



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**DISEÑO, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE NUEVAS PIRIDINAS 2,4,6-
TRISUSTITUIDAS COMO INHIBIDORES DE LA AKT CINASA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. ELKIN EDUARDO SANABRIA CHANAGA

TUTOR

Dr. RAFAEL CASTILLO BOCANEGRA
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

Ciudad de México, septiembre 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**DISEÑO, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE NUEVAS
PIRIDINAS 2,4,6-TRISUSTITUIDAS COMO INHIBIDORES DE LA AKT
CINASA**

**TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. ELKIN EDUARDO SANABRIA CHANAGA

**TUTOR
Dr. RAFAEL CASTILLO BOCANEGRA
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**



Ciudad de México, 2019

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Dr. José Alfredo Vázquez Martínez	Facultad de Química, UNAM
VOCAL: Dr. Francisco Hernández Luis	Facultad de Química, UNAM
VOCAL: Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez	Facultad de Farmacia, UAEM
VOCAL: Dr. Marco Antonio Velasco Velázquez	Facultad de Medicina, UNAM
SECRETARIO: Dr. José Ignacio Regla Contreras	Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM

LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ EL TRABAJO:

La parte sintética y computacional de este trabajo se realizó en el Laboratorio L-122, Departamento de Farmacia, Conjunto E, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Rafael Castillo Bocanegra.

Las pruebas de actividad biológica sobre líneas celulares cancerosas se hicieron en el Laboratorio de pruebas biológicas, Edificio B, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, por parte de la M. en C. María Teresa Ramírez Apan.

Las pruebas biológicas sobre la Proteína cinasa B se realizaron en el Centro de Investigación en Alimentos y Nutrición, Departamento de Medicina, Universidad Juárez del Estado de Durango, por parte del Dr. Félix Ernestino Matadamas Martínez, bajo la supervisión del Dr. Alfredo Téllez Valencia.

Parte de los resultados del presente trabajo de investigación dieron lugar a la publicación:

Elkin Eduardo Sanabria-Chanaga, Irene Betancourt-Conde, Alicia Hernández-Campos, Alfredo Téllez-Valencia, Rafael Castillo. (2019) In silico hit optimization towards AKT inhibition: fragment-based approach, molecular docking and molecular dynamics study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 37 (16), 4301-4311. DOI:10.1080/07391102.2018.1546618

Parte de los resultados del trabajo se presentaron en:

- **250th ACS National Meeting and Exposition**

Boston Convention and Exhibition Center, Boston, Massachusetts, United States of America, 2015.

“Structure-based design of 2,4,6-trisubstituted pyridines as AKT-2 inhibitors”

Elkin Eduardo Sanabria-Chanaga, Alicia Hernández-Campos, Rafael Castillo. Facultad de Química, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, Mexico City.

- **Tendencias actuales en la búsqueda y desarrollo de fármacos**

Edificio A, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México, 2016.

“Diseño y síntesis de piridinas 2,4,6-trisustituidas como inhibidores de AKT”

Elkin Eduardo Sanabria-Chanaga, Pedro Josué Trejo-Soto, Alicia Hernández-Campos, Rafael Castillo. Facultad de Química, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, Ciudad de México, México.

- **253rd ACS National Meeting and Exposition**

Moscone Center, San Francisco, California, United States of America, 2017.

“First steps in hit-to-lead optimization towards AKT inhibition”

Elkin Eduardo Sanabria-Chanaga, Alicia Hernández-Campos, Rafael Castillo. Facultad de Química, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, Mexico City.

- **6^{ta} Reunión de la rama de fisicoquímica, diseño y estructura de proteínas**

Universidad Juárez del Estado de Durango, Durango, México, 2017.

“AKT3 homology model: structural approach towards the search for inhibitors”

Elkin Eduardo Sanabria-Chanaga, Rafael Castillo, Alicia Hernández-Campos. Facultad de Química, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, Mexico City.

- **XIV Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica**

Cinvestav Mérida, Mérida, Yucatán, México, 2018.

“Diseño basado en la estructura y síntesis de piridinas 2,4,6-trisustituidas como potenciales inhibidores de la proteína cinasa B (AKT)”

Elkin Eduardo Sanabria-Chanaga, Alicia Hernández-Campos, Rafael Castillo. Facultad de Química, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, Ciudad de México, México.

AGRADECIMIENTOS

A México, el país que me brindó la oportunidad de desarrollar mis estudios de posgrado y me abrió las puertas a su fantástica cultura

A la Universidad Nacional Autónoma de México por todas las enseñanzas académicas y personales que recibí en esta majestuosa Universidad

Al Dr. Rafael Castillo, mi tutor, guía y amigo, por darme la oportunidad de ser parte de su grupo de investigación y tomarse tanto tiempo para formarme en tantos aspectos de la vida, por ser la gran persona que es

A la Dra. Alicia Hernández Campos, mi mamá adoptiva, por ofrecerme la oportunidad de trabajar en sus proyectos y principalmente por todo el apoyo que me brindó, todas las alegrías que provocó y las tristezas en las que fue mi soporte

Al posgrado en ciencias químicas, en especial a Josefina Tenopala por toda la ayuda que me brindó desde el inicio de mis estudios de posgrado y Jesús Gúmaro Viacobo, por la colaboración y las buenas charlas que tuvimos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT por la beca otorgada 273595/480507 la cual fue fundamental para mi estancia en el país y la realización de mis estudios de Doctorado

A los miembros del Jurado cuyos valiosos aportes y correcciones enriquecieron el presente trabajo

A la división de sección escolar, especialmente a Adriana Martínez por su amable guía en cada uno de mis trámites

Al Dr. Francisco Hernández Luis y al Dr. Audifás Salvador Matus por el permiso y la guía
en el uso del reactor de microondas

Al Dr. Alfredo Téllez Valencia y al Dr. Félix Ernestino Matadamas por la supervisión y
realización de los ensayos de inhibición sobre AKT

A la M. en C. Teresa Ramírez Apan del Instituto de Química por la realización de los
ensayos de citotoxicidad sobre líneas celulares cancerígenas

Al personal de la USAI, especialmente a Nayeli Balbiaux por la toma de los espectros de
RMN y EM

A mi familia, que a pesar de la distancia, siempre ha estado ahí para mí, a ellos que son mi
mayor motor, infinitas gracias

A mis amigos de la Universidad Industrial de Santander, especialmente Jeferson Mateus y
Elvis Robles, quienes han sido un apoyo constante a lo largo de este camino

A mis amigos y compañeros del laboratorio 122, con quienes compartí momentos muy
agradables y me llevo recuerdos muy valiosos

A los amigos que hice en este camino, Lucy Cano, Pedro Trejo, Carlos Carvente, Jorge
Victoria, Dianita Prado, Jose Luis Zabala, Gustavo Rico, Audi Matus, Abi Cruz, Tania
Hernández y tantas personas que aparecieron y fueron importantes en mi estancia en
México

A Alberto, Lilia, Paola y Cristian, mis personas favoritas

ABREVIATURAS

° C	Grados Celsius
¹ H- ¹ H COSY	Espectroscopia de correlación ¹ H- ¹ H
AD	Autodock
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AKT	Proteína Cinasas B
APCI	Ionización química a presión atmosférica
ATP	Trifosfato de Adenosina
B ₂ Pin ₂	Diborobispiracolato
BBB	Barrera hematoencefálica
CCF	Cromatografía en capa fina
CDI	1,1'-Carbonildiimidazol
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
DiFAC	Diseño de fármacos asistido por computadora
DMAP	<i>N,N</i> -Dimetilaminopiridina
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EI	Impacto de electrones
EM	Espectrometría de masas
ER	Receptor de estrógeno
ESI	Ionización por electrospray
FRET	Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia
GI	Gastrointestinal
HMBC	Correlación Heteronuclear de múltiple-enlace
HSQC	Correlación Heteronuclear de único-quantum
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
Log P	Coefficiente de reparto
<i>m/z</i>	Relación masa carga
MD	Dinámica molecular
MMPBSA	Mecánica Molecular del Área de Superficie Poisson-Boltzman
PDB	Banco de datos de proteínas
PDB ID	Identificación del banco de datos de proteínas
PDGFR	Receptores de factor de crecimiento derivado de plaquetas

Pf	Punto de fusión
P-gp	Glicoproteína P
PH	Dominio con homología a Pleckstrina
PI3K	Fosfoinositol 3-cinasa
PKB	Proteína Cinasa B
RMN ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear de protón
RMSD	Raíz cuadrada de la desviación media
RMSF	Raíz cuadrada de la fluctuación media
RTK	Receptor de Tirosina cinasa
SP	Precisión única
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VEGFR	Receptor de VEGF
XP	Precisión Extra
δ	Desplazamiento químico

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Cáncer	3
2.1.1. Estrategias de tratamiento	4
2.1.2. Atacando blancos específicos	5
2.2. Proteína Cinasas B	7
2.2.1. Inhibidores de AKT	8
2.3. Métodos computacionales en el diseño de fármacos	12
2.3.1. Diseño por homología	13
2.3.2. Acoplamiento molecular	14
2.3.3. Cribado virtual	14
2.3.4. Simulación de dinámica molecular	15
2.4. Reacciones de acoplamiento carbono-carbono y carbono-heteroátomo	15
2.4.1. Reacciones de acoplamiento catalizadas por paladio	16
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
4. HIPÓTESIS	19
5. OBJETIVOS	19
5.1. Objetivo general	19
5.2. Objetivos específicos	19
6. METODOLOGÍA	20
6.1. Diseño basado en la estructura	20
6.1.1. Diseño por homología de AKT3	20
6.1.2. Análisis de requerimientos estructurales	20
6.1.3. Acoplamiento molecular de las moléculas propuestas	21
6.2. Síntesis de los compuestos diseñados como inhibidores de AKT	22
6.2.1. Síntesis de la serie 8a-j	22
6.2.2. Síntesis de la serie 13a-j	24
6.3. Evaluación biológica de las series 8a-j y 13a-j	25
7. RESULTADOS Y ANÁLISIS	26
7.1. Diseño basado en la estructura	26

7.1.1. Obtención de las estructuras tridimensionales de las proteínas	26
7.1.2. Ligandos	28
7.2. Síntesis de los compuestos diseñados como inhibidores de AKT	47
7.2.1. Síntesis de la 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 4	47
7.2.2. Síntesis de las 4-amino-2,6-dicloropiridinas 4- <i>N</i> -sustituidas	48
7.2.3. Síntesis de las 6,6'-(4-aminopiridina-2,6-diil)bis(2 <i>H</i> -benzo[<i>b</i>][1,4]oxazin-3(4 <i>H</i>)-ona) 4 <i>N</i> -sustituidas 8a-j	51
7.2.4. Síntesis de las 6-(4-amino-6-cloropiridin-2-il)-2 <i>H</i> -benzo[<i>b</i>][1,4]oxazin-3(4 <i>H</i>)-onas <i>N</i> -sustituidas 9a-j	56
7.2.5. Síntesis de la (4-metilpiperazin-1-il)(3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil)metanona 12	58
7.2.6. Síntesis de las 6-(4-amino-6-(3-(4-metilpiperazin-1-carbonil)fenil)piridin-2-il)-2 <i>H</i> -benzo[<i>b</i>][1,4]oxazin-3(4 <i>H</i>)-onas 4 <i>N</i> -sustituidas 13a-j	60
7.3. Evaluación biológica de las series 8a-j y 13a-j	63
8. CONCLUSIONES	71
9. PERSPECTIVAS	73
10. SECCIÓN EXPERIMENTAL	74
11. REFERENCIAS	106
12. ANEXOS	114

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Incidencia del cáncer a nivel mundial.	3
Figura 2. Alteraciones comúnmente encontradas en el cáncer.	6
Figura 3. Cascada de señalización de AKT.	7
Figura 4. Estructuras de algunos Inhibidores de AKT.	9
Figura 5. Nuevo inhibidor competitivo de AKT.	11
Figura 6. Superposición de AT7867 (izquierda y 1 (derecha) en AKT2	12
Figura 7. Acoplamiento molecular.	14
Figura 8. MolProbity score y diagrama de Ramachandran del mejor modelo obtenido de AKT3	27
Figura 9. Superposición de los fragmentos F125 (izquierda) y F126 (derecha) sobre el nuevo <i>scaffold</i> encontrado.	30
Figura 10. Grupo de moléculas a evaluar computacionalmente sobre AKT.	31
Figura 11. Estructura del pan-inhibidor GSK690693	32
Figura 12. Estructura de algunos compuestos de la serie E en el sitio de unión de AKT1/AKT2/AKT3	35
Figura 13. RMSD de cada serie en el sitio de unión de AKT	37
Figura 14. Distancia de los puentes de hidrógeno del compuesto 3E durante toda la simulación de dinámica molecular	38
Figura 15. Panorama de modificaciones generales que favorecen la interacción de los ligandos en el sitio de unión a ATP	39
Figura 16. Primera estructura general propuesta para síntesis	39
Figura 17. pKa de diferentes piridinas monosustituídas	40
Figura 18. Segunda estructura general propuesta para síntesis	40
Figura 19. Obtención del fragmento para la posición 6 de la piridina a partir del Imatinib®	41
Figura 20. Series no simétricas propuestas	41
Figura 21. Estructura general de los compuestos a sintetizar	42
Figura 22. Resumen de los puntajes consenso de los compuestos propuestos en los 3 isotipos de AKT	45
Figura 23. Grupo final de compuestos a sintetizar	45
Figura 24. Protonación de las series propuestas a pH fisiológico	46
Figura 25. Espectro de RMN ¹ H del derivado 8g	53

Figura 26. Espectro HSQC del compuesto 8g	54
Figura 27. Espectro de RMN ¹ H del nitroderivado propuesto como intermediario clave	55
Figura 28. Protones unidos al anillo de piridina en la serie 9a-j	58
Figura 29. Espectro de RMN ¹ H del compuesto 13b	62
Figura 30. Histogramas de la actividad biológica de las series 8 y 13	64
Figura 31. Diagrama general de los posibles blancos moleculares de los compuestos 8a y 13a	70

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Tratamientos anticancerígenos utilizados en la actualidad	6
Tabla 2. Inhibidores de AKT evaluados y estatus de evaluación	10
Tabla 3. Series de moléculas propuestas para síntesis	21
Tabla 4. Mejores fragmentos encontrados en la base de datos de Maybridge	29
Tabla 5. Puntajes del estudio de acoplamiento molecular	33
Tabla 6. Valores de energía libre de enlace para los complejos proteína ligando	36
Tabla 7. Resultados de los estudios de acoplamiento molecular de las series propuestas	43
Tabla 8. Resultados análisis de espectrometría de masas de las series 6a-e y 7a-e	51
Tabla 9. Datos de masas de la serie 8	54
Tabla 10. Datos de masas de la serie 9	57
Tabla 11. Datos de masas de la serie 13a-j	61
Tabla 12. Resultados de actividad biológica a una concentración de 25 μ M sobre diferentes líneas celulares de cáncer de próstata (DU-145 y PC-3), mama (MCF-7 y MDA-MB-231) y colón (HCT-15), se utilizaron células de riñón de mono (COS-7) como control	63
Tabla 13. Índice de selectividad de los compuestos sintetizados	66
Tabla 14. Propiedades ADME de los compuestos 8b-e , 8j , 13b y 13c	67
Tabla 15. Resultados de actividad biológica de las series 8 y 13 sobre los diferentes isotipos de AKT	69
Tabla 16. Reactivos, controles y su respectiva distribución en el ensayo inhibición de AKT	103

ÍNDICE DE ESQUEMAS

	Pág.
Esquema 1. Proceso de optimización <i>in silico</i> .	12
Esquema 2. Algunas reacciones de acoplamiento catalizadas por paladio.	16
Esquema 3. Mecanismo general de la reacción de acoplamiento Suzuki-Miyaura	17
Esquema 4. Análisis retrosintético de las moléculas propuestas.	22
Esquema 5. Reactivos y condiciones: (a) α -Bromoacetato de etilo, K_2CO_3 , acetona/reflujo; (b) Fe^0 , AcOH, 50 °C; (c) $B_2(pin)_2$, $Pd(dppf)Cl_2 \cdot CH_2Cl_2$, AcOK, 1,4-dioxano.	23
Esquema 6. Reactivos y condiciones: (a) derivado de bromobenceno, $Pd(dba)_2$, Cs_2CO_3 , 1,4-dioxano, 90 °C; (b) derivado de benzaldehído, TsOH, $(CH_3CO_2)_3BHNa$, tolueno/reflujo; (c) 4 , $Pd(PPh_3)_4$, K_2CO_3 , CH_3CN/H_2O , μw 170 °C.	23
Esquema 7. Reactivos y condiciones: (a) 4 , $Pd(PPh_3)_4$, K_2CO_3 , CH_3CN/H_2O , μw 170 °C; (c) $B_2(pin)_2$, $Pd(dpPf.)Cl_2 \cdot CH_2Cl_2$, AcOK, 1,4-dioxano; (c) <i>N</i> -metilpiperazina, CDI, CH_2Cl_2 ; (d) 12 , $Pd(PPh_3)_4$, K_2CO_3 , CH_3CN/H_2O , μw 170 °C.	24
Esquema 8. Pasos de optimización del nuevo <i>scaffold</i> encontrado.	28
Esquema 9. Protonación de la piridina debida a la sustitución en posición 2	32
Esquema 10. Árbol de decisión de Topliss resaltando los sustituyentes elegidos	42
Esquema 11. Síntesis convergente de los derivados 8a-j	48
Esquema 12. Propuesta sintética para la obtención de las piridinas 6 y 7	48
Esquema 13. Proceso general de la reacción de aminoreducción indirecta realizada	50
Esquema 14. Obtención del primer intermediario clave propuesto	55
Esquema 15. Rutas sintéticas ensayadas para la síntesis de la serie 8a-j	56
Esquema 16. Rutas sintéticas propuestas para la obtención de 12	59
Esquema 17. Ruta sintética propuesta para la obtención del intermediario 4	78
Esquema 18. Preparación del intermediario 2	78
Esquema 19. Reducción – ciclación de 2-(4-Bromo-2-nitrofenoxi) acetato de etilo 2	79
Esquema 20. Obtención del éster borónico 4	79

Esquema 21. Acoplamiento de Buchwald-Hartwig para obtener las aminas 6a-e y 7a	80
Esquema 22. Síntesis de las piridinas 7b-e por amino-reducción indirecta	82
Esquema 23. Obtención de la serie simétrica 8a-j	84
Esquema 24. Preparación de los productos de monoacoplamiento 9a-j	89
Esquema 25. Ruta sintética propuesta para la obtención del intermediario 12	94
Esquema 26. Borilación de Miyaura del ácido <i>m</i> -Bromobenzoico 10	94
Esquema 27. Reacción de formación de la amida 12	95
Esquema 28. Síntesis de la serie no simétrica 13a-j	96

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
12.1. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas AKT1 y AKT3	115
12.2. Lista de posibles blancos moleculares de la serie 8	116
12.3. Lista de posibles blancos moleculares de la serie 13	117
12.4. Espectro de RMN ¹ H del compuesto 2	118
12.5. Espectro de RMN ¹³ C del compuesto 2	118
12.6. Espectro de RMN ¹ H del compuesto 3	119
12.7. Espectro de RMN ¹³ C del compuesto 3	119
12.8. Espectro de RMN ¹ H del compuesto 4	120
12.9. Espectro de RMN ¹³ C del compuesto 4	120
12.10. Espectro de RMN ¹ H del compuesto 6a	121
12.11. Espectro de RMN ¹³ C del compuesto 6a	121
12.12. Espectro de EM-APCI del compuesto 6a	122
12.13. Espectro de RMN ¹ H del compuesto 6b	122
12.14. Espectro de RMN ¹³ C del compuesto 6b	123
12.15. Espectro EM-APCI del compuesto 6b	123
12.16. Espectro de RMN ¹ H del compuesto 6c	124
12.17. Espectro de RMN ¹³ C del compuesto 6c	124
12.18. Espectro EM-APCI del compuesto 6c	125
12.19. Espectro de RMN ¹ H del compuesto 6d	125
12.20. Espectro de RMN ¹³ C del compuesto 6d	126
12.21. Espectro EM-APCI del compuesto 6d	126
12.22. Espectro de RMN ¹ H del compuesto 6e	127
12.23. Espectro de RMN ¹³ C del compuesto 6e	127
12.24. Espectro de EM-APCI del compuesto 6e	128

12.25.	Espectro de RMN ¹ H del compuesto 7a	128
12.26.	Espectro de RMN ¹³ C del compuesto 7a	129
12.27.	Espectro de EM-APCI del compuesto 7a	129
12.28.	Espectro de RMN ¹ H del compuesto 7b	130
12.29.	Espectro de RMN ¹³ C del compuesto 7b	130
12.30.	Espectro de EM-APCI del compuesto 7b	131
12.31.	Espectro de RMN ¹ H del compuesto 7c	131
12.32.	Espectro de RMN ¹³ C del compuesto 7c	132
12.33.	Espectro de EM-APCI del compuesto 7c	132
12.34.	Espectro de RMN ¹ H del compuesto 7d	133
12.35.	Espectro de RMN ¹³ C del compuesto 7d	133
12.36.	Espectro de EM-APCI del compuesto 7d	134
12.37.	Espectro de RMN ¹ H del compuesto 7e	134
12.38.	Espectro de RMN ¹³ C del compuesto 7e	135
12.39.	Espectro de EM-APCI del compuesto 7e	135
12.40.	Espectro de RMN ¹ H del compuesto final 8a	136
12.41.	Espectro de RMN ¹³ C del compuesto final 8a	136
12.42.	Espectro de EM-ESI del compuesto final 8a	137
12.43.	Espectro de RMN ¹ H del compuesto final 8b	137
12.44.	Espectro de RMN ¹³ C del compuesto final 8b	138
12.45.	Espectro de EM-ESI del compuesto final 8b	138
12.46.	Espectro de RMN ¹ H del compuesto final 8c	139
12.47.	Espectro de RMN ¹³ C del compuesto final 8c	139
12.48.	Espectro de EM-ESI del compuesto final 8c	140
12.49.	Espectro de RMN ¹ H del compuesto final 8d	140
12.50.	Espectro de RMN ¹³ C del compuesto final 8d	141
12.51.	Espectro de EM-ESI del compuesto final 8d	141

12.52.	Espectro de RMN ^1H del compuesto final 8e	142
12.53.	Espectro de RMN ^{13}C del compuesto final 8e	142
12.54.	Espectro de EM-ESI del compuesto final 8e	143
12.55.	Espectro de RMN ^1H del compuesto final 8f	143
12.56.	Espectro de RMN ^{13}C del compuesto final 8f	144
12.57.	Espectro de EM-ESI del compuesto final 8f	144
12.58.	Espectro de RMN ^1H del compuesto final 8g	145
12.59.	Espectro de RMN ^{13}C del compuesto final 8g	145
12.60.	Espectro de RMN ^1H del compuesto final 8h	146
12.61.	Espectro de RMN ^{13}C del compuesto final 8h	146
12.62.	Reporte de EM-EI del compuesto final 8h	147
12.63.	Espectro de RMN ^1H del compuesto final 8i	147
12.64.	Espectro de RMN ^{13}C del compuesto final 8i	148
12.65.	Espectro de RMN ^1H del compuesto final 8j	148
12.66.	Espectro de RMN ^{13}C del compuesto final 8j	149
12.67.	Reporte de EM-EI del compuesto 8j	149
12.68.	Espectro de RMN ^1H del compuesto 9a	150
12.69.	Espectro de RMN ^{13}C del compuesto 9a	150
12.70.	Espectro EM-APCI del compuesto 9a	151
12.71.	Espectro de RMN ^1H del compuesto 9b	151
12.72.	Espectro de RMN ^{13}C del compuesto 9b	152
12.73.	Espectro de EM-APCI del compuesto 9b	152
12.74.	Espectro de RMN ^1H del compuesto 9c	153
12.75.	Espectro de RMN ^{13}C del compuesto 9c	153
12.76.	Espectro de EM-APCI del compuesto 9c	154
12.77.	Espectro de RMN ^1H del compuesto 9d	154
12.78.	Espectro de RMN ^{13}C del compuesto 9d	155

12.79.	Espectro de EM-APCI del compuesto 9d	155
12.80.	Espectro de RMN ¹ H del compuesto 9e	156
12.81.	Espectro de RMN ¹³ C del compuesto 9e	156
12.82.	Espectro EM-APCI del compuesto 9e	157
12.83.	Espectro de RMN ¹ H del compuesto 9f	157
12.84.	Espectro de RMN ¹³ C del compuesto 9f	158
12.85.	Espectro EM-APCI del compuesto 9f	158
12.86.	Espectro de RMN ¹ H del compuesto 9g	159
12.87.	Espectro de RMN ¹³ C del compuesto 9g	159
12.88.	Espectro EM-APCI del compuesto 9g	160
12.89.	Espectro de RMN ¹ H del compuesto 9h	160
12.90.	Espectro de RMN ¹³ C del compuesto 9h	161
12.91.	Espectro de EM-APCI del compuesto 9h	161
12.92.	Espectro de RMN ¹ H del compuesto 9i	162
12.93.	Espectro de RMN ¹³ C del compuesto 9i	162
12.94.	Espectro EM-APCI del compuesto 9i	163
12.95.	Espectro de RMN ¹ H del compuesto 9j	163
12.96.	Espectro de RMN ¹³ C del compuesto 9j	164
12.97.	Espectro EM-APCI del compuesto 9j	164
12.98.	Espectro de RMN ¹ H del compuesto 11	165
12.99.	Espectro de RMN ¹ H del intermediario 12	165
12.100.	Espectro de RMN ¹³ C del intermediario 12	166
12.101.	Espectro de RMN ¹ H del compuesto final 13a	166
12.102.	Espectro de RMN ¹³ C del compuesto final 13a	167
12.103.	Espectro EM-APCI del compuesto final 13a	167
12.104.	Espectro de RMN ¹ H del compuesto final 13b	168
12.105.	Espectro de RMN ¹³ C del compuesto final 13b	168

12.106. Espectro EM-APCI del compuesto final 13b	169
12.107. Espectro de RMN ¹ H del compuesto final 13c	169
12.108. Espectro de RMN ¹³ C del compuesto final 13c	170
12.109. Espectro EM-APCI del compuesto final 13c	170
12.110. Espectro de RMN ¹ H del compuesto final 13d	171
12.111. Espectro de RMN ¹³ C del compuesto final 13d	171
12.112. Espectro EM-APCI del compuesto final 13d	172
12.113. Espectro de RMN ¹ H del compuesto final 13e	172
12.114. Espectro de RMN ¹³ C del compuesto final 13e	173
12.115. Espectro EM-APCI del compuesto final 13e	173
12.116. Espectro de RMN ¹ H del compuesto final 13f	174
12.117. Espectro de RMN ¹³ C del compuesto final 13f	174
12.118. Espectro EM-APCI del compuesto final 13f	175
12.119. Espectro de RMN ¹ H del compuesto final 13g	175
12.120. Espectro de RMN ¹³ C del compuesto final 13g	176
12.121. Espectro de EM-APCI del compuesto final 13g	176
12.122. Espectro de RMN ¹ H del compuesto final 13h	177
12.123. Espectro de RMN ¹³ C del compuesto final 13h	177
12.124. Espectro EM-APCI del compuesto final 13h	178
12.125. Espectro de RMN ¹ H del compuesto final 13i	178
12.126. Espectro de RMN ¹³ C del compuesto final 13i	179
12.127. Espectro EM-APCI del compuesto final 13i	179
12.128. Espectro de RMN ¹ H del compuesto final 13j	180
12.129. Espectro de RMN ¹³ C del compuesto final 13j	180
12.130. Espectro EM-APCI del compuesto final 13j	181
12.131. Artículo publicado	182

RESUMEN

El hallazgo del compuesto novedoso 6-(6-(2-oxo-2,3-dihidrobenzo[*d*]oxazol-5-il)-4-fenilpiridin-2-il)-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona (**1**), como inhibidor moderado de los tres isotipos de la proteína cinasa B (AKT), una diana implicada en desarrollo del cáncer, despertó en nuestro grupo de investigación el interés por someter este compuesto a un proceso de optimización.

Es así como en el presente trabajo se describe el diseño computacional, la síntesis y evaluación biológica sobre líneas celulares cancerosas y sobre los tres isotipos de AKT de 20 derivados novedosos de piridina 2,4,6-trisustituidas, inspirados en el compuesto **1**.

La primera parte del trabajo describe el diseño computacional de nuevas piridinas 2,4,6-trisustituidas utilizando las metodologías de acoplamiento molecular y dinámica molecular, en donde se utilizó, además, una variante del acoplamiento molecular de fragmentos para identificar los requerimientos estructurales *in silico* que favorecen la unión de los ligandos propuestos al sitio activo de AKT.

La segunda parte consta de la síntesis de los compuestos identificados como potenciales inhibidores de AKT en los estudios computacionales. En esta parte se sintetizaron dos series homólogas de piridinas 2,4,6-trisustituidas **8a-j** y **13a-j**, cada una de 10 compuestos.

La tercera parte versa sobre la evaluación biológica de las series sintetizadas, tanto en las líneas celulares cancerosas DU-145, PC-3, MCF-7, MDA-MB-231, HCT-15 como en la línea celular sana COS-7. También se muestran los resultados del ensayo de inhibición sobre los tres isotipos de AKT.

Los resultados del presente trabajo de investigación muestran que los compuestos obtenidos son activos hacia las diferentes líneas celulares, algunos muestran selectividad hacia las líneas DU-145 y MDA-MB-231; sin embargo, los compuestos no son activos contra los isotipos de AKT, sugiriendo que el blanco molecular de las series **8** y **13** no corresponde a esta proteína.

ABSTRACT

The finding that the novel compound 6-(6-(2-oxo-2,3-dihydrobenzo[*d*]oxazol-5-yl)-4-phenylpyridin-2-yl)-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-one (**1**) was a moderate inhibitor of the anticancer target AKT motivated our research group to do a hit-to-lead study.

In this work, the computational design, synthesis and biological evaluation of 20 new 2,4,6-trisubstituted pyridines against cancer cell lines and the three AKT isotypes are described.

The computational design of the substituted pyridines was made using molecular docking and molecular dynamics simulations. Besides, a variant of fragment docking was implemented to identify the *in silico* structural requirements that facilitate the protein ligand interaction.

The synthesis of two homologous series **8a-j** and **13a-j** identified as computational hits is reported.

Finally, the synthesized compounds were evaluated on cancer cell lines DU-145, PC-3, MCF-7, MDA-MB231, HCT-15 and control COS-7; in addition, the inhibition of the three AKT isotypes was studied.

Results show that series **8a-j** and **13a-j** are active against the cancer cell lines assayed, some of them with promising selectivity. However, these compounds are not active against AKT isotypes. Probably, AKT is not the biological target of the synthesized series.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer representa la segunda causa de muerte en el mundo y una de las principales causas de muerte en México. Según la Organización Mundial de la Salud el promedio de muertes anuales es de aproximadamente 9.6 millones alrededor del mundo y para el caso de México, las cifras más recientes del INEGI, presentan una tasa de mortalidad por cáncer de 65 por cada 100000 habitantes, siendo el cáncer de próstata, mama, cervicouterino, pulmón y estómago los más comunes en la población del país.

Debido a la importancia que tiene esta enfermedad, diversos grupos de investigación se han centrado en conocer a nivel molecular los factores que inciden en el cáncer para así desarrollar nuevas estrategias terapéuticas que permitan afectar de manera más específica y directa a dicha problemática.

Uno de los blancos importantes que ha surgido recientemente es la proteína cinasa B (PKB por sus siglas en inglés), también conocida como AKT; la cual es un nodo cardinal en diversas cascadas de señalización importantes tanto para procesos fisiológicos celulares normales como en diferentes estados patológicos. La señalización de AKT regula la proliferación y supervivencia celular, apoptosis, el crecimiento celular, el metabolismo de la glucosa, la motilidad celular y la angiogénesis. Diferentes estudios muestran la hiperactivación de la señalización de AKT en muchos cánceres humanos. Existen 3 isotipos conocidos de esta proteína, AKT1/PKB α , AKT2/PKB β y AKT3/PKB γ , cada una de éstas está asociada a diferentes tipos de cáncer.

En un estudio de *virtual screening* de una base de datos de 105937 compuestos realizado en el 2009, se encontraron 19 nuevas moléculas promisorias como inhibidores de AKT, de las cuales, la que mostró mejor valor de puntaje (acoplamiento molecular) y actividad biológica fue una piridina con una benzoxazinona en posición dos, un fenilo en posición 4 y una benzoxazolona en posición 6. Este compuesto presentó una concentración inhibitoria al 50% de 2.6, 1.5, 4.0 μ M sobre los isotipos 1, 2 y 3 respectivamente.

Lo más interesante de este estudio es que esta piridina constituye un nuevo *scaffold* (estructura base), el cual se propone someter a un proceso de optimización para así acceder a nuevos inhibidores más efectivos sobre los diferentes isotipos de esta proteína.

Es así como en el presente trabajo de investigación se describe el estudio computacional utilizando las estrategias de acoplamiento molecular y dinámica molecular que llevó a proponer 20 nuevas piridinas 2,4,-trisustituidas. Además, se presenta la síntesis y caracterización de los compuestos diseñados por metodologías computacionales y finalmente se muestran los resultados de actividad biológica sobre diversas líneas celulares cancerosas y sobre AKT directamente de las piridinas sintetizadas.

2. ANTECEDENTES

2.1. Cáncer

Se le denomina cáncer a un conjunto de enfermedades caracterizadas, principalmente, por la alteración en los procesos de crecimiento celular, proliferación y supervivencia celular. Estas alteraciones producen una expansión descontrolada de células, lo que en la mayoría de los casos desemboca en la formación de tumores. Colectivamente, estas enfermedades representan uno de los mayores retos en el ámbito de salud mundial en el siglo XXI.^{1,2}

El cáncer representa la segunda causa de muerte en el mundo y una de las principales causas de muerte en México. Según la organización mundial de la salud, se estima que el cáncer fue el responsable de cerca de 9.6 millones de muertes en 2018, esto es aproximadamente una de cada seis muertes a nivel mundial.²

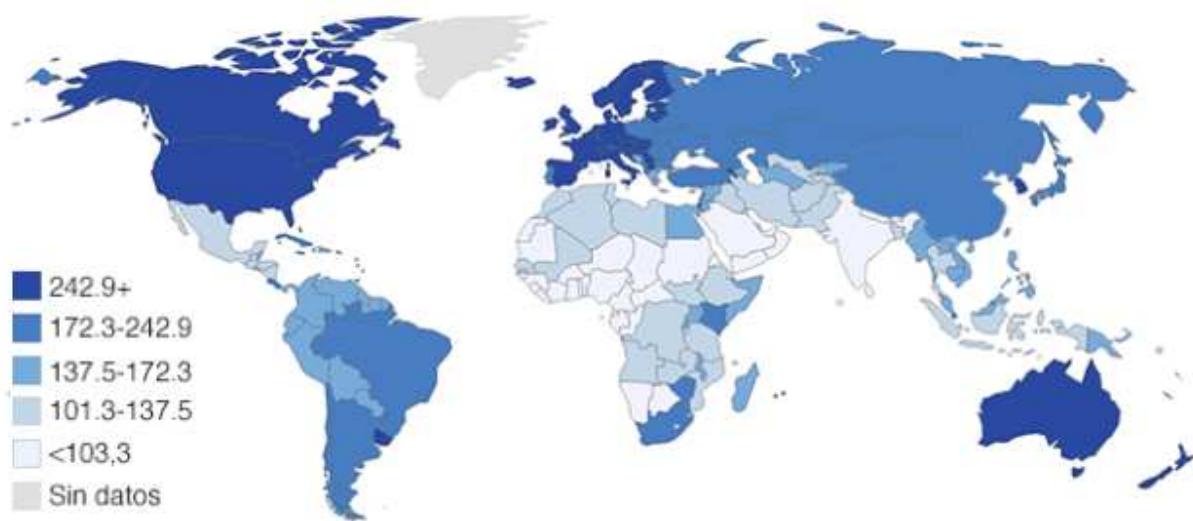


Figura 1. Incidencia del cáncer a nivel mundial.

Para el caso de México, según datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) durante el lapso de 2011 a 2016 dos de cada 100000 habitantes de 0 a 17 años fallecieron anualmente por un tumor en órganos hematopoyéticos (conformado entre otros por leucemia). Entre los jóvenes de 18 a 29 años murieron tres de cada 100 000 hombres contra 2 de cada 100 000 mujeres por esta causa. Tres de cada 10 muertes por cáncer en la población de 30 a 59 años, son consecuencia del cáncer en órganos digestivos. Para la

población de 60 y más años, cuatro de cada 10 defunciones por cáncer en mujeres se deben a tumores de órganos digestivos, contra tres de cada 10 en varones por la misma causa.³

A nivel genético, el cáncer involucra modificaciones al genoma provocadas por factores internos y externos. Estos procesos han sido identificados gracias al descubrimiento de genes mutados con ganancia de función, conocidos como oncogenes, y algunos con pérdida de función, conocidos como genes supresores de tumor.⁴

La tumorigénesis es un proceso multivariable, se ha propuesto que el desarrollo de tumores ocurre a través de un proceso similar a la evolución Darwiniana, en lo que respecta a una secuencia de modificaciones genéticas, las cuales proveen diferentes tipos de ventajas en el crecimiento, llevando a un cambio favorable en la salud de las células dentro del tumor. Se han identificado seis modificaciones esenciales en la fisiología celular que colectivamente inducen el cáncer; éstas son:^{5,6}

- Autosuficiencia en las señales de crecimiento.
- Insensibilidad a las señales de inhibición del crecimiento.
- Evasión de la muerte celular programada o apoptosis.
- Potencial ilimitado de replicación.
- Angiogénesis continua.
- Invasión a tejidos y metástasis.

2.1.1. Estrategias de tratamiento

Debido a la problemática que representa el cáncer, se han desarrollado diferentes opciones de tratamiento para luchar contra este tipo de padecimientos, éstas se pueden agrupar en tres grupos; cirugía, radioterapia y quimioterapia. La cirugía es el tratamiento más efectivo en tumores primarios localizados y asociados a ganglios linfáticos regionales. Por otra parte, la radioterapia se utiliza en los primeros estadios de algunos tipos de cáncer; sin embargo, el uso más común de la radioterapia es en combinación con cirugía o quimioterapia. De igual forma, la quimioterapia suele usarse en combinación con otra estrategia, el uso de esta última opción de tratamiento ha mostrado eficacia en el control y la erradicación de la micrometástasis.^{7,8}

Sin embargo, muchas de las opciones con las que se cuenta en la actualidad para atacar esta enfermedad, también traen consecuencias desfavorables para los pacientes, la principal desventaja es la poca selectividad de los tratamientos actuales, los cuales llevan a toxicidad y graves efectos secundarios que en muchos casos resultan siendo muy perjudiciales tanto para el paciente como para el tratamiento.

2.1.2. Atacando blancos específicos

Por casi un siglo la terapia sistémica del cáncer ha sido dominada por agentes citotóxicos; la mayoría de los cuales tienen como blanco el ADN y se diseñaron para matar o inhibir a las células que se dividen rápidamente.⁷ A menudo, estos agentes se administran como dosis única o por periodos cortos de tiempo utilizando la dosis más alta posible sin llegar a niveles de toxicidad para el paciente (dosis máxima tolerada). Las altas dosis utilizadas en este tipo de quimioterapia requieren un largo periodo de tiempo sin tratamiento, este aspecto aumenta la posibilidad de que las células cancerígenas adquieran resistencia a los fármacos utilizados.^{9,10}

Debido a los problemas que presentan las estrategias terapéuticas existentes, aunado a la importancia que tiene el cáncer en el ámbito de salud mundial; diversos grupos de investigación se han centrado en conocer a nivel molecular los factores que inciden en esta enfermedad, para así desarrollar nuevas estrategias terapéuticas que permitan afectar de manera más específica y directa a dicha problemática.

La elucidación de las bases moleculares de las transformaciones celulares sumado al concepto de que el cáncer es básicamente una enfermedad genética de células somáticas y que estas alteraciones (genéticas y epigenéticas) están bajo un programa de transcripción alterado, ha cambiado el marco de referencia clínico para afrontar esta enfermedad.

El inicio de la era de la terapia dirigida surge de la continua identificación de las alteraciones presentes en el cáncer y la elucidación de los mecanismos que llevan a estas alteraciones. En la Figura 2 se ejemplifican las alteraciones más comunes encontradas en diferentes tipos de cáncer; este conocimiento abrió una ventana importante en la búsqueda de fármacos ya que a pesar de que cada tipo de cáncer tiene mutaciones particulares, el hecho de que muchos tipos de cáncer compartan alteraciones en común permitió la

búsqueda de terapias que pudieran ser aplicables a un amplio número de estos padecimientos. En la Tabla 1 se muestran algunos de los tratamientos utilizados en la actualidad y su blanco específico.⁷

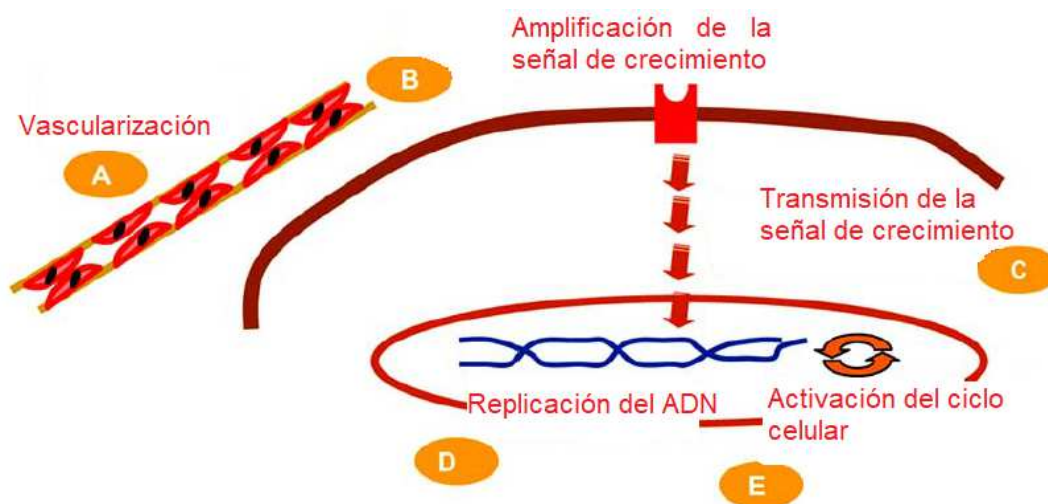


Figura 2. Alteraciones comúnmente encontradas en el cáncer. [Fuente: Referencia 7]

Tabla 1. Tratamientos anticancerígenos utilizados en la actualidad

Grupo Terapéutico	Medicamento	Blanco general	Blanco específico
Anticuerpos Monoclonales	Trastuzumab	B	Her-2
	Cetuximab	B	EGFR
	Bevacizumab	A	VEGF
Radioterapia/ quimioterapia	Múltiple	A, D, E	ADN, Complejo mitótico
Terapia endocrina	Tamoxifen	B	ER
	Fulvestrant	B	ER
	Inhibidores de aromatasa	B	Aromatasa
Moléculas pequeñas	Sunitinib	A, C	c-kit, PDGFR, VEGFR
	Imatinib	C	c-kit, PDGFR
	Lapatinib	C	Her-2
	Erlotinib	C	EGFR

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico, VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular, ER: Receptor de estrógeno, PDGFR: Receptores de factor de crecimiento derivado de plaquetas, VEGFR: Receptor de VEGF.

2.2. Proteína Cinasa B

Uno de los blancos importantes que ha surgido recientemente es la proteína cinasa B (PKB por sus siglas en inglés), también conocida como AKT;¹¹ la cual es una serina-treonina cinasa cuya función es fosforilar otras proteínas o moléculas que actúan como segundos mensajeros; esta proteína fue identificada hace más de dos décadas, pero su función no se esclareció hasta después de muchos años cuando se identificó como parte de la cascada de señalización de la fosfatidilinositol cinasa 3 (PI3K).^{12,13} AKT/PKB es un nodo cardinal en diversas cascadas de señalización importantes tanto para procesos fisiológicos celulares normales como en diferentes estados patológicos (Figura 3).¹⁴

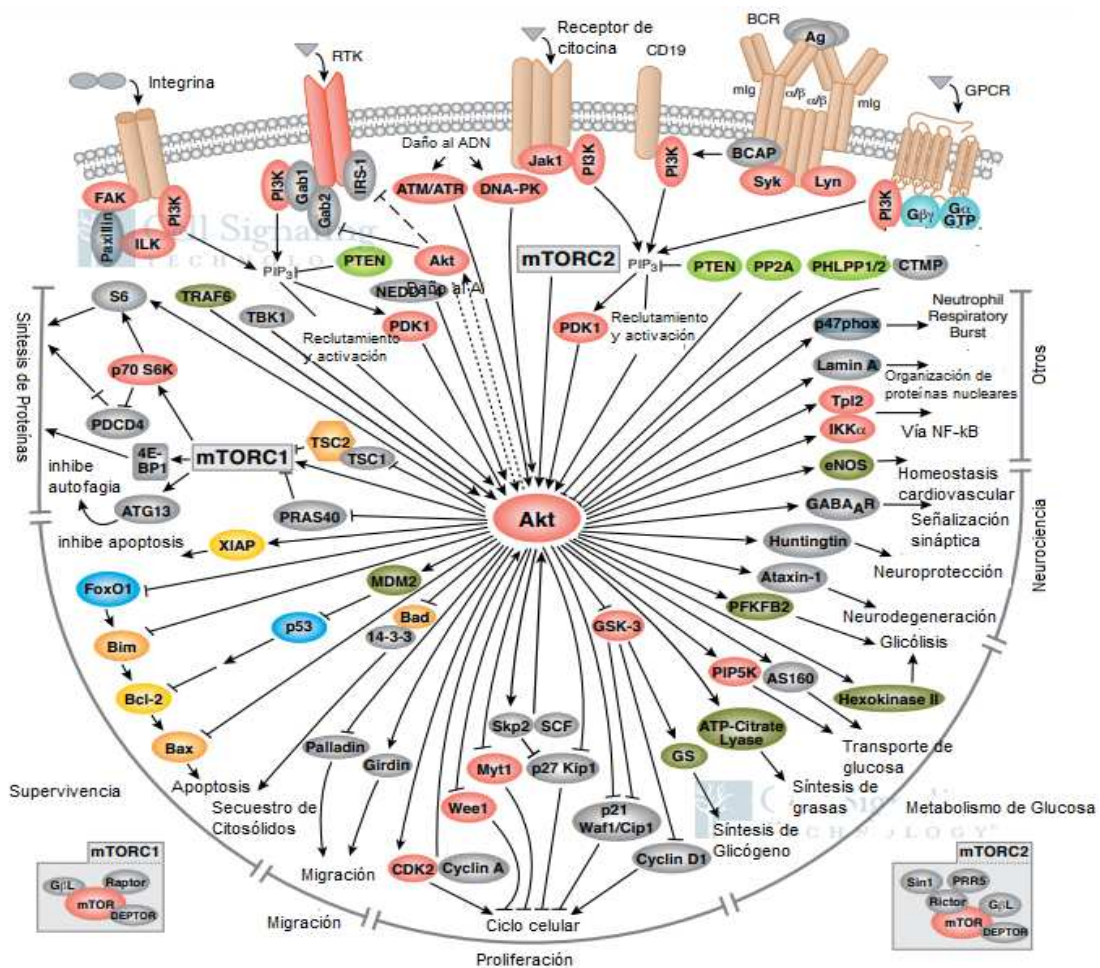


Figura 3. Cascada de señalización de AKT. [Fuente: Referencia 14]

La señalización de AKT regula la proliferación y supervivencia celular, apoptosis, el crecimiento celular, el metabolismo de la glucosa, la motilidad celular y la angiogénesis. Diferentes estudios muestran la hiperactivación de la señalización de AKT en diferentes tipos de cáncer, tales como, carcinoma gástrico, glicosarcoma, cáncer de páncreas, mama, ovario, estómago, próstata y mama triple negativo. Existen 3 isotipos conocidos de esta proteína, AKT1/PKB α , AKT2/PKB β y AKT3/PKB γ , cada una de éstas está asociada a diferentes tipos de cáncer.¹⁵⁻²⁰

Hay dos dominios importantes en esta proteína, uno conocido como dominio con homología a Pleckstrina (PH), en el cual se da la activación de la proteína y el dominio cinasa en el cual se encuentra el sitio de unión a ATP, es decir, el sitio catalítico de la proteína.^{21,22}

La vía de señalización PI3K/AKT es la que más se encuentra alterada en diferentes tipos de cáncer, la sobreexpresión de AKT normalmente se ha relacionado con la resistencia a la radioterapia y quimioterapia.²³ AKT1 se encuentra frecuentemente elevada en cáncer de mama y próstata, la sobreexpresión de AKT2 ha sido correlacionada con la agresividad del cáncer y bajas tasas de supervivencia y se ha encontrado en cáncer de próstata, ovario, mama, páncreas y colorrectal; finalmente, AKT3 se ha asociado con cáncer de próstata independiente de andrógenos, cáncer de mama deficiente de receptores de estrógeno y cáncer de ovario primario.¹⁵⁻²⁰

2.2.1. Inhibidores de AKT

Debido a la importancia de AKT en el mecanismo de supervivencia de diferentes tipos de cáncer, esta proteína se ha convertido en un blanco atractivo para el desarrollo de fármacos. A la fecha se han reportado diferentes inhibidores de la AKT, tanto alostéricos, como competitivos por el sitio de unión a ATP (Figura 4), estos últimos han mostrado actividad promisorio en el tratamiento del cáncer; entre dichos inhibidores se incluyen estructuras como isoquinolin-5-sulfonamidas, indazolo-piridinas y compuestos basados en el núcleo del pirazol entre otros.¹¹

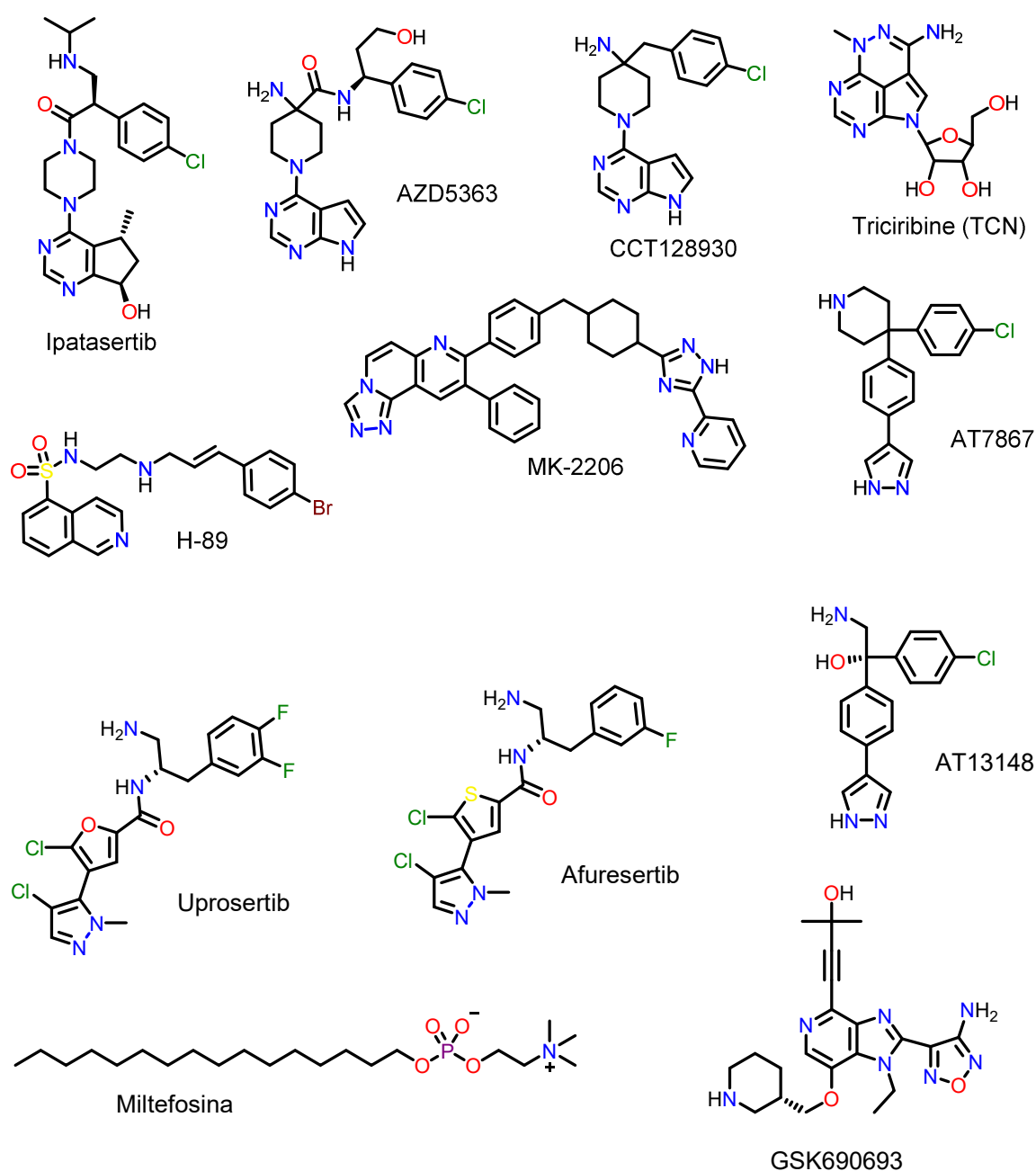


Figura 4. Estructuras de algunos inhibidores de AKT.

A pesar de la gran cantidad de compuestos que han mostrado ser inhibidores de AKT en modelos *in vitro* e *in vivo*, sólo una pequeña cantidad ha llegado hasta pruebas clínicas. La Miltefosina es el único inhibidor de AKT aprobado por la FDA, pero sólo para el tratamiento de leishmaniasis cutánea y visceral, no para el tratamiento de cáncer. Los compuestos evaluados clínicamente y su estatus se resumen en la Tabla 2.²⁴

Diferentes estrategias se han empleado para identificar estos inhibidores; entre estas sobresalen las metodologías computacionales, ya sea, cribado virtual o *virtual screening* para la identificación del compuesto CCT128930 o las estrategias de diseño basado en fragmentos y diseño basado en la estructura que llevaron al hallazgo de los compuestos AT7863 y AT13148.

Tabla 2. Inhibidores de AKT evaluados y estatus de evaluación

Régimen terapéutico	Indicación	Estatus
<i>GSK690693</i>	Neoplasia hematológica, leucemia linfocítica aguda	Pruebas clínicas suspendidas debido a hiperglicemia
<i>AZD5363*</i>	Cáncer de mama, gástrico y de próstata	Ensayos en fase I/II
<i>Afuresertib (GSK2110183)*</i>	Mieloma múltiple recurrente o refractario	Ensayos en fase I/II
<i>Afuresertib (GSK2110183) en combinación con bortezomib o dexametasona</i>	Mieloma múltiple recurrente o refractario	Ensayos en fase I/II
<i>Uprosertib (GSK2141795)*</i>	Mieloma múltiple recurrente o refractario	Ensayos en fase I/II
<i>Uprosertib (GSK2141795) en combinación con trametinib</i>	Mieloma múltiple recurrente o refractario	Ensayos en fase I/II
<i>Ipatasertib (GDC-0068, RG7440)*</i>	Cáncer de mama triple negativo	Ensayos en fase I/II
<i>MK-2206 en combinación con gefitinib o erlotinib</i>	Carcinoma de pulmón de células grandes avanzado	Ensayos en fase I/II
<i>MK-2206*</i>	Leucemia mieloide aguda	Resultados clínicos no satisfactorios Uso limitado a aplicación tópica debido a toxicidad hemolítica después de inyección intravenosa
<i>MK-2206 en combinación con selumetinib</i>	Carcinoma colorrectal	Resultados clínicos no satisfactorios Toxicidad similar a la monoterapia
<i>MK-2206*</i>	Enfermedad no cancerosa (leishmaniasis visceral y cutánea)	Evaluación clínica temprana
<i>TCN o TCN-P*</i>	Tumores sólidos	Eficacia clínica limitada debido a su toxicidad

* Monoterapia

En un estudio de *virtual screening* de una base de datos de 105937 compuestos realizado sobre dos estructuras cristalinas reportadas del isotipo 2 de AKT, se encontraron 19 moléculas promisorias como nuevos inhibidores de AKT2; estas moléculas se ensayaron *in vitro* sobre los diferentes isotipos de esta proteína y se encontró que el mejor valor de actividad biológica lo proporcionó la piridina 2,4,6-trisustituida **1** con una concentración inhibitoria al 50% de 2.6, 1.5, 4.0 μM sobre los isotipos 1, 2 y 3 respectivamente.²⁵

Lo más interesante de este estudio es que esta piridina constituye un nuevo *scaffold* (estructura base), ya que, de los inhibidores reportados anteriormente, ninguno está constituido por una piridina con un patrón de sustitución 2,4,6 (Figura 5).

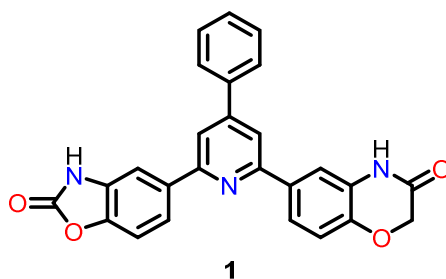


Figura 5. Nuevo inhibidor competitivo de AKT.

Este nuevo inhibidor competitivo llamó la atención de nuestro grupo de investigación, ya que podía ser sometido a un proceso de optimización para así acceder a compuestos más activos contra AKT.

El primer paso elegido en el proceso de optimización consistió en superponer la piridina 2,4,6-trisustituida con un inhibidor ya conocido (AT7867) en el sitio de unión a ATP, este estudio sugirió que la sustitución del grupo fenilo en la posición 4 por un grupo donador de puente de hidrógeno, favorecería la interacción en el sitio catalítico de la proteína ya que podría formar una interacción tipo puente de hidrógeno con un residuo de glutamato (Figura 6).²⁶

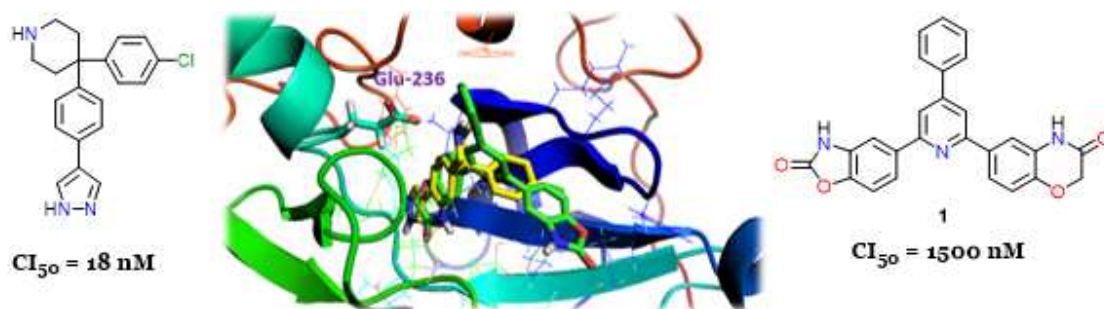
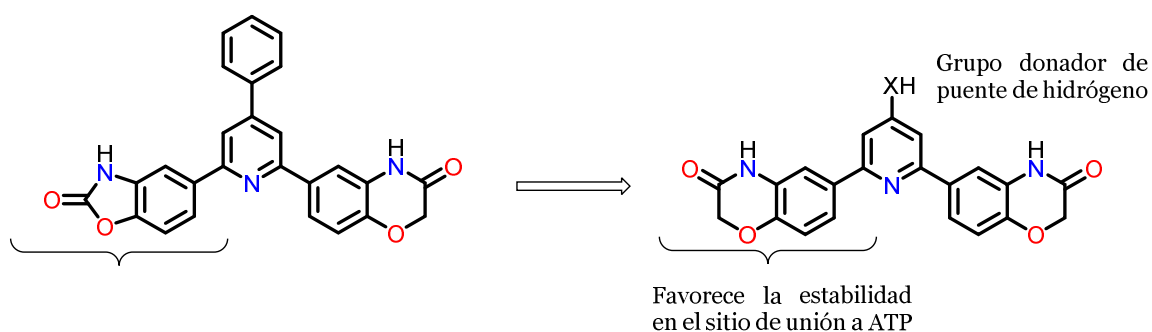


Figura 6. Superposición de AT7867 (izquierda) y **1** (derecha) en AKT2.

Se diseñó una molécula *in silico* sustituyendo el grupo fenilo de **1** con un grupo donador de puente de hidrógeno, además se sustituyó el sistema de la benzoxazolona por la benzoxazinona en la posición 2 de la piridina; los cálculos mostraron que las modificaciones realizadas en la piridina 2,4,6-trisustituida favorecerían la interacción de esta molécula con el sitio de unión a ATP de AKT dándole mayor estabilidad.²⁶



Esquema 1. Proceso de optimización *in silico*.

La información recolectada de este primer estudio fue crucial para la propuesta metodológica del presente trabajo.

2.3. Métodos computacionales en el diseño de fármacos

En el apartado anterior se puede vislumbrar la importancia que pueden tener los métodos computacionales en el proceso de descubrimiento de fármacos ya que el diseño tradicional es una tarea laboriosa y consume mucho tiempo. Anteriormente, se sintetizaba una gran cantidad de compuestos, los cuales se ensayaban en diferentes pruebas biológicas con el fin de obtener una clase adecuada de moléculas con el perfil de actividad biológica deseado.

El diseño de fármacos asistido por computadora (DiFAC) es un término ampliamente usado en la actualidad, que representa herramientas y servidores utilizados para el modelado, análisis y almacenamiento digital de compuestos. Esto incluye el desarrollo de bases de datos para el estudio de relaciones de interacciones químicas, programas computacionales para el diseño de compuestos con propiedades fisicoquímicas de interés, así como la identificación de potenciales moléculas activas antes de ser sintetizadas y evaluadas en el laboratorio.²⁷

El DiFAC se puede dividir en dos grupos, (a) diseño de fármacos basado en el ligando y (b) diseño de fármacos basado en la estructura. En el diseño de fármacos basado en el ligando, los modelos se construyen basados en el conocimiento de ligandos activos contra un receptor y así, estos modelos se usan para construir nuevas moléculas que interactúen con dicho receptor. Por el contrario, en el diseño basado en la estructura, se debe contar con la información de la estructura tridimensional del blanco molecular, ya sea por difracción de rayos X o por resonancia magnética nuclear, este conocimiento se usa para diseñar ligandos que puedan tener mejor afinidad con el blanco molecular para usarse como inhibidores de un blanco específico.²⁸

En este trabajo se utilizaron diferentes herramientas del conjunto de estrategias de diseño basado en la estructura, las cuales se explican a continuación:

2.3.1. Diseño por homología

El término diseño por homología hace referencia a obtener la estructura tridimensional de una proteína usando la estructura tridimensional obtenida experimentalmente de una proteína homóloga. La información estructural es útil para el estudio de la función y dinámica de la proteína, así como la interacción con ligandos y otras estructuras proteicas.

La elucidación experimental de la estructura de una proteína suele ser una tarea difícil debido a múltiples factores (clonación, expresión y purificación de cantidades pequeñas de proteína) así como las dificultades asociadas a la cristalización. En este contexto, no es extraño que métodos que permitan la predicción de estructuras tridimensionales de proteínas hayan despertado mucho interés y que estén en uso.

Este método se basa en la observación de que dos proteínas que pertenecen a la misma familia y comparten una secuencia similar de aminoácidos suelen tener estructuras tridimensionales similares. En realidad, el grado de conservación de la estructura tridimensional de una proteína dentro de la misma familia es mucho mayor que el grado de conservación de la secuencia de aminoácidos.²⁹

2.3.2. Acoplamiento molecular

El método de *docking* o acoplamiento molecular se utiliza para reconocer la posición, orientación y conformación más favorable de un ligando o una molécula pequeña en una proteína (Figura 7).



Figura 7. Acoplamiento molecular.

Debido a que la mayoría de las enfermedades del cuerpo humano se deben a una función inapropiada de una enzima o proteína, este método es ampliamente utilizado en *virtual screening* para la búsqueda de potenciales inhibidores de un blanco molecular en particular. También se utiliza para predecir la posición de un ligando del cual ya se conoce la proteína a la que se une, con el fin de identificar el sitio activo de dicho blanco molecular.^{28,30-32}

2.3.3. Cribado virtual

Virtual screening o cribado virtual es una técnica computacional utilizada en diseño de fármacos para buscar en bibliotecas de compuestos aquellas estructuras que puedan interactuar con un máximo de afinidad con un blanco específico, el cual puede ser una proteína o una enzima. El objetivo fundamental de esta técnica es puntuar, clasificar y filtrar un grupo de moléculas; esta técnica se ha definido como la evaluación automática de grandes bibliotecas de compuestos utilizando una computadora.^{31,33,34}

Actualmente, en el DiFAC se emplean ampliamente dos softwares de acoplamiento molecular: Autodock 4.2 y Glide. La función de score de Glide 4.0 XP ha sido desarrollada e implementada como el protocolo de acoplamiento molecular para estimar afinidades de unión proteína-ligando.²⁷

2.3.4. Simulación de dinámica molecular

La simulación de dinámica molecular (MD por sus siglas en inglés) es una técnica computacional que se utiliza para examinar el dinamismo de una macromolécula biológica, ésta calcula el comportamiento dependiente del tiempo de un sistema molecular. MD da información detallada sobre fluctuaciones y cambios conformacionales de proteínas y ácidos nucleicos. Estos métodos se utilizan actualmente de manera rutinaria para analizar la estructura, dinámica y termodinámica de macromoléculas biológicas y sus complejos. MD permite el estudio de las interacciones que se llevan a cabo entre diferentes macromoléculas durante varios procesos celulares, así como el estudio de la estabilidad y minimización de energía de proteínas y sus complejos proteína-ligando.^{27,35}

2.4. Reacciones de acoplamiento carbono-carbono y carbono-heteroátomo

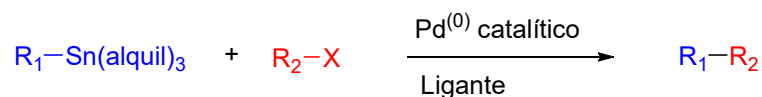
Desde hace muchos años se conocen diversas estrategias para formar enlaces carbono-carbono para la síntesis de alcanos, las reacciones más conocidas son: la reacción de Würtz empleando Sodio, la reacción de Corey-House utilizando litio y yoduro de cobre y el uso de reactivos de Grignard.³⁶ Las reacciones de Würtz y Corey-House presentan muchas dificultades a la hora de controlar las reacciones y de obtener los compuestos deseados. En el caso de los reactivos de Grignard, estos han mostrado ser bastante versátiles; sin embargo, su manipulación requiere bastante cuidado ya que son susceptibles a descomposición.

En la búsqueda de nuevas estrategias sintéticas para lograr acoplamientos carbono-carbono y carbono heteroátomo, han surgido metodologías más eficientes, las cuales en su mayoría involucran el uso de catalizadores de paladio; algunos ejemplos de este tipo de reacciones son: las reacciones de acoplamiento de Stille, Heck, Suzuki-Miyaura, Buhwald-Hartwig, entre otros.³⁶

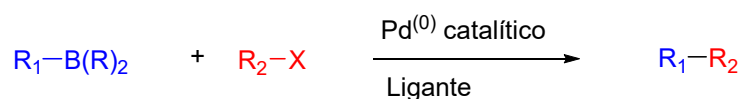
2.4.1. Reacciones de acoplamiento catalizadas por paladio

La versatilidad que presenta el paladio para llevar a cabo diferentes reacciones de acoplamiento cruzado a llevado al desarrollo de diferentes metodologías y catalizadores para potenciar su uso, en el Esquema 2 se muestran algunas de las reacciones más conocidas.³⁶

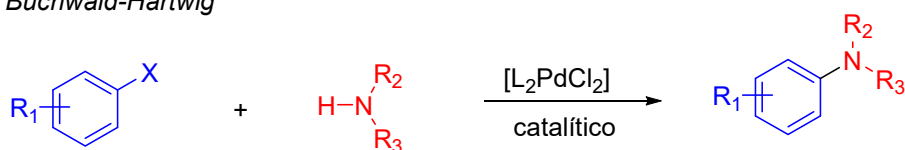
Stille



Suzuki-Miyaura

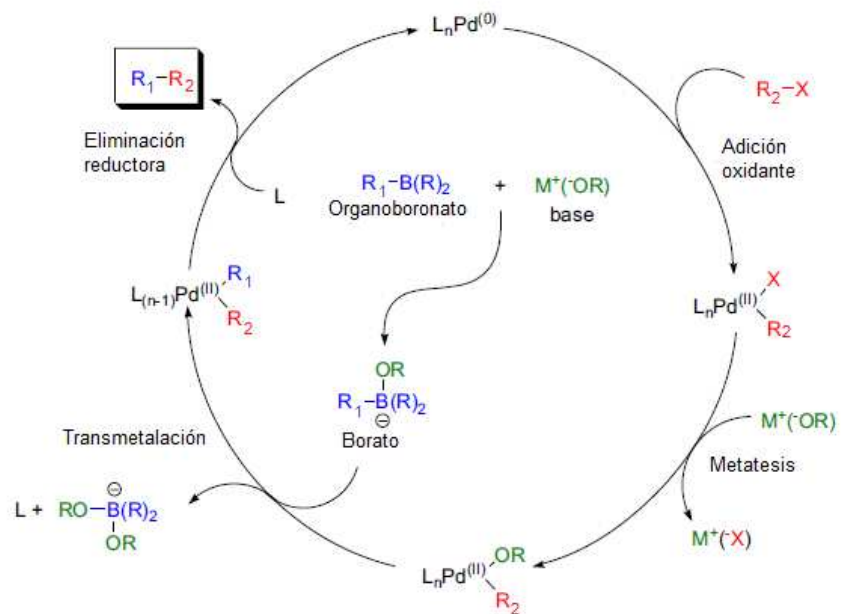


Buchwald-Hartwig



Esquema 2. Algunas reacciones de acoplamiento catalizadas por paladio.

En general, el mecanismo de estas reacciones consta de tres pasos, en el primero se da una adición oxidante por parte del paladio al enlace carbono-X, seguido de una transmetalación en algunos casos o un desplazamiento por parte de la amina en el caso de la reacción de Buchwald-Hartwig y finalmente una eliminación reductora para así obtener el enlace carbono-carbono o carbono-heteroátomo. En el Esquema 3 se muestra el mecanismo del acoplamiento de Suzuki-Miyaura.



Esquema 3. Mecanismo general de la reacción de acoplamiento Suzuki-Miyaura.

En el presente trabajo de investigación se implementó el uso de estrategias computacionales para el desarrollo de fármacos y metodologías sintéticas novedosas para el diseño y la síntesis de nuevos compuestos con actividad anticancerígena.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a la importancia que tiene el cáncer actualmente en el ámbito de salud mundial, aunado a la relevancia biológica que tiene la AKT en este tipo de enfermedades, el diseño de nuevos inhibidores de esta proteína aportará información valiosa para la lucha contra este grave problema de salud.

El presente trabajo de investigación está encaminado a encontrar información básica sobre los requerimientos estructurales que deben tener los derivados de 6-(6-(2-Oxo-2,3-dihidrobenzo[d]oxazol-5-il)-4-fenilpiridin-2-il)-2H-benzo[b][1,4] oxazin-3(4H)-ona **1** que favorezcan la actividad inhibitoria sobre la AKT. Para este fin, se analizarán diferentes sustituciones en las posiciones 4 y 6 del anillo de piridina, manteniendo en la posición 2 el sistema de benzoxazinona.

Como se mencionó anteriormente, en la posición 4 se ha observado en estudios computacionales anteriores que un grupo donador de puente de hidrógeno favorece la afinidad por el sitio activo de la proteína, por lo cual la posición 4 se planea funcionalizar con diferentes aminas aromáticas y en la posición 6 se quiere definir qué tipo de sustitución favorece en mayor medida la actividad inhibitoria sobre la AKT.

Es así como en el presente trabajo de investigación se propone el diseño de nuevos inhibidores de AKT basados en el núcleo de la piridina 2,4,6-trisustituida utilizando metodologías computacionales con el fin de identificar los requerimientos estructurales más favorables para la inhibición de AKT, una vez diseñadas las moléculas se propone la síntesis y evaluación biológica *in vitro* de éstas con el fin de validar los estudios realizados.

Los resultados de este trabajo aportarán información valiosa sobre las pautas necesarias para la inhibición de AKT y por ende, sobre nuevas moléculas que se puedan utilizar en la terapia contra el cáncer.

4. HIPÓTESIS

Sometiendo este nuevo *scaffold* a un proceso de optimización utilizando herramientas computacionales se accederá a nuevos derivados activos sobre diferentes líneas celulares de cáncer y a su vez más afines sobre los diferentes isotipos de la proteína AKT.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Diseñar con base en la estructura, sintetizar y evaluar la actividad biológica de nuevas piridinas 2,4,6-trisustituidas sobre diferentes líneas celulares cancerosas y directamente sobre la AKT/PKB.

5.2. Objetivos específicos

5.2.1. Realizar estudios de acoplamiento molecular y dinámica molecular sobre los diferentes isotipos de la proteína AKT/PKB con diferentes piridinas 2,4,6-trisustituidas propuestas, para seleccionar las que mejor comportamiento muestren en estos estudios.

5.2.2. Sintetizar y caracterizar las correspondientes piridinas que obtengan los mejores valores en el estudio de acoplamiento molecular y mejores resultados en los estudios de dinámica molecular.

5.2.3. Evaluar la actividad inhibitoria de los compuestos sintetizados sobre diferentes líneas celulares y sobre la proteína AKT/PKB.

6. METODOLOGÍA

El presente trabajo de investigación se compone de 3 partes: el primer apartado describe el diseño computacional de las moléculas a sintetizar. La segunda parte comprende la ruta sintética empleada para acceder a las moléculas elegidas a través del protocolo computacional. Finalmente, se explica la evaluación biológica *in vitro* de las moléculas sintetizadas.

6.1. Diseño basado en la estructura

6.1.1. Diseño por homología de AKT3

Sólo los isotipos AKT1 y AKT2 se encuentran reportadas en el Protein Data Bank (PDB) por lo tanto fue necesario diseñar por homología el isotipo AKT3.

Para el diseño de AKT3 se realizó una búsqueda de su secuencia de aminoácidos en el servidor UniProt, una vez hallada la secuencia se comparó con la base de datos del PDB usando el programa BLAST, éste arrojó a la AKT1 como la proteína con mayor homología por lo que se utilizó esta proteína como molde o plantilla para diseñar a AKT3.

Se hicieron diferentes modelos utilizando los programas Prime de Schrodinger[®], Modeller[®] y el servidor swissmodel. Los modelos obtenidos se optimizaron y luego se validaron utilizando el servidor MolProbity. Así se eligió el mejor modelo utilizando como referencia el diagrama de Ramachandran y el MolProbity score.

6.1.2. Análisis de requerimientos estructurales

Utilizando la biblioteca de fragmentos de MayBridge y la estructura tridimensional de AKT2 (PDB ID: 3O6L) se realizó un acoplamiento molecular de fragmentos, con el fin de proponer nuevas moléculas con posible actividad sobre AKT y analizar las modificaciones estructurales que favorecían la interacción sobre estas proteínas.

Este análisis se complementó con estudios de dinámica molecular para analizar así la estabilidad de las moléculas propuestas en el sitio activo de los diferentes isotipos de AKT.

Este estudio condujo a la identificación de algunos requerimientos estructurales importantes para mejorar la afinidad del núcleo de piridina 2,4,6-trisustituida en el *pocket* de AKT. Gracias a estos estudios se propuso un grupo de moléculas como candidatas a síntesis.

6.1.3. Acoplamiento molecular de las moléculas propuestas

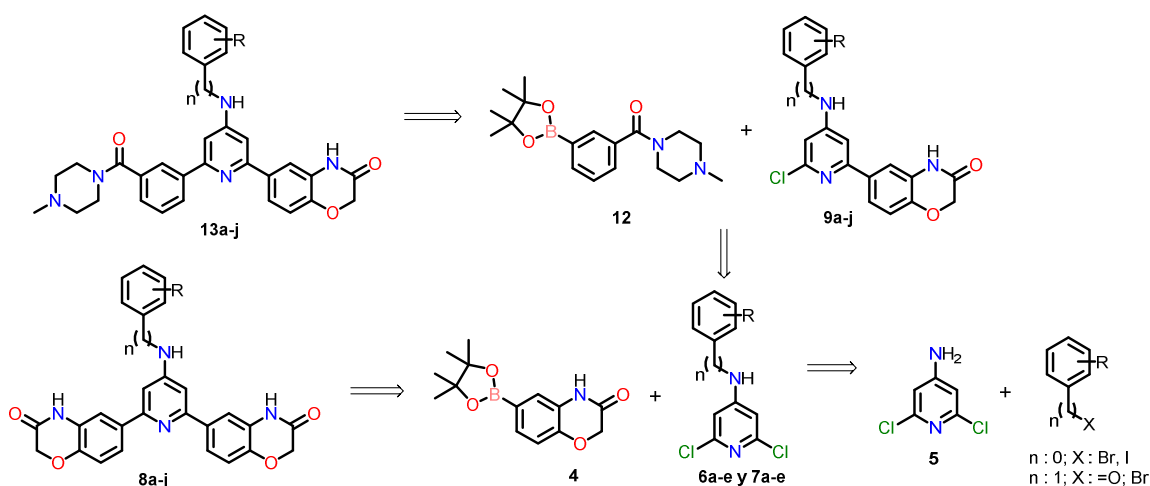
Se propuso un grupo de moléculas teniendo en cuenta las características encontradas en el estudio anterior; los resultados de acoplamiento molecular condujeron a la elección de dos series de 10 compuestos cada una para ser sintetizadas, las cuales se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Series de moléculas propuestas para síntesis

Compuestos	n	R ₁	R ₂
8a	0	H	
8b	0	3-CF ₃	
8c	0	4-CF ₃	
8d	0	3-Cl	
8e	0	4-Cl	
8f	1	H	
8g	1	3-CF ₃	
8h	1	4-CF ₃	
8i	1	3-Cl	
8j	1	4-Cl	
13a	0	H	
13b	0	3-CF ₃	
13c	0	4-CF ₃	
13d	0	3-Cl	
13e	0	4-Cl	
13f	1	H	
13g	1	3-CF ₃	
13h	1	4-CF ₃	
13i	1	3-Cl	
13j	1	4-Cl	

6.2. Síntesis de los compuestos diseñados como inhibidores de AKT

En el Esquema 2 se muestra el análisis retrosintético para la obtención de los compuestos **8a-j** y **13a-j**. La desconexión realizada muestra que para la obtención de la serie **13** se realizó un acoplamiento de Suzuki Miyaura con la serie de piridinas **9** y el boronato **12**; a su vez, la serie **9** se obtuvo a partir de una reacción de monoacoplamiento carbono-carbono de Suzuki partiendo de las piridinas 4*N*-sustituídas **6** y **7** y el boronato **4**. Las series **6** y **7** provienen de la 4-amino-2,6-dicloropiridina (**5**) en la cual se puede sustituir el grupo amino de la piridina para así obtener derivados con anilina o bencilamina en la posición 4 de la piridina, esta sustitución se logró utilizando un acoplamiento de Buchwald-Hartwig para la serie con $n = 0$ mientras que para la serie con $n = 1$ se utilizó la metodología de amino-reducción indirecta. Finalmente, la reacción de doble acoplamiento carbono-carbono entre las series **6** y **7** y el boronato **4** permitió acceder a la serie simétrica **8**.

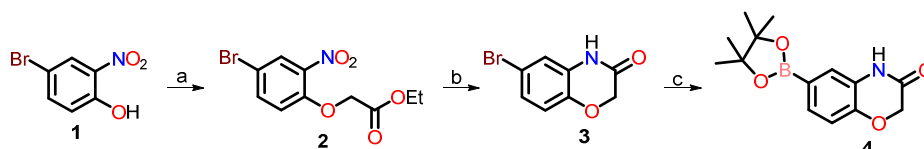


Esquema 4. Análisis retrosintético de las moléculas propuestas.

6.2.1. Síntesis de la serie **8a-j**

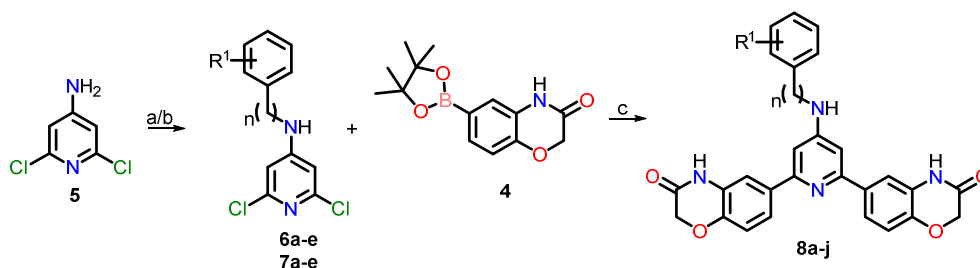
Para la obtención de la serie **8a-j** fue necesario sintetizar el correspondiente éster borónico del núcleo de la 2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona **4**. Para esto, se partió del 4-bromo-2-nitrofenol **1**, el cual se sometió a un proceso de *O*-alquilación utilizando α -bromoacetato de etilo como agente alquilante y carbonato de potasio en acetona. De esta forma se obtuvo el 2-(4-bromo-2-nitrofenoxi)acetato de etilo **2**, éste se sometió a un proceso tándem de reducción-ciclación mediante hierro en ácido acético para acceder a la 6-bromo-2*H*-

benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona **3**, la cual se hizo reaccionar en las condiciones de borilación de Miyaura con diborobispinacolato, utilizando [1,1'-Bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio(II) en complejo con diclorometano y acetato de potasio para así acceder 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 **4** (Esquema 3).



Esquema 5. Reactivos y condiciones: (a) α -Bromoacetato de etilo, K_2CO_3 , acetona/reflujo; (b) Fe^0 , AcOH, 50 °C; (c) $B_2(pin)_2$, Pd(dppf)Cl₂.CH₂Cl₂, AcOK, 1,4-dioxano.

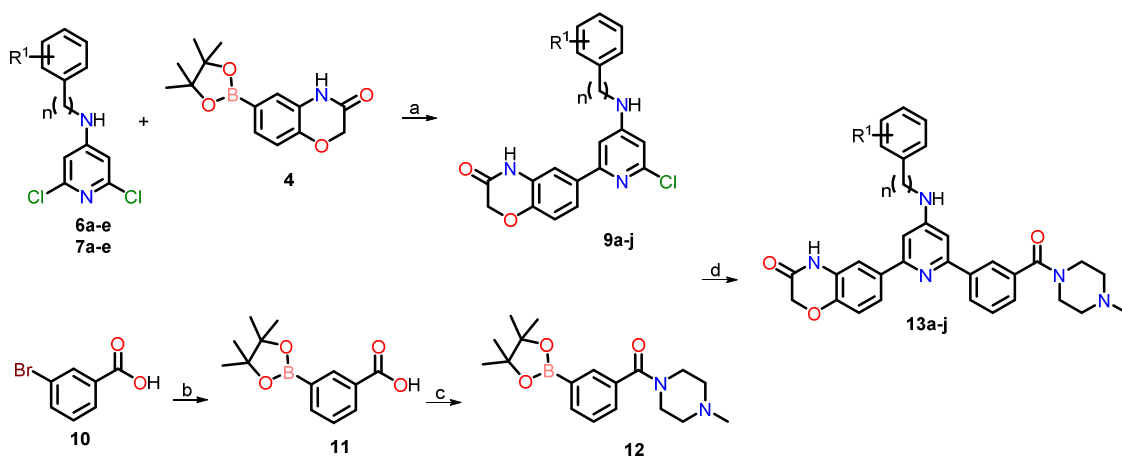
Una vez que se obtuvo el intermediario necesario para introducir el sustituyente de las posiciones 2 y 6 de la piridina, se procedió a obtener el núcleo central, para esto se partió de la 4-amino-2,6-dicloropiridina **5**. Se propusieron dos metodologías, la primera consistió en un acoplamiento de Buchwald-Hartwig con los respectivos haloderivados de benceno para acceder así a la serie **6a-e** utilizando bis(dibenzalacetona)paladio(0) y carbonato de cesio en 1,4-dioxano. Cabe resaltar que el compuesto **7a** se obtuvo de esta misma forma, en la segunda metodología se implementó una amino-reducción indirecta utilizando un derivado apropiado de benzaldehído, triacetoxiborohidruro de sodio y ácido *p*-toluensulfónico para así obtener los compuestos **7b-e**. Finalmente, los compuestos **6a-e** y **7a-e** se sometieron a una reacción de doble acoplamiento de Suzuki con el éster borónico **4**, catalizada por tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) utilizando radiación de microondas, dando como resultado la serie **8a-j** (Esquema 4).



Esquema 6. Reactivos y condiciones: (a) derivado de bromobenceno, Pd(dba)₂, Cs₂CO₃, 1,4-dioxano, 90 °C; (b) derivado de benzaldehído, TsOH, (CH₃CO₂)₃BHNa, tolueno/reflujo; (c) **4**, Pd(PPh₃)₄, K₂CO₃, CH₃CN/H₂O, μw 170 °C.

6.2.2. Síntesis de la serie 13a-j

Para la serie **13a-j** (Esquema 5) se realizó una reacción de monoacoplamiento de Suzuki partiendo de los intermediarios **6a-e** y **7a-e**; de esta forma se accedió a las piridinas **9a-j**. Para el último acoplamiento fue necesario sintetizar el éster borónico **12**; para esto se partió del ácido 3-bromobenzoico **10**, el cual se sometió a una reacción de borilación de Miyaura con diborobispinacolato utilizando [1,1'-Bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio(II) en complejo con diclorometano y acetato de potasio para así acceder al ácido 3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)benzoico **11**. Una vez obtenido, se hizo reaccionar con 1-metil-piperazina y 1,1'-carbonildiimazol, el cual dio como resultado la (4-metilpiperazin-1-il)(3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil)metanona **12**. Como último paso se realizó el acoplamiento de Suzuki entre las piridinas **9a-j** y el intermediario **12** para obtener la serie **13a-j**



Esquema 7. Reactivos y condiciones: (a) **4**, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, K_2CO_3 , $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, μw 170 °C; (c) $B_2(\text{pin})_2$, $\text{Pd}(\text{dpPf.})\text{Cl}_2 \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$, AcOK, 1,4-dioxano; (c) *N*-metilpiperazina, CDI, CH_2Cl_2 ; (d) **12**, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, K_2CO_3 , $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, μw 170 °C.

6.3. Evaluación biológica de las series 8a-j y 13a-j

Los ensayos de evaluación biológica de los compuestos **8a-j** y **13a-j** se realizaron tanto en líneas celulares cancerosas (PC-3, MCF-7, DU-145, MDA-MB-231, HCT-15 y sobre células de riñón de mono COS-7 como control sano) como sobre los tres isotipos de AKT. La evaluación sobre líneas celulares fue realizada en el instituto de química de la UNAM, utilizando un medio de cultivo RPMI-1640. Los compuestos se solubilizaron en DMSO y se incubaron con las líneas celulares de interés; finalmente, se midió el porcentaje de inhibición utilizando sulforrodamida B y midiendo la densidad óptica.

Los ensayos de inhibición de los tres isotipos de AKT fueron realizados en la Universidad Juárez del Estado de Durango. Para estos ensayos se utilizó el kit comercial Z-Lyte biochemical assay, el cual consta de un péptido que contiene dos fluorocromos, los cuales funcionan como un par FRET, una enzima proteolítica (la cual sólo rompe péptidos no fosforilados) y las proteínas AKT. El porcentaje de inhibición se calculó teniendo en cuenta la pérdida de transferencia de energía por parte del par FRET.

7. RESULTADOS Y ANÁLISIS

7.1. Diseño basado en la estructura

7.1.1. Obtención de las estructuras tridimensionales de las proteínas

Las estructuras de AKT1 y AKT2 se obtuvieron del Protein Data Bank (PDB); PDB Id: 4GV1 y 1O6L, respectivamente. En el caso de AKT3, la estructura cristalizada de esta proteína no se encuentra completa, sólo se encuentra cristalizado el dominio PH, pero no el dominio de unión a ATP, el cual es fundamental para el presente trabajo; por esta razón, se realizó un modelado por homología de AKT3.

7.1.1.1. Modelado por homología de AKT3

Debido a que el sitio de unión a ATP del isotipo 3 de AKT, y esta misma, no se encuentra cristalizada por completo, fue necesario realizar la construcción de un modelo por homología para así realizar los estudios de acoplamiento y dinámica molecular.

El primer paso consistió en hallar una proteína con alto grado de similitud en su secuencia de aminoácidos, para esto, se realizó la búsqueda de la secuencia de aminoácidos de este isotipo en la base de datos de UniProt (<https://www.uniprot.org/>) (número de acceso: Q9Y243) y, utilizando la búsqueda básica de alineamiento local (BLAST), se comparó con la base datos del PDB para encontrar una proteína cristalizada que tuviera una secuencia de aminoácidos similar; el resultado de esta búsqueda arrojó al isotipo 1 de AKT como la proteína cristalizada con mayor similitud con un porcentaje de identidad de 82.7 % y un porcentaje de similitud de 90.2 % (Anexo 12.1).

Esto significa que la secuencia de aminoácidos coincide exactamente en un 82.7 % y que, además, en un 90.2 % los aminoácidos tienen la misma naturaleza química.

Una vez identificada la proteína con mayor similitud, ésta se usó como molde para la construcción de AKT3, para esto, se utilizaron los programas Modeller®, Prime de Schrödinger® y el servidor swissmodel (<https://swissmodel.expasy.org/>), obteniendo así, diferentes modelos de la proteína.

La energía de los modelos obtenidos se minimizó utilizando el campo de fuerza OPLS_2005 del módulo *protein preparation wizard* incluido en el programa Schrödinger® y se evaluó su calidad en el servidor MolProbity (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>). De los diferentes modelos evaluados se eligió el que mostró un mejor MolProbity score y un diagrama de Ramachandran con pocos aminoácidos fuera de su geometría adecuada (Figura 8).

All-Atom Contacts	Clashscore, all atoms:	0	100 th percentile* (N=1784, all resolutions)	
	Clashscore is the number of serious steric overlaps (> 0.4 Å) per 1000 atoms.			
Protein Geometry	Poor rotamers	4	1.32%	Goal: <0.3%
	Favored rotamers	279	92.38%	Goal: >98%
	Ramachandran outliers	4	1.19%	Goal: <0.05%
	Ramachandran favored	316	93.77%	Goal: >98%
	MolProbity score [^]	1.01		100 th percentile* (N=27675, 0Å - 99Å)
	C β deviations >0.25Å	10	3.16%	Goal: 0
	Bad bonds:	0 / 2824	0.00%	Goal: 0%
	Bad angles:	28 / 3802	0.74%	Goal: <0.1%
Peptide Omegas	Cis Prolines:	0 / 14	0.00%	Expected: ≤ 1 per chain, or $\leq 5\%$
	Ivisted Peptides:	1 / 338	0.30%	Goal: 0

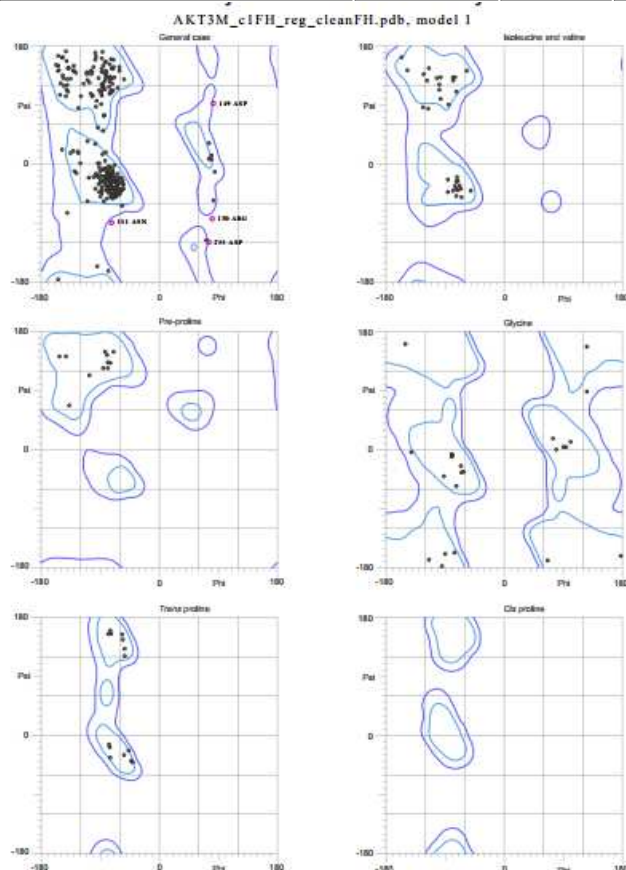
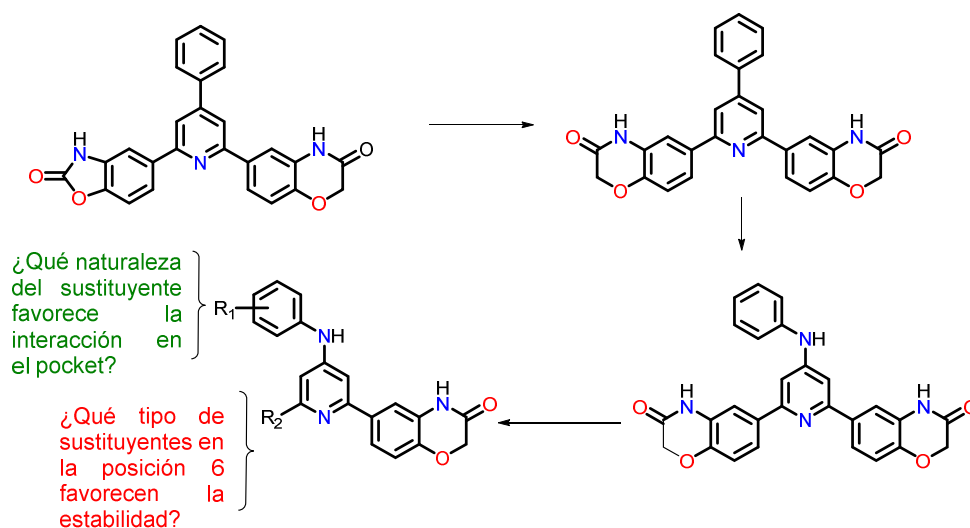


Figura 8. MolProbity score y diagrama de Ramachandran del mejor modelo obtenido de AKT3.

7.1.2. Ligandos

Uno de los objetivos clave de este trabajo consistió en diseñar análogos más potentes de la piridina 2,4,6-trisustituida encontrada. Con este fin, se propuso identificar por métodos computacionales, los requerimientos estructurales necesarios para mejorar la afinidad de esta piridina con el sitio de unión a ATP de los tres isotipos de AKT.

Tomando como base los estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación,^{25,26} donde se encontró que el sustituyente más voluminoso en la posición 6 favorecía la interacción y además que un grupo donador de puente de hidrógeno en la posición 4 era importante para estabilizar al inhibidor en el sitio activo, se propuso incluir en la posición 4 de la piridina un sustituyente amino, para así favorecer la interacción con el residuo de Glu 234/236/232 de AKT1/AKT2/AKT3, respectivamente. Además, también se propuso que el grupo amino de la posición 4 fuera derivado de anilina, para así favorecer las interacciones hidrofóbicas identificadas con los residuos de fenilalanina presentes en esa zona de la proteína. En el Esquema 6 se muestran los pasos previos de optimización de la piridina 2,4,6-trisustituida y los pasos desarrollados en este trabajo de investigación.



Esquema 8. Pasos de optimización del nuevo *scaffold* encontrado.

Por otra parte, para identificar qué tipo de sustitución en el fragmento de anilina favorece más la interacción en el sitio activo de AKT, se propusieron sustituciones en las posiciones


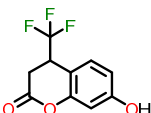
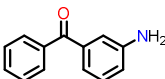
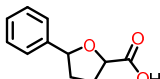
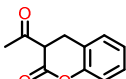
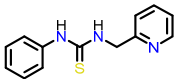
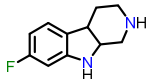
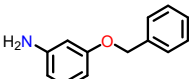
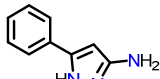
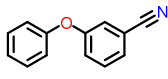
3 y 4 de la anilina con un sustituyente donador de puente de hidrógeno, aceptor de puente de hidrógeno e hidrofóbico para así dar respuesta a este cuestionamiento.

Como resultado de esta propuesta se definieron como sustituyentes en R₁ un grupo -OH (donador de puente de hidrógeno), -COOH (que a pH = 7 está desprotonado por lo cual es aceptor de puente de hidrógeno) y -CH₃ (hidrofóbico). Para definir los sustituyentes en la posición 6 de la piridina (R₂) se realizó una variante de protocolo de acoplamiento molecular de fragmentos.

7.1.2.1. Acoplamiento molecular de fragmentos

Partiendo de la base de datos de fragmentos de MayBridge, se realizó un proceso de depuración de ésta, donde se eliminaron los fragmentos con halógenos como bromo o yodo, epóxidos y demás sistemas que pueden causar efectos secundarios; además se eligieron fragmentos con pesos moleculares menores a 200 g/mol con el fin de proponerlos como sustituyentes en la posición 6 de la piridina. Utilizando el programa Autodock vina se realizaron los estudios de acoplamiento molecular y se eligieron los sustituyentes con los mejores 10 puntajes en el estudio (Tabla 4).

Tabla 4. Mejores fragmentos encontrados en la base de datos de Maybridge

Fragmento	F113 	F56 	F16 	F40 	F111 
Puntaje (kcal/mol)	-7.9	-7.6	-7.5	-7.2	-7.2
Fragmento	F125 	F73 	F126 	F61 	F129 
Puntaje (kcal/mol)	-7.1	-6.9	-6.9	-6.8	-6.8

Una vez seleccionados los fragmentos, éstos se superpusieron sobre la piridina 2,4,6-trisustituida (*scaffold*) para elegir a los que mostraron mejor superposición con las posiciones 2 o 6 del núcleo de piridina, ya que no sólo era de interés que tuvieran buenos valores de puntaje en el acoplamiento molecular, sino que, además, interactuaran en la zona donde los fragmentos en las posiciones 2 y 6 lo hacen. En la Figura 9 se observan los fragmentos F125 y F126 superpuestos sobre la piridina de interés en el pocket de AKT2.

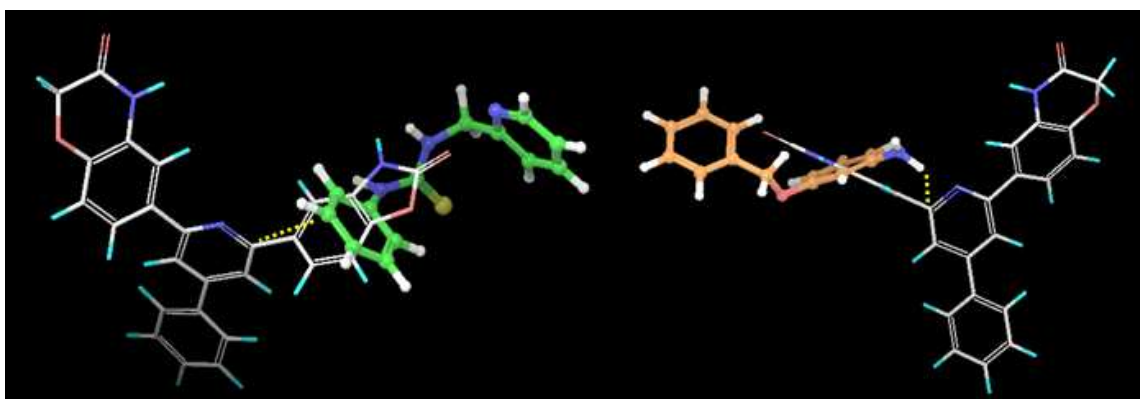


Figura 9. Superposición de los fragmentos F125 (izquierda) y F126 (derecha) sobre el nuevo *scaffold* encontrado.

De los 10 fragmentos seleccionados, 6 mostraron buena superposición sobre la posición 6, por lo cual, se propusieron nuevos enlaces entre el carbono de la posición 6 y el átomo más cercano a esta posición en cada fragmento. De esta forma combinando los sustituyentes propuestos en la piridina y los fragmentos encontrados en este estudio se propuso un grupo de 42 compuestos para ser evaluados sobre los diferentes isotipos de AKT y así determinar qué tipo de sustituyente favorece la interacción en el sitio de unión a ATP (Figura 10).

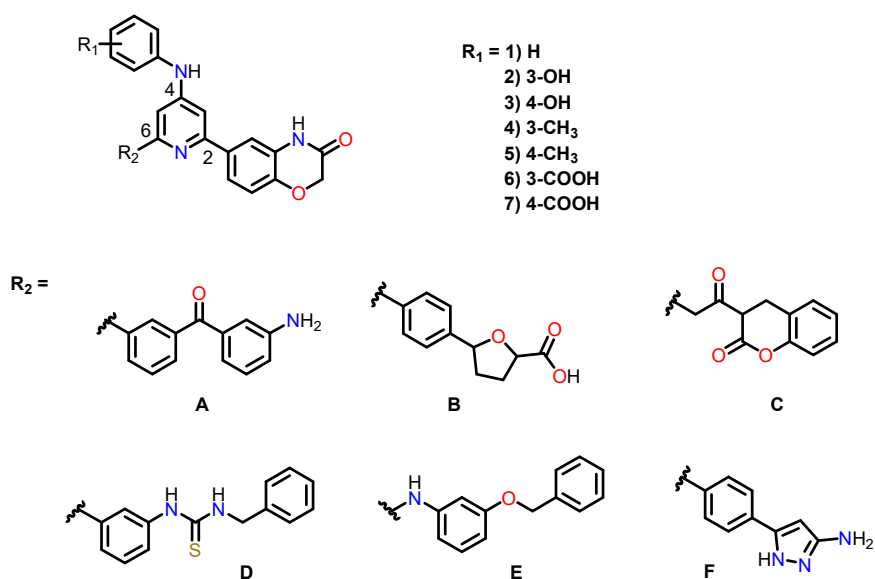
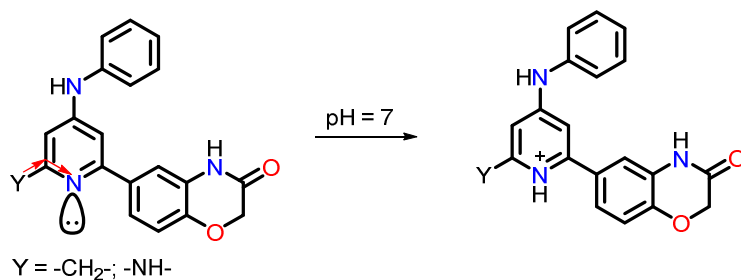


Figura 10. Grupo de moléculas a evaluar computacionalmente sobre AKT.

Al preparar los ligandos y analizarlos con el módulo Epik de Schrödinger[®], el cual incluye penalizaciones por pK_a , se pudo notar que los fragmentos C y E incrementan el pK_a de la piridina, por lo cual, los derivados con estos fragmentos provocarán que el átomo de nitrógeno de la piridina se encuentre protonado a pH fisiológico; especialmente en los casos donde el sustituyente en R^1 es electrodonador.

Esto se debe a que los sustituyentes C y E se unen a la piridina por un grupo metileno y un átomo de nitrógeno, respectivamente, lo cual provoca que por efecto inductivo en el caso de C y por efecto inductivo y mesomérico en el caso de E, el nitrógeno de la piridina gane más densidad electrónica haciéndose más básico, por lo cual, en un medio como el fisiológico, el átomo de nitrógeno de la piridina se encontrará protonado (Esquema 7), este hecho abrió la posibilidad de analizar la influencia de la protonación en los resultados de acoplamiento molecular.



Esquema 9. Protonación de la piridina debida a la sustitución en posición 2.

Los 42 ligandos propuestos se evaluaron sobre los 3 isotipos de AKT utilizando el programa Glide SP y XP de Schrödinger y el programa AutoDock 4.2. además, se incluyó en el estudio el pan-AKT inhibidor GSK690693 (Figura 11) con el fin de normalizar los resultados y calcular el puntaje consenso. Los resultados se resumen en la Tabla 6.

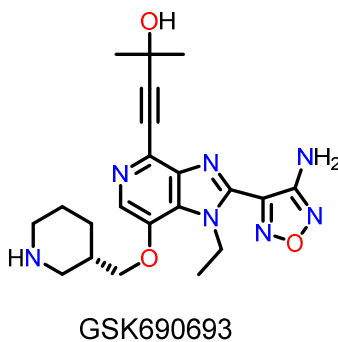


Figura 11. Estructura del pan-inhibidor GSK690693.

Tabla 6. Puntajes del estudio de acoplamiento molecular*

Ligandos	AKT1					AKT2					AKT3				
	Puntaje AD 4.2	Puntaje AD 4.2/GSK 690693	Puntaje Glide XP	Puntaje Glide/GS K690693	Puntaje consenso	Puntaje AD 4.2	Puntaje AD 4.2/GSK 690693	Puntaje Glide XP	Puntaje Glide/GS K690693	Puntaje consenso	Puntaje AD 4.2	Puntaje AD 4.2/GSK 690693	Puntaje Glide XP	Puntaje Glide/GS K690693	Puntaje consenso
1A	-8.51	1.05	-6.17	1.53	1.29	-9.06	1.20	-6.82	1.13	1.17	-5.8	0.81	-3.9	0.80	0.80
1B	-9.08	1.12	-3.8	0.94	1.03	-8.04	1.07	-5.35	0.89	0.98	-6.75	0.95	-2.5	0.51	0.73
1C	-10.67	1.31	-5.04	1.25	1.28	-8.56	1.14	-6.12	1.02	1.08	-8.26	1.16	-4.38	0.89	1.03
1D	-10.19	1.25	-6.08	1.50	1.38	-11.51	1.53	-6.36	1.06	1.29	-8.42	1.18	-4.19	0.86	1.02
1E	-10.68	1.31	-7.22	1.79	1.55	-9.77	1.30	-8.1	1.35	1.32	-9.17	1.29	-3.92	0.80	1.04
1F	-9.35	1.15	-3.69	0.91	1.03	-8.22	1.09	-4.38	0.73	0.91	-6.92	0.97	-3.48	0.71	0.84
2A	-6.95	0.85	-6.52	1.61	1.23	-8.72	1.16	-7.51	1.25	1.20	-7	0.98	-4.69	0.96	0.97
2B	-9.02	1.11	-3.01	0.75	0.93	-8.4	1.12	-5.67	0.94	1.03	-5.97	0.84	-4.54	0.93	0.88
2C	-8.78	1.08	-6.45	1.60	1.34	-9.66	1.28	-7.12	1.18	1.23	-7.45	1.04	-5.04	1.03	1.04
2D	-7.76	0.95	-6.14	1.52	1.24	-10.16	1.35	-7.18	1.19	1.27	-7.23	1.01	-4.78	0.98	0.99
2E	-7.93	0.98	-7.82	1.94	1.46	-9.7	1.29	-8.65	1.44	1.36	-6.3	0.88	-4.22	0.86	0.87
2F	-9.12	1.12	-3.33	0.82	0.97	-7.75	1.03	-4.75	0.79	0.91	-5.91	0.83	-4.5	0.92	0.87
3A	-8.59	1.06	-7.13	1.76	1.41	-9.06	1.20	-6.91	1.15	1.18	-6.96	0.98	-4.24	0.87	0.92
3B	-8.27	1.02	-4.77	1.18	1.10	-8.28	1.10	-4.22	0.70	0.90	-7.1	1.00	-3.64	0.74	0.87
3C	-9.37	1.15	-5.92	1.47	1.31	-8.95	1.19	-5.55	0.92	1.06	-6.69	0.94	-5.71	1.17	1.05
3D	-8.65	1.06	-5.29	1.31	1.19	-10.12	1.35	-6.47	1.08	1.21	-6.2	0.87	-4.96	1.01	0.94
3E	-8.43	1.04	-8.05	1.99	1.51	-9.31	1.24	-5.87	0.98	1.11	-8.76	1.23	-5.03	1.03	1.13
3F	-8.7	1.07	-5.12	1.27	1.17	-8.26	1.10	-5.37	0.89	1.00	-5.99	0.84	-4.37	0.89	0.87
4A	-9.19	1.13	-7.42	1.84	1.48	-9.66	1.28	-7.23	1.20	1.24	-6.86	0.96	-4.12	0.84	0.90
4B	-9.43	1.16	-3.86	0.96	1.06	-7.33	0.97	-4.4	0.73	0.85	-7.05	0.99	-3.7	0.76	0.87

4C	-10.62	1.31	-6.49	1.61	1.46	-10.23	1.36	-6.65	1.11	1.23	-6.94	0.97	-4.41	0.90	0.94
4D	-9.28	1.14	-5.95	1.47	1.31	-10.67	1.42	-6.98	1.16	1.29	-7.02	0.98	-4.55	0.93	0.96
4E	-10.59	1.30	-6.68	1.65	1.48	-10.95	1.46	-8.81	1.47	1.46	-8.74	1.23	-4.76	0.97	1.10
4F	-9.6	1.18	-3.88	0.96	1.07	-8.95	1.19	-4.8	0.80	0.99	-6.4	0.90	-3.68	0.75	0.82
5A	-9.51	1.17	-7.3	1.81	1.49	-9.02	1.20	-7.07	1.18	1.19	-7.66	1.07	-4.36	0.89	0.98
5B	-9.16	1.13	-4.46	1.10	1.12	-7.62	1.01	-3.91	0.65	0.83	-7.18	1.01	-3.09	0.63	0.82
5C	-8.54	1.05	-5.12	1.27	1.16	-8.87	1.18	-6	1.00	1.09	-7.14	1.00	-4.14	0.84	0.92
5D	-8.01	0.99	-5.35	1.32	1.15	-11.57	1.54	-6.95	1.16	1.35	-7.17	1.01	-4.95	1.01	1.01
5E	-10.54	1.30	-5.24	1.30	1.30	-9.68	1.29	-7.58	1.26	1.27	-7.51	1.05	-4.37	0.89	0.97
5F	-8.95	1.10	-3.27	0.81	0.96	-8.18	1.09	-4.55	0.76	0.92	-6.13	0.86	-3.38	0.69	0.77
6A	-8.44	1.04	-4.72	1.17	1.10	-8.45	1.12	-5.59	0.93	1.03	-6	0.84	-3.51	0.72	0.78
6B	-7.77	0.96	-1.26	0.31	0.63	-7.39	0.98	-3.12	0.52	0.75	-6.58	0.92	-3.01	0.61	0.77
6C	-7.56	0.93	-6.29	1.56	1.24	-8.4	1.12	-6.1	1.01	1.07	-6.57	0.92	-5.51	1.12	1.02
6D	-8.7	1.07	0.08	-0.02	0.53	-10.03	1.33	-6.29	1.05	1.19	-6.41	0.90	-4.47	0.91	0.91
6E	-8.52	1.05	-7.76	1.92	1.48	-8.98	1.19	-7.07	1.18	1.19	-7.13	1.00	-5.92	1.21	1.10
6F	-8.61	1.06	-4.28	1.06	1.06	-7.36	0.98	-4.94	0.82	0.90	-6.03	0.85	-3.75	0.77	0.81
7A	-7.24	0.89	-5.98	1.48	1.19	-8.12	1.08	-6.11	1.02	1.05	-5.31	0.74	-4.11	0.84	0.79
7B	-7.3	0.90	-5.67	1.40	1.15	-6.86	0.91	-5.91	0.98	0.95	-6.17	0.87	-3.97	0.81	0.84
7C	-9.4	1.16	-6.71	1.66	1.41	-6.29	0.84	-6.13	1.02	0.93	-6.27	0.88	-5.68	1.16	1.02
7D	-8	0.98	-4.87	1.21	1.09	-9.31	1.24	-7.38	1.23	1.23	-5.6	0.79	-4.93	1.01	0.90
7E	-8.12	1.00	-6.73	1.67	1.33	-8.67	1.15	-8.38	1.39	1.27	-8.65	1.21	-4.25	0.87	1.04
7F	-6.51	0.80	-3.73	0.92	0.86	-6.53	0.87	-5.02	0.84	0.85	-5.3	0.74	-3.25	0.66	0.70
GSK-690693	-8.13	1.00	-4.04	1.00	1.00	-7.52	1.00	-6.01	1.00	1.00	-7.13	1.00	-4.9	1.00	1.00

*Los valores de puntaje están en kcal/mol.

En la Tabla 5 se resaltan los compuestos que mostraron valores más altos de puntaje que el inhibidor GSK690693 en al menos 2 de los 3 isotipos. Se puede notar que los compuestos con mejores valores de puntaje son los que tienen los fragmentos C y E; además, la mayoría de los compuestos con fragmentos A y D también mostraron valores importantes en el puntaje. Por otra parte, los compuestos con fragmentos B y F mostraron los peores valores de puntaje y fueron descartados del estudio.

Además, es de resaltar que los compuestos con el fragmento E mostraron las mejores afinidades en el sitio de unión a ATP, en la Figura 12 se puede ver cómo además de que se conserva la interacción con los residuos de Glu 234/236/232, propuestos en los primeros estudios de optimización, también se pueden identificar interacciones con los residuos de Asp 292/293 para los isotipos 1 y 2, respectivamente. Estos resultados mostraron que las piridinas protonadas permiten una interacción adicional con algunos residuos de aminoácidos que los otros compuestos no tienen y que estas interacciones favorecen aún más la estabilidad dentro del sitio de unión a ATP.

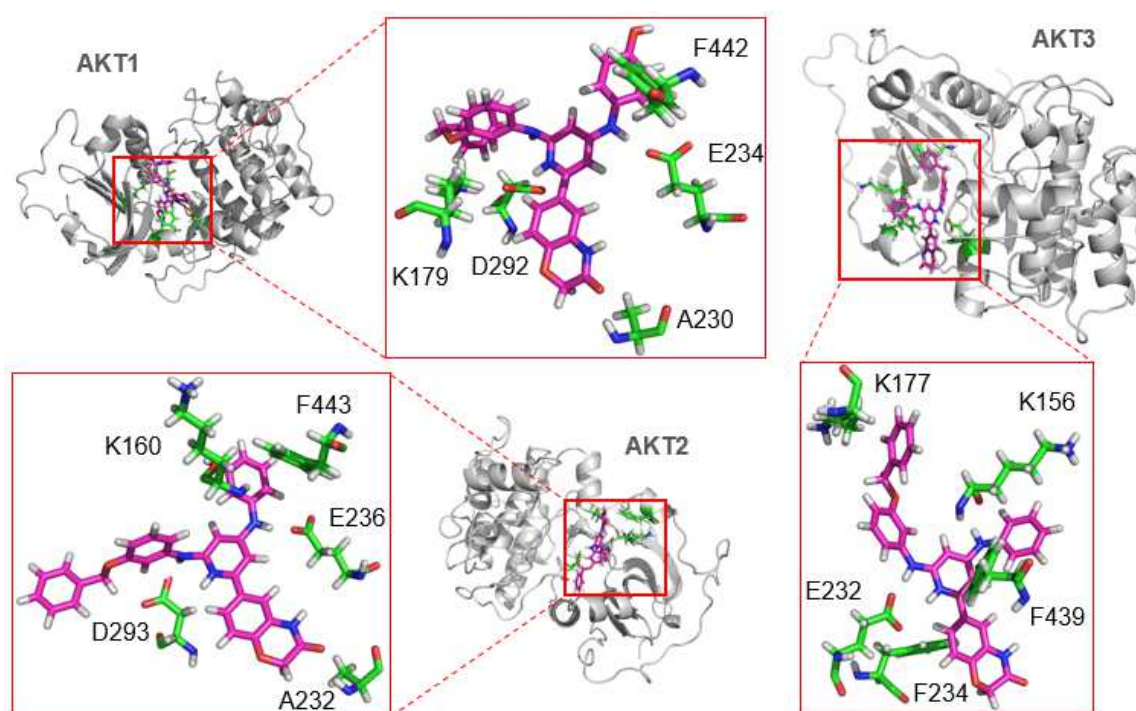


Figura 12. Estructura de algunos compuestos de la serie E en el sitio de unión de AKT1/AKT2/AKT3.

También se puede notar que los compuestos con sustituyentes aceptores de puente de hidrógeno mostraron valores desfavorables de puntaje, por lo que se descartó a la mayoría de estos derivados, ya que se pudo notar que este tipo de sustituyente en el anillo de la anilina en posición 4 de la piridina desfavorece la estabilidad en el sitio de unión a ATP.

Finalmente, 24 compuestos mostraron valores de puntaje consenso mayor a 1 en al menos dos de los tres isotipos de AKT. Estos compuestos se seleccionaron para analizar su comportamiento en estudios de dinámica molecular con el fin de observar la estabilidad dentro del sitio activo de las AKT y, además, calcular la energía de unión de estos compuestos por el método de MMPBSA (molecular mechanics Poison -Boltzman Surface area).

La estabilidad de los compuestos seleccionados se evaluó por medio de simulaciones de dinámica molecular de 10 ns en cada isotipo de AKT. Debido a que el cálculo por el método de MMPBSA sobreestima los valores de energía en especies con carga formal dependiendo de la constante dieléctrica utilizada,^{37,38} los compuestos se dividieron en dos grupos: protonados y no protonados (Tabla 6).

Tabla 6. Valores de energía libre de enlace para los complejos proteína ligando

Compuestos protonados*				Compuestos no-protonados*			
Ligando	AKT1	AKT2	AKT3	Ligando	AKT1	AKT2	AKT3
1C	-68.2	-111.9	-66.2	1A	-25.5	-12.8	-28.0
1E	-63.3	-120.8	-72.7	1D	-20.8	-23.8	-14.4
2C	-59.7	-125.9	-58.3	2A	-7.2	-26.6	-15.8
2E	-49.4	-109.4	-66.0	2D	-14.3	-20.0	-16.4
3C	-63.7	-119.8	-57.2	3A	-22.7	-25.2	-15.8
3E	-71.9	-108.4	-56.0	3D	-13.3	-14.7	-18.2
4C	-69.1	-112.8	-55.8	4A	-24.8	-29.3	-16.9
4E	-63.8	-121.8	-62.0	4D	-25.4	-25.7	-18.1
5C	-69.4	-120.2	-73.5	5A	-22.5	-27.3	-10.8
5E	-64.0	-122.7	-65.1	5D	-22.4	-27.2	-21.4
6C	--	-33.1	-18.0	6C	25.4	--	--
7C	--	-21.5	-9.4	6E	37.1	70.9	42.7
7E	-18.5	--	--	7C	26.0	--	--
GSK690693	-61.5	-107.8	-75.3	7E	--	62.3	26.4

*El valor de energía está expresado en kcal/mol.

Para el caso de los compuestos 6C, 6E, 7C y 7E, los cuales tienen un sustituyente electroattractor, se encontró que podrían estar en forma protonada o no protonada, por lo

cual, para el estudio de dinámica molecular se usó la forma que arrojó mejores valores de puntaje en el estudio de acoplamiento molecular.

La tabla muestra que en general, los compuestos 1, 4 y 5 arrojaron los mejores valores de energía de unión en los 3 isotipos de AKT, siendo estos los compuestos con H o CH₃ en R₁ en las posiciones 3 o 4 del anillo de anilina. El análisis del comportamiento de los ligandos durante el tiempo de simulación del estudio de dinámica molecular mostró que estos sustituyentes hidrófobos se estabilizan con los residuos de Phe 442/443/439, en la mayoría de los casos, mientras que en los casos donde los sustituyentes son polares, la estabilización con estos residuos no es favorable. Al analizar la estabilidad de los ligandos dentro del sitio activo por medio del RMSD (root-mean-square-deviation) se obtuvieron las siguientes gráficas (Figura 13).

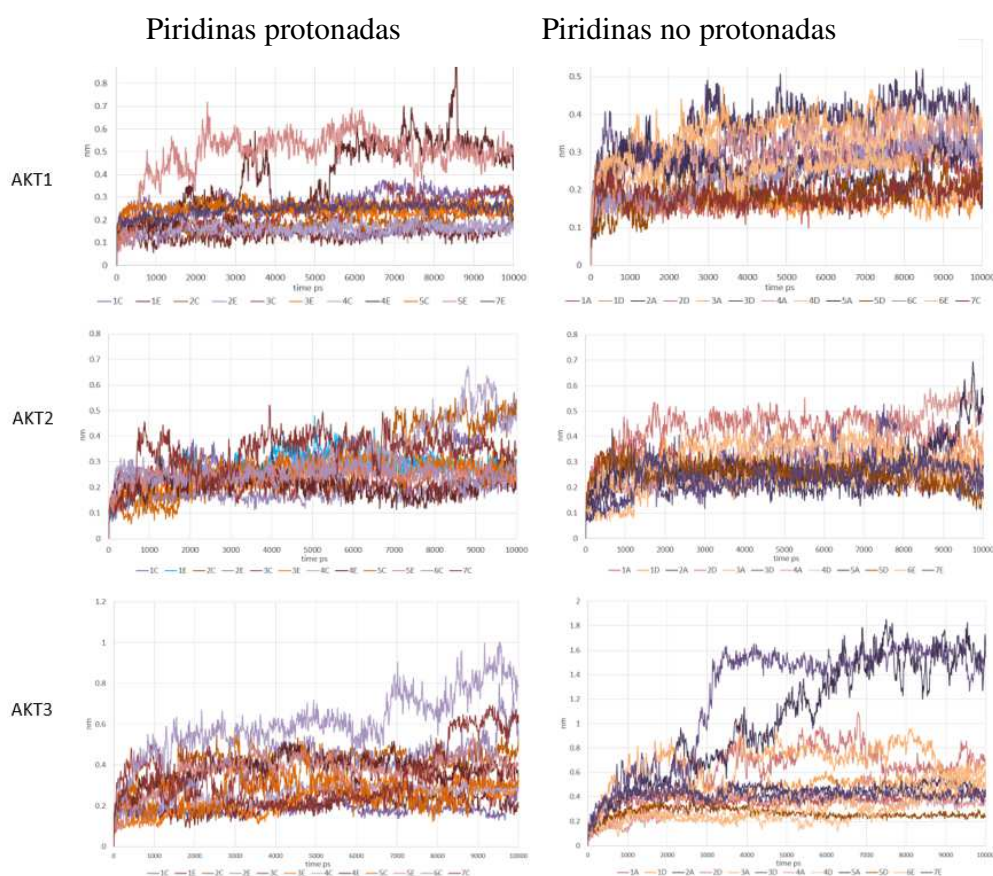


Figura 13. RMSD de cada serie en el sitio de unión de AKT.

En general, los compuestos de la serie E mostraron los mejores comportamientos en los estudios de dinámica molecular, esto se debe principalmente a la interacción tipo puente de hidrógeno entre la piridina protonada y el residuo de Asp292/293/289 en los isotipos 1, 2 y 3, respectivamente, esta interacción se intensifica además por el grupo amino en la posición 6.

En la Figura 14 se puede ver el comportamiento del enlace de hidrógeno entre el Glu234 y el hidrógeno del -NH en la posición 4 de la piridina, así como el del Asp292 y el protón sobre el nitrógeno endocíclico en el derivado 3E en el isotipo AKT1. La imagen muestra que durante toda la simulación la distancia entre estos átomos se conserva, y para el caso del átomo de nitrógeno de la piridina protonada y el Asp292 nunca supera los 0.3 nm, lo cual indica que el puente de hidrógeno entre estos sistemas se mantiene estable durante toda la simulación. Mientras que para el caso del Glu234, al inicio de la dinámica los dos sistemas se encontraban alejados, pero una vez se encontraron y empezó la interacción, ésta se conserva por el resto de la dinámica manteniendo una distancia entre 0.18 y 0.38 nm, distancia que muestra que el puente de hidrógeno se mantiene.³⁹

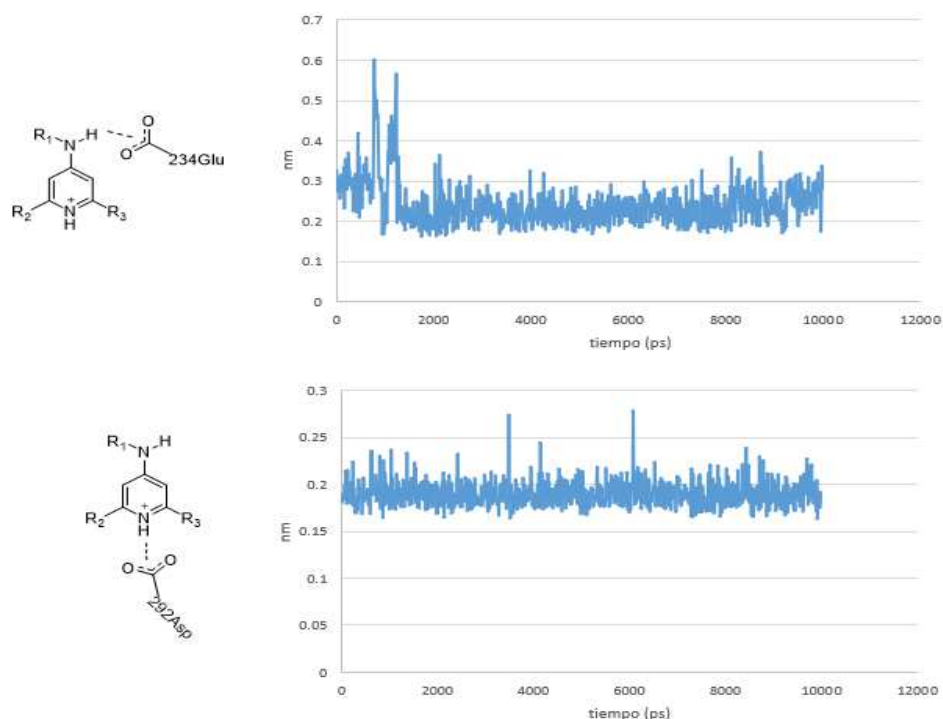


Figura 14. Distancia de los puentes de hidrógeno del compuesto 3E durante toda la simulación de dinámica molecular.

El análisis conjunto de las gráficas RMSD, RMSF y de los valores de energía mostró que las interacciones con los residuos de Asp292/293/298, Phe442/443/439 y Glu234/236/232 y, en el caso de AKT3, también Glu275 son clave para la estabilización de los ligandos dentro del sitio activo de los isotipos 1, 2, 3 de AKT. También se pudo observar que la protonación en la piridina podría ser favorable para la estabilidad de los ligandos en el sitio de unión a ATP, ya que es esta modificación la que genera la interacción con el residuo de Aspartato indicado anteriormente.

Teniendo en cuenta estos hallazgos se propuso un panorama general de modificaciones (Figura 15) que podrían favorecer la interacción de los ligandos en el sitio activo de AKT.

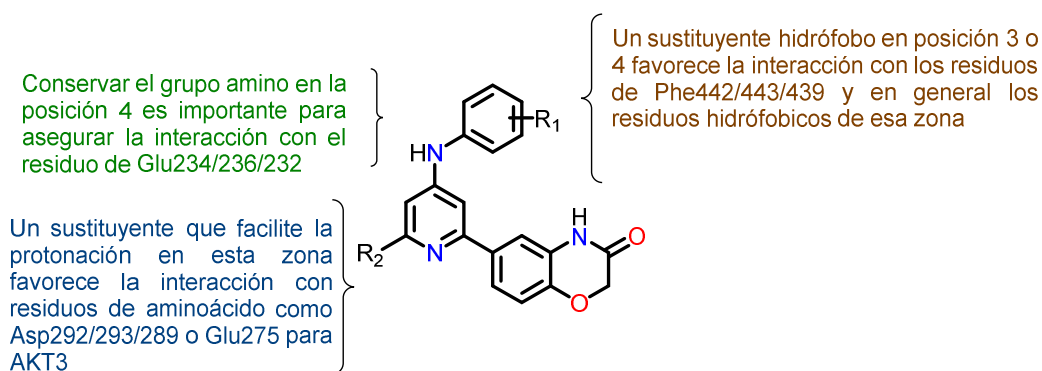


Figura 15. Panorama de modificaciones generales que favorecen la interacción de los ligandos en el sitio de unión a ATP.

7.1.2.2. Consideraciones estructurales en el diseño de las series a sintetizar

Con el fin de analizar exclusivamente la influencia de los sustituyentes hidrófobos, en R_1 en la posición 4 de la piridina, se propuso una serie de compuestos simétricos conservando el fragmento de 2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona como primera serie a sintetizar, modificando únicamente los sustituyentes en R_1 con sistemas hidrófobos (Figura 16).

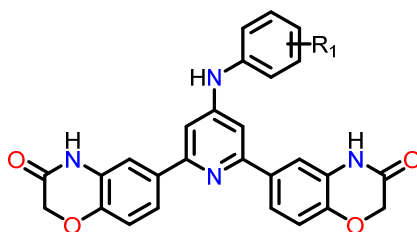


Figura 16. Primera estructura general propuesta para síntesis.

Al analizar el hecho de que en los estudios computacionales la protonación de la piridina muestra ser favorable para la interacción en el sitio activo de AKT surgió la pregunta: ¿cuál es realmente el tipo de sustituyente que favorece el incremento del pK_a de la piridina? Para

responder esta pregunta se analizaron los valores de pK_a de las piridinas sencillas monosustituidas las cuales se muestran en la Figura 17.

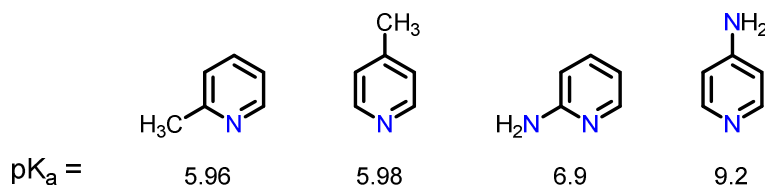


Figura 17. pK_a de diferentes piridinas monosustituidas.

Estos valores ponen en evidencia que el incremento del pK_a se debe principalmente al grupo amino en posición 4 de la piridina, pero que, al ser derivado de anilina, la densidad electrónica del átomo de nitrógeno se distribuye entre los dos sistemas aromáticos. Por esta razón, se propuso una segunda serie en la cual, utilizando la técnica de homologación, se introdujo un metileno entre el grupo amino y el sistema aromático de esta posición con el fin de evitar la competencia entre los dos sistemas aromáticos por la densidad electrónica del grupo amino, esta modificación derivó en una segunda estructura base que complementó la primera propuesta, en la que en la posición 4 ya no se proponen derivados de anilina sino de bencilamina (Figura 18).

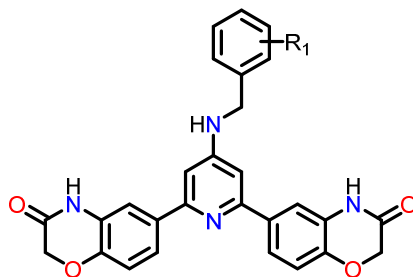


Figura 18. Segunda estructura general propuesta para síntesis.

Ahora bien, estas dos series son simétricas, por lo cual, aún quedaba la inquietud de qué otro tipo de sustituyente sería favorable para potenciar la actividad inhibitoria de esta estructura. En el estudio de acoplamiento molecular de fragmentos se encontraron candidatos potenciales pero todos presentan inconvenientes, algunos sintéticos ya que hay centros asimétricos, y otros, muestran un exceso de grupos aromáticos lo cual no favorece la relación de saturación/insaturación; por esta razón se decidió analizar el Imatinib[®], el cual, si bien no es inhibidor de AKT, si lo es del receptor de tirosina cinasa (RTK) extracelular, el cual está íntimamente relacionado con la cascada de señalización de AKT. El análisis de la estructura de Imatinib proporcionó un segundo fragmento (Figura 19), el cual además abre la posibilidad de protonación en otra parte de los compuestos que no sea necesariamente la piridina.

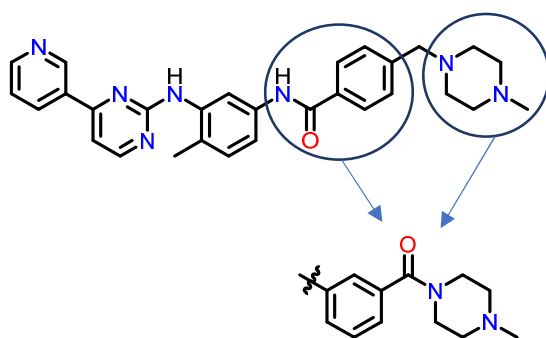


Figura 19. Obtención del fragmento para la posición 6 de la piridina a partir del Imatinib®.

Con este nuevo fragmento, el cual tiene la posibilidad de protonarse en la parte de la piperazina, se propusieron 2 series más, las cuales son homólogas a las primeras propuestas.

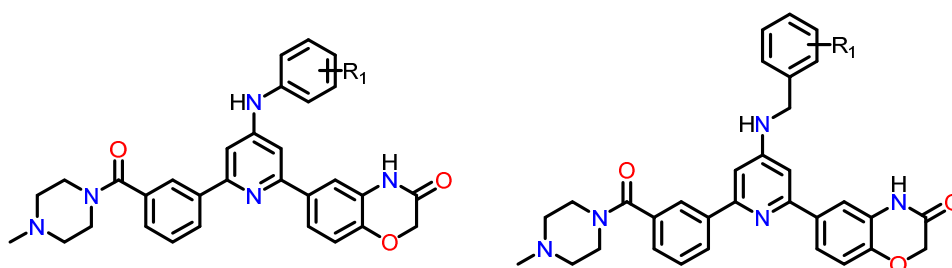
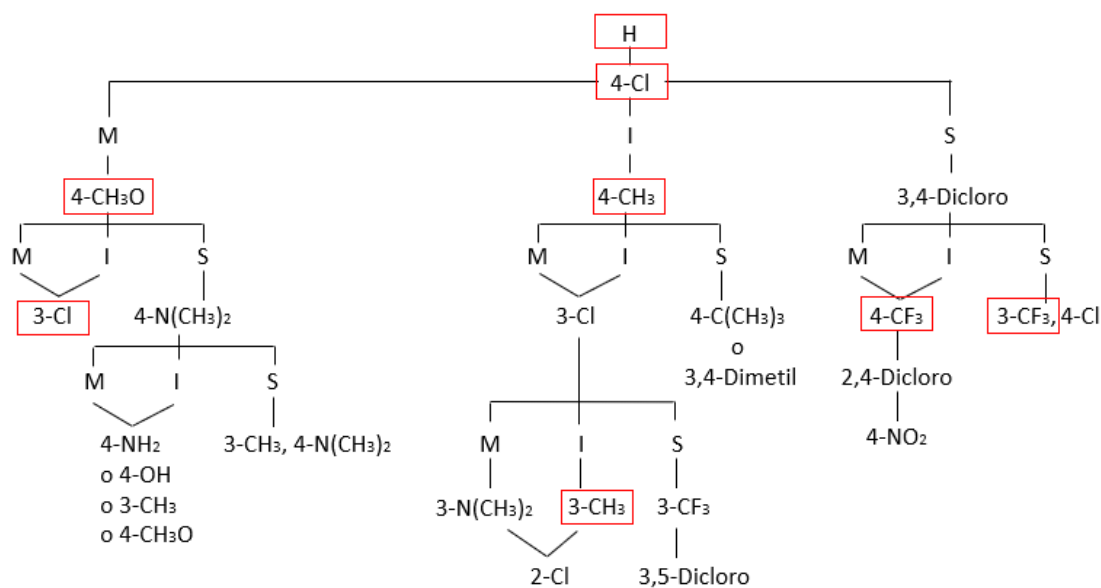


Figura 20. Series no simétricas propuestas.

Teniendo ya 4 sistemas para la fase de síntesis, se propusieron diferentes sustituyentes hidrófobos como sustituyentes en R_1 , con base en el árbol de decisión de Topliss,⁴⁰ el cual explora diferentes opciones electrónicas de los sustituyentes y ayuda a dirigir modificaciones sintéticas dependiendo de resultados biológicos previos. Debido a que aún no se había sintetizado ninguno, se decidió tomar algunos sustituyentes de cada parte del árbol de decisión, los cuales se resaltan en el Esquema 8.



Esquema 10. Árbol de decisión de Topliss resaltando los sustituyentes elegidos.

Para analizar el efecto de la sustitución en las posiciones 3 y 4 del sistema aromático en la posición 4 de la piridina, se propuso una primera serie de compuestos, los cuales se muestran en la siguiente figura.

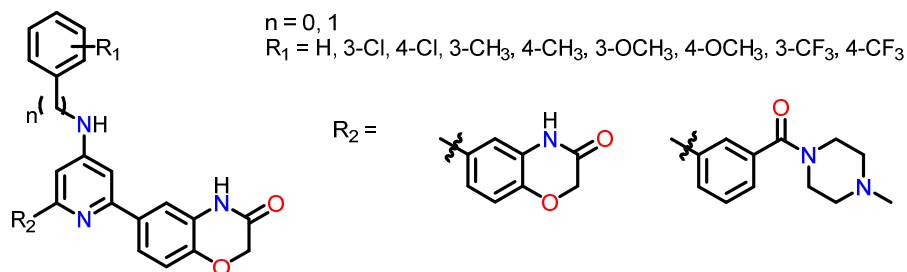
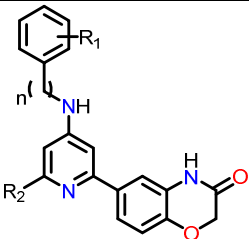
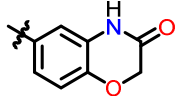
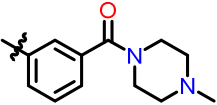


Figura 21. Estructura general de los compuestos a sintetizar.

Las series propuestas se analizaron por el protocolo de acoplamiento molecular anteriormente descrito, utilizando nuevamente los programas autodock 4.2 y Glide para así calcular el puntaje consenso y disminuir el número de compuestos a sintetizar. Es importante resaltar que, en este caso, la búsqueda se enfocó en la selectividad por encima de la actividad como en el caso anterior, ya que la idea es encontrar compuestos selectivos a alguna de los isotipos de AKT. Los resultados obtenidos de este segundo análisis se resumen en la Tabla 7.

Tabla 7. Resultados de los estudios de acoplamiento molecular de las series propuestas

												
Proteína				AKT1			AKT2			AKT3		
Compuestos	n	R ₁	R ₂	Puntaje AD 4.2	Puntaje Glide	Puntaje consenso	Puntaje AD 4.2.	Puntaje Glide	Puntaje consenso	Puntaje AD 4.2	Puntaje Glide	Puntaje consenso
1	0	H		-8.85	-4.47	1.28	-8.61	-4.85	0.98	-7.13	-3.8	0.89
2	0	3-CF ₃		-9.3	-4.15	1.28	-8.34	-7.49	1.18	-7.39	-2.79	0.80
3	0	4-CF ₃		-8.24	-3.89	1.16	-8.43	-4.24	0.91	-7.16	-3.16	0.82
4	0	3-Cl		-10.06	-3.95	1.32	-8.99	-5.48	1.05	-8.09	-2.75	0.85
5	0	4-Cl		-8.95	-4.30	1.27	-8.83	-5.57	1.05	-7.81	-2.96	0.85
6	0	3-CH ₃		-9.16	-4.21	1.28	-8.57	-5.36	1.02	-7.53	-2.66	0.80
7	0	4-CH ₃		-10.03	-3.52	1.26	-8.97	-5.31	1.04	-7.67	-2.91	0.83
8	0	3-OCH ₃		-8.56	-3.87	1.19	-8.78	-5.01	1.00	-7.08	-2.66	0.77
9	0	4-OCH ₃		-9.42	-3.75	1.24	-8.58	-5.14	1.00	-7.34	-2.07	0.73
10	1	H		-8.04	-5.78	1.38	-9.07	-5.77	1.08	-7.91	-6.47	1.21
11	1	3-CF ₃		-8.11	-4.46	1.22	-9.14	-6	1.11	-7.76	-5.52	1.11
12	1	4-CF ₃		-8.2	-5.71	1.38	-9.32	-7.06	1.21	-7.77	-6.42	1.20
13	1	3-Cl		-8.64	-5.3	1.37	-9.38	-6.2	1.14	-8.08	-4.94	1.07
14	1	4-Cl		-8.38	-5.84	1.41	-9.44	-5.18	1.06	-8.13	-6.69	1.25
15	1	3-CH ₃		-9.14	-5.4	1.42	-9.24	-6.05	1.12	-8.23	-5.95	1.18
16	1	4-CH ₃		-8.49	-5.31	1.36	-9.49	-5.29	1.07	-8.35	-6.26	1.22

17	1	3-OCH ₃		-8.79	-5.16	1.36	-9.52	-6.15	1.14	-7.88	-4.38	1.00	
18	1	4-OCH ₃		-8.93	-6.13	1.50	-9.43	-6.98	1.21	-7.21	-5.99	1.12	
19	0	H		-7.66	-4.66	1.21	-9.27	-8.17	1.30	-6.97	-4.87	0.99	
20	0	3-CF ₃		-7.82	-5.52	1.33	-9.44	-9.51	1.42	-7.81	-4.22	0.98	
21	0	4-CF ₃		-9.06	-5.36	1.41	-8.57	-8.6	1.29	-7.45	-5.14	1.05	
22	0	3-Cl		-9.72	-5.74	1.51	-9.42	-9.11	1.38	-7.93	-3.99	0.96	
23	0	4-Cl		-9.58	-5.78	1.51	-10.13	-7.36	1.29	-8.22	-4.33	1.02	
24	0	3-CH ₃		-9.2	-5.13	1.39	-9.72	-7.11	1.24	-7.67	-3.94	0.94	
25	0	4-CH ₃		-8.52	-3.99	1.20	-9.28	-7.97	1.28	-7.7	-4.22	0.97	
26	0	3-OCH ₃		-9.03	-5.26	1.40	-9.2	-7.54	1.24	-7.6	-3.95	0.94	
27	0	4-OCH ₃		-10.05	-4.83	1.43	-9.34	-8.83	1.36	-8.12	-4.86	1.07	
28	1	H		-9.75	-4.68	1.38	-9.73	-7.04	1.23	-7.3	-3.85	0.90	
29	1	3-CF ₃		-7.61	-6.27	1.40	-8.96	-6.88	1.17	-7.26	-5.67	1.09	
30	1	4-CF ₃		-9.3	-4.59	1.34	-8.9	-7.47	1.21	-7.51	-7.7	1.31	
31	1	3-Cl		-8.93	-6.27	1.51	-9.86	-7.32	1.26	-7.21	-6.22	1.14	
32	1	4-Cl		-9.83	-5.68	1.51	-11.07	-9.18	1.50	-7.67	-4.11	0.96	
33	1	3-CH ₃		-11.08	-7.63	1.86	-10.47	-7.23	1.30	-8.96	-6.67	1.31	
34	1	4-CH ₃		-10.89	-7.00	1.76	-10.32	-8.41	1.39	-9.44	-6.64	1.34	
35	1	3-OCH ₃		-8.37	-8.43	1.73	-9.28	-9.25	1.39	-7.6	-6.43	1.19	
36	1	4-OCH ₃		-8.81	-6.86	1.58	-9.44	-8.84	1.36	-8.99	-6.44	1.29	
GSK690693	-	-		-	-6.06	-4.04	1.00	-7.52	-6.01	1.00	-7.13	-4.9	1.00

En la Figura 22 se resumen los resultados de la Tabla 7, en el eje X y Y se pueden observar los resultados de puntaje consenso con los isotipos AKT1 y AKT2 respectivamente, mientras que por colores se puede observar los resultados con el isotipo AKT3 en los cuales, entre más verde significa mayor valor y entre más rojo, menor valor.

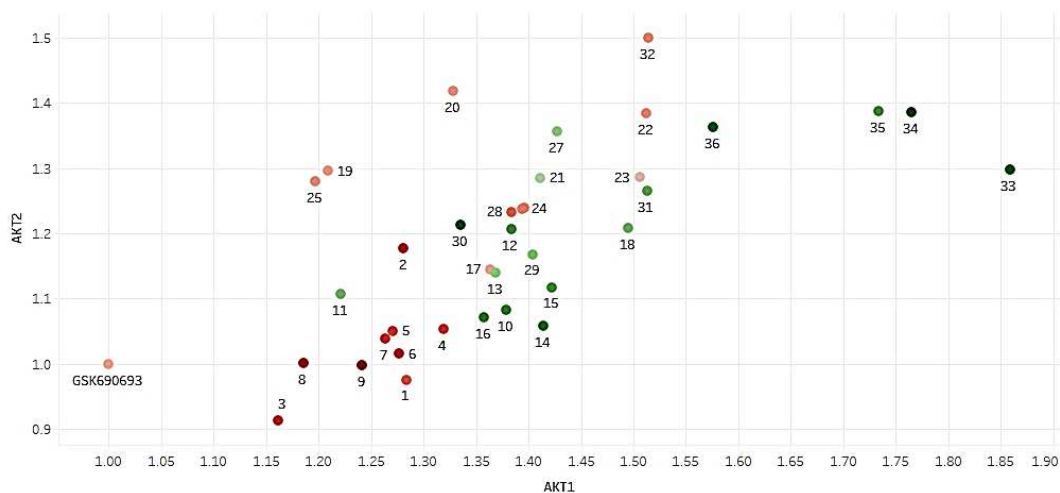


Figura 22. Resumen de los puntajes consenso de los compuestos propuestos en los 3 isotipos de AKT.

En estas series se puede notar que los compuestos **33-36**, los cuales son asimétricos con $n = 1$ y sustituyentes metilo y metoxilo, son los más promiscuos, ya que muestran afinidad hacia los 3 isotipos de AKT. Este hecho provocó que fueran excluidos del grupo final a sintetizar, debido a que mostraron muy baja selectividad.

Debido a que en el presente trabajo de investigación se propone comparar los resultados de series homólogas de compuestos, se decidió excluir todos los derivados con sustituyentes metilo y metoxilo en las series a sintetizar, por lo cual, se escogió un grupo de 20 compuestos para pasar a la fase de síntesis; los compuestos elegidos para la siguiente fase se muestran en la Figura 23.

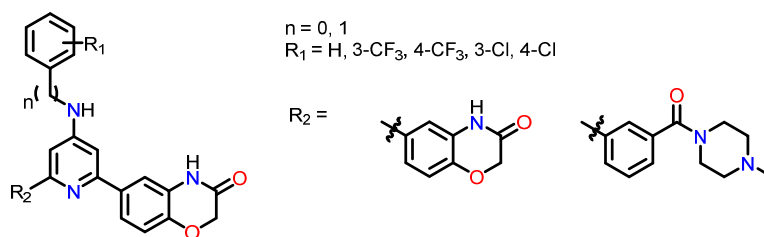


Figura 23. Grupo final de compuestos a sintetizar.

El interés en el grupo de compuestos propuestos surge de comparar las diferencias entre sistemas neutros y sistemas con diferentes grados de protonación, ya que si se analizan las estructuras teniendo en cuenta el pH fisiológico se puede notar que sus estados de protonación serán como se muestra en la Figura 24.

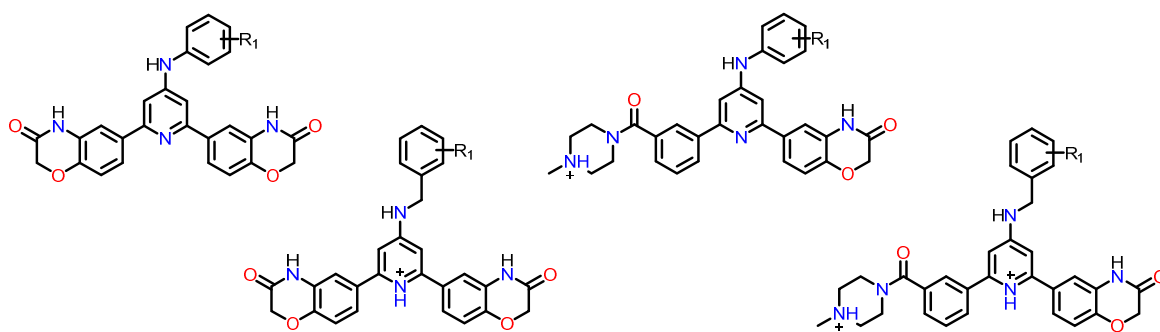


Figura 24. Protonación de las series propuestas a pH fisiológico.

7.2. Síntesis de los compuestos diseñados como inhibidores de AKT

A continuación se describe la síntesis de las series propuestas, así como la metodología para obtener los intermediarios necesarios para su preparación.

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

La síntesis inició con la obtención del éster borónico de la 2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona **4**; para esto, se partió del 4-bromo-2-nitrofenol **1**, el cual se hizo reaccionar con α -bromoacetato de etilo en acetona y carbonato de potasio para así acceder al 2-(4-bromo-2-nitrofenoxi)acetato de etilo **2** por medio de una reacción S_N2. La obtención del producto se confirmó al analizar el espectro de RMN ¹H, en el cual, además de las tres señales correspondientes al sistema aromático que integran cada una para un protón, aparecen tres señales que confirman la *O*-alquilación del –OH; una señal triple en 1.22 ppm que integra para 3 protones, una señal cuádruple en 4.20 ppm que integra para dos protones y una señal simple a 4.69 ppm que integra para 2 protones. Además, el su punto de fusión del compuesto obtenido (68 – 69 °C) coincide con el reportado.⁴¹

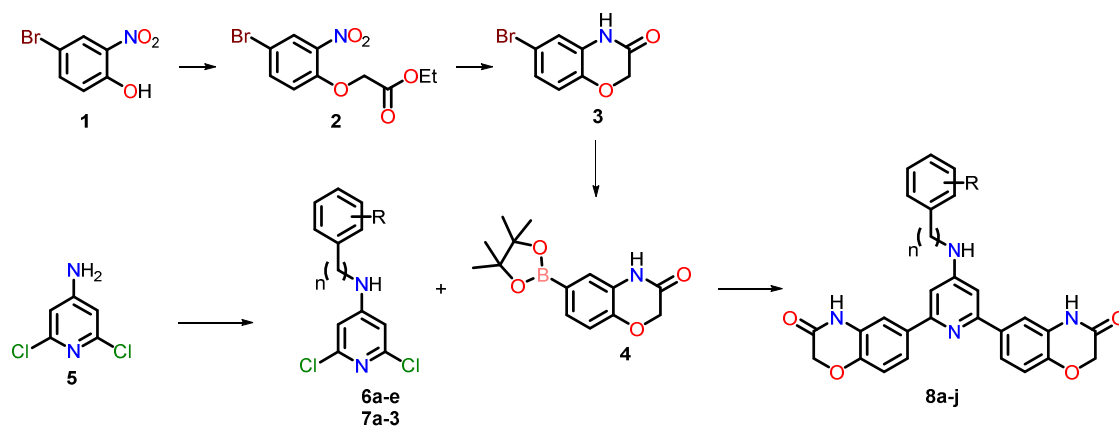
La obtención de **2** permitió realizar una reacción en dominó de reducción-ciclación utilizando hierro en ácido acético para obtener el intermediario 6-bromo-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona **3**, cuya identidad se corroboró al analizar su espectro de RMN ¹H en el cual se puede observar la desaparición del sistema etoxi y la aparición, en 10.81 ppm, de una señal simple que integra para un protón la cual corresponde al NH de la 2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona recién formada; además, su punto de fusión (222 – 223 °C) coincide con el reportado.⁴² Cabe resaltar que se usó el sistema Fe⁰/AcOH ya que este es más suave que el sistema Sn/HCl y además, evita reacciones colaterales como hidrogenólisis, que podría presentarse al usar H₂/Pd.

Finalmente, se obtuvo el éster borónico **4** sometiendo el intermediario **3** a las condiciones de borilación de Miyaura, utilizando diborobispinacolato, [1,1'-Bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaldio(II), en complejo con diclorometano y acetato de potasio, como catalizador. La obtención de **4** se corroboró por RMN ¹H, el indicio clave del éxito de esta reacción es la aparición de una señal simple que integra para 12 protones

en 1.26 ppm, los cuales corresponden a los 4 grupos metilo correspondientes al éster borónico; asimismo, en el espectro de RMN ^{13}C aparece, además de la señal correspondiente a los metilos en 25.0 ppm, una señal en 84.1 ppm correspondiente a los carbonos cuaternarios base de oxígeno del boropinacolato.

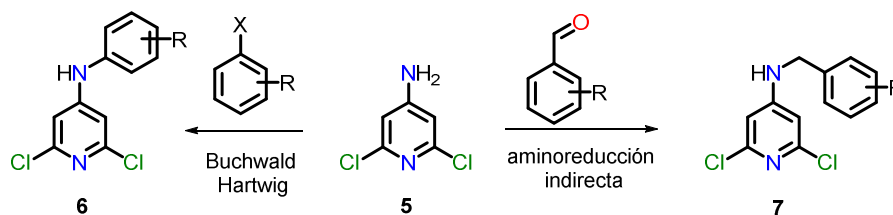
7.2.2. Síntesis de las 4-amino-2,6-dicloropiridinas 4-*N*-sustituidas

Para preparar la serie **8a-j** se propuso una síntesis convergente, donde por una parte se debía obtener el éster borónico **4** y por otra parte, dos series de aminopiridinas 4-*N*-sustituidas con fragmentos arilo y bencilo con las cuales se realizaría el acoplamiento de Suzuki (Esquema 9)



Esquema 11. Síntesis convergente de los derivados **8a-j**.

Para introducir los fragmentos arilo y bencilo se propusieron 2 estrategias sintéticas: una reacción de acoplamiento Carbono-Nitrógeno de Buchwald Hartwig entre halogenoderivados del benceno y el compuesto **5**, para la *N*-arilación; y una reacción de aminoreducción indirecta entre **5** y derivados de benzaldehído para la *N*-alquilación con el fragmento bencilo (Esquema 10).



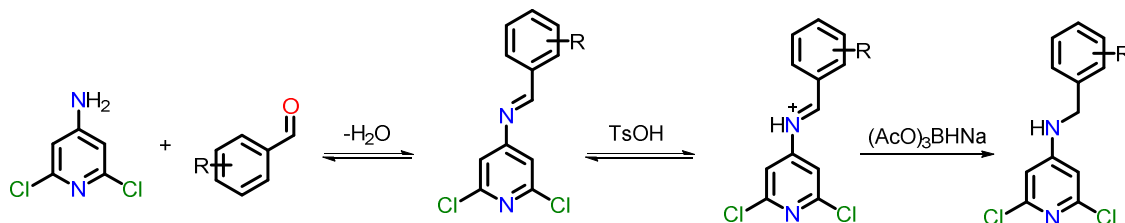
Esquema 12. Propuesta sintética para la obtención de las piridinas **6** y **7**.

Para la obtención de los intermediarios **6a-e** el compuesto **5** se sometió a las condiciones de acoplamiento de Buchwald Hartwig utilizando bis(dibenzalacetona)paladio (0), Xantphos y carbonato de cesio como base, además, se eligieron diferentes derivados halogenados en su mayoría bromocompuestos para el acoplamiento, sólo en el caso donde R = 3-CF₃ se utilizó un derivado con iodo. En general la reacción transcurrió de manera limpia y los subproductos generados se eliminaron utilizando cromatografía en columna. La obtención de las piridinas **6a-e** se corroboró por RMN¹H ya que en sus espectros aparecen las señales correspondientes al nuevo sistema aromático presente en la molécula y se mantiene la señal correspondiente a los protones de la piridina; además, entre 6.23 – 6.71 ppm aparece una señal que integra para un protón correspondiente al NH. Los derivados **6a-e** se obtuvieron con rendimientos entre 64 y 89%, siendo el de mayor rendimiento el derivado **6b**. Cabe resaltar que este derivado proviene de la reacción entre **5** y el 1-iodo-3-(trifluorometil)benceno, evidenciando así, que los derivados con un átomo de Iodo favorecen las reacciones de acoplamiento.

Para la síntesis de los derivados **7a-e** el intermediario **5** se sometió al protocolo de aminoreducción indirecta utilizando derivados de benzaldehído sustituidos adecuadamente. Se preparó la imina correspondiente utilizando ácido *p*-toluensulfónico y tolueno como disolvente, eliminando el agua mediante una trampa de Dean-Stark. La reacción se complementó añadiendo triacetoxiborohidruro de sodio para que una vez formada la imina, ésta se reduzca inmediatamente a la amina. Cabe mencionar que inicialmente se planeó emplear borohidruro de sodio como agente reductor; sin embargo, debido a que la reacción de formación de imina nunca se completó, se debió realizar una reducción *in situ*. La razón es que el grupo amino de la piridina es muy poco nucleofílico ya que su par de electrones está comprometido con el núcleo de piridina, esto provoca que la reacción se lleve a cabo lentamente y además, una vez formada la imina, el efecto electroatractor de la piridina induce un ataque rápido por parte del agua que se pierde, lo cual desplaza el equilibrio hacia los reactivos de partida.

Para superar este inconveniente se planteó entonces desplazar el equilibrio eliminando la imina del medio de reacción, para esto, se agregó triacetoxiborohidruro de sodio a la reacción, el cual, a diferencia del borohidruro de sodio, es selectivo hacia las iminas, con lo

cual el equilibrio se desplaza hacia la formación de amina. Los derivados **7b-e** se obtuvieron con rendimientos entre el 58 – 92% (Esquema 11).



Esquema 13. Proceso general de la reacción de aminoreducción indirecta realizada.

La obtención de esta serie de piridinas se comprobó por los espectros de RMN ^1H , en donde se observan, además de los protones correspondientes al anillo de benceno, dos señales simples que corroboran la alquilación del grupo amino: una entre 4.98 – 5.05 ppm que integra para un protón y corresponde al hidrógeno del grupo amino ahora secundario; y otra, entre 4.35 – 4.44 ppm que integra para dos protones correspondiente al metileno bencílico.

No obstante, la piridina **7a**, aquella derivada del benzaldehído, no se logró obtener por esta metodología, a pesar de que se probaron diferentes condiciones de reacción. La poca reactividad se debe a que a diferencia de los otros aldehídos, el benzaldehído no tiene ningún sustituyente electroattractor que aumente la electrofilia del carbonilo, como sucede con los otros aldehídos utilizados en esta serie de reacciones.

Aprovechando la experiencia favorable con la reacción de Buchwald Hartwig, se decidió realizar este procedimiento para la síntesis de **7a**, utilizando bromuro de bencilo y las condiciones previamente mencionadas, se logró obtener el compuesto **7a** con un rendimiento de 90%, siendo el rendimiento más alto de todas las reacciones de acoplamiento Carbono-Nitrógeno realizadas. El éxito del proceso fue inesperado ya que el primer paso del mecanismo de reacción implica la adición oxidativa del átomo de Paladio en un enlace $\text{Csp}^3\text{-Br}$ y este tipo de adiciones suelen ser más lentas y complicadas debido a la densidad electrónica en el enlace.

Finalmente, la obtención de los compuestos de las series **6a-e** y **7a-e** se confirmó al analizar los resultados de la medición de masas de alta resolución por medio de la técnica de APCI (Tabla 8).

Tabla 8. Resultados análisis de espectrometría de masas de las series **6a-e** y **7a-e**

<i>Compuesto</i>	<i>Masa teórica</i>	<i>Masa experimental</i>	<i>% error (ppm)</i>
6a	239.0137	239.0044	-38.9
6b	307.0011	306.9921	-28.3
6c	307.0011	306.9921	-29.3
6d	272.9784	272.9790	2.2
6e	272.9784	272.9789	1.8
7a	253.0294	253.0302	3.2
7b	321.0168	321.0151	-5.3
7c	321.0168	321.0143	-7.8
7d	286.9904	286.9913	3.1
7e	286.9904	286.9939	12.2

Teniendo en cuenta el éxito de la reacción de Buchwald Hartwig entre **5** y el bromuro de bencilo, se probó esta reacción con 1-(bromometil)-4-(trifluorometil)benceno con el fin de analizar si se podía obtener el intermediario **7c** con mejores rendimientos, sin embargo, en este caso la reacción no tuvo resultados satisfactorios ya que se obtuvo una mezcla de varios compuestos por lo que se descartó esta metodología para los otros derivados de la serie **7**.

7.2.3. Síntesis de las 6,6'-(4-aminopiridina-2,6-diil)bis(2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona) 4N-sustituidas **8a-j**

La obtención de las 4-aminopiridinas 4N-sustituidas **6a-e** y **7a-e** permitió acceder a la serie **8a-j**. Para obtener esta serie de derivados se realizó un acoplamiento Carbono-Carbono entre las series **6 - 7** y el éster borónico **4** bajo las condiciones de Suzuki, utilizando tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0) como catalizador y carbonato de potasio como base. La

reacción se llevó a cabo en un reactor de microondas utilizando una mezcla acetonitrilo:agua 4:1 como disolvente.

Inicialmente la reacción se intentó llevar a cabo con calentamiento convencional, sin embargo, los tiempos de reacción fueron bastante prolongados y los rendimientos bajos; por esta razón, se decidió utilizar un reactor de microondas. En este proceso se probaron diferentes temperaturas y tiempos de reacción; se encontró que las condiciones óptimas para esta reacción son 45 minutos de reacción a 170 °C.

Utilizando estas condiciones se logró obtener la serie **8a-j** con rendimientos entre 48 – 80%, los compuestos que se obtuvieron con más bajos rendimientos fueron los derivados sustituidos con 3- y 4-cloro en el sistema aromático unido al grupo amino; la razón recae en el hecho de que es posible que se den reacciones secundarias debidas al otro cloro en la estructura, no obstante, los rendimientos muestran que la reacción presenta cierta quimioselectividad hacia los átomos de cloro unidos a la piridina, este fenómeno se debe a que la piridina es un sistema π -deficiente, lo cual favorece la adición oxidativa del paladio a ese enlace.

La confirmación de la obtención de la serie **8a-j** se corroboró al analizar sus espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C y los experimentos bidimensionales de ^1H - ^1H COSY, HSQC y HMBC. A continuación, se muestra de manera representativa la elucidación del compuesto **8g**. La elucidación estructural de cada compuesto se describe a detalle en la parte experimental.

Para empezar, en el espectro de RMN ^1H (Figura 25) se observan, a campo alto, las señales correspondientes a los metilenos; el bencílico, se presenta como una señal doble que integra para dos protones a 4.59 ppm; y el metileno endocíclico del sistema de la 2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona, como una señal simple que integra para 4 protones a 4.61 ppm. En la zona aromática se aprecia la señal correspondiente a los dos protones de la piridina en 6.90 ppm como una señal simple, mientras que en 7.01, 7.57 y 7.62 ppm aparecen las señales de los protones 8-H, 7-H y 5-H del sistema de la benzoxazinona, respectivamente.

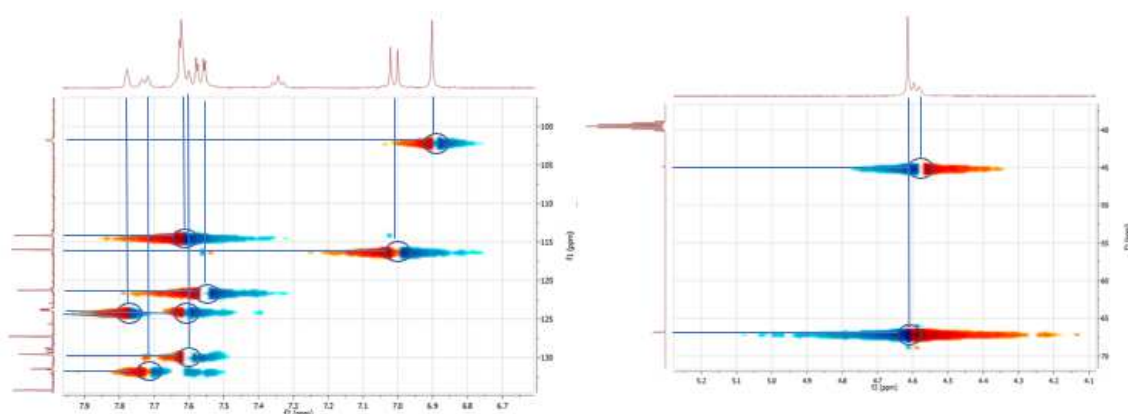


Figura 26. Espectro HSQC del compuesto **8g**.

Además de la confirmación por RMN, la mayoría de las estructuras de los compuestos de la serie **8a-j** quedó plenamente confirmada al analizar los resultados de masas de alta resolución (Tabla 9), los cuales se obtuvieron por medio de las técnicas ESI (ionización por electrospray) en la mayoría de los casos o EI (impacto de electrones).

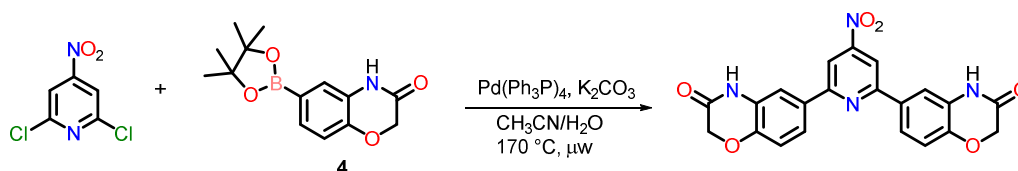
Tabla 9. Datos de masas de la serie **8**

<i>Compuesto</i>	<i>Masa teórica</i>	<i>Masa experimental</i>	<i>% error (ppm)</i>
8a	465.15628	465.15789	3.5
8b	533.14366	533.14538	3.2
8c	533.14366	533.14454	1.7
8d	499.11731	499.11722	-0.2
8e	499.11731	499.11742	0.2
8f	479.17193	479.17212	0.4
8h*	546.1515	546.1505	-1.8
8j*	512.1251	512.1260	1.7

* Muestras analizadas por la técnica de EI.

Cabe mencionar que la síntesis de la serie **8a-j** se intentó al inicio por medio de un acoplamiento de Suzuki con la 2,6-dicloro-4-nitropiridina y el intermediario **4** utilizando un reactor de microondas para así obtener un intermediario en el cual el grupo nitro, que después de reducirse a amino, se pudiera derivatizar (Esquema 12); sin embargo, la reacción de acoplamiento procedió con mucha dificultad ya que el producto crudo de esta

reacción fue una resina insoluble en todos los disolventes probados en el laboratorio (agua, metanol, etanol, acetona, acetonitrilo, DMF, DMSO) lo cual complicó mucho el tratamiento de la muestra. El nitroderivado de interés se aisló de la mezcla cruda por tratamiento con DMF con agitación durante varios días, obteniendo el compuesto en muy bajo rendimiento ($\approx 25\%$).



Esquema 14. Obtención del primer intermediario clave propuesto.

En la Figura 27 se muestra el espectro de RMN ^1H del intermediario propuesto, ya que aparecen las señales correspondientes al sistema de la benzoxazinona y además se observa una señal en 8.3 ppm que integra para 2 protones, la cual corresponde a los dos hidrógenos presentes en la piridina.

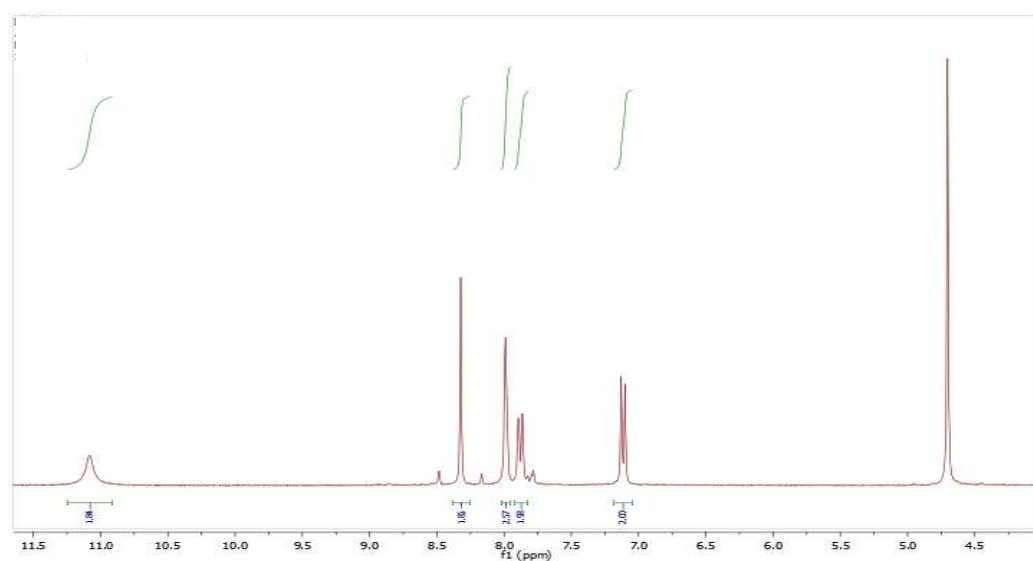
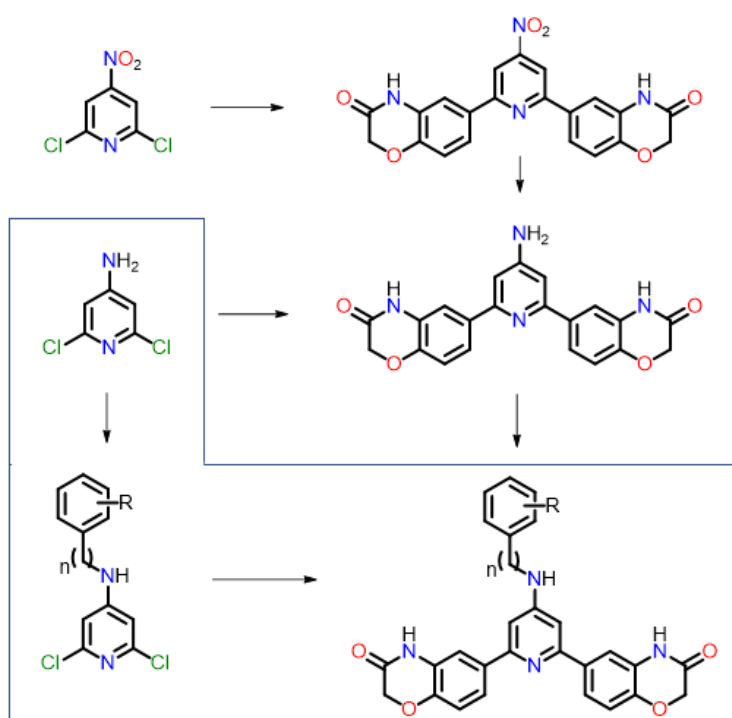


Figura 27. Espectro de RMN ^1H del nitroderivado propuesto como intermediario clave.

Algo que podría explicar el problema de esta reacción es que recientemente se reportó que el enlace carbono-nitro puede sufrir reacciones de adición oxidante;⁴³ si el enlace $\text{C}-\text{NO}_2$ presenta este tipo de reacciones, las posibilidades de reacciones colaterales se incrementan

en la reacción propuesta en el esquema anterior, por lo cual, se decidió cambiar la estrategia de síntesis.

Otra ruta propuesta consistió en realizar el acoplamiento C-C directamente con la 4-amino-2,6-dicloropiridina, aunque se sabe que una amina libre presenta problemas en la reacción de Suzuki, ya que, dependiendo del tipo de amina, el catalizador puede envenenarse por coordinación con el grupo amino. En efecto, esta reacción tuvo muchas complicaciones y el rendimiento fue muy bajo, por lo cual se descartó una ruta que llevara a un intermediario clave que pudiera ser derivatizado. En el Esquema 13 se resumen las 3 rutas propuestas y se encierra en azul la ruta sintética que llevó a la obtención de la serie **8a-j**.



Esquema 15. Rutas sintéticas ensayadas para la síntesis de la serie **8a-j**.

7.2.4. Síntesis de las 6-(4-amino-6-cloropiridin-2-il)-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-onas *N*-sustituidas **9a-j**

Para la síntesis de la serie no simétrica fue necesario implementar una metodología que permitiera tener el producto de monoacoplamiento entre los compuestos **6-7** y el éster bórico **4**. Después de ensayar diferentes proporciones entre los reactantes, se encontró que

la relación 1.25:1, entre los derivados de piridina y el éster borónico, favoreció la formación del producto monoacoplado con rendimientos moderados siendo uno de los contaminantes el producto de doble acoplamiento. Es importante mencionar que cuando se empleó una relación 1:1 de las correspondientes materias primas, se obtiene la mezcla de productos de mono y diacoplamiento en proporciones similares, además, una cantidad considerable de las piridinas de partida sin reaccionar. Esto se debe a que en el medio de reacción, al formarse una cantidad considerable de producto monoacoplado, éste compete como sustrato con las aminas **6** y **7** para el acoplamiento de Suzuki con **4**, provocando así que el éster borónico reaccione en un doble acoplamiento.

Con las condiciones de reacción óptimas se logró acceder a la serie **9a-j** con rendimientos entre el 40 y el 63%; en el caso de los derivados clorados en el sustituyente en posición 4 de la piridina, el rendimiento nunca superó el 50%; este hecho, al igual que en la serie **8a-j** se puede explicar por posibles reacciones secundarias, las cuales, sumadas a la obtención de los productos de doble acoplamiento llevaron a que los rendimientos fueran bajos.

La obtención de los intermediarios monoacoplados **9a-j** se pudo corroborar por espectrometría de masas utilizando la técnica de APCI, los valores obtenidos se muestran en la Tabla 10.

Tabla 11. Datos de masas de la serie **9**

<i>Compuesto</i>	<i>Masa teórica</i>	<i>Masa experimental</i>	<i>% error (ppm)</i>
9a	352.0847	352.0817	-8.5
9b	420.0721	420.0652	-16.4
9c	420.0721	420.0660	-14.5
9d	386.0458	386.0452	-1.5
9e	386.0458	386.0437	-5.4
9f	366.1004	366.0940	-17.5
9g	434.0878	434.0812	-15.2
9h	434.0878	434.0801	-17.7
9i	400.0614	400.0606	-2.0
9j	400.0614	400.0577	-9.2

Además de la confirmación por espectrometría de masas de alta resolución, el análisis de los espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C y los diferentes experimentos bidimensionales permitió la asignación inequívoca de todos los protones y carbonos presentes en las moléculas que componen la serie **9**. Los desplazamientos, tanto en los espectros de protón como de carbono guardan mucha similitud con la serie **8a-j**; aunque, en estos espectros se aprecia una clara diferencia en los desplazamientos de los protones del anillo de piridina, los cuales al estar rodeados de ambientes magnéticos diferentes dejan de ser equivalentes en este tipo de compuestos. En la Figura 28 se señalan los protones unidos al anillo de piridina.

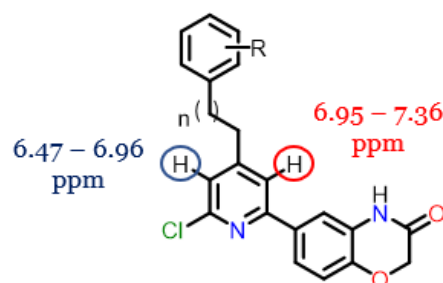


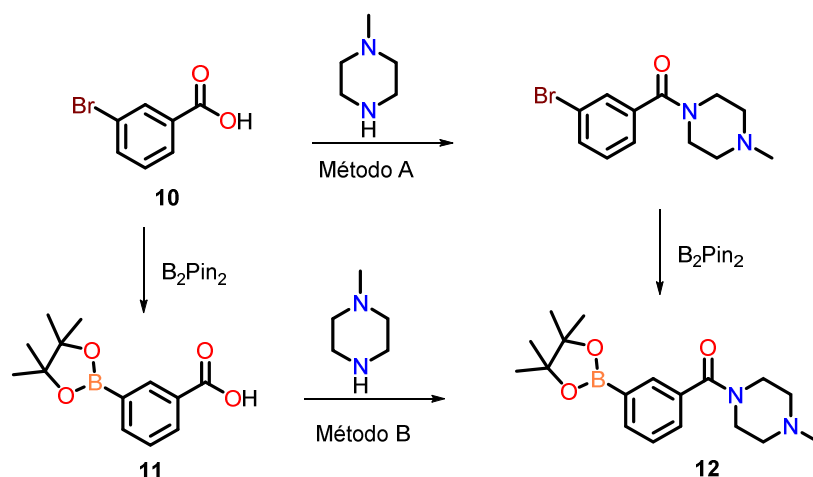
Figura 28. Protones unidos al anillo de piridina en la serie **9a-j**.

En los desplazamientos de estos protones se nota que el protón señalado en rojo conserva un desplazamiento igual o muy cercano a los de la serie **8**, mientras que el protón señalado en azul aparece a campo más alto; incluso en las series **9a-e** se puede calcular la constante de acoplamiento de estos protones, la cual es de aproximadamente 1.7 Hz, correspondiente a un acoplamiento en posición meta.

7.2.5. Síntesis de la (4-metilpiperazin-1-il)(3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil)metanona **12**

Para la síntesis de los compuestos de la serie **13a-j** fue necesario preparar el intermediario adecuado (compuesto **12**) para insertar el nuevo sustituyente en posición 6 de la piridina. Para la obtención de **12** se ensayaron dos metodologías, las cuales se muestran el Esquema 14. La primera (método A) fue preparar primero la amida (3-bromofenil)(4-metilpiperazin-1-il)metanona a partir del ácido *m*-bromobenzoico **10** y después realizar la borilación de

Miyaura. La segunda propuesta (método B) fue primeramente realizar la borilación para obtener el ácido 3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il) benzoico **11**, y en un segundo paso la formación de la amida para dar el compuesto **12**.



Esquema 16. Rutas sintéticas propuestas para la obtención de **12**.

En el método A, la (3-bromofenil)(4-metilpiperazin-1-il)metanona se obtuvo utilizando 1,1'-carbonildiimidazol (CDI) como agente acoplante y diclorometano como disolvente. Se usó CDI como agente acoplante ya que fue el que mejores resultados ofreció de entre los diversos agentes probados tales como DCC, DCC/DMAP y COMU. Una vez obtenida dicha la amida intermedia, se probó la obtención del éster borónico **12** utilizando las condiciones de borilación de Miyaura, pero la reacción no procedió. Al analizar la mezcla de reacción, por cromatografía en capa fina, se evidenció la formación de una gran cantidad de subproductos lo cual impidió el aislamiento y purificación del compuesto **12**. La explicación a esto puede estar en la posible interacción del nitrógeno básico de la 4-metilpiperazina, el cual podría interactuar con el paladio del catalizador y desencadenar reacciones secundarias.

En el método B, se invirtieron los pasos de síntesis; primero se llevó a cabo la borilación de Miyaura utilizando diborobispinacolato, [1,1'-Bis(difenilfosfino)ferroceno] dicloropaladio(II) en complejo con diclorometano y acetato de potasio, esta reacción permitió obtener el ácido 3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il) benzoico **11** con un rendimiento del 52%. La obtención de este compuesto se pudo corroborar al analizar su

espectro de RMN ^1H , en el cual a campo alto aparece una señal simple que integra para 12 protones los cuales coinciden con los 4 grupos metilos equivalentes en el éster borónico, además de conservarse las señales propias del ácido benzoico.

Una vez obtenido el ácido **11**, se preparó la (4-metilpiperazin-1-il)(3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil)metanona **12** haciendo reaccionar a **11** con 1.5 equivalentes de 1-metilpiperazina y CDI como agente acoplante. El proceso se llevó a cabo en diclorometano a temperatura ambiente, el compuesto deseado **12** se obtuvo con un rendimiento del 63%. Al analizar el espectro de RMN ^1H se puede corroborar el éxito de la reacción ya que en 1.30 ppm se puede observar una señal simple que integra para 12 protones la cual corresponde a los cuatro grupos metilos del éster borónico, además, en 2.29 ppm aparece una señal simple que integra para tres protones la cual corresponde al grupo metilo unido al átomo de Nitrógeno de la metilpiperazina, también se pueden ver las señales correspondientes a los cuatro metilenos del ciclo de la piperazina y los protones aromáticos; por último, se observa la desaparición del protón correspondiente al ácido carboxílico en 11.02 ppm, con esta información espectral se puede concluir que la obtención del compuesto **12** fue exitosa.

7.2.6. Síntesis de las 6-(4-amino-6-(3-(4-metilpiperazin-1-carbonil)fenil)piridin-2-il)-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-onas 4 N-sustituidas 13a-j

La obtención del éster borónico **12** abrió la puerta para la obtención de la serie final no simétrica **13a-j**. Para la síntesis de esta serie se hicieron reaccionar los derivados monoacoplados **9a-j** con el intermediario **12**, bajo las condiciones de la reacción de Suzuki, utilizando tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0) como catalizador y carbonato de potasio como base; la reacción se llevó a cabo en acetonitrilo:agua a 170 °C durante 45 minutos utilizando un reactor de microondas. Esta reacción sólo tuvo una complicación y fue el estado físico del éster borónico **12**, ya que se obtuvo como un aceite de alta viscosidad, se debió preparar una disolución de éste en acetonitrilo y a partir de ahí, adicionarla al tubo del reactor de microondas para llevar a cabo la reacción.

La serie **13a-j** se obtuvo con rendimientos entre 46 y 60% después de su purificación, esto se debe principalmente a que para algunos compuestos se detectó un contaminante que fue

difícil eliminar a pesar de continuas purificaciones por cromatografía y recristalizaciones, con detrimento en el rendimiento. A pesar de esto, en algunos casos no se pudo retirar completamente el contaminante presente. No obstante, los espectros de masas de alta resolución, los cuales se realizaron por la técnica de APCI, confirman la obtención de toda la serie (Tabla 11).

Tabla 11. Datos de masas de la serie **13a-j**

<i>Compuesto</i>	<i>Masa teórica</i>	<i>Masa experimental</i>	<i>% error (ppm)</i>
13a	520.2343	520.2304	-7.5
13b	588.2217	588.2138	-13.4
13c	588.2217	588.2167	-8.5
13d	554.1953	554.1877	-13.7
13e	554.1953	554.188	-13.2
13f	534.2500	534.2392	-20.2
13g	602.2374	602.2374	0.0
13h	602.2374	602.2373	-0.2
13i	568.2110	568.2064	-8.1
13j	568.2110	568.2005	-18.5

Así mismo, aunado a los datos de espectrometría de masas, el análisis de los espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C y los correspondientes experimentos bidimensionales ^1H - ^1H COSY, HSQC y HMBC permitieron confirmar y asignar de manera inequívoca todos los átomos de Hidrógeno y Carbono presentes en la serie **13**. A continuación se muestra de manera representativa la elucidación del espectro de RMN ^1H del compuesto **13b**. Los datos espectroscópicos de todos los compuestos se describen en la parte experimental.

En el espectro de RMN ^1H (Figura 29) se aprecian las señales ya identificadas del sistema de la 2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona como 7.07 ppm (8-H), 7.62 ppm (7-H) y 7.71 ppm (5-H) marcadas en verde. Además, los dos protones unidos a átomos de Nitrógeno se señalan en rojo siendo el protón de la oxazinona el que aparece a campo más bajo; también en rojo se señalan los dos protones de la piridina, los cuales ya no son equivalentes para

este sistema, para estos protones, a campo más bajo aparece el protón vecino al sistema de la (4-metilpiperazin-1-il)(fenil)metanona.

También, se señalan en gris las señales de los protones correspondientes al sustituyente en posición 4 de la piridina. Ahora bien, las señales alifáticas correspondientes al sistema de la (4-metilpiperazin-1-il)(fenil)metanona junto con el metileno de la 2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona se señalan en azul, cabe resaltar que este último aparece a campo más bajo que las demás señales alifáticas; además, una de las señales del sistema de la piperazina se superpone con la señal de agua presente en el disolvente. Finalmente las señales aromáticas de la (4-metilpiperazin-1-il)(fenil)metanona se señalan en color amarillo, de éstas señales se destacan las dos señales a campo bajo por encima de 8 ppm, las cuales corresponden a las posiciones 2 y 6 con respecto al átomo de Carbono unido al núcleo de piridina.

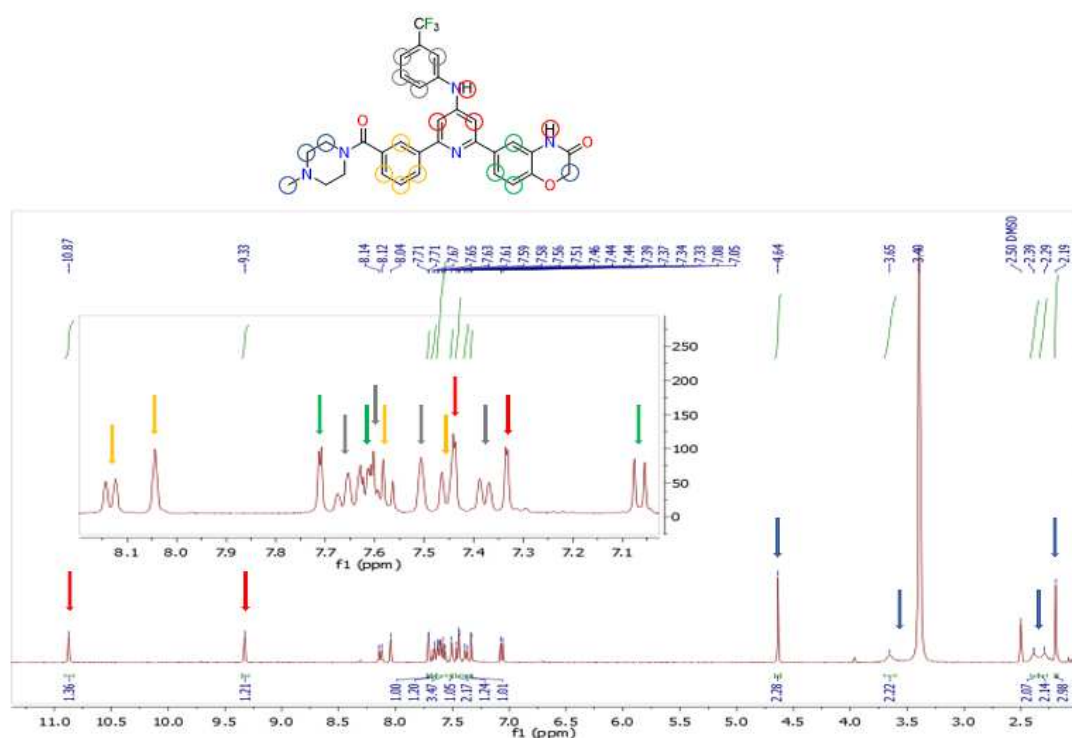


Figura 29. Espectro de RMN ¹H del compuesto **13b**.

Para la completa identificación de la serie **13a-j** se asignaron los carbonos utilizando, además del espectro de RMN ¹³C, los espectros de HSQC y HMBC, de esta forma se pudieron identificar todos los carbonos presentes en las moléculas de la serie **13** y así confirmar su obtención.

7.3. Evaluación biológica de las series 8a-j y 13a-j

Con los compuestos de las series **8a-j** y **13a-j** se procedió a su evaluación biológica tanto en las proteínas directamente, así como en líneas celulares cancerosas que sobreexpresan las proteínas AKT en su proceso de mutación, pero también en otras que no tienen esta característica; las células empleadas fueron: líneas celulares de cáncer de próstata (DU-145 y PC-3), mama (MCF-7 y MDA-MB-231) y colón (HCT-15), además, se utilizaron células de riñón de mono (COS-7) como control. Los resultados de estos ensayos se muestran en la Tabla 12. Cabe resaltar que los compuestos **8i** y **13h** no pudieron ser evaluados ya que en el momento de los análisis no se contaba con ellos.

Tabla 12. Resultados de actividad biológica a una concentración de 25 μ M sobre diferentes líneas celulares de cáncer de próstata (DU-145 y PC-3), mama (MCF-7 y MDA-MB-231) y colón (HCT-15), se utilizaron células de riñón de mono (COS-7) como control

Compuestos	% de inhibición de crecimiento por la línea celular					
	<i>DU-145</i>	<i>PC-3</i>	<i>MCF-7</i>	<i>MDA-MB-231</i>	<i>HCT-15</i>	<i>COS-7</i>
8a	54.7±0.7	66.2±8.9	24.8±0.3	77.9±6.5	36.9±1.2	52.6±11.0
8b	89.4±0.7	20.9±3.4	NC	32.1±2.6	NC	18.2±4.0
8c	57.9±7.3	60.1±5.1	18.2±5.2	81.6±4.0	35.3±2.7	19.9±4.4
8d	49.4±6.5	19.3±3.0	NC	56.8±5.7	NC	15.1±4.6
8e	52.1±2.0	21.3±3.8	NC	51.5±5.5	NC	4.1±1.6
8f	47.9±8.3	71.9±3.9	80.0±6.1	64.8±2.3	80.0±4.1	61.2±5.1
8g	59.8±7.1	68.9±6.5	88.5±10.2	64.0±5.9	74.9±4.3	57.9±3.8
8h (SP)*	48.3±1.9	82.7±8.6	92.4±6.6	59.3±4.0	84.6±1.5	68.2±6.1
8j*	50.5±5.2	52.2±1.4	91.6±5.1	75.1±2.0	92.8±3.3	51.8±4.3
13a*	63.6±6.0	87.5±6.2	65.9±3.7	81.0±4.8	96.8±2.1	77.3±7.5
13b*	58.4±5.0	95.2±5.3	92.6±6.1	73.2±4.5	98.1±1.1	86.7±6.2
13c*	42.0±3.6	81.3±5.4	60.6±5.1	69.2±6.0	89.4±4.8	48.5±5.0
13d*	51.8±3.1	64.8±6.4	83.8±6.8	81.2±6.1	87.7±7.5	89.6±3.0
13e*	43.2±2.3	73.6±9.6	63.7±6.8	65.8±2.5	91.0±2.4	77.0±7.8
13f (SP)	19.4±2.6	48.6±4.2	40.8±7.0	43.3±4.4	55.8±6.5	33.4±9.1
13g*	62.7±5.1	85.7±4.0	85.4±7.3	78.7±5.4	95.9±2.5	91.4±2.5
13i	19.1±1.3	40.4±3.7	33.6±10.7	29.4±3.1	44.7±4.7	56.8±10
13j*	36.2±2.3	66.9±1.0	69.1±9.5	45.4±4.1	85.0±1.1	83.3±1.0
GEFITINIB*	44.9±1.8	43.5±1.9	22.3±1.7	30.7±2.3	20.4±2.7	49.8±3.2

*Compuestos ensayados a una concentración de 12.5 μ M; SP: Solubilidad Parcial; NC: No Citotóxico

La evaluación de la inhibición se realizó a una concentración de 25 μM para la mayoría de los compuestos; no obstante, algunos de estos fueron muy potentes y se debió realizar el ensayo a una concentración de 12.5 μM . En la Figura 30 se resumen los resultados de estos ensayos.

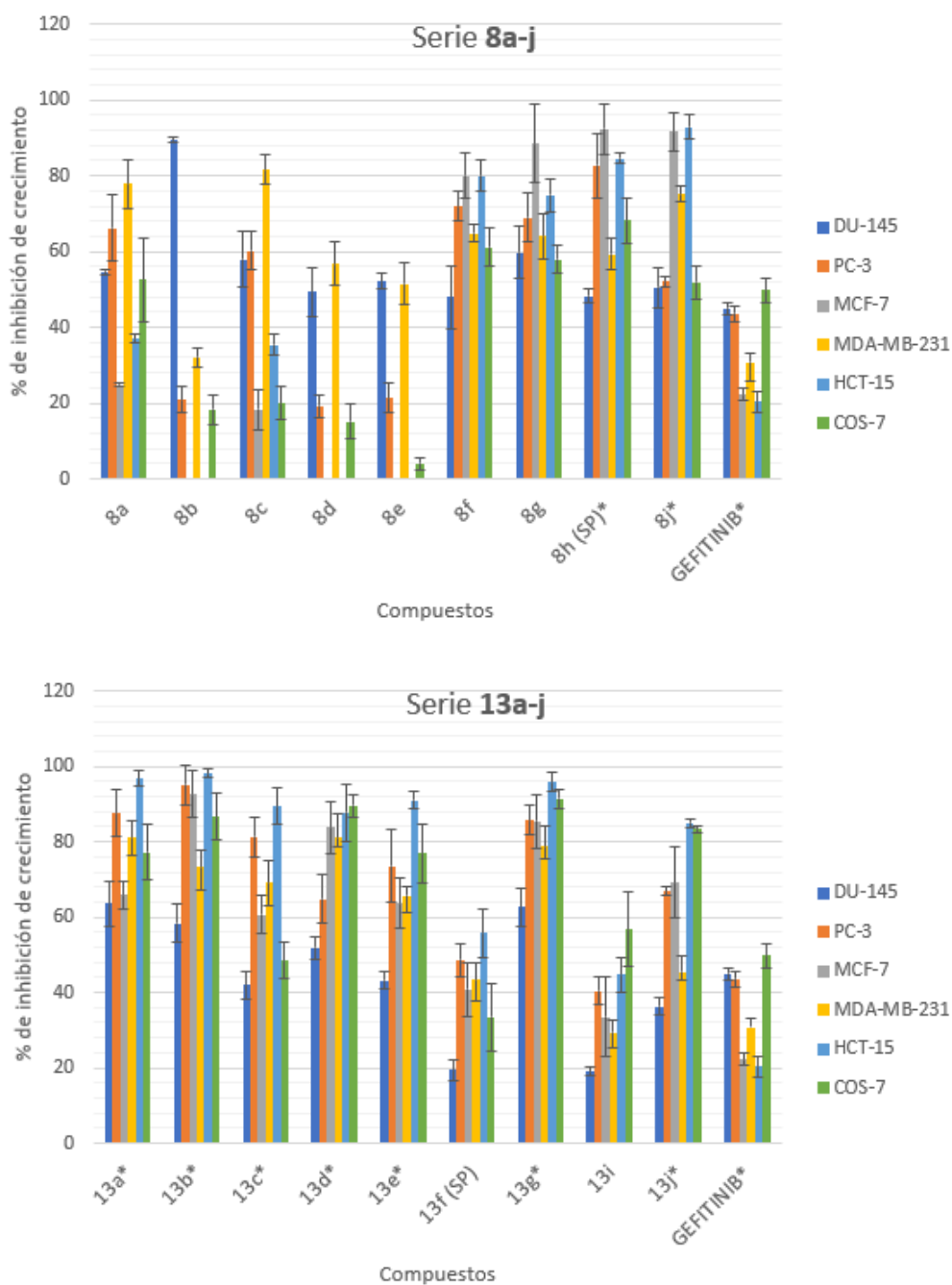


Figura 30. Histogramas de la actividad biológica de las series 8 y 13.

En los histogramas de la Figura 29 se observa de forma más clara que de los compuestos de la serie **8a-j**, los compuestos **8b-e** fueron los que mostraron valores más promisorios de actividad citotóxica, ya que inhibieron con cierta selectividad a las líneas celulares DU-145 y MDA-MB-231, y fueron menos citotóxicos con las células de control sano COS-7. De esta serie, el compuesto **8b** (que está sustituido simétricamente con benzoxanilo en posiciones 2 y 6 de la piridina y en 4 con un 4-(trifluorometil)fenilamino) fue el más activo sobre la línea DU-145 (% 89.4 ± 0.7) y poco tóxico sobre COS-7 (% 18.2 ± 4.0); y para la línea MDA-MB-231 el compuesto más activo de esta serie fue el compuestos **8c** con un sustituyente 4-trifluoroanilino en posición 4 de la piridina. Se puede observar entonces una tendencia clara en la serie ya que los compuestos **8f-j** los cuales tienen un fragmento bencilo en posición 4 de la piridina, fueron más potentes con las líneas MCF-7 y HCT-15 pero más citotóxico con la línea control COS-7; de estos compuestos, **8h** y **8j** fueron los más potentes con % de inhibición de MCF-7 de 91.6 ± 5.1 y 92.8 ± 3.3 , respectivamente; y para HCT-15 de 84.6 ± 1.5 , 92.8 ± 3.3 , respectivamente. Los resultados muestran que, al parecer, el grado de libertad mayor y principalmente la posibilidad de cederle densidad electrónica a la piridina si bien, favorece la inhibición de las líneas celulares cancerosas, especialmente MCF-7 y HTC-15, también hace que los compuestos pierdan selectividad, por ejemplo, **8h** con un sustituyente 4-trifluorobencilamino en posición 4 y **8j** con un sustituyente 4-clorobencilamino en posición 4 tuvieron valores de inhibición sobre COS-7 de 68.2 ± 6.1 y 51.8 ± 4.3 , respectivamente. En la serie **13a-j** se puede ver que los compuestos **13b** y **13g** con un sustituyente 3-trifluorometilo son los más potentes de la serie mono y diprotonada respectivamente. Excepto para el compuesto **13i** en toda la serie se ve una tendencia clara a la inhibición del crecimiento de las células HCT-15, siendo el más activo el compuesto **13b** con un porcentaje de inhibición de 98.1 ± 1.1 a $12.5 \mu\text{M}$. No obstante, toda la serie de compuestos presenta una baja selectividad y alta toxicidad a la línea celular sana COS-7, en la cual en compuesto **13g** presenta un valor de inhibición del crecimiento de 91.4 ± 2.5 a $12.5 \mu\text{M}$ lo cual hace poco viable que estos compuestos puedan seguir en camino a fases de desarrollo superiores.

En la Tabla 13 se muestran los índices de selectividad de los compuestos ensayados; el índice de selectividad se calculó como el cociente entre el porcentaje de inhibición de las células cancerígenas sobre el porcentaje de inhibición de COS-7. Se puede notar que en

efecto los compuesto **8b-e** muestran valores favorables de selectividad y que el compuesto **8e** es el compuesto más selectivo de toda la serie, ya que además de que no inhibe a las líneas MCF-7 y HCT-15, presenta valores de selectividad de 12.7 y 12.6 sobre las líneas celulares DU-145 y MDA-MB-231 respectivamente.

Tabla 13. Índice de selectividad de los compuestos sintetizados

<i>Compuestos</i>	<i>DU-145</i>	<i>PC-3</i>	<i>MCF-7</i>	<i>MDA-MB-231</i>	<i>HCT-15</i>
<i>8a</i>	1.0	1.3	0.5	1.5	0.7
<i>8b</i>	4.9	1.1	---	1.8	---
<i>8c</i>	2.9	3.0	0.9	4.1	1.8
<i>8d</i>	3.3	1.3	---	3.8	---
<i>8e</i>	12.7	5.2	---	12.6	---
<i>8f</i>	0.8	1.2	1.3	1.1	1.3
<i>8g</i>	1.0	1.2	1.5	1.1	1.3
<i>8h</i>	0.7	1.2	1.4	0.9	1.2
<i>8j</i>	1.0	1.0	1.8	1.4	1.8
<i>13a</i>	0.8	1.1	0.9	1.0	1.3
<i>13b</i>	0.7	1.1	1.1	0.8	1.1
<i>13c</i>	0.9	1.7	1.2	1.4	1.8
<i>13d</i>	0.6	0.7	0.9	0.9	1.0
<i>13e</i>	0.6	1.0	0.8	0.9	1.2
<i>13f</i>	0.6	1.5	1.2	1.3	1.7
<i>13g</i>	0.7	0.9	0.9	0.9	1.0
<i>13i</i>	0.3	0.7	0.6	0.5	0.8
<i>13j</i>	0.4	0.8	0.8	0.5	1.0
<i>GEFITINIB</i>	0.9	0.9	0.4	0.6	0.4

Es interesante notar que los compuestos **8a-e** que no pueden protonarse a pH fisiológico mostraron valores altos de inhibición frente a las líneas DU-145 y MDA-MB-231, mientras que los compuestos con posibilidad de tener al menos un átomo de Nitrógeno protonado como es el caso de **8f-j** y **13a-e** exhiben un alto porcentaje de inhibición frente a las líneas MCF-7 y HTC-15. Este hallazgo puede abrir la puerta al desarrollo de compuestos selectivos contra este tipo de líneas celulares.

Comparando los valores de citotoxicidad de los compuestos de la serie **8** y **13** se puede decir que la serie **8a-e** no fue la más potente frente a la inhibición del crecimiento de

células cancerígenas, pero si la más selectiva, mientras que las series **8f-j** y **13a-e** con un átomo de nitrógeno protonable mostraron mayor potencia, pero perdieron su selectividad; además, la serie **13f-j** la cual tiene dos átomos de nitrógeno con posibilidad de protonarse perdió potencia pero mantuvo su baja selectividad por lo que este tipo de modificaciones muestran ser poco favorables para la actividad biológica. Finalmente, la mayoría de los compuestos muestran mejores valores que el GEFITINIB®, el cual es un inhibidor de tirosina cinasa del receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR),⁴⁴ lo cual muestra que a pesar de su poca selectividad, los compuestos **8** y **13** pueden ser usados como base para el diseño de anticancerígenos más potentes.

Al analizar en conjunto el porcentaje de inhibición y la selectividad de las series sintetizadas, se pueden proponer a las moléculas **8b-e**, **8j**, **13b** y **13c** como los compuestos más prometedores para análisis más detallados. Algunas propiedades ADME calculadas en el servidor (<http://www.swissadme.ch/index.php>)⁴⁵ de estos compuestos se resumen en la Tabla 14.

Tabla 14. Propiedades ADME de los compuestos **8b-e**, **8j**, **13b** y **13c**

<i>Compuesto</i>	<i>Log P</i>	<i>GI</i>	<i>BBB</i>	<i>P-gp</i>	<i>Lipinski</i>	<i>Ghose</i>	<i>Veber</i>	<i>PAINS</i>
8b	4.34	Baja	No	Si	Si 1 alerta	No 3 alertas	Si	0 alertas
8c	4.30	Baja	No	Si	Si 1 alerta	No 3 alertas	Si	0 alertas
8d	3.80	Alta	No	Si	Si	No 2 alertas	Si	0 alertas
8e	3.80	Alta	No	Si	Si	No 2 alertas	Si	0 alertas
8j	3.82	Alta	No	Si	Si 1 alerta	No 2 alertas	Si	0 alertas
13b	4.57	Alta	No	Si	Si 1 alerta	No 4 alertas	Si	0 alertas
13c	4.59	Alta	No	Si	Si 1 alerta	No 4 alertas	Si	0 alertas

Log P: Coeficiente de partición; GI: Absorción gastrointestinal; BBB: Permeación de la barrera hemato-encefálica; P-gp: Sustrato de la Glicoproteína P.

En la Tabla 14 se puede observar que los compuestos seleccionados tienen un Log P relativamente alto, lo cual implica que la solubilidad acuosa puede ser baja; sin embargo, se debe tener en cuenta que los compuestos **8j**, **13b** y **13c** pueden protonarse en pH fisiológico, lo cual ayudaría a superar este problema. La absorción gastrointestinal es un parámetro importante relacionado directamente con la biodisponibilidad de los fármacos,⁴⁶

en este estudio se puede observar que para la mayoría de los compuestos analizados se dispone de una alta absorción gastrointestinal calculada, este es un dato favorable para las propiedades de los compuestos. Al analizar la capacidad de permear la barrera hematoencefálica, ninguno de los compuestos dio positivo para este parámetro, lo cual significa que los compuestos no son peligrosos para las neuronas en el cerebro. El hecho de que sean sustratos de la glicoproteína P es un dato desfavorable, ya que la glicoproteína P está relacionada con la resistencia a muchos fármacos ya que es una bomba de salida dependiente de ATP;⁴⁷ además, puede provocar baja biodisponibilidad de los fármacos, por lo tanto, el hecho de que los compuestos tengan afinidad hacia P-gp puede ser desfavorable para su eficiencia. El hecho de que no haya alertas en la parte de PAINS muestra que los compuestos no darán falsos positivos en los ensayos. Finalmente, los compuestos seleccionados cumplen con los criterios de Lipinski y Veber, pero no con los de Ghose; la principal alerta encontrada es el peso molecular, la cual está relacionada con el número de átomos y la refractividad molar, las cuales son las alertas o violaciones encontradas en los parámetros de Ghose.⁴⁴

En general, se puede decir que los compuestos seleccionados tienen un buen perfil farmacológico; sin embargo, se debe tener cuidado con el hecho de que se predicen como sustratos de la glicoproteína P, lo cual es una seria desventaja. Además, el peso molecular de los compuestos podría jugar un papel limitante en las posibilidades de optimización.

Con el fin de analizar si la inhibición del crecimiento celular iba vía AKT, se realizaron ensayos biológicos de los compuestos sobre los tres isotipos de esta proteína. Estos ensayos fueron realizados en la Universidad Juárez del Estado de Durango utilizando el kit comercial Z-Lyte biochemical assay. Los resultados de los ensayos se resumen en la Tabla 15.

Los resultados del ensayo de inhibición muestran que los compuestos no fueron activos contra esta proteína, sólo el compuesto **8c** y **8i** lograron inhibir en 23% y 30% respectivamente a AKT3 a una concentración de 100 μ M; esta concentración está muy por encima del inhibidor de referencia GSK690693, el cual muestra un porcentaje de inhibición de 30% a una concentración de 9 nM para AKT3.

Tabla 15. Resultados de actividad biológica de las series **8** y **13** sobre los diferentes isotipos de AKT

<i>Compuestos (100 μM)</i>	<i>AKT1 (24 ng)</i>	<i>AKT2 (40 ng)</i>	<i>AKT3 (8.3 ng)</i>
8a	3%	5 %	0%
8b	2%	3 %	0%
8c	0%	2.5 %	23 %
8d	2.5%	0 %	7%
8e	0%	0 %	3%
8f	0%	2.5 %	0%
8g	0%	5 %	7%
8h	0%	2.5	0%
8i	0%	7 %	30%
8j	0%	0%	3%
13a	0%	0%	0%
13b	0%	0%	0%
13c	0%	3%	0%
13d	0%	0%	0%
13e	0%	0%	0%
13f	0%	0%	0%
13g	3%	0%	0%
13h	0%	2.5%	0%
13i	0%	2.5%	0%
13j	0%	0%	0%
GSK690693	35 %	37 %	30 %

2, 13, 9 nM respectivamente

Estos estudios muestran que los compuestos sintetizados no inhiben a las proteínas para las que fueron diseñados; sin embargo, son compuestos citotóxicos; este hecho llevó a la pregunta de ¿cuál o cuáles pueden ser los blancos terapéuticos de los compuestos sintetizados?, para responder esta pregunta se recurrió al servidor <http://www.swisstargetprediction.ch> el cual ayuda a predecir posibles dianas farmacológicas. Al analizar los primeros compuestos de cada serie (**8a** y **13a**) en este servidor se puede apreciar que a pesar de que la mayor probabilidad es que sean inhibidores de cinasas (Figura 31), los isotipos de la proteína AKT no son la primera opción. En los anexos 12.2 y 12.3 se incluyen las listas de algunos de los posibles blancos para las series **8** y **13**.

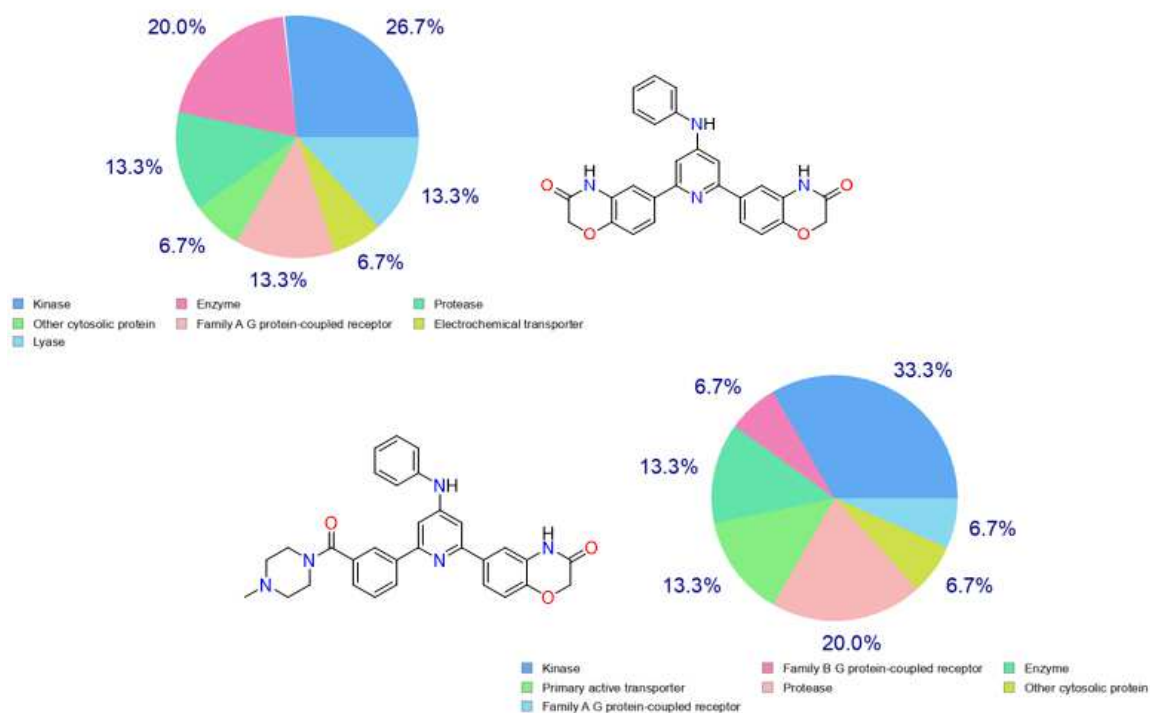


Figura 31. Diagrama general de los posibles blancos moleculares de los compuestos **8a** y **13a**.

Este análisis supone entonces que es posible que las series **8a-j** y **13a-j** inhiban otro tipo de cinasas, lo cual no es de sorprender ya que es una gran familia de proteínas, las cuales conservan el sitio de unión a ATP. Así pues, se requieren estudios complementarios para identificar el posible blanco farmacológico de los compuestos sintetizados.

8. CONCLUSIONES

- Combinando diferentes técnicas computacionales y conocimientos previos se diseñaron diversas series de piridinas 2,4,6-trisustituidas como posibles inhibidores de la proteína cinasa B.
- La variante del protocolo de acoplamiento molecular de fragmentos implementada en el presente trabajo mostró ser útil a la hora de proponer nuevos compuestos estructuralmente novedosos.
- Se demostró la validez y versatilidad de la ruta sintética diseñada e implementada en el Laboratorio 122 del departamento de Farmacia para acceder a derivados no descritos de piridinas 2,4,6-trisustituidas.
- En total se sintetizaron 20 compuestos finales de la piridina 2,4,6-trisustituida cuyas propiedades físicas y espectroscópicas se reportan por primera vez.
- La mayoría de los intermediarios **6a-e**, **7a-e** y todos los intermediarios **9a-j** no se encuentran descritos en la literatura, por lo que además de los compuestos finales, se reportan también por primera vez las propiedades físicas y espectroscópicas de otros 18 compuestos novedosos.
- Los resultados de actividad biológica muestran que las series no protonadas exhiben selectividad hacia las líneas celulares cancerosas DU-145 y MDA-MB-231, en especial, el compuesto **8b** muestra gran potencia hacia la línea DU-145, mientras que **8c** inhibe con mayor potencia a MDA-MB-231; aunado a esto, los compuestos **8d** y **8e** muestran selectividad hacia estas dos líneas celulares.
- El compuesto **8e** es el más selectivo de la serie, mostrando una baja inhibición de la línea celular COS-7 y alta inhibición hacia DU-145 y MDA-MB-231.

- Las series monoprotonadas **8f-j** y **13a-e** mostraron ser altamente citotóxicas pero muy poco selectivas frente a células sanas; sin embargo, se ve una clara tendencia de estas series hacia las líneas celulares MCF-7, HCT-15 y en algunos casos hacia PC-3.
- Los compuestos sintetizados resultaron ser inactivos en el ensayo realizado contra las proteínas AKT para las que se diseñaron; no obstante, mostraron actividad citotóxica, lo cual indica que su blanco molecular es otro.

9. PERSPECTIVAS

- Identificar el o los blancos biológicos de las series sintetizadas para así poder hacer un diseño molecular más detallado.
- Sintetizar otras de las series diseñadas con el fin de reforzar la validez del diseño computacional.
- Una vez identificado un blanco biológico, realizar un estudio de correlación QSAR.

10. SECCIÓN EXPERIMENTAL

El componente experimental del presente trabajo consta de 3 partes. En la primera parte se describe el trabajo computacional realizado con el fin de diseñar y seleccionar las estructuras que serían sintetizadas. En la segunda parte se reporta la síntesis y caracterización de los compuestos elegidos, así como de sus intermediarios y finalmente en la tercera parte se muestra la metodología utilizada para realizar los ensayos biológicos.

10.1. Diseño basado en la estructura

Los estudios de acoplamiento molecular, con el programa Autodock 4.2,^{48,49} se realizaron en el laboratorio 122 de la Facultad de Química de la UNAM. Los estudios de acoplamiento molecular, con el programa Glide de Schrodinger[®],⁵⁰ se realizaron en el laboratorio del Dr. Alfredo Téllez Valencia de la Universidad Juárez del Estado de Durango. Finalmente, los estudios de dinámica molecular se realizaron en la supercomputadora Miztli de la UNAM (proyecto: LANCAD-UNAM-DGTIC-285).

10.1.1. Obtención de las estructuras tridimensionales de los isotipos de AKT

Los isotipos 1 y 2 se encuentran consignadas en la base de datos PDB (protein data bank), para este estudio se seleccionaron las estructuras con PDBiD: 4GV1⁵¹ y 1O6L⁵² de los isotipos 1 y 2 respectivamente.

Debido a que AKT3 no se encuentra cristalizada, fue necesario realizar un diseño por homología; para esto, utilizando la base de datos UniProt (<http://www.uniprot.org/>) se buscó la secuencia de aminoácidos de AKT3, esta secuencia se almacenó en formato FASTA (número de acceso: Q9Y243) para así poder alinear la secuencia con la base de datos del PDB.

10.1.2. Modelado por homología

10.1.2.1. Búsqueda del mejor molde (template)

Para poder encontrar el mejor molde para la construcción de un modelo por homología, fue necesario conocer la secuencia completa de aminoácidos de la proteína de interés; así, utilizando la base de datos de UniProt (<http://www.uniprot.org/>)⁵³ se buscó la secuencia de

aminoácidos de AKT3 y se comparó con la base de datos del PDB para hallar la estructura cristalizada que más homología compartiera con AKT3. La búsqueda arrojó al isotipo 1 de AKT como la proteína con más similitud.

10.1.2.2. Construcción del modelo de AKT3

Teniendo como base la estructura cristalizada de AKT1 (PDBID: 4GV1) se realizaron diferentes modelos de AKT3 utilizando los programas Prime de Schrodinger[®],⁵⁴ Modeller[®]⁵⁵ y el servidor swissmodel (<https://swissmodel.expasy.org/>),^{56,57} una vez obtenidos diferentes modelos de las diferentes herramientas, se optimizaron las estructuras utilizando el programa Maestro de Schrodinger[®]⁵⁸ y finalmente, los modelos se validaron utilizando el servidor MolProbity (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>).⁵⁹

10.1.3. Estudio de acoplamiento molecular

10.1.3.1. Preparación de la proteína

Las proteínas obtenidas del PDB se procesaron en el programa *PyMOL 0.99*, donde se les retiró las moléculas de aguas y ligandos presentes, luego se hizo una optimización de la estructura utilizando el módulo “Protein preparation wizard” incluido en el programa Maestro de Schrodinger[®], una vez optimizadas la estructuras de las proteínas se procedió a prepararlas para los estudios de acoplamiento molecular, para esto, se agregaron los hidrógenos polares capaces de formar puente de hidrógeno y se corrigieron las cargas de las histidinas utilizando la interfaz gráfica *Autodock tools 1.5.6*.

10.1.3.2. Preparación de los ligandos

Los compuestos seleccionados se construyeron en Spartan' 10,⁶⁰ donde se optimizó su geometría utilizando el método semiempírico PM6. Posteriormente, empleando el programa Autodock 4.2 y su interfaz gráfica *Autodock tools 1.5.6*, los átomos de hidrógeno no polares se fusionaron a sus correspondientes carbonos, se detectaron los centros de torsión y enlaces rotables.

10.1.3.3. Acoplamiento molecular

Utilizando la interfaz gráfica *Autodock tools 1.5.6* y el programa complementario *Autogrid4*, se generó la región de búsqueda (grid) la cual se posicionó en el sitio de unión a ATP de los tres isotipos de AKT evaluadas en las coordenadas x: -19.687, y: 5.811 y z: 16.166 para los isotipos 1 y 3, mientras que para el isotipo 2, el grid se posicionó en las coordenadas x: 42.679, y: 30.329 y z: 109.603. Las dimensiones del grid se definieron como 60x60x60 puntos con un espacio entre puntos de 0.375 Å.

La búsqueda de las conformaciones más favorables para los ligandos dentro del sitio activo se realizó utilizando el programa *Autodock 4.2*, empleando un algoritmo genético Lamarkiano, con un tamaño de población inicial de 150 conformaciones, 5×10^6 evaluaciones y 20 corridas. Para la selección de la conformación más probable se utilizaron dos criterios, el puntaje (score) y el tamaño de clúster.

En el caso del acoplamiento molecular, utilizando el programa *Glide de Schrodinger®*, se definió un grid de 25x25x25 Å. Se utilizaron los protocolos de precisión estándar y extra-precisión utilizando el ligando flexible e incluyendo penalizaciones por pH con el programa *Epik de Schrodinger®*.

Finalmente se calculó un puntaje consenso utilizando como referencia el puntaje del inhibidor GSK690693.

10.1.4. Estudio de dinámica molecular

Para los estudios de dinámica molecular se partió de la conformación más estable encontrada en los estudios de acoplamiento molecular. Los parámetros y la topología molecular de los ligandos se generaron usando SQM (semi-empirical quantum chemistry programme) de ACPYPE.⁶¹⁻⁶⁷ Todos los estudios de dinámica molecular se llevaron a cabo utilizando el programa *GROMACS 4.6.7*, los complejos proteína-ligando se simularon en solución acuosa de NaCl a una concentración de 0.15 M, el campo de fuerza empleado fue *Amber99-ILDN*⁶⁸⁻⁷⁰ y se utilizó el modelo de agua *TIP3P*.⁷¹

Para este estudio primero se realizó una minimización de energía del sistema proteína-ligando, luego, se equilibró cada sistema haciendo una dinámica molecular de 100 ps con

los protocolos NVT⁷² y NPT,⁷³ finalmente, las simulaciones de dinámica molecular se realizaron por un tiempo de 10 ns para cada complejo proteína ligando.

El RMSD (root-mean-square-deviation), formación de puentes de hidrógeno y energía libre de unión se determinó durante el estudio. Para el cálculo de energía libre se usó el protocolo g_mmpbsa (molecular mechanics Poisson-Boltzmann surface area).^{38,74}

10.2. Síntesis de los compuestos propuestos como inhibidores de AKT

Los reactivos y disolventes utilizados fueron de las marcas J.T. Baker[®], Sigma Aldrich[®], Merck[®], Umicore[®], Johnson Matthey[®] y Química Pura[®]. Éstos se utilizaron sin previa purificación.

El control del curso de las reacciones se realizó sobre cromatoplasmas de gel de sílice 60 Merck[®] GF-254 y la visualización de éstas se hizo con una lámpara UVP[®] UVGL-25 Mineralight. Algunos compuestos se purificaron por cromatografía en columna empleando gel de sílice (60 Å, Sigma Aldrich[®]) las cuales se eluyeron con mezclas de hexano:acetato de etilo o cloroformo:metanol, con aumento gradual de polaridad.

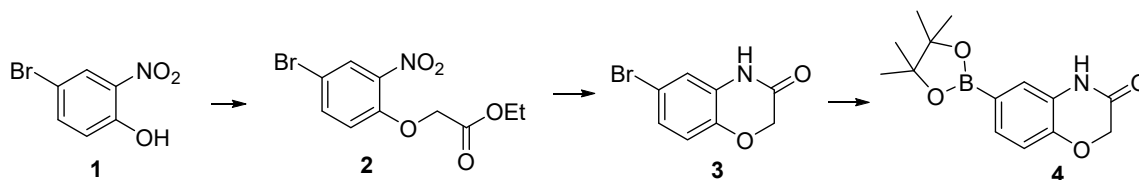
Los puntos de fusión (no corregidos) de todos los compuestos se determinaron en un fusiómetro Büchi[®] B-540 utilizando capilares de vidrio.

Los espectros de masas se registraron en un equipo Perkin Elmer AxION[®] 2 TOF acoplado a un módulo AxION DSA para la técnica de APCI y en un equipo MStation[®] para la técnica EI.

Los espectros de resonancia magnética nuclear se obtuvieron utilizando equipos Varian[®] Unity Inova de 400 y 600 MHz, empleando cloroformo deuterado o sulfóxido de dimetilo deuterado como disolventes.

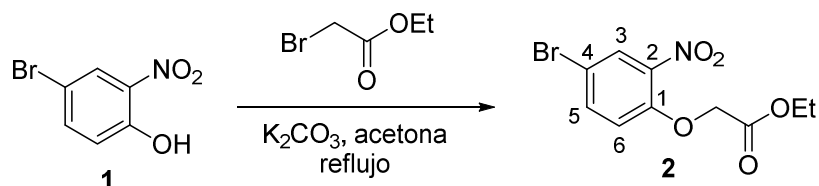
Las reacciones de acoplamiento Suzuki-Miyaura se llevaron a cabo en un reactor de microondas Anton Paar[®] Monowave 400 acoplado a un automuestreador Paar[®] MAS 24, utilizando viales de 10 y 30 mL.

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



Esquema 17. Ruta sintética propuesta para la obtención del intermediario 4.

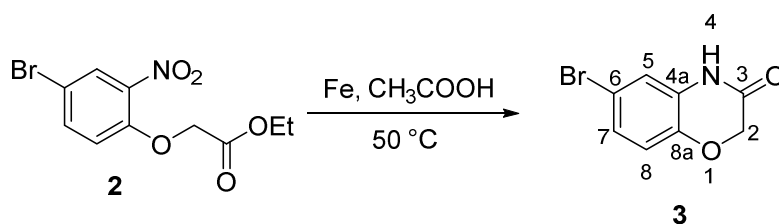
10.2.1.1. Obtención de 2-(4-Bromo-2-nitrofenoxi) acetato de etilo (2)



Esquema 18. Preparación del intermediario 2.

En un matraz de bola de 100 mL se mezclaron 1.00 g (4.6 mmol) de 4-bromo-2-nitrofenol (**1**) con 20 mL de acetona y 0.95 g de K_2CO_3 (6.9 mmol, 1.5 eq). La mezcla anterior se agitó a temperatura ambiente hasta la formación de una suspensión roja, luego se adicionaron 0.76 mL de α -bromoacetato de etilo (6.9 mmol) y posteriormente se calentó a reflujo hasta terminar la reacción (ccf); posteriormente se retiró el disolvente y se adicionó hielo a la mezcla de reacción con lo que precipitó el producto de la reacción, el cual se separó por filtración con succión y se recristalizó de metanol. Se obtuvieron 1.32 g (4.37 mmol, 95 %) de 2-(4-bromo-2-nitrofenoxi) acetato de etilo **2** como cristales blancos. Pf. 68 – 69 °C. RMN 1H : (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 1.22 (3H, t, $J = 7.2$ Hz, $-CH_3$), 4.20 (2H, q, $J = 7.2$ Hz, $-OCH_2CH_3$), 4.69 (2H, s, $-OCH_2CO$), 6.83 (1H, d, $J = 8.9$ Hz, 6-H), 7.55 (1H, dd, $J = 8.9, 2.5$ Hz, 5-H), 7.94 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, 3-H); RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$); δ : 14.2 ($-CH_3$), 62.1 ($-OCH_2CH_3$), 66.8 ($-OCH_2CO$), 113.6 (4-C), 117.0 (6-C), 128.7 (3-C), 136.9 (5-C), 141.2 (2-C), 150.6 (1-C), 167.5 (C=O).

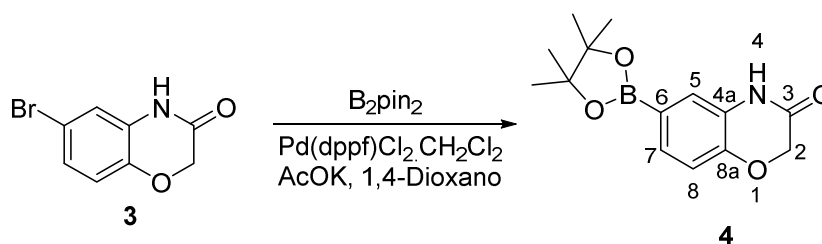
10.2.1.2. Síntesis de 6-Bromo-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona (3)



Esquema 19. Reducción – ciclación de 2-(4-Bromo-2-nitrofenoxi) acetato de etilo **2**.

En un vaso de precipitados de 250 mL se mezclaron 1.00 g (3.3 mmol) del compuesto **2** con 2.00 g de hierro y 20 mL de ácido acético, la reacción sea calentó a 50 °C por 6 horas y se mantuvo en agitación con un agitador mecánico. Una vez terminada la reacción, se filtró y las sales se lavaron con ácido acético, el filtrado se concentró y al residuo resultante se le agregó agua fría. El sólido resultante se filtró y se secó, obteniendo 0.72 g (3.1 mmol, 96 %) del compuesto **3** como agujas blancas. Pf. 222 – 223 °C. RMN ¹H: (300 MHz, DMSO-_{d6}) δ: 4.59 (2H, s, CH₂), 6.91 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, 8-H), 7.01 (1H, d, *J* = 2.3 Hz, 5-H), 7.07 (1H, dd, *J* = 8.5, 2.4 Hz, 7-H), 10.81 (1H, s, 4-H); RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-_{d6}); δ: 66.7 (CH₂), 113.3 (6-C), 118.0 (8-C), 118.1 (5-C), 125.3 (7-C), 129.1 (4a-C), 142.6 (8a-C), 166.2 (3-C).

10.2.1.3. Acoplamiento de Miyaura para la obtención del éster borónico 6-(4,4,5,5-Tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona (4)



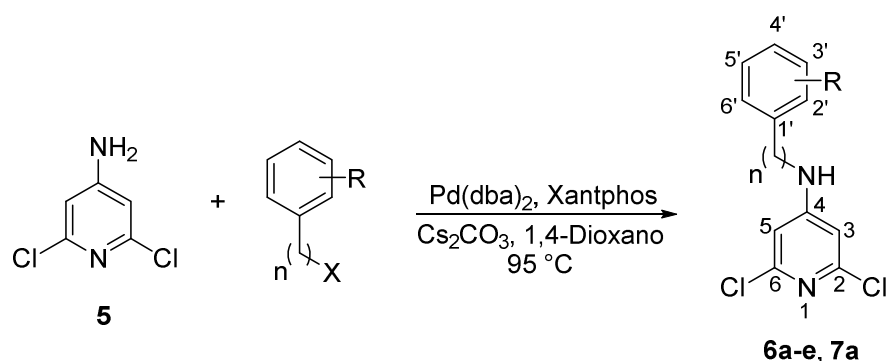
Esquema 20. Obtención del éster borónico **4**.

En un matraz de bola de 3 bocas se mezcló 1.00 g (4.4 mmol) del compuesto **3** con 1.17 g (4.6 mmol) de diborobispinacolato, 0.18 g (0.2 mmol) de [1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno] dicloropaladio(II) en complejo con diclorometano y 1.29 g (13.2 mmol) de acetato de potasio, se realizaron 4 purgas sucesivas de nitrógeno; finalmente, al sistema se le

agregaron 15 mL de 1,4-dioxano. La reacción se calentó a 120 °C con agitación constante durante 4 horas. Concluida la reacción se purificó por cromatografía en columna empacada con gel de sílice. Se obtuvieron 0.94 g (3.4 mmol, 78 %) del éster borónico **4** como un sólido blanco. Pf. 178 – 180 °C. RMN ¹H: (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.26 (12H, s, CH₃), 4.59 (2H, s, CH₂), 6.89 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, 8-H), 7.20 (1H, s, 5-H), 7.37 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, 7-H), 9.03 (1H, s, 4-H); RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃); δ: 25.0 (CH₃), 67.3 (CH₂), 84.1 (OC(CH₃)₂), 116.4 (8-C), 122.4 (5-C), 125.6 (6-C), 131.5 (4a-C y 7-C), 146.3 (8a-C), 166.0 (3-C).

10.2.2. Síntesis de las 4-Amino-2,6-dicloropiridinas *N*-sustituidas **6a-e** y **7a**.

10.2.2.1. Método general para la síntesis por el método de Buchwald-Hartwig



Esquema 21. Acoplamiento de Buchwald-Hartwig para obtener las piridinas **6a-e** y **7a**.

En un matraz de bola de 3 bocas se mezclaron 1.00 g (6.1 mmol) de la 4-amino-2,6-dicloropiridina **5**, 1.1 equivalentes del derivado halogenado adecuado del benceno, 0.18 g (0.3 mmol) de bis(dibenzalacetona)paladio (0), 0.35 g (0.6 mmol) de Xantphos, 4.97 g (15.2 mmol) de carbonato de cesio, el sistema se purgó con nitrógeno repetidas veces; finalmente, al sistema se le agregaron 15 mL de 1,4-dioxano. La reacción se calentó por 18 horas a 95 °C. Finalizada la reacción se agregó acetato de etilo a la matriz de reacción y se limpió por una precolumna de silica gel, luego el disolvente se evaporó a presión reducida y el producto obtenido se purificó por cromatografía en columna.

10.2.2.1.1. **2,6-Dicloro-*N*-fenilpiridin-4-amina 6a.** De 0.7 mL (6.7 mmol, 1.05 g) de bromobenceno se obtuvieron 0.91 g (3.8 mmol, 62 %) de **6a** como laminas amarillas. Pf.

152.8 – 153.2 °C. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃); δ: 6.38 (1H, s, -NH), 6.70 (2H, s, 3-H y 5-H), 7.19 (2H, dd, *J* = 8.4, 0.9 Hz, 2'-H y 6'-H), 7.23 (1H, t, *J* = 7.5 Hz, 4'-H), 7.41 (2H, t, *J* = 7.9, 3'-H y 5'-H); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃); δ: 107.4 (3-C y 5-C), 123.3 (2'-C y 6'-C), 126.0 (4'-C), 130.0 (3'-C y 5'-C), 138.1 (1'-C), 151.2 (2-C y 6-C), 154.8 (4-C). EM APCI; *m/z* [M+H]⁺ Calculado para C₁₁H₉Cl₂N₂: 239.0137; encontrado: 239.0044.

10.2.2.1.2. **2,6-Dicloro-*N*-(3-(trifluorometil)fenil)piridin-4-amina 6b**. De 1.0 mL (6.7 mmoles, 1.82 g) de 1-iodo-3-(trifluorometil)benceno se obtuvieron 1.67 g (5.4 mmoles, 89 %) de **6b** como un sólido naranja. Pf. 133.8 – 135.1 °C. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃); δ: 6.71 (1H, s, -NH), 6.74 (2H, s, 3-H y 5-H), 7.40 – 7.43 (2H, m, 2'-H y 4'-H), 7.47 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, 6'-H), 7.54 (1H, t, *J* = 8.4, 5'-H); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃); δ: 107.8 (3-C y 5-C), 119.6 (q, *J* = 3.8 Hz, 4'-C), 122.3 (q, *J* = 3.6 Hz, 2'-C), 125.8 (6'-C), 127.3 (q, *J* = 246.1 Hz, -CF₃), 132.6 (q, *J* = 32.7 Hz, 3'-C), 139.0 (1'-C), 151.5 (2-C y 6-C), 154.0 (4-C). EM APCI; *m/z* [M+H]⁺ Calculado para C₁₂H₈Cl₂F₃N₂: 307.0011; encontrado: 306.9923.

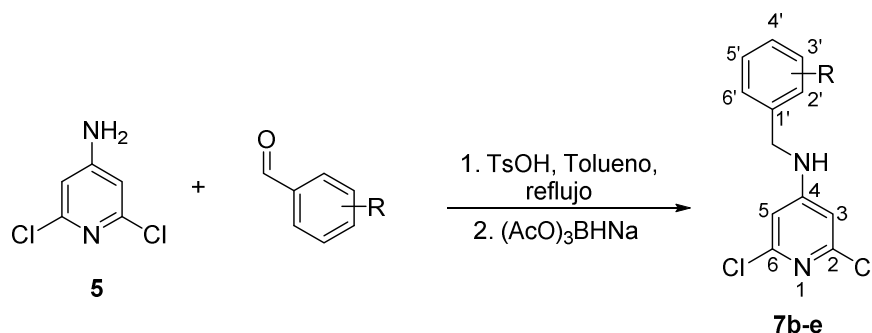
10.2.2.1.3. **2,6-Dicloro-*N*-(4-(trifluorometil)fenil)piridin-4-amina 6c**. De 0.9 mL (6.7 mmol, 1.51 g) de 1-bromo-4-(trifluorometil)benceno se obtuvieron 1.46 g (4.8 mmoles, 78 %) de **6c** como cristales naranjas. 198.1 – 198.6 °C. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃); δ: 6.59 (1H, s, -NH), 6.80 (2H, s, 3-H y 5-H), 7.26 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, 2'-H y 6'-H), 7.64 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, 3'-H y 5'-H); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃); δ: 108.4 (3-C y 5-C), 121.5 (2'-C y 6'-C), 124.0 (q, *J* = 271.7 Hz, -CF₃), 126.9 (q, *J* = 33.1 Hz, 4'-C), 127.3 (q, *J* = 3.8 Hz, 3'-C y 5'-C), 141.7 (1'-C), 151.5 (2-C y 6-C), 153.4 (4-C). EM APCI; *m/z* [M+H]⁺ Calculado para C₁₂H₈Cl₂F₃N₂: 307.0011; encontrado: 306.9921.

10.2.2.1.4. **2,6-Dicloro-*N*-(3-clorofenil)piridin-4-amina 6d**. De 0.8 mL (6.7 mmoles, 1.28 g) de 1-bromo-3-clorobenceno se obtuvieron 1.01 g (3.9 mmoles, 64 %) de **6d** como sólido amarillo. Pf. 189.8 – 190.4 °C. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃); δ: 6.23 (1H, s, -NH), 6.72 (2H, s, 3-H y 5-H), 7.09 (1H, dd, *J* = 8.0, 1.3 Hz, 4'-H), 7.18 (1H, t, *J* = 1.9 Hz, 2'-H), 7.20 (1H, d, *J* = 8.0, 6'-H), 7.34 (1H, t, *J* = 8.0, 5'-H); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃); δ: 107.8 (3-C y 5-C), 120.1 (6'-C), 123.0 (2'-C), 126.0 (4'-C), 131.0 (5'-C), 135.6 (3'-C) 139.4 (1'-C), 151.5 (2-C y 6-C), 154.0 (4-C). EM APCI; *m/z* [M+H]⁺ Calculado para C₁₁H₈Cl₃N₂: 272.9784; encontrado: 272.9790.

10.2.2.1.5. **2,6-Dicloro-N-(4-clorofenil)piridin-4-amina 6e**. De 1.28 g (6.7 mmoles) de 1-bromo-4-clorobenceno se obtuvieron 1.15 g (4.2 mmoles, 69 %) de **6e** como sólido amarillo. Pf. 128.2 – 130.4 °C. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃); δ: 6.44 (1H, s, -NH), 6.67 (2H, s, 3-H y 5-H), 7.19 (2H, d, *J* = 8.7 Hz, 3'-H y 5'-H), 7.37 (2H, d, *J* = 8.7 Hz, 2'-H y 6'-H); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃); δ: 107.5 (3-C y 5-C), 124.6 (2'-C y 6'-C), 130.1 (3'-C y 5'-C), 131.2 (4'-C), 136.7 (1'-C), 151.3 (2-C y 6-C), 154.5 (4-C). EM APCI; *m/z* [M+H]⁺ Calculado para C₁₁H₈Cl₃N₂: 272.9784; encontrado: 272.9789.

10.2.2.1.6. **N-Bencil-2,6-dicloropiridin-4-amina 7a**. De 0.8 mL (6.7 mmoles, 1.14 g) de bromuro de bencilo se obtuvieron 1.39 g (5.5 mmoles, 90 %) de **7a** como sólido amarillo. Pf. 100.8 – 102.5 °C. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃); δ: 4.35 (2H, d, *J* = 5.5 Hz, -CH₂-), 4.95 (1H, br. s, -NH), 6.43 (2H, s, 3-H y 5-H), 7.27 – 7.41 (5H, m, 2'-H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 6'-H); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃); δ: 47.2 (-CH₂-), 106.0 (3-C y 5-C), 127.4 (2'-C y 6'-C), 128.2 (4'-C), 129.1 (3'-C y 5'-C), 136.7 (1'-C), 150.8 (2-C y 6-C), 156.6 (4-C). EM APCI; *m/z* [M+H]⁺ Calculado para C₁₂H₁₁Cl₂N₂: 253.0294; encontrado: 253.0305.

10.2.2.2. Método general para la síntesis por el método de amino-reducción indirecta **7b-e**



Esquema 22. Síntesis de las piridinas **7b-e** por amino-reducción indirecta.

En un matraz de bola se mezclaron 1.00 g (6.1 mmol) de la 4-amino-2,6-dicloropiridina **5**, 1.3 equivalentes del correspondiente derivado de benzaldehído y 0.1 g (0.6 mmol) de ácido p-toluensulfónico en 10 mL de tolueno, la mezcla de reacción se calentó a reflujo de tolueno utilizando un sistema Dean Stark por 12 horas, después de las cuales se agregaron 2.60 g (12.2 mmol) de triacetoxiborohidruro de sodio directamente a la reacción. El sólido

resultante se lavó con agua y se separó por filtración en algunos casos fue necesario purificar por cromatografía en columna después de los lavados con agua.

10.2.2.2.1. **2,6-Dicloro-*N*-(3-(trifluorometil)bencil)piridin-4-amina 7b**. De 1.38 g (7.9 mmol) de *m*-trifluorobenzaldehído se obtuvieron 1.80 g (5.6 mmol, 92 %) de **7b** como cristales blancos. Pf. 95.4 -96.1 °C. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃); δ: 4.43 (2H, d, *J* = 5.7 Hz, -CH₂-), 5.05 (1H, br. s, -NH), 6.43 (2H, s, 3-H y 5-H), 7.49 (1H, d, *J* = 7.3 Hz, 6'-H), 7.51 (1H, t, *J* = 7.7 Hz, 5'-H) 7.56 – 7.60 (2H, m, 2'-H y 4'-H); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃); δ: 46.8 (-CH₂-), 106.1 (3-C y 5-C), 124.0 (q, *J* = 272.4 Hz, -CF₃), 124.0 (q, *J* = 3.8 Hz, 4'-C), 125.1 (q, *J* = 3.7 Hz, 2'-C), 129.7 (5'-C), 130.6 (6'-C), 131.6 (q, *J* = 32.4 Hz, 3'-C), 137.8 (1'-C), 151.0 (2-C y 6-C), 156.5 (4-C). EM APCI; *m/z* [M+H]⁺ Calculado para C₁₃H₁₀Cl₂F₃N₂: 321.0168; encontrado: 321.0151.

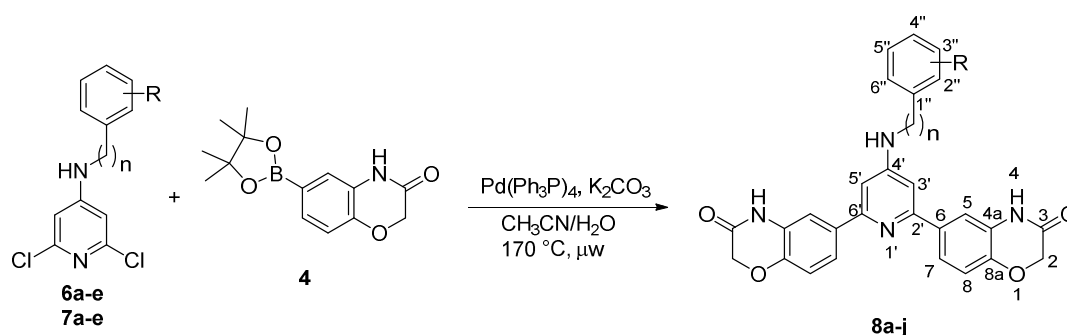
10.2.2.2.2. **2,6-Dicloro-*N*-(4-(trifluorometil)bencil)piridin-4-amina 7c**. De 1.38 g (7.9 mmol) de *p*-trifluorobenzaldehído se obtuvieron 1.21 g (3.8 mmol, 62 %) de **7c** como cristales blancos. Pf. 134.6 – 135.1 °C. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃); δ: 4.44 (2H, s, -CH₂-), 5.06 (1H, br. s, -NH), 6.42 (2H, s, 3-H y 5-H), 7.42 (2H, d, *J* = 8.0 Hz, 2'-H y 6'-H), 7.63 (2H, d, *J* = 8.0 Hz, 3'-H y 5'-H); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃); δ: 46.5 (-CH₂-), 106.0 (3-C y 5-C), 123.9 (q, *J* = 272.2 Hz, -CF₃), 126.0 (q, *J* = 3.8 Hz, 3'-C y 5'-C), 127.3 (2'-C y 6'-C), 130.4 (q, *J* = 32.4 Hz, 4'-C), 140.6 (1'-C), 150.9 (2-C y 6-C), 156.3 (4-C). EM APCI; *m/z* [M+H]⁺ Calculado para C₁₂H₁₁Cl₂N₂: 321.0168; encontrado: 321.0143.

10.2.2.2.3. **2,6-Dicloro-*N*-(3-clorobencil)piridin-4-amina 7d**. De 1.11 g (7.9 mmol) de *m*-clorobenzaldehído se obtuvieron 1.01 g (3.5 mmol, 58 %) de **7d** como cristales blancos. Pf. 108.3 – 109.0 °C. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃); δ: 4.35 (2H, s, -CH₂-), 4.98 (1H, br. s, -NH), 6.42 (2H, s, 3-H y 5-H), 7.18 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, 6'-H), 7.28 (1H, s, 2'-H) 7.29 – 7.32 (2H, m, 4'-H y 5'-H); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃); δ: 46.6 (-CH₂-), 106.1 (3-C y 5-C), 125.4 (6'-C), 127.4 (2'-C), 128.4 (4'-C), 130.5 (5'-C), 135.1 (3'-C), 138.8 (1'-C), 151.0 (2-C y 6-C), 156.4 (4-C). EM APCI; *m/z* [M+H]⁺ Calculado para C₁₃H₁₀Cl₃N₂: 286.9904; encontrado: 286.9913.

10.2.2.2.4. **2,6-Dicloro-*N*-(4-clorobencil)piridin-4-amina 7e**. De 1.11 g (7.9 mmol) de *m*-clorobenzaldehído se obtuvieron 1.23 g (4.3 mmol, 70 %) de **7e** como cristales blancos. Pf.

135.0 – 137.4. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃); δ: 4.33 (2H, d, *J* = 5.6 Hz, -CH₂-), 5.03 (1H, br. s, -NH), 6.41 (2H, s, 3-H y 5-H), 7.23 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, 2'-H y 6'-H), 7.34 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, 3'-H y 5'-H); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃); δ: 46.6 (-CH₂-), 106.1 (3-C y 5-C), 128.7 (3'-C y 5'-C), 129.3 (2'-C y 6'-C), 134.0 (4'-C), 135.2 (1'-C), 150.9 (2-C y 6-C), 156.5 (4-C). EM APCI; *m/z* [M+H]⁺ Calculado para C₁₂H₁₁Cl₂N₂: 286.9904; encontrado: 286.9939.

10.2.3. Método general para la síntesis de las 6,6'-(4-aminopiridina-2,6-diil)bis(2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona) 4*N* sustituidas **8a-j**.



Esquema 23. Obtención de la serie simétrica **8a-j**.

En un tubo G10 para reactor de microondas se mezclaron 0.1 g de la amina de partida **6a-e** o **7a-e** y 2.2 equivalentes de **4**, 5% molar del tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0) y 3 equivalentes de carbonato de potasio en una mezcla 4:1 de acetonitrilo:agua, el tubo se selló y se sometió a radiación de microondas durante 45 minutos, con una velocidad de agitación constante de 600 rpm. Finalizada la reacción, el disolvente orgánico se evaporó a presión reducida, quedando un sólido suspendido en agua el cual se filtró y se lavó con diclorometano. En algunos casos fue necesario purificar por cromatografía en columna.

10.2.3.1. **6,6'-(4-(Fenilamino)piridin-2,6-diil)bis(2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona) **8a**.** De 0.10 g (0.42 mmoles) de **6a**, 0.25 (0.92 mmoles) de **4**, 24 mg (0.021 mmoles) tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0), 0.17 g (1.26 mmoles) de carbonato de potasio se obtuvieron 0.15 g (0.32 mmoles, 76 %) de **8a** como un sólido café claro. Pd. 325 – 327 °C. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆); δ: 4.63 (4H, s, -OCH₂-), 7.05 (2H, d, *J* = 9.0 Hz, 8-H), 7.08 (1H, t, *J* = 7.3 Hz, 4''-H), 7.23 (2H, s, 3'-H y 5'-H), 7.28 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, 2''-H y

6''-H), 7.40 (2H, t, $J = 7.9$ Hz, 3''-H y 5''-H), 7.61 – 7.63 (4H, m, 5-H y 7-H), 8.98 (1H, s, -NH), 10.79 (2H, s, 4-H); RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6); δ : 66.8 (2-C), 103.4 (3'-C y 5'-C), 114.0 (5-C), 116.2 (8-C), 120.4 (2''-C y 6''-C), 121.3 (7-C), 122.7 (4''-C), 127.4 (4a-C), 129.5 (3''-C y 5''-C), 133.9 (6-C), 140.5 (1''-C), 144.0 (8a-C), 152.1 (4'-C), 155.9 (2'-C y 6'-C), 164.7 (3-C). EM ESI; m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ Calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_4$: 465.15628; encontrado: 465.15789.

10.2.3.2. **6,6'-(4-((3-(Trifluorometil)fenil)amino)piridin-2,6-diil)bis(2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona) 8b.** De 0.10 g (0.32 mmoles) de **6b**, 0.19 (0.70 mmoles) de **4**, 18 mg (0.016 mmoles) tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0), 0.13 g (0.96 mmoles) de carbonato de potasio se obtuvieron 0.12 g (0.23 mmoles, 73 %) de **8b** como un sólido amarillo claro. Pd. 281 – 284 °C. RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6); δ : 4.64 (4H, s, -OCH $_2$ -), 7.06 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, 8-H), 7.27 (2H, s, 3'-H y 5'-H), 7.38 (1H, d, $J = 6.9$ Hz, 4''-H), 7.48 (1H, s, 2''-H), 7.58 – 7.65 (6H, m, 5-H, 7-H, 5''-H y 6''-H), 9.29 (1H, s, -NH), 10.81 (2H, s, 4-H); RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6); δ : 66.8 (2-C), 104.1 (3'-C y 5'-C), 114.1 (5-C), 115.9 (q, $J = 3.7$ Hz, 2''-C), 116.2 (8-C), 118.4 (q, $J = 3.5$ Hz, 4''-C), 121.4 (7-C), 122.8 (6''-C), 124.1 (q, $J = 272.3$ Hz, -CF $_3$), 127.4 (4a-C), 130.3 (q, $J = 31.6$ Hz, 3''-C), 130.7 (5''-C), 133.6 (6-C), 141.8 (1''-C), 144.1 (8a-C), 151.3 (4'-C), 156.1 (2'-C y 6'-C), 164.6 (3-C). EM ESI; m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ Calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{20}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_4$: 533.14366; encontrado: 533.14538.

10.2.3.3. **6,6'-(4-((4-(Trifluorometil)fenil)amino)piridin-2,6-diil)bis(2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona) 8c.** De 0.10 g (0.32 mmoles) de **6c**, 0.19 (0.70 mmoles) de **4**, 18 mg (0.016 mmoles) tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0), 0.13 g (0.96 mmoles) de carbonato de potasio se obtuvieron 0.14 g (0.28 mmoles, 80 %) de **8c** como un sólido amarillo. Pd. 300 – 302 °C. RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6); δ : 4.63 (4H, s, -OCH $_2$ -), 7.05 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, 8-H), 7.38 (2H, s, 3'-H y 5'-H), 7.45 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, 2''-H y 6''-H), 7.66 (2H, dd, $J = 8.4, 2.1$ Hz, 7-H), 7.69 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, 3''-H y 5''-H), 7.73 (2H, d, $J = 2.0$ Hz, 5-H), 9.54 (1H, s, -NH), 11.00 (2H, s, 4-H); RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6); δ : 66.8 (2-C), 104.7 (3'-C y 5'-C), 114.3 (5-C), 116.2 (8-C), 118.4 (2''-C y 6''-C), 121.3 (7-C), 121.8 (q, $J = 32.0$ Hz, 4''-C), 124.6 (q, $J = 271.2$ Hz, -CF $_3$), 126.7 (q, $J = 3.5$ Hz, 3''-C y 5''-C), 127.5 (4a-C), 133.5 (6-C), 144.4 (8a-C), 144.8 (1''-C), 150.7 (4'-C), 156.1 (2'-C

y 6'-C), 164.6 (3-C). EM ESI; m/z $[M+H]^+$ Calculado para $C_{28}H_{20}F_3N_4O_4$: 533.14366; encontrado: 533.14454.

10.2.3.4. **6,6'-(4-((3-Clorofenil)amino)piridin-2,6-diil)bis(2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona) 8d**. De 0.10 g (0.36 mmoles) de **6d**, 0.22 (0.79 mmoles) de **4**, 21 mg (0.018 mmoles) tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0), 0.15 g (1.08 mmoles) de carbonato de potasio se obtuvieron 0.09 g (0.17 mmoles, 52 %) de **8d** como un sólido claro. Pd. 287 – 290 °C. RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6); δ : 4.63 (4H, s, -OCH $_2$ -), 7.06 (2H, d, J = 8.9 Hz, 8-H), 7.09 (1H, d, J = 8.0 Hz, 4''-H), 7.25 (3H, s, 3'-H, 5'-H y 2''-H), 7.29 (1H, d, J = 8.2 Hz, 6''-H), 7.40 (1H, t, J = 8.0 Hz, 5''-H), 7.62 – 7.65 (4H, m, 5-H y 7-H), 9.15 (1H, s, -NH), 10.81 (2H, s, 4-H); RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6); δ : 66.8 (2-C), 104.0 (3'-C y 5'-C), 114.1 (5-C), 116.2 (8-C), 118.1 (6''-C), 119.4 (2''-C), 121.4 (7-C), 122.0 (4''-C), 127.4 (4a-C), 131.1 (3''-C), 133.7 (6-C), 133.8 (5''-C), 142.5 (1''-C), 144.1 (8a-C), 151.4 (4'-C), 156.0 (2'-C y 6'-C), 164.7 (3-C). EM ESI; m/z $[M+H]^+$ Calculado para $C_{27}H_{20}ClN_4O_4$: 499.11731; encontrado: 499.11722.

10.2.3.5. **6,6'-(4-((4-Clorofenil)amino)piridin-2,6-diil)bis(2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona) 8e**. De 0.10 g (0.36 mmoles) de **6e**, 0.22 (0.79 mmoles) de **4**, 21 mg (0.018 mmoles) tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0), 0.15 g (1.08 mmoles) de carbonato de potasio se obtuvieron 0.09 g (0.17 mmoles, 52 %) de **8e** como un sólido claro. 310 – 313 °C. RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6); δ : 4.63 (4H, s, -OCH $_2$ -), 7.05 (2H, d, J = 8.3 Hz, 8-H), 7.22 (2H, s, 3'-H y 5'-H), 7.30 (2H, d, J = 8.9 Hz, 2''-H y 6''-H), 7.42 (2H, d, J = 8.8 Hz, 3''-H y 5''-H), 7.63 – 7.65 (4H, m, 5-H y 7-H), 9.08 (1H, s, -NH), 10.80 (2H, s, 4-H); RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6); δ : 66.8 (2-C), 103.6 (3'-C y 5'-C), 114.1 (5-C), 116.2 (8-C), 121.4 (7-C), 121.8 (2''-C y 6''-C), 126.0 (4''-C), 127.4 (4a-C), 129.4 (3''-C y 5''-C), 133.7 (6-C), 139.6 (1''-C), 144.0 (8a-C), 151.7 (4'-C), 155.9 (2'-C y 6'-C), 164.7 (3-C). EM ESI; m/z $[M+H]^+$ Calculado para $C_{27}H_{20}ClN_4O_4$: 499.11731; encontrado: 499.11742.

10.2.3.6. **6,6'-(4-(Bencilamino)piridin-2,6-diil)bis(2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona) 8f**. De 0.10 g (0.40 mmoles) de **7a**, 0.24 (0.88 mmoles) de **4**, 23 mg (0.020 mmoles) tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0), 0.16 g (1.20 mmoles) de carbonato de potasio se obtuvieron 0.13 g (0.26 mmoles, 66 %) de **8f** como un sólido amarillo claro. Pd. 284 – 286 °C. RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6); δ : 4.47 (2H, d, J = 6.0 Hz, -CH $_2$ -), 4.61 (4H, s, -OCH $_2$ -

), 6.88 (2H, s, 3'-H y 5'-H), 7.01 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, 8-H), 7.25 (1H, t, $J = 7.2$ Hz, 4''-H), 7.28 (1H, t, $J = 6.0$ Hz, -NH), 7.36 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, 3''-H y 5''-H), 7.41 (2H, d, $J = 7.1$ Hz, 2''-H y 6''-H), 7.57 (2H, dd, $J = 8.4, 2.1$ Hz, 7-H), 7.61 (2H, d, $J = 2.1$ Hz, 5-H), 10.78 (2H, s, 4-H); RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6); δ : 45.5 (-CH $_2$ -), 66.8 (2-C), 101.8 (3'-C y 5'-C), 114.1 (5-C), 116.0 (8-C), 121.2 (7-C), 126.9 (4''-C), 127.2 (4a-C), 127.3 (2''-C y 6''-C), 128.5 (3''-C y 5''-C), 134.3 (6-C), 139.3 (1''-C), 143.8 (8a-C), 155.2 (2'-C y 6'-C), 155.4 (4'-C), 164.7 (3-C). EM ESI; m/z [M+H] $^+$ Calculado para C $_{28}$ H $_{23}$ N $_4$ O $_4$: 479.17193; encontrado: 479.17212.

10.2.3.7. **6,6'-(4-((3-(Trifluorometil)encil)amino)piridin-2,6-diil)bis(2H-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4H)-ona) 8g.** De 0.10 g (0.31 mmoles) de **7b**, 0.19 (0.68 mmoles) de **4**, 18 mg (0.016 mmoles) tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0), 0.13 g (0.93 mmoles) de carbonato de potasio se obtuvieron 0.14 g (0.26 mmoles, 84 %) de **8g** como un sólido amarillo claro. 235 – 236 °C. RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6); δ : 4.59 (2H, d, $J = 5.8$ Hz, -CH $_2$ -), 4.61 (4H, s, -OCH $_2$ -), 6.90 (2H, s, 3'-H y 5'-H), 7.01 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, 8-H), 7.34 (1H, t, $J = 6.1$ Hz, -NH), 7.57 (2H, dd, $J = 8.4, 2.1$ Hz, 7-H), 7.60 – 7.64 (2H, m, 4''-H y 5''-H), 7.62 (2H, d, $J = 2.1$ Hz, 5-H), 7.73 (1H, d, $J = 6.6$ Hz, 6''-H), 7.78 (1H, s, 2''-H), 10.77 (2H, s, 4-H); RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6); δ : 44.9 (-CH $_2$ -), 66.8 (2-C), 101.8 (3'-C y 5'-C), 114.2 (5-C), 116.0 (8-C), 121.3 (7-C), 123.6 (q, $J = 3.0$ Hz, 4''-C), 123.8 (q, $J = 3.7$ Hz, 2''-C), 124.3 (q, $J = 272.3$ Hz, -CF $_3$), 127.2 (4a-C), 129.2 (q, $J = 31.4$ Hz, 3''-C), 129.5 (5''-C) 131.4 (6''-C), 134.2 (6-C), 141.0 (1''-C), 143.8 (8a-C), 155.2 (2'-C y 6'-C), 155.3 (4'-C), 164.7 (3-C).

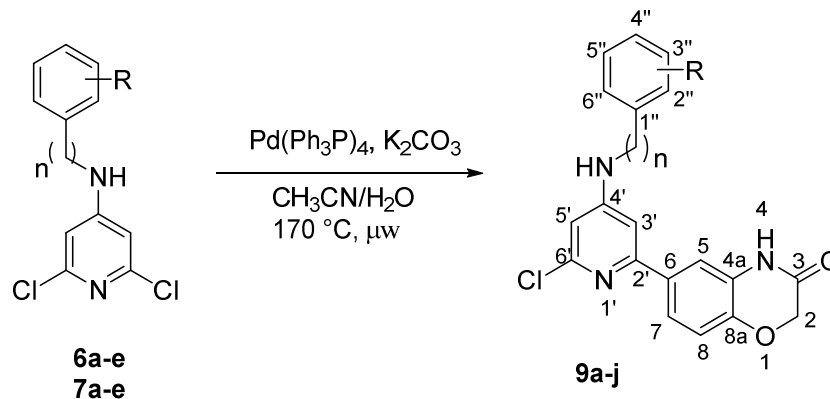
10.2.3.8. **6,6'-(4-((4-(Trifluorometil)encil)amino)piridin-2,6-diil)bis(2H-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4H)-ona) 8h.** De 0.10 g (0.31 mmoles) de **7c**, 0.19 (0.68 mmoles) de **4**, 18 mg (0.016 mmoles) tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0), 0.13 g (0.93 mmoles) de carbonato de potasio se obtuvieron 0.13 g (0.24 mmoles, 76 %) de **8h** como un sólido amarillo claro. Pd. 256 – 258 °C. RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6); δ : 4.59 (2H, d, $J = 4.9$ Hz, -CH $_2$ -), 4.61 (4H, s, -OCH $_2$ -), 6.88 (2H, s, 3'-H y 5'-H), 7.01 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, 8-H), 7.39 (1H, t, $J = 6.2$ Hz, -NH), 7.57 (2H, dd, $J = 8.4, 2.1$ Hz, 7-H), 7.61 (2H, d, $J = 2.1$ Hz, 5-H), 7.62 (2H, d, $J = 8.1$ Hz, 2''-H y 6''-H), 7.73 (2H, d, $J = 8.2$ Hz, 3''-H y 5''-H), 10.78 (2H, s, 4-H); RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6); δ : 44.9 (-CH $_2$ -), 66.8 (2-C), 101.8 (3'-C y

5'-C), 114.2 (5-C), 116.1 (8-C), 121.3 (7-C), 124.4 (q, $J = 271.8$ Hz, -CF₃), 125.4 (q, $J = 3.4$ Hz, 3''-C y 5''-C), 127.3 (4a-C), 127.6 (q, $J = 31.7$ Hz, 4''-C), 127.9 (2''-C y 6''-C), 134.2 (6-C), 143.9 (8a-C), 144.5 (1''-C), 155.3 (4'-C), 155.4 (2'-C y 6'-C), 164.8 (3-C). EM EI; m/z [M] Calculado para C₂₉H₂₁F₃N₄O₄: 546.1515; encontrado: 546.1505.

10.2.3.9. **6,6'-(4-((3-Clorobencil)amino)piridin-2,6-diil)bis(2H-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4H)-ona) 8i.** De 0.10 g (0.35 mmoles) de **7d**, 0.21 (0.76 mmoles) de **4**, 20 mg (0.018 mmoles) tetrakis(trifenilfosfina)paladio, 0.14 g (1.05 mmoles) de carbonato de potasio se obtuvieron 0.09 g (0.17 mmoles, 48%) de **8i** como un sólido claro. Pd. 269.3 – 271.3 °C. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-_{d6}); δ: 4.50 (2H, d, $J = 6.1$ Hz, -CH₂-), 4.59 (4H, s, -OCH₂-), 6.90 (2H, s, 3'-H y 5'-H), 7.00 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, 8-H), 7.29 – 7.32 (1H, m, 6''-H), 7.33 (1H, t, $J = 6.2$ Hz, -NH), 7.37 – 7.39 (2H, m, 4''-H y 5''-H), 7.46 (1H, s, 2''-H), 7.55 (2H, dd, $J = 8.4, 2.1$ Hz, 7-H), 7.71 (2H, d, $J = 1.9$ Hz, 5-H); RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-_{d6}); δ: 44.8 (-CH₂-), 66.8 (2-C), 101.7 (3'-C y 5'-C), 114.5 (5-C), 115.9 (8-C), 121.0 (7-C), 125.9 (4''-C), 126.9 (2''-C), 127.0 (6''-C), 127.8 (4a-C), 130.3 (5''-C), 133.2 (3''-C), 134.1 (6-C), 142.2 (1''-C), 143.9 (8a-C), 155.2 (2'-C, 4'-C y 6'-C), 164.8 (3-C).

10.2.3.10. **6,6'-(4-((4-Clorobencil)amino)piridin-2,6-diil)bis(2H-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4H)-ona) 8j.** De 0.10 g (0.35 mmoles) de **7e**, 0.21 (0.76 mmoles) de **4**, 20 mg (0.018 mmoles) tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0), 0.14 g (1.05 mmoles) de carbonato de potasio se obtuvieron 0.10 g (0.20 mmoles, 58 %) de **8j** como un sólido claro. Pd. 259 – 261 °C. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-_{d6}); δ: 4.47 (2H, d, $J = 6.0$ Hz, -CH₂-), 4.61 (4H, s, -OCH₂-), 6.86 (2H, s, 3'-H y 5'-H), 7.01 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, 8-H), 7.31 (1H, t, $J = 6.1$ Hz, -NH), 7.42 (4H, br. s, 2''-H, 3''-H, 5''-H y 6''-H), 7.57 (2H, dd, $J = 8.4, 2.1$ Hz, 7-H), 7.60 (2H, d, $J = 2.1$ Hz, 5-H), 10.78 (2H, s, 4-H); RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-_{d6}); δ: 44.7 (-CH₂-), 66.8 (2-C), 101.8 (3'-C y 5'-C), 114.1 (5-C), 116.1 (8-C), 121.3 (7-C), 127.3 (4a-C), 128.5 (3''-C y 5''-C), 129.1 (2''-C y 6''-C), 131.4 (4''-C), 134.3 (6-C), 138.5 (1''-C), 143.9 (8a-C), 155.3 (2'-C, 4'-C y 6'-C), 164.8 (3-C). EM EI; m/z [M] Calculado para C₂₈H₂₁ClN₄O₄: 512.1251; encontrado: 512.1260.

10.2.4. Método general para la síntesis de las 6-(4-amino-6-cloropiridin-2-il)-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-onas *N*-sustituidas 9a-j.



Esquema 24. Preparación de los productos de monoacoplamiento **9a-j**.

En un tubo G10 para reactor de microondas se mezclaron 0.1 g de la amina de partida **6a-e** o **7a-e** y 0.8 equivalentes de **4**, 5% molar de tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0) y 2 equivalentes de carbonato de potasio en una mezcla 4:1 de acetonitrilo:agua, el tubo se selló y se sometió a radiación de microondas durante 45 minutos, con una velocidad de agitación constante de 600 rpm. Finalizada la reacción, el disolvente orgánico se evaporó a presión reducida, el residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna.

10.2.4.1. **6-(6-Cloro-4-(fenilamino)piridin-2-il)-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona 9a.** De 100 mg (0.42 mmoles) de **9a**, 92 mg (0.34 mmoles) de **4**, 24 mg (0.021 mmoles) de tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0) y 116 mg (0.84 mmol) de carbonato de potasio, se obtuvieron 71.8 mg (0.20 mmol, 60 %) de **9a** como un sólido blanco. Pf. 154.7 – 155.9 °C. RMN ¹H (600 MHz, DMSO-_{d6}); δ: 4.63 (2H, s, -OCH₂-), 6.78 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, 5'-H), 7.03 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, 8-H), 7.13 (1H, t, *J* = 7.3 Hz, 4''-H), 7.22 (1H, s, 3'-H), 7.26 (2H, d, *J* = 7.1 Hz, 2''-H y 6''-H), 7.41 (2H, t, *J* = 7.3 Hz, 3''-H y 5''-H), 7.44 (1H, dd, *J* = 8.4, 2.2 Hz, 7-H), 7.54 (1H, s, 5-H), 9.19 (1H, s, -NH), 10.80 (1H, s, 4-H); RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-_{d6}); δ: 67.3 (-OCH₂-), 104.4 (3'-C), 106.1 (5'-C), 114.4 (5-C), 116.9 (8-C), 121.7 (7-C, 2''-C y 6''-C), 124.2 (4''-C), 128.0 (4a-C), 130.1 (3''-C y 5''-C), 132.5 (6-C), 140.1 (1''-C), 144.9 (8a-C), 151.7 (6'-C), 154.3 (4'-C), 156.7 (2'-C), 165.1 (3-C). EM APCI; *m/z* [M+H]⁺ Calculado para C₁₉H₁₅ClN₃O₂: 352.0847; encontrado: 352.0817.

10.2.4.2. **6-(6-Cloro-4-((3-(trifluorometil)fenil)amino)piridin-2-il)-2H-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona 9b.** De 100 mg (0.33 mmoles) de **6b**, 72 mg (0.26 mmoles) de **4**, 20 mg (0.017 mmoles) de tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0) y 91 mg (0.66 mmol) de carbonato de potasio, se obtuvieron 61.2 mg (0.15 mmol, 56 %) de **9b** como un sólido beige. Pf. 151.7 – 153.0 °C. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-_{d6}); δ: 4.63 (2H, s, -OCH₂-), 6.86 (1H, s, 5'-H), 7.03 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, 8-H), 7.27 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, 3'-H), 7.42 – 7.45 (1H, m, 5''-H), 7.46 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.2 Hz, 4''-H), 7.48 (1H, s, 2''-H), 7.57 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, 5-H), 7.60 – 7.63 (2H, m, 7-H y 6''-H), 9.44 (1H, s, -NH), 10.80 (1H, s, 4-H); RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-_{d6}); δ: 66.8 (-OCH₂-), 104.6 (3'-C), 106.4 (5'-C), 114.0 (5-C), 116.4 (8-C), 116.8 (q, *J* = 3.8 Hz, 2''-C), 119.5 (q, *J* = 3.3 Hz, 4''-C), 121.2 (7-C), 123.9 (6''-C), 124.0 (q, *J* = 272.3 Hz, -CF₃), 127.6 (4a-C), 130.3 (q, *J* = 31.7 Hz, 3''-C), 130.9 (5''-C), 131.8 (6-C), 140.8 (1''-C), 144.5 (8a-C), 151.3 (6'-C), 152.9 (4'-C), 156.4 (2'-C), 164.6 (3-C). EM APCI; *m/z* [M+H]⁺ Calculado para C₂₀H₁₄ClF₃N₃O₂: 420.0721; encontrado: 420.0652.

10.2.4.3. **6-(6-Cloro-4-((4-(trifluorometil)fenil)amino)piridin-2-il)-2H-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona 9c.** De 100 mg (0.33 mmoles) de **6c**, 72 mg (0.26 mmoles) de **4**, 20 mg (0.017 mmoles) de tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0) y 91 mg (0.66 mmol) de carbonato de potasio, se obtuvieron 68.8 mg (0.16 mmol, 63 %) de **9c** como un sólido amarillo claro. Pf. 219.0 – 220.8 °C. RMN ¹H (600 MHz, DMSO-_{d6}); δ: 4.64 (2H, s, -OCH₂-), 6.96 (1H, d, *J* = 1.7 Hz, 5'-H), 7.04 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, 8-H), 7.36 (1H, d, *J* = 1.7 Hz, 3'-H), 7.42 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, 2''-H y 6''-H), 7.50 (1H, dd, *J* = 8.4, 2.1 Hz, 7-H), 7.58 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, 5-H), 7.71 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, 3''-H y 5''-H), 9.58 (1H, s, -NH), 10.81 (1H, s, 4-H); RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-_{d6}); δ: 67.3 (-OCH₂-), 105.6 (3'-C), 107.1 (5'-C), 114.5 (5-C), 116.9 (8-C), 119.9 (2''-C y 6''-C), 121.8 (7-C), 123.0 (q, *J* = 32.0 Hz, 4''-C), 125.0 (q, *J* = 271.5 Hz, -CF₃), 127.3 (q, *J* = 3.5 Hz, 3''-C y 5''-C), 128.1 (4a-C), 132.2 (6-C), 144.3 (1''-C), 145.0 (8a-C), 151.8 (6'-C), 152.9 (4'-C), 157.0 (2'-C), 165.1 (3-C). EM APCI; *m/z* [M+H]⁺ Calculado para C₂₀H₁₄ClF₃N₃O₂: 420.0721; encontrado: 420.0660.

10.2.4.4. **6-(6-Cloro-4-((3-clorofenil)amino)piridin-2-il)-2H-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-ona 9d.** De 100 mg (0.37 mmoles) de **6d**, 80 mg (0.29 mmoles) de **4**, 22 mg (0.019 mmoles) de tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0) y 102 mg (0.74 mmol) de carbonato de

potasio, se obtuvieron 51.5 mg (0.13 mmol, 46 %) de **9d** como un sólido blanco. 195.0 – 196.2 °C. RMN ¹H (600 MHz, DMSO-_{d6}); δ: 4.63 (2H, s, -OCH₂-), 6.83 (1H, d, *J* = 1.7 Hz, 5'-H), 7.03 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, 8-H), 7.15 (1H, dt, *J* = 8.6, 1.4 Hz, 4''-H), 7.24 (1H, d, *J* = 1.7 Hz, 3'-H), 7.25 (1H, d, *J* = 1.6 Hz, 2''-H), 7.26 (1H, d, *J* = 7.4 Hz, 6''-H), 7.41 (1H, t, *J* = 8.3 Hz, 3''-H), 7.46 (1H, dd, *J* = 8.4, 2.1 Hz, 7-H), 7.55 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, 5-H), 9.33 (1H, s, -NH), 10.81 (1H, s, 4-H); RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-_{d6}); δ: 67.3 (-OCH₂-), 105.0 (3'-C), 106.7 (5'-C), 114.4 (5-C), 116.9 (8-C), 119.5 (6''-C), 120.8 (2''-C), 121.7 (7-C), 123.6 (4''-C), 128.0 (4a-C), 131.7 (5''-C), 132.3 (3''-C), 134.3 (6-C), 141.9 (1''-C), 145.0 (8a-C), 151.7 (6'-C), 153.5 (4'-C), 156.8 (2'-C), 165.1 (3-C). EM APCI; *m/z* [M+H]⁺ Calculado para C₁₉H₁₄Cl₂N₃O₂: 386.0458; encontrado: 386.0452.

10.2.4.5. **6-(6-Cloro-4-((4-clorofenil)amino)piridin-2-il)-2H-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4H)-ona 9e**. De 100 mg (0.37 mmoles) de **6e**, 80 mg (0.29 mmoles) de **4**, 22 mg (0.019 mmoles) de tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0) y 102 mg (0.74 mmol) de carbonato de potasio, se obtuvieron 47.0 mg (0.12 mmol, 42 %) de **9e** como un sólido blanco. 196.4 – 198.3 °C. RMN ¹H (600 MHz, DMSO-_{d6}); δ: 4.63 (2H, s, -OCH₂-), 6.79 (1H, d, *J* = 1.7 Hz, 5'-H), 7.02 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, 8-H), 7.22 (1H, d, *J* = 1.7 Hz, 3'-H), 7.27 (2H, d, *J* = 8.7 Hz, 2''-H y 6''-H), 7.44 (2H, d, *J* = 8.7 Hz, 3''-H y 5''-H), 7.46 (1H, dd, *J* = 8.4, 2.2 Hz, 7-H), 7.54 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, 5-H), 9.27 (1H, s, -NH), 10.86 (1H, s, 4-H); RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-_{d6}); δ: 67.3 (-OCH₂-), 104.5 (3'-C), 106.5 (5'-C), 114.4 (5-C), 116.9 (8-C), 121.7 (7-C), 132.1 (2''-C y 6''-C), 127.6 (4''-C), 128.0 (4a-C), 130.0 (3''-C y 5''-C), 132.4 (6-C), 139.2 (1''-C), 144.9 (8a-C), 151.7 (6'-C), 153.8 (4'-C), 156.8 (2'-C), 165.1 (3-C). EM APCI; *m/z* [M+H]⁺ Calculado para C₁₉H₁₄Cl₂N₃O₂: 386.0458; encontrado: 386.0437.

10.2.4.6. **6-(4-(Bencilamino)-6-cloropiridin-2-il)-2H-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4H)-ona 9f**. De 100 mg (0.40 mmoles) de **7a**, 87 mg (0.31 mmoles) de **4**, 23 mg (0.020 mmoles) de tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0) y 110.4 mg (0.80 mmol) de carbonato de potasio, se obtuvieron 65.8 mg (18 mmol, 58 %) de **9f** como un sólido blanco. Pf. 229.8 – 230.1 °C. RMN ¹H (600 MHz, DMSO-_{d6}); δ: 4.41 (2H, d, *J* = 6.0 Hz, -CH₂-), 4.61 (2H, s, -OCH₂-), 6.48 (1H, s, 5'-H), 6.96 (1H, s, 3'-H), 7.00 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, 8-H), 7.26 (1H, tt, *J* = 8.5, 2.9 Hz, 4''-H), 7.34 – 7.37 (4H, m, 2''-H, 3''-H, 5''-H y 6''-H), 7.42 (1H, dd, *J* = 8.4, 2.1 Hz, 7-H), 7.54 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, 5-H), 7.55 (1H, t, *J* = 6.0 Hz, -NH), 10.78 (1H, s, 4-H);

RMN ^{13}C (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$); δ : 45.9 ($-\text{CH}_2-$), 67.2 ($-\text{OCH}_2-$), 103.3 ($3'-\text{C}$ y $5'-\text{C}$), 114.4 ($5-\text{C}$), 116.7 ($8-\text{C}$), 121.6 ($7-\text{C}$), 127.6 ($4''-\text{C}$), 127.8 ($2''-\text{C}$ y $6''-\text{C}$), 127.9 ($4a-\text{C}$), 129.1 ($3''-\text{C}$ y $5''-\text{C}$), 132.9 ($6-\text{C}$), 139.1 ($1''-\text{C}$), 144.7 ($8a-\text{C}$), 151.4 ($6'-\text{C}$), 155.9 ($2'-\text{C}$), 157.3 ($4'-\text{C}$), 165.1 ($3-\text{C}$). EM APCI; m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ Calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{ClN}_3\text{O}_2$: 366.1004; encontrado: 366.0940.

10.2.4.7. **6-(6-Cloro-4-((3-(trifluorometil)bencil)amino)piridin-2-il)-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona 9g.** De 100 mg (0.31 mmoles) de **7b**, 69 mg (0.25 mmoles) de **4**, 18.5 mg (0.016 mmoles) de tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0) y 85.5 mg (0.62 mmol) de carbonato de potasio, se obtuvieron 62.9 mg (14 mmol, 58 %) de **9g** como un sólido blanco. Pf. 241.7 – 242.1 °C. RMN ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$); δ : 4.54 (2H, d, $J = 6.0$ Hz, $-\text{CH}_2-$), 4.61 (2H, s, $-\text{OCH}_2-$), 6.52 (1H, s, $5'-\text{H}$), 6.99 (1H, s, $3'-\text{H}$), 7.00 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, $8-\text{H}$), 7.43 (1H, dd, $J = 8.4, 2.1$ Hz, $7-\text{H}$), 7.55 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, $5-\text{H}$), 7.59 (1H, s, $-\text{NH}$), 7.61 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, $6''-\text{H}$), 7.63 (1H, d, $J = 7.3$ Hz, $5''-\text{H}$), 7.68 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, $4''-\text{H}$), 7.74 (1H, s, $2''-\text{H}$), 10.78 (1H, s, $4-\text{H}$); RMN ^{13}C (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$); δ : 45.3 ($-\text{CH}_2-$), 67.3 ($-\text{OCH}_2-$), 103.4 ($3'-\text{C}$ y $5'-\text{C}$), 114.5 ($5-\text{C}$), 116.7 ($8-\text{C}$), 121.6 ($7-\text{C}$), 124.4 ($2''-\text{C}$ y $5''-\text{C}$), 124.8 (q, $J = 272.0$ Hz, $-\text{CF}_3$), 127.9 ($4a-\text{C}$), 129.7 (q, $J = 31.6$ Hz, $3''-\text{C}$), 130.1 ($6''-\text{C}$) 131.9 ($4''-\text{C}$), 132.8 ($6-\text{C}$), 140.9 ($1''-\text{C}$), 144.7 ($8a-\text{C}$), 151.4 ($6'-\text{C}$), 156.0 ($2'-\text{C}$), 157.1 ($4'-\text{C}$), 165.1 ($3-\text{C}$). EM APCI; m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ Calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{ClF}_3\text{N}_3\text{O}_2$: 434.0878; encontrado: 434.0812.

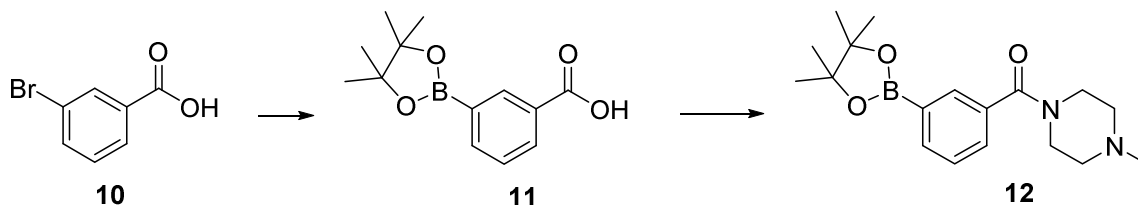
10.2.4.8. **6-(6-Cloro-4-((4-(trifluorometil)bencil)amino)piridin-2-il)-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona 9h.** De 100 mg (0.31 mmoles) de **7c**, 69 mg (0.25 mmoles) de **4**, 18.5 mg (0.016 mmoles) de tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0) y 85.5 mg (0.62 mmol) de carbonato de potasio, se obtuvieron 65.1 mg (0.15 mmol, 60 %) de **9h** como un sólido blanco. Pf. 214.0 – 214.6 °C. RMN ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$); δ : 4.55 (2H, d, $J = 6.0$ Hz, $-\text{CH}_2-$), 4.61 (2H, s, $-\text{OCH}_2-$), 6.49 (1H, s, $5'-\text{H}$), 6.97 (1H, s, $3'-\text{H}$), 7.00 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, $8-\text{H}$), 7.43 (1H, dd, $J = 8.4, 2.1$ Hz, $7-\text{H}$), 7.54 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, $5-\text{H}$), 7.57 (2H, d, $J = 8.1$ Hz, $2''-\text{H}$ y $6''-\text{H}$), 7.65 (1H, t, $J = 6.0$ Hz, $-\text{NH}$), 7.73 (2H, d, $J = 8.2$ Hz, $3''-\text{H}$ y $5''-\text{H}$), 10.78 (1H, s, $4-\text{H}$); RMN ^{13}C (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$); δ : 45.3 ($-\text{CH}_2-$), 67.3 ($-\text{OCH}_2-$), 103.3 ($3'-\text{C}$ y $5'-\text{C}$), 114.5 ($5-\text{C}$), 116.7 ($8-\text{C}$), 121.6 ($7-\text{C}$), 124.8 (q, $J = 271.8$ Hz, $-\text{CF}_3$), 125.9 (q, $J = 3.3$ Hz, $3''-\text{C}$ y $5''-\text{C}$), 127.9 ($4a-\text{C}$), 128.2 (q, $J = 31.8$ Hz,

4''-C), 128.4 (2''-C y 6''-C), 132.8 (6-C), 144.3 (1''-C), 144.7 (8a-C), 151.4 (6'-C), 156.0 (2'-C), 157.2 (4'-C), 166.1 (3-C). EM APCI; m/z $[M+H]^+$ Calculado para $C_{21}H_{16}ClF_3N_3O_2$: 434.0878; encontrado: 434.0801.

10.2.4.9. **6-(6-Cloro-4-((3-(clorobencil)amino)piridin-2-il)-2H-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4H)-ona 9i**. De 100 mg (0.35 mmoles) de **7d**, 77 mg (0.28 mmoles) de **4**, 21 mg (0.018 mmoles) de tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0) y 97 mg (0.70 mmol) de carbonato de potasio, se obtuvieron 44.8 mg (0.11 mmol, 40 %) de **9i** como un sólido amarillo claro. Pf. 235.2 – 236.6 °C. RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6); δ : 4.45 (2H, d, $J = 6.0$ Hz, -CH $_2$ -), 4.61 (2H, s, -OCH $_2$ -), 6.49 (1H, s, 5'-H), 6.97 (1H, s, 3'-H), 7.00 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, 8-H), 7.31 – 7.33 (2H, m, 5''-H y 6''-H), 7.37 (1H, s, 2''-H), 7.40 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, 4''-H), 7.43 (1H, dd, $J = 8.5, 2.1$ Hz, 7-H), 7.55 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, 5-H), 7.57 (1H, t, $J = 6.0$ Hz, -NH), 10.80 (1H, s, 4-H); RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6); δ : 44.7 (-CH $_2$ -), 66.8 (-OCH $_2$ -), 102.8 (3'-C), 104.1 (5'-C), 114.0 (5-C), 116.3 (8-C), 121.1 (7-C), 125.9 (6''-C), 127.1 (4''-C y 5''-C), 127.4 (4a-C), 130.5 (2''-C), 132.3 (6-C), 133.1 (3''-C), 141.5 (1''-C), 144.2 (8a-C), 150.9 (6'-C), 155.4 (2'-C), 156.6 (4'-C), 164.6 (3-C). EM APCI; m/z $[M+H]^+$ Calculado para $C_{20}H_{16}Cl_2N_3O_2$: 400.0614; encontrado: 400.0606.

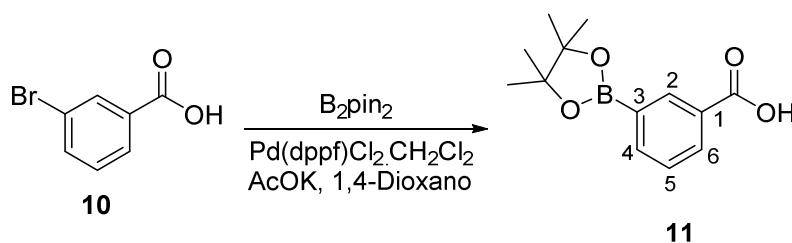
10.2.4.10. **6-(6-Cloro-4-((4-(clorobencil)amino)piridin-2-il)-2H-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4H)-ona 9j**. De 100 mg (0.35 mmoles) de **7d**, 77 mg (0.28 mmoles) de **4**, 21 mg (0.018 mmoles) de tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0) y 97 mg (0.70 mmol) de carbonato de potasio, se obtuvieron 53.8 mg (0.13 mmol, 48%) de **9j** como un sólido blanco. Pf. 197.1 – 197.8 °C. RMN 1H (600 MHz, DMSO- d_6); δ : 4.42 (2H, d, $J = 5.9$ Hz, -CH $_2$ -), 4.61 (2H, s, -OCH $_2$ -), 6.47 (1H, s, 5'-H), 6.95 (1H, s, 3'-H), 7.00 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, 8-H), 7.38 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, 2''-H y 6''-H), 7.42 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, 3''-H y 5''-H), 7.43 (1H, dd, $J = 8.4, 2.1$ Hz, 7-H), 7.54 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, 5-H), 7.57 (1H, t, $J = 5.9$ Hz, -NH), 10.78 (1H, s, 4-H); RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO- d_6); δ : 45.1 (-CH $_2$ -), 67.3 (-OCH $_2$ -), 102.9 (3'-C y 5'-C), 114.4 (5-C), 116.7 (8-C), 121.6 (7-C), 127.9 (4a-C), 129.0 (2''-C y 6''-C), 129.6 (3''-C y 5''-C), 132.0 (4''-C), 132.6 (6-C), 138.3 (1''-C), 144.7 (8a-C), 151.4 (6'-C), 156.0 (2'-C), 157.1 (4'-C), 165.1 (3-C). EM APCI; m/z $[M+H]^+$ Calculado para $C_{20}H_{16}Cl_2N_3O_2$: 400.0614; encontrado:400.0577.

10.2.5. Síntesis de (4-Metilpiperazin-1-il)(3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil)metanona 12



Esquema 25. Ruta sintética propuesta para la obtención del intermediario 12.

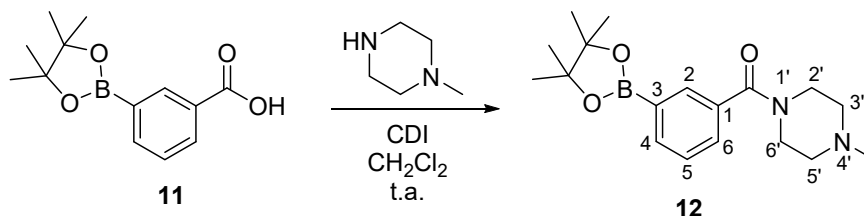
10.2.5.1. Síntesis del Ácido 3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)benzoico 11



Esquema 26. Borilación de Miyaura del ácido *m*-Bromobenzoico 10.

En un matraz de bola de 3 bocas se mezcló 1.00 g (5.0 mmol) del compuesto 10 con 1.52 g (6.0 mmoles) de diborobispinacolato, 0.30 g (0.37 mmoles) de [1,1'-Bis(difenilfosfino)ferroceno] dicloropaladio(II) en complejo con diclorometano y 1.46 g (14.9 mmoles) de acetato de potasio, se realizaron purgas sucesivas de nitrógeno y vacío, finalmente al sistema se le agregaron 15 mL de 1,4-Dioxano. La reacción se calentó a 100 °C con agitación constante durante 6 horas, concluida la reacción se purificó por cromatografía en columna obteniéndose 0.64 g (2.6 mmoles, 52%) del ácido 3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il) benzoico como un sólido blanco. Pf. 204 – 206 °C. RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$); δ : 1.37 (12H, s, - CH_3), 7.48 (1H, t, $J = 7.6$ Hz, 5-**H**), 8.04 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, 4-**H**), 8.21 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, 6-**H**), 8.58 (1H, s, 2-**H**), 11.02 (1H, br. s, -COOH).

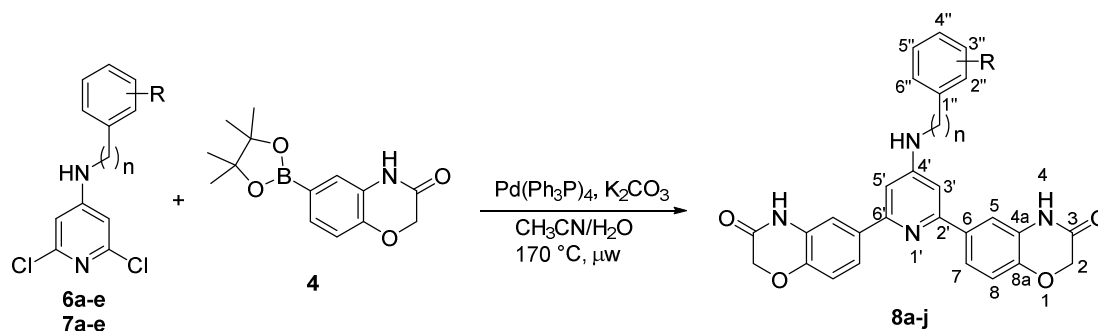
10.2.5.2. Obtención de la amida (4-Metilpiperazin-1-il)(3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil)metanona **12**



Esquema 27. Reacción de formación de la amida **12**.

En un matraz de bola se agregó 1.0 g de **11** (4.0 mmol) con y 1.0 g (6.2 mmol) de 1,1'-carbonildiimidazol en 50 mL de diclorometano, la reacción se mantuvo en agitación por 10 minutos e inmediatamente se agregaron 0.6 g (0.64 mL, 6.0 mmol) de 1-metilpiperazina, la mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente por 3 horas. Finalizado este tiempo, la mezcla de reacción se extrajo con salmuera (3x100 mL) y se concentró el producto, obteniéndose 0.83 g (2.52 mmol, 63%) de la (4-metilpiperazin-1-il)(3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil)metanona **12** como un aceite amarillo. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃); δ: 1.30 (12H, s, -CH₃), 2.29 (3H, s, -NCH₃), 2.34 (2H, s, 3'-CH₂), 2.46 (2H, s, 5'-CH₂), 3.42 (2H, s, 2'-CH₂), 3.77 (2H, s, 6'-CH₂), 7.36 (1H, t, *J* = 7.8 Hz, 5-H), 7.43 (1H, dt, *J* = 7.4, 1.6 Hz, 4-H), 7.79 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, 2-H), 7.80 (1H, dt, *J* = 7.2, 1.5 Hz, 6-H); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃); δ: 24.9 (-CH₃), 41.8 (6'-CH₂), 45.9 (-NCH₃), 47.5 (2'-CH₂), 54.6 (5'-C), 55.2 (3'-C), 84.1 (-OC), 127.9 (5-C), 129.7 (4-C), 133.2 (2-C), 135.2 (1-C y 3-C), 136.0 (6-C), 170.4 (-CO).

10.2.6. Método general para la síntesis de las 6-(4-Amino-6-(3-(4-metilpiperazin-1-carbonil)fenil)piridin-2-il)-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-onas 4N-sustituidas 13a-j



Esquema 28. Síntesis de la serie no simétrica **13a-j**.

En un tubo G10 para reactor de microondas se mezclaron 0.1 g del producto monoacoplado **9a-j** y 1.2 equivalentes de **12**, 5% molar del tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0) y 2.5 equivalentes de carbonato de potasio en una mezcla 4:1 de acetonitrilo:agua, el tubo se selló y se sometió a radiación de microondas durante 45 minutos, con una velocidad de agitación constante de 600 rpm. Finalizada la reacción, el disolvente orgánico se evaporó a presión reducida, el residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna utilizando una mezcla de metanol:cloroformo 95:5.

10.2.6.1. **6-(4-(Fenilamino)-6-(3-(4-metilpiperazin-1-carbonil)fenil)piridin-2-il)-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona 13a.** De 100 mg (0.28 mmol) de **9a**, 112.5 mg (0.34 mmol) de **12**, 16 mg (0.014 mmol) de tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0) y 96.6 mg (0.70 mmol) de carbonato de potasio se obtuvieron 81.5 mg (0.157 mmol, 56 %) de **13a** como un sólido blanco. Pf. 236.9 – 237.8 °C. RMN ¹H (600 MHz, DMSO-_{d6}); δ: 2.20 (3H, s, NCH₃), 2.29 (2H, s, NCH_{2a}), 2.38 (2H, s, 5'-NCH_{2b}), 3.36 (2H, s, C(O)NCH_{2a}), 3.65 (2H, s, C(O)NCH_{2b}), 4.63 (2H, s, -OCH₂-), 7.05 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, 8-H), 7.08 (1H, t, *J* = 7.4 Hz, 4''-H), 7.30 (1H, s, 3'-H), 7.31 (2H, d, *J* = 7.4 Hz, 2''-H y 6''-H), 7.38 (1H, s, 5'-H), 7.40 (2H, d, *J* = 7.4 Hz, 3'''-H y 5'''-H), 7.44 (1H, dd, *J* = 7.7, 0.8 Hz, 4'''-H), 7.57 (1H, t, *J* = 7.7 Hz, 5'''-H), 7.60 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, 7-H), 7.68 (1H, s, 5-H), 8.03 (1H, s, 2'''-H), 8.10 (1H, d, *J* = 7.7 Hz, 6'''-H), 9.07 (1H, s, -NH), 10.88 (1H, s, 4-H); RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-_{d6}); δ: 42.0 (C(O)NCH_{2b}), 46.1 (-NCH₃), 47.7 (C(O)NCH_{2a}), 54.8 (NCH_{2b}), 55.2

(NCH_{2a}), 67.3 (-OCH₂-), 104.3 (3'-C), 104.8 (5'-C), 114.6 (5-C), 116.8 (8-C), 120.9 (2''-C y 6''-C), 121.7 (7-C), 123.3 (4''-C), 125.7 (2'''-C), 127.8 (4a-C y 4'''-C), 128.0 (6'''-C), 129.4 (5'''-C), 130.1 (3''-C y 5''-C), 134.2 (6-C), 136.8 (3'''-C), 140.0 (1'''-C), 141.0 (1''-C), 144.6 (8a-C), 152.8 (4'-C), 156.2 (6'-C), 156.5 (2'-C), 165.2 (3-C), 169.3 (NCO). EM APCI; *m/z* [M+H]⁺ Calculado para C₃₁H₃₀N₅O₃: 520.2343; encontrado:520.2304.

10.2.6.2.

6-(6-(3-(4-Metilpiperazin-1-carbonil)fenil)-4-((3-(trifluorometil)fenil)amino)piridin-2-il)-2H-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4H)-ona 13b. De 100 mg (0.24 mmol) de **9b**, 94.5 mg (0.29 mmol) de **12**, 14 mg (0.012 mmol) de tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0) y 82.8 mg (0.60 mmol) de carbonato de potasio se obtuvieron 84.6 mg (0.144 mmol, 60 %) de **13b** como láminas blancas. Pf. 197.0 – 198.7 °C. RMN ¹H (600 MHz, DMSO-_{d6}); δ: 2.19 (3H, s, NCH₃), 2.29 (2H, s, NCH_{2a}), 2.39 (2H, s, 5'-NCH_{2b}), 3.40 (2H, s, C(O)NCH_{2a}), 3.65 (2H, s, C(O)NCH_{2b}), 4.64 (2H, s, -OCH₂-), 7.07 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, 8-H), 7.33 (1H, d, *J* = 1.7 Hz, 3'-H), 7.38 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, 4''-H), 7.44 (1H, d, *J* = 1.7 Hz, 5'-H), 7.45 (1H, d, *J* = 7.9 Hz, 4'''-H), 7.51 (1H, s, 2''-H), 7.58 (1H, t, *J* = 7.7 Hz, 5'''-H), 7.61 (1H, t, *J* = 8.0 Hz, 5''-H), 7.62 (1H, dd, *J* = 8.1, 2.1 Hz, 7-H), 7.66 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, 6''-H), 7.71 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, 5-H), 8.04 (1H, s, 2'''-H), 8.13 (1H, d, *J* = 7.9 Hz, 6'''-H), 9.33 (1H, s, -NH), 10.87 (1H, s, 4-H); RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-_{d6}); δ: 42.0 (C(O)NCH_{2b}), 46.1 (-NCH₃), 47.7 (C(O)NCH_{2a}), 54.8 (NCH_{2b}), 55.2 (NCH_{2a}), 67.3 (-OCH₂-), 105.2 (3'-C), 105.6 (5'-C), 114.7 (5-C), 116.2 (2''-C), 117.1 (8-C), 119.2 (4''-C), 121.8 (q, *J* = 28.3 Hz, 3''-C), 121.9 (7-C), 123.4 (6''-C), 125.4 (2'''-C), 128.0 (4a-C, 4'''-C y 6'''-C), 129.3 (5'''-C), 130.9 (5''-C), 134.0 (6-C), 136.8 (3'''-C), 139.8 (1'''-C), 142.2 (1''-C), 144.7 (8a-C), 151.9 (4'-C), 156.5 (6'-C), 156.8 (2'-C), 165.2 (3-C), 169.4 (NCO). EM APCI; *m/z* [M+H]⁺ Calculado para C₃₂H₂₉F₃N₅O₃: 588.2217; encontrado: 588.2138.

10.2.6.3.

6-(6-(3-(4-Metilpiperazin-1-carbonil)fenil)-4-((4-(trifluorometil)fenil)amino)piridin-2-il)-2H-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4H)-ona 13c. De 100 mg (0.24 mmol) de **9c**, 94.5 mg (0.29 mmol) de **12**, 14 mg (0.012 mmol) de tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0) y 82.8 mg (0.60 mmol) de carbonato de potasio se obtuvieron 79.0 mg (0.134 mmol, 56 %) de **13c** como un sólido blanco. Pf. 229.2 – 229.8 °C. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-_{d6}); δ: 2.20 (3H, s, NCH₃), 2.31 (2H, s, NCH_{2a}), 2.39 (2H,

s, 5'-NCH_{2b}), 3.36 (2H, s, C(O)NCH_{2a}), 3.66 (2H, s, C(O)NCH_{2b}), 4.64 (2H, s, -OCH₂-), 7.07 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, 8-H), 7.42 (1H, d, *J* = 1.7 Hz, 3'-H), 7.46 (3H, d, *J* = 8.7 Hz, 2''-H, 6''-H y 4'''-H), 7.52 (1H, d, *J* = 1.7 Hz, 5'-H), 7.59 (1H, t, *J* = 7.7 Hz, 5'''-H), 7.66 (1H, dd, *J* = 8.4, 2.1 Hz, 7-H), 7.70 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, 3''-H y 5''-H), 7.72 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, 5-H), 8.08 (1H, t, *J* = 1.3 Hz, 2'''-H), 8.16 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, 6'''-H), 9.45 (1H, s, -NH), 10.87 (1H, s, 4-H); RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-_{d6}); δ: 41.5 (C(O)NCH_{2b}), 45.6 (-NCH₃), 47.2 (C(O)NCH_{2a}), 54.3 (NCH_{2b}), 54.7 (NCH_{2a}), 66.9 (-OCH₂-), 105.4 (3'-C), 105.7 (5'-C), 114.2 (5-C), 116.3 (8-C), 118.5 (2''-C y 6''-C), 121.4 (7-C), 121.6 (q, *J* = 32.1 Hz, 4''-C), 124.6 (q, *J* = 270.9 Hz, -CF₃), 125.0 (2'''-C), 126.8 (3''-C y 5''-C), 127.5 (4a-C), 127.6 (4'''-C y 6'''-C), 129.0 (5'''-C), 133.4 (6-C), 136.4 (3'''-C), 139.3 (1'''-C), 144.2 (1''-C), 144.7 (8a-C), 150.8 (4'-C), 156.0 (6'-C), 156.3 (2'-C), 164.7 (3-C), 168.8 (NCO). EM APCI; *m/z* [M+H]⁺ Calculado para C₃₂H₂₉F₃N₅O₃: 588.2217; encontrado: 588.2167.

10.2.6.4. **6-(4-((3-Clorofenil)amino)-6-(3-(4-metilpiperazin-1-carbonil)fenil)piridin-2-il)-2H-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4H)-ona 13d**. De 100 mg (0.26 mmol) de **9d**, 102.9 mg (0.31 mmol) de **12**, 15 mg (0.013 mmol) de tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0) y 89.7 mg (0.65 mmol) de carbonato de potasio se obtuvieron 70.6 mg (0.127 mmol, 49 %) de **13d** como un sólido blanco. Pf. 252.0 – 253.4 °C. RMN ¹H (600 MHz, DMSO-_{d6}); δ: 2.20 (3H, s, NCH₃), 2.29 (2H, s, NCH_{2a}), 2.39 (2H, s, 5'-NCH_{2b}), 3.37 (2H, s, C(O)NCH_{2a}), 3.66 (2H, s, C(O)NCH_{2b}), 4.64 (2H, s, -OCH₂-), 7.07 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, 8-H), 7.10 (1H, dd, *J* = 7.8, 1.1 Hz, 4''-H), 7.27 (1H, s, 2''-H), 7.31 (1H, d, *J* = 1.3 Hz, 3'-H), 7.31 (1H, m, 6''-H), 7.41 (1H, t, *J* = 8.0 Hz, 5''-H), 7.41 (1H, s, 5'-H), 7.46 (1H, d, *J* = 7.4 Hz, 4'''-H), 7.58 (1H, t, *J* = 7.7 Hz, 5'''-H), 7.62 (1H, dd, *J* = 8.4, 1.9 Hz, 7-H), 7.69 (1H, d, *J* = 1.7 Hz, 5-H), 8.04 (1H, s, 2'''-H), 8.12 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, 6'''-H), 9.17 (1H, s, -NH), 10.87 (1H, s, 4-H); RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-_{d6}); δ: 42.0 (C(O)NCH_{2b}), 46.1 (-NCH₃), 47.7 (C(O)NCH_{2a}), 54.8 (NCH_{2b}), 55.3 (NCH_{2a}), 67.3 (-OCH₂-), 105.1 (3'-C), 105.4 (5'-C), 114.6 (5-C), 116.8 (8-C), 118.6 (6''-C), 119.9 (2''-C), 121.8 (7-C), 122.6 (4''-C), 125.5 (2'''-C), 128.0 (4a-C, 4'''-C y 6'''-C), 129.4 (5'''-C), 131.7 (5''-C), 134.0 (6-C), 134.3 (3''-C), 136.8 (3'''-C), 139.9 (1'''-C), 142.9 (1''-C), 144.7 (8a-C), 152.0 (4'-C), 156.4 (6'-C), 156.7 (2'-C), 165.2 (3-C), 169.3 (NCO). EM APCI; *m/z* [M+H]⁺ Calculado para C₃₁H₂₉ClN₅O₃: 554.1953; encontrado: 554.1877.

10.2.6.5. **6-(4-((4-Clorofenil)amino)-6-(3-(4-metilpiperazin-1-carbonil)fenil)piridin-2-il)-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona 13e**. De 100 mg (0.26 mmol) de **9e**, 102.9 mg (0.31 mmol) de **12**, 15 mg (0.013 mmol) de tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0) y 89.7 mg (0.65 mmol) de carbonato de potasio se obtuvieron 72.0 mg (0.130 mmol, 49 %) de **13e** como un sólido blanco. Pf. 232.3 – 234. 2 °C. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-_{d6}); δ: 2.20 (3H, s, NCH₃), 2.31 (2H, s, NCH_{2a}), 2.39 (2H, s, 5'-NCH_{2b}), 3.39 (2H, s, C(O)NCH_{2a}), 3.65 (2H, s, C(O)NCH_{2b}), 4.63 (2H, s, -OCH₂-), 7.05 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, 8-H), 7.29 (1H, d, *J* = 1.7 Hz, 3'-H), 7.30 (2H, d, *J* = 8.8 Hz, 2''-H y 6''-H), 7.37 (1H, d, *J* = 1.6 Hz, 5'-H), 7.43 (2H, d, *J* = 8.8 Hz, 3''-H y 5''-H), 7.45 (1H, dd, *J* = 8.0, 1.3 Hz, 4'''-H), 7.57 (1H, t, *J* = 7.7 Hz, 5'''-H), 7.62 (1H, dd, *J* = 8.4, 2.1 Hz, 7-H), 7.69 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, 5-H), 8.04 (1H, t, *J* = 1.3 Hz, 2'''-H), 8.12 (1H, dt, *J* = 8.0, 1.1 Hz, 6'''-H), 9.12 (1H, s, -NH), 10.86 (1H, s, 4-H); RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-_{d6}); δ: 41.6 (C(O)NCH_{2b}), 45.6 (-NCH₃), 47.2 (C(O)NCH_{2a}), 54.3 (NCH_{2b}), 54.7 (NCH_{2a}), 66.9 (-OCH₂-), 104.1 (3'-C), 104.6 (5'-C), 114.1 (5-C), 116.3 (8-C), 121.4 (7-C), 121.8 (2''-C y 6''-C), 125.0 (2'''-C), 126.1 (4''-C), 127.8 (4a-C y 4'''-C), 127.6 (6'''-C), 129.0 (5'''-C), 129.4 (3''-C y 5''-C), 133.6 (6-C), 136.3 (3'''-C), 139.4 (1'''-C), 139.6 (1''-C), 144.2 (8a-C), 151.9 (4'-C), 155.9 (6'-C), 156.1 (2'-C), 164.8 (3-C), 168.9 (NCO). EM APCI; *m/z* [M+H]⁺ Calculado para C₃₁H₂₉ClN₅O₃: 554.1953; encontrado: 554.188.

10.2.6.6. **6-(4-(Bencilamino)-6-(3-(4-metilpiperazin-1-carbonil)fenil)piridin-2-il)-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona 13f**. De 100 mg (0.27 mmol) de **9f**, 108.2 mg (0.33 mmol) de **12**, 16 mg (0.014 mmol) de tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0) y 93.2 mg (0.68 mmol) de carbonato de potasio se obtuvieron 75.0 mg (0.140 mmol, 52 %) de **13f** como agujas blancas. Pf. 177.3 – 177.9 °C. RMN ¹H (600 MHz, DMSO-_{d6}); δ: 2.20 (3H, s, NCH₃), 2.27 (2H, s, NCH_{2a}), 2.38 (2H, s, 5'-NCH_{2b}), 3.36 (2H, s, C(O)NCH_{2a}), 3.65 (2H, s, C(O)NCH_{2b}), 4.51 (2H, d, *J* = 5.8 Hz, -CH₂-), 4.61 (2H, s, -OCH₂-), 6.96 (1H, s, 3'-H), 7.02 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, 8-H), 7.05 (1H, s, 5'-H), 7.25 (1H, t, *J* = 7.3 Hz, 4''-H), 7.29 (1H, t, *J* = 5.2 Hz, -NH), 7.35 (2H, t, *J* = 7.6 Hz, 3''-H y 5''-H), 7.40 (1H, d, *J* = 7.7, Hz, 4'''-H), 7.42 (2H, d, *J* = 7.6 Hz, 2''-H y 6''-H), 7.53 (1H, t, *J* = 7.7 Hz, 5'''-H), 7.55 (1H, dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 7-H), 7.69 (1H, d, *J* = 1.9 Hz, 5-H), 8.01 (1H, s, 2'''-H), 8.10 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, 6'''-H), 10.84 (1H, s, 4-H); RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-_{d6}); δ: 42.0 (C(O)NCH_{2b}), 46.0 (-CH₂-), 46.1 (-NCH₃), 47.7 (C(O)NCH_{2a}), 54.8 (NCH_{2b}), 55.3 (NCH_{2a}), 67.3 (-OCH₂-

), 103.0 (3'-C y 5'-C), 114.6 (5-C), 116.6 (8-C), 121.7 (7-C), 125.3 (2'''-C), 127.4 (4''-C), 127.5 (2''-C y 6''-C), 127.9 (4a-C, 4'''-C y 6'''-C), 129.0 (3''-C y 5''-C), 129.2 (5'''-C), 134.6 (6-C), 136.7 (3'''-C), 139.8 (1''-C), 140.3 (1'''-C), 144.4 (8a-C), 155.5 (6'-C), 155.7 (2'-C), 156.1 (4'-C), 165.2 (3-C), 169.4 (NCO). EM APCI; m/z [M+H]⁺ Calculado para C₃₂H₃₂N₅O₃: 534.2500; encontrado:534.2392.

10.2.6.7. **6-(6-(3-(4-Metilpiperazin-1-carbonil)fenil)-4-((3-(trifluorometil)bencil)amino)piridin-2-il)-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona 13g.** De 100 mg (0.23 mmol) de **9g**, 91.3 mg (0.28 mmol) de **12**, 14 mg (0.012 mmol) de tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0) y 79.3 mg (0.58 mmol) de carbonato de potasio se obtuvieron 77.5 mg (0.129 mmol, 56 %) de **13g** como un sólido blanco. Pf. 241.4 – 243.6 °C. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆); δ: 2.20 (3H, s, NCH₃), 2.28 (2H, s, NCH_{2a}), 2.38 (2H, s, 5'-NCH_{2b}), 3.33 (2H, s, C(O)NCH_{2a}), 3.64 (2H, s, C(O)NCH_{2b}), 4.61 (2H, s, -OCH₂-), 4.63 (2H, s, -CH₂-), 6.98 (1H, s, 3'-H), 7.02 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, 8-H), 7.07 (1H, s, 5'-H), 7.40 (1H, d, $J = 7.6$, Hz, 4'''-H), 7.53 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, 7-H), 7.55 (1H, m, 5'''-H), 7.60 – 7.63 (2H, m, 4''-H y 5''-H), 7.70 (1H, s, 5-H), 7.73 (1H, d, $J = 6.5$ Hz, 6''-H), 7.79 (1H, s, 2''-H), 8.02 (1H, s, 2'''-H), 8.10 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, 6'''-H), 10.82 (1H, s, 4-H); RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆); δ: 41.5 (C(O)NCH_{2b}), 44.9 (-CH₂-), 45.6 (-NCH₃), 47.2 (C(O)NCH_{2a}), 54.2 (NCH_{2b}), 54.7 (NCH_{2a}), 66.8 (-OCH₂-), 102.5 (3'-C y 5'-C), 114.1 (5-C), 116.0 (8-C), 121.1 (7-C), 123.7 (q, $J = 3.4$ Hz, 2''-C), 123.8 (4''-C), 124.0 (6''-C), 124.8 (2'''-C), 127.3 (4a-C, 4'''-C y 6'''-C), 128.6 (5'''-C), 129.5 (5''-C), 131.4 (3''-C), 134.4 (6-C), 136.2 (3'''-C), 139.7 (1'''-C), 141.0 (1''-C), 143.9 (8a-C), 155.1 (6'-C), 155.3 (2'-C), 155.4 (4'-C), 164.7 (3-C), 168.9 (NCO). EM APCI; m/z [M+H]⁺ Calculado para C₃₃H₃₁F₃N₅O₃: 602.2374; encontrado: 602.2374.

10.2.6.8. **6-(6-(3-(4-Metilpiperazin-1-carbonil)fenil)-4-((4-(trifluorometil)bencil)amino)piridin-2-il)-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona 13h.** De 100 mg (0.23 mmol) de **9h**, 91.3 mg (0.28 mmol) de **12**, 14 mg (0.012 mmol) de tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0) y 79.3 mg (0.58 mmol) de carbonato de potasio se obtuvieron 77.5 mg (0.129 mmol, 56 %) de **13h** como un sólido blanco. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆); δ: 2.19 (3H, s, NCH₃), 2.27 (2H, s, NCH_{2a}), 2.38 (2H, s, 5'-NCH_{2b}), 3.38 (2H, s, C(O)NCH_{2a}), 3.65 (2H, s, C(O)NCH_{2b}), 4.61 (2H, s, -OCH₂-), 4.63 (2H, d, $J = 6.0$

Hz, -CH₂-), 6.97 (1H, s, 3'-H), 7.02 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, 8-H), 7.06 (1H, s, 5'-H), 7.22 (1H, t, *J* = 6.0 Hz, -NH), 7.46 (1H, d, *J* = 7.2, Hz, 4''-H), 7.53 (1H, t, *J* = 7.7 Hz, 5'''-H), 7.55 (1H, dd, *J* = 8.5, 2.1 Hz, 7-H), 7.62 (2H, d, *J* = 8.1 Hz, 2''-H y 6''-H), 7.68 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, 5-H), 7.72 (2H, d, *J* = 8.1 Hz, 3''-H y 5'''-H), 8.01 (1H, s, 2'''-H), 8.10 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, 6'''-H), 10.84 (1H, s, 4-H); RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆); δ: 41.5 (C(O)NCH_{2b}), 44.9 (-CH₂-), 45.6 (-NCH₃), 47.2 (C(O)NCH_{2a}), 53.9 (NCH_{2b}), 54.7 (NCH_{2a}), 66.9 (-OCH₂-), 102.4 (3'-C y 5'-C), 114.2 (5-C), 116.1 (8-C), 121.2 (7-C), 124.9 (2'''-C), 125.4 (3''-C y 5''-C), 126.8 (q, *J* = 205.2 Hz, -CF₃), 127.4 (4a-C, 4'''-C y 6'''-C), 127.9 (2''-C, 4''-C y 6''-C), 128.7 (5'''-C), 134.0 (6-C), 136.2 (3'''-C), 139.8 (1'''-C), 143.9 (8a-C), 144.5 (1''-C), 155.1 (6'-C), 155.4 (2'-C), 155.5 (4'-C), 164.8 (3-C), 169.0 (NCO). EM APCI; *m/z* [M+H]⁺ Calculado para C₃₃H₃₁F₃N₅O₃: 602.2374; encontrado: 602.2373.

10.2.6.9. **6-(4-((3-Clorobencil)amino)-6-(3-(4-metilpiperazin-1-carbonil)fenil)piridin-2-il)-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona 13i**. De 100 mg (0.25 mmol) de **9i**, 99.0 mg (0.30 mmol) de **12**, 15 mg (0.013 mmol) de tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0) y 86.9 mg (0.63 mmol) de carbonato de potasio se obtuvieron 71.0 mg (0.125 mmol, 50 %) de **13i** como agujas blancas. Pf. 166.2 – 168.5 °C. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆); δ: 2.20 (3H, s, NCH₃), 2.28 (2H, s, NCH_{2a}), 2.38 (2H, s, 5'-NCH_{2b}), 3.36 (2H, s, C(O)NCH_{2a}), 3.65 (2H, s, C(O)NCH_{2b}), 4.54 (2H, d, *J* = 6.1 Hz, -CH₂-), 4.61 (2H, s, -OCH₂-), 6.96 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, 3'-H), 7.02 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, 8-H), 7.05 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, 5'-H), 7.29 – 7.33 (2H, m, 6''-H y -NH), 7.38 – 7.46 (2H, m, 4''-H y 5''-H), 7.41 (1H, dd, *J* = 7.7, 1.2 Hz, 4'''-H), 7.47 (1H, s, 2''-H), 7.54 (1H, t, *J* = 7.7 Hz, 5'''-H), 7.55 (1H, dd, *J* = 8.1, 1.2 Hz, 7-H), 7.69 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, 5-H), 8.01 (1H, t, *J* = 1.2 Hz, 2'''-H), 8.10 (1H, dt, *J* = 8.1, 1.2 Hz, 6'''-H), 10.84 (1H, s, 4-H); RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆); δ: 41.5 (C(O)NCH_{2b}), 44.7 (-CH₂-), 45.7 (-NCH₃), 47.2 (C(O)NCH_{2a}), 54.3 (NCH_{2b}), 54.7 (NCH_{2a}), 66.8 (-OCH₂-), 102.5 (3'-C y 5'-C), 114.2 (5-C), 116.1 (8-C), 121.2 (7-C), 124.8 (2'''-C), 126.0 (4''-C), 126.9 (4'''-C), 127.1 (2''-C y 6''-C), 127.4 (4a-C y 6'''-C), 128.7 (5'''-C), 130.4 (5''-C), 133.2 (3''-C), 134.1 (6-C), 136.2 (3'''-C), 139.7 (1'''-C), 142.1 (1''-C), 143.9 (8a-C), 155.1 (6'-C), 155.3 (2'-C), 155.4 (4'-C), 164.8 (3-C), 168.9 (NCO). EM APCI; *m/z* [M+H]⁺ Calculado para C₃₂H₃₁ClN₅O₃: 568.2110; encontrado: 568.2064.

10.2.6.10. **6-(4-((4-Clorobencil)amino)-6-(3-(4-metilpiperazin-1-carbonil)fenil)piridin-2-il)-2H-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4H)-ona 13j**. De 100 mg (0.25 mmol) de **9j**, 99.0 mg (0.30 mmol) de **12**, 15 mg (0.013 mmol) de tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0) y 86.9 mg (0.63 mmol) de carbonato de potasio se obtuvieron 65.3 mg (0.115 mmol, 46 %) de **13j** como agujas blancas. Pf. 173.8 – 175.2 °C. RMN ¹H (600 MHz, DMSO-_d6); δ: 2.20 (3H, s, NCH₃), 2.28 (2H, s, NCH_{2a}), 2.39 (2H, s, 5'-NCH_{2b}), 3.36 (2H, s, C(O)NCH_{2a}), 3.66 (2H, s, C(O)NCH_{2b}), 4.51 (2H, d, *J* = 6.1 Hz, -CH₂-), 4.61 (2H, s, -OCH₂-), 6.95 (1H, s, 3'-H), 7.02 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, 8-H), 7.04 (1H, s, 5'-H), 7.32 (1H, t, *J* = 6.1 Hz, -NH), 7.41 (2H, d, *J* = 8.8 Hz, 2''-H y 6''-H), 7.41 (1H, m, 4'''-H), 7.43 (2H, d, *J* = 8.8 Hz, 3''-H y 5''-H), 7.54 (1H, t, *J* = 7.7 Hz, 5'''-H), 7.55 (1H, dd, *J* = 8.4, 2.0 Hz, 7-H), 7.68 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, 5-H), 8.01 (1H, s, 2'''-H), 8.10 (1H, d, *J* = 7.9 Hz, 6'''-H), 10.84 (1H, s, 4-H); RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-_d6); δ: 41.9 (C(O)NCH_{2b}), 45.1 (-CH₂-), 46.1 (-NCH₃), 47.7 (C(O)NCH_{2a}), 54.8 (NCH_{2b}), 55.2 (NCH_{2a}), 67.3 (-OCH₂-), 103.0 (3'-C y 5'-C), 114.6 (5-C), 116.6 (8-C), 121.7 (7-C), 125.3 (2'''-C), 127.6 (4a-C), 127.8 (4''-C), 127.9 (6'''-C), 128.4 (3''-C y 5''-C), 129.2 (5'''-C), 129.6 (2''-C y 6''-C), 131.9 (4''-C), 134.6 (6-C), 136.7 (3'''-C), 139.0 (1''-C), 140.3 (1'''-C), 144.4 (8a-C), 155.5 (6'-C), 155.8 (2'-C), 156.0 (4'-C), 165.2 (3-C), 169.4 (NCO). EM APCI; *m/z* [M+H]⁺ Calculado para C₃₂H₃₁ClN₅O₃: 568.2110; encontrado: 568.2005.

10.3. Evaluación biológica de las series 8a-j y 13a-j

10.3.1. Ensayo de inhibición de AKT

Los compuestos **8a-j** y **13a-j** se evaluaron como inhibidores de los 3 isotipos de la proteína cinasa B. Este ensayo se realizó empleando el kit comercial Z-Lyte biochemical assay. El ensayo consta de tres pasos; el primero consiste en mezclar los diferentes componentes del kit como se muestra en la Tabla 16.

Tabla 16. Reactivos, controles y su respectiva distribución en el ensayo inhibición de AKT

Paso 1. Reacción de AKT

Reactivos	Ensayo	Controles		
	AKT + compuesto	100% de inhibición	0% de inhibición	100% de fosforilación
<i>2X 8 y 13 (10%DMSO)</i>	2.5 µL			
<i>10% DMSO</i>		2.5 µL	2.5 µL	2.5 µL
<i>Mezcla Cinasa/péptido</i>	5 µL	5 µL	5 µL	
<i>Solución de fosfo-péptido</i>				5 µL
<i>Búfer de cinasa</i>		2.5 µL		2.5 µL
<i>2X solución de ATP</i>	2.5 µL		2.5 µL	

El péptido incluido en el ensayo contiene dos fluorocromos los cuales por su cercanía funcionan como un par FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia). Una vez mezclados todos los componentes en los diferentes pozos, se incubaron por una hora.

Transcurrido ese tiempo se procedió con el segundo paso, el cual consistió en la adición de 5 µL de una solución que contiene una enzima proteolítica, esta enzima rompe los péptidos no fosforilados interrumpiendo el par FRET. La mezcla resultante se incubó por una hora nuevamente.

En el último paso se midió la fluorescencia a 460 nm, la cual corresponde al fluorocromo donador (cumarina) y a 530 nm para el fluorocromo aceptor (fluoresceína). Finalmente, se calcula el radio de emisión, el porcentaje de fosforilación y de inhibición usando las siguientes fórmulas:

$$\text{Radio de emisión} = \frac{\text{emisión de cumarina (460 nm)}}{\text{emisión de fluoresceína (530 nm)}}$$

$$\% \text{ de fosforilación} = \left\{ 1 - \frac{(\text{Radio de emisión} \times F_{100\%}) - C_{100\%}}{(C_{0\%} - C_{100\%}) + [\text{Radio de emisión} \times (F_{100\%} - F_{0\%})]} \right\} \times 100$$

$$\% \text{ de inhibición} = \left\{ 1 - \frac{\% \text{ de fosforilación}_{\text{MUESTRA}}}{\% \text{ de fosforilación}_{\text{control (0\% de inhibición)}}} \right\} \times 100$$

$C_{100\%}$ = Promedio de la señal de emisión de la cumarina en el control de 100% de fosforilación.

$C_{0\%}$ = Promedio de la señal de emisión de la cumarina en el control de 0% de fosforilación.

$F_{100\%}$ = Promedio de la señal de emisión de la fluoresceína en el control de 100% de fosforilación.

$F_{0\%}$ = Promedio de la señal de emisión de la fluoresceína en el control de 0% de fosforilación.

10.3.2. Ensayo de actividad citotóxica

Los compuestos **8a-j** y **13a-j** se evaluaron sobre las líneas cancerosas PC-3, MCF-7, DU-145, MDA-MB-231, HCT-15 y sobre células de riñón de mono COS-7 como control. Las líneas celulares se hicieron crecer en el medio de cultivo RPMI-1640 adicionado con suero fetal bovino (10%) y una mezcla de antibióticos-antimitótico. Los ensayos en las líneas celulares se hicieron por triplicado en un volumen de 100 µl/pozo y se incubaron por 24 h a 37 °C con una atmósfera de 5% de CO₂ para favorecer la estabilidad de éstos antes de adicionar los compuestos a probar. Para un screening primario los compuestos se solubilizaron en sulfóxido de dimetilo (DMSO) a la concentración de 20 µM. Se tomó una

alícuota de la sustancia de prueba (20 μ M) y se diluyó en el medio de cultivo suplementado para alcanzar la concentración de 0.05 o 0.025 mM y nuevamente la microplaca fue incubada por 48 horas bajo las condiciones antes mencionadas.

Al finalizar el periodo de incubación las células se fijaron *in situ* añadiendo 50 μ l de una solución de ácido tricloroacético frío al 50% y se incubaron a 4 °C por 60 minutos. Se desechó el sobrenadante, las placas se lavaron 5 veces con agua y se dejaron secar a la temperatura ambiente. El teñido de las células fijadas al sustrato del pozo se efectuó añadiendo 100 μ l de una solución al 0.4% de sulforrodamina B (SRB) y se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente. La SRB no unida se removió con lavados con ácido acético al 1% y se dejó secar a temperatura ambiente. A las placas teñidas se les agregó 100 μ l de un buffer de tris y se agitaron por 10 minutos para favorecer la disolución del complejo; en seguida se midió la densidad óptica (DO) en un lector de microplacas a una longitud de onda de 515 nm.

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

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

11. REFERENCIAS

1. Matthews, D., Gerritsen, M. (2010). Targeting protein kinase for cancer therapy. John Wiley and Sons, Inc.
2. Organización mundial de la salud. WHO – Cancer. (2018) Revisado el 2 de octubre de 2018. Fuente: <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
3. Instituto Nacional de Estadística y geografía INEGI Comunicado de prensa No. 61/18 “estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer”. Revisado el 1 de noviembre de 2018. Fuente: http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018_Nal.pdf
4. Jones, R., & Thompson, C. (2018). Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes & development*, 23, 537-548.
5. Cahill, D., Kinzler, K., Vogelstein, B., & Lengauer, C. (1999). Genetic instability and Darwinian selection in tumors. *Trends in Cell biology*, 9(12), M57-M60.
6. Gerlinger, M., McGranahan, N., Dewhurst, S., Burrell, R., Tomlinson, I., & Swanton, C. (2014). Cancer: Evolution Within a Lifetime. *The Annual Review of Genetics*, 48, 215-236.
7. Urruticoechea, A., Alemany, R., Balart, J., Villanueva, A., Viñals, F., & Capellá, G. (2010). Recent advances in cancer therapy: an overview. *Current Pharmaceutical Design*, 16, 3-10.
8. Heymach, J., Krilov, L., Alberg, A., Baxter, N., Chang, S.M., Corcoran, R., ... Burstein, H. (2018). Clinical cancer advances 2018: Annual report on progress against cancer from the American society of clinical oncology. *Journal of Clinical Oncology*, 36(10), 1020-1044.
9. Kerbel, R.S., & Kamen, B.A. (2004). The antiangiogenic basis of metronomic chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 4(6), 423-436.

10. Hanahan, D., Berges, G., & Bergsland, E. (2000). Less is more, regularly: metronomic dosing of cytotoxic drugs can target tumor angiogenesis in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 105(8), 1045-1047.
11. Huck, B., & Mochalkin, I. (2017). Recent progress towards clinically relevant ATP-competitive Akt inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 27(13), 2838-2848.
12. Testa, J.R., & Tsichlis, P.N. (2005). AKT signaling in normal and malignant cells. *Oncogene*, 24(50), 7391-7393.
13. Manning, B., & Cantley, L. (2007). AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell*, 129(7), 1262-1274.
14. Cell Signaling Technology. (2016). Revisado el 15 de marzo de 2019. Fuente: https://media.cellsignal.com/www/pdfs/science/pathways/Akt_PKB.pdf.
15. Testa, J.R., & Tsichlis, P.N. (2005). AKT signaling in normal and malignant cells. *Oncogene*, 24(50), 7391-7393.
16. Zhu, L., Derijard, B., Chakrabandhu, K., Wang, B.S., Chen, H.Z., & Hueber, A.O. (2014). Synergism of PI3K/Akt inhibition and Fas activation on colon cancer cell death. *Cancer Letters*, 354(2), 355-364.
17. Ma, L., Fu, Q., Xu, B., Zhou, H., Gao, J., Shao, X., ... Lyu, J. (2018). Breast cancer-associated mitochondrial DNA haplogroup promotes neoplastic growth via ROS-mediated AKT activation. *International Journal of Cancer*, 142(9), 1786-1796.
18. Liu, L., & Dong, X. (2014). Complex impacts of PI3K/AKT inhibitors to androgen receptor gene expression in prostate cancer cells, *PLoS ONE*, 9(10), e108780.
19. Liby, T., Spyropoulos, P., Linder, H.B., Eldridge, J., Beeson, C., Hsu, T., & Musie-Helmericks, R.C. (2012). Akt3 controls vascular endothelial growth factor secretion and angiogenesis in ovarian cancer cells. *International Journal of Cancer*, 130, 532-543.

20. Liu, J., Chen, X., Ward, T., Pegram, M., & Shen, K. (2016). Combined niclosamide with cisplatin inhibits epithelial-mesenchymal transition and tumor growth in cisplatin-resistant triple-negative breast cancer. *Tumor Biology*, 37(7) 9825-9835.
21. Robey, R. B., & Hay, N. (2009). Is Akt the “Warburg kinase”? -Akt-energy metabolism interactions and oncogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 19, 25-31.
22. Romano, G. (2013). The Role of the Dysfunctional Akt-Related Pathway in Cancer: Establishment and Maintenance of a Malignant Cell Phenotype, Resistance to Therapy, and Future Strategies for Drug Development. *Scientifica*, 13, 1-12.
23. Millis, S.Z., Ikeda, S., Reddy, S., Gatalica, Z., & Kurzrock, R. (2016). Landscape of Phosphatidylinositol-3-Kinase Pathway Alterations Across 19 784 Diverse Solid Tumors. *JAMA Oncology*, 2(12) 1565-1573.
24. Nitulescu, G., Margina, D., Juzenas, P., Peng, Q., Olaru, O., Saloustros, E., ... Tsatsakis, A. (2016). Akt inhibitors in cancer treatment: The long journey from drug discovery to clinical use (Review). *International Journal of Oncology*, 48, 869-885.
25. Medina-Franco, J., Giulianotti, M.A., Yu, Y., Shen, L., Yao, L., & Singh, N. (2009). Discovery of a novel protein kinase B inhibitor by structure-based virtual screening. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19(16), 4634-4638.
26. Hernández-Campos, A., Velázquez-Martínez, I., Castillo, R., López-Vallejo, F., Jia, P., Yu, Y., ... Medina-Franco, J. (2010). Docking of Protein Kinase B Inhibitors: Implications in the Structure-Based Optimization of a Novel Scaffold. *Chemical Biology & Drug Design*, 76(3), 269-276.
27. Rungta, D. (2014). A Review of Computational Tools for Designing Drugs Used by General Practitioners. *Journal of General Practice*, 2(6), 1-3.
28. Leelananda, S., & Lindert, S. (2016). Computational methods in drug discovery. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 12, 2694-2718.
29. Hoque, I., Chatterjee, A., Bhattacharya, S., & Biswas, R. (2017). An approach of Computer-Aided Drug Design (CAAD) Tools for *In Silico* Pharmaceutical Drug Design and Development. *International Journal of Advances Research in Biological Sciences*, 4(2), 60-71.

30. Bello, M., Martínez-Archundia, M., & Correa-Basurto, J. (2013). Automated Docking for novel drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 8(7), 821-834.
31. Kitchen, D., Decornez, H., Furr, J., & Bajorath, J. (2004). Docking and scoring virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3, 935-945.
32. Kumar, A., & Zhang, K. (2018). A cross docking pipeline for improving pose prediction and virtual screening performance. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 32, 163-173.
33. McInnes, C. (2007) Virtual screening strategies in drug discovery. *Current Opinion in Chemical Biology*, 11, 494-502.
34. Klebe, G. (2006). Virtual ligand screening: strategies, perspectives and limitations. *Drug Discovery Today*, 11(13/14), 580-594.
35. Adcock, S., & McCammon, A. Molecular Dynamics: Survey of Methods for Simulating the Activity of Proteins. *Chemical Reviews*, 106(5), 1589-1615.
36. Kürti, L., & Czakó, B. (2005). Strategic applications of named reactions in organic Synthesis. Elsevier. USA.
37. Hou, T., Wang, J., Li, Y., & Wang, W. (2011). Assessing the performance of the MM/PBSA and MM/GBSA methods: I. The accuracy of binding free energy calculations based on molecular dynamics simulations. *Journal of Chemical Information and Modelling*, 51(1), 69-82.
38. Homeyer, N., & Gohlke, H. (2012). Free Energy Calculations by the Molecular Mechanics Poisson–Boltzmann Surface Area Method. *Molecular Informatics*, 31(2), 114-122.
39. Sanabria-Chanaga, E., Betancourt-Conde, I., Hernández-Campos, A, Téllez-Valencia, A., & Castillo R. (2019). *In silico* hit optimization towards AKT inhibition: fragment-based approach, molecular docking and molecular dynamics study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 37 (16), 4301-4311.

40. Jorge, S., Palace-Berl, F., Masunari, A., Cechinel, C., Ishii, M., Mesquita, K., & Costa, T. Novel benzofuroxan derivatives against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* strains: Design using Topliss' decision tree, synthesis and biological assay. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, *19*, 5031-5038.
41. Romeiro, L., da Silva, M., da Silva, L., Castro, H., Miranda, A., Silva, C., ... Fraga, C. (2011). Discovery of LASSBio-772, a 13-benzodioxole *N*-phenylpiperazine derivative with potent alpha 1A/D-Adrenergic receptor blocking properties. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *46*(7), 3000-3012.
42. Kolarovic, A., Käslin, A., & Wennemers, H. (2014). Stereoselective Synthesis of Indolines via Organocatalytic Thioester Enolate Addition Reaction. *Organic Letters*, *16*(16), 4236-4239.
43. Yadav, R., Nagaoka, M., Kashihara, M., Zhong, R., Miyazaki, T., Sakaki, S., & Nakao, Y. The Suzuki-Miyaura Coupling of Nitroarenes. *Journal of the American Chemical Society*, *139*, 9423-9426.
44. Tiseo, M., Bartolotti, M., Gelsomino, F., & Bordi, P. (2010). Emerging role of gefitinib in the treatment of non-small-cell lung cancer (NSCLC). *Drug Design, Development and Therapy*, *4*, 81-98.
45. Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2017). SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, *7*, 42717.
46. Barthe, L., Woodley, J., & Houin, G. (1999). Gastrointestinal absorption of drugs: methods and studies. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, *13* (2), 154-168.
47. Lin, J. & Yamazaki, M. (2003). Role of P-Glycoprotein in Pharmacokinetics. *Clinical Pharmacokinetics*, *42* (1), 59-98.
48. Sanner, M.F. (1999). Python: a programming language for software integration and development. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, *17*(1), 57-61.
49. Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M.F., Belew, R.K., Goodsell, D.S., & Olson, A.J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with

- selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16), 2785-2791.
50. Schrödinger release 2015-4: Glide version 6.9. Schrödinger, LLC, NY, (2015).
51. Addie, M., Ballard, P., Buttar, D., Crafter, C., Currie, G., Davies, B.R., ... Ruston, L. (2013). 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. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(5), 2059-2073.
52. Yang, J., Cron, P., Good, V.M., Thompson, V., Hemmings, B.A., & Barford, D. (2002). Crystal structure of an activated Akt/Protein Kinase B ternary complex with GSK3-peptide and AMP-PNP. *Nature Structural & Molecular Biology*, 9, 940-944.
53. The UniProt Consortium (2016). UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D158-D169.
54. Schrödinger release 2015-4: Prime version 4.2. Schrödinger, LLC, NY (2015)
55. Šali, A., & Blundell, T.L. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *Journal of Molecular Biology*, 234(3), 779-815.
56. Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmitd, T., ... Schwede, T. (2014). SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Research*, 42(W1), W252-W258.
57. Benkert, P., Biasini, M., & Schwede, T. (2011) Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics*, 27(3), 343-350.
58. Schrödinger release 2015-4: Protein Preparation Wizard; Epik version 3.4. Schrödinger, LLC, NY, (2015).
59. Chen, V.B., Arendall 3rd, W.B., Headd, J.J., Keedy, D.A., Immormino, R.M., Kapral, G.J., ... Richardson, D.C. (2010). MolProbity: all-atom structure validation

for macromolecular crystallography. *Acta Crystallographic. Section D, Biological crystallographic*, D66(1), 12-21.

60. Wavefunction Inc. Spartan version 10. Irvine, CA 92612 USA. (2010).
61. Sousa Da Silva, A., & Vranken, W. F. (2012). ACPYPE - AnteChamber PYthon Parser interfacE. *BMC Research Notes*, 5, 367.
62. Wang, J., Wang, W., Kollman, P.A., & Case, D.A. (2006). Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, 25(2), 247-260.
63. Wang J, et al (2004). Development and testing of a general amber force field. *Journal of Computational Chemistry*, 25(9), 1157-1174.
64. Fogh, R., Boucher, W., Vranken, W.F., Pajon, A., Stevens, T.J., Bhat, T.N., ... Laue, E.D. (2005). A framework for scientific data modeling and automated software development. *Bioinformatics*, 21(8), 1678-1684.
65. Vranken, W.F., Boucher, W., Stevens, T.J., Fogh, R.H., Pajon, A., Llinas, M., ... Laue E.D. (2005). The CCPN data model for NMR spectroscopy: Development of a software pipeline. *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics*, 59(4), 687-696.
66. Rieping, W., Habeck, M., Bardiaux, B., Bernard, A., Malliavin, T.E., & Nilges, M. (2007). ARIA2: Automated NOE assignment and data integration in NMR structure calculation. *Bioinformatics*, 23(3), 381-382.
67. Nilges, M., Bernard, A., Bardiaux, B., Malliavin, T., Habeck, M., & Rieping, W. (2008). Accurate NMR Structures Through Minimization of an Extended Hybrid Energy. *Structure*, 16(9), 1305-1312.
68. Hornak, V., Abel, R., Okur, A., Strockbine, B., Roitberg, A., & Simmerling, C. (2006). Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics*, 65(3), 712-725.

69. Best, R., & Hummer, G. (2009). Optimized Molecular Dynamics Force Fields Applied to the Helix–Coil Transition of Polypeptides. *The Journal of Physical Chemistry*, *113*(26), 9004-9015.
70. Lindorff-Larsen, K., Piana, S., Palmo, K., Maragakis, P., Klepeis, J.L., Dror, R.O., & Shaw, D.E. (2010). Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics*, *78*(8), 1950-1958.
71. Jorgensen, W.L., Chandrasekhar, J., & Madura, J.D. (1983). Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of Chemical Physics*, *79*(2), 926-935.
72. Berendsen, H., Postma, J., Van-Gunsteren, W., DiNola, A., & Haak, J. (1984). Molecular dynamics with coupling to an external bath. *The Journal of Chemical Physics*, *81*(8), 3684-3690.
73. Parrinello, M., & Rahman, A. (1980). Crystal Structure and Pair Potentials: A Molecular-Dynamics Study. *Physical Review Letters*, *45*(14), 1196-1199.
74. Kumari, R., Kumar, R., Open Source Drug Discovery Consortium, & Lynn, A. (2014). *g_mmpbsa*—A GROMACS Tool for High-Throughput MM-PBSA Calculations. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *54*(7), 1951-1962.

12. ANEXOS

VALIDACIÓN DEL MODELO POR HOMOLOGÍA, POSIBLES BLANCOS MOLECULARES DE LAS MOLÉCULAS SINTETIZADAS Y ESPECTROS DE MASAS, RMN ¹H Y RMN ¹³C OBTENIDOS EN LA PRESENTE INVESTIGACIÓN

12.1. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas AKT1 y AKT3.

Q9Y243	AKT3_HUMAN	1	MSDVTIVKEGwVQKRGEYIKNWRPRYFLLKTDGSGFIGYKEKPDVDL-PYPLNNFSVAKC
P31749	AKT1_HUMAN	1	MSDV IVKEGw+ KRGEYIK WRPRYFLLK DG+FIGYKE+PQDVD PLNNFSVA+C
Q9Y243	AKT3_HUMAN	60	QLMKTERPKPNTFIIIRCLQWTTVIERTFHVDTPEEREWEIAIQAVADRLQRQEERMMNC
P31749	AKT1_HUMAN	61	QLMKTERP+PNTFIIIRCLQWTTVIERTFHV+TPEEREWT AIQ VAD L++QEEE M+
Q9Y243	AKT3_HUMAN	120	SPTSQIDNIGEEEMDASTTHHK-RKTMNDFDYLLKLGKTFGKVIIVREKASGKYYAMKI
P31749	AKT1_HUMAN	121	S DN G EEM+ S K R TMN+F+YLKLLGKTFGKVIIV+EKA+G+YYAMKI
Q9Y243	AKT3_HUMAN	179	LKKEVIIAKDEVAHTLTERVLKNRHPFLTSLKYSFQTKDRLCFVMEYVNGGELFFHLS
P31749	AKT1_HUMAN	181	LKKEVI+AKDEVAHTL TE+RVL+N+RHPFLT+LKYSFQT DRLCFVMEY NGGELFFHLS
Q9Y243	AKT3_HUMAN	239	RERVFSEDRTRFYGAEIVSALDYLSHGK-IVYRDLKLENMLDKDGHKIDTDFGLCKEGI
P31749	AKT1_HUMAN	241	RERVFSEDR RFYGAEIVSALDYLSH K +VYRDLKLENMLDKDGHKIDTDFGLCKEGI
Q9Y243	AKT3_HUMAN	298	TDAATMKTFCGTPEYLAPEVLEDNDYGRAVDWwGLGVVYEMMCGRLPFYNDHEKLFEL
P31749	AKT1_HUMAN	301	D ATMKTFCGTPEYLAPEVLEDNDYGRAVDWwGLGVVYEMMCGRLPFYNDHEKLFEL
Q9Y243	AKT3_HUMAN	358	ILMEDIKFPRTLSSDAKSLLSGLLIKDPNKRLLGGGPDDAKEIMRHSFFSGVNWQDVYDKK
P31749	AKT1_HUMAN	361	ILME+I+FPRTL +AKSLLSGLL KDP +RLGGG +DAKEIM+H FF+G+ WQ VY+KK
Q9Y243	AKT3_HUMAN	418	LVPPFKPQVTSETDTRYFDEEFTAQTITITPPEKYDEGMDCMNERRPHFPQFSYSASG
P31749	AKT1_HUMAN	421	L PPFKPQVTSETDTRYFDEEFTAQ ITITPP++ +D M+C+D+ERRPHFPQFSYSASG

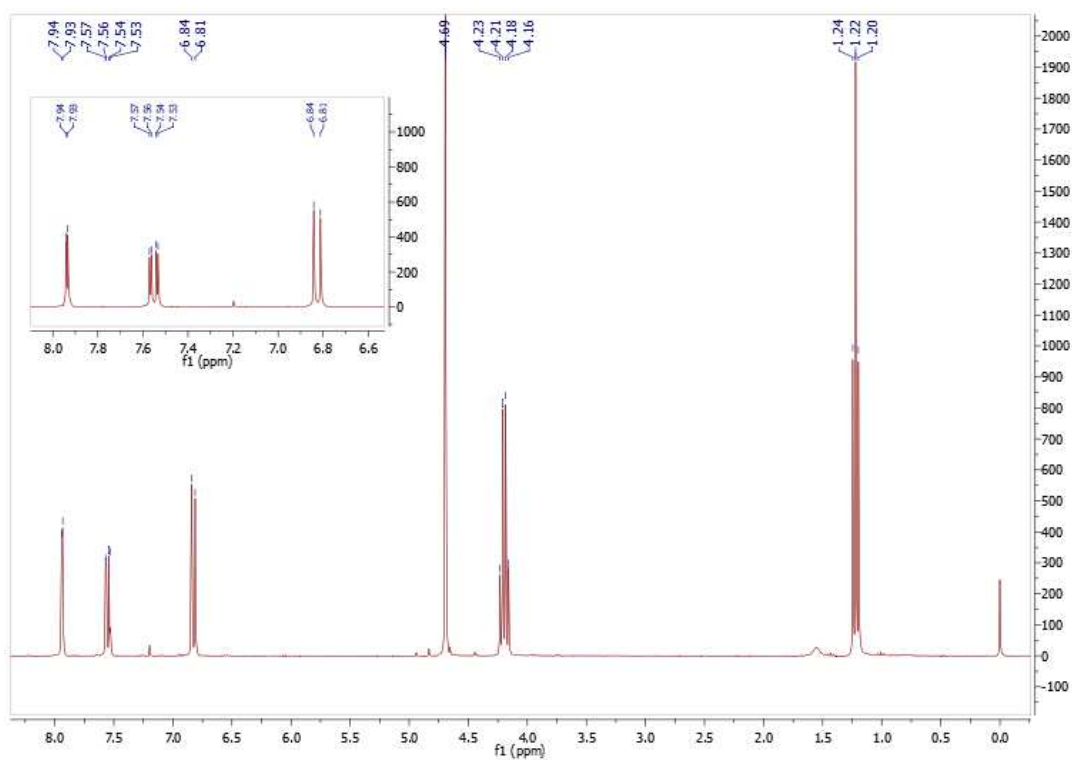
12.132. Lista de posibles blancos moleculares de la serie 8.

Target	Common name	Uniprot ID	ChEMBL ID	Target Class	Probability*	Known actives (3D/2D)
Serine/threonine-protein kinase Aurora-B	AURKB	Q96GD4	CHEMBL2185	Kinase	0.110612204199	107 / 0
Ribosomal protein S6 kinase 1	RPS6KB1	P23443	CHEMBL4501	Kinase	0.110612204199	120 / 0
Bloom syndrome protein	BLM	P54132	CHEMBL1293237	Enzyme	0.110612204199	1 / 0
Werner syndrome ATP-dependent helicase	WRN	Q14191	CHEMBL2146312	Enzyme	0.110612204199	1 / 0
Serine/threonine-protein kinase AKT2	AKT2	P31751	CHEMBL2431	Kinase	0.110612204199	78 / 1
Plasma kallikrein	KLKB1	P03952	CHEMBL2000	Protease	0.110612204199	6 / 0
Coagulation factor XI	F11	P03951	CHEMBL2820	Protease	0.110612204199	22 / 0
5-lipoxygenase activating protein	ALOX5AP	P20292	CHEMBL4550	Other cytosolic protein	0.110612204199	157 / 0
Serotonin 1d (5-HT1d) receptor	HTR1D	P28221	CHEMBL1983	Family A G protein-coupled receptor	0.110612204199	134 / 73
Carbonic anhydrase II	CA2	P00918	CHEMBL205	Lyase	0.110612204199	130 / 0
MAP kinase-activated protein kinase 2	MAPKAPK2	P49137	CHEMBL2208	Kinase	0.110612204199	69 / 0
Anandamide amidohydrolase	FAAH	O00519	CHEMBL2243	Enzyme	0.110612204199	59 / 0
Carbonic anhydrase I	CA1	P00915	CHEMBL261	Lyase	0.110612204199	116 / 0
Carbonic anhydrase XII	CA12	O43570	CHEMBL3242	Lyase	0.110612204199	72 / 0
Carbonic anhydrase IX	CA9	Q16790	CHEMBL3594	Lyase	0.110612204199	94 / 0
Calcitonin gene-related peptide type 1 receptor	CALCRL	Q16602	CHEMBL3798	Family B G protein-coupled receptor	0.110612204199	82 / 0
TNF-alpha	TNF	P01375	CHEMBL1825	Secreted protein	0.110612204199	78 / 0
Phosphatidylcholine:ceramide cholinephosphotransferase 1	SGMS1	Q86VZ5	CHEMBL3611965	Transferase	0.110612204199	1 / 0

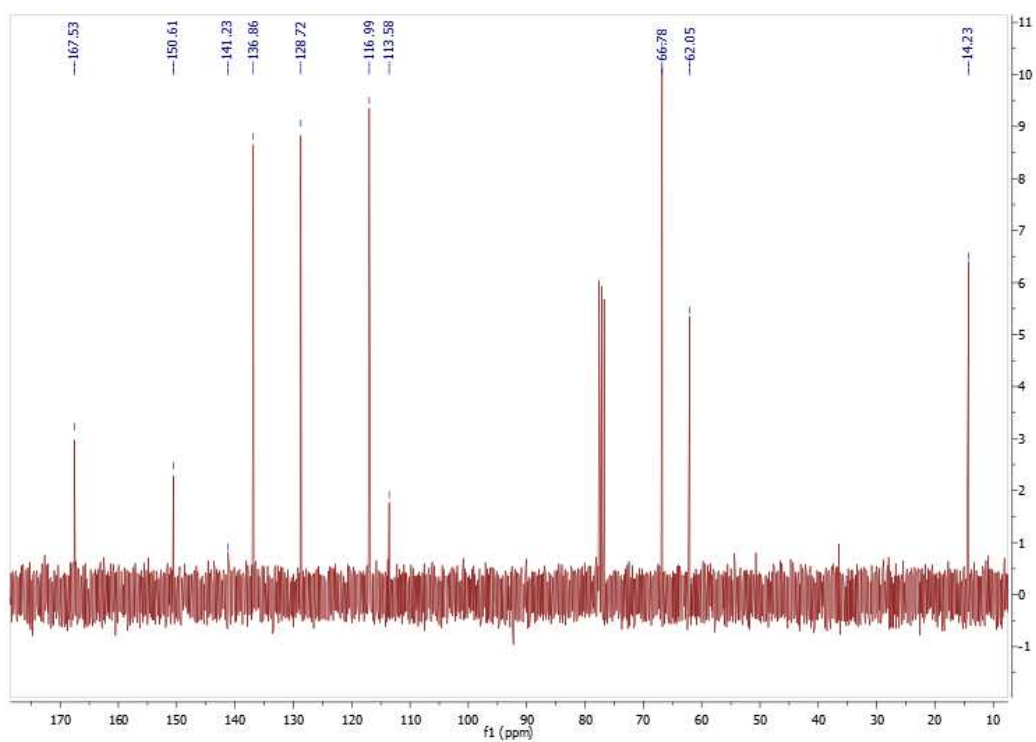
12.133. Lista de posibles blancos moleculares de la serie 13.

Target	Common name	Uniprot ID	ChEMBL ID	Target Class	Probability*	Known actives (3D/2D)
Neurotrophic tyrosine kinase receptor type 2	NTRK2	Q16620	CHEMBL4898	Kinase	0.0956237870388	26 / 0
Calcitonin gene-related peptide type 1 receptor	CALCRL	Q16602	CHEMBL3798	Family B G protein-coupled receptor	0.0956237870388	246 / 0
Protein tyrosine kinase 2 beta	PTK2B	Q14289	CHEMBL5469	Kinase	0.0956237870388	32 / 0
Carnitine O-palmitoyltransferase 1, liver isoform	CPT1A	P50416	CHEMBL1293194	Enzyme	0.0956237870388	99 / 0
Transitional endoplasmic reticulum ATPase	VCP	P55072	CHEMBL1075145	Primary active transporter	0.0956237870388	50 / 0
Receptor protein-tyrosine kinase erbB-2	ERBB2	P04626	CHEMBL1824	Kinase	0.0956237870388	170 / 0
Fibroblast growth factor receptor 1	FGFR1	P11362	CHEMBL3650	Kinase	0.0956237870388	110 / 0
Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase	TGM2	P21980	CHEMBL2730	Enzyme	0.0956237870388	64 / 0
Cathepsin K	CTSK	P43235	CHEMBL268	Protease	0.0956237870388	204 / 0
Cathepsin S	CTSS	P25774	CHEMBL2954	Protease	0.0956237870388	193 / 0
Cathepsin L	CTSL	P07711	CHEMBL3837	Protease	0.0956237870388	148 / 0
Cyclin-dependent kinase 4/cyclin D1	CCND1 CDK4	P24385 P11802	CHEMBL1907601	Kinase	0.0956237870388	70 / 0
Cyclin-dependent kinase 2/cyclin E	CCNE2 CDK2 CCNE1	O96020 P24941 P24864	CHEMBL2094126	Other cytosolic protein	0.0956237870388	68 / 0
Bradykinin B1 receptor	BDKRB1	P46663	CHEMBL4308	Family A G protein-coupled receptor	0.0956237870388	78 / 0
ATP-binding cassette sub-family G member 2	ABCG2	Q9UNQ0	CHEMBL5393	Primary active transporter	0.0956237870388	65 / 0
Serine/threonine-protein kinase PLK1	PLK1	P53350	CHEMBL3024	Kinase	0.0956237870388	61 / 0
UDP-N-acetylglucosamine--peptide N-acetylglucosaminyltransferase 110 kDa subunit	OGT	O15294	CHEMBL5955	Enzyme	0.0956237870388	11 / 0
Matrix metalloproteinase 3	MMP3	P08254	CHEMBL283	Protease	0.0956237870388	226 / 0
Matrix metalloproteinase 9	MMP9	P14780	CHEMBL321	Protease	0.0956237870388	303 / 0
Matrix metalloproteinase 1	MMP1	P03956	CHEMBL332	Protease	0.0956237870388	308 / 0
Tyrosine-protein kinase BRK	PTK6	Q13882	CHEMBL4601	Kinase	0.0956237870388	23 / 0

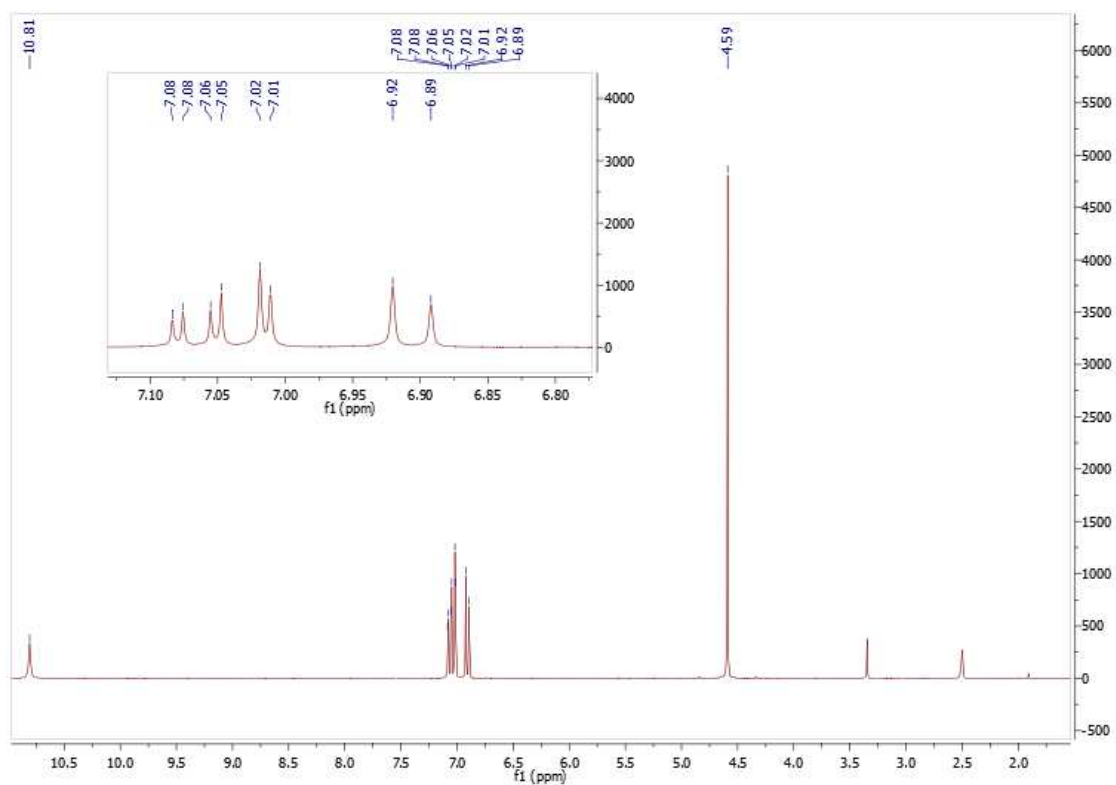
12.134. Espectro de RMN ^1H del compuesto 2.



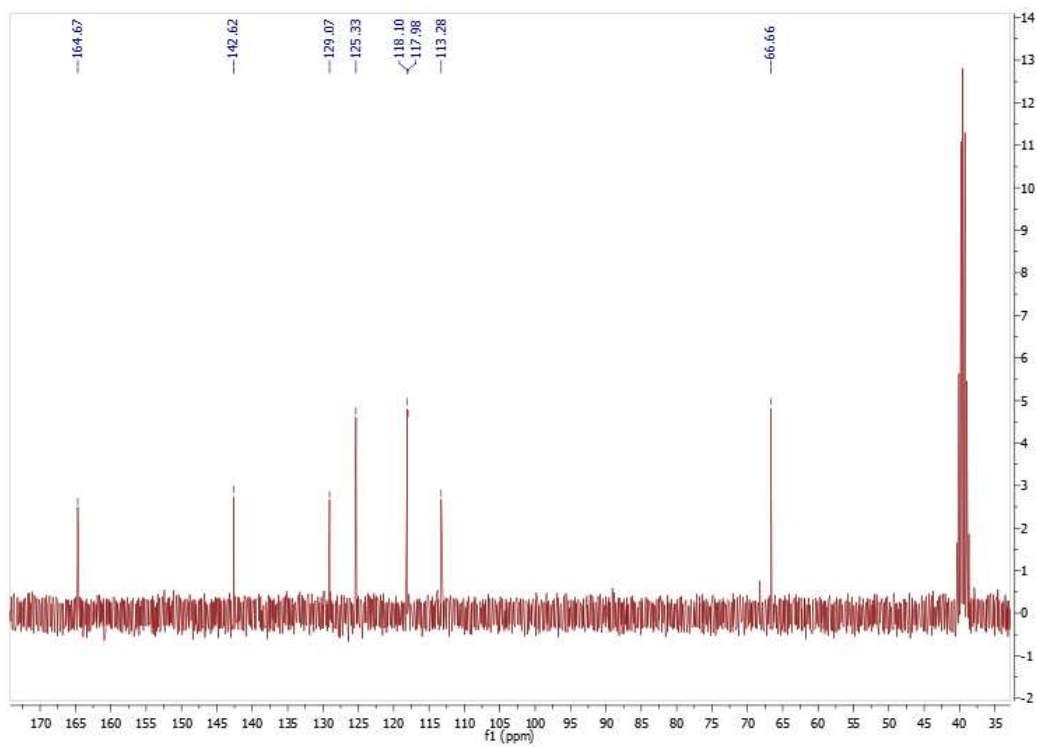
12.135. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto 2.



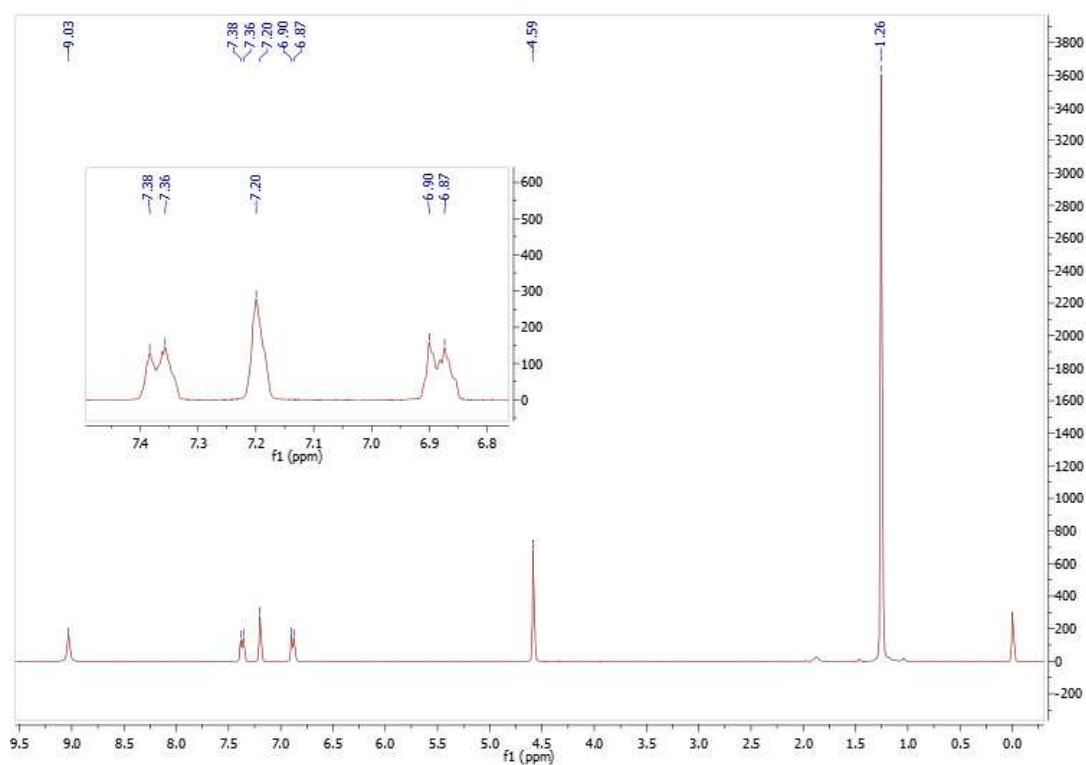
12.136. Espectro de RMN ^1H del compuesto 3.



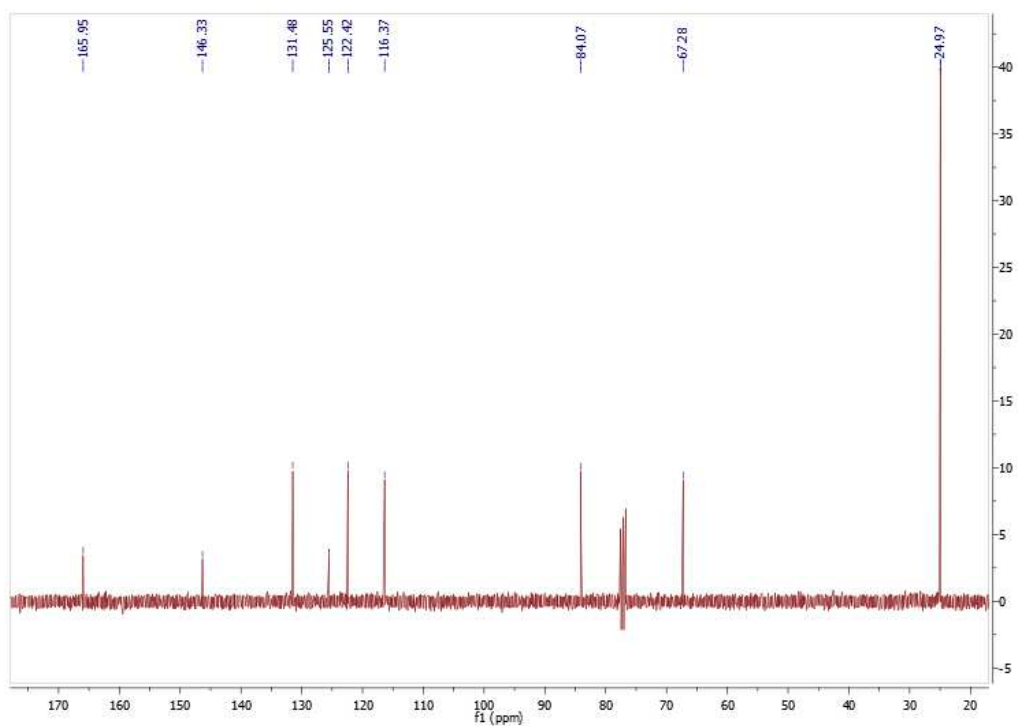
12.137. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto 3.



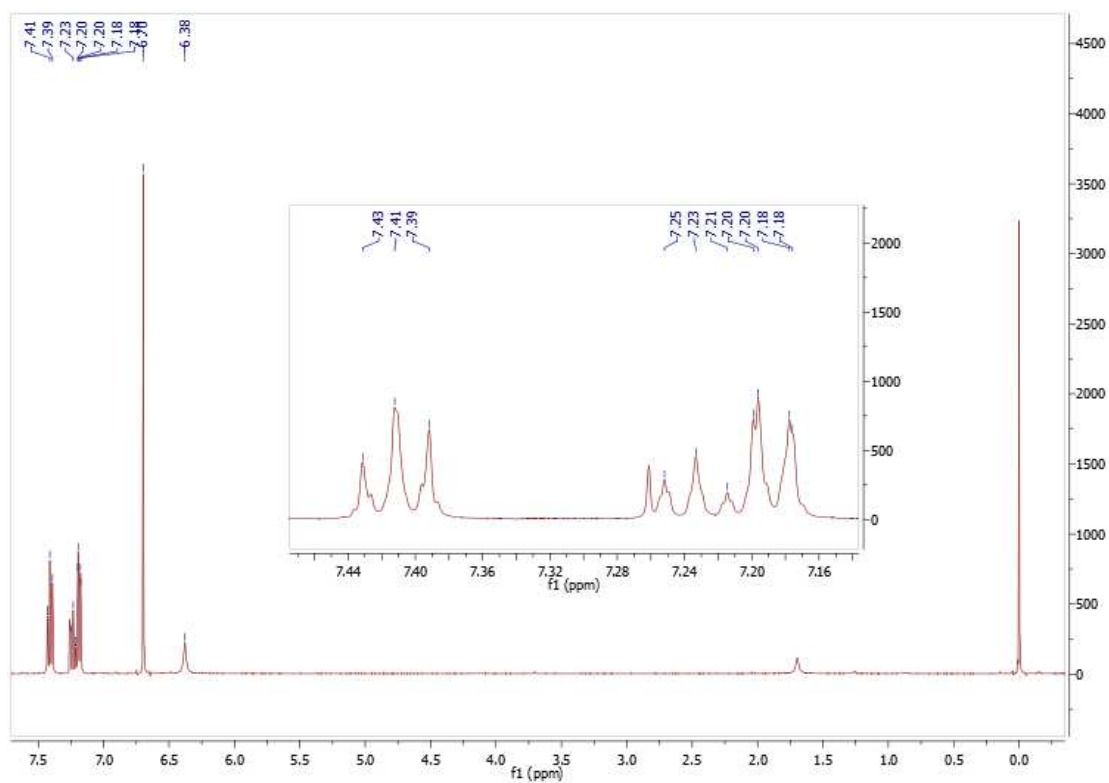
12.138. Espectro de RMN ^1H del compuesto 4.



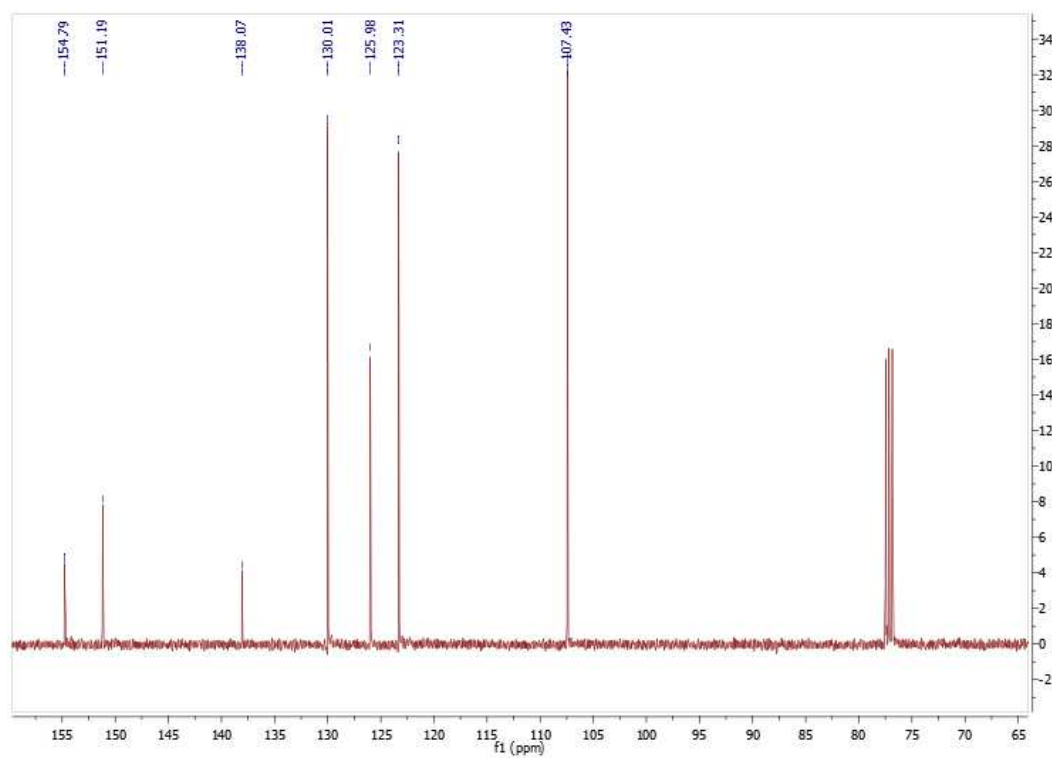
12.139. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto 4.



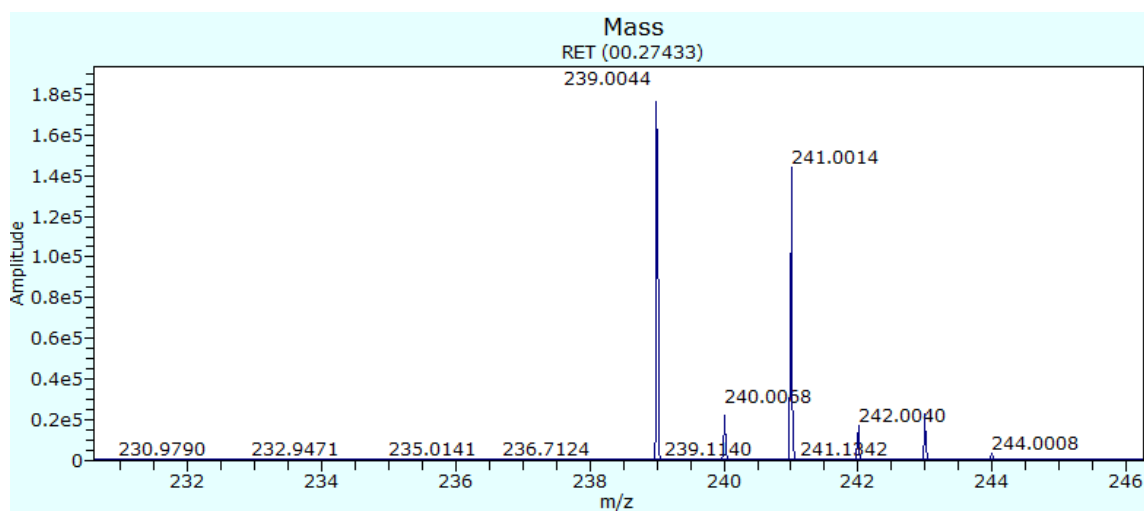
12.140. Espectro de RMN ^1H del compuesto **6a**.



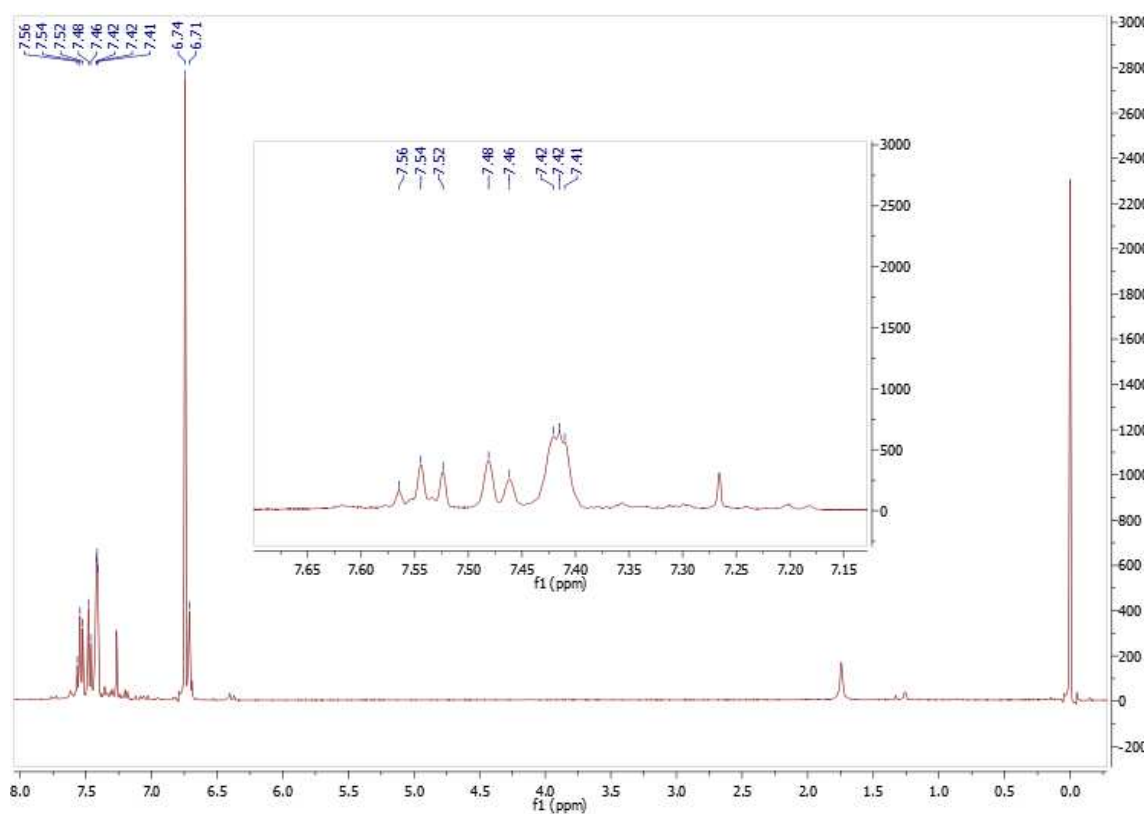
12.141. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **6a**.



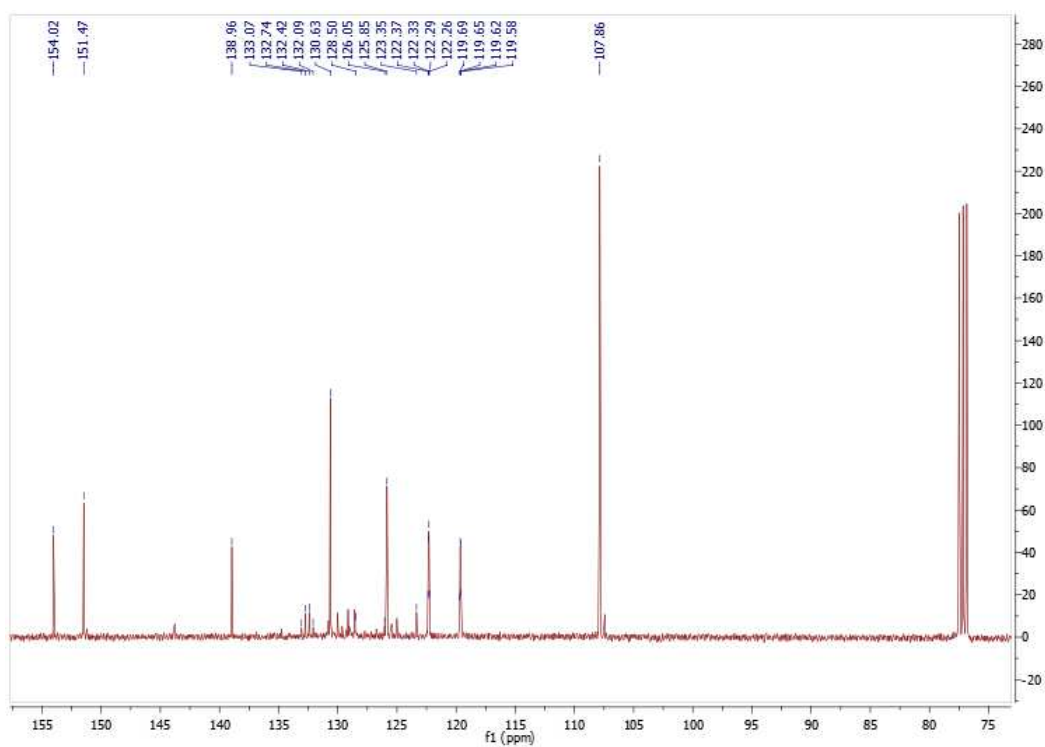
12.142. Espectro de EM-APCI del compuesto **6a**.



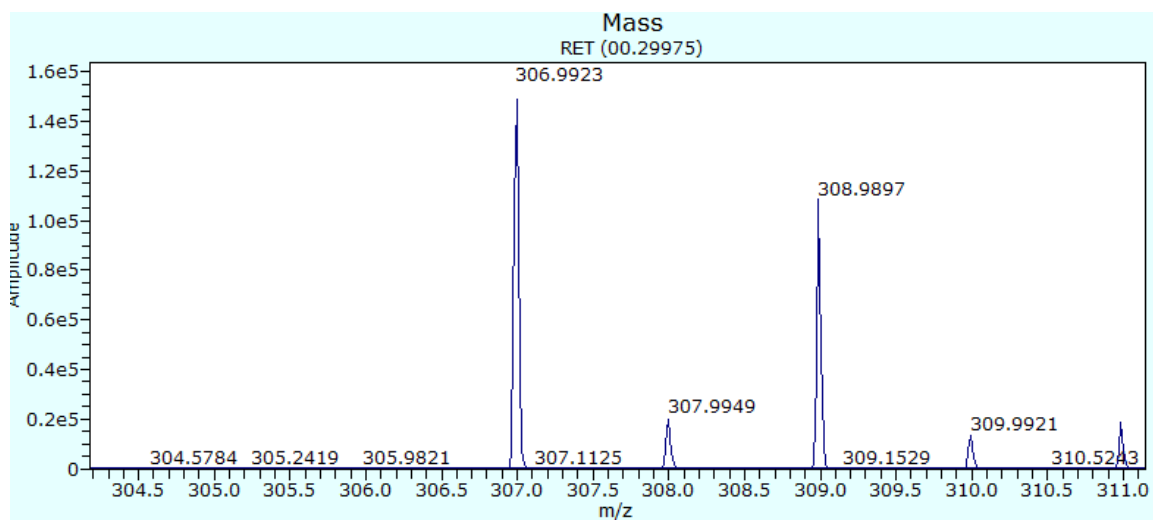
12.143. Espectro de RMN ^1H del compuesto **6b**.



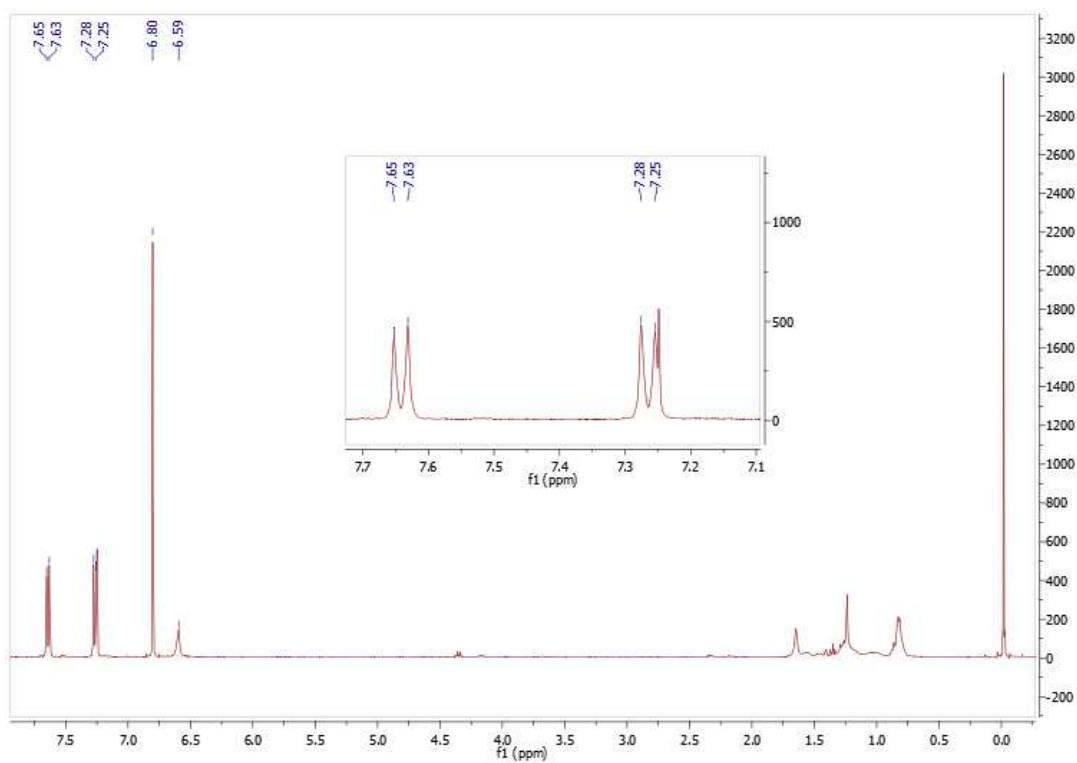
12.144. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **6b**.



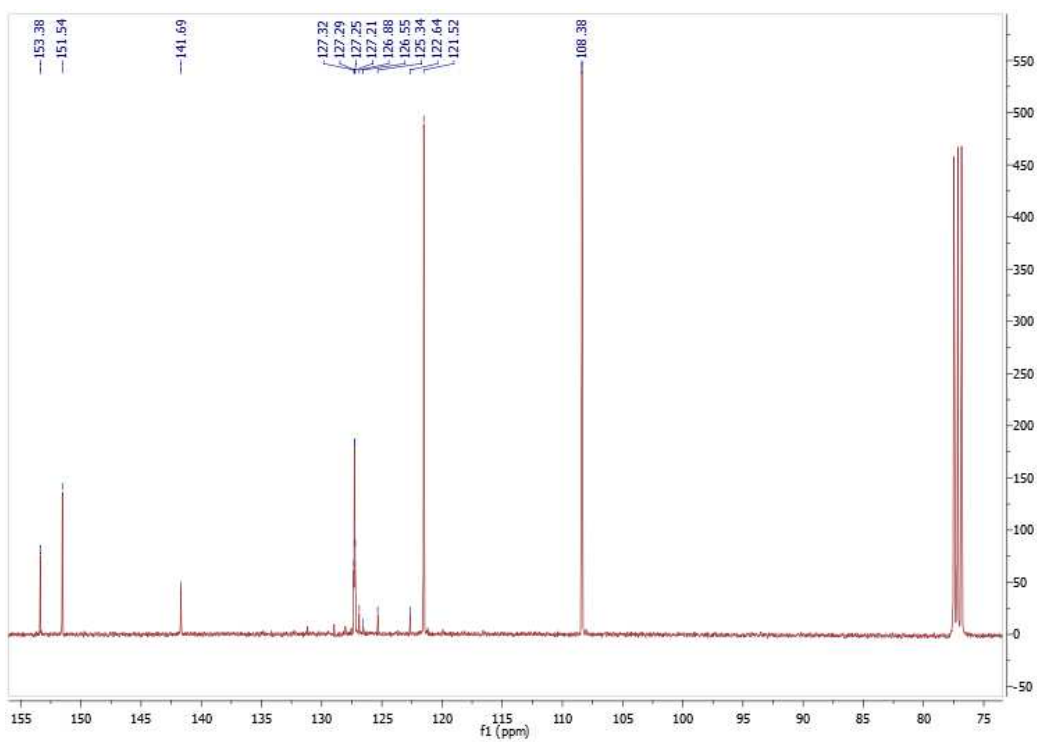
12.145. Espectro EM-APCI del compuesto **6b**.



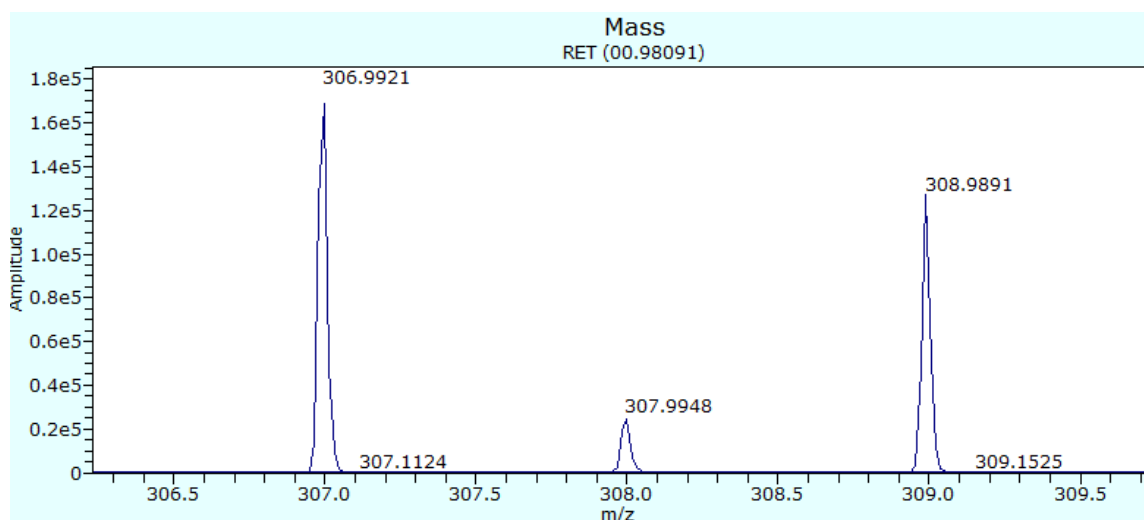
12.146. Espectro de RMN ^1H del compuesto **6c**.



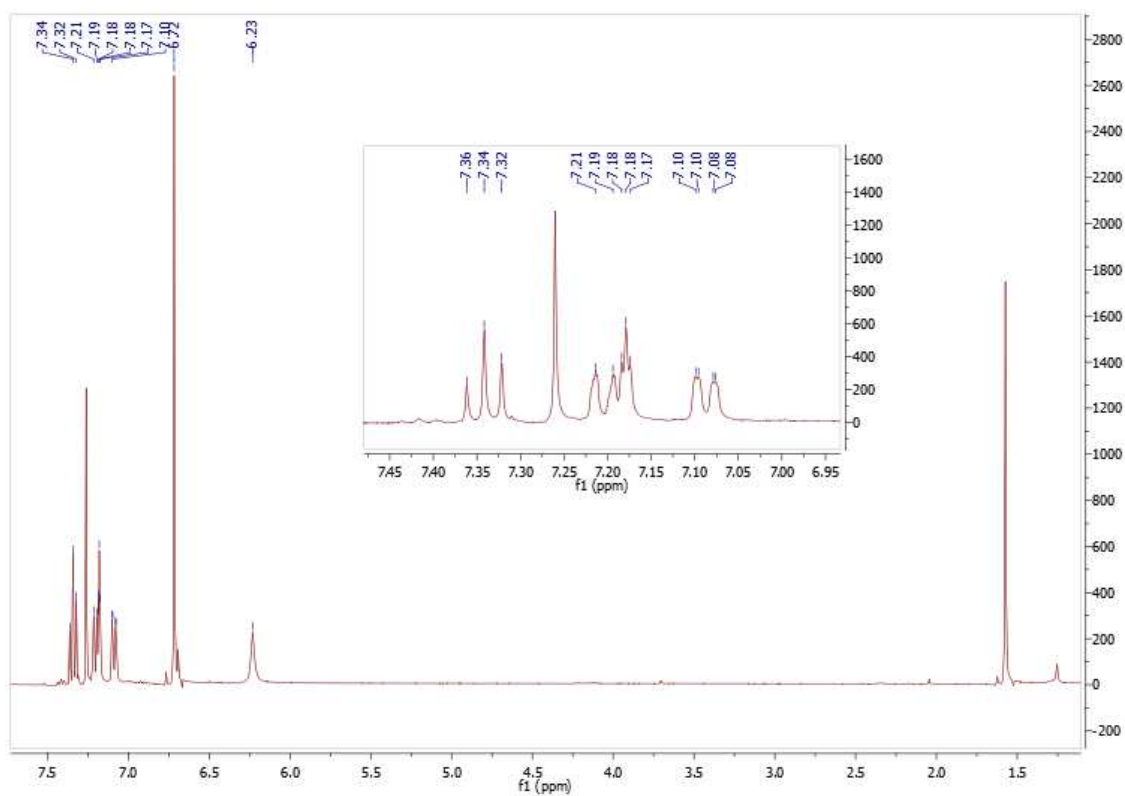
12.147. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **6c**.



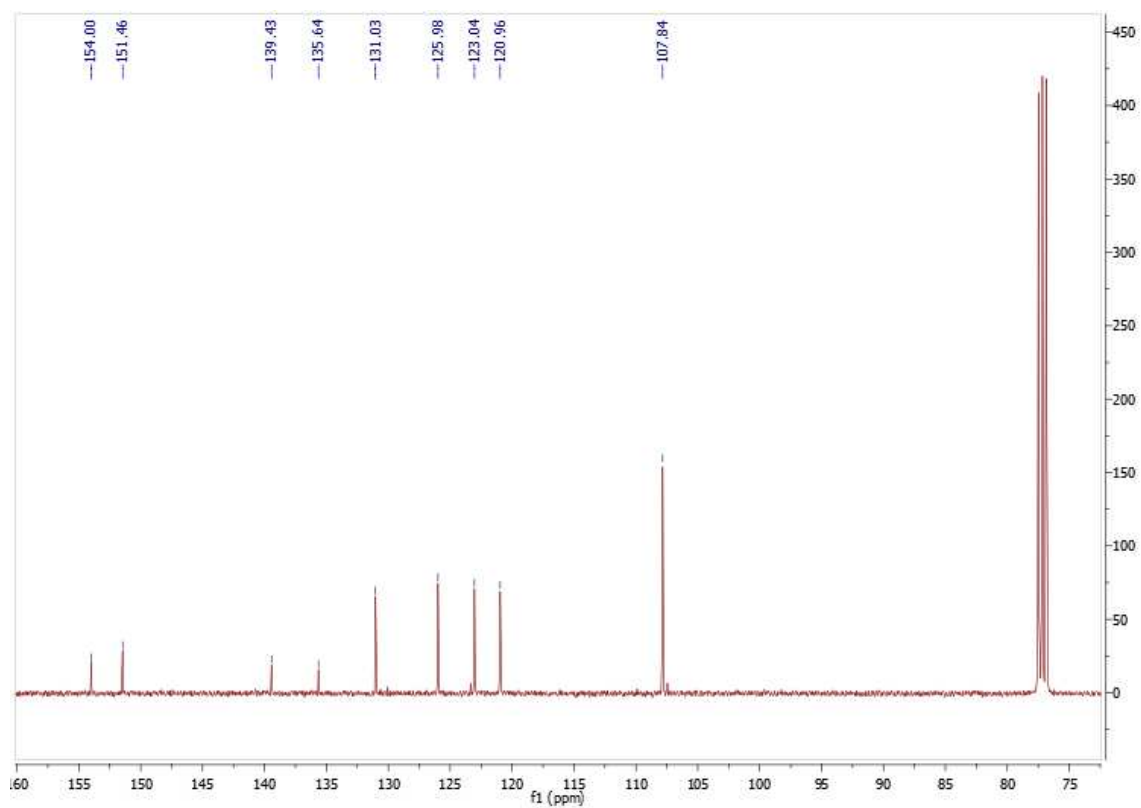
12.148. Espectro EM-APCI del compuesto **6c**.



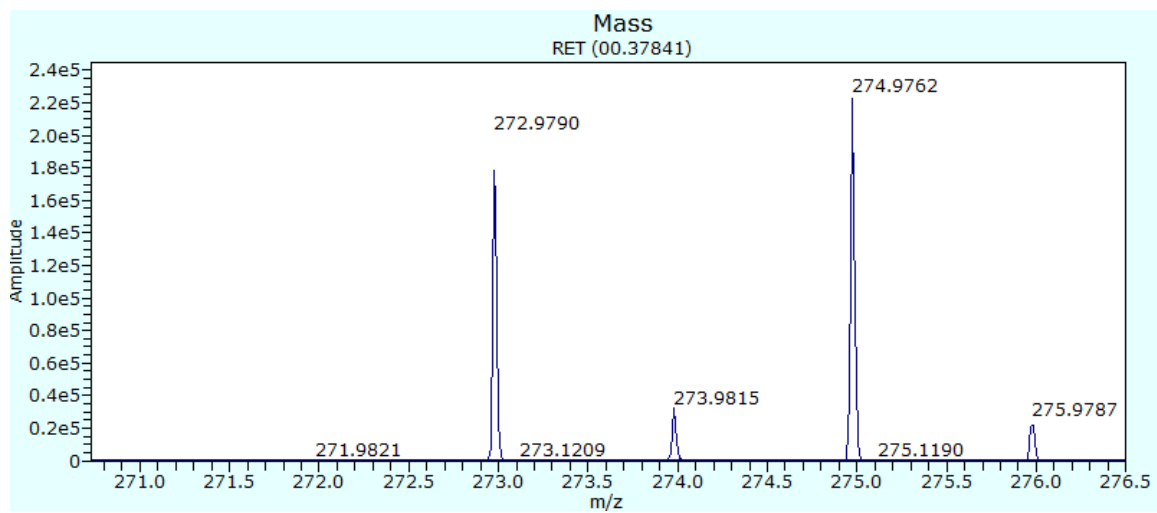
12.149. Espectro de RMN ^1H del compuesto **6d**.



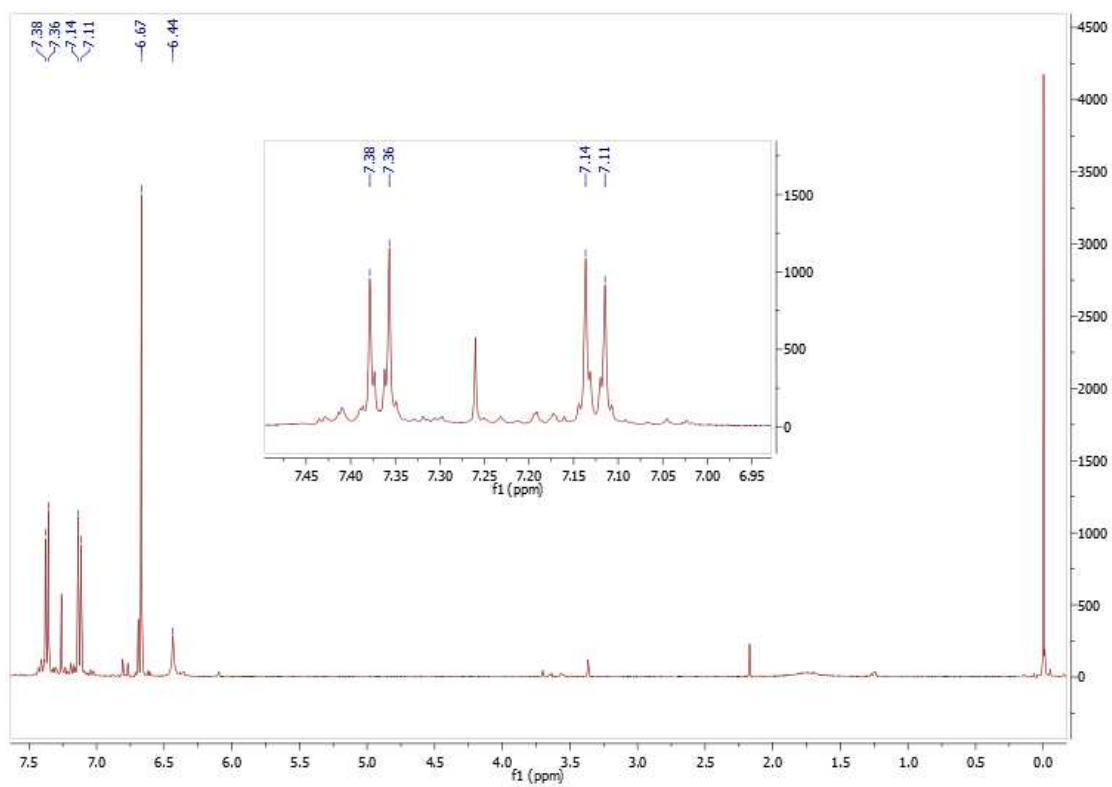
12.150. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **6d**.



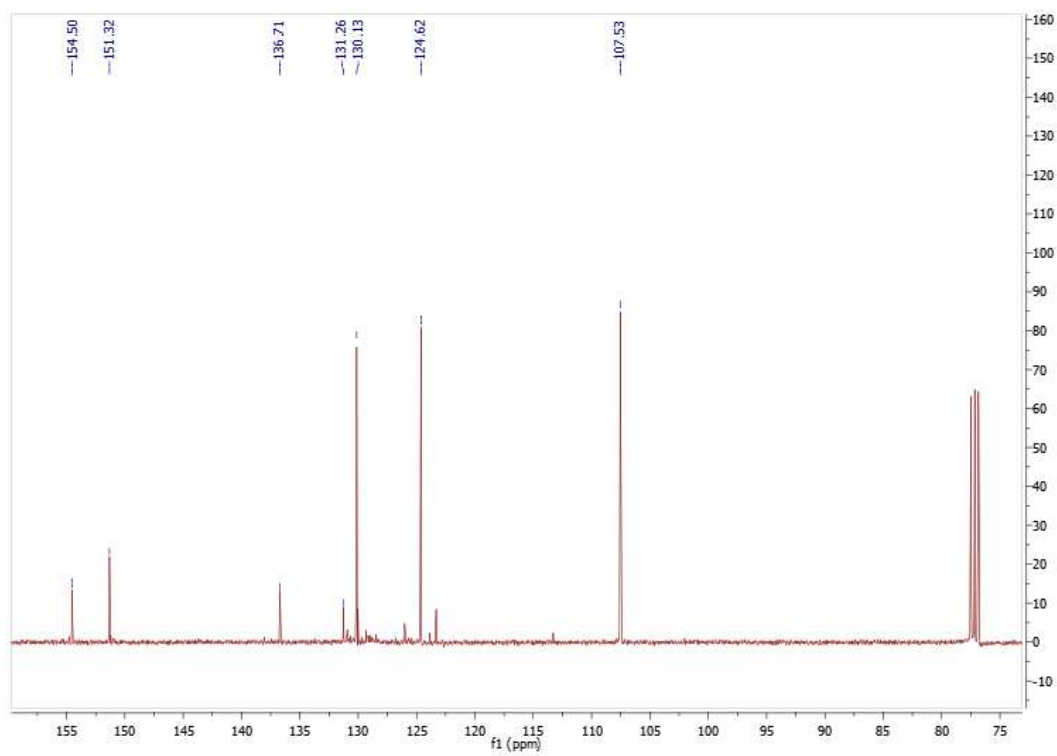
12.151. Espectro EM-APCI del compuesto **6d**.



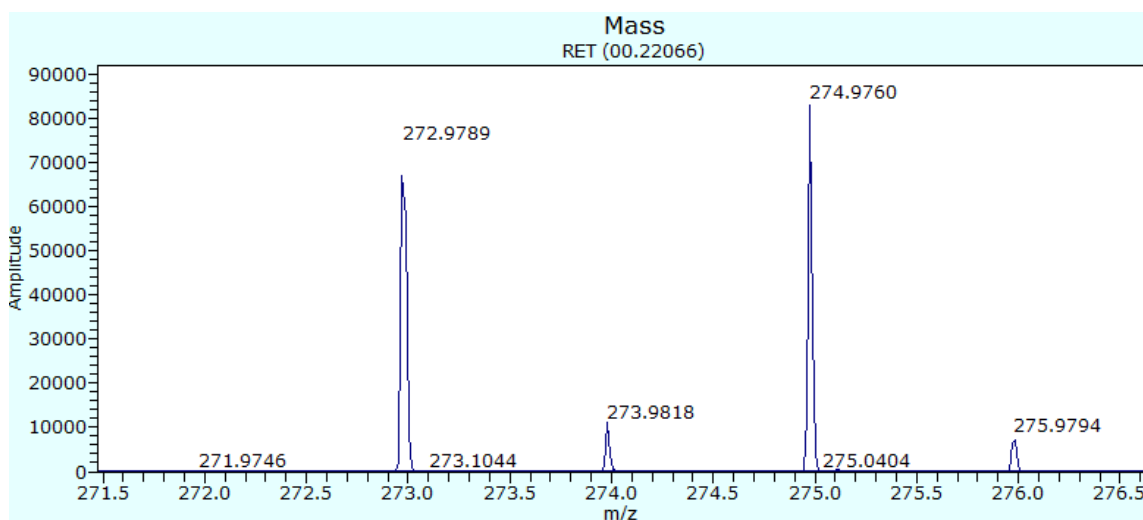
12.152. Espectro de RMN ^1H del compuesto **6e**.



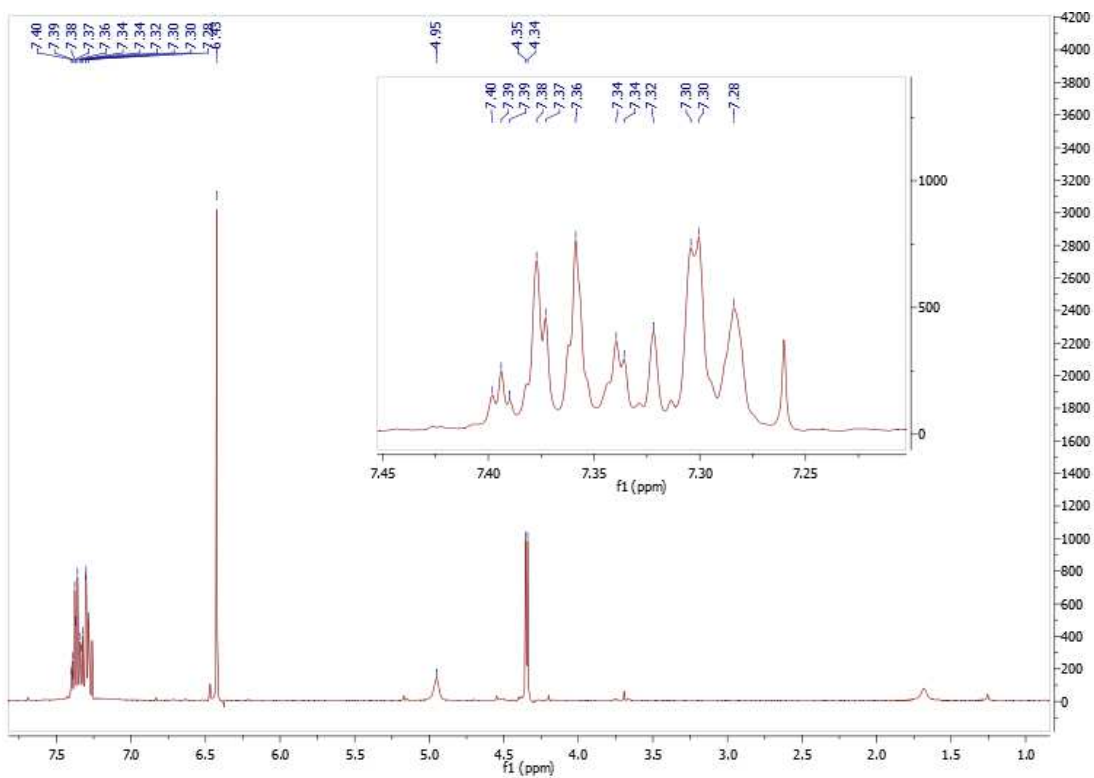
12.153. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **6e**.



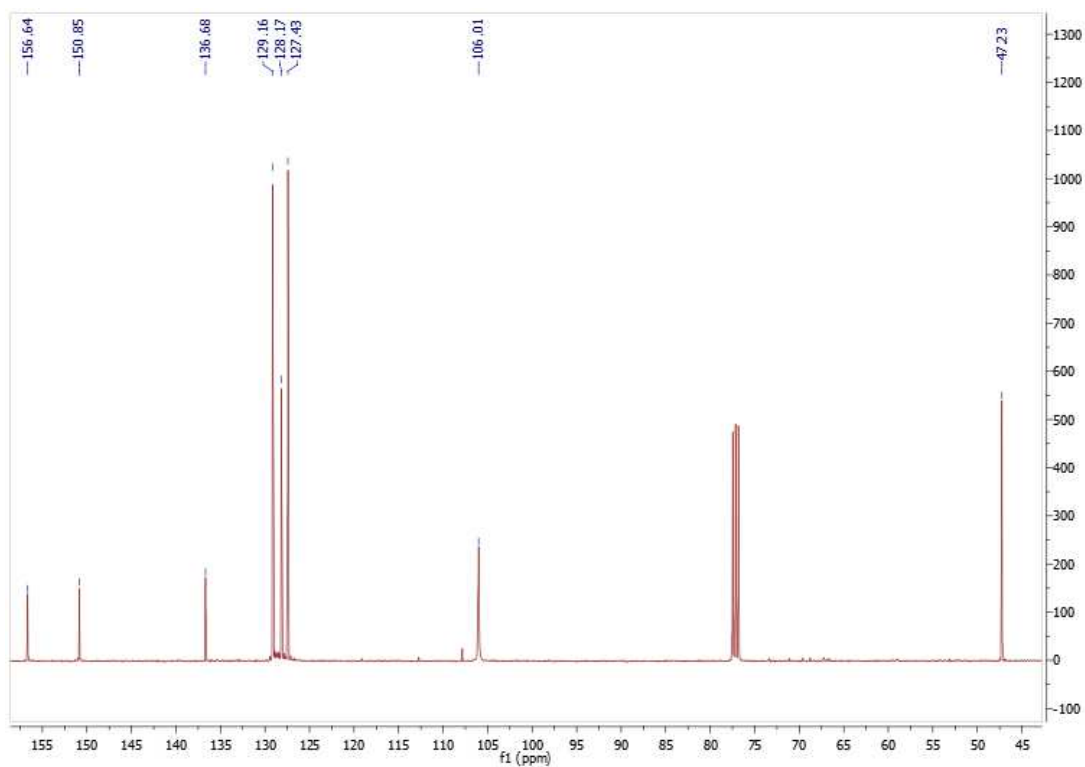
12.154. Espectro de EM-APCI del compuesto 6e.



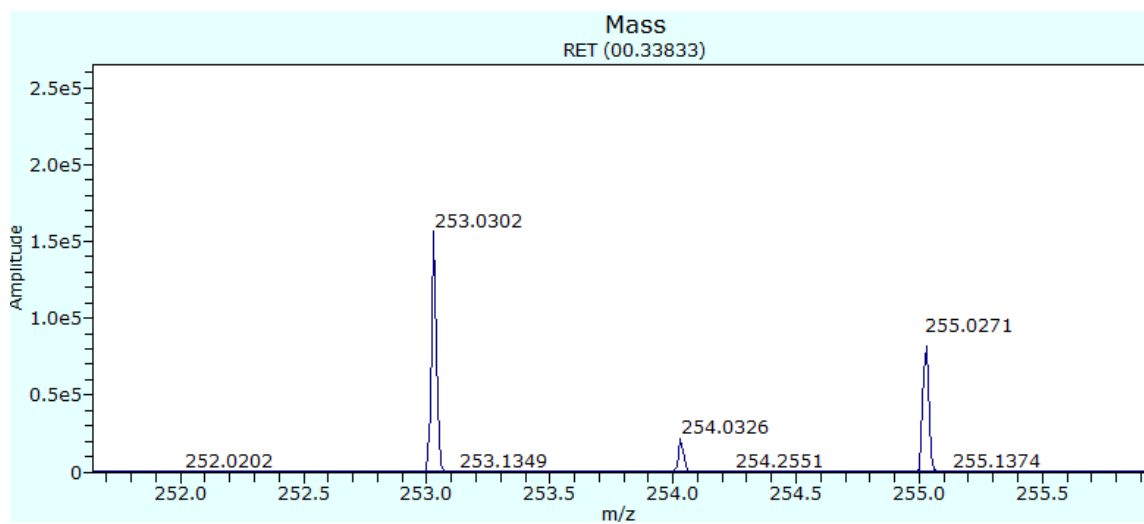
12.155. Espectro de RMN ^1H del compuesto 7a.



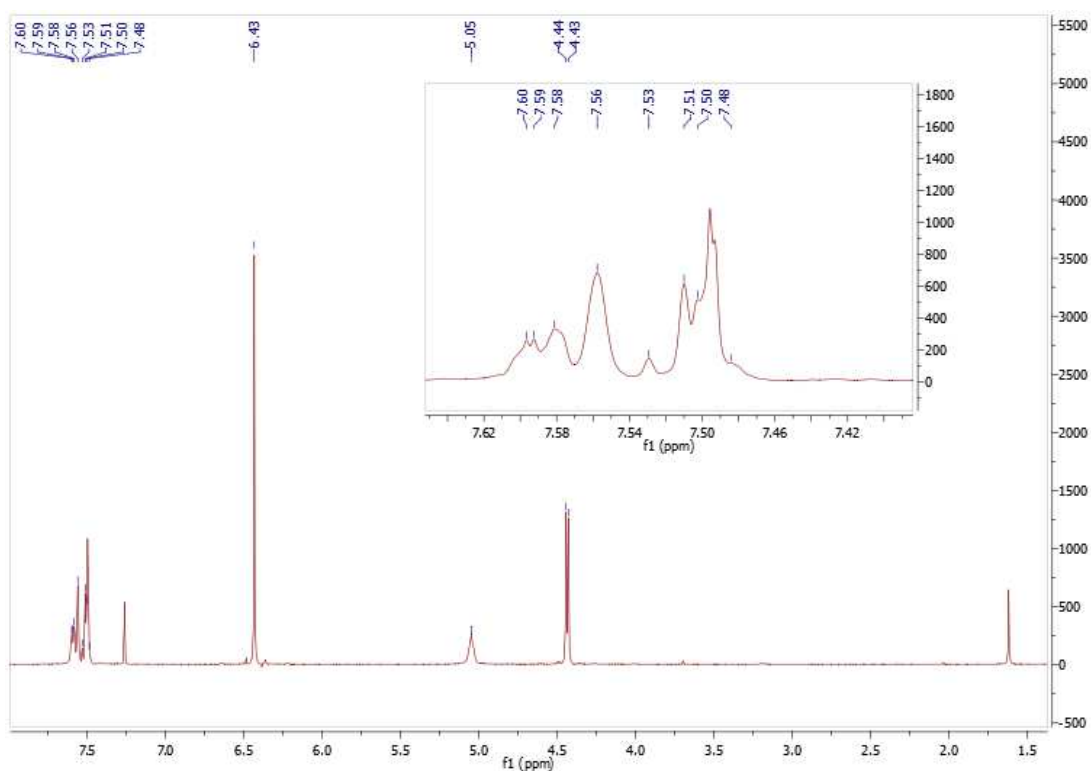
12.156. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **7a**.



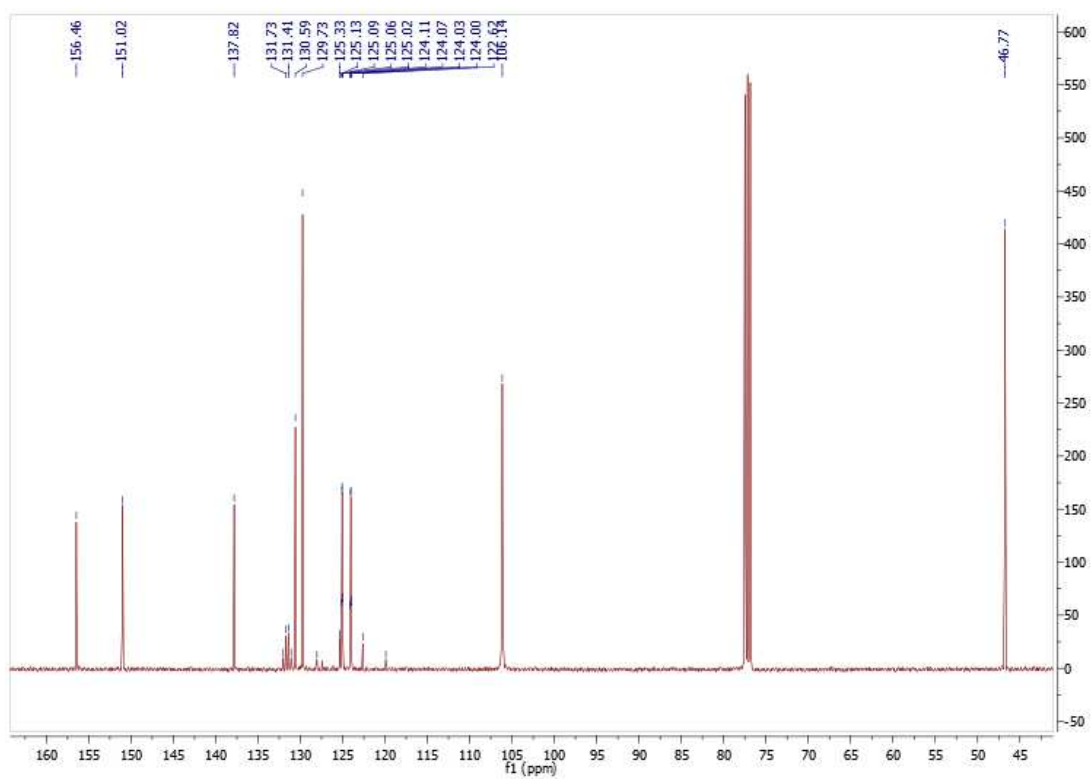
12.157. Espectro de EM-APCI del compuesto **7a**.



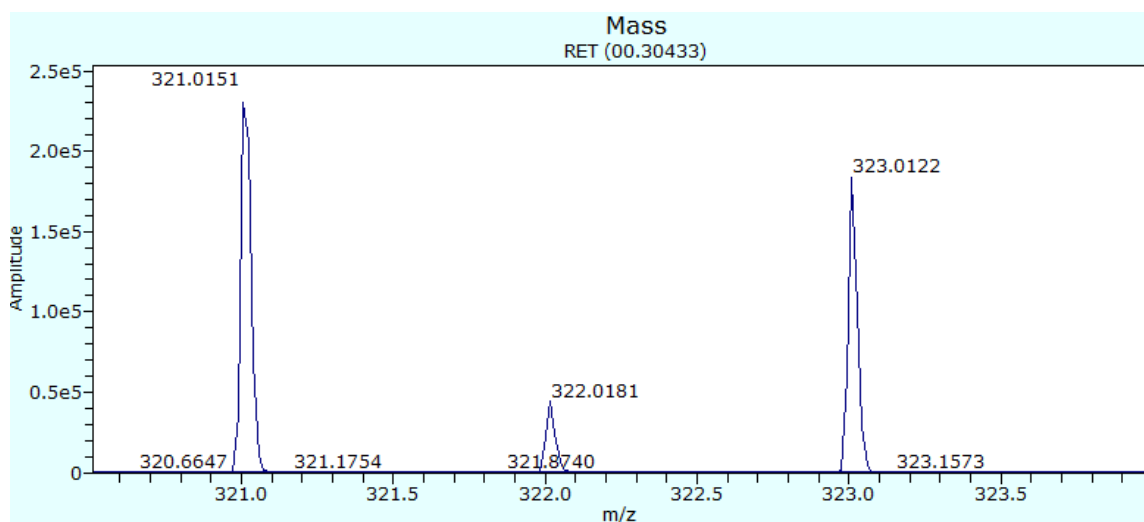
12.158. Espectro de RMN ^1H del compuesto **7b**.



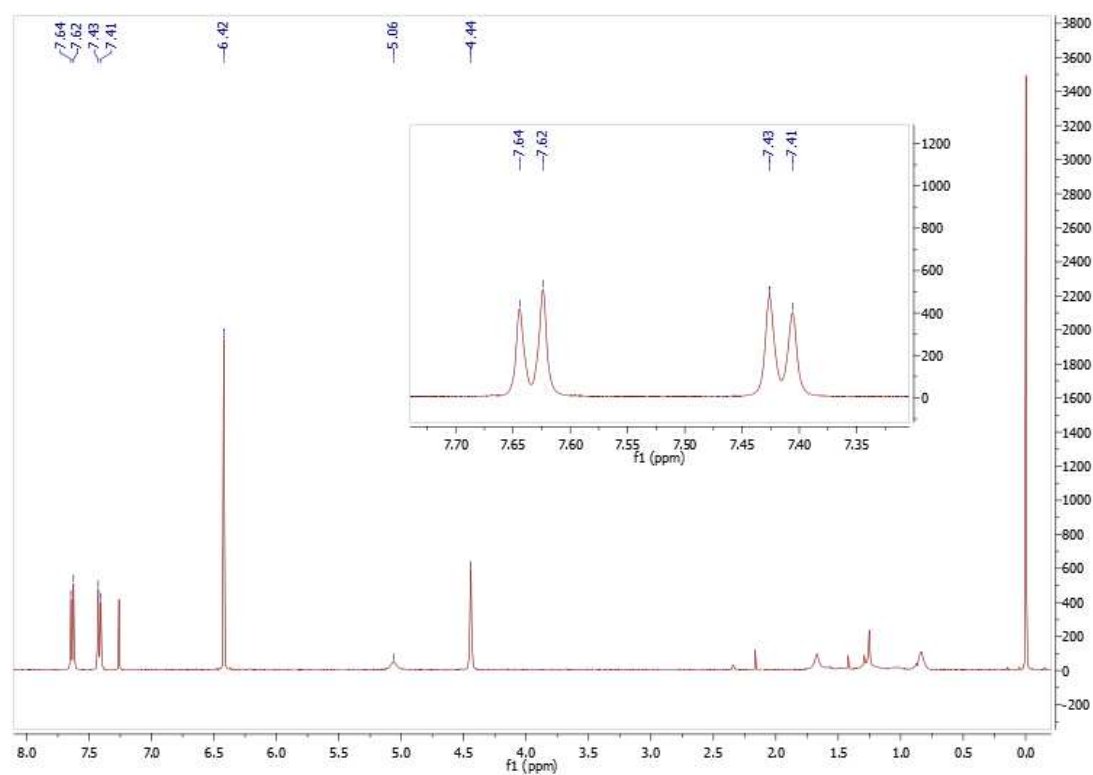
12.159. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **7b**.



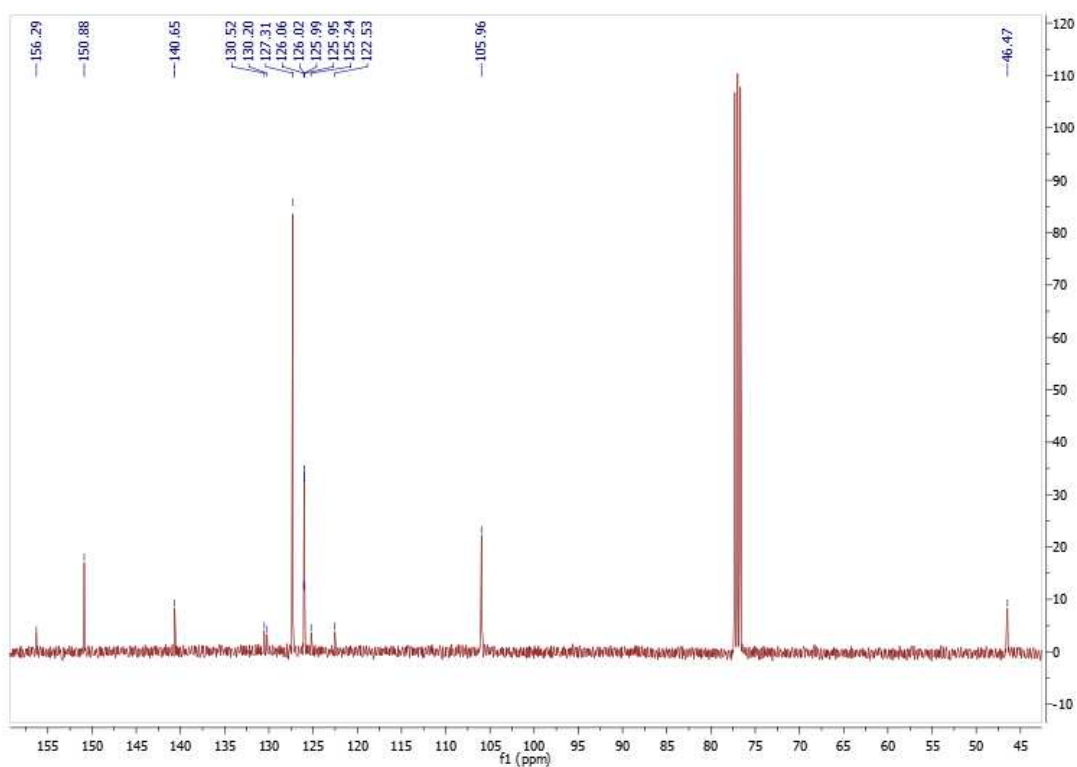
12.160. Espectro de EM-APCI del compuesto **7b**.



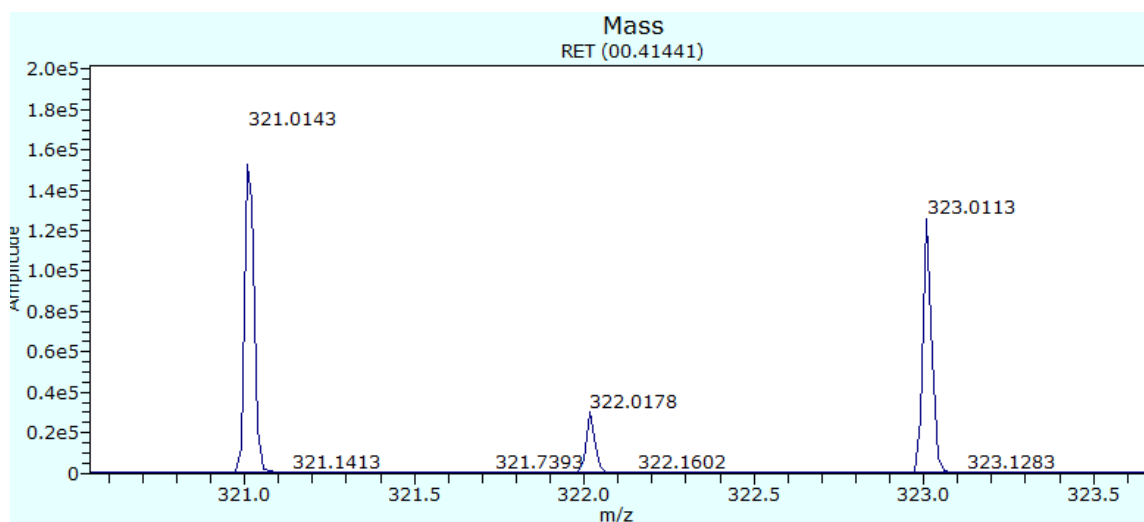
12.161. Espectro de RMN ^1H del compuesto **7c**.



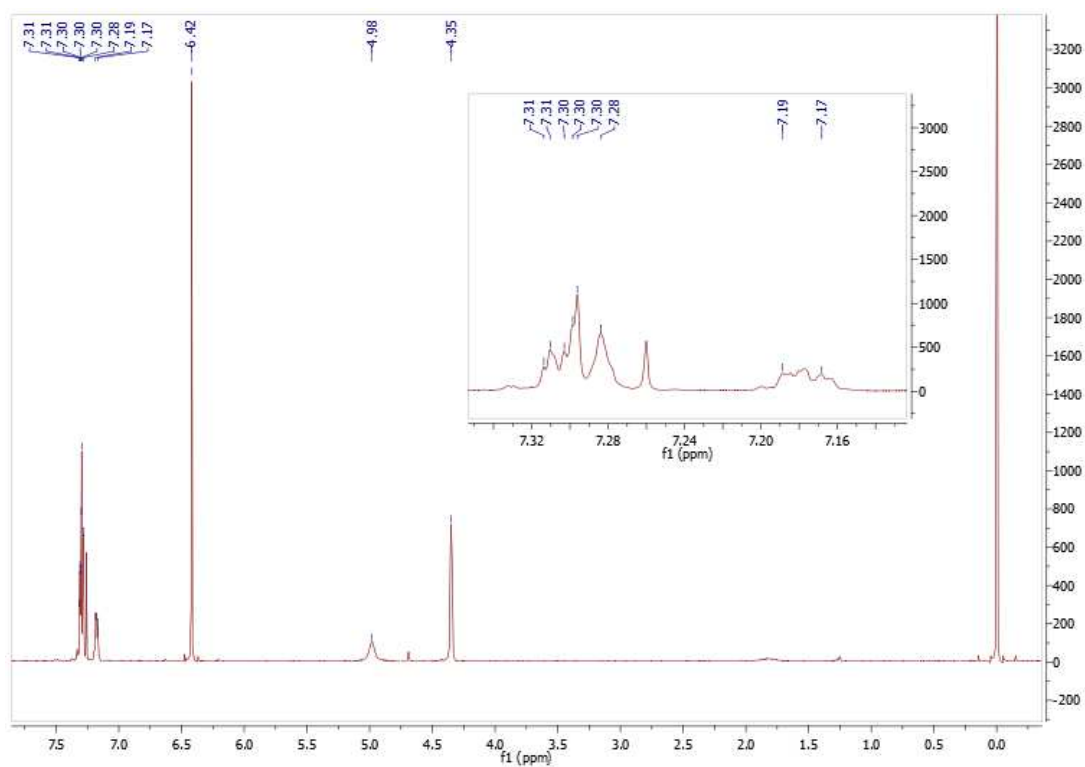
12.162. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **7c**.



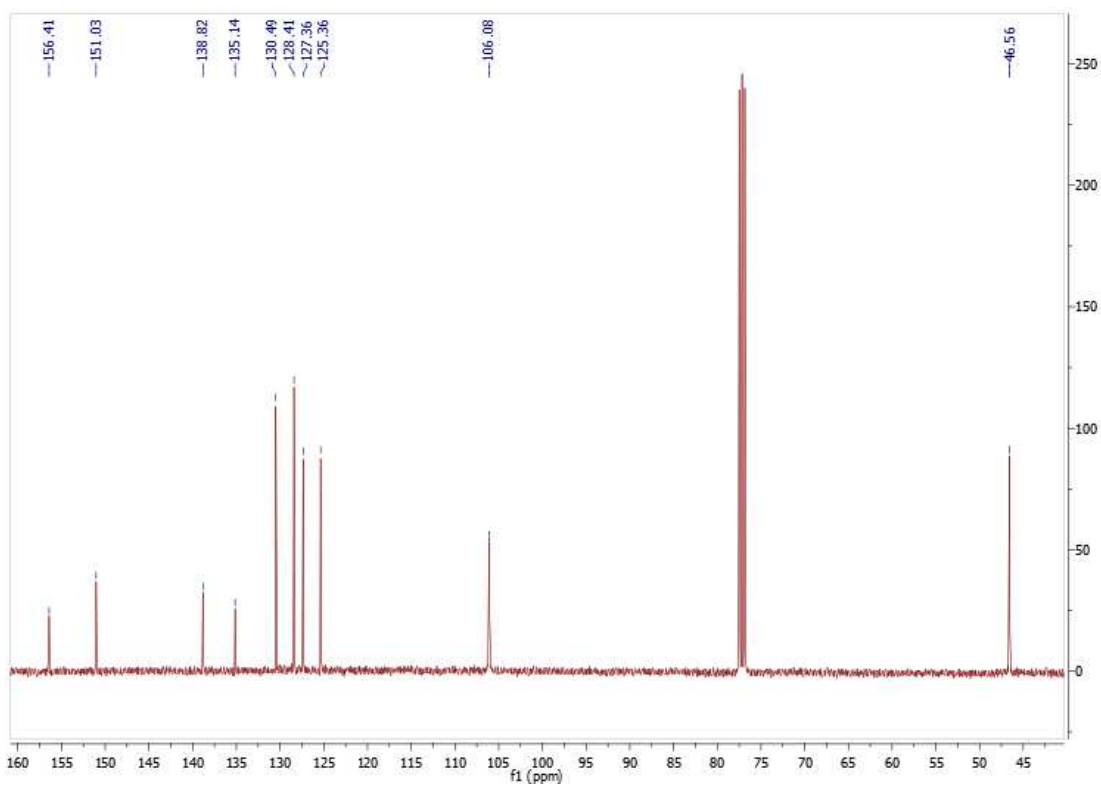
12.163. Espectro de EM-APCI del compuesto **7c**.



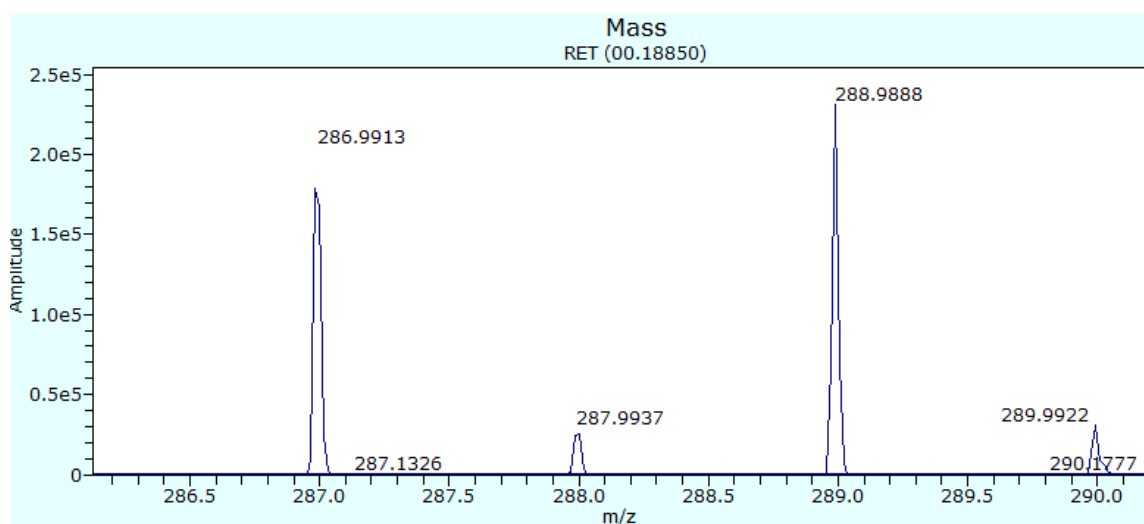
12.164. Espectro de RMN ^1H del compuesto **7d**.



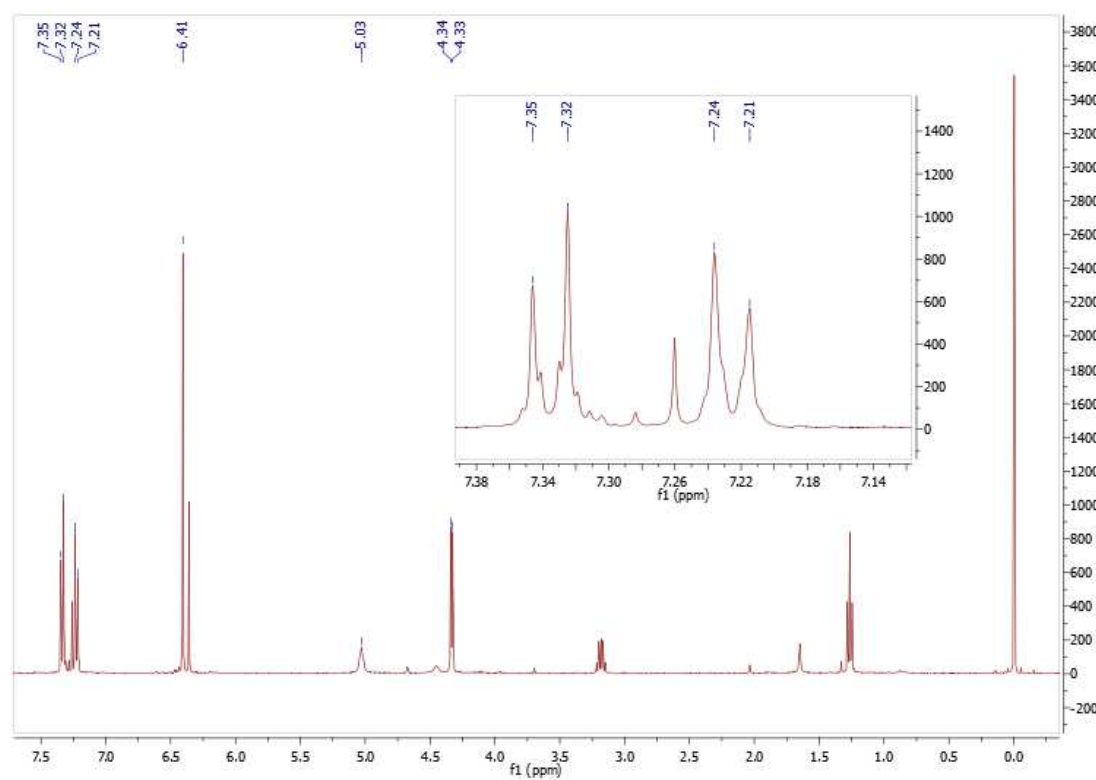
12.165. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **7d**.



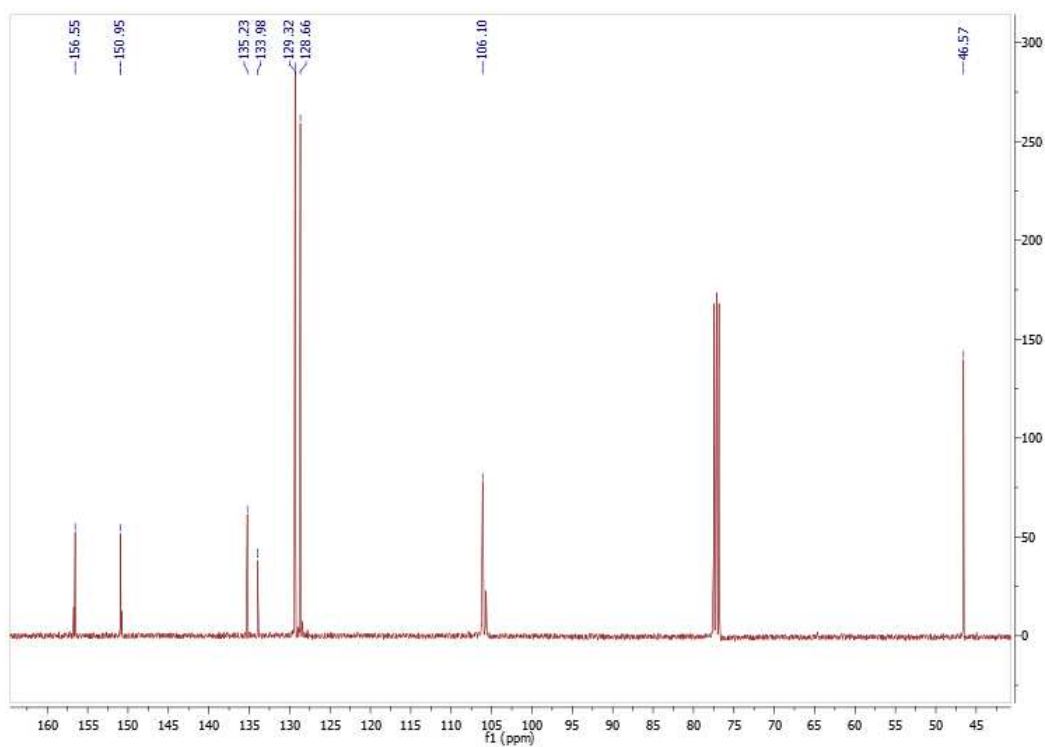
12.166. Espectro de EM-APCI del compuesto **7d**.



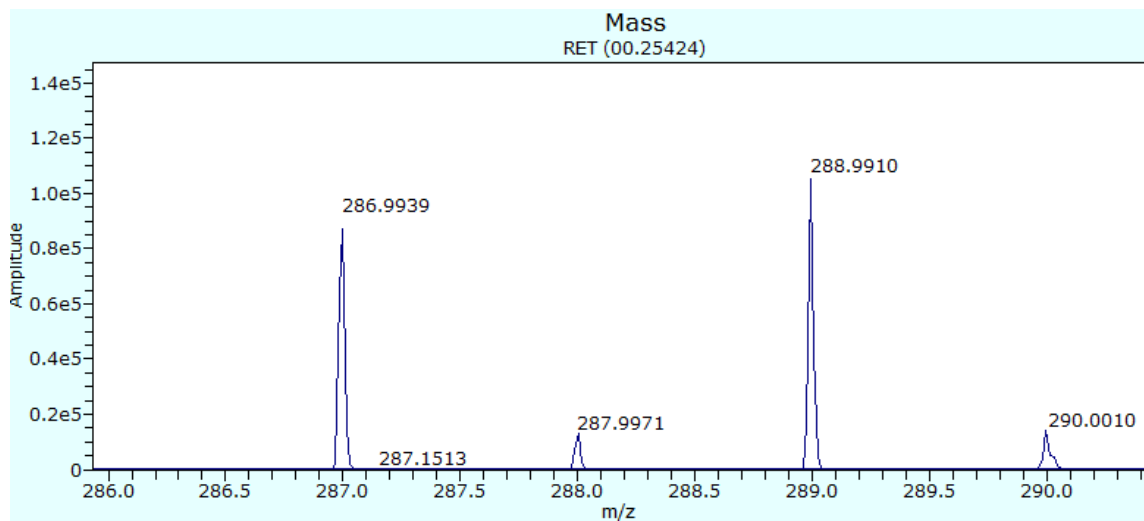
12.167. Espectro de RMN ^1H del compuesto **7e**.



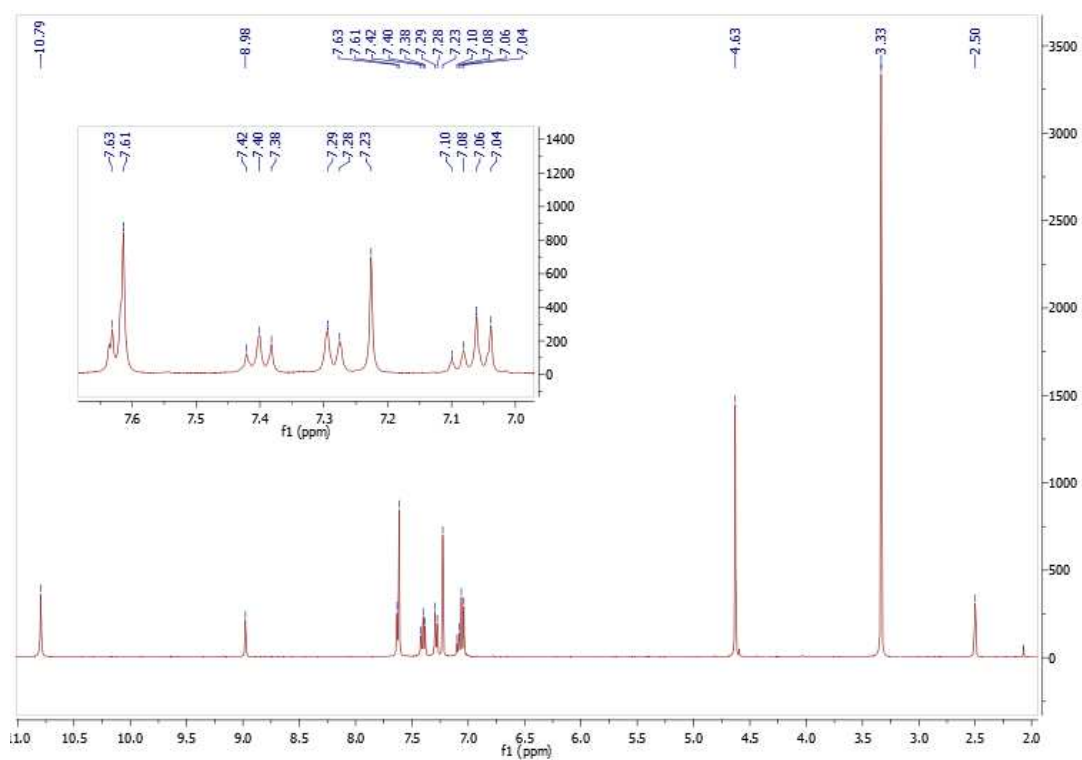
12.168. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **7e**.



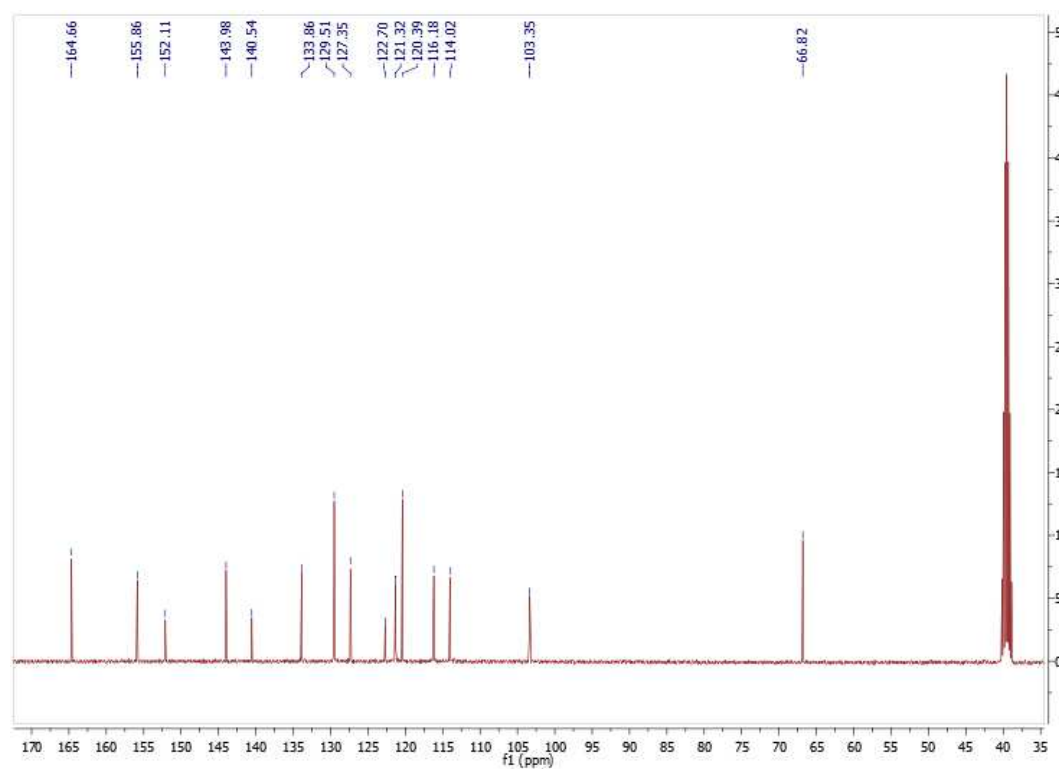
12.169. Espectro de EM-APCI del compuesto **7e**.



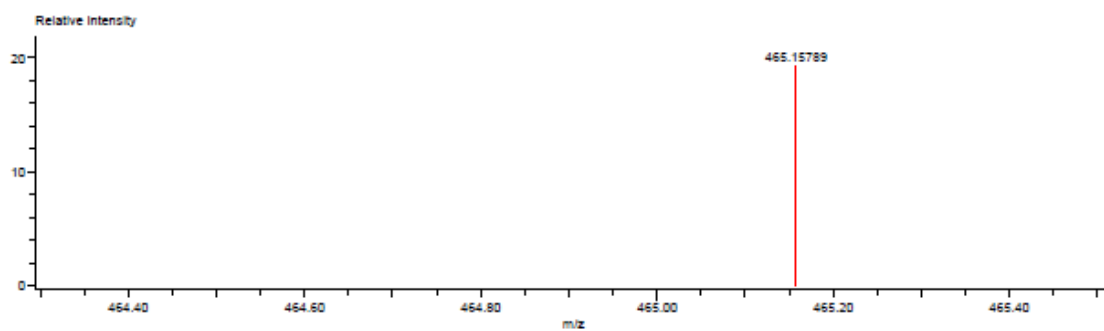
12.170. Espectro de RMN ^1H del compuesto final **8a**.



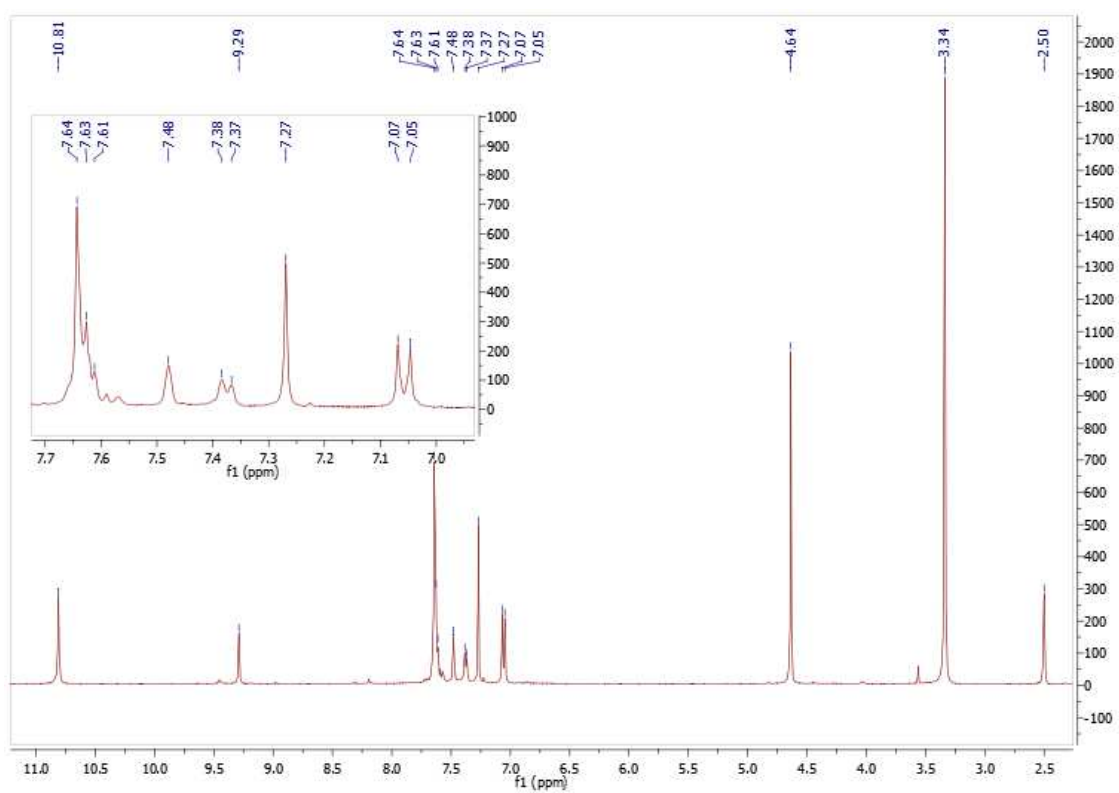
12.171. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto final **8a**.



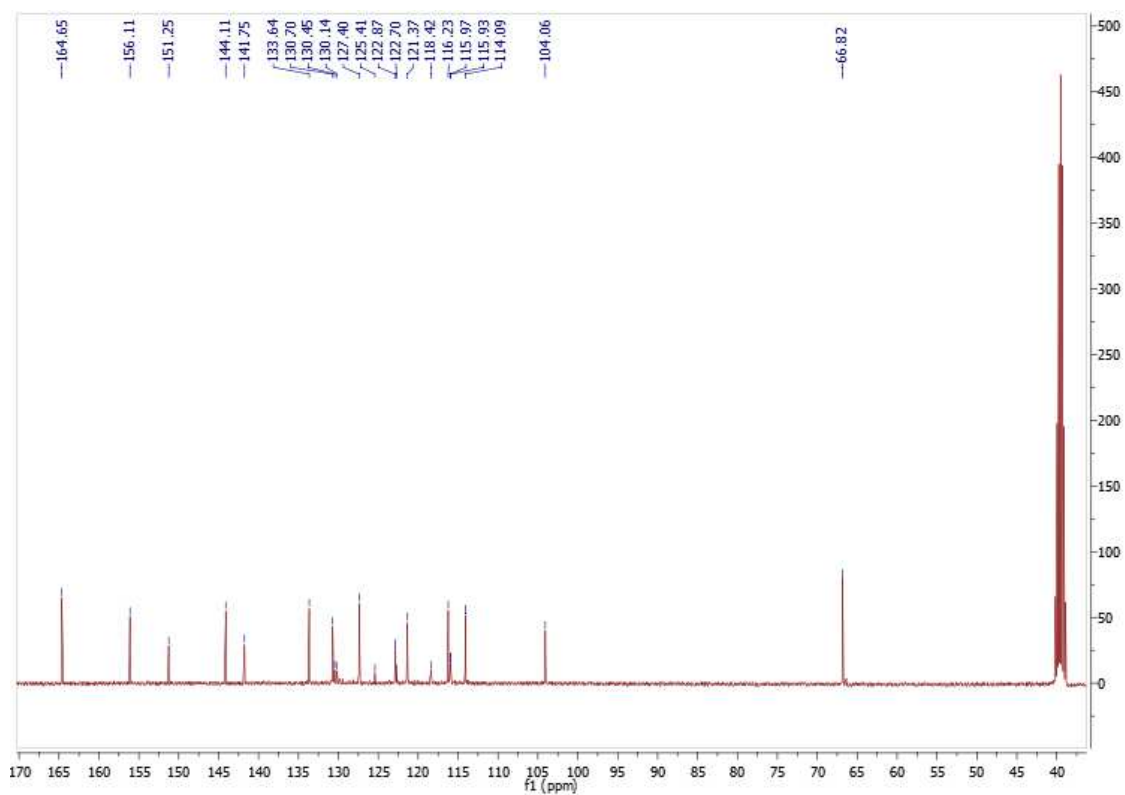
12.172. Espectro de EM-ESI del compuesto final **8a**.



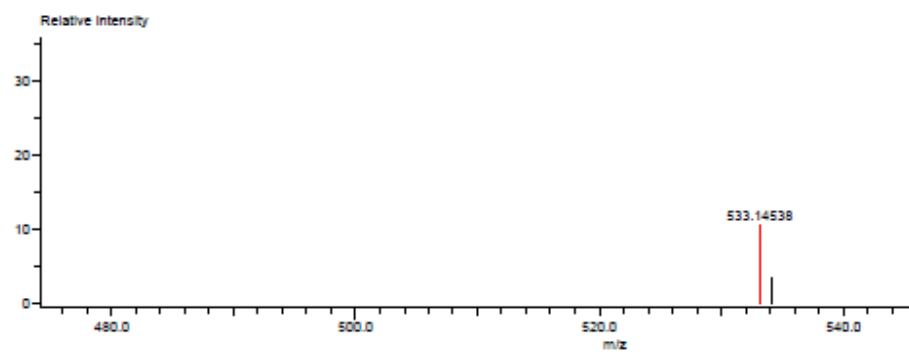
12.173. Espectro de RMN ^1H del compuesto final **8b**.



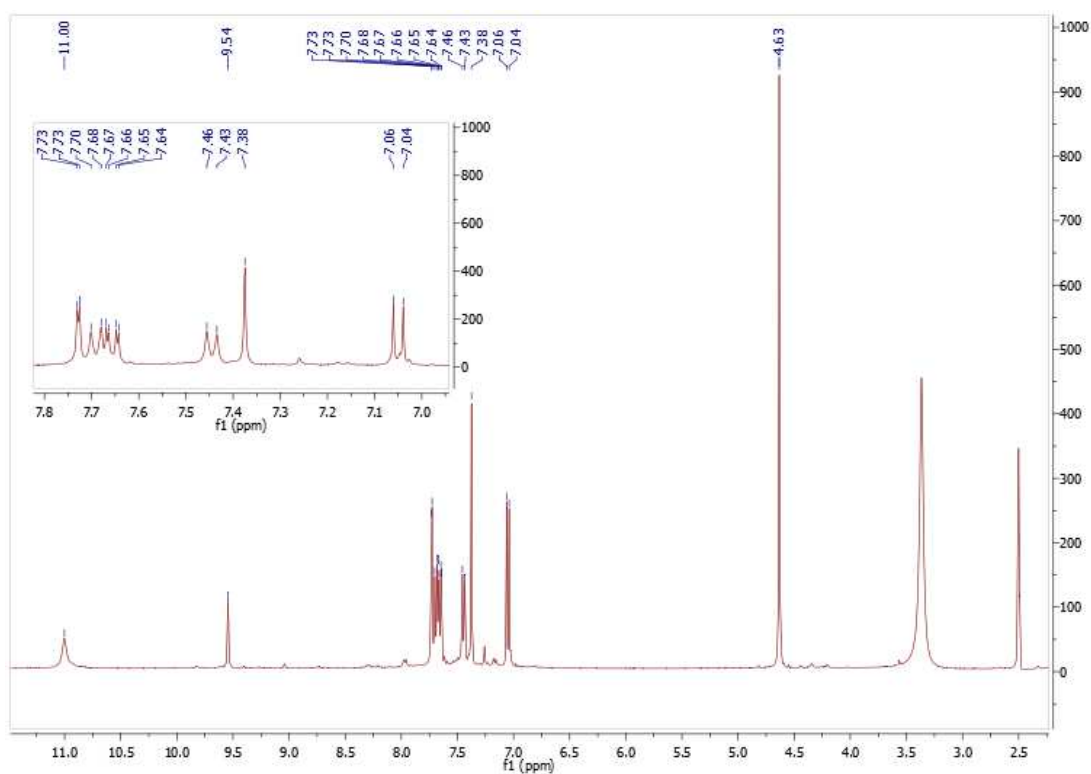
12.174. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto final **8b**.



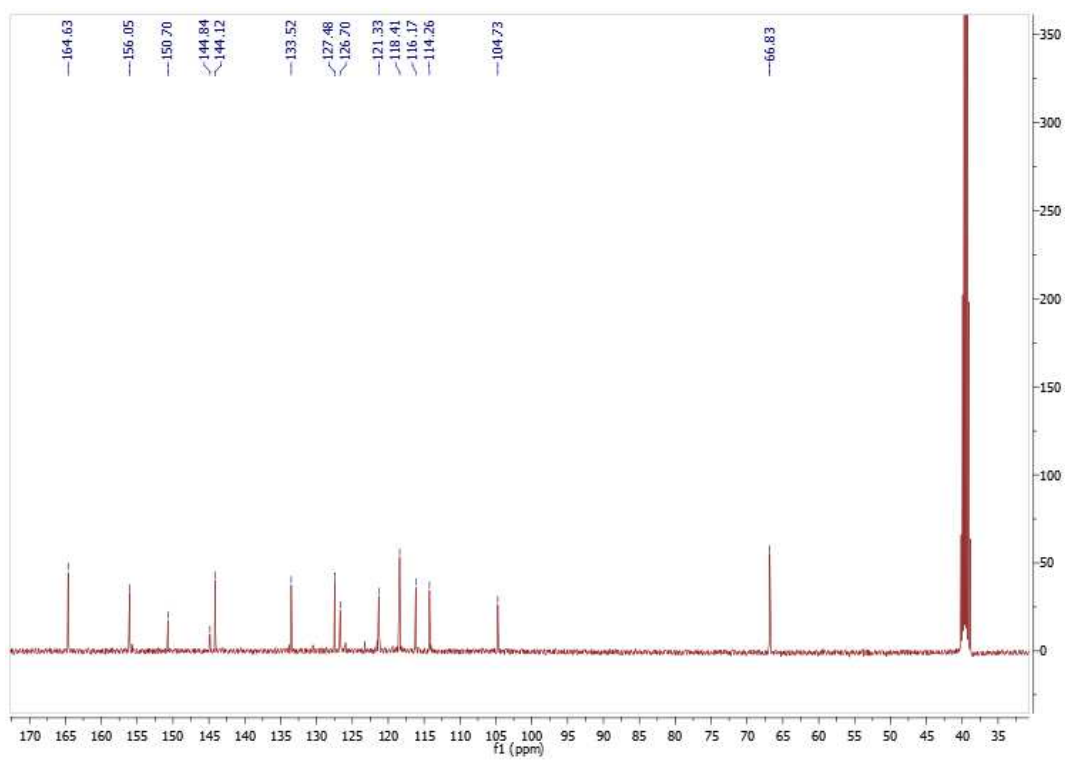
12.175. Espectro de EM-ESI del compuesto final **8b**.



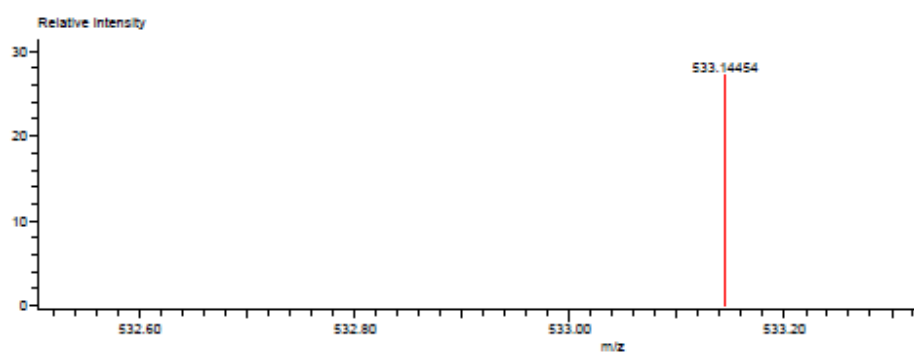
12.176. Espectro de RMN ^1H del compuesto final **8c**.



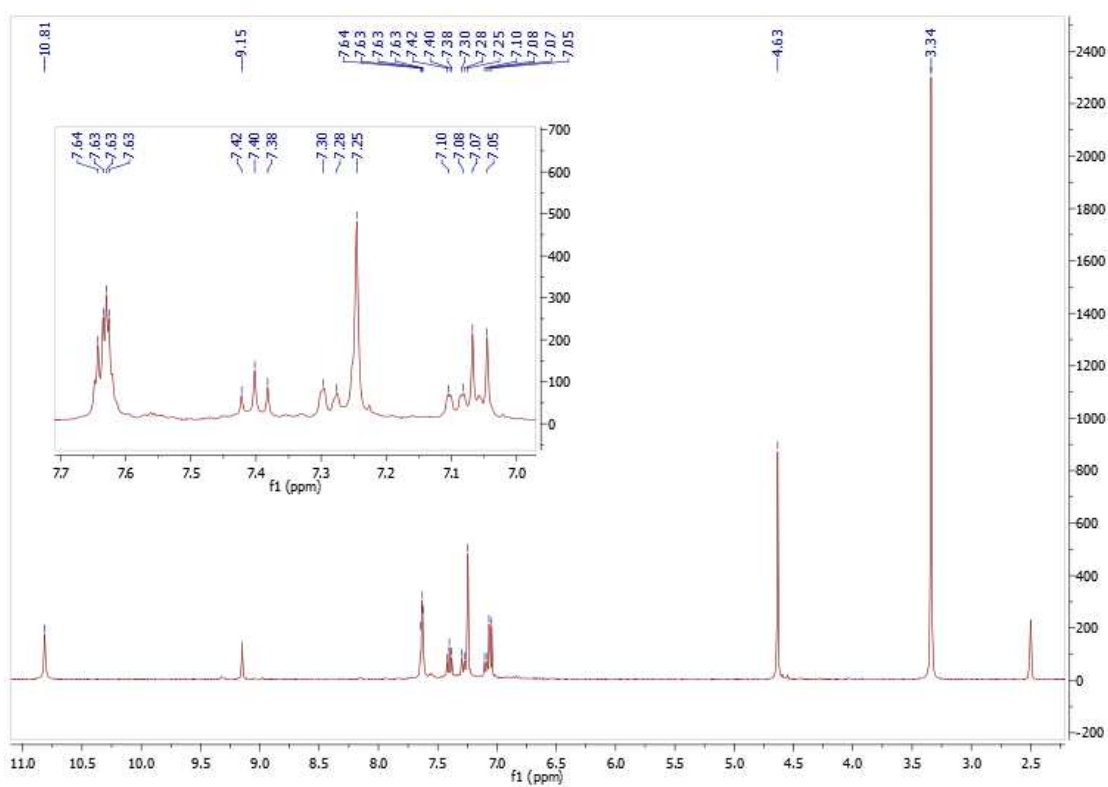
12.177. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto final **8c**.



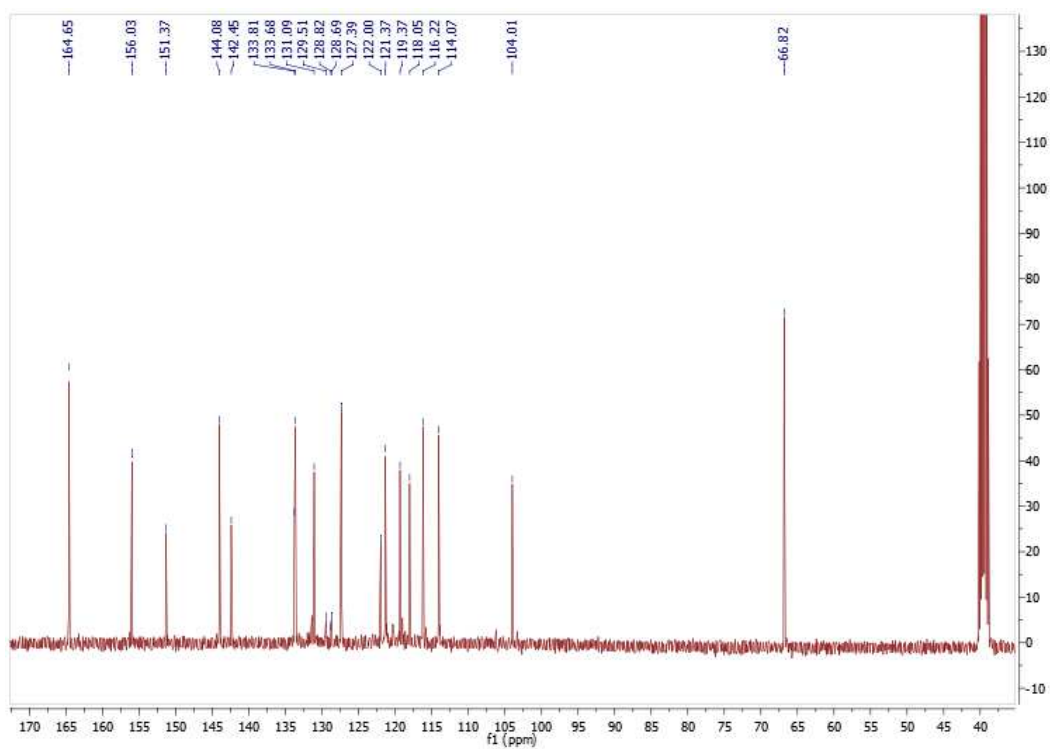
12.178. Espectro de EM-ESI del compuesto final **8c**.



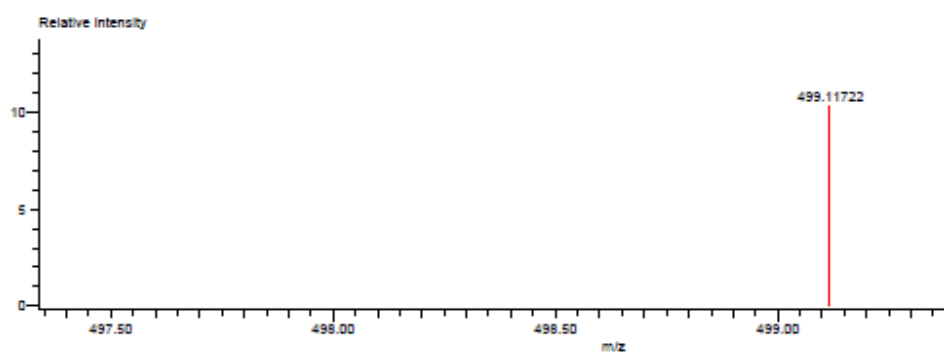
12.179. Espectro de RMN ¹H del compuesto final **8d**.



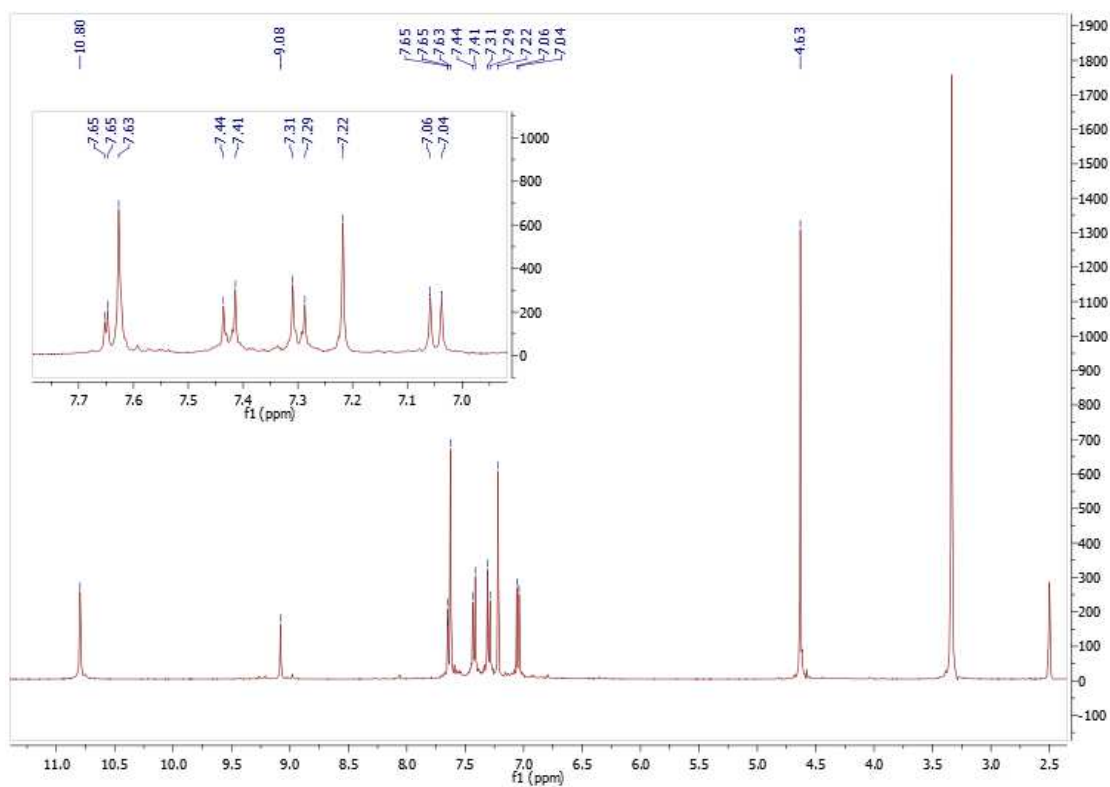
12.180. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto final **8d**.



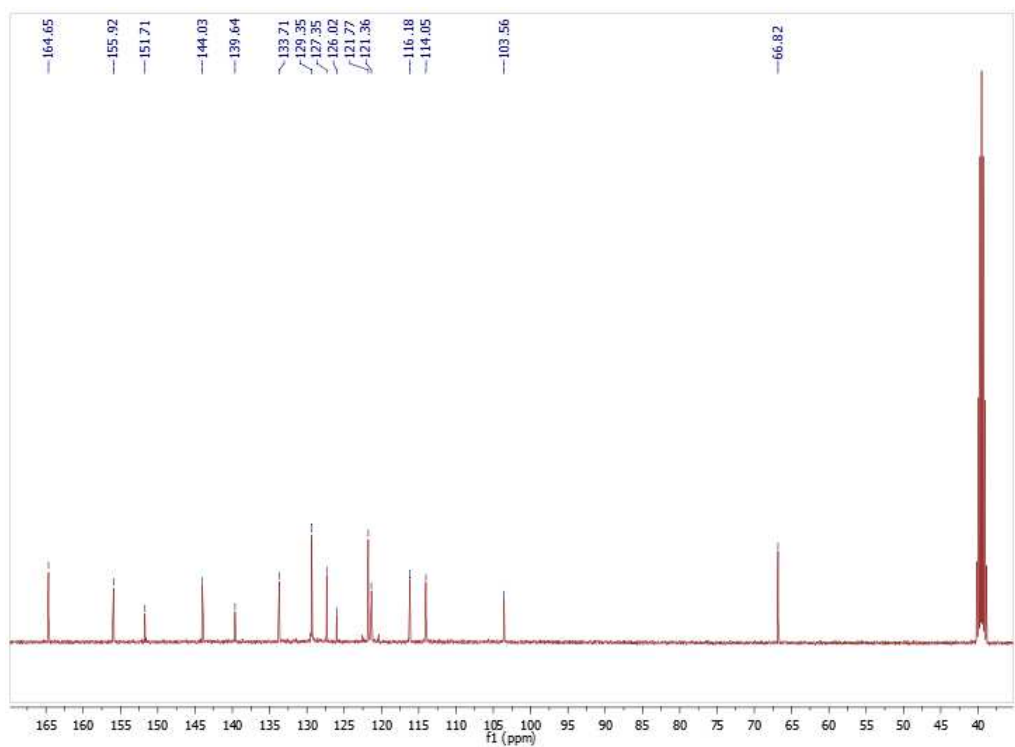
12.181. Espectro de EM-ESI del compuesto final **8d**.



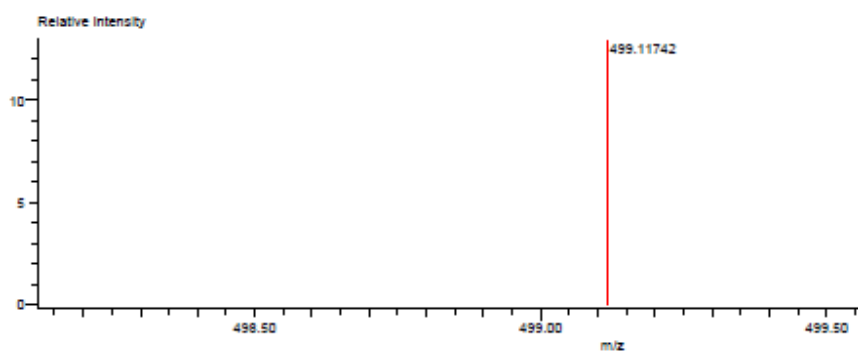
12.182. Espectro de RMN ^1H del compuesto final **8e**.



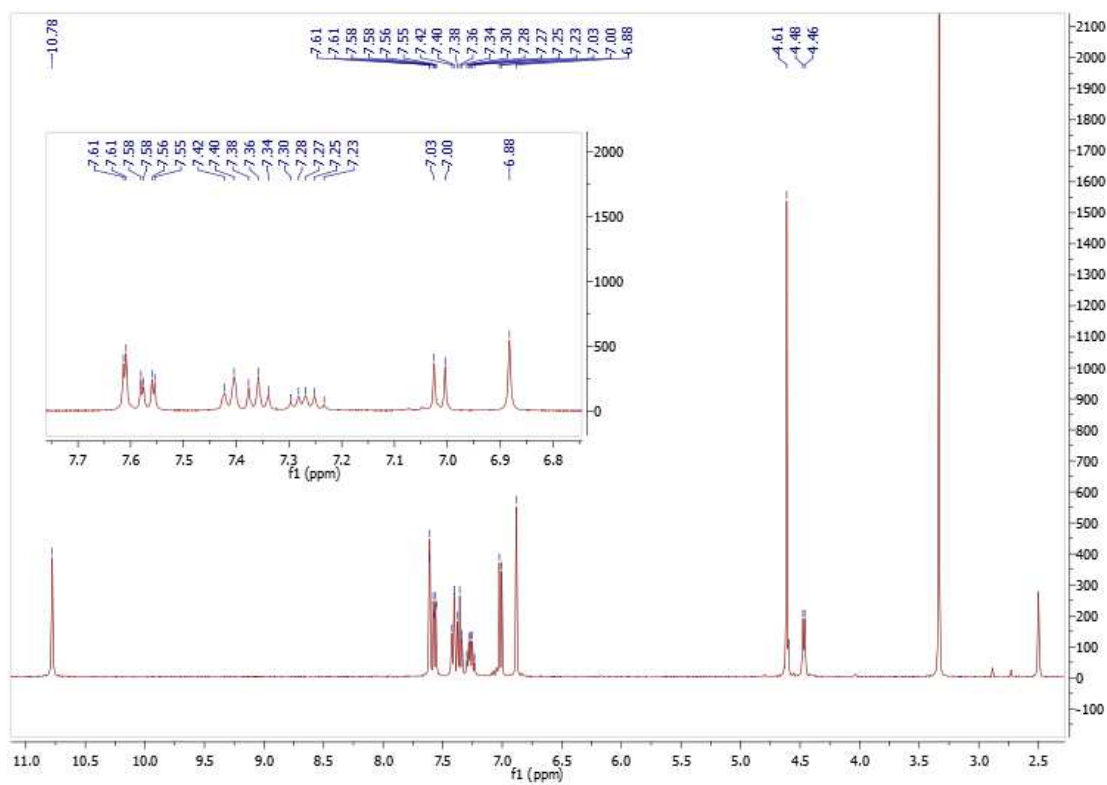
12.183. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto final **8e**.



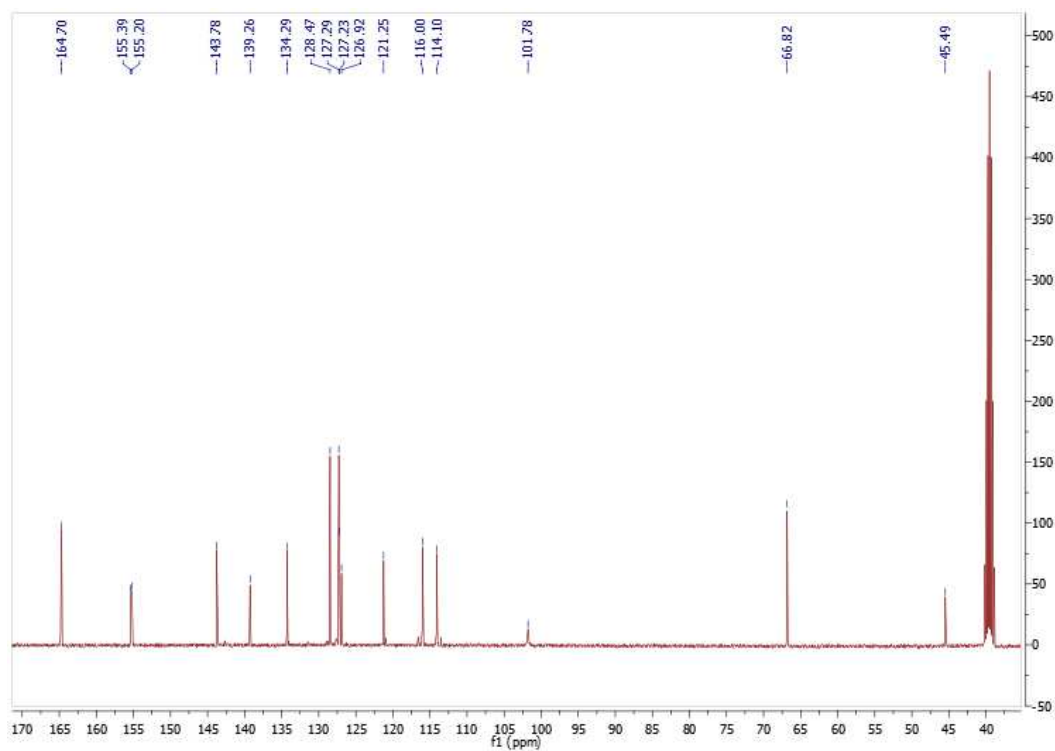
12.184. Espectro de EM-ESI del compuesto final **8e**.



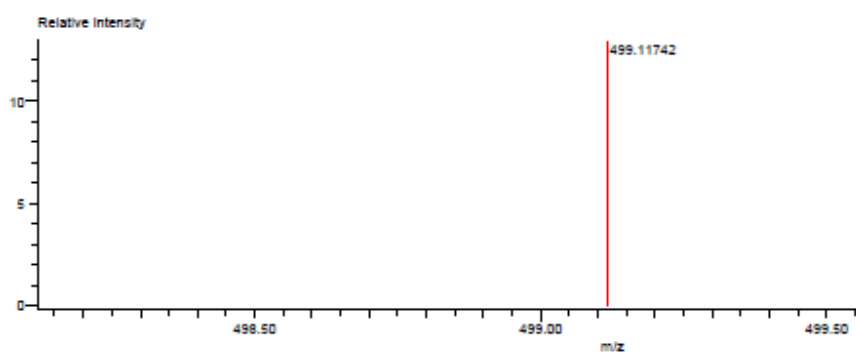
12.185. Espectro de RMN ^1H del compuesto final **8f**.



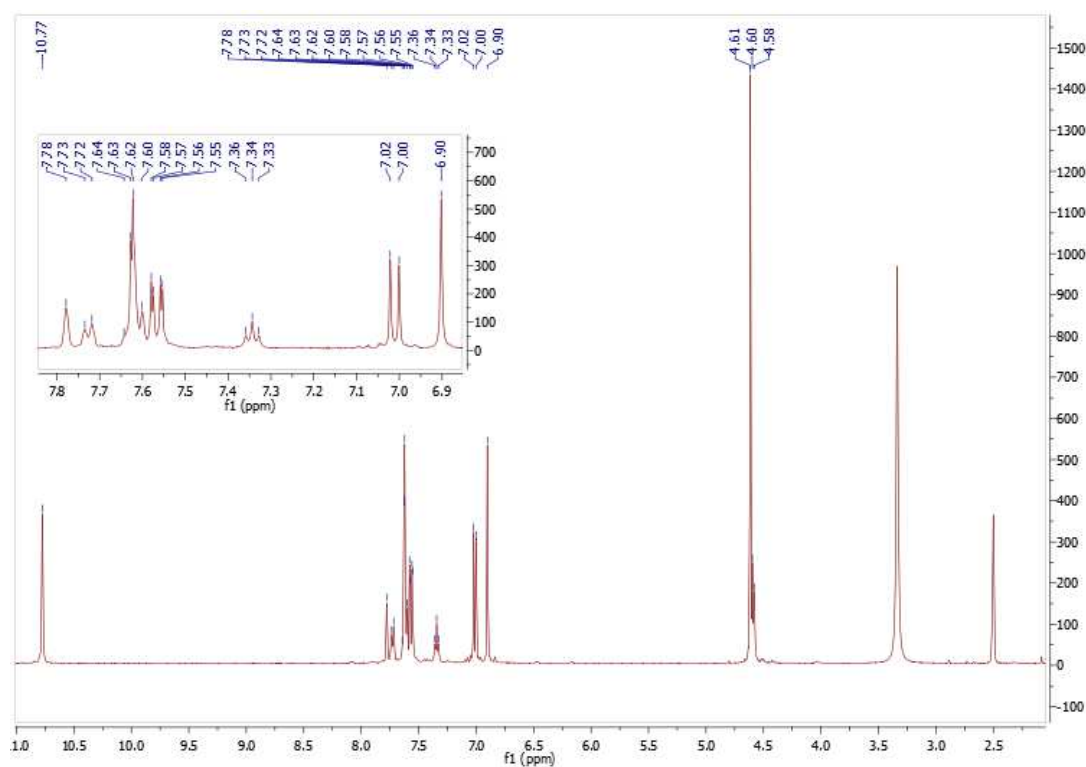
12.186. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto final **8f**.



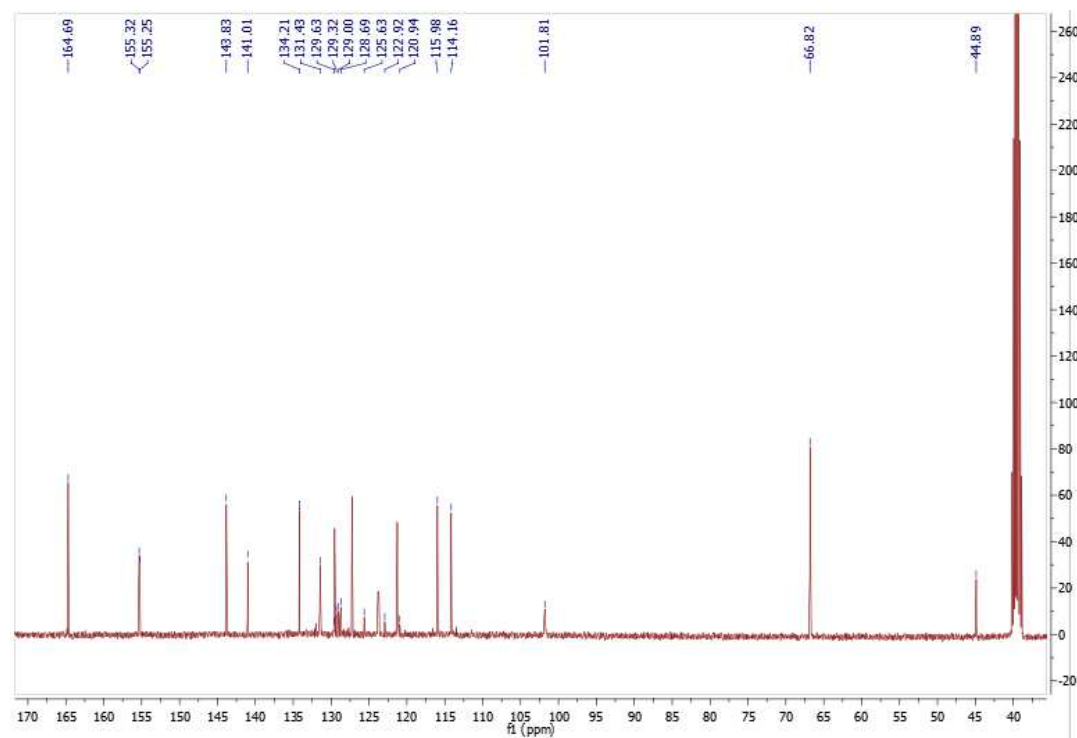
12.187. Espectro de EM-ESI del compuesto final **8f**.



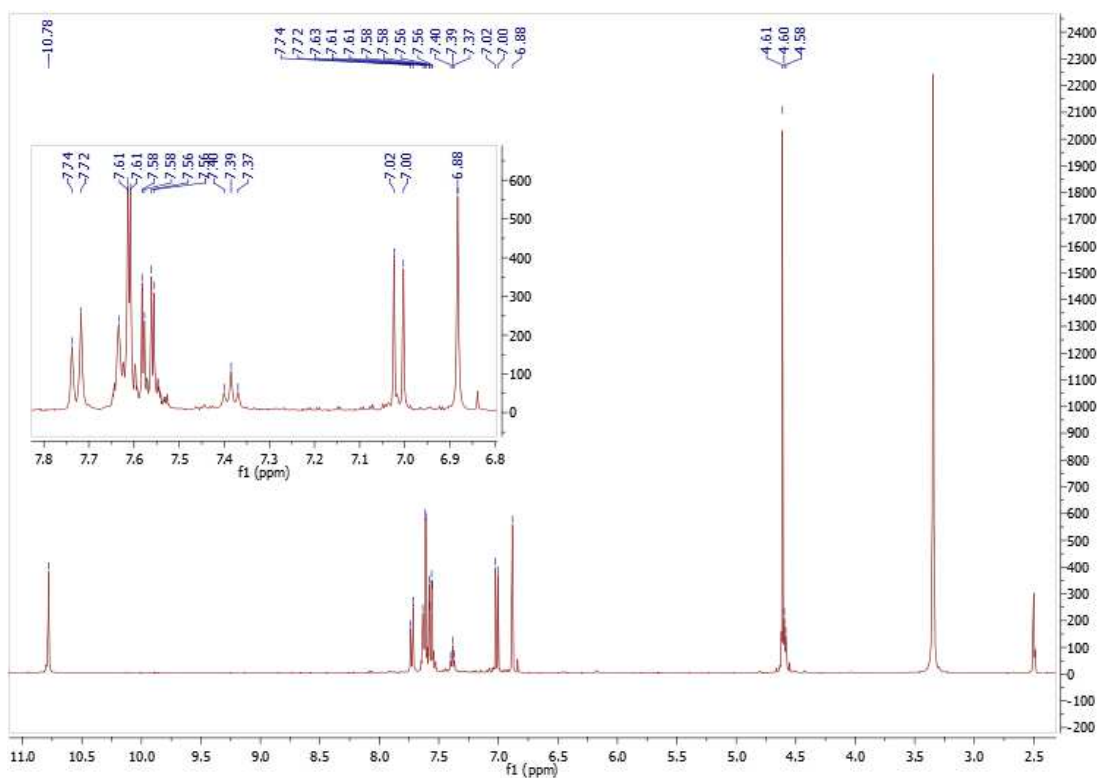
12.188. Espectro de RMN ^1H del compuesto final **8g**.



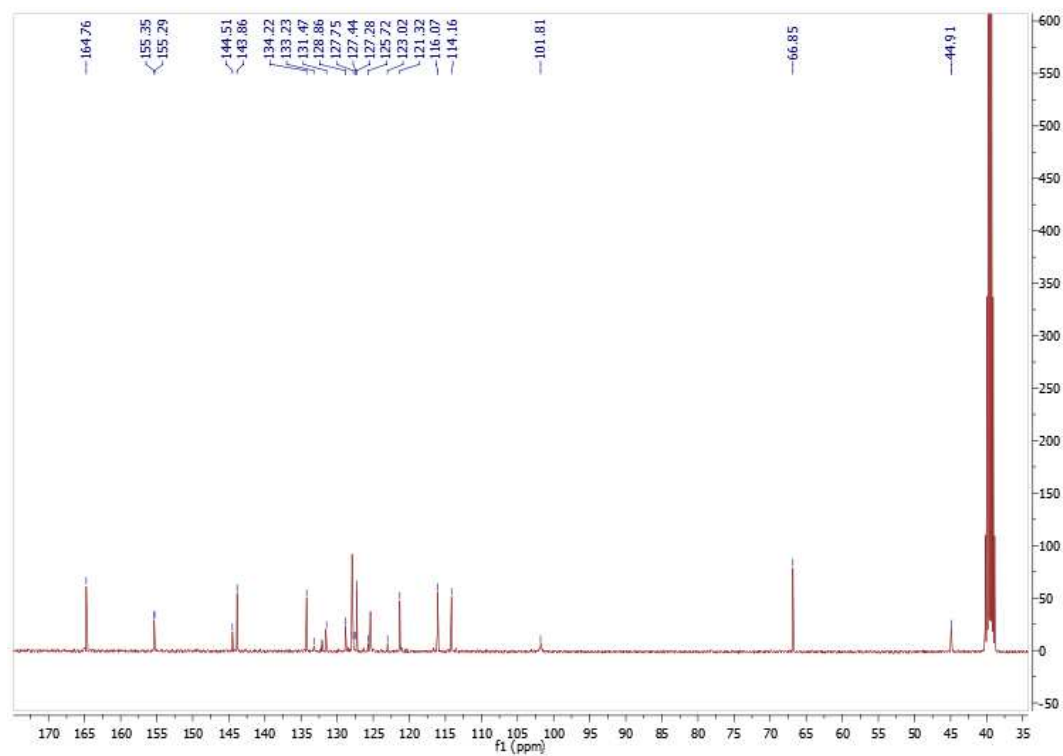
12.189. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto final **8g**.



12.190. Espectro de RMN ^1H del compuesto final **8h**.



12.191. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto final **8h**.

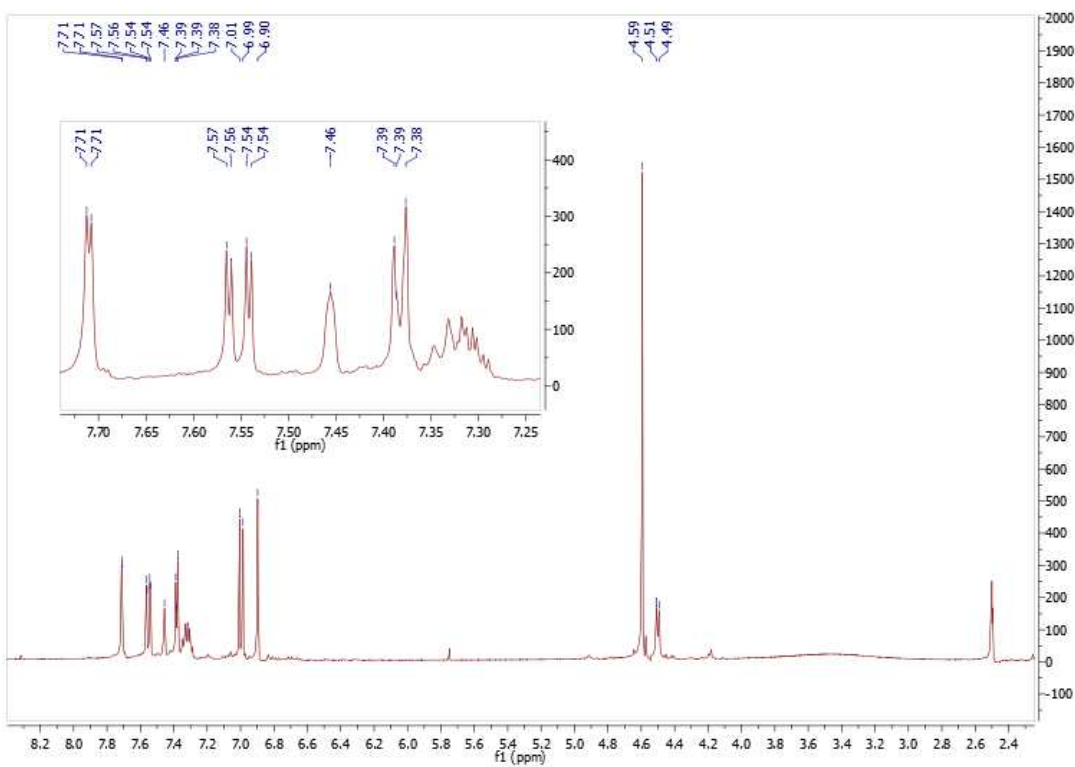


12.192. Reporte de EM-EI del compuesto final **8h**.

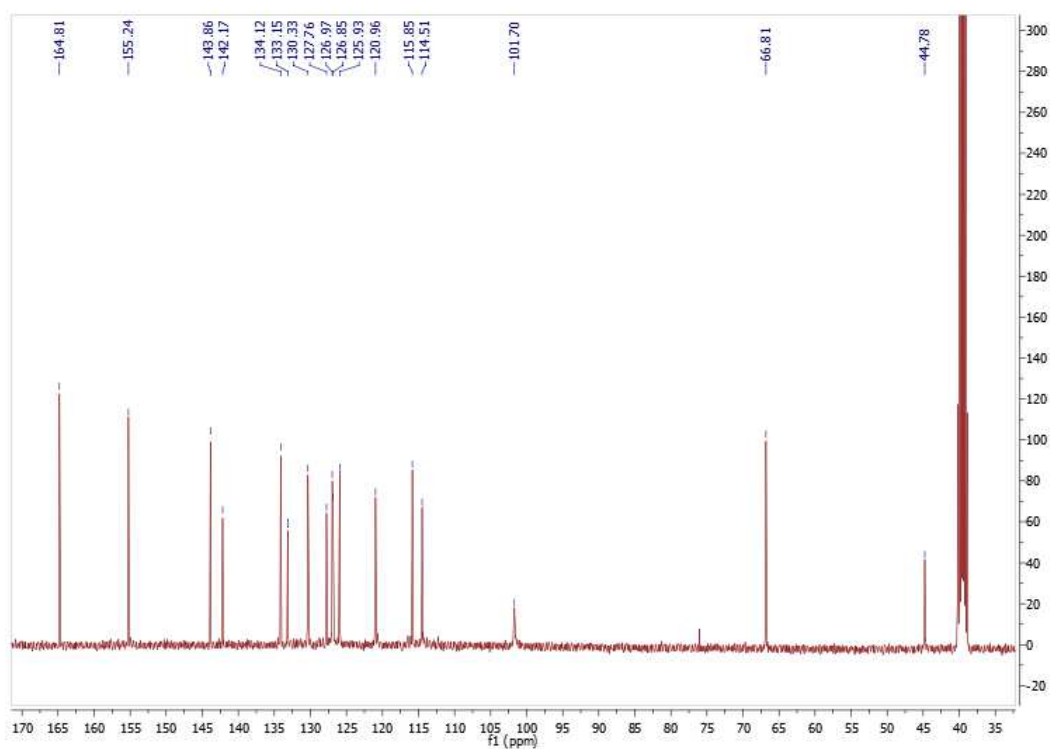
Data : Dr Castillo Rafael-028 Date : 07-Nov-2017 11:25
Instrument : MSStation
Sample : 228 STE-7341 ESB4CF3 Jeol MSStation
Note : Operadores Carmen Garcia Javier Perez
Inlet : Direct Ion Mode : EI+
RT : 3.92 min Scan# : (48,52)
Elements : C 40/0, H 49/0, F 4/2, N 6/2, O 5/3
Mass Tolerance : 2mmu
Unsaturation (U.S.) : 18.0 - 22.0

Observed m/z	Int%	Estimated m/z	Err [ppm / mmu]	U.S.	C	H	F	N	O
546.1505	100.00	546.1515	-1.8 / -1.0	20:0	29	21	3	4	4

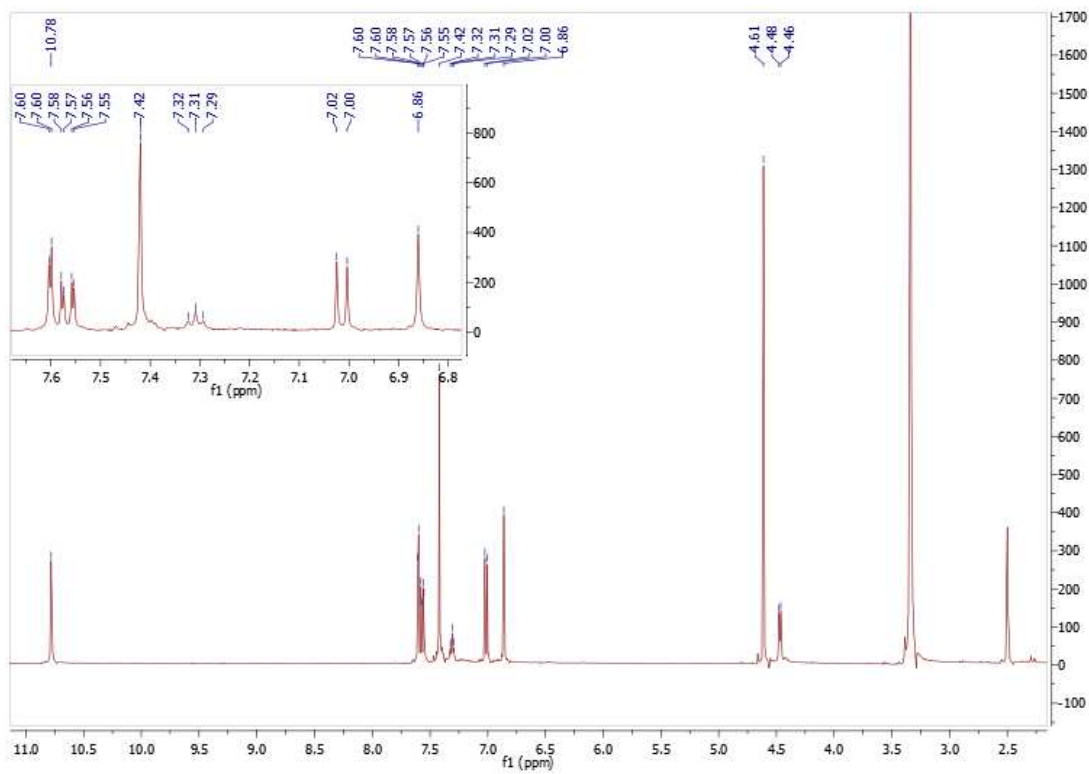
12.193. Espectro de RMN ¹H del compuesto final **8i**.



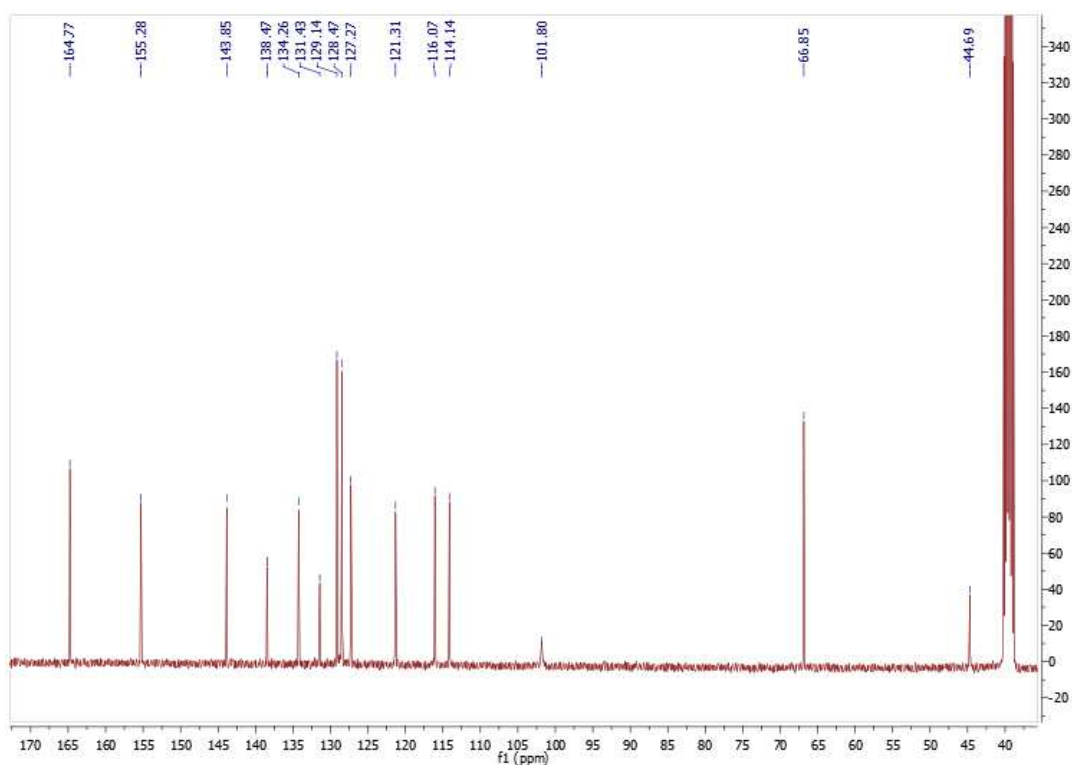
12.194. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto final **8i**.



12.195. Espectro de RMN ^1H del compuesto final **8j**.



12.196. Espectro de RMN ¹³C del compuesto final **8j**.

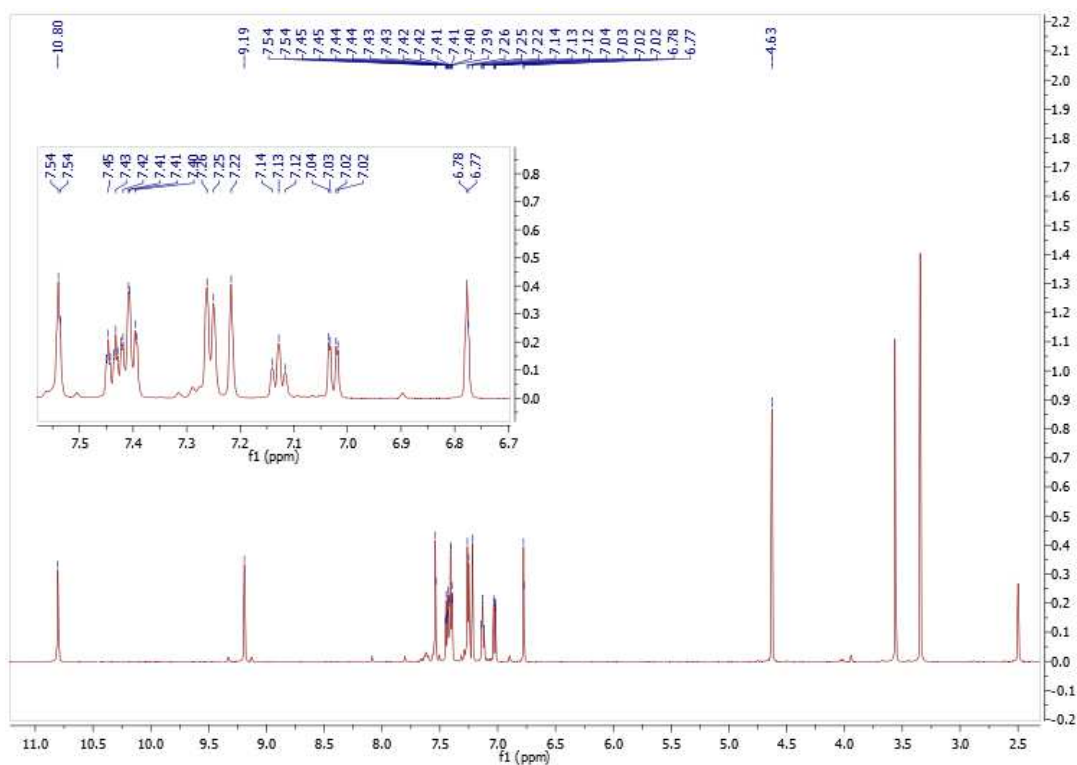


12.197. Reporte de EM-EI del compuesto **8j**.

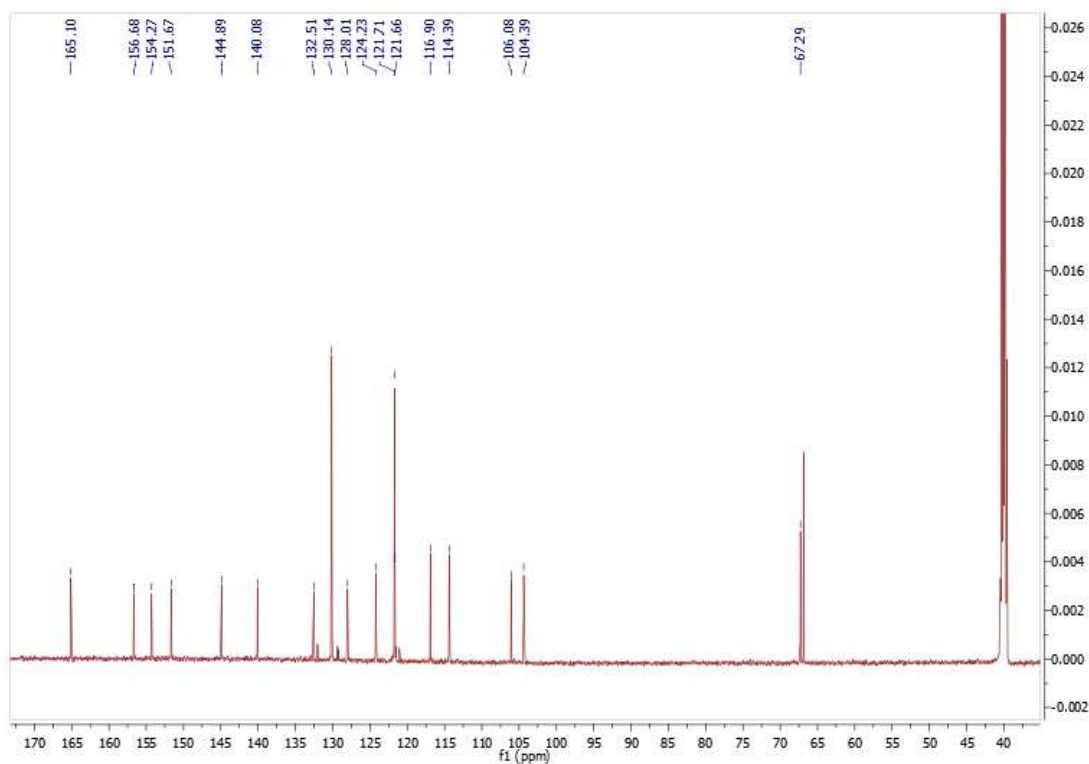
Data : Dr Castillo Rafael-023 Date : 07-Nov-2017 08:29
 Instrument : MSStation
 Sample : 229 STE-7342 ESB+Cl Jeol MSStation
 Note : Operadora: Carmen Garcia Javier Perez
 Inlet : Direct Ion Mode : EI+
 RT : 4.16 min Scan# : (47.60)
 Elements : C 30/0, H 46/0, 35Cl 1/0, 37Cl 1/0, N 5/2, O 5/0
 Mass Tolerance : 3mmu
 Unsaturation (U.S.) : 12.0 - 30.0

Observed m/z	Int%	Estimated m/z	Err [ppm / mmu]	U.S.	C	H	35Cl	37Cl	N	O
512.1260	50.93	512.1251	+1.7 / +0.9	20.0	28	21	1	-	4	4

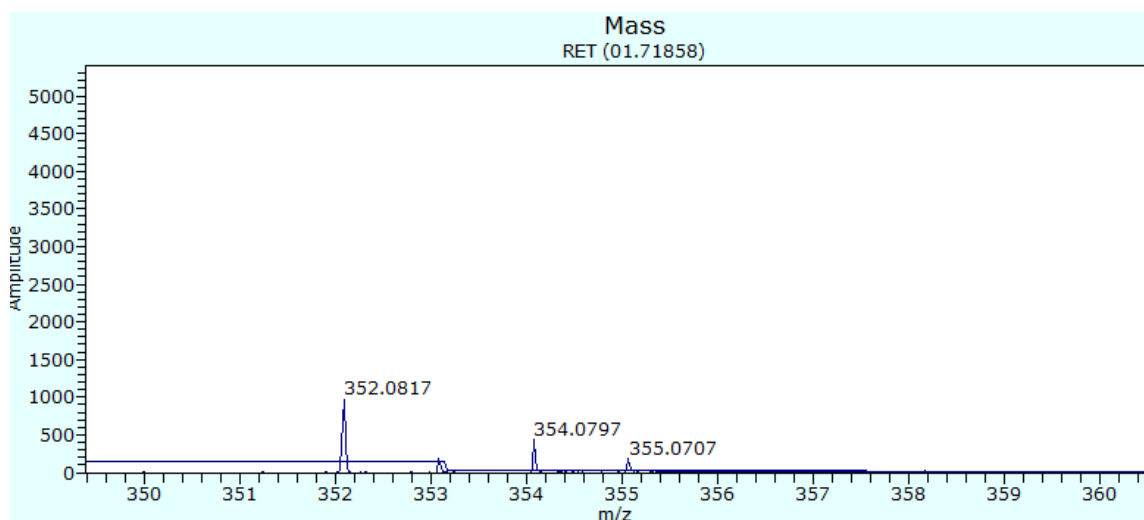
12.198. Espectro de RMN ^1H del compuesto **9a**.



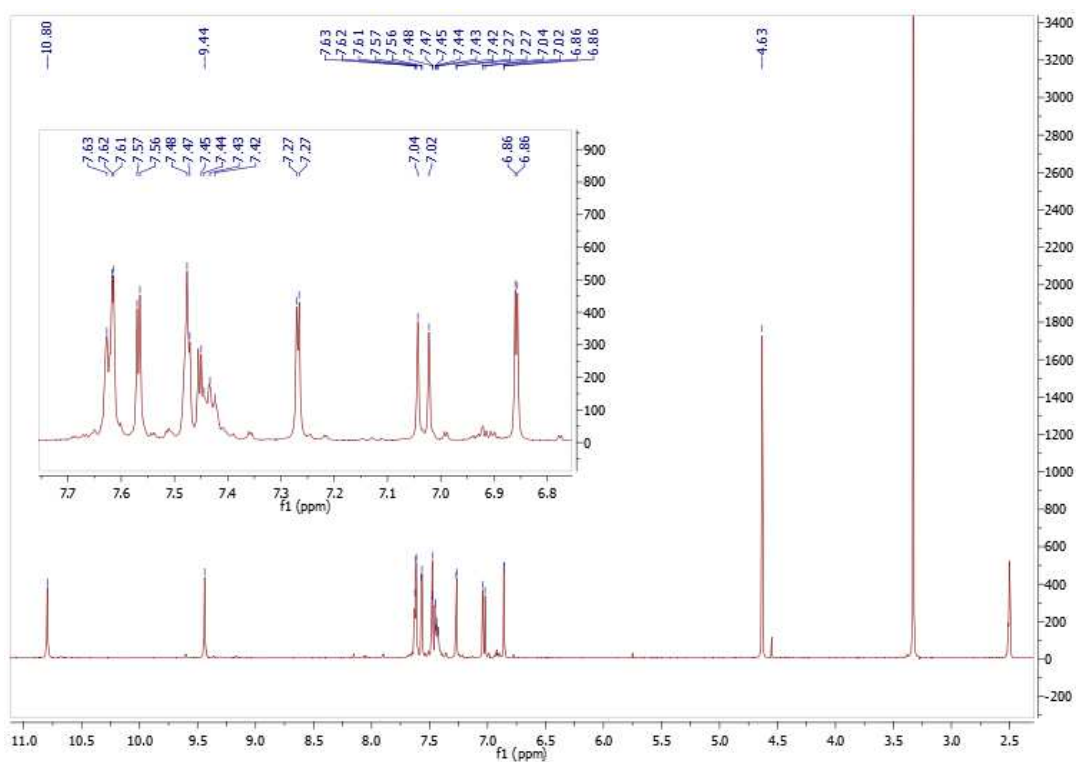
12.199. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **9a**.



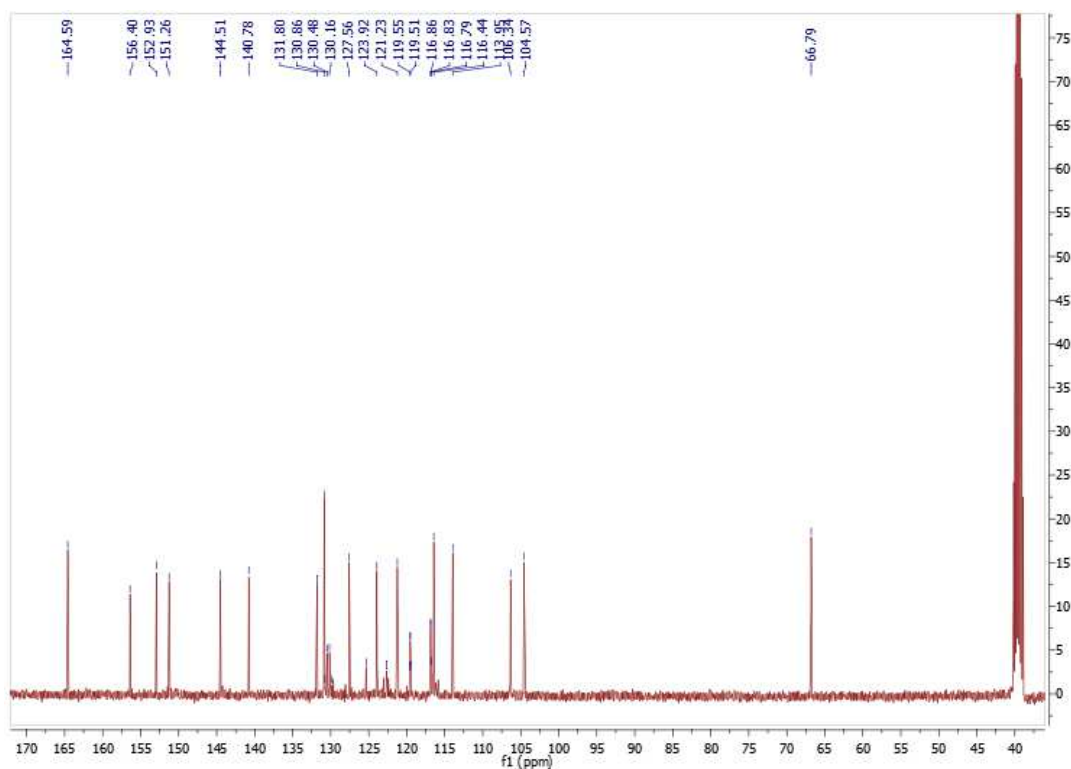
12.200. Espectro EM-APCI del compuesto **9a**.



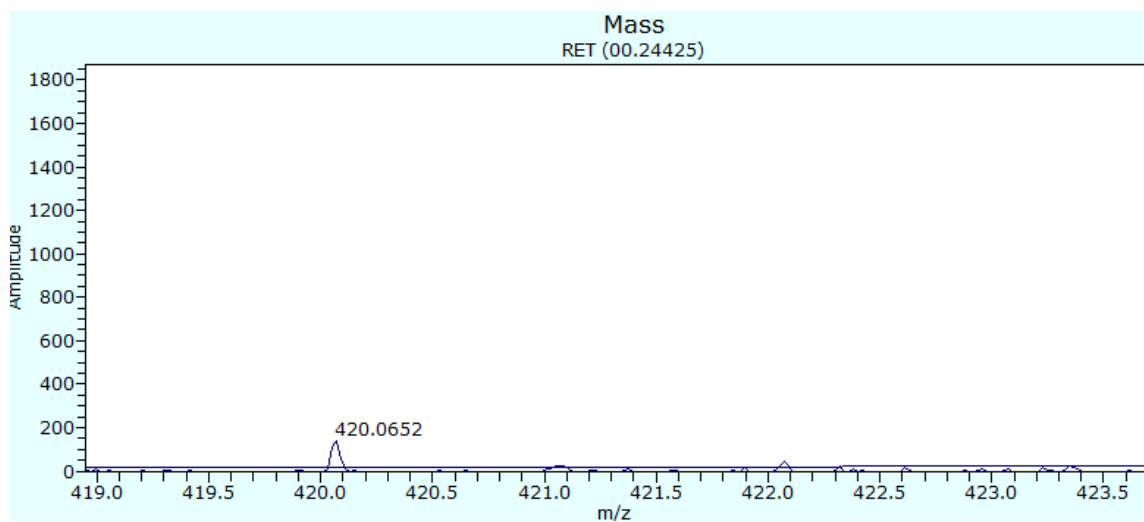
12.201. Espectro de RMN ^1H del compuesto **9b**.



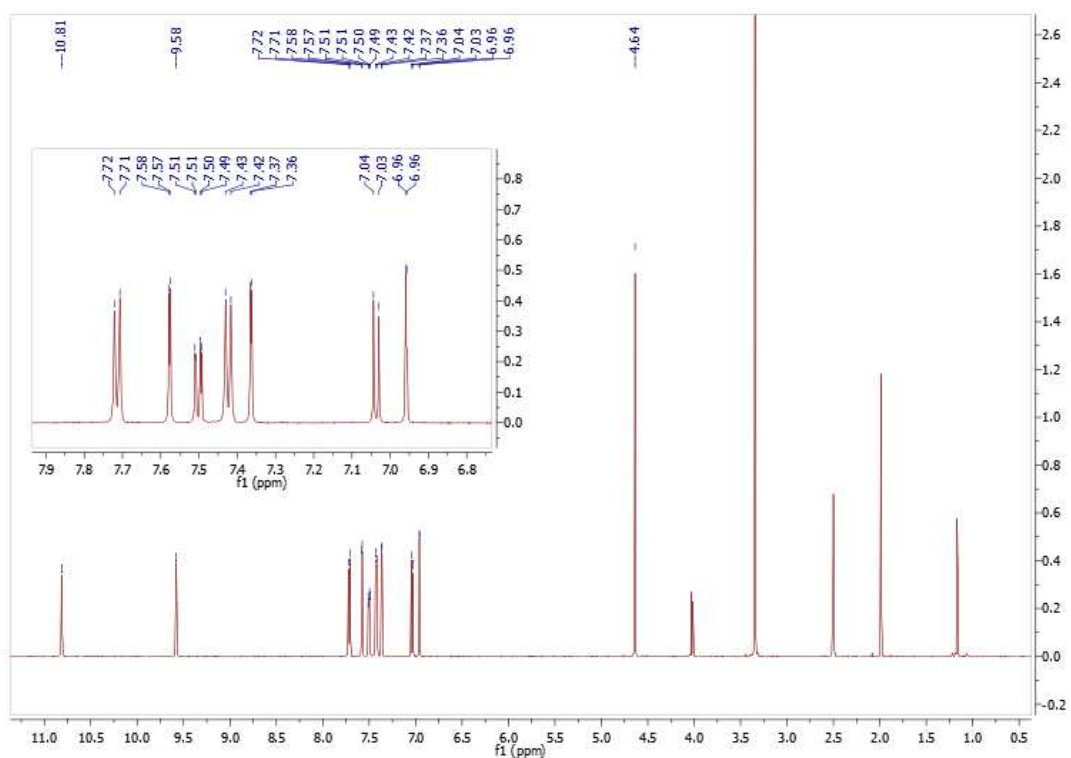
12.202. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **9b**.



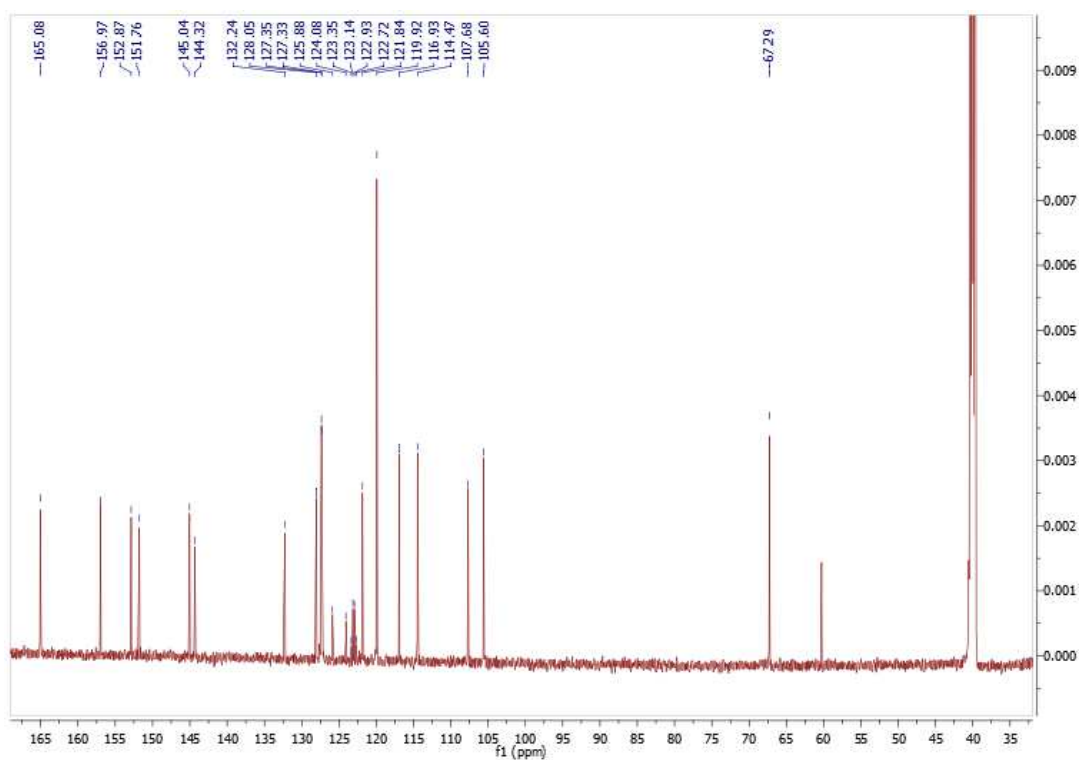
12.203. Espectro de EM-APCI del compuesto **9b**.



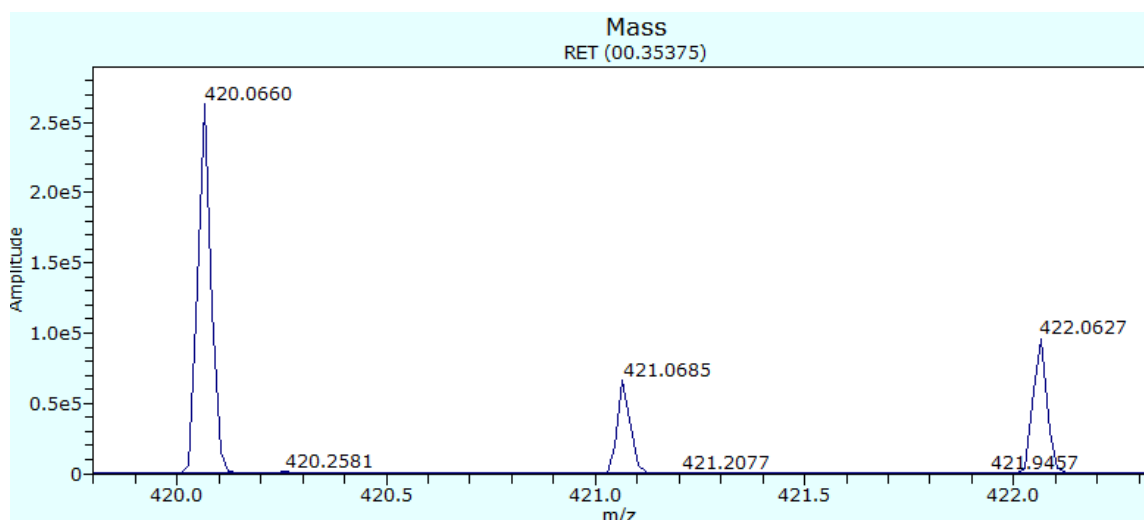
12.204. Espectro de RMN ^1H del compuesto **9c**.



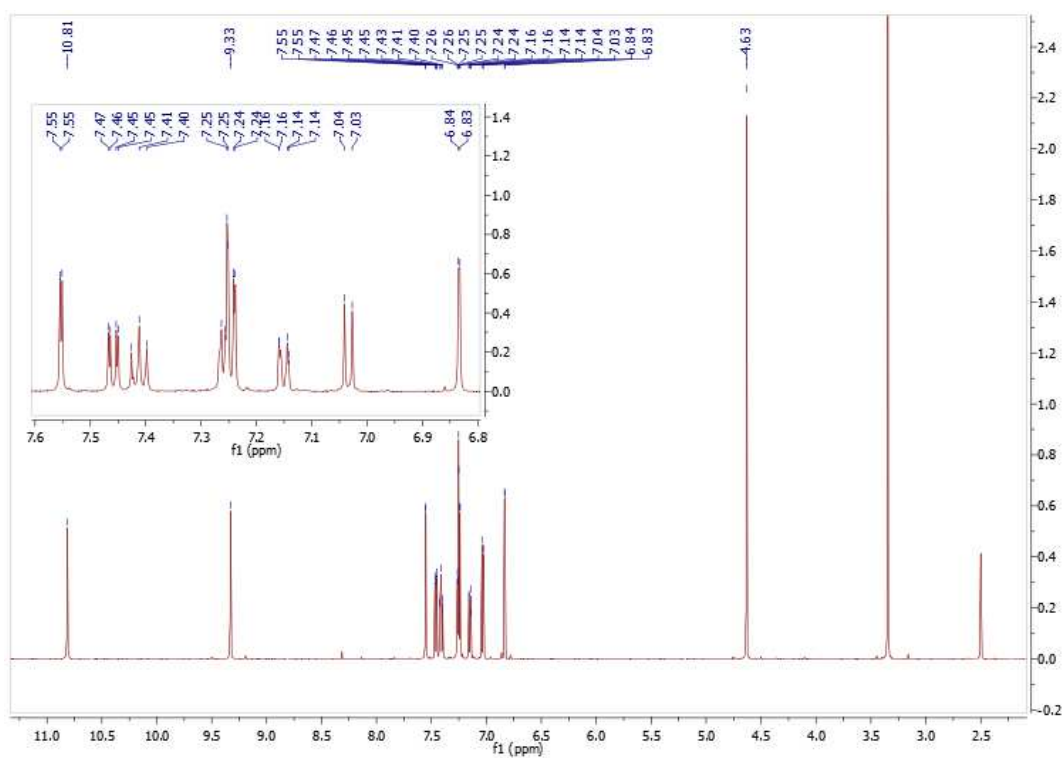
12.205. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **9c**.



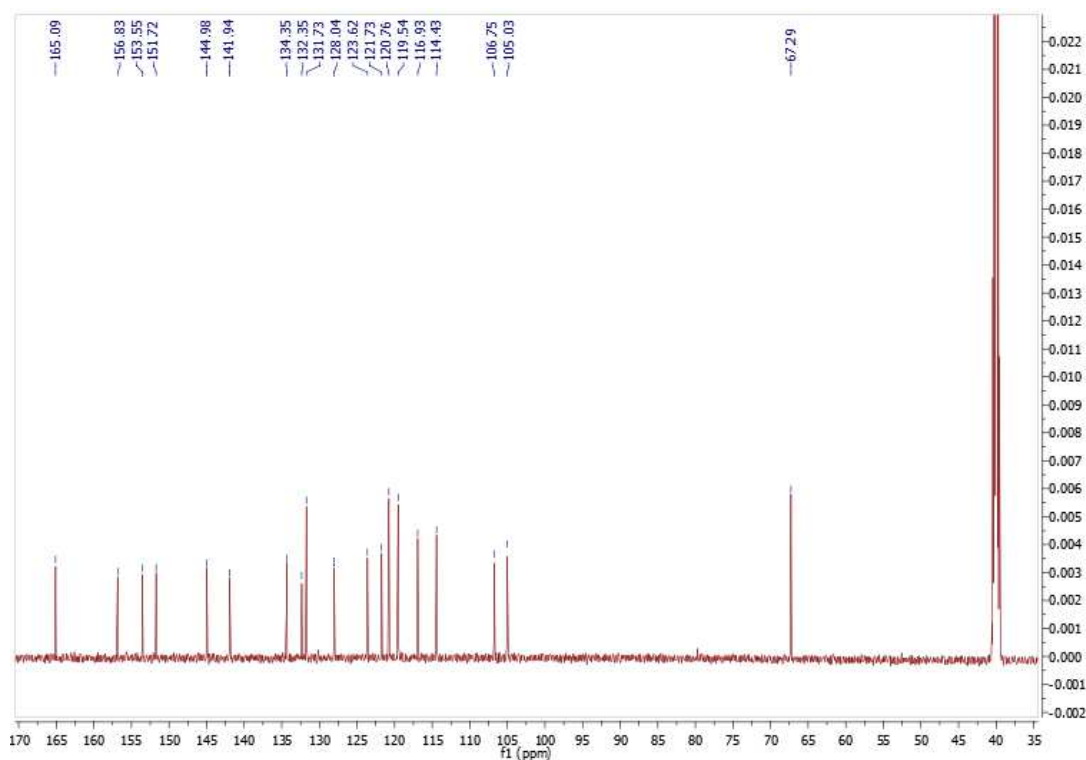
12.206. Espectro de EM-APCI del compuesto **9c**.



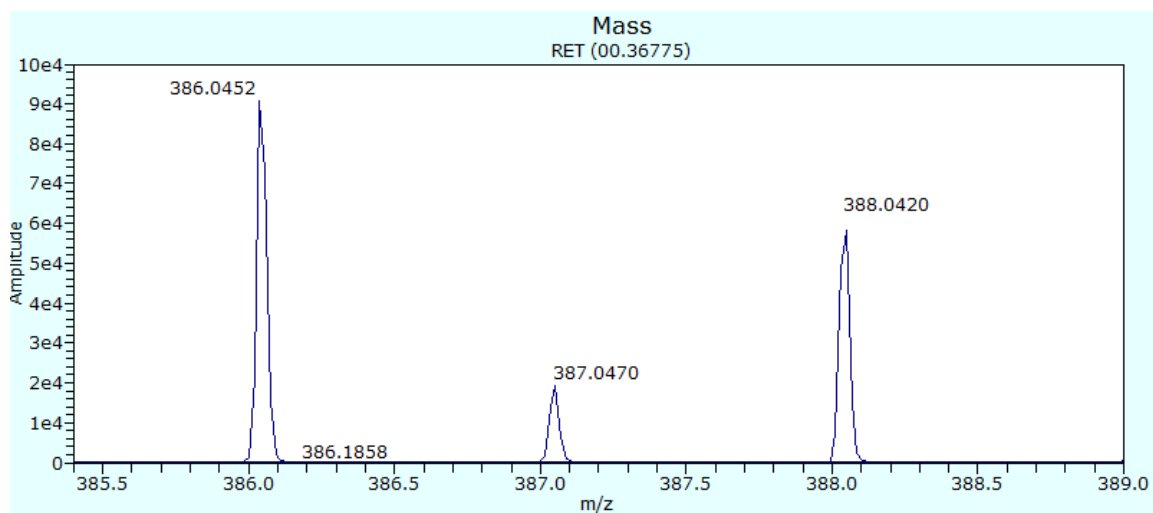
12.207. Espectro de RMN ^1H del compuesto **9d**.



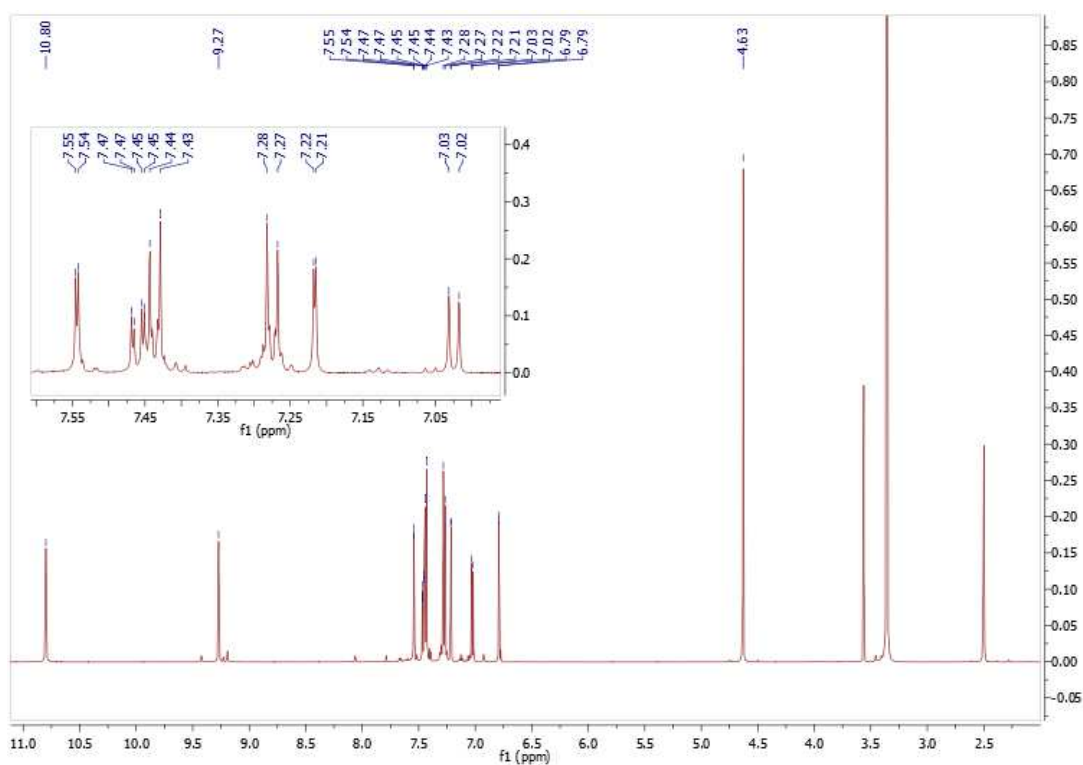
12.208. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **9d**.



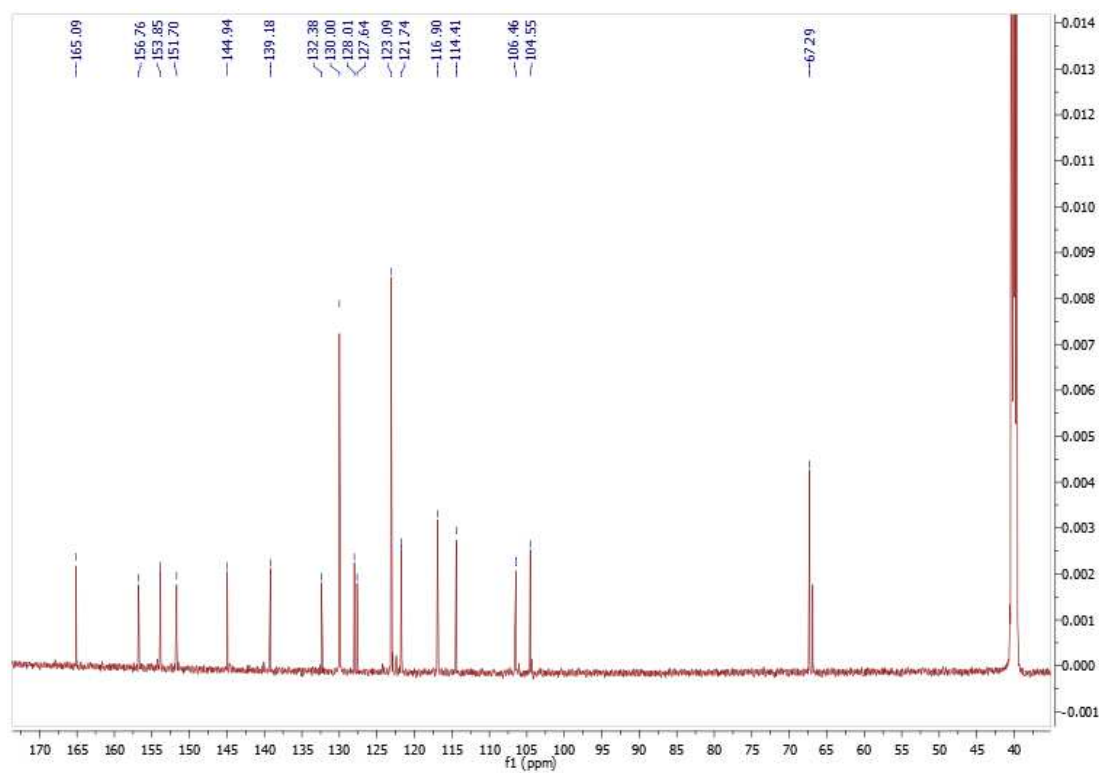
12.209. Espectro de EM-APCI del compuesto **9d**.



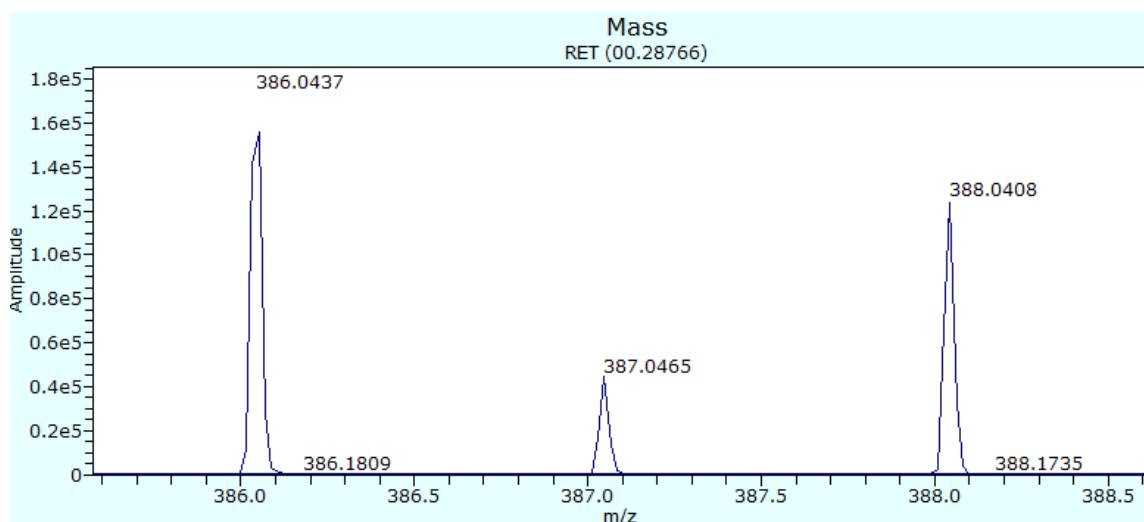
12.210. Espectro de RMN ^1H del compuesto **9e**.



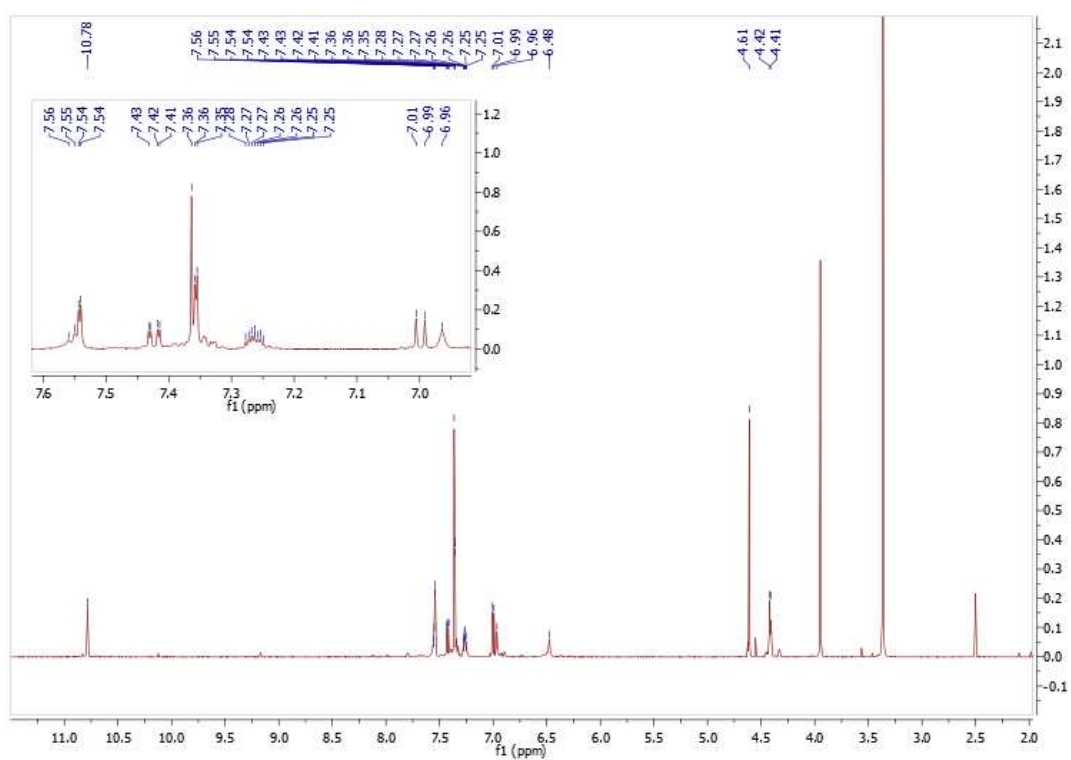
12.211. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **9e**.



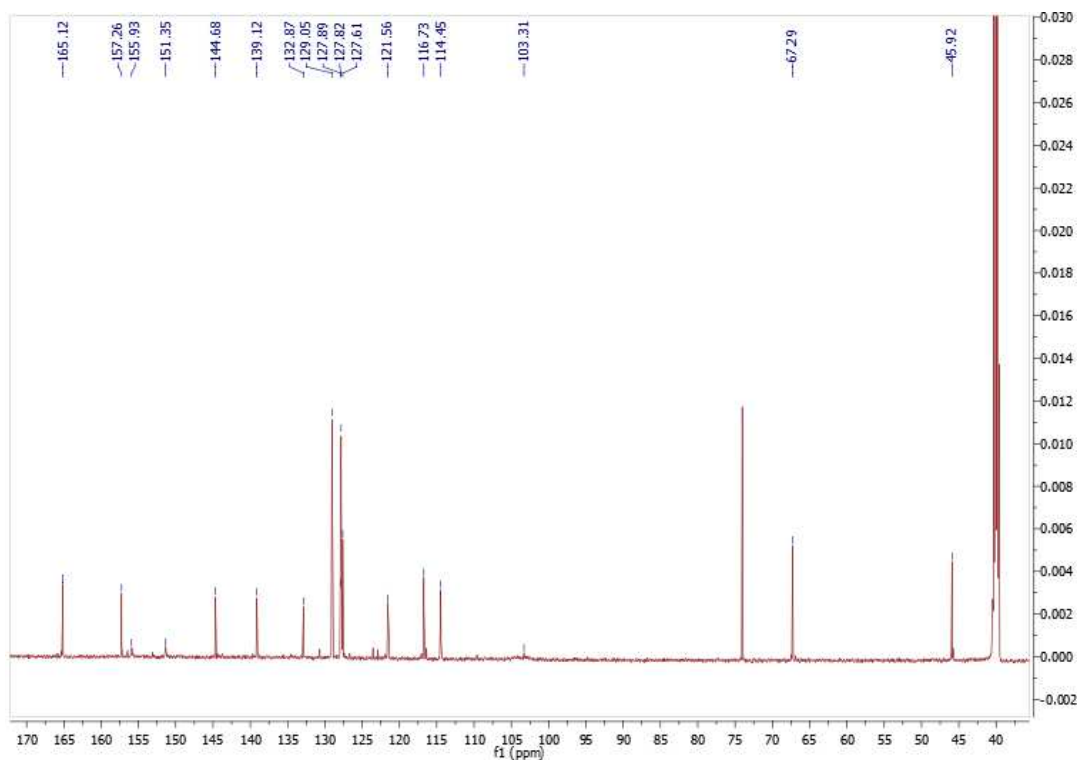
12.212. Espectro EM-APCI del compuesto **9e**.



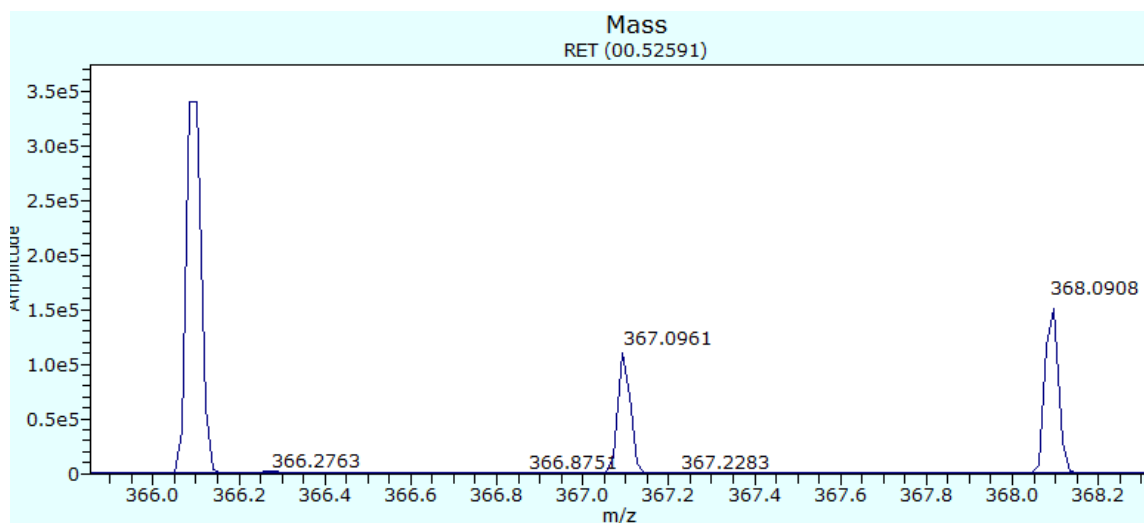
12.213. Espectro de RMN ^1H del compuesto **9f**.



12.214. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **9f**.

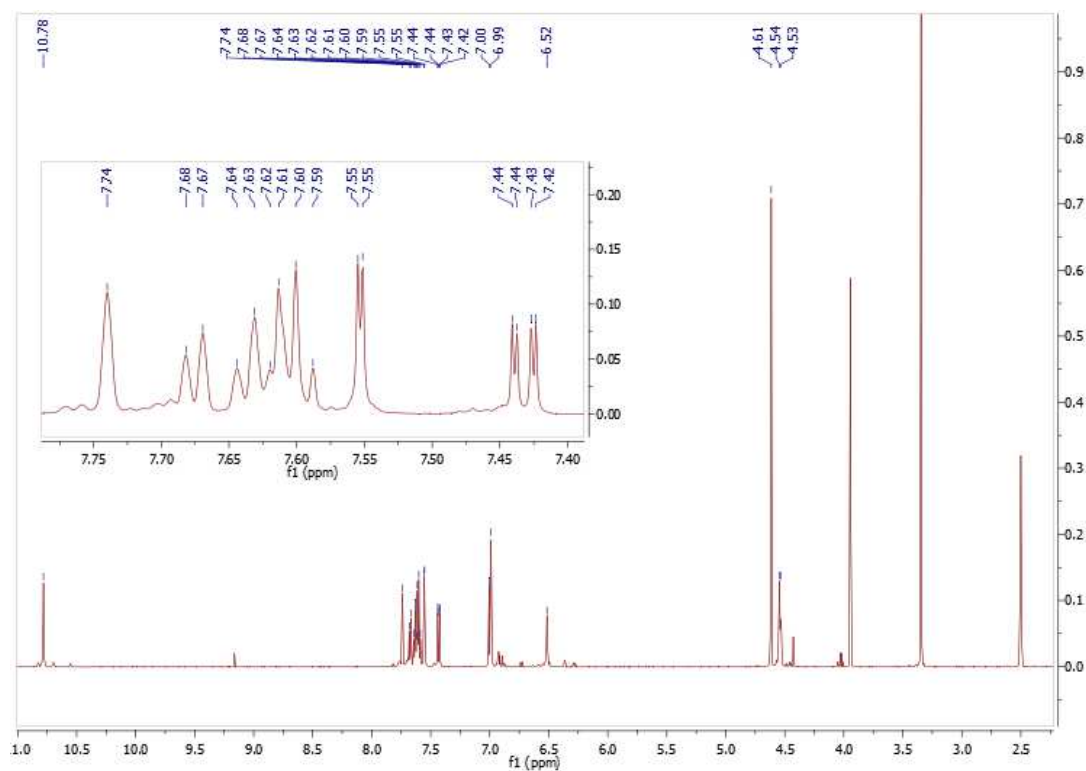


12.215. Espectro EM-APCI del compuesto **9f**.

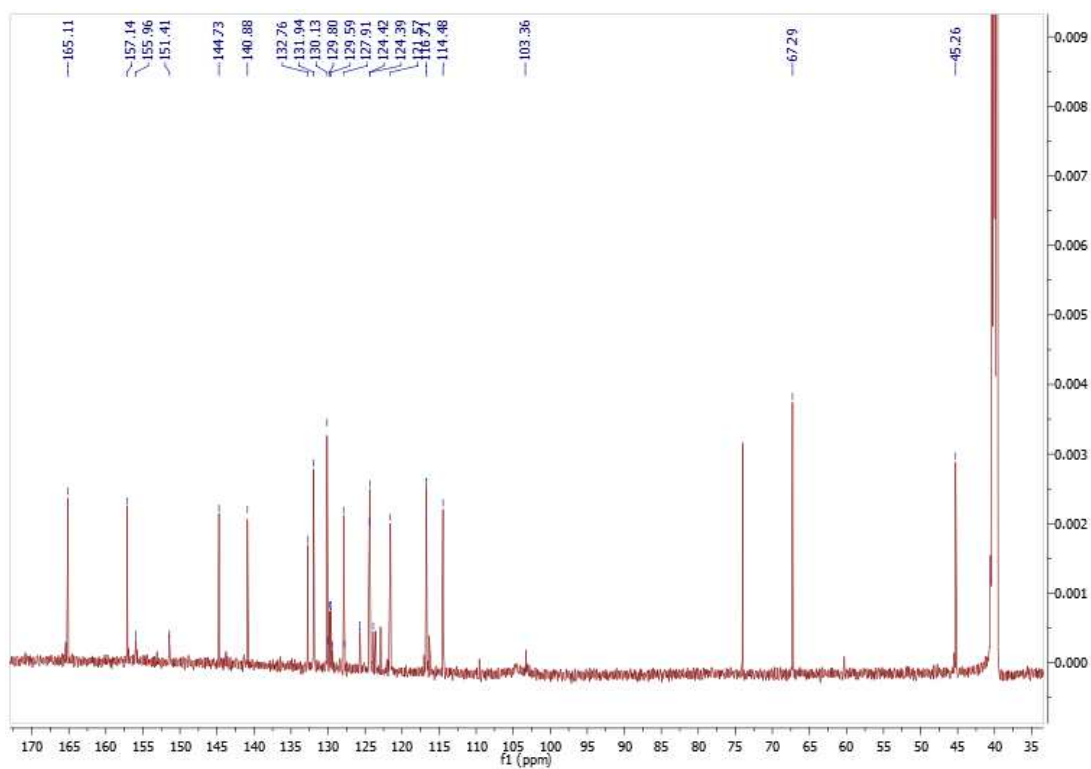


	Cntrd m/z	Max Ampl m/z	Charge	Mono Mass	Average Mass	Width (m/z)	Res. Power	Noise
174	365.8123	365.8136	0	0.0000	0.0000	0.0608	6021.07	8.44
175	366.0940	366.0938	0	0.0000	0.0000	0.0352	10386.68	8.44

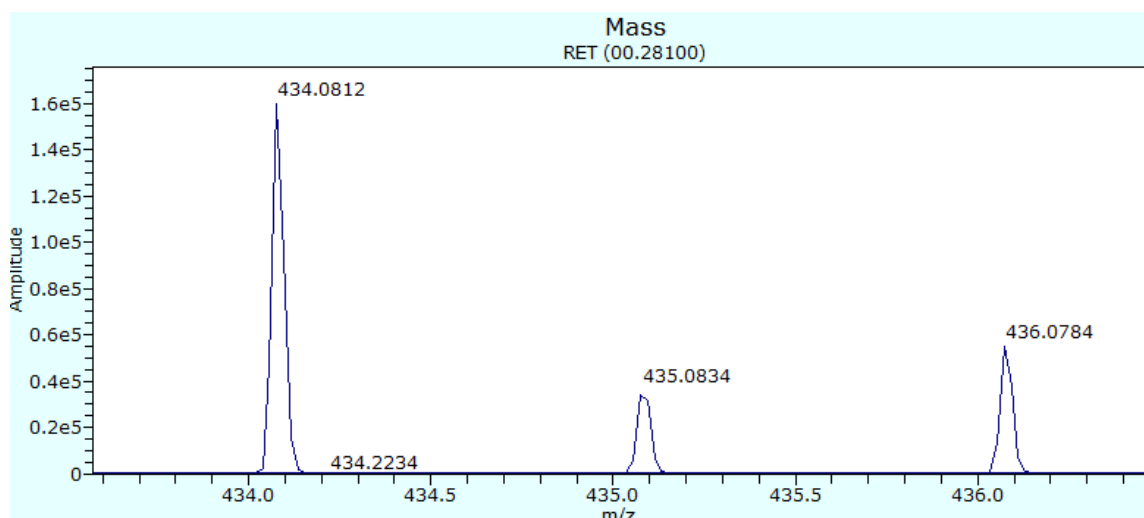
12.216. Espectro de RMN ^1H del compuesto **9g**.



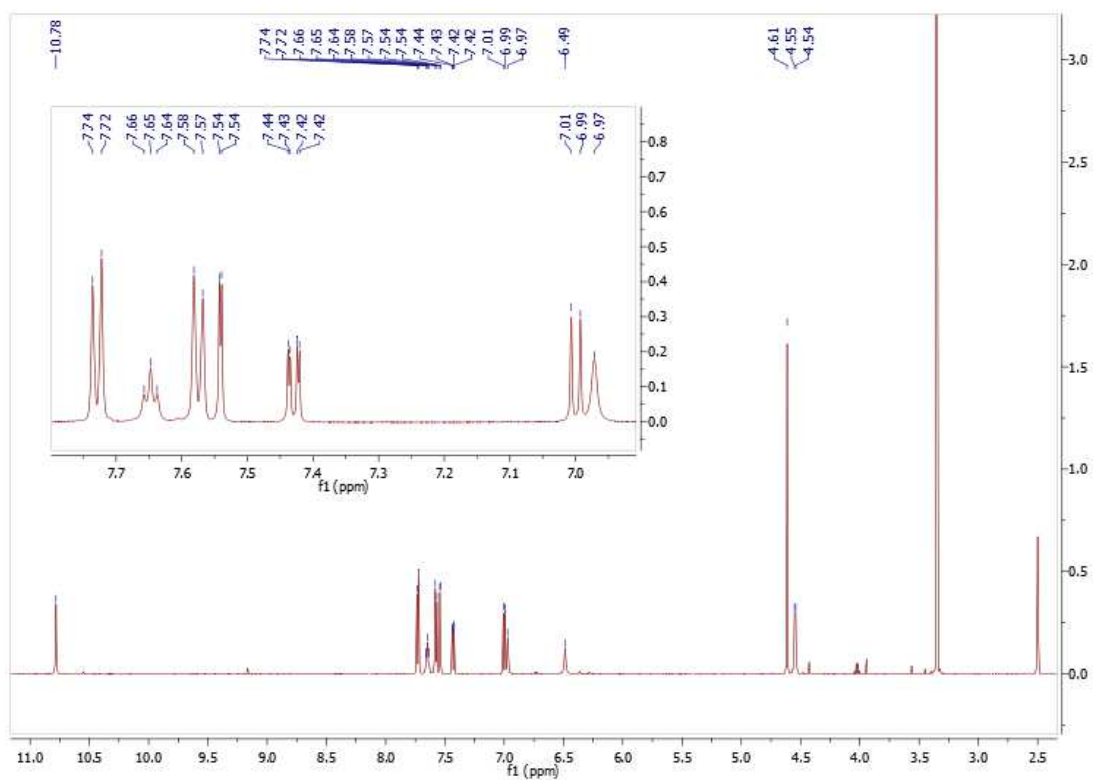
12.217. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **9g**.



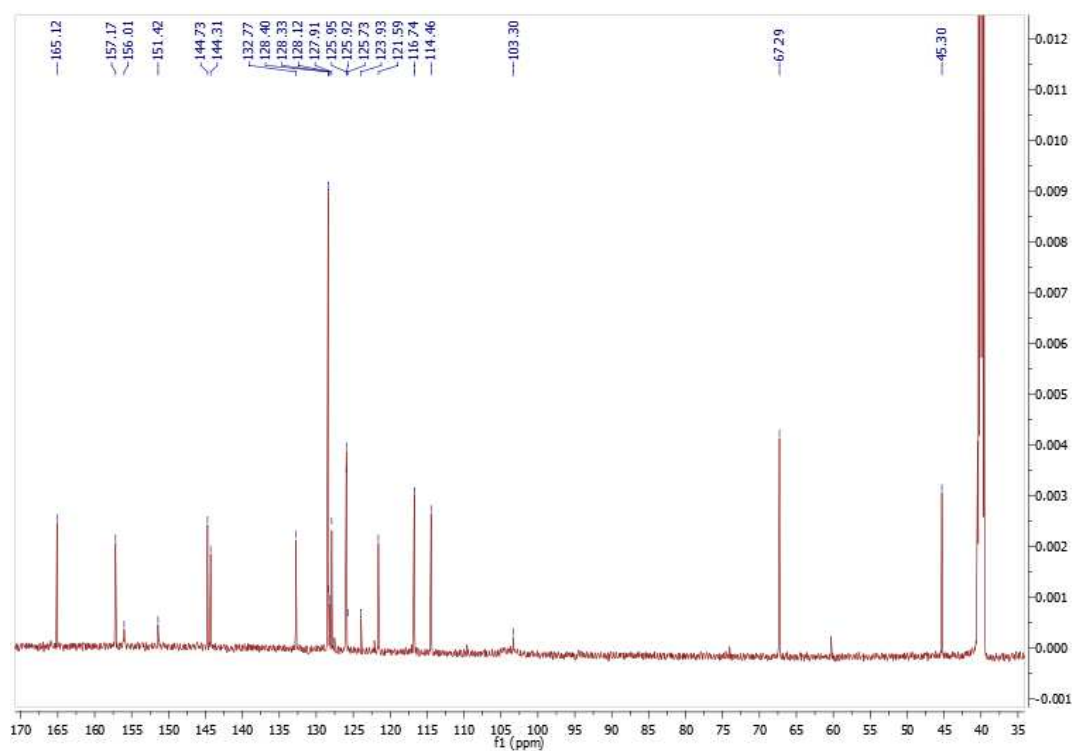
12.218. Espectro EM-APCI del compuesto **9g**.



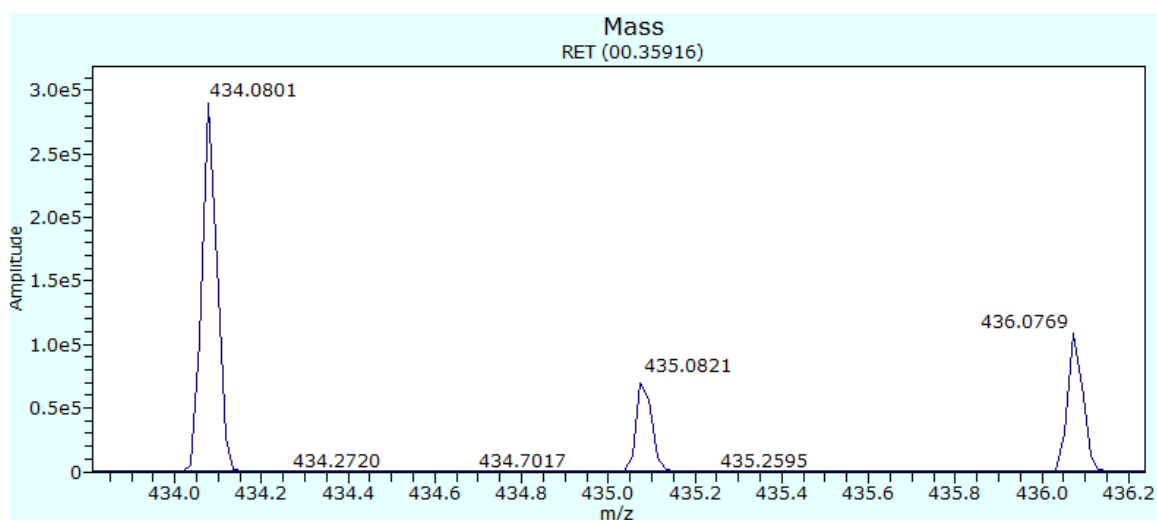
12.219. Espectro de RMN ¹H del compuesto **9h**.



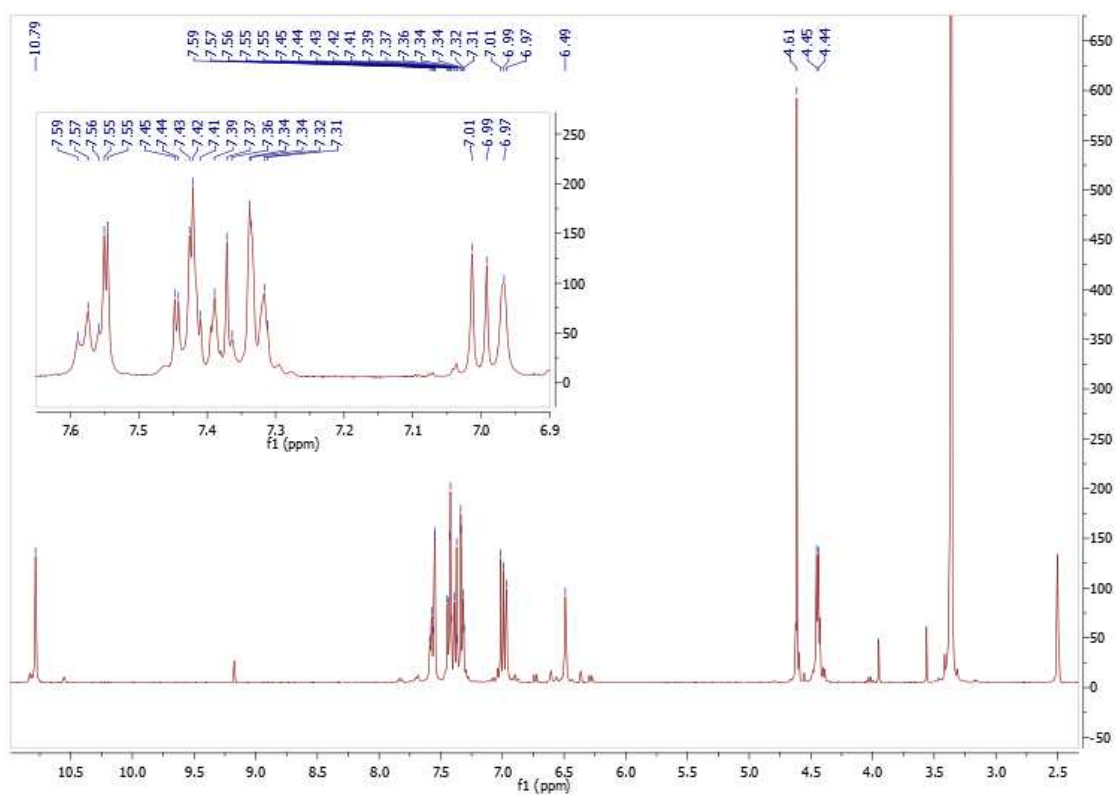
12.220. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **9h**.



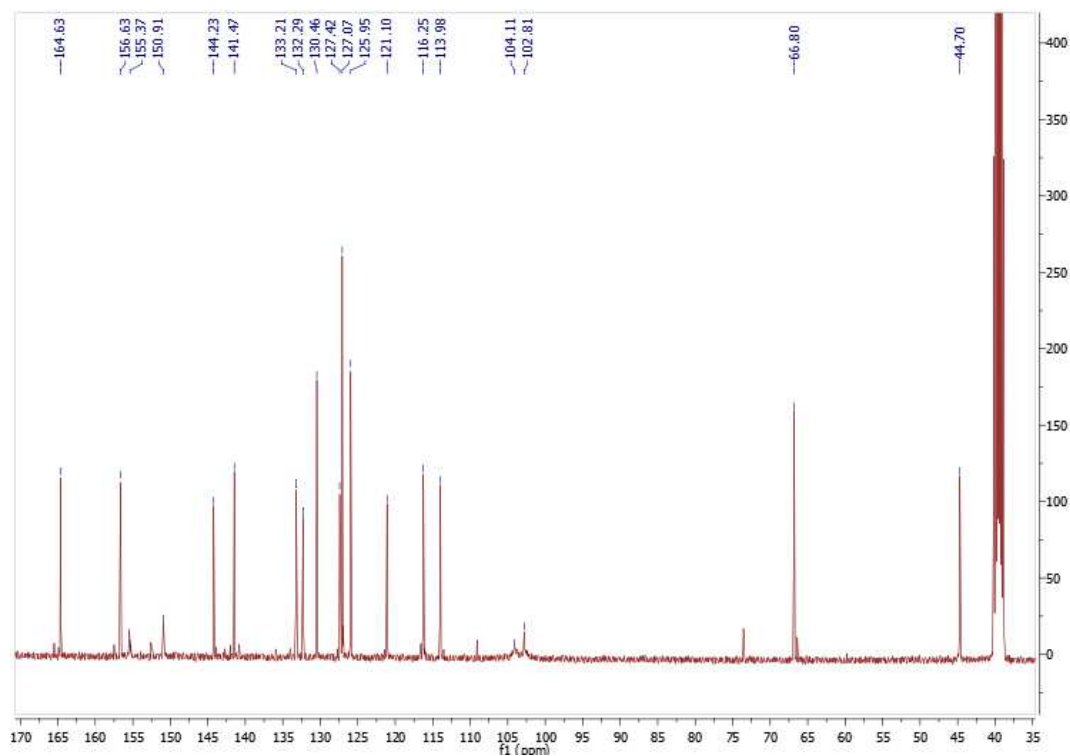
12.221. Espectro de EM-APCI del compuesto **9h**.



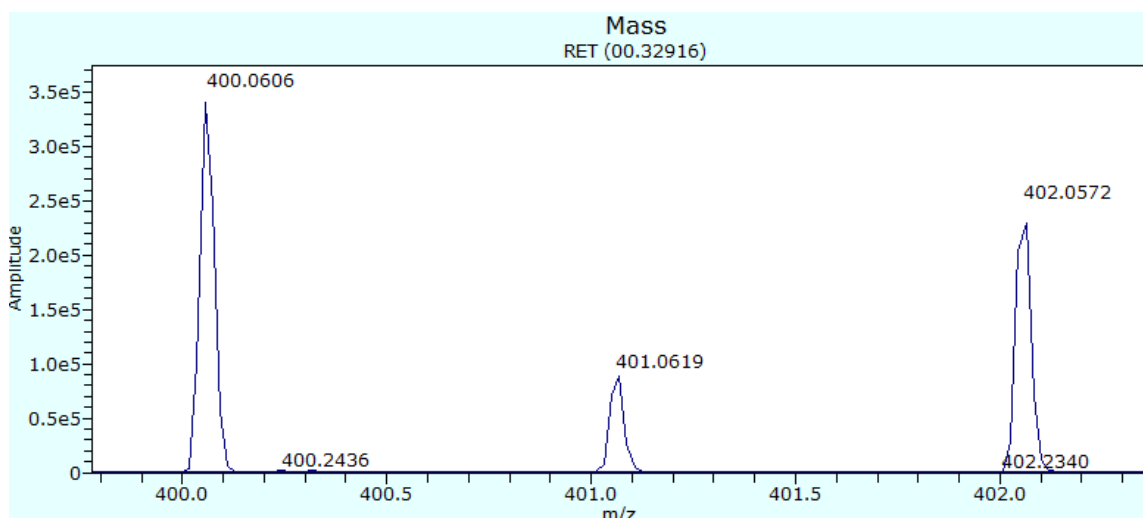
12.222. Espectro de RMN ^1H del compuesto **9i**.



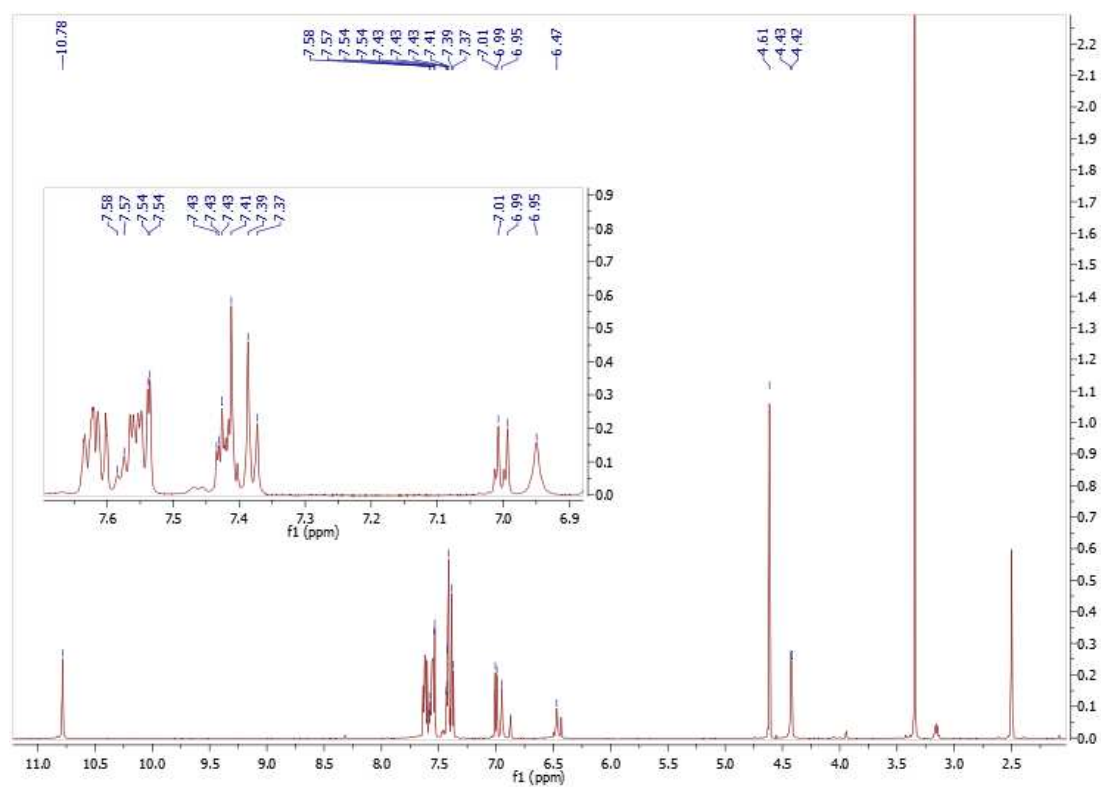
12.223. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **9i**.



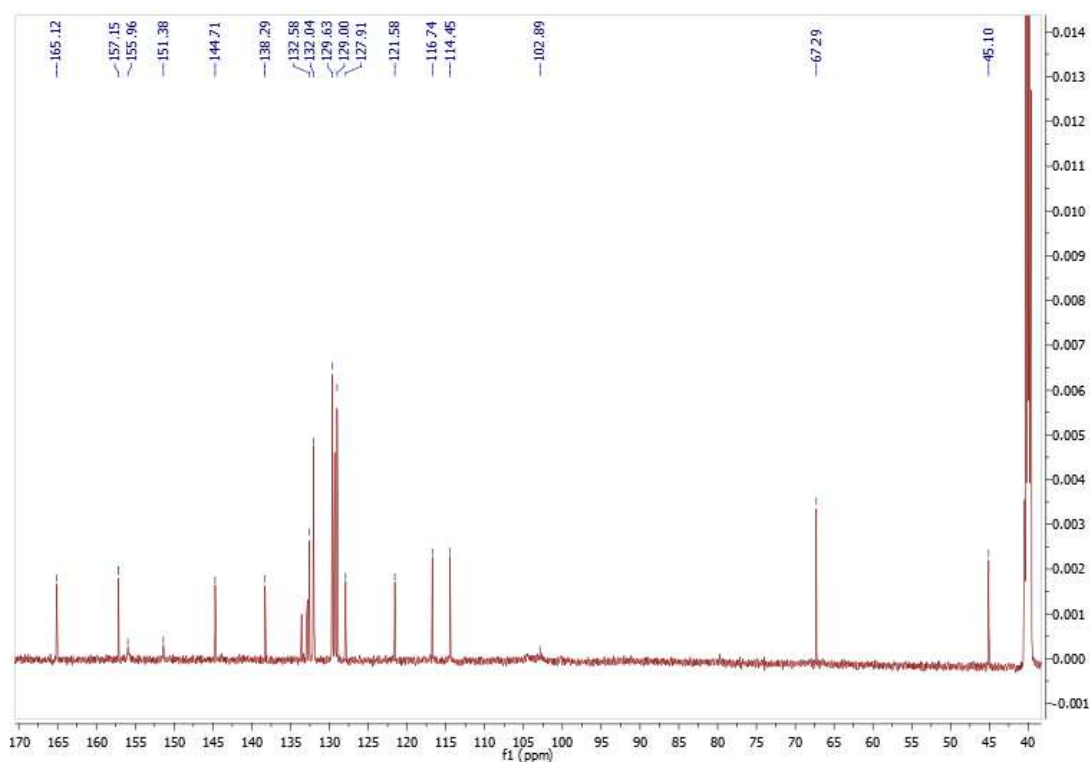
12.224. Espectro EM-APCI del compuesto **9i**.



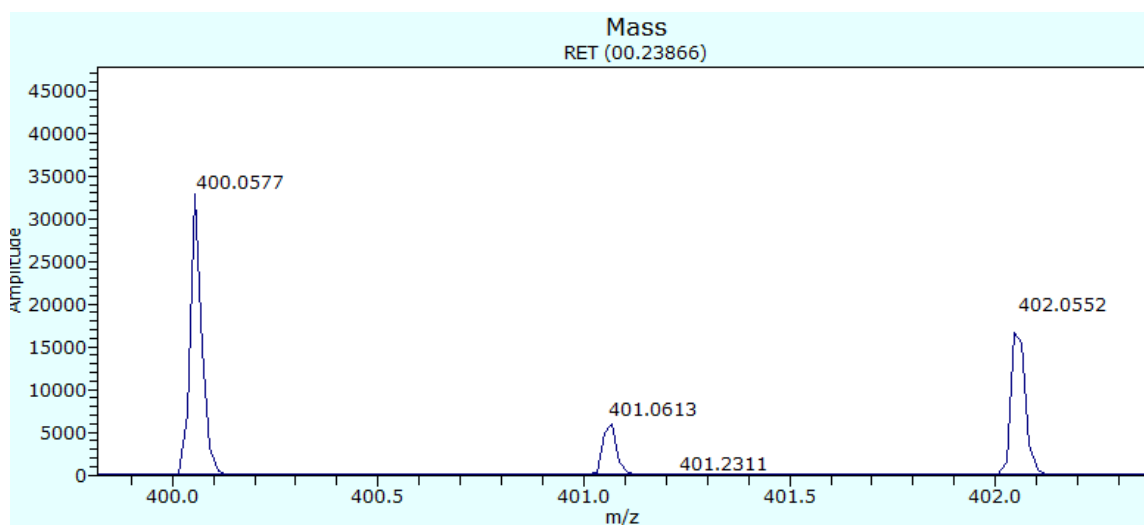
12.225. Espectro de RMN ^1H del compuesto **9j**.



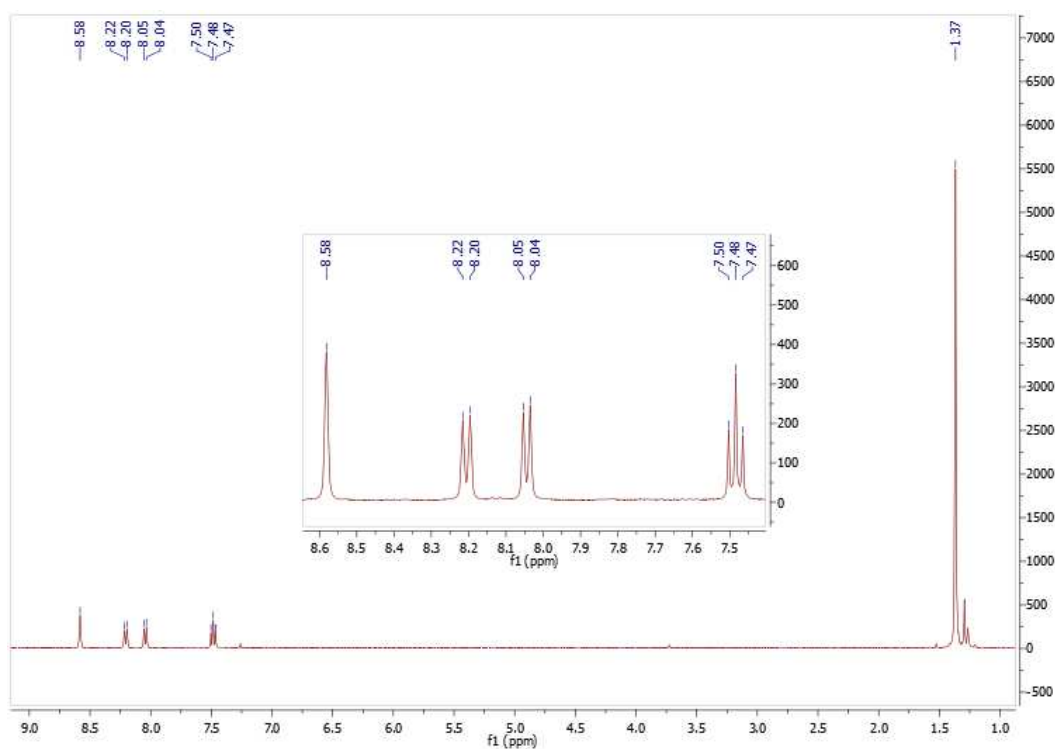
12.226. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **9j**.



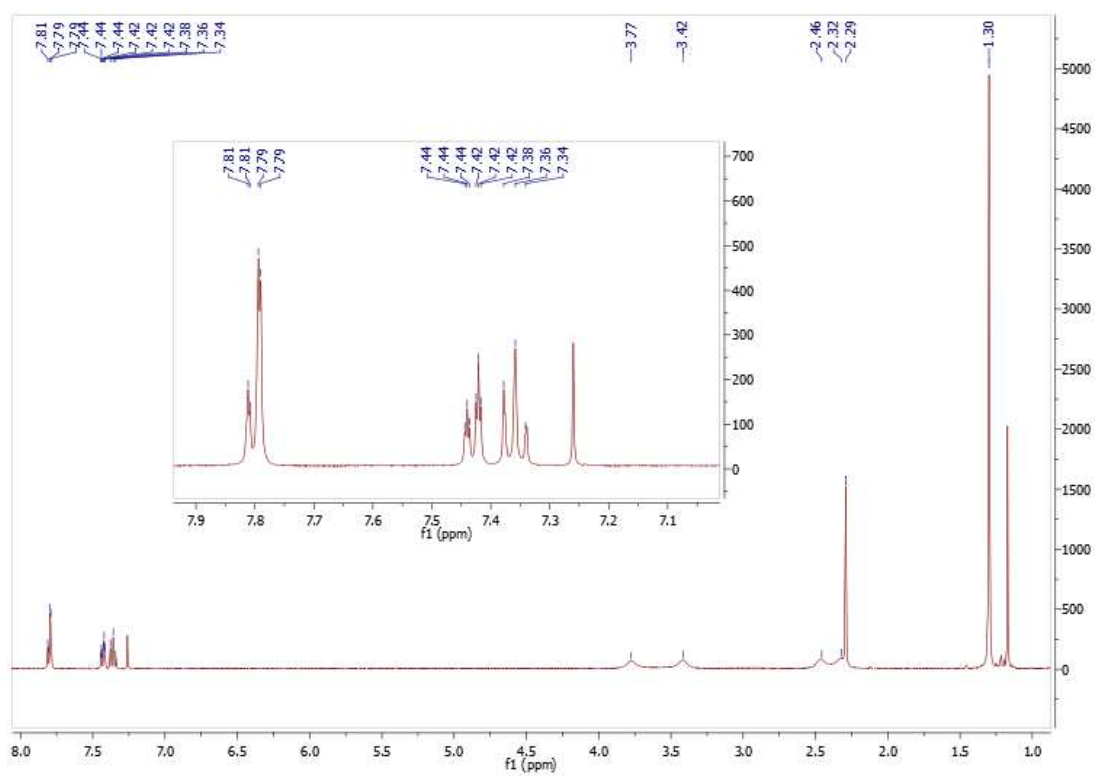
12.227. Espectro EM-APCI del compuesto **9j**.



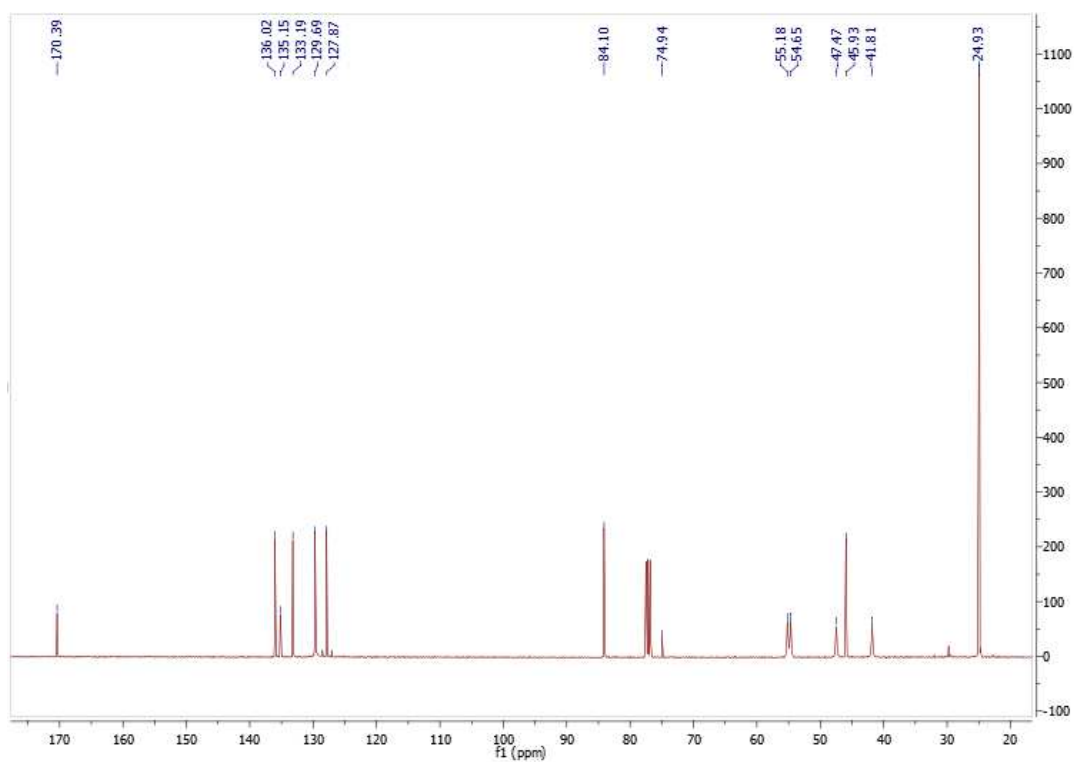
12.228. Espectro de RMN ^1H del compuesto 11.



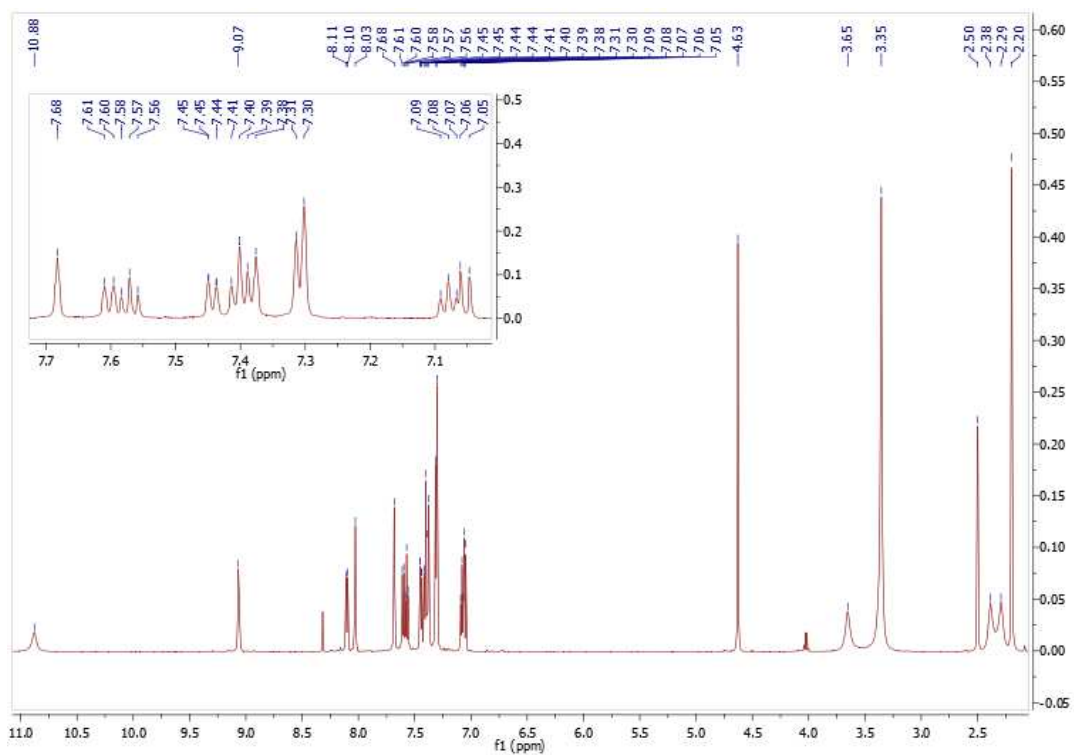
12.229. Espectro de RMN ^1H del intermediario 12.



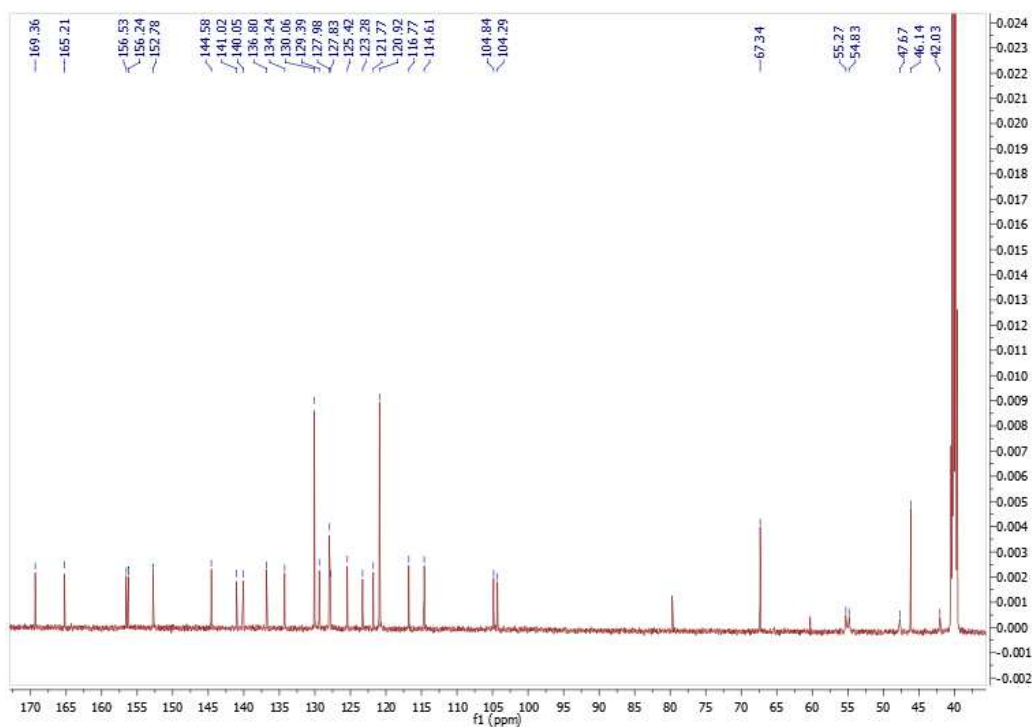
12.230. Espectro de RMN ^{13}C del intermediario **12**.



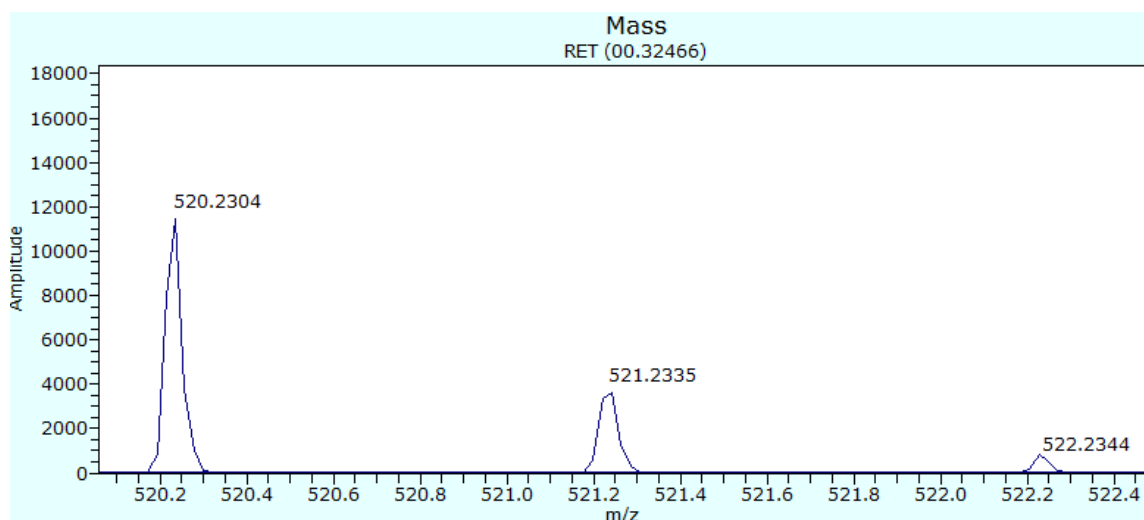
12.231. Espectro de RMN ^1H del compuesto final **13a**.



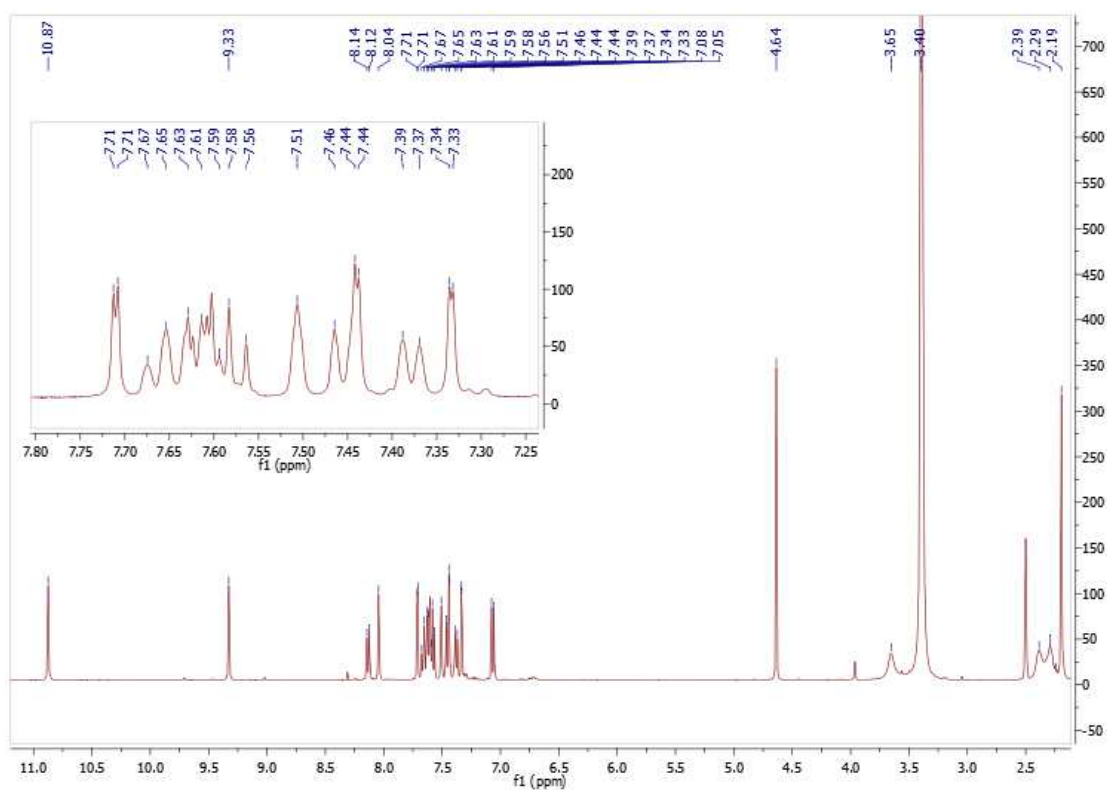
12.232. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto final **13a**.



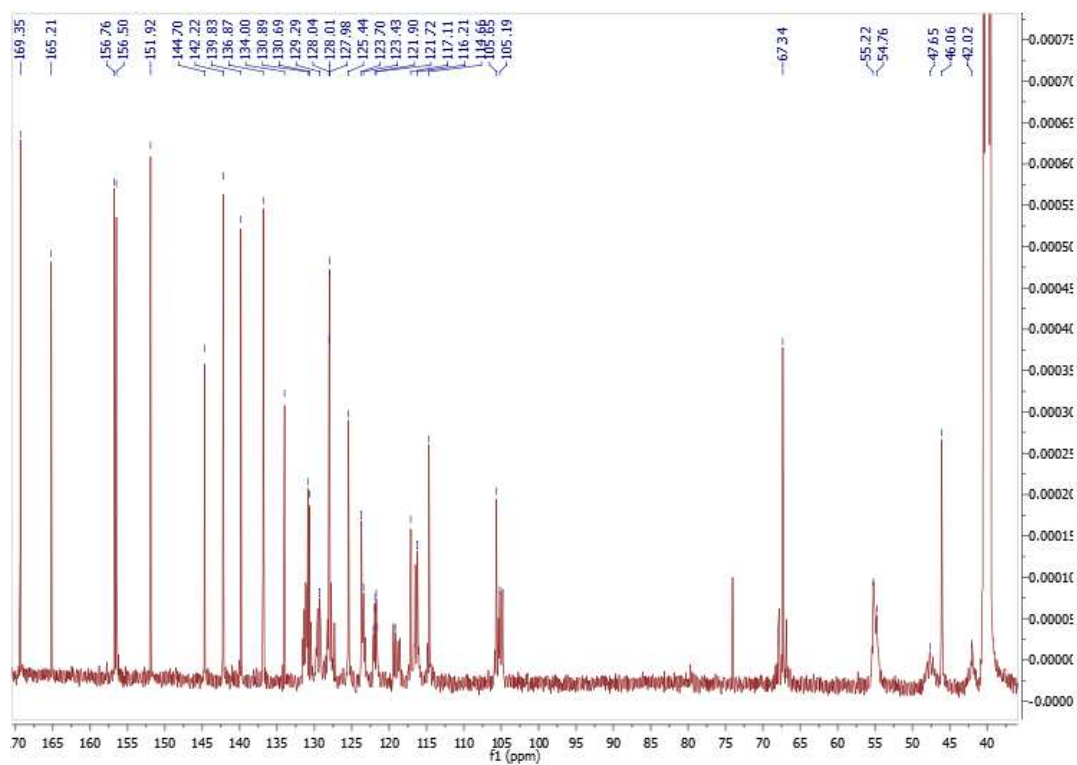
12.233. Espectro EM-APCI del compuesto final **13a**.



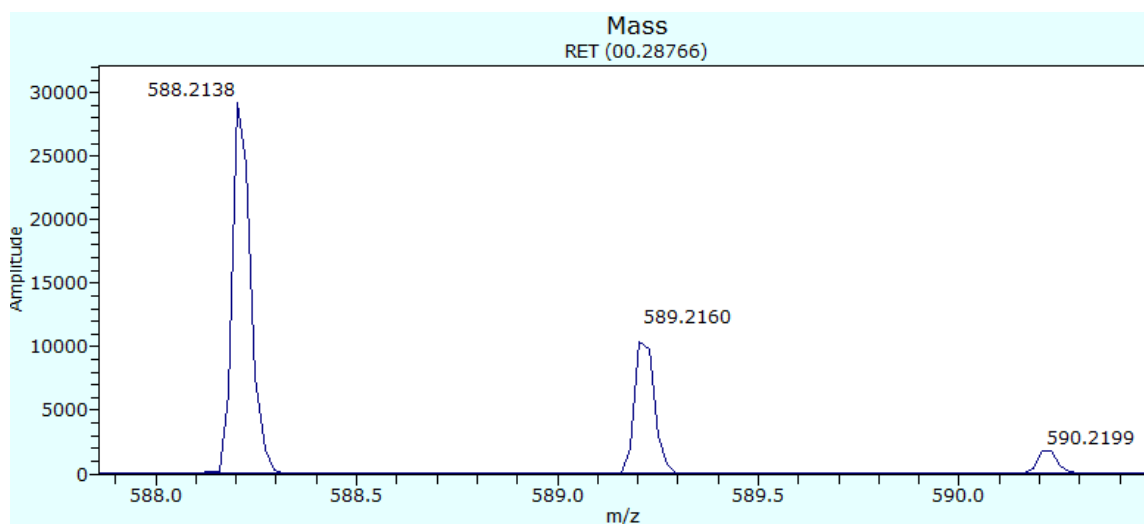
12.234. Espectro de RMN ^1H del compuesto final **13b**.



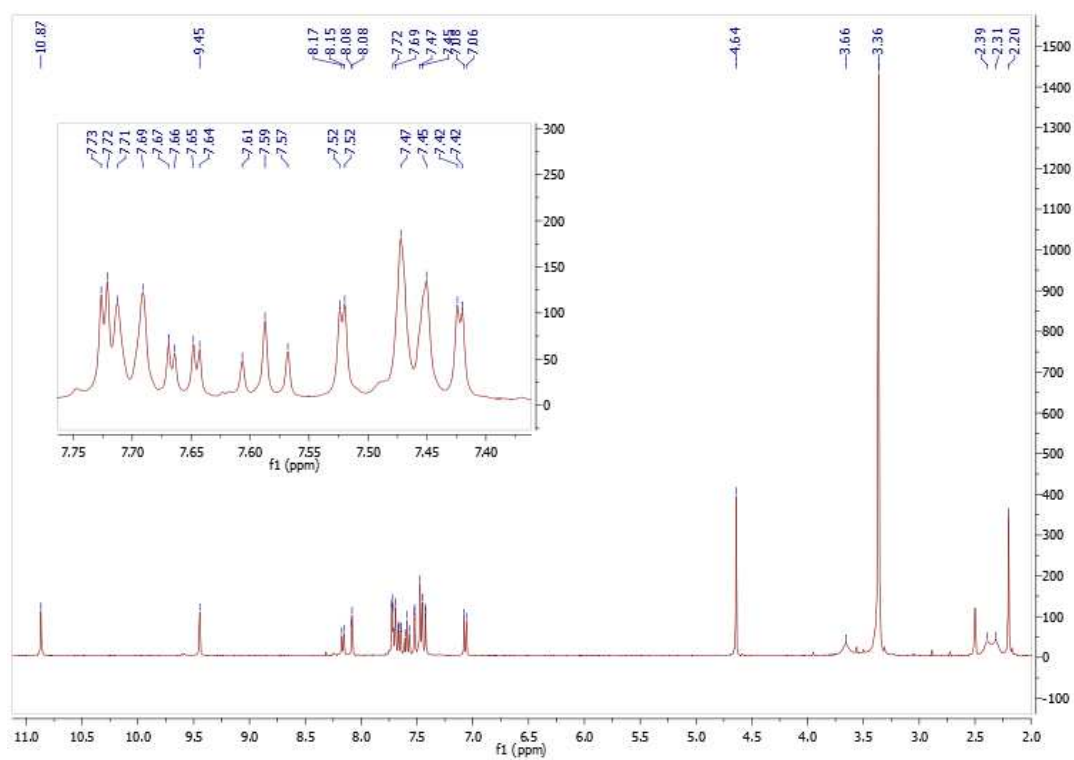
12.235. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto final **13b**.



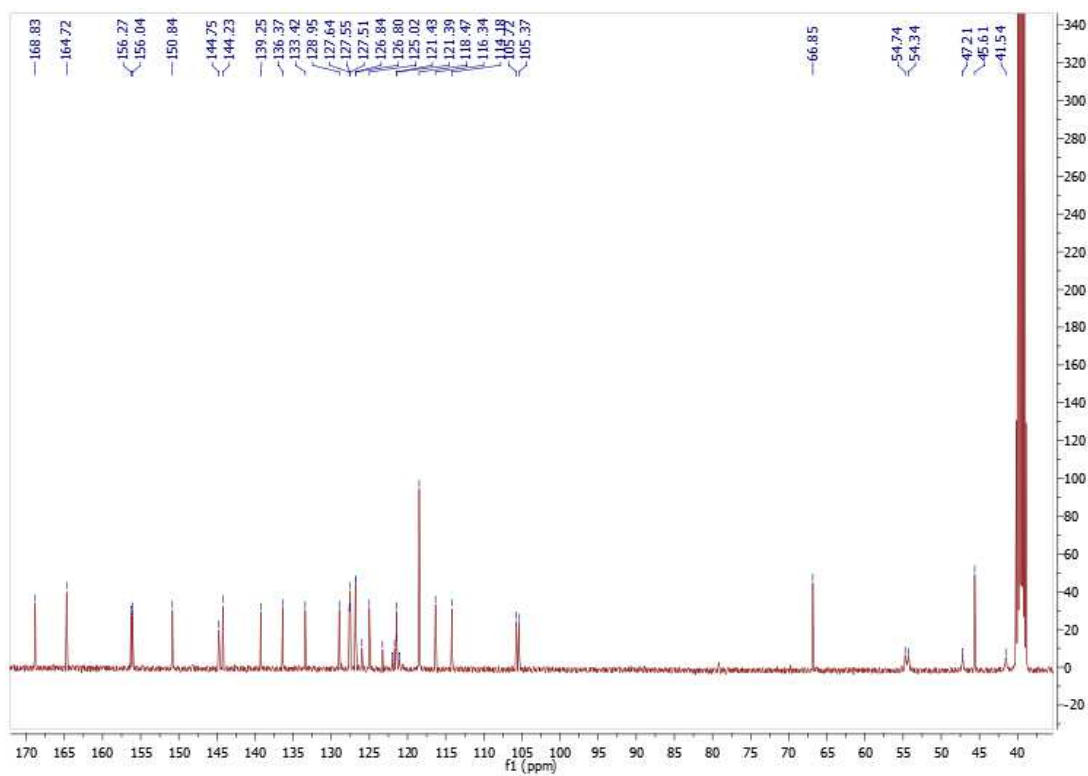
12.236. Espectro EM-APCI del compuesto final **13b**.



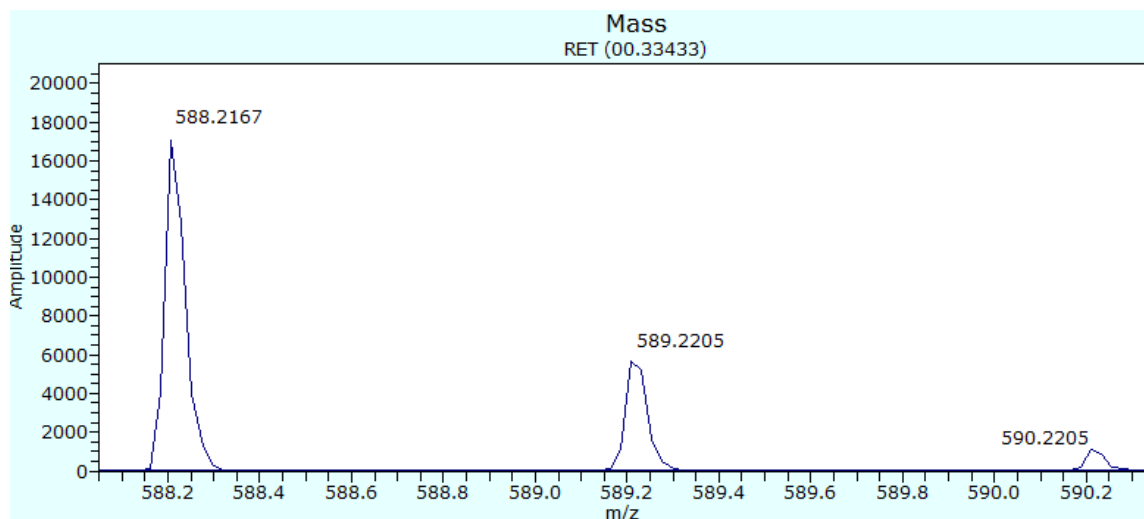
12.237. Espectro de RMN ^1H del compuesto final **13c**.



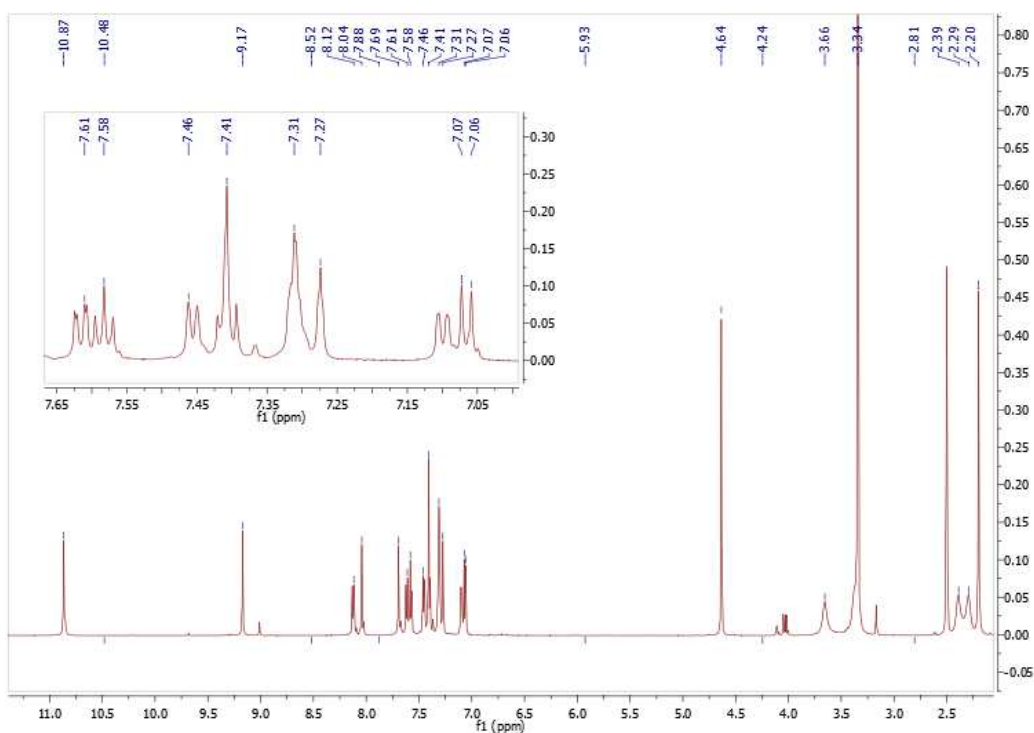
12.238. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto final **13c**.



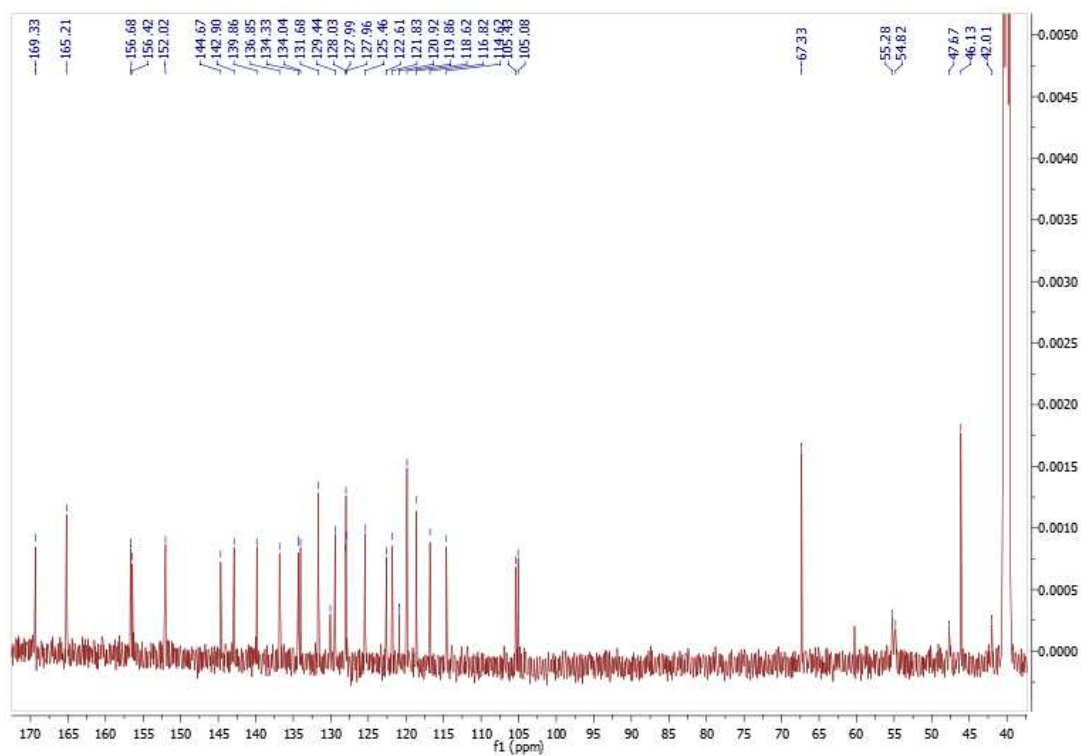
12.239. Espectro EM-APCI del compuesto final **13c**.



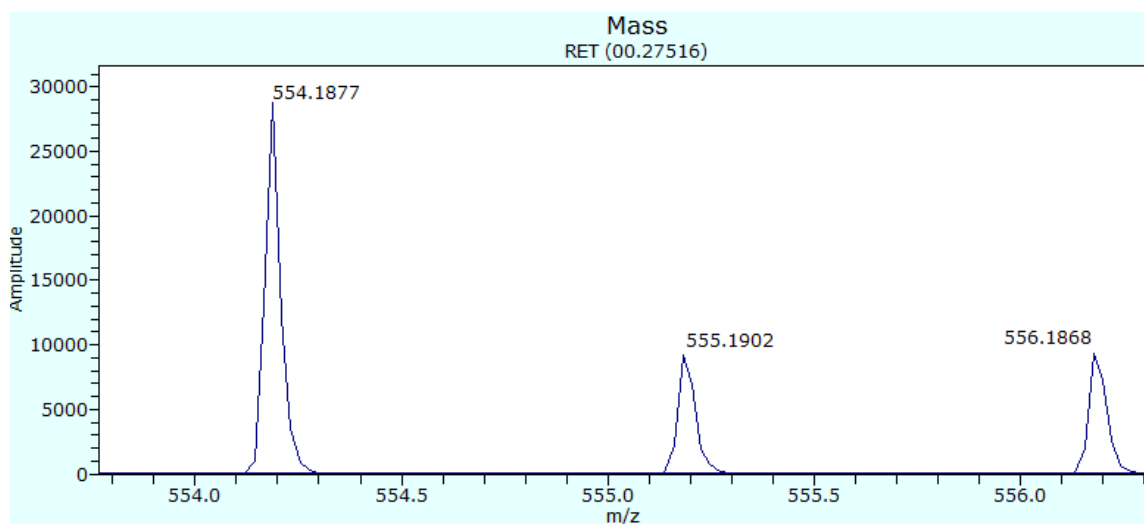
12.240. Espectro de RMN ^1H del compuesto final **13d**.



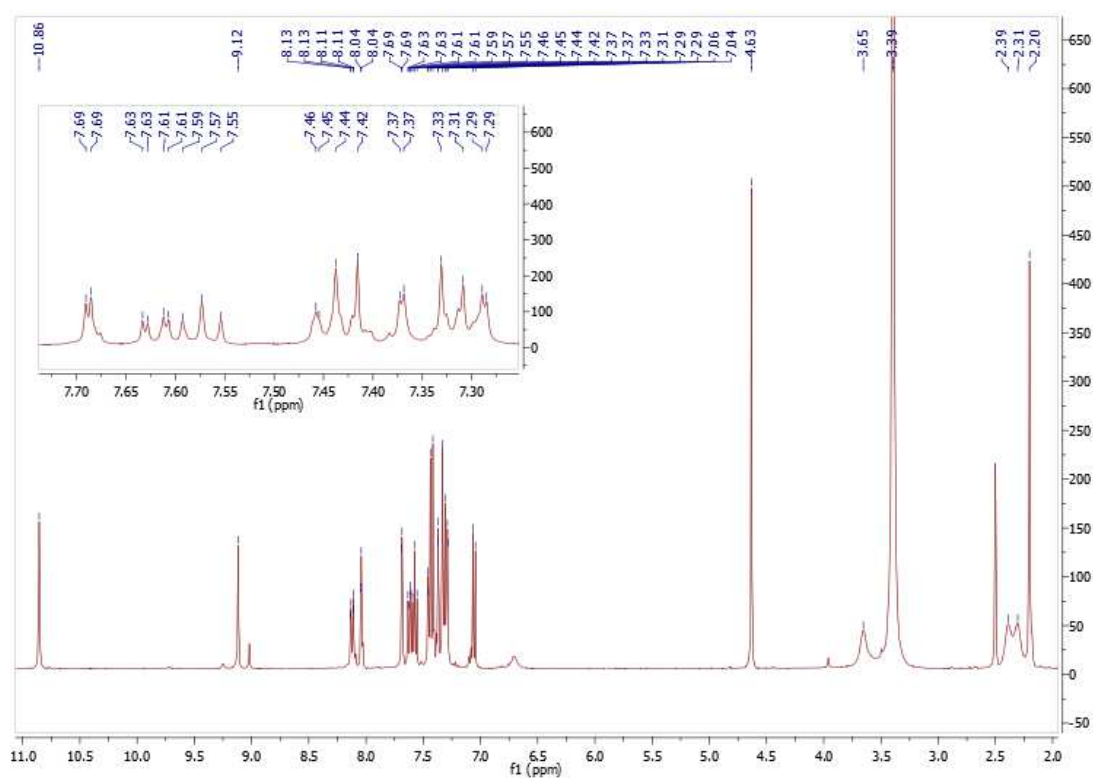
12.241. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto final **13d**.



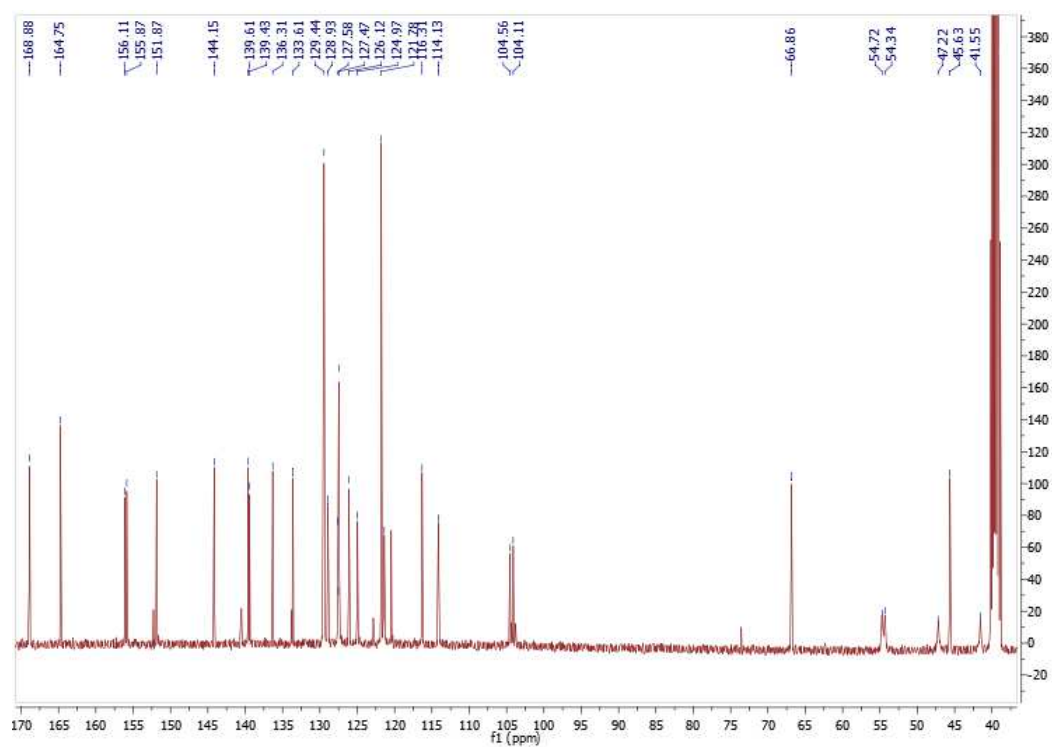
12.242. Espectro EM-APCI del compuesto final **13d**.



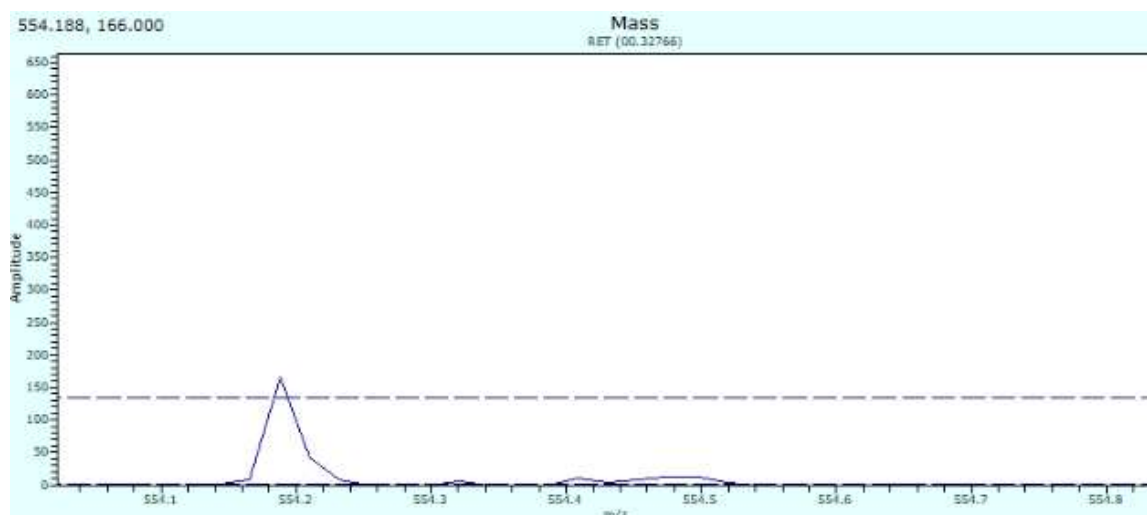
12.243. Espectro de RMN ^1H del compuesto final **13e**.



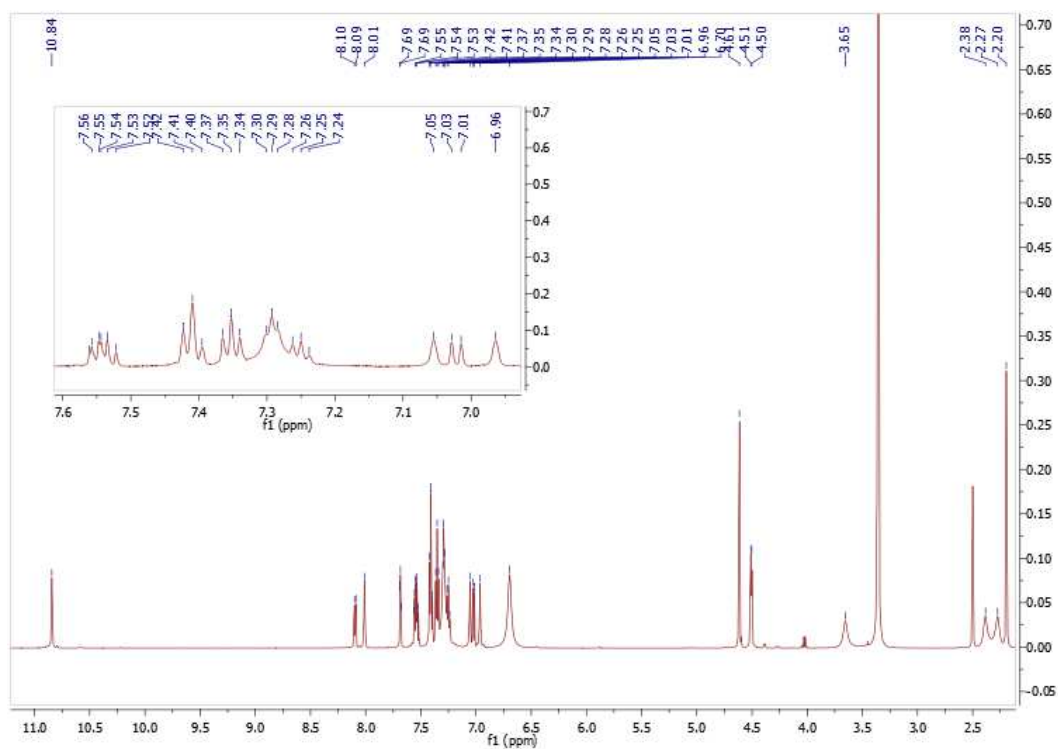
12.244. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto final **13e**.



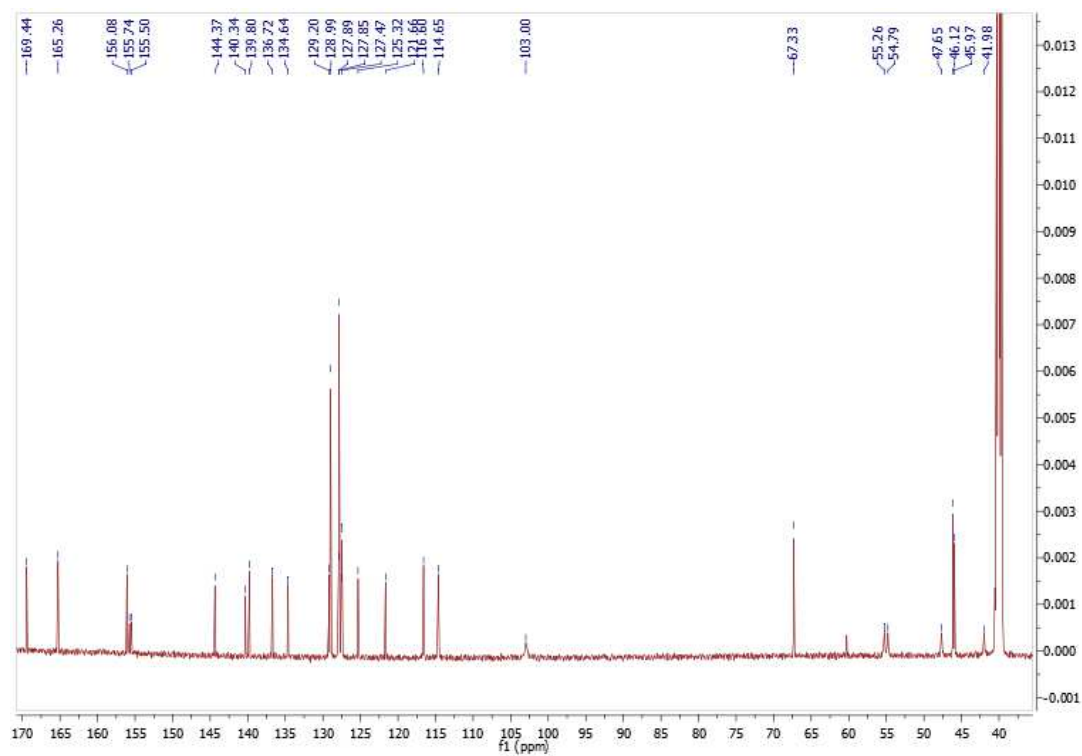
12.245. Espectro EM-APCI del compuesto final **13e**.



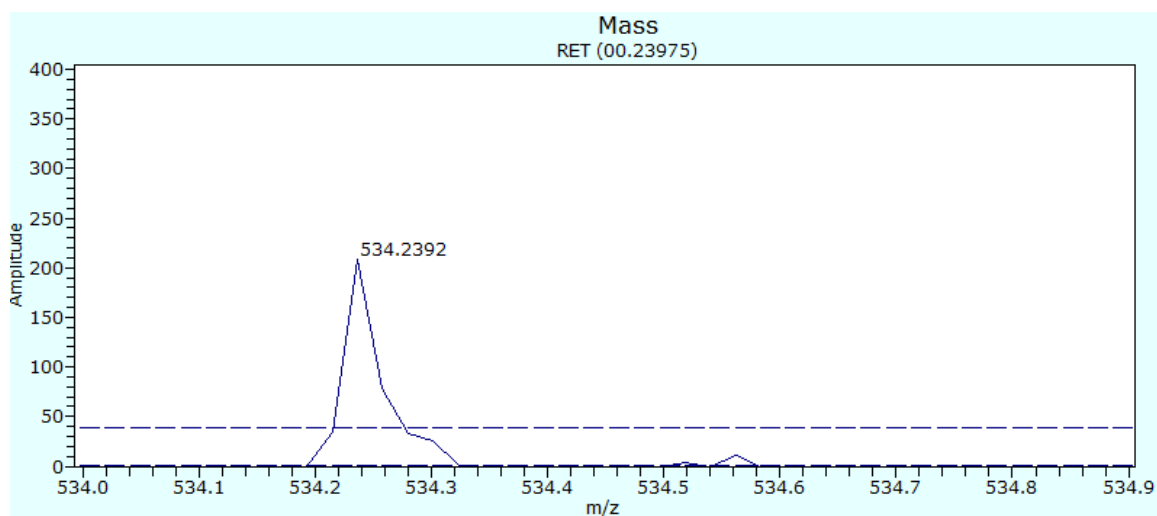
12.246. Espectro de RMN ^1H del compuesto final **13f**.



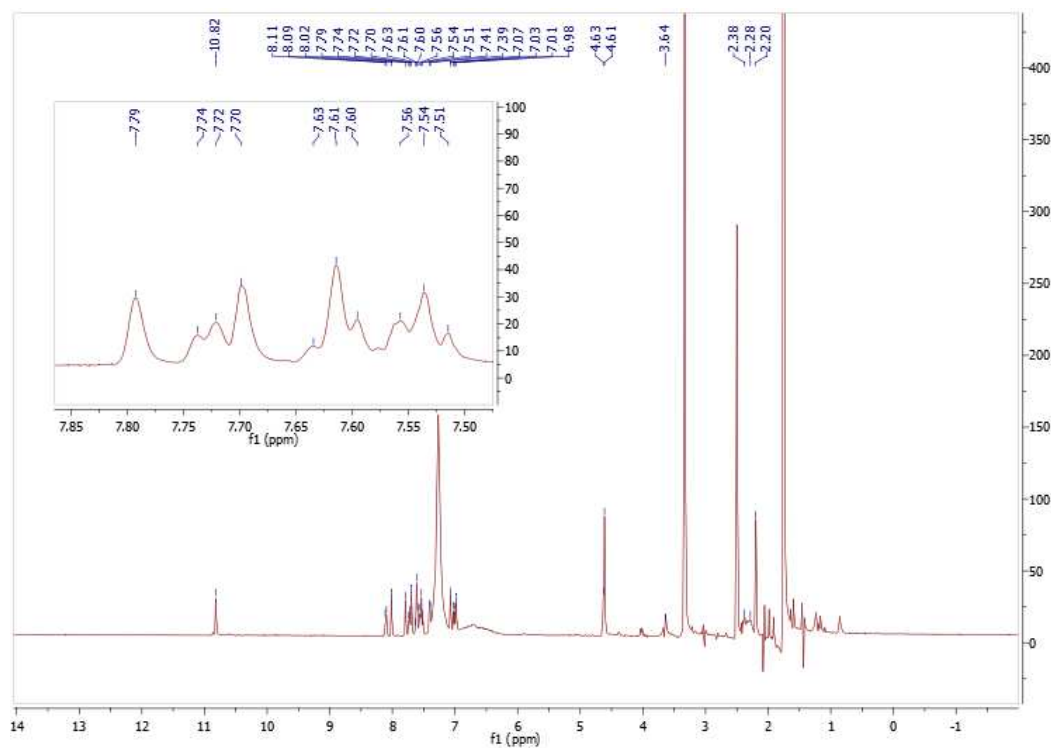
12.247. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto final **13f**.



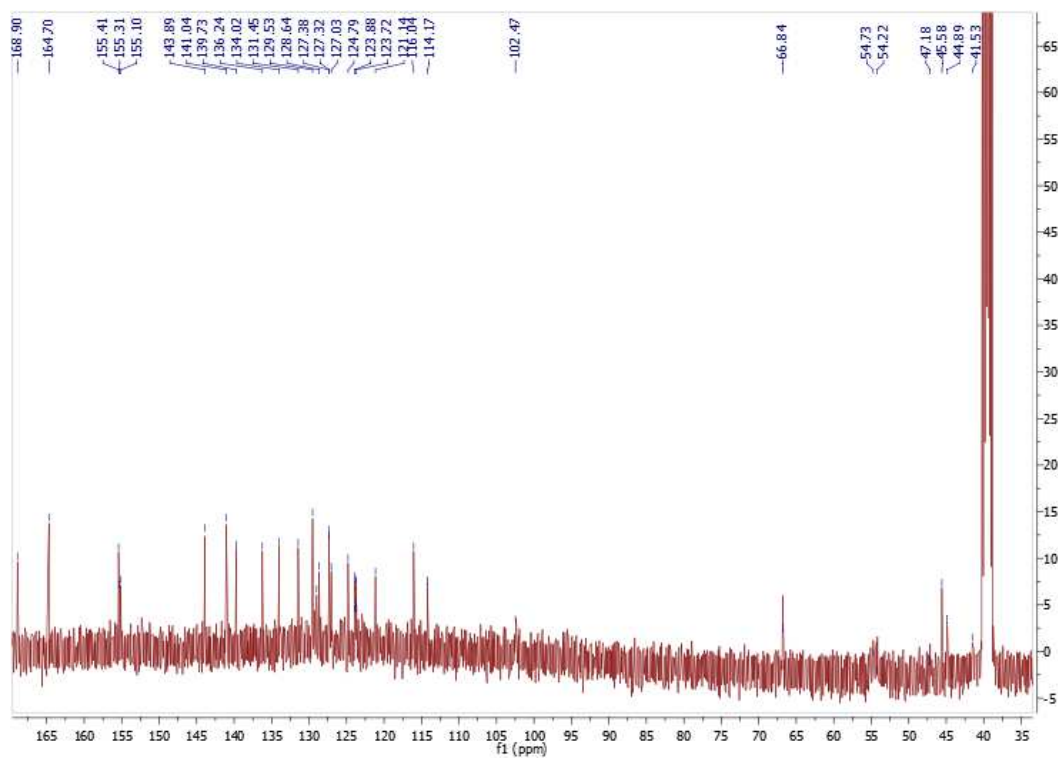
12.248. Espectro EM-APCI del compuesto final 13f.



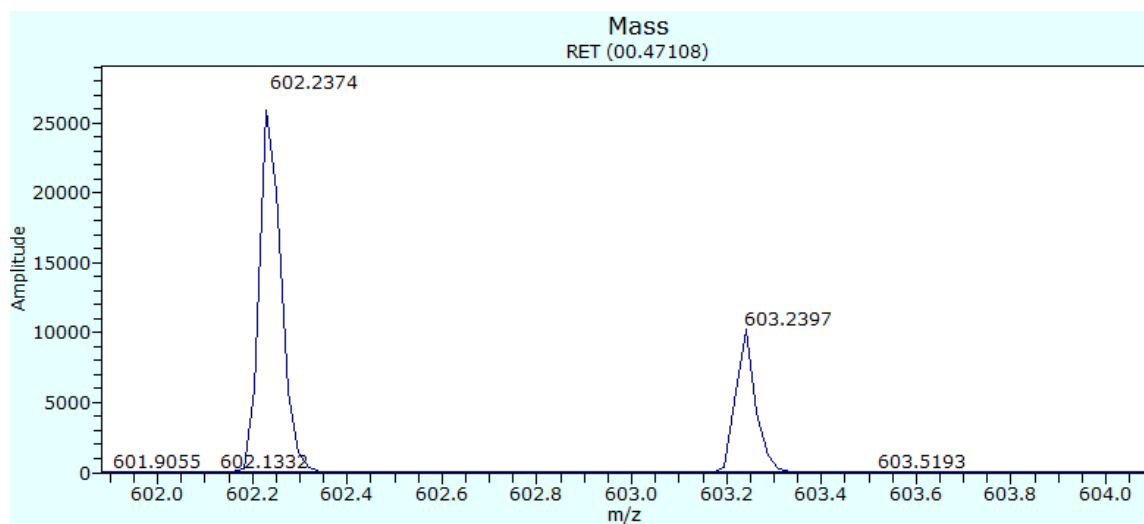
12.249. Espectro de RMN ¹H del compuesto final 13g.



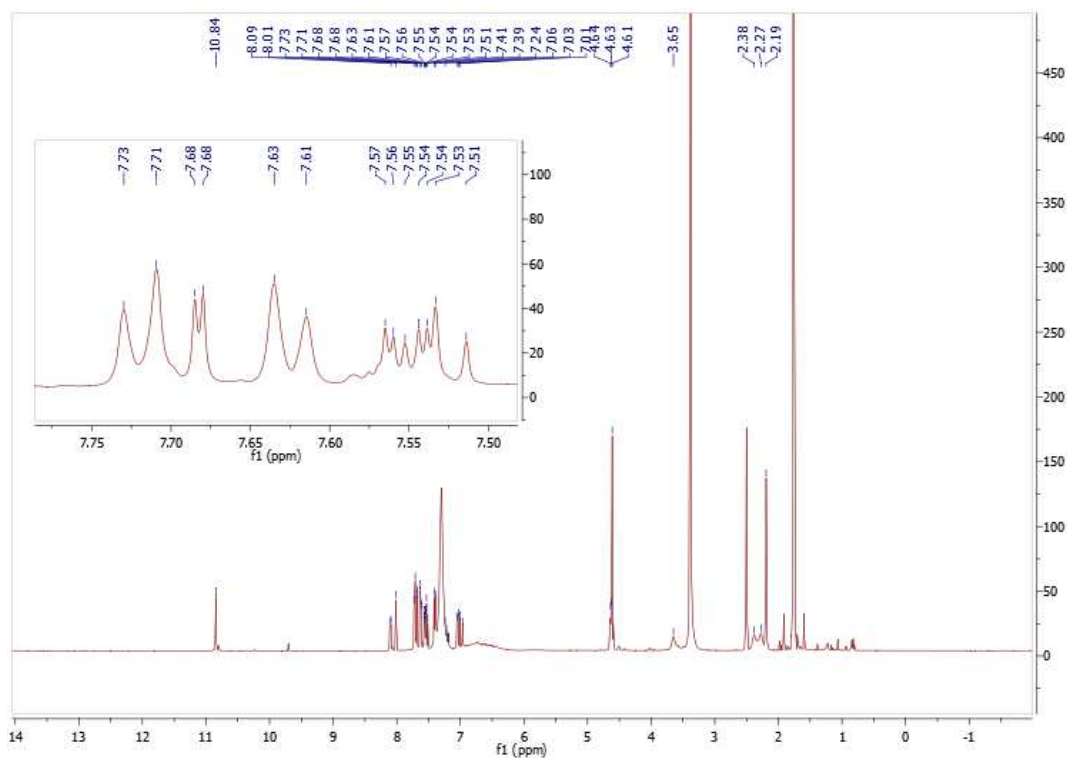
12.250. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto final **13g**.



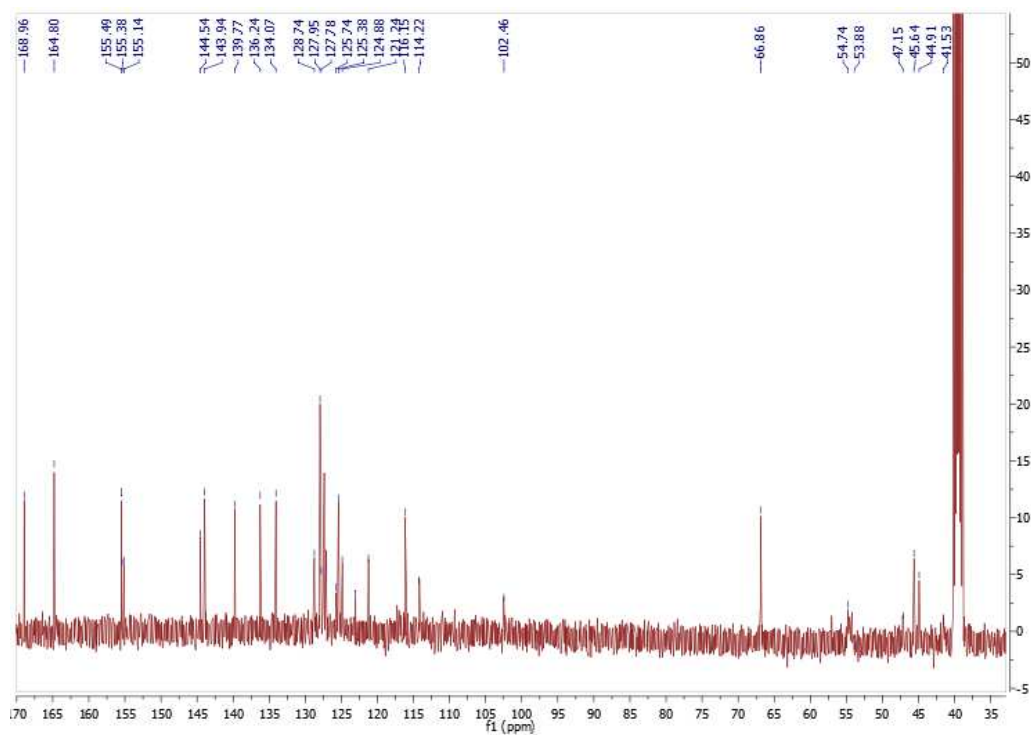
12.251. Espectro de EM-APCI del compuesto final **13g**.



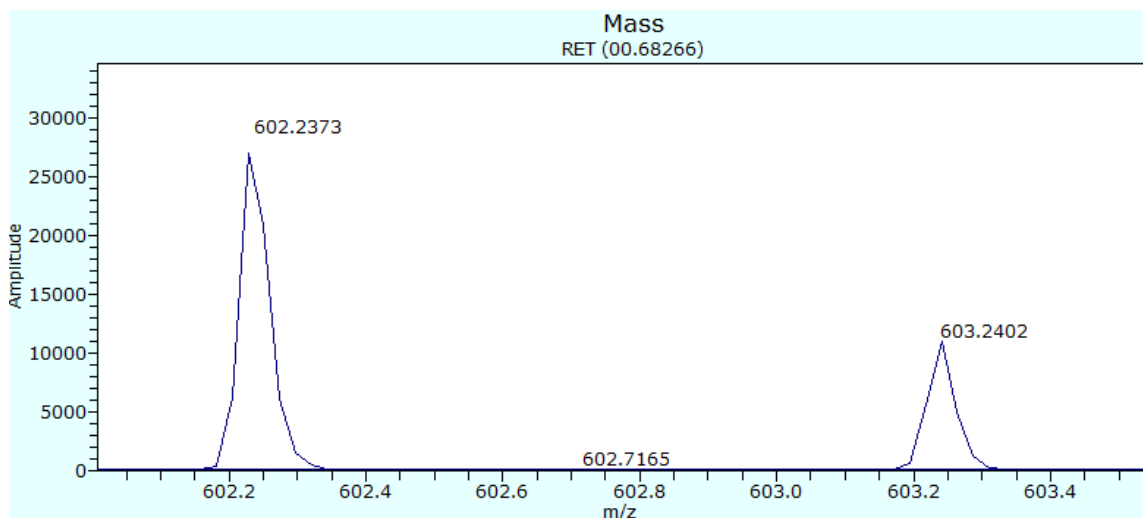
12.252. Espectro de RMN ^1H del compuesto final **13h**.



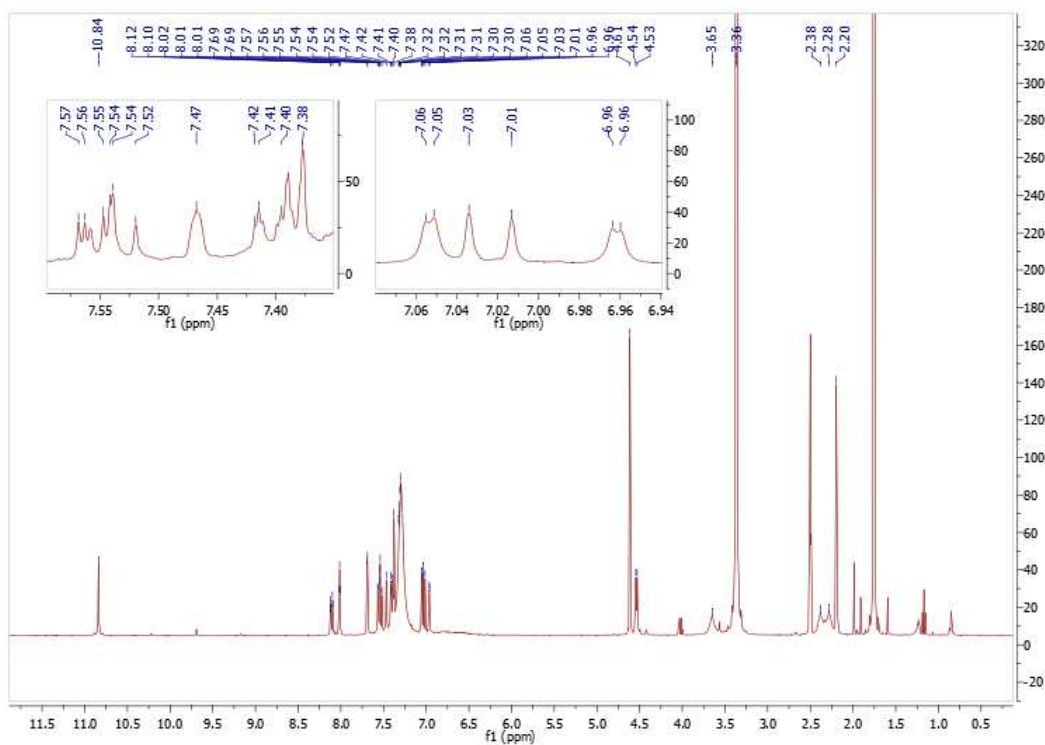
12.253. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto final **13h**.



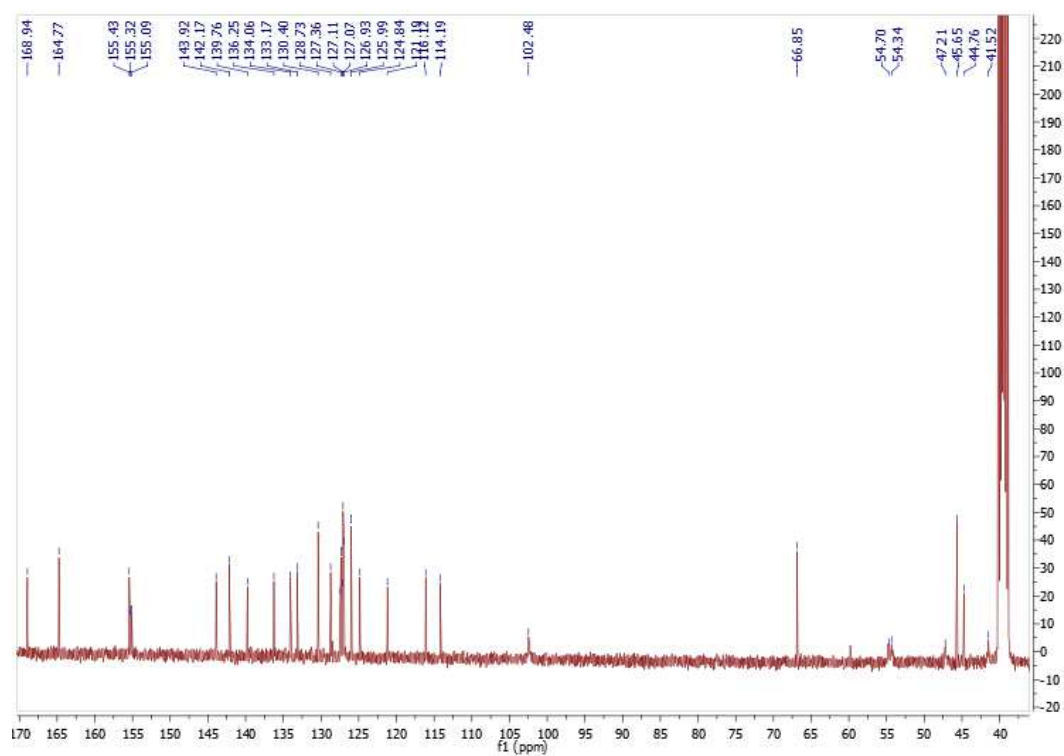
12.254. Espectro EM-APCI del compuesto final **13h**.



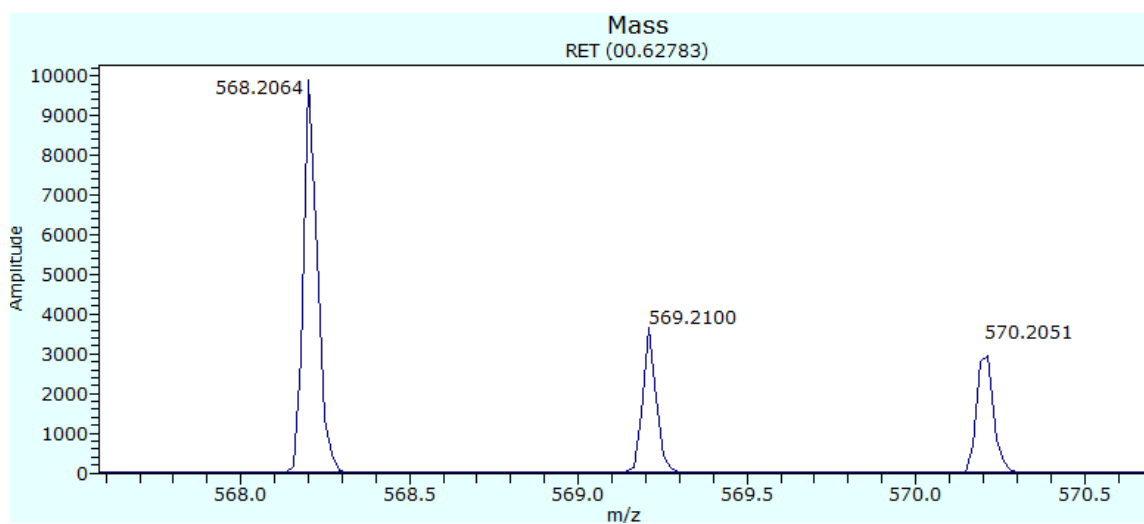
12.255. Espectro de RMN ^1H del compuesto final **13i**.



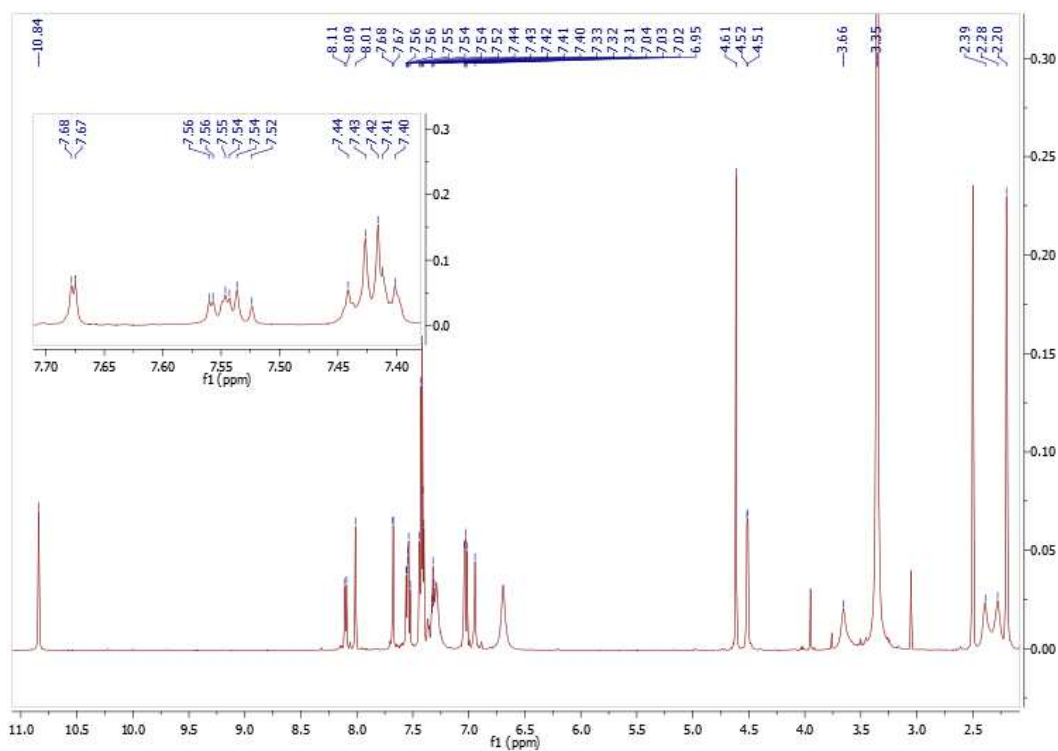
12.256. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto final **13i**.



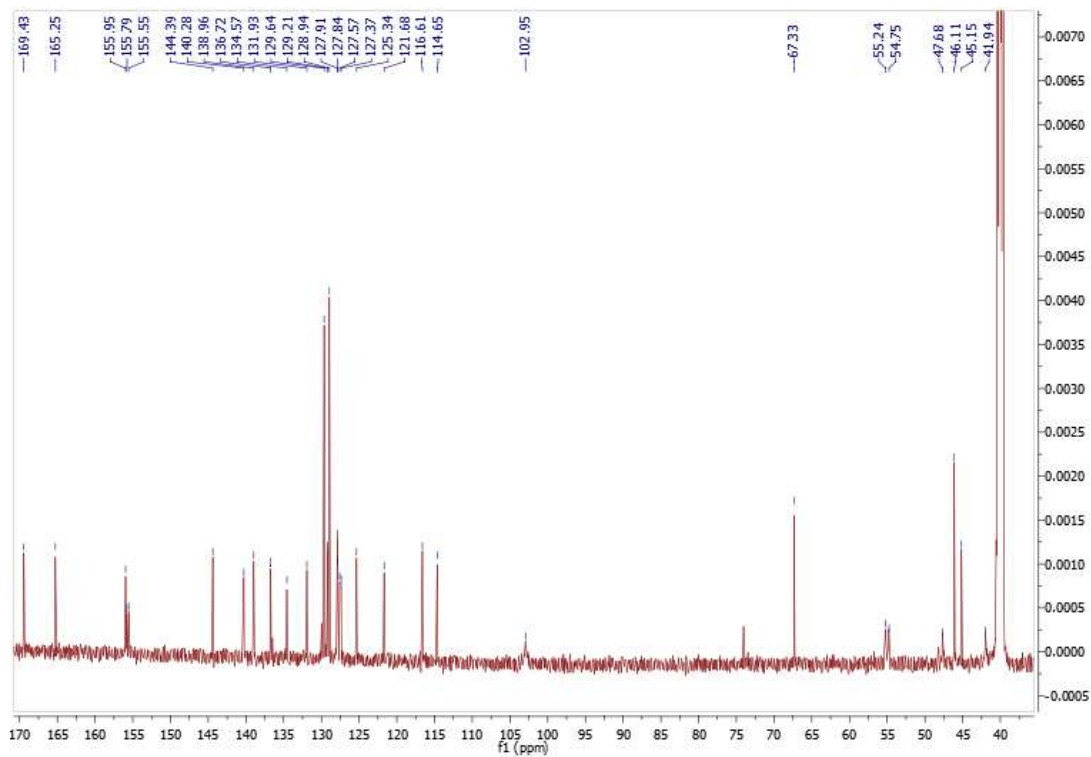
12.257. Espectro EM-APCI del compuesto final **13i**.



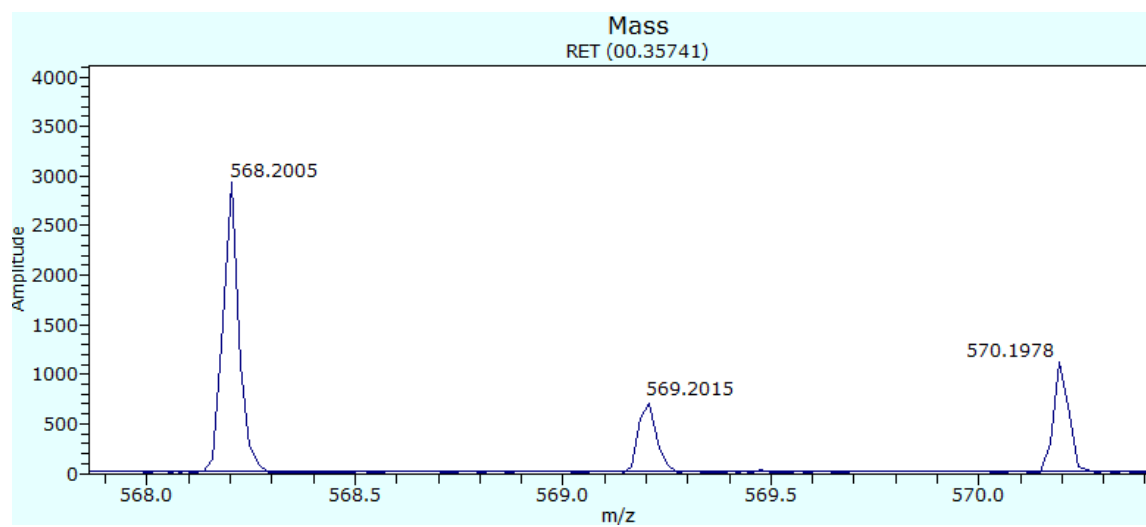
12.258. Espectro de RMN ^1H del compuesto final **13j**.



12.259. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto final **13j**.



12.260. Espectro EM-APCI del compuesto final 13j.





In silico hit optimization toward AKT inhibition: fragment-based approach, molecular docking and molecular dynamics study

Elkin Eduardo Sanabria-Chanaga, Irene Betancourt-Conde, Alicia Hernández-Campos, Alfredo Téllez-Valencia & Rafael Castillo

To cite this article: Elkin Eduardo Sanabria-Chanaga, Irene Betancourt-Conde, Alicia Hernández-Campos, Alfredo Téllez-Valencia & Rafael Castillo (2019) *In silico* hit optimization toward AKT inhibition: fragment-based approach, molecular docking and molecular dynamics study, Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 37:16, 4301-4311, DOI: [10.1080/07391102.2018.1546618](https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1546618)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1546618>



View supplementary material [↗](#)



Accepted author version posted online: 26 Nov 2018.
Published online: 29 Jan 2019.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 84



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)



In silico hit optimization toward AKT inhibition: fragment-based approach, molecular docking and molecular dynamics study

Elkin Eduardo Sanabria-Chanaga^a, Irene Betancourt-Conde^b, Alicia Hernández-Campos^a, Alfredo Téllez-Valencia^b and Rafael Castillo^a 

^aFacultad de Química, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico; ^bDurango, Facultad de Medicina y Nutrición Universidad Juárez del Estado de Durango Av. Universidad y Fanny Anitúa S/N, Durango, Mexico

Communicated by Ramaswamy H. Sarma

ABSTRACT

Protein kinase B also known as AKT is a cardinal node in different signaling pathways that regulates diverse cell processes. AKT has three isoforms that share high homology. Hyperactivation of each isoform is related with different types of cancer. This work describes the computational search for new inhibitors using a hit optimization process of the previously reported AKT pan inhibitor, a 2,4,6-trisubstituted pyridine. A database of new molecules was proposed using a variant of fragment-based docking methodology and previous reported considerations. Molecular docking followed by molecular dynamics studies were performed to select the best compounds and analyze their behavior. Protein–ligand complexes energy was calculated using molecular mechanics Poisson–Boltzmann surface area protocol. Further, proposed molecules were compared with the ChEMBL database of compounds assayed against AKT. Data analysis leads to determine the structural requirements necessary for a favorable interaction of the proposed ligands with the AKT pocket. Molecular dynamics data suggested that the pK_a of the ligands is important for the stability in the AKT pocket. Molecular similarity analysis shows that proposed ligands have not been previously reported. Thus, ligands with high docking scores and favorable behavior on molecular dynamics simulations are proposed as potential AKT inhibitors.

Abbreviations: ATP: Adenosine triphosphate; BLAST: Basic local alignment search; MD: Molecular dynamics; MMPBSA: Molecular mechanics Poisson–Boltzmann surface area; AKT/PKB: Protein kinase B; RMSD: Root-mean-square deviation; RMSF: Root-mean-square fluctuation; SQM: Semi-empirical quantum chemistry program; WHO: The World Health Organization

ARTICLE HISTORY

Received 29 June 2018
Accepted 30 October 2018

KEYWORDS

AKT inhibitors; cancer; fragment-based docking; 2,4,6-trisubstituted pyridine; serine–threonine kinase B



1. Introduction


Cancer is a generic term for a large group of diseases characterized by the abnormal growth of cells beyond their usual boundaries, which can invade adjoining parts of the body and spread to other organs. According to World Health Organization (WHO), cancer is responsible for an estimated 9.6 million deaths in 2018, which is nearly one in six of all global deaths (<http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer>, 2018). Despite the effort of different research groups in finding new treatments, cancer remains as one of the main health issues worldwide. In the search for new alternatives of treatment, several research groups have focused their work in identifying molecular targets implicated in aberrant cell functions; one of the molecular targets recently identified as a druggable target is protein kinase B, also known as AKT (Huck & Mochalkin, 2017).

AKT is a serine–threonine kinase implicated in several signaling downstream that regulates different processes

associated with cell metabolism, growth, differentiation, division, apoptosis and proliferation (Manning & Cantley, 2007; Testa & Tschlis, 2005). There are three subtypes of protein kinase B: AKT-1/PKB α , AKT-2/PKB β and AKT-3/PKB γ (Hennesy, Smith, Ram, Lu, & Mills, 2005). Each one has been associated with different types of cancer, such as colon, stomach, breast, ovarian tumors, hormone-insensitive breast and prostate cancers (Liby et al., 2012; Liu, Chen, Ward, Pegram, & Shen, 2016; Liu & Dong, 2014; Ma et al., 2018; Testa & Tschlis, 2005; Zhu et al., 2014). PI3K/AKT pathway is the most commonly disrupted pathway in human cancers (Millis, Ikeda, Reddy, Gatalica, & Kurzrock, 2016).

Competitive ATP inhibitors against AKT have shown promising properties as alternative cancer therapies; however, existing inhibitors display high toxicity and are not used in current therapy (Huck & Mochalkin, 2017). Therefore, more efforts must be done to find better inhibitors. In this aspect, our research group previously reported a 2,4,6-trisubstituted pyridine as a new scaffold with an IC_{50} : 2.6, 1.5 and 4.0

CONTACT Rafael Castillo  rafaelc@unam.mx  Facultad de Química, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico

 Supplemental data for this article can be accessed [here](#).

© 2019 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

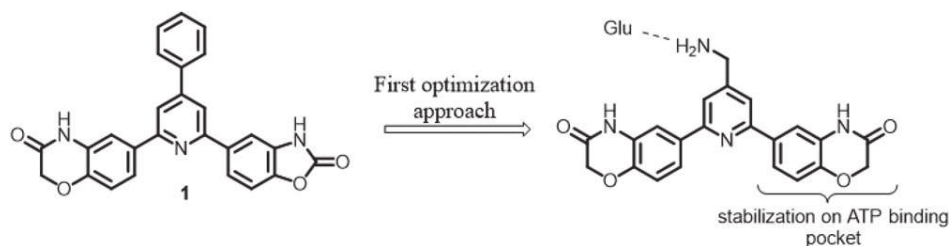


Figure 1. New pan inhibitor found **1** and the first optimization approach.

micromolar for AKT1/AKT2/AKT3, respectively (Medina-Franco et al., 2009).

Further studies proposed the replacement of the phenyl group at position four by an amino group, because this change improves the binding energy in the active site by hydrogen bonding with glutamate 236 in AKT2. Moreover, benzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-one substituent was replaced for a 2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-one system in order to improve interaction with the ATP loop region (Figure 1) (Hernández-Campos et al., 2010).

2,4,6-Trisubstituted pyridine scaffold has become a starting point to discover new compounds with potential biological activity on AKT. In the present research, a hit optimization process was made by combining contributions of the previous works and modification of fragment-based docking to propose new molecules with better AKT interaction profiles. Thus, to begin with, a new series of compounds derived from pyridine were proposed conserving the 2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-one system at position two to interact with the ATP loop. Also, aniline derivatives were chosen as substituent at position four; the amino group was linked directly to the pyridine to increase the acidity of the hydrogens to form stronger hydrogen bonds with glutamate. Modification at position six in the new series of compounds was determined by a fragment-based docking. For this, fragments with satisfactory score and favorable overlapping on **1** were selected, and a new series of 2,4,6-trisubstituted pyridines were proposed and subjected to an *in silico* study. Results indicate that ligands with the best score values in molecular docking studies and the best behavior in molecular dynamics (MD) simulation represent new potential AKT inhibitors.

2. Materials and methods

2.1. AKT3 homology modeling

Since the 3D model of AKT3 isoform is needed in this study and is not reported yet, we made a search for a suitable template. First, AKT3 isoform FASTA sequence was obtained from UniProtKB database (accession number: Q9Y243), then, using basic local alignment search (BLAST) in UniProt server, we found AKT1 (accession number: P31749) as the most accurate template (The UniProt Consortium, 2016). Finally, different models of AKT3 were built using the crystal structure of AKT1 (PDB ID: 4GV1) (Addie et al., 2013) with Prime (Schrödinger release 2015-4: Prime version 4.2.), Modeller (Šali & Blundell, 1993) and SwissModel server (Benkert,

Biasini, & Schwede, 2011; Biasini et al., 2014). Structure of AKT3 models was optimized with protein preparation wizard module (Schrödinger release 2015-4: Protein Preparation Wizard; Epik version 3.4.) present in Maestro (Schrödinger release 2015-4: Maestro version 10.4.), and the quality of the homology models was appraised in MolProbity server (Chen et al., 2010; Davis et al., 2007). The AKT3 model with the best MolProbity score and the best stereochemical quality in Ramachandran plot was selected and used in this study (see supplementary information).

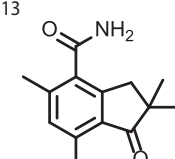
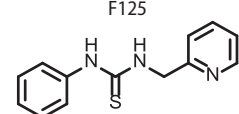
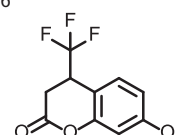
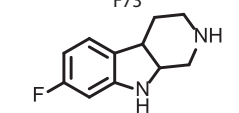
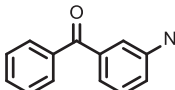
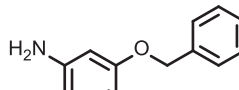
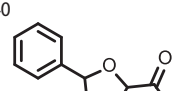
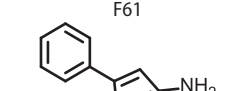
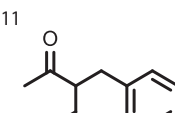
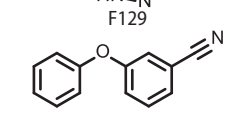
2.2. Structure-based design

To select the substituent at position six, we analyzed and deputed MayBridge fragment database. Then, docking studies of the selected fragments were carried out using Autodock 4.2 (Morris et al., 2009; Sanner, 1999) on AKT2 (PDB ID: 1O6L) (Yang et al., 2002). Ten fragments with the best score values were selected and overlapped on **1**; from this, six fragments showed good overlapping on the scaffold. These fragments were used to propose new substitution at position six of the 2,4,6-trisubstituted pyridine. Additionally, keeping the idea of H-donor group at position four, seven aniline derivatives with different substituents were proposed to modify this position, binding the amino group directly to the pyridine scaffold, conserving the 2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-one system at position two.

2.3. Molecular docking

The 3D models for AKT1 and AKT2 were obtained from the protein data bank PDB ID: 4GV1 (Addie et al., 2013) and 1O6L (Yang et al., 2002), respectively; then water molecules, ions and ligands present in the protein crystallographic structures were removed. Finally, energy minimization was carried out with Protein Preparation Wizard using OPLS_2005 force field. All proposed ligands and reference inhibitor GSK690693 were built and submitted to a geometry optimization in Spartan' 10 (Wavefunction Inc., Spartan version 10, 2010), using the semi-empirical method PM6. 2,4,6-Trisubstituted pyridines were docked in isoforms AKT1, AKT2 crystal structures and AKT3 model using Glide (Schrödinger release 2015-4: Glide version 6.9.) and Autodock 4.2 (Morris et al., 2009; Sanner, 1999). In both programs, grid box was centered at *x*: -19.687, *y*: 5.811, *z*: 16.166 for AKT1 and AKT3; and *x*: 42.679, *y*: 30.329, *z*: 109.603 for AKT2. For Glide, dimensions of the grid box were 25 × 25 × 25 Å; standard precision and extra precision modes were performed with flexible ligand

Table 1. Best 10 structures found through fragment-based docking.

Fragment	Score (kcal/mol)	Fragment	Score (kcal/mol)
F113 	-7.9	F125 	-7.1
F56 	-7.6	F73 	-6.9
F16 	-7.5	F126 	-6.9
F40 	-7.2	F61 	-6.8
F111 	-7.2	F129 	-6.8

adding penalization states of the Epik software in the docking score. For Autodock 4.2, MGLtools 1.5.6 was used to merge non-polar hydrogens and assign Gasteiger atomic charges to each atom in the proteins and ligands; the dimensions of the grid map were selected as $60 \times 60 \times 60$ points with a grid point spacing of 0.375 Å, and the conformational search of the ligand was carried out using a Lamarckian genetic algorithm with 20 GA runs, 25,000,000 of evaluations and 27,000 generations. The best binding mode of each molecule was selected based on the cluster size and lowest free binding energy. In order to select the best candidates, a normalization of docking score values was made using the GSK690693 score value as reference. Consensus score was calculated as average of the result of the normalization process on the two programs used.

2.4. MD simulation

The lowest binding free energy conformation of each selected complex was considered as the initial conformation for MD studies. Parameters and molecular topologies for the ligands were generated using the semi-empirical quantum chemistry program SQM of ACPYPE (Fogh et al., 2005; Nilges et al., 2008; Rieping et al., 2007; Sousa Da Silva & Vranken, 2012; Vranken et al., 2005; Wang et al., 2004; Wang, Wang, Kollman, & Case, 2006). All MD simulations of protein–ligand complexes were performed using GROMACS 4.6.7. Complexes were described using the all-atom Amber99-ILDN force field (Best & Hummer, 2009; Hornak et al., 2006; Lindorff-Larsen et al., 2010); protein–ligand complexes were solvated with water in a cubic box with 1.0 nm of water in all sides using a three-point model for water (TIP3P)

(Jorgensen, Chandrasekhar, Madura, Impey, & Klein, 1983); additionally, simulated NaCl solution of 0.15 M was added randomly.

First, an energy minimization of the system was carried out using the steepest-descent algorithm; in addition, the system was equilibrated by two 100 ps MD using the NVT with Berendsen thermostat (Berendsen, Postma, Van-Gunsteren, DiNola, & Haak, 1984) and NPT with the Parrinello–Rahman barostat (Parrinello & Rahman, 1980); finally, 10 ns MD simulations were performed on the protein–ligand complexes using 1000 frames and a canonical ensemble.

The root-mean-square deviation (RMSD) and root-mean-square fluctuation (RMSF) were analyzed during the complete MD simulation, and binding free energy of the complexes was calculated based on the molecular mechanics/Poisson–Boltzmann surface area (MMPBSA) (Homeyer & Gohlke, 2012) using *g_mmpbsa* package (Kumari, Kumar, Open Source Drug Discovery Consortium, & Lynn, 2014) installed in GROMACS during the last 3 ns. The value of dielectric constant for the solute used in the energy calculations was $\epsilon_{in} = 1$.

2.5. Molecular similarity analysis

To find the molecular similarity between the proposed molecules and the reported compounds with biological activity on AKT, it was necessary to download from ChEMBL server (Bento et al., 2014) the database of molecules assayed on AKT. The comparison between proposed molecules in this work and ChEMBL database was carried out with DataWarrior (Sander et al., 2015) using FragFp and PathFp.

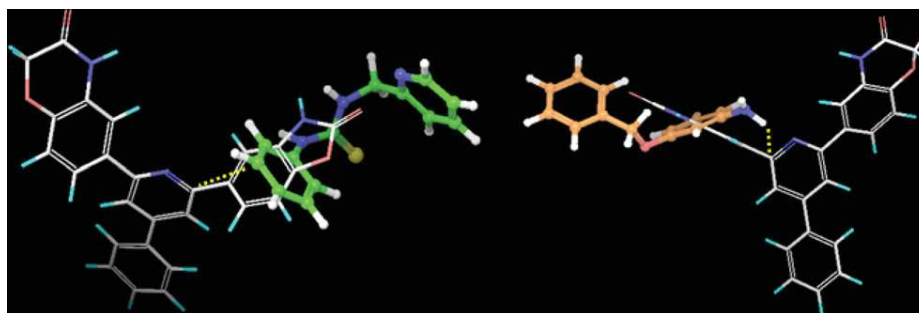


Figure 2. F125 (green) and F126 (orange) overlapped on 1.

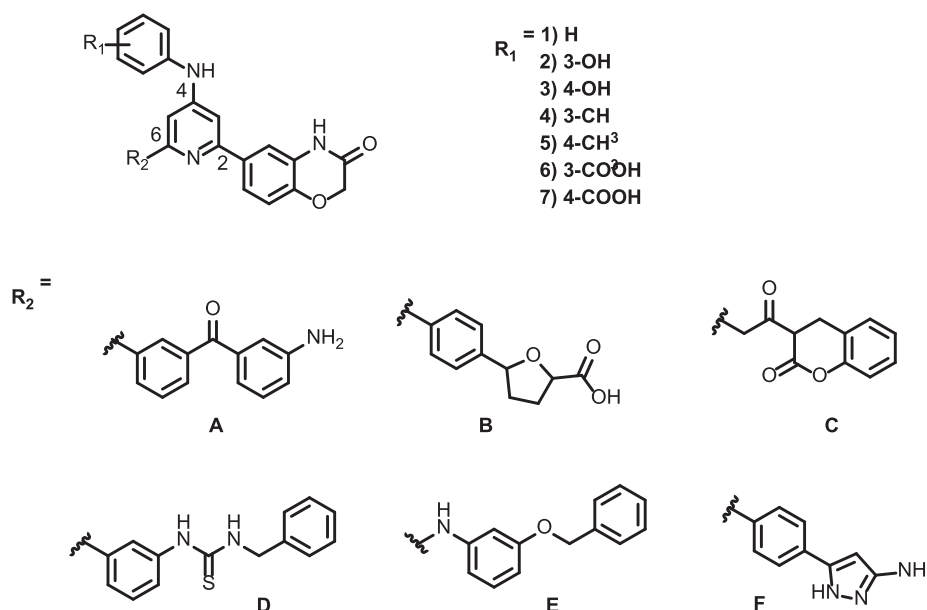


Figure 3. Positions of the pyridine substituents and proposed series obtained through fragment-based docking.

Tanimoto coefficient was used as molecular similarity parameter.

3. Results and discussion

3.1. Structure-based design

In this research, we propose a variant of fragment-based docking that can be helpful for an *in silico* hit optimization; the main idea is to find new fragments with good score values in molecular docking and good overlapping on the pyridine scaffold and propose new substitutions. The first step in our structure-based design was to analyze the MayBridge database and remove the fragments with groups that can provide an unacceptable toxicity (e.g. nitrile, epoxide or halogen groups) and fragments with a molecular weight greater than 250 g/mol; the purpose of this analysis was to substitute a 2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-one system, and big fragments are not suitable for this aim. As a result, 141 fragments were selected. We carried out a fragment docking and selected the best 10 fragments for proposing new modifications at position six of compound 1. The best 10 fragments are listed in Table 1; the selection was made considering the score value in the docking study.

We overlapped each fragment on compound 1 in ATP binding site as shown in Figure 2. In cases where fragments have good overlapping, we proposed new links from position six of the pyridine to the closest atom of the fragment. F16, F40, F111, F125, F126 and F61 showed favorable overlapping on pyridine scaffold. These results led us to propose six new series (A–F) of pyridines 2,4,6-trisubstituted.

Additionally, with the aim of keeping the amine group at position four and to determine what kind of chemical group promotes a better interaction in the ATP binding site of the AKT, we proposed a series of anilines 3- or 4-substituted with a hydrogen donor group (–OH), hydrogen acceptor group (–COOH) and hydrophobic group (–CH₃). Finally, mixing proposed substitution, we create a database of 42 compounds to evaluate on AKT; the complete series subjected to this study is shown in Figure 3.

Fragments C and E, with electron-releasing capacity, increase the p*K*_a of the pyridine ring and thus protonate the nitrogen atom; especially, in those cases where *R*¹ is an electron-releasing group. Protonated and non-protonated pyridines can be possible in molecules with electron-withdrawing groups (*R*¹ in 6 and 7 is COOH). In this way, we evaluated the influence of the protonated pyridines in the stability and binding energy on AKT.

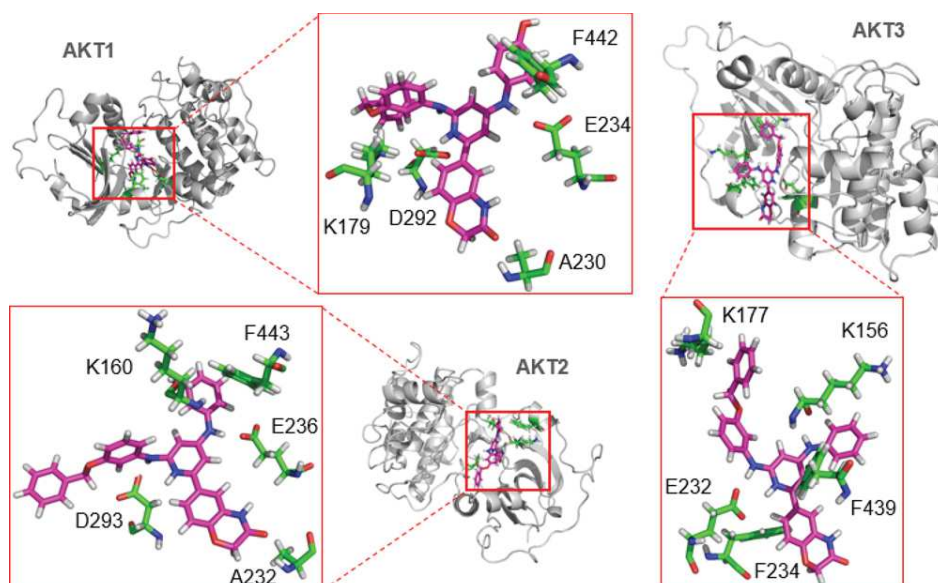


Figure 4. Structure of some compounds of series E docked in AKT1/AKT2/AKT3.

3.2. Molecular docking

After proposing a new database, we carried out molecular docking using Glide XP and Autodock 4.2. The reason to use two programs is the differences in the searching algorithm for each one; Glide uses a hierarchical filter where ligands are submitted a series of steps before to be evaluated in the searching site, and this feature avoids a stochastic method of conformational search (Friesner et al., 2004), while Autodock 4.2. starts with stochastic conformations, and using a genetic algorithm, the energy of each conformation is evaluated in the searching site. The main idea is that if two programs with different scoring functions find the same ligands as the most promising, it is possible to suggest those ligands as good candidates for further studies. The analysis of the molecular docking results for each AKT isoform revealed that the series with fragment 3-(benzyloxy)aniline (E) displays the best docking score value in all isoforms. This is due to protonated pyridine interacts with the anionic residues as Asp292/293 in AKT1/AKT2 and Glu232 in AKT3 binding pocket. Moreover, the amino group at position four aids the interaction with anionic residues as Glu234/236 in AKT1/AKT2 and backbone of Lys156 in AKT3; besides, π - π stacking interactions are detected with Phe442/443/439 (Figure 4).

Additionally, molecules with fragment (3-aminophenyl)(phenyl)methanone (A), especially with a methyl group in R^1 , showed good score values in AKT1. Derivatives with fragment A interact with crucial amino acid residues in ATP binding pocket such as Glu234, Asp274, Ala230, Lys179 and Phe442. While compounds constructed π - π stacking interaction with Phe442, hydrogen-bonding interactions appear with Glu234, Asp274, Ala230 and Lys179. With respect to AKT2, derivatives with fragment 1-phenyl-3-(pyridin-2-ylmethyl)thiourea (D) show satisfactory score values; nevertheless, these compounds just display π - π stacking interactions with Phe163 and Phe238. Additionally, molecules with fragment 3-acetylchroman-2-one (C) exhibit favorable score values on AKT3 isoform; these compounds present hydrogen-bonding

interactions with Glu232, constructed cation- π interaction with Lys177, Lys233 and Phe234 and establish π - π stacking interaction with Phe234. On the other hand, using the consensus score analysis, we found that the series with fragments B and F shows the worst score values in all studies; this finding led us to discard these series for MD simulations. Furthermore, compounds **6A**, **6D**, **7A** and **7D** display unfavorable score values in three AKT isoforms due to unfavorable interaction between carboxylate group on substituent at position four and Phe442/443/439; hence, these compounds were also discarded.

Finally, 24 compounds displayed a consensus score value higher than one with at least two AKT isoforms. For this reason, we selected these compounds for MD simulations with each AKT isoform to analyze their behavior in binding site, calculate the binding free energy of the complexes and evaluate selectivity toward one isoform. In the cases of compounds **6C**, **6E**, **7C** and **7E**, where protonated and non-protonated pyridines were possible, we chose the state with the best docking score value for MD study. Table 2 shows results of molecular docking studies, and compounds selected for MD simulations are highlighted in gray.

3.3. MD simulations

Stability of molecular docking complexes was verified by 10 ns of MD simulations of each compound in the three AKT isoforms. The dynamic stability of each protein-ligand complex was evaluated using RMSD values. For a clear visualization, we separated the ligands in protonated pyridines and non-protonated pyridines series (Figure 5). In the case of AKT1, compounds **1A**, **1D**, **1E**, **2C**, **2D**, **2E**, **5C** and **6E** show satisfactory behavior, since these molecules maintain their deviation below 0.3 nm, while ligands **1C**, **2A**, **3A**, **3C**, **4E** and **5E** have fluctuations above 0.4 nm, especially compounds **2A**, **4E** and **5E**. For AKT2, compounds exhibit the lowest values (0.05–0.7 nm); however, compounds **1D**, **1E**,

Table 2. Docking score values: consensus score is the average of ligand score values of each program divided by the GSK690693 score of each program.

Ligands	AKT1					AKT2					AKT3				
	Score AD 4.2	Score AD 4.2/GSK690693	Score Glide XP	Score Glide/GSK690693	Consensus score	Score AD 4.2	Score AD 4.2/GSK690693	Score Glide XP	Score Glide/GSK690693	Consensus score	Score AD 4.2	Score AD 4.2/GSK690693	Score Glide XP	Score Glide/GSK690693	Consensus score
1A	-8.51	1.05	-6.17	1.53	1.29	-9.06	1.20	-6.82	1.13	1.17	-5.8	0.81	-3.9	0.80	0.80
1B	-9.08	1.12	-3.8	0.94	1.03	-8.04	1.07	-5.35	0.89	0.98	-6.75	0.95	-2.5	0.51	0.73
1C	-10.67	1.31	-5.04	1.25	1.28	-8.56	1.14	-6.12	1.02	1.08	-8.26	1.16	-4.38	0.89	1.03
1D	-10.19	1.25	-6.08	1.50	1.38	-11.51	1.53	-6.36	1.06	1.29	-8.42	1.18	-4.19	0.86	1.02
1E	-10.68	1.31	-7.22	1.79	1.55	-9.77	1.30	-8.1	1.35	1.32	-9.17	1.29	-3.92	0.80	1.04
1F	-9.35	1.15	-3.69	0.91	1.03	-8.22	1.09	-4.38	0.73	0.91	-6.92	0.97	-3.48	0.71	0.84
2A	-6.95	0.85	-6.52	1.61	1.23	-8.72	1.16	-7.51	1.25	1.20	-7	0.98	-4.69	0.96	0.97
2B	-9.02	1.11	-3.01	0.75	0.93	-8.4	1.12	-5.67	0.94	1.03	-5.97	0.84	-4.54	0.93	0.88
2C	-8.78	1.08	-6.45	1.60	1.34	-9.66	1.28	-7.12	1.18	1.23	-7.45	1.04	-5.04	1.03	1.04
2D	-7.76	0.95	-6.14	1.52	1.24	-10.16	1.35	-7.18	1.19	1.27	-7.23	1.01	-4.78	0.98	0.99
2E	-7.93	0.98	-7.82	1.94	1.46	-9.7	1.29	-8.65	1.44	1.36	-6.3	0.88	-4.22	0.86	0.87
2F	-9.12	1.12	-3.33	0.82	0.97	-7.75	1.03	-4.75	0.79	0.91	-5.91	0.83	-4.5	0.92	0.87
3A	-8.59	1.06	-7.13	1.76	1.41	-9.06	1.20	-6.91	1.15	1.18	-6.96	0.98	-4.24	0.87	0.92
3B	-8.27	1.02	-4.77	1.18	1.10	-8.28	1.10	-4.22	0.70	0.90	-7.1	1.00	-3.64	0.74	0.87
3C	-9.37	1.15	-5.92	1.47	1.31	-8.95	1.19	-5.55	0.92	1.06	-6.69	0.94	-5.71	1.17	1.05
3D	-8.65	1.06	-5.29	1.31	1.19	-10.12	1.35	-6.47	1.08	1.21	-6.2	0.87	-4.96	1.01	0.94
3E	-8.43	1.04	-8.05	1.99	1.51	-9.31	1.24	-5.87	0.98	1.11	-8.76	1.23	-5.03	1.03	1.13
3F	-8.7	1.07	-5.12	1.27	1.17	-8.26	1.10	-5.37	0.89	1.00	-5.99	0.84	-4.37	0.89	0.87
4A	-9.19	1.13	-7.42	1.84	1.48	-9.66	1.28	-7.23	1.20	1.24	-6.86	0.96	-4.12	0.84	0.90
4B	-9.43	1.16	-3.86	0.96	1.06	-7.33	0.97	-4.4	0.73	0.85	-7.05	0.99	-3.7	0.76	0.87
4C	-10.62	1.31	-6.49	1.61	1.46	-10.23	1.36	-6.65	1.11	1.23	-6.94	0.97	-4.41	0.90	0.94
4D	-9.28	1.14	-5.95	1.47	1.31	-10.67	1.42	-6.98	1.16	1.29	-7.02	0.98	-4.55	0.93	0.96
4E	-10.59	1.30	-6.68	1.65	1.48	-10.95	1.46	-8.81	1.47	1.46	-8.74	1.23	-4.76	0.97	1.10
4F	-9.6	1.18	-3.88	0.96	1.07	-8.95	1.19	-4.8	0.80	0.99	-6.4	0.90	-3.68	0.75	0.82
5A	-9.51	1.17	-7.3	1.81	1.49	-9.02	1.20	-7.07	1.18	1.19	-7.66	1.07	-4.36	0.89	0.98
5B	-9.16	1.13	-4.46	1.10	1.12	-7.62	1.01	-3.91	0.65	0.83	-7.18	1.01	-3.09	0.63	0.82
5C	-8.54	1.05	-5.12	1.27	1.16	-8.87	1.18	-6	1.00	1.09	-7.14	1.00	-4.14	0.84	0.92
5D	-8.01	0.99	-5.35	1.32	1.15	-11.57	1.54	-6.95	1.16	1.35	-7.17	1.01	-4.95	1.01	1.01
5E	-10.54	1.30	-5.24	1.30	1.30	-9.68	1.29	-7.58	1.26	1.27	-7.51	1.05	-4.37	0.89	0.97
5F	-8.95	1.10	-3.27	0.81	0.96	-8.18	1.09	-4.55	0.76	0.92	-6.13	0.86	-3.38	0.69	0.77
6A	-8.44	1.04	-4.72	1.17	1.10	-8.45	1.12	-5.59	0.93	1.03	-6	0.84	-3.51	0.72	0.78
6B	-7.77	0.96	-1.26	0.31	0.63	-7.39	0.98	-3.12	0.52	0.75	-6.58	0.92	-3.01	0.61	0.77
6C	-7.56	0.93	-6.29	1.56	1.24	-8.4	1.12	-6.1	1.01	1.07	-6.57	0.92	-5.51	1.12	1.02
6D	-8.7	1.07	0.08	-0.02	0.53	-10.03	1.33	-6.29	1.05	1.19	-6.41	0.90	-4.47	0.91	0.91
6E	-8.52	1.05	-7.76	1.92	1.48	-8.98	1.19	-7.07	1.18	1.19	-7.13	1.00	-5.92	1.21	1.10
6F	-8.61	1.06	-4.28	1.06	1.06	-7.36	0.98	-4.94	0.82	0.90	-6.03	0.85	-3.75	0.77	0.81
7A	-7.24	0.89	-5.98	1.48	1.19	-8.12	1.08	-6.11	1.02	1.05	-5.31	0.74	-4.11	0.84	0.79
7B	-7.3	0.90	-5.67	1.40	1.15	-6.86	0.91	-5.91	0.98	0.95	-6.17	0.87	-3.97	0.81	0.84
7C	-9.4	1.16	-6.71	1.66	1.41	-6.29	0.84	-6.13	1.02	0.93	-6.27	0.88	-5.68	1.16	1.02
7D	-8	0.98	-4.87	1.21	1.09	-9.31	1.24	-7.38	1.23	1.23	-5.6	0.79	-4.93	1.01	0.90
7E	-8.12	1.00	-6.73	1.67	1.33	-8.67	1.15	-8.38	1.39	1.27	-8.65	1.21	-4.25	0.87	1.04
7F	-6.51	0.80	-3.73	0.92	0.86	-6.53	0.87	-5.02	0.84	0.85	-5.3	0.74	-3.25	0.66	0.70
GSK-690693	-8.13	1.00	-4.04	1.00	1.00	-7.52	1.00	-6.01	1.00	1.00	-7.13	1.00	-4.9	1.00	1.00

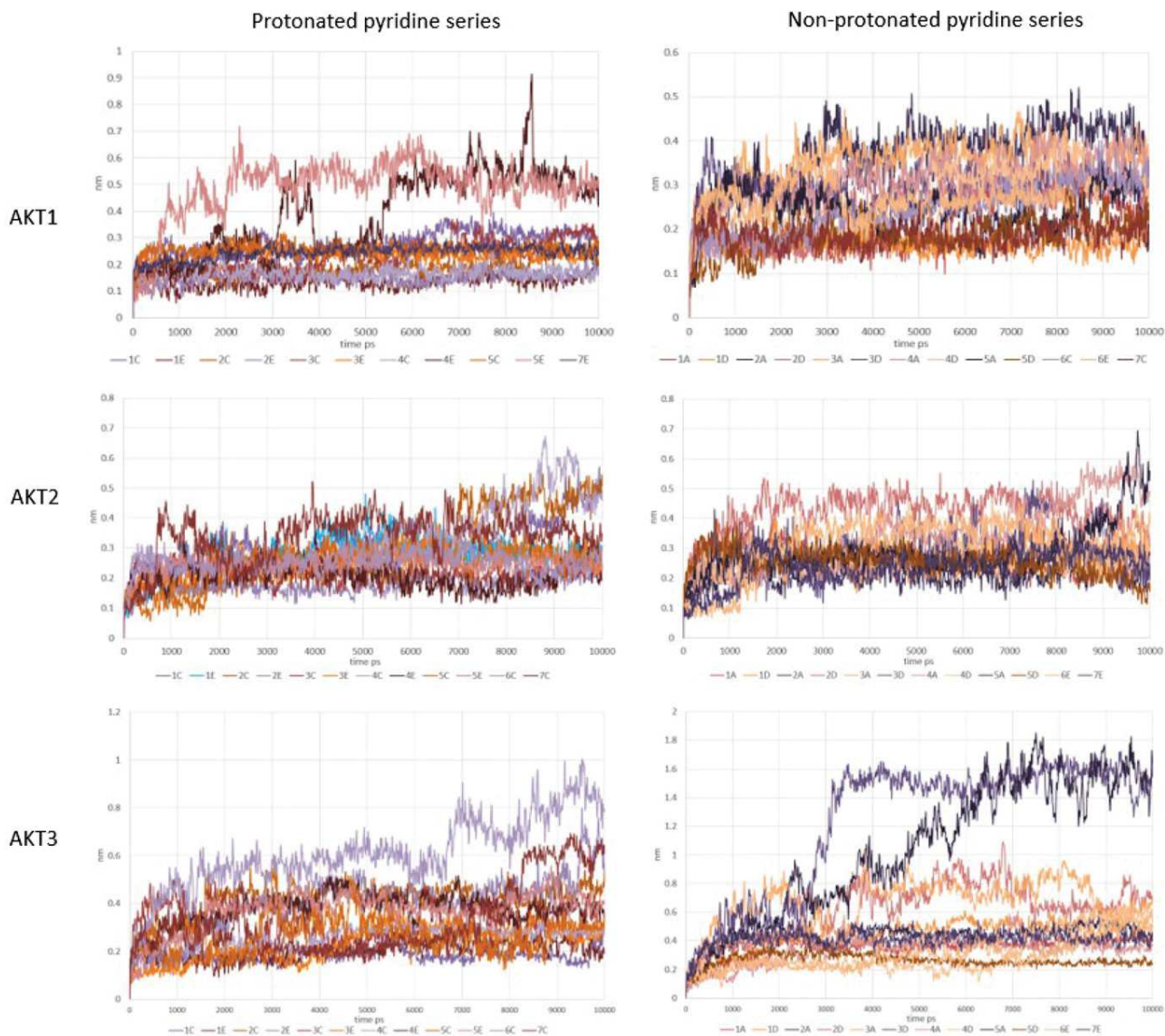


Figure 5. RMSD behavior of protonated and non-protonated pyridine series on each AKT isoform.

2A, 2E, 3C, 4D, 4E, 5C, 5D and **5E** display the best values of the series. Finally, AKT3–ligand complexes show the highest deviations, particularly, compounds **3D, 5A** and **6C**, because they reach a value of 1 nm or higher; nevertheless, ligands **1A, 1E, 3C, 4A, 5C** and **5D** exhibit favorable behavior with values of 0.3 nm or lower.

In general, compounds of series E show the most promising behavior in the three AKT isoforms. Stability of series E can be explained by the strong H-bond interaction between protonated pyridine scaffold and Asp292/293/289 for AKT1/AKT2/AKT3; moreover, the amino group at position six intensifies this interaction. The aromatic fragment at position four contributed to the stabilization of this series by interacting with Phe442/443/439. Additionally, the amine group at position four interacts with Glu234/236 AKT1/AKT2; in AKT3 case, this interaction is possible with Glu232 and Glu275, depending on the derivative; however, during MD simulations, interaction with Glu275 in AKT3 is the most conserved (for details of distance between H-donor and H-acceptor, see

supplementary information). Furthermore, fragment 3-(benzyloxy)aniline occupies the P-loop region and stabilizes these compounds due to interaction with Phe161/163/159. Compounds **6E** and **7E** show disadvantageous performance due to unfavorable interactions of the carboxylate group at position four in the ATP binding site. Series A exhibits positive behavior in AKT1; H-bond interactions with Asp292 and Lys179 are the key of the stability in the pocket. In addition, series A exhibits interactions among fragment (3-aminophenyl)(phenyl)methanone with Phe163 and Thr162 in AKT2, and Glu275 and Phe 234 in AKT3; however, these interactions cause loss of the interactions with Glu236/232 for AKT2/AKT3, generating instability on the pocket in these isoforms. Series C and D exhibit good interactions in AKT2. In series C, the main interactions are with Asp293, and these interactions are with the amine group at position four (compounds **2C** and **3C**) and protonated pyridine with compounds **1C, 4C** and **5C**. Compounds **2C** and **3C** occupy the hydrophobic zone with the 3-acetylchroman-2-one fragment,

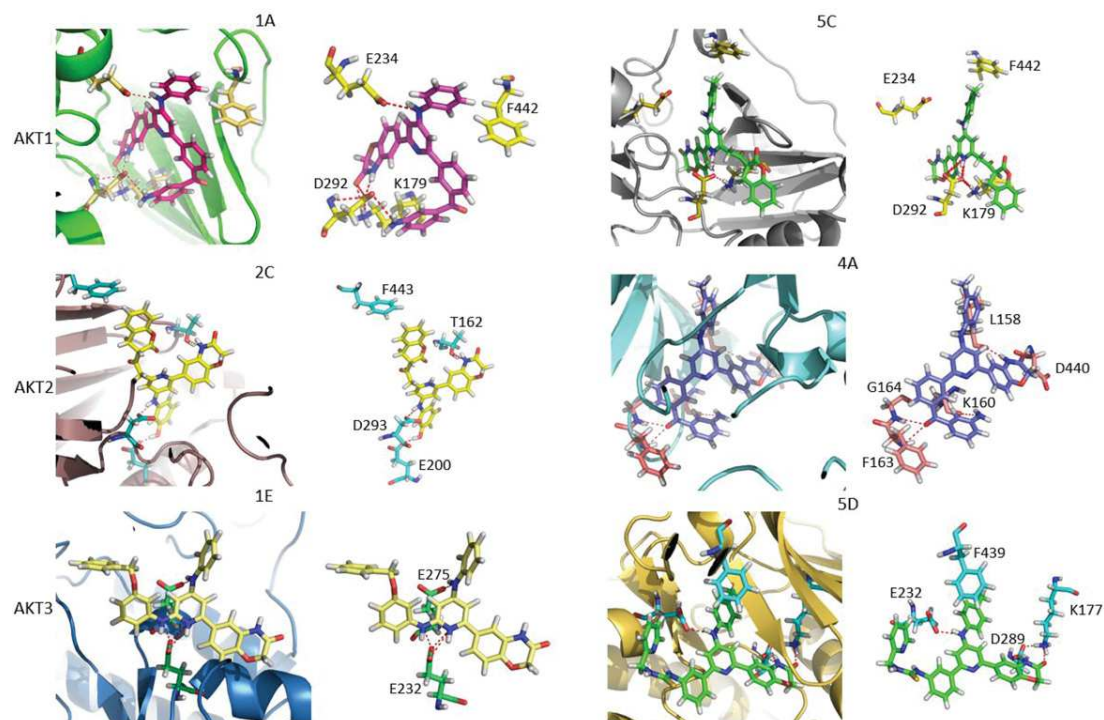


Figure 6. Interactions of selected ligands in the pocket of the three AKT isoforms.

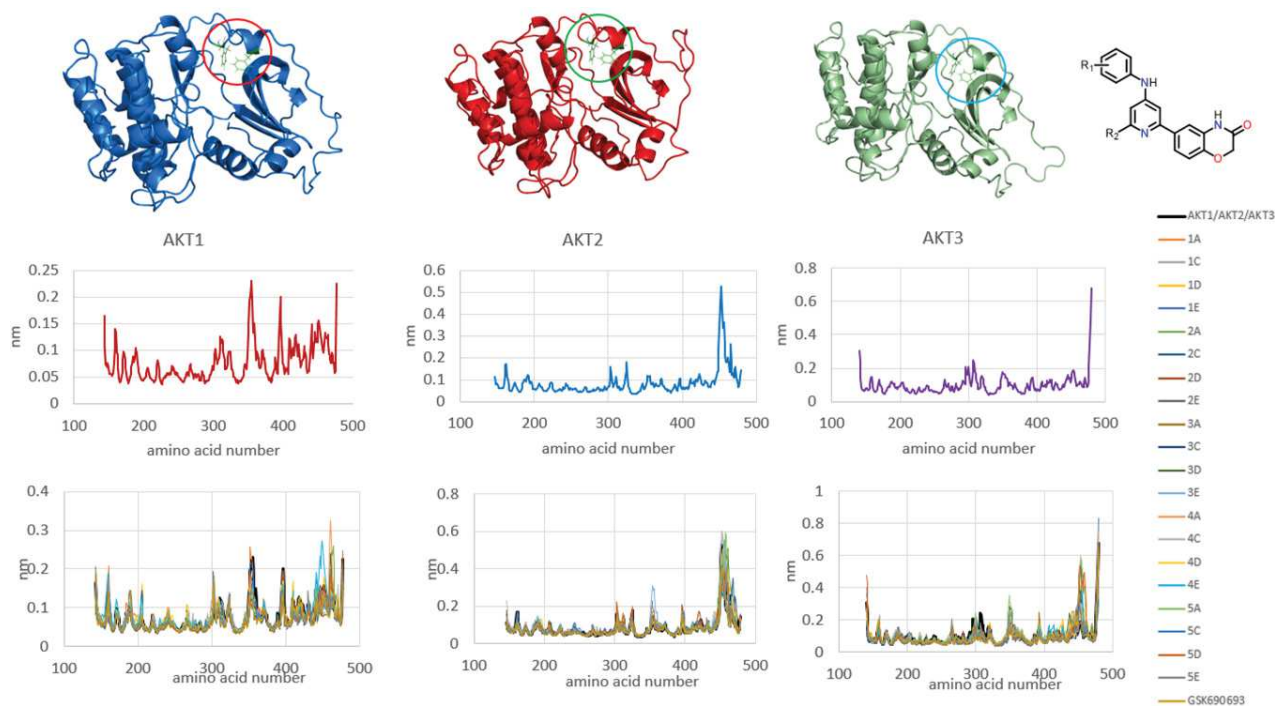


Figure 7. RMSF results of proteins and protein-ligand complexes: zone 1 is highlighted with a circle.

while compounds **1C**, **4C** and **5C** interact in this zone with substituent at position four. Besides, compound **2C** interacts with Glu200 through $-OH$ in AKT2; this interaction is not observed with other compounds. Series D displays good behavior in AKT2 because the fragment 1-phenyl-3-(pyridin-2-ylmethyl)thiourea occupies the P-loop region in AKT2. In AKT3, series C and E display favorable behavior in MD simulations; the main reason for the stability of these series is the

strong interaction between protonated pyridine and Glu232 or Asp289. In addition, series D exhibits unfavorable behaviors with this isoform, since fragment 1-phenyl-3-(pyridin-2-ylmethyl)thiourea unstabilizes the proposed ligands. However, compound **5D** shows an excellent behavior in AKT3 mainly due to interaction between Glu232 and NH of aniline moiety. Figure 6 shows some protonated and non-protonated ligands in ATP binding site.

Table 3. Binding free energy values for protein–ligand complexes.

Protonated compounds*			Non-protonated compounds*				
Ligand	AKT1	AKT2	AKT3	Ligand	AKT1	AKT2	AKT3
1C	−68.2	−111.9	−66.2	1A	−25.5	−12.8	−28.0
1E	−63.3	−120.8	−72.7	1D	−20.8	−23.8	−14.4
2C	−59.7	−125.9	−58.3	2A	−7.2	−26.6	−15.8
2E	−49.4	−109.4	−66.0	2D	−14.3	−20.0	−16.4
3C	−63.7	−119.8	−57.2	3A	−22.7	−25.2	−15.8
3E	−71.9	−108.4	−56.0	3D	−13.3	−14.7	−18.2
4C	−69.1	−112.8	−55.8	4A	−24.8	−29.3	−16.9
4E	−63.8	−121.8	−62.0	4D	−25.4	−25.7	−18.1
5C	−69.4	−120.2	−73.5	5A	−22.5	−27.3	−10.8
5E	−64.0	−122.7	−65.1	5D	−22.4	−27.2	−21.4
6C	−	−33.1	−18.0	6C	25.4	−	−
7C	−	−21.5	−9.4	6E	37.1	70.9	42.7
7E	−18.5	−	−	7C	26.0	−	−
GSK690693	−61.5	−107.8	−75.3	7E	−	62.3	26.4

*Energy values are expressed in kcal/mol.

RMSF analysis shows the highest fluctuations with external residues for AKT1 and AKT3; however, AKT1 displays high fluctuations with Glu355 and Ser396 too, because these amino acids are in contact with the solvent. AKT2 exhibits the highest fluctuations with residues Pro453, Tyr456 and Glu465, since these amino acids are in a coil with high mobility. On the other hand, RMSF analysis of the AKT1–ligand complexes shows that compounds **1A**, **2A**, **2C**, **4A**, **5A**, **5C** and **5E** decrease the fluctuation on zone 1 (see Figure 7). This zone is hydrophobic and has favorable interactions with R^1 of compounds **1A**, **4A**, **5A**, **5C** and **5E**. Compounds **2A** and **2C** interact through H-bond between $-OH$ of R^1 and Asp439, interaction that makes possible the stabilization. Besides, compounds **2C** and **5C** decrease the movement of P-loop through interaction between the backbone of Thr160 and the carbonyl group of 3-acetylchroman-2-one. In the case of AKT2, ligands **1A**, **1C**, **2A**, **2C**, **2D**, **3C**, **3D**, **4C**, **4D**, **4E**, **5C**, **5D** and **5E** reduce the fluctuation of P-loop, but just **1E**, **3A**, **4E**, **5C**, **5D** and **5E** decrease the dynamic of hydrophobic zone 1. The reason for the reduction of the fluctuation is the hydrophobic features of the R^1 group. For AKT3, the lowest values of P-loop fluctuation are found in molecules **1A**, **1E**, **2A**, **4C**, **5C** and **5D**; however, only protonated pyridines with hydrophobic substituents **1E** and **5C** decrease the fluctuations of zone 1 of AKT3.

MMPBSA calculations were implemented for calculating complexes binding free energy (Table 3). Since we used a $\epsilon_r = 1$, it is possible that calculated energy for protonated ligands could have an overestimated value (Hou, Wang, Li, & Wang, 2011); however, our reference (GSK690693) is protonated too, which means that our comparison between protonated pyridines and reference was made with the same conditions; then, it is possible to compare energy results among pyridines and GSK690693. Taking into account that MMPBSA method is accurate with similar structures in similar systems (Homeyer & Gohlke, 2012), we divided the series in protonated and non-protonated compounds.

To begin with, compounds where $R^1 = H$, 3- CH_3 and 4- CH_3 exhibit good energy values with protonated and non-protonated series. The reason is that these substituents interact with a hydrophobic region rich in phenylalanine residues. Thus, hydrophobic substituents display the best interaction

in this region. Taking as reference the inhibitor GSK690693, compounds **1C**, **3E**, **4C** and **5C** display the best energy values in AKT1, showing at least 7 kcal/mol less than the reference. Talking about AKT2, all protonated pyridines show lower energy values than the reference, but compounds **1E**, **2C**, **4E**, **5C** and **5E** stand out because they have energy values lower than GSK690693 with 12 kcal/mol, or even more. In the case of AKT3, none of the compounds exceeded the energy value of the reference inhibitor; nevertheless, molecules **1E** and **5C** have close energy values with just about 2 kcal/mol of difference. Moreover, compounds **1C** and **2E** display good energy values. It is important to note that molecule **5C** displays good energy values with three AKT isoforms, while compound **2C** exposes selectivity toward AKT2. In general, series C presents preference for AKT1 with exception of **2C**, and series E discloses tendency toward AKT2; in case of AKT3, protonated series do not display a clear preference. For non-protonated series, compound **1A**, **4A** and **4D** exhibit good values for AKT1, while molecules **2A**, **4A**, **5A** and **5D** feature the best values with AKT2, besides compounds **1A** and **5D** present important energy values for AKT3. Energy analysis reinforces the idea that compounds where $R^1 = H$, 3- CH_3 and 4- CH_3 exhibit the best behavior in AKT pocket because they display favorable interactions between substituent at position four and the zone rich in phenylalanine. Nevertheless, compounds **2C** and **2A** show interesting profiles in AKT2; this finding leads to propose that a substituent H-donor on R^1 could display selectivity against AKT2. Additionally, compounds **6C**, **6E**, **7C** and **7E** exhibit the worst binding energy values with both protonated and non-protonated series. We can conclude that $R^1 =$ carboxylate group displays instability and unfavorable free binding energy in the ATP pocket. In Figure 8, we can see that carboxylate group is out of hydrophobic zone due to the repulsion interaction between them.

Gathering the analysis of RMSD, RMSF and energy values, compounds **4A** and **4C** show a promising profile as AKT1 inhibitors. On the other hand, compounds **4E** and **5E** show meaningful values in AKT2; this finding reinforces the idea that series E exhibits an interesting preference on AKT2; however, compound **2C** shows an attractive profile against AKT2, especially for its high free binding energy value and its different conformation and interactions in the binding site. In addition, compound **1A** shows an attractive selectivity toward AKT1 and AKT3, while compounds **1E** and **5D** show good values on AKT2 and AKT3; it is necessarily highlighted that compound **5D** is the only one that is able to conserve the main interactions discussed in the present work in the AKT3 pocket. Finally, compound **5C** displays a pan-inhibitor profile since it exhibits good values in the three isoforms.

In summary, compounds with hydrophobic substituents in R^1 and protonated pyridines display the best behavior due to favorable stabilization on the AKT pocket; moreover, ligands with $-OH$ at position three of the aniline moiety show better interactions and less fluctuation than $-OH$ at position four, especially in AKT2, so that H-bond donor in R^1 could display selectivity toward AKT2. In spite of the favorable energy values of series A in the three isoforms, the loss

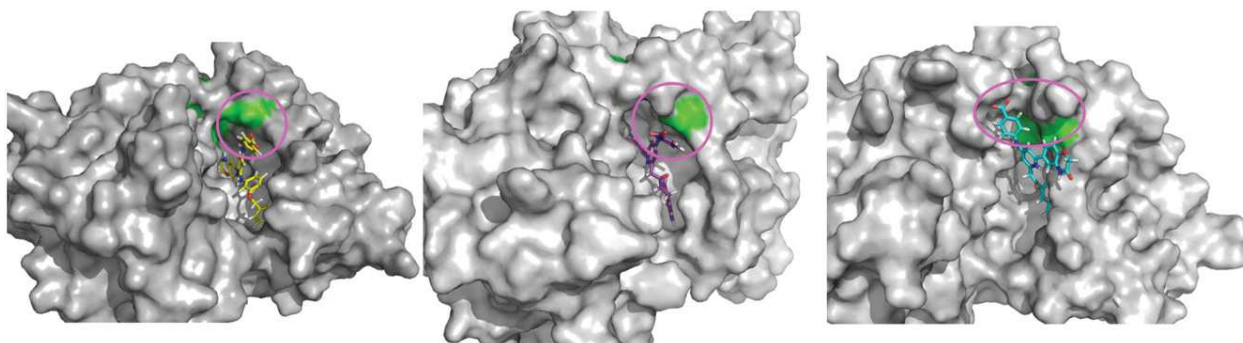


Figure 8. Compounds 7E, 6C and 7C in binding pocket of AKT1/AKT2/AKT3, respectively: we can see that carboxylate group is out of the hydrophobic zone highlighted in green.

of the stability in AKT2 and AKT3 leads us to propose that compounds with fragment (3-aminophenyl)(phenyl)methanone at position six of the pyridine could remain for more time in the AKT1 pocket and exhibit selectivity toward this isoform, with exception of **1A**. Additionally, ligands with fragment 3-(benzyloxy)aniline (series E) expose a clear tendency toward AKT2, mainly where R^1 is a methyl group.

3.4. Molecular similarity analysis

Database of compounds assayed against AKT from ChEMBL server includes >6000 compounds. Using DataWarrior, we compared the proposed compounds with ChEMBL database using FragFP and Pathfp descriptors included in the program. Analysis of molecular similarity was made using Tanimoto coefficient. In this sense, first, we carried out the similarity search using a Tanimoto coefficient of 0.9, because this value is considered good for structural similarity (<http://www.openmolecules.org/help/chemistry.html>, 2018); however, in this research, we did not find similarity between proposed molecules and assayed compounds. Then, we decreased the similarity value to a Tanimoto coefficient of 0.6 and found that about 4% of the database have similarity with our proposed compounds. Additionally, we compared our database against the ChEMBL compounds with $IC_{50} < 1 \mu M$ (about 2000 molecules) using the same Tanimoto coefficient (0.6). Analysis of the similarity between proposed molecules and reported compounds with a good value of activity showed that about 1% of the active compounds have similarity with our database. These findings and *in silico* results indicate that our proposed compounds are different from the previously reported inhibitors and could be of interest as new inhibitors of AKT (for molecular similarity details, see supplementary information).

4. Conclusion

The variant of fragment-based docking used in a hit optimization processes is a useful methodology to find new substitutions with high structural diversity. Such as at the present work, combining this methodology with modifications reported in previous works, it was possible to design a database of 42 compounds. As a result of the *in silico* analysis, we identified structural requirements to improve the affinity of the 2,4,6-trisubstituted pyridine scaffold in the ATP pocket of PKB/AKT. Among these,

we must highlight the importance of a system with a pK_a value able to be protonated at physiological pH and make favorable interactions with residues as glutamate or aspartate in ATP binding site. Besides, the hydrophobic substituents at position four that could interact with the hinge rich in phenylalanine are important. In addition, the reported idea about an H-bond donor adequate to interact with Glu234/236/232 and make an additional favorable interaction was supported. Finally, we identified a group of compounds not previously reported with high structural diversity and high selectivity profiles toward AKT1 and AKT2, as well as compounds with selectivity for two of the three isoforms. Results of this study can be useful for the design and development of new AKT inhibitors.

Acknowledgements

The authors acknowledge DGESCA for the use of the supercomputer Miztli in project LANCAD-UNAM-DGTIC-285. The authors thank Dr. Antonio Romo-Mancillas for his valuable contributions to this work.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

The authors thank CONACyT for the financial support granted to the project [CB-251807]. EESC and IBC are grateful to CONACyT for the fellowships granted [Nos. 273595 and 521238], respectively.

ORCID

Rafael Castillo  <http://orcid.org/0000-0003-4466-2340>

References

- Addie, M., Ballard, P., Buttar, D., Crafter, C., Currie, G., Davies, B. R., ... Ruston, L. (2013). 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. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(5), 2059–2073.
- Benkert, P., Biasini, M., & Schwede, T. (2011). Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics*, 27(3), 343–350.

- Bento, A. P., Gaulton, A., Hersey, A., Bellis, L. J., Chambers, J., Davies, M., ... Overington, J. P. (2014). The ChEMBL bioactivity database: An update. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), 1083–1090.
- Berendsen, H., Postma, J., Van-Gunsteren, W., DiNola, A., & Haak, J. (1984). Molecular dynamics with coupling to an external bath. *Journal of Chemical Physics*, 81(8), 3684–3690.
- Best, R., & Hummer, G. (2009). Optimized molecular dynamics force fields applied to the helix-coil transition of polypeptides. *Journal of Physical Chemistry B*, 113(26), 9004–9015.
- Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., ... Schwede, T. (2014). SWISS-MODEL: Modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Research*, 42(W1), W252–W258.
- Chen, V. B., Arendall 3rd, W. B., Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., ... Richardson, D. C. (2010). MolProbity: All-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, D66(1), 12–21.
- DataWarrior User Manual. (2018). Retrieved May 5, 2018, from <http://www.openmolecules.org/help/chemistry.html>
- Davis, I. W., Leaver-Fay, A., Chen, V. B., Block, J. N., Kapral, G. J., Wang, X., ... Richardson, D. C. (2007). MolProbity: All-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Research*, 35(Web Server), W375–W383.
- Fogh, R. H., Boucher, W., Vranken, W. F., Pajon, A., Stevens, T. J., Bhat, T. N., ... Laue, E. D. (2005). A framework for scientific data modeling and automated software development. *Bioinformatics*, 21(8), 1678–1684.
- Friesner, R. A., Banks, J. L., Murphy, R. B., Halgren, T. A., Klicic, J. J., Mainz, D. T., ... Shenkin, P. S. (2004). Glide: A new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(7), 1739–1749.
- Hennessy, B. T., Smith, D. L., Ram, P. T., Lu, Y., & Mills, G. B. (2005). Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 4(12), 988–1004.
- Hernández-Campos, A., Velázquez-Martínez, I., Castillo, R., López-Vallejo, F., Jia, P., Yu, Y., ... Medina-Franco, J. (2010). Docking of protein kinase B inhibitors: Implications in the structure-based optimization of a novel scaffold. *Chemical Biology & Drug Design*, 76(3), 269–276.
- Homeyer, N., & Gohlke, H. (2012). Free energy calculations by the molecular mechanics Poisson-Boltzmann surface area method. *Molecular Informatics*, 31(2), 114–122.
- Hornak, V., Abel, R., Okur, A., Strockbine, B., Roitberg, A., & Simmerling, C. (2006). Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics*, 65(3), 712–725.
- Hou, T., Wang, J., Li, Y., & Wang, W. (2011). Assessing the performance of the MM/PBSA and MM/GBSA methods: I. The accuracy of binding free energy calculations based on molecular dynamics simulations. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 51(1), 69–82.
- Huck, B., & Mochalkin, I. (2017). Recent progress towards clinically relevant ATP-competitive Akt inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 27(13), 2838–2848.
- Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W., & Klein, M. L. (1983). Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *Journal of Chemical Physics*, 79(2), 926–935.
- Kumari, R., Kumar, R., Open Source Drug Discovery Consortium., & Lynn, A. (2014). *g_mmpbsa* – A GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 54(7), 1951–1962.
- Liby, T. A., Spyropoulos, P., Buff Lindner, H., Eldridge, J., Beeson, C., Hsu, T., & Muise-Helmericks, R. C. (2012). Akt3 controls vascular endothelial growth factor secretion and angiogenesis in ovarian cancer cells. *International Journal of Cancer*, 130(3), 532–543.
- Lindorff-Larsen, K., Piana, S., Palmo, K., Maragakis, P., Klepeis, J. L., Dror, R. O., & Shaw, D. E. (2010). Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics*, 78(8), 1950–1958.
- Liu, J., Chen, X., Ward, T., Pegram, M., & Shen, K. (2016). Combined niclosamide with cisplatin inhibits epithelial-mesenchymal transition and tumor growth in cisplatin-resistant triple-negative breast cancer. *Tumor Biology*, 37(7), 9825–9835.
- Liu, L., & Dong, X. (2014). Complex impacts of PI3K/AKT inhibitors to androgen receptor gene expression in prostate cancer cells. *PLoS One*, 9(10), e108780.
- Ma, L., Fu, Q., Xu, B., Zhou, H., Gao, J., Shao, X., ... Lyu, J. (2018). Breast cancer-associated mitochondrial DNA haplogroup promotes neoplastic growth via ROS-mediated AKT activation. *International Journal of Cancer*, 142(9), 1786–1796.
- Manning, B., & Cantley, L. (2007). AKT/PKB signaling: Navigating downstream. *Cell*, 129(7), 1262–1274.
- Medina-Franco, J., Giulianotti, M. A., Yu, Y., Shen, L., Yao, L., & Singh, N. (2009). Discovery of a novel protein kinase B inhibitor by structure-based virtual screening. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19(16), 4634–4638.
- Millis, S. Z., Ikeda, S., Reddy, S., Gatalica, Z., & Kurzrock, R. (2016). Landscape of phosphatidylinositol-3-kinase pathway alterations across 19 784 diverse solid tumors. *JAMA Oncology*, 2(12), 1565–1573.
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16), 2785–2791.
- Nilges, M., Bernard, A., Bardiaux, B., Malliavin, T., Habeck, M., & Rieping, W. (2008). Accurate NMR structures through minimization of an extended hybrid energy. *Structure*, 16(9), 1305–1312.
- Parrinello, M., & Rahman, A. (1980). Crystal structure and pair potentials: A molecular-dynamics study. *Physical Review Letters*, 45(14), 1196–1199.
- Rieping, W., Habeck, M., Bardiaux, B., Bernard, A., Malliavin, T. E., & Nilges, M. (2007). ARIA2: Automated NOE assignment and data integration in NMR structure calculation. *Bioinformatics*, 23(3), 381–382.
- Šali, A., & Blundell, T. L. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *Journal of Molecular Biology*, 234(3), 779–815.
- Sander, T., Freyss, J., von Korff, M., & Rufener, C. (2015). DataWarrior: An open-source program for chemistry aware data visualization and analysis. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 55(2), 460–473.
- Sanner, M. F. (1999). Python: A programming language for software integration and development. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, 17(1), 57–61.
- Schrödinger release 2015-4. (2015). *Glide version 6.9*. New York, NY: Schrödinger, LLC.
- Schrödinger release 2015-4. (2015). *Maestro version 10.4*. New York, NY: Schrödinger, LLC.
- Schrödinger release 2015-4. (2015). *Prime version 4.2*. New York, NY: Schrödinger, LLC.
- Schrödinger release 2015-4. (2015). *Protein Preparation Wizard; Epik version 3.4*. New York, NY: Schrödinger, LLC.
- Sousa Da Silva, A., & Vranken, W. F. (2012). ACPYPE – AnteChamber PYthon Parser interfacE. *BMC Research Notes*, 5(1), 367.
- Testa, J. R., & Tsichlis, P. N. (2005). AKT signaling in normal and malignant cells. *Oncogene*, 24(50), 7391–7393.
- The UniProt Consortium. (2016). UniProt: The universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D158–D169.
- Vranken, W. F., Boucher, W., Stevens, T. J., Fogh, R. H., Pajon, A., Llinas, M., ... Laue, E. D. (2005). The CCPN data model for NMR spectroscopy: Development of a software pipeline. *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics*, 59(4), 687–696.
- Wang, J., Wolf, R. M., Caldwell, J. W., Kollman, P. A., & Case, D. A. (2004). Development and testing of a general amber force field. *Journal of Computational Chemistry*, 25(9), 1157–1174.
- Wang, J., Wang, W., Kollman, P. A., & Case, D. A. (2006). Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, 25(2), 247–260.
- Wavefunction Inc. (2010). *Spartan version 10*. Irvine, CA: Wavefunction Inc.
- WHO – Cancer. (2018). Retrieved October 2, 2018, from <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Yang, J., Cron, P., Good, V. M., Thompson, V., Hemmings, B. A., & Barford, D. (2002). Crystal structure of an activated Akt/protein kinase B ternary complex with GSK3-peptide and AMP-PNP. *Nature Structural & Molecular Biology*, 9, 940–944.
- Zhu, L., Derijard, B., Chakrabandhu, K., Wang, B. S., Chen, H. Z., & Hueber, A. O. (2014). Synergism of PI3K/Akt inhibition and Fas activation on colon cancer cell death. *Cancer Letters*, 354(2), 355–364.