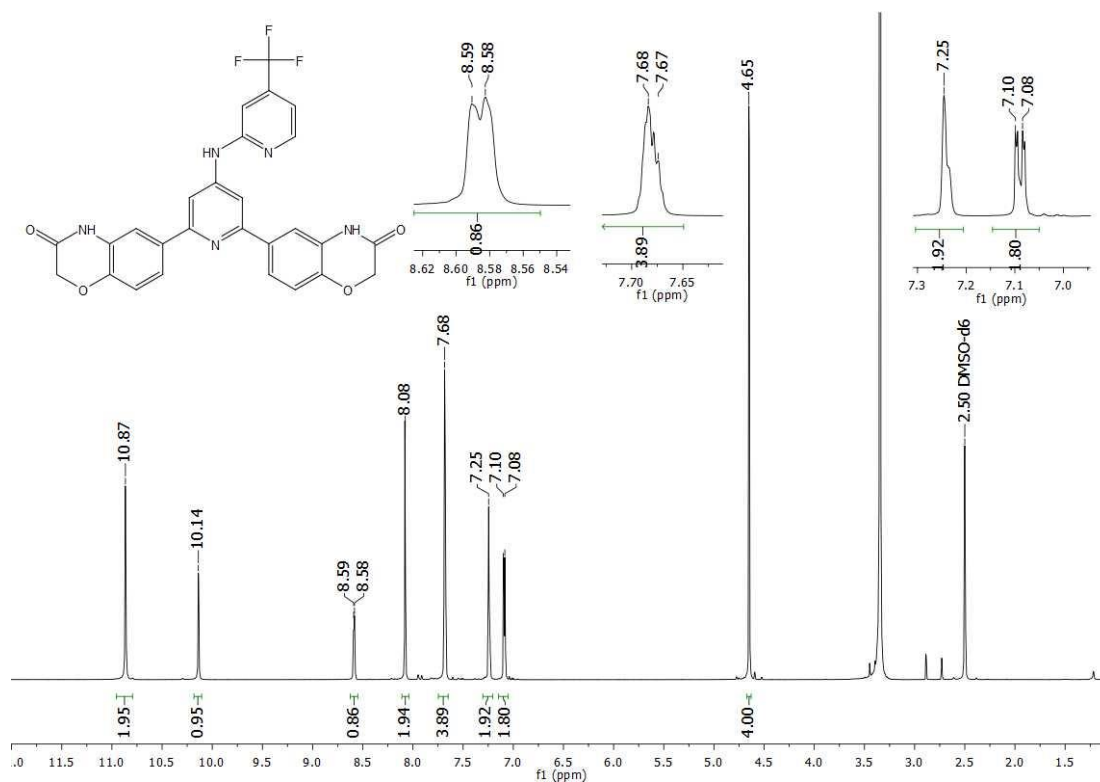
Elements : C 25/0, H 20/0, N 6/0, O 5/0

Mass Tolerance : 1000ppm, 20mmu if $m/z > 20$

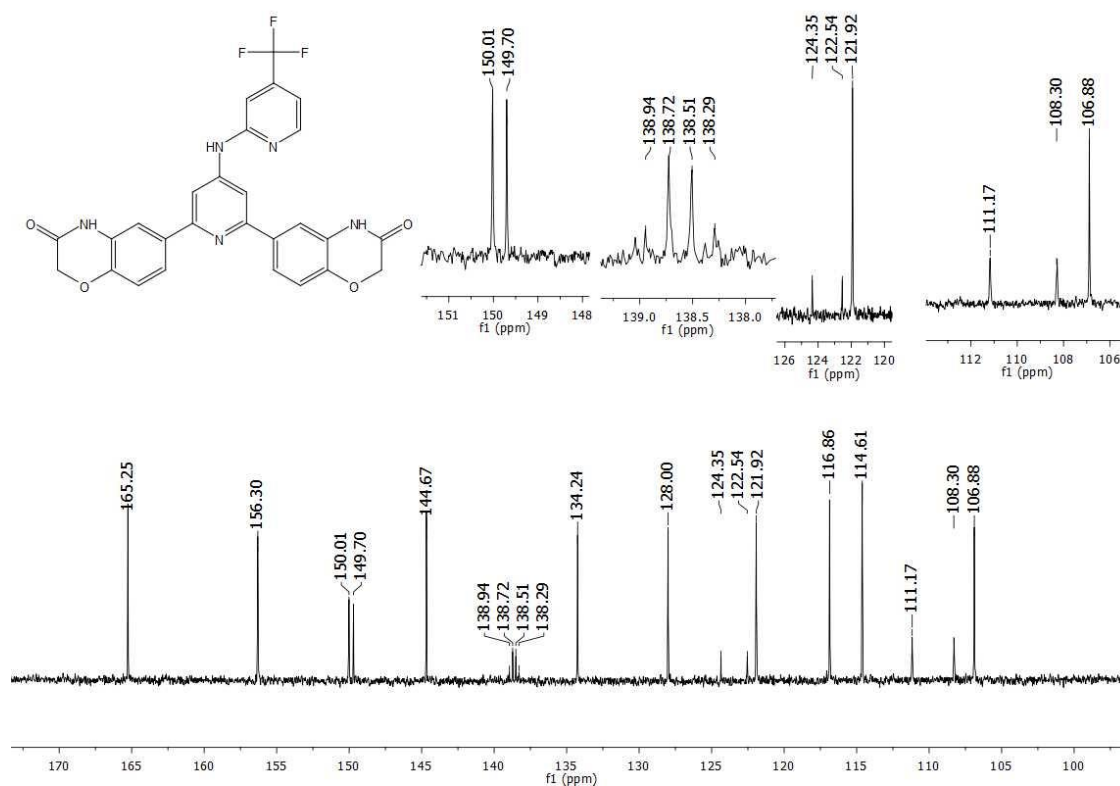
Unsaturation (U.S.) : -0.5 - 50.0

Observed m/z	Int%	Estimated m/z	Err [ppm / mmu]	U.S.	C	H	N	O
466.1372	1.33							
1 466.1390			-3.8 / -1.8	20.0	25	18	6	4

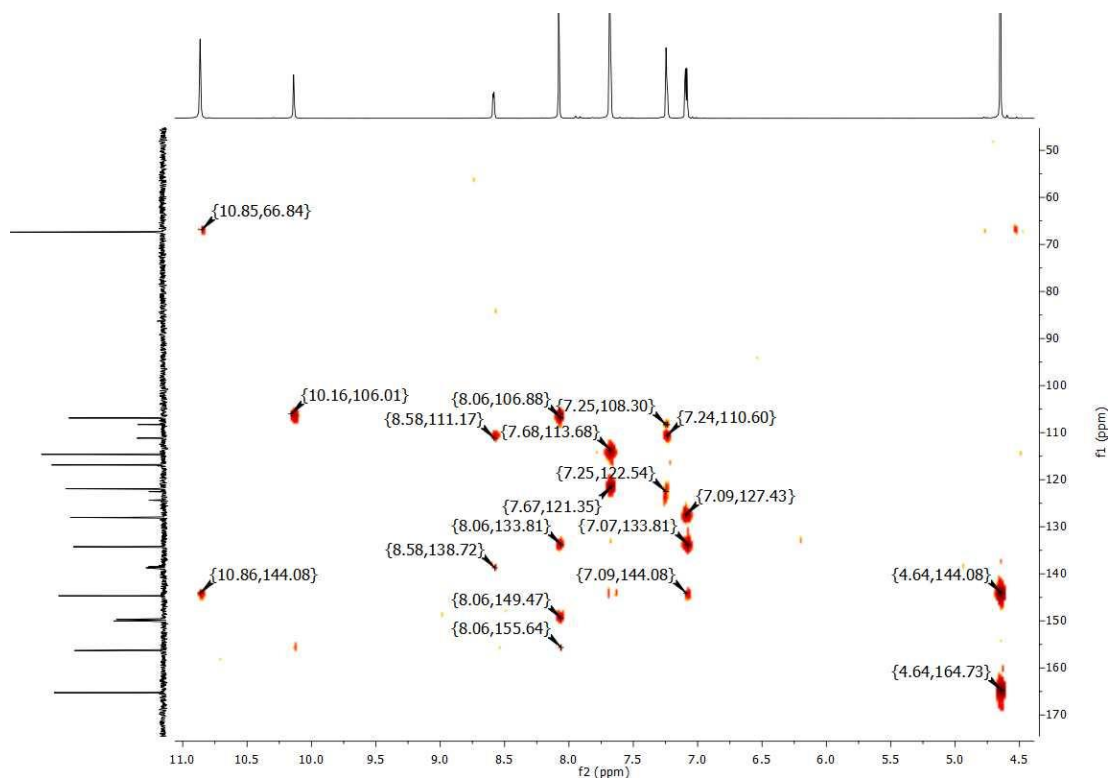
Espectro 92. EMAR (IE^+ , m/z) del compuesto 6,6'-[4-amino-*N*-(pirimidin-2-il)piridin-2,6-diil]bis(2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona) (**JVM6**).



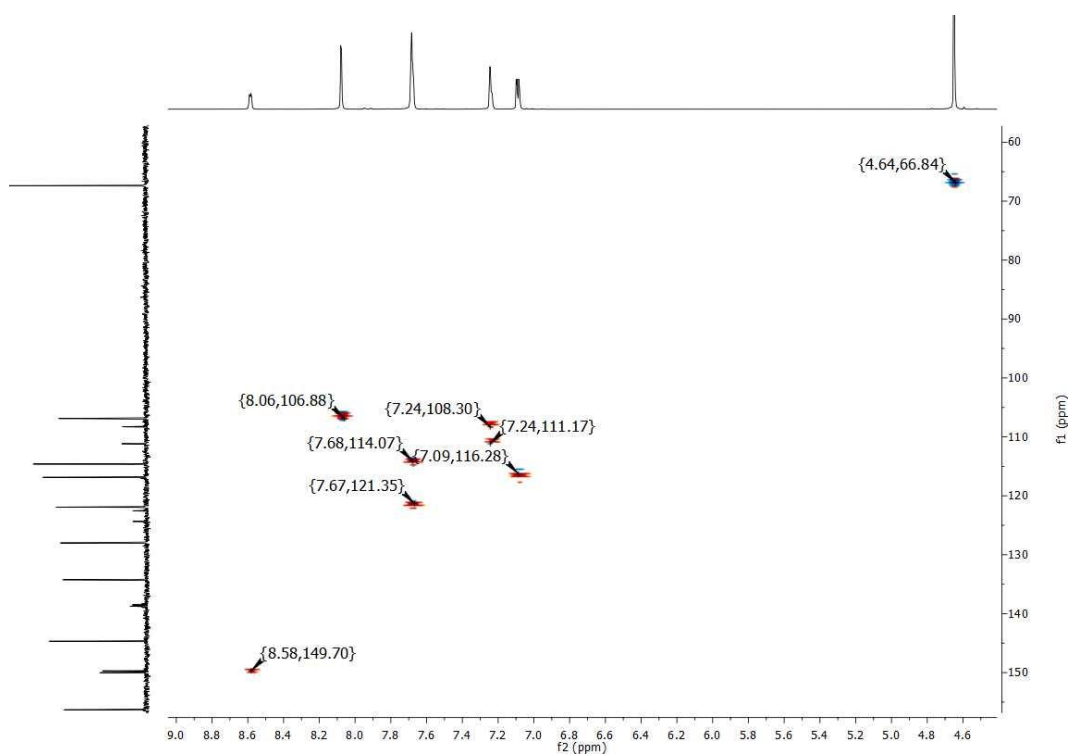
Espectro 93. RMN ¹H (TMS, DMSO-*d*₆, 400 MHz, δ en ppm) del compuesto 6,6'-[4-amino-*N*-(4-trifluorometilpiridin-2-il)piridin-2,6-diil]bis(2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona) (**JVM7**).



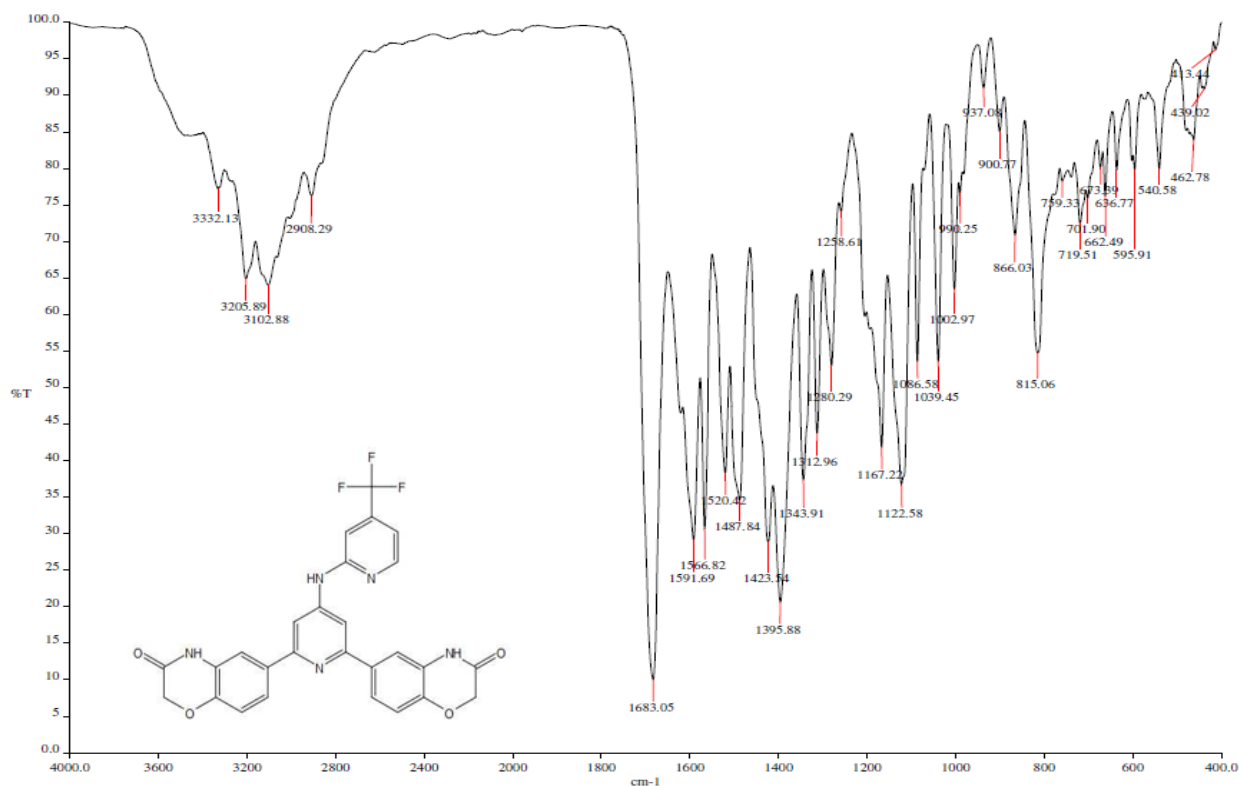
Espectro 94. RMN ¹³C (TMS, DMSO-*d*₆, 100 MHz, δ en ppm) del compuesto 6,6'-[4-amino-*N*-(4-trifluorometilpiridin-2-il)piridin-2,6-diil]bis(2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona) (**JVM7**).



Espectro 95. RMN ^1H (TMS, DMSO- d_6 , 400 MHz, δ en ppm), RMN ^{13}C (TMS, DMSO- d_6 , 100 MHz, δ en ppm). Experimento HMBC del compuesto 6,6'-[4-amino-*N*-(4-trifluorometilpiridin-2-il)piridin-2,6-diil]bis(2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona) (JVM7).



Espectro 96. RMN ^1H (TMS, DMSO- d_6 , 400 MHz, δ en ppm), RMN ^{13}C (TMS, DMSO- d_6 , 100 MHz, δ en ppm). Experimento HSQC del compuesto 6,6'-[4-amino-*N*-(4-trifluorometilpiridin-2-il)piridin-2,6-diil]bis(2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona) (JVM7).



Espectro 97. IR (FTIR por reflectancia ATR, cm⁻¹) del compuesto 6,6'-[4-amino-*N*-(4-trifluorometilpiridin-2-il)piridin-2,6-diil]bis(2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona) (**JVM7**).

Data : Dr Castillo Rafael048 Date : 26-Sep-2018 11:35

Instrument : MStation

Sample : 149 STE-7813 JVM7

Note : Operadores Javier Perez-Carmen Garcia

Inlet : Direct Ion Mode : EI+

RT : 0.94 min Scan# : (8,9)

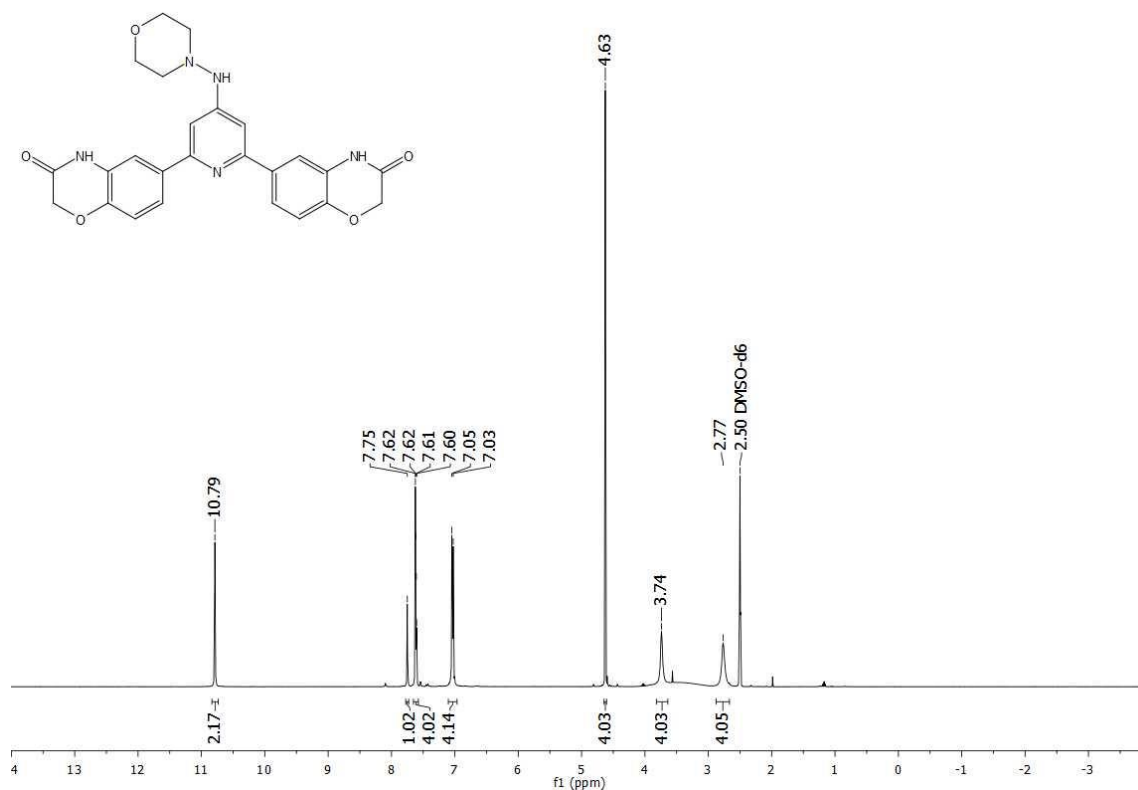
Elements : C 30/0, H 20/0, F 3/3, N 5/0, O 4/0

Mass Tolerance : 1000ppm, 3mmu if m/z > 3

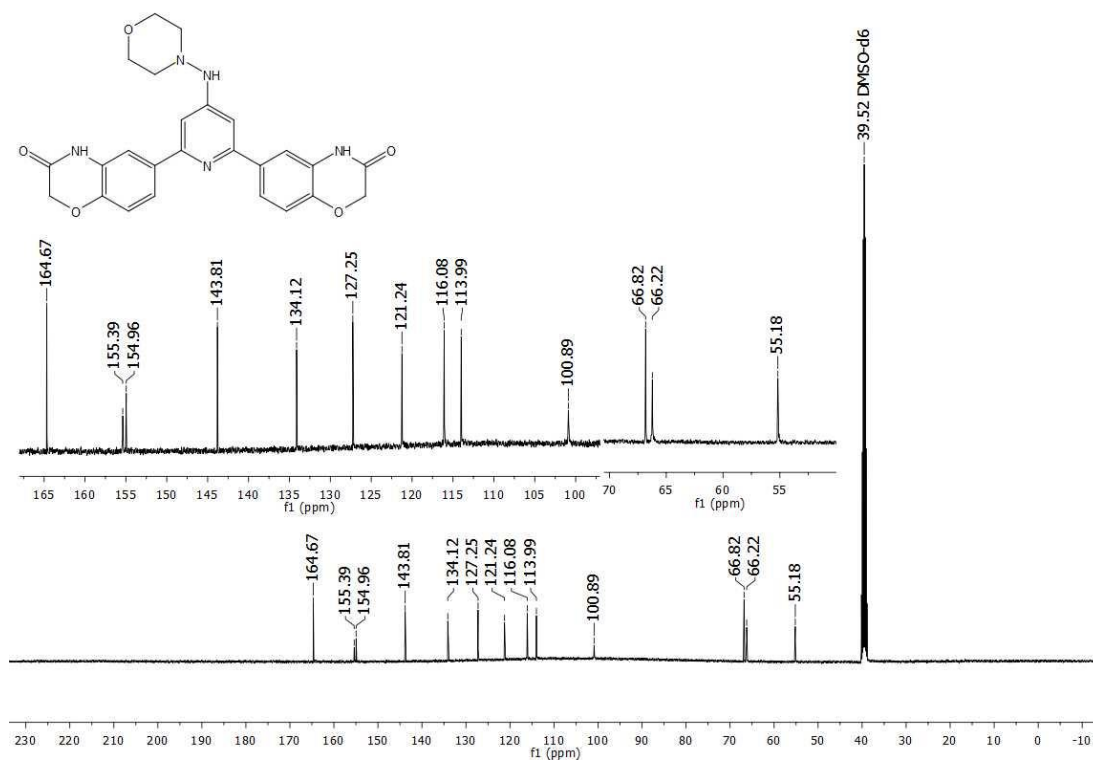
Unsaturation (U.S.) : -0.5 - 30.0

Observed m/z	Int%	Estimated m/z	Err [ppm / mmu]	U.S.	C	H	F	N	O
533.1321	100.00	533.1311	+1.9 / +1.0	20.0	27	18	3	5	4

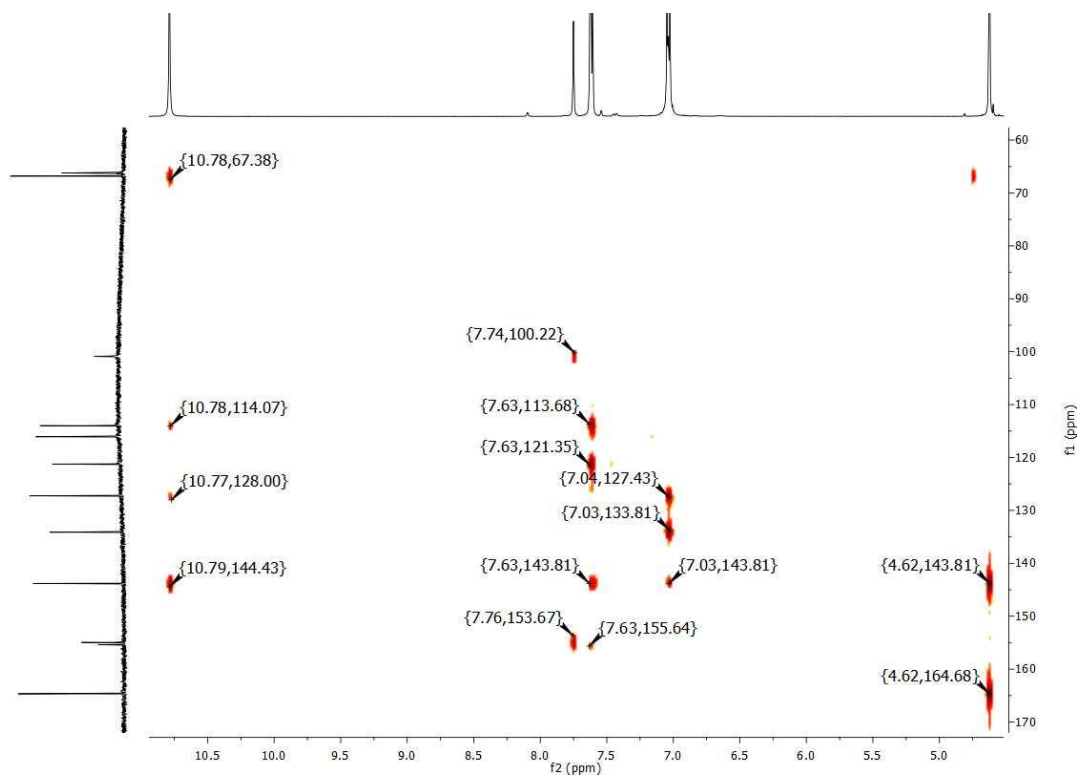
Espectro 98. EMAR (IE⁺, m/z) del compuesto 6,6'-[4-amino-*N*-(4-trifluorometilpiridin-2-il)piridin-2,6-diil]bis(2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona) (**JVM7**).



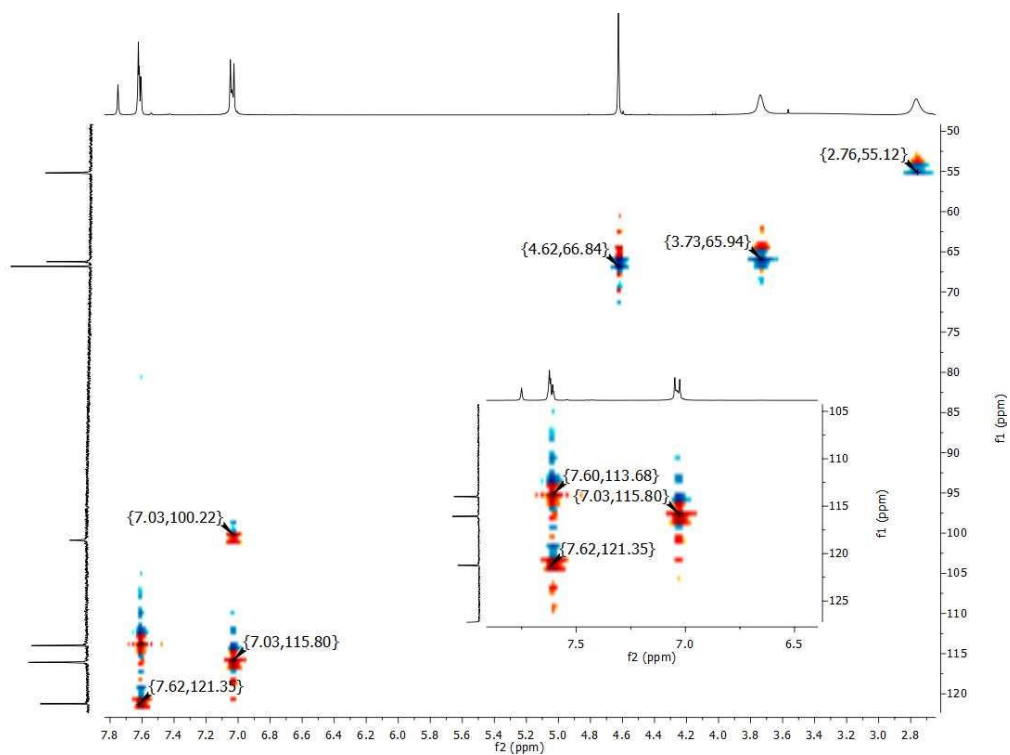
Espectro 99. RMN ^1H (TMS, $\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz, δ en ppm) del compuesto 6,6'-[4-amino-N-(morfolin-4-il)piridin-2,6-diil]bis(2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona) (JVM8).



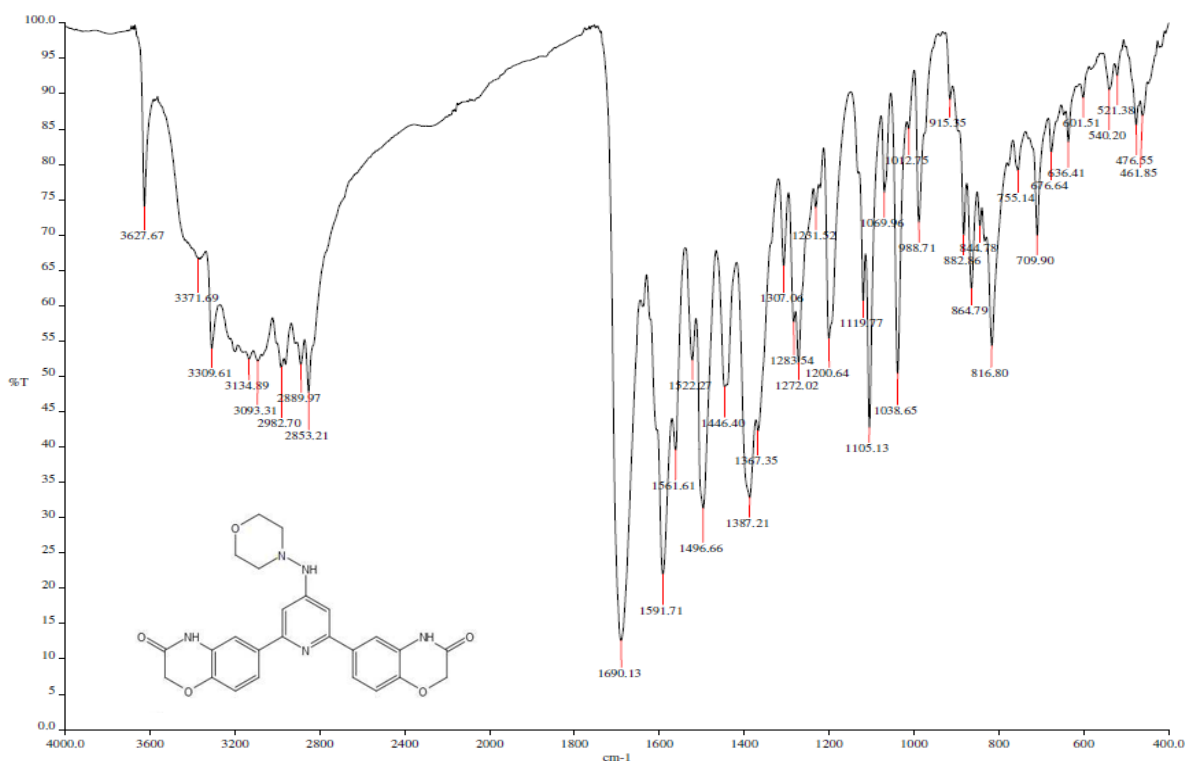
Espectro 100. RMN ^{13}C (TMS, $\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz, δ en ppm) del compuesto 6,6'-[4-amino-N-(morfolin-4-il)piridin-2,6-diil]bis(2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona) (JVM8).



Espectro 101. RMN ^1H (TMS, DMSO- d_6 , 400 MHz, δ en ppm), RMN ^{13}C (TMS, DMSO- d_6 , 100 MHz, δ en ppm). Experimento HMBC del compuesto 6,6'-[4-amino-*N*-(morfolin-4-il)piridin-2,6-diil]bis(2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona) (JVM8).



Espectro 102. RMN ^1H (TMS, DMSO- d_6 , 400 MHz, δ en ppm), RMN ^{13}C (TMS, DMSO- d_6 , 100 MHz, δ en ppm). Experimento HSQC del compuesto 6,6'-[4-amino-*N*-(morfolin-4-il)piridin-2,6-diil]bis(2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona) (JVM8).



Espectro 103. IR (FTIR por reflectancia ATR, cm⁻¹) del compuesto 6,6'-[4-amino-*N*-(morfolin-4-il)piridin-2,6-diil]bis(2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona) (**JVM8**).

Data : Dr Castillo Rafael049 Date : 26-Sep-2018 11:39

Instrument : MStation

Sample : 150 STE-7814 JVM8

Note : Operadores Javier Perez-Carmen Garcia

Inlet : Direct Ion Mode : EI+

RT : 1.88 min Scan# : (15,16)

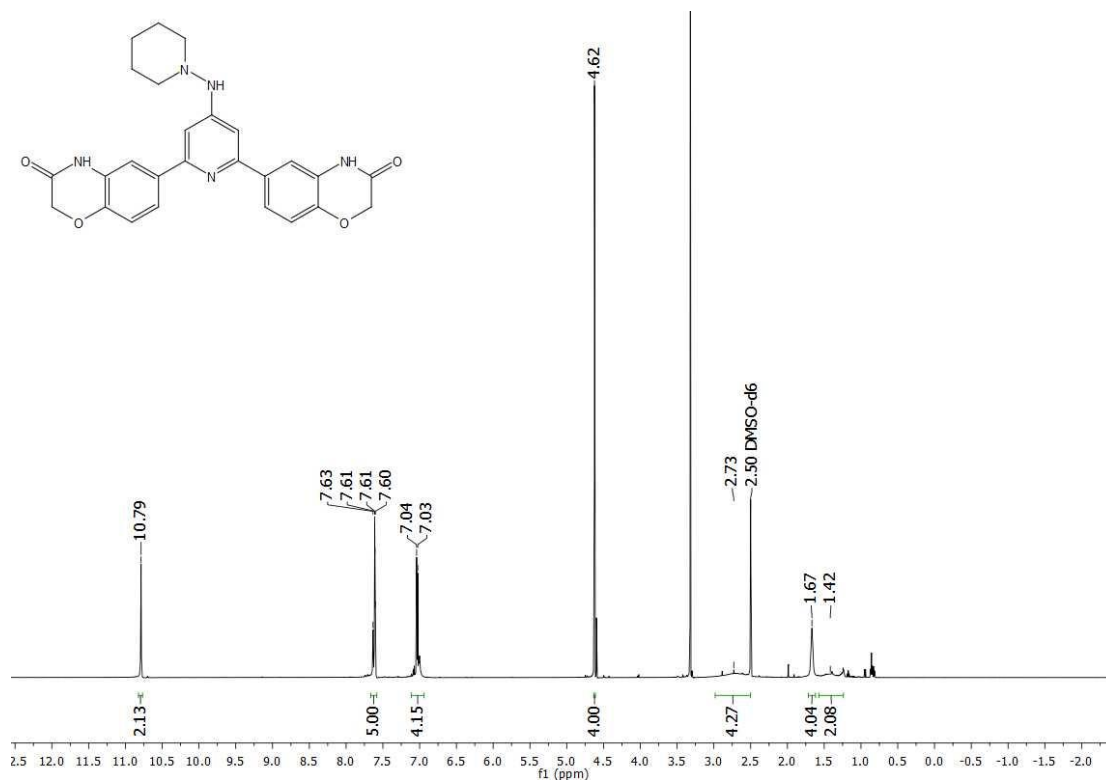
Elements : C 25/0, H 25/0, N 5/0, O 5/0

Mass Tolerance : 1000ppm, 10mmu if m/z > 10

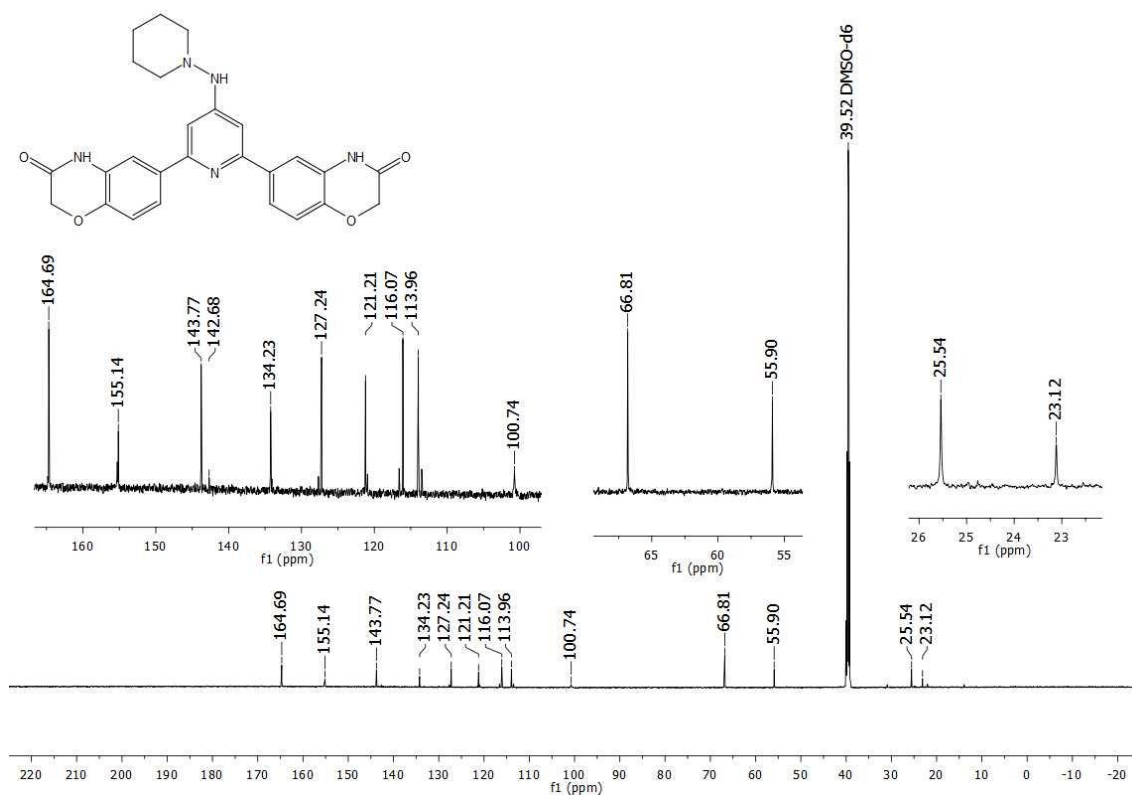
Unsaturation (U.S.) : -0.5 - 30.0

Observed m/z	Int%	Estimated m/z	Err [ppm / mmu]	U.S.	C	H	N	O
473.1689	92.59							
1 473.1699			-2.2 / -1.0	17.0	25	23	5	5

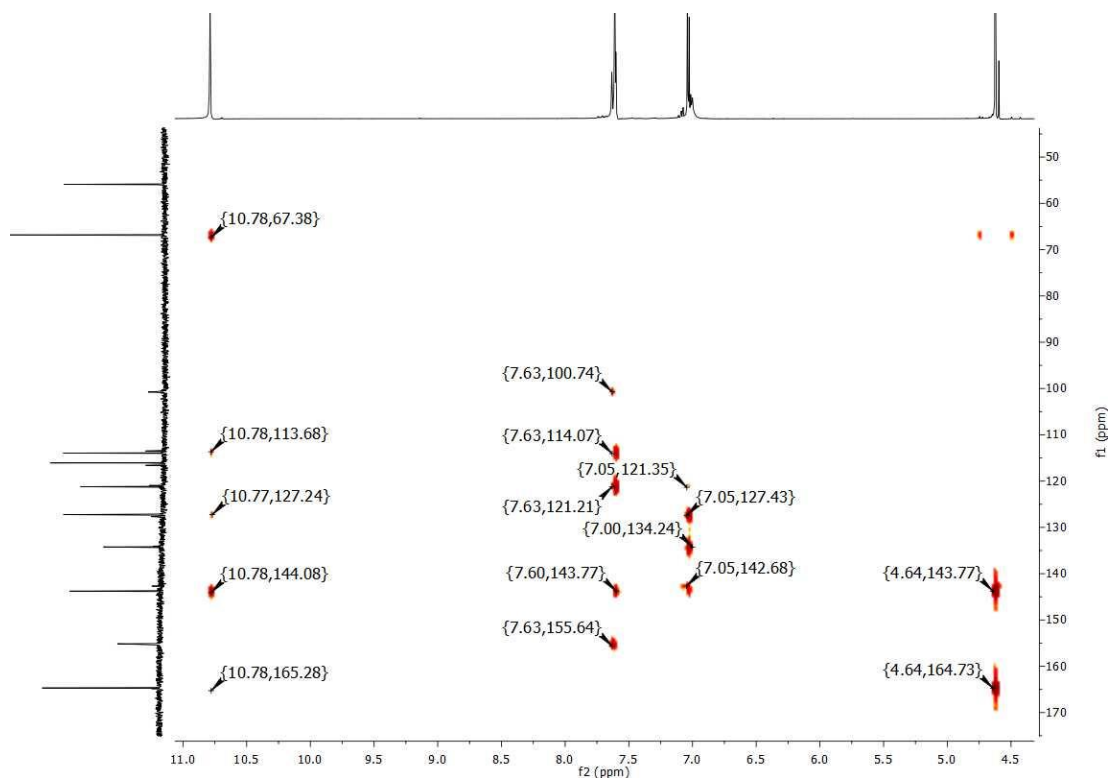
Espectro 104. EMAR (IE⁺, m/z) del compuesto 6,6'-[4-amino-*N*-(morfolin-4-il)piridin-2,6-diil]bis(2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona) (**JVM8**).



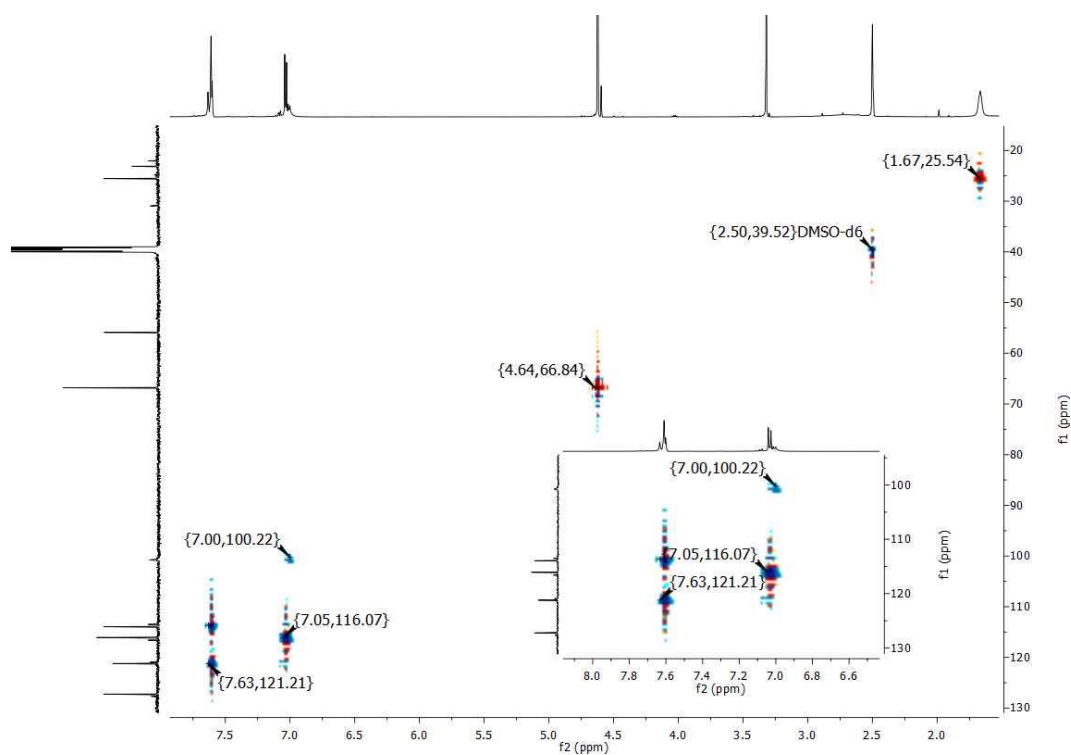
Espectro 105. RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆, 400 MHz, δ en ppm) del compuesto 6,6'-[4-amino-N-(piperidin-1-il)piridin-2,6-diil]bis(2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona) (JVM9).



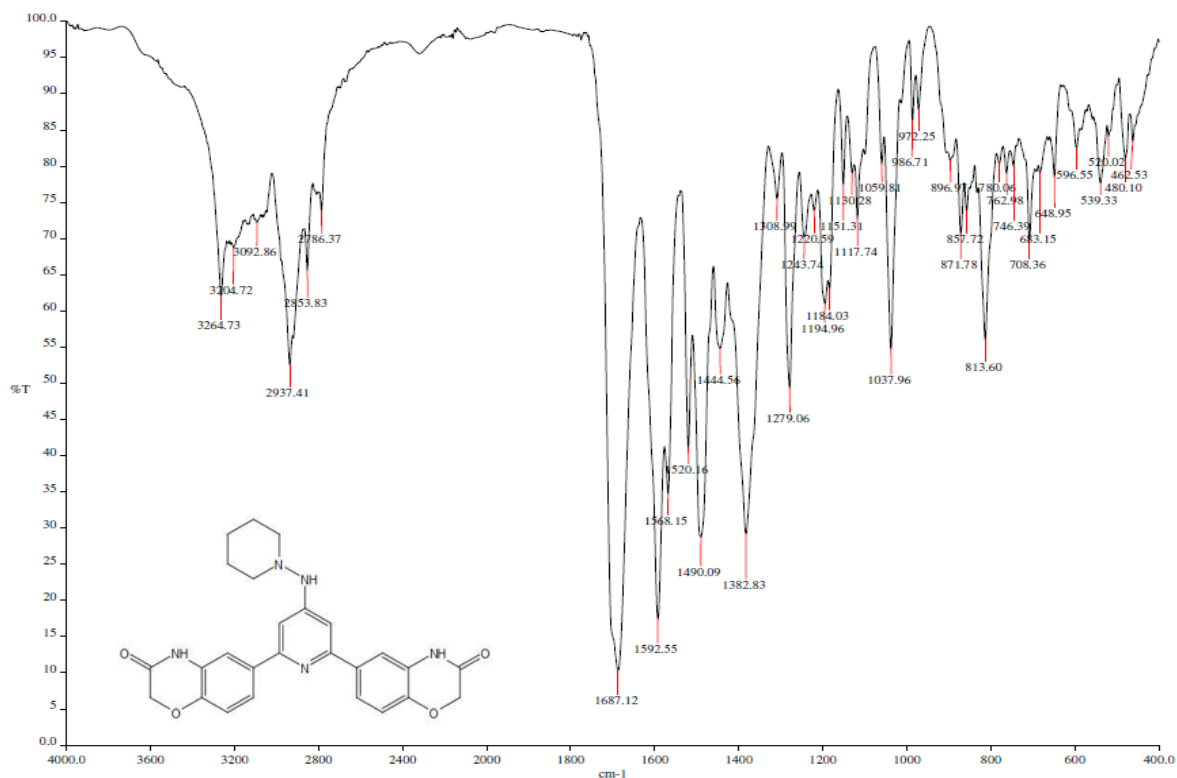
Espectro 106. RMN ¹³C (TMS, DMSO-d₆, 100 MHz, δ en ppm) del compuesto 6,6'-[4-amino-N-(piperidin-1-il)piridin-2,6-diil]bis(2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona) (JVM9).



Espectro 107. RMN ^1H (TMS, DMSO- d_6 , 400 MHz, δ en ppm), RMN ^{13}C (TMS, DMSO- d_6 , 100 MHz, δ en ppm). Experimento HMBC del compuesto 6,6'-[4-amino-*N*-(piperidin-1-il)piridin-2,6-diil]bis(2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona) (JVM9).



Espectro 108. RMN ^1H (TMS, DMSO- d_6 , 400 MHz, δ en ppm), RMN ^{13}C (TMS, DMSO- d_6 , 100 MHz, δ en ppm). Experimento HSQC del compuesto 6,6'-[4-amino-*N*-(piperidin-1-il)piridin-2,6-diil]bis(2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona) (JVM9).



Espectro 109. IR (FTIR por reflectancia ATR, cm^{-1}) del compuesto 6,6'-[4-amino-*N*-(piperidin-1-il)piridin-2,6-diil]bis(2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona) (JVM9).

Data : Dr Castillo Rafael050 Date : 26-Sep-2018 11:44

Instrument : MStation

Sample : 151 STE-7815 JVM9

Note : Operadores Javier Perez-Carmen Garcia

Inlet : Direct Ion Mode : EI+

RT : 1.88 min Scan# : (15,21)

Elements : C 34/0, H 49/0, N 6/3, O 5/3

Mass Tolerance : 5mmu

Unsaturation (U.S.) : -0.5 - 20.0

Observed m/z	Int%	Estimated m/z	Err [ppm / mmu]	U.S.	C	H	N	O
471.1909	5.14	471.1907	+0.5 / +0.2	17.0	26	25	5	4

Espectro 110. EMAR (IE^+ , m/z) del compuesto 6,6'-[4-amino-*N*-(piperidin-1-il)piridin-2,6-diil]bis(2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona) (JVM9).