



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

DISEÑO Y SÍNTESIS DE PIRIDINAS TRISUSTITUIDAS COMO INHIBIDORES DE LA
PROTEÍNA CINASA B (AKT)

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

QFB. DIANA LORENA PRADO ROMERO

DR. RAFAEL CASTILLO BOCANEGRA
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

CDMX, AGOSTO 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**DISEÑO Y SÍNTESIS DE PIRIDINAS TRISUSTITUIDAS COMO INHIBIDORES
DE LA PROTEÍNA CINASA B (AKT)**

**TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

QFB. DIANA LORENA PRADO ROMERO



Ciudad de México, 2020

Jurado asignado

- **Presidente:** Dr. Roberto Martínez Instituto de Química, UNAM
- **Vocal:** M. en C. José Manuel Méndez Stivalet Facultad de Química, UNAM
- **Vocal:** Dr. José Guadalupe López Cortés Instituto de Química, UNAM
- **Vocal:** Dr. Jaime Pérez Villanueva UAM-Xochimilco
- **Secretario:** Dr. José Luis Medina Franco Facultad de Química, UNAM

Sitio donde se desarrolló el tema

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

Parte de los resultados de este trabajo se presentaron en

258th American Chemical Society National Meeting and Exposition llevada a cabo en San Diego, California en agosto de 2019 bajo la modalidad póster:

Design and synthesis of trisubstituted pyridines as AKT inhibitors

A mis padres

Gracias por apoyarme durante mi camino profesional, por acompañarme, por sus enseñanzas y su comprensión.

AGRADECIMIENTOS

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

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría (No. de becario **888207**). Así como al Posgrado en Ciencias Químicas por el apoyo otorgado durante mi estancia en el programa.

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

A los proyectos CONACyT 251807 y PAPIIT 5000-9133 por los financiamientos concedidos para la realización de diversos trabajos de investigación.

Al PAEP por el apoyo brindado para asistir a la *258th ACS National Meeting* en San Diego, California y poder presentar parte de los resultados de este trabajo en la modalidad póster.

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

A María Teresa Obdulia Ramírez Apan del Instituto de Química de la UNAM del Laboratorio de Pruebas Biológicas (LSA), por la determinación de citotoxicidad en líneas celulares cancerosas.

A los miembros del jurado por sus valiosas correcciones y observaciones que contribuyeron a enriquecer el presente trabajo de tesis.

A mis compañeros del L-122: David Tovar, Daniela Rubalcava, Sebastián Huerta, Cristián Nava, Francisco Barrera, Hugo Jiménez, Miguel Flores y Mara Campos, por compartir tanto los momentos de diversión como los de frustración.

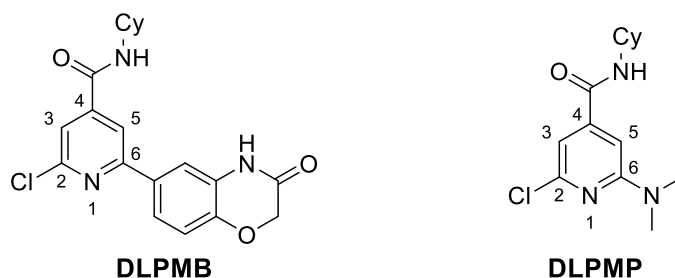
A Jorge Victoria, por estar conmigo en los buenos y malos momentos, por todos sus consejos, por creer en mí y por su honestidad, eres el mejor.

A Nayeli Balbiaux y Víctor Lemus, por todas sus recomendaciones, por su amistad y por compartir sus enseñanzas.

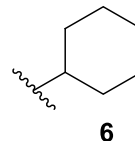
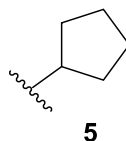
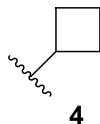
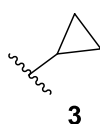
A mis amigos, compañeros y profesores que me acompañaron y contribuyeron a mi formación personal y profesional.

RESUMEN

En el presente trabajo se reporta la síntesis, caracterización, evaluación biológica y estudios de acoplamiento molecular de ocho piridinas novedosas, cuyo núcleo base y patrón de sustitución no se ha observado en otros inhibidores de AKT. Dichas piridinas trisustituidas presentan amidas en la posición 4:



Cy=



La evaluación biológica consistió en la determinación del porcentaje de inhibición del crecimiento de cinco líneas celulares cancerosas (PC-3, DU-145, HCT-15, MCF-7, MDA-MB-231) y una línea celular sana (COS-7). Las dos primeras como modelos de cáncer de próstata, las cuales están relacionadas con AKT3, al igual que la línea de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231.

Se utilizó también la línea celular de cáncer de mama MCF-7, la cual está asociada con la isoforma AKT1, al igual que la línea restante HCT-15, de cáncer de colon. Sin embargo, para comprobar la especificidad de los compuestos contra alguna isoforma particular sería necesario complementar con estudios de inhibición enzimática.

En lo que respecta a los resultados de actividad biológica, los compuestos de la serie **DLPMB** presentaron valores más altos de porcentaje de inhibición que la serie **DLPMP**. La mayoría de los compuestos no presentaron inhibición en la línea HCT-15. No obstante, todos presentaron valores moderados de inhibición contra la línea celular de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231, lo cual podría correlacionarse con cierta selectividad frente a AKT3.

Se encontraron también moderados porcentajes de inhibición de las líneas de cáncer de próstata (DU-145 y PC-3, asociadas con AKT3) por parte de los compuestos pertenecientes a la serie **DLPMB**. Estos resultados sugieren que los compuestos evaluados podrían ser el punto de partida para la optimización de las estructuras, con la finalidad de encontrar moléculas más potentes y selectivas.

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

%	Porcentaje	DMF	Dimetilformamida
2D	Bidimensional	DMSO	Dimetil sulfóxido
3D	Tridimensional	DO	Densidad óptica
AcOEt	Acetato de etilo	DPH	Donadores de puentes de hidrógeno
AcOH	Ácido acético	EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
AcOK	Acetato de potasio	EM	Espectrometría de masas
ADN	Ácido desoxirribonucleico	EnR	Enlaces rotables
AKT	Proteína cinasa B	eq	Equivalentes
AO	Adición oxidante	ER	Eliminación reductora
APCI	Del inglés: <i>Atmospheric pressure chemical ionization</i>	ESOL	Del inglés: <i>Estimated Solubility</i>
APH	Aceptores de puentes de hidrógeno	EtOH	Etanol
Asp	Ácido aspártico	FoxO	Del inglés: <i>Forkhead box class O</i>
ATP	Adenosín trifosfato	Gly	Glicina
B ₂ Pin ₂	4,4,4',4',5,5,5',5'-Octametil-2,2'-di-1,3,2-dioxaborolano	HMBC	Del inglés: <i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i>
ccf	Cromatografía en capa fina	HSQC	Del inglés: <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
CDI	1,1'-Carbonildiimidazol	IR	Espectroscopia de infrarrojo
CDKI	Inhibidor de cinasa dependiente de ciclina	logP	Logaritmo del coeficiente de reparto octanol-agua
Cl ₅₀	Concentración inhibitoria 50	Lys	Lisina
COMU	Hexafluorofosfato de (1-ciano-2-etoxi-2-oxoetilidenaminooxi)dimetilamino-morfolin-4-il-carbenio	m	Señal múltiple
COSY	Del inglés: <i>Correlation Spectroscopy</i>	m/z	Relación masa/carga
d	Señal doble	MeOH	Metanol
-D ₂ O	Señal que desaparece con óxido de deuterio	mTOR	Receptor mamífero de rapamicina
dd	Señal doble de dobles	NBS	N-Bromosuccinimida
DiFAC	Diseño de fármacos asistido por computadora	NH ₄ OAc	Acetato de amonio
DME	1,2-Dimetoxietano	OMS	Organización Mundial de la Salud

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Pd(dppf)Cl₂·CH₂Cl₂	[1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio(II) en complejo con diclorometano
PDK1	Cinasa-1 dependiente de PI3K
pf	Punto de fusión
PH	Dominio con homología a Pleckstrina
Phe	Fenilalanina
PI3K	Fosfatidilinositol-3 cinasa
PIP2	Fosfatidilinositol-3,4-bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PKB	Proteína cinasa B
PM	Peso molecular
ppm	Partes por millón
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3-fosfatasa
PyBOP	Hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tripirridodifosfonio
Rf	Factor de retención
RMN	Resonancia magnética nuclear
s	Señal simple
Ser	Serina
S_N2	Sustitución nucleofílica bimolecular
SRB	Sulforrodamina B
t	Señal triple
Thr	Treonina
tPSA	Área polar superficial topológica

VEGFR	Receptores del factor de crecimiento endotelial vascular
δ	Desplazamiento químico
λ	Longitud de onda

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Fundamentos del cáncer	2
2.1.1 Estadísticas sobre el cáncer	3
2.1.2 Tratamiento disponible	5
2.2 Proteínas cinasas	8
2.2.1 Ruta de señalización de AKT	9
2.2.2 AKT como blanco terapéutico	11
2.2.3 Líneas celulares relacionadas con las isoformas de AKT	12
2.2.4 Compuestos inhibidores de AKT	13
2.3 Diseño de fármacos asistido por computadora	15
2.3.1 Acoplamiento molecular	16
2.3.2 Cribado virtual.....	17
2.3.3 Búsqueda por similitud.....	17
2.4 Piridinas 2,4,6-trisustituidas como inhibidores potenciales de AKT	18
2.5 Reacciones de acoplamiento catalizadas por paladio	20
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. HIPÓTESIS	24
5. OBJETIVOS	24
5.1 Objetivo general	24
5.2 Objetivos específicos.....	24
6. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	25
6.1 Diseño de nuevas piridinas trisustituidas	25
6.2 Parte química	26
6.2.1 Síntesis de los intermediarios AM3-AM6.....	26
6.2.2 Síntesis del compuesto 6-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-2 <i>H</i> -benzo[<i>b</i>][1,4]oxazin- 3(4 <i>H</i>)-ona (BXN)	28
6.2.3 Síntesis de la serie DLPMB.....	28
6.2.4 Síntesis de [2-(acetilamino)pirimidin-5-il](trifluoro)borato de potasio (PYR1)	28
6.2.5 Síntesis de la serie DLPMP	29
6.3 Evaluación biológica de las series DLPMB y DLPMP	29
6.4 Parte computacional.....	30
6.4.1 Acoplamiento molecular con AutoDock 4.2	30
6.4.2 Acoplamiento molecular con Maestro	31
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
7.1 Diseño de nuevas piridinas trisustituidas	32

7.2	Parte química	35
7.2.1	Síntesis de los intermediarios AM3–AM6	35
7.2.2	Síntesis del compuesto 6-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-2 <i>H</i> -1,4-benzoxazin-3(4 <i>H</i>)-ona (BXN)	37
7.2.3	Síntesis de la serie DLPMB.....	39
7.2.4	Síntesis de [2-(acetilamino)pirimidin-5-il](trifluoro)borato de potasio (PYR1)	44
7.2.5	Síntesis de la serie DLPMP.....	47
7.3	Evaluación biológica de las series DLPMB y DLPMP	52
7.4	Parte computacional	55
7.4.1	Acoplamiento molecular con AutoDock 4.2	55
7.4.2	Acoplamiento molecular con Maestro	60
8.	CONCLUSIONES	65
9.	PERSPECTIVAS	66
10.	REFERENCIAS	67
11.	ANEXO I. SECCIÓN EXPERIMENTAL	74
11.1	Instrumentación y materiales	74
11.2	Técnicas para la síntesis de los compuestos.....	75
12.	ANEXO II. ESPECTROS	91
13.	ANEXO III. ACOPLAMIENTO MOLECULAR.....	137
13.1	Diagramas 2D de interacciones obtenidos del acoplamiento molecular con AutoDock.....	137
13.2	Diagramas 2D de interacciones obtenidos del acoplamiento molecular con Glide.....	150

Tabla 1. Algunos fármacos aprobados para el tratamiento del cáncer y su blanco terapéutico.....	7
Tabla 2. Valores de energía de unión de moléculas diseñadas evaluadas contra las isoformas de AKT.....	34
Tabla 3. Propiedades moleculares de los compuestos propuestos para la síntesis.	35
Tabla 4. Condiciones de reacción utilizadas para la formación de las amidas intermediarias.	35
Tabla 5. Caracterización espectroscópica mediante RMN ¹ H de la serie DLPMB.....	43
Tabla 6. Caracterización espectroscópica mediante RMN ¹³ C de la serie DLPMB.	44
Tabla 7. Condiciones de reacción empleadas para el segundo acoplamiento de Suzuki-Miyaura	48
Tabla 8. Condiciones de reacción empleadas para el acoplamiento de Suzuki-Miyaura	49
Tabla 9. Caracterización espectroscópica mediante RMN ¹ H de la serie DLPMP.....	51
Tabla 10. Caracterización espectroscópica mediante RMN ¹³ C de la serie DLPMP.	51
Tabla 11. Condiciones de reacción empleadas para el segundo acoplamiento de Suzuki-Miyaura ...	52
Tabla 12. Porcentaje de inhibición de crecimiento celular de las series DLPMB y DLPMP a 25 µM. .	53
Tabla 13. Propiedades moleculares de los compuestos de las series DLPMB y DLPMP.	55
Tabla 14. Valores de energía de unión y tamaño de grupo encontrados con AutoDock 4.2 para los compuestos de las series DLPMB y DLPMP.....	56
Tabla 15. Valores de energía de unión encontrados con Glide de Maestro para los compuestos de las series DLPMB y DLPMP.	61

Figura 1. La transformación de células normales es el resultado de alteraciones genéticas acumuladas	2
Figura 2. Tasas estandarizadas de mortalidad, en ambos sexos, todas las edades y para todos los tipos de cáncer en 2018.....	3
Figura 3. Tasas estandarizadas de incidencia, cáncer más común en el sexo masculino, todas las edades en 2018	4
Figura 4. Tasas estandarizadas de incidencia, cáncer más común en el sexo femenino, todas las edades en 2018	4
Figura 5. Número estimado de nuevos casos de cáncer en México, en mujeres y hombres de todas las edades en 2018	5
Figura 6. Ejemplos de rutas de señalización que involucran cinasas	8
Figura 7. Sustratos y funciones celulares de la ruta de AKT	10
Figura 8. Estructura cristalográfica compuesta del dominio PH de AKT1 (PDB:1UNQ) y el dominio catalítico de AKT2 (PDB:1O6K)	11
Figura 9. Ruta de señalización de AKT y su activación en cáncer.....	12
Figura 10. Estructuras químicas de algunos inhibidores de AKT.....	14
Figura 11. Esquema general del diseño basado en la estructura	15
Figura 12. Esquema del flujo de trabajo para el descubrimiento del compuesto A	18
Figura 13. Series de piridinas 2,4,6-trisustituidas sintetizadas por nuestro grupo de investigación a la fecha. Se muestra en color rojo la modificación realizada.....	19
Figura 14. Reacciones comunes de acoplamiento catalizadas por paladio para formar enlaces C-C.....	21
Figura 15. Piridina 2,4,6-trisustituida con el mismo sustituyente en posiciones 2 y 6	25
Figura 16. Piridinas 2,4,6-trisustituidas propuestas.	26

Figura 17. Piridinas 2,4,6-trisustituidas evaluadas.....	32
Figura 18. Piridinas 2,4,6-trisustituidas.....	33
Figura 19. Espectro RMN ¹ H del compuesto DLPMB5.....	41
Figura 20. Experimento HSQC del compuesto DLPMB5.....	42
Figura 21. Experimento HMBC del compuesto DLPMB5.....	42
Figura 22. Estructura de GSK690693, un inhibidor reportado para las tres isoformas de AKT	56
Figura 23. Modelo 3D de las conformaciones adoptadas por los compuestos de la serie DLPMB con AKT1.....	57
Figura 24. Modelo 3D de las conformaciones adoptadas por los compuestos de la serie DLPMB con AKT2.....	58
Figura 25. Superposición de los compuestos de la serie DLPMB y el inhibidor GSK690693 (negro) en la cavidad de AKT2.....	59
Figura 26. Modelo 3D de las conformaciones adoptadas por los compuestos de la serie DLPMP con AKT3.....	60
Figura 27. Modelo 3D de las conformaciones adoptadas por los compuestos de la serie DLPMB con AKT1.....	61

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, las enfermedades no transmisibles representan las principales causas de mortalidad a nivel mundial. Entre estas se encuentran todas aquellas con características propias, relacionadas con el término cáncer, de las cuales se ha observado un incremento en la incidencia durante los últimos años. Los principales tipos que afectan actualmente a la población son los de mama, próstata y pulmón. Aunque existen diversas opciones terapéuticas, se ha encontrado que gran parte de estas presentan efectos adversos; por lo que la búsqueda de tratamientos más eficaces y seguros que los disponibles hoy en día es de suma importancia.

Los avances de la biología molecular y diversas técnicas computacionales han hecho posible el entendimiento del cáncer a nivel bioquímico. A partir de esto, se han desarrollado nuevas terapias dirigidas, enfocadas en blancos terapéuticos relacionados con aspectos fisiológicos desregulados en las células cancerosas, que les confieren características como la división descontrolada de células anormales o la reprogramación del metabolismo. De esta forma, se ha obtenido una nueva generación de compuestos que presentan mayor selectividad, resultando en fármacos con menor número de efectos adversos y mayor efectividad.

Entre las dianas biológicas que se han detectado como blancos prometedores para el descubrimiento de nuevos anticancerígenos se encuentran las isoformas de la proteína cinasa B (AKT), involucradas en procesos como la regulación del ciclo celular. A partir de este conocimiento, nuestro grupo de investigación encontró, mediante herramientas computacionales, una molécula del tipo piridina 2,4,6-trisustituida con potencial inhibitorio contra AKT. Este patrón de sustitución del anillo de piridina no se ha observado anteriormente en otros compuestos reportados como inhibidores de la cinasa mencionada.

Por lo anterior, se han realizado estudios de acoplamiento y dinámica molecular para la modificación estructural de los sustituyentes presentes en la molécula encontrada, con el fin de determinar los requerimientos estructurales fundamentales para la actividad biológica deseada. A partir de este razonamiento, se diseñaron y sintetizaron series de compuestos derivados de piridina como potenciales inhibidores de AKT. Sin embargo, la mayoría de los compuestos sintetizados ha presentado baja solubilidad, lo que ha dificultado su evaluación. A raíz de ello, en el presente trabajo se propuso la incorporación de ciclos alifáticos en la posición 4 de las piridinas, sustituyentes que no se han explorado anteriormente en nuestro grupo. Adicionalmente, se realizaron ensayos de inhibición del crecimiento de líneas celulares cancerosas para evaluar el potencial de los nuevos compuestos.

2. ANTECEDENTES

2.1 Fundamentos del cáncer

El término cáncer describe a un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar cualquier parte del organismo, caracterizadas por la pérdida de control sobre el crecimiento y la división celulares. La multiplicación rápida de células anormales causa un tumor primario que se extiende más allá de sus límites habituales. También es posible que se extienda a otras regiones del cuerpo mediante un proceso conocido como metástasis, lo cual provoca aproximadamente el 90% de las defunciones.^{1,2}

El cáncer se produce por la transformación de células normales en células tumorales.³ Esta transformación puede dividirse conceptualmente en cuatro pasos: iniciación del tumor, promoción del tumor, conversión maligna y progresión del tumor.⁴ La acumulación de mutaciones en los genes que regulan la proliferación celular, la apoptosis y la reparación del ADN está asociada a la carcinogénesis. En general, el origen de la transformación maligna recae en la pérdida del balance entre la apoptosis y la proliferación celular (**Figura 1**).⁵

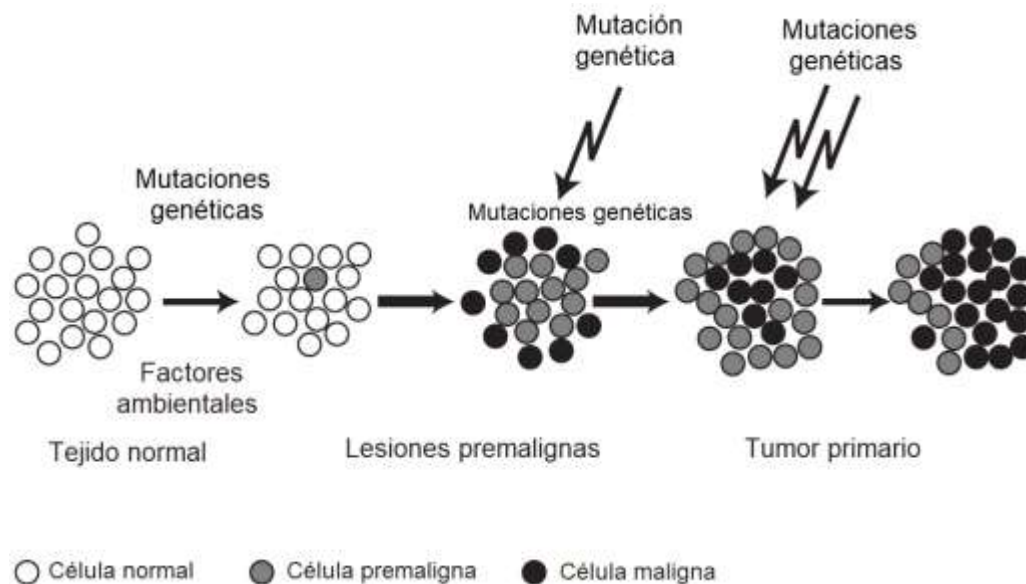


Figura 1. La transformación de células normales es el resultado de alteraciones genéticas acumuladas.⁵

La tumorigénesis es un proceso de múltiples pasos, los cuales reflejan distintas alteraciones genéticas, las cuales incluyen: aberraciones cromosomales, como translocaciones, deleciones y amplificaciones; y cambios que afectan la estructura de la cromatina y están asociados con la disfunción del control epigenético. Dichas alteraciones genéticas le confieren a la célula ventajas para su crecimiento, lo que transforma células normales en células cancerosas.²

Dichas alteraciones son resultado de la interacción entre los factores genéticos del paciente y tres categorías de agentes externos: carcinógenos físicos, como las radiaciones ultravioletas e ionizantes; carcinógenos químicos, como los componentes del humo de tabaco, las aflatoxinas, el arsénico, etc.; y carcinógenos biológicos, como determinados virus, bacterias y parásitos. La acumulación general de factores de riesgo se combina con la pérdida de eficacia de los mecanismos de reparación celular que suele ocurrir con la edad.^{1,6}

En células normales existen varios mecanismos que controlan la acumulación de mutaciones que ocurren de manera espontánea: la detención del ciclo celular, la reparación del ADN y los genes supresores de tumor. La tasa de mutaciones en las células tumorales es más alta debido a su mayor sensibilidad a agentes mutagénicos o por fallas en uno o más puntos de la maquinaria de control de la integridad genética, por lo que la célula no es destinada a senescencia o apoptosis.⁷

Algunas características reportadas que son adquiridas durante el desarrollo de tumores humanos, se enlistan a continuación: mantenimiento de señalización proliferativa, evasión de supresores de crecimiento, resistencia a muerte celular, inmortalidad replicativa, inducción de angiogénesis, invasión y metástasis, evasión del sistema inmune, reprogramación del metabolismo energético, inestabilidad genómica y mutación, inflamación promovida por el tumor.^{2,7}

En la actualidad, se conoce el funcionamiento de la mayoría de las células involucradas en distintos tipos de cáncer, a nivel genético y bioquímico. Sin embargo, la búsqueda de opciones terapéuticas continúa siendo fundamental debido al alto potencial de mutación de las células tumorales y la variedad de alteraciones genéticas que presentan. Estas propiedades podrían ser la causa de que se observen recaídas en pacientes que recibieron un tratamiento anticancerígeno exitoso.²

2.1.1 Estadísticas sobre el cáncer

A nivel mundial, el cáncer es una enfermedad que va en aumento y es la segunda causa de muerte. En el 2018 se registraron cerca de 9.6 millones de defunciones, lo que se traduce en 1 de cada 6 muertes causadas por algún tipo de cáncer. Las proyecciones de defunciones por neoplasias indican que de 2007 a 2030 la mortalidad aumentará en 45%, pasando de ocho millones a 11.5 millones anuales (**Figura 2**).^{1,8}

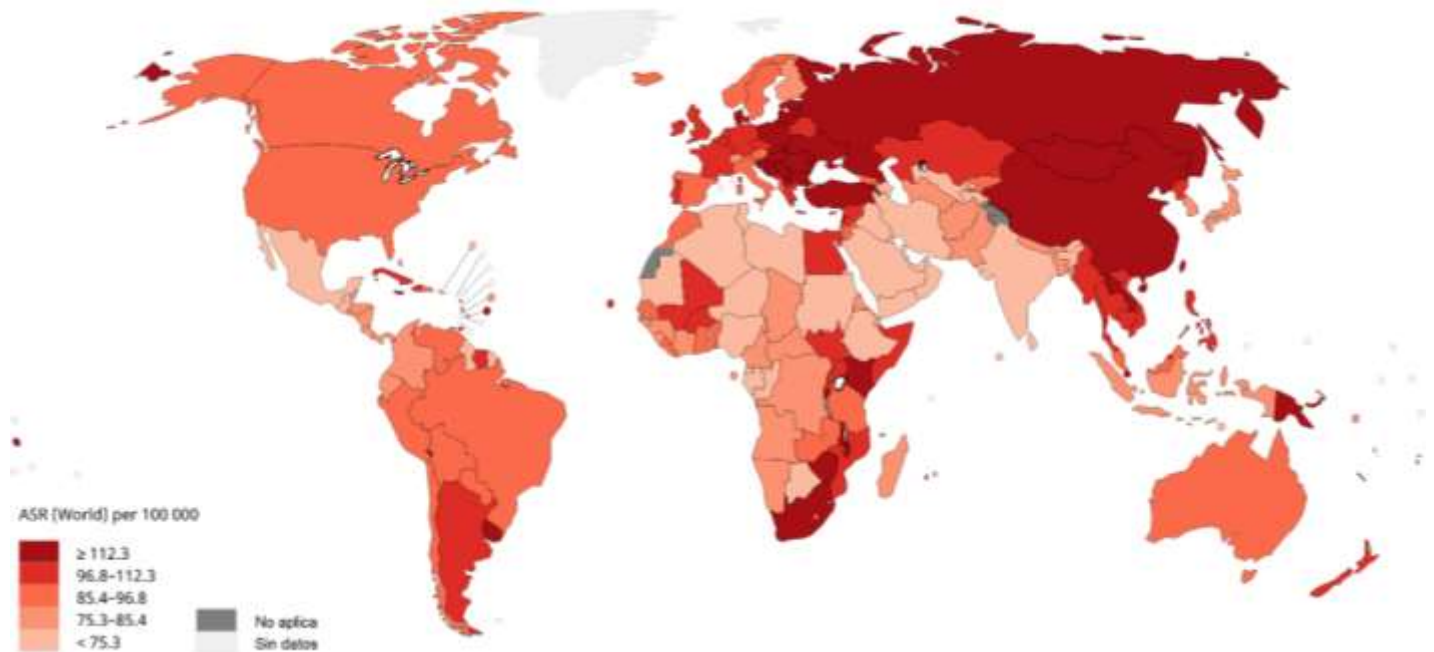


Figura 2. Tasas estandarizadas de mortalidad, en ambos sexos, todas las edades y para todos los tipos de cáncer en 2018.⁹

Debido al crecimiento poblacional y el envejecimiento, se estima que para el año 2030 los casos nuevos sobrepasarán los 20 millones anuales; empero se calcula que entre el 30 y el 50% de los cánceres se pueden evitar.⁹ Para ello es necesario reducir los factores de riesgo y aplicar estrategias preventivas de base científica. La prevención abarca también la detección precoz de la enfermedad y el tratamiento de los pacientes.¹

Los tipos de cáncer que causan un mayor número anual de muertes son los de pulmón, hígado, estómago, colon y mama. Los tipos más frecuentes son diferentes en el hombre y la mujer; en el caso del sexo masculino los tipos más frecuentes son los de próstata y pulmón (**Figura 3**), mientras que en el caso del sexo femenino son más comunes los de mama y el cervicouterino (**Figura 4**).

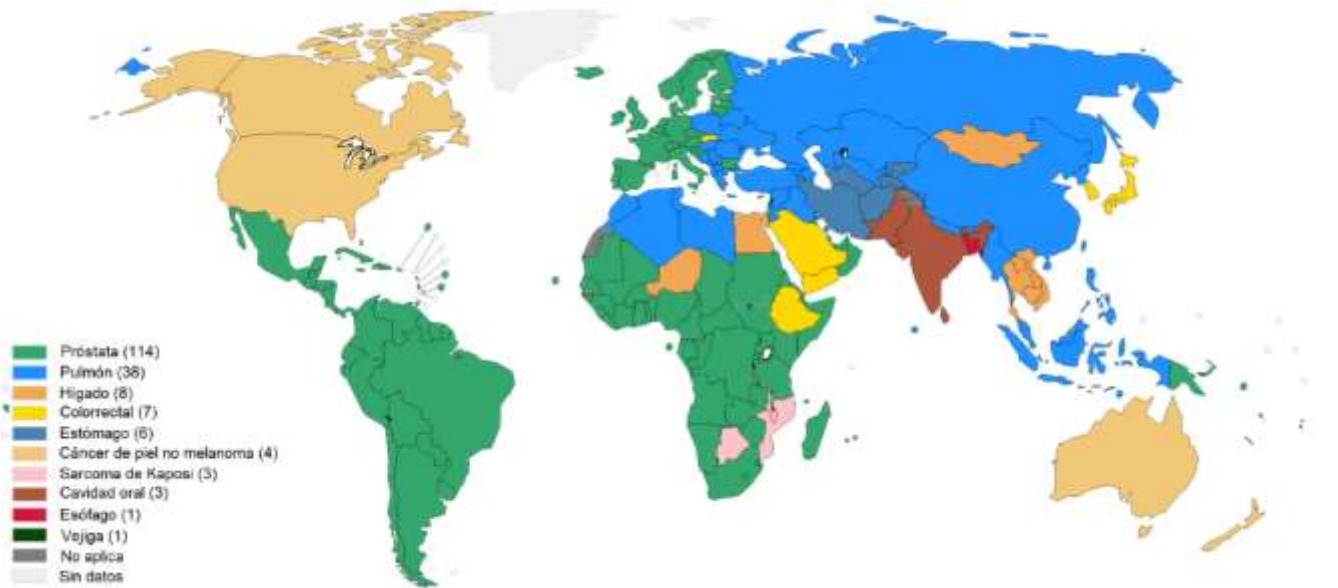


Figura 3. Tasas estandarizadas de incidencia, cáncer más común en el sexo masculino, todas las edades en 2018.⁹

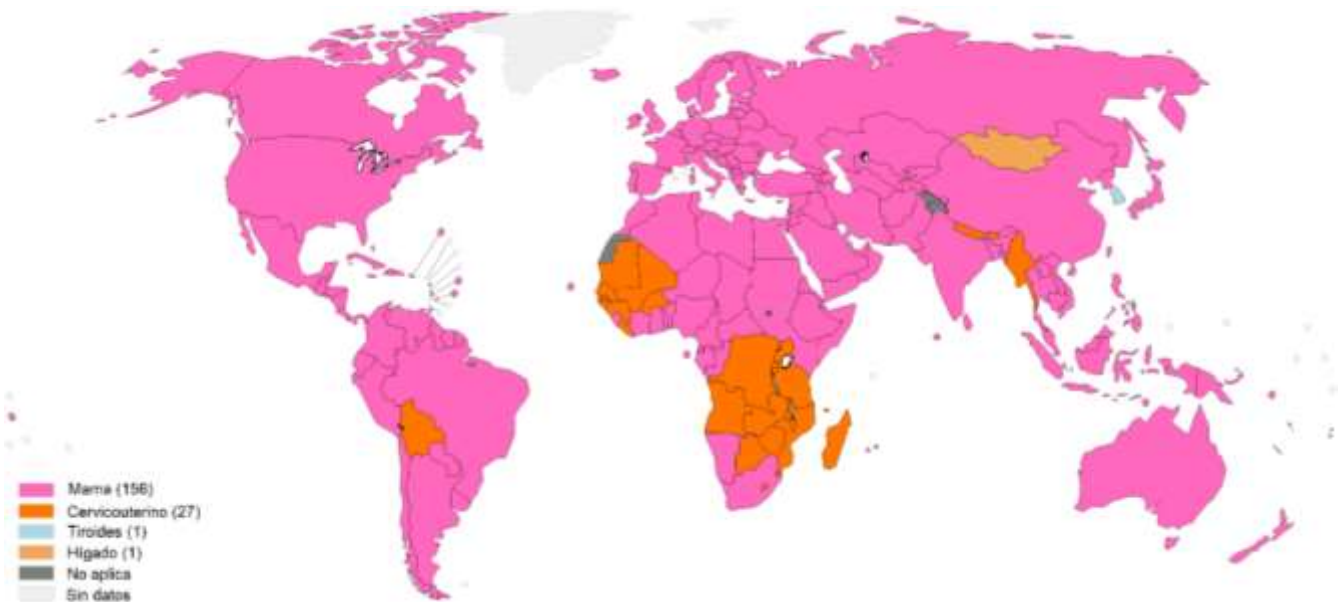


Figura 4. Tasas estandarizadas de incidencia, cáncer más común en el sexo femenino, todas las edades en 2018.⁹

En México, el cáncer es la tercera causa de muerte después de las enfermedades cardiovasculares y la diabetes. Desde la década de 1960 se ha ubicado entre las diez principales causas de defunciones. La mortalidad por tumores malignos presenta un comportamiento ascendente, lo que tiene como consecuencia una carga económico-social para el sistema de salud, para los pacientes y sus familias.¹⁰

En la población general, en ambos sexos, los más recurrentes son los cánceres de mama, de próstata, cervicouterino, colorrectal y de pulmón. Los más comunes en mexicanos son los de próstata, colorrectal, testicular, pulmonar y gástrico. Mientras los más comunes en mexicanas son los de mama, tiroides, cervicouterino, cuerpo uterino y colorrectal (**Figura 5**).⁹

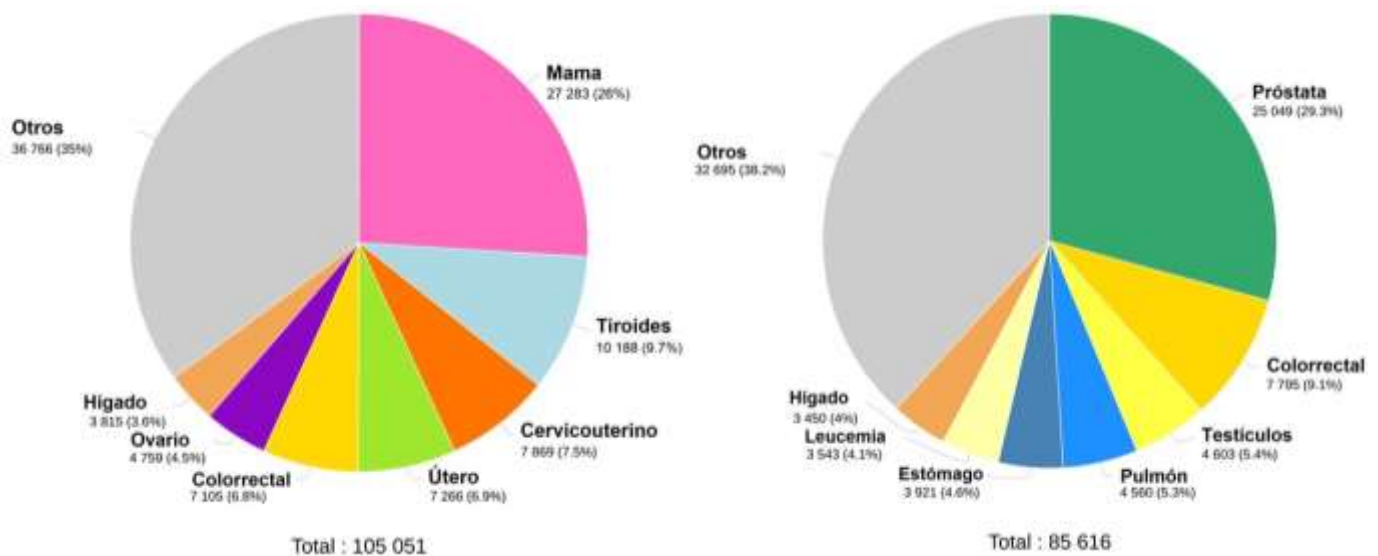


Figura 5. Número estimado de nuevos casos de cáncer en México, en mujeres (izquierda) y hombres (derecha) de todas las edades en 2018.⁹

Los estados del norte, como Chihuahua, Sonora y Nuevo León, así como la Ciudad de México son aquellos en los que se ha observado un mayor número de neoplasias con tasas de mortalidad superiores a 75 por 100,000 habitantes.¹⁰ Durante el periodo de 2011 a 2016, aproximadamente 50% de las muertes observadas por tumores malignos, en la población de 0 a 17 años, se deben a cáncer de órganos hematopoyéticos; lo que se traduce en dos de cada 100 000 personas.¹¹

Por otro lado, en los jóvenes menores de 25 años son más comunes las leucemias y los linfomas, mientras que entre los de 26 a 29 años se observan cánceres cervicales, de mama y colon. En población de 30 a 59 años comienzan a presentarse tumores relacionados a factores de riesgo asociados al estilo de vida. Se observa que tres de cada diez muertes por cáncer en la población mayor a 30 años se deben a cáncer en órganos digestivos.¹¹

2.1.2 Tratamiento disponible

La mortalidad por cáncer se puede reducir si los casos se detectan y se tratan a tiempo. La primera fase fundamental en el tratamiento del cáncer es el diagnóstico de este, basado en un examen patológico, para la posterior selección de un tratamiento adecuado y eficaz.⁷ Las opciones disponibles abarcan una o más modalidades, tales como la cirugía, la radioterapia o la

quimioterapia.¹ Cuando el tumor es localizado, los tratamientos de elección son la cirugía y la radioterapia.^{8,12}

Dentro de las opciones de tratamiento disponibles, la quimioterapia ha probado su efectividad contra ciertos tipos de cáncer a lo largo de los años.^{13,14} Esta utiliza distintos fármacos para eliminar células cancerosas, deteniendo o alentando el crecimiento de las mismas.⁸ La mayoría de los agentes quimioterapéuticos utilizados en la clínica inhiben los mecanismos involucrados en la división celular. Como consecuencia, los compuestos desarrollados bajo ese principio son citostáticos o citotóxicos para cada célula en división, lo cual incluye a las células normales, por lo que son inespecíficos.²

La quimioterapia afecta principalmente a las células cancerosas debido a su rápido crecimiento, sin embargo, puede también atacar células sanas que se dividen rápidamente, como las que se encuentran en el intestino o las responsables del crecimiento del cabello. Esta inespecificidad causa efectos secundarios frecuentes como: náuseas, fatiga, anemia, problemas de memoria o concentración, edema, dificultad para dormir y pérdida de cabello.⁸

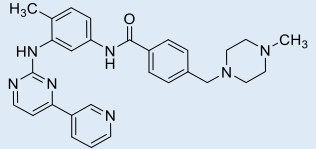
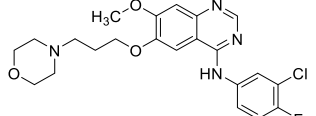
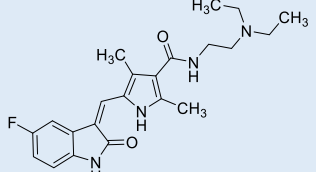
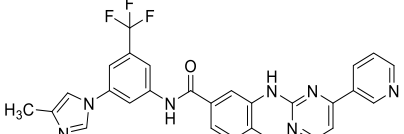
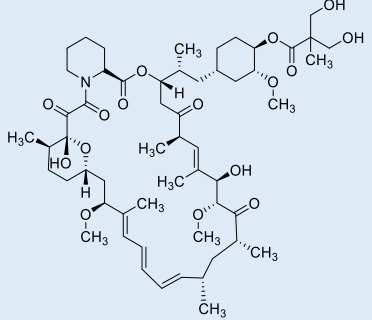
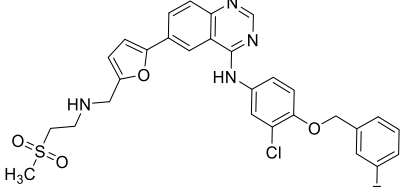
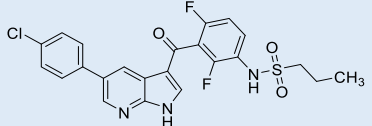
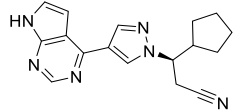
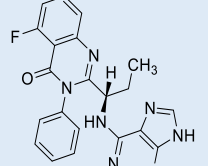
Las investigaciones recientes se enfocan en el descubrimiento de agentes quimioterapéuticos diseñados para atacar aberraciones moleculares específicas de las células tumorales, es decir, terapia dirigida. Estos agentes antitumorales específicos se basan en los avances de la biología molecular desarrollada a finales de los años ochenta. Dichos avances permitieron conocer las redes de señalización y regulación de procesos celulares como la vascularización, el crecimiento celular y la proliferación.²

El entendimiento actual sobre la biología tumoral ha hecho posible el surgimiento de nuevos fármacos dirigidos hacia una diana específica.² La descripción de los genes, proteínas y el microambiente que caracteriza a los tumores entrega información específica para facilitar el diagnóstico y pronóstico, además de la elección del tratamiento más eficaz. El conocimiento de los procesos biológicos que caracterizan a los distintos tipos de cáncer permitirá acelerar la introducción de nuevas prácticas moleculares a los procedimientos clínicos habituales.⁷

Las terapias dirigidas pueden incluir moléculas pequeñas o estructuras macromoleculares como anticuerpos monoclonales.² Las dianas terapéuticas pueden incluir factores de crecimiento, moléculas de señalización, proteínas del ciclo celular, moduladores de la apoptosis y moléculas que promueven la angiogénesis. De esta forma, en la actualidad han sido aprobados distintos fármacos dentro del grupo de las moléculas pequeñas que inhiben preferentemente a un blanco molecular específico (**Tabla 1**).¹²

Tomando en consideración, por ejemplo, la independencia de señales de crecimiento que presentan frecuentemente las células tumorales se sabe que existe una pérdida de homeostasis del ciclo celular. Normalmente, las células son estimuladas por señales externas de proliferación que activan receptores presentes en la superficie celular, típicamente con dominios tirosina cinasa. La descripción de estas alteraciones ha permitido la identificación de blancos terapéuticos para controlar el crecimiento de las células cancerosas.⁷

Tabla 1. Algunos fármacos aprobados para el tratamiento del cáncer y su blanco terapéutico ^{2,15}

Fármaco	Estructura	Blanco	Aprobación por la FDA
Imatinib		c-kit, PFGFR	2001
Gefitinib		EGFR	2003
Sunitinib		VEGFR	2006
Nilotinib		Bcr-Abl	2006
Temsirolimus		mTOR	2007
Lapatinib		HER-2	2007
Vemurafenib		Raf	2011
Ruxolitinib		JAK	2011
Idelalisib		PI3K	2014

2.2 Proteínas cinasas

Las proteínas cinasas son enzimas que catalizan la transferencia de un grupo fosfato del ATP hacia un residuo de serina, treonina o tirosina de su proteína blanco. Desempeñan un rol fundamental en la transducción de señales y otros procesos celulares (**Figura 6**), representando entre el 2% y el 3% de los genes. La disfunción de las cinasas está implicada en distintas enfermedades humanas, particularmente cáncer, lo cual las ha colocado como una de las familias proteicas más estudiadas como dianas terapéuticas.¹⁶

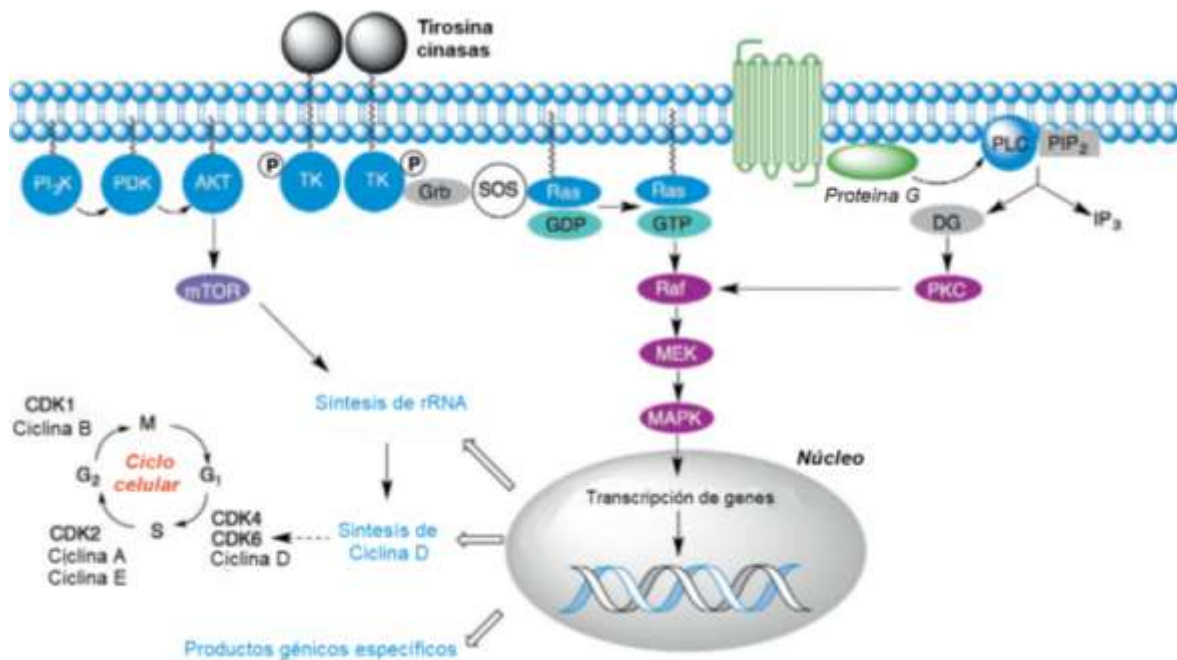


Figura 6. Ejemplos de rutas de señalización que involucran cinasas.¹⁷

La fosforilación de proteínas puede tener efectos drásticos en la señalización celular, por lo que existen varios mecanismos para la regulación de las cinasas tales como: la inhibición por otras proteínas, auto inhibición con dominios regulatorios, el control de los niveles de expresión y la restricción de la localización. Las mutaciones asociadas a los distintos padecimientos relacionados con las cinasas suelen evadir dichos mecanismos inhibitorios.^{18,19}

El dominio catalítico de las proteínas cinasas consiste en el lóbulo N-terminal y el C-terminal. El primero consiste en cinco hojas β -plegadas y una α -hélice. En contraste, el C-terminal es mayormente compuesto por α -hélices. La cavidad del sitio de unión a ATP se encuentra entre los dos lóbulos. El ATP tiene interacciones con ambos, además de elementos conservados como la región bisagra y los bucles de unión a fosfato (*P-loop*), de activación y catalítico.²⁰

La región bisagra conecta al lóbulo N-terminal con el C-terminal y forma interacciones con la adenina presente en el ATP. El bucle de unión a fosfato es rico en residuos de glicina, mientras el bucle de activación posee los residuos Asp-Phe-Gly, el cual es altamente conservado. Asimismo, en el sitio activo se encuentra un ácido aspártico que promueve la fosforilación del sustrato, el cual forma puentes de hidrógeno con el residuo de serina, treonina o tirosina.²¹

El desarrollo de compuestos inhibidores de cinasas comenzó con la síntesis de análogos de la tirosina. Posteriormente se analizaron productos naturales, como el erstatin, para inhibir al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y otras cinasas.^{17,22} Se desarrollaron también inhibidores contra las serina-treonina cinasas, encontrando moléculas pequeñas que inhiben a las cinasas compitiendo por el ATP. Así surgió el interés de sintetizar nuevas moléculas pequeñas para inhibir cinasas involucradas en rutas de señalización como la de AKT.^{23–25}

2.2.1 Ruta de señalización de AKT

Las células con altas tasas de crecimiento, como las células cancerosas, requieren una eficiente biosíntesis de macromoléculas para satisfacer las demandas metabólicas, además de procesos celulares que contribuyen a la tumorigénesis.²⁰ La ruta que involucra a PI3K-AKT-mTOR se activa por factores de crecimiento, lo que lleva al aumento de la glucólisis mediante distintos caminos. AKT promueve la expresión del transportador GLUT1, estimula la actividad de la fosfofructoquinasa y la asociación de las hexocinasas 1 y 2 con la mitocondria.²⁶

La señal corriente abajo de AKT involucra a la diana de la rapamicina en mamíferos (mTOR), que estimula numerosas rutas de señalización. Además, la ruta de PI3K/AKT/mTOR y la de MAPK están involucradas en la biosíntesis de lípidos.²⁶ También controla factores de transcripción que intervienen en la expresión de algunos elementos clave de otras rutas de señalización. De esta forma, AKT, una serina-treonina cinasa, tiene un papel fundamental en numerosos procesos celulares.^{27,28}

AKT se acciona por factores de crecimiento a través de PI3K; la activación de PI3K genera fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3) a partir del sustrato fosfatidilinositol 3,4-bifosfato (PIP2). PIP3 se une al dominio de homología con pleckstrina (PH), presente en AKT, lo que provoca la traslocación de este último a la membrana celular.²⁰ El reclutamiento de AKT a la membrana provoca su fosforilación en la Ser473 mediante mTORC2 y en la Thr308 mediante la cinasa dependiente de fosfoinositol-1 (PDK1) para su completa activación.²⁹

Posteriormente es capaz de fosforilar sustratos como: la glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK-3), los factores de transcripción FoxO y el complejo 1 del blanco de la rapamicina en mamíferos (mTORC1).^{20,27} Esta señalización contribuye a funciones celulares como la toma de nutrientes, reacciones anabólicas, crecimiento celular y supervivencia, síntesis de proteínas, traducción de RNA, autofagia, angiogénesis, etc (**Figura 7**).^{28,30–32}

Existen tres isoformas conocidas de AKT: AKT1 (PKB α), AKT2 (PKB β) y AKT3 (PKB γ), las cuales tienen aproximadamente el 80% de homología en sus secuencias. Cada una de las isoformas de estas serina/treonina cinasas son de unos 57 kDa, que comparten una estructura similar: un dominio amino-terminal de homología a Pleckstrina (PH), un dominio central catalítico de serina/treonina (CAT) y un dominio regulatorio C-terminal (EXT) que contiene el motivo hidrofóbico regulatorio (HM). El dominio catalítico se encuentra unido con el dominio PH mediante un *linker* (**Figura 8**).^{27,33}

AKT1 se expresa en la mayoría de los tejidos; AKT2 es predominante en tejidos sensibles a la insulina, como el hígado y el tejido adiposo; mientras que AKT3 se encuentra principalmente en el cerebro. El cultivo de diferentes líneas celulares de cáncer sugiere que la inhibición selectiva de cada una de las diferentes isoformas de AKT puede ser útil en tipos de cáncer específicos.²⁰

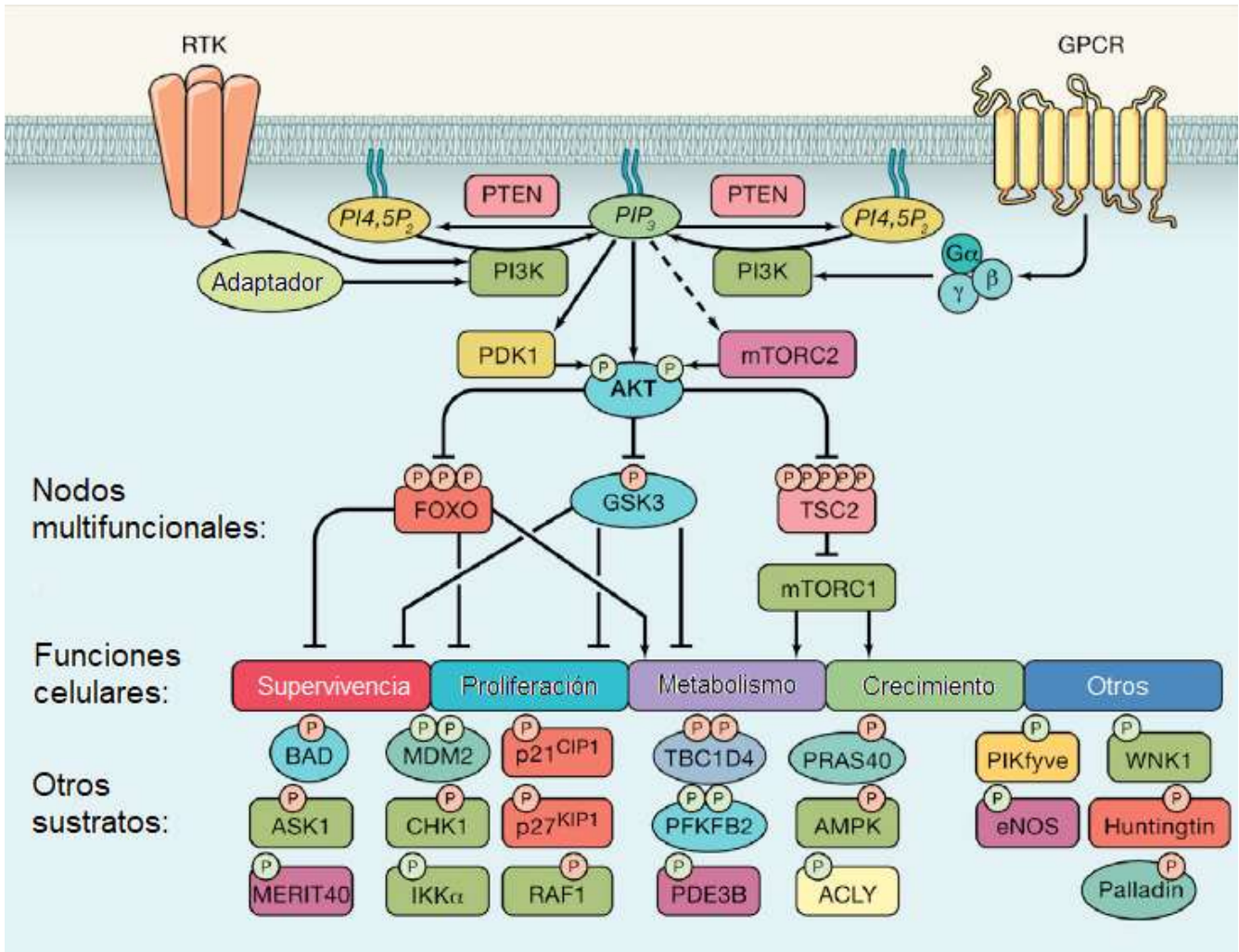


Figura 7. Sustratos y funciones celulares de la ruta de AKT.²⁹

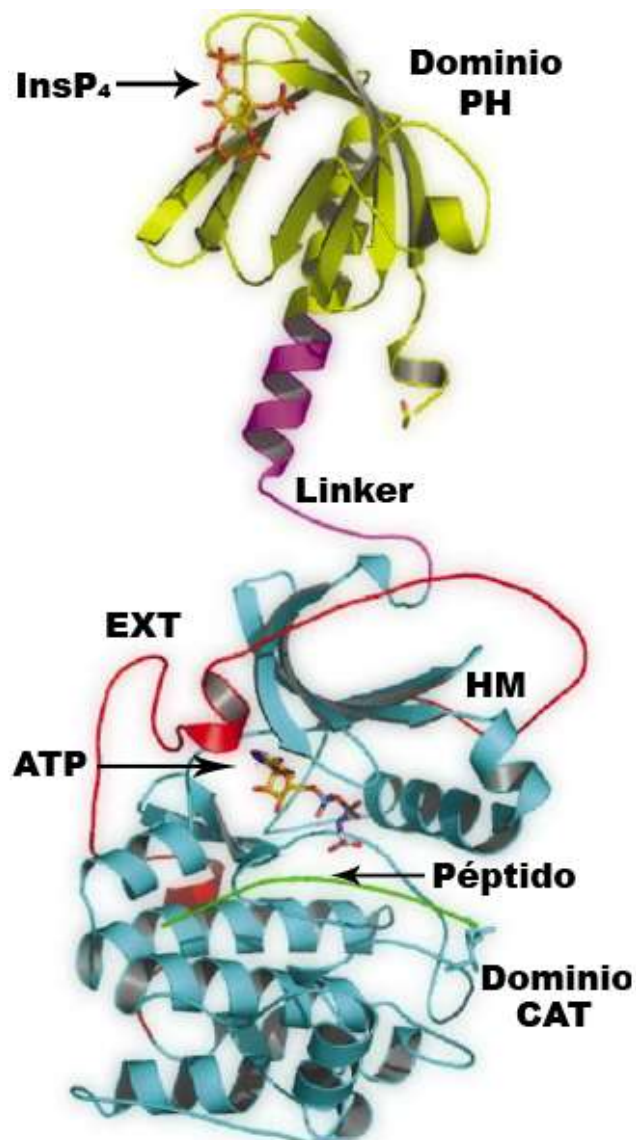


Figura 8. Estructura cristalográfica compuesta del dominio PH de AKT1 (PDB:1UNQ) y el dominio catalítico de AKT2 (PDB:1O6K). El *linker* fue modelado.³⁴

2.2.2 AKT como blanco terapéutico

La ruta de señalización de AKT se ha posicionado como fuente de blancos atractivos para el descubrimiento de nuevos anticancerígenos. La hiperactivación de AKT se observa mediante múltiples mecanismos como: la pérdida de la actividad de la fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato-3-fosfatasa (PTEN), mutaciones que activan la subunidad catalítica de PI3K, mutaciones que activan a las isoformas de AKT, la activación de RAS y receptores de factores de crecimiento, así como la amplificación de genes que codifican la subunidad catalítica de PI3K y AKT (**Figura 9**).^{35–37}

AKT, también conocida como proteína cinasa B (PKB), suele estar sobreexpresada o hiperactivada en cáncer de pulmón, mama, ovario, gástrico, pancreático y gliomas. Cada una de las isoformas conocidas está asociada a ciertos tipos de cáncer. Por ejemplo, AKT1 está asociada con cáncer gástrico y de mama; mientras que AKT2 con cáncer de ovario, páncreas, hígado y colorrectal; por último, AKT3 con cáncer de mama triple negativo y melanoma.^{2,36,38–40}

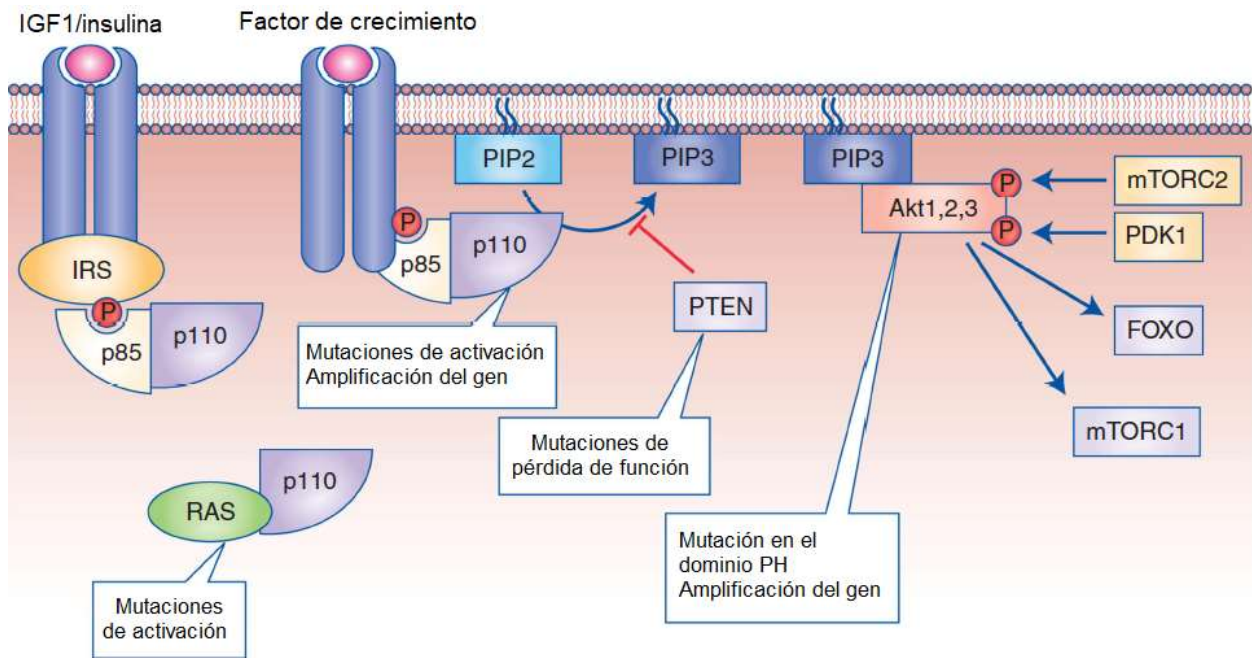


Figura 9. Ruta de señalización de AKT y su activación en cáncer.²⁰

Por ello, se han desarrollado inhibidores específicos de PI3K y AKT como compuestos anticancerígenos. Sin embargo, se ha demostrado que la inhibición de AKT puede ser más útil en combinación con otros anticancerígenos. Esto es debido a la relación que existe entre la ruta de señalización de PI3K y la absorción de glucosa, lo cual puede provocar efectos adversos como hiperglucemia o hiperinsulinemia.^{20,36}

De ahí el interés por el descubrimiento de inhibidores selectivos para las isoformas de AKT, desde la búsqueda por nuevos blancos para terapia dirigida en los años 2000,⁴⁰ donde se observó que la inhibición de estas cinasas podría ser clave para el tratamiento de tipos de cáncer agresivos o que desarrollan resistencia después del tratamiento farmacológico inicial. Tal es el caso de cáncer de pulmón de células no pequeñas³⁸ y el cáncer de mama triple negativo.⁴¹

2.2.3 Líneas celulares relacionadas con las isoformas de AKT

Para el estudio de compuestos potencialmente anticancerígenos suelen utilizarse líneas celulares. Una línea celular de cultivo se define como el conjunto de células de un tipo único (humano, animal o vegetal) que se han adaptado para crecer continuamente en el laboratorio y que se usan en investigación.⁴² Entre las líneas celulares relacionadas con AKT se encuentran las siguientes: LNCaP, CL-1, DU-145, PC-3 (próstata), HCT-15, HCT116 (colon), MCF-7, HS578T, MDA-MB-468, MDA-MB-231 (mama). A continuación, se detallan las utilizadas en el estudio de los compuestos presentados en este trabajo.

Comenzando con las líneas de cáncer de próstata, en general, se ha encontrado una activación significativa de AKT en más del 50% de los carcinomas de próstata. Particularmente, se ha encontrado que la actividad de AKT3 está elevada de 40 a 100 veces en la línea celular PC-3. Otra línea celular que expresa niveles moderados de AKT1, AKT2 y AKT3 es la línea celular DU-145, ambas utilizadas en el estudio del cáncer de próstata.⁴³

Las células PC-3 y DU-145 son negativas al receptor de andrógenos, las cuales se obtuvieron a partir de metástasis de cáncer de próstata en hueso y cerebro, respectivamente. Estas líneas celulares presentan mayor abundancia de la isoforma AKT3 respecto a LNCaP. La elevación de AKT3 promueve la proliferación de líneas celulares de cáncer de próstata como DU-145 y PC-3.⁴⁴

Por otro lado, la actividad de AKT se ha considerado un factor crítico en la agresividad del cáncer de colon. En estudios previos, se han observado niveles altos de AKT fosforilada en las células HCT-15, una característica común en varios tipos de células cancerosas. Se ha comprobado que la isoforma AKT1 es indispensable para mantener la tumorigenicidad de células cancerosas, entre ellas las clasificadas como HCT-15.^{45,46}

En cuanto a líneas celulares de cáncer de mama, se ha reportado actividad elevada de AKT2 en el 30-40% de los carcinomas, además se ha detectado actividad elevada de AKT1 en el 30-38% de los tumores primarios de mama. Entre las células más utilizadas para el estudio de este tipo de cáncer están las de la línea MCF-7, derivada de un derrame pleural maligno, cuyas células son positivas para el receptor de estrógeno. Se sabe que este tipo de células expresan niveles significativos de AKT1 fosforilada.⁴⁷

En contraste, se ha encontrado que los niveles de expresión de AKT3 están elevados en tumores de cáncer de mama negativos para el receptor de estrógeno, lo que sugiere que esa isoforma está relacionada con el fenotipo agresivo del cáncer de mama.⁴⁷ Tal es el caso de los cánceres de mama triple negativo, los cuales presentan mayores tasas de recurrencia.

Una de las líneas utilizadas para el estudio del cáncer de mama triple negativo es la MDA-MB-231, cuyo crecimiento es independiente de hormonas.⁴⁸ El tratamiento de este tipo de cáncer es complicado debido a la complejidad y heterogeneidad de este, por lo que siguen estudiándose los mecanismos moleculares involucrados en su progresión.⁴⁹

Los ejemplos anteriores muestran que las isoformas de AKT se relacionan con distintos tipos de cáncer, por lo que representan un blanco terapéutico prometedor. Los inhibidores de AKT pueden ser un tratamiento anticancerígeno eficaz por sí mismos o en combinación con otros fármacos.

2.2.4 Compuestos inhibidores de AKT

La investigación de moléculas pequeñas como inhibidores de AKT está centrada en el descubrimiento y en la mejora de los perfiles farmacológicos de los compuestos. Dentro de estas moléculas, los inhibidores competitivos de ATP son los más comunes, sin embargo, también existe una gran diversidad de inhibidores alostéricos de otras regiones de la cinasa como el dominio PH o el dominio catalítico.⁵⁰⁻⁵³

Realizando la búsqueda de las isoformas de AKT como blanco, en la base de datos ChEMBL⁵⁴, se encontró que existen 6024 moléculas pequeñas reportadas para el caso de AKT1, 2898 para AKT2 y 1934 para AKT3; lo cual no implica que sean selectivas para las isoformas de AKT. Por ello, es posible citar varios ejemplos de inhibidores (**Figura 10**), los cuales son diversos estructuralmente, incluyendo núcleos como: aminofurazanos, pirrolopirimidinas, tiazoles, indoles, espirocromanos, indazoles, entre otros.^{27,50,53,55-62}

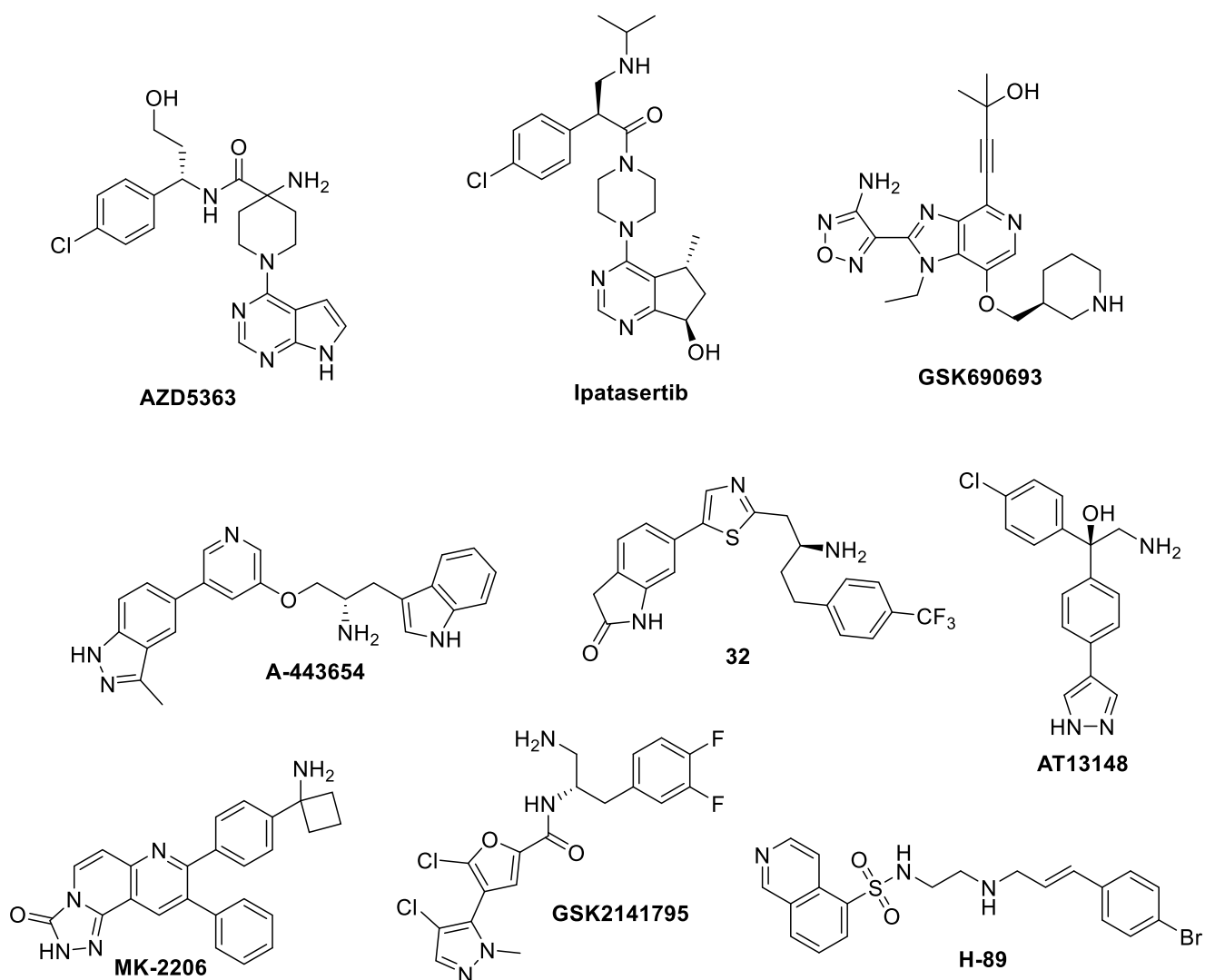


Figura 10. Estructuras químicas de algunos inhibidores de AKT.^{17,51,63,64}

De los resultados de actividad biológica, de los compuestos que presentaron alta potencia sobre alguna isoforma en particular, surgió el interés sobre la selectividad de los futuros inhibidores. Esto es porque se ha encontrado que las diferentes isoformas tienen diferentes funciones, incluso opuestas, en la regulación de la migración celular de las células cancerosas, lo que implica que la inhibición no selectiva puede llevar a efectos indeseables de diseminación del cáncer *in vivo*.⁴⁸ Además, se ha encontrado que los compuestos con menor potencia hacia AKT2 presentan mejores perfiles farmacológicos, debido a la relación de esta isoforma con el metabolismo de la glucosa.²⁰

El diseño y la optimización de nuevos inhibidores contra AKT se debe, en gran medida, a la disponibilidad de las estructuras cristalográficas de las isoformas AKT1 y AKT2. Estas cristalografías han sido reportadas por varios grupos y se encuentran disponibles en el PDB. Sin embargo, la estructura de AKT3 no ha sido determinada experimentalmente, por lo que se ha recurrido al modelado por homología de esta isoforma, tomando ventaja de la alta similitud entre las secuencias de las tres isoformas. Con esto ha sido posible utilizar diversas técnicas computacionales para el diseño basado en la estructura.^{65,66}

2.3 Diseño de fármacos asistido por computadora

Los métodos computacionales han sido ampliamente utilizados en el proceso de descubrimiento de fármacos durante los últimos años. Esto es debido a que el proceso tradicional para posicionar un fármaco en el mercado consume mucho tiempo. Por ello, diversos métodos computacionales se han aplicado al descubrimiento, desarrollo y análisis de moléculas biológicamente activas. La aplicación de dichos métodos se conoce como diseño de fármacos asistido por computadora.⁶⁷⁻⁶⁹

El diseño de fármacos asistido por computadora (DiFAC) ha sido de crucial importancia en el desarrollo de nuevas moléculas pequeñas por más de tres décadas. Los métodos utilizados pueden estar basados en el ligando o en la estructura. Los métodos basados en el ligando se fundamentan en el conocimiento de moléculas activas. Mientras que los basados en la estructura requieren el conocimiento de la estructura tridimensional del blanco o diana farmacológica, obtenida por rayos X o RMN. Además, los métodos computacionales pueden ser útiles para la optimización de propiedades fisiológicas y predicción de la toxicidad de nuevas moléculas.⁷⁰

Por otro lado, durante el desarrollo de nuevos fármacos es importante conocer sus propiedades químicas, tales como solubilidad y reactividad, debido a que estas son relevantes para el metabolismo en todas sus etapas: absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME).² Estas propiedades pueden predecirse mediante DiFAC para aumentar las probabilidades de encontrar compuestos con características deseables y acelerar el desarrollo de *hit* a *lead* (**Figura 11**).^{68,71}

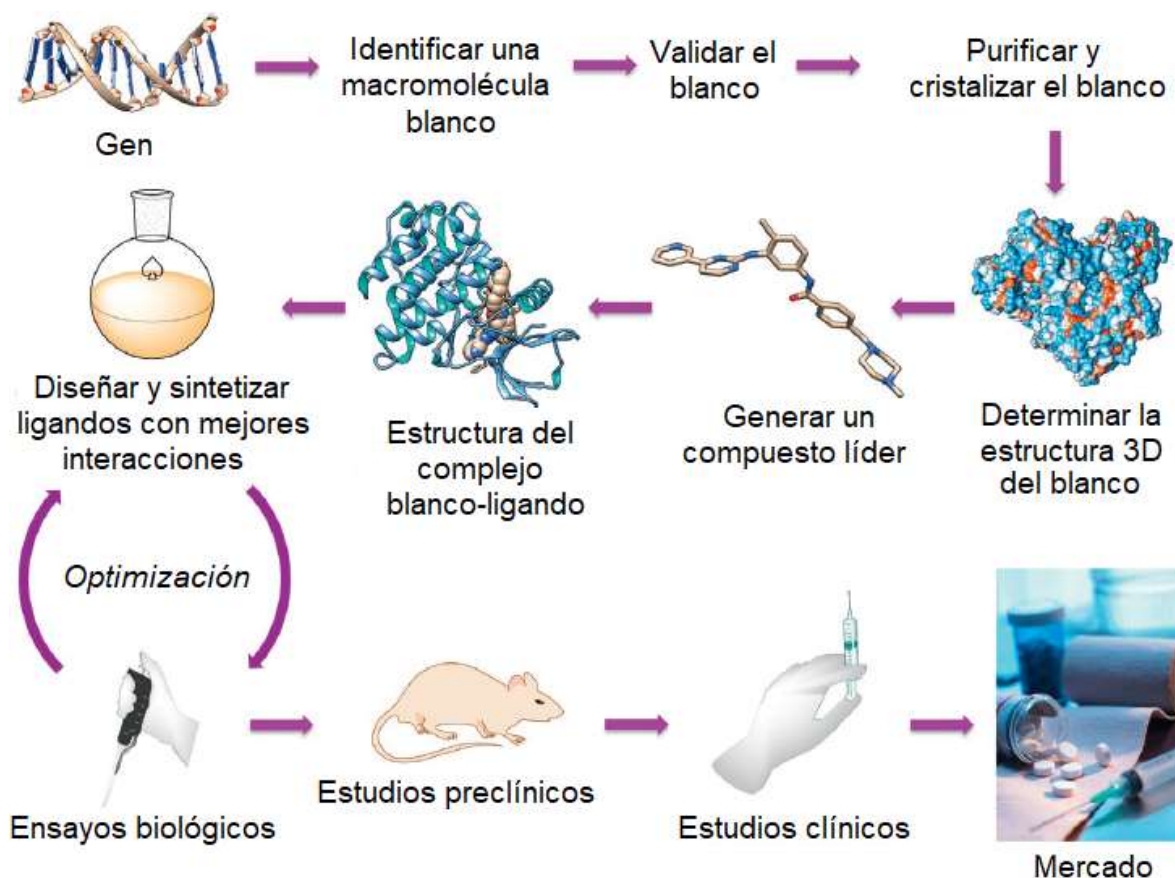


Figura 11. Esquema general del diseño basado en la estructura.²

Lo anterior debido a que los métodos de evaluación de las propiedades ADME y la toxicidad de nuevos compuestos son costosos, toman tiempo y suelen requerir una gran cantidad de pruebas con animales. Además, la predicción de estas permite eliminar candidatos en etapas tempranas del proceso de descubrimiento de nuevas moléculas. No obstante, la predicción realizada depende de factores como la calidad de los datos utilizados para crear el modelo, la cantidad de compuestos y los parámetros utilizados.⁷²

Por otro lado, el conocimiento de las estructuras tridimensionales (3D) de los nuevos blancos de interés, comúnmente proteínas, permite el diseño de moléculas pequeñas. Cuando no existe una estructura 3D, se aplican criterios de homología para obtener modelos basados en estructuras experimentales de proteínas similares. Estas estructuras también son útiles para diseñar y generar bibliotecas de compuestos para su evaluación *in silico*, como el caso anteriormente expuesto sobre las isoformas de AKT. La evaluación puede realizarse con técnicas como el acoplamiento molecular.²

2.3.1 Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular tiene como objetivo proponer un modelo de unión entre dos moléculas, lo que ha permitido el entendimiento de las fuerzas de interacción involucradas en el reconocimiento molecular. En la química farmacéutica y el descubrimiento de nuevos fármacos, dicha técnica se enfoca principalmente en las interacciones proteína-ligando, aunque recientemente también se ha aplicado para la predicción de interacciones proteína-proteína.⁷³

La mayoría de los programas de acoplamiento molecular están basados en mecánica molecular, lo que implica la descripción de sistemas poliatómicos mediante física clásica. Se utilizan parámetros experimentales como cargas, ángulos torsionales y geométricos para minimizar la diferencia existente entre los datos experimentales y las predicciones de mecánica molecular. También pueden utilizarse cálculos teóricos semiempíricos o *ab initio*.⁷³

La mecánica molecular se utiliza para calcular parámetros relacionados con la entalpía de unión, cambios en el área superficial, enlaces rotables fijos y otros relacionados con la entropía. Además de la predicción del complejo intermolecular formado por el ligando y su blanco, puede aportar información como la extensión y especificidad de la interacción. Con esto se pueden identificar los sitios de unión esenciales que posee un ligando para interactuar con la estructura tridimensional conocida del blanco.^{68,74}

En algunos programas se incluyen también parámetros de mecánica estadística, con campos de fuerza que incluyen polarizabilidad y solvatación; por lo que las funciones de evaluación se vuelven complejas. El acoplamiento molecular puede dividirse en tres etapas: preparación del ligando y la macromolécula, definición del tipo de acoplamiento molecular (rígido o flexible) y establecimiento del método de búsqueda para la conformación de los ligandos. El análisis de los datos resultantes es de utilidad para priorizar la síntesis y evaluación de los compuestos candidatos.^{73,74}

Entre las limitaciones del acoplamiento molecular está la falta de precisión de las funciones de evaluación para determinar las energías de unión, lo cual se relaciona con que la predicción de algunas interacciones como el efecto de solvatación y el cambio de entropía son difíciles de estimar. También puede mencionarse el problema de las moléculas de agua en el sitio de unión, debido a la

dificultad que representa calcular el número de moléculas de agua que podrían reemplazarse con ligandos potenciales.⁷⁵

Otro de los grandes retos a resolver es la flexibilidad del blanco en el caso de las proteínas, ya que estas pueden adoptar diferentes conformaciones dependiendo del ligando al cual se unen. En consecuencia, el diseño de fármacos asistido por computadora aún tiene varios retos por resolver; sin embargo, es posible encontrar varios ejemplos en los cuales las técnicas *in silico* han sido de ayuda en el desarrollo de nuevos fármacos.⁷⁵

2.3.2 Cribado virtual

Durante el descubrimiento de fármacos, es posible analizar una gran cantidad de compuestos presentes en bases de datos, lo cual se define como cribado virtual. Este representa una de las metodologías fundamentales para encontrar nuevos candidatos potenciales que muestran cierta actividad inicial (*hits*). Las bases de datos utilizadas incluyen compuestos virtuales que poseen similitud con un inhibidor conocido del blanco estudiado o que muestran complementariedad con la estructura del receptor.⁷⁶

Con esta técnica pueden utilizarse tanto métodos basados en la estructura del receptor, como métodos que no requieren el conocimiento de la estructura del blanco para diseñar nuevos compuestos. Esto permite la evaluación de bases de datos numerosas o bibliotecas de compuestos para identificar un pequeño número de moléculas cuya actividad puede confirmarse experimentalmente.^{68,76}

2.3.3 Búsqueda por similitud

La búsqueda por similitud está basada en el principio que dicta: “los compuestos químicos con estructuras similares pueden tener actividades similares”,⁷⁷ lo cual guía la identificación de nuevos líderes. La similitud puede determinarse basada en propiedades topológicas, estéricas, electrónicas o fisicoquímicas. Los criterios utilizados para la similitud pueden variar e incluyen: compuestos que comparten un grupo funcional, que comparten el mismo núcleo base, sus descriptores o propiedades son similares, o compuestos con farmacóforos similares.⁷⁸

La búsqueda por similitud que involucra propiedades o descriptores requiere el cálculo de coeficientes entre pares de compuestos. Los descriptores pueden ser números o mapas de bits, mientras que las propiedades de las moléculas suelen obtenerse de datos experimentales o estudios *in silico*. En la actualidad existen varios algoritmos de búsqueda por similitud basados en propiedades bidimensionales de las estructuras estudiadas.⁷⁸

Los compuestos suelen representarse con *fingerprints* o huellas digitales que representan una propiedad molecular o un fragmento estructural. Para cuantificar la similitud pueden utilizarse distintos coeficientes o correlaciones como la distancia Euclideana o el coeficiente de Tanimoto. Esta técnica puede ser utilizada, por ejemplo, para realizar búsquedas basadas en el ligando y encontrar compuestos que actúen sobre un blanco de interés.⁷⁸

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

En el caso de los inhibidores de AKT, se han encontrado compuestos que inhiben a la isoforma AKT2 en el rango micromolar. La combinación de metodologías basadas en fragmentos y en la estructura han permitido la identificación de compuestos inhibidores en el rango nanomolar. Estos antecedentes y el acceso a las estructuras cristalográficas de AKT2 (PDB: 2UW9 y 2JDR) han permitido la identificación de nuevos compuestos potenciales inhibidores de AKT.⁷⁹

Debido al interés en la identificación de nuevos compuestos anticancerígenos con actividad inhibitoria frente a AKT, en trabajos previos se realizó un cribado virtual con una base de datos de 105 937 compuestos, usando las dos estructuras cristalográficas de la AKT2 mencionadas anteriormente. Se realizó acoplamiento molecular en dos etapas, como se describe a continuación:⁷⁹

La primera etapa se realizó con el programa FRED 2.2.3 de donde se seleccionaron 1000 moléculas para cada estructura de AKT2. Estos compuestos se volvieron a someter a acoplamiento molecular con el programa GOLD 3.2. Se seleccionaron los compuestos con mejor puntaje para cada una de las estructuras cristalográficas utilizadas. Finalmente, fueron seleccionados 19 compuestos para evaluar *in vitro*. De la evaluación realizada se detectó al compuesto **A** como potencial inhibidor de AKT, mientras los otros compuestos no presentaron actividad detectable a 50 μM y 25 μM (Figura 12).⁷⁹

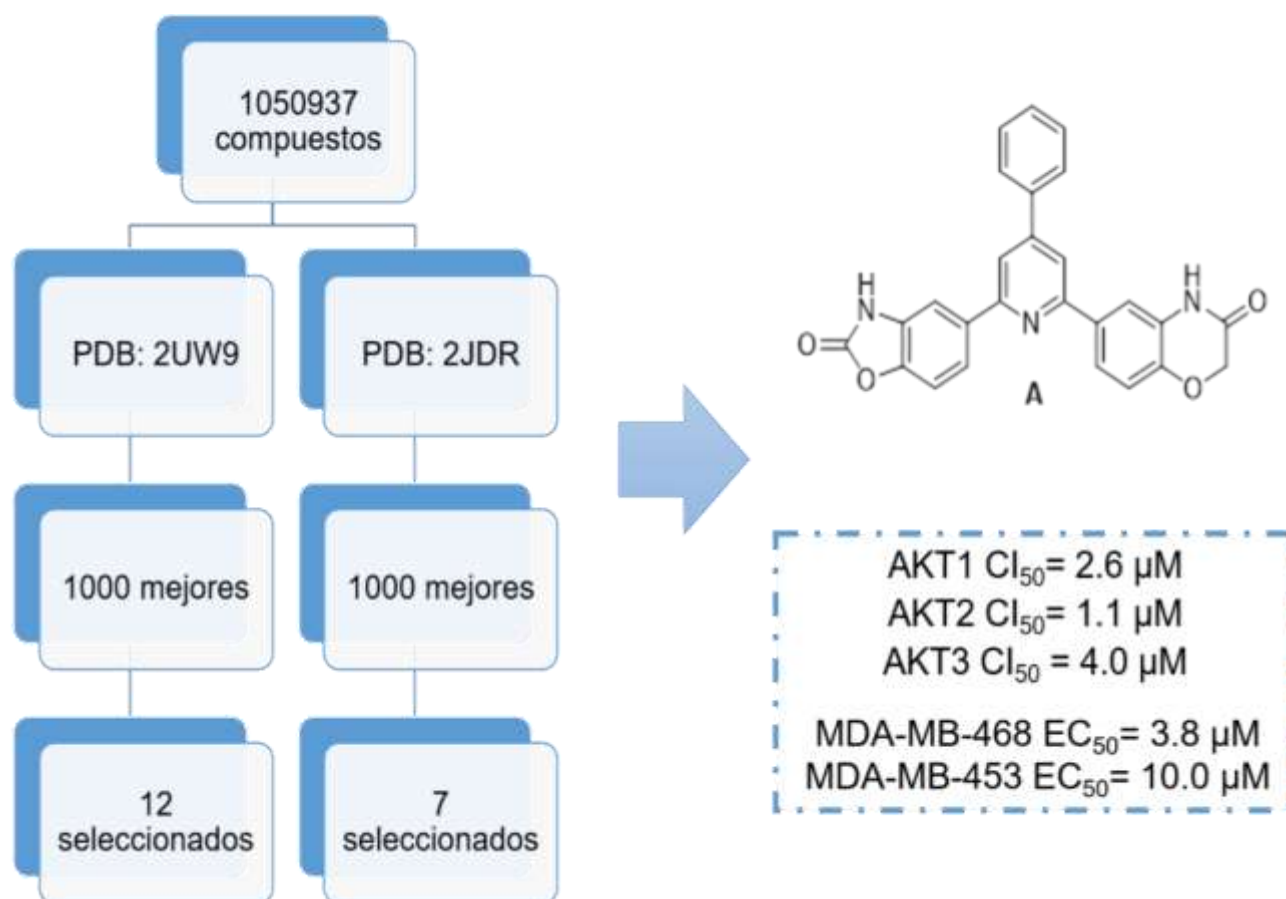


Figura 12. Esquema del flujo de trabajo para el descubrimiento del compuesto A.⁷⁹

Este compuesto **A** no presenta compuestos similares en la base de datos ChEMBL⁵⁴ utilizando un límite al 85% de similitud y es novedoso respecto a los núcleos observados en otros inhibidores de AKT, por lo que se decidió optimizarlo utilizando acoplamiento molecular para diseñar nuevos compuestos basados en la estructura.⁸⁰ La piridina 2,4,6-trisustituida (compuesto **A**) fue utilizada como base para el inicio de un programa de optimización que resultó en el diseño y síntesis de una gran variedad de compuestos por parte de nuestro grupo de investigación (**Figura 13**).⁸¹

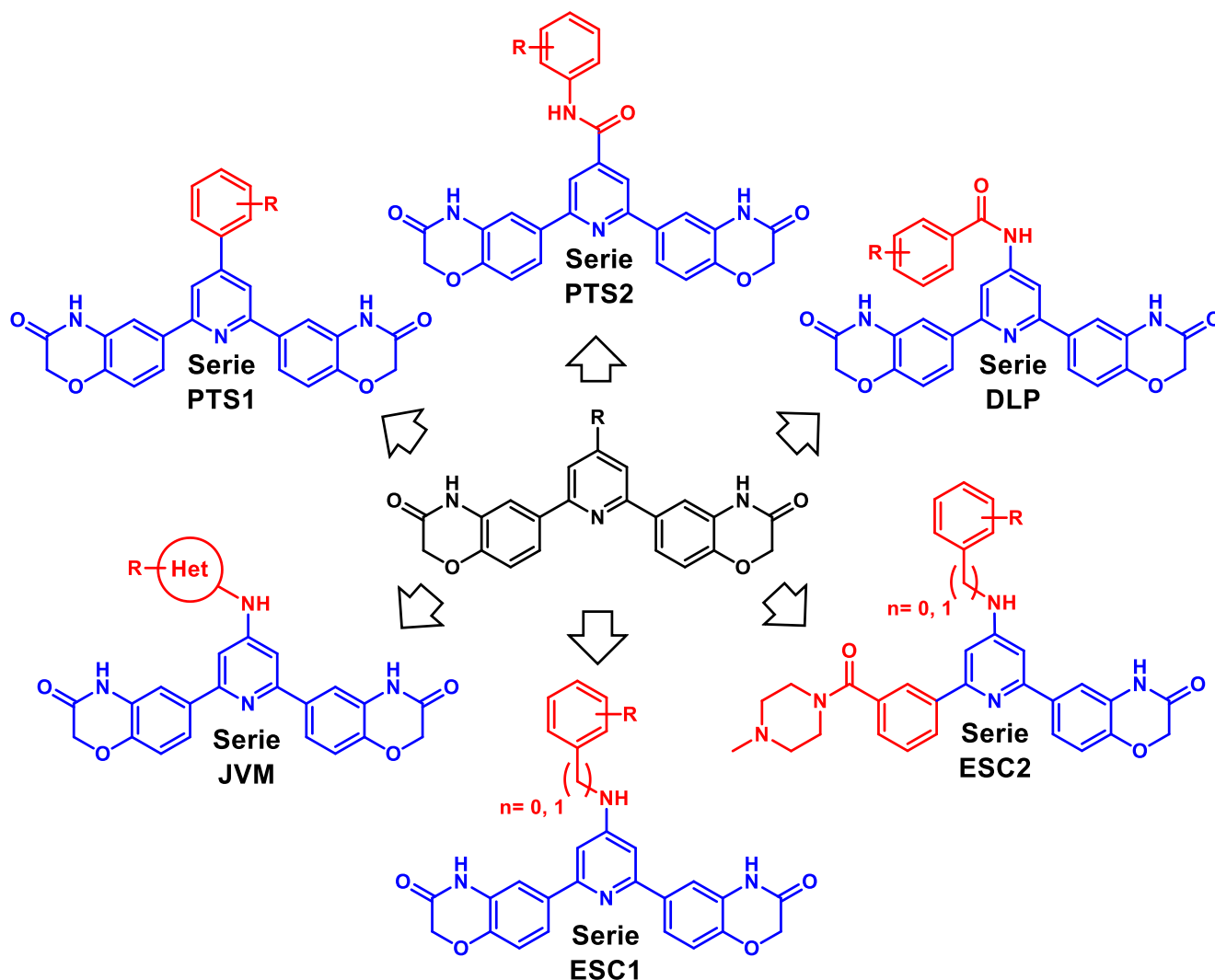


Figura 13. Series de piridinas 2,4,6-trisustituidas sintetizadas por nuestro grupo de investigación a la fecha. Se muestra en color rojo la modificación realizada.^{65,82-84}

En una primera etapa de optimización se conservaron simétricos los patrones 2,6 de la piridina, mientras que en la posición 4 se añadieron grupos NH y amidas con diferentes patrones de sustitución para favorecer interacciones por puente de hidrógeno con el sitio activo de AKT (Series PTS, JVM y DLP; **Figura 13**). Posteriormente, debido a la baja solubilidad observada en los compuestos con patrones simétricos de sustitución en las posiciones 2,6, se propuso la sustitución de un fragmento para obtener la Serie ESC2.

Por otro lado, en la serie JVM se decidió sustituir la posición 4 con heterociclos saturados y no saturados para tener un espacio químico más diverso. Todo esto permitió expandir la base de datos de piridinas trisustituidas en nuestro grupo de investigación, con el objetivo de realizar estudios QSAR que serían de utilidad en la búsqueda de inhibidores con mejores propiedades farmacológicas.

2.5 Reacciones de acoplamiento catalizadas por paladio

En fechas recientes, la catálisis con metales de transición ha tomado relevancia en la síntesis orgánica, debido a la versatilidad y utilidad de los catalizadores en diversas transformaciones químicas. El uso de las reacciones catalizadas con paladio ha aumentado en los últimos años, tanto en el ámbito académico como en el industrial. Los laboratorios de síntesis las han utilizado como una herramienta poderosa para la formación de nuevos enlaces C-C y C-heteroátomo. En ese sentido, se han desarrollado varias reacciones de acoplamiento catalizadas por paladio (**Figura 14**).⁸⁵

Los ejemplos en la **Figura 14** muestran los sustratos y condiciones clásicas reportados en la literatura, la mayoría de estas reacciones sigue un ciclo catalítico como mecanismo de reacción. Este trabajo se enfocó en la reacción de Suzuki-Miyaura, por lo que se muestra su mecanismo a manera de ejemplo (**Esquema 1**). Sin embargo, los acoplamientos cruzados muestran similitudes mecanísticas entre ellos.⁸⁵

El mecanismo del acoplamiento cruzado de Suzuki-Miyaura (**Esquema 1**) comienza con la adición oxidante (AO) del haluro de arilo sobre el centro metálico (cambio de estado de oxidación de Pd(0) a Pd(II)). Después se intercambia el anión unido al Pd por el anión de la base (metátesis); posteriormente, se lleva a cabo la transmetalación (T) del Pd(II) y el boronato (generado de la reacción del compuesto de organoboro y la base). Finalmente, se lleva a cabo una eliminación reductora (ER) en el centro metálico que genera el enlace C-C y libera Pd(0) en el medio de reacción.⁸⁵

Para nuestro grupo de investigación, la implementación de acoplamientos cruzados catalizados por paladio fue de gran relevancia, debido principalmente al patrón de sustitución que presentan las piridinas trisustituidas. Esto es porque las moléculas propuestas serían de difícil obtención por otras rutas sintéticas mediante química convencional. En general, debido a que en los trabajos anteriores se han presentado resultados positivos, en este trabajo se utilizó la reacción de Suzuki-Miyaura como parte de la ruta de síntesis planteada para la obtención de las moléculas propuestas.

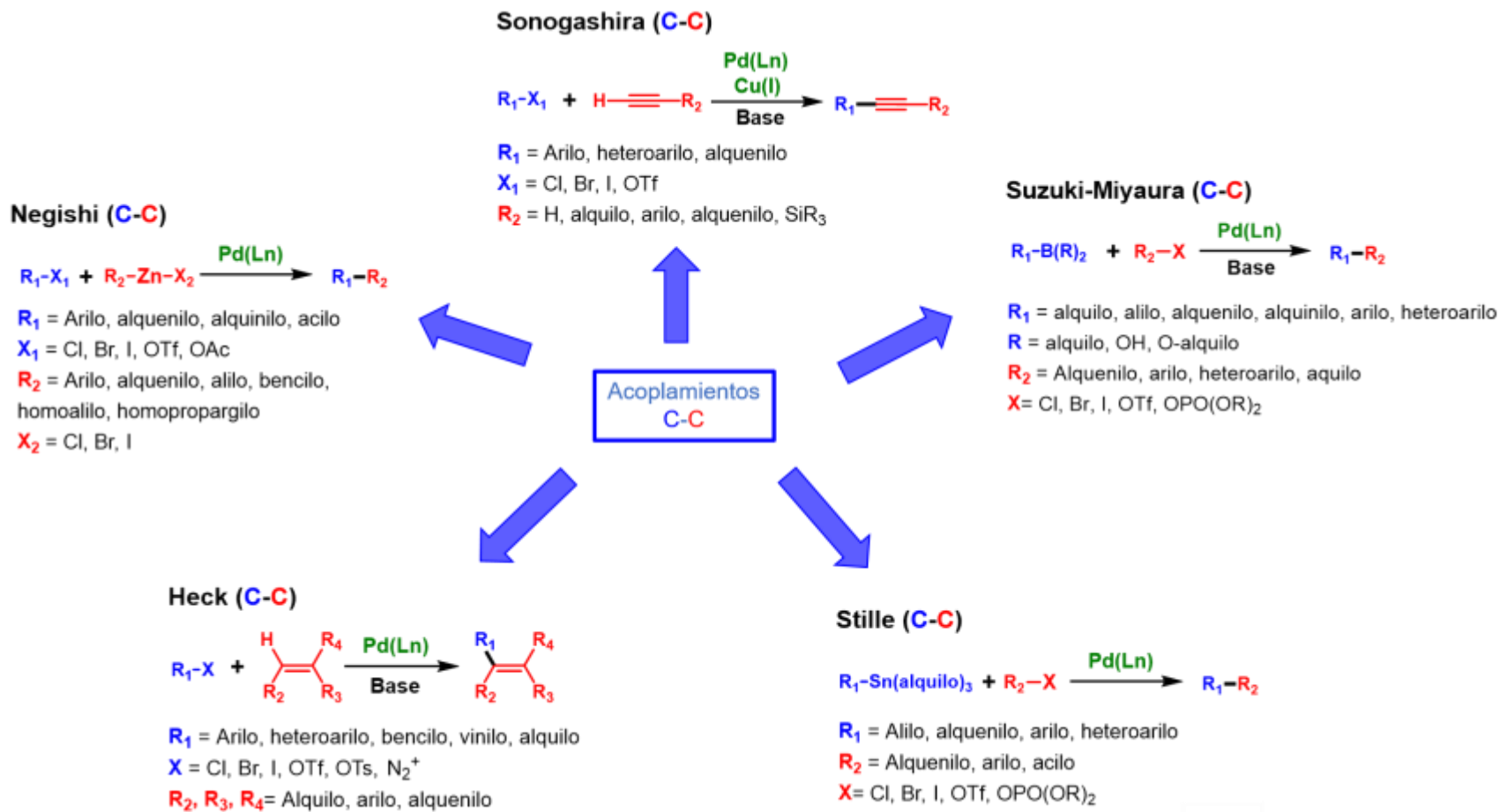
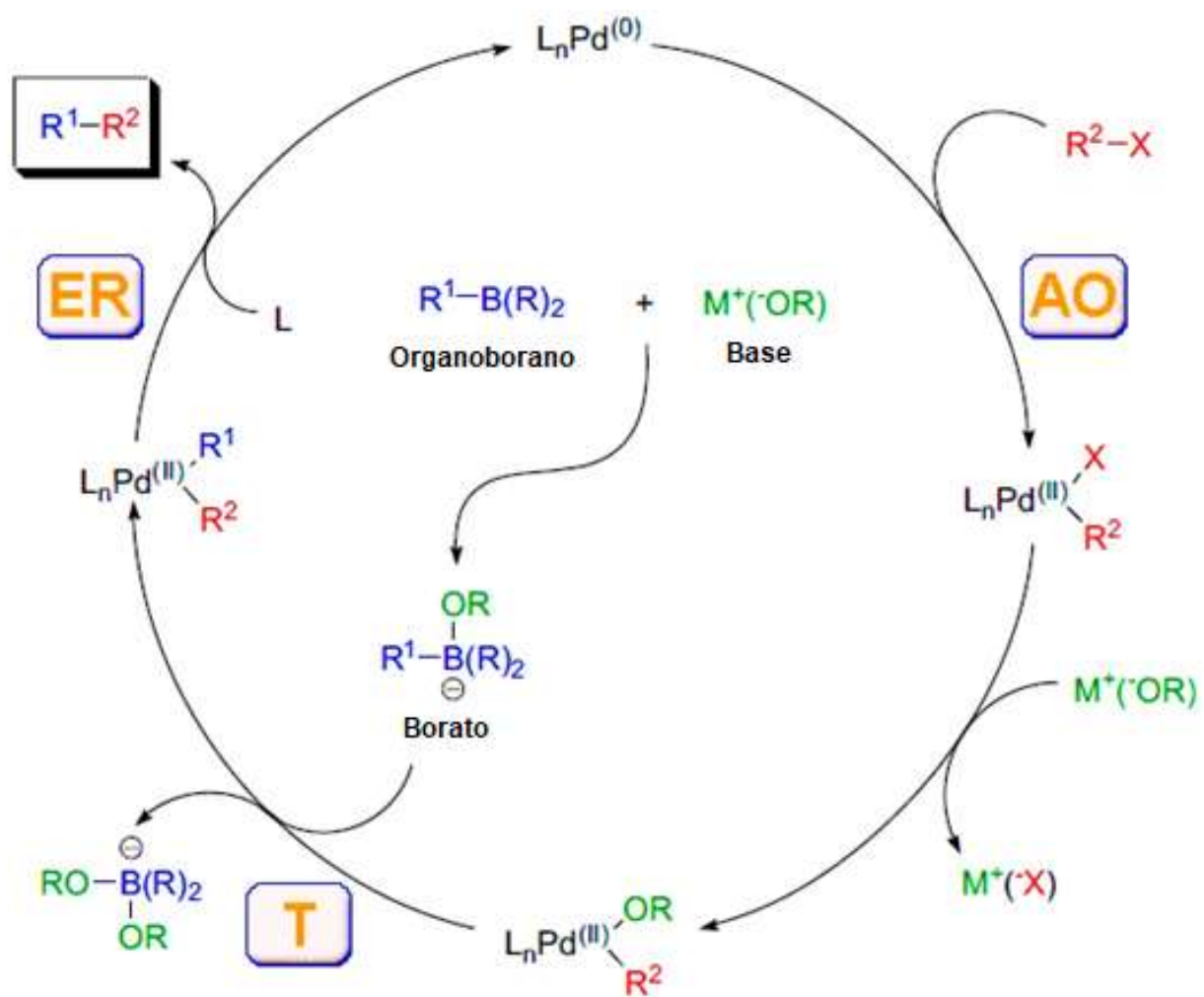


Figura 14. Reacciones comunes de acoplamiento catalizadas por paladio para formar enlaces C-C.⁸⁵



Esquema 1. Mecanismo del acoplamiento Suzuki-Miyaura.⁸⁵

3. JUSTIFICACIÓN

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial causando 9.6 millones de defunciones anuales, es decir, 1 de cada 6 muertes. Además, las estadísticas revelan que la incidencia de los distintos tipos de cáncer va en aumento. Esto se traduce en un 45% más de casos anuales, lo cual representaría 11.5 millones de casos. El incremento de pacientes representa un esfuerzo para los servicios de salud pública.

Aunque existen varias opciones de tratamiento disponibles, la mayoría de ellas conlleva una serie de efectos adversos que afecta la calidad de vida de los pacientes. Se sabe que la principal causa de esos efectos adversos es la falta de selectividad de las opciones terapéuticas, principalmente de los agentes quimioterapéuticos. A esto se suma la aparición de la resistencia tras un primer tratamiento, donde un paciente en remisión podría volver a presentar un tipo de cáncer más agresivo.

Estas evidencias hacen notable la necesidad de continuar con la búsqueda de nuevos fármacos anticancerígenos, que presenten mayor potencia y selectividad para minimizar los efectos adversos comunes; además de tener opciones terapéuticas en caso de que se presente resistencia a algún grupo de fármacos específicos. En los últimos años se han identificado diversos blancos terapéuticos de interés para el diseño de nuevas moléculas, entre estos se encuentran las isoformas de AKT.

Se sabe que las isoformas de AKT están desreguladas en varios tipos de cáncer, por lo que se han realizado esfuerzos para el descubrimiento de nuevos inhibidores contra dicha cinasa. El cultivo de diferentes líneas celulares de cáncer sugiere que la inhibición selectiva de AKT1, AKT2 o AKT3 puede ser útil en tipos de cáncer específicos, lo que ha incrementado el interés en la selectividad de los inhibidores. Además, se han encontrado posibles efectos adversos de los compuestos activos contra las tres isoformas, tales como la diseminación del cáncer *in vivo* o alteraciones del metabolismo de la glucosa.

Dentro de estas investigaciones, se han llevado a cabo estudios computacionales para la identificación de nuevos compuestos. En trabajos previos, se realizó un cribado virtual con el que se identificó a una piridina trisustituida como nuevo compuesto potencial, el cual representa un núcleo base novedoso, sin compuestos similares reportados en la base de datos de ChEMBL. Por ello, la piridina encontrada se optimizó utilizando métodos de diseño basado en la estructura.

Bajo esta premisa, se han sintetizado más de 50 compuestos de tipo piridina trisustituida en nuestro grupo de investigación. Sin embargo, la mayoría de ellos presenta problemas de solubilidad acuosa y en disolventes orgánicos, lo cual representa un obstáculo para su desarrollo como posibles fármacos, en algunos casos, ha dificultado también su evaluación biológica.

Estos resultados, junto con la problemática actual del cáncer hacen resaltar la importancia del desarrollo de nuevos compuestos inhibidores de AKT. Es por ello por lo que, en el presente trabajo, se muestra una estrategia para la obtención de piridinas trisustituidas que podrían presentar mejores características de solubilidad, además de potencial actividad anticancerígena.

4. HIPÓTESIS

Si se modifica la sustitución en la posición 4 de las piridinas trisustituidas con distintos ciclos alifáticos unidos a través de un enlace carboxamida, además de la presencia de sustituyentes diferentes en las posiciones 2 y 6, entonces se obtendrán compuestos con potencia inhibitoria superior frente a diversas líneas celulares de cáncer que sobreexpresan AKT. Además, se mantendrán las predicciones de interacciones observadas previamente con el sitio de unión de AKT1, AKT2 y AKT3.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Diseñar, sintetizar y evaluar el potencial anticancerígeno de nuevas piridinas trisustituidas *in vitro* sobre diferentes líneas celulares de cáncer e *in silico* con las tres isoformas de AKT.

5.2 Objetivos específicos

- Encontrar un nuevo fragmento mediante búsqueda por similitud estructural para proponer nuevas piridinas trisustituidas con diferentes sustituyentes en posiciones 2 y 6 del núcleo de piridina.
- Establecer una ruta de síntesis para los compuestos diseñados, caracterizar espectroscópicamente-espectrométricamente y determinar las constantes físicas (punto de fusión y *Rf*) de las piridinas trisustituidas obtenidas.
- Evaluar la actividad citotóxica de los compuestos obtenidos sobre diferentes líneas celulares de cáncer (**DU-145**, **PC-3**, **MCF-7**, **MDA-MB-231** y **HCT-15**) y una línea celular sana (**COS-7**).
- Realizar estudios de acoplamiento molecular de las piridinas trisustituidas obtenidas con las tres isoformas de AKT.

6. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La metodología del presente trabajo se divide en cuatro secciones, la primera de las cuales describe la estrategia seguida para el diseño de nuevas piridinas como inhibidores de las isoformas de AKT. La segunda parte describe la ruta de síntesis para la obtención de los compuestos, posteriormente se presenta la evaluación biológica realizada *in vitro* sobre distintas líneas celulares. Finalmente, se muestran los estudios de acoplamiento molecular con las tres isoformas de AKT.

6.1 Diseño de nuevas piridinas trisustituidas

Para el diseño de nuevas piridinas 2,4,6-trisustituidas se planteó el reemplazo de uno de los fragmentos de 2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-ona (benzoxazinona), presentes en las posiciones 2 y 6 del núcleo de piridina (**Figura 15**). Para esto se realizó una búsqueda por similitud estructural con la benzoxazinona utilizando el servidor Swiss Similarity,⁸⁶ en el que se calcularon las huellas digitales de los fragmentos de la base de datos *Zinc Fragment Like* con el método *Spectrophores*, y comparando con el coeficiente de similitud de Tanimoto.

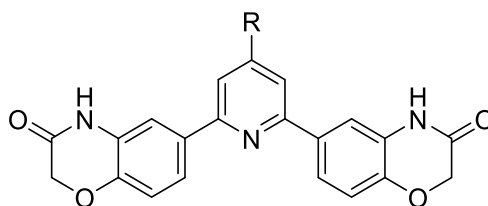


Figura 15. Piridina 2,4,6-trisustituida con el mismo sustituyente en posiciones 2 y 6.

Los fragmentos encontrados y seleccionados se evaluaron con acoplamiento molecular. Se construyeron piridinas con un fenilo como sustituyente en la posición 4, la benzoxazinona original en posición 2 y el fragmento evaluado en posición 6. Los ligandos se construyeron y minimizaron en Spartan 10⁸⁷ y se optimizó su geometría con el método semi-empírico PM6. Los átomos de hidrógeno no polares se fusionaron a sus correspondientes carbonos, se detectaron los centros de torsión y enlaces rotables de la molécula utilizando la interfaz gráfica Autodock Tools 1.5.4.

Todos los ligandos se evaluaron con la isoforma AKT1 (preparada como se describe en la sección 6.4.1), la búsqueda de los complejos de unión más favorables se realizó con el programa AutoDock 4.2⁸⁸ utilizando el algoritmo genético Lamarckiano como método de búsqueda conformacional, un total de 20 corridas, un tamaño de población de 150 confórmeros, un número máximo de 2 500 000 evaluaciones energéticas y 27 000 generaciones. El resultado de energía de unión para cada molécula se comparó con el de la piridina simétrica con benzoxazinona en posiciones 2 y 6.

De esta forma, se encontró un fragmento de pirimidina que sustituyó a la benzoxazinona en una de las posiciones adyacentes al heteroátomo del núcleo de piridina (**Figura 16**). Continuando con la optimización de los compuestos, se propuso la sustitución de las piridinas en posición 4 con amidas unidas a sustituyentes alifáticos cíclicos. De esta forma, se evaluó la influencia entre el tamaño del ciclo y el grado de interacción de los ligandos con la cavidad hidrofóbica de AKT.

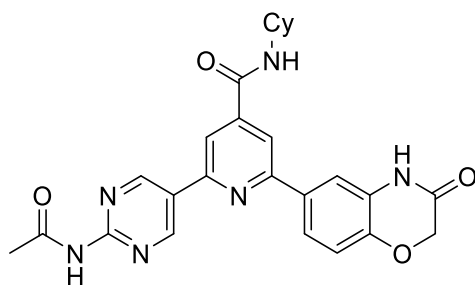


Figura 16. Piridinas 2,4,6-trisustituidas propuestas.

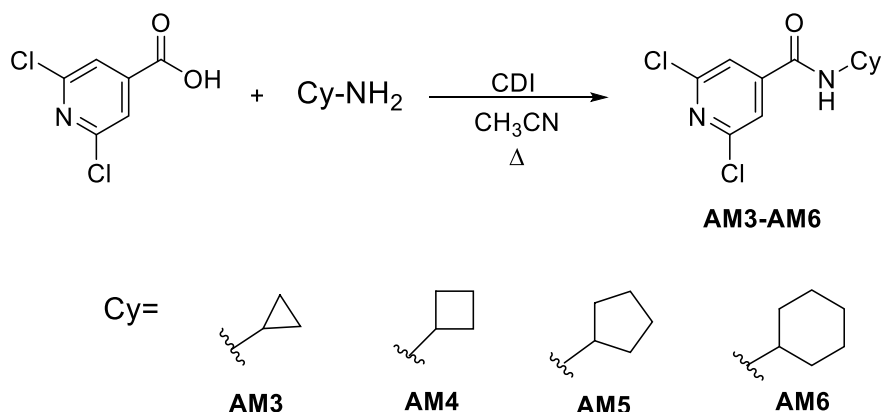
Posteriormente, las moléculas propuestas se evaluaron con el servidor SwissTarget⁸⁹ para la predicción de su diana biológica más probable. Además, se calcularon algunas propiedades de interés con el servidor SwissADME⁹⁰ como: el área polar superficial topológica (tPSA), número de aceptores y donadores de puente de hidrógeno, número de enlaces rotables, entre otras. Con el cálculo de estas propiedades se determinó si los compuestos propuestos cumplen con las reglas de Lipinski, Veber y Egan.

6.2 Parte química

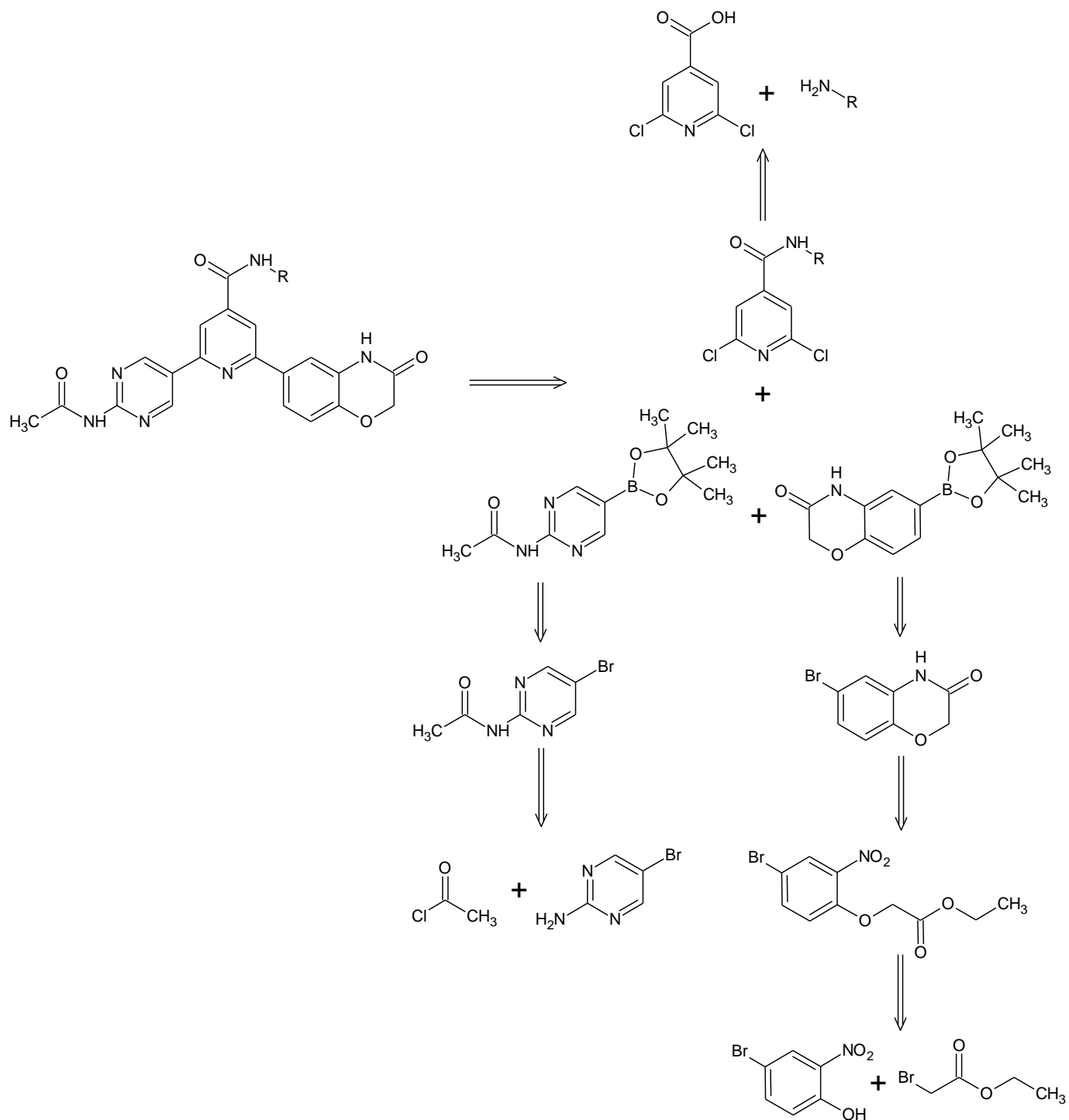
La síntesis de los compuestos propuestos se planteó a partir del análisis retrosintético mostrado en el **Esquema 2**. En este se muestran estrategias utilizadas previamente por nuestro grupo de investigación para la síntesis de piridinas 2,4,6-trisustituidas. La desconexión de las posiciones 2 y 6 del anillo de piridina muestra que se requiere la formación de un enlace amida en la posición 4 para sintetizar intermediarios del tipo 2,6-dicloro-*N*-cicloalquilpiridin-4-carboxamidas (**AM3-AM6**). Con estos intermediarios y el compuesto de organoboro correspondiente se realizaron acoplamientos de Suzuki-Miyaura para la obtención de los compuestos.

6.2.1 Síntesis de los intermediarios AM3-AM6

Los intermediarios **AM3-AM6** se desconectaron en la posición 4, lo cual dio como resultado el ácido 2,6-dicloro-4-carboxílico y las aminas cíclicas alifáticas correspondientes (**Esquema 3**). Para la obtención de estos intermediarios se realizó la activación del ácido carboxílico con el agente acoplante CDI, utilizando acetonitrilo como disolvente y la amina correspondiente, bajo condiciones de calentamiento convencional.



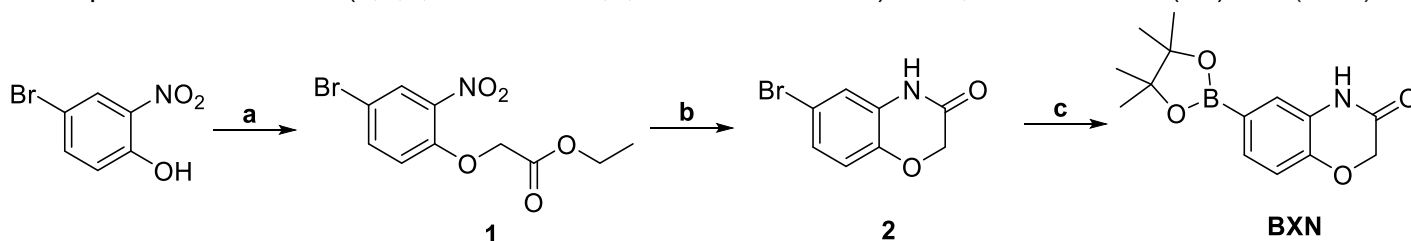
Esquema 3. Síntesis de las amidas **AM3-AM6**.



Esquema 2. Síntesis de las piridinas asimétricas con amidas en posición 4.

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

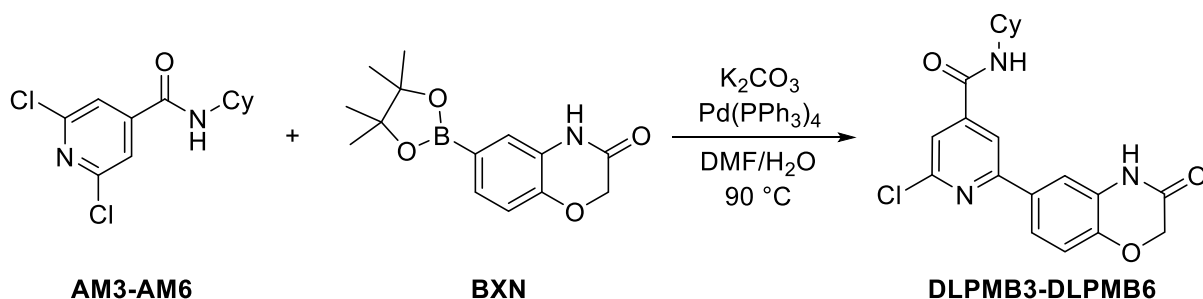
Posteriormente, para la obtención de la serie **DLPMB** fue necesario sintetizar el éster borónico del núcleo de la 2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona (**BXN**, **Esquema 4**). La síntesis partió del 4-bromo-2-nitrofenol y α -bromoacetato de etilo, en presencia de carbonato de potasio como base y acetona como disolvente para sintetizar el producto de la reacción S_N2 . Se obtuvo así el (4-bromo-2-nitrofenoxi)acetato de etilo (**1**), el cual se hizo reaccionar bajo condiciones de reducción-ciclación en tándem, con hierro en presencia de ácido acético para originar a la 6-bromo-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona (**2**). Esta última se sometió a condiciones de borilación de Miyaura, con diborobispinacolato (B_2Pin_2), $Pd(dppf)Cl_2 \cdot CH_2Cl_2$ como catalizador y acetato de potasio como base para acceder a la 6-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona (**BXN**).



Esquema 4. Síntesis de 6-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona. Reactivos y condiciones: **a:** α -bromoacetato de etilo, K_2CO_3 , acetona, 50 °C; **b:** Fe^0 , AcOH, 50 °C; **c:** B_2Pin_2 , $Pd(dppf)Cl_2 \cdot CH_2Cl_2$, AcOK, 1,4-dioxano, reflujo.

6.2.3 Síntesis de la serie DLPMB

Una vez obtenidos los intermediarios necesarios, se procedió a realizar monoacoplamiento de Suzuki con los compuestos **AM3-AM6** y **BXN**, $Pd(PPh_3)_4$ como catalizador, carbonato de potasio como base y una mezcla de DMF/ H_2O como disolventes, bajo condiciones de calentamiento convencional para acceder a los compuestos de la serie **DLPMB** (**Esquema 5**).

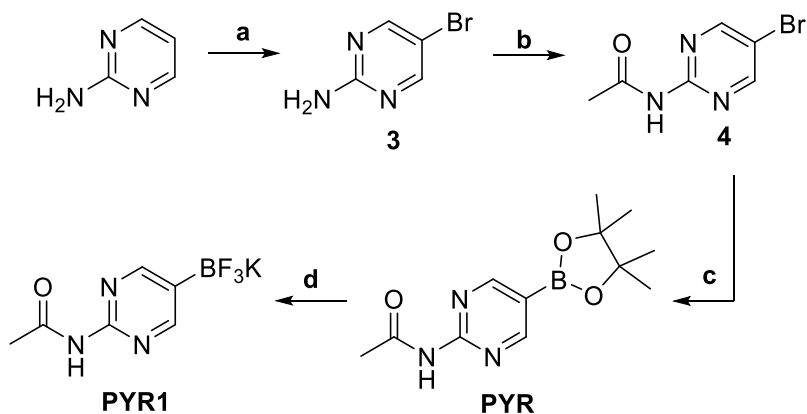


Esquema 5. Síntesis de los compuestos de la serie **DLPMB**.

6.2.4 Síntesis de [2-(acetilamino)pirimidin-5-il](trifluoro)borato de potasio (PYR1)

Para continuar con la síntesis de los compuestos diseñados se obtuvo la sal de trifluoroborato derivada del núcleo de *N*-(5-bromopirimidin-2-il)acetamida (**PYR1**, **Esquema 6**). Se inició con la bromación de la 2-aminopirimidina con *N*-bromosuccinimida y acetato de amonio para obtener la 5-bromopirimidin-2-amina (**3**). Este último compuesto se sometió a una acetilación con cloruro de acetilo y piridina para originar la *N*-(5-bromopirimidin-2-il)acetamida (**4**). Dicha molécula se sometió a las condiciones estándar de borilación de Miyaura mencionadas previamente para acceder a la *N*-

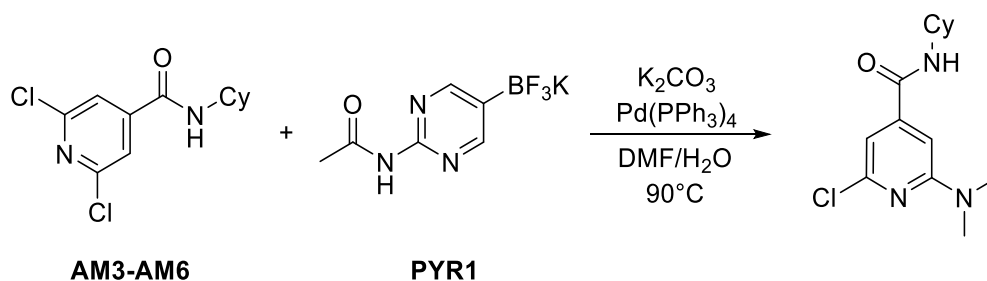
(5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)pirimidin-2-il)acetamida (**PYR**). Finalmente, el último compuesto se transformó en su sal de trifluoroborato de potasio correspondiente, mediante el tratamiento con exceso de bifluoruro de potasio (KHF_2) en $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ para obtener **PYR1**.



Esquema 6. Síntesis de [2-(acetilamino)pirimidin-5-il](trifluoro)borato de potasio (**PYR1**). Reactivos y condiciones: **a:** NBS, NH_4OAc , CH_3CN ; **b:** Cloruro de acetilo, piridina, CH_2Cl_2 ; **c:** B_2Pin_2 , $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2 \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$, AcOK , 1,4-dioxano, reflujo; **d:** KHF_2 , $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$.

6.2.5 Síntesis de la serie DLPMP

Por último, se hicieron reaccionar los intermediarios **AM3-AM6** y **PYR1** para la obtención de intermediarios necesarios en la síntesis de los compuestos diseñados **DLP** (Figura 16). Se utilizaron las condiciones de acoplamiento de Suzuki mencionadas anteriormente, con $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ como catalizador, carbonato de potasio como base y la mezcla de $\text{DMF}/\text{H}_2\text{O}$ como disolventes. No obstante, las condiciones de reacción no dieron lugar a la formación del enlace C-C como se tenía previsto. De estos experimentos se logró aislar una nueva serie de compuestos denominados como **DLPMP** (Esquema 7).



Esquema 7. Síntesis de los compuestos de la serie **DLPMP**.

6.3 Evaluación biológica de las series DLPMB y DLPMP

Los ensayos de inhibición del crecimiento en líneas celulares se realizaron en el Laboratorio de Pruebas Biológicas (LSA) del Instituto de Química, UNAM, utilizando el protocolo de la sulforrodamina B. Se emplearon las siguientes líneas celulares:

- **DU-145:** Cáncer de próstata (ATTC)
- **PC-3:** Cáncer de próstata (NCI)

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

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

Para efectuar el análisis primario, los compuestos a evaluar se solubilizaron en DMSO a una concentración de 20 mM. Después se tomó una alícuota de la disolución de prueba y se diluyó en medio de cultivo suplementado. A continuación, se adicionaron 100 μ L de la solución preparada con anterioridad a la microplaca, y después se incubó durante 48 h bajo las condiciones previamente mencionadas.

Al finalizar el periodo de incubación, las células se fijaron *in situ* añadiendo 50 μ L de una solución de CF₃COOH frío al 50% y se incubaron a 4 °C durante 60 min. Después se desechó el sobrenadante, se realizaron 5 lavados con agua fría y se dejó secar a temperatura ambiente. Para efectuar el teñido de las células fijadas al pozo, se añadieron 100 μ L de una solución al 0.4% de sulforrodamina B (SRB) y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente.

La SRB no unida se removió con lavados de CH₃COOH al 1% para después secar a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 100 μ L de solución amortiguadora Tris y se agitó durante 10 minutos para favorecer la disolución del complejo. Luego se midió la densidad óptica (DO) en un lector de microplacas a una $\lambda=515$ nm.

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

$$\%IC = 100 - \left(\frac{DOt - DOb}{DOc - DOb} \right) * (100)$$

6.4 Parte computacional

6.4.1 Acoplamiento molecular con AutoDock 4.2

Los ligandos se construyeron en el programa Spartan 10⁸⁷ y se optimizó su geometría con el método semi-empírico PM6. Empleando el programa AutoDock 4.2⁸⁸ y su interfaz gráfica Autodock Tools 1.5.4, los átomos de hidrógeno no polares se fusionaron a sus correspondientes carbonos, se detectaron los centros de torsión y enlaces rotables de la molécula.

Las estructuras cristalográficas de las isoformas AKT1 y AKT2 se obtuvieron del *Protein Data Bank* (PDB), seleccionando las claves 4GV1⁹¹ y 1O6L⁶⁶ para las isoformas 1 y 2, respectivamente. Se removieron las moléculas de agua y el sustrato GSK-3 β . Estas estructuras, junto con el modelo por homología de AKT3 previamente construido por nuestro grupo de investigación⁶⁵, se prepararon

para el estudio de acoplamiento molecular. Se añadieron cargas Gasteiger y se fusionaron los hidrógenos no polares a las proteínas utilizando MGLTools 1.5.6.

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

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

6.4.2 Acoplamiento molecular con Maestro

El acoplamiento molecular se realizó con el módulo Glide del software Maestro 12.2⁹², se utilizó el Protein Preparation Wizard para preparar las tres isoformas de la enzima (PDB AKT1: 4GV1, AKT2: 1O6L y el modelo por homología de AKT3) mediante una minimización con un campo de fuerza OPLS_2005. Las cajas de búsqueda se construyeron utilizando cubos de 10x10x10 Å en las coordenadas (x, y, z) -19.687, 5.811, 16.166 para AKT1 y AKT3, en 42.679, 30.329, 109.603 para AKT2. Se utilizó el modo Flexible con la precisión XP (Extra Precisión) bajo condiciones estándar.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Diseño de nuevas piridinas trisustituidas

Debido a la insolubilidad presentada por la mayoría de los compuestos investigados previamente en nuestro grupo, se propuso la síntesis de nuevas piridinas trisustituidas con el objetivo de mejorar sus propiedades fisicoquímicas. Se ha encontrado que aquellas piridinas que poseen diferentes sustituyentes en las posiciones 2 y 6 (asimétricas) presentan una mayor solubilidad en disolventes orgánicos⁶⁵. A partir de esta observación, se planteó la sustitución de uno de los sustituyentes en dichas posiciones.

Utilizando la molécula de 2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-ona (benzoxazinona), se realizó una búsqueda por similitud con el servidor Swiss Similarity⁸⁶ para sustituir el fragmento en las piridinas trisustituidas. Se utilizó la base de datos de *Zinc Fragment Like* disponible en dicho servidor, con el fin de aumentar la probabilidad de encontrar un fragmento sintéticamente accesible. El descriptor utilizado fue la huella digital o *fingerprint* de tipo *Spectrophores*, el cual toma en cuenta interacciones espaciales de las moléculas analizadas. Esto, con el fin de conservar la afinidad observada mediante estudios computacionales, entre los ligandos diseñados anteriormente por nuestro grupo de investigación y las isoformas de AKT.

Cabe destacar que, la mayoría de los puentes de hidrógeno que se han predicho con acoplamiento molecular involucran los sustituyentes de las posiciones 2 y 6 de las piridinas. Se eligieron los primeros 27 fragmentos más similares (coeficiente de similitud= 0.912-0.848), excluyendo a la molécula original de búsqueda y aquellos con centros quirales. Se construyeron moléculas que incluyeron al núcleo de piridina con un fenilo en la posición 4, benzoxazinona en la posición 2 y el fragmento evaluado en posición 6 (**Figura 17**).

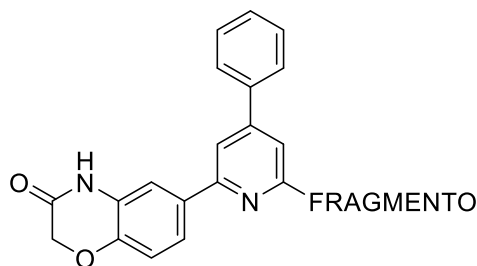


Figura 17. Piridinas 2,4,6-trisustituidas evaluadas.

En lo que respecta a la posición 4 de la piridina, se conservó un grupo fenilo con la finalidad de minimizar los efectos de este sustituyente en el desempeño del fragmento evaluado, debido a que se ha observado que ciertos grupos afectan el pKa de la piridina, modificando su protonación cuando el valor de pH es igual a 7.⁶⁵ Con las moléculas construidas, se procedió al acoplamiento molecular con la isoforma AKT1. Para continuar con el diseño, se eligió al fragmento con mejor energía de unión calculada, la cual fue más favorable que la presentada por la piridina simétrica, con benzoxazinona en posiciones 2 y 6.

Una vez encontrado el fragmento más favorable se cambió el sustituyente de la posición 4. La primera modificación contempló la adición de un enlace amida, con el grupo carbonilo unido directamente a la piridina. Esto fue debido a que, en estudios anteriores, se determinó que un *linker*

de tipo carboxamida podría favorecer interacciones con Glu234/236/234 (AKT1/AKT2/AKT3) y Lys158/160/158, al ser un grupo aceptor/donador de hidrógeno⁸¹. El diseño se complementó con ciclos alifáticos adyacentes a las amidas propuestas, con el objetivo de mejorar la solubilidad acuosa de los compuestos respecto a sus contrapartes aromáticas. Además, se planteó la posibilidad de estudiar la influencia del tamaño del ciclo en las propiedades experimentales de las moléculas.

Respecto a los valores de energía de unión, las moléculas diseñadas se contrastaron con la molécula **A**, encontrada con el estudio previo de cribado virtual y utilizada como punto de partida para el diseño de nuevos inhibidores de AKT; además de compararse con la molécula **B**, utilizada para encontrar un nuevo fragmento para la generación de piridinas asimétricas (**Figura 18**). Utilizando la isoforma de AKT1 como modelo, se obtuvo un valor de -10.05 Kcal/mol para la molécula **A**; mientras que, para la molécula **B** se obtuvo un valor de -9.99 Kcal/mol. Con esto se comprobó que el nuevo fragmento de pirimidina presente en la molécula **B** podría ser equivalente al de la molécula original.

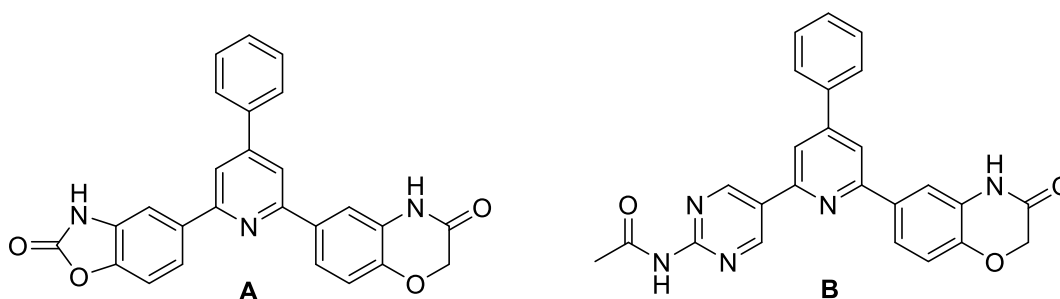


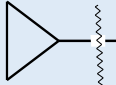
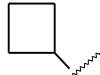
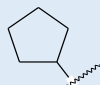

Figura 18. Piridinas 2,4,6-trisustituidas.

Al comparar los resultados de energía de unión de las moléculas **A** y **B** con las nuevas moléculas propuestas (**Tabla 2**), se encontró que las últimas no presentan una diferencia significativa de energía de unión con AKT1. A pesar de ello, se observó una aparente selectividad por las isoformas AKT1 y AKT3, lo cual podría ser de utilidad para mejorar sus propiedades farmacológicas; excepto en el caso de la molécula que presenta un ciclohexilo como sustituyente, la cual presenta menos afinidad por la isoforma de AKT3.

No obstante, la molécula que presenta el ciclohexilo como sustituyente conservó las interacciones antes mencionadas con Glu234/236 y Lys160/158 en las isoformas de AKT2 y AKT3, respectivamente. El compuesto diseñado con ciclopropilo como sustituyente también conservó esas interacciones con la isoforma AKT2, mientras que el resto de las moléculas no lo presentaron. Sin embargo, se observó una nueva interacción entre el fragmento propuesto y el residuo Asp439/440/439 en la mayoría de los casos. Estos resultados motivaron la síntesis de los nuevos compuestos.

En cuanto a los resultados obtenidos con el servidor SwissTarget⁸⁹, cuya predicción se basa en búsqueda por similitud, las cuatro amidas propuestas presentaron probabilidad de actuar contra una cinasa como blanco terapéutico. El compuesto con la amida adyacente al ciclopropilo en posición 4 presentó el 40% de actuar frente a algún tipo de cinasa; el compuesto con ciclobutilo presentó el 20%; el ligando propuesto con ciclopentilo un 53%; finalmente, el compuesto con ciclohexilo como sustituyente mostró el 60% de probabilidad. Todos los compuestos presentaron a las tres isoformas de AKT como las dianas más probables.

Tabla 2. Valores de energía de unión de moléculas diseñadas evaluadas contra las isoformas de AKT

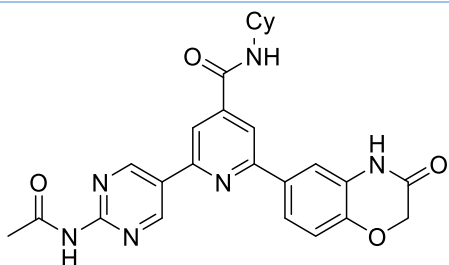
R	AKT1		AKT2		AKT3	
	$\Delta G^{\circ}_{\text{unión}}$ (Kcal/mol)	Cluster*	$\Delta G^{\circ}_{\text{unión}}$ (Kcal/mol)	Cluster*	$\Delta G^{\circ}_{\text{unión}}$ (Kcal/mol)	Cluster*
 DLP3	-10.21	57	-9.96	61	-10.35	33
 DLP4	-10.41	50	-9.59	50	-10.72	39
 DLP5	-10.68	63	-10.28	68	-11.18	45
 DLP6	-11.66	24	-10.79	63	-9.55	18

*Basado en un total de 100 corridas.

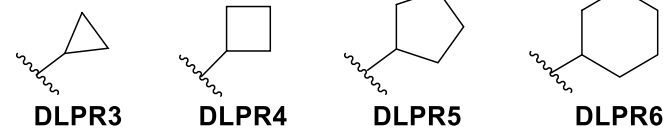
Además de los resultados anteriores, se predijeron también distintas propiedades estructurales de interés con el servidor Swiss ADME⁹⁰, tales como: peso molecular (PM), donadores de hidrógeno (DPH), aceptores de hidrógeno (APH), enlaces rotables (EnR), área polar superficial topológica y logaritmo del coeficiente de partición (logP) (Tabla 3). Estas propiedades se utilizaron para la predicción de la biodisponibilidad oral, basándose en las reglas de Lipinski (PM ≤ 500, DPH ≤ 5, APH ≤ 10 y logP ≤ 5), Egan (0 ≤ tPSA ≤ 132, -1 ≤ logP ≤ 6) y Veber (ER ≤ 10, tPSA ≤ 140).

Ninguno de los compuestos propuestos cumplió con las reglas de Egan debido a su área polar superficial (tPSA), que en todos los casos fue igual a 135.20 Å². No obstante, se cumplieron con todas las reglas de Lipinski y Veber. En cuanto a la solubilidad, puede observarse que el aumento del tamaño del ciclo alifático es inversamente proporcional con el valor de la predicción; sin embargo, todos son superiores al calculado para la molécula B, de 18.8 mg/L. Los cálculos anteriores sugieren que las nuevas piridinas diseñadas podrían tener la misma o mayor actividad que los compuestos estudiados con anterioridad, además de la posibilidad de mejora de sus propiedades farmacológicas.

Tabla 3. Propiedades moleculares de los compuestos propuestos para la síntesis



Cy=



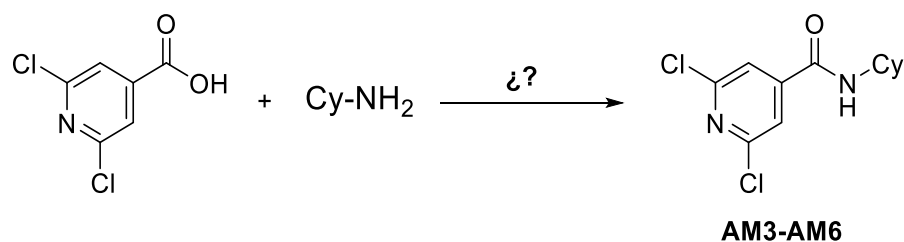
Clave	PM (g/mol)	LogP*	tPSA (Å ²)	DPH	APH	EnR	Solubilidad (mg/L)**
DLPR3	444.44	1.50	135.20	3	7	7	435
DLPR4	458.47	1.80	135.20	3	7	7	224
DLPR5	472.50	2.07	135.20	3	7	7	117
DLPR6	486.52	2.38	135.20	3	7	7	45.3

*Solubilidad estimada con el método ESOL. **LogP consenso.

7.2 Parte química

7.2.1 Síntesis de los intermediarios AM3–AM6

Para la obtención de las amidas correspondientes a los intermediarios **AM3–AM6**, se planteó la retrosíntesis a partir del ácido 2,6-dicloropiridin-4-carboxílico y las aminas cíclicas alifáticas correspondientes (**Esquema 8**). En primera instancia, se planteó el uso de agentes acoplantes para la activación del ácido carboxílico. En ese sentido, se realizó un pequeño estudio tomando a la ciclohexilamina como ejemplo, con distintos agentes, disolventes y una base orgánica, en caso necesario (**Tabla 4**).

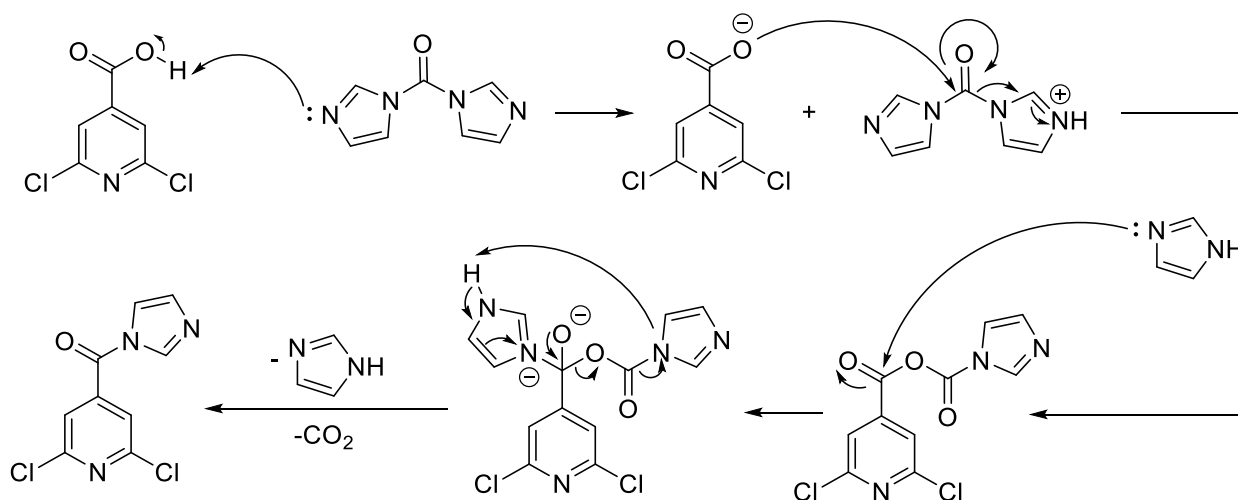


Esquema 8. Obtención de las amidas intermediarias **AM3–AM6**.

Tabla 4. Condiciones de reacción utilizadas para la formación de las amidas intermediarias

Experimento	Disolvente	Agente acoplante	Base	Tiempo de reacción	Rendimiento
1	CH ₃ CN	CDI	-----	1.5 h	80%
2	CH ₂ Cl ₂	PyBOP	NMM	3.5 h	63%
3	CH ₂ Cl ₂	COMU	NMM	2 h	21%

Al observar los resultados, se determinó que la mejor opción de agente acoplante era el CDI. Esto debido a que el tiempo de reacción fue el más corto, además de que proporcionó al compuesto de interés con mayor pureza respecto a PyBOP y COMU, aunado a que es un reactivo económico. El montaje de la reacción requiere atmósfera libre de humedad para evitar la hidrólisis del CDI, este se mezcla en primera instancia con el ácido carboxílico para activarlo y formar un buen grupo saliente (**Esquema 9**). Además, se estableció que para la formación del intermediario imidazólido se requiere una temperatura de 50 °C, la cual debe disminuirse antes de la adición de la ciclopropilamina debido a su bajo punto de ebullición.



Esquema 9. Mecanismo de reacción de la formación del imidazólido.

Los rendimientos obtenidos para las cuatro cicloalquilaminas utilizadas fueron cercanos al 90% después del proceso de purificación, el cual resultó sencillo. En el caso de la ciclohexilamina, la purificación del crudo de reacción se realizó con extracciones líquido-líquido con AcOEt y una dilución acuosa de HCl a pH=5. No obstante, los productos obtenidos con las reacciones de ciclobutilamina y ciclopropilamina presentaron algún grado de solubilidad acuosa, por lo que la recuperación del producto por este método disminuyó significativamente. Esta fue la razón por la cual las purificaciones de los demás productos se realizaron mediante cromatografía en columna.

La caracterización de los intermediarios **AM3–AM6** mediante RMN ^1H (**Espectros II-29, 33, 37 y 41**) mostró una señal aromática simple en 7.55 ppm, que integra para los dos hidrógenos del núcleo de piridina. Se observó también la señal del grupo NH de la amida que intercambia con óxido de deuterio en 6.01–6.57 ppm, la señal se desplazó a campo más bajo conforme el tamaño del ciclo alifático disminuyó. La señal del hidrógeno del ciclo alifático adyacente al grupo amida se encontró alrededor de 3.93–4.53 ppm; la excepción fue el intermediario **AM3**, el cual se observó en 2.89 ppm, evidencia de las diferencias electrónicas que presenta el sustituyente ciclopropilo.⁹³

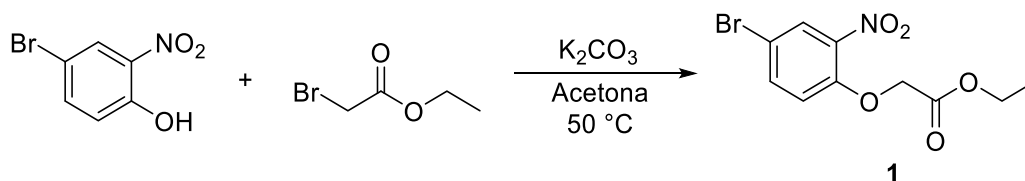
Mientras que, en los espectros de ^{13}C (**Espectros II-30, 34, 38 y 42**), se observó el número de señales aromáticas esperadas para cada compuesto en el intervalo de 120.78–151.62 ppm, junto con el grupo carbonilo en 162.25–164.61 ppm. En cuanto a las señales del ciclo alifático, los intermediarios **AM4–AM6** presentaron las señales del carbono unido directamente al grupo NH alrededor de 45.70–52.40 ppm y las señales de los carbonos restantes del ciclo en 15.35–33.10

ppm. Por otro lado, el intermediario **AM3** presentó las señales anteriores en 23.61 ppm y 6.92 ppm, respectivamente.

En cuanto a los espectros de IR (**Espectros II-31, 35, 39 y 43**) se destacan las señales pertenecientes a la vibración N-H en 3263.74–3273.53 cm^{-1} y las características del grupo C=O de la amida en 1640.56-1643.97 cm^{-1} . Finalmente, en los espectros de masas de los compuestos (**Espectros II-32, 36, 40 y 44**), pueden observarse los iones moleculares de los intermediarios. Particularmente, se detectó que de la pérdida del ciclo alifático resultó el pico de m/z 188.994 en el caso de **AM4**, y el pico base en 191 Da en los casos de **AM5** y **AM6**. Asimismo, se observó al ion acilio en el fragmento localizado alrededor de 174 Da, en los espectros de **AM3, AM5 y AM6**; en ambos picos puede observarse la isotopía del cloro.

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

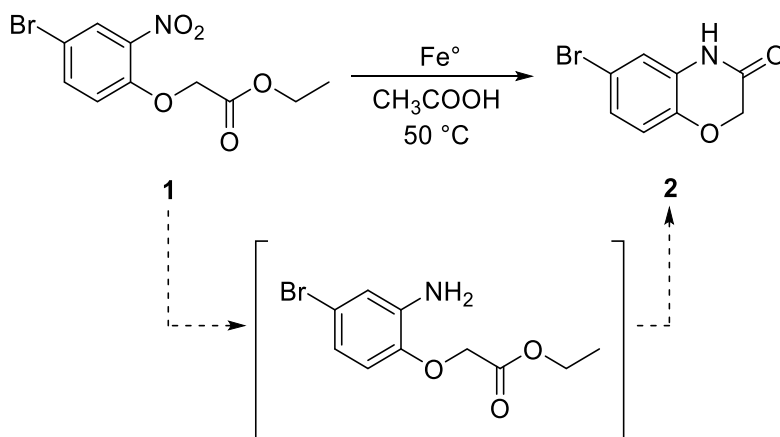
La ruta de síntesis del intermediario **BXN** comenzó con el 4-bromo-2-nitrofenol como materia prima, el cual se hizo reaccionar con α -bromoacetato de etilo (**Esquema 10**) para llevar a cabo una sustitución nucleofílica S_N2 , en medio básico (1.5 equivalentes de K_2CO_3) y acetona como disolvente. Se obtuvo un alto rendimiento y el producto se identificó estructuralmente mediante varias técnicas. El espectro de RMN ^1H (**Espectro II-1**) mostró tres señales en la región de los aromáticos, cada una representa uno de los hidrógenos correspondientes al anillo. Se observa también la señal del metileno adyacente al grupo carbonilo en 4.98 ppm, además de señales características del etilo: una señal cuádruple en 4.21 ppm y una triple en 1.24 ppm.



Esquema 10. Reacción de sustitución nucleofílica para la obtención de **1**.

Por otro lado, en el espectro de ^{13}C (**Espectro II-2**) se confirmó la presencia de un carbono alifático en 14.44 ppm; de carbonos unidos a heteroátomo en 61.99 ppm y 66.84 ppm, correspondientes a los metilenos adyacentes al oxígeno y al carbonilo, respectivamente. Además, se observó la señal característica de carbonilo en 168.37 ppm. El espectro de IR (**Espectro II-3**) mostró también la banda característica del carbonilo del éster en 1747.67 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=O}}$ éster).

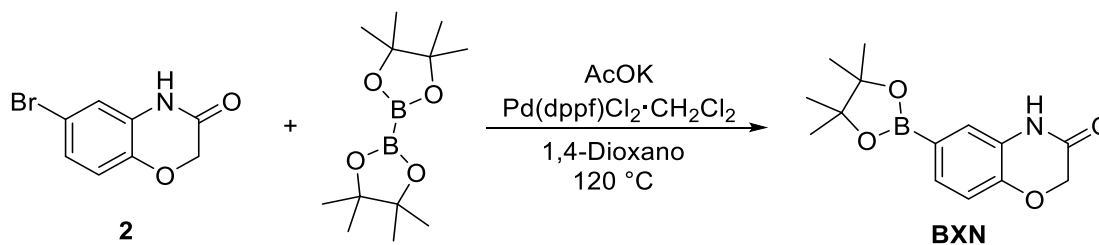
Tras confirmar la obtención del producto (4-bromo-2-nitrofenoxi)acetato de etilo (**1**), se realizó una reducción química con Fe^0 en presencia de ácido acético glacial. De esta reducción química resulta un grupo amino, el cual puede atacar intramolecularmente al éster etílico, resultando una ciclación en tándem (**Esquema 11**). Esta metodología de reducción química tiene como ventaja la posibilidad de evitar reacciones de hidrogenólisis que comprometan al halógeno presente en la molécula, lo cual sucedería en el caso de utilizar catalizadores como Pd/C.



Esquema 11. Reacción de reducción-ciclación para la obtención de **2**. Se muestra entre corchetes el intermediario con la reducción del grupo nitro antes de la ciclación.

La obtención del compuesto 6-bromo-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-ona (**2**) se comprobó mediante RMN ¹H (**Espectro II-5**), donde se observó la desaparición de las señales alifáticas correspondientes al etilo del éster presente en **1**; además de la aparición de una señal que intercambia con D₂O, correspondiente al NH de la amida en 9.74 ppm. En el espectro de ¹³C (**Espectro II-6**) igualmente se confirmó la ausencia de señales de carbonos alifáticos y se observó solamente el carbono correspondiente al metileno adyacente a la amida en 67.83 ppm, así como la señal característica del grupo carbonilo en 165.24 ppm. En IR (**Espectro II-7**) se observaron las bandas del NH de amida secundaria en 3340.01 cm⁻¹ (ν_{N-H}), y del grupo carbonilo en 1677.37 cm⁻¹ (ν_{C=O amida}).

Posteriormente, el compuesto **2** se utilizó como materia prima para una borilación de Miyaura (**Esquema 12**), con 1.1 equivalentes de diborobis(pinacolato), 5% mol de [1,1'-bis(difenilfosfina)ferroceno]dicloropaldio (II) en complejo con diclorometano como fuente de paladio y tres equivalentes de AcOK bajo atmósfera de nitrógeno. Después de la purificación del compuesto se obtuvo un rendimiento del 71.9%. Al observar el espectro de RMN ¹H (**Espectro II-9**) se detectó en 1.28 ppm la señal característica de los metilos adyacentes al enlace B-O, la cual integró para doce hidrógenos.

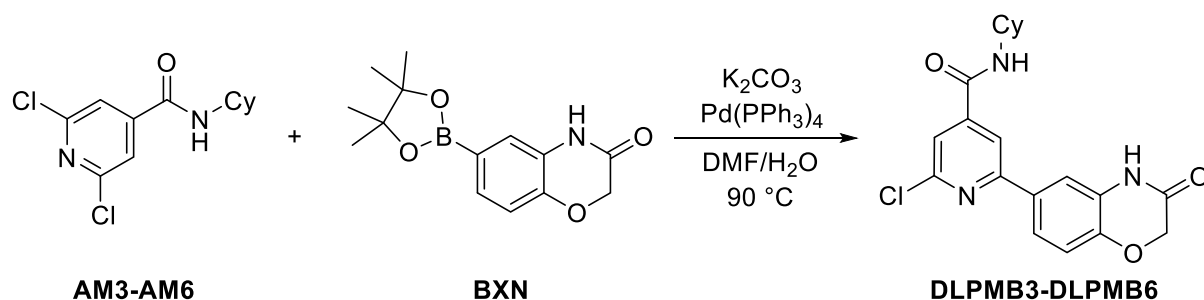


Esquema 12. Borilación de Miyaura para la obtención del éster borónico **BXN**.

Asimismo, en el espectro de ¹³C (**Espectro II-10**) se observó la señal correspondiente a los metilos alifáticos en 25.16 ppm, además del carbono cuaternario unido a dichos metilos en 84.51 ppm. En el espectro de IR (**Espectro II-11**) se encontraron las bandas características del grupo N-H de amida en 3360.17 cm⁻¹ (ν_{N-H}), del grupo carbonilo de amida en 1690.49 cm⁻¹ (ν_{C=O amida}) y del enlace B-O en 1349.45 cm⁻¹ (ν_{B-O}). Finalmente, en el espectro de masas (EM) (**Espectro II-12**) se detectó el [M+H]⁺ en 276.1400, concordante con el calculado [M+H]⁺: 276.1402, confirmando la obtención del compuesto 6-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-ona (**BXN**).

7.2.3 Síntesis de la serie DLPMB

Una vez obtenido el éster borónico **BXN**, se continuó la ruta de síntesis con los acoplamientos de Suzuki-Miyaura que originaron los compuestos **DLPMB3–DLPMB6**. Como las amidas intermediarias presentan dos posiciones posibles para el nuevo enlace C-C (**Esquema 13**), se modificaron las condiciones clásicas del acoplamiento. Previamente, en nuestro grupo de investigación, se exploraron condiciones de monoacoplamiento con el haluro de arilo correspondiente, 0.7 equivalentes del compuesto **BXN**, Pd(PPh₃)₄ como fuente de paladio y K₂CO₃ como base en un medio de CH₃CN/H₂O 4:1 bajo condiciones de calentamiento asistido por microondas (MW, 170 °C, 40 minutos).⁶⁵



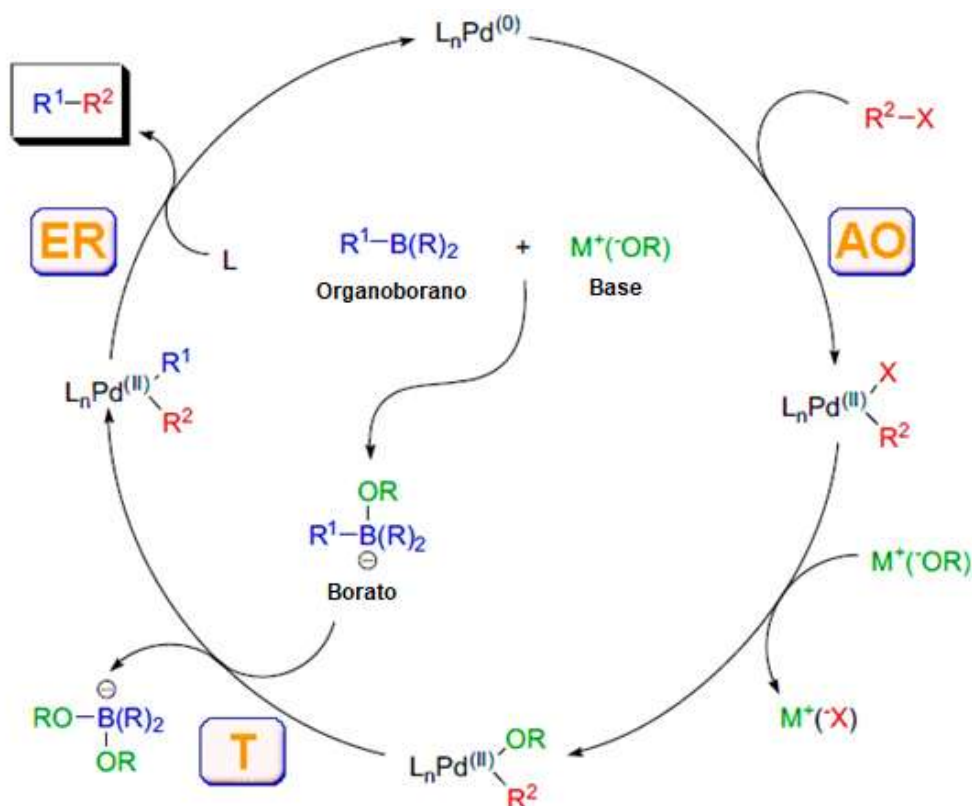
Esquema 13. Acoplamiento de Suzuki para la obtención de los compuestos de la serie **DLPMB**.

Sin embargo, dichas condiciones no resultaron muy alentadoras, por lo que en un intento por aumentar el rendimiento de la reacción y evitar la formación colateral del producto disustituido del núcleo de piridina, se llevó a cabo la reacción de acoplamiento cruzado con calentamiento convencional y utilizando DMF/H₂O 4:1 como disolventes. La presencia de la atmósfera de nitrógeno fue fundamental ya que el catalizador de paladio utilizado es sensible al oxígeno. El mecanismo de reacción del acoplamiento de Suzuki se muestra en el **Esquema 14**.

Otra estrategia que se utilizó para minimizar la formación del producto doblemente sustituido correspondió a la adición de una disolución del éster borónico **BXN** mediante un embudo de adición. Es decir, los reactivos necesarios para el acoplamiento de Suzuki-Miyaura no estuvieron en contacto desde el inicio de la reacción. De esta forma, se intentaron favorecer los pasos de adición oxidante y metátesis, poniendo en contacto a la amida intermediaria correspondiente (haluro de arilo; **AM3–AM6**) con la base y la fuente de paladio.

Una vez que estos reactivos estuvieron en agitación, se adicionó el organoborano y se completó el volumen utilizado para la obtención de una dilución alta (1.1 mmol de materia prima en 25 mL). Se piensa que la alta dilución disminuye la probabilidad de colisión entre moléculas, lo cual podría favorecer el monoacoplamiento. Tras añadir completamente la disolución del intermediario **BXN**, se inició el calentamiento de la mezcla de reacción a 90 °C, temperatura menor a la utilizada con el calentamiento asistido por microondas, con el fin de minimizar las reacciones colaterales.

Los rendimientos observados oscilaron entre el 40 y el 64%, después del proceso de purificación. Esto podría deberse, en parte, a las posibles reacciones de homoacoplamiento del compuesto de organoboro. Sin embargo, gran parte de la disminución del rendimiento se debe al mismo proceso de purificación. Esto es, porque los compuestos de la serie **DLPMB** presentan moderada solubilidad en disolventes orgánicos como el AcOEt.



Esquema 14. Mecanismo general del acoplamiento cruzado de Suzuki-Miyaura.⁸⁵

Una vez purificados los compuestos, se corroboró su estructura mediante la asignación de señales de RMN ^1H y ^{13}C , la cual se realizó con la ayuda de los experimentos de RMN en dos dimensiones (2D RMN): *Correlated Spectroscopy* (COSY), *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (HSQC) y *Heteronuclear Multiple Bond Coherence* (HMBC). A manera de ejemplo, se muestra la elucidación del compuesto **DLPMB5** (Figuras 19-21). En primera instancia, en el espectro de RMN ^1H (Espectro II-57) se detectaron señales múltiples correspondientes al ciclo alifático en 1.51–1.95 ppm. Asimismo, se identificó otra señal múltiple centrada en 4.24 ppm, que integró para 1H, correspondiente al hidrógeno del ciclo alifático unido directamente al -NH.

A la par, se observó una señal simple en 4.66 ppm, que integró para 2H, correspondiente a la señal del metileno presente en la benzoxazinona. De este mismo grupo se identificaron señales correspondientes a hidrógenos aromáticos: una señal doble en 7.09 ppm y una señal múltiple de 7.68 a 7.71 ppm que integró para 2H. Se encontraron también señales dobles en 7.75 ppm y 8.16 ppm, cada una de las cuales integró para 1H, correspondientes al núcleo de piridina. Finalmente, se asignaron dos señales que disminuyeron al intercambiar con D_2O , en 8.73 ppm y 10.83 ppm, cada una integró para 1H y corresponden con los grupos -NH de la molécula.

Para determinar la asignación de los hidrógenos alifáticos, así como de los grupos -NH de cada una de las amidas se observó el experimento COSY (Espectro II-58). En este se encontraron correlaciones de la señal en 4.24 ppm con la señal múltiple en 1.90 ppm y la señal doble en 8.73 ppm. La primera correlación correspondió a la existente entre el hidrógeno alifático que se encuentra adyacente al grupo amino (4.24 ppm) y el resto de los hidrógenos alifáticos presentes en el ciclo. La segunda correspondió a la correlación existente entre el mismo hidrógeno en 4.24 ppm y el

hidrógeno del -NH; confirmando que la señal en 8.73 ppm perteneció a la amida presente en la posición 4 de la piridina. Por lo tanto, la señal en 10.83 ppm se asignó al -NH de la benzoxazinona (**Figura 19**).

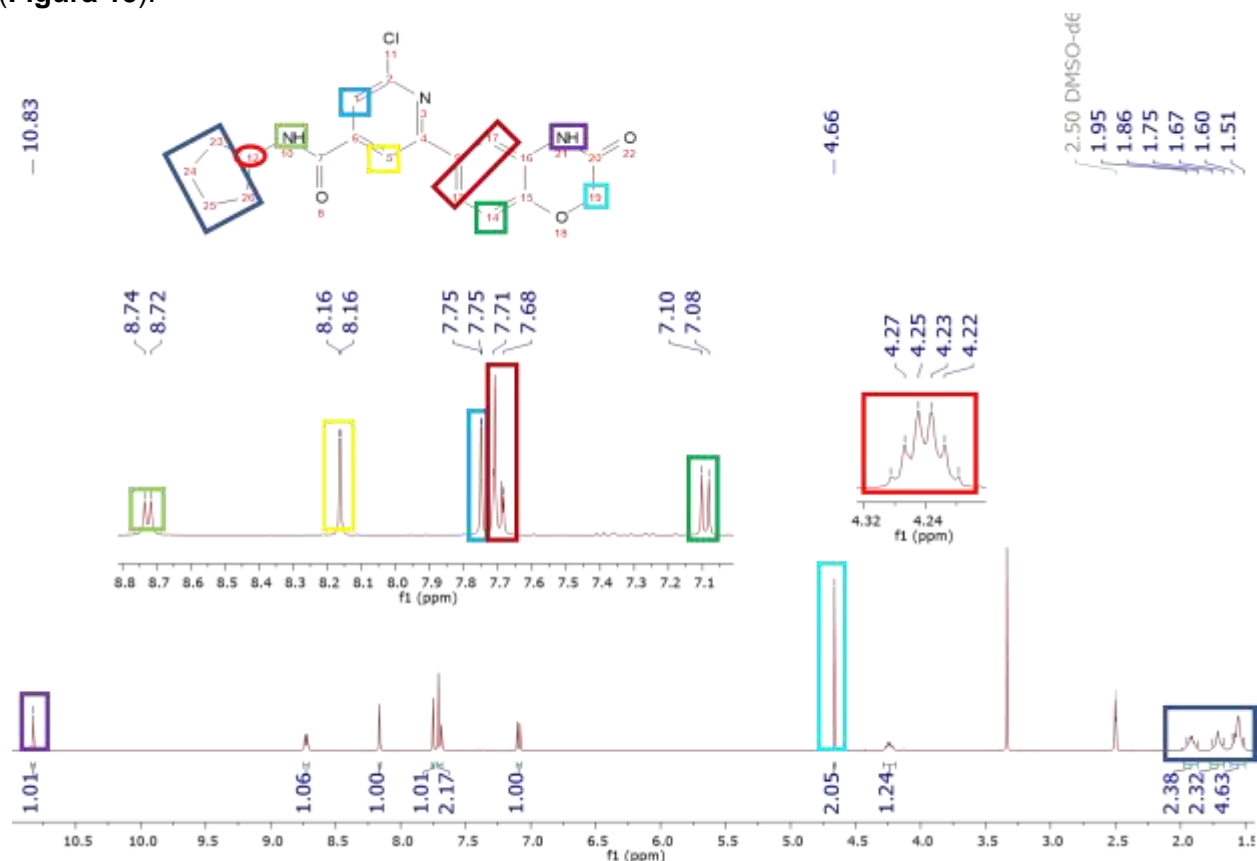


Figura 19. Espectro RMN ^1H del compuesto **DLPMB5**. Se muestra la asignación de señales.

Una vez determinadas las señales correspondientes a cada uno de los protones presentes en el compuesto, se procedió a analizar el espectro HSQC (**Espectro II-60**), que mostró la correlación H-C a un enlace de distancia, para la asignación de las señales encontradas en el espectro de RMN ^{13}C (**Espectro II-59**). De esta forma, se encontró que las señales en 23.73 ppm y 32.06 ppm pertenecieron al ciclo alifático; así como la señal en 51.29 ppm correlacionó con el carbono adyacente al grupo -NH de la amida en posición 4 de la piridina (**Figura 20**).

Después, se asignó la señal presente en 66.81 ppm, característica del metileno de la benzoxazinona. Posteriormente, se observó un grupo de 11 señales aromáticas, que coincidieron con lo esperado de acuerdo con la estructura analizada. En primera instancia, se asignaron las de 116.38 ppm y 120.12 ppm a cada uno de los carbonos del núcleo de piridina. Posteriormente, la señal en 116.59 ppm correlacionó con el C-14 del núcleo de benzoxazinona (**Figura 20**).

Para completar la asignación de las señales, se recurrió al experimento HMBC, el cual permitió observar la correlación heteronuclear a más de un enlace de distancia. Se comenzó con las interacciones observadas entre la señal de 4.66 ppm (H-19) y las señales en 146.20 ppm y 164.49 ppm (**Figura 21**); de esto se concluyó que la primera correspondió con el carbono cabeza de puente de la benzoxazinona, más cercano al metileno (C-15). Mientras que, la señal en 164.49 ppm

pertenció al carbono carbonílico de la misma benzoxazinona (C-20). Con lo anterior, se asignó la señal en 162.96 ppm al otro grupo carbonilo presente (C-7).

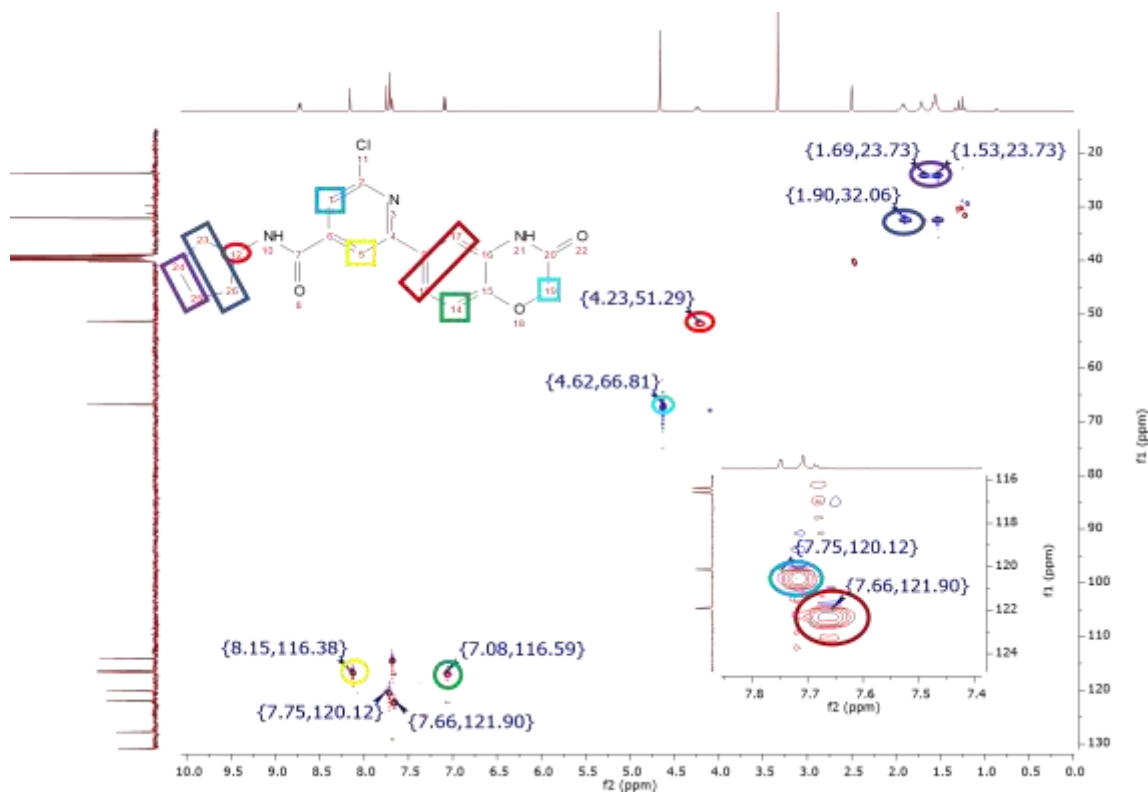


Figura 20. Experimento HSQC del compuesto **DLPMB5**. Se muestra la asignación de señales.

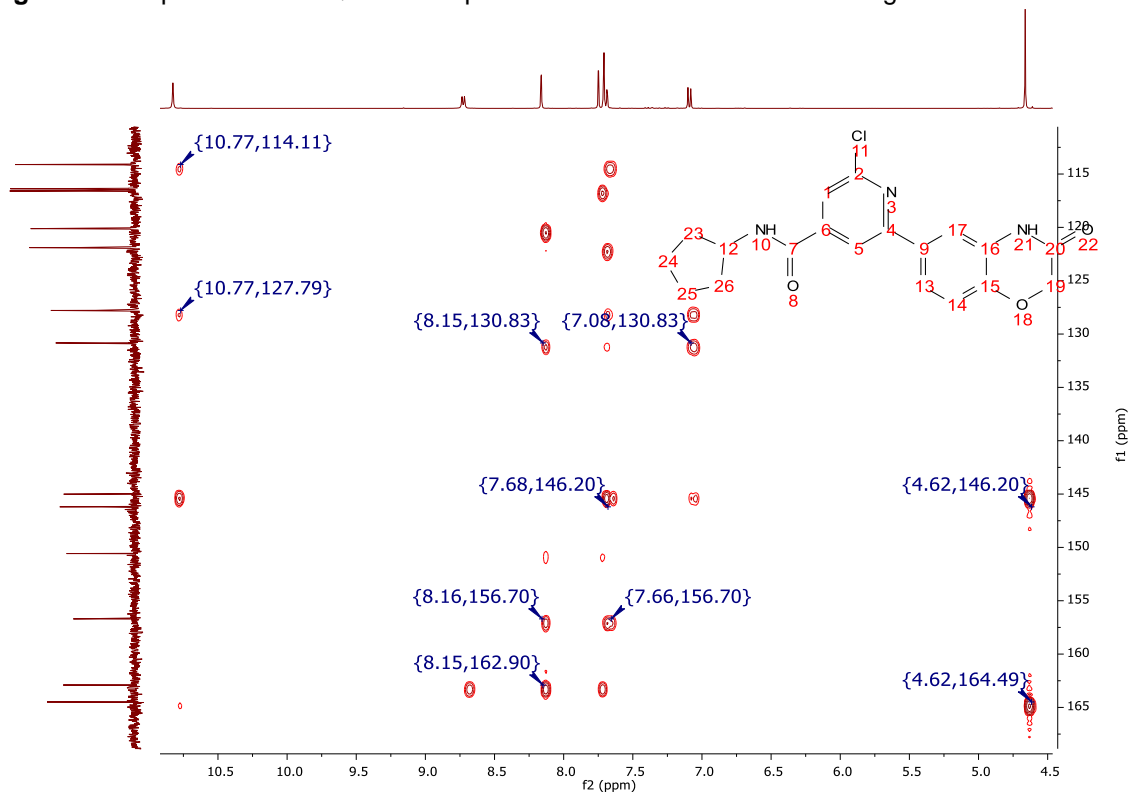


Figura 21. Experimento HMBC del compuesto **DLPMB5**. Se muestran algunas de las correlaciones más relevantes utilizadas para la asignación de las señales de ^{13}C .

Las correlaciones encontradas del protón H-14 de la benzoxazinona con la señal en 127.79 ppm permitió asignar esta última al otro carbono cabeza de puente C-16. Mientras que, la relación del mismo H-14 con la señal observada en 130.83 ppm correspondió con el carbono cuaternario de la benzoxazinona unido a la piridina; esto porque también se encontró correlación con la señal de ^1H en 8.16 ppm, que corresponde al H-5 del núcleo de piridina. Para terminar la asignación de los carbonos pertenecientes al sustituyente de tipo benzoxazinona, se observó la correspondencia del protón del H-21 con la señal en 114.11 ppm, perteneciente al C-17; por lo tanto, la última señal en 121.90 ppm se asignó al C-13.

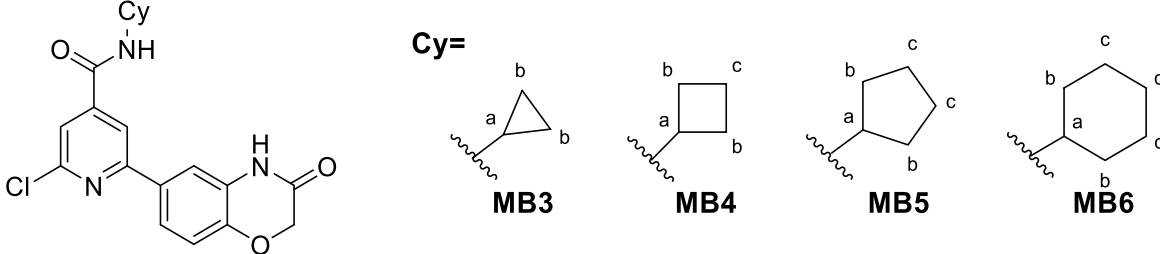
Quedando sin establecer únicamente los carbonos cuaternarios del núcleo de piridina, el primero que se asignó fue el observado en 156.70 ppm, el cual correlacionó con la señal de H-13 y 17, por lo que correspondió con el C-4. La señal en 156.70 ppm mostró interacción con la señal en 8.16 ppm del H-5 de la piridina, por lo que se determinó su pertenencia con el carbono cuaternario C-4 de ese mismo núcleo. Finalmente, la última señal por asignar fue la de 150.58 ppm que perteneció al otro carbono cuaternario C-2.

Las señales del resto de los compuestos de la serie **DLPMB** se determinaron de manera similar a la mostrada anteriormente como ejemplo. A continuación, se muestra un resumen de las señales de RMN ^1H y ^{13}C asignadas a los compuestos (**Tablas 5 y 6**). Posteriormente, se observó la masa esperada para las moléculas mediante espectrometría de masas (**Espectros II-50, 56, 62 y 67**). Además, se encontraron las señales de los grupos funcionales característicos en los espectros de IR (**Espectros II-49, 55, 61 y 66**), que incluyen: el grupo -NH en $3254.89\text{--}3309.28\text{ cm}^{-1}$, dos grupos carbonilo en $1676.32\text{--}1689.84\text{ cm}^{-1}$ y $1630.33\text{--}1655.51\text{ cm}^{-1}$, además de señales características aromáticas de enlace C=N en $1526.78\text{--}1536.02\text{ cm}^{-1}$ y $1489.56\text{--}1494.33\text{ cm}^{-1}$.

Tabla 5. Caracterización espectroscópica mediante RMN ^1H de la serie **DLPMB**

Compuesto	Señal H1	Señal H5	Señal NH	Señal Ha	Señales del resto del ciclo alifático
DLPMB3	7.71 ppm (d, $J=1.17\text{Hz}$)	8.15 ppm (d, $J=1.09\text{Hz}$)	8.85 ppm (d, $J=4.12\text{Hz}$)	2.89 ppm (m, $J=8.04, 4.01\text{Hz}$)	0.60–0.63 ppm, 0.73–0.78 ppm
DLPMB4	7.74 ppm (d, $J=1.05\text{Hz}$)	8.17 ppm (d, $J=1.07\text{Hz}$)	9.03 ppm (d, $J=7.34\text{Hz}$)	4.39–4.45 ppm	1.68–1.75 ppm, 2.04–2.14 ppm, 2.22–2.29 ppm
DLPMB5	7.75 ppm (d, $J=1.01\text{Hz}$)	8.16 ppm (d, $J=1.03\text{Hz}$)	8.73 ppm (d, $J=7.15\text{Hz}$)	4.24 (m, $J=7.21\text{Hz}$)	1.51–1.60 ppm, 1.67–1.75 ppm, 1.86–1.95 ppm
DLPMB6	7.74 ppm (s)	8.16 ppm (s)	8.64 ppm (d, $J=7.72\text{Hz}$)	3.77–3.78 ppm	1.01–1.86 ppm

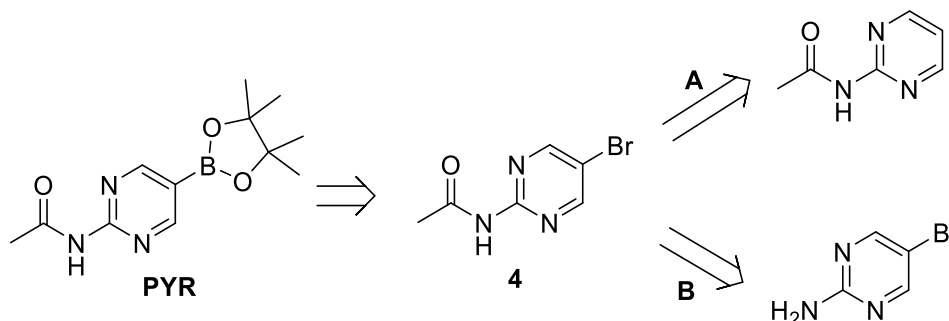
Tabla 6. Caracterización espectroscópica mediante RMN ¹³C de la serie DLPMB



Compuesto	Señal Ca en ppm	Señal Cb en ppm	Señal Cc en ppm	Señal Cd en ppm
DLPMB3	23.20	5.71	----	----
DLPMB4	44.79	29.91	14.83	----
DLPMB5	51.29	32.06	23.73	----
DLPMB6	48.78	32.21	24.80	24.44

7.2.4 Síntesis de [2-(acetilamino)pirimidin-5-il](trifluoro)borato de potasio (PYR1)

La retrosíntesis del intermediario **PYR** se planteó originalmente para utilizar el éster borónico como el organoborato en una posterior reacción de Suzuki. Para obtenerlo se plantearon dos posibles rutas, marcadas como **A** y **B** en el **Esquema 15**. La ruta **A** implicó la acetilación de la 2-aminopirimidina como primer paso, posteriormente la bromación para obtener la *N*-(5-bromopirimidin-2-il)acetamida (**4**). Por otro lado, la ruta **B** requirió la obtención de la 2-amino-5-bromopirimidina como primer paso y la posterior acetilación para acceder al compuesto **4**.



Esquema 15. Retrosíntesis de *N*-(5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)pirimidin-2-il)acetamida (**PYR**).

Se comenzó explorando la ruta **A**, con la 2-aminopirimidina como materia prima. La primera reacción correspondió a una acetilación, utilizando cloruro de acetilo en presencia de piridina y diclorometano como disolvente. La obtención del producto se comprobó mediante RMN ¹H (**Espectro 1**), en el que se observa la señal en 2.18 ppm correspondiente al metilo del acetilo, una señal aromática que integra para dos hidrógenos correspondiente a los vecinos del nitrógeno, otra señal aromática correspondiente al otro hidrógeno de la pirimidina y finalmente, la señal en 10.50 ppm que corresponde al -NH de la amida.

Sin embargo, el rendimiento de la reacción fue muy bajo (~10%), por lo que se descartó esta metodología. Se intentó realizar la misma transformación con anhídrido acético, obteniéndose un rendimiento de ~20%. Debido a los bajos rendimientos observados, se exploró la ruta **B**. La primera

reacción fue la bromación de la 2-aminopirimidina con *N*-bromosuccinimida, en presencia de acetato de amonio como catalizador.



Espectro 1. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ ppm) del compuesto *N*-(pirimidin-2-il)acetamida.

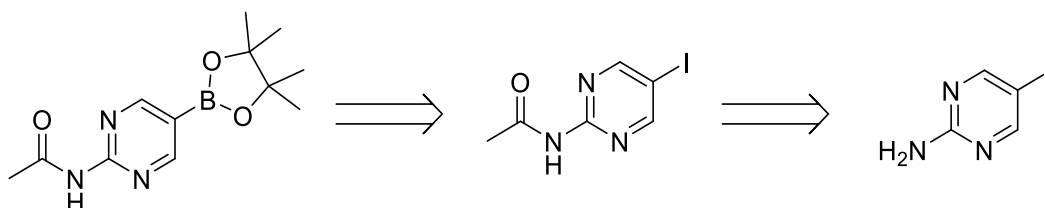
Se ha propuesto que la NBS en presencia de NH_4OAc genera Br_2 y HBr en el medio de reacción; debido a que el NH_4OAc puede disociarse en NH_4^+ y OAc^- , se genera NH_3 y AcOH después de una transferencia de protón. La NBS podría reducirse para formar Br_2 , succinimida y N_2 . La posterior reducción del Br_2 por el NH_3 podría originar HBr y N_2 . La presencia del HBr podría polarizar el enlace N-Br de la NBS y facilitar la bromación.^{94,95}

Se observó la formación del producto deseado en poco tiempo (alrededor de 1h) y un rendimiento alto (cerca del 90%), por lo que la ruta **B** fue la de elección para continuar con la síntesis del éster borónico **PYR** (**Esquema 15**). Se comprobó la transformación de la materia prima con el espectro de RMN ^1H (**Espectro II-13**), en el cual se asignó una señal en 6.90 ppm, que integra para los dos hidrógenos aromáticos de la pirimidina y la señal del grupo amino en 8.30 ppm, la cual intercambia con D_2O .

Una vez obtenida la 2-amino-5-bromopirimidina, se continuó con la reacción de acetilación, utilizando las condiciones iniciales en presencia de cloruro de acetilo y piridina como base. El producto *N*-(5-bromopirimidin-2-il)acetamida (**4**) se obtuvo con un rendimiento de 88.5%. Con el espectro de RMN ^1H (**Espectro II-17**) se comprobó la presencia del metilo adyacente al enlace amida, con una señal en 2.15 ppm que integra para tres hidrógenos. En el espectro de ^{13}C (**Espectro**

II-18) se observó una señal en 24.61 ppm, perteneciente al mismo metilo; además de la señal característica del grupo carbonilo en 168.77 ppm.

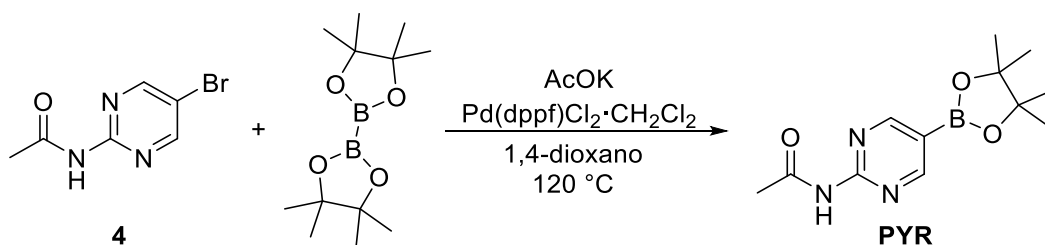
Por otra parte, se realizaron ensayos con la 2-amino-5-yodopirimidina para la obtención del éster borónico **PYR**. Con dicha materia prima se requieren dos reacciones: una acetilación y una borilación de Miyaura (**Esquema 16**). La ventaja de este sustrato es la presencia de un mejor grupo saliente para la reacción de borilación, no obstante, se presentaron varias desventajas experimentales como la pureza del sustrato y reactividad de este en la reacción de acetilación.



Esquema 16. Retrosíntesis del éster borónico **PYR**, a partir de 2-amino-5-yodopirimidina.

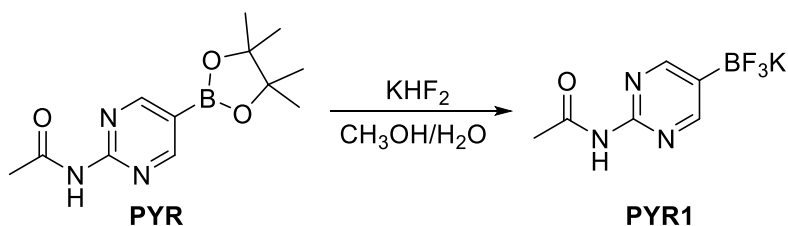
Se comprobó que la materia prima no se encontraba pura de origen con ccf, por lo que el compuesto se purificó mediante cromatografía en columna previo a la reacción de acetilación. Una vez lista la materia prima, se volvió a intentar la reacción; sin embargo, tampoco se completó con las condiciones encontradas para el sustrato bromado. Se exploraron algunos disolventes (CH_2Cl_2 , AcOEt), no obstante, la solubilidad del compuesto resultó ser muy baja, lo que repercutió directamente en la transformación del sustrato al producto de interés.

Debido a lo expuesto anteriormente, la borilación de Miyaura se continuó con el compuesto **4**, obtenido por la ruta B antes expuesta (**Esquema 17**). Se llevó a cabo la reacción con las mismas condiciones descritas para la obtención del anterior éster borónico (**Esquema 12**), con 1.1 equivalentes de diborobis(pinacolato), 5% mol de $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2 \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$ como fuente de paladio y tres equivalentes de AcOK bajo atmósfera de nitrógeno. La obtención del producto deseado **PYR** se comprobó con las señales de RMN características de los metilos adyacentes al enlace B-O, presentes en 1.31 ppm (^1H , **Espectro II-21**) y en 24.64 ppm (^{13}C , **Espectro II-22**).



Esquema 17. Borilación de Miyaura para la obtención del éster borónico **PYR**.

El éster borónico **PYR** presentó dificultades para su purificación, debido principalmente a su baja solubilidad en varios disolventes orgánicos incluyendo: 1,4-dioxano, acetona, acetato de etilo y etanol. Considerando que esta problemática podría influir en el posterior acoplamiento de Suzuki, el compuesto **PYR** se sometió a una reacción de fluoración con un exceso de KHF_2 en una mezcla de $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ para la obtención de la sal de trifluoroborato de potasio correspondiente (**Esquema 18**).



Esquema 18. Reacción de fluoración del éster borónico para la obtención del intermediario **PYR1**.

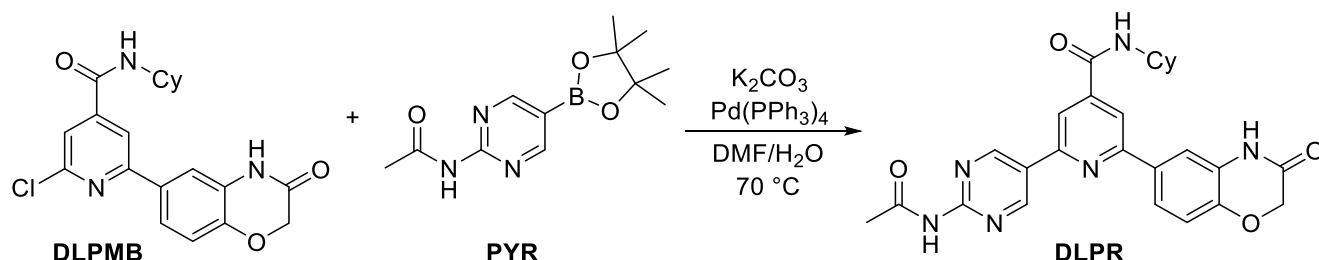
Para la purificación de la sal de trifluoroborato **PYR1**, se realizaron lavados de MeOH/H₂O 1:1 debido a que se ha reportado anteriormente que el pinacol liberado durante el curso de la reacción forma un azeótropo con el agua, el cual puede ser removido con destilación a presión reducida con un rotaevaporador.⁸² El sólido obtenido después de realizar la destilación azeotrópica se extrae varias veces con metanol, concentrando la fase orgánica a presión reducida. Esto con la finalidad de eliminar el exceso de KHF₂, así como el KF producido durante el curso de la reacción.

Para tratar de minimizar el número de extracciones, se realizó el procedimiento con acetona y etanol, sin embargo, el metanol presentó mejores resultados. La transformación se verificó con RMN ¹H (**Espectro II-25**), con una señal aromática en 8.63 ppm que integró para los dos hidrógenos del núcleo de pirimidina y otra señal en 2.21 ppm que representó a los tres hidrógenos del metilo adyacente al grupo amida. En RMN¹³C (**Espectro II-26**) se encontraron los mismos grupos: el metilo en 23.63 ppm, los carbonos aromáticos en 161.36 ppm; además del carbono aromático cuaternario unido al grupo amida en 155.23 ppm y el del grupo carbonilo en 173.39 ppm.

Se realizó también el espectro de RMN ¹⁹F (**Espectro II-27**) donde se observó una señal cuádruple en -143.61 ppm, correspondiente al desplazamiento obtenido anteriormente para otras sales de trifluoroborato; además de observar el acoplamiento ¹¹B-¹⁹F con una *J*=15.05 Hz, cercana a la reportada en la literatura de 14.6 Hz cuando el disolvente es D₂O.⁹⁶ En cuanto al espectro de IR (**Espectro II-28**), se detectaron señales características del enlace B-F en 1382.69 cm⁻¹ (*v*_{B-F}), además de las ya observadas para el grupo NH en 3223.58 cm⁻¹ (*v*_{N-H}) y el grupo carbonilo 1688.84 cm⁻¹ (*v*_{C=O amida}).

7.2.5 Síntesis de la serie DLPMP

Una vez obtenidos los compuestos de la serie **DLPMB** y el compuesto de organoboro **PYR**, la ruta de síntesis para la obtención de las piridinas trisustituidas diseñadas, se continuó con un segundo acoplamiento de Suzuki-Miyaura (**Esquema 19**). Para establecer una metodología adecuada para esta reacción, se probaron distintas condiciones para acceder a los compuestos de la serie **DLPR**, mostrados en la **Tabla 7**.



Esquema 19. Acoplamiento de Suzuki-Miyaura propuesto para la síntesis de los compuestos diseñados **DLPR**.

Para comenzar los experimentos se utilizaron como condiciones iniciales aquellas que se emplearon para obtener los compuestos de la serie **DLPMB**; a excepción de la proporción del derivado de organoboro utilizado que se aumentó de 0.7 a 1.2 equivalentes. Además, la temperatura se elevó de 70 °C a 90 °C para tratar de favorecer el segundo acoplamiento (condiciones **A**, **Tabla 7**). Dichas condiciones no transformaron significativamente las materias primas, por lo que se decidió aumentar la carga catalítica (condiciones **B**).

Tabla 7. Condiciones de reacción empleadas para el segundo acoplamiento de Suzuki-Miyaura

Condiciones	Compuesto de organoboro*	Base	% de catalizador	Temperatura	Tiempo	Resultado
A	1.2 eq PYR	2.5 eq K ₂ CO ₃	5% mol	90 °C	24 horas	Materia prima recuperada
B	1.2 eq PYR	3 eq K ₂ CO ₃	10% mol	90 °C	24 horas	~20% de materia prima consumida
C	1.2 eq PYR	3 eq K ₂ CO ₃	10% mol	90 °C	72 horas	~25% de materia prima consumida
D	1.2 eq PYR	3 eq K ₂ CO ₃	10% mol	100 °C	72 horas	Mezcla compleja
E	1.2 eq PYR	3 eq Cs ₂ CO ₃	10% mol	100 °C	48 horas	Mezcla compleja
F	1.2 eq PYR1	2.5 eq K ₂ CO ₃	10% mol	100 °C	48 horas	Mezcla compleja
G	2.5 eq PYR1	2.5 eq K ₂ CO ₃	10% mol	100 °C	48 horas	Mezcla compleja

*Las primeras pruebas se realizaron con el éster borónico **PYR**, para después utilizar su sal de trifluoroborato correspondiente **PYR1**.

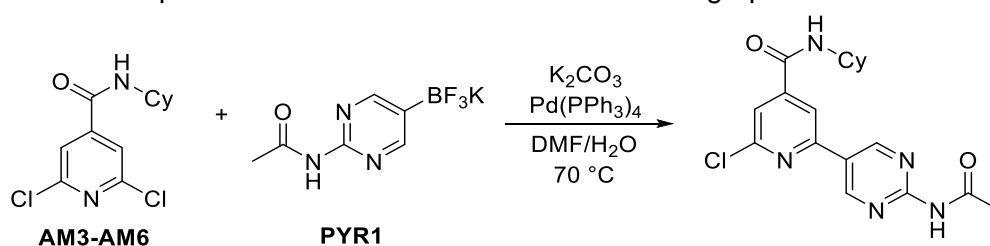
Tras el aumento del porcentaje de catalizador, se estimó con ccf la transformación de las materias primas; sin embargo, la proporción de los compuestos de partida siguió siendo alta. Por ello, se aumentó el tiempo de reacción para favorecer la transformación observada previamente (condiciones **C**). Se obtuvo una transformación ligeramente mayor que en las condiciones anteriores; no obstante, el porcentaje cualitativo no aumentó drásticamente.

Para beneficiar el curso de la reacción, se aumentó la temperatura de la mezcla (condiciones **D**), sin resultados favorables, obteniéndose una mezcla compleja de compuestos. En trabajos previos se ha observado que el cambio del K₂CO₃ por Cs₂CO₃ puede ayudar al curso del ciclo catalítico, mediante la transformación más eficiente del éster borónico a su boronato correspondiente. Por esa razón, se cambió la base utilizada por Cs₂CO₃ con los mismos equivalentes (condiciones **E**). Como resultado no se observó diferencia respecto al uso del K₂CO₃.

Derivado de los resultados negativos hasta el momento, surgió la hipótesis de que la baja solubilidad del éster borónico **PYR** podría dificultar el curso de la reacción, al no disolverse completamente en el medio de reacción. Para solucionar esto, se probó la sal de trifluoroborato correspondiente **PYR1**, debido a que este compuesto fue altamente soluble en agua, por lo que pudo disolverse en la mezcla utilizada para la reacción (DMF/H₂O 4:1).

Como la transformación observada a 90 °C no fue significativa, se decidió hacer la reacción con **PYR1** a 100 °C; no obstante, estas condiciones (**F, Tabla 7**) tampoco permitieron la obtención del producto esperado. Una posible causa podría ser la falta de equivalentes de sal de trifluoroborato, debido a que se ha reportado que estos compuestos se hidrolizan lentamente, lo cual impide su entrada al ciclo catalítico.^{97,98} Por esta causa se utilizaron 2.5 equivalentes de la sal para las condiciones **G**; dando resultados poco favorables de igual manera, al observarse una mezcla compleja de productos.

Analizando los resultados anteriores y sabiendo que el primer acoplamiento de Suzuki fue exitoso, la ruta de síntesis se modificó. Así, se planteó la obtención de los compuestos acoplados en primera instancia con el derivado de pirimidina (a partir de **PYR1**; **Esquema 20**), y posteriormente realizar el segundo acoplamiento con el compuesto de tipo benzoxazinona, lo cual ha permitido la obtención de resultados exitosos previos con distintos sustratos en nuestro grupo.



Esquema 20. Acoplamiento de Suzuki-Miyaura para la obtención de compuestos monoacoplados a partir de **PYR1** y las amidas precursoras.

Las pruebas de condiciones de reacción se iniciaron con la sal de trifluoroborato **PYR1**, debido a lo expuesto anteriormente sobre la solubilidad que presentaron los derivados de pirimidina. Se inició con 0.7 equivalentes de dicho compuesto, 5% mol del catalizador Pd(PPh₃)₄ y 70 °C (**A, Tabla 8**); condiciones que fueron exitosas en el primer monoacoplamiento realizado (serie **DLPMB**).

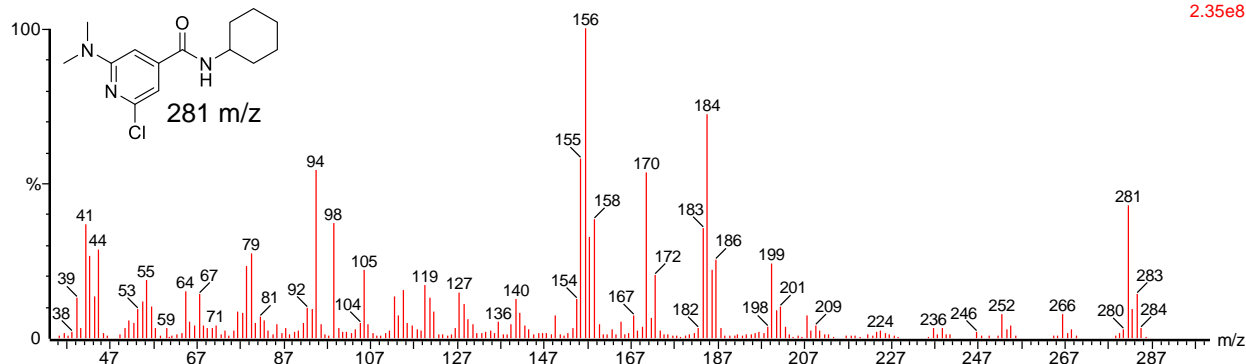
Tabla 8. Condiciones de reacción empleadas para el acoplamiento de Suzuki-Miyaura. Se invirtió el orden del acoplamiento cruzado planteado en la ruta de síntesis seguida hasta este punto.

Condiciones	Compuesto de organoboro	Base	% de catalizador	Temperatura	Tiempo	Rendimiento
A	0.7 eq PYR1	2.5 eq K ₂ CO ₃	5% mol	70 °C	24 horas	~30%
B	1.5 eq PYR1	2.5 eq K ₂ CO ₃	5% mol	70 °C	36 horas	~45%

No obstante, la transformación no fue significativa, probablemente debido a los equivalentes de sal de trifluoroborato, como se mencionó en la sección precedente. De esta forma, se aumentaron los equivalentes del derivado de organoboro y se amplió el tiempo de reacción (**B, Tabla 8**). Con estas condiciones de reacción se obtuvo un producto mayoritario, el cual fue de fácil aislamiento mediante cromatografía flash.

Sin embargo, al observar el espectro de RMN ¹H se determinó que las señales del compuesto aislado no correspondían con la estructura esperada, al no observarse las señales características del núcleo de benzoxazinona. Con ayuda del espectro de masas por impacto electrónico (**Espectro 2**) se elucidó que el compuesto aislado era resultado de la sustitución nucleofílica aromática (S_NA)

de la dimetilamina, producto de descomposición de la DMF utilizada como disolvente en el medio de reacción.



Espectro 2. EM (IE, $[M^+]$, m/z) del compuesto 2-Cloro-*N*-ciclohexil-6-(dimetilamino)piridin-4-carboxamida (DLPMP6).

En el **Espectro 2** pudo notarse el ión molecular del espectro en 281 m/z que correspondió con la masa calculada para el compuesto **DLPMP6**; además pudo observarse la isotopía del cloro, con el pico característico en 283 m/z . Las rupturas principales son resultado de la pérdida del grupo amino unido al ciclo alifático para la formación del ion acilio y la posterior descarboxilación.

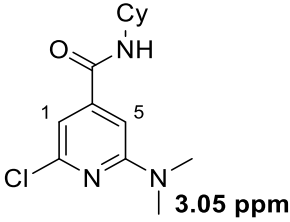
Con las condiciones de reacción encontradas se originó la serie **DLPMP**, la cual se eligió evaluar biológicamente, como prueba de la importancia de los sustituyentes de las piridinas en las posiciones 2 y 6 para su actividad. Esto debido a que se ha predicho que el sustituyente de tipo benzoxazinona es crucial para la interacción de los compuestos con las isoformas de AKT; no obstante, en nuestro grupo no se ha evaluado ningún compuesto que no presente dicho sustituyente.

Una vez obtenidos los compuestos de la serie, se caracterizaron con los espectros de RMN 1H y ^{13}C de manera similar a la ejemplificada con los compuestos pertenecientes a **DLPMB**. En las siguientes tablas (**Tabla 9** y **10**) se presenta un resumen de las principales señales de las moléculas analizadas, donde se observó nuevamente que **DLPMP3** posee desplazamientos distintos a los de sus contrapartes alifáticas.

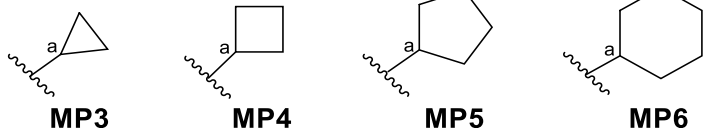
En los espectros de masas (**Espectros II-73, 79, 85** y **91**) se encontró la masa esperada para todos los compuestos de la serie. Además, en los espectros de IR (**Espectros II-72, 78, 84** y **90**) se observaron señales pertenecientes a los grupos funcionales característicos: el grupo -NH en 3291.83–3279.55 cm^{-1} , el grupo carbonilo de amida en 1633.63–1637.43 cm^{-1} y señales aromáticas de enlace C=N en 1595.12–1598.36 cm^{-1} y 1520.90–1527.11 cm^{-1} .

Los resultados obtenidos a partir de las pruebas realizadas para el acoplamiento de Suzuki que incorporaría al sustituyente derivado de pirimidina, arrojaron distintos problemas que sugieren la necesidad de cambiar las condiciones utilizadas. De la sustitución nucleofílica que realizó la dimetilamina se dedujo que el principal inconveniente fue el disolvente utilizado. Sin embargo, se hicieron distintos experimentos para probar que este, aunado a la temperatura de reacción, podrían ser las principales causas que promueven dicha sustitución.

Tabla 9. Caracterización espectroscópica mediante RMN ¹H de la serie DLPMP

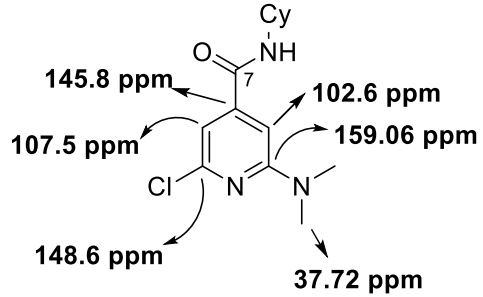


Cy=

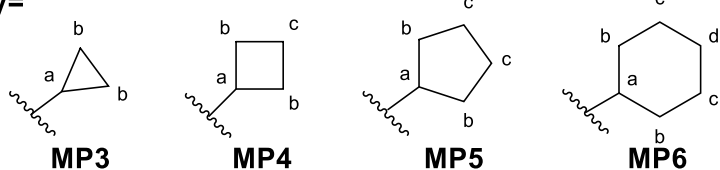


Compuesto	Señal H1	Señal H5	Señal NH	Señal Ha	Señales del resto del ciclo alifático
DLPMP3	6.88 ppm	6.88 ppm	8.59 ppm (d, J=3.60Hz)	2.82 ppm (m, J= 8.04, 4.04Hz)	0.55–0.59 ppm, 0.68–0.73 ppm
DLPMP4	6.92 ppm (d, J= 0.85Hz)	6.90 ppm (d, J= 0.96Hz)	8.75 ppm (d, J= 7.35Hz)	4.37 ppm (m, J= 8.04Hz)	1.63–1.71 ppm, 2.00–2.11 ppm, 2.17–2.24 ppm, 3.05 ppm
DLPMP5	6.93 ppm	6.89 ppm	8.45 ppm (d, J=7.22Hz)	4.13–4.23 ppm	1.48–1.58 ppm, 1.65–1.73 ppm, 1.84–1.92 ppm, 3.05 ppm
DLPMP6	6.92 ppm (d, J= 0.83Hz)	6.89 ppm (d, J= 0.92Hz)	8.37 ppm (d, J=7.86Hz)	3.68–3.76 ppm	1.19–1.87 ppm, 3.05 ppm

Tabla 10. Caracterización espectroscópica mediante RMN ¹³C de la serie DLPMP



Cy=



Compuesto	Señal C7	Señal Ca	Señal Cb	Señal Cc	Señal Cd
DLPMP3	165.28 ppm	23.06 ppm	5.65 ppm	-----	-----
DLPMP4	163.05 ppm	44.60 ppm	29.90 ppm	14.76 ppm	-----
DLPMP5	163.73 ppm	51.07 ppm	31.99 ppm	23.70 ppm	-----
DLPMP6	163.15 ppm	48.59 ppm	32.27 ppm	25.24 ppm	24.92 ppm

Para estudiar las condiciones que podrían estar afectando al acoplamiento, se conservaron los 2.5 equivalentes de K₂CO₃ utilizados y la carga catalítica de Pd(PPh₃)₄ en 5% mol. Se comenzó comprobando que la temperatura era un factor crucial para la descomposición de la DMF, que eventualmente generó la dimetilamina en el medio de reacción. Para ello, se llevó a cabo una reacción a temperatura ambiente y 1.5 eq de la sal de trifluoroborato **PYR1** (condiciones **A**, **Tabla 11**), de la cual no se observó transformación de las materias primas; esto comprobó que se necesita temperatura elevada tanto para el acoplamiento de Suzuki como para la sustitución observada.

Tabla 11. Condiciones de reacción empleadas para el segundo acoplamiento de Suzuki-Miyaura

Condiciones	Compuesto de organoboro	Temperatura	Disolvente	Tiempo	Resultado
A	1.5 eq PYR1	T. ambiente	DMF/H ₂ O 4:1	1 semana	Sin transformación
B	-----	70 °C	DMF/H ₂ O 4:1	72 horas	Sustitución nucleofílica
C	1.5 eq PYR1	70 °C	1,4-dioxano/H ₂ O 4:1	72 horas	Sin transformación
D	0.7 eq PYR	70 °C	DME/H ₂ O 4:1	72 horas	Sin transformación
E	1.5 eq PYR1	70 °C	DME/H ₂ O 4:1	72 horas	Sin transformación

Posteriormente se comprobó que la presencia del compuesto de organoboro no fue fundamental para la *S_NA* (condiciones **B**), ya que se observó en ccf la formación del mismo producto de sustitución con la dimetilamina. Los experimentos se continuaron con distintos disolventes, primero se reemplazó la DMF por 1,4-dioxano, conservando los 1.5 eq del compuesto **PYR1**. De esta mezcla de reacción se recuperaron las materias primas íntegramente, por lo que se decidió utilizar otro disolvente.

Se realizaron dos pruebas adicionales sustituyendo la DMF por 1,2-dimetoxietano (DME), en una de las cuales se sustituyó la sal de trifluoroborato utilizada hasta el momento, por su éster borónico precursor: el compuesto **PYR** (condiciones **D** y **E**, **Tabla 10**). Esto con el fin de corroborar la reactividad de los dos derivados de organoboro en el acoplamiento de Suzuki. No obstante, los resultados observados fueron los mismos que con las condiciones anteriores (**C**), lo cual sugiere que podría existir una deficiencia en la transmetalación del ciclo catalítico que imposibilita la obtención de los compuestos deseados mediante el acoplamiento de Suzuki.

7.3 Evaluación biológica de las series DLPMB y DLPMP

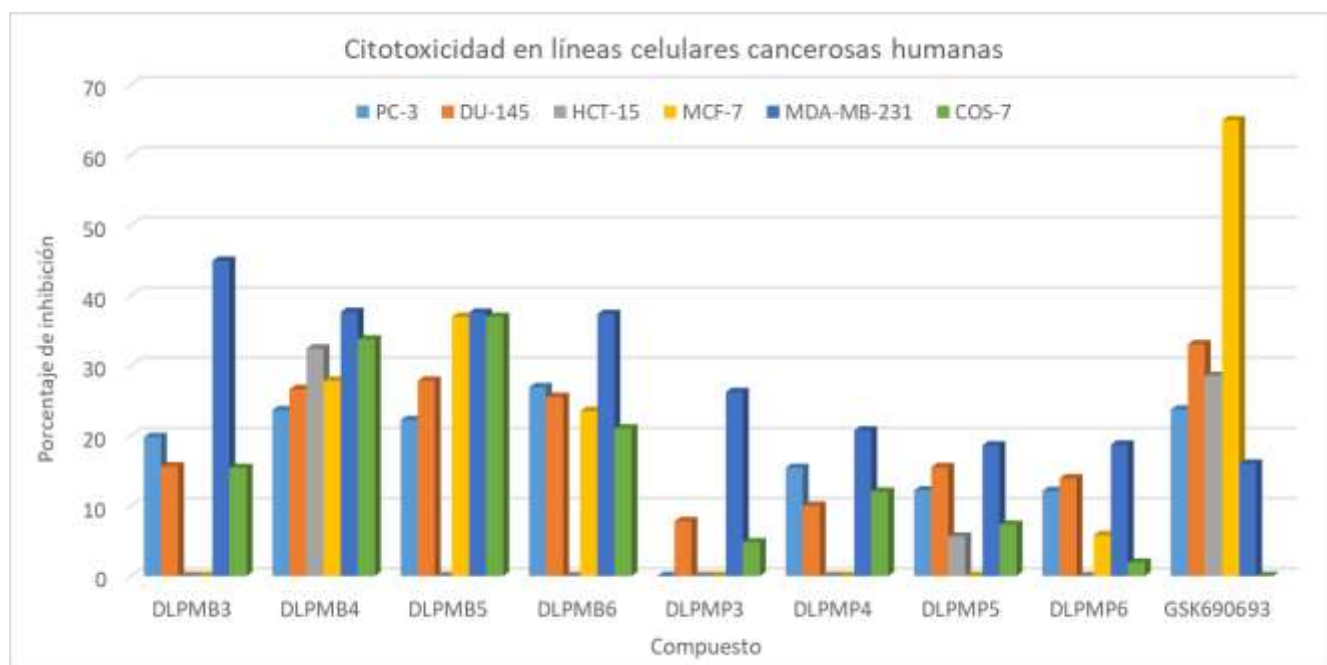
La evaluación biológica de los compuestos obtenidos se realizó mediante un protocolo establecido por el *National Cancer Institute*.⁹⁹ La evaluación de la sensibilidad de las líneas celulares frente a los compuestos de la serie **DLPMB** y **DLPMP** se determinó a una concentración de 25 μM, mientras que el compuesto **GSK690693**, reportado como un inhibidor frente a las tres isoformas de AKT se evaluó a una concentración de 2.5 μM. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 12** y en la **Gráfica 1**, presentadas a continuación.

Al observar los resultados de la **Tabla 12**, se estableció que la mayoría de los compuestos no presenta actividad frente a la línea HCT-15, lo cual indica determinada selectividad. El compuesto **DLPMP5** presentó una inhibición baja frente a esta línea y el compuesto **DLPMB4** destacó en su porcentaje de inhibición.

Tabla 12. Porcentaje de inhibición de crecimiento celular de las series **DLPMB** y **DLPMP** a 25 μM

Compuesto	% de inhibición del crecimiento celular					
	PC-3	DU-145	HCT-15	MCF-7	MDA-MB-231	COS-7
DLPMB3	19.8 \pm 2.0	15.6 \pm 2.8	NC	NC	44.9 \pm 3.5	15.4 \pm 2.4
DLPMB4	23.6 \pm 1.9	26.6 \pm 4.4	32.4 \pm 5.6	27.8 \pm 3.5	37.6 \pm 2.4	33.7 \pm 3.0
DLPMB5	22.2 \pm 2.0	27.8 \pm 5.3	NC	36.9 \pm 3.0	37.5 \pm 2.9	36.9 \pm 6.2
DLPMB6	26.9 \pm 2.4	25.5 \pm 2.2	NC	23.5 \pm 3.2	37.3 \pm 2.4	21.0 \pm 2.4
DLPMP3	NC	7.8 \pm 1.6	NC	NC	26.2 \pm 3.6	4.8 \pm 0.7
DLPMP4	15.4 \pm 1.2	10.0 \pm 1.8	NC	NC	20.7 \pm 2.7	12.0 \pm 1.6
DLPMP5	12.2 \pm 3.0	15.5 \pm 3.2	5.6 \pm 1.8	NC	18.6 \pm 2.7	7.3 \pm 0.6
DLPMP6	12.1 \pm 1.5	13.9 \pm 2.7	NC	5.8 \pm 1.3	18.7 \pm 2.7	1.9 \pm 1.7
GSK690693 (2.5 μM)	23.7 \pm 2.3	33.0 \pm 1.5	28.5 \pm 5.6	64.9 \pm 1.9	16.0 \pm 2.4	NC

NC: no citotóxico; **PC-3:** células cancerosas de próstata, **DU-145:** células cancerosas de próstata, **HCT-15:** células cancerosas de colon, **MCF-7:** células cancerosas de mama, **MDA-MB-231:** células cancerosas de mama triple negativo, **COS-7:** células de riñón de mono no cancerosas.



Gráfica 1. Porcentaje de inhibición de crecimiento celular de los compuestos de las series **DLPMB** y **DLPMP**, además del inhibidor **GSK690693**.

La siguiente línea celular donde se observó menor inhibición fue la MCF-7, donde la mitad de los compuestos evaluados no presentó actividad. Dentro de la serie **DLPMB**, tres de las cuatro moléculas presentaron moderada actividad; el aumento del tamaño del ciclo alifático favoreció la inhibición de los compuestos **DLPMB4** y **DLPMB5**. No obstante, la tendencia no se siguió con el compuesto **DLPMB6**, lo cual podría estar asociado al mayor número de conformaciones posibles,

en el caso de que una o algunas de ellas ejercieran la actividad inhibitoria; o con alguna otra propiedad fisicoquímica como la solubilidad, la cual fue menor entre mayor fuera el tamaño del ciclo.

Continuando con la otra línea celular de cáncer de mama, todos los compuestos evaluados presentaron algún grado de inhibición frente a la MDA-MB-231. En general, la serie **DLPMP** fue menos activa que la otra serie evaluada. En esta línea celular se encontró la tendencia a disminuir la actividad conforme aumentó el tamaño del ciclo alifático sustituyente, especialmente al aumentar del ciclopropilo a los ciclos de 4, 5 y 6 carbonos, sugiriendo que las propiedades del primer sustituyente son favorables para la actividad en esta línea particular.

Caso contrario, en la línea celular DU-145, donde el incremento en la cantidad de carbonos presentes en el ciclo alifático aumenta ligeramente la actividad en ambas series. Mientras que, al observar los resultados de la línea PC-3, no se detectó una diferencia significativa de citotoxicidad dentro de la serie **DLPMB**. En cambio, para los compuestos de la serie **DLPMP**, la presencia del ciclopropilo como sustituyente anuló la actividad observada para los otros compuestos; lo cual sugiere que en dicha serie el aumento del ciclo podría favorecer su potencial anticancerígeno.

En cuanto a la citotoxicidad observada contra la línea celular no cancerosa (COS-7), pudo notarse que todos los compuestos presentaron inhibición. En general, los compuestos de la serie **DLPMP** presentan un menor porcentaje de inhibición contra esta línea. No obstante, los valores observados son cercanos a los de otras líneas cancerosas o incluso mayores, lo cual sugiere que estos compuestos requieren mayor optimización por su baja selectividad. Esto podría estar relacionado con su tamaño molecular, ya que ocuparían menor volumen de la cavidad del blanco, y esto a su vez favorecería la inespecificidad de su actividad.

Por otro lado, los porcentajes de inhibición de la serie **DLPMB** contra la línea COS-7 son comparables con los observados con otras de las líneas celulares o incluso mayores. Esto sugiere que los compuestos podrían no presentar selectividad entre células sanas y células cancerosas, lo cual podría deberse a la elevada homología de AKT con otras cinasas o a la falta de afinidad por la diana biológica.

La diferencia de actividad entre las líneas también podría relacionarse con el grado de sobreexpresión de las isoformas de AKT en cada una de estas y una posible preferencia de las moléculas evaluadas frente a determinada isoforma. Sin embargo, aunque existen diversos trabajos de la sobreexpresión de AKT en las líneas celulares cancerosas evaluadas, no se ha reportado cuantitativamente el grado de sobreexpresión de cada isoforma.^{44,45,49,100,101}

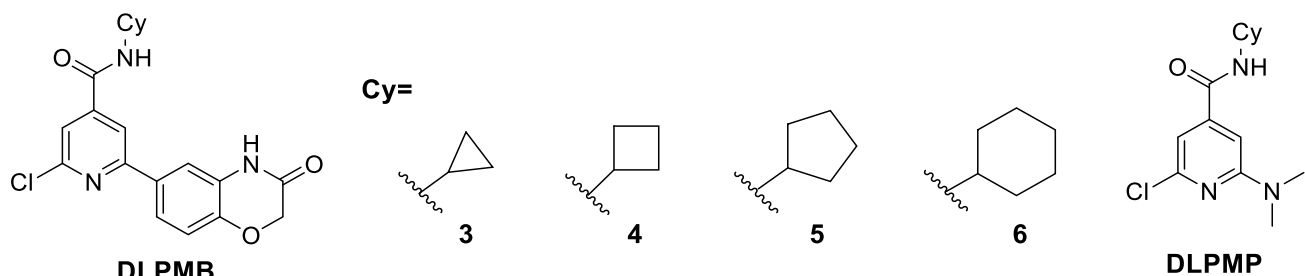
No obstante, se ha reportado que las líneas de cáncer de próstata PC-3 y DU-145 podrían responder a tratamientos que inhiban a la isoforma AKT3, al igual que el cáncer de mama triple negativo representado por MDA-MB-231.⁴⁴ Por lo cual, los resultados anteriores podrían sugerir que los compuestos evaluados presentaron cierta selectividad contra la isoforma AKT3, lo cual tendría que ser evaluado cuantitativamente con un ensayo de inhibición enzimática.

Las características fisicoquímicas como el coeficiente de partición también podrían estar relacionadas con la diferencia de actividad observada, afectando la solubilidad o permeabilidad de los compuestos. Por ello, se determinaron las propiedades moleculares de las series evaluadas con el servidor SwissADME (**Tabla 13**).⁹⁰ A partir de las predicciones obtenidas, no se observó una

tendencia clara entre alguna de las propiedades con la citotoxicidad presentada por los compuestos. No obstante, pudo notarse que los valores de solubilidad de las moléculas sustituidas con ciclopropilo (**DLPMB3** y **DLPMP3**) difieren significativamente del resto de los compuestos de cada una de las series.

En cuanto a los valores de logP, se observó el aumento directamente proporcional al tamaño del ciclo. Sin embargo, aunque las dos propiedades mencionadas podrían sugerir que el aumento del número de carbonos en los compuestos podría desfavorecer su permeabilidad, se observó que dicho aumento favorece la citotoxicidad en la mayoría de las líneas. Lo anterior refuerza la hipótesis de que la actividad podría estar relacionada con la afinidad de los compuestos por alguna o algunas de las isoformas de AKT, sin descartar la posibilidad de que existan otras cinasas involucradas en la citotoxicidad observada.

Tabla 13. Propiedades moleculares de los compuestos de las series **DLPMB** y **DLPMP**



Clave	PM (g/mol)	LogP*	tPSA (Å ²)	DPH	APH	EnR	Solubilidad (mg/L)**
DLPMB3	343.76	2.25	80.32	2	4	4	108
DLPMB4	357.79	2.56	80.32	2	4	4	56.7
DLPMB5	371.82	2.84	80.32	2	4	4	30.0
DLPMB6	385.84	3.14	80.32	2	4	4	11.8
DLPMP3	239.70	1.83	45.23	1	2	4	521
DLPMP4	253.73	2.15	45.23	1	2	4	278
DLPMP5	267.75	2.45	45.23	1	2	4	147
DLPMP6	281.78	2.77	45.23	1	2	4	59.8

* LogP consenso. **Solubilidad estimada con el método ESOL.

7.4 Parte computacional

Como parte complementaria del presente trabajo, se efectuaron estudios de acoplamiento molecular con los compuestos de las series **DLPMB** y **DLPMP** utilizando dos programas diferentes, con la finalidad de realizar una comparación entre los modelos de interacción y energías de unión predichas por cada uno de estos. A continuación, se presentan los resultados obtenidos con ambos programas.

7.4.1 Acoplamiento molecular con AutoDock 4.2

Los valores más favorables calculados por el programa se presentan en la **Tabla 14**, así como el tamaño de grupo. Se eligió el grupo con mayor número de elementos y mejor energía de unión. En

estos estudios, se incluyó al inhibidor **GSK690693** como referencia (**Figura 22**), cuyos valores de energía predichos no fueron significativamente distintos. Esto coincide con el valor experimental reportado de actividad inhibitoria contra cada una de las isoformas.

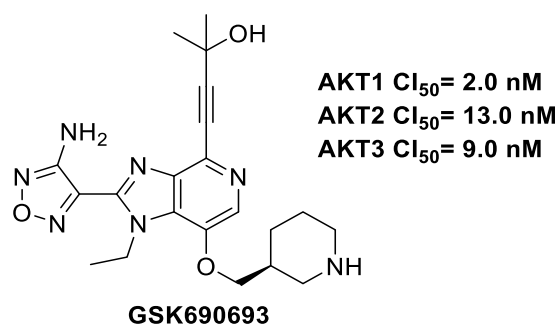
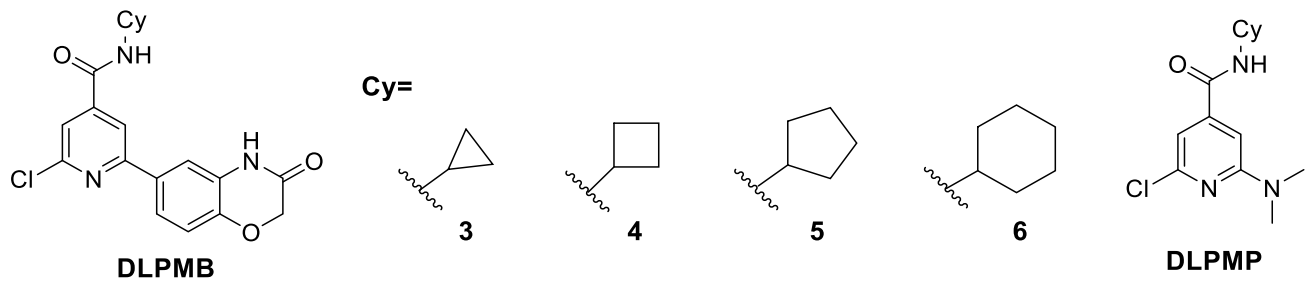


Figura 22. Estructura de **GSK690693**, un inhibidor reportado para las tres isoformas de AKT.

Tabla 14. Valores de energía de unión y tamaño de grupo encontrados con AutoDock 4.2 para los compuestos de las series **DLPMB** y **DLPMP**



Clave	AKT1		AKT2		AKT3	
	$\Delta G_{\text{unión}}$ (Kcal/mol)	Grupo*	$\Delta G_{\text{unión}}$ (Kcal/mol)	Grupo*	$\Delta G_{\text{unión}}$ (Kcal/mol)	Grupo*
DLPMB3	-8.08	9	-7.92	8	-7.41	4
DLPMB4	-8.24	9	-8.11	6	-7.50	6
DLPMB5	-8.47	5	-8.54	5	-8.55	4
DLPMB6	-8.60	4	-8.70	6	-8.41	4
DLPMP3	-5.71	5	-5.28	9	-5.88	6
DLPMP4	-6.17	3	-5.79	15	-5.80	7
DLPMP5	-6.07	9	-6.66	11	-6.89	4
DLPMP6	-6.62	13	-6.76	10	-7.00	6
GSK690693	-7.49	3	-7.04	8	-7.49	5

*Basado en 20 corridas

A primera vista, se observó que los compuestos de la serie **DLPMB** presentaron mejores valores de energía de unión que los de la serie **DLPMP**. Esto podría explicarse con el volumen molecular de los compuestos, ya que las moléculas de la primera serie mencionada poseen mayor peso molecular

y ocupan un mayor espacio, lo que podría favorecer las interacciones entre estos ligandos y la cavidad estudiada de las isoformas de AKT. Dentro de los compuestos pertenecientes a la misma serie, no se observó una diferencia significativa entre los valores de energía de unión, aunque existió una tendencia directamente proporcional entre mayor tamaño de ciclo alifático como sustituyente y una mejor energía.

Hablando específicamente de la serie **DLPMB**, los resultados mostraron ligeras variaciones entre los valores de energía de unión para cada isoforma, donde AKT3 tuvo los valores menos favorables; no obstante, la diferencia no pareció significativa. Sin embargo, los grupos no fueron altos, lo cual sugiere que la estabilidad del complejo ligando-proteína podría ser baja. Además, los diversos conformeros de las moléculas también pudieron influenciar el tamaño de grupo observado.

Pasando a la serie **DLPMP**, se encontraron algunos tamaños de grupos mayores a los de la serie anterior; principalmente en el caso de la isoforma AKT2. Nuevamente, se observaron diferencias mínimas entre los valores de energía de unión entre las isoformas, con preferencia ligera hacia AKT3, seguido de la isoforma AKT2 en el caso de los compuestos **DLPMP5** y **DLPMP6**. Esta mínima tendencia que favoreció a la isoforma AKT3 podría estar relacionada con la citotoxicidad observada contra las líneas PC-3, DU-145 y MDA-MB-231, mientras que la actividad contra HCT-15 y MCF-7 fue mínima en el caso de la serie **DLPMP**.

En cuanto a las interacciones observadas, se encontró que los compuestos de la serie **DLPMB** presentaron poses similares, excepto en el caso del compuesto **DLPMB5**. El compuesto **DLPMB6** también presentó un acomodo ligeramente distinto de la amida en posición 4 del núcleo de piridina (**Figura 23**), lo que favoreció su interacción con el residuo Glu234, que no presentó ningún otro compuesto de la serie. En cambio, los compuestos **DLPMB3** y **DLPMB4** presentaron un puente de hidrógeno entre el oxígeno del grupo carbonilo en posición 4 de la piridina y el residuo Lys158. Además de interacciones del núcleo de benzoxazinona con Ala230 y Tyr229.

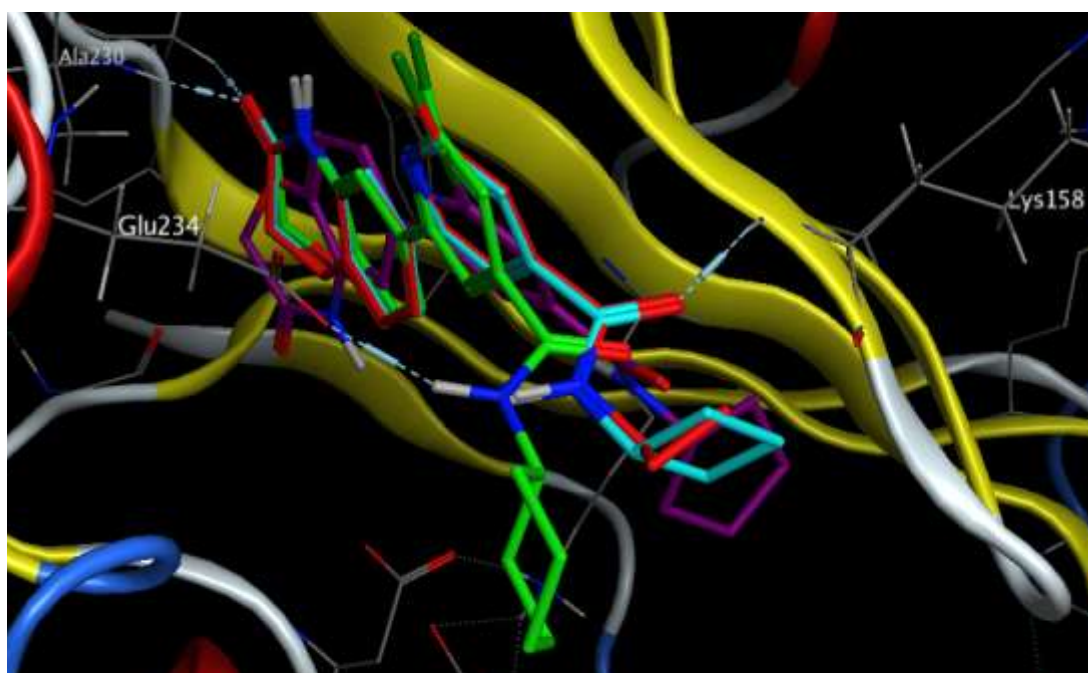


Figura 23. Modelo 3D de las conformaciones adoptadas por los compuestos de la serie **DLPMB** con AKT1. Se muestran: **DLPMB3** en rojo, **DLPMB4** en azul, **DLPMB5** en morado y **DLPMB6** en verde.

En cambio, **DLPMB5** no presentó ninguno de los puentes de hidrógeno antes mencionados; sin embargo, a pesar de la reducción de dichas interacciones, la energía de unión predicha no se afectó significativamente. Esto podría deberse a la diferencia de pose respecto a los otros compuestos de la serie, ya que este se encuentra menos expuesto; es decir que, este ligando se introdujo con mayor efectividad dentro de la cavidad de AKT1. Por otro lado, en el inhibidor **GSK690693** se observaron interacciones con Glu191, Met281, Lys276 y Asp292; la interacción con este último residuo se encontró también en los compuestos evaluados.

Continuando con las observaciones realizadas para la isoforma AKT2 con los compuestos de la serie **DLPMB**, las poses fueron igualmente similares para **DLPMB3** y **DLPMB4**, mientras que las otras dos moléculas tomaron acomodos diferentes (**Figura 24**). Los dos primeros compuestos presentaron un puente de hidrógeno similar al de AKT1 con Lys160, además de Ala232 y Tyr231 con el grupo de benzoxazinona. El compuesto **DLPMB5** también interactuó con Lys160, además de Glu236.



Figura 24. Modelo 3D de las conformaciones adoptadas por los compuestos de la serie **DLPMB** con AKT2. Se muestran: **DLPMB3** en rojo, **DLPMB4** en azul, **DLPMB5** en morado y **DLPMB6** en verde.

A pesar de que el último compuesto de la serie no mostró estos puentes de hidrógeno, igualmente se observó menor exposición del ligando, lo que podría explicar su valor de energía de unión. En cuanto a **GSK690693**, se observaron varias interacciones, incluyendo a los residuos: Asn280, Asp293, Asp275, Thr197 y Thr313. El valor menos favorecido para este inhibidor podría relacionarse con la zona donde se acomoda este compuesto respecto a los compuestos de la serie **DLPMB** (**Figura 25**).⁸²

La tendencia observada con las isoformas descritas anteriormente se conservó con AKT3. Los compuestos **DLPMB3** y **DLPMB4** interactuaron con Glu234, Asp292 y Lys179. Mientras que **DLPMB5** sólo conservó las dos últimas interacciones; el último compuesto **DLPMB6** no presentó ninguna de las mencionadas, lo que explicaría la ligera disminución observada en la energía de unión. El inhibidor presentó interacciones con varios residuos, que incluyen: Asp274, Lys179, Thr291 y Asn279.

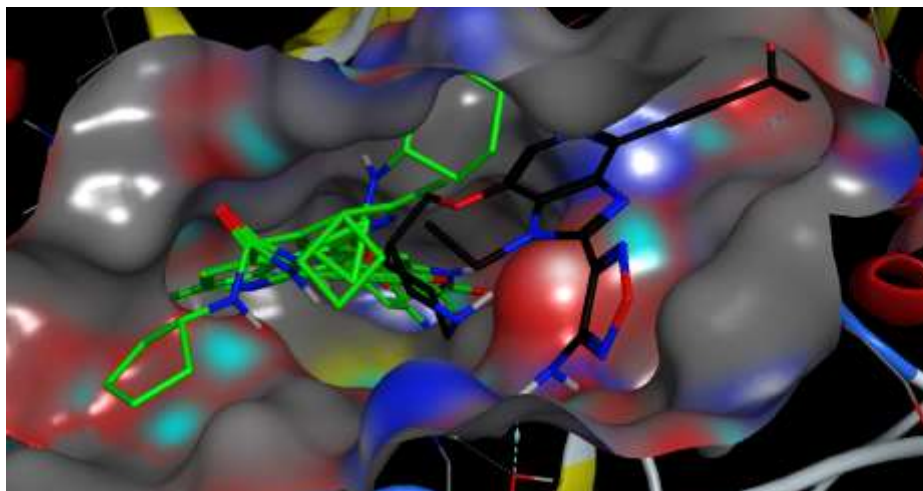


Figura 25. Superposición de los compuestos de la serie **DLPMB** y el inhibidor **GSK690693** (negro) en la cavidad de AKT2.

Respecto a los compuestos presentes en la serie **DLPMP**, la pose observada fue la misma para **DLPMP3** y **DLPMP4**, mientras que los otros dos compuestos presentaron una pose similar entre ellos. Esto explica la razón por la cual se observó una interacción entre los dos primeros ligandos y el residuo Asp439. En cambio, para los compuestos **DLPMP5** y **DLPMP6** no se predijo ningún puente de hidrógeno. Esto último podría explicar la ligera disminución en valor de energía de unión que se observó para el compuesto **DLPMP5**.

Por el contrario, en el caso de AKT2 las poses observadas para todos los compuestos de la serie **DLPMP** fueron muy similares. Esto podría explicar la interacción entre el grupo carbonilo de la amida en posición 4 del núcleo de piridina con Lys181, que se predijo para todos los compuestos. Los compuestos **DLPMP3** y **DLPMP4** presentaron también interacciones con los residuos Phe163 y Gly161. Lo anterior justificaría la razón por la cual aumentó el tamaño de los grupos en esta isoforma particular.

En el caso de AKT3, se observó que las poses adoptadas por los compuestos se predijeron en sitios distintos de la cavidad del receptor (**Figura 26**). Los compuestos **DLPMP3** y **DLPMP4** tuvieron modelos tridimensionales similares y una interacción con Asp274. El compuesto **DLPMP4** presentó puentes de hidrógeno también entre el grupo carbonilo y los residuos Gly294 y Leu295. En cambio, los compuestos **DLPMP5** y **DLPMP6** interactuaron con Asp439.

La distribución de los ligandos dentro de la superficie del blanco confirmó que los compuestos pertenecientes a esa serie están en desventaja, lo cual era esperado debido a que típicamente los inhibidores de cinasas son compuestos que ocupan mayor volumen. Esto sugiere que los compuestos evaluados podrían ser inespecíficos para las isoformas de AKT, lo que correlacionaría con la citotoxicidad observada con la línea celular sana COS-7.

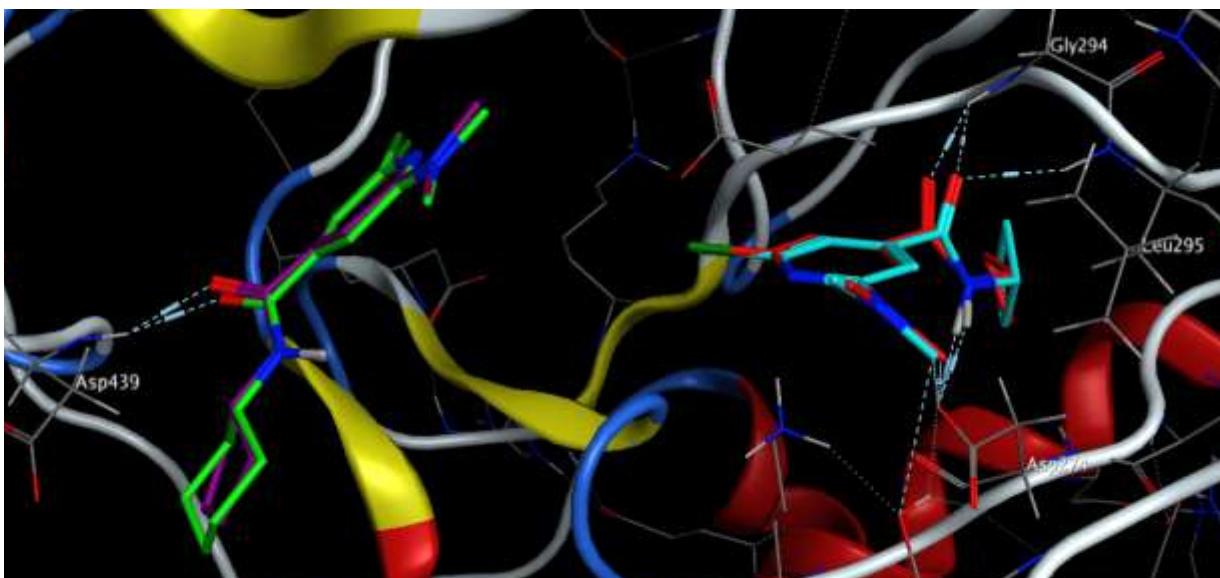


Figura 26. Modelo 3D de las conformaciones adoptadas por los compuestos de la serie **DLPMP** con AKT3. Se muestran: **DLPMP3** en rojo, **DLPMP4** en azul, **DLPMP5** en morado y **DLPMP6** en verde.

7.4.2 Acoplamiento molecular con Maestro

Los resultados de energía de unión calculados con el módulo Glide de Maestro para los compuestos sintetizados, además del inhibidor **GSK690693**, se muestran en la **Tabla 15**. Los valores observados difieren significativamente de los obtenidos con el software anterior, debido a las diferencias de algoritmos utilizados por cada uno de los programas. Nuevamente, los compuestos de la serie **DLPMB** presentaron valores más favorables de energía de unión respecto a los de la serie **DLPMP**.

Respecto a la serie **DLPMB**, se encontró que la isoforma AKT3 podría estar desfavorecida con respecto a las otras dos isoformas; los compuestos **DLPMB3** y **DLPMB4** mostraron una ligera mejora de energía de unión (valores más negativos) contra AKT2, mientras **DLPMB5** hacia AKT1. El último compuesto se presentó similar ante AKT1 y AKT2. Se observó una drástica disminución de la energía de unión para **DLPMB6** y la isoforma AKT3, lo que podría deberse a la exposición del ligando presente en el diagrama de interacciones (**Figura III-1**).

La interacción común observada para todos los compuestos de la serie con AKT1, correspondió al residuo Ala230 con el grupo carbonilo del sustituyente de tipo benzoxazinona. Adicionalmente, el compuesto **DLPMB3** tuvo una interacción de tipo π - π con Phe442. Los compuestos **DLPMB5** y **DLPMB6** también interaccionaron con Asp292, este residuo también se observó en el diagrama de interacciones de **GSK690693**. La observación anterior podría deberse a la diferencia de poses que se encontraron en el modelo 3D del acoplamiento molecular; esto es porque los compuestos **DLPMB5** y **DLPMB6** mostraron un acomodo muy similar, mientras los otros dos fueron diferentes (**Figura 27**).

Tabla 15. Valores de energía de unión encontrados con Glide de Maestro para los compuestos de las series DLPMB y DLPMP

Clave	AKT1	AKT2	AKT3
	$\Delta G_{\text{unión}}$ (Kcal/mol)	$\Delta G_{\text{unión}}$ (Kcal/mol)	$\Delta G_{\text{unión}}$ (Kcal/mol)
DLPMB3	-4.750	-5.657	-3.940
DLPMB4	-4.926	-5.685	-3.831
DLPMB5	-5.182	-4.711	-4.151
DLPMB6	-5.058	-5.084	-3.786
DLPMP3	-1.198	-3.606	-2.016
DLPMP4	-2.321	-3.539	-2.539
DLPMP5	-2.353	-4.236	-2.733
DLPMP6	-2.249	-4.421	-3.114
GSK690693	-3.068	-5.082	-2.817

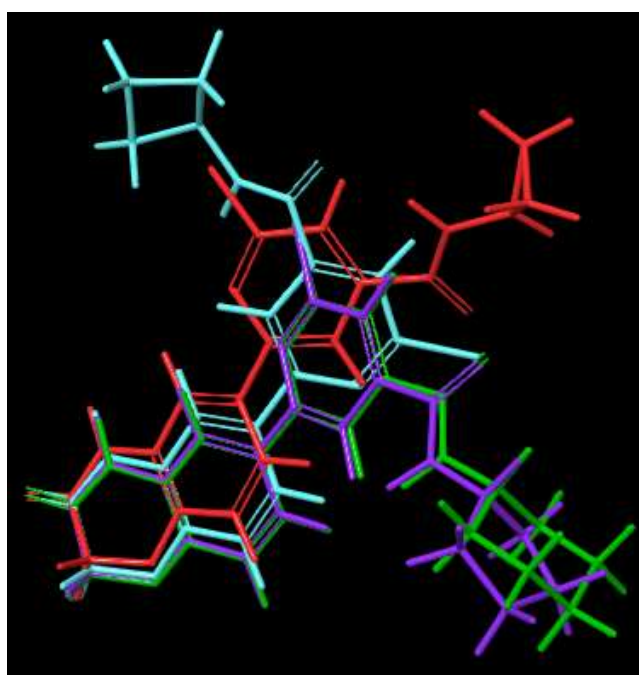


Figura 27. Modelo 3D de las conformaciones adoptadas por los compuestos de la serie DLPMB con AKT1. Se muestran: DLPMB3 en rojo, DLPMB4 en azul, DLPMB5 en morado y DLPMB6 en verde.

En cuanto a la isoforma AKT2, los compuestos **DLPMB3**, **DLPMB4** y **DLPMB6** interaccionaron con los residuos Thr292 y Ala232. Dichas interacciones se observaron con la benzoxazinona presente en los compuestos, lo que sugiere que, en estos no influye el sustituyente en posición 4 del núcleo de piridina. Por el contrario, el compuesto **DLPMB5** formó puentes de hidrógeno con Lys181 por parte del grupo carbonilo de la amida en posición 4 de la piridina; y otra con la benzoxazinona y Glu193. Esta última también se observó con el inhibidor **GSK690693**. La posible causa de la disminución de afinidad del compuesto **DLPMB5** podría ser el aumento en la exposición del ligando en el sitio catalítico.

Al observar el modelo tridimensional de las interacciones anteriores (**Figura 28**), puede decirse que el compuesto **DLPMB5** tiene un acomodo particular, que difiere significativamente del resto de los compuestos de la serie. Esto expondría la razón por la cual se detectó una interacción con un residuo no predicho para el resto de las moléculas. Además, este resultado hizo notar lo que se discutió anteriormente sobre la ocupación de la cavidad de AKT por parte del ligando. Esto referente a que, la predicción en distintas topologías hecha para ligandos similares sugiere la posibilidad de que los compuestos propuestos presenten baja selectividad frente a AKT respecto a otras cinasas.

Por otro lado, con AKT3, el residuo Glu234 interaccionó con el grupo -NH en posición 4 de la piridina en el caso de **DLPMB3** y **DLPMB4**. El sustituyente de tipo benzoxazinona se asoció con el residuo Lys179 con **DLPMB3** y **DLPMB5**; con Asn279 en el caso de **DLPMB4**; y con Val230 hablando de **DLPMB6**, además de una interacción π - π con Phe442. Nuevamente, las poses se distribuyeron de manera ligeramente diferente para dar origen a distintas interacciones. En la **Figura 29** puede observarse que el espacio que ocupan los ligandos dentro de la cavidad es relativamente pequeño, lo cual podría ser perjudicial para la actividad biológica estudiada.

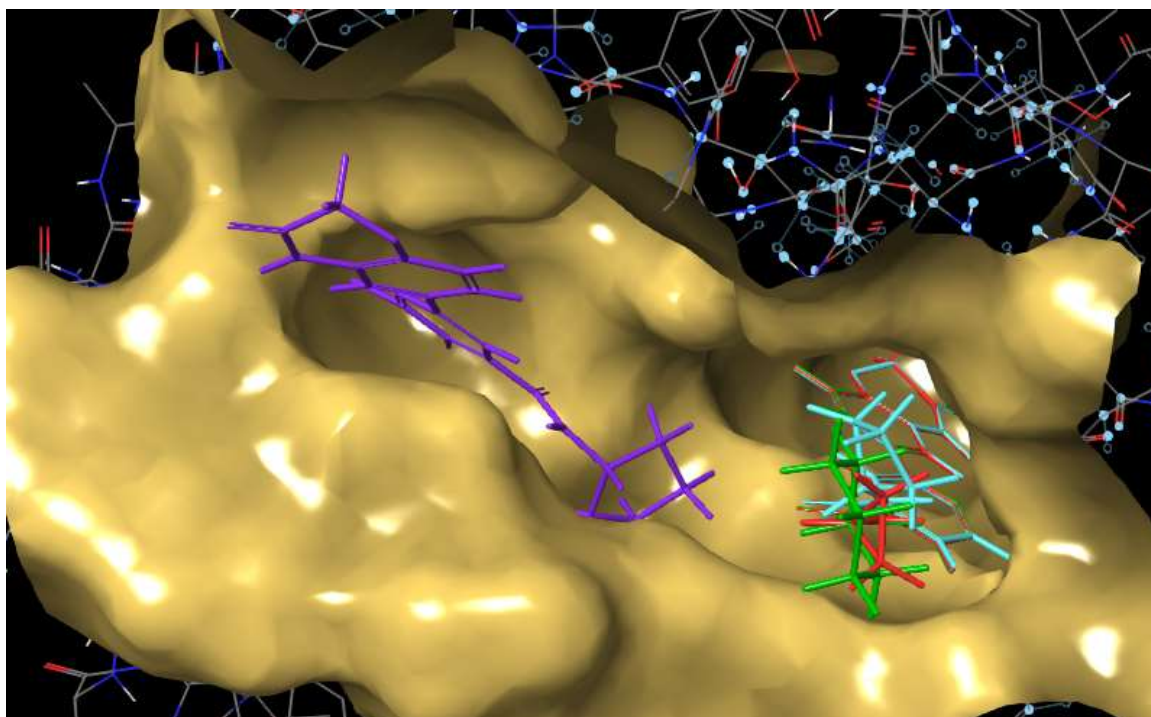


Figura 28. Modelo 3D de las conformaciones adoptadas por los compuestos de la serie **DLPMB** con AKT2. Se muestran: **DLPMB3** en rojo, **DLPMB4** en azul, **DLPMB5** en morado y **DLPMB6** en verde.

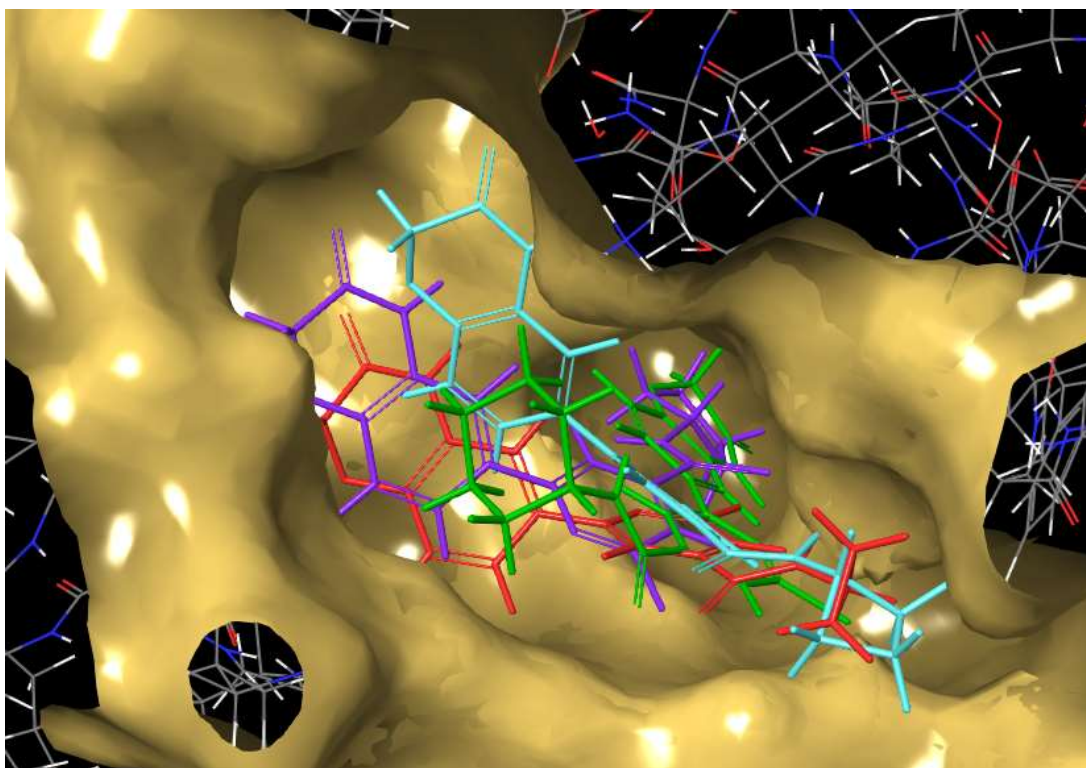


Figura 29. Modelo 3D de las conformaciones adoptadas por los compuestos de la serie **DLPMB** con AKT3. Se muestran: **DLPMB3** en rojo, **DLPMB4** en azul, **DLPMB5** en morado y **DLPMB6** en verde.

Hablando de la serie **DLPMP**, los valores obtenidos sugieren una posible selectividad frente a la isoforma AKT2, después frente a AKT3 y finalmente contra AKT1. AKT2 está relacionada con efectos adversos como hiperglucemia, mencionado en secciones anteriores, lo que podría poner en desventaja a estos compuestos. Además, no se observó una clara correlación entre la actividad biológica y los resultados encontrados en la **Tabla 15**.

Respecto a AKT1, los primeros dos compuestos de la serie también formaron un puente de hidrógeno con Asp292. El compuesto **DLPMP5** presentó una interacción de tipo π - π con Phe442. Como el compuesto **DLPMP6** no presentó alguna interacción de este tipo, es probable que aumentara ligeramente su energía de unión (menos favorable); no obstante, parece existir una relación directamente proporcional entre la energía más favorable y mayor tamaño del ciclo alifático como sustituyente. Las poses encontradas difieren significativamente entre los compuestos, sugiriendo que existirá menor probabilidad de que la unión sea selectiva a la cinasa blanco, debido a que el sitio de unión a ATP es altamente conservado.

Continuando con AKT2, se conservó la interacción predicha entre la amida en posición 4 de la piridina y el residuo Asp293, para los compuestos **DLPMP3** y **DLPMP4**. Sin embargo, ambos compuestos presentaron cierta preferencia por esta isoforma. La interacción se conservó en los otros dos compuestos, e igualmente la energía tiende a ser más favorable conforme aumenta el tamaño del ciclo. La predicción del modelo 3D coloca a todos los compuestos en un sitio cercano (**Figura 30**), sin embargo, los dos primeros mencionados son los que poseyeron las poses más similares entre sí.

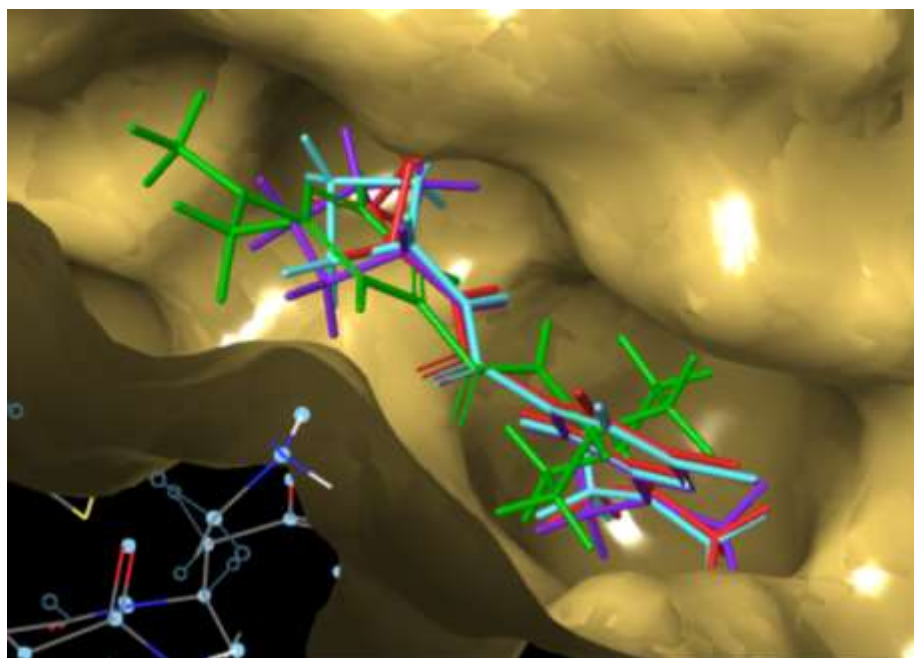


Figura 30. Modelo 3D de las conformaciones adoptadas por los compuestos de la serie **DLPMP** con AKT2. Se muestran: **DLPMP3** en rojo, **DLPMP4** en azul, **DLPMP5** en morado y **DLPMP6** en verde.

Finalmente, para AKT3 no se observaron interacciones de tipo puente de hidrógeno o π - π para los compuestos **DLPMP3** y **DLPMP4**. El compuesto **DLPMP5** presentó interacción de tipo π - π con Phe442, observada también con AKT1. En el último compuesto de la serie se observó esta misma interacción con el núcleo de piridina. En este caso, los acomodos tridimensionales variaron entre cada compuesto de la serie; sin embargo, las poses se encontraron distribuidas en un radio cercano (**Figura 31**).

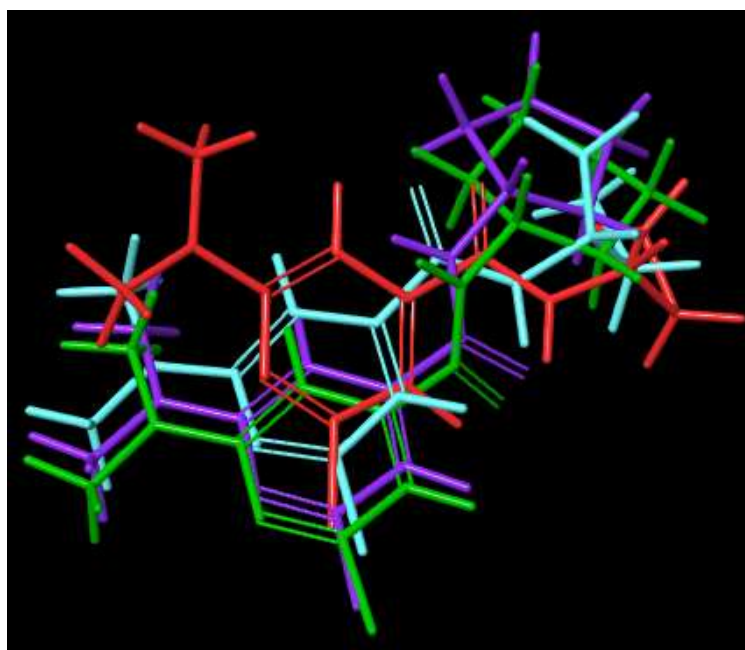


Figura 31. Modelo 3D de las conformaciones adoptadas por los compuestos de la serie **DLPMP** con AKT3. Se muestran: **DLPMP3** en rojo, **DLPMP4** en azul, **DLPMP5** en morado y **DLPMP6** en verde.

8. CONCLUSIONES

Se propuso un nuevo sustituyente de las piridinas trisustituidas, basándose en un método de búsqueda por similitud. El nuevo fragmento, derivado de pirimidina, se seleccionó con valores de acoplamiento molecular; además se sustituyó la posición 4 de la piridina con ciclos alifáticos y una amida como *linker*. Con esto se lograron diseñar nuevas piridinas 2,4,6-trisustituidas que presentaron una predicción de energía de unión comparable con la molécula encontrada por nuestro grupo mediante cribado virtual.

Los compuestos diseñados originalmente no se lograron sintetizar mediante la ruta propuesta con acoplamientos catalizados por paladio, debido a problemas experimentales encontrados para la formación del enlace carbono-carbono con el nuevo fragmento derivado de pirimidina. No obstante, se sintetizaron dos ésteres borónicos, y de las pruebas realizadas se obtuvieron los compuestos de la serie **DLPMP**.

De los experimentos realizados con los acoplamientos de Suzuki, se observó que la causa más probable que impide la obtención de los compuestos esperados es la deficiencia de la transmetalación. Se encontraron condiciones para la sustitución de sólo uno de los halógenos presentes en los intermediarios de piridina **AM3–AM6**, mediante acoplamientos de Suzuki con calentamiento convencional; de este monoacoplamiento se obtuvo la serie **DLPMB**.

Respecto al porcentaje de inhibición en líneas celulares, los resultados mostraron que la serie **DLPMB** tuvo mayor potencia que la serie **DLPMP**, lo que sugiere que el sustituyente de tipo benzoxazinona es importante para la actividad biológica de los compuestos. La mayoría de las moléculas evaluadas no presentó actividad frente a la línea **HCT-15**, de células cancerosas de colon. En cuanto a las líneas de cáncer de mama, los compuestos **DLPMB4–6** presentaron cierta inhibición contra **MCF-7**.

No obstante, todos los compuestos tuvieron algún grado de citotoxicidad con **MDA-MB-231**, por lo que podrían ser el punto de partida para mayor optimización de las piridinas trisustituidas. Todos los compuestos excepto **DLPMP3**, presentaron actividad frente a las dos líneas celulares cancerosas de próstata **PC-3** y **DU-145**, aunque en menor medida que contra la línea de cáncer de mama triple negativo. Ninguno de los compuestos presentó mayor potencia que el inhibidor **GSK690693**, excepto en el caso de la línea celular sana **COS-7**.

Las predicciones de acoplamiento molecular mostraron que se conservaron interacciones con Glu234/236/234 en el caso de **DLPMB6/DLPMB5/DLPMB3-4**. Los valores mostraron que los compuestos **DLPMB** tuvieron energías de unión más favorables, lo cual coincide con la tendencia observada en los resultados de porcentaje de inhibición del crecimiento celular. No obstante, las diferencias entre dichos valores de energía no fueron significativamente diferentes entre los compuestos sintetizados y el inhibidor **GSK690693**, lo cual no puede correlacionarse directamente con la actividad observada en las líneas celulares. Esto último resalta la necesidad de realizar ensayos de inhibición enzimática con las isoformas de AKT.

9. PERSPECTIVAS

- Proponer una nueva ruta de síntesis para la obtención de las piridinas 2,4,6-trisustituidas diseñadas como potenciales inhibidores de las isoformas de AKT.
- Optimizar los compuestos de la serie **DLPMB** para aumentar su potencia y selectividad.
- Realizar estudios de inhibición enzimática contra cada una de las isoformas de AKT, con las ocho piridinas obtenidas. Determinar la CI_{50} de los compuestos que presenten mejores resultados.
- Efectuar estudios de dinámica molecular de los compuestos sintetizados en este trabajo, con cada una de las isoformas de AKT y predecir la estabilidad de los complejos proteína-ligando.
- Realizar estudios de selectividad frente a diversas cinasas.

10. REFERENCIAS

1. Organización Mundial de la Salud. Cáncer. Disponible en: <https://www.who.int/cancer/es/> (Consultada el 05 de enero del 2020).
2. Avendaño, C.; Menéndez, J. C. General aspects of cancer chemotherapy. In *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*, 2nd ed.; Elsevier: Amsterdam, 2015; 1–22.
3. International Agency for Research on Cancer. Cancer Today. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map> (Consultada el 05 de enero de 2020).
4. Rollins, B. J.; Golub, T. R.; Polyak, K.; Stiles, C. D.; Andreeff, M.; Goodrich, D. W.; Pardee, A. B.; Fedi, P.; Kimmelman, A.; Aaronson, S. A.; *et al.* *Cancer medicine*, 5th ed.; B. C. Decker: Hamilton, Ontario, 2000.
5. Jankovic, R.; Brankovic-Magic, M.; Radulovic S. The past and the future of cancer genetics. *JBUON* **2004**, *9*(4), 347–354.
6. Organización Mundial de la Salud. Perfiles oncológicos de los países, 2014. Disponible en: https://www.who.int/cancer/country-profiles/mex_es.pdf?ua=1 (Consultada el 05 de enero del 2020).
7. Sánchez, C. Conociendo y Comprendiendo la Célula Cancerosa: Fisiopatología del Cáncer. *Rev. Med. Clin. Condes* **2013**, *24*(4), 553–562.
8. National Cancer Institute. Chemotherapy to Treat Cancer. Disponible en: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/chemotherapy> (Consultada el 07 de enero de 2020).
9. World Health Organization. Cancer treatment. Disponible en: <https://www.who.int/cancer/treatment/es/> (Consultada el 08 de enero de 2020).
10. Reynoso-Noverón, N.; Torres-Domínguez, J. A. Epidemiología del cáncer en México: carga global y proyecciones 2000-2020. *Rev. latinoam. med. conducta* **2018**, *8*(1), 9–15.
11. INEGI. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer (4 de febrero, 2018). Comunicado de prensa Núm. 61/18.
12. Urruticoechea, A.; Alemany, R.; Balart, J.; Villanueva, A.; Viñals, F.; Capellá, G. Recent advances in cancer therapy: an overview. *Curr. Pharm. Des.* **2010**, *16*(1), 3–10.
13. Galmarini, D.; Galmarini, C. M.; Galmarini, F. C. Cancer chemotherapy: A critical analysis of its 60 years of history. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2012**, *84*(2), 181–199.
14. DeVita, V. T.; Chu, E. A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res.* **2008**, *68*(21), 8643–8653.
15. DrugBank. Disponible en: <https://www.drugbank.ca/> (Consultada el 10 de enero de 2020).
16. Wang, Z.; Cole, P. A. Catalytic mechanisms and regulation of protein kinases. *Methods Enzymol.* **2014**, *548*, 1–21.
17. Avendaño, C.; Menéndez, J. C. Drugs that inhibit signaling pathways for tumor cell growth and proliferation. Kinase inhibitors. In *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs* 2nd ed.; Elsevier: Amsterdam, 2015; 391–491.

18. Wang, Q.; Zorn, J. A.; Kuriyan, J. A Structural Atlas of Kinases Inhibited by Clinically Approved Drugs. *Methods Enzymol.* **2014**, *548*, 23–67.
19. Leroux, A. E.; Schulze, J. O.; Biondi, R. M. AGC kinases, mechanisms of regulation and innovative drug development. *Semin. Cancer Biol.* **2018**, *48*, 1–17.
20. Wang, Q.; Chen, X.; Hay, N. Akt as a target for cancer therapy: More is not always better (lessons from studies in mice). *Br. J. Cancer* **2017**, *117*(2), 159–163.
21. Vijayan, R. S. K.; He, P.; Modi, V.; Duong-Ly, K. C.; Ma, H.; Peterson, J. R.; Dunbrack Jr, R. L.; Levy, R. M. Conformational analysis of the DFG-out kinase motif and biochemical profiling of structurally validated type II inhibitors. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*(1), 466–479.
22. Singh, U.; Chashoo, G.; Khan, S. U.; Mahajan, P.; Nargotra, A.; Mahajan, G.; Singh, A.; Sharma, A.; Minto, M. J.; Guru, S. K.; *et al.* Design of Novel 3-Pyrimidinylazaindole CDK2/9 Inhibitors with Potent in Vitro and in Vivo Antitumor Efficacy in a Triple-Negative Breast Cancer Model. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*(23), 9470–9489.
23. Wu, P.; Nielsen, T. E.; Clausen, M. H. Small-molecule kinase inhibitors: An analysis of FDA-approved drugs. *Drug Discov. Today* **2016**, *21*(1), 5–10.
24. Prêtre, V.; Wicki, A. Inhibition of Akt and other AGC kinases: A target for clinical cancer therapy? *Semin. Cancer Biol.* **2018**, *48*, 70–77.
25. Zhao, Z.; Bourne, P. E. Progress with covalent small-molecule kinase inhibitors. *Drug Discov. Today* **2018**, *23*(3), 727–735.
26. Muñoz-Pinedo, C.; El Mjiyad, N.; Ricci, J. E. Cancer metabolism: Current perspectives and future directions. *Cell Death Dis.* **2012**, *3*(1), 1–10.
27. Yang, D.; Tong, D.; Zhang, Q.; Wang, Y.; Sun, J.; Zhang, F.; Zhao, G. Design, synthesis, and evaluation of novel Akt1 inhibitors based on an indole scaffold. *Chem. Biol. Drug Des.* **2017**, *90*(5), 791–803.
28. Hoxhaj, G.; Manning, B. D. The PI3K–AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. *Nat. Rev. Cancer* **2020**, *20*(2), 74–88.
29. Manning, B. D.; Toker, A. AKT/PKB signaling: navigating the network. *Cell* **2017**, *169*(3), 381–405.
30. Yu, J. S. L.; Cui, W. Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/ mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination. *Development* **2016**, *143*(17), 3050–3060.
31. Mayer, I. A.; Arteaga, C. L. The PI3K/AKT Pathway as a Target for Cancer Treatment. *Annu Rev Med.* **2016**, *67*, 11–28.
32. Polivka Jr, J.; Janku, F. Molecular targets for cancer therapy in the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Pharmacol. Ther.* **2014**, *142*(2), 164–175.
33. Zhu, J.; Wang, M.; Cao, B.; Hou, T.; Mao, X. Targeting the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway for the treatment of multiple myeloma. *Curr. Med. Chem.* **2014**, *21*(27), 3173–3187.
34. Kumar, C. C.; Madison, V. AKT crystal structure and AKT-specific inhibitors. *Oncogene* **2005**,

- 24(50), 7493–7501.
35. Alzahrani, A. S. PI3K/Akt/mTOR inhibitors in cancer: At the bench and bedside. *Semin. Cancer Biol.* **2019**, *59*, 125–132.
 36. Hoxhaj, G.; Manning, B. D. The PI3K–AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. *Nat. Rev. Cancer* **2020**, *20*(2), 74–88.
 37. Robey, R. B.; Hay, N. Is Akt the ‘Warburg kinase’?–Akt-energy metabolism interactions and oncogenesis. *Semin. Cancer Biol.* **2009**, *19*(1), 25–31.
 38. Han, F.; Li, C. F.; Cai, Z.; Zhang, X.; Jin, G.; Zhang, W. N.; Xu, C.; Wang, C. Y.; Morrow, J.; Zhang, S.; *et al.* The critical role of AMPK in driving Akt activation under stress, tumorigenesis and drug resistance. *Nat. Commun.* **2018**, *9*(1), 1–16.
 39. Sun, M.; Wang, G.; Paciga, J. E.; Feldman, R. I.; Yuan, Z. Q.; Ma, X. L.; Shelley, S. A.; Jove, R.; Tschlis, P. N.; Nicosia, S. V.; *et al.* AKT1/PKB α Kinase Is Frequently Elevated in Human Cancers and Its Constitutive Activation Is Required for Oncogenic Transformation in NIH3T3 Cells. *Am J Pathol.* **2001**, *159*(2), 431–437.
 40. Gonzalez, E.; McGraw, T. E. The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell Cycle.* **2009**, *8*(16), 2502–2508.
 41. van der Noord, V. E.; McLaughlin, R. P.; Smid, M.; Foekens, J. A.; Martens, J. W. M.; Zhang, Y.; van de Water, B. An increased cell cycle gene network determines MEK and Akt inhibitor double resistance in triple-negative breast cancer. *Sci. Rep.* **2019**, *9*(1), 1–12.
 42. National Cancer Institute. Diccionario de cáncer. Definición de línea celular de cultivo. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/linea-celular-de-cultivo> (Consultada el 05 de mayo del 2020).
 43. Zhang, M.; Fang, X.; Liu, H.; Wang, S.; Yang, D. Blockade of AKT activation in prostate cancer cells with a small molecule inhibitor, 9-chloro-2-methylellipticinium acetate (CMEP). *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *73*(1), 15–24.
 44. Lin, H. P.; Lin, C. Y.; Huo, C.; Jan, Y. J.; Tseng, J. C.; Jiang, S. S.; Kuo, Y. Y.; Chen, S. C.; Wang, C. T.; Chan, T. M.; *et al.* AKT3 promotes prostate cancer proliferation cells through regulation of Akt, B-Raf, and TSC1/TSC2. *Oncotarget.* **2015**, *6*(29), 27097–27112.
 45. Umesalma, S.; Nagendraprabhu, P.; Sudhandiran, G. Ellagic acid inhibits proliferation and induced apoptosis via the Akt signaling pathway in HCT-15 colon adenocarcinoma cells. *Mol. Cell Biochem.* **2015**, *399*(1–2), 303–313.
 46. Liu, X.; Shi, Y.; Han, E. K.; Chen, Z.; Rosenberg, S. H.; Giranda, V. L.; Luo, Y.; Ng, S. C. Downregulation of Akt1 inhibits anchorage-independent cell growth and induces apoptosis in cancer cells. *Neoplasia.* **2001**, *3*(4), 278–286.
 47. Jordan, N. J.; Gee, J. M. W.; Barrow, D.; Wakeling, A. E.; Nicholson, R. I. Increased constitutive activity of PKB/Akt in tamoxifen resistant breast cancer MCF-7 cells. *Breast Cancer Res. Treat.* **2004**, *87*(2), 167–180.
 48. Grottke, A.; Ewald, F.; Lange, T.; Nörz, D.; Herzberger, C.; Bach, J.; Grabinski, N.; Gräser, L.; Höppner, F.; Nashan, B.; *et al.* Downregulation of AKT3 Increases Migration and Metastasis in Triple Negative Breast Cancer Cells by Upregulating S100A4. *PLoS One.* **2016**, *11*(1), 1–16.

49. Yi, Y. W.; Hong, W.; Kang, H. J.; Kim, H. J.; Zhao, W.; Wang, A.; Seong, Y. S.; Bae, I. Inhibition of the PI3K/AKT pathway potentiates cytotoxicity of EGFR kinase inhibitors in triple-negative breast cancer cells. *J. Cell Mol. Med.* **2013**, *17*(5), 648–656.
50. Wu, Z.; Robinson, R. G.; Fu, S.; Barnett, S. F.; Defeo-Jones, D.; Jones, R. E.; Kral, A. M.; Huber, H. E.; Kohl, N. E.; Hartman, G. D.; *et al.* Rapid assembly of diverse and potent allosteric Akt inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*(6), 2211–2214.
51. Brown, J. S.; Banerji, U. Maximising the potential of AKT inhibitors as anti-cancer treatments. *Pharmacol. Ther.* **2017**, *172*, 101–115.
52. Mattmann, M. E.; Stoops, S. L.; Lindsley, C. W. Inhibition of Akt with small molecules and biologics: historical perspective and current status of the patent landscape. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2011**, *21*(9), 1309–1338.
53. Bilodeau, M. T.; Balitza, A. E.; Hoffman, J. M.; Manley, P. J.; Barnett, S. F.; Defeo-Jones, D.; Haskell, K.; Jones, R. E.; Leander, K.; Robinson, R. G.; *et al.* Allosteric inhibitors of Akt1 and Akt2: A naphthyridinone with efficacy in an A2780 tumor xenograft model. **2008**, *18*(11), 3178–3182.
54. ChEMBL Database. Disponible en: <https://www.ebi.ac.uk/chembl/> (Consultada el 15 de junio del 2020).
55. Parthasarathy, S.; Henry, K.; Pei, H.; Clayton, J.; Rempala, M.; Johns, D.; De Frutos, O.; Garcia, P.; Mateos, C.; Pleite, S.; *et al.* Discovery of chiral dihydropyridopyrimidinones as potent, selective and orally bioavailable inhibitors of AKT. *Bioorg Med. Chem. Lett.* **2018**, *28*(10), 1887–1891.
56. Lin, J.; Sampath, D.; Nannini, M. A.; Lee, B. B.; Degtyarev, M.; Oeh, J.; Savage, H.; Guan, Z.; Hong, R.; Kassees, R.; *et al.* Targeting activated Akt with GDC-0068, a novel selective Akt inhibitor that is efficacious in multiple tumor models. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*(7), 1760–1772.
57. Kallan, N. C.; Spencer, K. L.; Blake, J. F.; Xu, R.; Heizer, J.; Bencsik, J. R.; Mitchell, I. S.; Gloor, S. L.; Martinson, M.; Risom, T.; *et al.* Discovery and SAR of spirochromane Akt inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*(8), 2410–2414.
58. Woods, K. W.; Fischer, J. P.; Claiborne, A.; Li, T.; Thomas, S. A.; Zhu, G. D.; Diebold, R. B.; Liu, X.; Shi, Y.; Klinghofer, V.; *et al.* Synthesis and SAR of indazole-pyridine based protein kinase B/ Akt inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*(20), 6832–6846.
59. Nitulescu, G. M.; Margina, D.; Juzenas, P.; Peng, Q.; Olaru, O. T.; Saloustros, E.; Fenga, C.; Spandidos, D. A.; Libra, M.; Tsatsakis, A. M. Akt inhibitors in cancer treatment: The long journey from drug discovery to clinical use (Review). *Int. J. Oncol.* **2016**, *48*(3), 869–885.
60. Addie, M.; Ballard, P.; Buttar, D.; Crafter, C.; Currie, G.; Davies, B. R.; Debreczeni, J.; Dry, H.; Dudley, P.; Greenwood, R.; *et al.* Discovery of 4-Amino-N-[(1S)-1-(4-chlorophenyl)-3-hydroxypropyl]-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidine-4-carboxamide (AZD5363), an orally bioavailable, potent inhibitor of Akt kinases. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*(5), 2056–2073.
61. Rouse, M. B.; Seefeld, M. A.; Leber, J. D.; McNulty, K. C.; Sun, L.; Miller, W. H.; Zhang, S.; Minthorn, E. A.; Concha, N. O.; Choudhry, A. E.; *et al.* Aminofurazans as potent inhibitors of AKT kinase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*(5), 1508–1511.
62. Altıntop, M. D.; Sever, B.; Akalın Çiftçi, G.; Özdemir, A. Design, Synthesis, and Evaluation of a

- New Series of Thiazole-Based Anticancer Agents as Potent Akt Inhibitors. *Molecules*. **2018**, *23*(6), 1-17.
63. Huck, B. R.; Mochalkin, I. Recent progress towards clinically relevant ATP-competitive Akt inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*(13), 2838–2848.
64. Liu, Y.; Yin, Y.; Zhang, Z.; Li, C. J.; Zhang, H.; Zhang, D.; Jiang, C.; Nomie, K.; Zhang, L.; Wang, M. L.; *et al.* Structural optimization elaborates novel potent Akt inhibitors with promising anticancer activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *138*, 543–551.
65. Sanabria-Chanaga, E. E. Diseño, síntesis y evaluación biológica de nuevas piridinas 2,4,6-trisustituidas como inhibidores de la AKT cinasa. Tesis de doctorado, Facultad de Química, UNAM, CDMX, 2019.
66. Yang, J.; Cron, P.; Good, V. M.; Thompson, V.; Hemmings, B. A.; Barford, D. Crystal structure of an activated Akt/protein kinase B ternary complex with GSK3-peptide and AMP-PNP. *Nat. Struct. Biol.* **2002**, *9*(12), 940–944.
67. Lounnas, V.; Ritschel, T.; Kelder, J.; McGuire, R.; Bywater, R. P.; Foloppe, N. Current progress in Structure-Based Rational Drug Design marks a new mindset in drug discovery. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2013**, *5*, 1–14.
68. Kumar, A.; Jha, A. Drug Development Strategies. In *Anticandidal Agents*; Academic Press: Cambridge, MA, 2017; 63–71.
69. Jamkhande, P. G.; Ghante, M. H.; Ajgunde, B. R. Software based approaches for drug designing and development: A systematic review on commonly used software and its applications. *Bull. Fac. Pharmacy, Cairo Univ.* **2017**, *55*(2), 203–210.
70. Leelananda, S. P.; Lindert, S. Computational Methods in Drug Discovery. *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, *12*, 2694–2718.
71. Osakwe, O. The Significance of Discovery Screening and Structure Optimization Studies. In *Social Aspects of Drug Discovery, Development and Commercialization*; Academic Press: San Diego, CA, 2016; 109–128.
72. Alqahtani, S. In silico ADME-Tox modeling: progress and prospects. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2017**, *13*(11), 1147–1158.
73. Prieto-Martínez, F. D.; Arciniega, M.; Medina-Franco, J. L. Acoplamiento Molecular: Avances Recientes y Retos. *TIP Rev. Espec. en Cienc. Quim. Biol.* **2018**, *21*(S1), 65–87.
74. Marshall, G. R.; Taylor, C. M. Introduction to computer-assisted drug design - overview and perspective for the future. *Compr. Med. Chem. II* **2006**, *4*, 13–41.
75. Sethi, A.; Joshi, K.; Sasikala, K.; Alvala, M. Molecular Docking in Modern Drug Discovery: Principles and Recent Applications. In *Drug Discovery and Development - New Advances*; Gaitonde, V., Karmakar, P., Trivedi, A., Eds.; IntechOpen: USA, 2020; 21–42.
76. Berry, M.; Fielding, B.; Gamielien, J. Practical Considerations in Virtual Screening and Molecular Docking. In *Emerging Trends in Computational Biology, Bioinformatic and Systems Biology*; Elsevier: Waltham, MA, 2015; 487–502.
77. Hansch, C.; Sammes, P. G.; Taylor, J. B. *Comprehensive Medicinal Chemistry: The Rational*

- Design, Mechanistic Study & Therapeutic Application of Chemical Compounds*, 1st ed.; Pergamon Press: Oxford, 1990.
78. Yan, X.; Liao, C.; Liu, Z.; Hagler, A. T.; Gu, Q.; Xu, J. Chemical Structure Similarity Search for Ligand-based Virtual Screening: Methods and Computational Resources. *Curr. Drug Targets*. **2016**, *17*(14), 1580–1585.
 79. Medina-Franco J. L.; Giulianotti, M. A.; Yu, Y.; Shen, L.; Yao, L.; Singh N. Discovery of a novel protein kinase B inhibitor by structure-based virtual screening. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*(16) 4634–4638.
 80. Hernández- Campos, A.; Velázquez-Martínez, I.; Castillo, R.; López-Vallejo, F.; Jia, P.; Yu, Y.; Giulianotti, M. A.; Medina-Franco, J. L. Docking of protein kinase B inhibitors: implications in the structure-based optimization of a novel scaffold. *Chem. Biol. Drug Des.* **2010**, *76*(3), 269–276.
 81. Trejo-Soto, P. J.; Hernández-Campos, A.; Romo-Mancillas, A.; Medina-Franco, J. L.; Castillo, R. In search of AKT kinase inhibitors as anticancer agents: structure-based design, docking, and molecular dynamics studies of 2,4,6-trisubstituted pyridines. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2018**, *36*(2), 423–442.
 82. Victoria Miguel, J. Síntesis y evaluación anticancerígena de piridinas 2,4,6-trisustituidas diseñadas como inhibidores de la serina-treonina cinasa B (AKT). Tesis de maestría, Facultad de Química, UNAM, CDMX, 2019.
 83. Trejo Soto, P. J. Estudios computacionales y síntesis de piridinas 2,4,6-trisustituidas inhibidores de AKT cinasas para el tratamiento del cáncer. Tesis de doctorado, Facultad de Química, UNAM, CDMX, 2018.
 84. Prado Romero, D. L. Diseño de piridinas 2,4,6-trisustituidas como anticancerígenos inhibidores de la AKT cinasa y estudio sobre su síntesis. Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM, CDMX, 2018.
 85. Kürti, L.; Czakó, B. *Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis*; Elsevier Academic Press: Burlington, MA, 2005.
 86. Zoete, V.; Daina, A.; Bovigny, C.; Michielin, O. SwissSimilarity: A Web Tool for Low to Ultra High Throughput Ligand-Based Virtual Screening. *J. Chem. Inf. Model.* **2016**, *56*(8), 1399–1404.
 87. Spartan'10, version 1.1.0. Wavefunction, Inc. Irvine, C. 2010. Spartan.
 88. Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*(16), 2785–2791.
 89. Gfeller, D.; Michielin, O.; Zoete, V. Shaping the interaction landscape of bioactive molecules. *Bioinformatics.* **2013**, *29*(23), 3073–3079.
 90. Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V. SwissADME : a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–13.
 91. Addie, M.; Ballard, P.; Buttar, D.; Crafter, C.; Currie, G.; Davies, B. R.; Debreczeni, J.; Dry, H.; Dudley, P.; Greenwood, R.; *et al.* Discovery of 4-amino-N-[(1S)-1-(4-chlorophenyl)-3-hydroxypropyl]-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidine-4-carboxamide (AZD5363), an orally bioavailable, potent inhibitor of Akt kinases. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*(5), 2059–2073.
 92. Schrödinger Release 2019-4: Glide, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2019. Maestro.

93. Talele, T. T. The 'Cyclopropyl Fragment' is a Versatile Player that Frequently Appears in Preclinical/Clinical Drug Molecules. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*(19), 8712–8756.
94. Tanemura, K.; Suzuki, T.; Nishida, Y.; Satsumabayashi, K.; Horaguchi, T. A mild and efficient procedure for α -bromination of ketones using N-bromosuccinimide catalysed by ammonium acetate. *Chem. Commun.* **2004**, *4*, 470–471.
95. Das, B.; Venkateswarlu, K.; Majhi, A.; Siddaiah, V.; Reddy, K. R. A facile nuclear bromination of phenols and anilines using NBS in the presence of ammonium acetate as a catalyst. *J. Mol. Catal. A Chem.* **2007**, *267*(1-2), 30–33.
96. Oliveira, R. A.; Silva, R. O.; Molander, G. A.; Menezes, P. H. (1)H, (13)C, (19)F and (11)B NMR spectral reference data of some potassium organotrifluoroborates. *Magn. Reson. Chem.* **2009**, *47*(10), 873–878.
97. Molander, G. A.; Ito, T. Cross-coupling reactions of potassium alkyltrifluoroborates with aryl and 1-alkenyl trifluoromethanesulfonates. *Org. Lett.* **2001**, *3*(3), 393–396.
98. Barder, T. E.; Buchwald, S. L. Efficient catalyst for the Suzuki-Miyaura coupling of potassium aryl trifluoroborates with aryl chlorides. *Org. Lett.* **2004**, *6*(16), 2649–2652.
99. Vichai, V.; Kirtikara, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*(3), 1112–1116.
100. Zhang, H.; Xu, H. L.; Wang, Y. C.; Lu, Z. Y.; Yu, X. F.; Sui, D. Y. 20(S)-Protopanaxadiol-Induced Apoptosis in MCF-7 Breast Cancer Cell Line through the Inhibition of PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*(4), 1–12.
101. Rabi, T.; Huwiler, A.; Zangemeister-Wittke, U. AMR-Me inhibits PI3K/Akt signaling in hormone-dependent MCF-7 breast cancer cells and inactivates NF- κ B in hormone-independent MDA-MB-231 cells. *Mol. Carcinog.* **2014**, *53*(7), 578–588.

11. ANEXO I. SECCIÓN EXPERIMENTAL**11.1 Instrumentación y materiales**

Los reactivos y disolventes utilizados corresponden a las casas J.T. Baker®, Sigma Aldrich® y Merck®. Estos materiales se utilizaron directamente de los recipientes contenedores y no se sometieron a procesos adicionales de purificación a menos que se indique lo contrario.

La masa de las sustancias se determinó en una balanza analítica Sartorius® A210P o bien en una balanza granataria Scientech® SL600.

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

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

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

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear se realizaron en espectrómetros Varian® modelo VNMRS o MR de 9.4 T equipados con una sonda Broad Band Switchable de dos canales de radiofrecuencia ($^1\text{H}/^{19}\text{F}$) ($^{31}\text{P}/^{15}\text{N}$) o una sonda de Detección Indirecta de dos canales de radiofrecuencia (^1H) ($^{31}\text{P}/^{15}\text{N}$), respectivamente. Los desplazamientos químicos (δ) se reportan en ppm, las constantes de acoplamiento J se reportan en Hertz. Los disolventes deuterados empleados fueron dimetilsulfóxido, cloroformo, acetona y agua. La simbología empleada es: s=señal simple, d=señal doble, m= señal múltiple, dd= señal doble de dobles, $-\text{D}_2\text{O}$ = desaparece por intercambio con agua deuterada.

Los espectros de IR se determinaron en un espectrofotómetro de transformada de Fourier marca y modelo Perkin Elmer® FT-IR 1600, equipado con un accesorio universal de ATR, las frecuencias de las bandas resultantes se representan en cm^{-1} , la resolución del equipo es 4 cm^{-1} .

La espectrometría de masas se realizó en un equipo Perkin Elmer AxION® 2 TOF acoplado a un módulo AxION® DSA mediante la técnica de ionización APCI, con temperatura de corona de 280°C y $3 \mu\text{A}$ usando como gas secante N_2 a 4 L/min en una ventana espectral de $50\text{--}3000 \text{ u}$. En lo que respecta a la técnica IE, se utilizó un cromatógrafo de gases Perkin Elmer Clarus 680 con columna de 30 m y fase DB5 acoplado a un espectrómetro de masas Perkin Elmer Clarus SQ 8 C con 200°C y 70 eV en la cámara de ionización, con una ventana espectral de $33\text{--}500 \text{ u}$.

Las cromatografías en capa fina (CCF) para el monitoreo de reacciones se hicieron en placas cromatográficas de gel de sílice 60 Merck® GF-254. La visualización de los compuestos se realizó con una lámpara UVP® UVGL-25 Mineralight®.

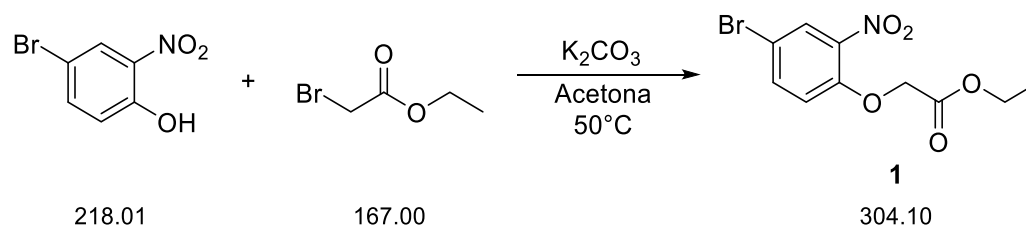
Las cromatografías en columna se llevaron a cabo usando como fase estacionaria gel de sílice 60Å Sigma Aldrich con una distribución de tamaño de partícula de 63-200 µm (malla 70–230). Los sistemas de elución utilizados se muestran en la **Tabla I-1**.

Tabla I-1. Sistemas cromatográficos utilizados

Sistema	Disolventes	Proporción
I	Hex/AcOEt	60:40
II	Hex/AcOEt	70:30
III	Hex/AcOEt	80:20
IV	AcOEt/Hex	60:40
V	AcOEt/Hex	70:30
VI	CHCl ₃ /MeOH	99.5/0.5

11.2 Técnicas para la síntesis de los compuestos

11.2.1 (4-Bromo-2-nitrofenoxi)acetato de etilo (1)



En un matraz bola de 25 mL, equipado con agitador magnético, atmósfera de nitrógeno y condensador en posición de reflujo, se mezclaron 5.00 g (22.93 mmol) de 4-bromo-2-nitrofenol y 4.80 g (34.73 mmol, 1.5 eq) de K₂CO₃ en 10 mL de acetona. Posteriormente se adicionaron lentamente 4 mL (34.50 mmol, 1.5 eq) de α-bromoacetato de etilo. La mezcla se calentó a 50 °C durante dos horas. La ausencia de la materia prima se comprobó mediante análisis por ccf, se adicionó agua fría y se eliminó el disolvente a presión reducida. El sólido resultante se separó mediante filtración al vacío, se lavó con agua helada y se dejó secar. Se recuperaron 6.73 g (rendimiento 96.3%) de un sólido amarillo correspondiente al compuesto **1**, el cual presentó un *R_f* de 0.35 (**Sistema I**) y un *pf* de 68.8–69.0 °C.

RMN ¹H ((CD₃)₂CO-*d*₆, 400 MHz, δ ppm): 1.24 (t, 3H, *J*= 7.1Hz), 4.21 (c, 2H, *J*= 7.1Hz), 4.98 (s, 2H), 7.29 (d, 1H, *J*= 9Hz), 7.77 (dd, 1H, *J*= 9, 2.5Hz), 8.04 (d, 1H, *J*= 2.5Hz)

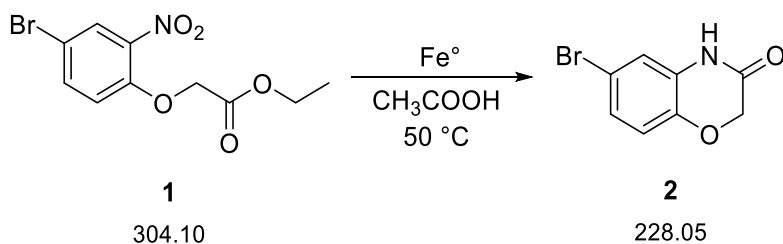
RMN ¹³C ((CD₃)₂CO-*d*₆, 100 MHz, δ ppm): 14.44, 61.99, 66.84, 113.03, 118.27, 128.39, 137.27, 151.17, 168.37

IR (FTIR por reflectancia ATR, cm⁻¹): 2994.80 (ν_{Ar-H}), 1747.67 (ν_{C=O} éster), 1520.25 (ν_{C-NO₂}), 1345.28 (ν_{C-NO₂}), 1204.41 (ν_{ArC-O-C})

EM (IE, [M⁺], *m/z*): 302.902 (teórico [M⁺]: 302.974)

Anexo II – **Espectros 1, 2, 3 y 4**

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



En un vaso de precipitados de 250 mL, equipado con agitación mecánica, se mezclaron 22.89 g (75.27 mmol) de (4-bromo-2-nitrofenoxi)acetato de etilo (**1**), 46.20 g (82.73 mmol, 1.1 eq) de Fe^0 y 110 mL de ácido acético glacial. Se inició la agitación de la mezcla y se calentó a una temperatura de 50 °C durante 3 horas. Una vez terminada la reacción se eliminó el ácido acético a presión reducida, el sólido resultante se suspendió con acetato de etilo y se filtró al vacío, realizando varios lavados. Se eliminó el disolvente del filtrado y se adicionó agua helada hasta observar la formación de un precipitado. El sólido obtenido se separó mediante filtración al vacío y se dejó secar. Se obtuvieron 15.90 g (rendimiento 92.6%) de un sólido beige correspondiente al producto **2**, el cual presentó un *Rf* de 0.29 (**Sistema I**), y un *pf* de 223.4–223.9 °C.

RMN ^1H ((CD_3) $_2\text{CO}-d_6$, 400 MHz, δ ppm): 4.59 (s, 2H), 6.90 (d, 1H, $J = 8.5\text{Hz}$), 7.09 (dd, 1H, $J = 8.5, 2.3\text{Hz}$), 7.15 (d, 1H, $J = 2.3\text{Hz}$), 9.74 (s, 1H, $-D_2O$)

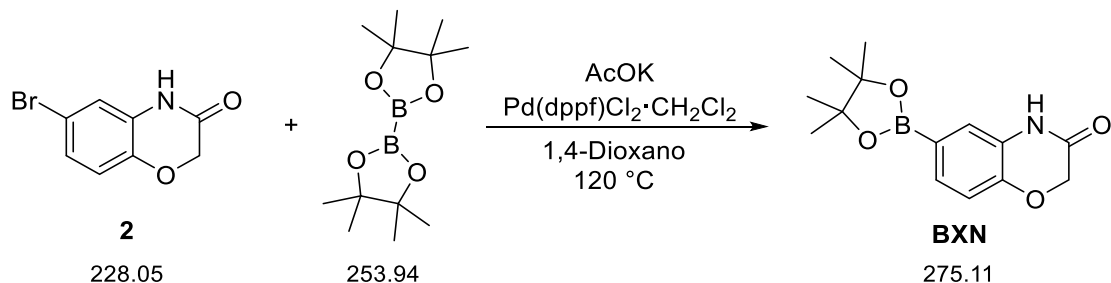
RMN ^{13}C ((CD_3) $_2\text{CO}-d_6$, 100 MHz, δ ppm): 67.83, 114.63, 118.97, 119.19, 126.55, 165.24

IR (FTIR por reflectancia ATR, cm^{-1}) 3340.01 ($\nu_{\text{N-H}}$), 2960.22 ($\nu_{\text{Ar-H}}$), 1677.37 ($\nu_{\text{C=O}}$ amida), 1597.36 ($\nu_{\text{Ar-N}}$), 1216.63 ($\nu_{\text{Ar-C-O-C}}$)

EM (IE, [M^+], m/z): 226.935 (teórico [M^+]: 226.958)

Anexo II – **Espectros 5, 6, 7 y 8.**

11.2.3 6-(4,4,5,5)-Tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona (BXN)



En un matraz de 50 mL, equipado con agitador magnético, condensador en posición de reflujo y atmósfera de nitrógeno se colocaron 4.0 g (17.54 mmol) de 6-bromo-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)ona (**2**), 4.9 g (19.30 mmol, 1.1 eq) de diborobis(pinacolato) (B_2Pin_2), 5.16 g (52.58 mmol, 3 eq) de acetato de potasio y 0.716 g (5% mol) de [1,1'-bis(difenilfosfina)ferroceno]dicloropaladio (II) en complejo con

diclorometano. Se añadieron 30 mL de 1,4-dioxano, se inició la agitación y el calentamiento a reflujo por 5 horas. Al término de la reacción, la mezcla se filtró a través de celita y AcOEt como fase móvil. El disolvente se concentró a presión reducida, obteniéndose un sólido que se purificó por columna flash usando como fase móvil Hexano/AcOEt 60:40. Las fracciones colectadas se concentraron a presión reducida hasta obtener 3.47 g (rendimiento 71.9%) de un sólido blanco correspondiente al producto **BXN**, que presentó un *Rf* de 0.41 (**Sistema I**) y un *pf* de 189.4–190.8 °C.

RMN ¹H ((CD₃)₂CO-*d*₆, 400 MHz, δ ppm): 1.28 (s, 12H), 4.60 (s, 2H), 6.91 (d, 1H, *J*= 8Hz), 7.22 (s, 1H), 7.39 (d, 1H, *J*= 8Hz), 9.05 (s, 1H, -D₂O)

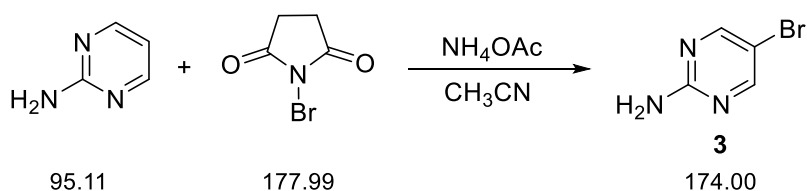
RMN ¹³C ((CD₃)₂CO-*d*₆, 100 MHz, δ ppm): 25.16, 67.90, 84.51, 116.71, 122.88, 127.78, 131.08, 147.28, 165.17

IR (FTIR por reflectancia ATR, cm⁻¹): 3360.17 (ν_{N-H}), 3043.47 (ν_{Ar-H}), 2979.22 (ν_{Me}), 1690.49 (ν_{C=O} amida), 1488.68 (ν_{Me}), 1349.45 (ν_{B-O}), 1210.73 (ν_{ArC-O-C}), 1125.39 (ν_{CH₂-O})

EM (APCI, [M+H]⁺, *m/z*): 276.1400 (teórico [M+H]⁺: 276.1402)

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

11.2.4 5-Bromopirimidin-2-amina (**3**)



En un matraz de 500 mL, equipado con agitador magnético y una columna Vigreux se adicionaron 10.01 g de 2-aminopirimidina (105.14 mmol), 0.83 g (10.77 mmol, 10% mol) de acetato de amonio y 250 mL de acetonitrilo. La mezcla se agitó por 30 minutos y después se añadieron 19.84 g (11.15 mmol, 1.06 eq) de NBS, dejando en agitación a temperatura ambiente por una hora. Tras comprobar el fin de la reacción con ccf, se añadieron 25 mL de H₂O y se concentró el acetonitrilo a presión reducida. La suspensión resultante se enfrió y se filtró al vacío, el sólido resultante se lavó con agua fría. Se obtuvieron 16.58 g (rendimiento 90.5%) de un sólido blanco correspondiente al compuesto **3**, con un *Rf* de 0.20 (**Sistema I** + NH₄OH) y un *pf* de 242.8–243.6 °C.

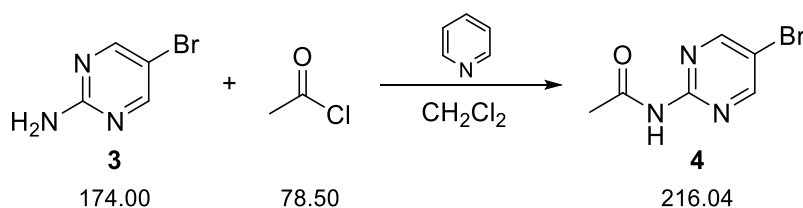
RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz, δ ppm): 6.90 (s, 2H, -D₂O), 8.30 (s, 2H)

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz, δ ppm): 105.14, 158.11, 162.06

IR (FTIR por reflectancia ATR, cm⁻¹) 3322.26 (ν_{NH₂}), 3166.93 (ν_{Ar-NH₂}), 1645.59 (ν_{C=N}), 1570.43 (ν_{C=N}), 1545.51 (ν_{C=N}), 1479.61 (ν_{C=N})

EM (IE, [M⁺], *m/z*): 173.058 (teórico [M⁺]: 172.959)

Anexo II – **Espectros 13, 14, 15 y 16.**

11.2.5 *N*-(5-Bromopirimidin-2-il)acetamida (**4**)

En un matraz de 250 mL, equipado con agitador magnético, refrigerante en posición de reflujo y atmósfera de nitrógeno, se adicionaron 10.00 g (57.47 mmol) de 2-amino-5-bromopirimidina (**3**), 9.3 mL (11.50 mmol, 2eq) de piridina y 6.1 mL (85.79 mmol, 1.5 eq) de cloruro de acetilo. La mezcla se dejó en agitación con 100 mL de CH₂Cl₂, por 1.5 horas, a temperatura ambiente. Para comprobar el término de la reacción se realizó ccf con el **Sistema VI**, más hidróxido de amonio; fueron necesarias cuatro eluciones para observar diferencia con respecto a la materia prima. Se añadieron 10 mL de H₂O y se concentró el CH₂Cl₂ a presión reducida. El sólido resultante se filtró al vacío, se lavó con agua fría y se dejó secar. Se obtuvieron 11.0 g (rendimiento 88.5%) de un sólido blanco correspondiente al producto **4**, con un *R_f* de 0.44 y un *p_f* de 237.7–240.6 °C.

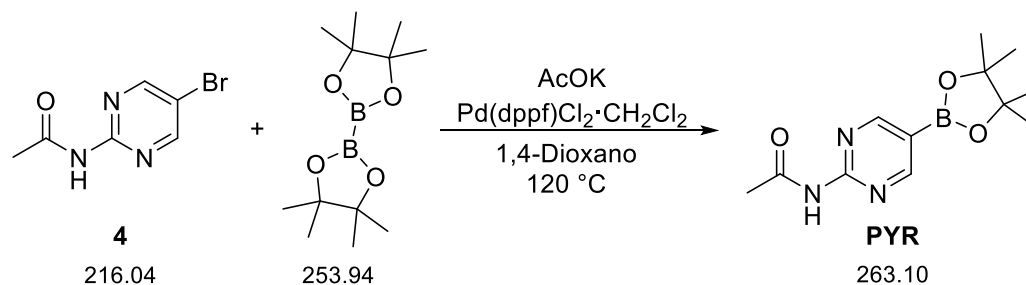
RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz, δ ppm): 2.15 (s, 3H), 8.79 (s, 2H), 10.74 (s, 1H, -D₂O)

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz, δ ppm): 24.61, 112.85, 156.22, 158.63, 168.77

IR (FTIR por reflectancia ATR, cm⁻¹): 3158.62 (ν_{N-H}), 3114.85 (ν_{N-H}), 2979.45 (ν_{Me}), 1694.29 (ν_{C=O}), 1674.49 (ν_{C=N}), 1563.12 (ν_{C=N}), 1510.51 (ν_{C=N}), 1420.52 (ν_{Me})

EM (IE, [M⁺], *m/z*): 214.946 (teórico [M⁺]: 214.969)

Anexo II – **Espectros 17, 18, 19 y 20.**

11.2.6 *N*-(5-(4,4,5,5-Tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)pirimidin-2-il)acetamida (PYR)

En un matraz de 50 mL, equipado con agitador magnético, condensador en posición de reflujo y atmósfera de nitrógeno se colocaron 5.0 g (23.14 mmol) de *N*-(5-bromopirimidin-2-il)acetamida (**4**), 6.5 g (25.60 mmol, 1.1 eq) de diborobis(pinacolato) (B₂Pin₂), 6.8 g (69.29 mmol, 3 eq) de acetato de potasio y 0.95 g (5% mol) de [1,1'-bis(difenilfosfina)ferroceno]dicloropaldio (II) en complejo con diclorometano. Se añadieron 30 mL de 1,4-dioxano, se inició la agitación y el calentamiento a reflujo por 5 horas. Al término de la reacción, la mezcla se filtró con celita y MeOH como fase móvil. El

disolvente se concentró a presión reducida, obteniéndose un sólido que se lavó con EtOH caliente. El sólido se filtró al vacío y se dejó secar hasta obtener 4.0 g (rendimiento 65.5%) de un sólido blanco correspondiente al producto **PYR**, que presentó un *pf* de 216.8–217.5 °C.

RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz, δ ppm): 1.31 (s, 12H), 2.20 (s, 3H), 8.74 (s, 2H), 10.69 (s, 1H, -D₂O)

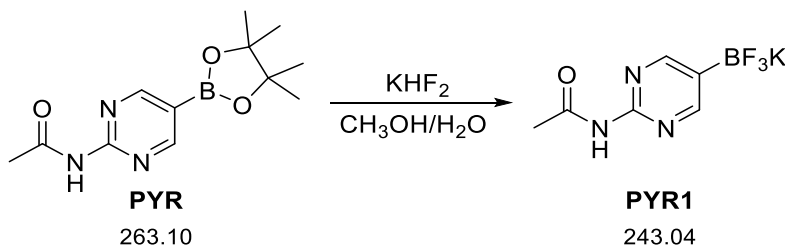
RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz, δ ppm): 24.64, 24.87, 84.25, 159.31, 163.63, 169.15

IR (FTIR por reflectancia ATR, cm⁻¹): 3159.22 (ν_{N-H}), 3119.84 (ν_{N-H}), 3061.44 (ν_{ArC-H}), 2990.40 (ν_{Me}), 1686.37 (ν_{C=O amida}), 1594.79 (ν_{C=N}), 1575.30 (ν_{C=N}), 1520.30 (ν_{C=N}), 1350.55 (ν_{B-O}), 1296.34 (ν_{C-B})

EM (APCI, [M+H]⁺, *m/z*): 264.1488 (teórico [M+H]⁺: 264.1514)

Anexo II – **Espectros 21, 22, 23 y 24.**

11.2.7 [2-(Acetilamino)pirimidin-5-il](trifluoro)borato de potasio (**PYR1**)



En un matraz bola de 100 mL, equipado con agitador magnético, se colocaron 2.93 g (11.1 mmol) del compuesto **PYR** y 50 mL de MeOH. El matraz se sumergió en un baño de hielo y se adicionaron 10 mL de una solución acuosa 4.5 M de bifluoruro de potasio (KHF₂), dejando en agitación por 4 horas a temperatura ambiente. Concluido el tiempo de reacción, se concentró la mezcla a presión reducida. Posteriormente, se adicionaron 50 mL de una mezcla MeOH/H₂O 1:1 y se eliminaron los disolventes a presión reducida; este proceso se repitió dos veces. El sólido obtenido se extrajo con MeOH a ebullición (10x50 mL), se recuperó el MeOH y se eliminó el disolvente mediante destilación a presión reducida. Se obtuvieron 1.64 g (rendimiento 60%) de un sólido beige, con punto de fusión de 270.4-270.7 °C, correspondiente al producto **PYR1**.

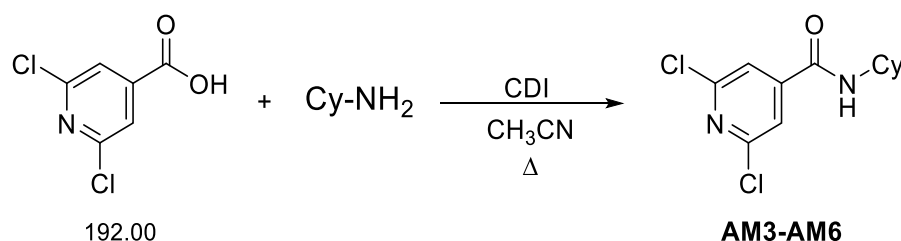
RMN ¹H (D₂O-*d*₂, 400 MHz, δ ppm): 2.21 (s, 3H), 8.63 (s, 2H)

RMN ¹³C (D₂O-*d*₂, 100 MHz, δ ppm): 23.63, 155.23, 161.36, 173.39

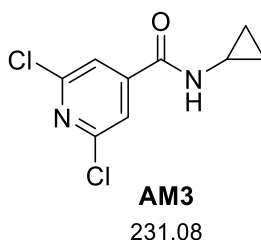
RMN ¹⁹F (D₂O-*d*₂, 565 MHz, δ ppm): -143.62 (c, *J*= 15.05 Hz)

IR (FTIR por reflectancia ATR, cm⁻¹): 3223.58 (ν_{N-H}), 3055.06 (ν_{ArC-H}), 1688.84 (ν_{C=O amida}), 1613.06 (ν_{C=N}), 1578.23 (ν_{C=N}), 1522.52 (ν_{C=N}), 1430.92 (ν_{Me}), 1382.69 (ν_{B-F}), 840.61 (ν_{C-B})

Anexo II – **Espectros 25, 26, 27 y 28.**

11.2.8 2,6-Dicloro-*N*-cicloalquilpiridin-4-carboxamidas (AM3–AM6)

En un matraz bola de 25 mL, equipado con agitador magnético, condensador en posición de reflujo y atmósfera de nitrógeno se colocaron 850 mg (4.43 mmol) del ácido 2,6-dicloropiridin-4-benzoico, 1.08 g (6.66 mmol, 1.5 eq) de CDI y 10 mL de CH₃CN. Se inició la agitación y el calentamiento a 50 °C por 30 minutos. Se comprobó la formación del imidazólido con ccf (**Sistema I**) y se adicionaron 1.2 equivalentes de la cicloalquilamina correspondiente, la mezcla se dejó en agitación a 50 °C por tres horas más. Tras comprobar la ausencia de materia prima, se concentró el disolvente a presión reducida. El sólido obtenido se purificó mediante cromatografía en columna (**Sistema I**).

11.2.8.1 2,6-Dicloro-*N*-ciclopropilpiridin-4-carboxamida (AM3)

De 850 mg (4.43 mmol) de ácido 2,6-dicloropiridin-4-carboxílico, 1.077 g (6.64 mmol, 1.5 eq) de CDI y 368 μ L (5.31 mmol, 1.2 eq) de ciclopropilamina, se obtuvieron 974.8 mg (rendimiento 95.3%) de un sólido blanco correspondiente a **AM3**.

R_f = 0.22 (**Sistema II**) pf = 149.9–150.0 °C

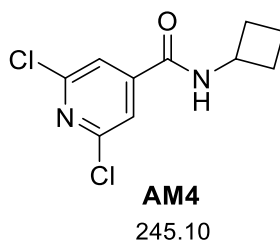
RMN ¹H (CDCl₃-*d*, 400 MHz, δ ppm): 0.62–0.67 (m, 2H), 0.86–0.93 (m, 2H), 2.89 (m, 1H, J = 7.08, 3.76Hz), 6.57 (s, 1H, -D₂O), 7.55 (s, 2H)

RMN ¹³C (CDCl₃-*d*, 100 MHz, δ ppm): 6.92, 23.61, 120.78, 146.89, 151.62, 164.61

IR (FTIR por reflectancia ATR, cm⁻¹): 3273.53 (ν_{N-H}), 3070.52 (ν_{ArC-H}), 3029.65 (ν_{ArC-H}), 1640.56 ($\nu_{C=O}$ amida), 1529.69 ($\nu_{C=N}$)

EM (IE, [M⁺], m/z): 229.880 (teórico [M⁺]: 230.001)

Anexo II – **Espectros 29, 30, 31 y 32.**

11.2.8.2 2,6-Dicloro-*N*-ciclobutilpiridin-4-carboxamida (AM4)

De 850 mg (4.43 mmol) de ácido 2,6-dicloropiridin-4-carboxílico, 1.08 g (6.66 mmol, 1.5 eq) de CDI y 454 μ L (5.32 mmol, 1.2 eq) de ciclobutilamina, se obtuvieron 907 mg (rendimiento 83.2%) de un sólido blanco correspondiente a **AM4**.

R_f = 0.24 (**Sistema II**) p_f = 145.8–145.9 °C

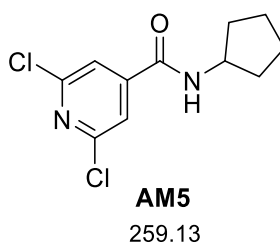
RMN ^1H (CDCl_3 -*d*, 400 MHz, δ ppm): 1.73–1.84 (m, 2H), 1.92–2.05 (m, 2H), 2.37–2.47 (m, 2H), 4.53 (m, 1H, J = 7.76Hz), 6.47 (s, 1H, $-\text{D}_2\text{O}$), 7.55 (s, 2H)

RMN ^{13}C (CDCl_3 -*d*, 100 MHz, δ ppm): 15.35, 31.12, 45.70, 120.82, 147.19, 151.59, 162.25

IR (FTIR por reflectancia ATR, cm^{-1}): 3268.03 ($\nu_{\text{N-H}}$), 3082.08 ($\nu_{\text{ArC-H}}$), 2968.05 (ν_{Me}), 1643.97 ($\nu_{\text{C=O}}$ amida), 1531.97 ($\nu_{\text{C=N}}$)

EM (APCI, $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z):245.0211 (teórico $[\text{M}+\text{H}]^+$: 245.0243)

Anexo II – **Espectros 33, 34, 35 y 36.**

11.2.8.3 2,6-Dicloro-*N*-ciclopentilpiridin-4-carboxamida (AM5)

De 800 mg (4.17 mmol) de ácido 2,6-dicloropiridin-4-carboxílico, 1.013 g (6.25 mmol, 1.5 eq) de CDI y 493 μ L (5 mmol, 1.2 eq) de ciclopentilamina, se obtuvieron 820.9 mg (rendimiento 76.0%) de un sólido blanco correspondiente a **AM5**.

R_f = 0.34 (**Sistema II**) p_f = 172.8–173.0 °C

RMN ^1H (CDCl_3 -*d*, 400 MHz, δ ppm): 1.46–1.52 (m, 2H), 1.65–1.73 (m, 4H), 2.03-2.11 (m, 2H), 4.35 (m, 1H, J = 6.94Hz), 6.38 (s, 1H, $-\text{D}_2\text{O}$), 7.55 (s, 2H)

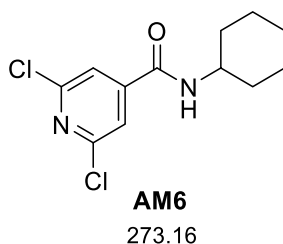
RMN ^{13}C (CDCl_3 -*d*, 100 MHz, δ ppm): 23.91, 33.14, 52.40, 120.84, 147.49, 151.50, 162.88

IR (FTIR por reflectancia ATR, cm^{-1}): 3265.98 ($\nu_{\text{N-H}}$), 3078.99 ($\nu_{\text{ArC-H}}$), 2959.51 (ν_{Me}), 2871.63 (ν_{Me}), 1643.31 ($\nu_{\text{C=O}}$ amida), 1532.97 ($\nu_{\text{C=N}}$)

EM (IE, $[\text{M}^+]$, m/z): 258.084 (teórico $[\text{M}^+]$: 258.033)

Anexo II – **Espectros 37, 38, 39 y 40.**

11.2.8.4 2,6-Dicloro-*N*-ciclohexilpiridin-4-carboxamida (**AM6**)



De 800 mg (4.17 mmol) de ácido 2,6-dicloropiridin-4-carboxílico, 1.013 g (6.25 mmol, 1.5 eq) de CDI y 572 μL (5 mmol, 1.2 eq) de ciclohexilamina, se obtuvieron 836.1 mg (rendimiento 73.5%) de un sólido blanco correspondiente a **AM6**.

NOTA: El sólido obtenido puede también disolverse con AcOEt y purificarse con tres extracciones de una disolución de bicarbonato de sodio (5% m/v), posteriormente tres extracciones de una dilución de HCl (pH=5) y una extracción con agua. La fase orgánica se seca con Na_2SO_4 anhidro y se concentra a presión reducida para obtener al producto puro.

R_f = 0.30 (**Sistema III**) p_f = 187.1–187.3 $^\circ\text{C}$

RMN ^1H (CDCl_3 -*d*, 400 MHz, δ ppm): 1.18–1.48 (m, 4H), 1.65–1.80 (m, 4H), 1.99–2.04 (m, 2H), 3.93 (m, 1H, J = 11.34, 8.17, 3.82Hz), 6.01 (s, 1H, $-\text{D}_2\text{O}$), 7.54 (s, 2H)

RMN ^{13}C (CDCl_3 -*d*, 100 MHz, δ ppm): 24.94, 25.50, 33.10, 49.61, 120.80, 147.63, 151.59, 162.30

IR (FTIR por reflectancia ATR, cm^{-1}) 3263.74 ($\nu_{\text{N-H}}$), 3077.95 ($\nu_{\text{ArC-H}}$), 2939.98 (ν_{Me}), 2855.92 (ν_{Me}), 1641.98 ($\nu_{\text{C=O}}$ amida), 1535.23 ($\nu_{\text{C=N}}$)

EM (IE, $[\text{M}^+]$, m/z): 271.994 (teórico $[\text{M}^+]$: 272.048)

Anexo II – **Espectros 41, 42, 43 y 44.**

$R_f = 0.30$ (**Sistema IV**) $pf = 295.3\text{--}295.4$ °C

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ ppm): 0.60–0.63 (m, 2H, $-\text{CH}_2-$ 13), 0.73–0.78 (m, 2H, $-\text{CH}_2-$ 14), 2.89 (m, 1H, $J = 8.04, 4.01\text{Hz}$, H 12), 4.66 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$ 21), 7.09 (d, 1H, $J = 8.37\text{Hz}$, H 16), 7.67–7.69 (m, 1H, H 15), 7.71 (d, 2H, $J = 1.17\text{Hz}$, H 1 y 19), 8.15 (d, 1H, $J = 1.09\text{Hz}$, H 5), 8.85 (d, 1H, $J = 4.12\text{Hz}$, $-\text{D}_2\text{O}$, H 11), 10.81 (s, 1H, $-\text{D}_2\text{O}$, H 23)

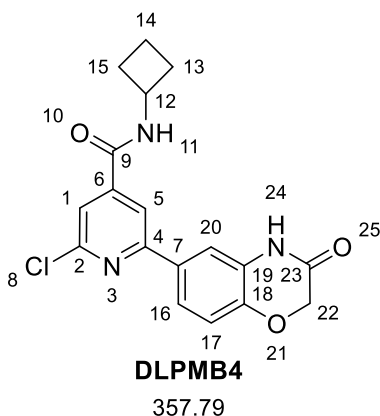
RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz, δ ppm): 5.71 (C 13 y 14), 23.20 (C 12), 66.78 (C 21), 114.09 (C 19), 116.20 (C 5), 116.56 (C 16), 119.92 (C 15), 121.83 (C 1), 127.77 (C 18), 130.78 (C 8), 145.01 (C 6), 145.82 (C 17), 150.59 (C 2), 156.76 (C 4), 164.44 (C 9), 164.46 (C 22)

IR (FTIR por reflectancia ATR, cm^{-1}): 3260.91 ($\nu_{\text{N-H}}$), 3074.55 ($\nu_{\text{ArC-H}}$), 2959.36 (ν_{Me}), 2923.59 (ν_{Me}), 2879.68 (ν_{Me}), 2852.84 (ν_{Me}), 1676.32 ($\nu_{\text{C=O}}$ amida), 1633.37 ($\nu_{\text{C=O}}$ amida), 1526.78 ($\nu_{\text{C=N}}$), 1489.56 ($\nu_{\text{C=N}}$)

EM (APCI, $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z): 344.0872 (teórico $[\text{M}+\text{H}]^+$): 344.0796)

Anexo II – Espectros 45, 46, 47, 48, 49 y 50.

11.2.9.2 2-Cloro-*N*-ciclobutil-6-(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (DLPMB4)



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

De 200 mg (0.82 mmol) de **AM4**, 157 mg (0.57 mmol, 0.7 eq) de **BXN**, 282 mg (2.29 mmol, 2.5 eq) de K_2CO_3 y 47 mg (5% mol) de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, se obtuvieron 146 mg (rendimiento 50.0%) de un sólido beige correspondiente a **DLPMB4**.

$R_f = 0.22$ (**Sistema I**) $pf = 255.4\text{--}256.1$ °C

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ ppm): 1.68–1.75 (m, 2H, $-\text{CH}_2-$ 13), 2.04–2.14 (m, 2H, $-\text{CH}_2-$ 14), 2.22–2.29 (m, 2H, $-\text{CH}_2-$ 15), 4.39–4.45 (m, 1H, H 12), 4.66 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$ 22), 7.09 (d, 1H, $J = 8.26\text{Hz}$, H 17), 7.68–7.72 (m, 2H, H 16 y 20), 7.74 (d, 1H, $J = 1.05\text{Hz}$, H 1), 8.17 (d, 1H, $J = 1.07\text{Hz}$, H 5), 9.03 (d, 1H, $J = 7.34\text{Hz}$, $-\text{D}_2\text{O}$, H 11), 10.81 (s, 1H, $-\text{D}_2\text{O}$, H 24)

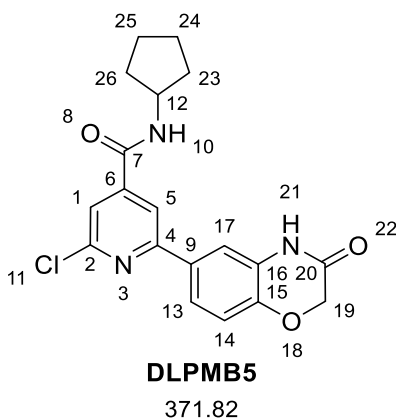
RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz, δ ppm): 14.83 (C 14), 29.91 (C 13 y 15), 44.79 (C 12), 66.81 (C 22), 114.12 (C 20), 116.31 (C 5), 116.60 (C 17), 120.06 (C 1), 121.89 (C 16), 127.80 (C 19), 130.81 (C 7), 145.03 (C 6), 145.92 (C 18), 150.63 (C 2), 156.78 (C 4), 162.22 (C 9), 164.49 (C 23)

IR (FTIR por reflectancia ATR, cm⁻¹): 3271.19 (ν_{N-H}), 3202.82 (ν_{N-H}), 3128.75 (ν_{N-H}), 3075.55 (ν_{ArC-H}), 2973.61 (ν_{Me}), 2948.14 (ν_{Me}), 2894.12 (ν_{Me}), 2870.32 (ν_{Me}), 1681.40 (ν_{C=O amida}), 1655.51 (ν_{C=O amida}), 1533.14 (ν_{C=N}), 1494.33 (ν_{C=N})

EM (APCI, [M+H]⁺, *m/z*): 358.1030 (teórico [M+H]⁺: 358.0953)

Anexo II – **Espectros 51, 52, 53, 54, 55 y 56.**

11.2.9.3 2-Cloro-*N*-ciclopentil-6-(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (DLPMB5)



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

De 250 mg (0.96 mmol) de **AM5**, 186.4 mg (0.64 mmol, 0.7 eq) de **BXN**, 333 mg (2.29 mmol, 2.5 eq) de K₂CO₃ y 55.7 mg (5% mol) de Pd(PPh₃)₄, se obtuvieron 162 mg (rendimiento 64.3%) de un sólido beige correspondiente a **DLPMB5**.

*R*_f= 0.27 (**Sistema I**) *p*_f= 270.2–270.6 °C

RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz, δ ppm): 1.51–1.60 (m, 4H, -CH₂- 24 y 25), 1.67–1.75 (m, 2H, -CH₂- 26), 1.86–1.95 (m, 2H, -CH₂- 23), 4.24 (m, 1H, *J*= 7.21Hz, *H* 12), 4.66 (s, 2H, -CH₂- 19), 7.09 (d, 1H, *J*= 8.19Hz, *H* 14), 7.68–7.71 (m, 2H, *H* 13 y 17), 7.75 (d, 1H, *J*= 1.01Hz, *H* 1), 8.16 (d, 1H, *J*=1.03Hz, *H* 5), 8.73 (d, 1H, *J*= 7.15Hz, -D₂O, *H* 10), 10.83 (s, 1H, -D₂O, *H* 21)

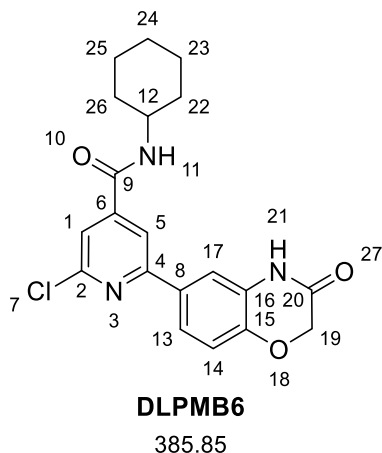
RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz, δ ppm): 23.73 (C 24 y 25), 32.06 (C 23 y 26), 51.29 (C 12), 66.81 (C 19), 114.11 (C 17), 116.38 (C 5), 116.59 (C 14), 120.12 (C 1), 121.90 (C 13), 127.79 (C 16), 130.83 (C 9), 145.01 (C 6), 146.20 (C 15), 150.58 (C 2), 156.70 (C 4), 162.90 (C 7), 164.49 (C 20)

IR (FTIR por reflectancia ATR, cm⁻¹) 3254.89 (ν_{N-H}), 3126.93 (ν_{N-H}), 3074.91 (ν_{ArC-H}), 2957.93 (ν_{Me}), 2870.51 (ν_{Me}), 1676.46 (ν_{C=O amida}), 1630.33 (ν_{C=O amida}), 1535.44 (ν_{C=N}), 1490.89 (ν_{C=N})

EM (APCI, $[M+H]^+$, m/z): 372.1199 (teórico $[M+H]^+$): 372.1109)

Anexo II – **Espectros 57, 58, 59, 60, 61 y 62.**

11.2.9.4 2-Cloro-N-ciclohexil-6-(3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (DLPMB6)



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

De 250 mg (0.91 mmol) de **AM6**, 176 mg (0.64 mmol, 0.7 eq) de **BXN**, 316 mg (2.29 mmol, 2.5 eq) de K_2CO_3 y 53 mg (5% mol) de $Pd(PPh_3)_4$, se obtuvieron 141 mg (rendimiento 40.1%) de un sólido blanco correspondiente a **DLPMB6**.

$R_f = 0.20$ (**Sistema II**) $pf = 280.1-280.3$ °C

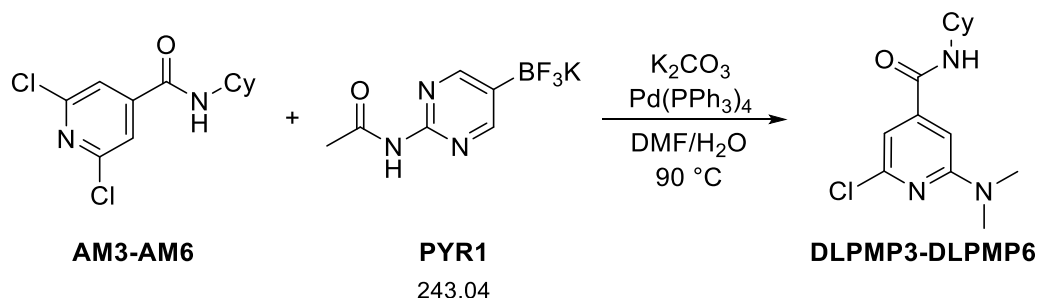
RMN 1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ ppm): 1.01–1.86 (m, 10H, $-CH_2-$ 22-26), 3.77–3.78 (m, 1H, H 12), 4.66 (s, 2H, $-CH_2-$ 19), 7.09 (d, 1H, $J = 8.33$ Hz, H 19), 7.69–7.71 (m, 2H, H 13 y 17), 7.74 (s, 1H, H 1), 8.16 (s, 1H, H 5), 8.64 (d, 1H, $J = 7.72$ Hz, $-D_2O$, H 11), 10.81 (s, 1H, $-D_2O$, H 21)

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz, δ ppm): 24.44 (C 24), 24.80 (C 23 y 25), 32.21 (C 22 y 26), 48.78 (C 12), 66.77 (C 19), 114.09 (C 17), 116.29 (C 5), 116.53 (C 14), 120.06 (C 1), 121.85 (C 13), 127.76 (C 16), 130.81 (C 8), 144.98 (C 6), 146.26 (C 15), 150.56 (C 2), 156.71 (C 4), 162.32 (C 9), 164.42 (C 20)

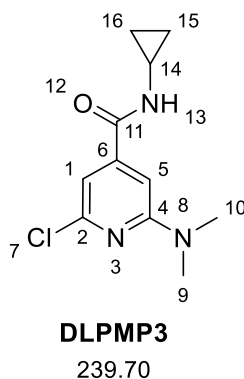
IR (FTIR por reflectancia ATR, cm^{-1}): 3309.28 (ν_{N-H}), 3196.68 (ν_{N-H}), 3156.66 (ν_{N-H}), 3075.49 (ν_{ArC-H}), 2932.82 (ν_{Me}), 2852.57 (ν_{Me}), 1689.84 ($\nu_{C=O}$ amida), 1638.15 ($\nu_{C=O}$ amida), 1536.02 ($\nu_{C=N}$), 1489.08 ($\nu_{C=N}$)

EM (APCI, $[M+H]^+$, m/z): 386.1291 (teórico $[M+H]^+$): 386.1266)

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

11.2.10 2-Cloro-*N*-cicloalquil-6-(dimetilamino)piridin-4-carboxamidas (DLPMP3–DLPMP6)

En un matraz bola de 25 mL se añadieron 250 mg de la 2,6-dicloro-*N*-cicloalquilpiridin-4-carboxamida (**AM3-AM6**), 2.5 equivalentes de carbonato de potasio, 5% mol del catalizador Pd(PPh₃)₄ y 20 mL de DMF, bajo atmósfera de nitrógeno. Con un embudo de adición, se agregaron 1.5 equivalentes de la sal de trifluoroborato **PYR1** disuelta en 5 mL de H₂O. Terminada la adición, la mezcla de reacción se mantuvo a 70 °C por 24 horas. Tras confirmar la transformación de la materia prima (~50%) con cromatografía en capa fina, se concentró el disolvente de la mezcla de reacción a presión reducida. El sólido resultante se lavó con agua y se filtró al vacío; la mezcla se purificó mediante cromatografía flash con el sistema correspondiente (el mismo utilizado para determinar su *R_f*).

11.2.10.1 2-Cloro-*N*-ciclopropil-6-(dimetilamino)piridin-4-carboxamida (DLPMP3)

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

De 250 mg (1.08 mmol) de **AM3**, 394.4 mg (1.62 mmol, 1.5 eq) de **PYR1**, 373.8 mg (2.70 mmol, 2.5 eq) de K₂CO₃ y 62.5 mg (5% mol) de Pd(PPh₃)₄, se obtuvieron 62.3 mg (rendimiento 24.0%) de un sólido blanco correspondiente a **DLPMP3**.

R_f = 0.17 (**Sistema II**) *pf* = 130.5–131.1 °C

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ ppm): 0.55–0.59 (m, 2H, $-\text{CH}_2-$ 15), 0.68–0.73 (m, 2H, $-\text{CH}_2-$ 16), 2.82 (m, 1H, $J= 8.04, 4.04\text{Hz}$, H 14), 3.04 (s, 6H, $-\text{CH}_3-$ 9 y 10), 6.88 (s, 2H, H 1 y 5), 8.59 (d, 1H, $J=3.60\text{Hz}$, $-\text{D}_2\text{O}$, H 13)

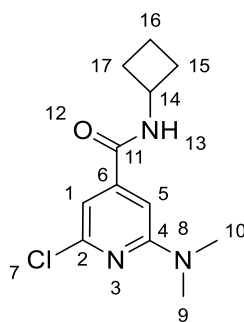
RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz, δ ppm): 5.65 (C 15 y 16), 23.06 (C 14), 37.67 (C 9 y 10), 102.50 (C 5), 107.43 (C 1), 145.60 (C 6), 148.62 (C 2), 159.05 (C 4), 165.28 (C 11)

IR (FTIR por reflectancia ATR, cm^{-1}): 3279.15 ($\nu_{\text{N-H}}$), 3084.81 ($\nu_{\text{ArC-H}}$), 2955.94 (ν_{Me}), 2927.04 (ν_{Me}), 1636.67 ($\nu_{\text{C=O amida}}$), 1595.12 ($\nu_{\text{C=N}}$), 1520.90 ($\nu_{\text{C=N}}$), 1403.83 (ν_{Me})

EM (APCI, $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z): 240.0890 (teórico $[\text{M}+\text{H}]^+$: 240.0898)

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

11.2.10.2 2-Cloro-*N*-ciclobutil-6-(dimetilamino)piridin-4-carboxamida (DLPMP4)



DLPMP4
253.73

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

De 250 mg (1.02 mmol) de **AM4**, 370.4 mg (1.52 mmol, 1.5 eq) de **PYR1**, 352.4 mg (2.55 mmol, 2.5 eq) de K_2CO_3 y 58.9 mg (5% mol) de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, se obtuvieron 79.6 mg (rendimiento 30.7%) de un sólido blanco correspondiente a **DLPMP4**.

$R_f= 0.33$ (**Sistema II**) $pf= 133.5\text{--}134.6\text{ }^\circ\text{C}$

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ ppm): 1.63–1.71 (m, 2H, $-\text{CH}_2-$ 15), 2.00–2.11 (m, 2H, $-\text{CH}_2-$ 16), 2.17–2.24 (m, 2H, $-\text{CH}_2-$ 17), 3.05 (s, 6H, $-\text{CH}_3-$ 9 y 10), 4.37 (m, 1H, $J= 8.04\text{Hz}$, H 14), 6.90 (d, 1H, $J= 0.96\text{Hz}$, H 5), 6.92 (d, 1H, $J= 0.85\text{Hz}$, H 1), 8.75 (d, $J=7.35\text{Hz}$, $-\text{D}_2\text{O}$, H 13)

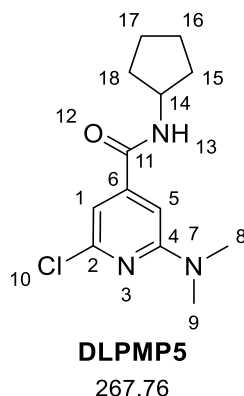
RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz, δ ppm): 14.76 (C 16), 29.90 (C 15 y 17), 37.72 (C 9 y 10), 44.60 (C 14), 102.65 (C 5), 107.51 (C 1), 145.71 (C 6), 148.65 (C 2), 159.08 (C 4), 163.05 (C 11)

IR (FTIR por reflectancia ATR, cm^{-1}) 3279.55 ($\nu_{\text{N-H}}$), 3075.87 ($\nu_{\text{ArC-H}}$), 2957.07 (ν_{Me}), 2924.64 (ν_{Me}), 2855.67 (ν_{Me}), 1637.43 ($\nu_{\text{C=O amida}}$), 1598.36 ($\nu_{\text{C=N}}$), 1527.11 ($\nu_{\text{C=N}}$), 1494.29 ($\nu_{\text{C=N}}$), 1464.65 (ν_{Me}), 1361.79 (ν_{Me})

EM (APCI, $[M+H]^+$, m/z): 254.1113 (teórico $[M+H]^+$: 254.1055)

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

11.2.10.3 2-Cloro-*N*-ciclopentil-6-(dimetilamino)piridin-4-carboxamida (DLPMP5)



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

De 250 mg (0.96 mmol) de **AM5**, 351.7 mg (1.37 mmol, 1.5 eq) de **PYR1**, 333 mg (2.29 mmol, 2.5 eq) de K_2CO_3 y 56 mg (5% mol) de $Pd(PPh_3)_4$, se obtuvieron 80 mg (rendimiento 32.7%) de un sólido blanco correspondiente a **DLPMP5**.

$R_f = 0.18$ (**Sistema III**) $pf = 149.0-149.9$ °C

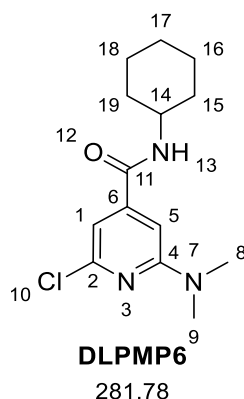
RMN 1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ ppm): 1.48–1.58 (m, 4H, $-CH_2-$ 16 y 17), 1.65–1.73 (m, 2H, $-CH_2-$ 15), 1.84–1.92 (m, 2H, $-CH_2-$ 18), 3.05 (s, 6H, $-CH_3-$ 8 y 9), 4.13–4.23 (m, 1H, H 14), 6.89 (s, 1H, H 5), 6.93 (s, 1H, H 1), 8.45 (d, $J=7.22$ Hz, $-D_2O$, H 13)

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz, δ ppm): 23.70 (C 16 y 17), 31.99 (C 15 y 18), 37.73 (C 8 y 9), 51.07 (C 14), 102.70 (C 5), 107.61 (C 1), 146.00 (C 6), 148.59 (C 2), 159.06 (C 4), 163.73 (C 11)

IR (FTIR por reflectancia ATR, cm^{-1}): 3274.65 (ν_{N-H}), 3068.81 (ν_{ArC-H}), 2957.99 (ν_{Me}), 2869.55 (ν_{Me}), 2810.68 (ν_{Me}), 1634.77 ($\nu_{C=O}$ amida), 1596.19 ($\nu_{C=N}$), 1524.95 ($\nu_{C=N}$), 1362.45 (ν_{Me})

EM (APCI, $[M+H]^+$, m/z): 268.1269 (teórico $[M+H]^+$: 268.1211)

Anexo II – **Espectros 80, 81, 82, 83, 84 y 85.**

11.2.10.4 2-Cloro-*N*-ciclohexil-6-(dimetilamino)piridin-4-carboxamida (DLPMP6)

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

De 250 mg (0.91 mmol) de **AM6**, 333 mg (1.37 mmol, 1.5 eq) de **PYR1**, 316 mg (2.29 mmol, 2.5 eq) de K_2CO_3 y 53 mg (5% mol) de $Pd(PPh_3)_4$, se obtuvieron 80 mg (rendimiento 32.7%) de un sólido blanco correspondiente a **DLPMP6**.

$R_f = 0.23$ (**Sistema III**) $pf = 178.9-181.5$ °C

RMN 1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ ppm): 1.19–1.87 (m, 10H, $-CH_2-$ 15-19), 3.05 (s, 6H, $-CH_3-$ 8 y 9), 3.68–3.76 (m, 1H, H 14), 6.89 (d, 1H, $J = 0.92$ Hz, H 5), 6.92 (d, 1H, $J = 0.83$ Hz, H 1), 8.37 (d, $J = 7.86$ Hz, $-D_2O$, H 13)

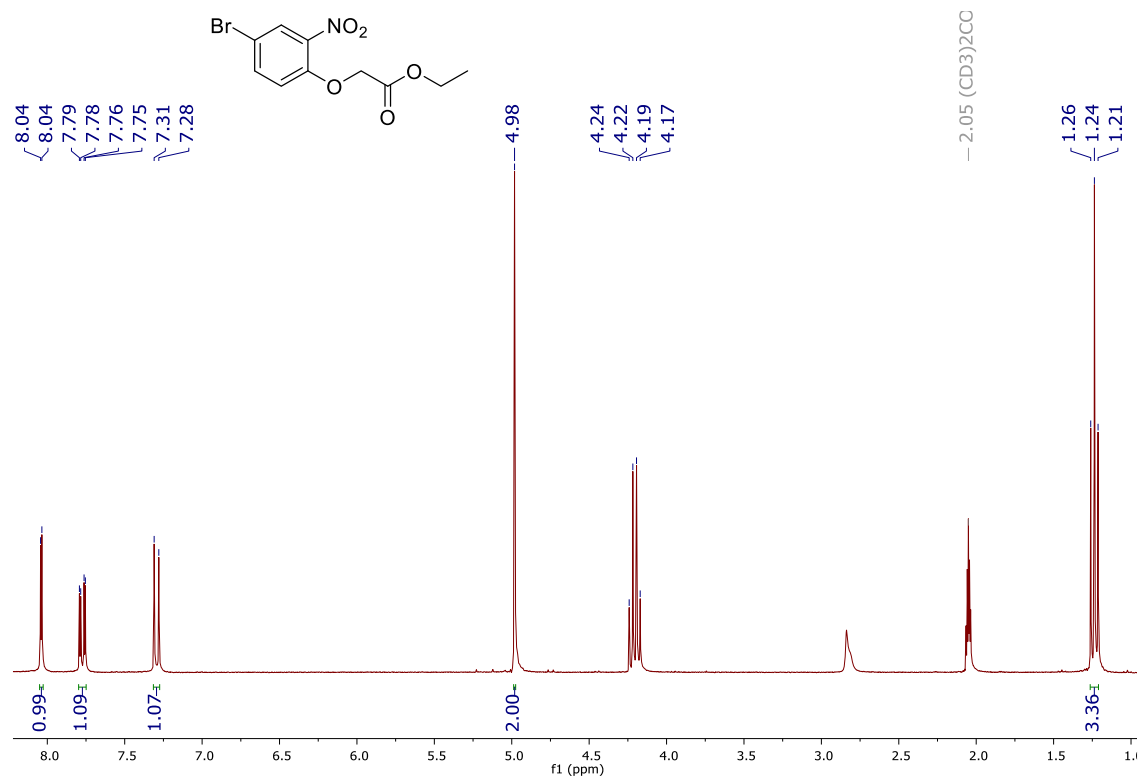
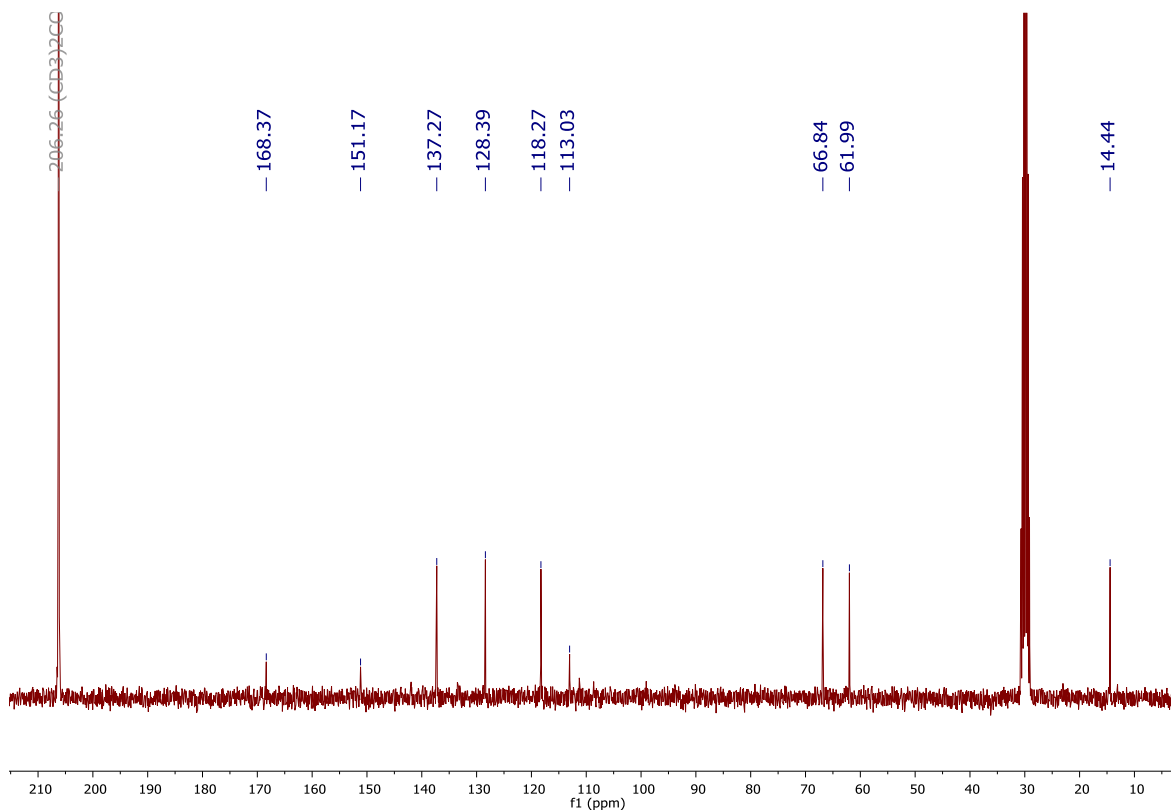
RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz, δ ppm): 24.92 (C 16 y 18), 25.24 (C 17), 32.27 (C 15 y 19), 37.73 (C 8 y 9), 48.59 (C 14), 102.66 (C 5), 107.62 (C 1), 146.09 (C 6), 148.61 (C 2), 159.07 (C 4), 163.15 (C 11)

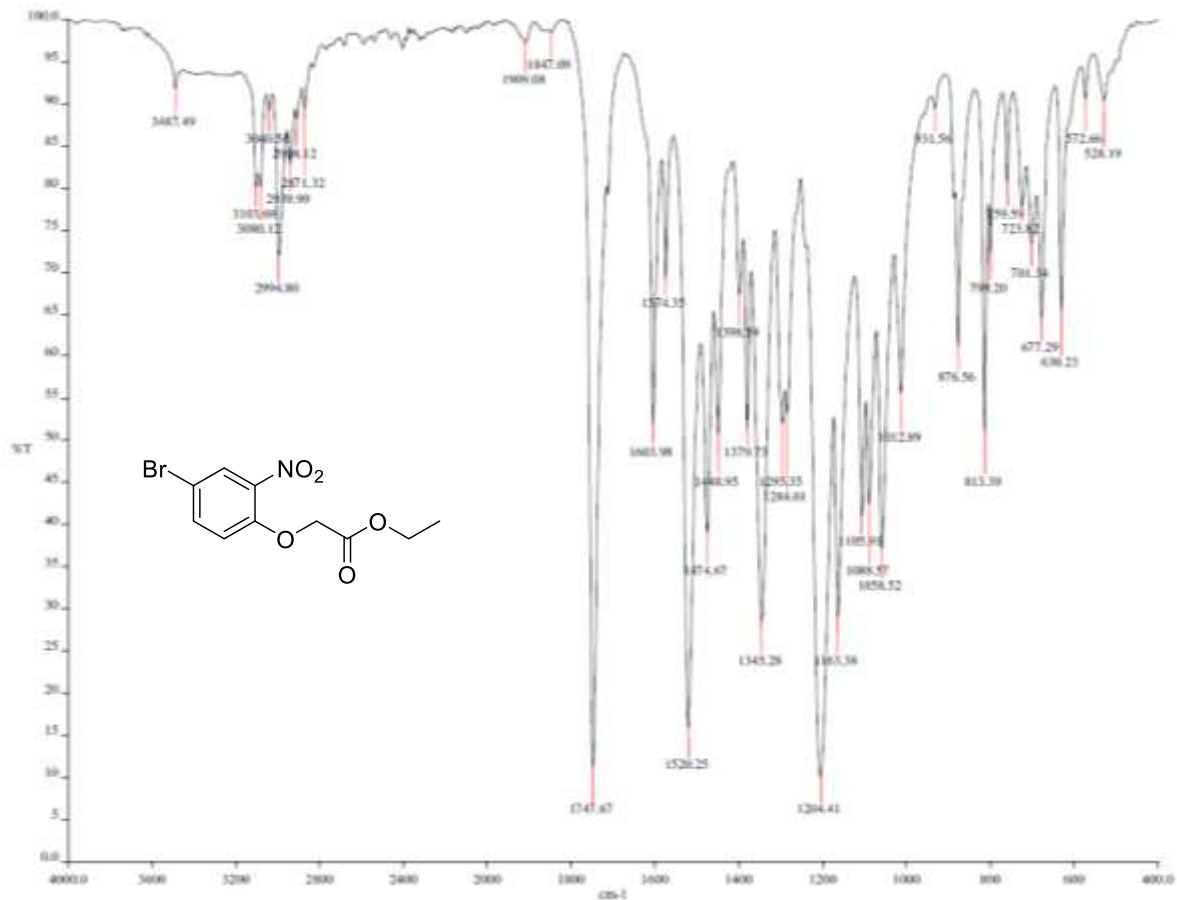
IR (FTIR por reflectancia ATR, cm^{-1}): 3291.83 (ν_{N-H}), 2933.22 (ν_{Me}), 2853.69 (ν_{Me}), 2808.12 (ν_{Me}), 1633.63 ($\nu_{C=O}$ amida), 1595.33 ($\nu_{C=N}$), 1523.91 ($\nu_{C=N}$), 1449.91 (ν_{Me}), 1409.87 (ν_{Me})

EM (APCI, $[M+H]^+$, m/z): 282.1446 (teórico $[M+H]^+$: 282.1368)

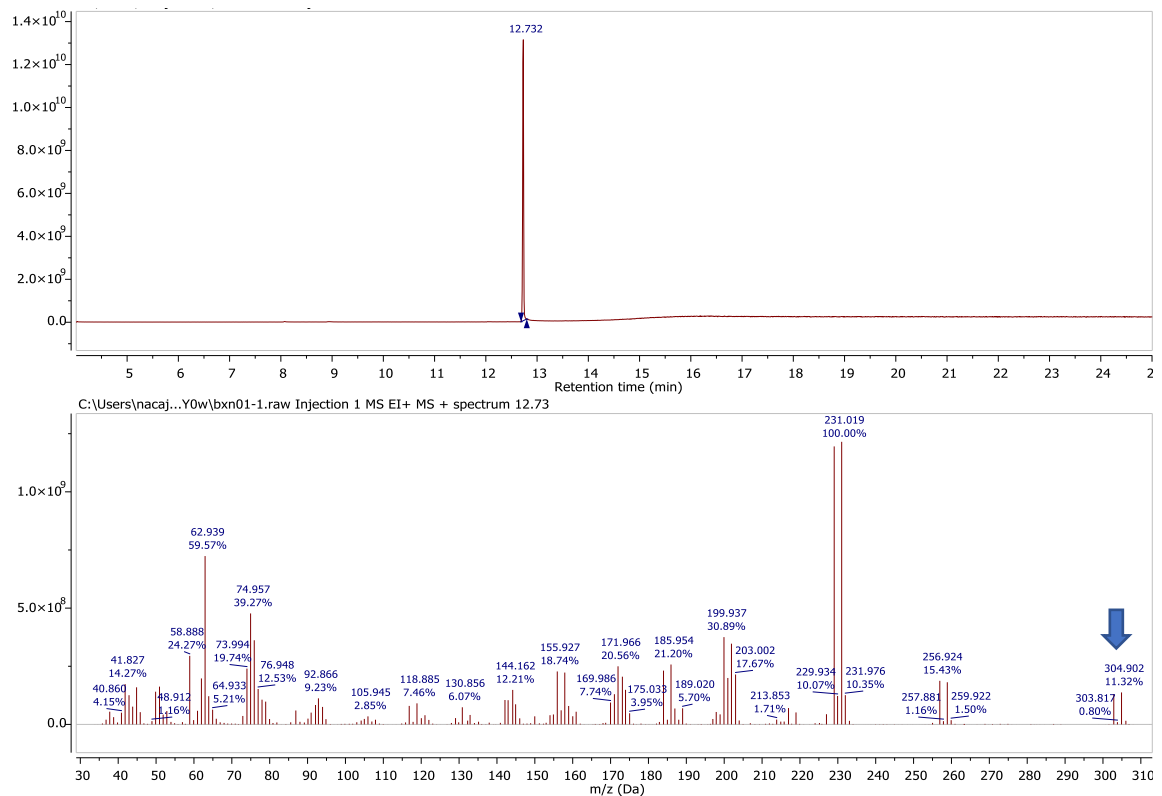
Anexo II – **Espectros 86, 87, 88, 89, 90 y 91.**

12. ANEXO II. ESPECTROS

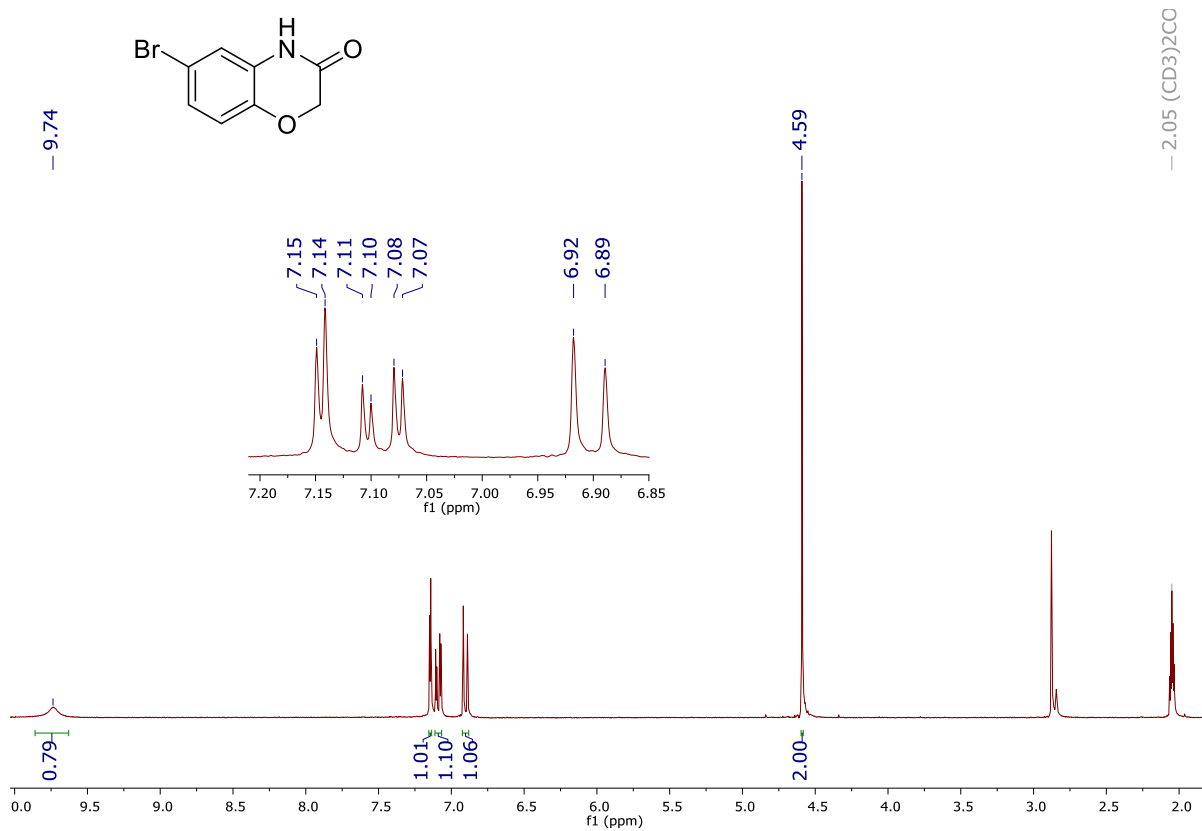
Espectro II-1. RMN ^1H ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}-d_6$, 400 MHz, δ ppm) del compuesto (4-bromo-2-nitrofenoxi)acetato de etilo (1)Espectro II-2. RMN ^{13}C ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}-d_6$, 100 MHz, δ ppm) del compuesto (4-bromo-2-nitrofenoxi)acetato de etilo (1)



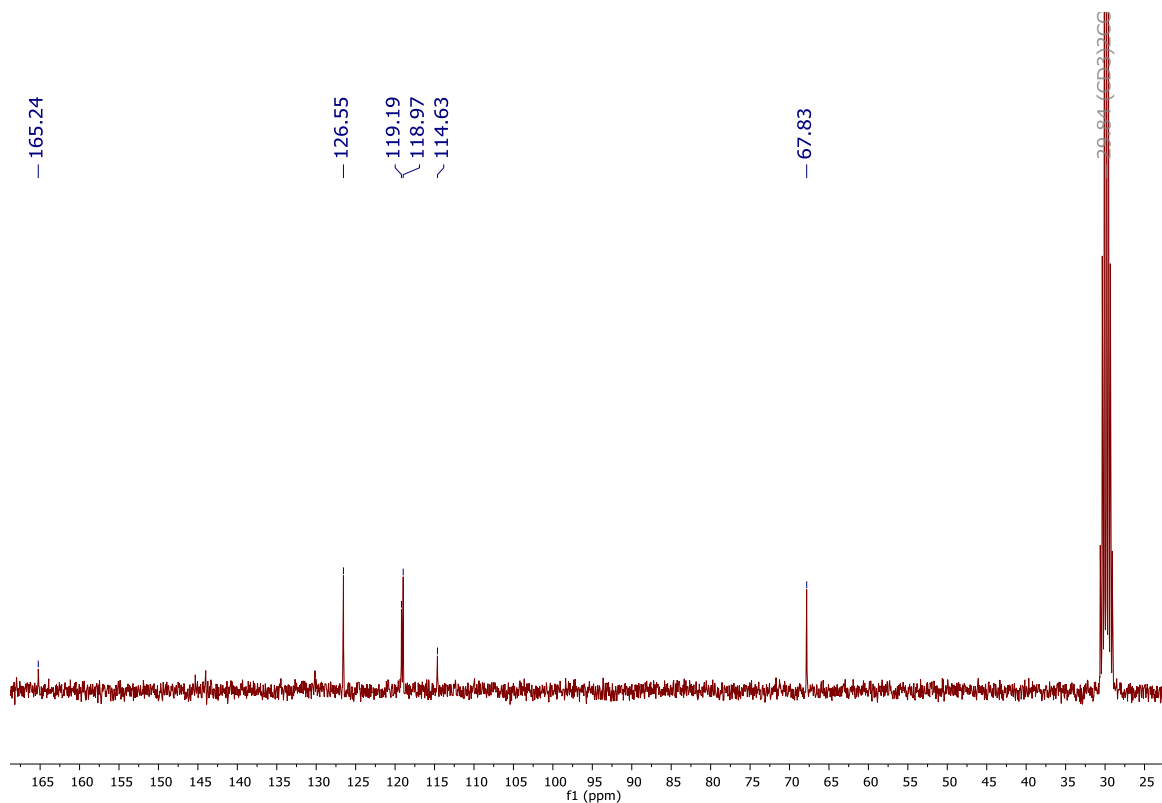
Espectro II-3. IR (FTIR por reflectancia ATR, cm^{-1}) del compuesto (4-bromo-2-nitrofenoxi)acetato de etilo (1)



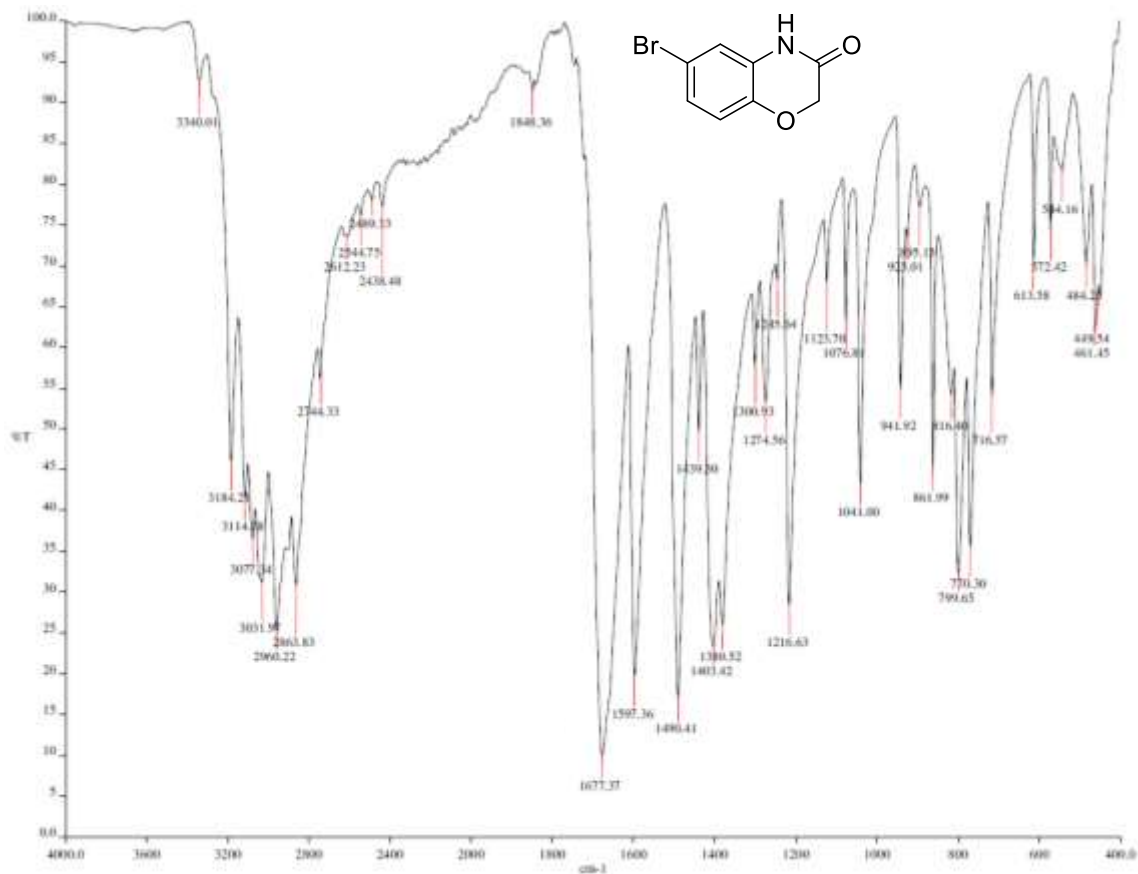
Espectro II-4. EM (IE, $[\text{M}^+]$, m/z) del compuesto (4-bromo-2-nitrofenoxi)acetato de etilo (1)



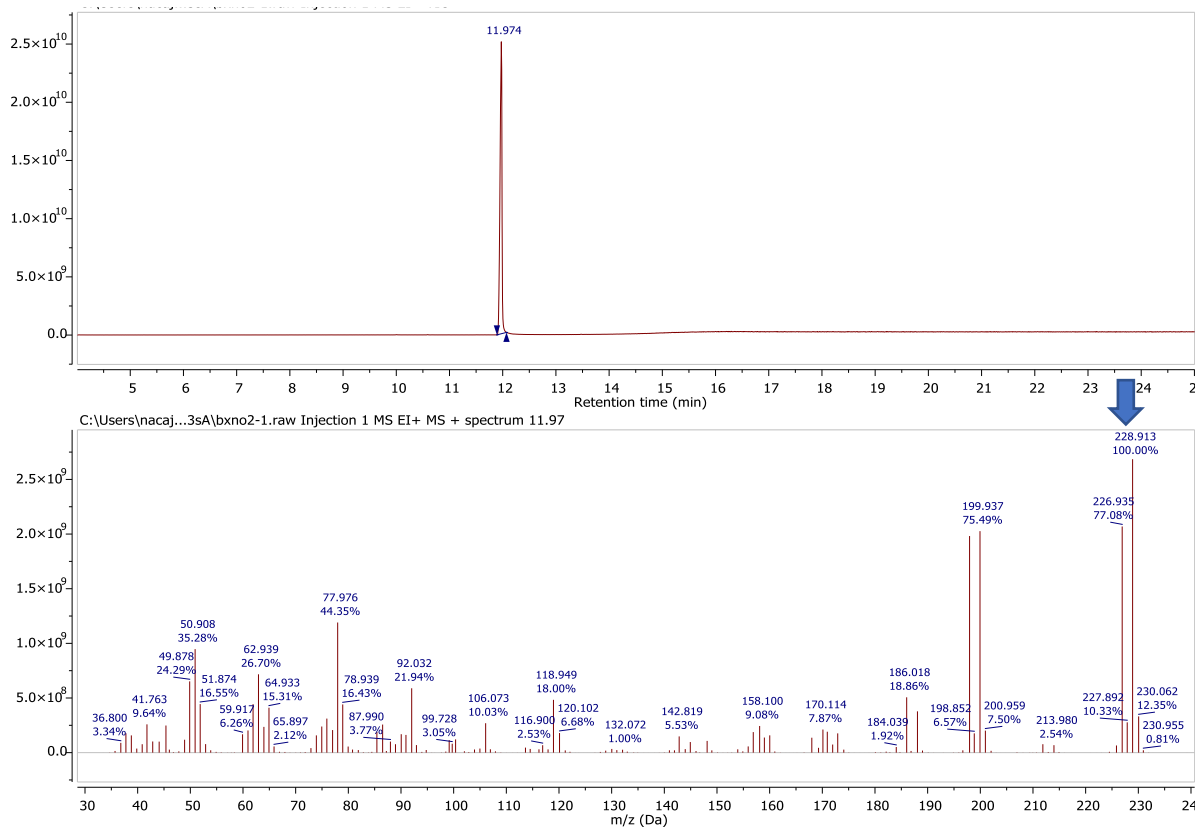
Espectro II-5. RMN ^1H ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}-d_6$, 400 MHz, δ ppm) del compuesto 6-bromo-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona (2)



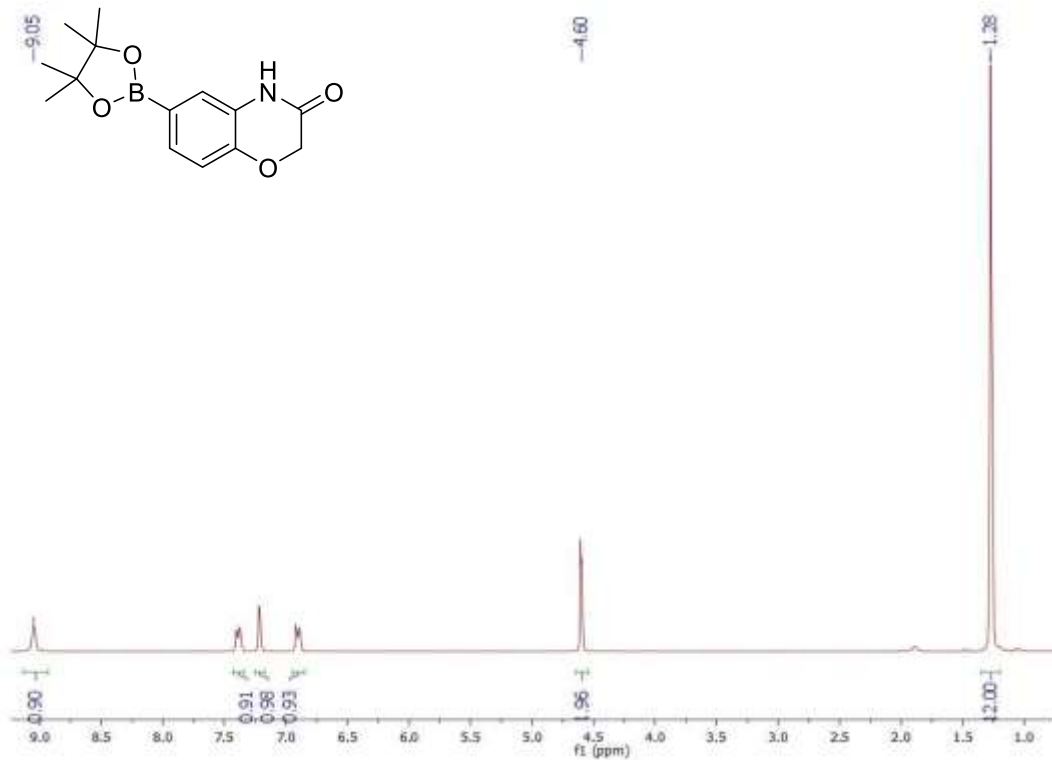
Espectro II-6. RMN ^{13}C ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}-d_6$, 100 MHz, δ ppm) del compuesto 6-bromo-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona (2)



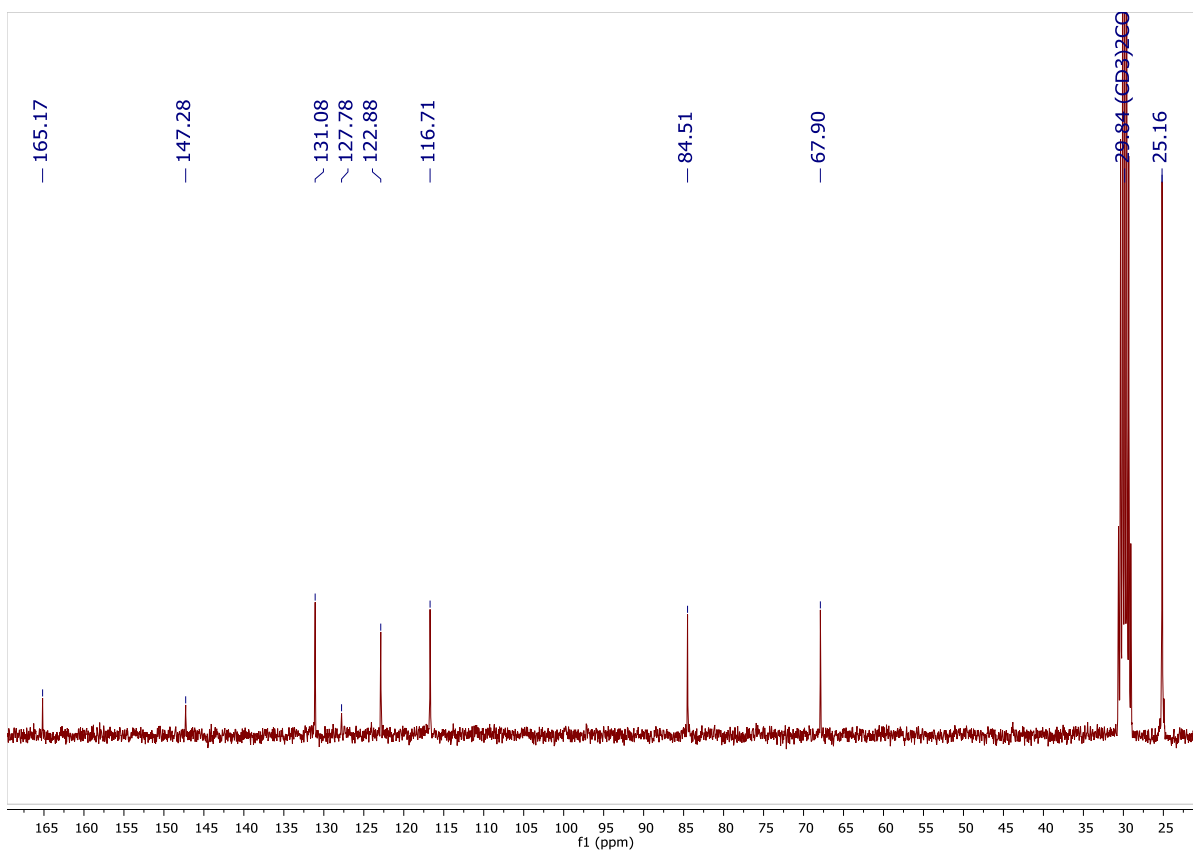
Espectro II-7. IR (FTIR por reflectancia ATR, cm⁻¹) del compuesto 6-bromo-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona (2)



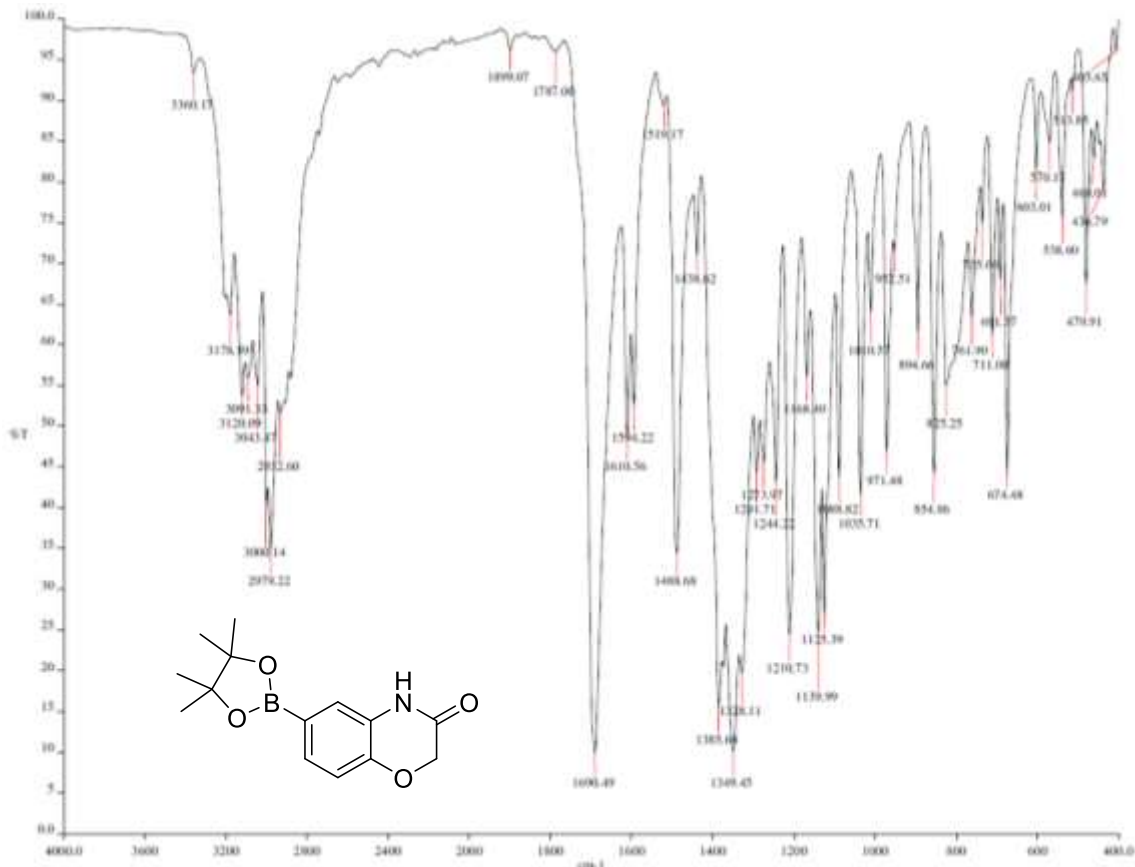
Espectro II-8. EM (IE, [M⁺], m/z) del compuesto 6-bromo-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona (2)



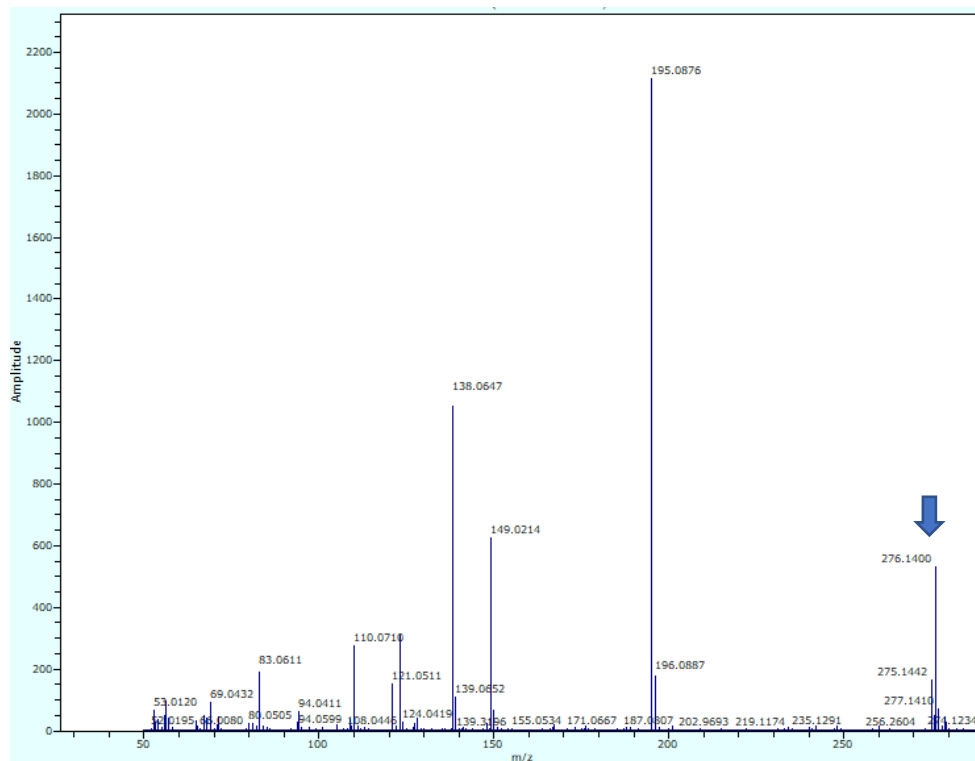
Espectro II-9. RMN ^1H ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}-d_6$, 400 MHz, δ ppm) del compuesto 6-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona (BXN)



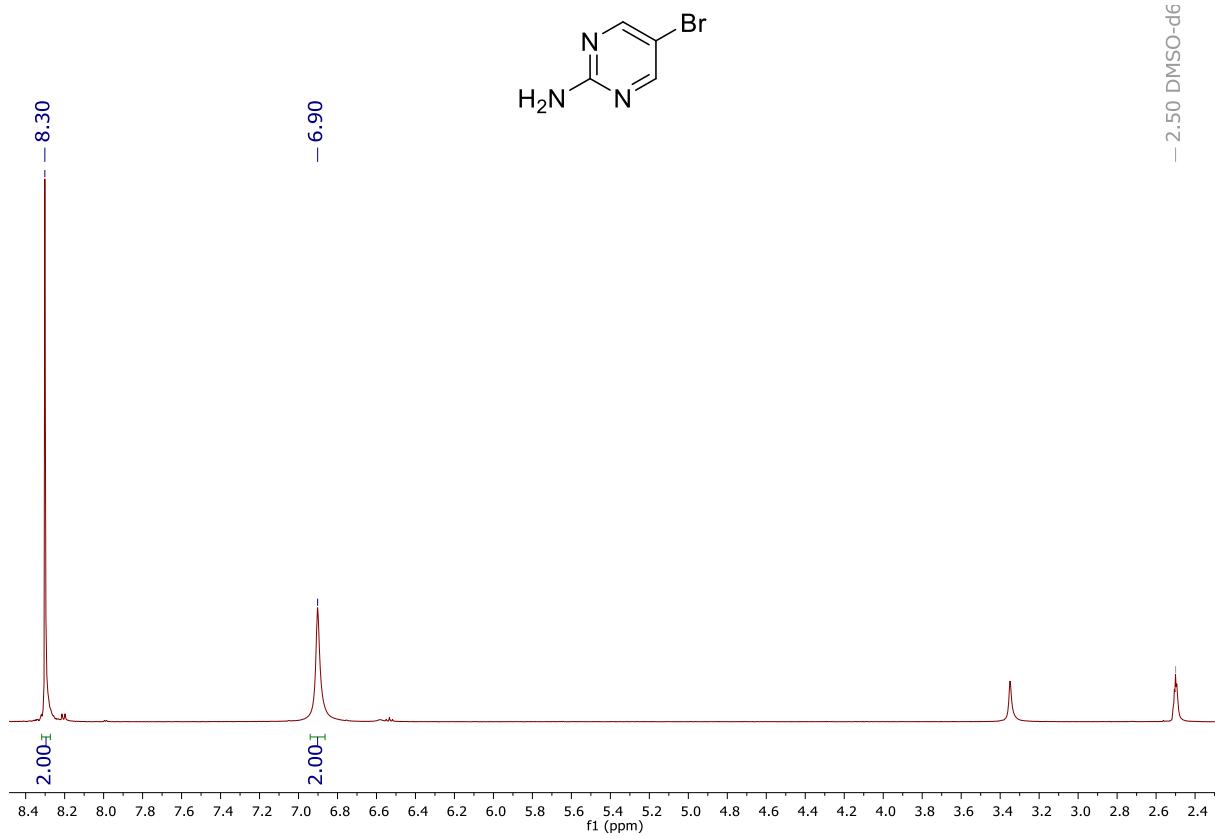
Espectro II-10. RMN ^{13}C ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}-d_6$, 100 MHz, δ ppm) del compuesto 6-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona (BXN)



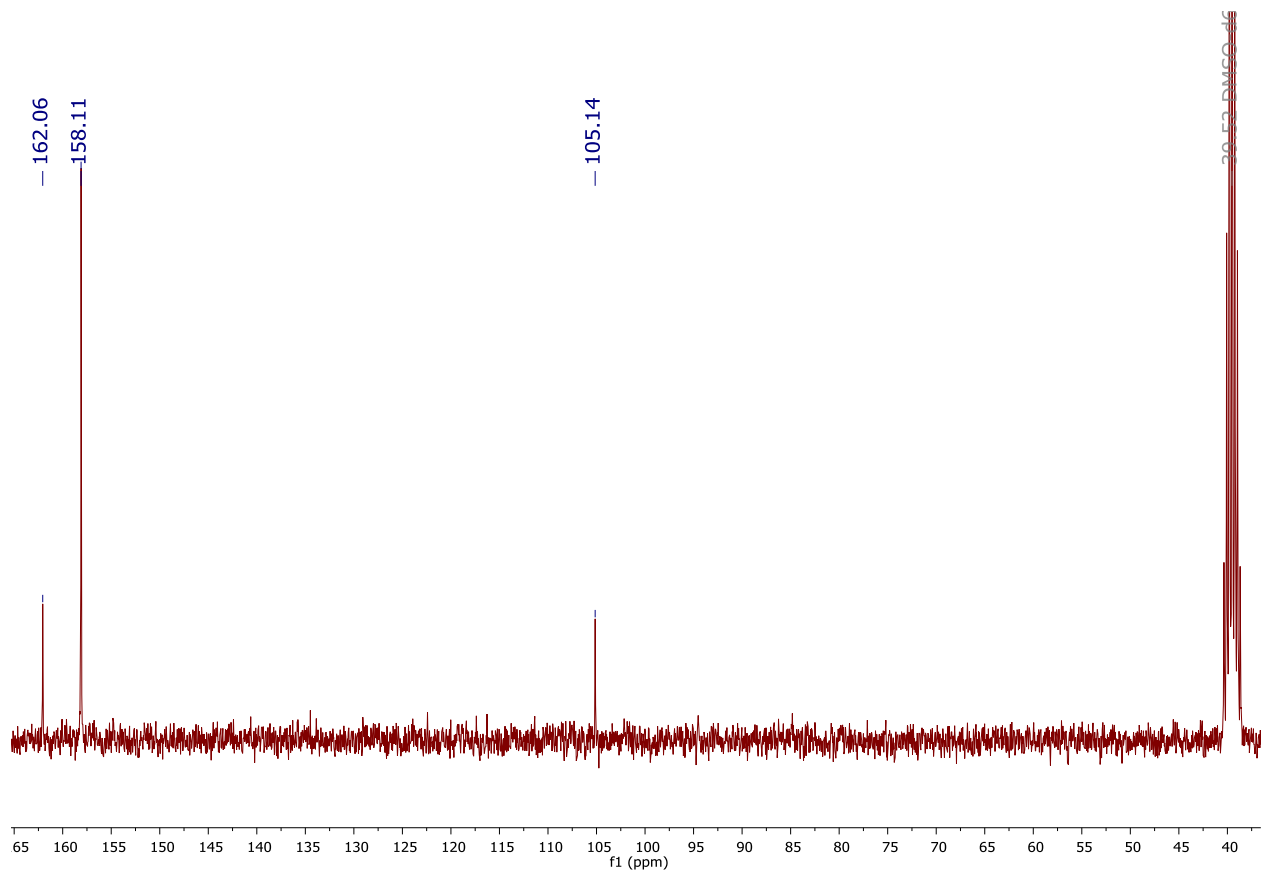
Espectro II-11. IR (FTIR por reflectancia ATR, cm^{-1}) del compuesto 6-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona (BXN)



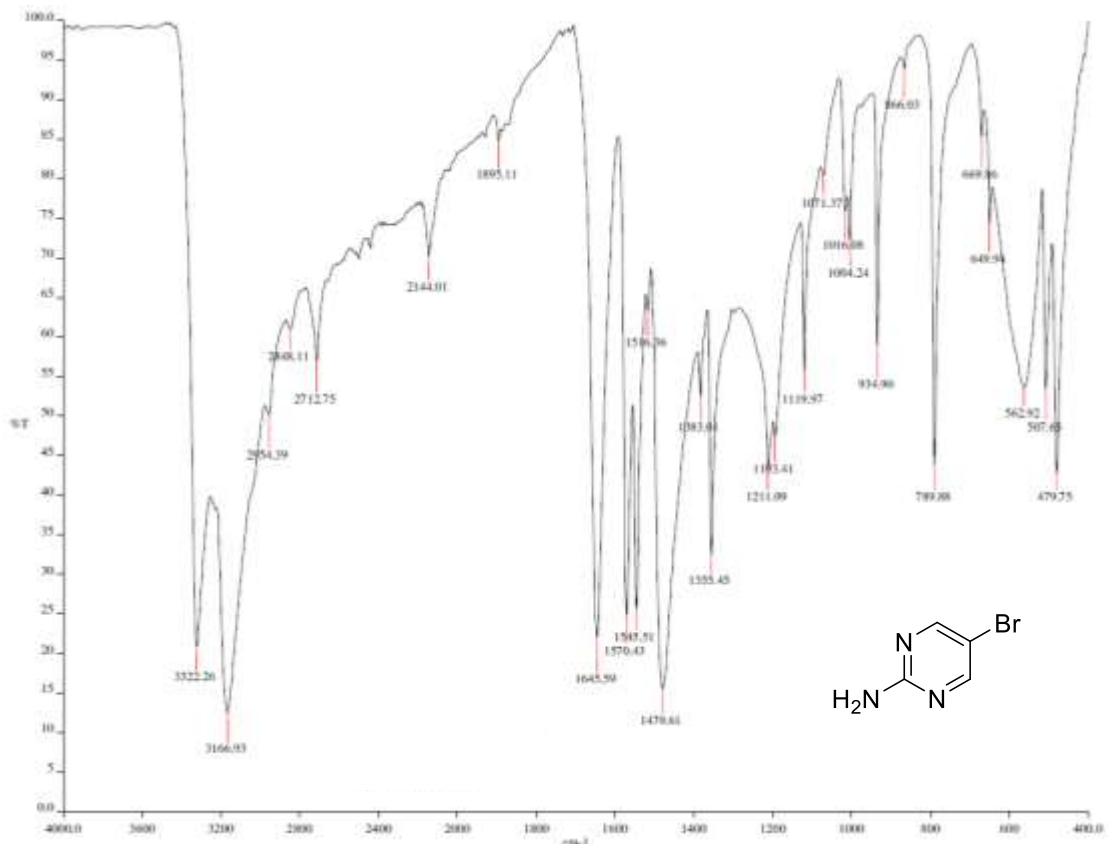
Espectro II-12. EM (APCI, $[\text{M} + \text{H}]^+$, m/z) del compuesto 6-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona (BXN)



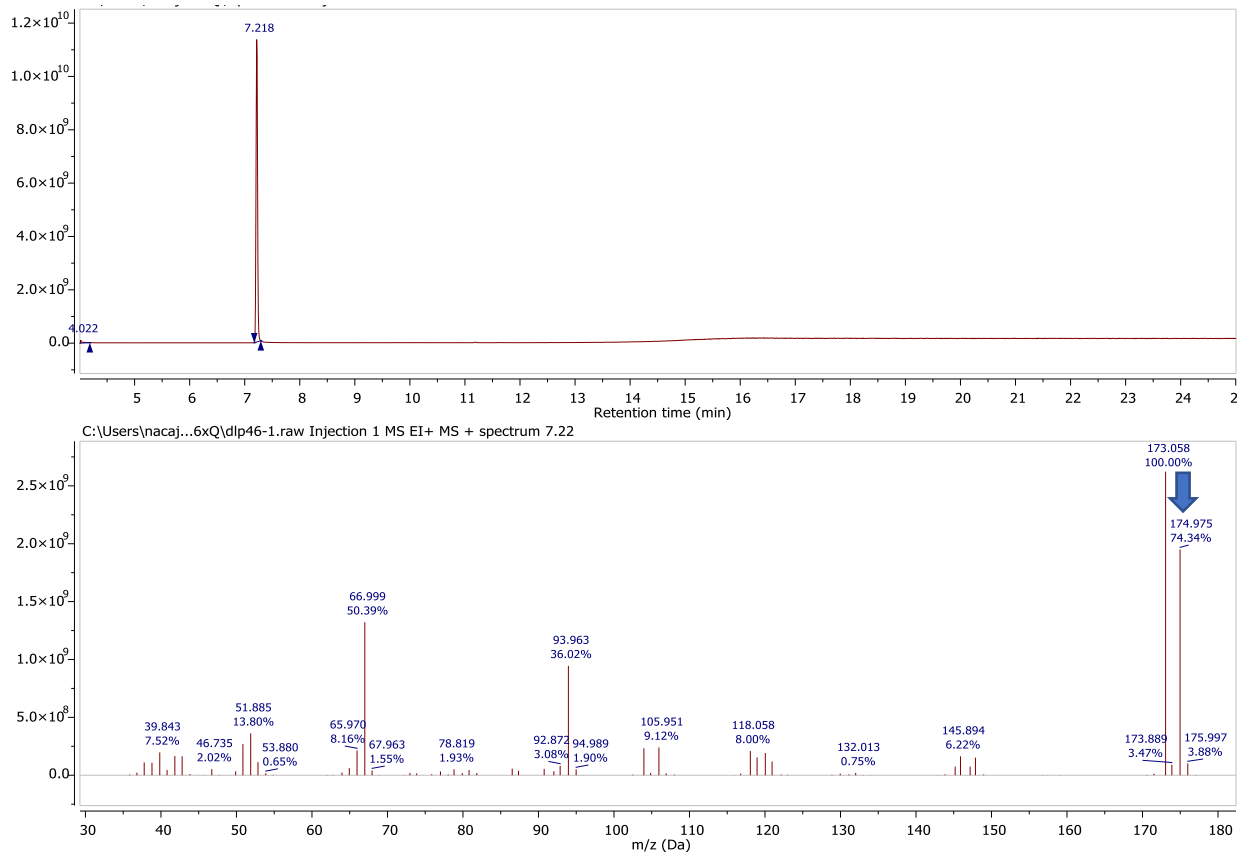
Espectro II-13. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ ppm) del compuesto 5-bromopirimidin-2-amina (**3**)



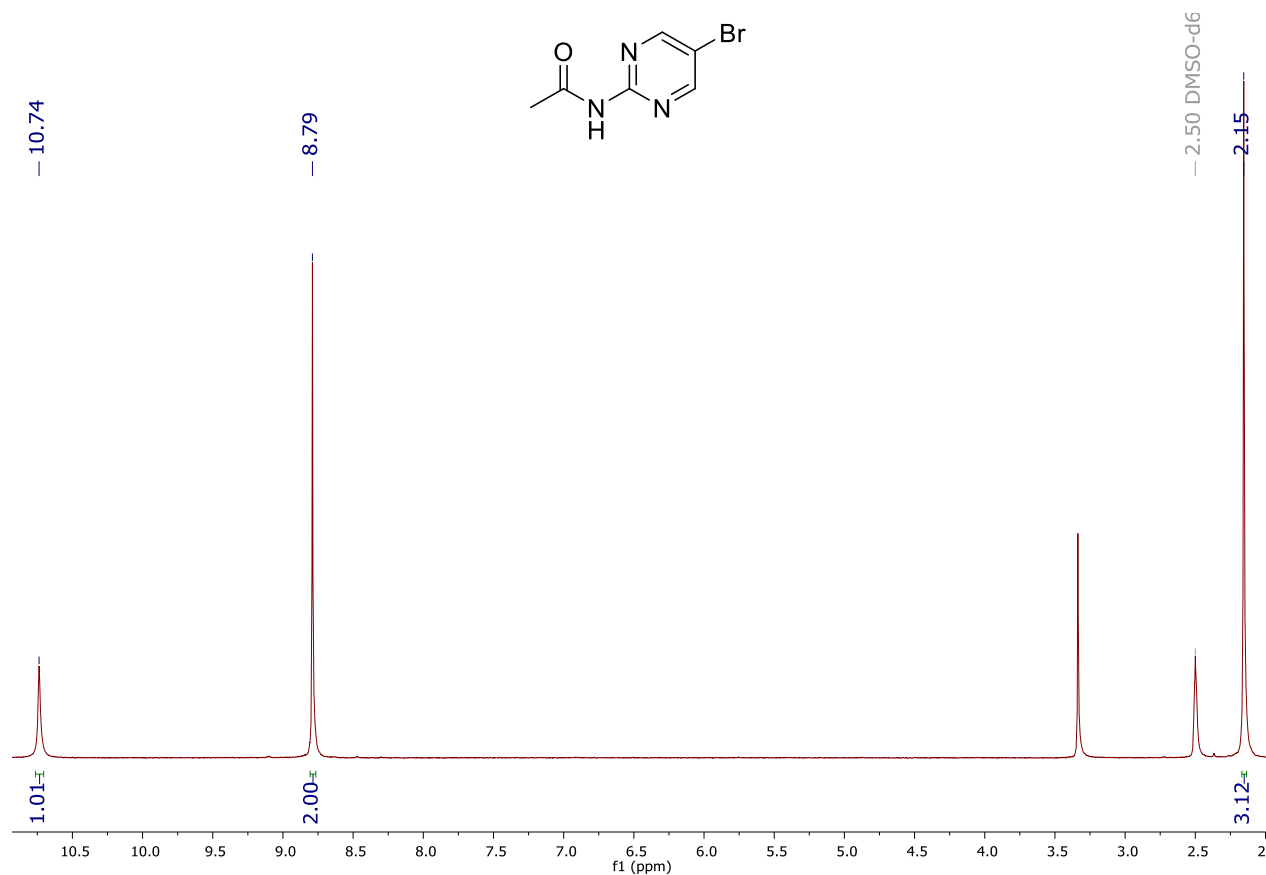
Espectro II-14. RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz, δ ppm) del compuesto 5-bromopirimidin-2-amina (**3**)



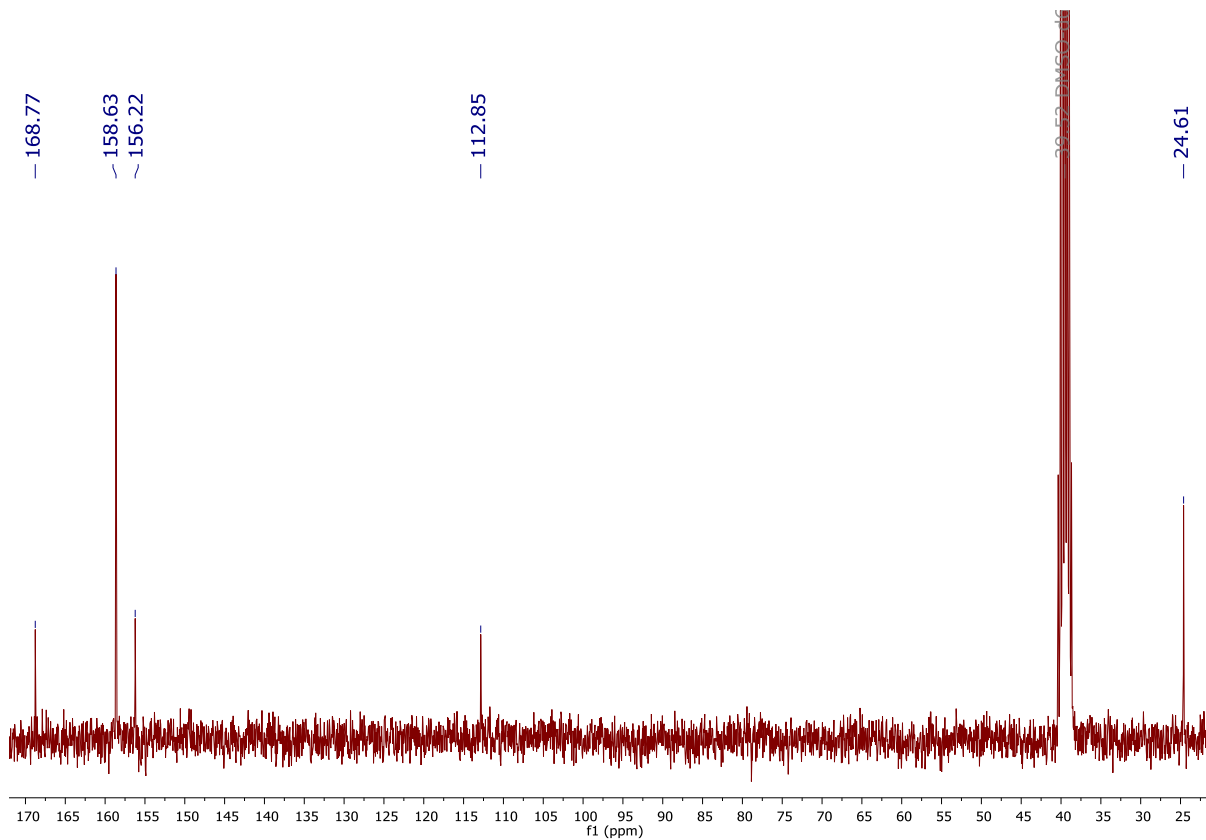
Espectro II-15. IR (FTIR por reflectancia ATR, cm^{-1}) del compuesto 5-bromopirimidin-2-amina (3)



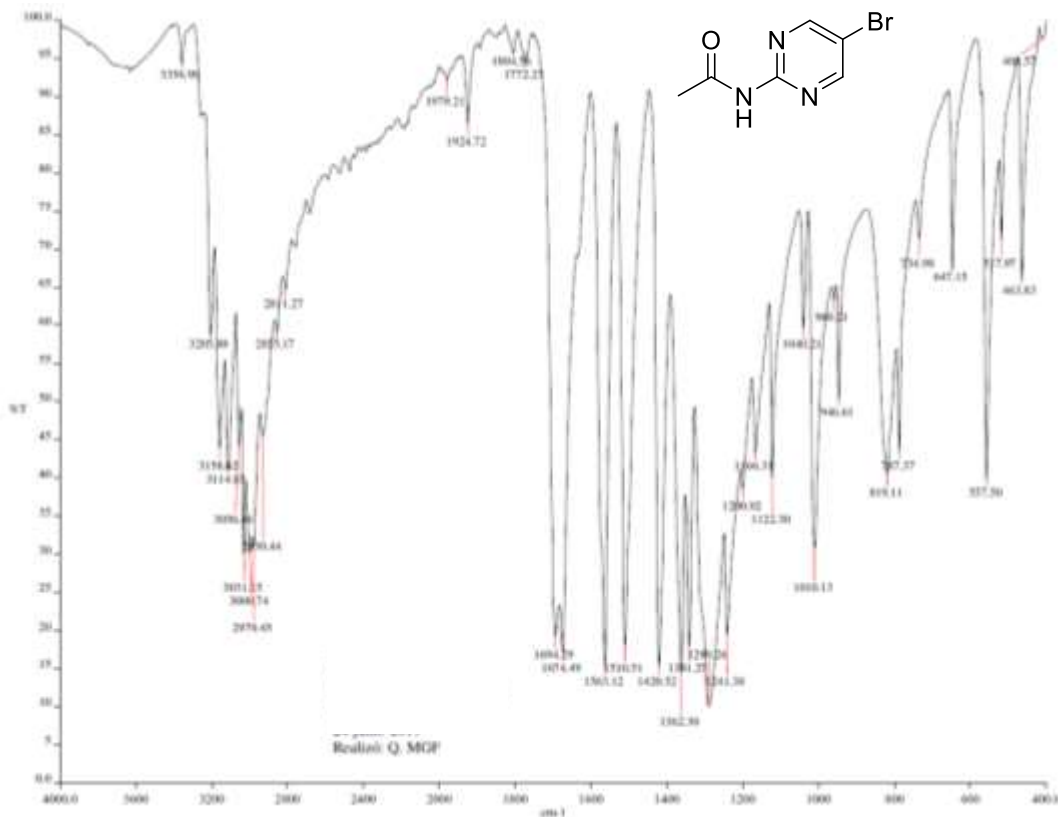
Espectro II-16. EM (IE, $[M^+]$, m/z) del compuesto 5-bromopirimidin-2-amina (3)



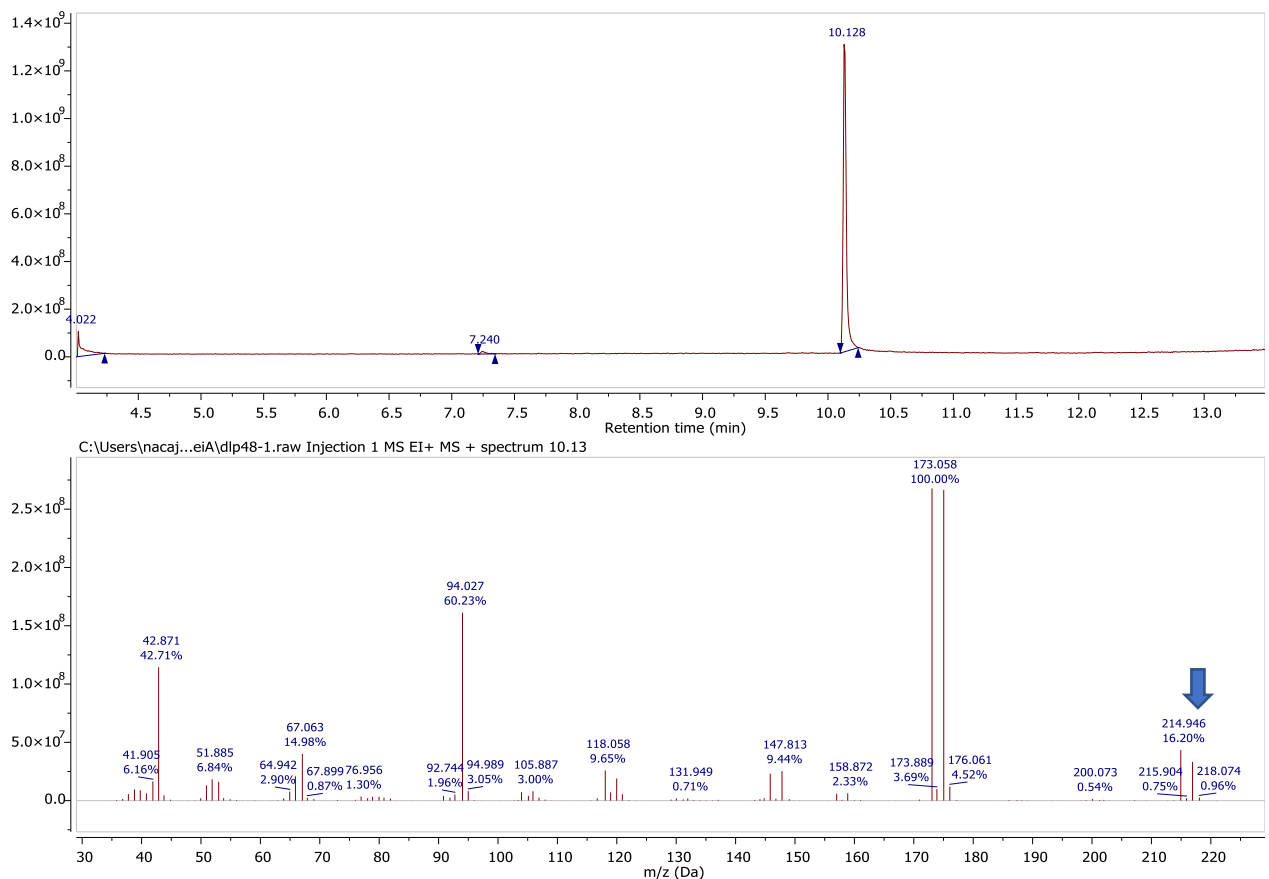
Espectro II-17. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz, δ ppm) del compuesto *N*-(5-bromopirimidin-2-il)acetamida (4)



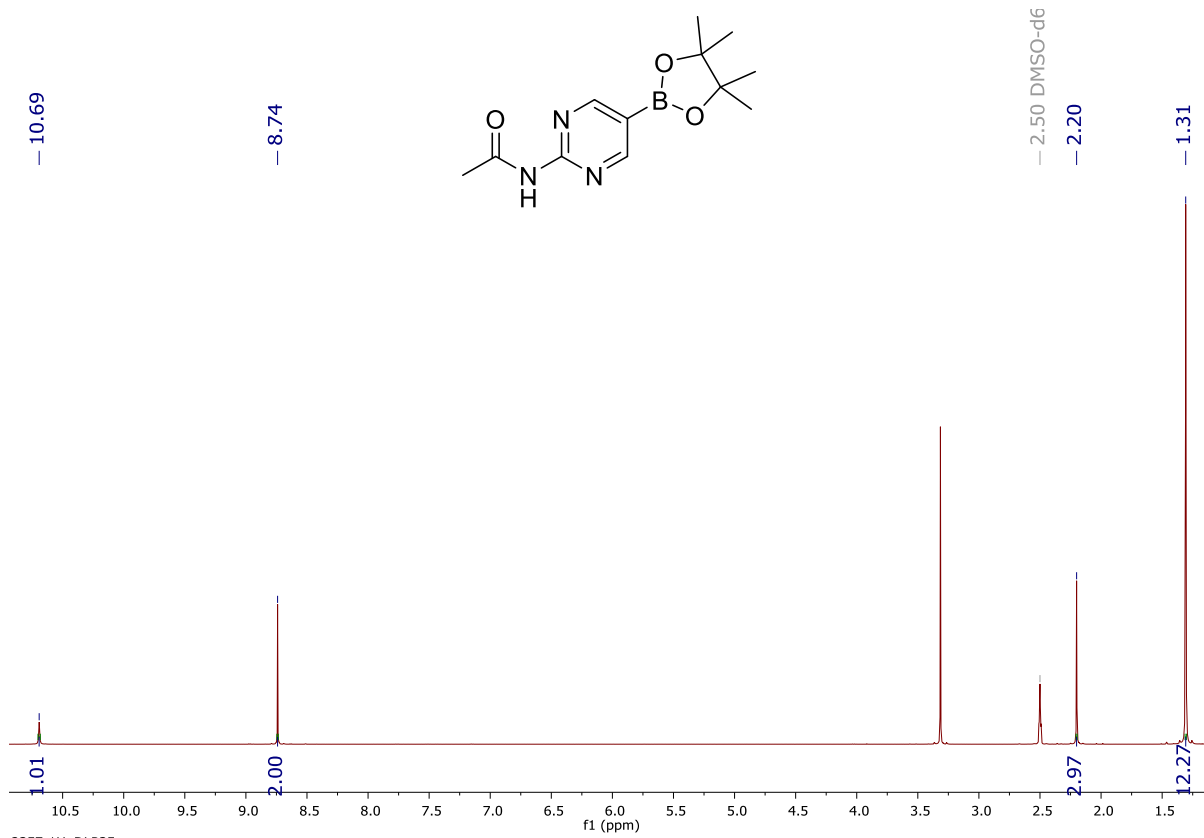
Espectro II-18. RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz, δ ppm) del compuesto *N*-(5-bromopirimidin-2-il)acetamida (4)



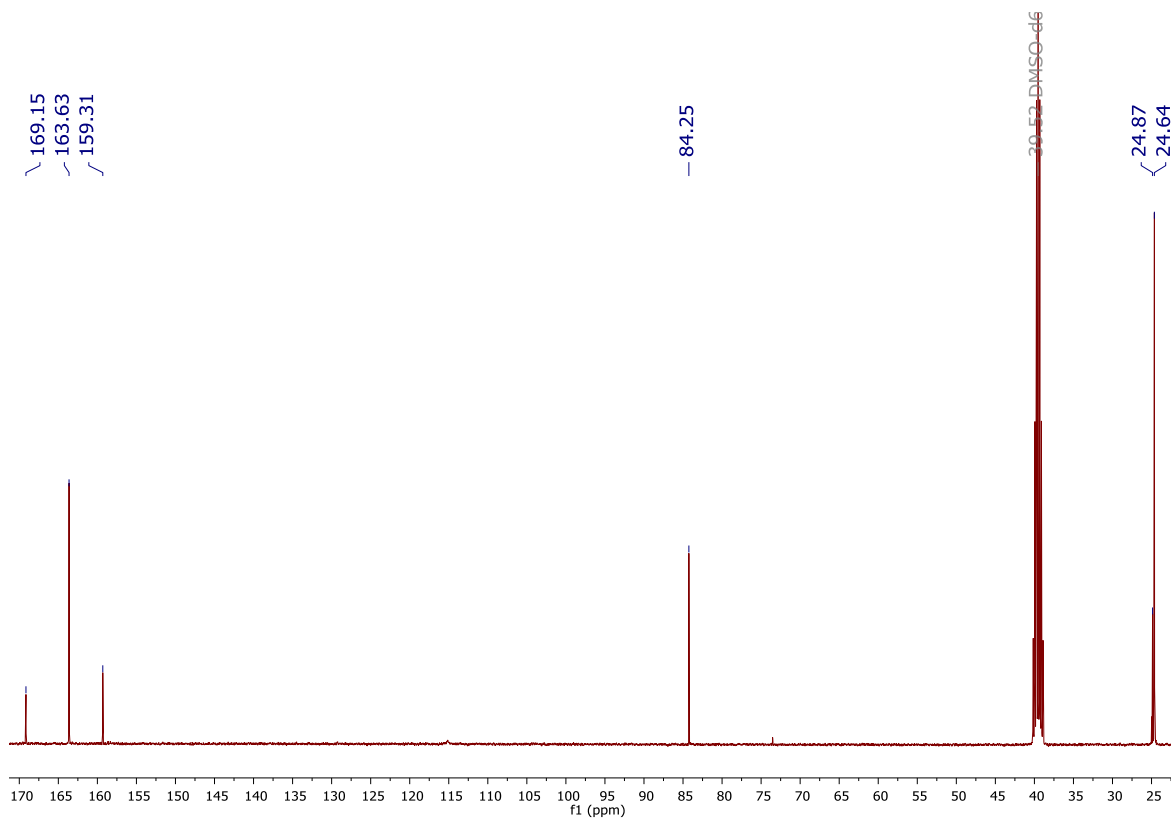
Espectro II-19. IR (FTIR por reflectancia ATR, cm⁻¹) del compuesto *N*-(5-bromopirimidin-2-il)acetamida (4)



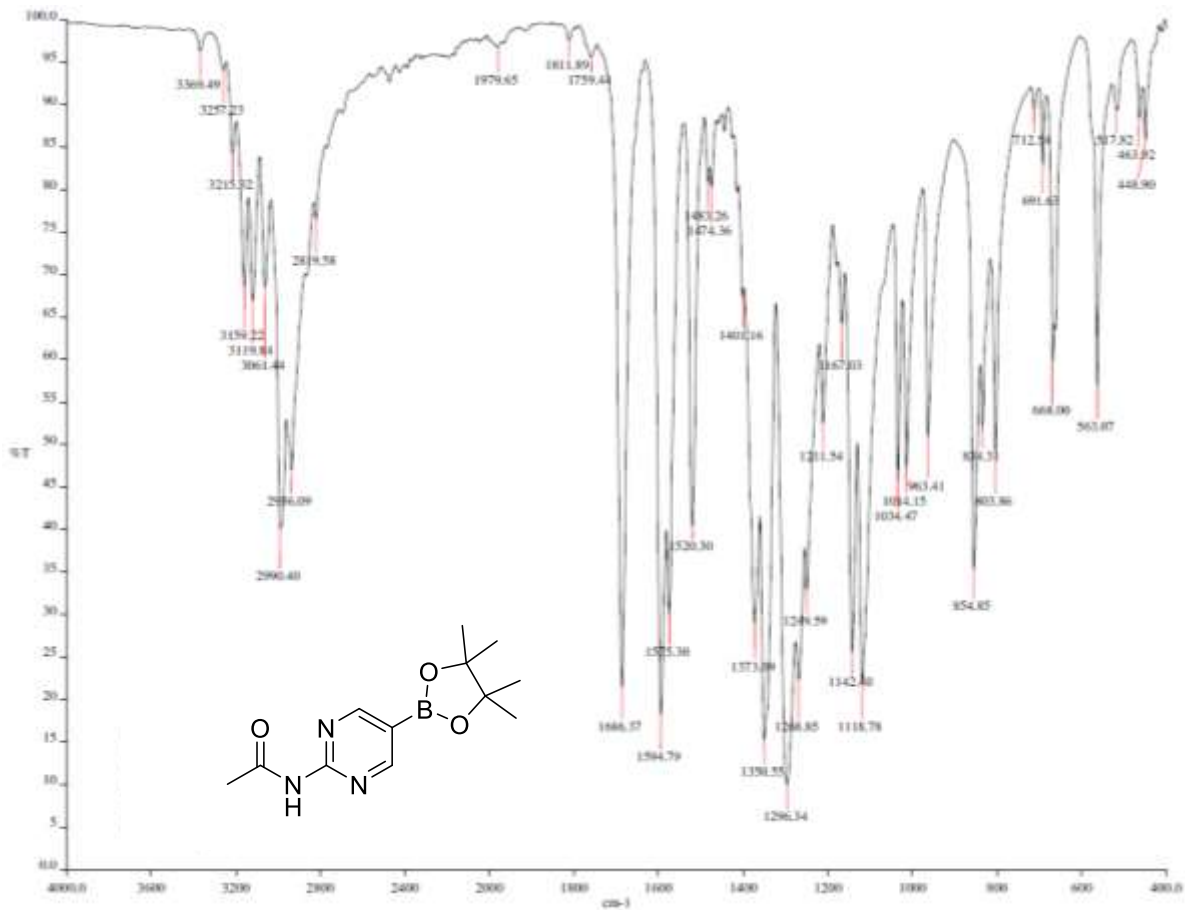
Espectro II-20. EM (IE, [M⁺], *m/z*) del compuesto *N*-(5-bromopirimidin-2-il)acetamida (4)



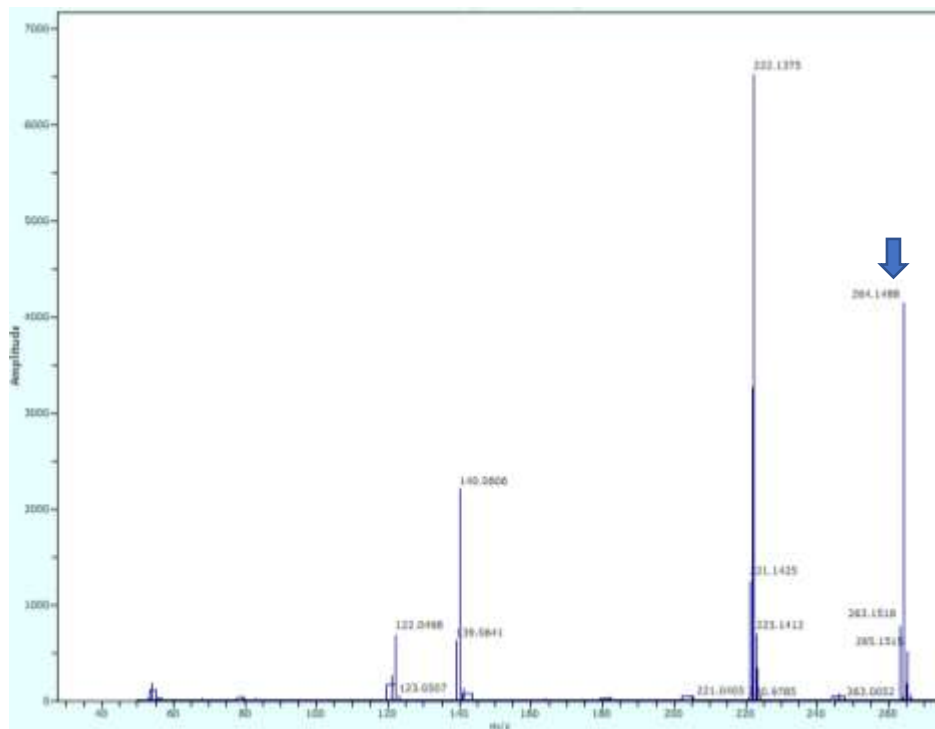
Espectro II-21. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz, δ ppm) del compuesto *N*-(5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3-dioxaborolan-2-il)pirimidin-2-il)acetamida (PYR)



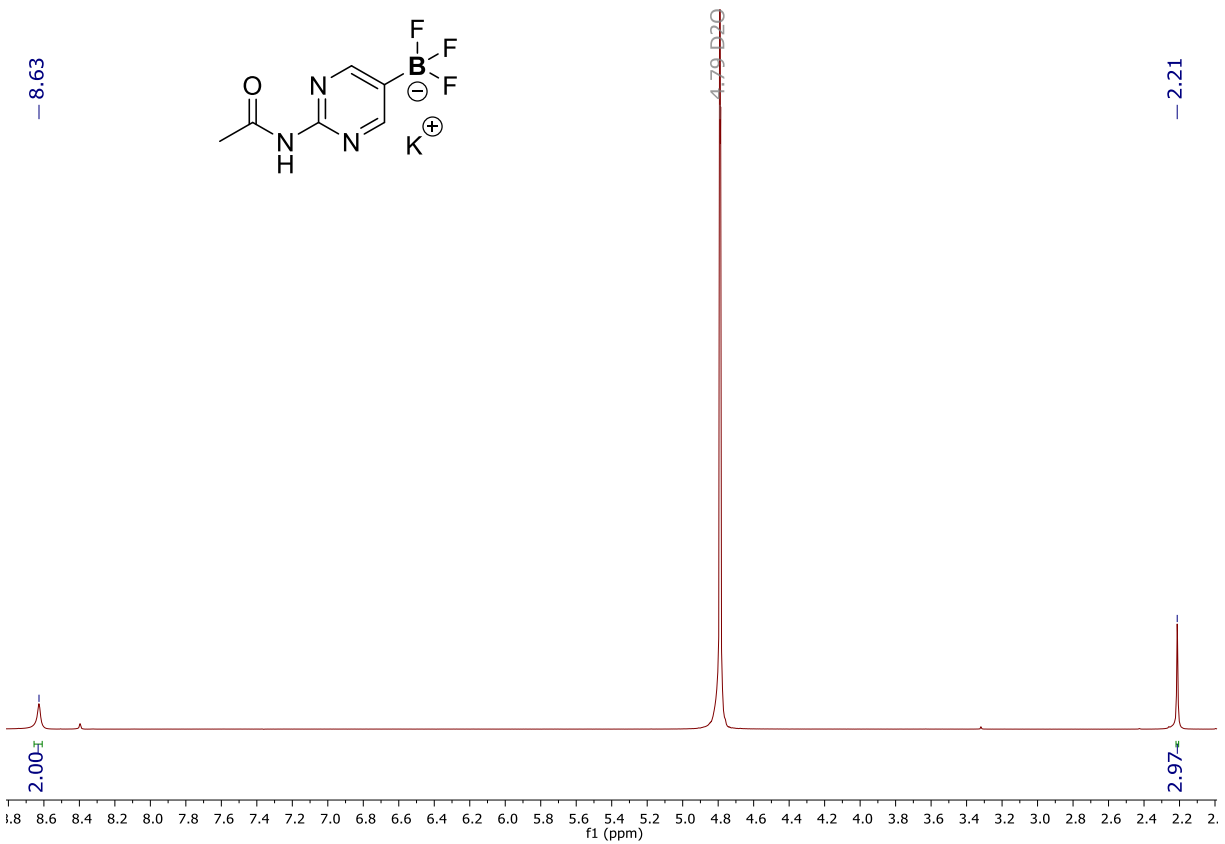
Espectro II-22. RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz, δ ppm) del compuesto *N*-(5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3-dioxaborolan-2-il)pirimidin-2-il)acetamida (PYR)



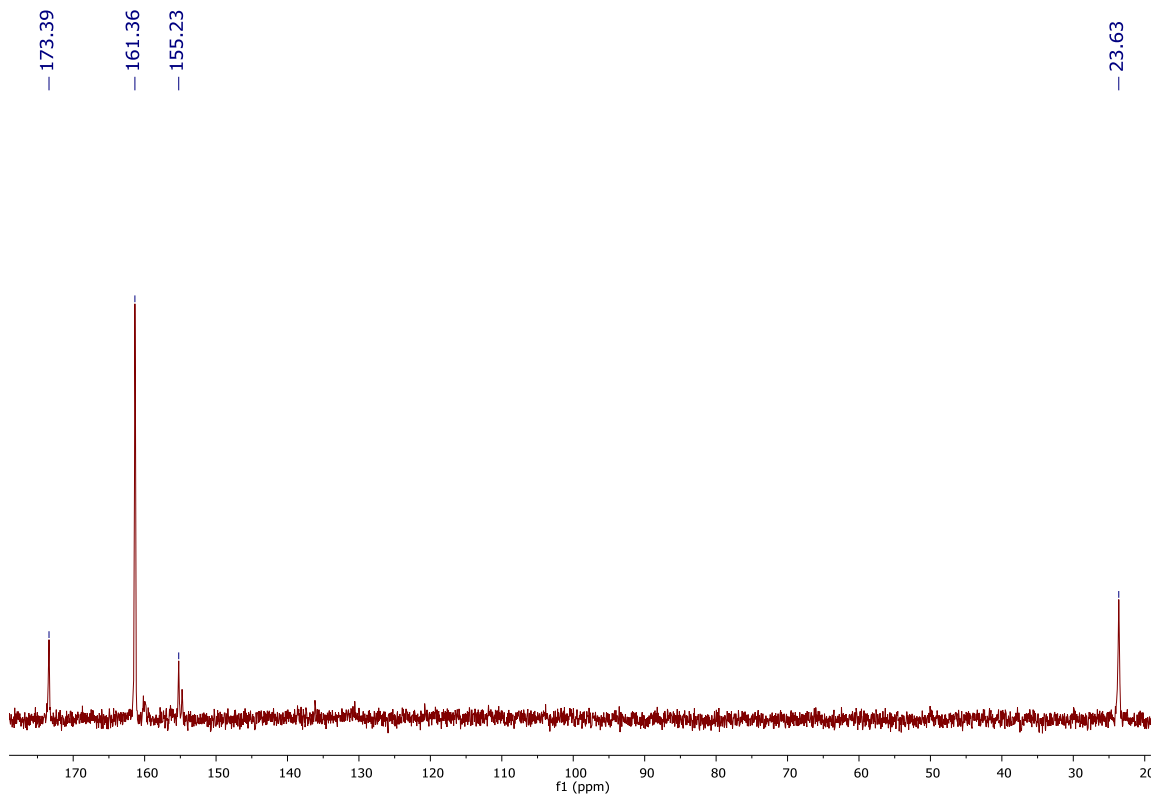
Espectro II-23. IR (FTIR por reflectancia ATR, cm⁻¹) del compuesto *N*-(5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)pirimidin-2-il)acetamida (PYR)



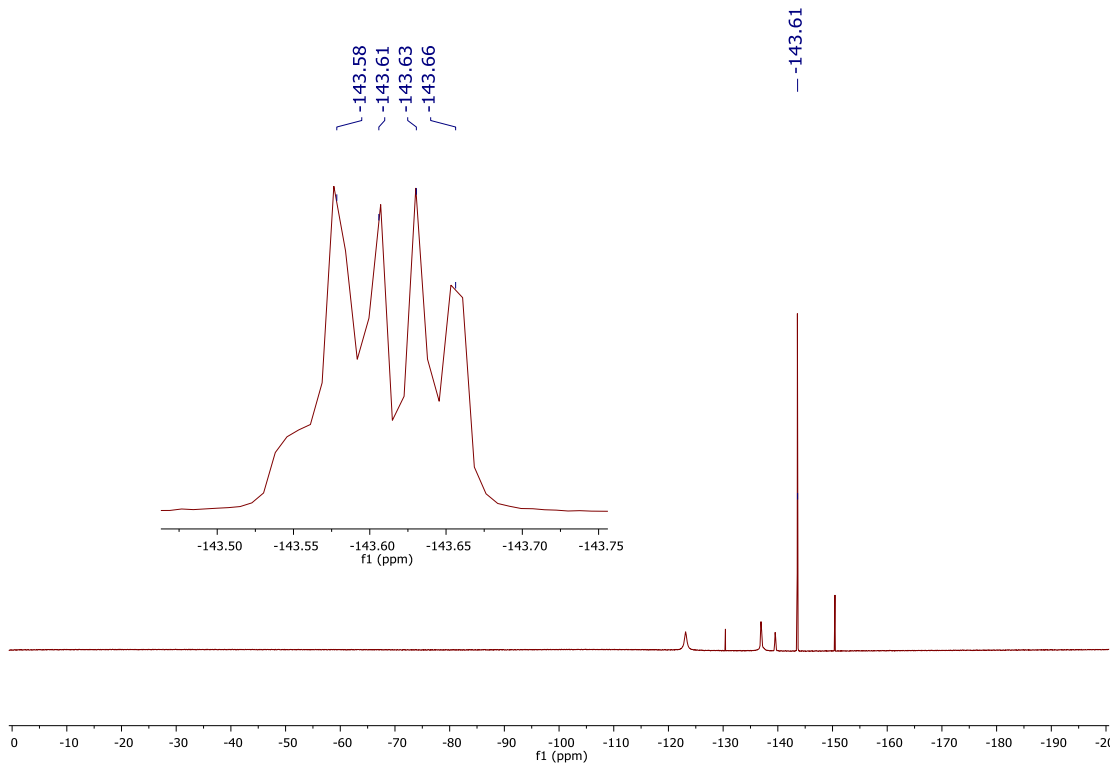
Espectro II-24. EM (APCI, [M + H]⁺, m/z) del compuesto *N*-(5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)pirimidin-2-il)acetamida (PYR)



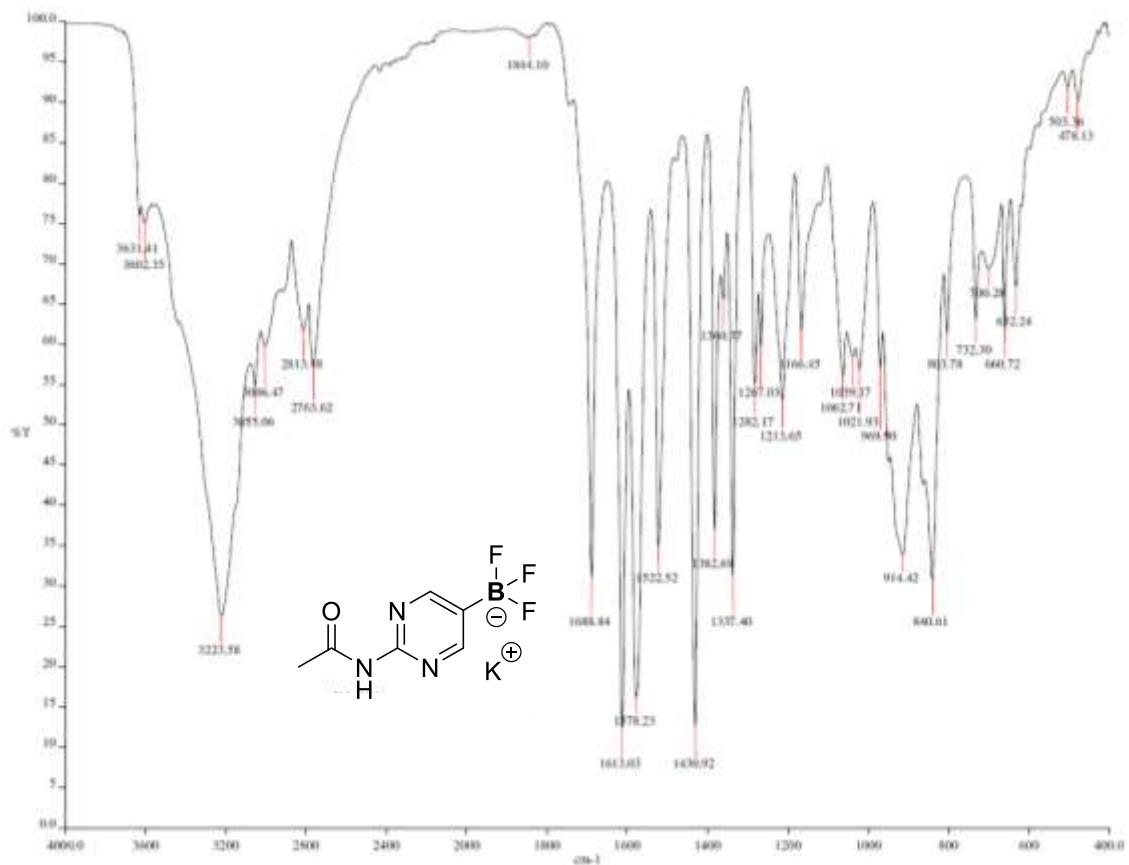
Espectro II-25. RMN ^1H (D_2O , 400 MHz, δ ppm) del compuesto [2-(acetilamino)pirimidin-5-il](trifluoro)borato de potasio (PYR1)



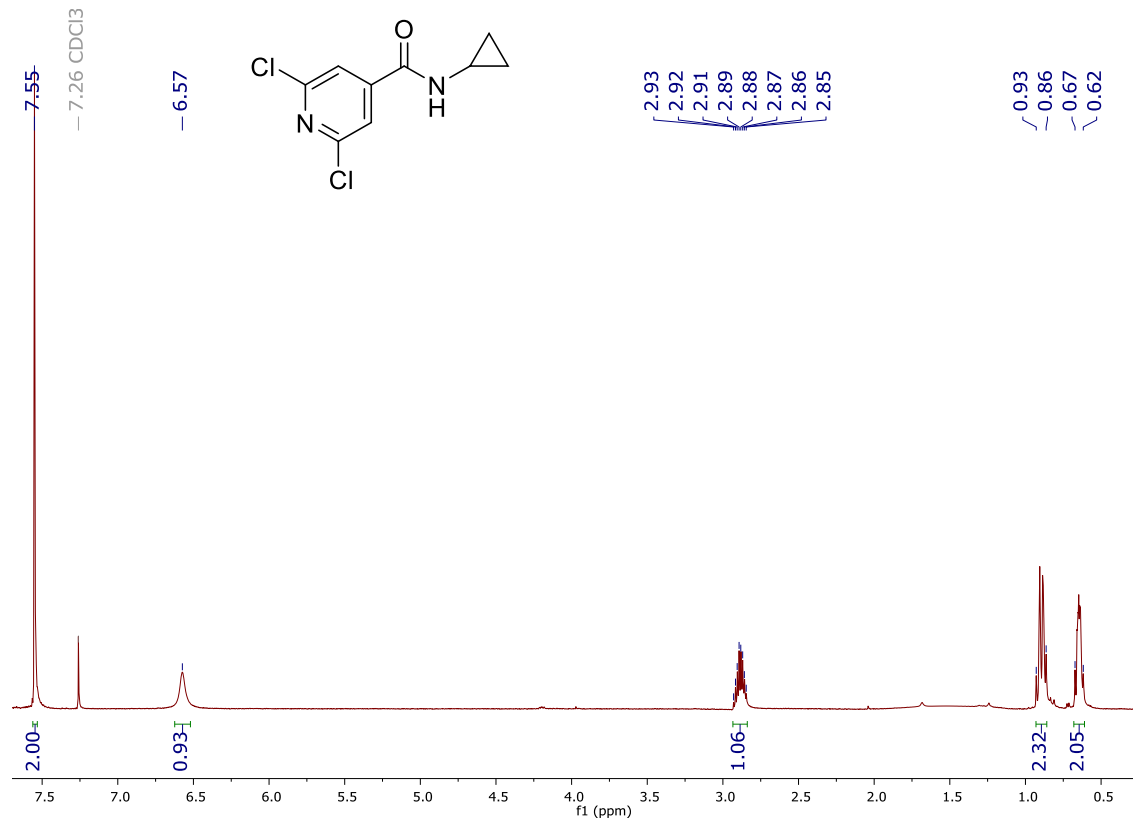
Espectro II-26. RMN ^{13}C (D_2O , 100 MHz, δ ppm) del compuesto [2-(acetilamino)pirimidin-5-il](trifluoro)borato de potasio (PYR1)



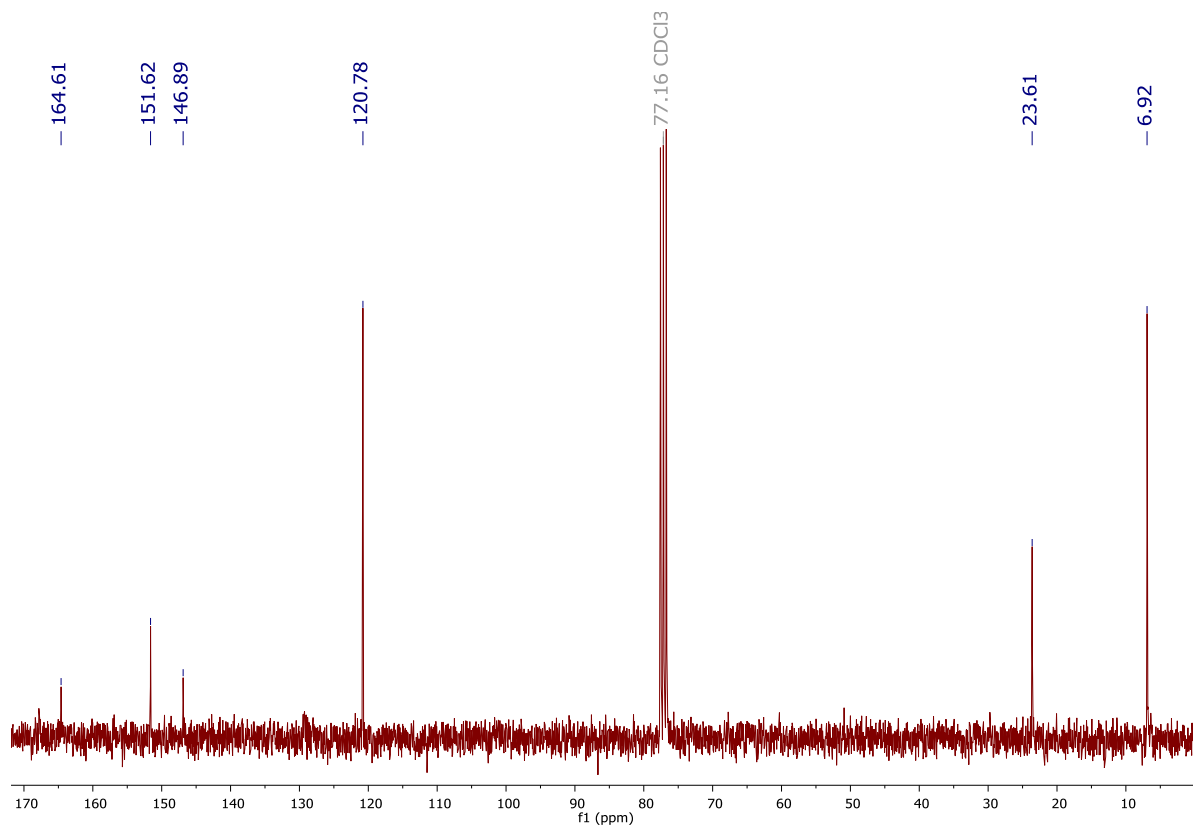
Espectro II-27. RMN ^{19}F (D_2O , 565 MHz, δ ppm) del compuesto [2-(acetilamino)pirimidin-5-il](trifluoro)borato de potasio (PYR1)



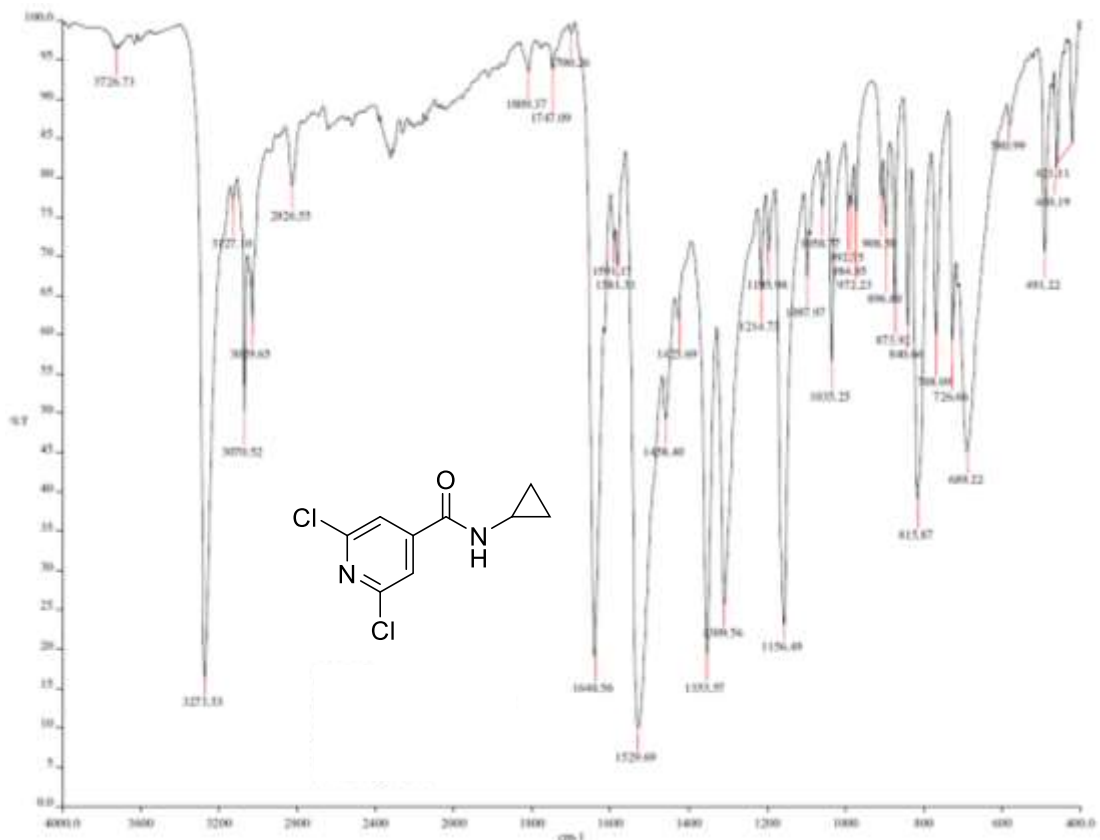
Espectro II-28. IR (FTIR por reflectancia ATR, cm^{-1}) del compuesto [2-(acetilamino)pirimidin-5-il](trifluoro)borato de potasio (PYR1)



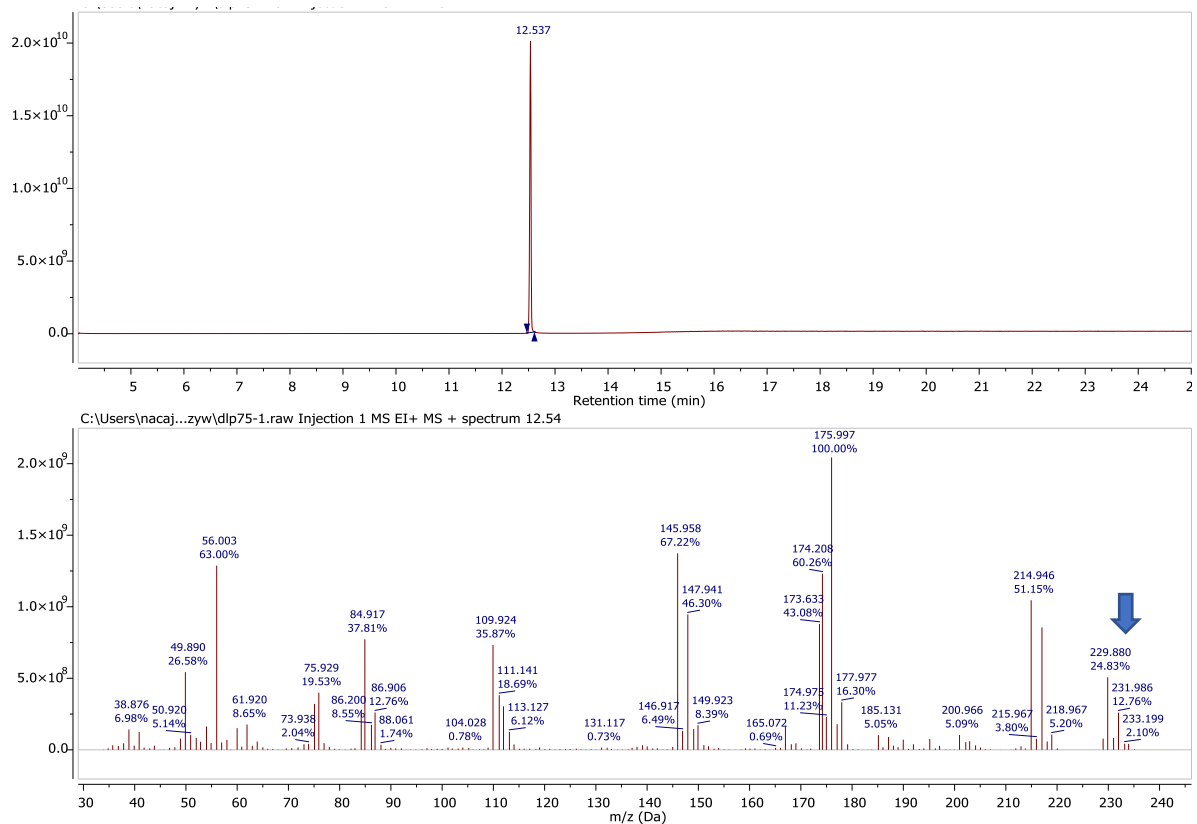
Espectro II-29. RMN ¹H (CDCl₃-d, 400 MHz, δ ppm) del compuesto 2,6-dicloro-N-ciclopropilpiridin-4-carboxamida (**AM3**)



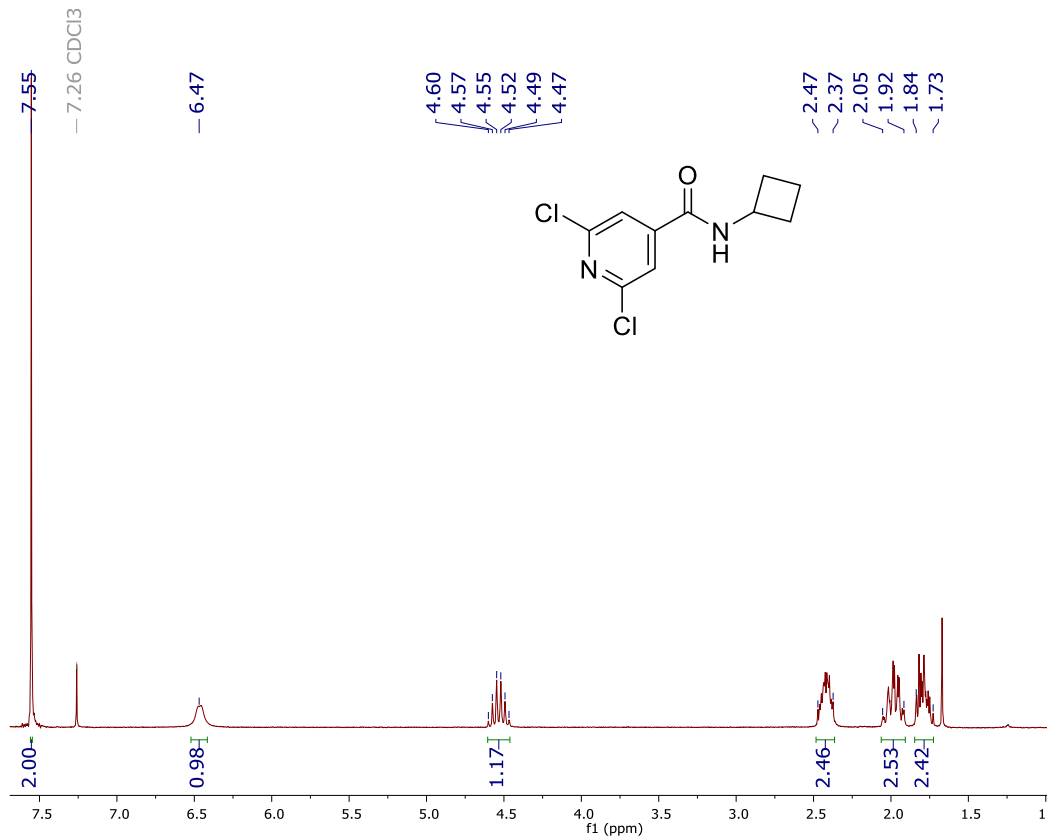
Espectro II-30. RMN ¹³C (CDCl₃-d, 100 MHz, δ ppm) del compuesto 2,6-dicloro-N-ciclopropilpiridin-4-carboxamida (**AM3**)



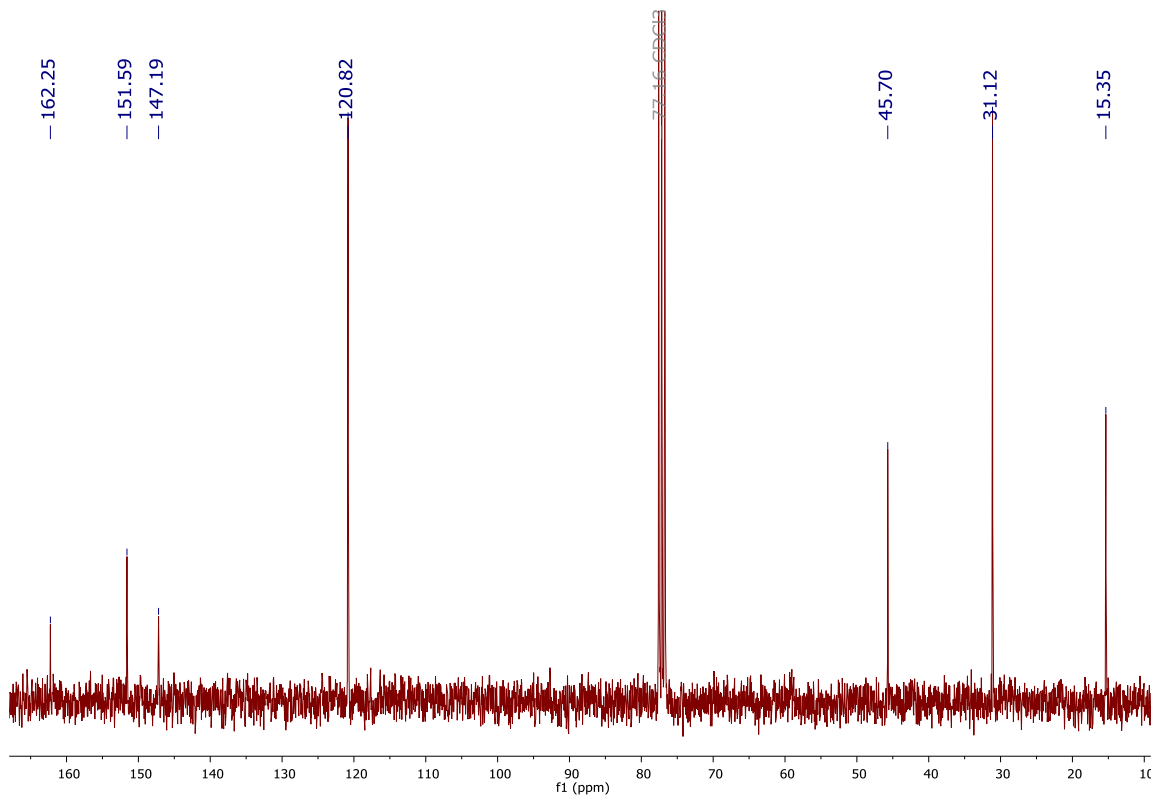
Espectro II-31. IR (FTIR por reflectancia ATR, cm^{-1}) del compuesto 2,6-dicloro-*N*-ciclopropilpiridin-4-carboxamida (**AM3**)



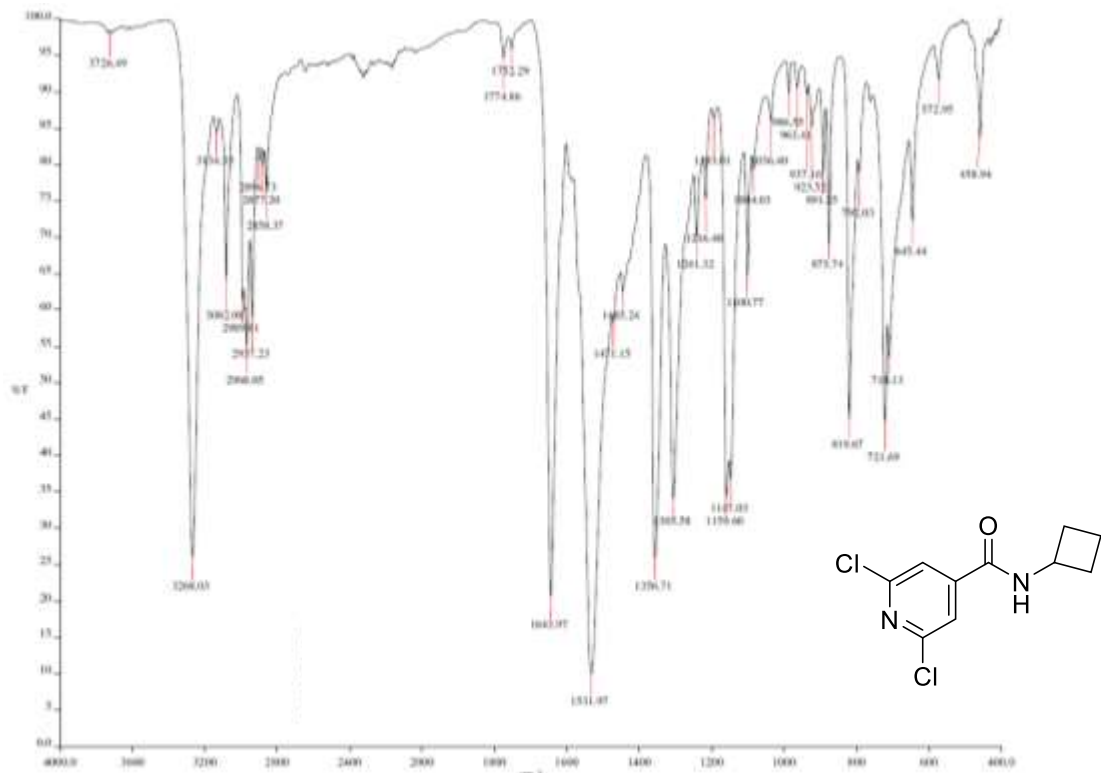
Espectro II-32. EM (IE, $[M^+]$, m/z) del compuesto 2,6-dicloro-*N*-ciclopropilpiridin-4-carboxamida (**AM3**)



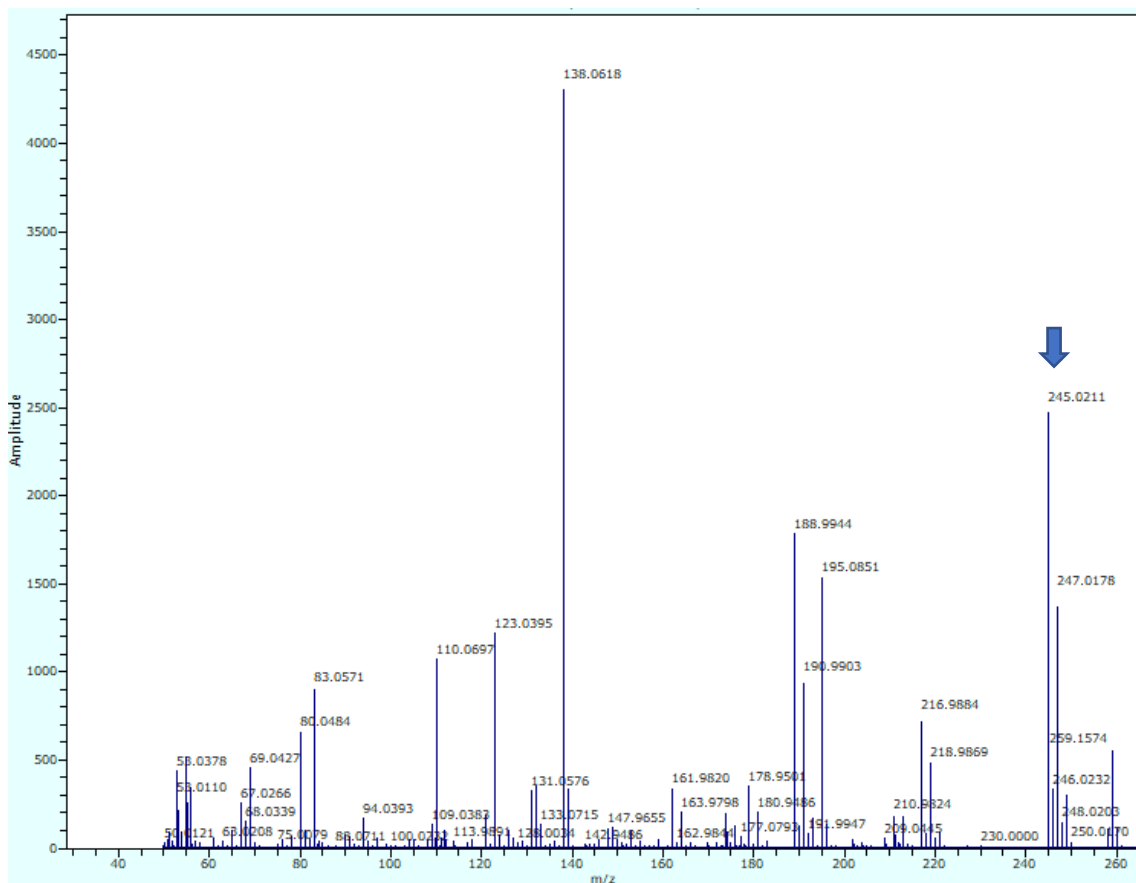
Espectro II-33. RMN ^1H (CDCl₃-d, 400 MHz, δ ppm) del compuesto 2,6-dicloro-N-ciclobutilpiridin-4-carboxamida (AM4)



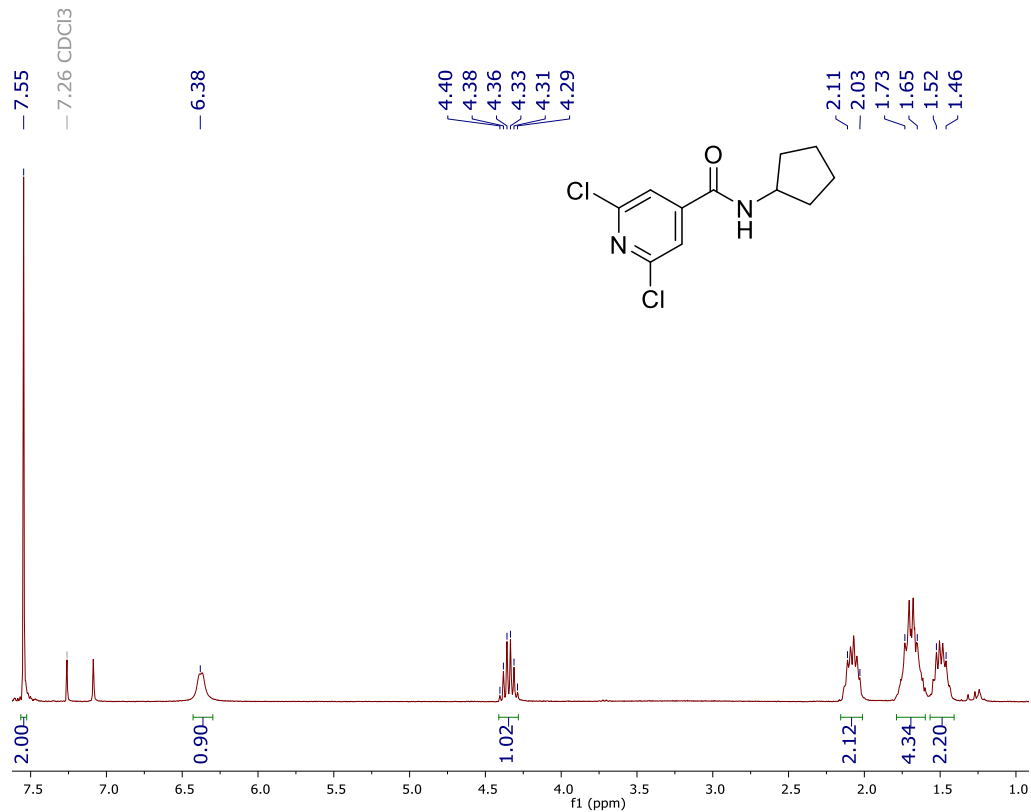
Espectro II-34. RMN ^{13}C (CDCl₃-d, 100 MHz, δ ppm) del compuesto 2,6-dicloro-N-ciclobutilpiridin-4-carboxamida (AM4)



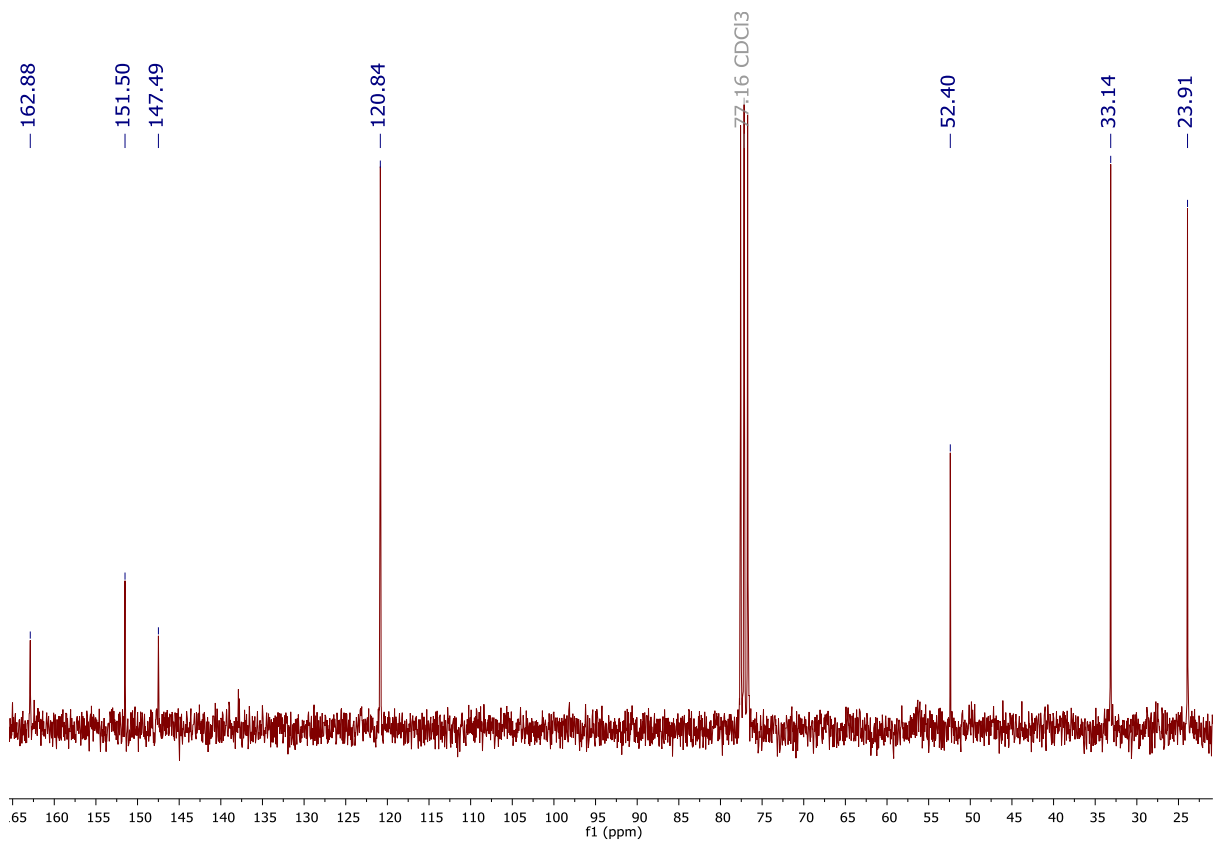
Espectro II-35. IR (FTIR por reflectancia ATR, cm^{-1}) del compuesto 2,6-dicloro-*N*-ciclobutilpiridin-4-carboxamida (**AM4**)



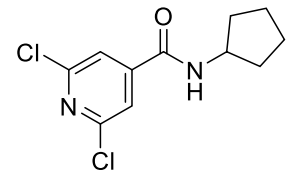
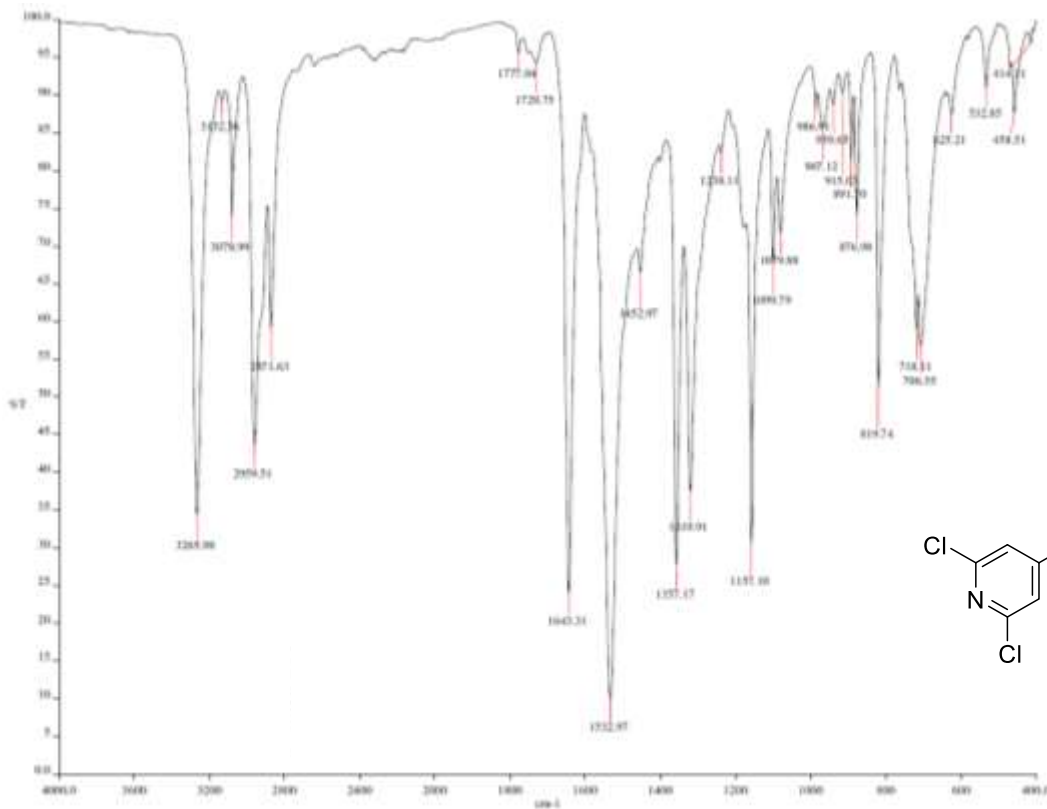
Espectro II-36. EM (APCI, $[\text{M} + \text{H}]^+$, m/z) del compuesto 2,6-dicloro-*N*-ciclobutilpiridin-4-carboxamida (**AM4**)



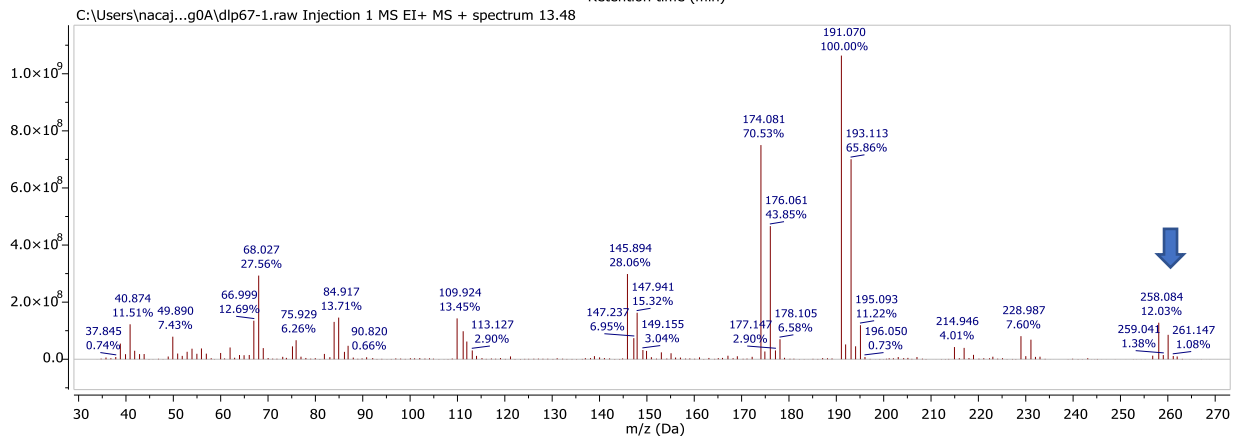
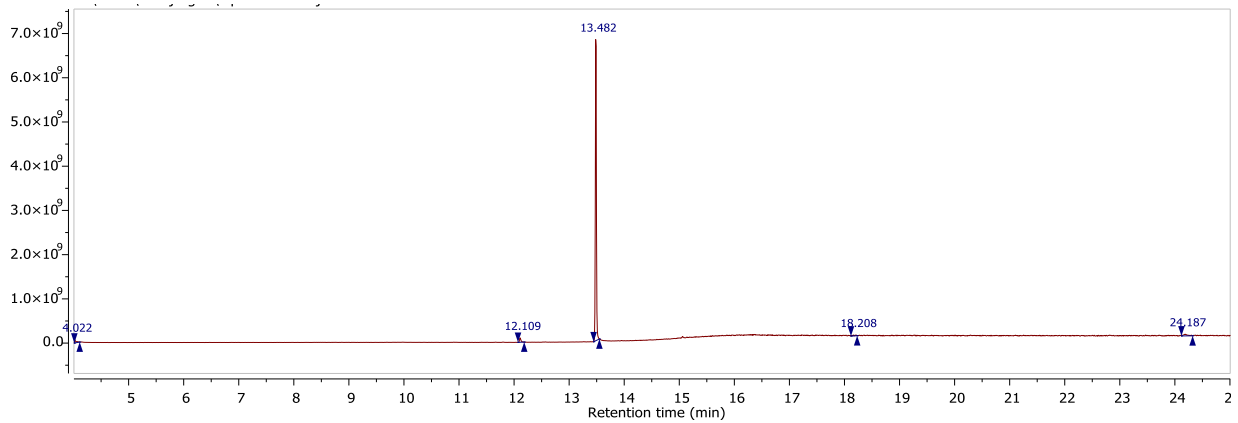
Espectro II-37. RMN ^1H (CDCl_3 -*d*, 400 MHz, δ ppm) del compuesto 2,6-dicloro-*N*-ciclopentilpiridin-4-carboxamida (**AM5**)



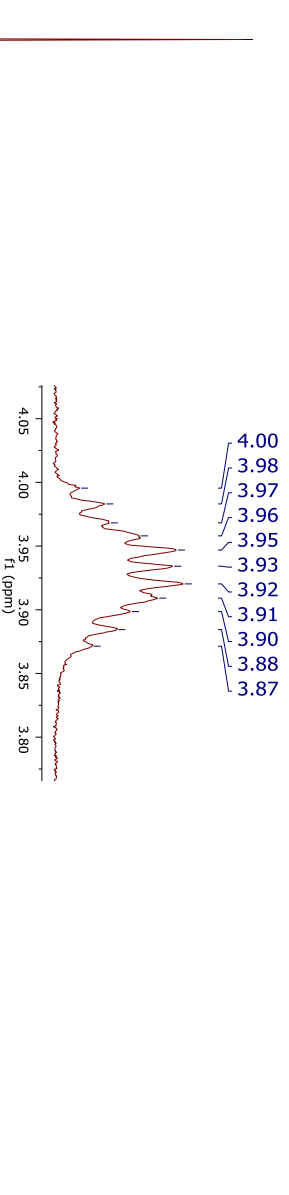
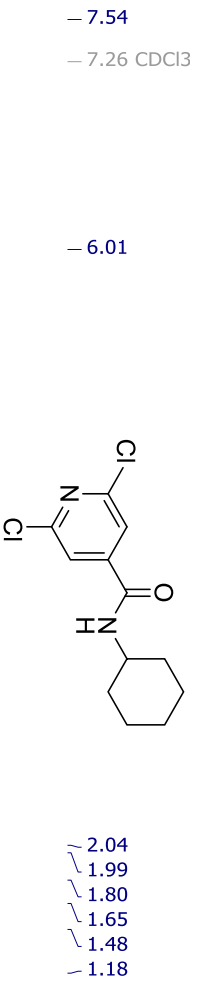
Espectro II-38. RMN ^{13}C (CDCl_3 -*d*, 100 MHz, δ ppm) del compuesto 2,6-dicloro-*N*-ciclopentilpiridin-4-carboxamida (**AM5**)



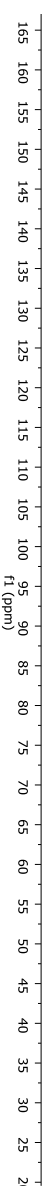
Espectro II-39. IR (FTIR por reflectancia ATR, cm^{-1}) del compuesto 2,6-dicloro-*N*-ciclopentilpiridin-4-carboxamida (**AM5**)



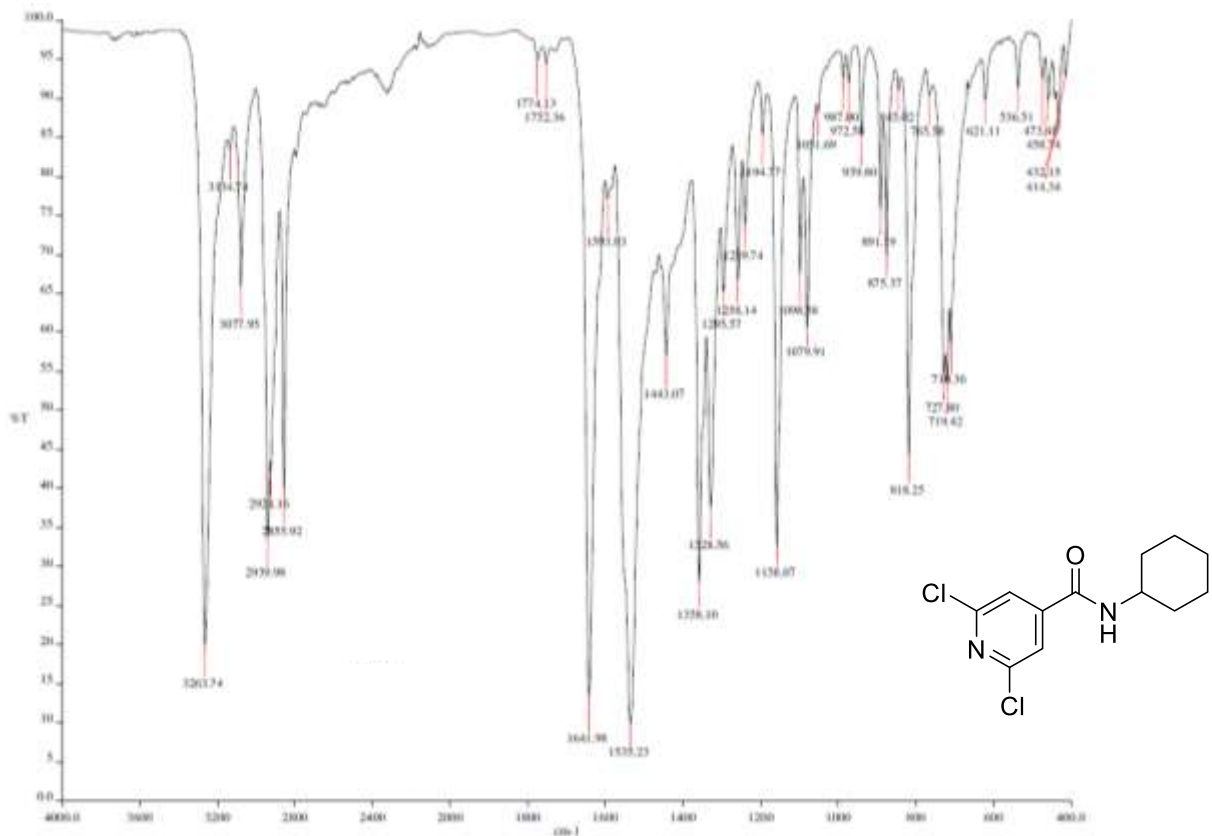
Espectro II-40. EM (IE, $[M^+]$, m/z) del compuesto 2,6-dicloro-*N*-ciclopentilpiridin-4-carboxamida (**AM5**)



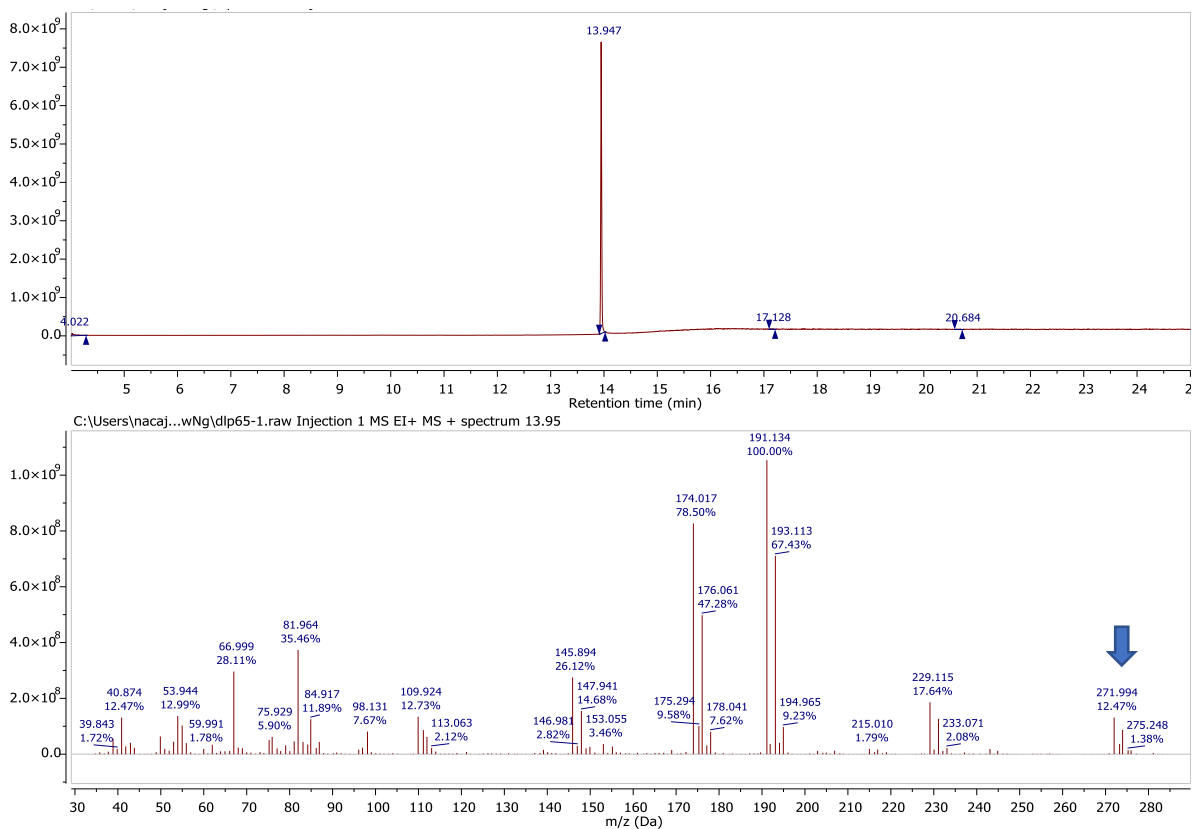
Espectro II-41. RMN ¹H (CDCl₃-d, 400 MHz, δ ppm) del compuesto 2,6-dicloro-N-ciclohexilpiridin-4-carboxamida (**AM6**)



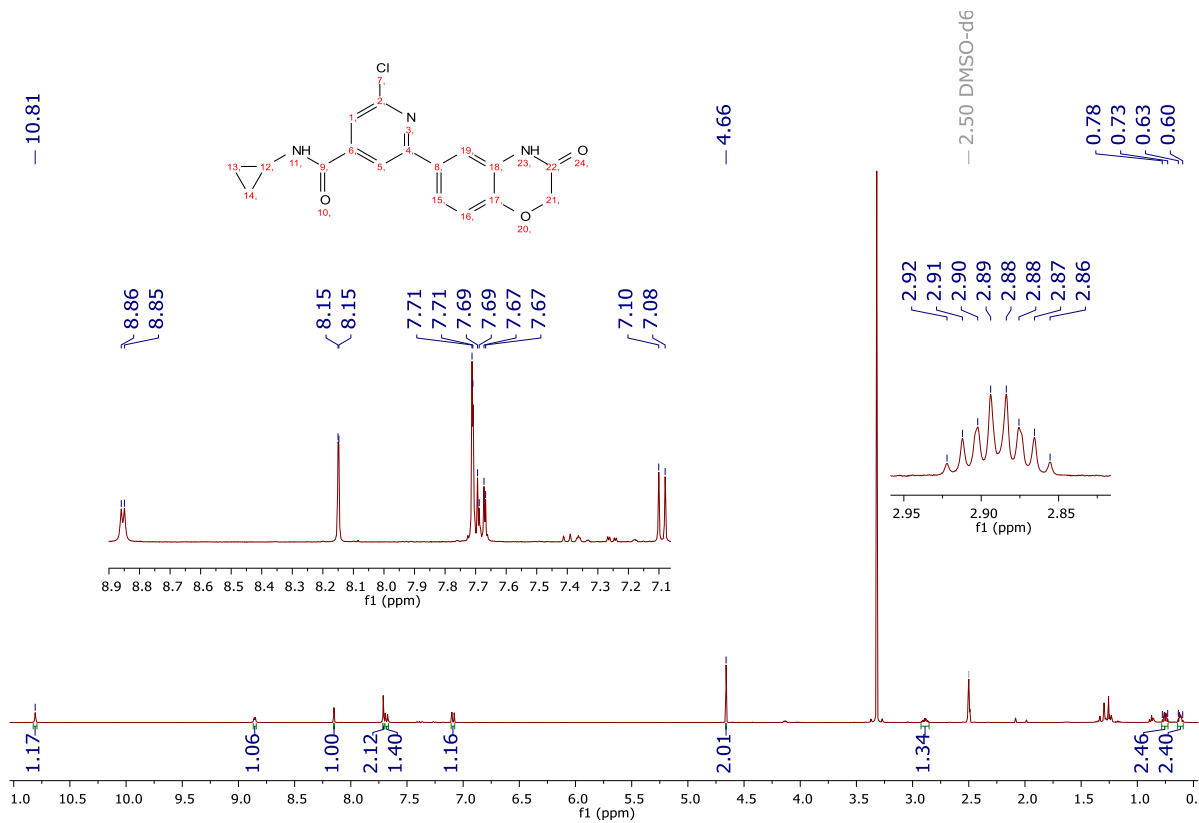
Espectro II-42. RMN ¹³C (CDCl₃-d, 100 MHz, δ ppm) del compuesto 2,6-dicloro-N-ciclohexilpiridin-4-carboxamida (**AM6**)



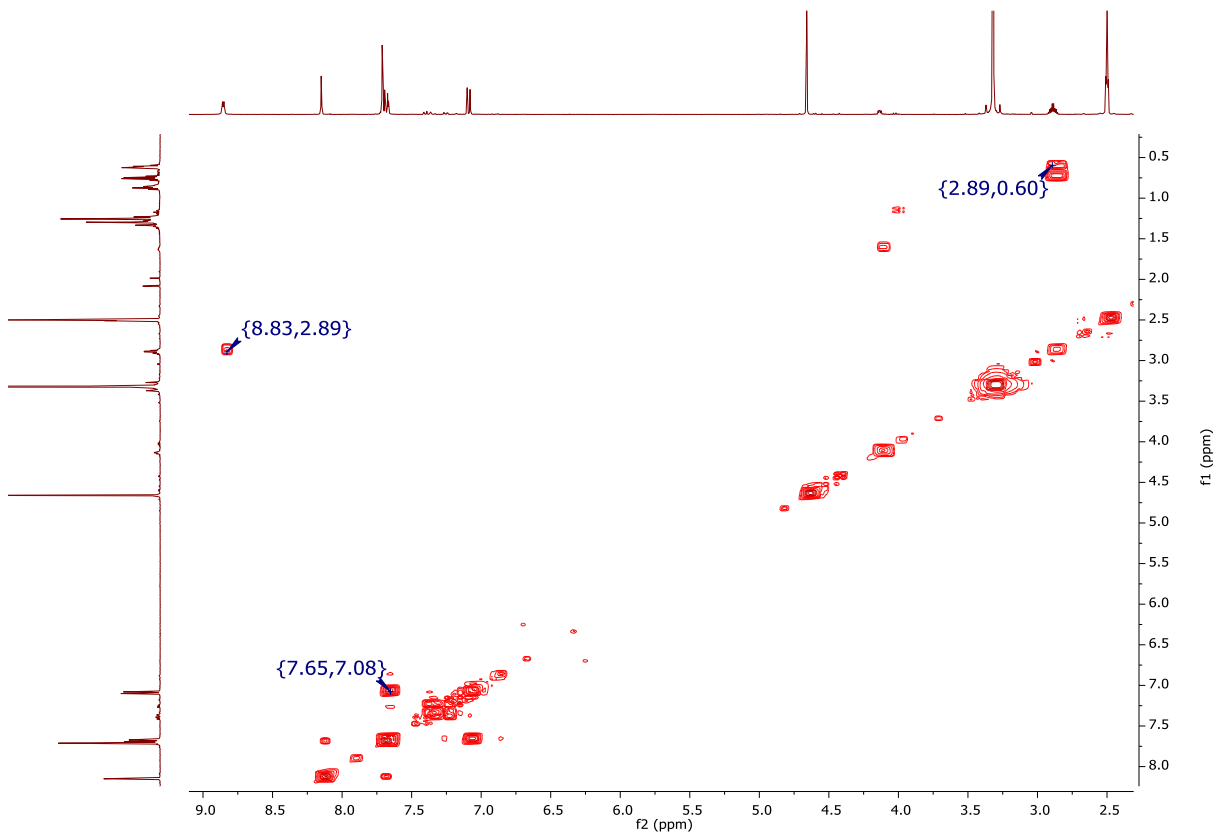
Espectro II-43. IR (FTIR por reflectancia ATR, cm^{-1}) del compuesto 2,6-dicloro-*N*-ciclohexilpiridin-4-carboxamida (**AM6**)



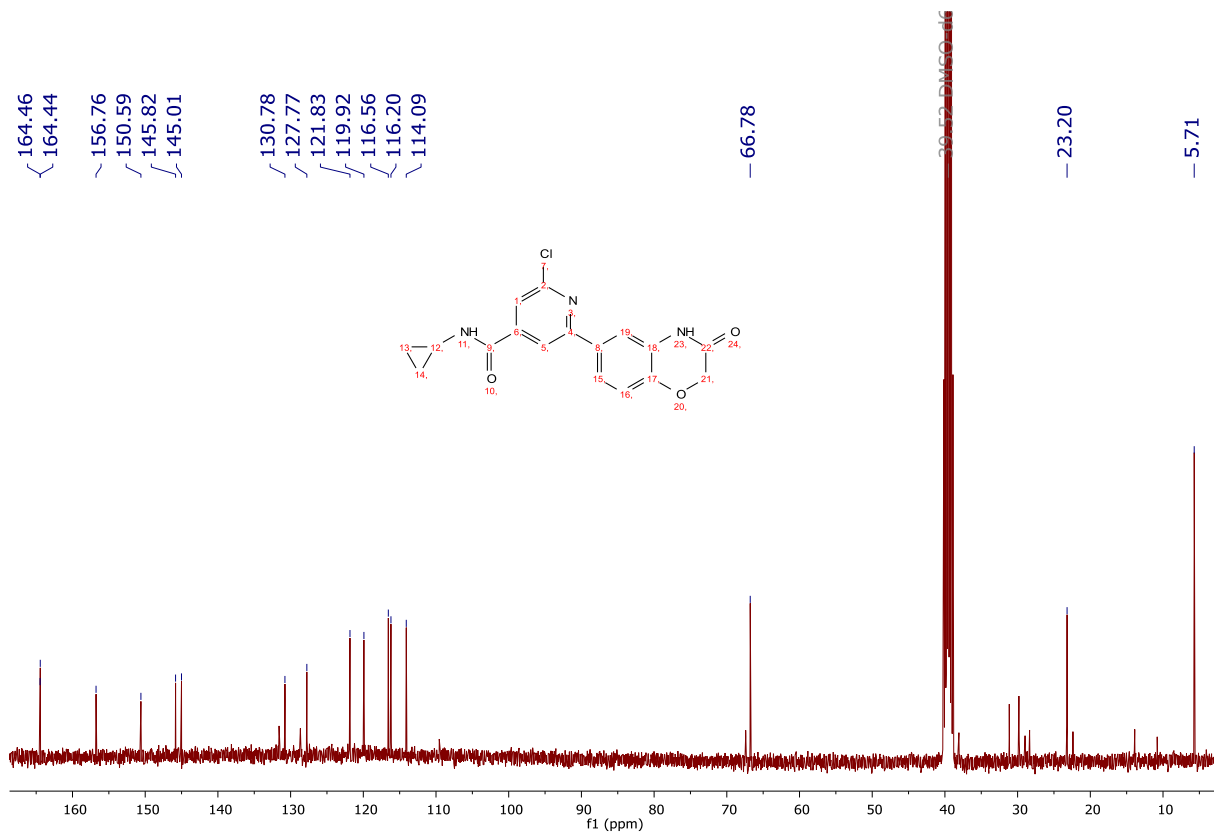
Espectro II-44. EM (IE, $[M^+]$, m/z) del compuesto 2,6-dicloro-*N*-ciclohexilpiridin-4-carboxamida (**AM6**)



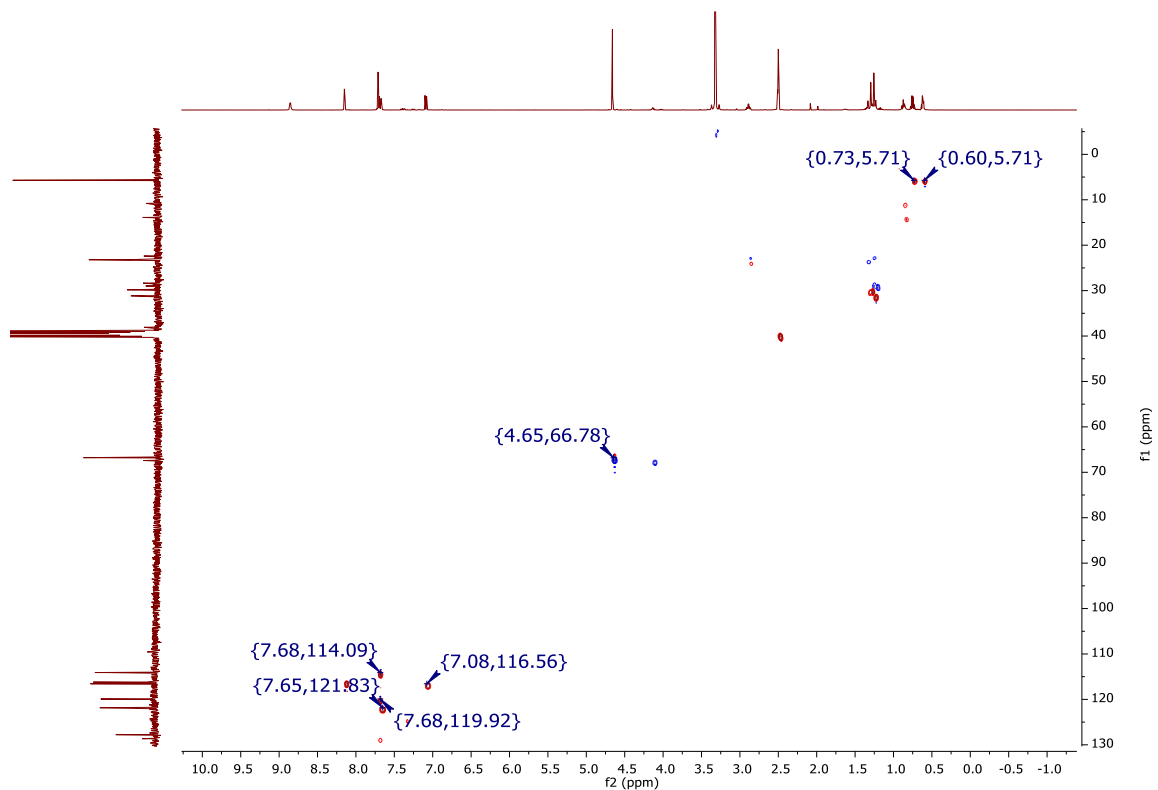
Espectro II-45. RMN ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz, δ en ppm) del compuesto 2-cloro-N-ciclopropil-6-(3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (DLPMB3)



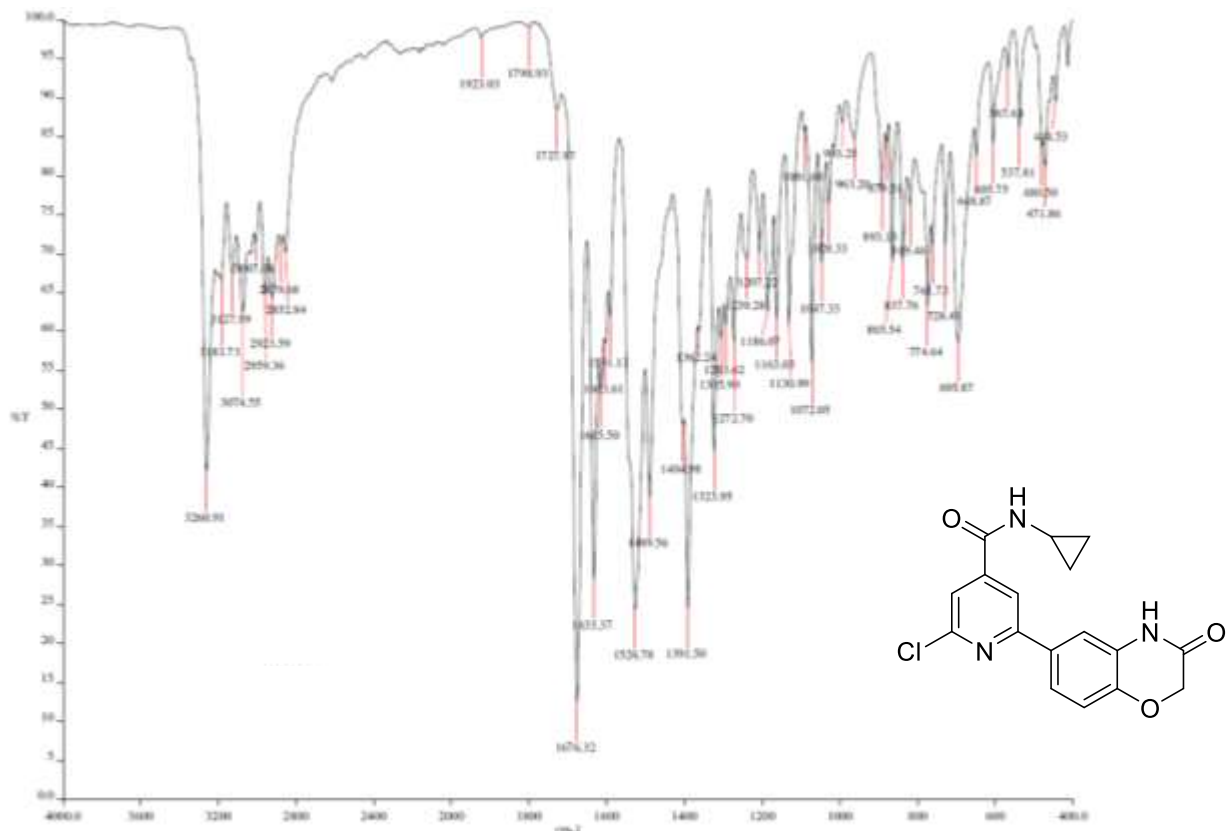
Espectro II-46. RMN ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz, δ ppm). Experimento COSY del compuesto 2-cloro-N-ciclopropil-6-(3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (DLPMB3)



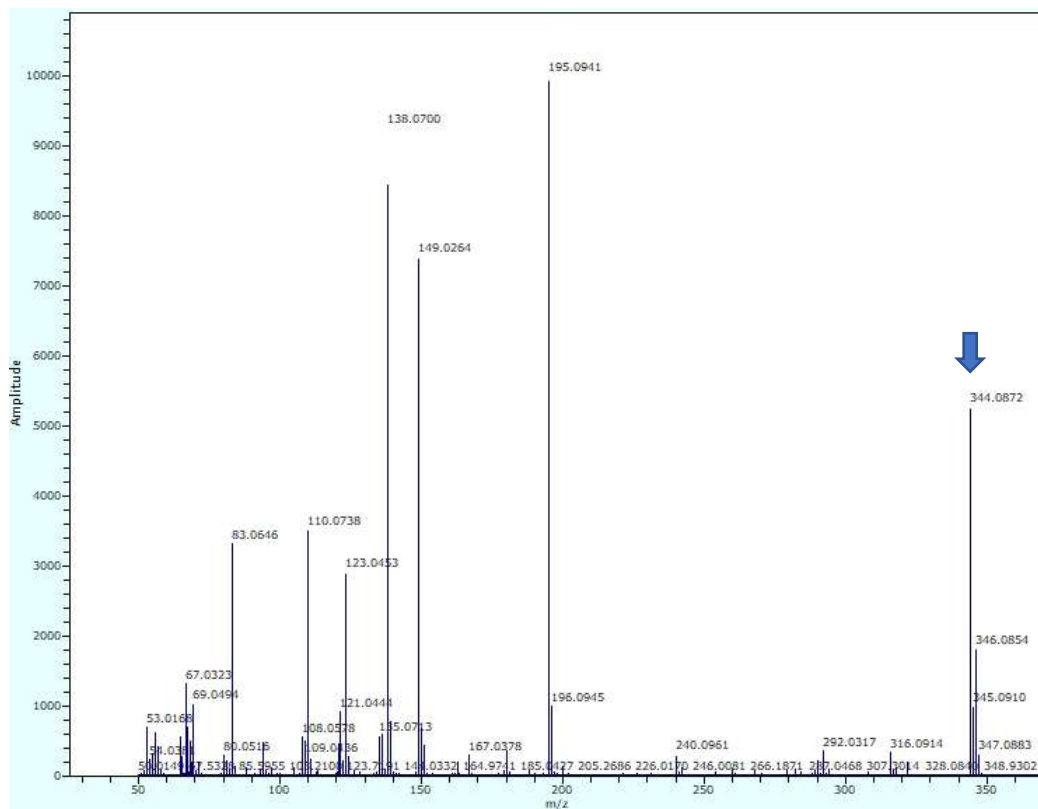
Espectro II-47. RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz, δ en ppm) del compuesto 2-cloro-*N*-ciclopropil-6-(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (DLPMB3)



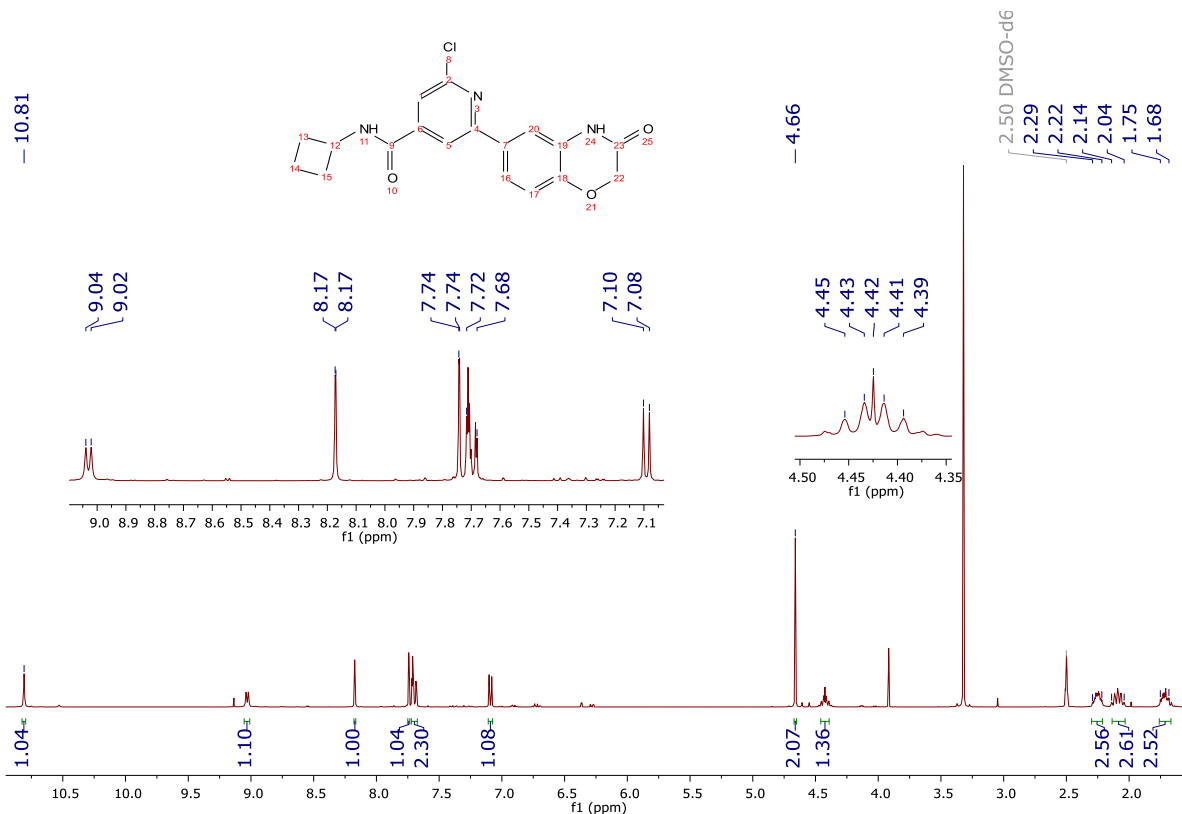
Espectro II-48. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ ppm). RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz, δ en ppm). Experimento HSQC del compuesto 2-cloro-*N*-ciclopropil-6-(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (DLPMB3)



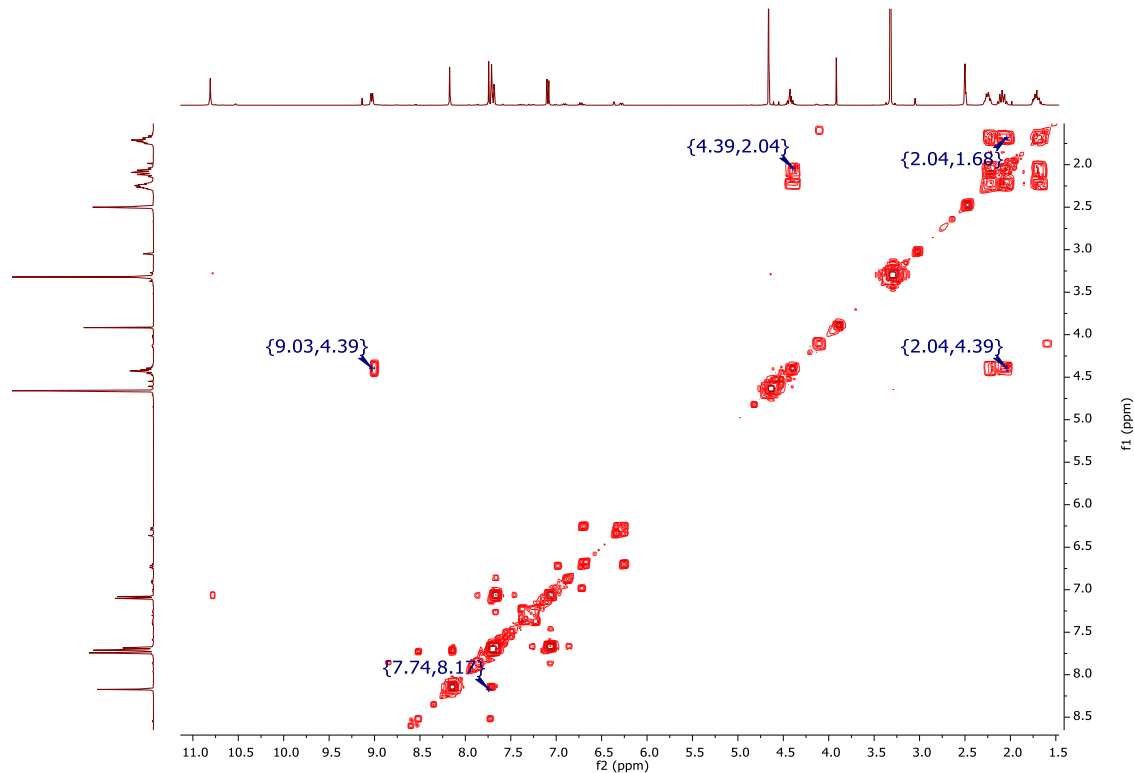
Espectro II-49. IR (FTIR por reflectancia ATR, cm^{-1}) del compuesto 2-cloro-*N*-ciclopropil-6-(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (**DLPMB3**)



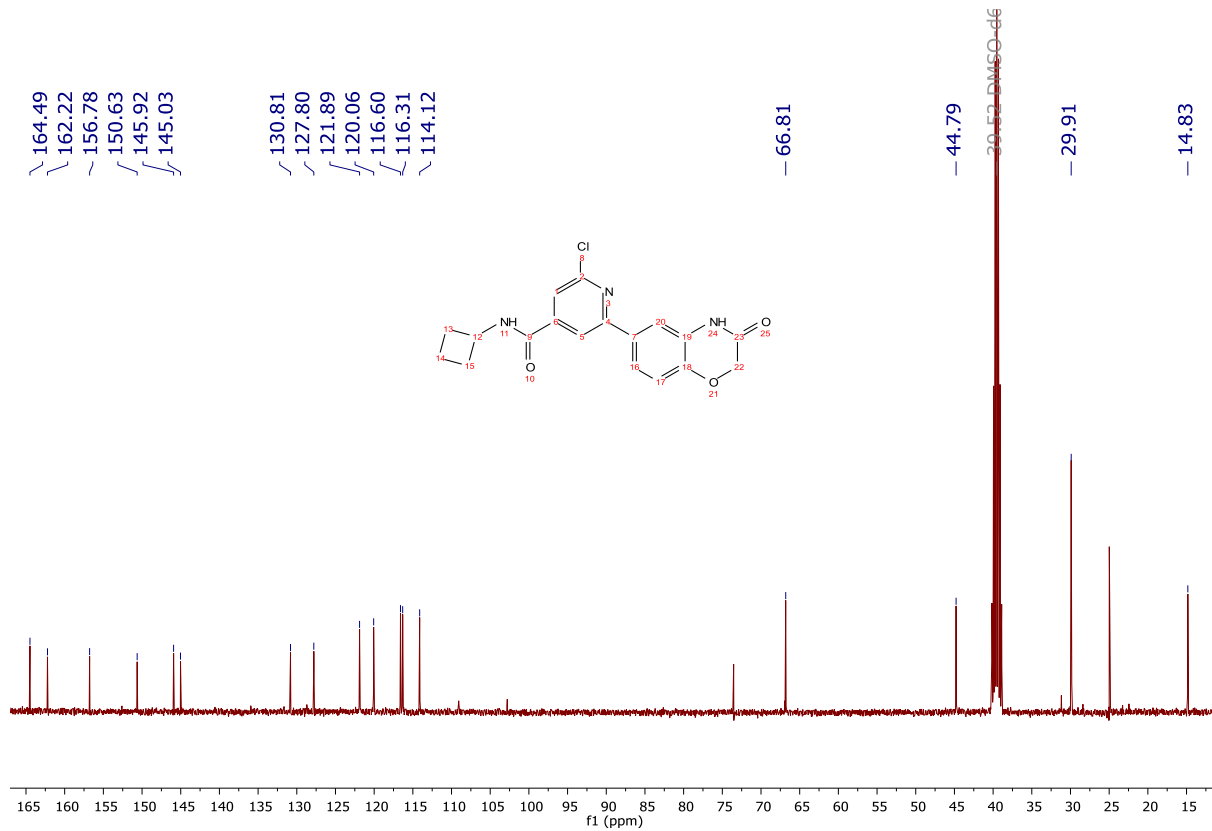
Espectro II-50. EM (APCI, $[\text{M} + \text{H}]^+$, m/z) del compuesto 2-cloro-*N*-ciclopropil-6-(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (**DLPMB3**)



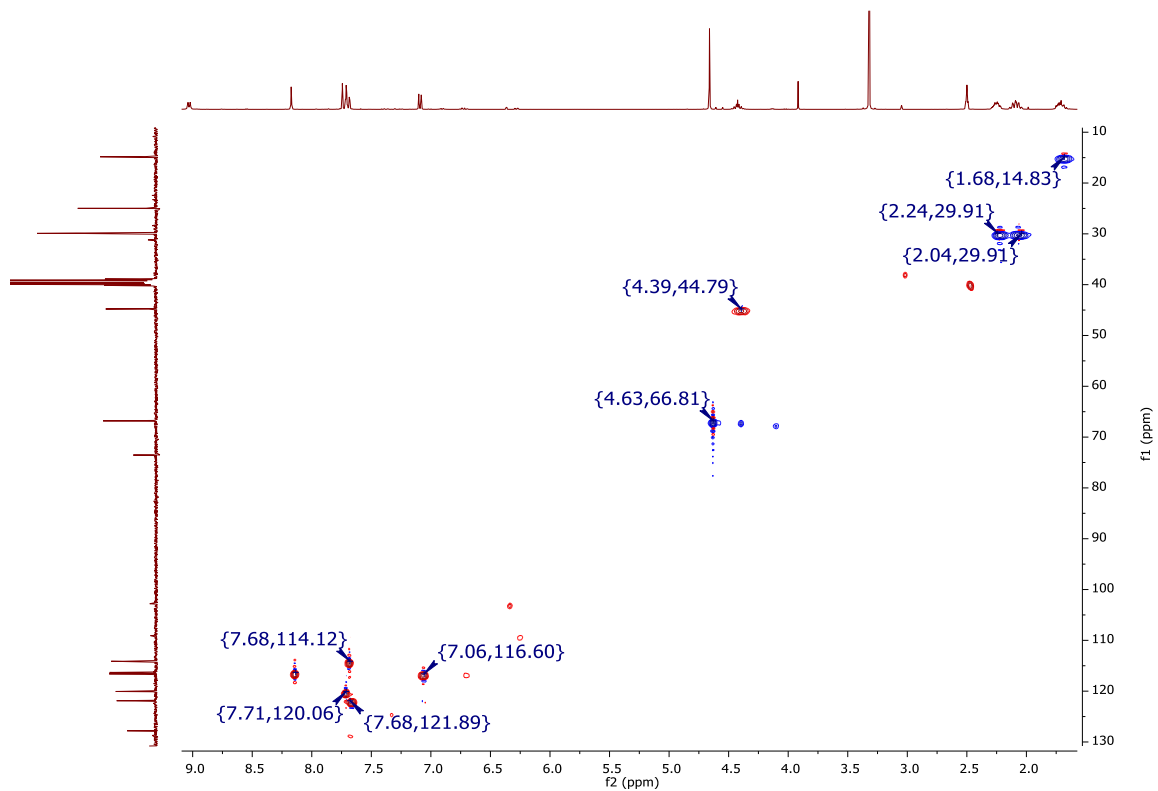
Espectro II-51. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ en ppm) del compuesto 2-cloro-N-ciclobutil-6-(3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (**DLPMB4**)



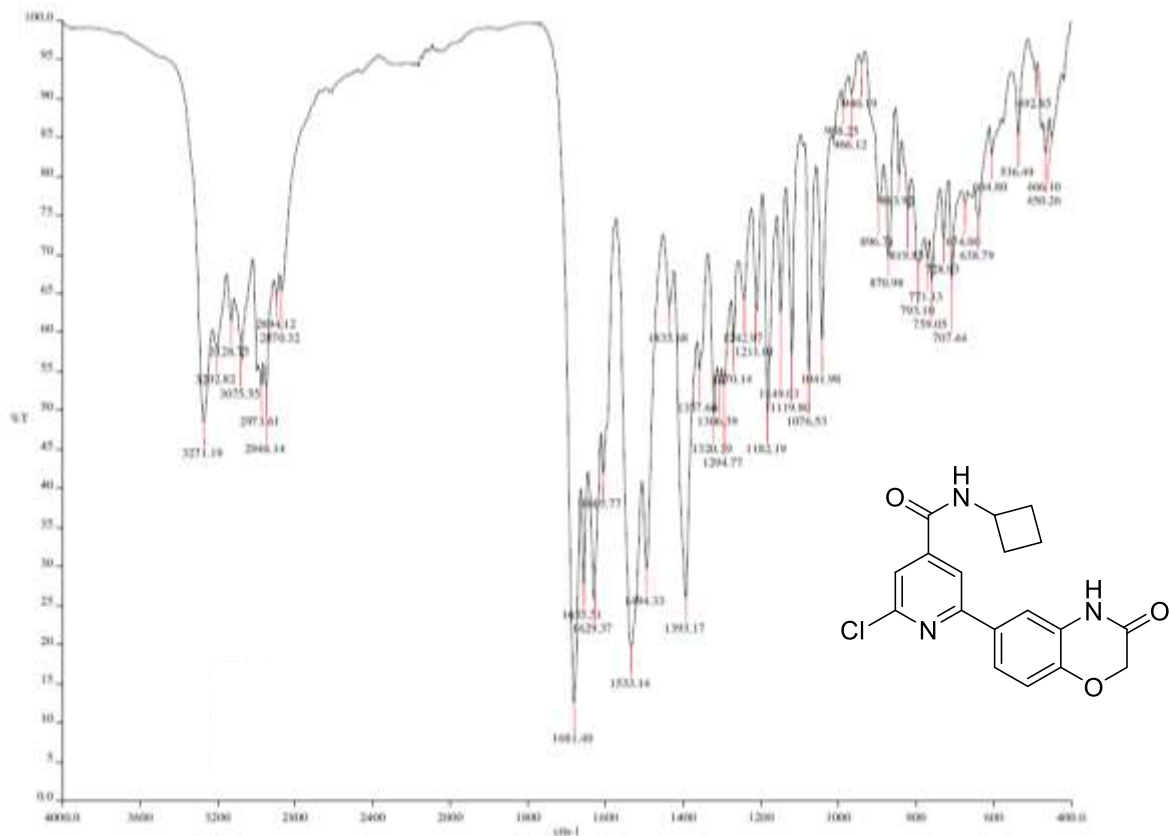
Espectro II-52. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ ppm). Experimento COSY del compuesto 2-cloro-N-ciclobutil-6-(3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (**DLPMB4**)



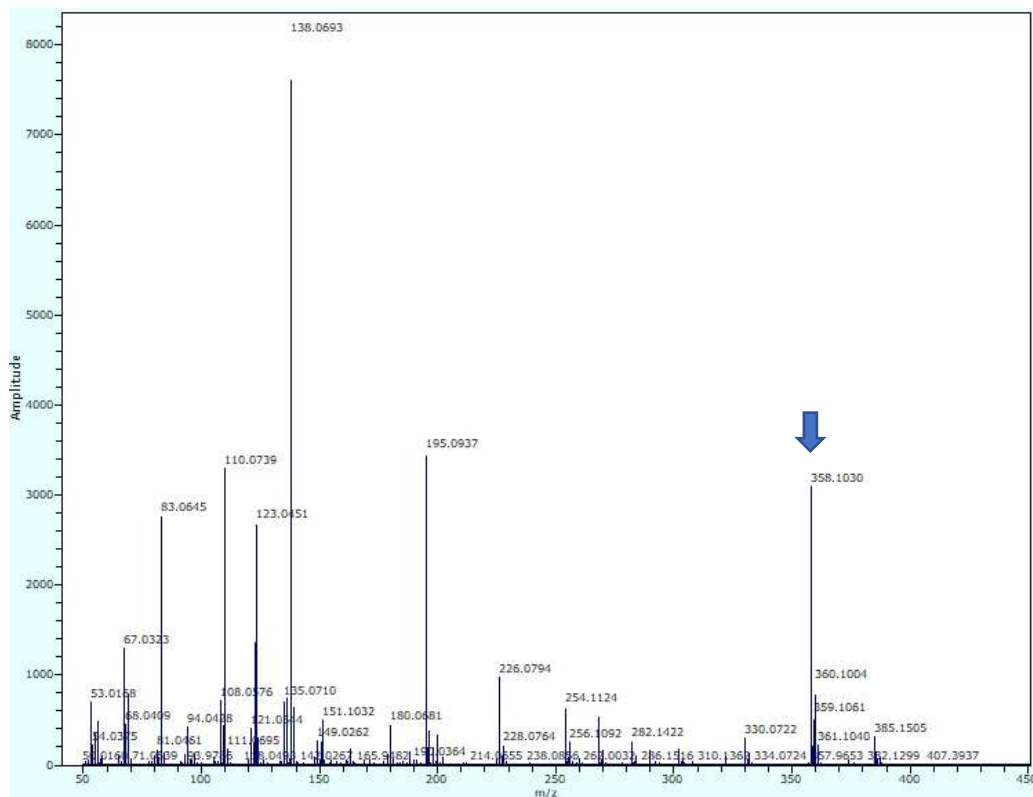
Espectro II-53. RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz, δ en ppm) del compuesto 2-cloro-*N*-ciclobutil-6-(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (**DLPMB4**)



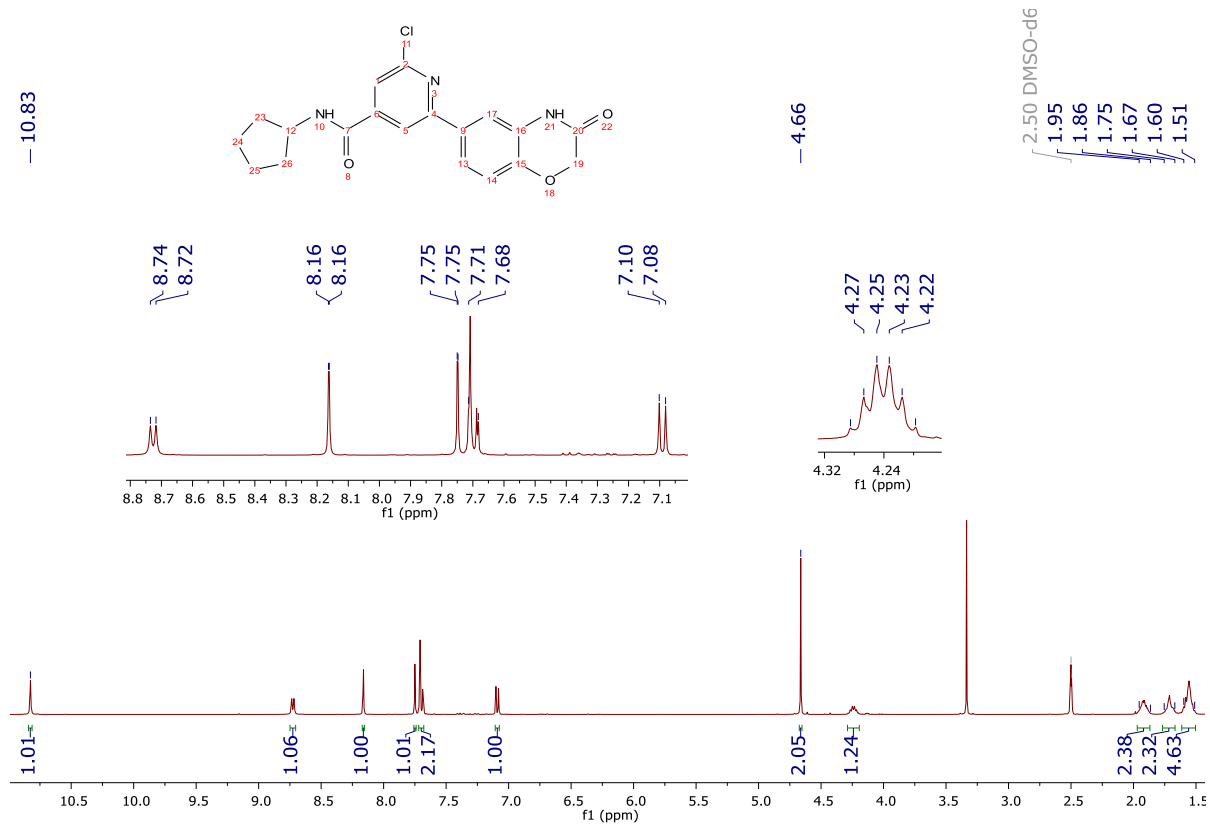
Espectro II-54. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ ppm). RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz, δ en ppm). Experimento HSQC del compuesto 2-cloro-*N*-ciclobutil-6-(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (**DLPMB4**)



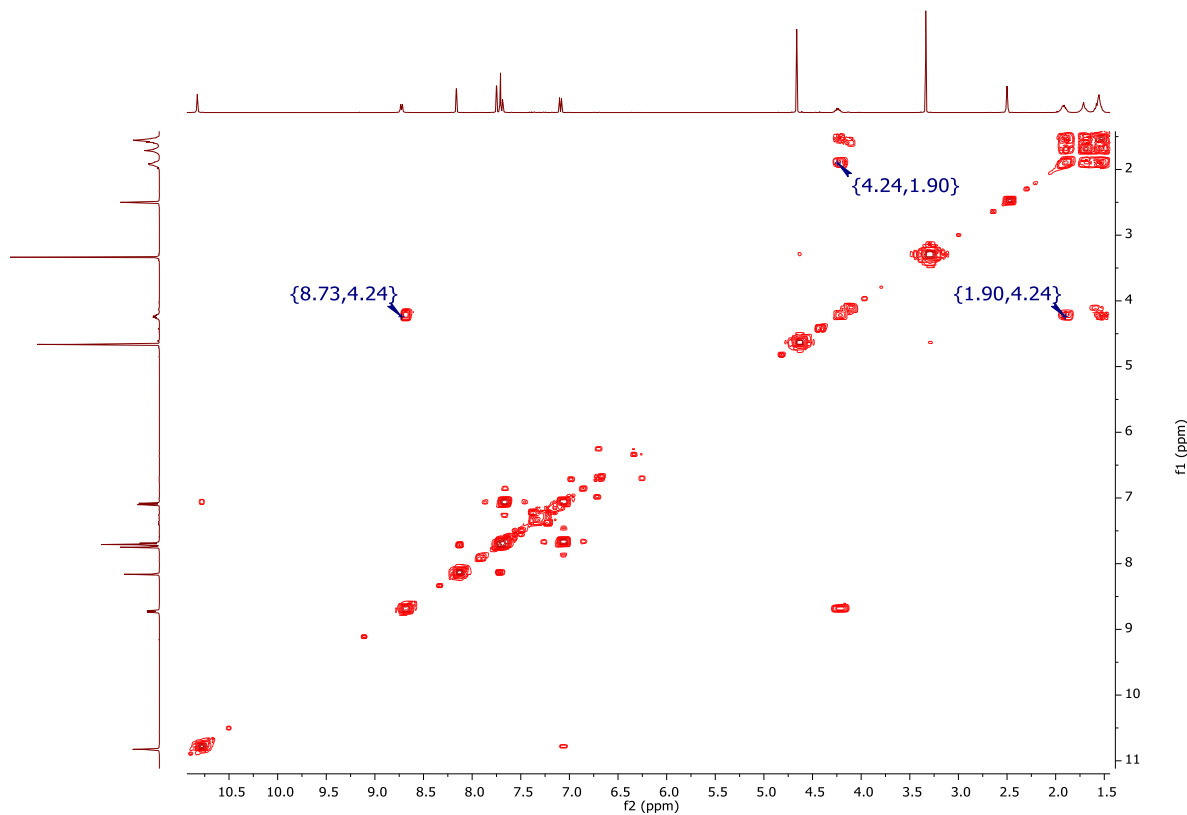
Espectro II-55. IR (FTIR por reflectancia ATR, cm^{-1}) del compuesto 2-cloro-N-ciclobutil-6-(3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (**DLPMB4**)



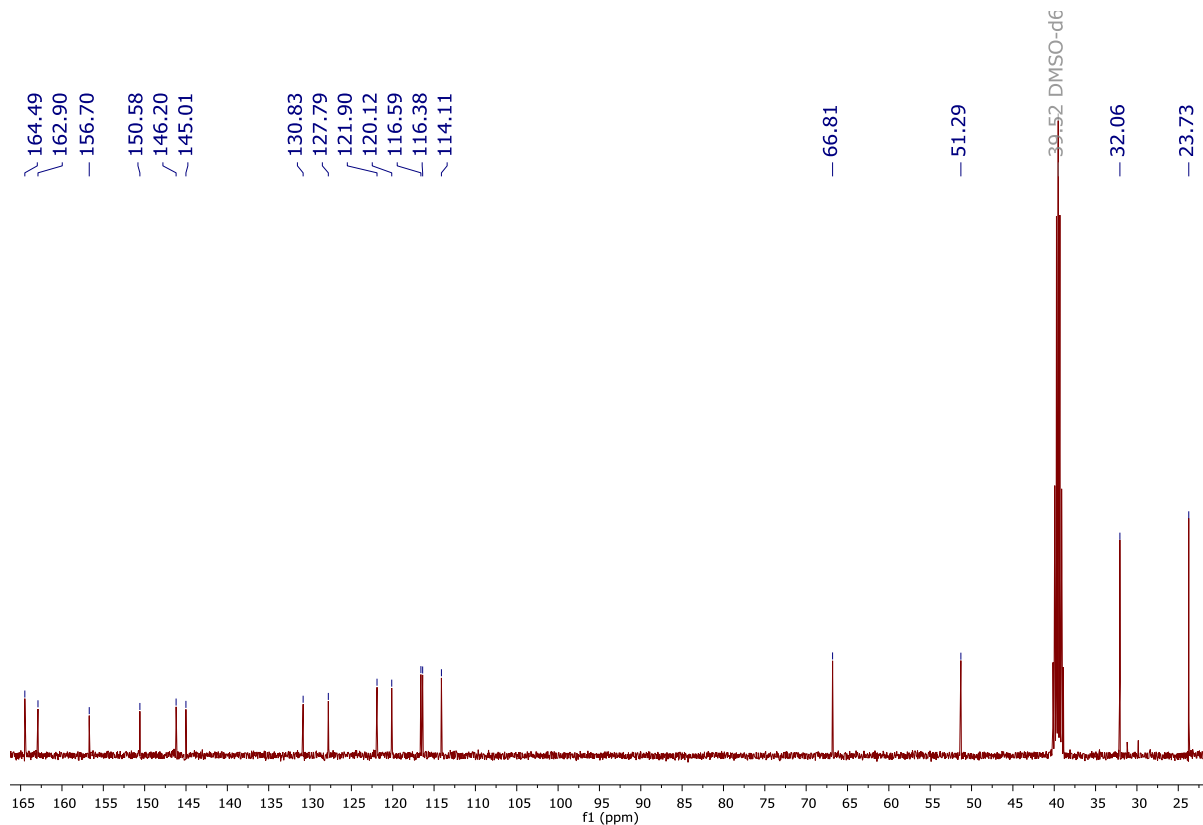
Espectro II-56. EM (APCI, $[M + H]^+$, m/z) del compuesto 2-cloro-N-ciclobutil-6-(3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (**DLPMB4**)



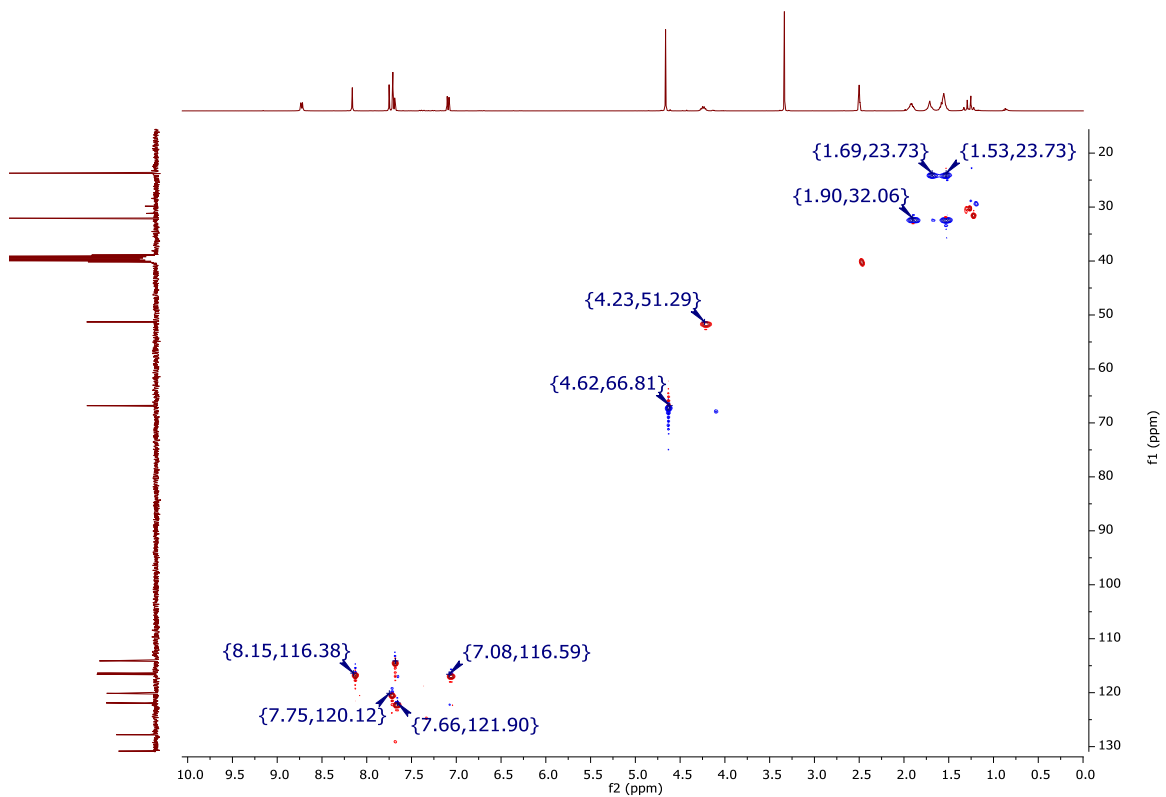
Espectro II-57. RMN ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz, δ en ppm) del compuesto 2-cloro-N-ciclopentil-6-(3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (DLPMB5)



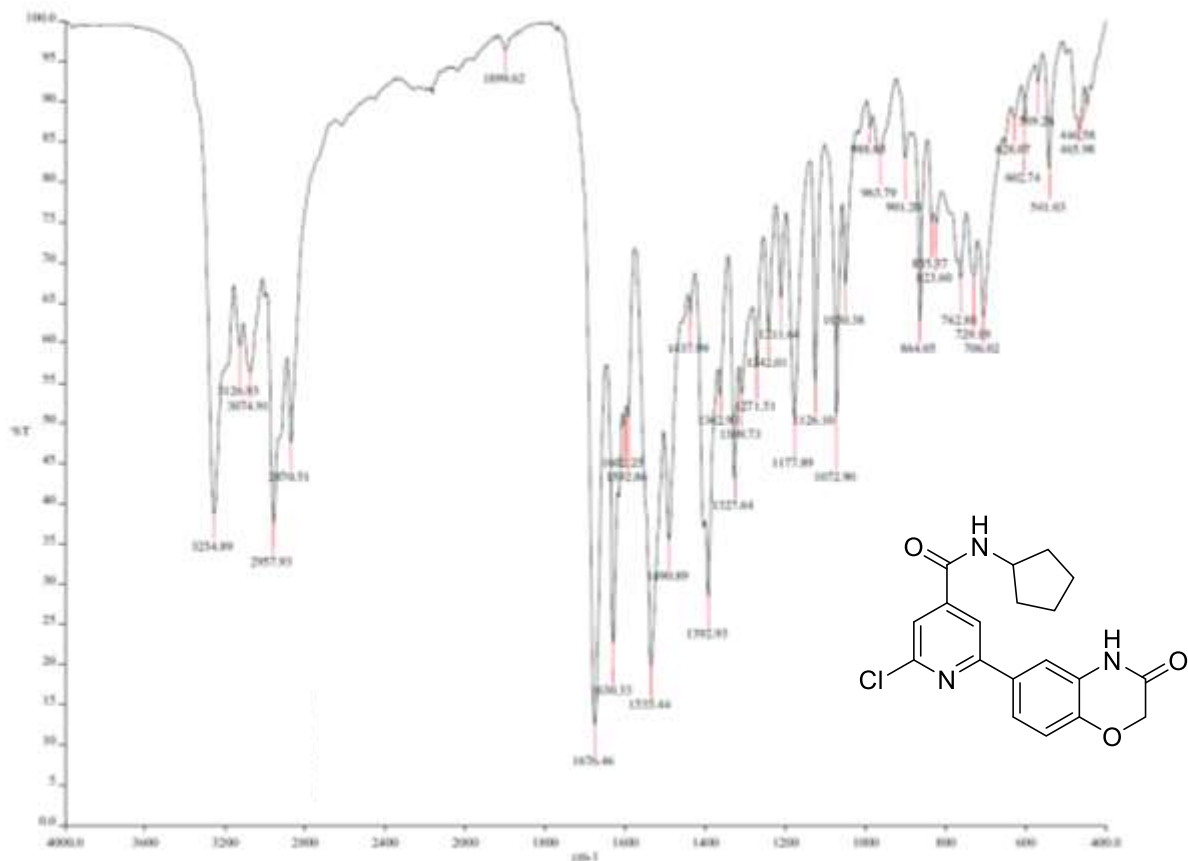
Espectro II-58. RMN ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz, δ ppm). Experimento COSY del compuesto 2-cloro-N-ciclopentil-6-(3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (DLPMB5)



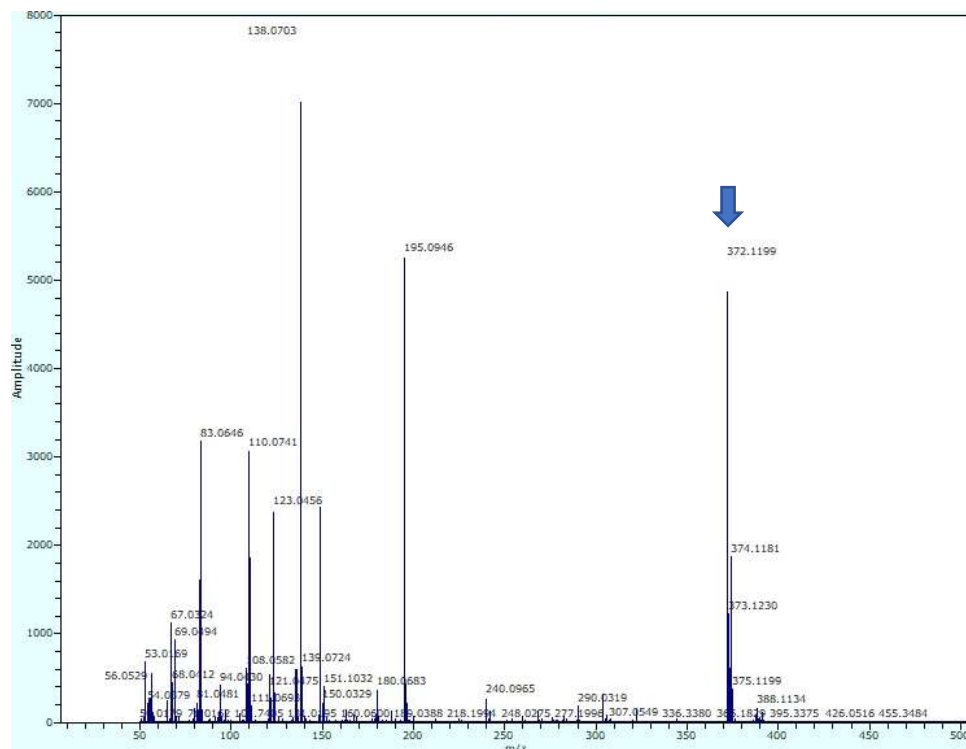
Espectro II-59. RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz, δ en ppm) del compuesto 2-cloro-*N*-ciclopentil-6-(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (**DLPMB5**)



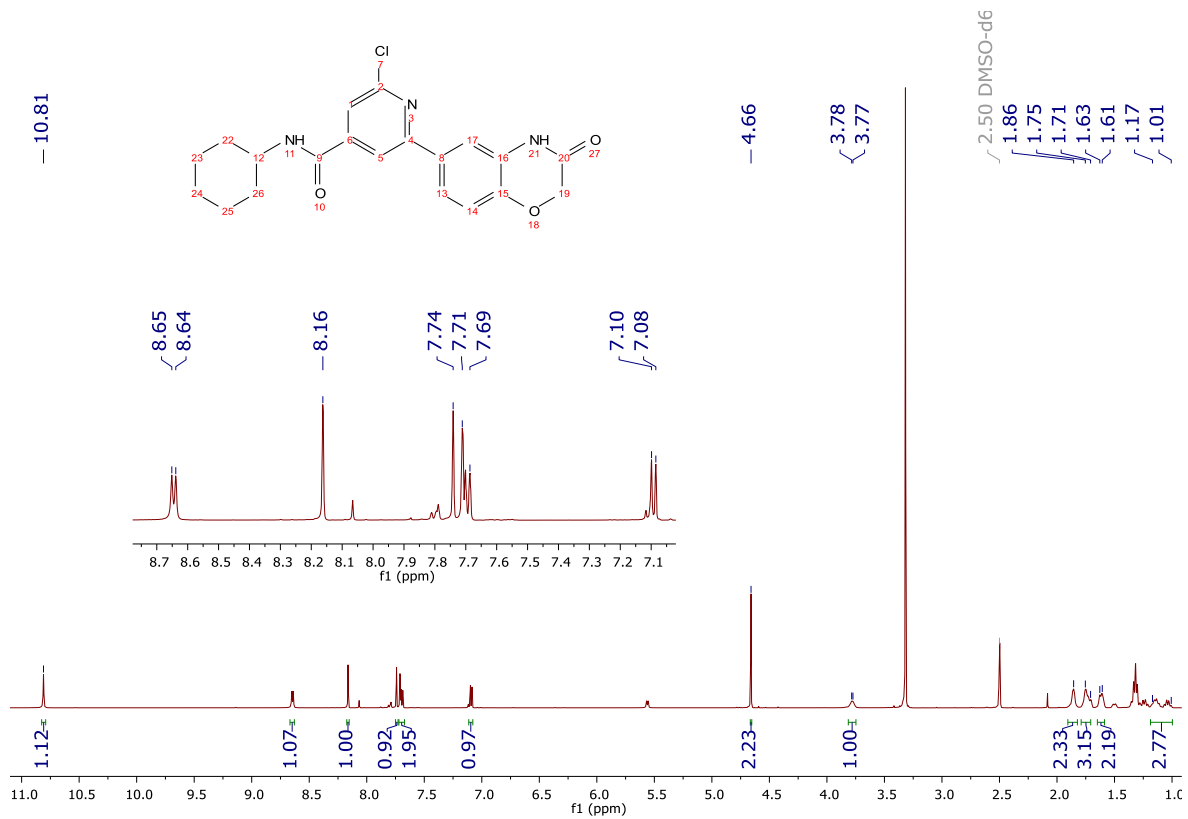
Espectro II-60. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ ppm). RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz, δ en ppm). Experimento HSQC del compuesto 2-cloro-*N*-ciclopentil-6-(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (**DLPMB5**)



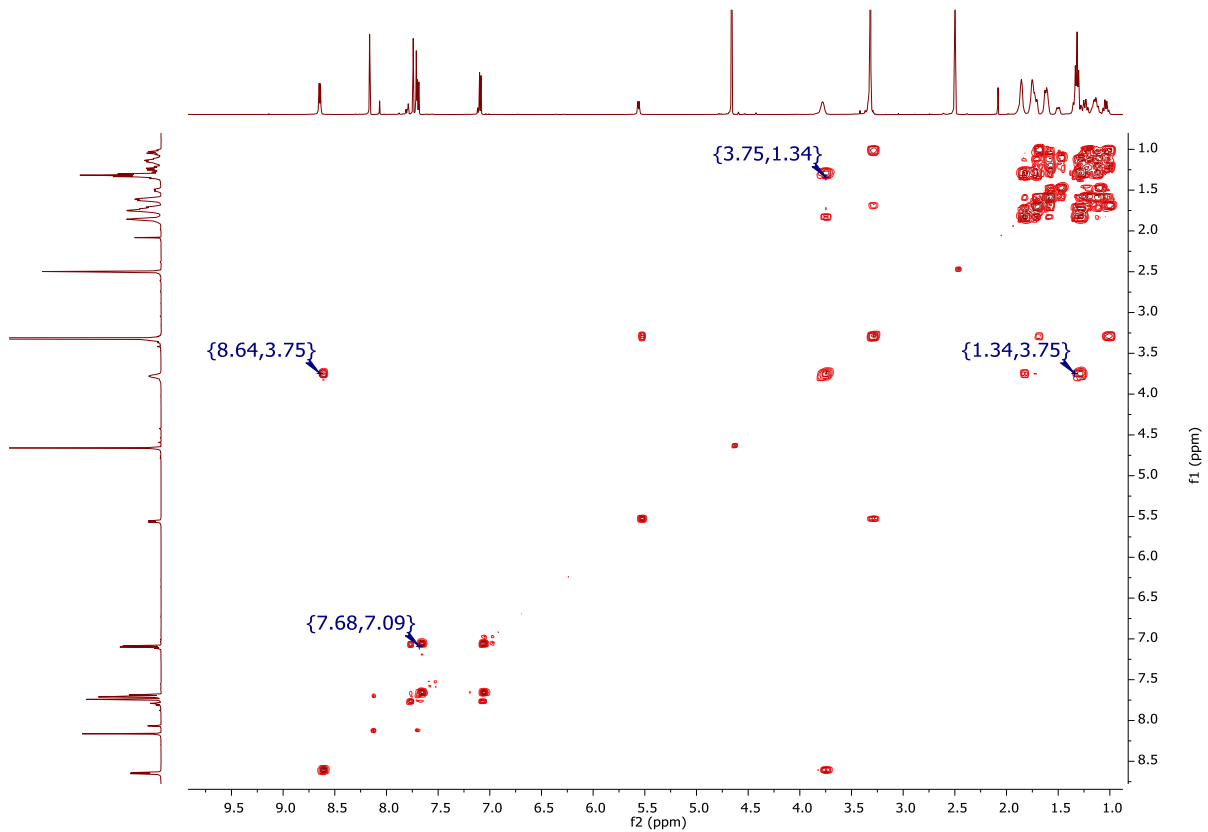
Espectro II-61. IR (FTIR por reflectancia ATR, cm^{-1}) del compuesto 2-cloro-*N*-ciclopentil-6-(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (**DLPMB5**)



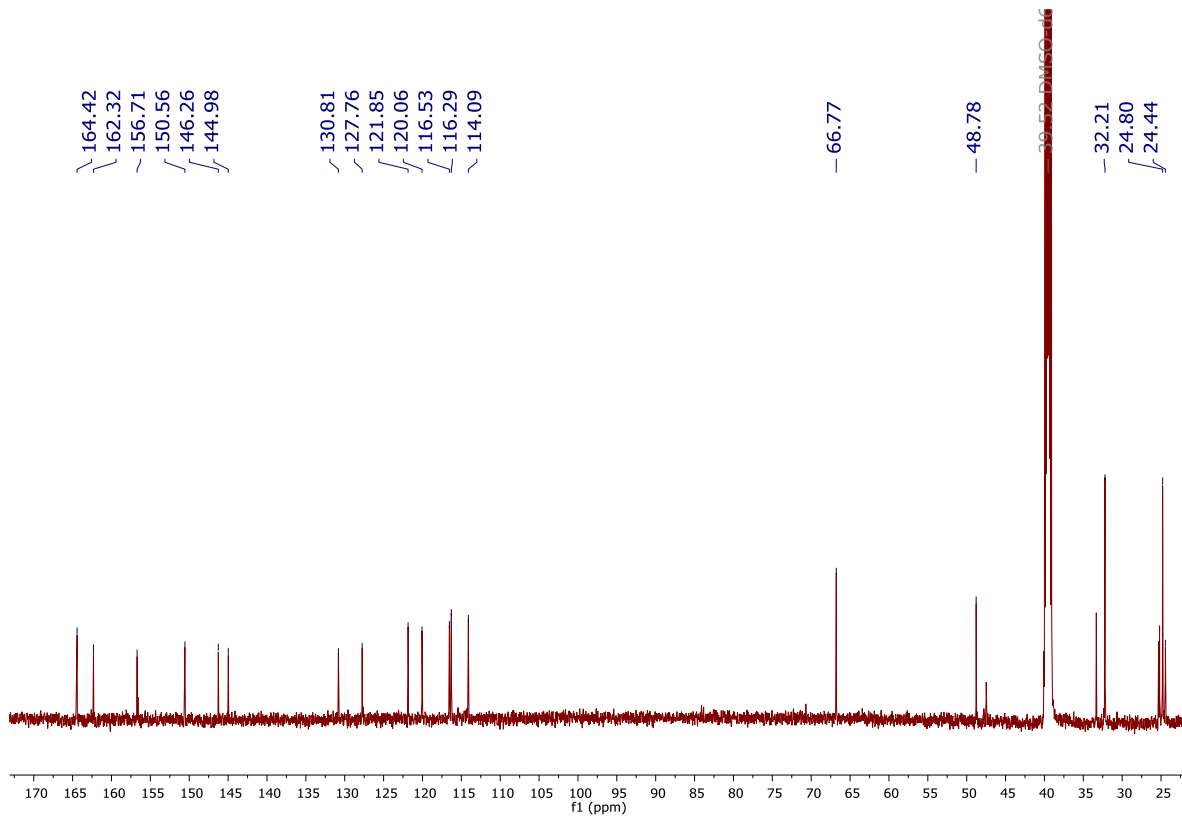
Espectro II-62. EM (APCI, $[\text{M} + \text{H}]^+$, m/z) del compuesto 2-cloro-*N*-ciclopentil-6-(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (**DLPMB5**)



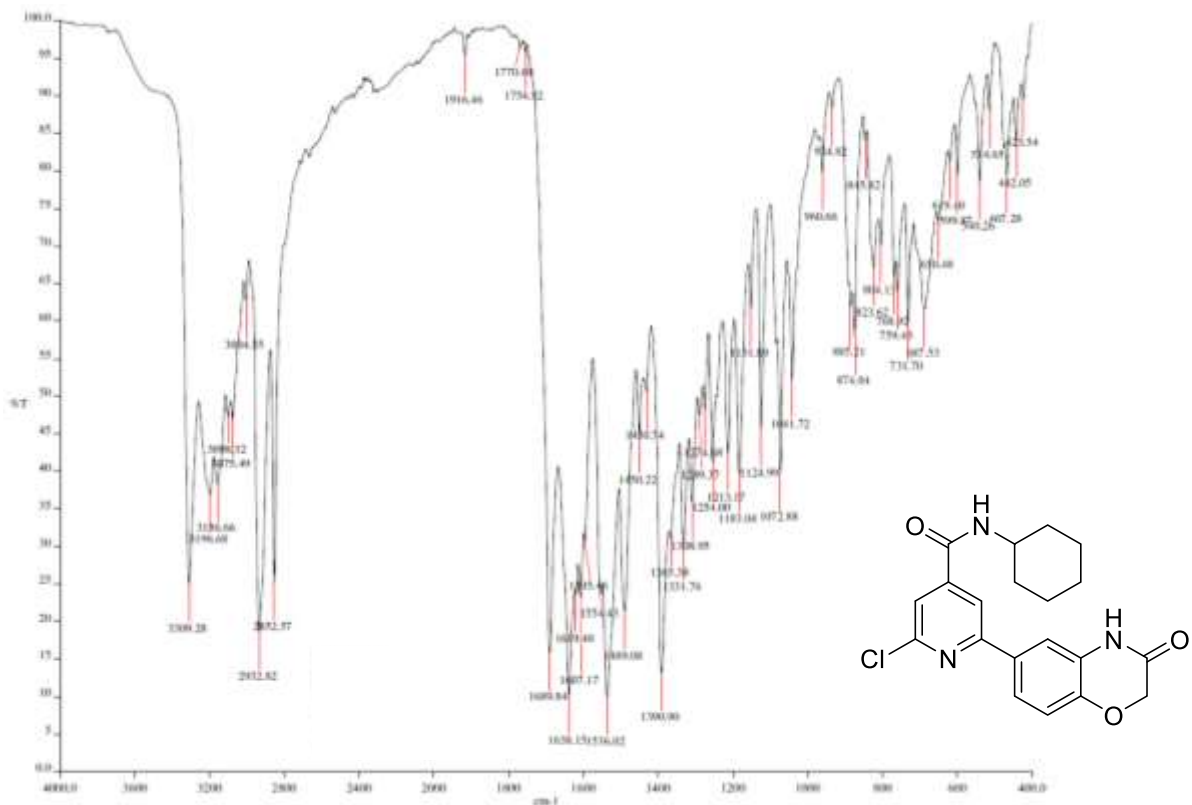
Espectro II-63. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ en ppm) del compuesto 2-cloro-N-ciclohexil-6-(3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (DLPMB6)



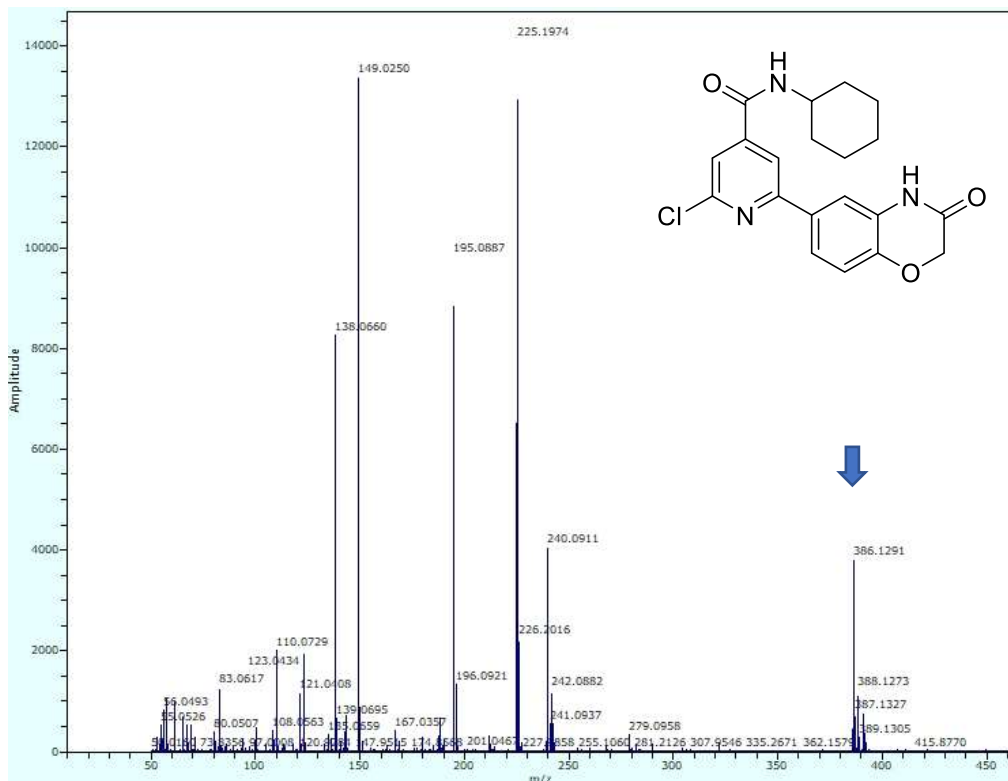
Espectro II-64. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ ppm). Experimento COSY del compuesto 2-cloro-N-ciclohexil-6-(3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (DLPMB6)



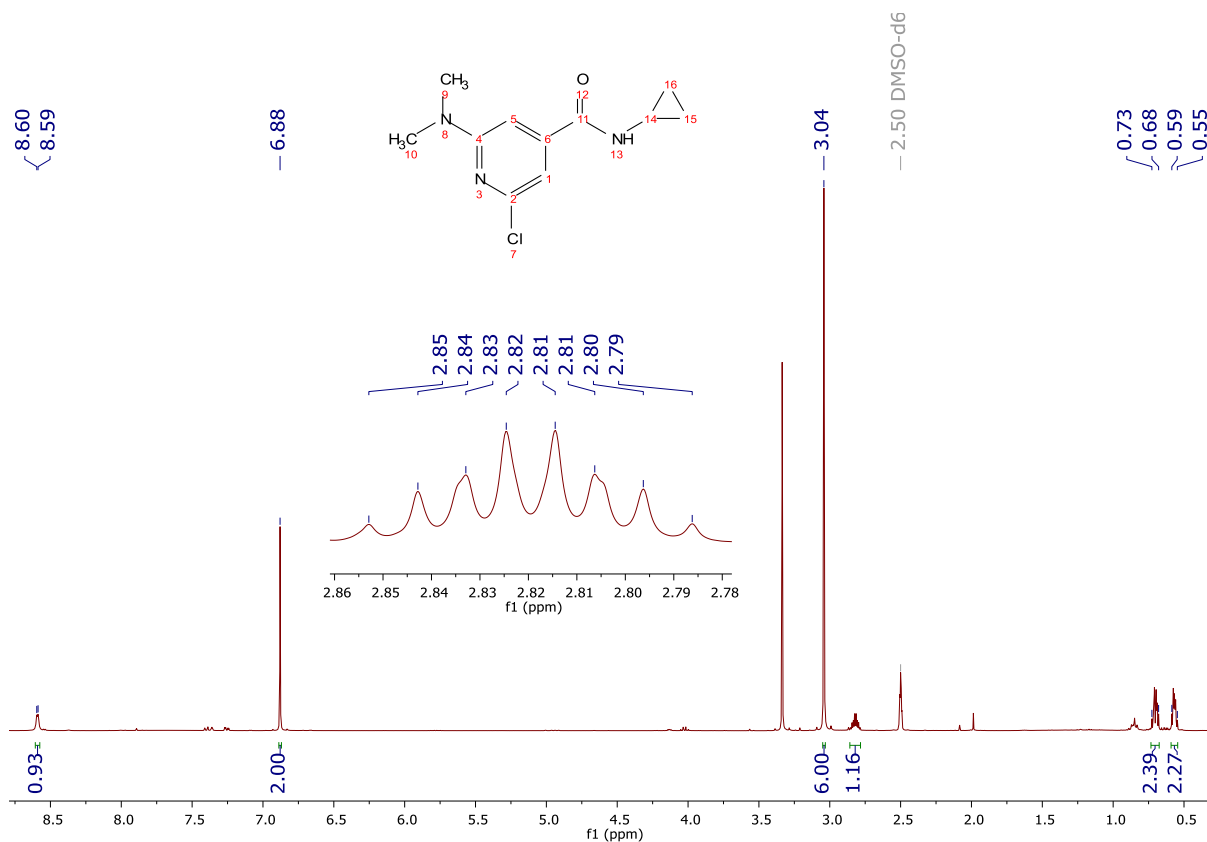
Espectro II-65. RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz, δ en ppm) del compuesto 2-cloro-*N*-ciclohexil-6-(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (**DLPMB6**)



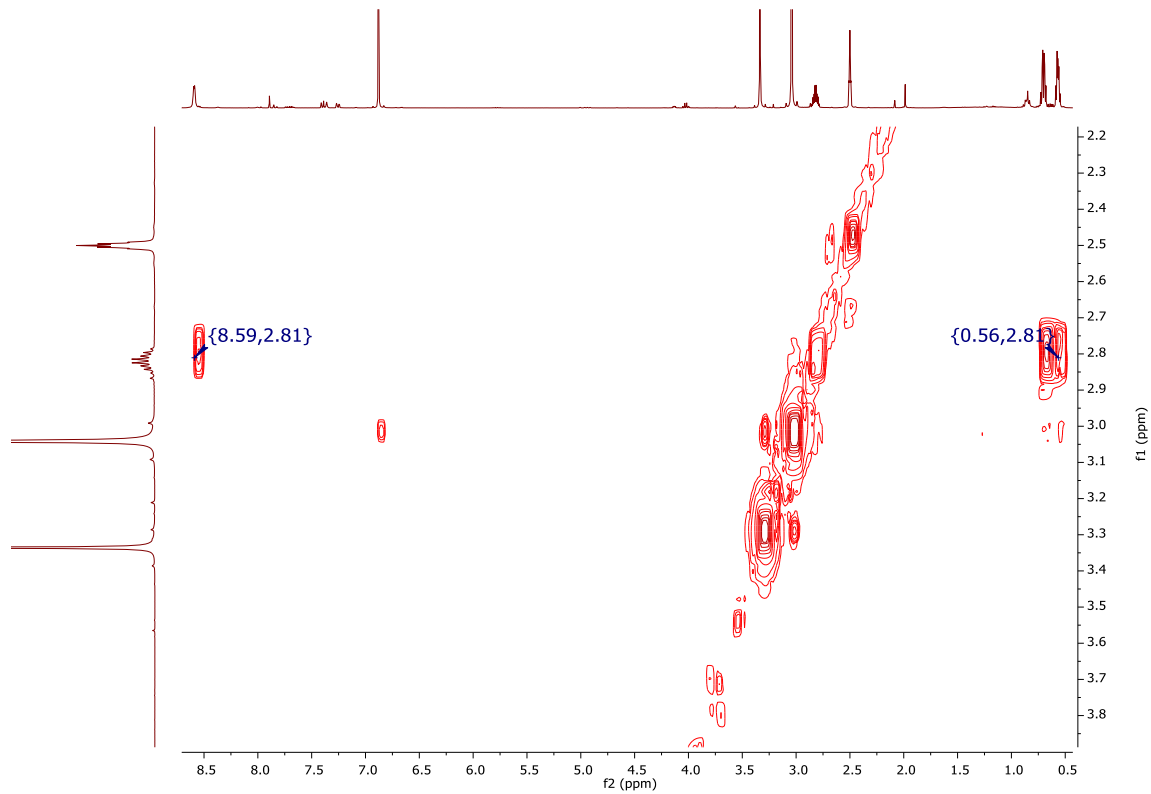
Espectro II-66. IR (FTIR por reflectancia ATR, cm^{-1}) del compuesto 2-cloro-*N*-ciclohexil-6-(3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (**DLPMB6**)



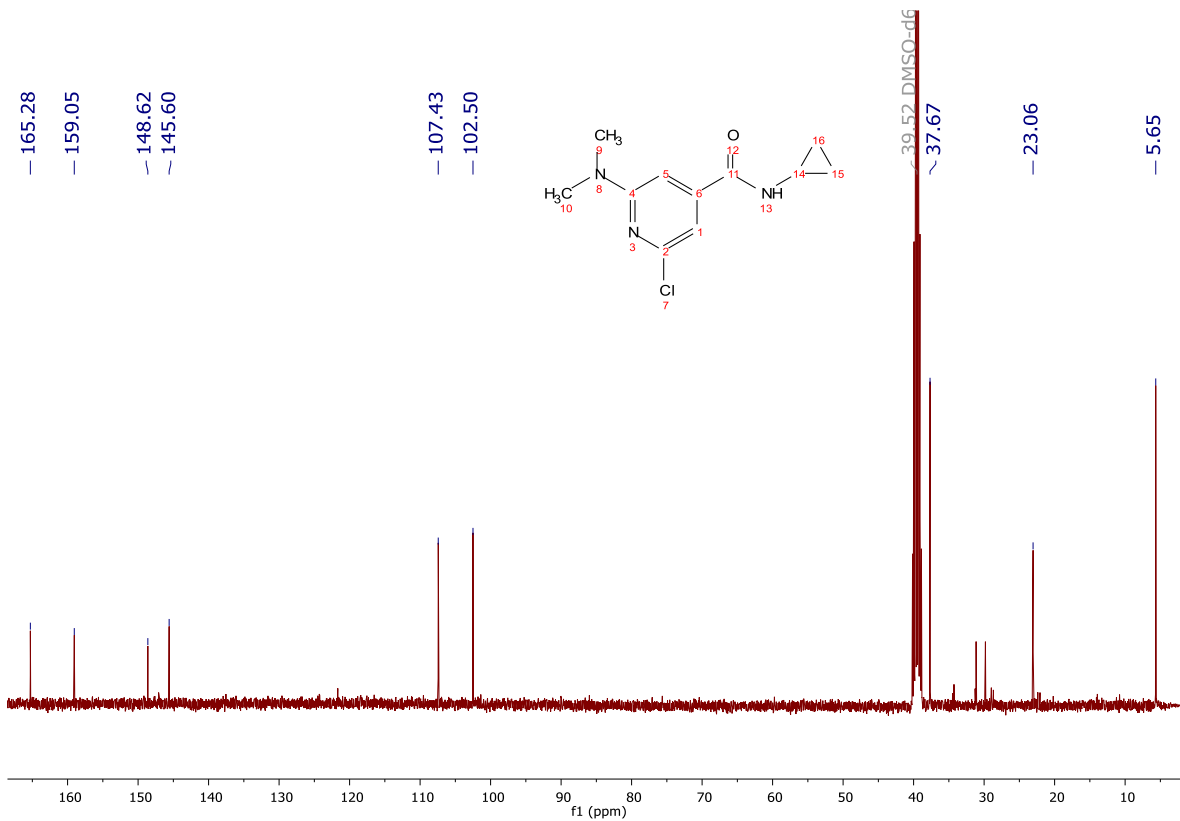
Espectro II-67. EM (APCI, $[M + H]^+$, m/z) del compuesto 2-cloro-N-ciclohexil-6-(3-oxo-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-6-il)piridin-4-carboxamida (**DLPMB6**)



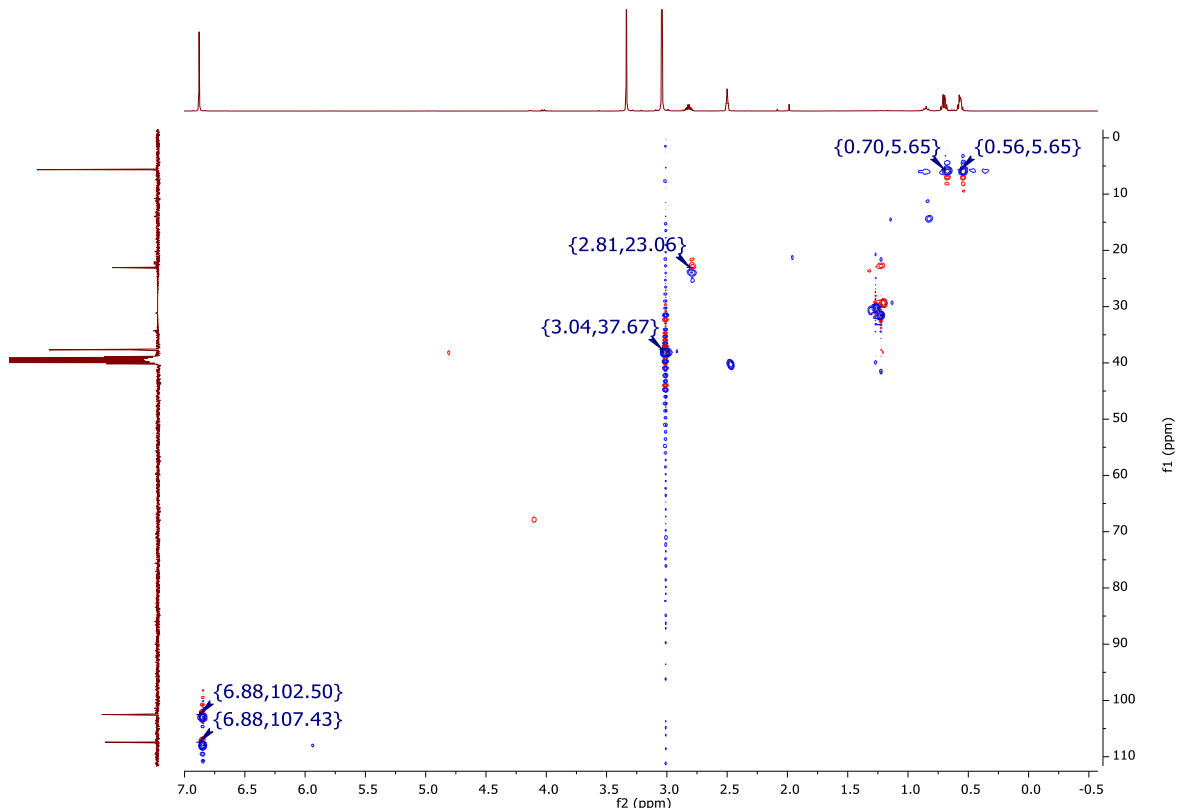
Espectro II-68. RMN 1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ ppm) del compuesto 2-cloro-N-ciclopropil-6-(dimetilamino)piridin-4-carboxamida (**DLPMP3**)



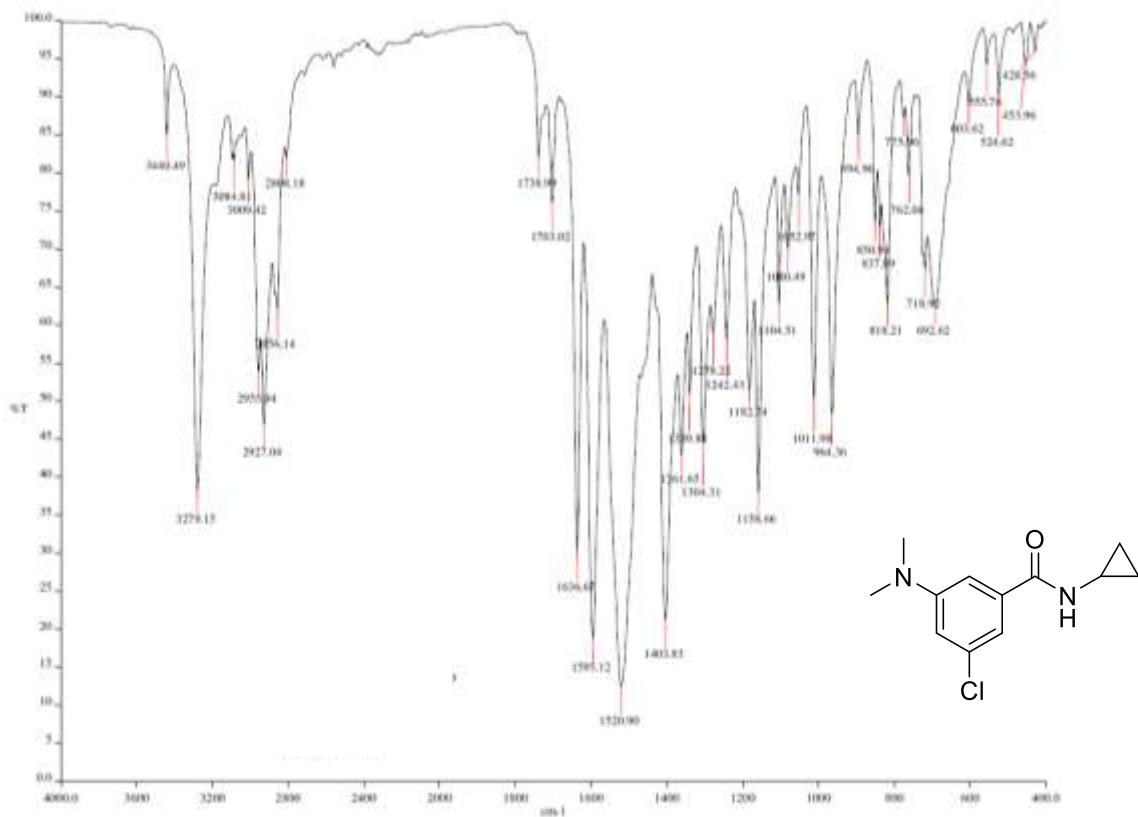
Espectro II-69. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ ppm). Experimento COSY del compuesto 2-cloro-*N*-ciclopropil-6-(dimetilamino)piridin-4-carboxamida (**DLPMP3**)



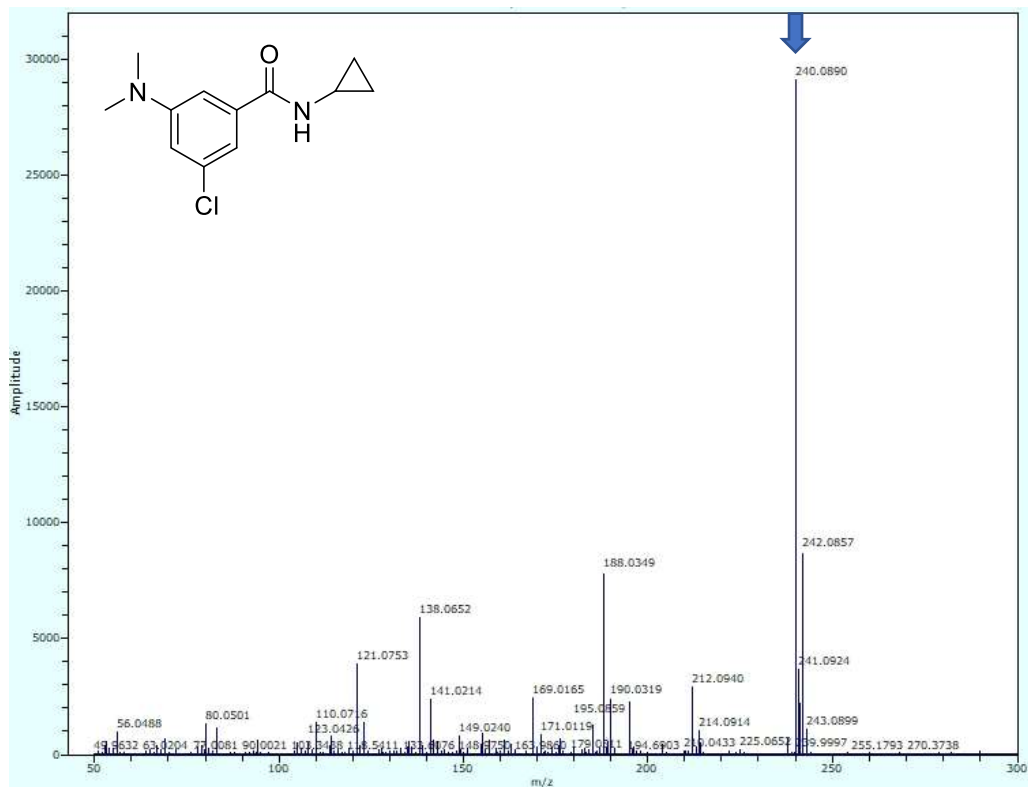
Espectro II-70. RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz, δ ppm) del compuesto 2-cloro-*N*-ciclopropil-6-(dimetilamino)piridin-4-carboxamida (**DLPMP3**)



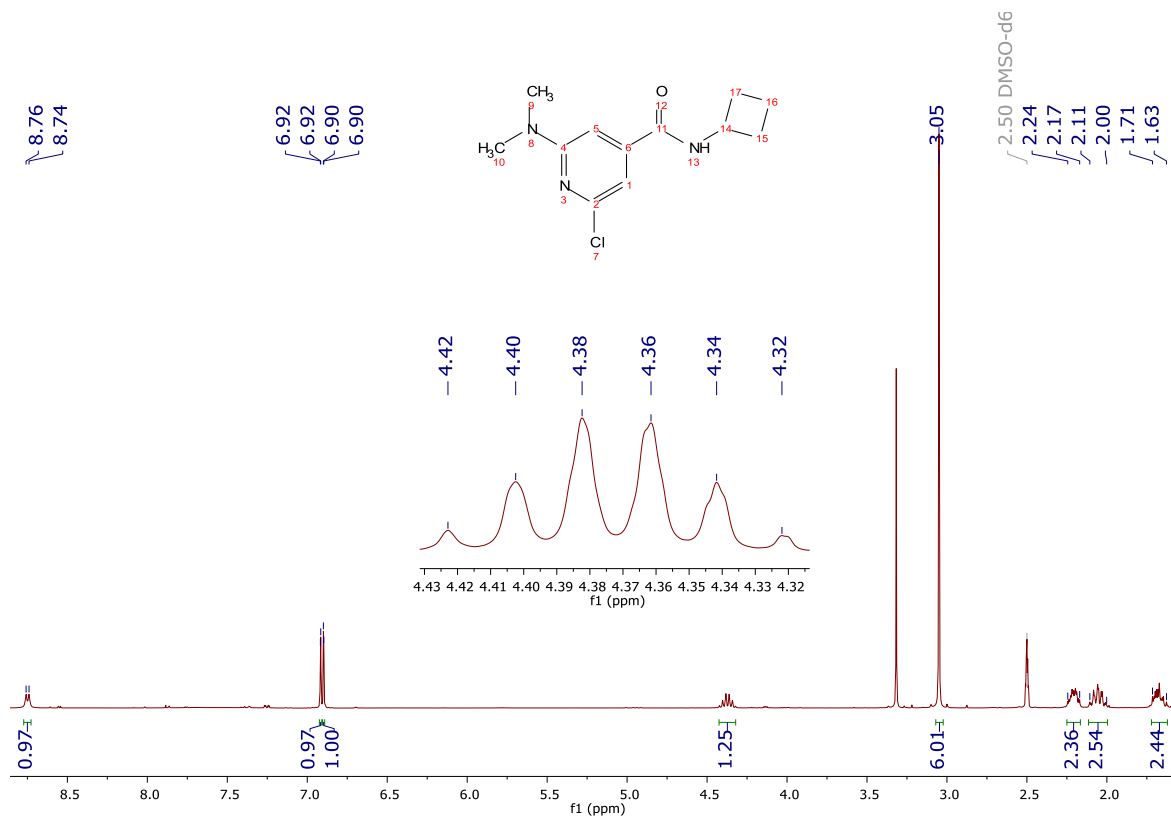
Espectro II-71. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ ppm). RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz, δ ppm). Experimento HSQC del compuesto 2-cloro-*N*-ciclopropil-6-(dimetilamino)piridin-4-carboxamida (**DLPMP3**)



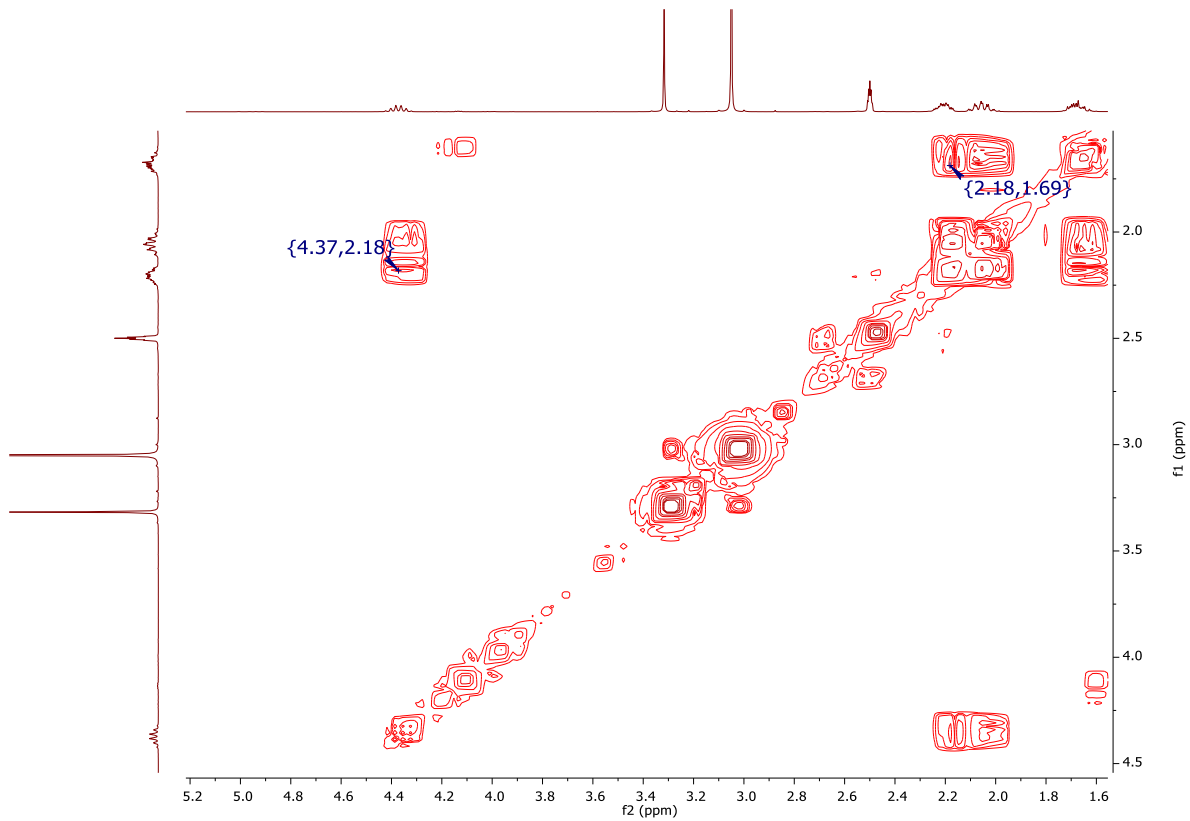
Espectro II-72. IR (FTIR por reflectancia ATR, cm^{-1}) del compuesto 2-cloro-*N*-ciclopropil-6-(dimetilamino)piridin-4-carboxamida (**DLPMP3**)



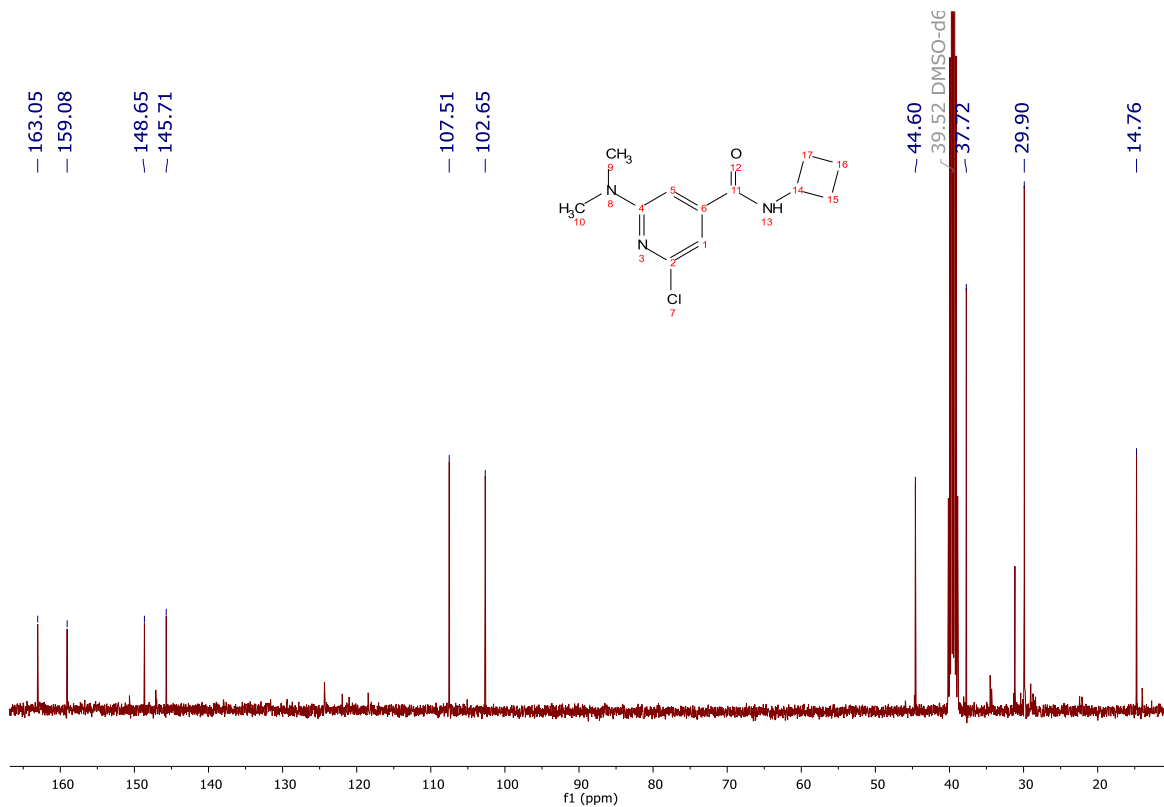
Espectro II-73. EM (APCI, $[M + H]^+$, m/z) del compuesto 2-cloro-*N*-ciclopropil-6-(dimetilamino)piridin-4-carboxamida (DLPMP3)



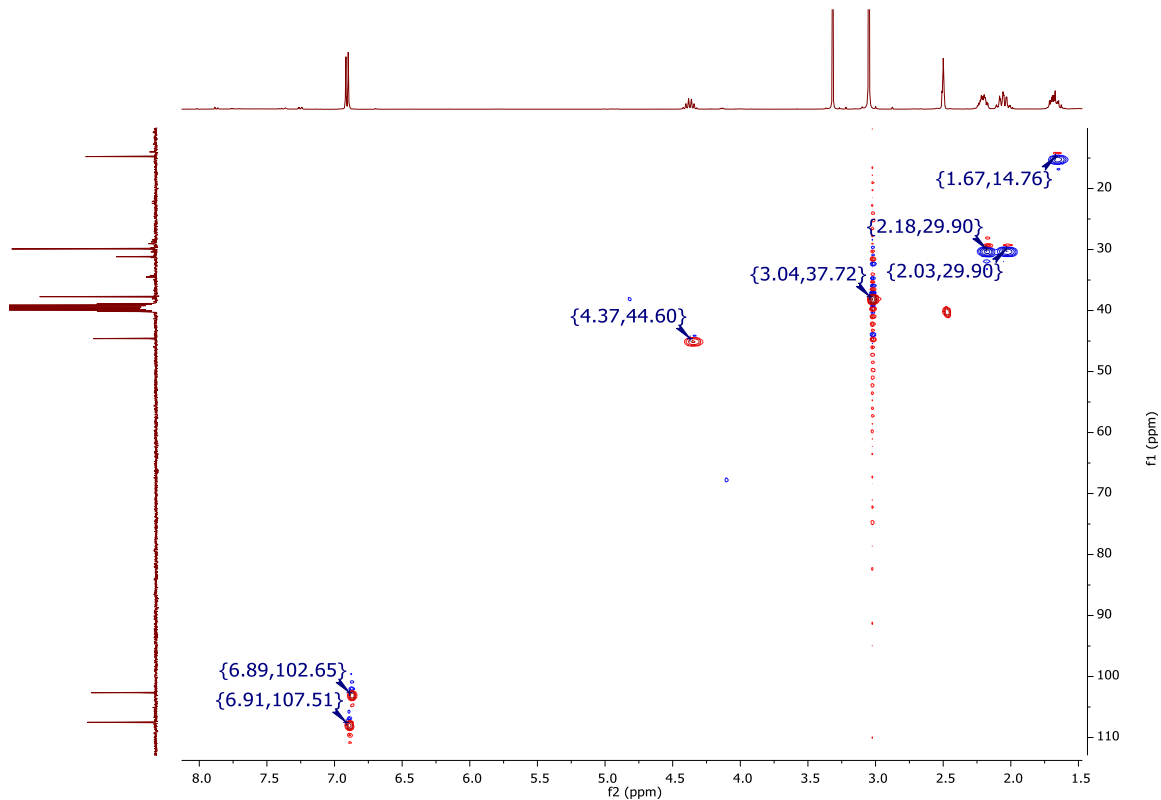
Espectro II-74. RMN 1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ ppm) del compuesto 2-cloro-*N*-ciclobutil-6-(dimetilamino)piridin-4-carboxamida (DLPMP4)



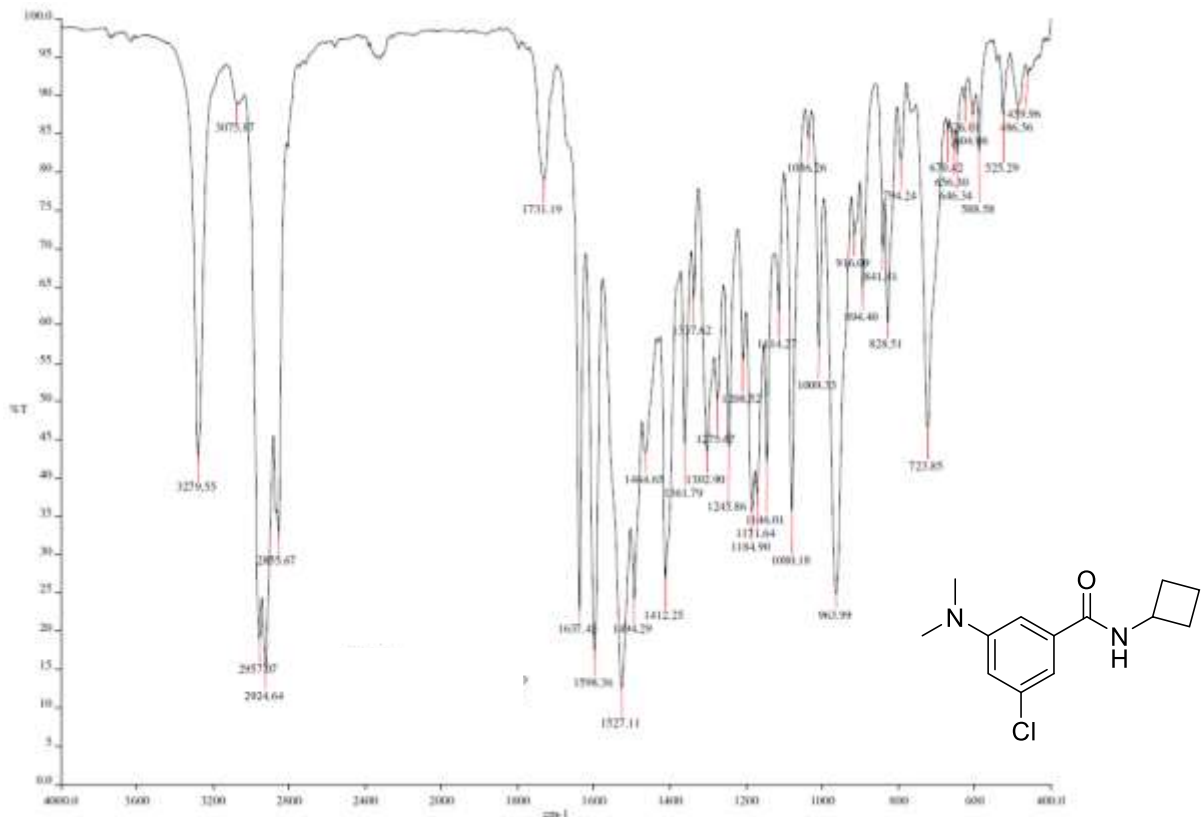
Espectro II-75. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ ppm). Experimento COSY del compuesto 2-cloro-*N*-ciclobutil-6-(dimetilamino)piridin-4-carboxamida (**DLPMP4**)



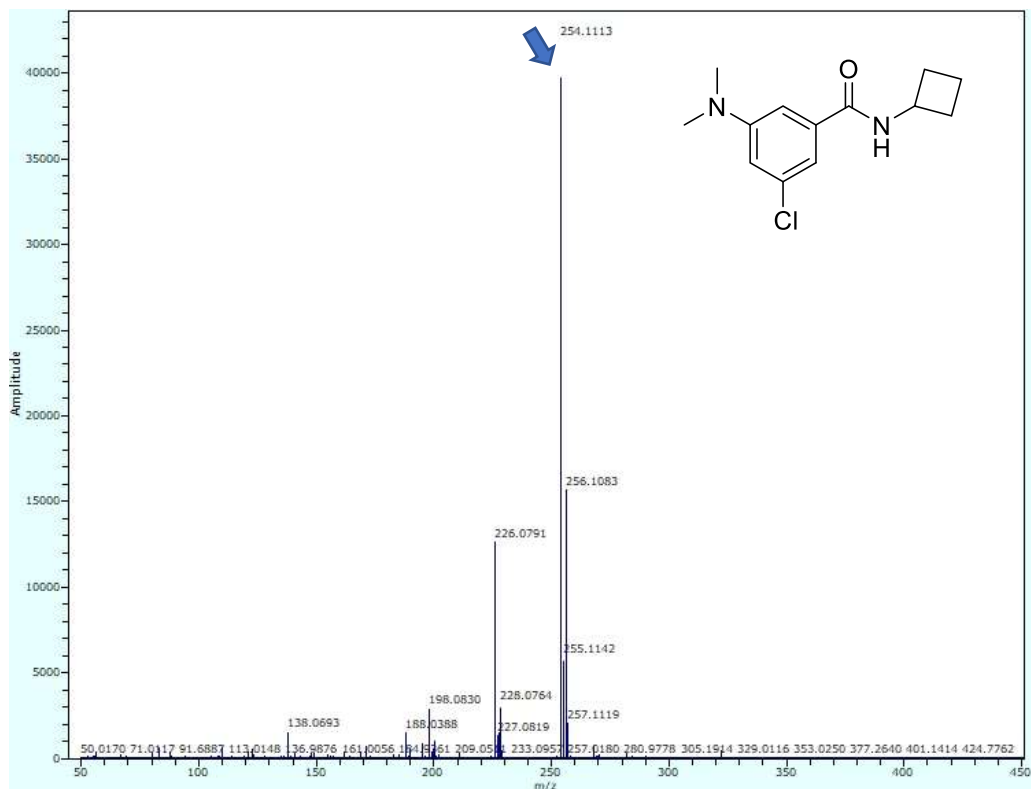
Espectro II-76. RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz, δ ppm) del compuesto 2-cloro-*N*-ciclobutil-6-(dimetilamino)piridin-4-carboxamida (**DLPMP4**)



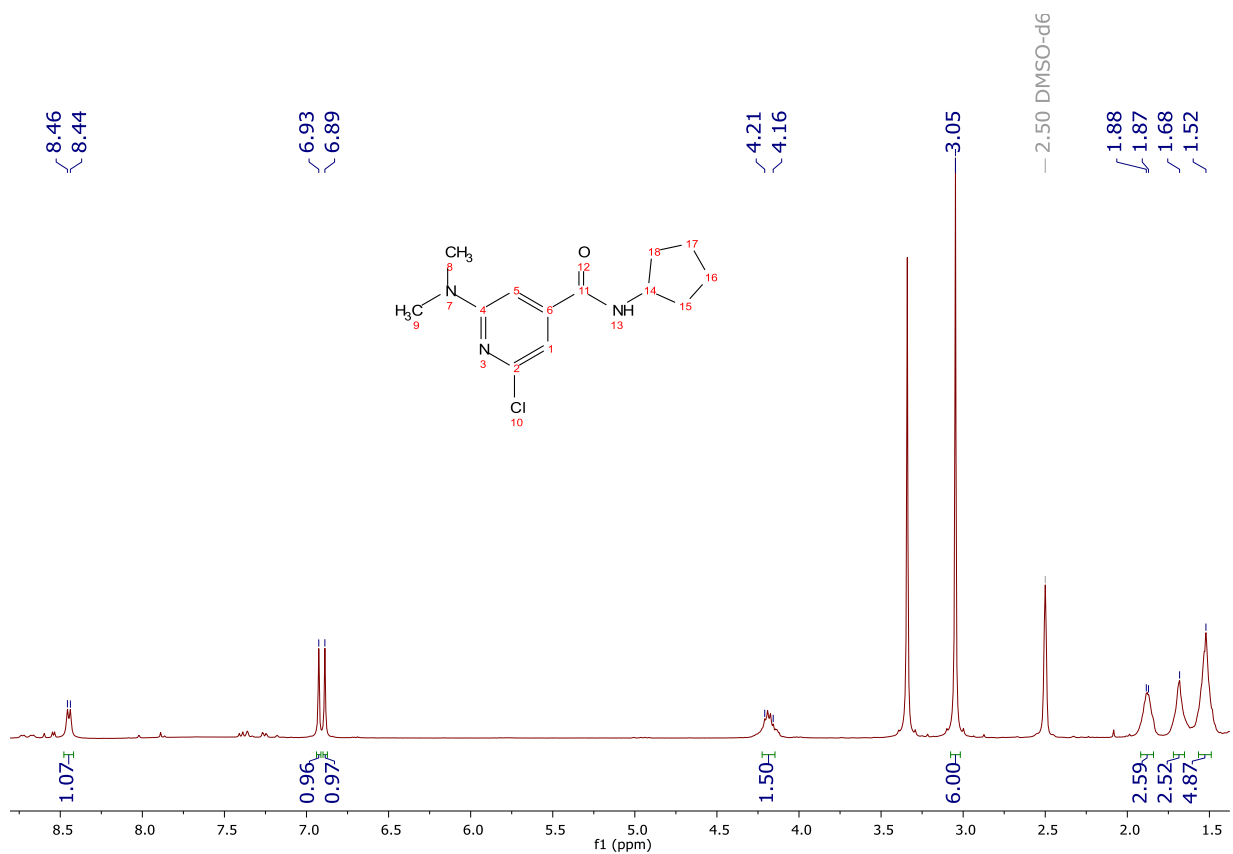
Espectro II-77. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ ppm). RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz, δ ppm). Experimento HSQC del compuesto 2-cloro-*N*-ciclobutil-6-(dimetilamino)piridin-4-carboxamida (**DLPMP4**)



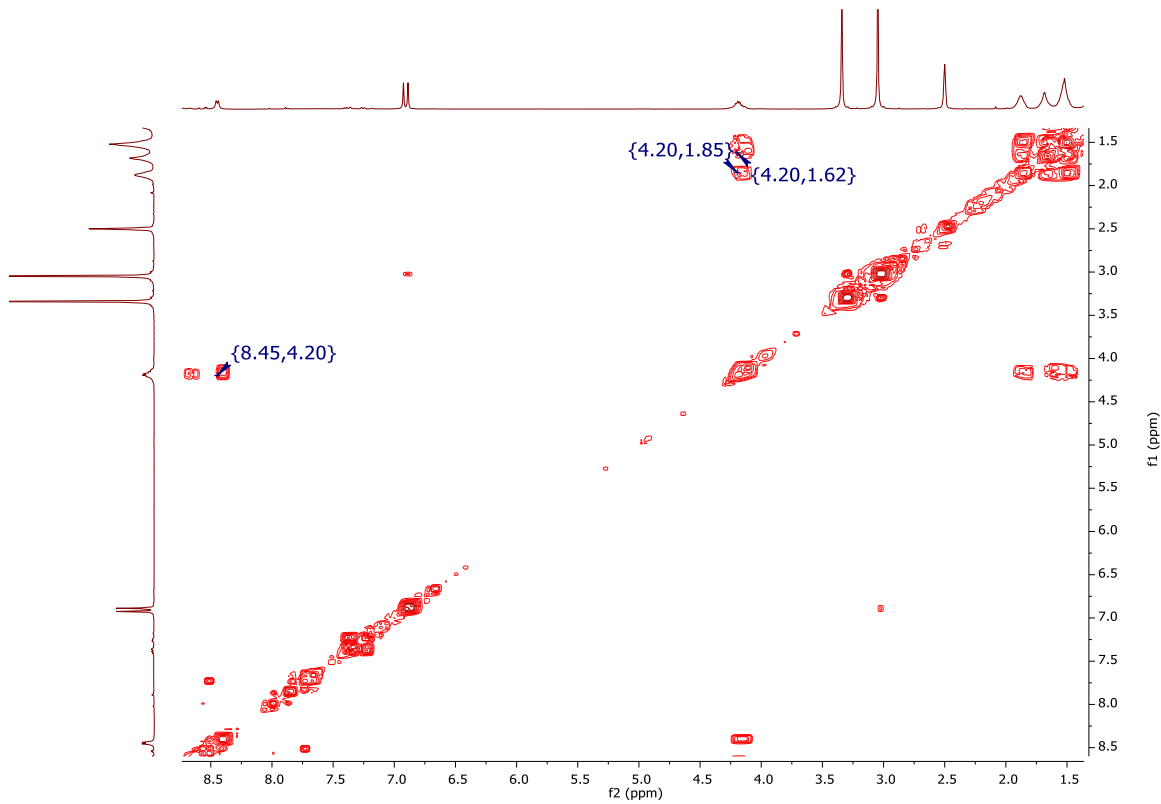
Espectro II-78. IR (FTIR por reflectancia ATR, cm^{-1}) del compuesto 2-cloro-*N*-ciclobutil-6-(dimetilamino)piridin-4-carboxamida (**DLPMP4**)



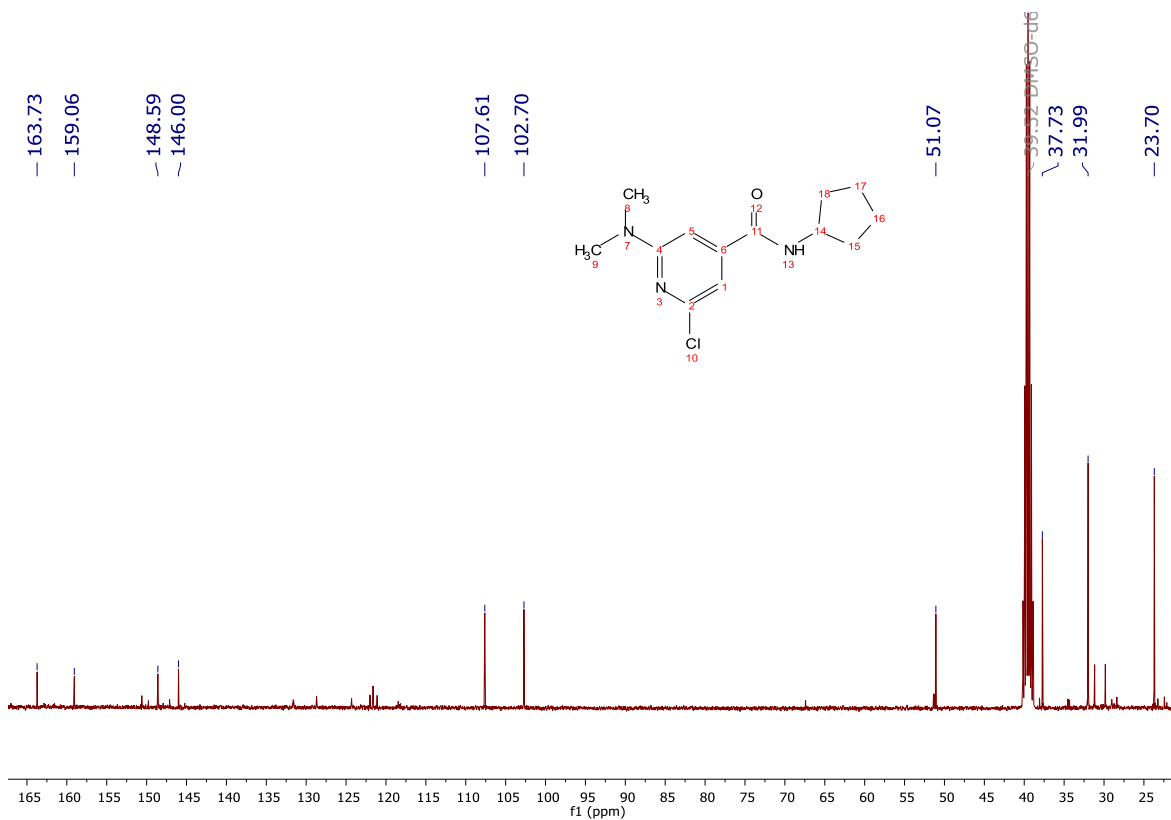
Espectro II-79. EM (APCI, $[M + H]^+$, m/z) del compuesto 2-cloro-N-ciclobutil-6-(dimetilamino)piridin-4-carboxamida (**DLPMP4**)



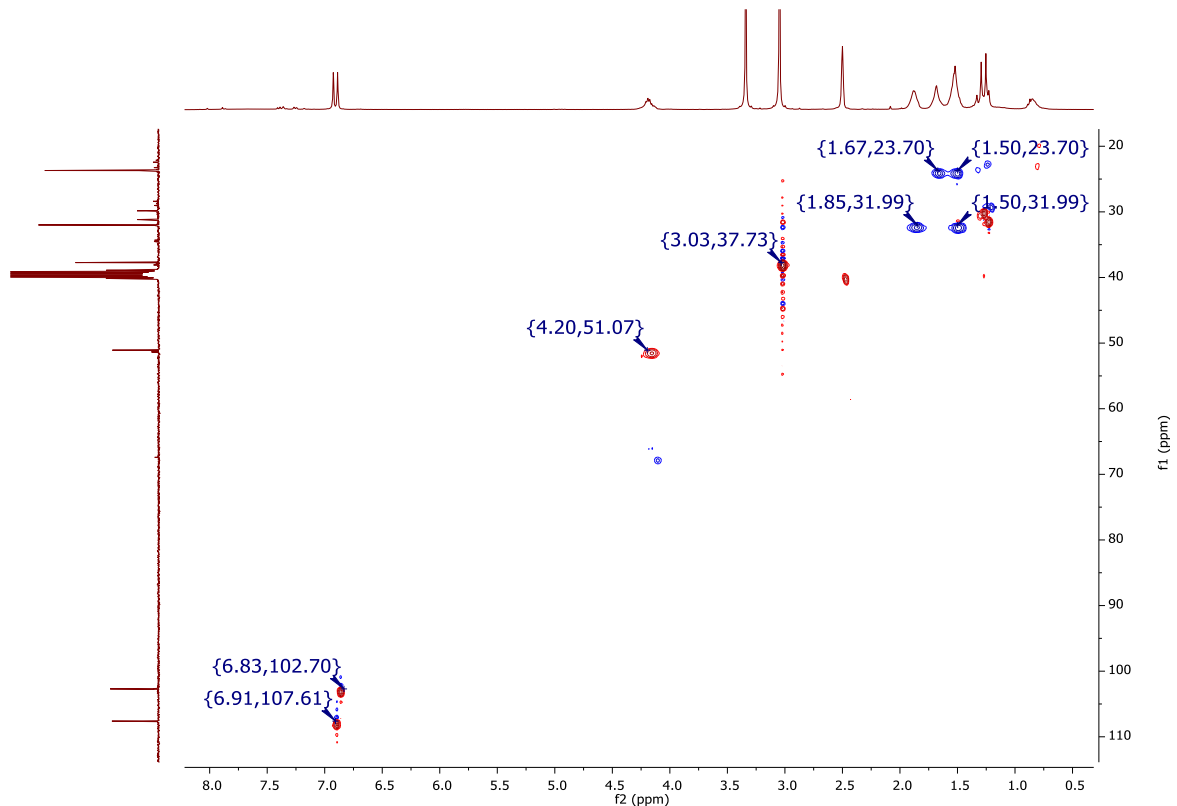
Espectro II-80. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ en ppm) del compuesto 2-cloro-N-ciclopentil-6-(dimetilamino)piridin-4-carboxamida (**DLPMP5**)



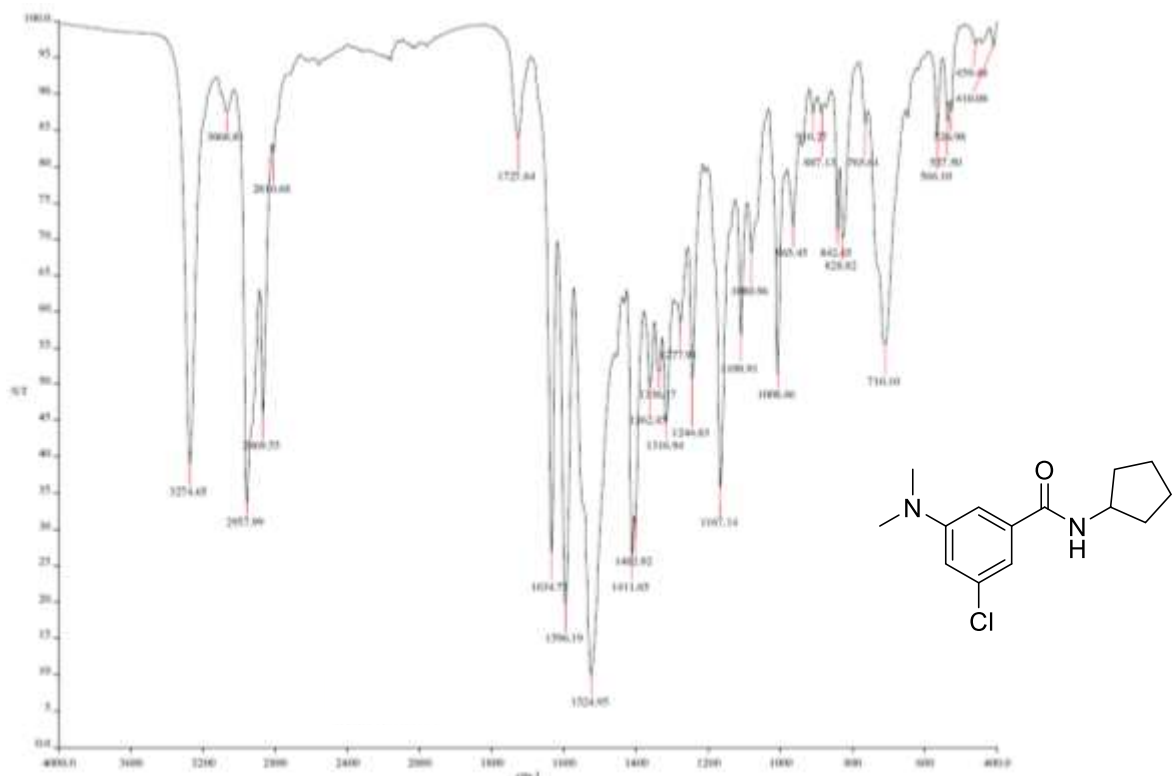
Espectro II-81. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ ppm). Experimento COSY del compuesto 2-cloro-*N*-ciclopentil-6-(dimetilamino)piridin-4-carboxamida (**DLPMP5**)



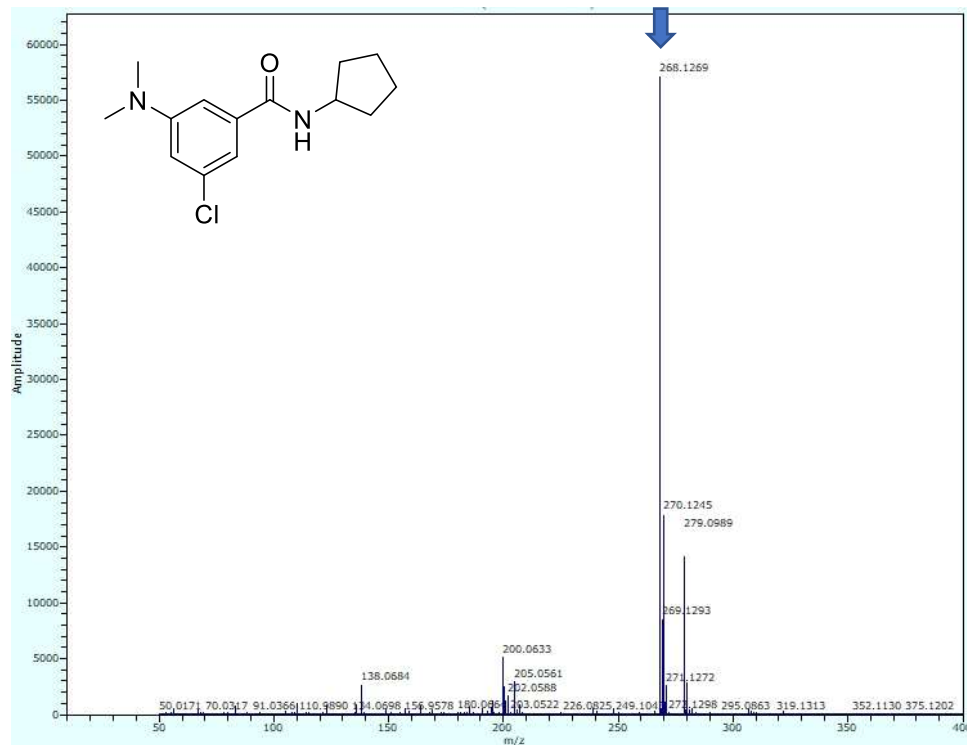
Espectro II-82. RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz, δ en ppm) del compuesto 2-cloro-*N*-ciclopentil-6-(dimetilamino)piridin-4-carboxamida (**DLPMP5**)



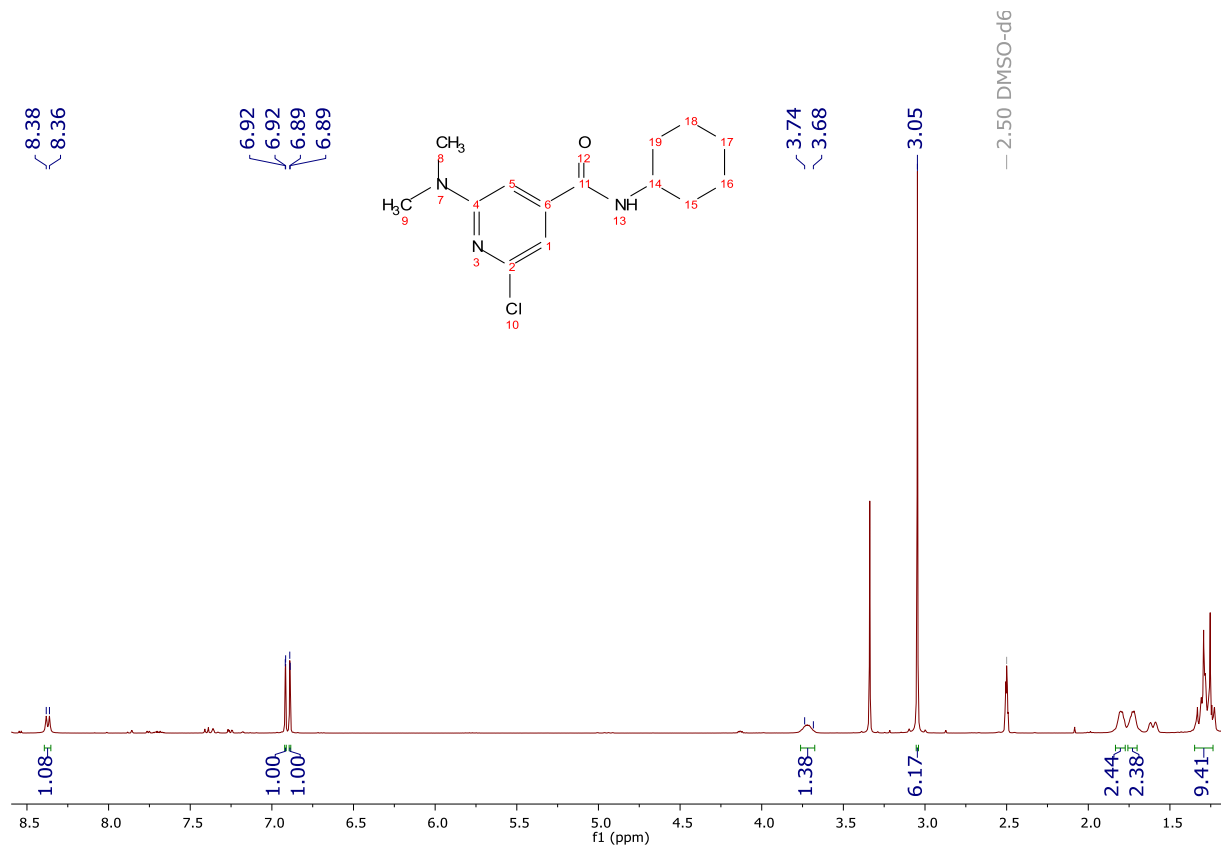
Espectro II-83. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ ppm). RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz, δ en ppm). Experimento HSQC del compuesto 2-cloro-*N*-ciclopentil-6-(dimetilamino)piridin-4-carboxamida (**DLMP5**)



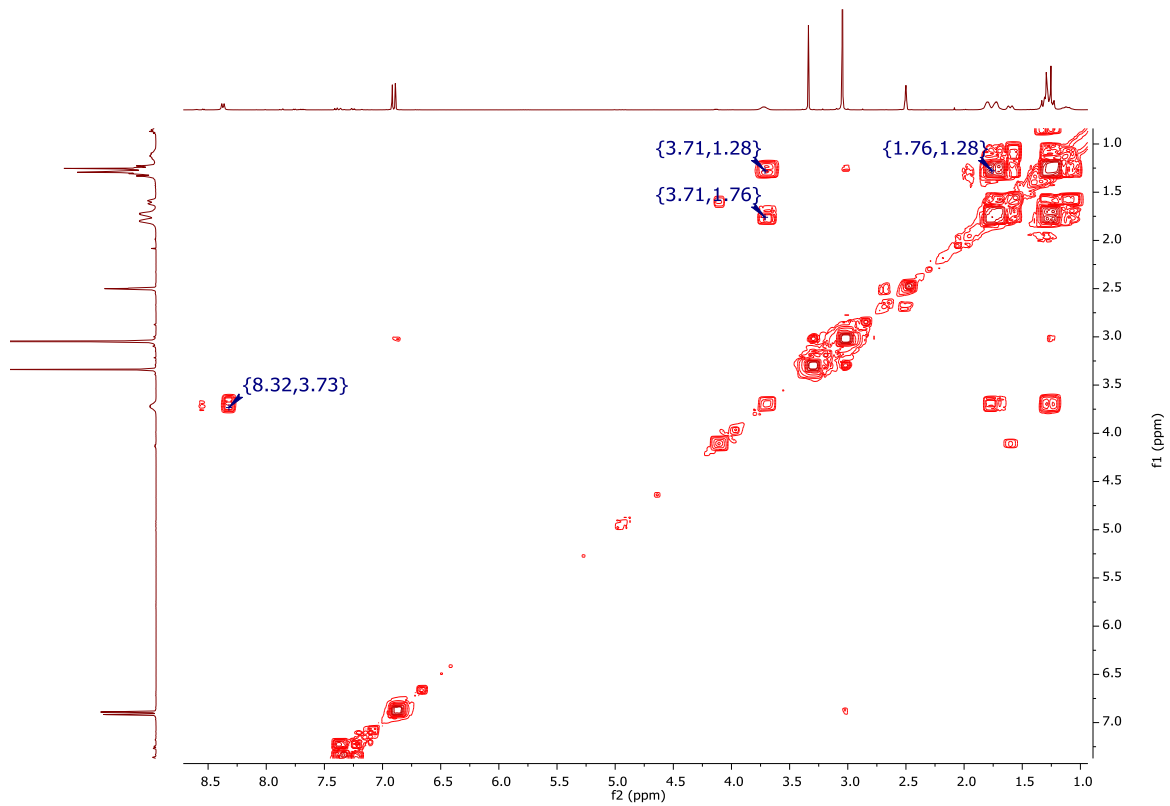
Espectro II-84. IR (FTIR por reflectancia ATR, cm^{-1}) del compuesto 2-cloro-*N*-ciclopentil-6-(dimetilamino)piridin-4-carboxamida (**DLMP5**)



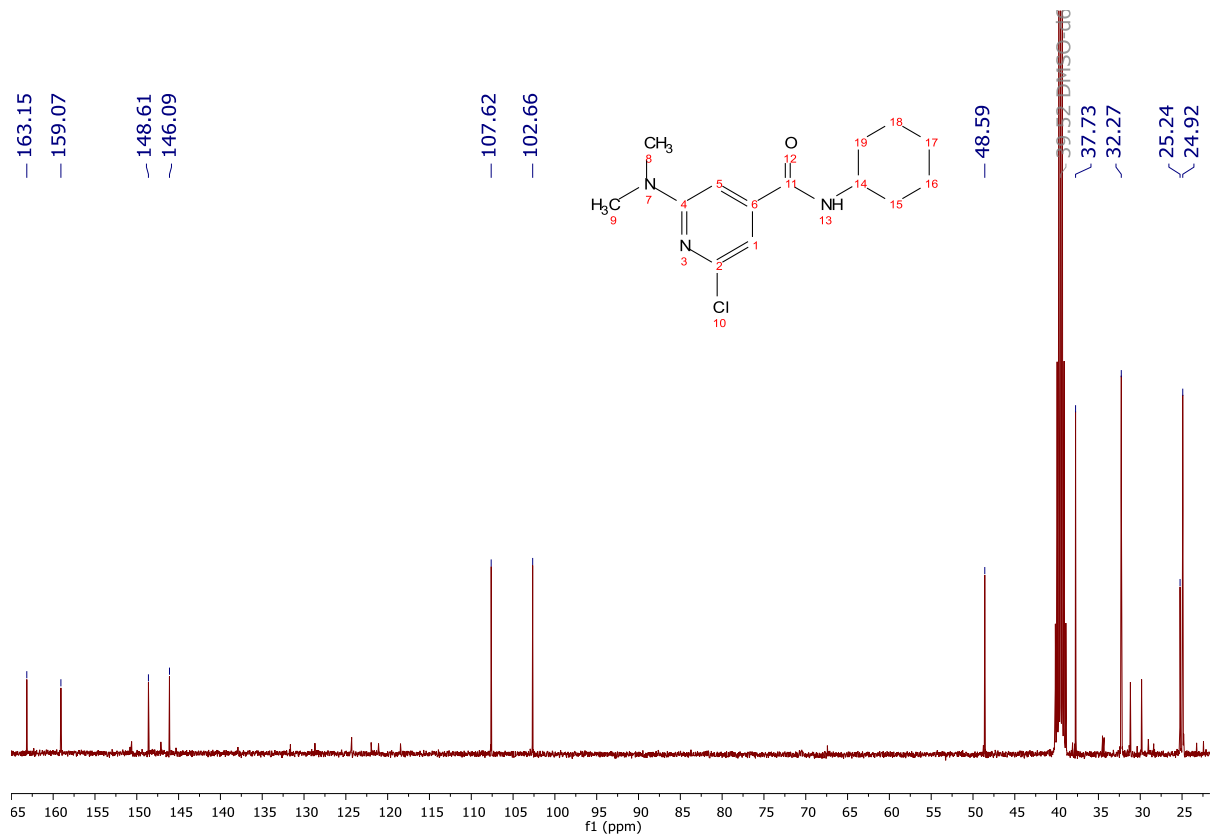
Espectro II-85. EM (APCI, $[M + H]^+$, m/z) del compuesto 2-cloro-*N*-ciclopentil-6-(dimetilamino)piridin-4-carboxamida (DLPMP5)



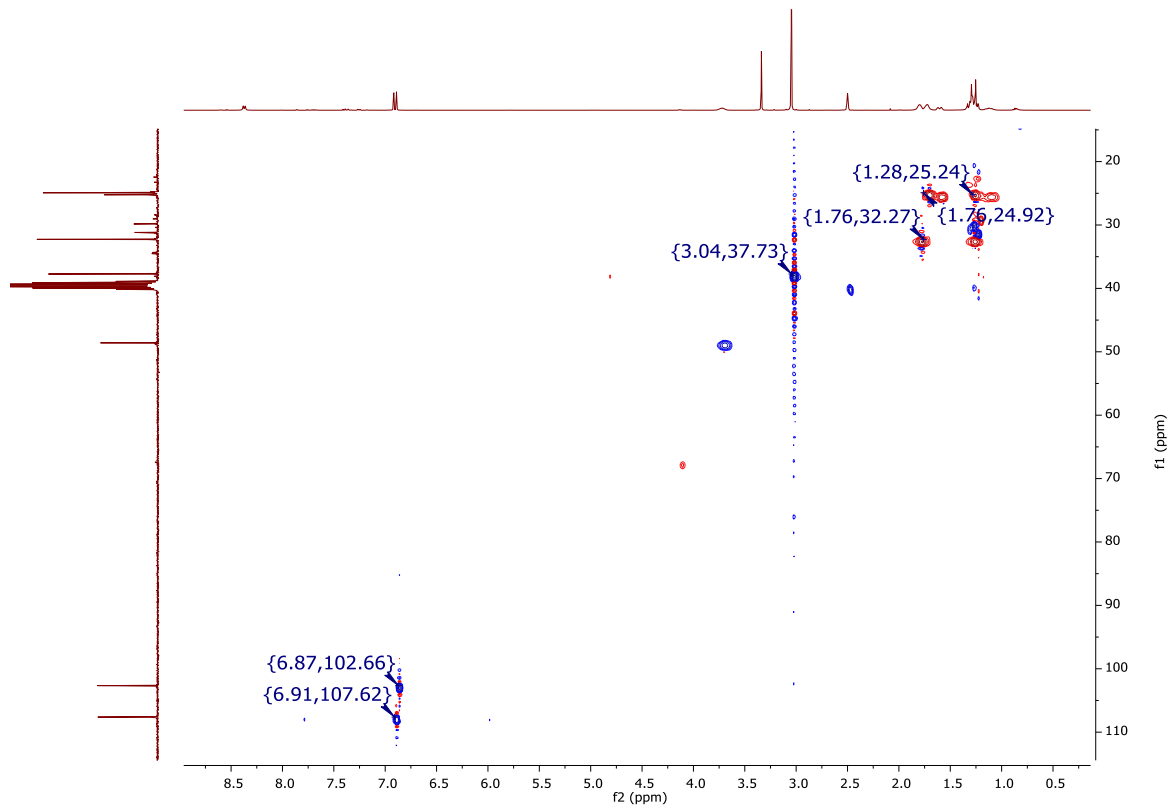
Espectro II-86. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ en ppm) del compuesto 2-cloro-*N*-ciclohexil-6-(dimetilamino)piridin-4-carboxamida (DLPMP6)



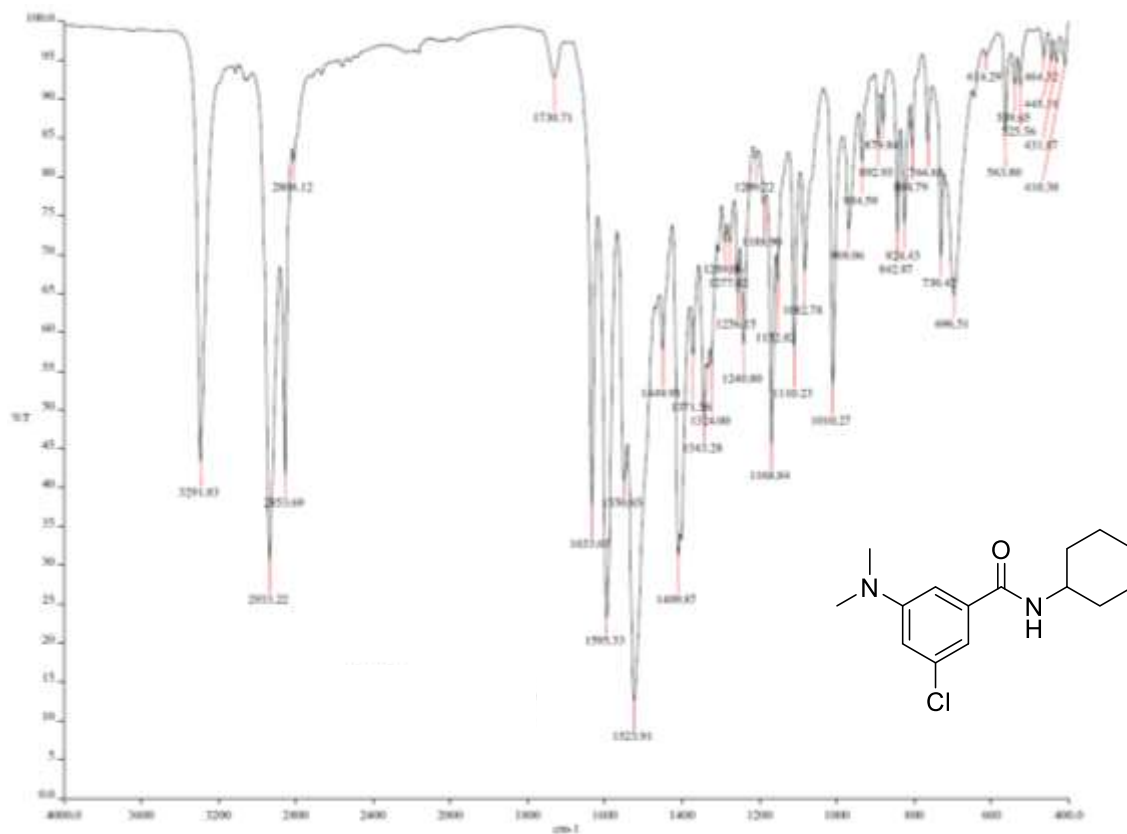
Espectro II-87. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ ppm). Experimento COSY del compuesto 2-cloro-*N*-ciclohexil-6-(dimetilamino)piridin-4-carboxamida (**DLPMP6**)



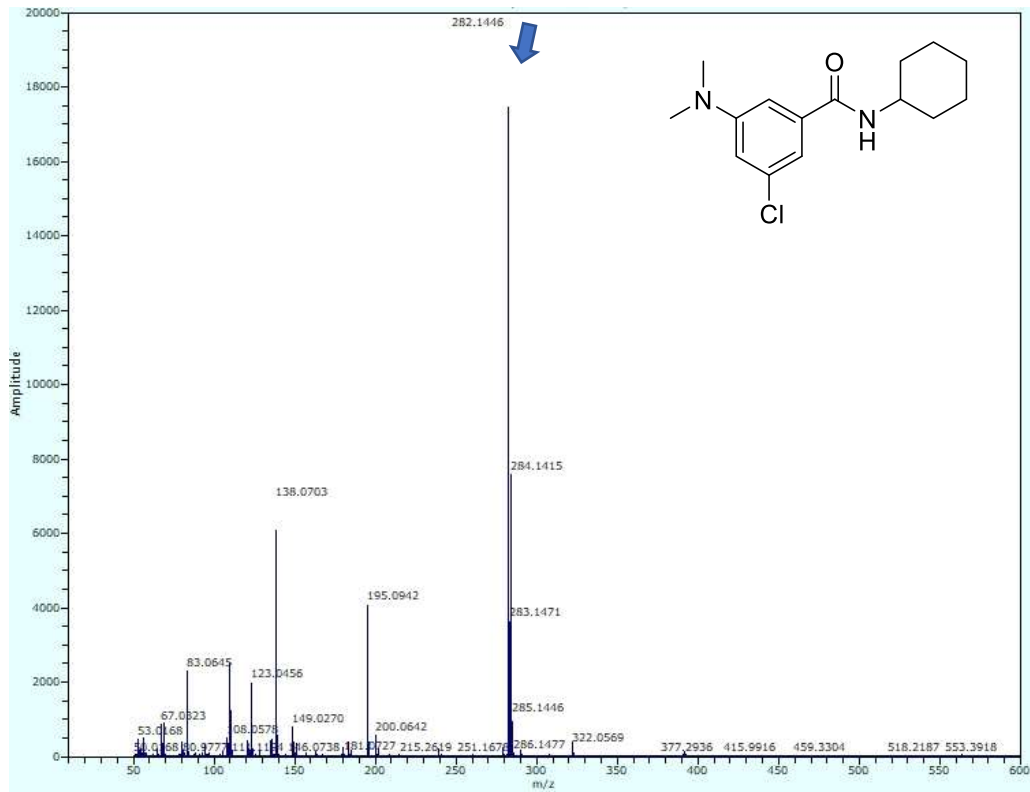
Espectro II-88. RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz, δ en ppm) del compuesto 2-cloro-*N*-ciclohexil-6-(dimetilamino)piridin-4-carboxamida (**DLPMP6**)



Espectro II-89. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, δ ppm). RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz, δ en ppm). Experimento HSQC del compuesto 2-cloro-*N*-ciclohexil-6-(dimetilamino)piridin-4-carboxamida (**DLPMP6**)



Espectro II-90. IR (FTIR por reflectancia ATR, cm^{-1}) del compuesto 2-cloro-*N*-ciclohexil-6-(dimetilamino)piridin-4-carboxamida (**DLPMP6**)



Espectro II-91. EM (APCI, $[M + H]^+$, m/z) del compuesto 2-cloro-N-ciclohexil-6-(dimetilamino)piridin-4-carboxamida (DLPMP6)

13. ANEXO III. ACOPLAMIENTO MOLECULAR

13.1 Diagramas 2D de interacciones obtenidos del acoplamiento molecular con AutoDock

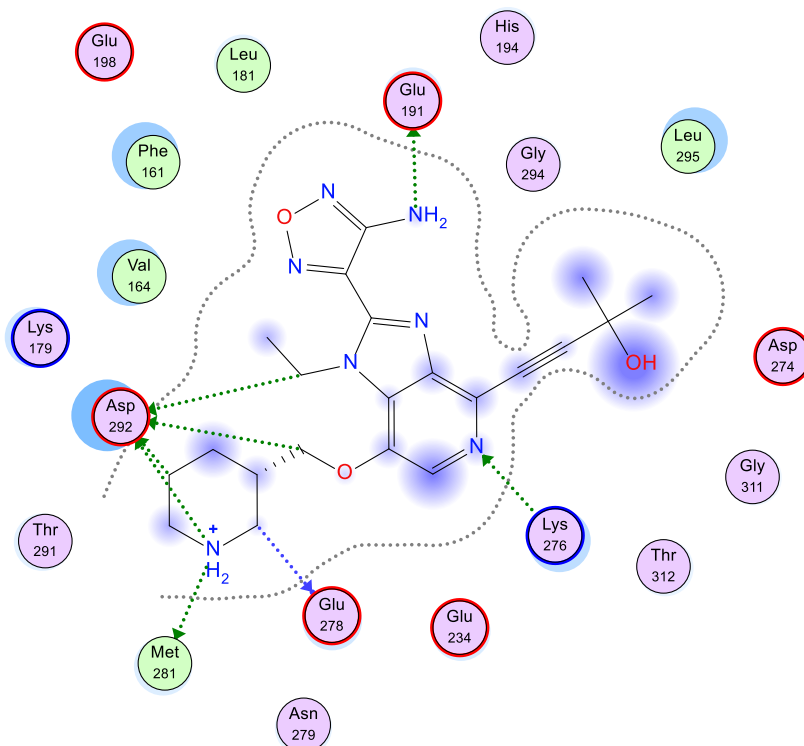


Figura III-1. Diagrama 2D de interacciones de **GSK690693** con AKT1.

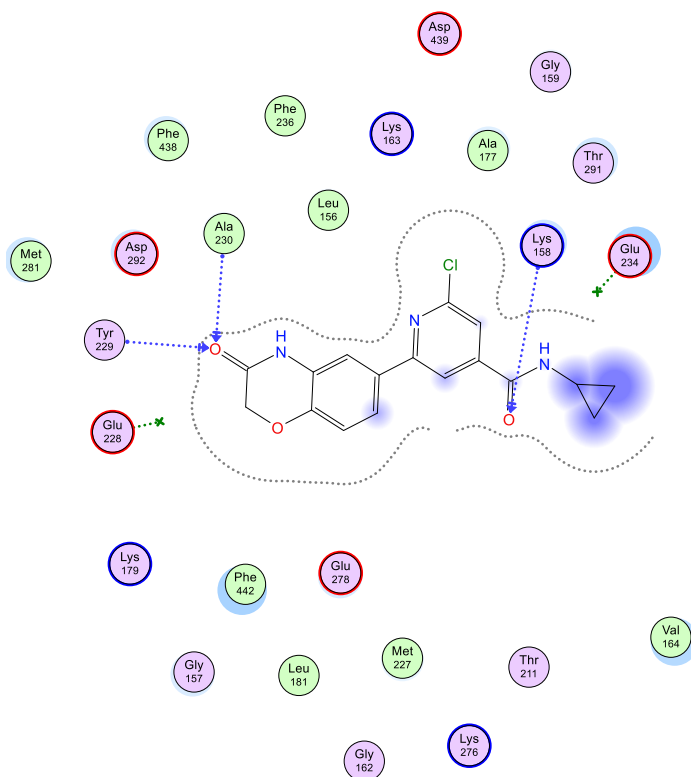


Figura III-2. Diagrama 2D de interacciones de **DLPMB3** con AKT1.

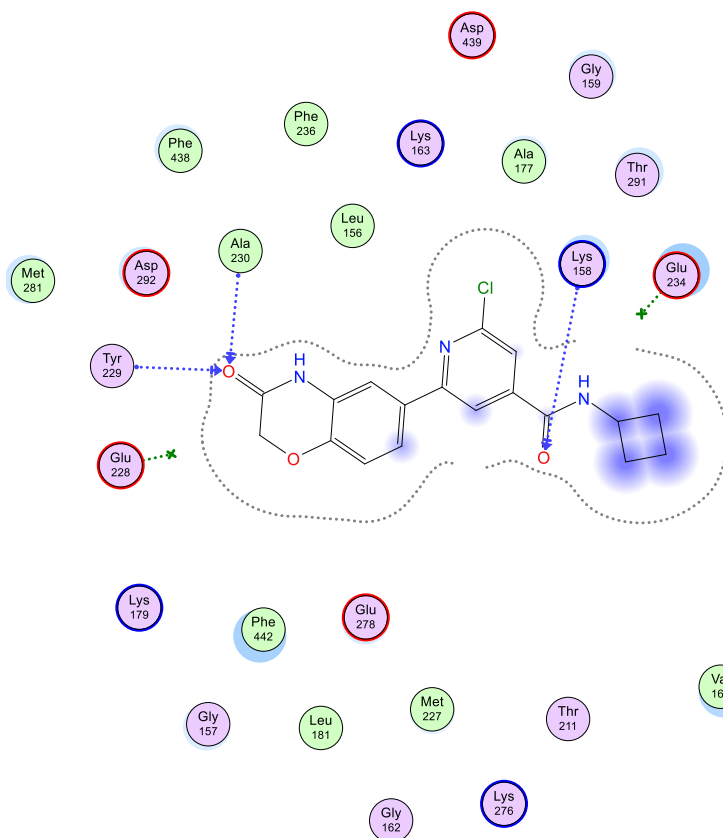


Figura III-3. Diagrama 2D de interacciones de **DLPMB4** con AKT1.

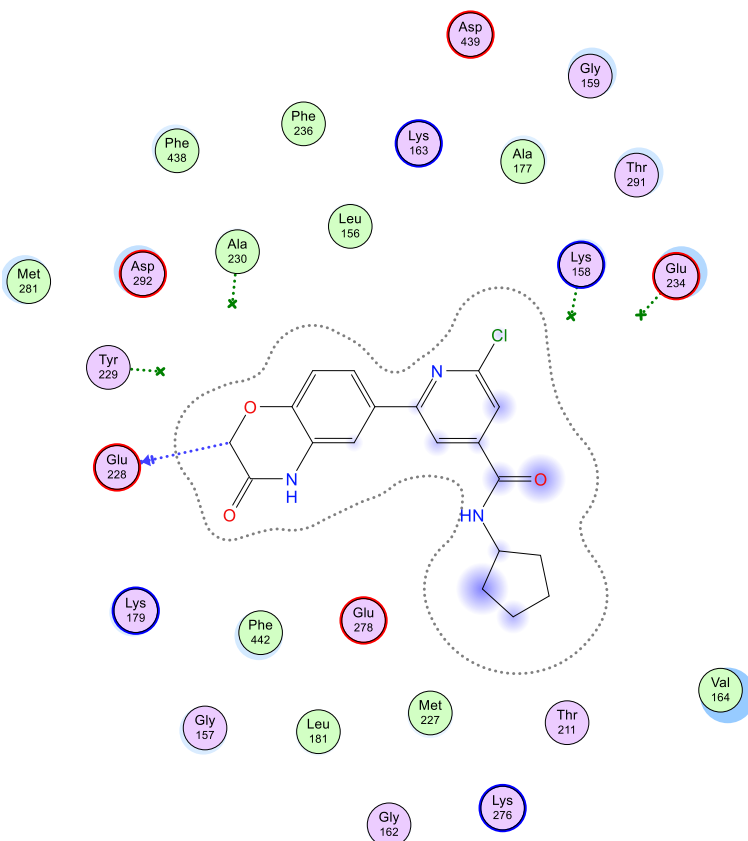


Figura III-4. Diagrama 2D de interacciones de **DLPMB5** con AKT1.

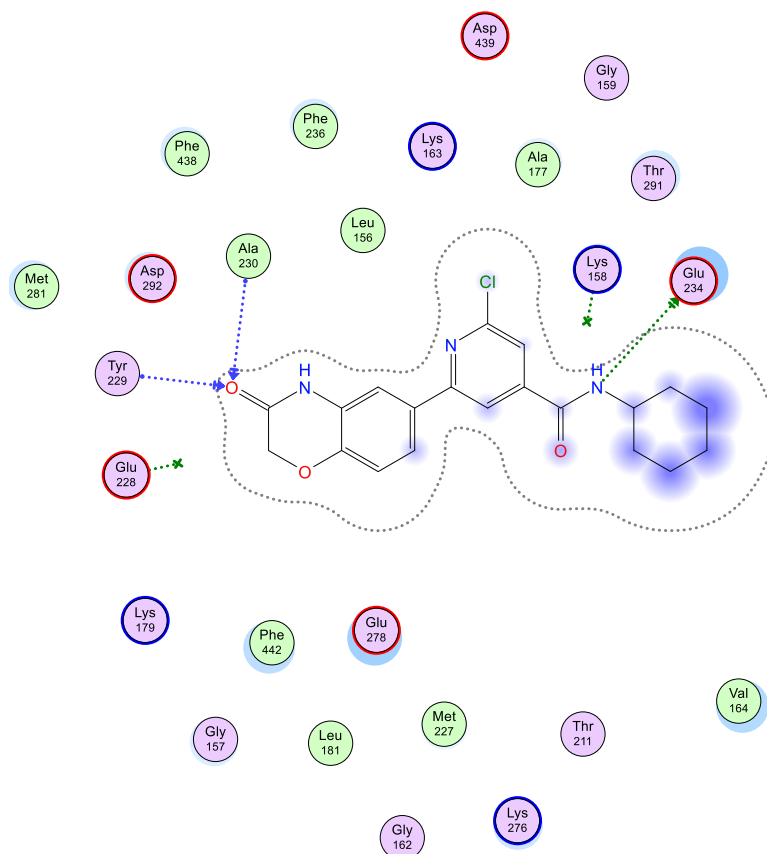


Figura III-5. Diagrama 2D de interacciones de **DLPMB6** con AKT1.

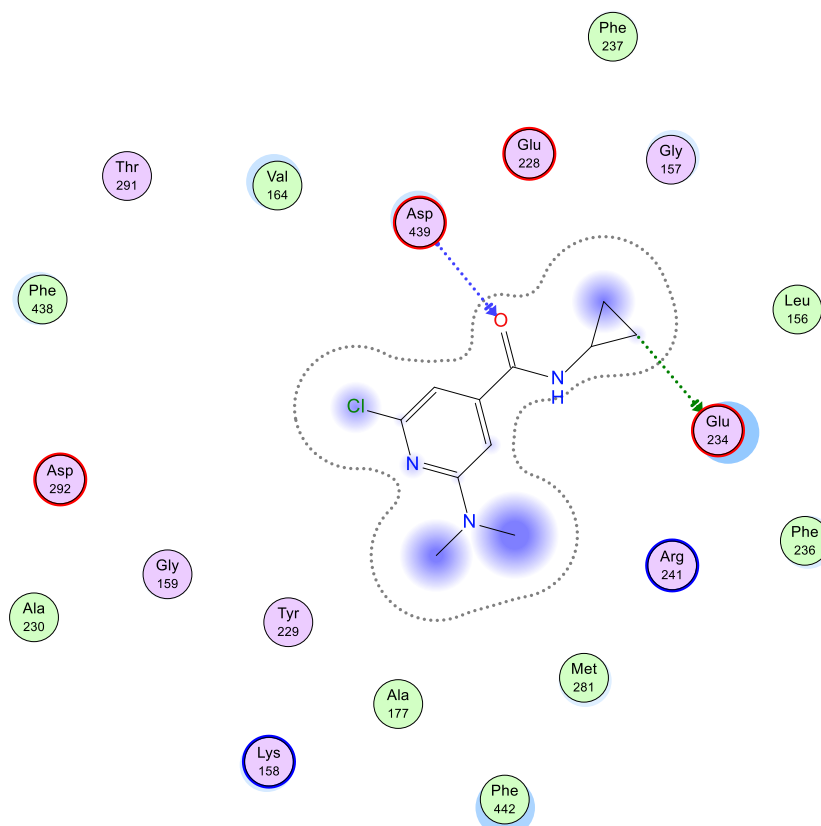


Figura III-6. Diagrama 2D de interacciones de **DLPMP3** con AKT1.

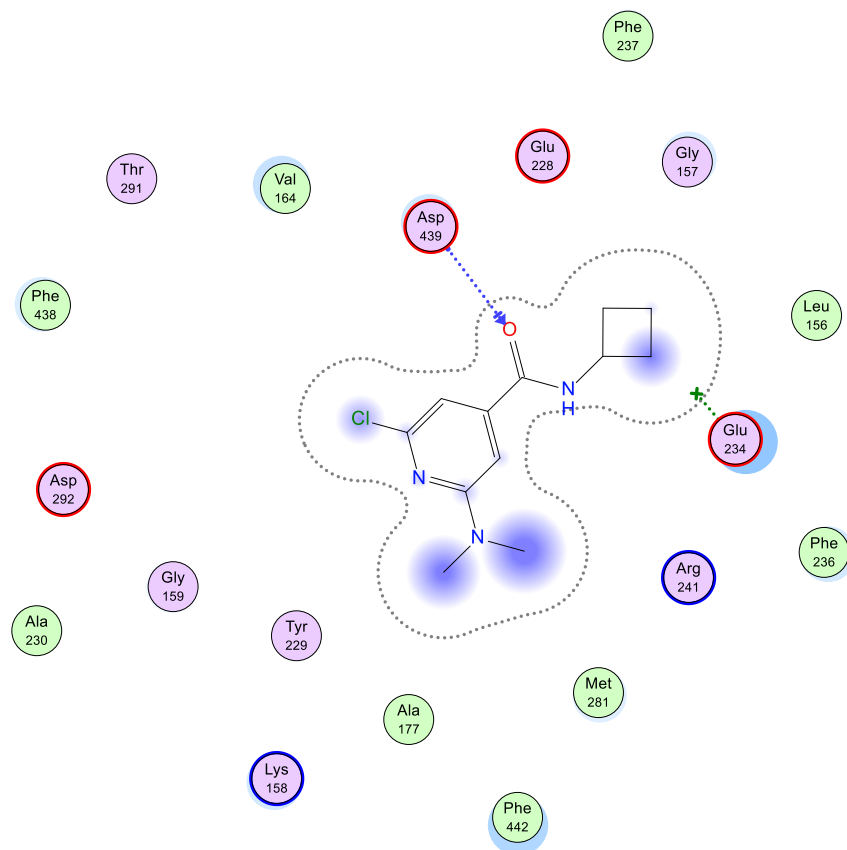


Figura III-7. Diagrama 2D de interacciones de DLPMP4 con AKT1.

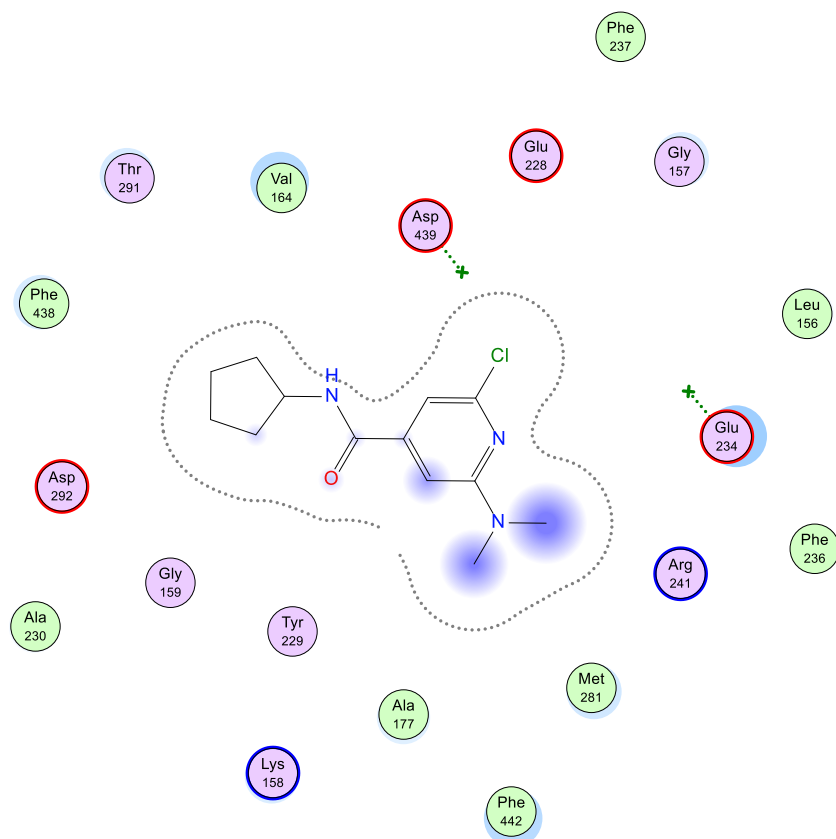


Figura III-8. Diagrama 2D de interacciones de DLPMP5 con AKT1.

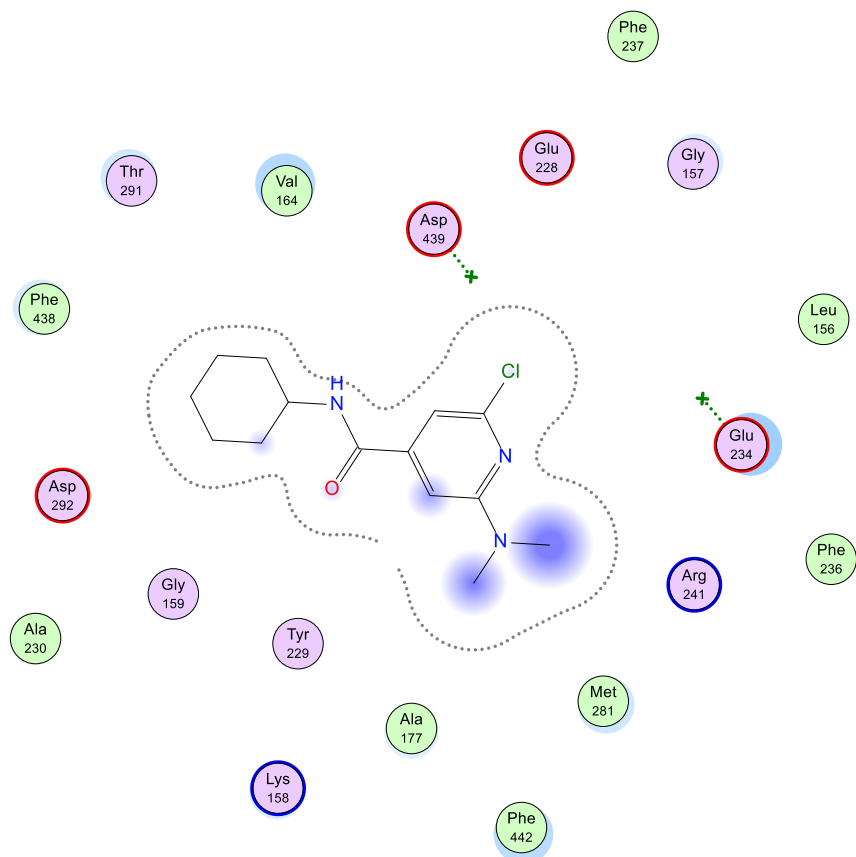


Figura III-9. Diagrama 2D de interacciones de **DLPMP6** con AKT1.

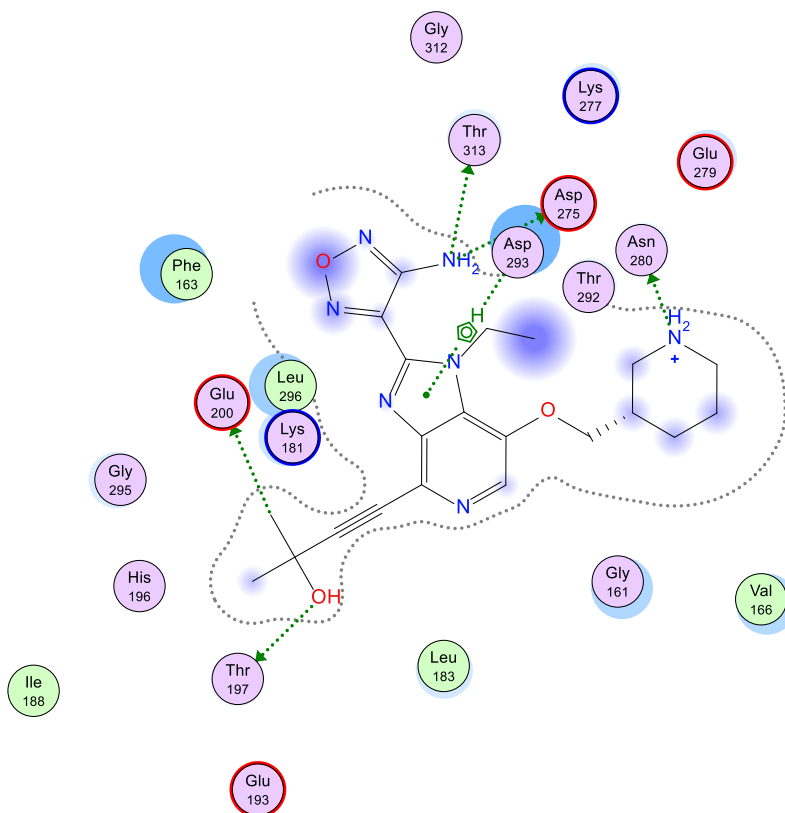


Figura III-10. Diagrama 2D de interacciones de **GSK690693** con AKT2.

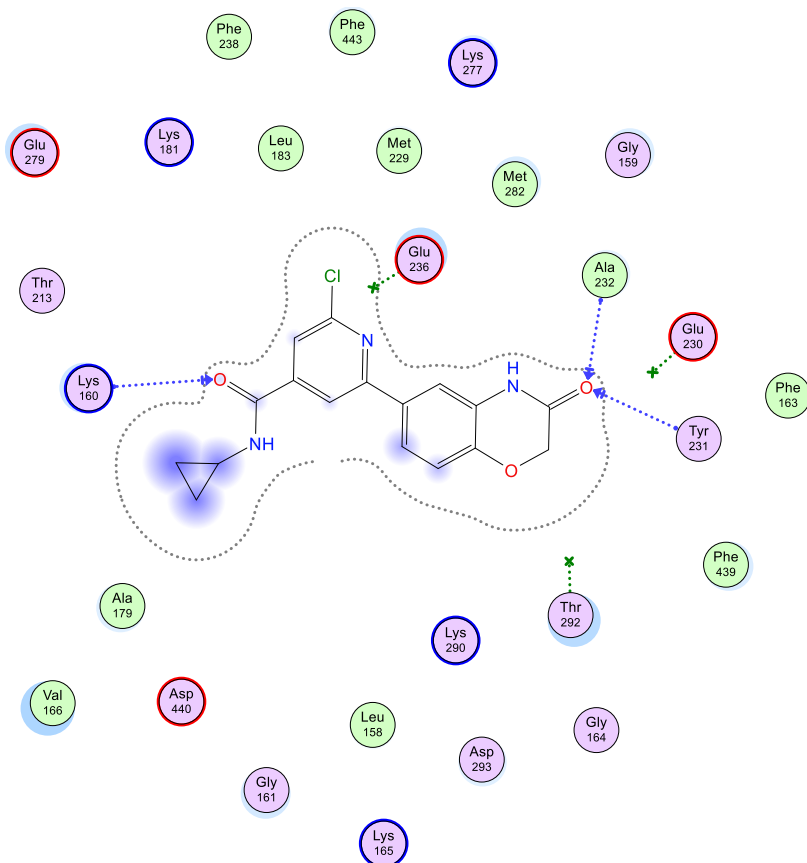


Figura III-11. Diagrama 2D de interacciones de DLPMB3 con AKT2.

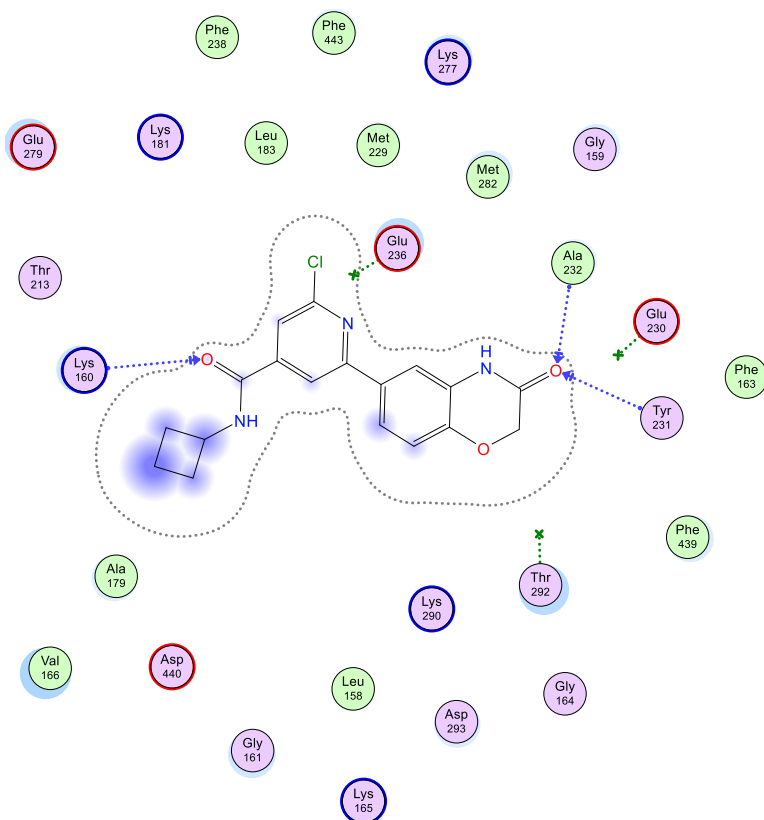


Figura III-12. Diagrama 2D de interacciones de DLPMB4 con AKT2.

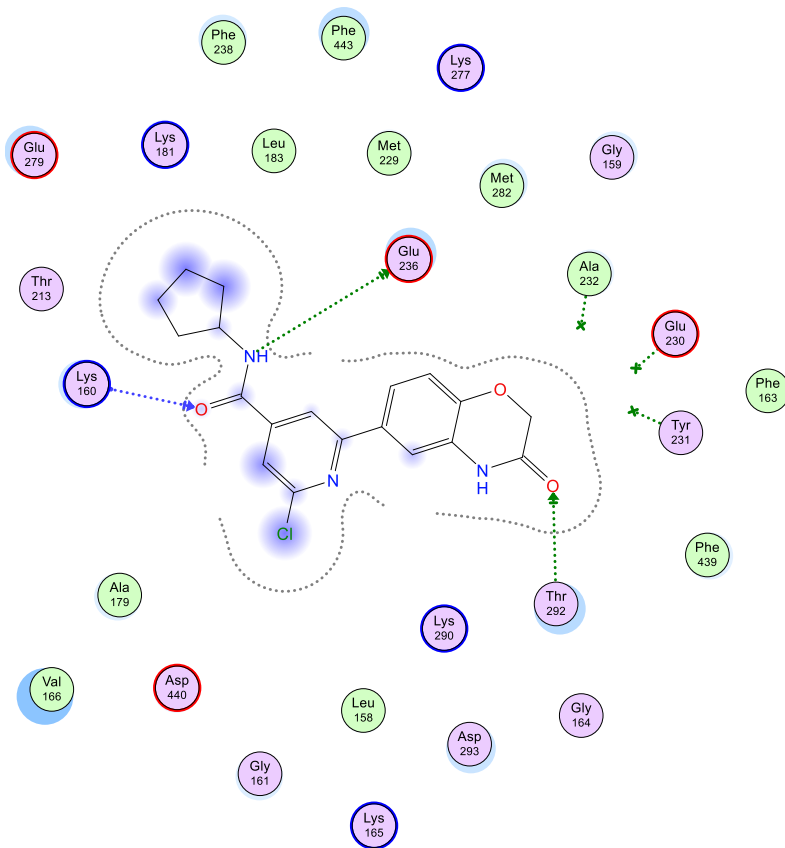


Figura III-13. Diagrama 2D de interacciones de DLPMB5 con AKT2.

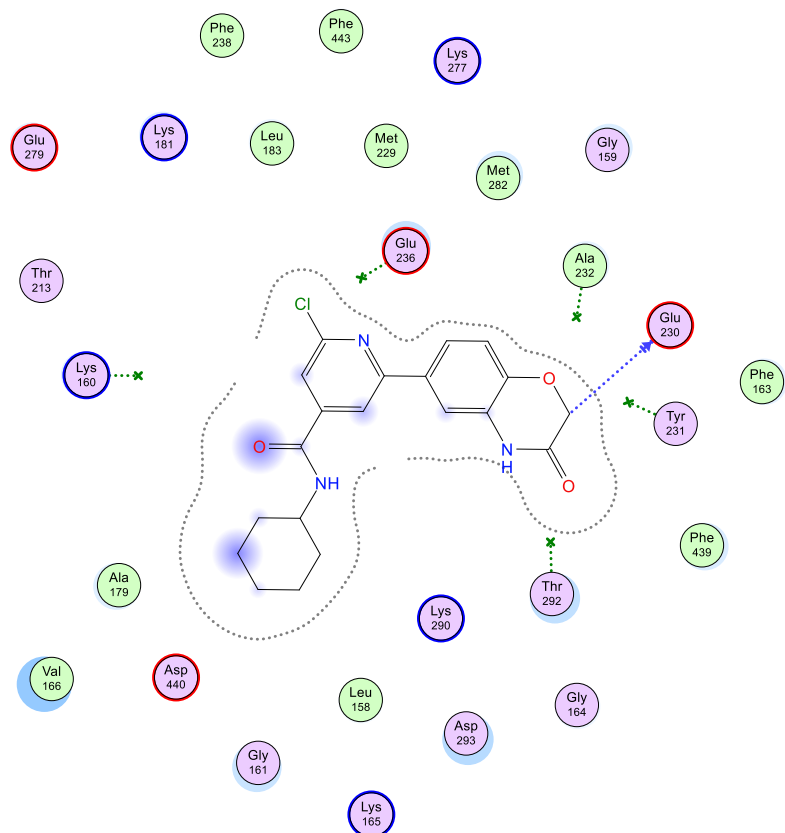


Figura III-14. Diagrama 2D de interacciones de DLPMB6 con AKT2.

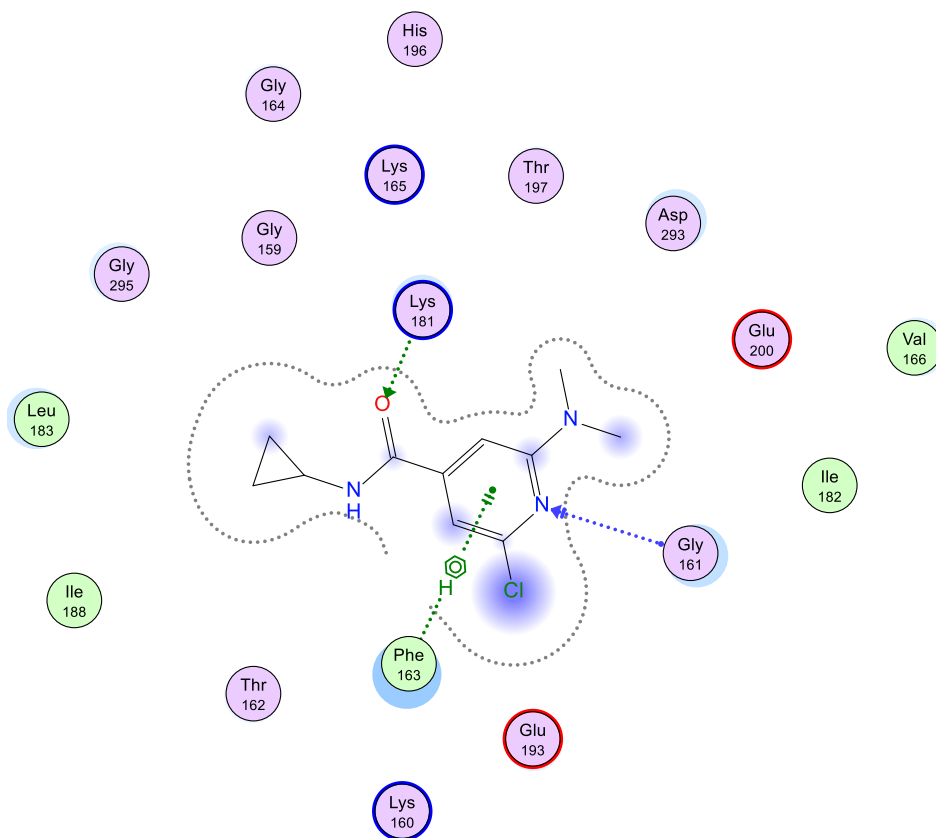


Figura III-15. Diagrama 2D de interacciones de **DLPMP3** con AKT2.

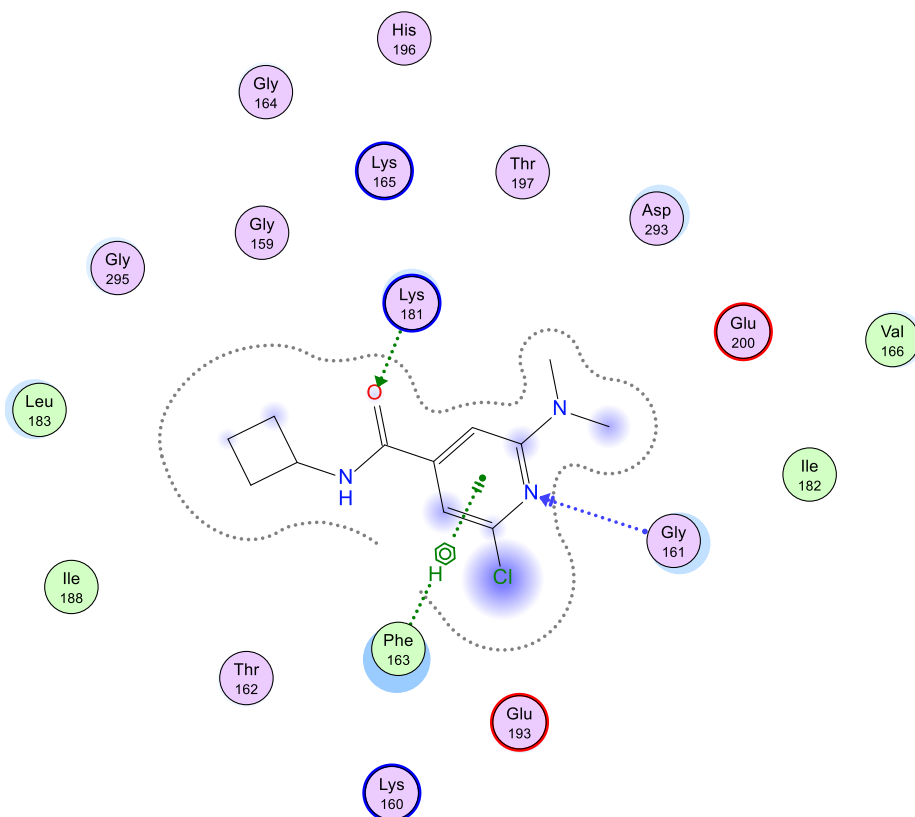


Figura III-16. Diagrama 2D de interacciones de **DLPMP4** con AKT2.

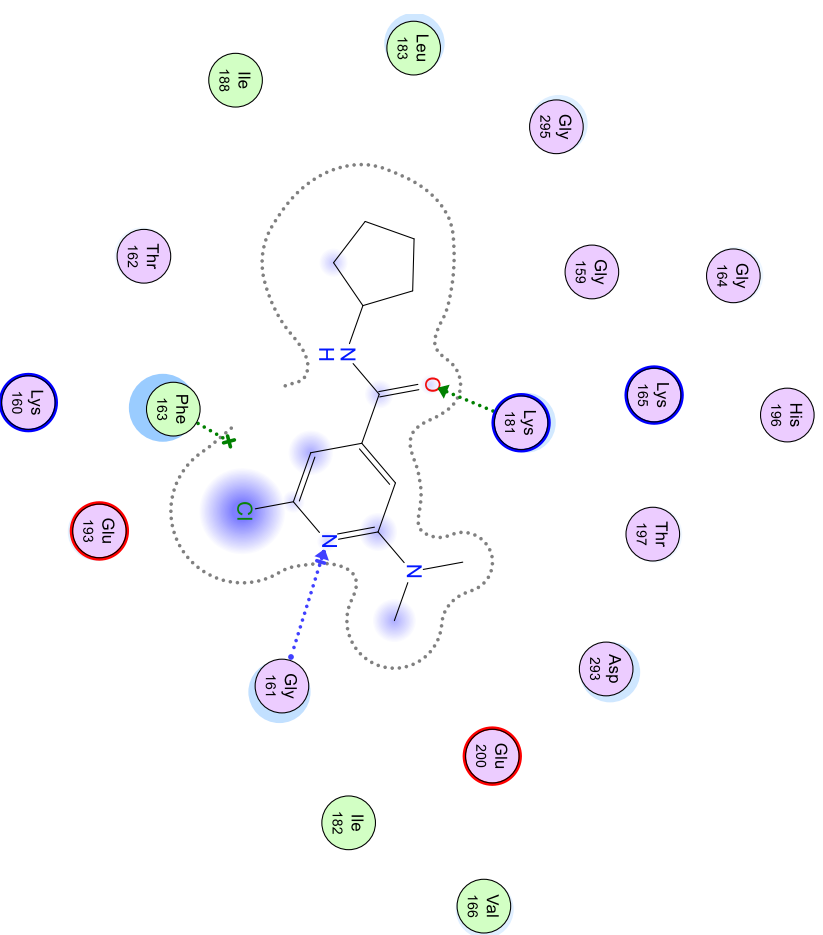


Figura III-17. Diagrama 2D de interacciones de DLPMMP5 con AKT2.

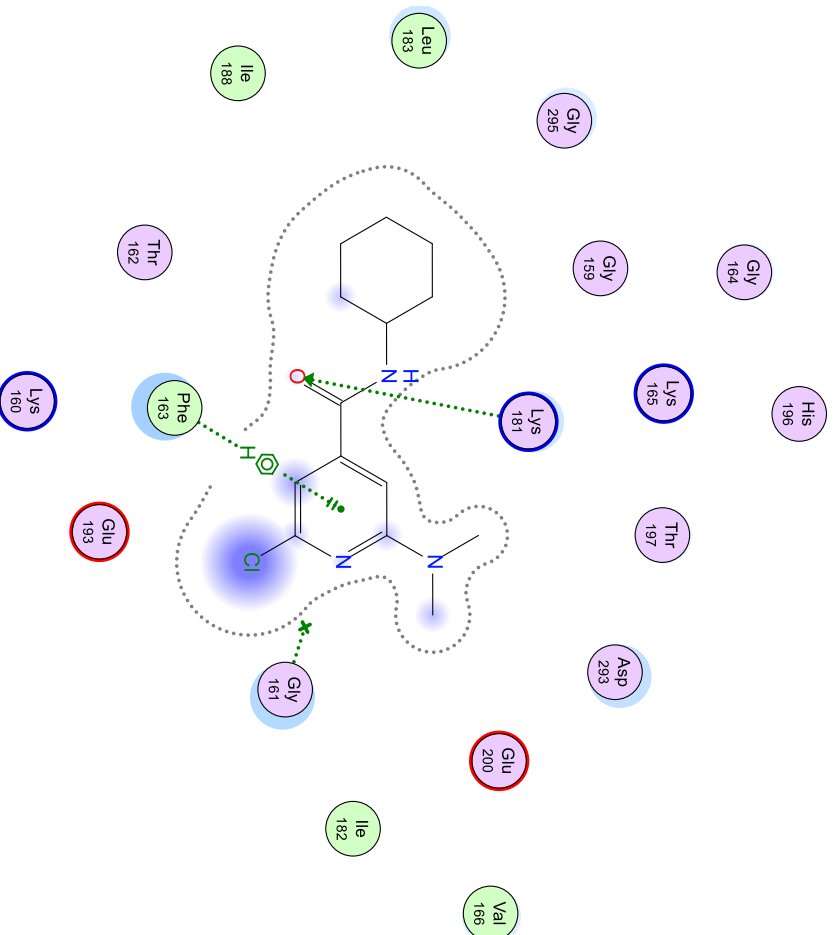


Figura III-18. Diagrama 2D de interacciones de DLPMMP6 con AKT2.

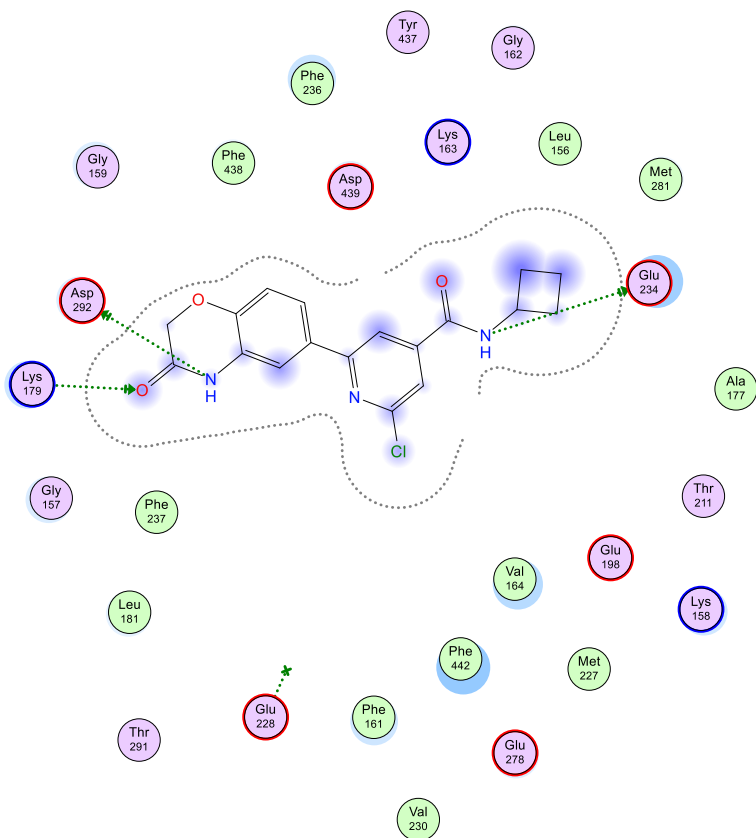


Figura III-21. Diagrama 2D de interacciones de **DLPMB4** con AKT3.

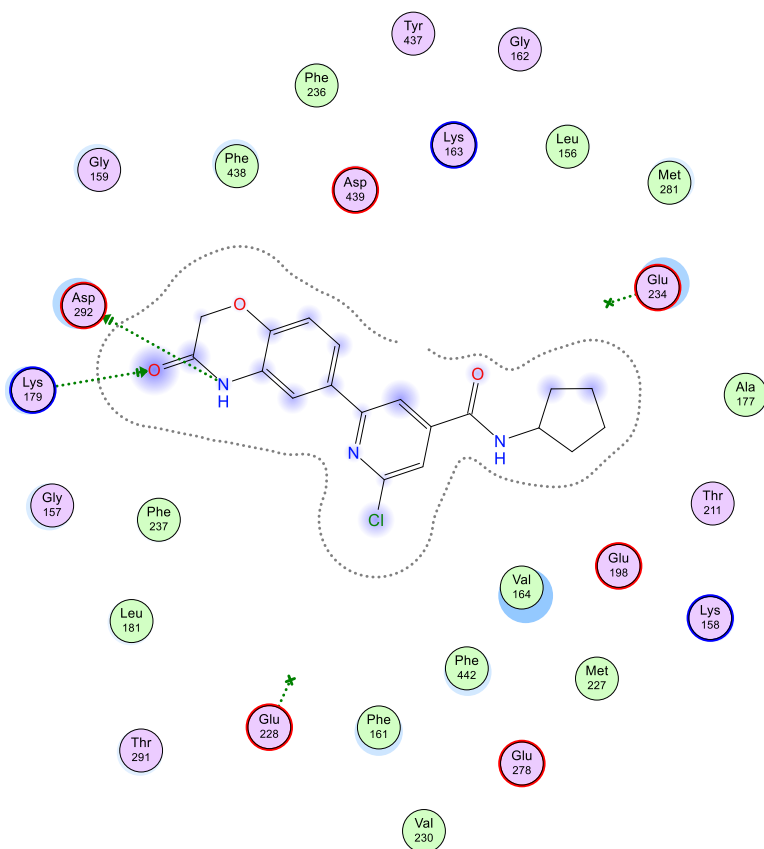


Figura III-22. Diagrama 2D de interacciones de **DLPMB5** con AKT3.

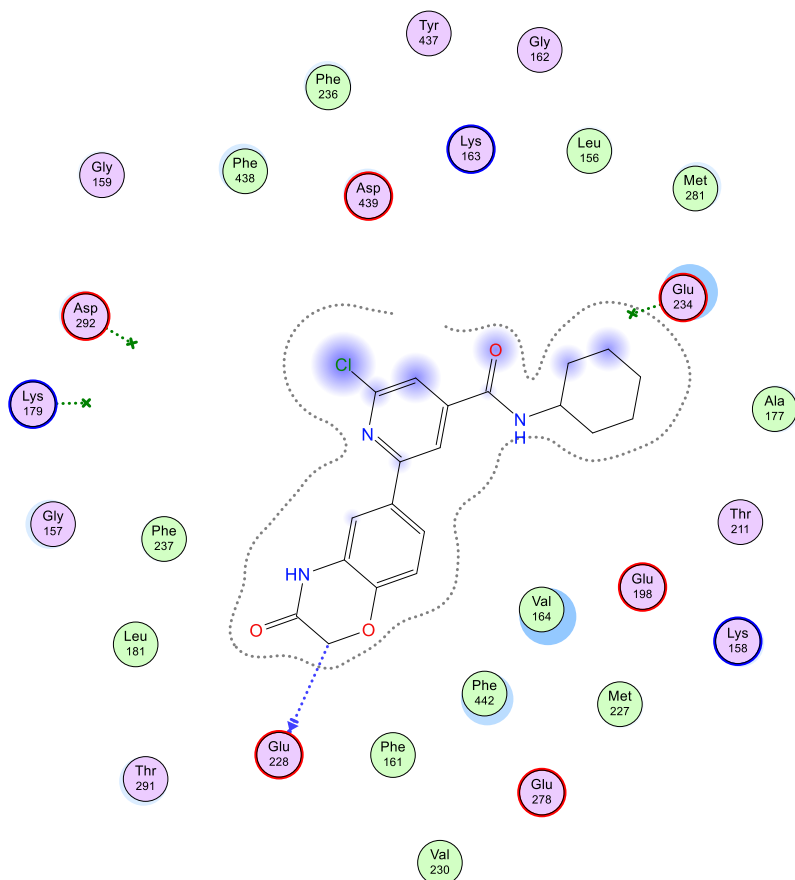


Figura III-23. Diagrama 2D de interacciones de DLPMB6 con AKT3.

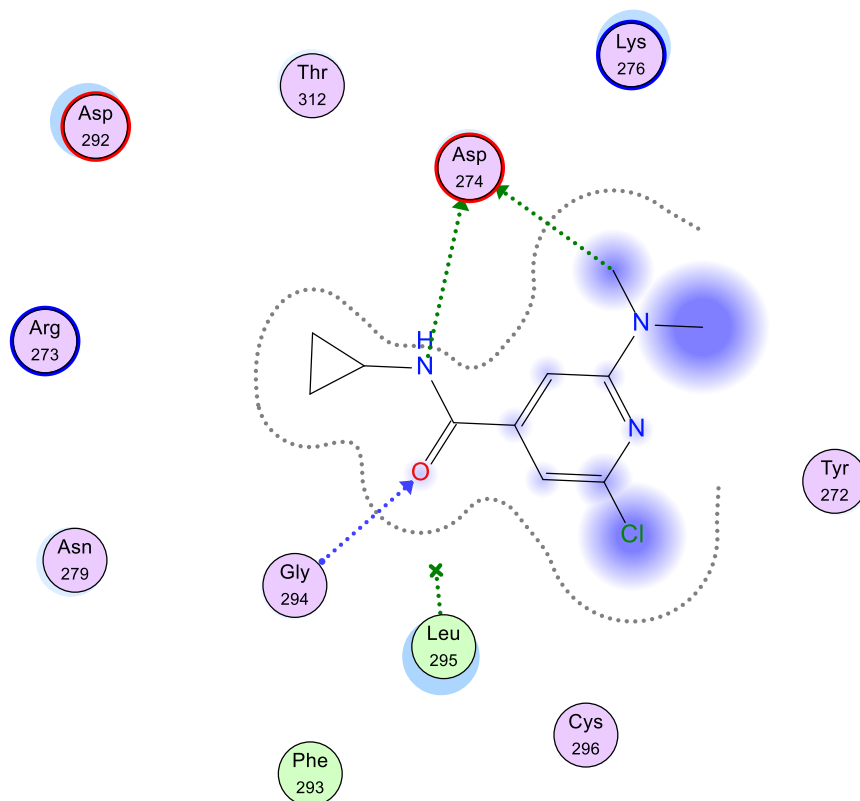


Figura III-24. Diagrama 2D de interacciones de DLPMP3 con AKT3.

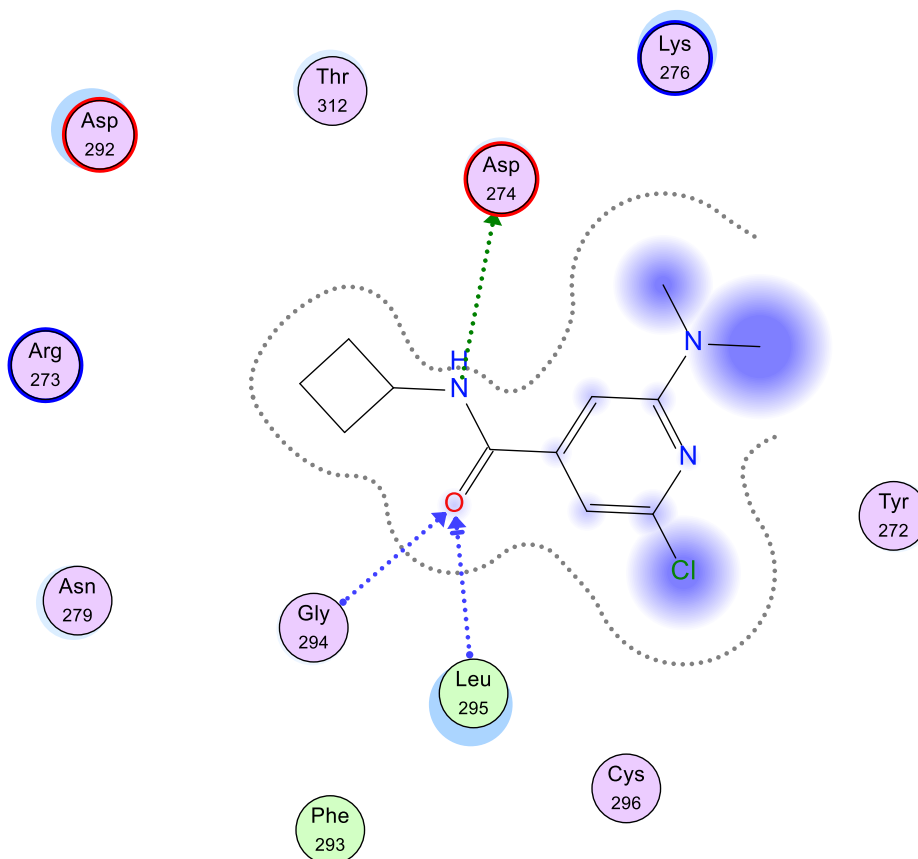


Figura III-25. Diagrama 2D de interacciones de DLPMP4 con AKT3.

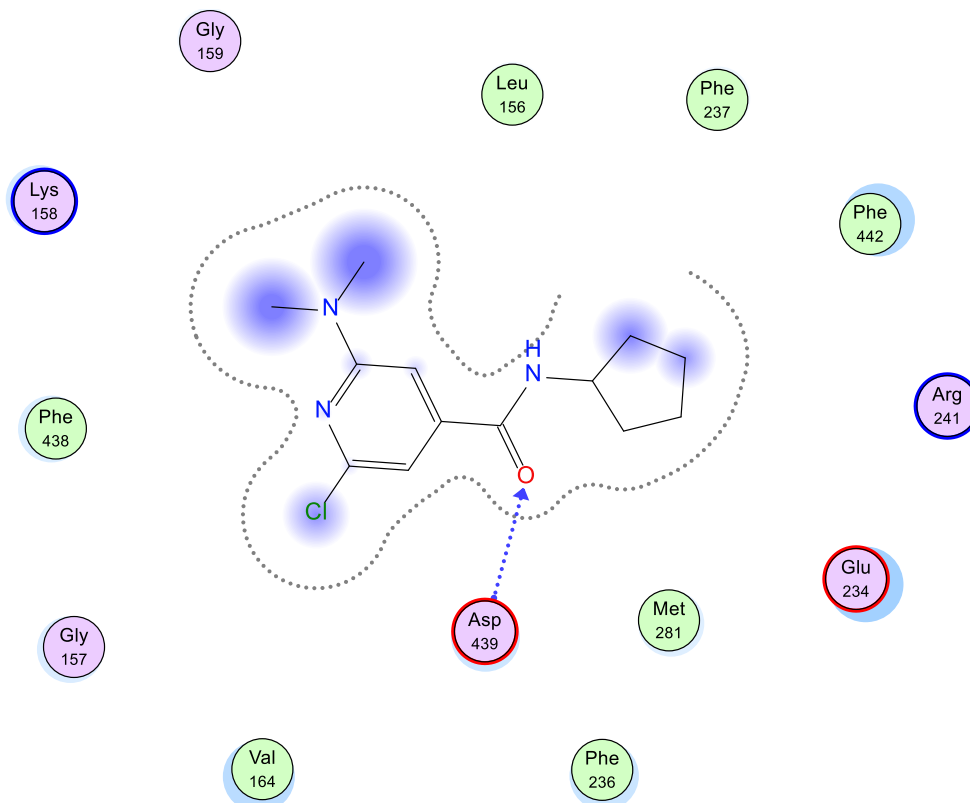


Figura III-26. Diagrama 2D de interacciones de DLPMP5 con AKT3.

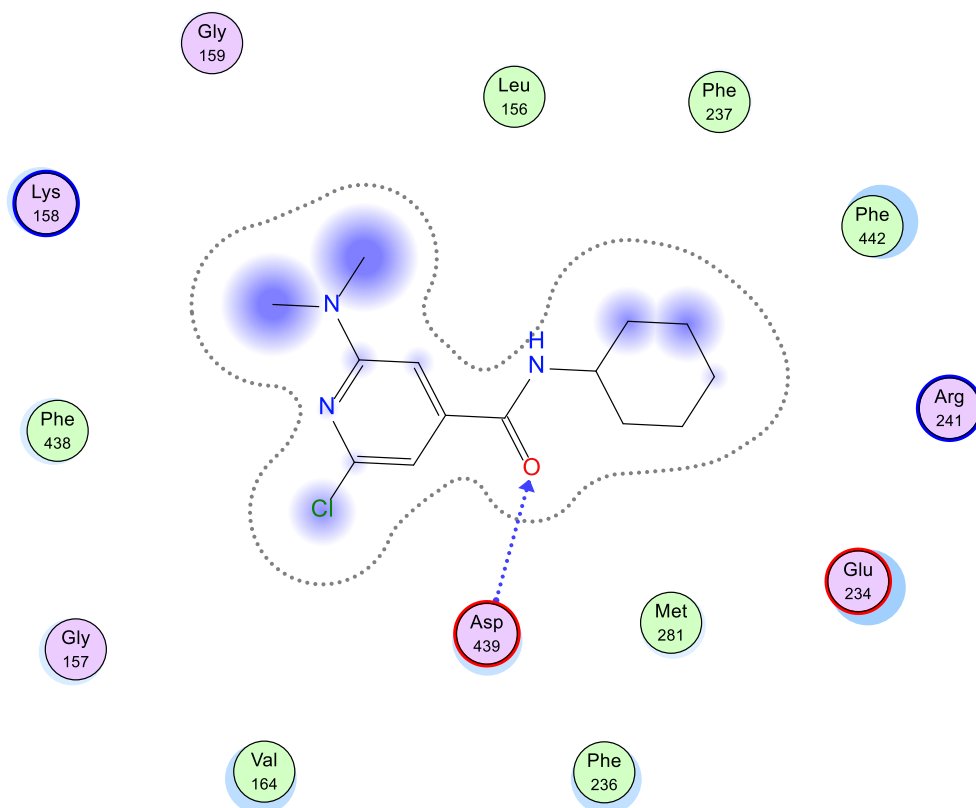


Figura III-27. Diagrama 2D de interacciones de **DLPMP6** con AKT3.

13.2 Diagramas 2D de interacciones obtenidos del acoplamiento molecular con Glide

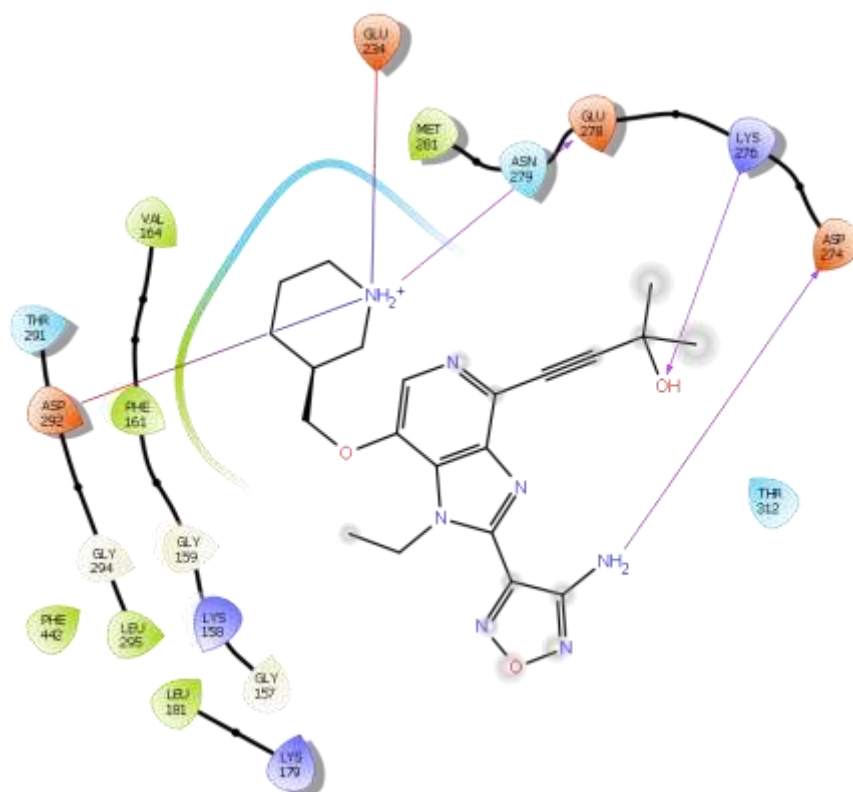


Figura III-28. Diagrama 2D de interacciones de **GSK690693** con AKT1.

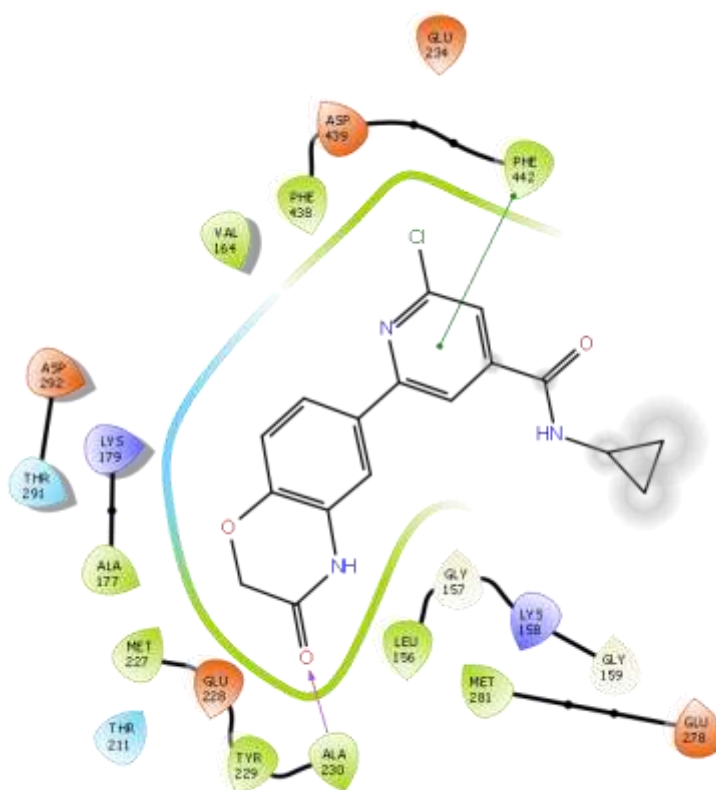


Figura III-29. Diagrama 2D de interacciones de DLPMB3 con AKT1.

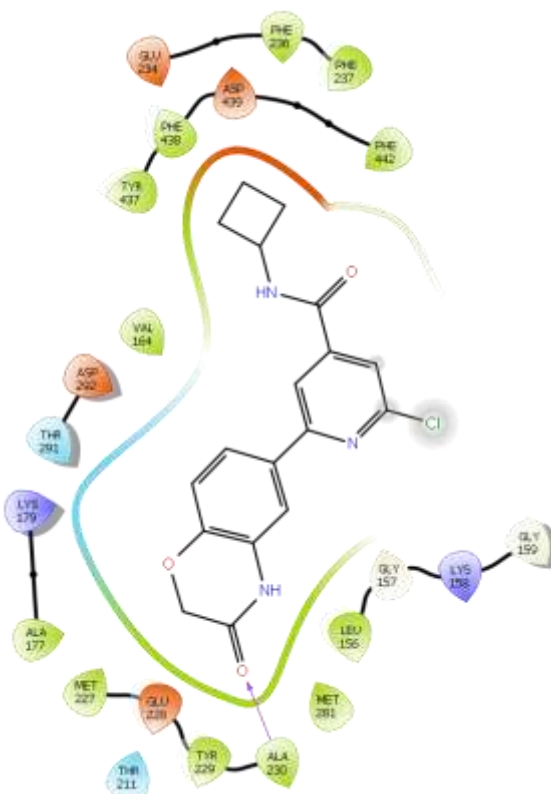


Figura III-30. Diagrama 2D de interacciones de DLPMB4 con AKT1.

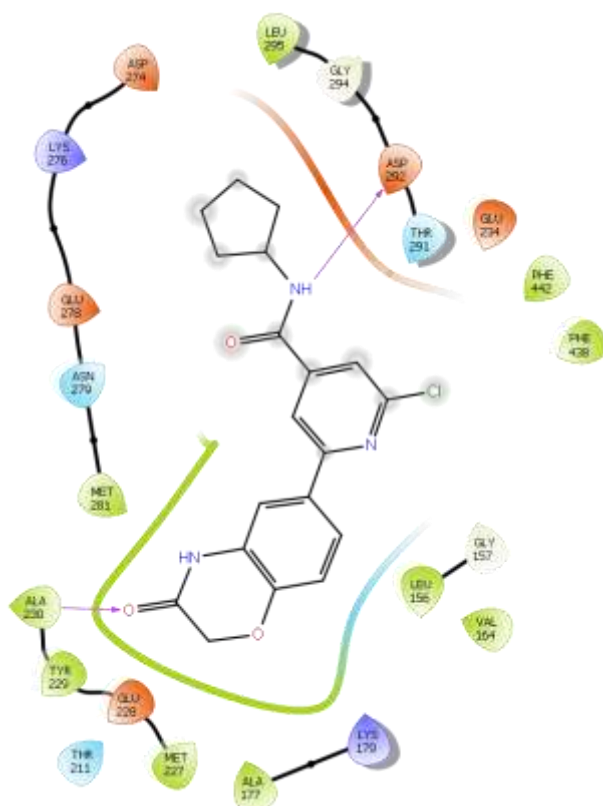


Figura III-31. Diagrama 2D de interacciones de **DLPMB5** con AKT1.

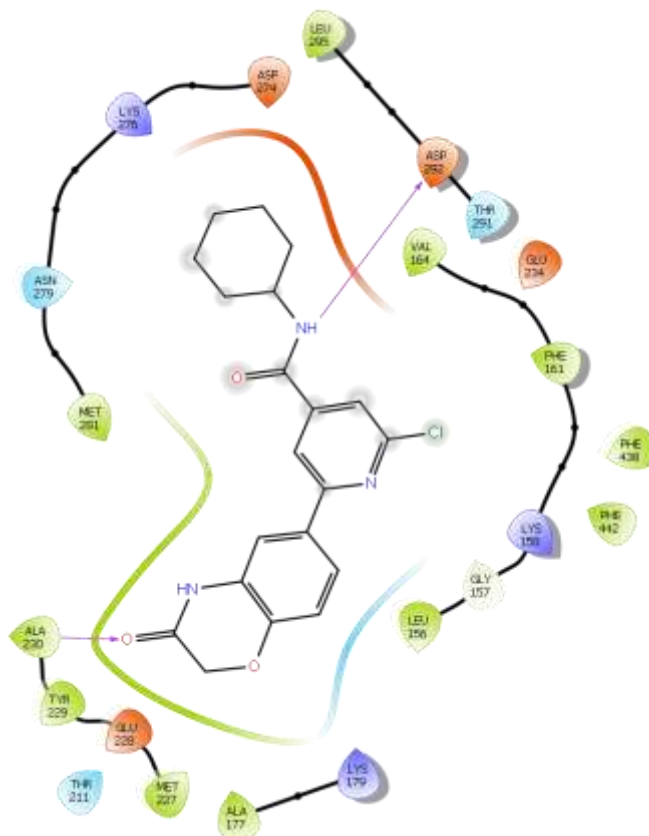


Figura III-32. Diagrama 2D de interacciones de **DLPMB6** con AKT1.

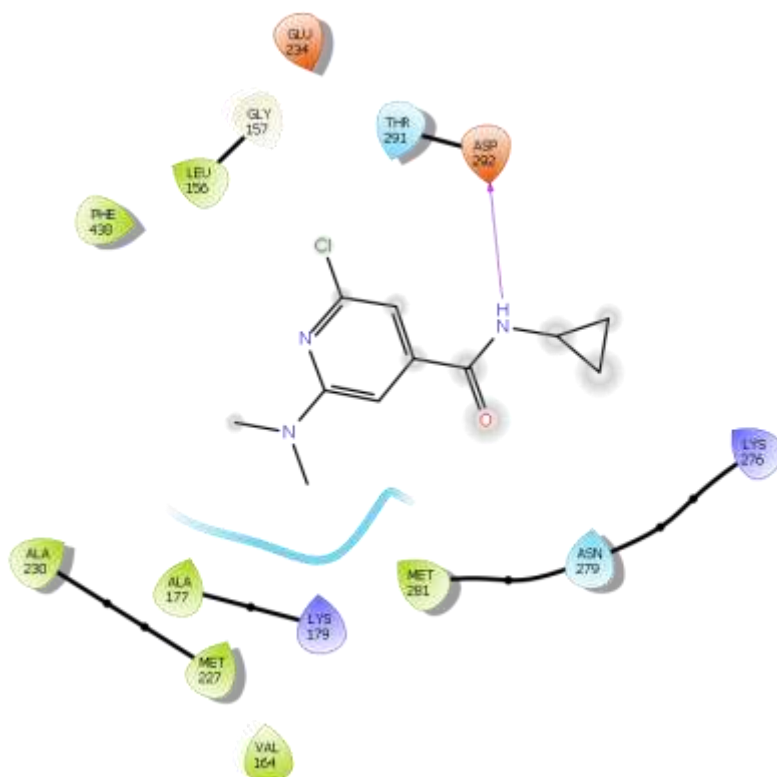


Figura III-33. Diagrama 2D de interacciones de DLPMP3 con AKT1.

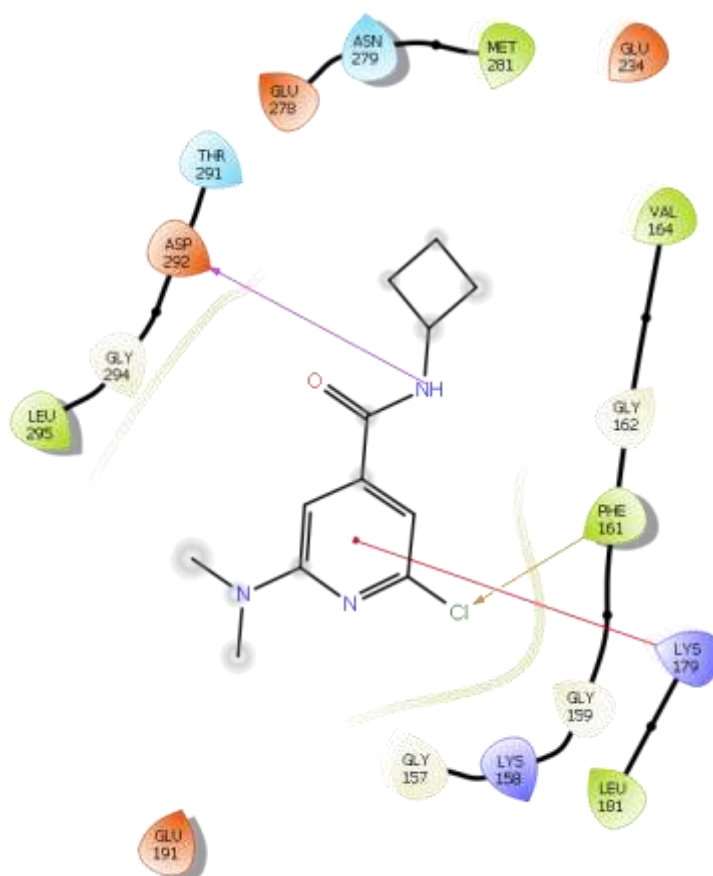


Figura III-34. Diagrama 2D de interacciones de DLPMP4 con AKT1.

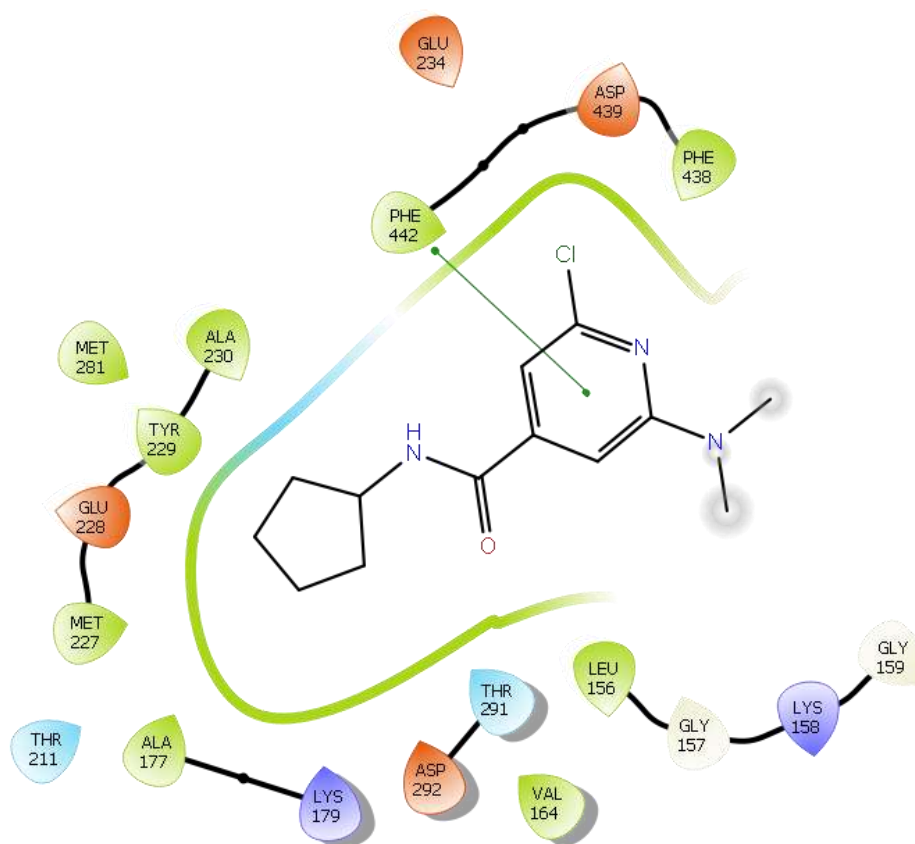


Figura III-35. Diagrama 2D de interacciones de DLPMP5 con AKT1.

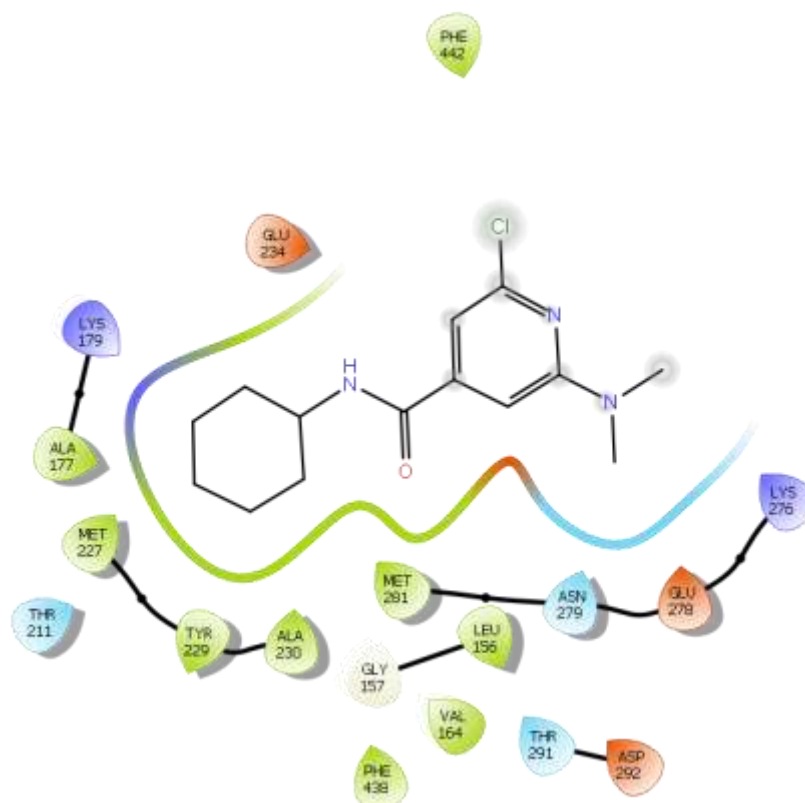


Figura III-36. Diagrama 2D de interacciones de DLPMP6 con AKT1.

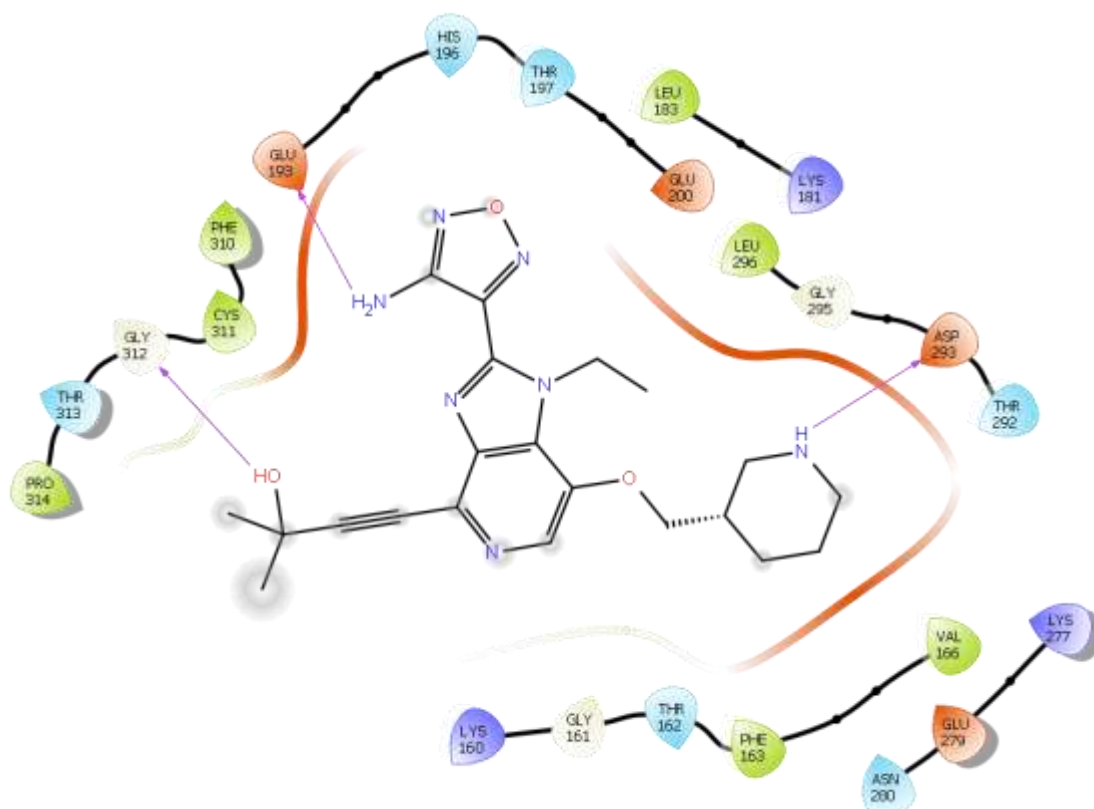


Figura III-37. Diagrama 2D de interacciones de **GSK690693** con AKT2.

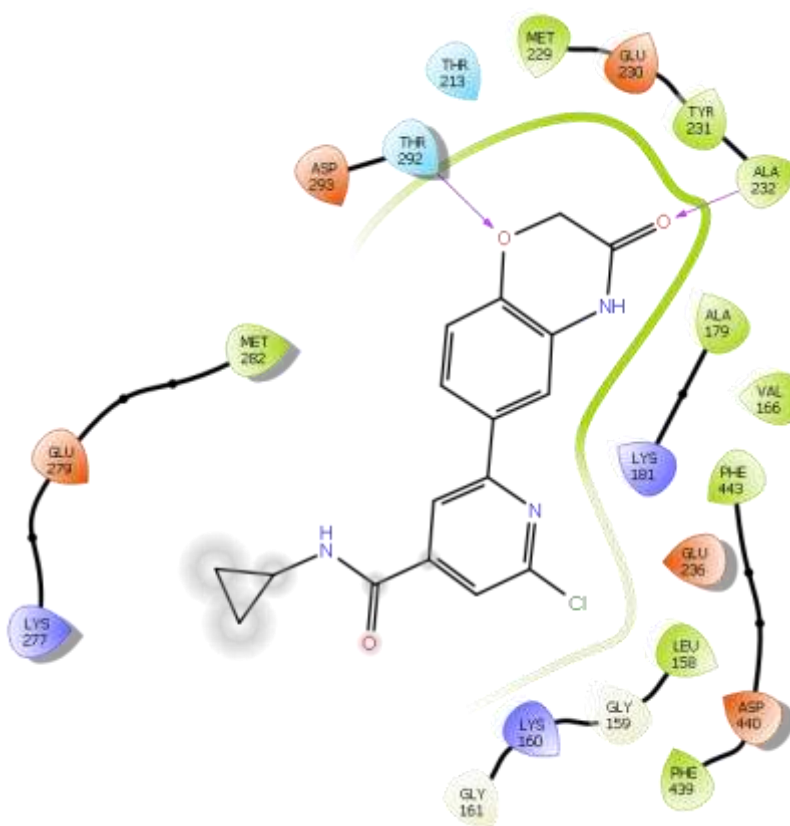


Figura III-38. Diagrama 2D de interacciones de **DLPMB3** con AKT2.

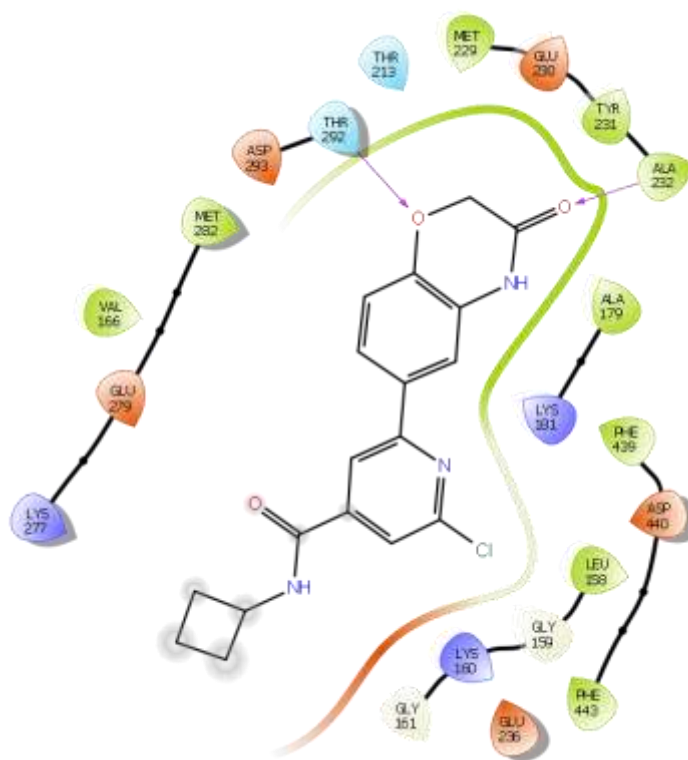


Figura III-39. Diagrama 2D de interacciones de DLPMB4 con AKT2.

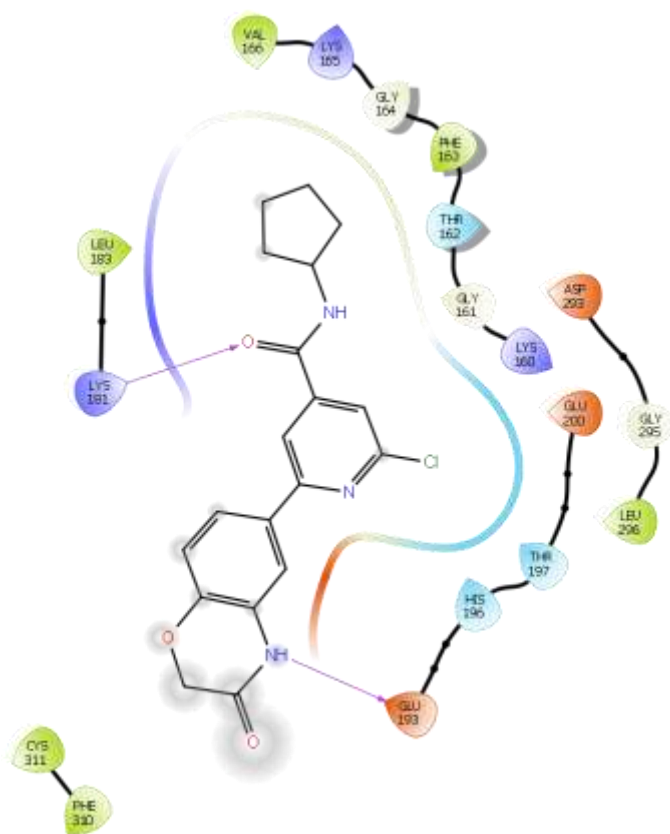


Figura III-40. Diagrama 2D de interacciones de DLPMB5 con AKT2.

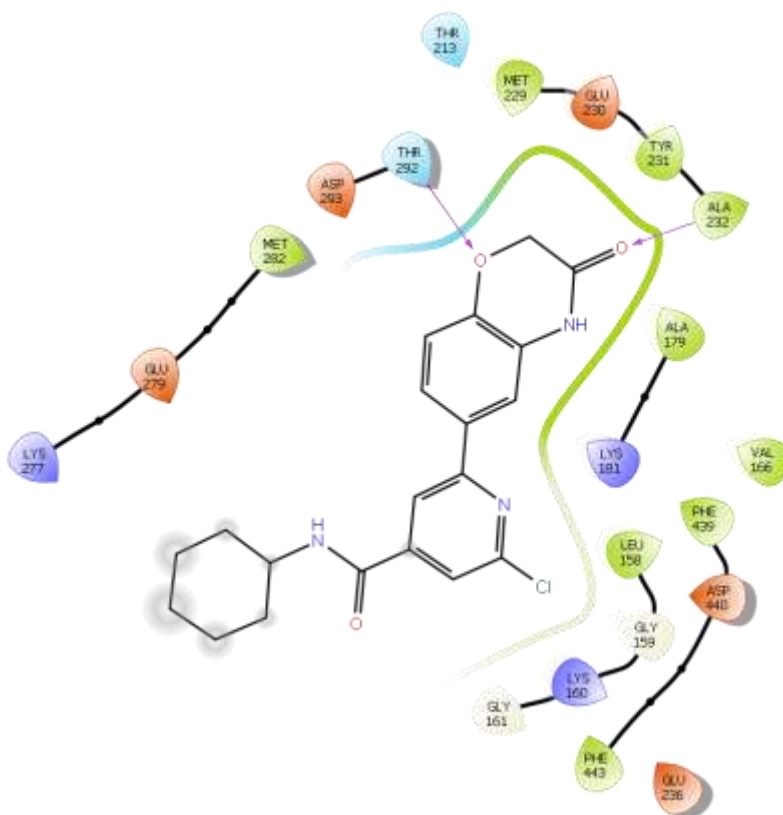


Figura III-41. Diagrama 2D de interacciones de DLPMB6 con AKT2.

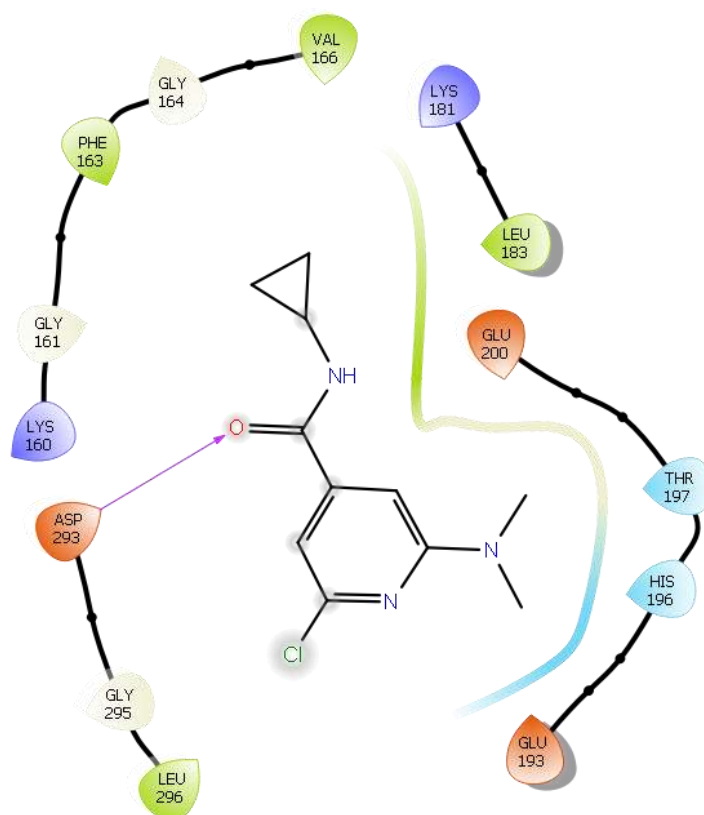


Figura III-42. Diagrama 2D de interacciones de DLPMP3 con AKT2.

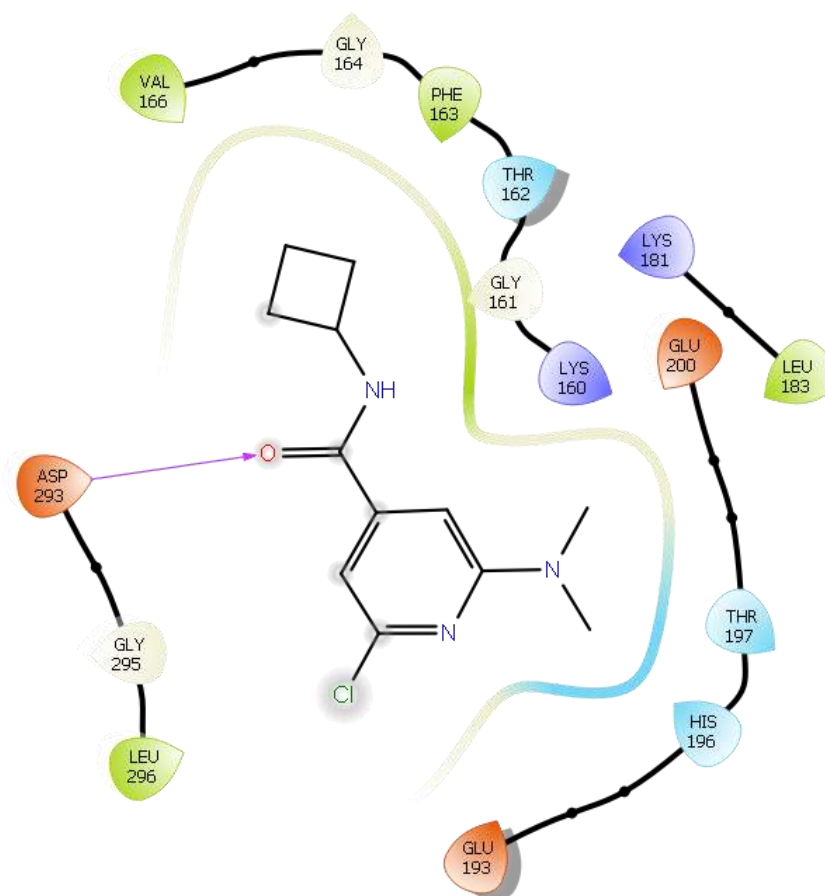


Figura III-43. Diagrama 2D de interacciones de DLPMP4 con AKT2.

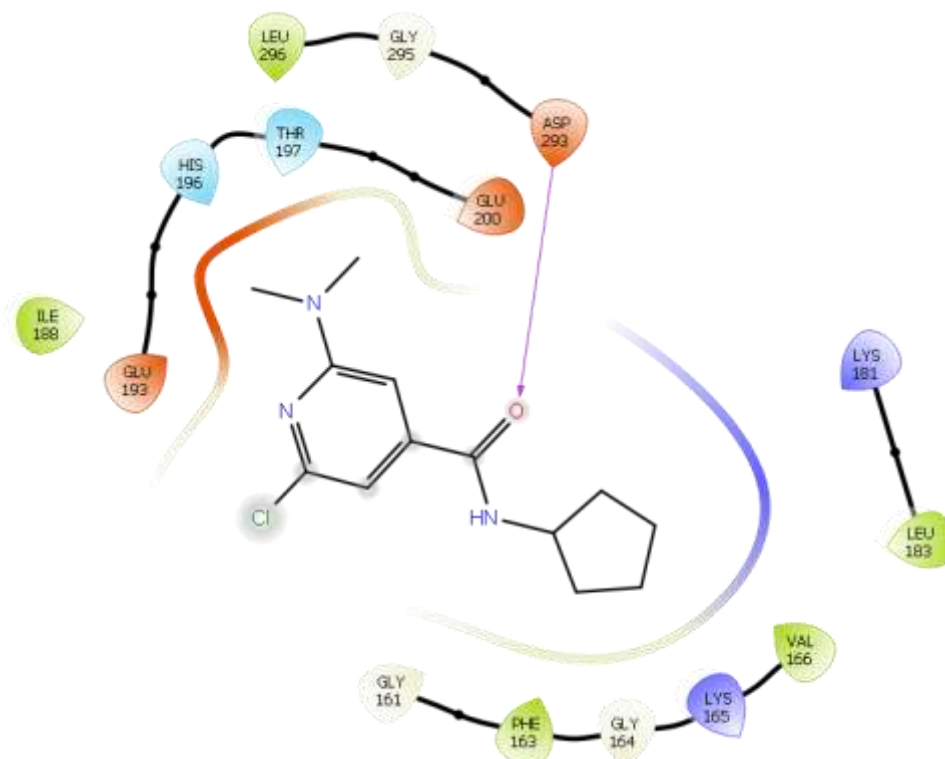


Figura III-44. Diagrama 2D de interacciones de DLPMP5 con AKT2.

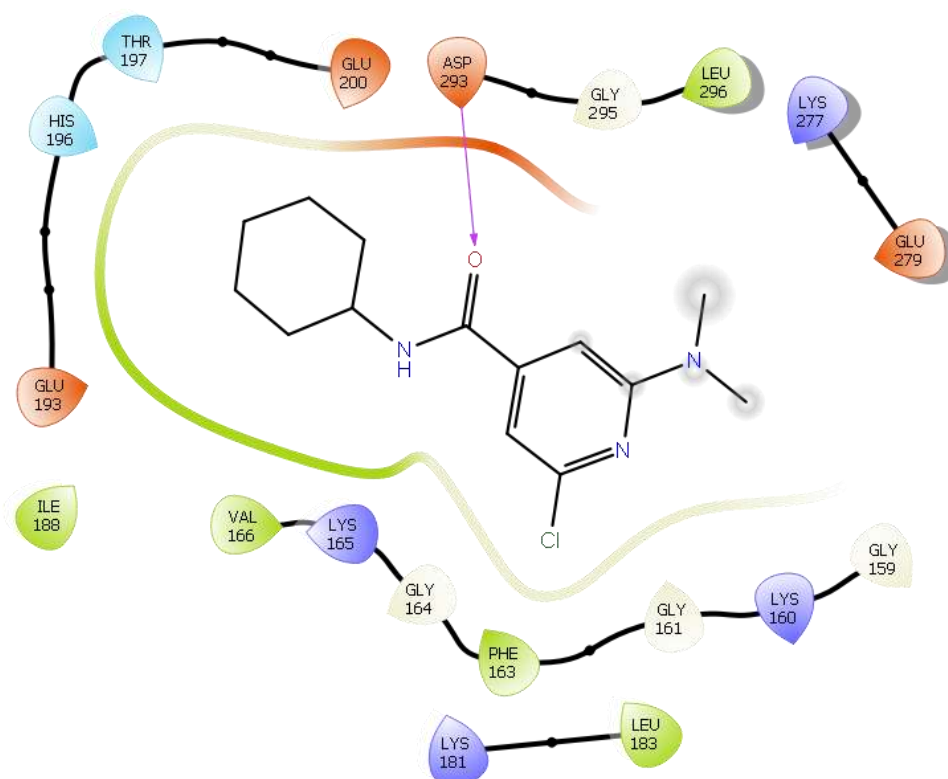


Figura III-45. Diagrama 2D de interacciones de **DLPMP6** con AKT2.

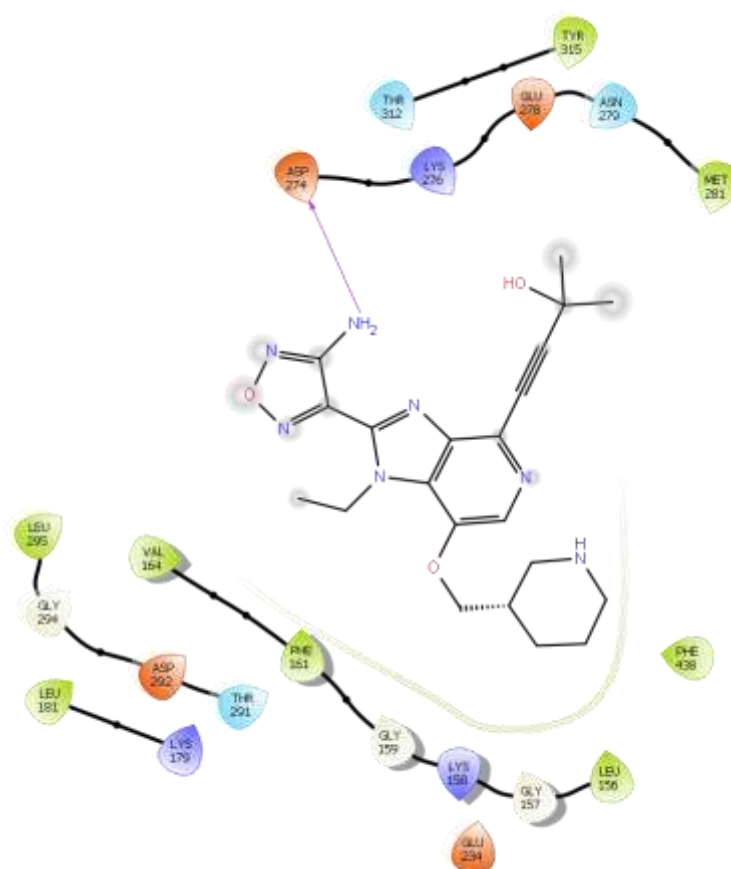


Figura III-46. Diagrama 2D de interacciones de **GSK690693** con AKT3.

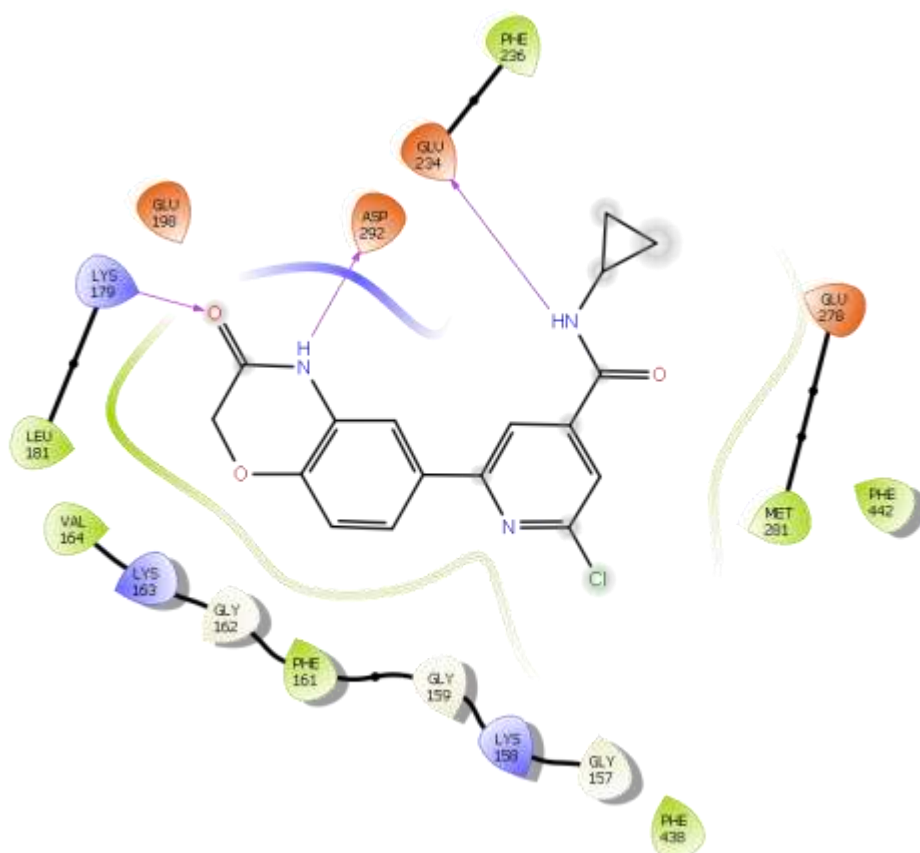


Figura III-47. Diagrama 2D de interacciones de **DLPMB3** con AKT3.

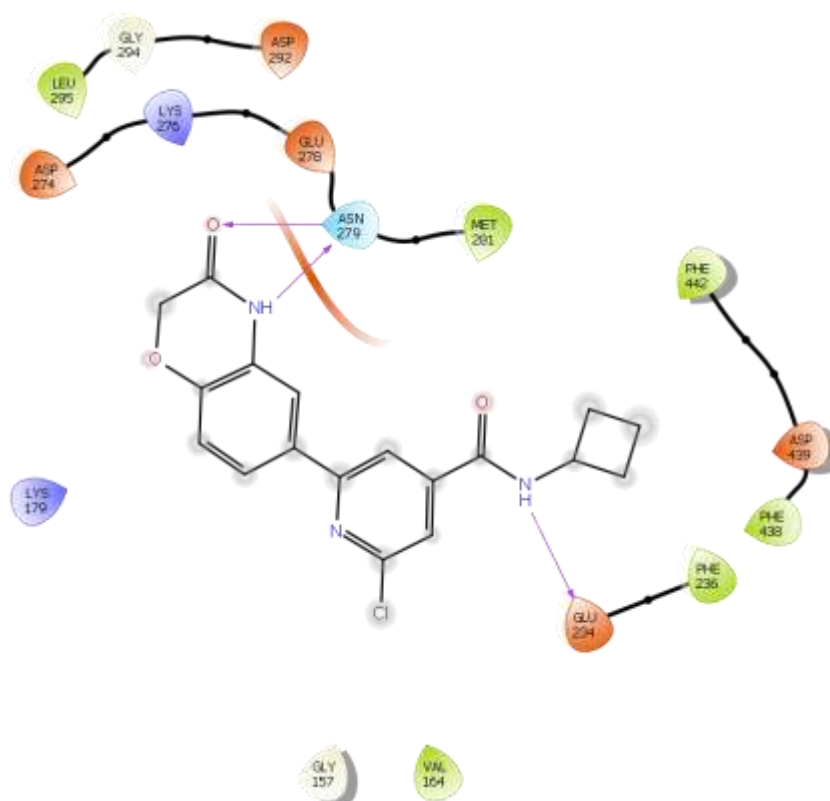


Figura III-48. Diagrama 2D de interacciones de **DLPMB4** con AKT3.

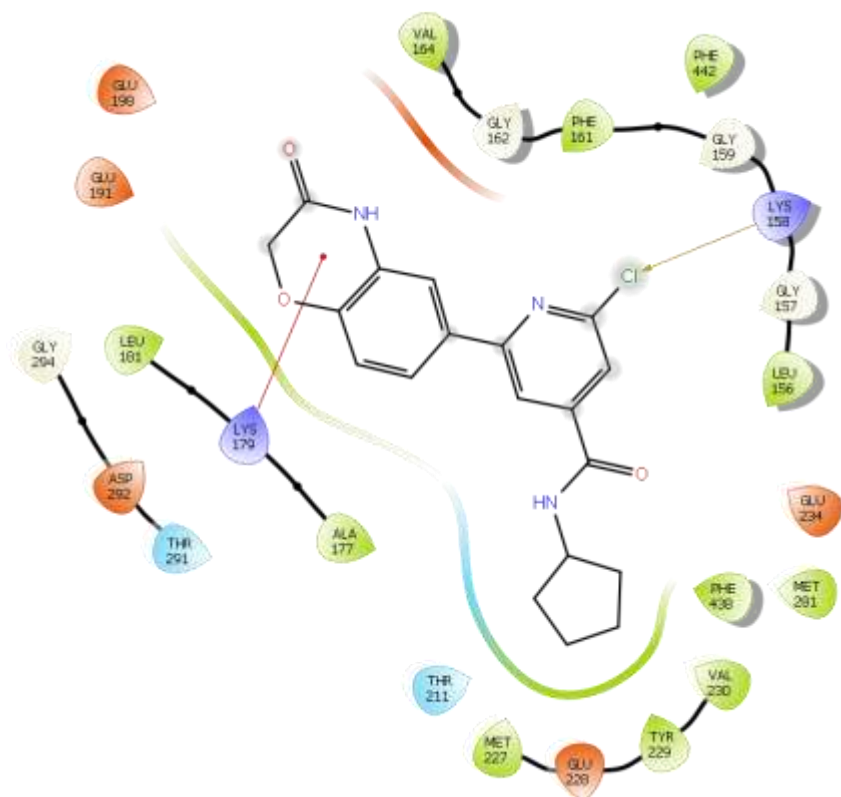


Figura III-49. Diagrama 2D de interacciones de DLPMB5 con AKT3.

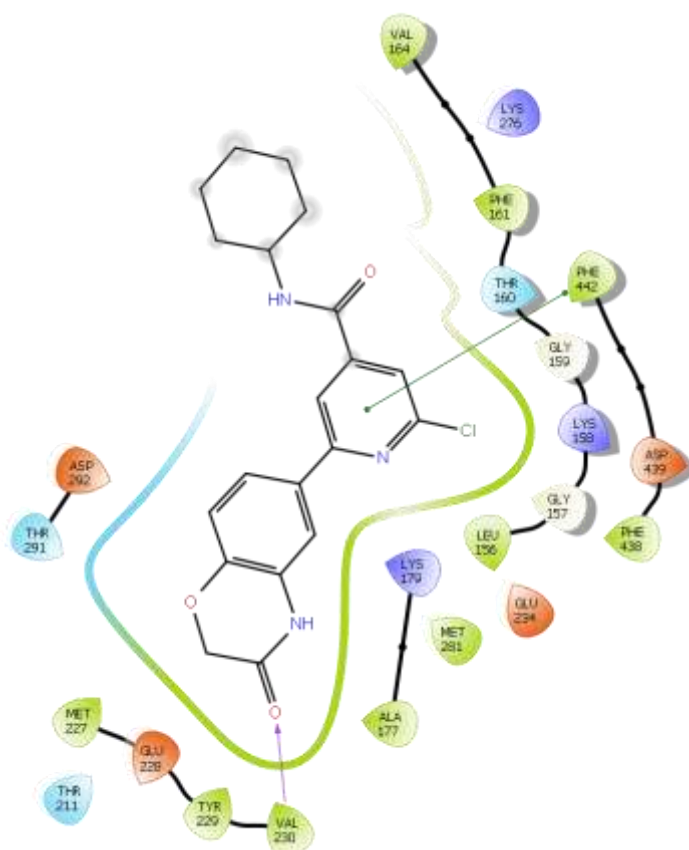


Figura III-50. Diagrama 2D de interacciones de DLPMB6 con AKT3.

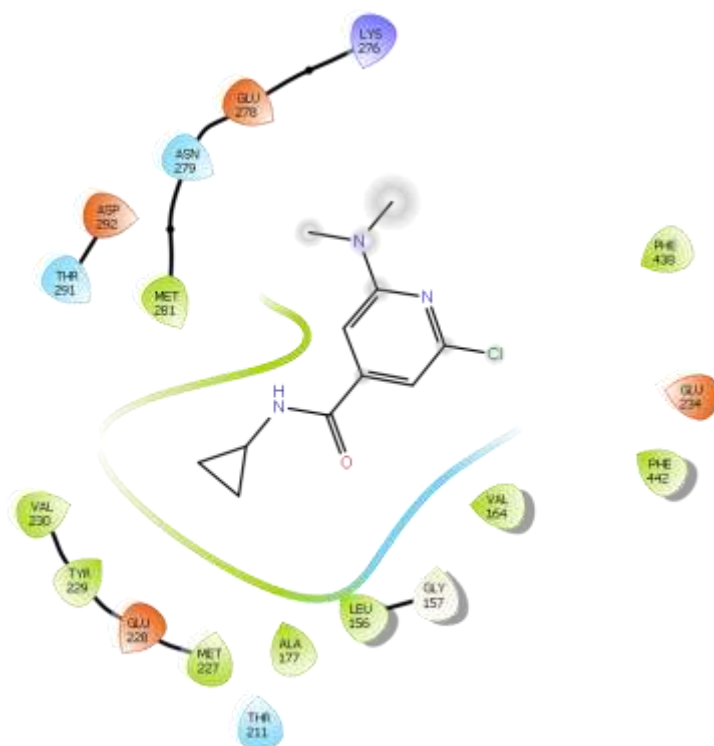


Figura III-51. Diagrama 2D de interacciones de DLPMP3 con AKT3.

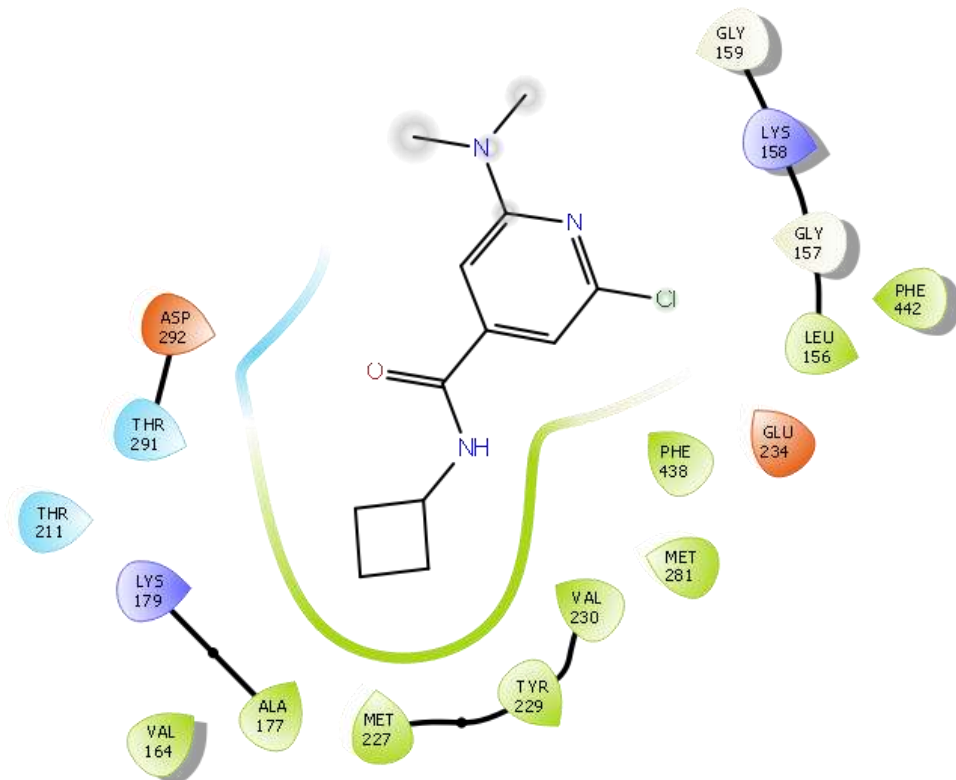


Figura III-52. Diagrama 2D de interacciones de DLPMP4 con AKT3.

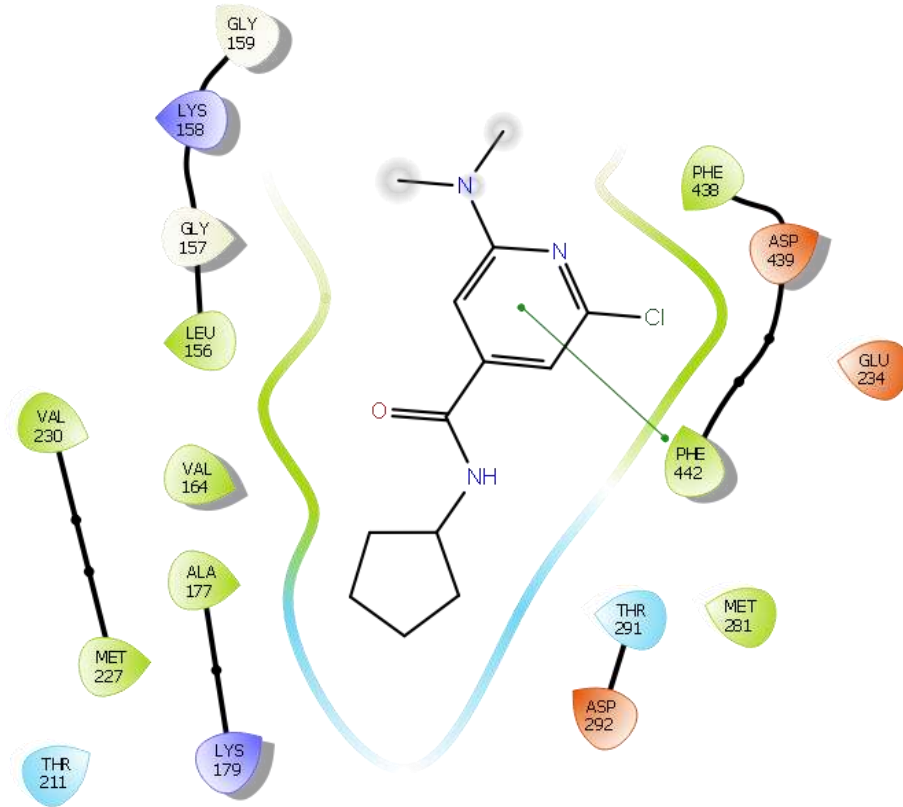


Figura III-53. Diagrama 2D de interacciones de DLPMP5 con AKT3.

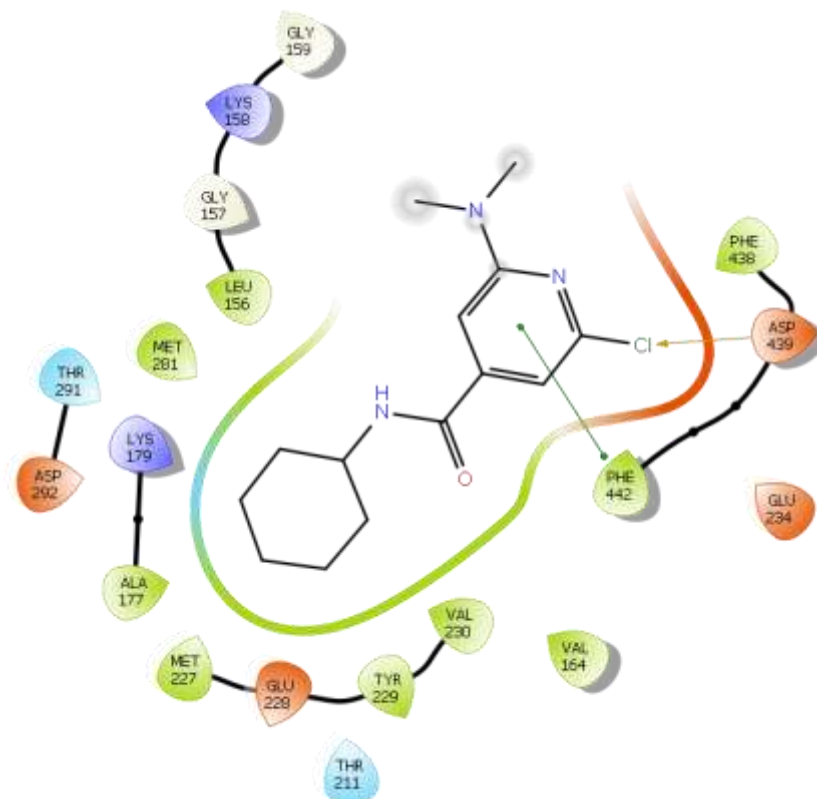


Figura III-54. Diagrama 2D de interacciones de DLPMP6 con AKT3.