



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**Diseño y síntesis parcial de azafenalenonas basadas en
duclauxina y su actividad frente *h*PTP1B₍₁₋₄₀₀₎**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO**

PRESENTA

Carlos Daniel Quezada Suaste

TUTOR

Dr. José Alberto Rivera Chávez



Ciudad Universitaria, CD.MX.

2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: MÉNDEZ STIVALET JOSÉ MANUEL

VOCAL: DEL RIO PORTILLA JOSÉ FEDERICO

SECRETARIO: RIVERA CHÁVEZ JOSÉ ALBERTO

1°. SUPLENTE: TOBÓN CORNEJO SANDRA

2°. SUPLENTE: MENDOZA PÉREZ JACINTO EDUARDO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO 2-5, DEPARTAMENTO DE PRODUCTOS NATURALES,
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM**

ASESOR DEL TEMA:

Dr. José Alberto Rivera Chávez

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. Enrique Aguilar Ramírez

SUSTENTANTE:

Carlos Daniel Quezada Suaste

Agradecimientos

- A la **Universidad Nacional Autónoma de México** que me permitió formarme académicamente.
- Al **Dr. José Rivera Chávez** por la oportunidad, el compromiso, instrucción y herramientas brindadas que lograron culminar con este trabajo.
- Al **M. en C. Enrique Aguilar Ramírez** por su tiempo, dedicación, apoyo e instrucción durante este proyecto que con mucha dedicación logró ver fin.
- Al **Dr. Baldomero Esquivel Rodríguez** por los comentarios y observaciones realizadas que sirvieron para enriquecer significativamente el contenido de este trabajo.
- Al **Laboratorio Universitario de Resonancia Magnética Nuclear (LURMN)** por la colección de los datos espectroscópicos.
- A la **Dra. Patricia Cano Sánchez**, por la expresión y purificación de la proteína *hPTP1B*₁₋₄₀₀.
- A la **Dra. Celia Bustos-Brito** y al **Dr. Javier Pérez Flores** del Instituto de Química por la adquisición de espectros de masas.
- A la **Dra. María del Carmen García González** del Instituto de Química por los análisis espectrométricos.
- A la **Dra. Beatriz Quiroz-García** del Instituto de Química por los análisis espectroscópicos.
- A mis compañeros de laboratorio por su apoyo y tiempo que me terminaron motivando durante este trayecto.
- A la **M. en I. Maricruz López López**, por el procesamiento de los residuos generados en este trabajo de investigación.
- A la Dirección General de Apoyo al Personal Académico (**DGAPA**) que a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (**PAPIIT: IA207422**) proporcionó el financiamiento para la realización de algunas de las actividades experimentales de investigación presentadas en este trabajo.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**) por el financiamiento otorgado para la realización de este proyecto, a través del proyecto: **CF-2019-263977**.
- A la Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de Información y Comunicación (**DGTIC, LANCAD-UNAM-DGTIC-374**) de la UNAM por la asignación de recursos de cómputo para la realización de algunos cálculos.

Dedicatorias

A mis padres.

“Una vez que hayas tomado una decisión, acátala y no mires atrás. Conseguirás mucho más así.”

David Kazi

Índice

Lista de Figuras	III
Lista de Tablas	V
Lista de abreviaturas y símbolos	VI
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1. Proteína Tirosina Fosfatasa 1B (PTP1B): generalidades	3
2.2. Importancia de la PTP1B en el tratamiento de la DMTII	4
2.3. Modelos truncos de PTP1B y PTP1B₁₋₄₀₀	5
2.4. Inhibidores de PTP1B	6
2.4.1. Inhibidores de PTP1B trunca	6
2.4.2. Inhibidores de PTP1B de cadena completa	8
2.5. Duclauxinas	9
2.6. Semisíntesis	10
3. Justificación	14
4. Objetivos	16
4.1. Objetivo general	16
4.2. Objetivos particulares	16
5. Metodología	17
5.1. Análisis cromatográficos	17
5.2. Determinación de constantes físicas	17
5.3. Estudios de acoplamiento molecular (<i>Docking</i>)	17
5.4. Síntesis parcial de análogos de duclauxina (1)	18
5.5. Purificación de derivados semisintéticos de duclauxina	19
5.5.1. Semisíntesis, aislamiento y purificación de 16	19
5.5.2. Semisíntesis, aislamiento y purificación de 17	19
5.5.3. Semisíntesis, aislamiento y purificación de 18	20
5.5.4. Semisíntesis, aislamiento y purificación de 19	20
5.5.5. Semisíntesis, aislamiento y purificación de 20	21
5.5.6. Semisíntesis, aislamiento y purificación de 21	22
5.5.7. Semisíntesis, aislamiento y purificación de 22	22
5.5.8. Semisíntesis, aislamiento y purificación de 23	23
5.5.9. Semisíntesis, aislamiento y purificación de 24	23

5.5.10. <i>Semisíntesis, aislamiento y purificación de 25</i>	24
5.5.11. <i>Semisíntesis, aislamiento y purificación de 26</i>	25
5.6. Ensayos de inhibición.....	25
6. Resultados y discusión.....	27
7. Conclusiones.....	47
8. Perspectivas.....	48
9. Bibliografía.....	49
10. ANEXO.....	53

Lista de figuras

Figura 1. A, B) Dominios estructurales y C) mecanismo catalítico de hidrólisis en la proteína tirosina fosfatasa 1B.....	4
Figura 2. Rol de la enzima PTP1B en la señalización de insulina y leptina. Donde el receptor de insulina fosforila varias proteínas sustrato que median el efecto de la hormona para la translocación de los transportadores de glucosa (GLUT-4), del citoplasma a la membrana plasmática. La enzima PTP1B desfosforila estas proteínas evitando la translocación de los transportadores GLUT-4. Tomado y editado de.....	5
Figura 3. Inhibidores destacados de PTP1B de origen natural (verde), semisintético (azul) y sintético (naranja). En paréntesis se indica la CI_{50} expresada en μM	7
Figura 4. Derivados de duclauxina (1) aislados y semisintetizados por Aguilar-Ramírez y su actividad frente a <i>h</i> PTP1B ₁₋₄₀₀ . En paréntesis se indica la CI_{50} expresada en μM	10
Figura 5. Número de fármacos (derivados semisintéticos) aprobados por la FDA de 1981-2019, organizadas por padecimiento.....	12
Figura 6. Estructuras selectas de fármacos usados en la terapéutica contemporánea obtenidos por semisíntesis.....	13
Figura 7. Cromatograma de la purificación de 16 . Columna Phenomenex® PFP (5 μm , 10.0 \times 250 mm). Fase móvil: Gradiente de 60%→70% de MeCN en agua ácida (0.1% de ácido fórmico) en 15 minutos.....	19
Figura 8. Cromatograma de la purificación de 17 . Columna Phenomenex® PFP (5 μm , 10.0 \times 250 mm). Fase móvil: Gradiente de 60%→70% de MeCN en agua ácida (0.1% de ácido fórmico) en 30 minutos.....	20
Figura 9. Cromatograma de la purificación de 18 . Columna Phenomenex® PFP (5 μm , 10.0 \times 250 mm). Fase móvil: Gradiente de 50%→85% de MeCN en agua ácida (0.1% de ácido fórmico) en 20 minutos.....	20
Figura 10. Cromatograma de la purificación de 19 . Columna Phenomenex® PFP (5 μm , 10.0 \times 250 mm). Fase móvil: Gradiente de 50%→70% de MeCN en agua ácida (0.1% de ácido fórmico) en 25 minutos.....	21
Figura 11. Cromatograma de la purificación de 20 . Columna Phenomenex® PFP (5 μm , 10.0 \times 250 mm). Fase móvil: Gradiente de 50%→100% de MeCN en agua ácida (0.1% de ácido fórmico) en 20 minutos.....	21
Figura 12. Cromatograma de la purificación de 21 . Columna Phenomenex® PFP (5 μm , 10.0 \times 250 mm). Fase móvil: Gradiente de 70%→100% de MeCN en agua ácida (0.1% de ácido fórmico) en 15 minutos.....	22
Figura 13. Cromatograma de la purificación de 22 . Columna Phenomenex® PFP (5 μm , 10.0 \times 250 mm). Fase móvil: Método isocrático de 70% de MeCN en agua ácida (0.1% de ácido fórmico) por 20 minutos.....	23
Figura 14. Cromatograma de la purificación de 23 . Columna Phenomenex® PFP (5 μm , 10.0 \times 250 mm). Fase móvil: Método isocrático de 70% de MeCN en agua ácida (0.1% de ácido fórmico) por 22 minutos.....	23
Figura 15. Cromatograma de la purificación de 24 . Columna Phenomenex® PFP (5 μm , 10.0 \times 250 mm). Fase móvil: Gradiente de 70%→100% de MeCN en agua ácida (0.1% de ácido fórmico) en 10 minutos.....	24
Figura 16. Cromatograma de la purificación de 25 . Columna Phenomenex® PFP (5 μm , 10.0 \times 250 mm). Fase móvil: Gradiente de 80%→100% de MeCN en agua ácida (0.1% de ácido fórmico) en 10 minutos.....	24
Figura 17. Cromatograma de la purificación de 26 . Columna Phenomenex® PFP (5 μm , 10.0 \times 250 mm). Fase móvil: Gradiente de 70%→100% de MeCN en agua ácida (0.1% de ácido fórmico) en 10 minutos.....	25
Figura 18. Azafenalenonas estudiadas por acoplamiento molecular seleccionadas para realizar su síntesis parcial. Los valores de ΔG se expresan en kcal/mol.....	29
Figura 19. Modelos predichos por AutoDock 4.0 para la interacción de las azafenalenonas 16-26 con la enzima <i>h</i> PTP1B ₁₋₄₀₀ . Todos los compuestos se muestran en bastones de acuerdo con el siguiente código de colores. 16	

(azul medio), 17 (azul marino), 18 (naranja), 19 (dorado), 20 (verde), 21 (cian), 22 (rosa claro), 23 (violeta), 24 (café), 25 (verde limón) y 26 (negro).....	30
Figura 20. Frecuencia de aparición de los aminoácidos de la enzima <i>h</i> PTP1B ₁₋₄₀₀ que interactúan con los productos 16-26 según los modelos predichos por AutoDock 4.0.....	31
Figura 21. Modelo estructural predicho por AutoDock 4.0 para la interacción de los productos 16-26 (A-K, respectivamente) con un modelo generado por homología para la enzima <i>h</i> PTP1B ₁₋₄₀₀	31
Figura 22. A). Mecanismo de reacción propuesto para la formación de los derivados 16, 21 y 24 . B) Mecanismo de reacción propuesto para la formación de los derivados 17-20, 22, 23 y 25 a partir del precursor correspondiente.....	34
Figura 23. Espectros de RMN- ¹ H colectados en CDCl ₃ a 500 MHz para los productos A) 1 , B) 16 , C) 21 y D) 24	36
Figura 24. Espectros de RMN- ¹ H colectados en CDCl ₃ a 500 MHz para los productos A) 17 , B) 22 , C) 23 , y D) 25	39
Figura 25. Espectros de RMN- ¹ H colectados en CDCl ₃ a 500 MHz para los productos A) 18 , B) 19 y C) 20	40
Figura 26. Modelos estructurales generados para los atropoisómeros de las moléculas 18-20 . Las estructuras se construyeron en Spartan10® y se optimizaron geoméricamente empleando el método semiempírico PM3. Todas las moléculas de la serie “a” tienen una configuración axial <i>Ra</i> (<i>P</i>), mientras que las moléculas de la serie “b” tienen la configuración opuesta <i>Sa</i> (<i>M</i>).....	41
Figura 27. Curvas de inhibición concentración respuesta para los compuestos 16-26 frente a la enzima <i>h</i> PTP1B ₁₋₄₀₀	44
Figura 28. Variación de la actividad de derivados de duclauxina (1) acoplados con anilinas sustituidas en posición <i>orto</i> (verde) y anilinas sustituidas en posición <i>para</i> (morado), en función del volumen de la molécula (calculado a partir de un modelo CPK que toma en cuenta los radios atómicos de van der Waals).....	45
Figura 29. Variación de actividad de derivados de duclauxina (13, 15 y 18) acoplados con nitroanilinas sustituidas en posición <i>orto</i> , <i>meta</i> y <i>para</i>	45
Figura 30. Comparación de actividad inhibitoria de un par de derivados de duclauxina acoplados con <i>p</i> -bromoanilina. Uno contiene un metoxilo en C-7 (16) y el otro un doble enlace entre los carbonos C-7 y C-8 (17) que impone una mayor rigidez en la molécula.....	46

Lista de tablas

Tabla 1. Características físicas y datos espectrométricos para los productos 16, 21 y 24	35
Tabla 2. Datos espectroscópicos de RMN- ¹ H para los productos 16, 21 y 24 , registrados en CDCl ₃ a 500 MHz.....	37
Tabla 3. Datos espectroscópicos de RMN- ¹³ C para los productos 16, 21 y 24 , registrados en CDCl ₃ a 125 MHz.....	37
Tabla 4. Características físicas y datos espectrométricos para los productos 17-20, 22, 23 y 25	38
Tabla 5. Datos espectroscópicos de RMN- ¹ H para los productos 17-20, 22, 23 y 25 , registrados en CDCl ₃ a 500 MHz.....	41
Tabla 6. Datos espectroscópicos de RMN- ¹³ C para los productos 17-20, 22, 23 y 25 , registrados en CDCl ₃ a 125 MHz.....	42
Tabla 7. Datos espectroscópicos de RMN para el producto 26 , registrado en CDCl ₃ a 500 MHz para ¹ H y 125 MHz para ¹³ C.....	43
Tabla 8. Valores de CI ₅₀ calculados para los productos de semisíntesis obtenidos en este trabajo.....	44

Lista de abreviaturas y símbolos

Abreviatura	Significado
<i>M</i>	Isómero axial <i>Ra</i>
<i>P</i>	Isómero axial <i>Sa</i>
°C	Grados Celsius
μL	Microlitro
μM	Micromolar
Å	Angström
aa	Aminoácido
ADT	AutoDockTools
CCA	Cromatografía en columna abierta
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CI ₅₀	Concentración inhibitoria media
CLAE	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
CPK	Índice de capacibilidad
DART	Análisis directo en tiempo real
dd	Señal doble de dobles
ddd	Señal doble de dobles de dobles
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMTII	Diabetes mellitus tipo II
EM-AR	Espectrometría de masas de alta resolución
EM-AR-DART	Espectrometría de masas de alta resolución por análisis directo en tiempo real
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
grid	Rejilla
h	Hora
HMBC	Conectividad heteronuclear a enlaces múltiples
<i>h</i> PTP1B ₁₋₄₀₀	PTP1B de cadena completa de humano
HSQC	Correlación cuántica única heteronuclear
Hz	Hertz
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
IR	Receptor de insulina
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
kcal	kilocalorías
kDa	Kilodalton
KO	Knockout
LGA	Algoritmo Genético Lamarckiano
<i>m/z</i>	Relación masa carga
MeOH	Metanol

Abreviatura	Significado
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PM3	Campo de fuerza semiempírico
<i>p</i> NPP	Fosfato de <i>p</i> -nitrofenol
ppm	Partes por millón
PTP1B	Proteína tirosina fosfatasa 1B
PTPs	Proteínas tirosina fosfatasas
RE	Retículo endoplásmico
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMN- ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
RMN- ¹ H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
s	Señal simple
SAR	Relación estructura actividad
SBL	<i>Substrate-binding loop</i>
t _{1/2}	Tiempo de vida media
t _R	Tiempo de retención
Δ	Error de masa teórica respecto a masa experimental
δ	Desplazamiento químico
δ _C	Desplazamiento químico de carbono
ΔG	Energía libre de Gibbs
δ _H	Desplazamiento químico de hidrógeno
λ	Longitud de onda
Ω	Índice de insaturación

1. Introducción

La diabetes mellitus es una de las enfermedades metabólicas crónico degenerativas más comunes que se caracteriza por una deficiencia en la producción y/o acción de la insulina. De acuerdo con la Federación Internacional de la Diabetes (IDF por sus siglas en inglés) en el mundo existen alrededor de 537 millones de personas con este padecimiento y se espera que la cifra aumente a 643 millones para 2030 y 783 millones para 2045.¹ La diabetes mellitus tipo 2 (DMTII) es la más común, y representa cerca del 90% de todos los casos.¹ El sobrepeso, la obesidad y la inactividad física son los principales factores de riesgo de la DMTII.^{1,2} Por estas consideraciones, es de suma importancia el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que ayuden al tratamiento de la DMTII.

La proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B) tiene un papel importante dentro de la fisiopatología de la DMTII, pues actúa como regulador negativo en las rutas de señalización de la insulina y la leptina, además de que esta enzima se asocia con una gran variedad de enfermedades humanas, como algunos tipos de cáncer, desordenes autoinmunes y enfermedades cardiovasculares.³ Hasta el momento, al menos ocho moléculas que inhiben la actividad de PTP1B se han estudiado en ensayos clínicos,³ pero la mayoría de estos se han descontinuado por distintos motivos; entre estos, la inespecificidad de los inhibidores debido al alto grado de homología de PTP1B con otras tirosina-fosfatasa y el uso de modelos trunco de PTP1B en las etapas iniciales del descubrimiento de inhibidores.³ Teniendo esto en cuenta, el desarrollo de inhibidores específicos de PTP1B sigue siendo un reto.

En este sentido, los productos naturales y sus derivados semisintéticos (síntesis de un compuesto a partir de un precursor elaborado, que se obtiene por aislamiento a partir de fuentes naturales),⁴ han sido una fuente de inspiración para el desarrollo de fármacos novedosos potenciales, debido a su diversidad química, su complejidad estructural y su selectividad biológica.⁵

La duclauxina (**1**) (un producto natural de origen fúngico), y diversos análogos (talaromycesona B (**2**), bacillisporina G (**3**) y xenoclauxina (**4**)), se han descrito como inhibidores potentes de una PTP1B humana de cadena completa (1-400 aminoácidos, *h*PTP1B₁₋₄₀₀).⁶ Los compuestos **1-4** son dímeros asimétricos de fenalenonas heptacíclicas. Estos constan de una unidad de isocumarina y una unidad de dihidroisocumarina, y son biosintetizados por hongos de los géneros *Penicillium* y *Talaromyces*.⁷ En un estudio subsecuente, Aguilar-Ramírez reportó el aislamiento de dos derivados metoxilados de **1**, los productos **5** y **6** y la síntesis parcial de nueve azafenalenonas (**7-15**), así como su potencial inhibitorio frente a la proteína *h*PTP1B₁₋₄₀₀. Los resultados de este trabajo evidenciaron que el reemplazo de la función lactona por una lactama con anilinas sustituidas en la unidad de isocumarina y la eliminación de metanol a partir del esqueleto base, incrementan la actividad frente a *h*PTP1B₁₋

400.⁸

Con base en estos hallazgos, el presente trabajo describe la síntesis parcial de 11 azafenalenonas (**16-26**) basadas en duclauxina (**1**) que incorporan sustituyentes aromáticos con diferentes propiedades químicas para la generación de duclauxamidas inhibitoras de la enzima *h*PTP1B₁₋₄₀₀. Las moléculas sintetizadas presentaron valores de CI₅₀ en la inhibición de la *h*PTP1B₁₋₄₀₀ en el rango de 9.3 μM a 78.4 μM, y con porcentajes de inhibición que van del 60 al 80%. De esta serie de análogos, los productos más activos fueron aquellos en los que se elimina metanol para formar un doble enlace entre los carbonos C-7 y C-8 y están acoplados con una anilina sustituida en posición para con un grupo polarizable y voluminoso, por ejemplo, el híbrido de *p*-bromoanilina con duclauxina (**17**).

2. Antecedentes

2.1. Proteína Tirosina Fosfatasa 1B (PTP1B): generalidades

La fosforilación y desfosforilación son mecanismos bien conocidos por modular una gran cantidad de eventos biológicos clave.⁹ Las proteínas fosfatasa (PTP's) son enzimas que catalizan la desfosforilación de residuos de tirosina, mientras que las proteínas tirosina cinasas fosforilan residuos de tirosina; en conjunto, estas enzimas son de suma importancia para la regulación de los eventos de señalización que mantienen la homeostasis celular¹⁰ y su desregulación impacta en la patogenia de varias enfermedades humanas, incluido el cáncer, la diabetes y algunos trastornos inmunológicos.¹⁰ Entre varios miembros pertenecientes a la familia de PTP's, la PTP1B se ha convertido en uno de los blancos más prometedores frente a la DMII, por su participación en la desfosforilación del receptor de insulina (IR). La sobreexpresión de ésta disminuye la fosforilación del IR, contribuyendo a la aparición de obesidad y diabetes.¹¹

La PTP1B es una proteína de 435 aminoácidos (aa) de aproximadamente 50 kDa.¹² Su estructura consiste en un dominio catalítico N-terminal seguido de dos motivos ricos en prolina en tándem que permiten la interacción con proteínas que contienen el dominio SH3.¹³ PTP1B se expresa ampliamente y contiene un pequeño segmento hidrofóbico que es necesario y suficiente para localizar la enzima en el retículo endoplásmico (RE). La escisión de este fragmento libera la enzima del RE y aumenta su actividad, sugiriendo que la localización subcelular regula la accesibilidad de PTP1B a sus sustratos de manera espacial y temporal.^{12, 14, 15}

Como todos los miembros de la familia PTP, el dominio catalítico de la PTP1B alberga varios motivos conservados. El sitio activo de la PTP1B consiste de los residuos His₂₁₄-Arg₂₂₁ que conforman el asa PTP e incluye a la cisteína catalítica Cys₂₁₅; arriba de ésta, cerrando el bolsillo de unión, está el asa WPD conformada por los residuos 177-188, destacando los aminoácidos Trp₁₇₉, Pro₁₈₀ y Asp₁₈₁ por su participación durante la hidrólisis.^{12, 16} En la forma inactiva de la enzima, el asa WPD suele estar en una conformación “abierta”, que se tuerce sobre el residuo activo Cys₂₁₅ tras la unión del sustrato (pTyr), dando origen a la conformación “cerrada” y a la activación de la proteína.^{11, 12, 16, 17} Diversos estudios, tanto teóricos como experimentales han demostrado que el cierre del asa WPD es un evento esencial en el mecanismo catalítico de PTP1B.^{12, 17, 18} El asa Q contiene un residuo de glutamina (Glu₂₆₂) esencial para la catálisis y el asa SBL (*substrate-binding loop*) que define la profundidad y selectividad del sitio catalítico (**Figura 1A**).^{11, 12}

Los motivos del dominio catalítico de la PTP1B actúan en coordinación durante el proceso catalítico. El asa PTP contiene la cisteína catalítica que es responsable de ejecutar el ataque nucleofílico en el grupo fosfato del sustrato. El segundo paso en la reacción es llevado a cabo por el asa WPD, que es

flexible y permite que el sitio activo tome una conformación abierta o cerrada.¹¹ En su conformación abierta, el motivo WPD deja accesible el sitio catalítico al sustrato y una vez que se une el sustrato el motivo WPD se cierra y acerca el residuo de aspartato (Asp₁₈₁) para la catálisis. El último paso en la reacción involucra al asa Q, donde el residuo de glutamina (Q₂₆₂) y el residuo de aspartato del asa WPD actúan conjuntamente para hidrolizar el intermediario fosfato-cisteína con la ayuda de una molécula de agua liberando finalmente el fosfato del sitio activo (**Figura 1C**).^{12, 17, 19, 20}

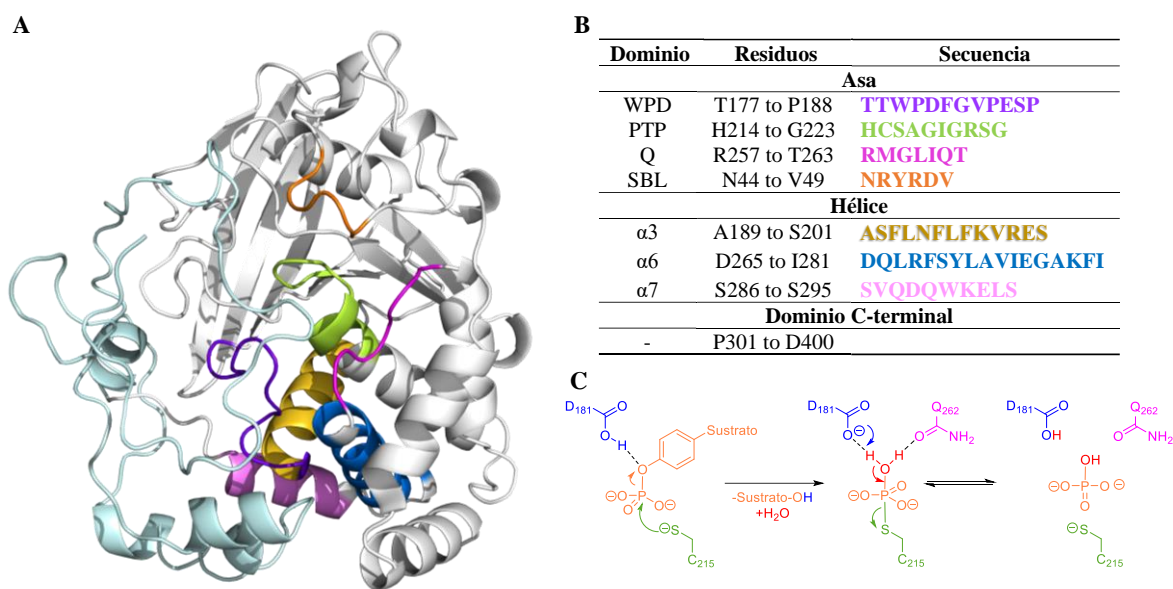


Figura 1. A, B) Dominios estructurales y C) mecanismo catalítico de hidrólisis en la proteína tirosina fosfatasa 1B.^{6, 12}

2.2. Importancia de la PTP1B en el tratamiento de la DMTH

Ningún fármaco disponible actualmente es capaz de imitar la acción de la insulina fisiológica. Por ello, la búsqueda de nuevas moléculas antidiabéticas eficaces sigue siendo un desafío importante. En este contexto, las PTP's y en específico la PTP1B, es considerada como uno de los blancos más importantes para tratar la DMTH.²¹ Diversos estudios han demostrado que esta proteína regula de forma negativa la señalización de la insulina, a través de la desfosforilación del receptor de insulina (IR) y sustratos del receptor de insulina (IRS).²¹ La insulina es secretada por las células β pancreáticas, además de que favorece el metabolismo de carbohidratos y lípidos en el hígado, el músculo esquelético y el tejido adiposo.²¹ La insulina regula la homeostasis de la glucosa a través de una red de señalización compleja e integrada. La señalización de la insulina se realiza a través de múltiples vías que actúan en diferentes pasos de tráfico de vesículas para distribuir el transportador de glucosa-4 (GLUT4) y mejorar la captación de glucosa en las células grasas y musculares (**Figura 2**).²²

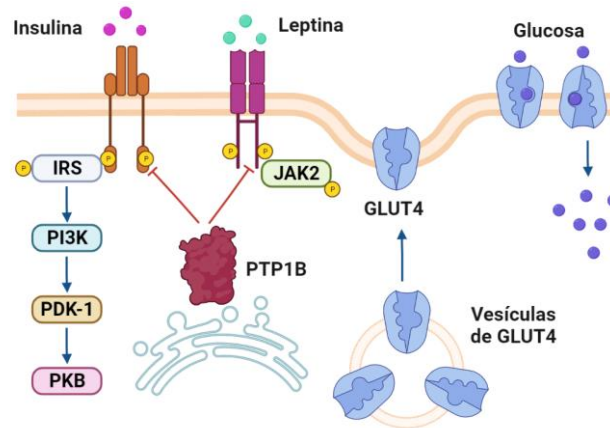


Figura 2. Rol de la enzima PTP1B en la señalización de insulina y leptina. Donde el receptor de insulina fosforila varias proteínas sustrato que median el efecto de la hormona para la translocación de los transportadores de glucosa (GLUT-4), del citoplasma a la membrana plasmática. La enzima PTP1B desfosforila estas proteínas evitando la translocación de los transportadores GLUT-4. Tomado y editado de ²².

La creciente evidencia de estudios bioquímicos, genéticos y farmacológicos apoyan el papel de esta enzima como regulador negativo en la señalización tanto de insulina como de leptina. A continuación, se mencionan algunos de esos estudios y sus conclusiones:

- La sobreexpresión de la PTP1B en cultivos celulares disminuyó la fosforilación estimulada por insulina del IR y/o IRS-1, reflejándose en una reducción de los efectos desencadenados por la insulina; mientras que la reducción en el nivel de PTP1B, por oligonucleótidos antisentido o anticuerpos neutralizantes, aumentó la señalización iniciada por dicha hormona.^{11, 14}
- La administración de inhibidores de PTP1B en ratones diabéticos normalizan la glucemia y promueven la pérdida de peso corporal en ratones obesos. Los ratones que carecen de PTP1B (PTP1B^{-/-}) muestran una mayor sensibilidad a la insulina, con un aumento o prolongación de la fosforilación de tirosina del IR en músculo e hígado.^{11, 14}
- Estudios en ratones *knockout* (KO) PTP1B^{-/-} sometidos a dietas altas en grasas presentan niveles más bajos de triglicéridos, respecto a la variedad silvestre. La pérdida de peso asociada a la administración de inhibidores de PTP1B está directamente relacionada con el gasto de energía y a una supresión de la ingesta de alimentos, debido a una mayor sensibilidad a la hormona leptina.^{11, 14}

En conjunto, los resultados de estos estudios han proporcionado una prueba sólida que valida la hipótesis de que la inhibición de la PTP1B podría abordar tanto a la diabetes como a la obesidad, y hacer de esta proteína un objetivo para el desarrollo de nuevos fármacos.

2.3. Modelos truncos de PTP1B y PTP1B₁₋₄₀₀

La forma canónica de PTP1B (435 aminoácidos) constituye la forma soluble en el ambiente celular, mientras que en la mayoría de los estudios bioquímicos y biológicos encaminados al descubrimiento de inhibidores o a discernir el comportamiento bioquímico de la enzima se emplean modelos más cortos (de 282, 298 o 321 residuos), conduciendo a la pérdida de información valiosa sobre la interacción de ligantes con la enzima.^{6, 12, 16, 17, 23}

El modelo más completo de PTP1B con reporte de estructura cristalográfica en el “Protein Data Bank” (PDB) consiste en 321 aminoácidos (1PXH).²⁴ Este ensamble alberga un sitio alostérico ubicado a 20 Å del bolsillo catalítico, en la interfaz conjunta de las hélices α -3 (residuos 189–201), α -6 (residuos 265–281) y α -7 (residuos 286–295) (**Figuras 1A y 1B**).²⁴ A pesar de que los modelos truncos de PTP1B usados en los ensayos bioquímicos y de cribado de inhibidores de la enzima albergan los motivos de mayor importancia para la catálisis, existen otras interacciones con aminoácidos no incluidos en las regiones esenciales que son importantes para que la enzima lleve a cabo la desfosforilación.¹² Algunos ejemplos incluyen los residuos Lys₁₂₀, Gln₂₆₂, Val₄₉, Arg₄₇, Phe₁₈₂ y Tyr₄₆, aminoácidos que contribuyen considerablemente al reconocimiento del sustrato peptídico mediante una combinación de interacciones electrostáticas, hidrofóbicas y de enlaces de hidrógeno.¹¹ Estas evidencias, sumadas a los hallazgos realizados por Tonks y colaboradores²⁵ tras la expresión de la *h*PTP1B₁₋₄₀₀ humana, y el descubrimiento de un nuevo sitio de unión alostérico posicionado en el dominio C-terminal intrínsecamente desordenado (residuos 301–400) de la proteína, en la hélice α -9' y un sitio extendido que incorpora la hélice α -7 y los residuos 299, 310 y 311, han motivado la búsqueda de inhibidores alostéricos de esta enzima.²⁵

Interesantemente, los modelos de *h*PTP1B truncados y *h*PTP1B₁₋₄₀₀ presentan comportamientos bioquímicos diferentes cuando se enfrentan a inhibidores en ensayos *in vitro*. Por ejemplo, el ácido ursólico, un inhibidor competitivo de los modelos truncos de la enzima se comporta como un inhibidor no competitivo de la enzima de cadena completa, sugiriendo que el uso de modelos truncados de la proteína en programas de descubrimiento de fármacos puede conducir a la pérdida de información valiosa sobre el mecanismo de inhibición de un ligando y por lo tanto, a la interpretación errónea de resultados.^{6, 16, 23}

2.4. Inhibidores de PTP1B

2.4.1. Inhibidores de PTP1B trunca

La gran mayoría de los inhibidores que se han desarrollado para la PTP1B son para los modelos truncos, e incluyen los ligandos que se unen al dominio catalítico de forma similar y no similar al sustrato y moléculas que interactúan con el sitio alostérico.²⁶ Los inhibidores alostéricos pueden

bloquear a la PTP1B en su conformación abierta y previenen su conversión a la conformación cerrada, que es esencial para la hidrólisis del sustrato.¹⁸ El cierre del asa WPD, en parte, es el resultado de una serie extensiva de interacciones de enlaces de hidrógeno entre las hélices α -7, α -3 y α -6. Los inhibidores alostéricos bloquean estas interacciones colocándose ellos mismos entre estas hélices.¹⁷ Estudios de dinámica molecular han demostrado que la hélice α -7 limita el movimiento de la hélice α -3 y facilita la dinámica del asa WPD.^{12, 17, 24}

A la fecha se han descubierto y desarrollando más de 300 inhibidores de modelos truncos de PTP1B²⁴ (PTP1B₁₋₂₉₇, PTP1B₁₋₃₀₀, PTP1B₁₋₃₂₁),¹¹ incluyendo productos naturales, derivados semisintéticos y productos de síntesis total (**Figura 3**).

Al menos ocho de estos inhibidores de modelos truncos de PTP1B han llegado a pruebas clínicas, sin embargo, varios de ellos han sido discontinuados.³ El ertiprotafib, por ejemplo, era considerado como un inhibidor efectivo de la PTP1B; llegó a fase clínica 2, pero en 2002, la baja eficacia del producto derivada del efecto indeseado que causa la agregación de la enzima en ensayos *in vitro* descartó la molécula de más pruebas.³ El producto JTT-551, que como inhibidor era prometedor, se discontinuó en 2007.² Finalmente, los derivados de 1,1-dióxido-5-(naftalen-2-il)-1,2,5-tiadiazolidin-3-ona, de los cuales se desarrolló una patente como inhibidores de PTP1B, siguen siendo evaluados en etapas clínicas.^{27, 28}

A la fecha ninguno de los inhibidores de la PTP1B reportados ha sido aprobado por la FDA, ya que la mayoría de ellos sufren de escasa selectividad y propiedades farmacocinéticas no deseadas.²⁷

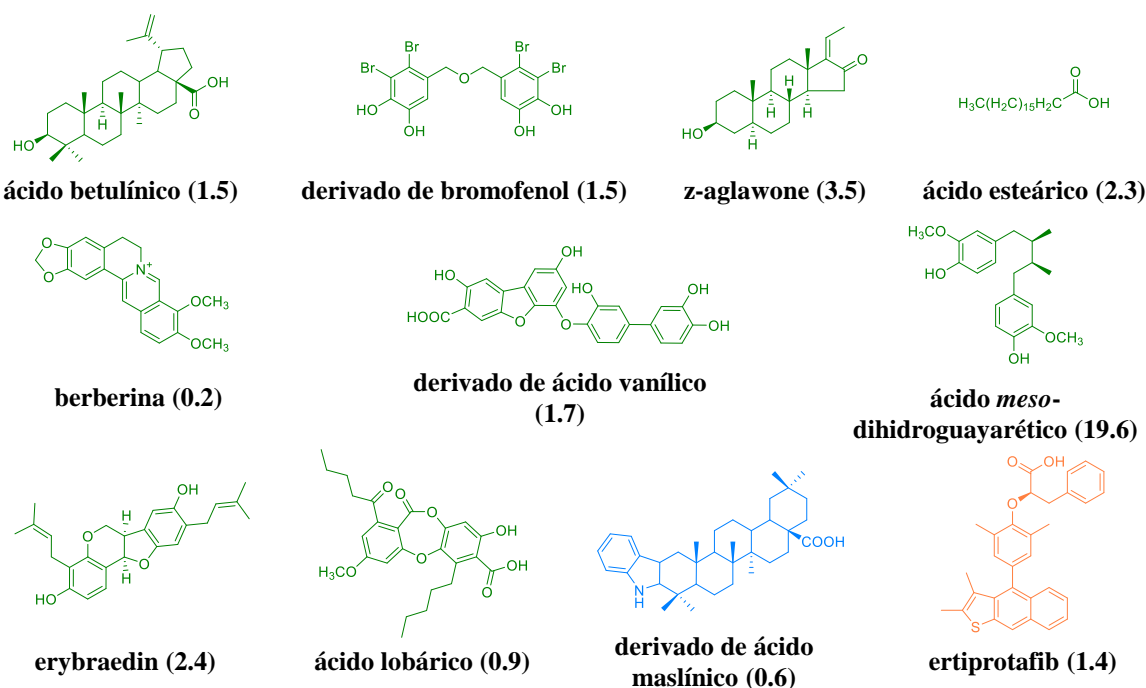


Figura 3. Inhibidores destacados de PTP1B de origen natural (verde), semisintético (azul) y sintético (naranja). En paréntesis se indica la CI_{50} expresada en μM .

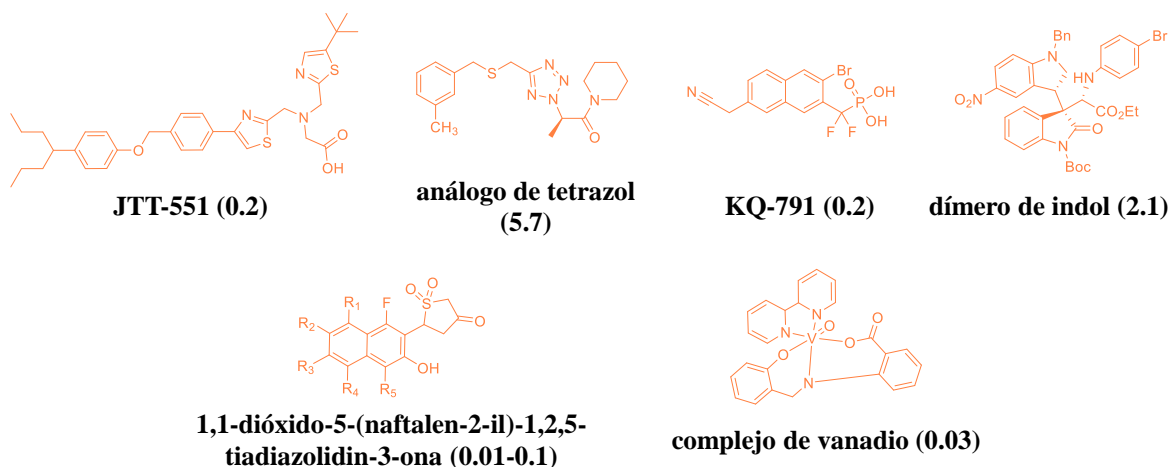
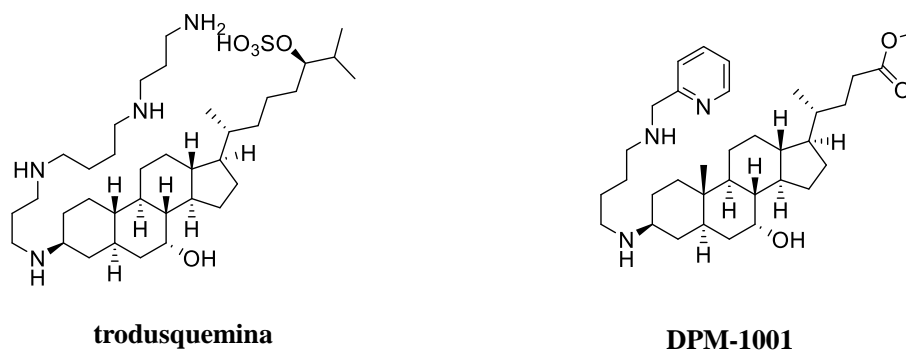


Figura 3 (continuación). Inhibidores destacados de PTP1B de origen natural (verde), semisintético (azul) y sintético (naranja). En paréntesis se indica la CI_{50} expresada en μM .

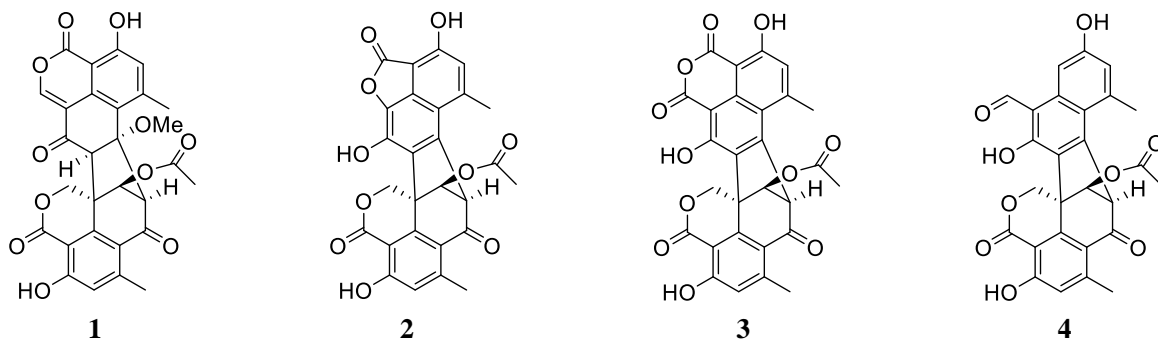
2.4.2. Inhibidores de PTP1B de cadena completa

La PTP1B de cadena completa aloja un sitio alostérico en el segmento C-terminal no catalítico de la proteína.²⁴ Esta característica ha permitido desarrollar investigación conducente al desarrollo de inhibidores específicos de $hPTP1B_{1-405}$.²⁵ Algunos ejemplos de inhibidores de PTP1B de cadena completa son la trodusquemina²⁵ (un producto natural) y su derivado semisintético DPM-1001,²⁹ en el que se reemplaza la cola de espermina en la posición C-3 por el grupo N^1 -(piridin-2-ilmetil)butano-1,4-diamina y el grupo sulfato en C-24 por un éster metílico con respecto al compuesto base.³ Los estudios de inhibición de DPM-1001 con el modelo trunco y de cadena completa de la enzima, evidenciaron que este compuesto presenta mejor actividad frente a $hPTP1B_{1-405}$ ($CI_{50} = 0.1 \mu M$) vs. $hPTP1B_{trunca}$ ($CI_{50} = 4.0 \mu M$).^{3, 29} Ambos productos, la trodusquemina y DPM-1001 han llegado a fases clínicas, sin embargo, el producto natural fue discontinuado por presentar efectos secundarios severos.³



Recientemente, en nuestro grupo de trabajo se logró expresar y purificar la proteína *h*PTP1B₁₋₄₀₀ en *Escherichia coli*, y se desarrolló un método espectrofotométrico para evaluar la actividad como inhibidores de esta proteína de extractos orgánicos y compuestos puros de origen fúngico.⁶

Los resultados de estas investigaciones han conducido al aislamiento de algunos núcleos estructurales con actividad promisorio como inhibidores de la enzima *h*PTP1B₁₋₄₀₀, algunos ejemplos son las butirolactonas, obtenidas de *Aspergillus terreus*,²³ la xanthopocina de *Penicillium* sp.¹⁶ y las fenalenonas diméricas duclauxina (**1**), talaromycesona B (**2**), xenoclauxina (**3**) y la bacillispororina F (**4**).⁶ Los productos **1-4** inhibieron la actividad enzimática de la *h*PTP1B₁₋₄₀₀ de manera dependiente de la concentración con valores de CI₅₀ de 12.7, 82.1, 21.8 y 13.4 μM, respectivamente.⁶ La interacción de **1** con *h*PTP1B₁₋₄₀₀, el probable sitio de unión y el mecanismo de inhibición se determinaron empleando experimentos de apagamiento de la fluorescencia intrínseca de la proteína, estudios de acoplamiento molecular y ensayos de cinética enzimática. En conjunto, estos resultados demostraron que **1** induce cambios conformacionales en la proteína, que afectan directamente su actividad, sugiriéndose que duclauxina (**1**) se comporta como un modulador alostérico de la proteína.⁶



2.5. Duclauxinas

Las duclauxinas son un grupo de compuestos diméricos heptacíclicos formados por dos fenalenonas. Estos compuestos constan de una unidad de isocumarina y una unidad de dihidroisocumarina, y son biosintetizados generalmente por hongos de los géneros *Penicillium* y *Talaromyces*.⁷ Estos metabolitos exhiben actividades biológicas notables, entre las que destacan su potencial citotóxico,³⁰ antitumoral,³¹ antibacterianos,³² antipalúdico,³³ y de inhibición enzimática,³⁴ proyectándose como candidatos idóneos para el desarrollo de compuestos con aplicación en la industria agrícola y en medicina.⁷

Derivado de los resultados de inhibición enzimática de duclauxina (**1**) frente a *h*PTP1B₁₋₄₀₀, en un estudio subsecuente, Aguilar-Ramírez reportó el aislamiento de dos metabolitos fúngicos (**5** y **6**) y la síntesis parcial de nueve azafenalenonas (**7-15**), así como su potencial inhibitorio frente a la proteína

*h*PTP1B₁₋₄₀₀ (**Figura 4**).⁸ Los resultados de este trabajo evidenciaron que el reemplazo de la función lactona por una lactama con sustituyente aromático en la unidad de isocumarina y la eliminación de metanol a través de un mecanismo de tipo E1cB a partir del esqueleto base, incrementan la actividad frente a *h*PTP1B₁₋₄₀₀.⁸

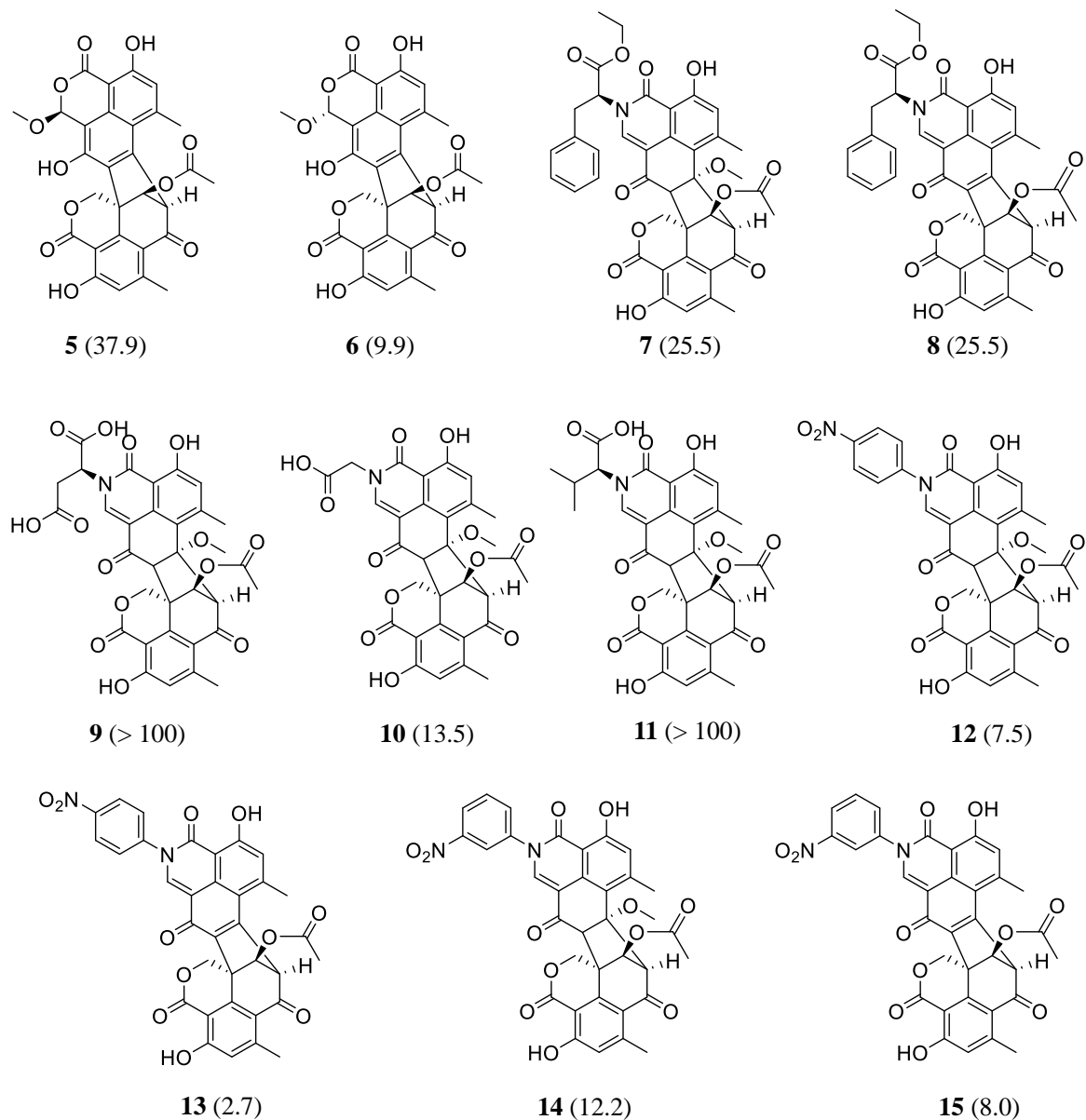


Figura 4. Derivados de duclauxina (**1**) aislados y semisintetizados por Aguilar-Ramírez y su actividad frente a *h*PTP1B₁₋₄₀₀. En paréntesis se indica la CI_{50} expresada en μ M.

2.6. Semisíntesis

Los productos naturales son considerados un gran recurso para el descubrimiento de nuevos fármacos, debido a la amplia variedad de arreglos estructurales y grupos funcionales, el elevado número de centros estereogénicos y el contenido de heteroátomos, características que les confieren la propiedad

de interactuar con numerosas macromoléculas y en algunos casos, estas interacciones se proyectan como actividades biológicas y farmacológicas.³⁵ Estas sustancias, también conocidas como metabolitos secundarios o especializados, han sido utilizadas en la medicina humana y animal por milenios. Una revisión realizada por Newman y Cragg y publicada en el *Journal of Natural Products* en 2020 reportó que en el periodo comprendido de 1981 a 2019 se aprobaron 1394 nuevos medicamentos, de los cuales el 5.1% son productos naturales, 25.5% son derivados de productos naturales y 19.5% son compuestos obtenidos por síntesis, pero que contienen un farmacóforo de producto natural, sumando un 51.1% (713) de moléculas aprobadas para uso en medicina humana procedentes de productos naturales.³⁶

Si bien, los productos naturales contribuyen de manera importante al descubrimiento de nuevos fármacos, generalmente estos presentan limitaciones que no les permiten ser empleados de forma directa como fármacos.³⁷ Algunas de estas restricciones son la baja solubilidad o la inestabilidad química y las estructuras de alto peso molecular que rompen la regla de Lipinski.³⁷ Esta regla expresa el hecho conocido de que la biodisponibilidad oral supone un balance entre la solubilidad acuosa del compuesto activo y su habilidad para difundir pasivamente a través de diferentes tipos de membranas biológicas.^{38, 39}

En el caso de los productos naturales que presentan una actividad promisoriosa pero que tienen propiedades farmacocinéticas deficientes, se plantea como opción recurrir a la preparación de derivados semisintéticos, con la intención de aumentar la actividad y selectividad, mejorar la solubilidad y la propiedad de partición, aumentar la estabilidad metabólica y química, eliminar o atenuar la toxicidad y reacciones adversas, además de obtener novedad y propiedad intelectual.^{4, 35} Por lo tanto, la semisíntesis es la herramienta de primera elección para incrementar la diversidad estructural y mejorar las propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas.^{4, 35}

Las estrategias semisintéticas inician con la selección de una molécula bioactiva, subsecuentemente, se realizan modificaciones simples en los esqueletos y se evalúan nuevamente las propiedades biológicas para determinar el impacto de las transformaciones. Actualmente, esta estrategia se apoya de métodos computacionales como el acoplamiento molecular para dirigir la obtención de moléculas con mejores propiedades farmacológicas, disminuyendo significativamente los costos en la obtención de la molécula líder.⁴⁰

Las modificaciones más comunes en esqueletos de productos naturales incluyen aquellas dirigidas a aumentar la lipofilia de la molécula inicial a través de la incorporación de fragmentos que incrementen esta propiedad.⁴¹ Otras estrategias que han contribuido de manera importante a la solución de estos problemas se basan en la incorporación de halógenos e incluso la reducción de la

complejidad estructural de tan sofisticadas entidades químicas, a través de la eliminación de fragmentos innecesarios para su bioactividad.³⁷

De acuerdo con la revisión de Newman y Cragg, entre enero de 1981 y septiembre de 2019,³⁶ la FDA había aceptado un total de 356 derivados de productos naturales (usualmente derivados semisintéticos). Destacando aquellos empleados para el tratamiento de infecciones bacterianas (78), anticancerígenos (43), antidiabéticos (8), antiglaucoma (6), antiinflamatorios (13), antiparasitarios (7), antitrombóticos (5), antiulcerosos (12), antivirales (6), reguladores del metabolismo de calcio (8), hormonas (10), anticonceptivos (10), terapias de reemplazo hormonal (8), antialérgicos (4), antiartríticos (4), antihiperprolactinemia (4), esclerosis múltiple (4), relajantes musculares (4), vasodilatadores (3), inhibidores de la agregación plaquetaria (3), osteoporosis (3), nootrópicos (3), inmunosupresores (3), cardiotónicos (3), antipsoriáticos (3), antifúngicos (3), antihistamínicos (3), analgésicos (2), antiepilépticos (2), antihipertensivos (2), broncodilatadores (2), inmunoestimulantes (2), tratamientos para síndrome de intestino irritable (2), vulneraria (2), degradación macular (1), inmunomodulador (1), hipocolesterolemiante (1), antiobesidad (1), antinarcóticos (1), antídotos (1), antidepresivos (1), y tratamiento para las enfermedades de Parkinson (1), Gaucher (1) y Alzheimer (1), **Figura 5**.³⁶

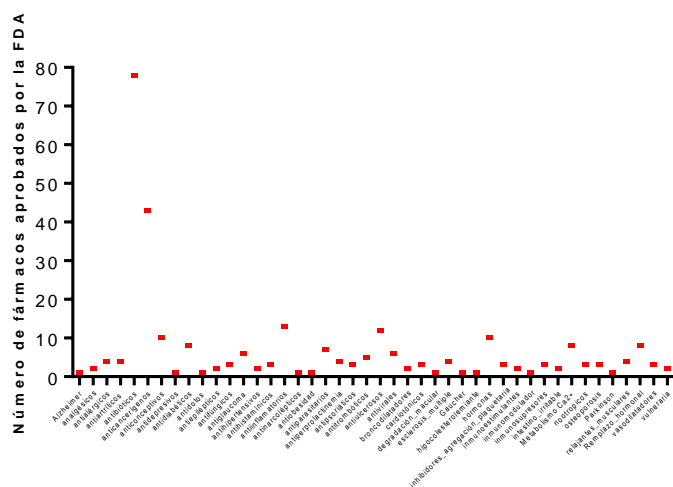


Figura 5. Número de fármacos (derivados semisintéticos) aprobados por la FDA de 1981-2019, organizados por padecimiento.

Algunos ejemplos selectos de estas moléculas incluyen la ceftazidima, plazomicina y roxitromicina, el antifúngico acetato de caspofungina, el antiviral oseltamivir, el antiparasitario artemeter, los anticancerígenos alitretinoína, cabazitaxel, temsirolimus y teniposido, el antidiabético miglitol, y el fingolimod, el primer tratamiento oral para la esclerosis múltiple (**Figura 6**).³⁶

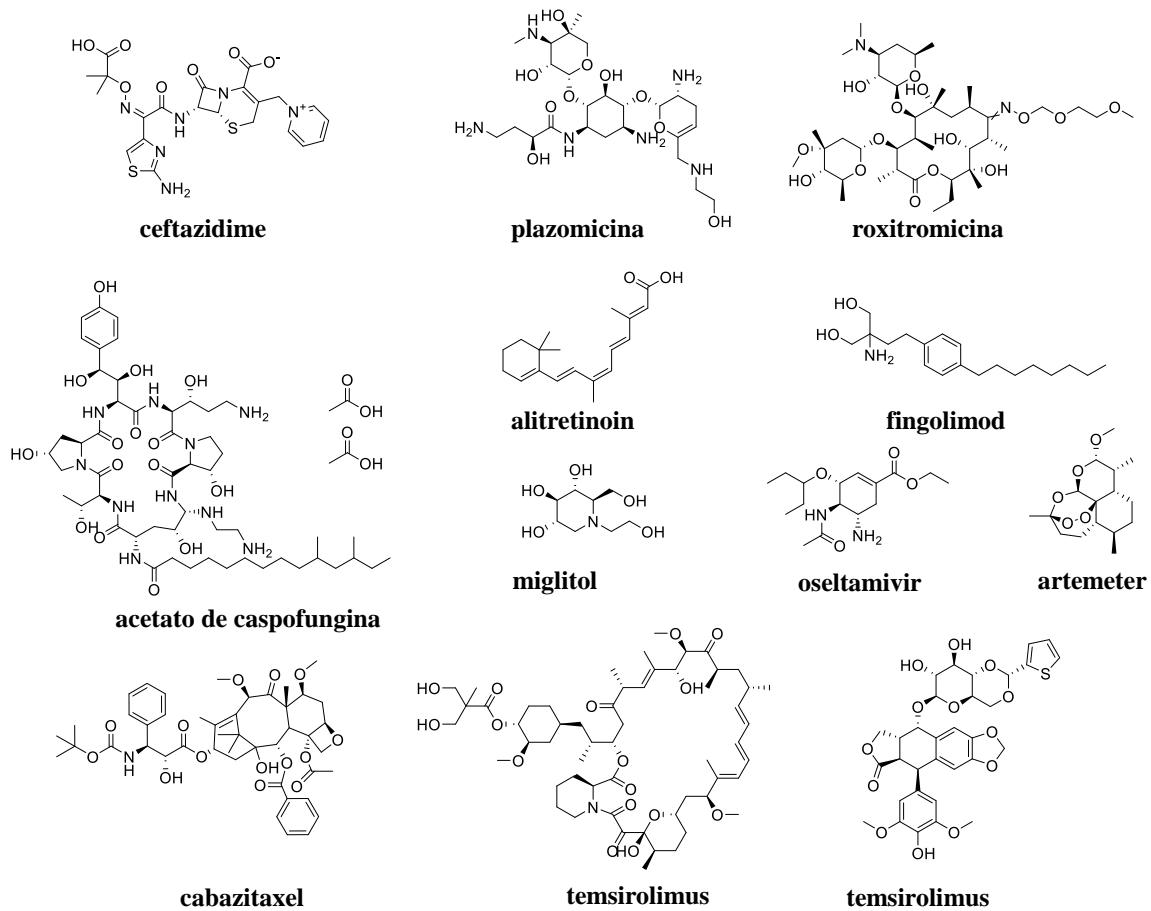


Figura 6. Estructuras selectas de fármacos usados en la terapéutica contemporánea obtenidos por semisíntesis.

3. Justificación

La DM2 es el tipo de diabetes más común y actualmente es considerada como uno de los problemas de salud pública más importantes tanto a nivel global como en México. Este padecimiento afecta significativamente la calidad de vida y tiempo de vida productiva de las personas que la padecen.^{1,2} En 2021, se estimó que en México existían 14.1 millones de mexicanos diagnosticados con esta enfermedad; esto ocasionó que en 2022 fuera la tercera causa de muerte en el país y la primera en pérdida de años saludables. Estas cifras ponen de manifiesto la importancia de la búsqueda de fármacos para el tratamiento de este padecimiento, actividad que ha recobrado importancia en los últimos años, por el incremento en el número de casos que aumenta a gran velocidad, estimando que para 2045 el número de diabéticos aumente a 21.2 millones.¹

Con este propósito se han validado distintos blancos moleculares, entre los que destaca la enzima PTP1B. Esta proteína ha tomado gran interés ya que se ha demostrado su papel como regulador negativo en la señalización de la insulina y de la leptina, sin embargo, los inhibidores más prometedores en la investigación no han superado las fases clínicas ya sea por su falta de potencia o baja selectividad. No obstante, aún con los muchos avances que se han logrado en la búsqueda de inhibidores de PTP1B, aún no hay un compuesto que haya sido exitoso y esté basado en este blanco molecular; pues si bien existen muchos inhibidores, tanto sintéticos como de origen natural, la mayoría no son completamente eficaces y/o seguros, por lo que continúa la búsqueda de nuevos fármacos con menos efectos adversos, más selectivos y eficaces para tratar esta enfermedad.

Cabe mencionar que varios de los inhibidores que se han descubierto para este blanco molecular, son productos naturales de origen vegetal, algas marinas, hongos microscópicos, etc. Esta información subraya el hecho de que los productos naturales son una fuente valiosa para el descubrimiento de fármacos novedosos. Adicionalmente, los programas enfocados en el descubrimiento de inhibidores de la PTP1B generalmente emplean modelos trunca de la enzima, conduciendo a la pérdida de información importante en relación con el modo de inhibición y selectividad de los ligandos.

La semisíntesis ha sido de gran utilidad para aumentar la potencia, selectividad, solubilidad, mejorar la propiedad de partición, aumentar la estabilidad metabólica y química, modular otros parámetros farmacocinéticos, eliminar o atenuar la toxicidad y las reacciones adversas, así como para obtener novedad y propiedad intelectual de sustancias activas. De hecho, del total de fármacos aprobados por la FDA entre 1981 y 2019, el 25.5 % son derivados semisintéticos.

Anteriormente, la duclauxina (**1**) y derivados tanto naturales como semisintéticos se describieron como inhibidores de una PTP de cadena completa (*h*PTP1B₁₋₄₀₀). Un estudio de relación estructura-actividad demostró que el reemplazo de la función lactona por una lactama con sustituyente aromático

en la unidad de isocumarina y la eliminación de metanol del tipo E1cB a partir de la molécula base incrementan la actividad frente a *h*PTP1B₁₋₄₀₀.

Con base en las consideraciones anteriores, el objetivo general del presente trabajo consistió en sintetizar 11 azafenalenonas (**16-26**) basadas en duclauxina (**1**) que incorporan sustituyentes aromáticos con diferentes propiedades químicas para la generación de duclauxamidas inhibitoras de la enzima *h*PTP1B₁₋₄₀₀.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Tomando a duclauxina (**1**) como prototipo estructural y con el uso de acoplamiento molecular, explorar el impacto de incorporar sustituyentes aromáticos con diferentes propiedades químicas para la generación de duclauxamidas inhibitoras de la enzima *h*PTP1B₁₋₄₀₀.

4.2. Objetivos particulares

- Emplear estudios de acoplamiento molecular (*docking*) para dirigir la síntesis de azafenalenonas basadas en duclauxina con potencial inhibitorio frente a la enzima *h*PTP1B₁₋₄₀₀.
- Realizar la síntesis parcial de azafenalenonas basadas en duclauxina (**1**), empleando una reacción de acoplamiento entre duclauxina (**1**) y anilinas sustituidas.
- Obtener y confirmar la identidad química de las azafenalenonas semisintetizadas empleando métodos cromatográficos convencionales (HPLC-semipreparativo), así como métodos espectroscópicos (1D y 2D-RMN) y espectrométricos (EM-AR).
- Evaluar la actividad (CI₅₀) de las azafenalenonas semisintetizadas frente a la enzima *h*PTP1B₁₋₄₀₀.
- Estudiar las características estructurales y biodinámicas para determinar una relación estructura-actividad inhibitoria frente a la enzima *h*PTP1B₁₋₄₀₀.

5. Metodología

5.1. Análisis cromatográficos

Los análisis de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) se realizaron en un cromatógrafo Waters® equipado con un detector UV de arreglo de fotodiodos (PDA- 2998) acoplado a un detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD-2424). Los análisis se realizaron en una columna Phenomenex® (PFP, 5 μ m, 4.6 \times 250 mm) y los aislamientos de los compuestos en una columna semipreparativa Phenomenex® (PFP, 5 μ m, 10.0 \times 250 mm). Como fase móvil se usaron distintos gradientes de elución de agua acidificada (al 0.1% con ácido fórmico) con MeCN. Las corridas analíticas se realizaron inyectando 10 μ L de muestra a una concentración de 5 mg/mL y empleando un automuestreador (Waters 2707) a un flujo de 1 mL/min. Los fraccionamientos semipreparativos se hicieron usando el mismo equipo acoplado a un colector de fracciones (WFCIII), configurado para colectar fracciones de 2.3 mL a un flujo de 4.6 mL/min. Todos los cromatogramas se registraron a una longitud de onda de 254 nm. Los datos se adquirieron y procesaron usando el software Empower, versión 3.0 (Waters®).

5.2. Determinación de constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas

Los espectros de RMN se registraron en alguno de los siguientes equipos: Bruker Avance III a 500 (1 H) y 125 (13 C) MHz; Bruker Avance III a 400 (1 H) y 100 (13 C) MHz, utilizando CDCl_3 como disolvente. Los desplazamientos químicos se registraron en ppm (δ). Los espectros de masas se obtuvieron por la técnica de análisis directo en tiempo real (DART) en un espectrómetro de masas Jeol JMS-T100LC AccuTOF y/o por Jet Stream Technology empleando un equipo Q-TOF (modelo G6530BA).

5.3. Estudios de acoplamiento molecular (*Docking*)

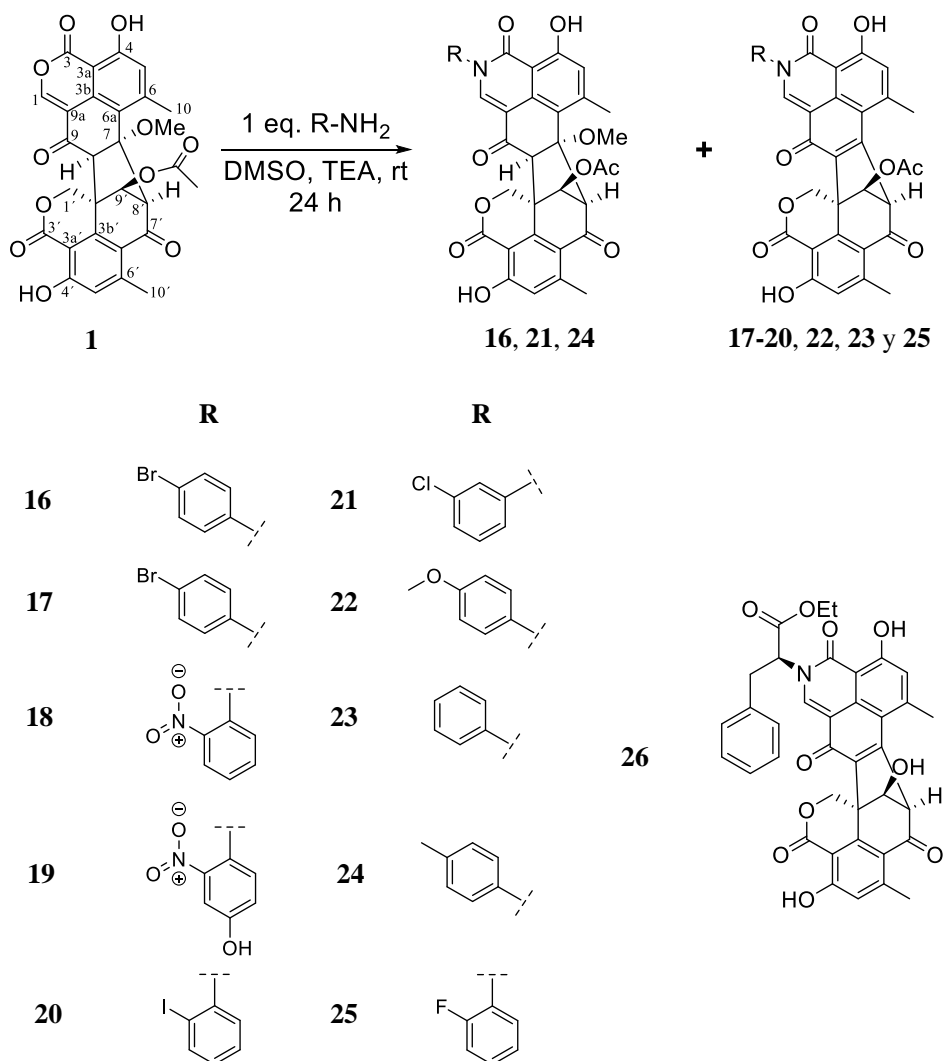
La estructura proteica empleada en este trabajo corresponde al modelo homologado de *h*PPT1B₁₋₄₀₀ descrito por Jiménez-Arreola y colaboradores en 2020.⁵ Los archivos de la proteína adecuados para estudios de acoplamiento molecular se prepararon asignando hidrógenos polares y cargas (de Kollman), usando AutoDockTools (ADT) 1.5.6 y se almacenaron en formato .pdbqt para su uso en las interfaces AutoGrid 4.0 y AutoDock 4.0 (<http://autodock.scripps.edu/>). Todos los compuestos estudiados se construyeron en ChemDraw 18 y optimizaron en Spartan'10 con un campo de fuerza semiempírico (AM1). Los ligandos se prepararon con la adición de hidrógenos no polares y la asignación de cargas atómicas de Gasteiger-Marsilli en la interfaz gráfica ADT 1.5.6. de Autodock 4.0.²³

La predicción de las conformaciones más favorables de interacción proteína-ligante se realizó empleando un algoritmo Genético Lamarckiano (LGA). Los estudios de acoplamiento molecular

ciego para cada ligando se realizaron en una rejilla (grid) de búsqueda de $126 \times 126 \times 126$ puntos (con 0.5 \AA de separación) centrados en la proteína. Todas las simulaciones se realizaron con un LGA y 100 corridas. Los resultados se analizaron en ADT 1.5.6, PyMOL 2.4.0 y Drug Discovery Studio.²³

5.4. Síntesis parcial de análogos de duclauxina (1)

Distintas cantidades de duclauxina (1) (~85 % de pureza, determinada por CLAE) se hicieron reaccionar en DMSO, a temperatura ambiente y en agitación constante durante ~24 horas, con un equivalente de diversas anilinas que incorporan sustituyentes aromáticos con diferentes propiedades químicas para la generación de las duclauxamidas **16-26**, de acuerdo con el **esquema 1**.



Esquema 1. Estrategia semisintética empleada para la obtención de las azafenalenonas **16-26**. Duclauxamidas A (**16**, **21** y **24**), duclauxamidas B (**17-20**, **22**, **23** y **25**).

5.5. Purificación de derivados semisintéticos de duclauxina (16-26)

5.5.1. Semisíntesis, aislamiento y purificación de 16

Aproximadamente 5 mg de duclauxina (**1**) se hicieron reaccionar con 1.8 mg de *p*-bromoanilina en DMSO a temperatura ambiente y en agitación constante durante 24 horas. Los productos de reacción se purificaron por CLAE en modalidad semipreparativa (**Figura 7**), haciendo dos inyecciones de 90 μ L, utilizando como fase estacionaria una columna Phenomenex® (PFP) y como fase móvil un gradiente de 60%→80% de MeCN/agua acidificada (al 0.1% de ácido fórmico) en 30 minutos. Este procedimiento permitió el aislamiento y purificación del producto **16** (2.0 mg; t_R 11.0 min).

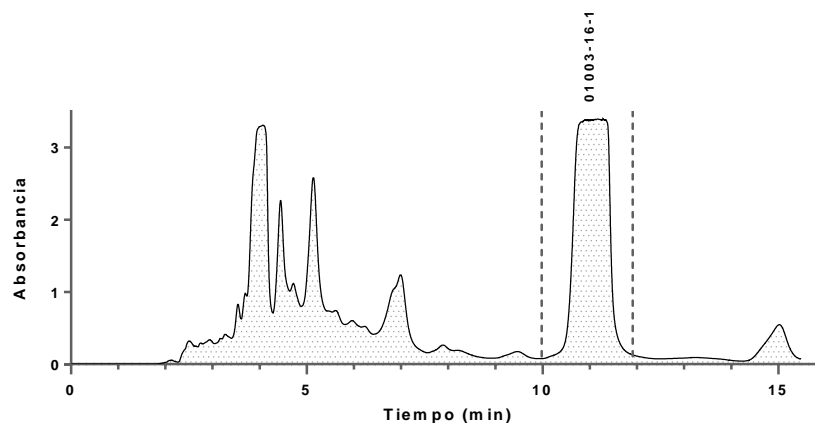


Figura 7. Cromatograma de la purificación de 16. Columna Phenomenex® PFP (5 μ m, 10.0 \times 250 mm). Fase móvil: Gradiente de 60%→80% de MeCN en agua ácida (0.1% de ácido fórmico) en 30 minutos.

5.5.2. Semisíntesis, aislamiento y purificación de 17

Aproximadamente 7.6 mg de **1** se hicieron reaccionar con 2.4 mg de *p*-bromoanilina en DMSO con 10 μ L de trietilamina a temperatura ambiente y en agitación constante durante 24 horas. Los productos de reacción se purificaron por CLAE en modalidad semipreparativa (**Figura 8**), haciendo una inyección de 200 μ L, utilizando como fase estacionaria una columna Phenomenex® (PFP) y como fase móvil una mezcla binaria de MeCN/agua acidificada (al 0.1% de ácido fórmico) en gradiente de 60%→70% de MeCN durante 30 minutos. Este fraccionamiento condujo al aislamiento y purificación de **17** (2.5 mg; t_R 24.7 min).

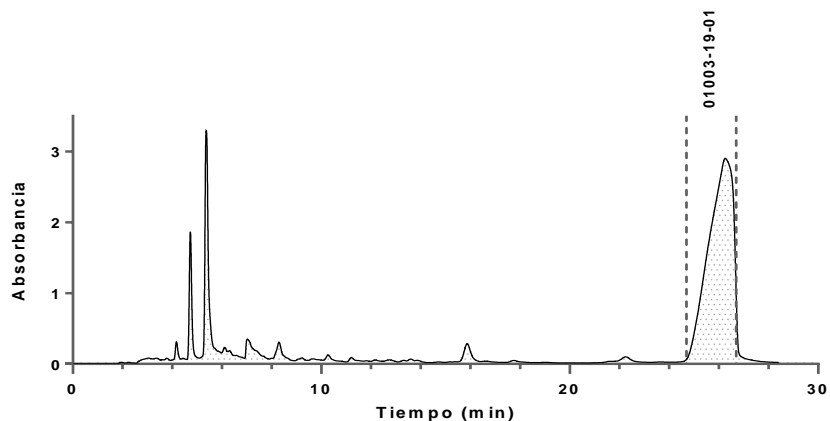


Figura 8. Cromatograma de la purificación de 17. Columna Phenomenex® PFP (5 μ m, 10.0 \times 250 mm). Fase móvil: Gradiente de 60% \rightarrow 70% de MeCN en agua ácida (0.1% de ácido fórmico) en 30 minutos.

5.5.3. Semisíntesis, aislamiento y purificación de 18

Aproximadamente 20.2 mg de duclauxina (**1**) se hicieron reaccionar con 10.7 mg de *o*-nitroanilina en DMSO con 10 μ L de trietilamina a temperatura ambiente y en agitación constante durante 24 horas. Los productos de reacción se purificaron por CLAE en modalidad semipreparativa (**Figura 9**), haciendo dos inyecciones de \approx 90 μ L, utilizando como fase estacionaria una columna Phenomenex® (PFP) y como fase móvil una mezcla binaria de MeCN/agua acidificada (al 0.1% de ácido fórmico): en gradiente de 50% \rightarrow 85% de MeCN durante 30 minutos. Este fraccionamiento condujo al aislamiento y purificación de **18** (3.9 mg; t_R 18.6 min).

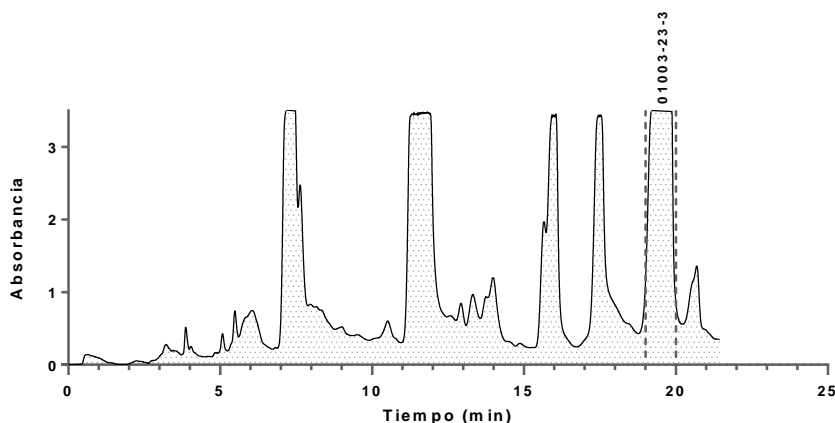


Figura 9. Cromatograma de la purificación de 18. Columna Phenomenex® PFP (5 μ m, 10.0 \times 250 mm). Fase móvil: Gradiente de 50% \rightarrow 85% de MeCN en agua ácida (0.1% de ácido fórmico) en 30 minutos.

5.5.4. Semisíntesis, aislamiento y purificación de 19

Aproximadamente 15.0 mg de duclauxina (**1**) se hicieron reaccionar con 9.0 mg de 4-amino-2-nitrofenol en DMSO con 10 μ L de trietilamina a temperatura ambiente y en agitación constante

durante 24 horas. Los productos de reacción se purificaron por CLAE en modalidad semipreparativa (**Figura 10**), haciendo tres inyecciones de $\approx 90 \mu\text{L}$, utilizando como fase estacionaria una columna Phenomenex® (PFP) y como fase móvil una mezcla binaria de MeCN/agua acidificada (al 0.1% de ácido fórmico) en gradiente de 50% \rightarrow 70% de MeCN durante 30 minutos. Este fraccionamiento condujo al aislamiento y purificación de **19** (3.3 mg; t_R 21.3 min).

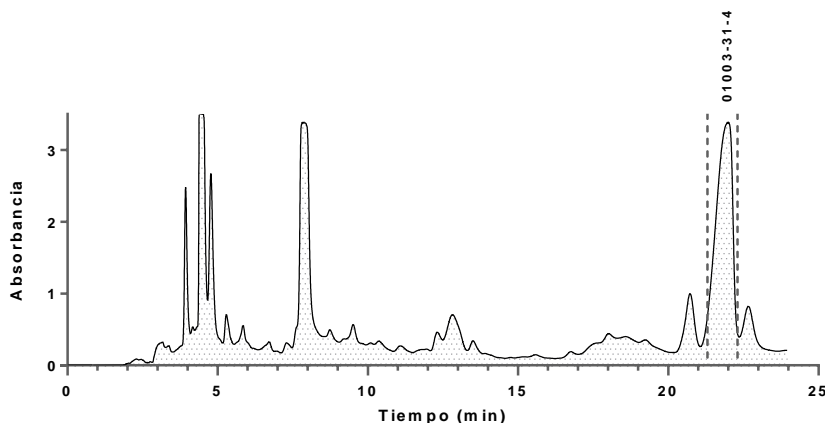


Figura 10. Cromatograma de la purificación de **19**. Columna Phenomenex® PFP (5 μm , 10.0 \times 250 mm). Fase móvil: Gradiente de 50% \rightarrow 70% de MeCN en agua ácida (0.1% de ácido fórmico) en 30 minutos.

5.5.5. Semisíntesis, aislamiento y purificación de **20**

Aproximadamente 17.6 mg de duclauxina (**1**) se hicieron reaccionar con 15.6 mg de *o*-yodoanilina en DMSO con 10 μL de trietilamina a temperatura ambiente y en agitación constante durante 24 horas. Los productos de reacción se purificaron por CLAE en modalidad semipreparativa (**Figura 11**), haciendo dos inyecciones de $\approx 90 \mu\text{L}$, utilizando como fase estacionaria una columna Phenomenex® (PFP) y como fase móvil una mezcla binaria de MeCN/agua acidificada (al 0.1% de ácido fórmico) en gradiente de 50% \rightarrow 100% de MeCN durante 30 minutos. Este fraccionamiento condujo al aislamiento y purificación de **20** (2.9 mg; t_R 17.9 min).

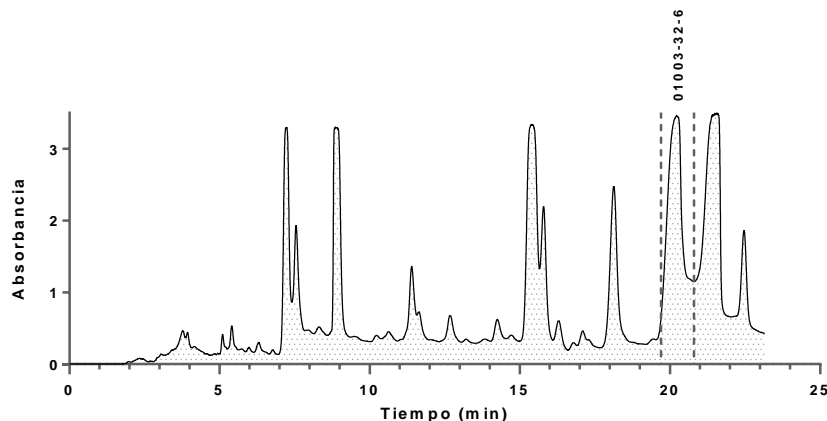


Figura 11. Cromatograma de la purificación de **20**. Columna Phenomenex® PFP (5 μm , 10.0 \times 250 mm). Fase móvil: Gradiente de 50% \rightarrow 100% de MeCN en agua ácida (0.1% de ácido fórmico) en 30 minutos.

5.5.6. Semisíntesis, aislamiento y purificación de **21**

Aproximadamente 24.3 mg de duclauxina (**1**) se hicieron reaccionar con 9.2 μL de *m*-cloroanilina en DMSO a temperatura ambiente y en agitación constante durante 24 horas. Los productos de reacción se purificaron por CLAE en modalidad semipreparativa (**Figura 12**), haciendo tres inyecciones de ≈ 70 μL , utilizando como fase estacionaria una columna Phenomenex® (PFP) y como fase móvil una mezcla binaria de MeCN/agua acidificada (al 0.1% de ácido fórmico) y un gradiente de 70% \rightarrow 100% de MeCN durante 30 minutos. Este fraccionamiento condujo al aislamiento y purificación de **21** (13.0 mg; t_R 8.6 min).

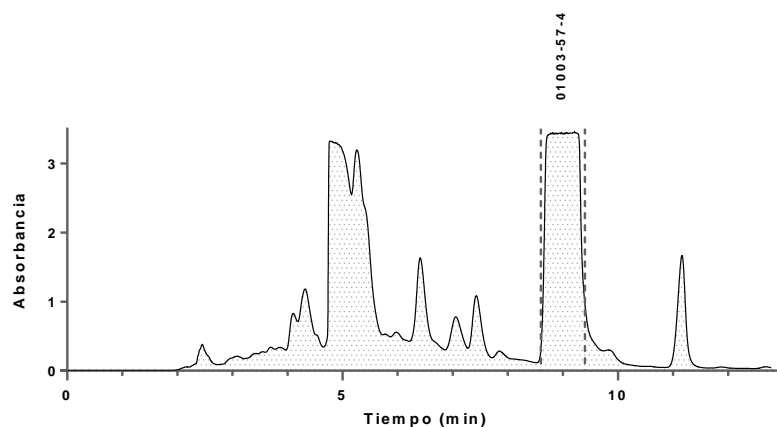


Figura 12. Cromatograma de la purificación de **21**. Columna Phenomenex® PFP (5 μm , 10.0 \times 250 mm). Fase móvil: Gradiente de 70% \rightarrow 100% de MeCN en agua ácida (0.1% de ácido fórmico) en 30 minutos.

5.5.7. Semisíntesis, aislamiento y purificación de **22**

Aproximadamente 20.9 mg de duclauxina (**1**) se hicieron reaccionar con 10.4 mg de *p*-anisidina en DMSO con 10 μL de trietilamina a temperatura ambiente y en agitación constante durante 24 horas. Los productos de reacción se purificaron por CLAE en modalidad semipreparativa (**Figura 13**), haciendo tres inyecciones de ≈ 90 μL , utilizando como fase estacionaria una columna Phenomenex® (PFP) y como fase móvil una mezcla binaria de MeCN/agua acidificada (al 0.1% de ácido fórmico) y un método de 70% de MeCN durante 30 minutos. Este fraccionamiento condujo al aislamiento y purificación de **22** (9.1 mg; t_R 10.9 min).

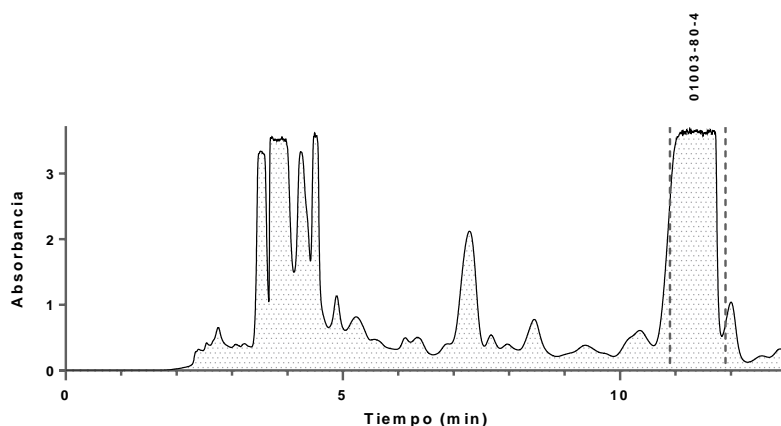


Figura 13. Cromatograma de la purificación de **22**. Columna Phenomenex® PFP (5 μ m, 10.0 \times 250 mm). Fase móvil: Método isocrático de 70% de MeCN en agua ácida (0.1% de ácido fórmico) por 30 minutos.

5.5.8. Semisíntesis, aislamiento y purificación de **23**

Aproximadamente 24.0 mg de duclauxina (**1**) se hicieron reaccionar con 7.5 μ L de anilina en DMSO a temperatura ambiente y en agitación constante durante 24 horas. Los productos de reacción se purificaron por CLAE en modalidad semipreparativa (**Figura 14**), haciendo tres inyecciones de \approx 80 μ L, utilizando como fase estacionaria una columna Phenomenex® (PFP) y como fase móvil una mezcla binaria de 70% de MeCN/agua acidificada (al 0.1% de ácido fórmico) por 30 minutos. Este fraccionamiento condujo al aislamiento y purificación de **23** (10.2 mg; t_R 10.6 min).

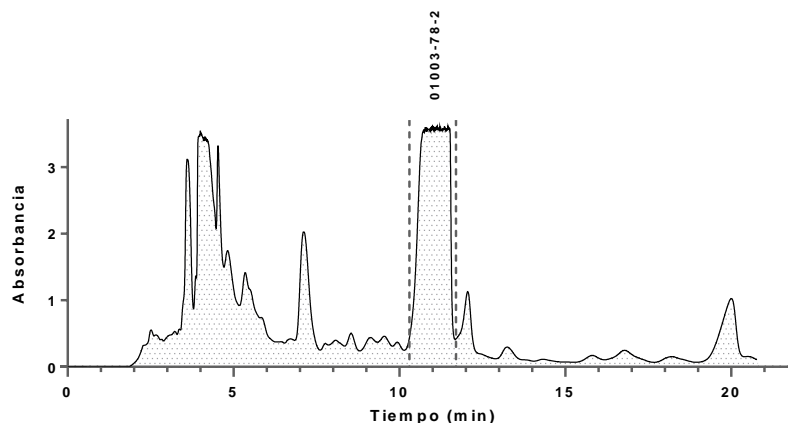


Figura 14. Cromatograma de la purificación de **23**. Columna Phenomenex® PFP (5 μ m, 10.0 \times 250 mm). Fase móvil: Método isocrático de 70% de MeCN en agua ácida (0.1% de ácido fórmico) por 30 minutos.

5.5.9. Semisíntesis, aislamiento y purificación de **24**

18.2 mg de duclauxina (**1**) se hicieron reaccionar con 13.3 mg de *p*-toluidina en DMSO a temperatura ambiente y en agitación constante durante 24 horas. Los productos de reacción se purificaron por

CLAE en modalidad semipreparativa (**Figura 15**), haciendo tres inyecciones de $\approx 80 \mu\text{L}$, utilizando como fase estacionaria una columna Phenomenex® (PFP) y como fase móvil una mezcla binaria de MeCN/agua acidificada (al 0.1% de ácido fórmico) y un gradiente de 70% \rightarrow 100% de MeCN durante 30 minutos. Este fraccionamiento condujo al aislamiento y purificación de **24** (12.0 mg; t_R 5.7 min).

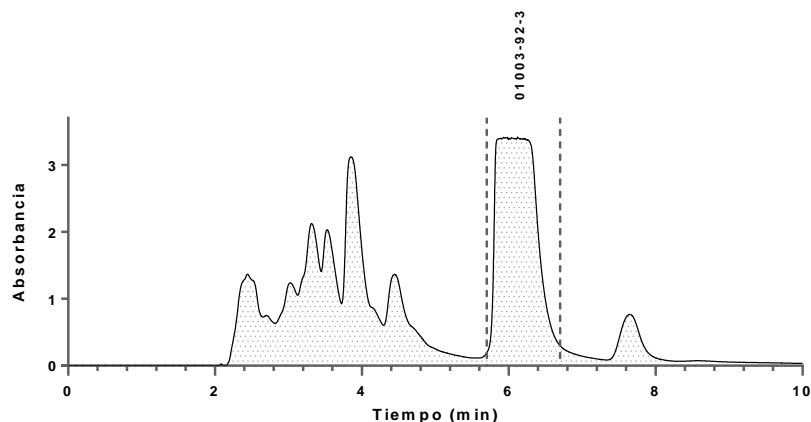


Figura 15. Cromatograma de la purificación de **24**. Columna Phenomenex® PFP (5 μm , 10.0 \times 250 mm). Fase móvil: Gradiente de 70% \rightarrow 100% de MeCN en agua ácida (0.1% de ácido fórmico) en 30 minutos.

5.5.10. Semisíntesis, aislamiento y purificación de **25**

Aproximadamente 24.8 mg de duclauxina (**1**) se hicieron reaccionar con 13.2 μL de *o*-fluroanilina en DMSO a temperatura ambiente y en agitación constante durante 24 horas. Los productos de reacción se purificaron por CLAE en modalidad semipreparativa (**Figura 16**), haciendo dos inyecciones de $\approx 90 \mu\text{L}$, utilizando como fase estacionaria una columna Phenomenex® (PFP) y como fase móvil una mezcla binaria de MeCN/agua acidificada (al 0.1% de ácido fórmico) y un gradiente de 80% \rightarrow 100% de MeCN durante 30 minutos. Este fraccionamiento condujo al aislamiento y purificación de **25** (2.6 mg; t_R 6.0 min).

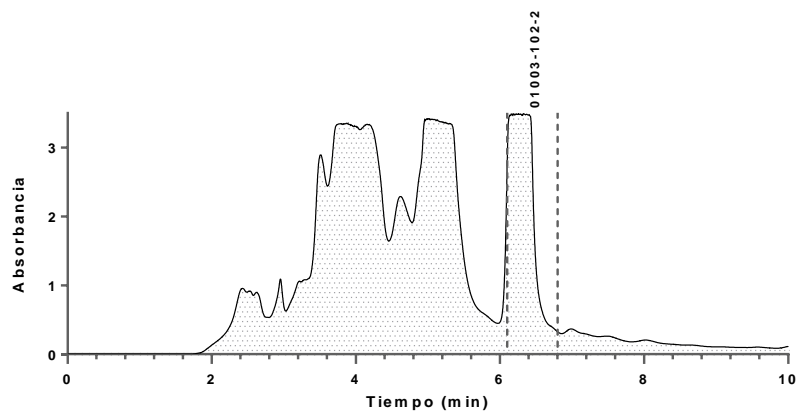


Figura 16. Cromatograma de la purificación de **25**. Columna Phenomenex® PFP (5 μm , 10.0 \times 250 mm). Fase móvil: Gradiente de 80% \rightarrow 100% de MeCN en agua ácida (0.1% de ácido fórmico) en 30 minutos.

5.5.11. Semisíntesis, aislamiento y purificación de **26**

Aproximadamente 23.9 mg de duclauxina (**1**) se hicieron reaccionar con 18.7 mg de clorhidrato de éster etílico de L-fenilalanina en DMSO con 10 μ L de trietilamina a temperatura ambiente y en agitación constante durante 96 horas. Los productos de reacción se purificaron por CLAE en modalidad semipreparativa (**Figura 17**), haciendo tres inyecciones de \approx 65 μ L, utilizando como fase estacionaria una columna Phenomenex® (PFP) y como fase móvil una mezcla binaria de MeCN/agua acidificada (al 0.1% de ácido fórmico) y un gradiente de 70% \rightarrow 100% de MeCN durante 30 minutos. Este fraccionamiento condujo al aislamiento y purificación de **26** (0.8 mg; t_R 7.5 min).

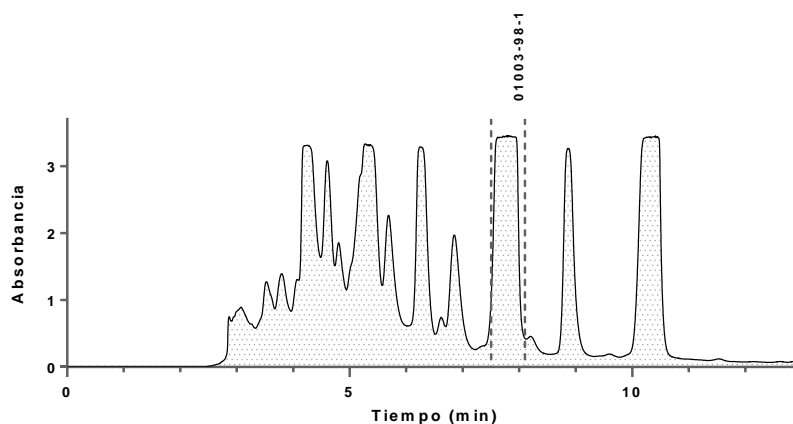


Figura 17. Cromatograma de la purificación de **26**. Columna Phenomenex® PFP (5 μ m, 10.0 \times 250 mm). Fase móvil: Gradiente de 70% \rightarrow 100% de MeCN en agua ácida (0.1% de ácido fórmico) en 30 minutos.

5.6. Ensayo de inhibición

El efecto de los compuestos semisintetizados sobre la actividad de la enzima *hPTP1B*₁₋₄₀₀ se evaluó espectrofotométricamente en cajas de 96 pozos. Para los ensayos se usó una solución de *hPTP1B*₁₋₄₀₀ 3 μ M y una solución de sustrato (*p*NPP) 30 mM en solución amortiguadora 50 mM HEPES, pH 6.8, 100 mM NaCl y 1.5 mM DTT. Para cada compuesto puro se prepararon soluciones stock en DMSO (1 mM) y posteriormente, alícuotas de 0, 2, 4, 6, 8 y 10 μ L (por triplicado). Se incubaron por 10 minutos con 5 μ L de una solución enzimática de *hPTP1B*₁₋₄₀₀ (3 μ M) en un volumen total de 90 μ L. Después de la incubación se adicionaron 10 μ L de la solución de sustrato y se registró la primera lectura de absorbancia (t_0) con un lector de placas Thermo Scientific® Multiskan FC ($\lambda = 405$ nm). Posteriormente, la mezcla de reacción se incubó por 20 minutos a 37°C. Al término de este tiempo, se tomó una segunda lectura de absorbancia (t_{20}). Para el control del equipo, así como para la adquisición, el manejo y manipulación de datos, se utilizó el software Skanlt, versión 5.0. El porcentaje de inhibición se calculó tomando en cuenta la corrección por la absorbancia del blanco

(enzima sin inhibidor) de acuerdo con la **Ecuación 1** y se usó duclauxina (**1**) como control positivo.⁶
16, 23

$$\%Inhibición\ hPTP1B_{1-400} = \left(1 - \frac{A_{405t}}{A_{405c}}\right) \times 100$$

Ecuación 1.

Donde A_{405t} representa la absorbancia corregida de los compuestos puros ($A_{405t_{final}} - A_{405t_{inicial}}$) y A_{405c} la absorbancia del blanco corregida ($A_{405c_{final}} - A_{405c_{inicial}}$). La concentración de compuesto puro necesaria para inhibir el 50% de la actividad enzimática (CI_{50}) se calculó mediante una regresión no lineal, empleando la ecuación de unión específica con coeficiente de Hill en el software GraphPad Prism 6.0.

6. Resultados y discusión

El presente trabajo se desarrolló como parte de un proyecto de mayor alcance que tiene como objetivo principal el descubrimiento de moduladores alostéricos de la enzima *hPTP1B*₁₋₄₀₀ a partir de hongos microscópicos.^{6, 16, 23}

Previamente, Jiménez-Arreola y colaboradores reportaron la clonación, expresión y purificación de la enzima *hPTP1B*₁₋₄₀₀, así como el desarrollo de un ensayo espectrofotométrico para el cribado de mezclas complejas conducentes al descubrimiento de inhibidores de la proteína.⁶ En este estudio se identificó el extracto orgánico de la especie fúngica *Talaromyces* sp. IQ-313 (aislada de una muestra de suelo de hormiguero colectada en la Huasteca Hidalguense) como una fuente promisoría de sustancias capaces de inhibir la actividad fosfatasa de *hPTP1B*₁₋₄₀₀.⁶ Tras la aplicación de distintas metodologías convencionales de purificación, principalmente cromatografía en columna abierta (CCA) y cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) en su modalidad preparativa, se lograron aislar las duclauxinas **1-4**. Las duclauxinas son un grupo de compuestos dimericos hetpacíclicos formados por dos fenalenonas.^{6, 7} Estos compuestos constan de una unidad de isocumarina y una unidad de dihidroisocumarina, y son generalmente biosintetizados por hongos de los géneros *Penicillium* y *Talaromyces*.⁷ La evaluación de estas sustancias como inhibidores de *hPTP1B*₁₋₄₀₀ indicó que las sustancias inhiben la actividad de la enzima de manera dependiente de la concentración con valores de CI_{50} en el rango de 12-90 μ M, sugiriendo que pequeños cambios en la estructura base del producto impactan considerablemente en la actividad.⁶ Por otra parte, estudios de cinética enzimática concluyeron que por lo menos los compuestos **1** y **4** se comportan como inhibidores mixtos de *hPTP1B*₁₋₄₀₀, es decir, se unen tanto a la enzima libre como al complejo enzima sustrato, a diferencia del ácido ursólico (control positivo) que se comporta como un inhibidor no competitivo de la proteína.⁶ Además, en este trabajo de investigación se postuló, a través de estudios de acoplamiento y dinámica molecular, que los productos **1-4** se comportan como moduladores alostéricos de la proteína, ya que se unen a la región desestructurada de la enzima (aminoácidos 301-400),⁶ provocando cambios conformacionales importantes que derivan en la inactivación de la macromolécula. Estos hallazgos se apoyaron en los resultados de un experimento de interacción ligante-proteína seguido por dicroísmo circular, en el que se demostró que **1** se une a la proteína modificando tanto su conformación como su estructura secundaria.⁶

Motivados por la complejidad estructural de las sustancias **1-4**, su potente actividad como inhibidores de la enzima *hPTP1B*₁₋₄₀₀ y su mecanismo de acción, Aguilar-Ramírez aisló (a partir de un co-cultivo hongo-hongo) y preparó (por medio de síntesis parcial) una serie de derivados de fenalenonas análogas (**5-15**).^{6, 8} Los derivados semisintéticos se prepararon considerando la reactividad del residuo

de isocumarina frente a aminas primarias.⁴² Esta reacción de acoplamiento fue motivada por el descubrimiento de una serie de duclauxamidas⁴² a partir del hongo *Talaromyces* sp. en la que se reemplaza la lactona del motivo de isocumarina por una lactama.⁴² La comparación de los valores de CI_{50} de los productos **1-15** como inhibidores de *hPTP1B*₁₋₄₀₀ mostraron una clara relación estructura-actividad entre las sustancias.⁸ Por ejemplo, para los productos **6**, **12-15** fueron hasta cinco veces más activos que duclauxina (**1**), mientras que para las sustancias **5**, **8** y **9-11**, las propiedades de inhibición se vieron disminuidas o incluso desaparecieron. Estos resultados mostraron una buena correlación con los datos de afinidad obtenidos para este conjunto de moléculas a través de estudios de apagamiento de la fluorescencia intrínseca de *hPTP1B*₁₋₄₀₀.⁸

En el trabajo realizado por Aguilar-Ramírez la correlación estructura-actividad se explicó en función de las interacciones supramoleculares entre los ligantes y la enzima, postuladas a través de estudios de acoplamiento molecular (*docking*), ya que las sustancias más activas se unen en la región desestructurada de la proteína en una región cercana al sitio alostérico, mientras que las sustancias menos activas se unen en regiones del dominio N-terminal.⁸ Otros descubrimientos importantes presentados en este trabajo son aquellos que mostraron que los derivados que incorporan una anilina sustituida en la estructura base de **1** y que eliminan metanol a partir de la sustancia de partida son los más afines y activos.⁸ Este incremento en la inhibición y afinidad se explicó en términos del incremento en la rigidez de las moléculas, que impactan directamente sobre su interacción con el blanco molecular.⁸

Con base en estos antecedentes, este trabajo consistió en sintetizar una serie de azafenalenonas basadas en duclauxina (**1**) y evaluar su potencial como inhibidores de la enzima *hPTP1B*₁₋₄₀₀ *in vitro*, con la finalidad de mejorar el potencial inhibitorio de **1**, además de incrementar la diversidad estructural de este esqueleto carbonado.

El estudio comenzó con la postulación de una serie de posibles derivados de duclauxina (**1**) y la predicción de su k_d y probable sitio de unión mediante estudios de acoplamiento molecular (*docking*), empleando un protocolo previamente validado. Los criterios de selección de las moléculas a sintetizar fueron: 1) los valores de energía libre de Gibbs (ΔG) predichas por *docking* que fueran menores a los del compuesto **1** (-5.57 kcal/mol) y 2) la disponibilidad de la materia prima. El *docking* es una herramienta computacional que permite proponer un modelo de acoplamiento entre un ligante y un receptor.^{43, 44} Estas aproximaciones han sido ampliamente utilizadas en programas enfocados al descubrimiento de compuestos de interés terapéutico y a la optimización de moléculas líder en el proceso de desarrollo de fármacos, a través de estudios de relación estructura actividad (SAR).^{43, 44} Si bien, estos algoritmos fueron desarrollados inicialmente para predecir la interacción de macromoléculas con moléculas pequeñas, en la actualidad cubren un amplio abanico de aplicaciones,

entre las que destacan la predicción de efectos adversos, farmacología, reposicionamiento de fármacos y búsqueda de blancos moleculares para moléculas bioactivas.⁴⁵

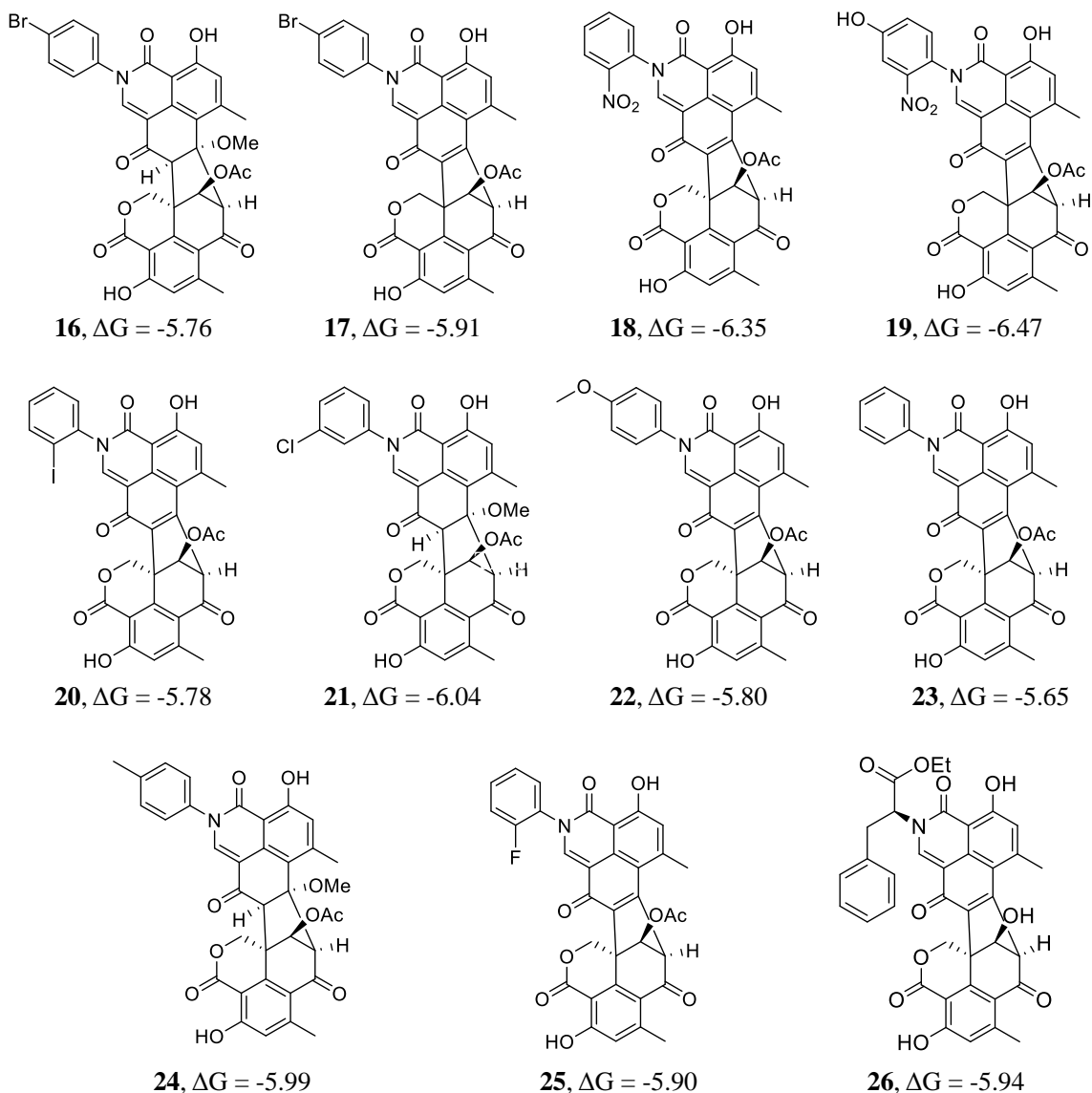


Figura 18. Azafenalenonas estudiadas por acoplamiento molecular seleccionadas para realizar su síntesis parcial. Los valores de ΔG se expresan en kcal/mol.

Los resultados de las predicciones de unión entre las moléculas postuladas y la enzima *h*PTP1B₁₋₄₀₀ indicaron que las azafenalenonas **16-26** presentan valores de ΔG ligeramente menores a los del compuesto **1** (Figura 18) y se unen en la región desordenada del dominio C-terminal de la proteína (Figura 19). Los resultados sugieren que estas sustancias se pueden comportar como moduladores alostéricos de la enzima *h*PTP1B₁₋₄₀₀ a través de la inducción de cambios conformacionales, ya sea locales o globales, que afecten la flexibilidad de las asas PTP y/o con ello, su actividad catalítica.

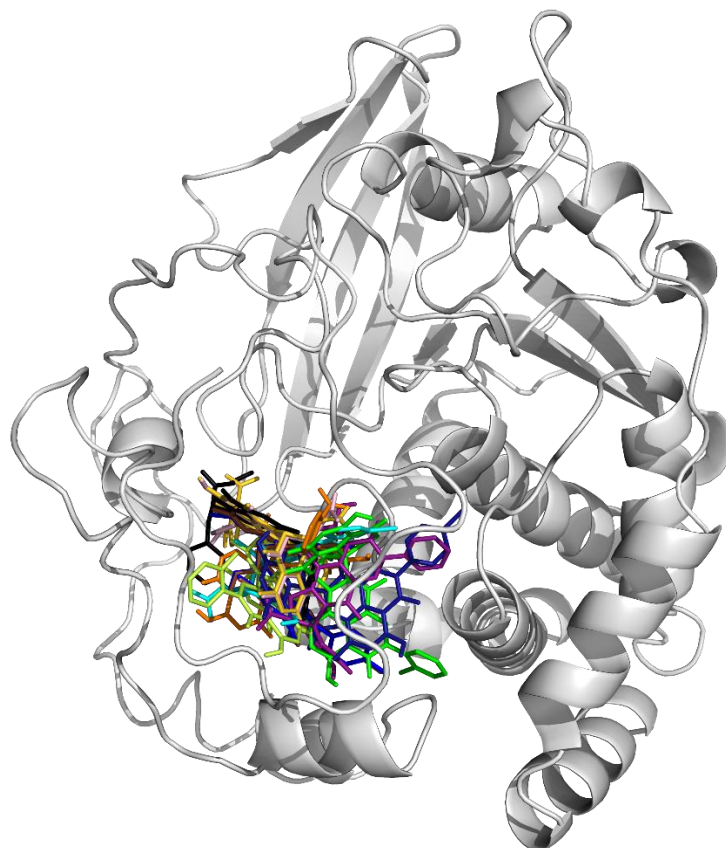


Figura 19. Modelos predichos por Autodock 4.0 para la interacción de las azafenalenonas **16-26** con la enzima *hPTP1B*₁₋₄₀₀. Todos los compuestos se muestran en bastones de acuerdo con el siguiente código de colores. **16** (azul medio), **17** (azul marino), **18** (naranja), **19** (dorado), **20** (verde), **21** (cian), **22** (rosa claro), **23** (violeta), **24** (café), **25** (verde limón) y **26** (negro).

Los aminoácidos que conforman el sitio de unión de los compuestos **16-26** incluyen aquellos con cadenas laterales alifáticas, polares no cargadas, aromáticas y polares cargadas negativamente (**Figura 20**). Los residuos que aparecen con mayor frecuencia en el reconocimiento molecular de **16-26** con *hPTP1B*₁₋₄₀₀ son la Lys116, los residuos del asa WPD Pro₁₈₀, Asp₁₈₁, Phe₁₈₂ y Pro₁₈₃; el Trp₃₃₃ y la Pro₃₈₇. La interacción de las moléculas sintetizadas con los aminoácidos del asa WPD soportan la hipótesis de una modulación alostérica, de manera similar a como se reportó para la naftopirona dimérica xantopocina,³⁵ un inhibidor mixto de *hPTP1B*₁₋₄₀₀ que bloquea el asa WPD en su conformación cerrada, ya sea en ausencia o en presencia del sustrato, e impide el curso de la reacción de hidrólisis.³⁵ Las interacciones más importantes involucradas en el reconocimiento molecular son las de van der Waals, de tipo alquilo, π -alquilo, π -catión, apilamientos de tipo π - π , interacciones π - σ , enlaces de halógeno, π -sulfuro y enlaces de hidrógeno (**Figura 21**).

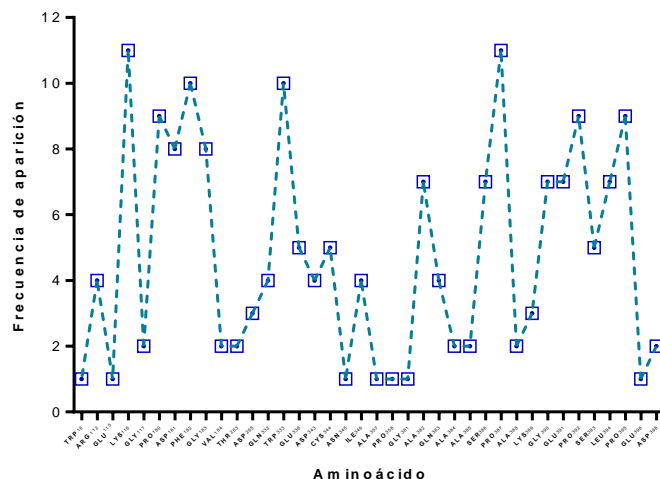


Figura 20. Aminoácidos concesos que participan en la interacción de los productos **16-26** con hPTP1B₁₋₄₀₀.

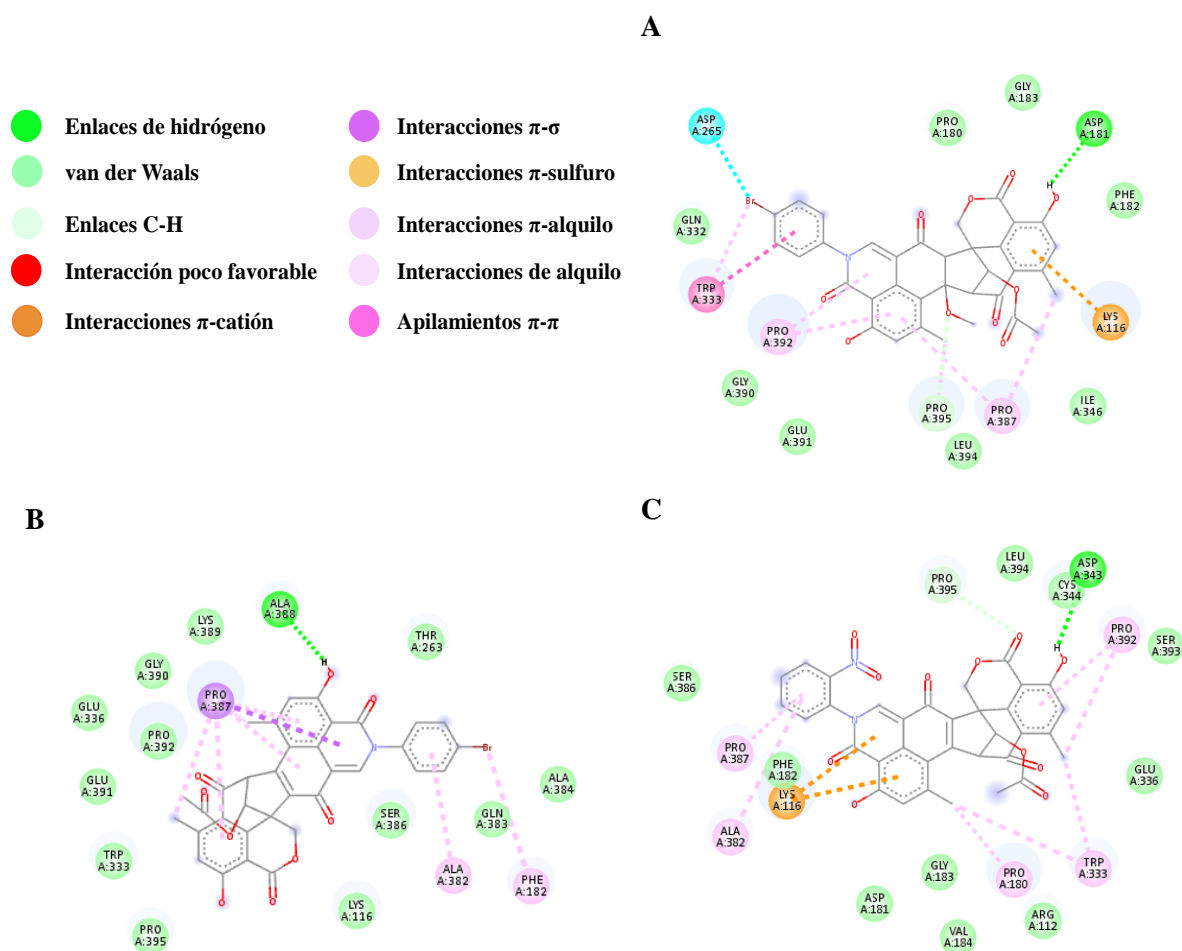


Figura 21. Modelo estructural predicho por AutoDock 4.0 para la interacción de los productos **16-26** (A-K, respectivamente) con un modelo generado por homología para la enzima hPTP1B₁₋₄₀₀.

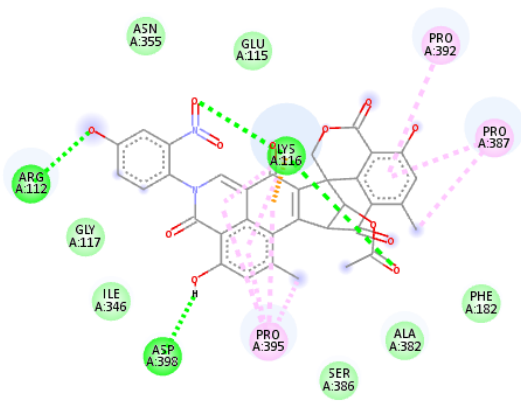
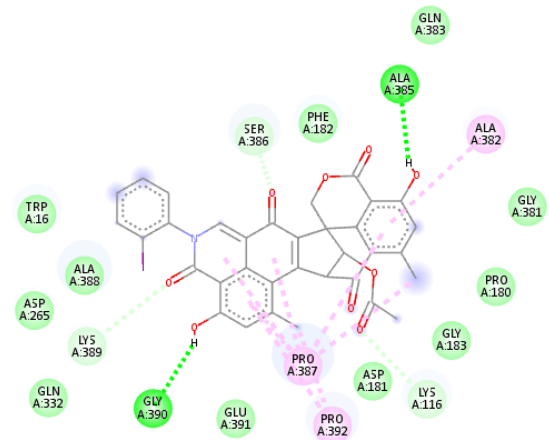
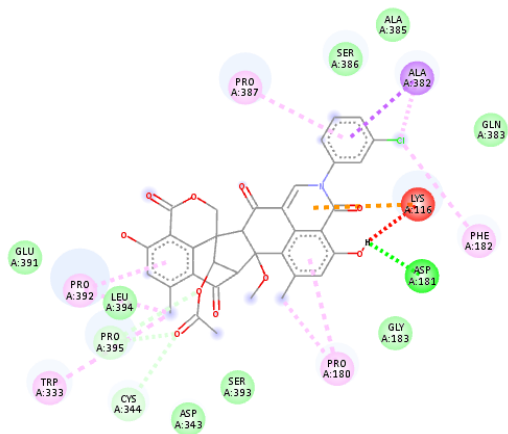
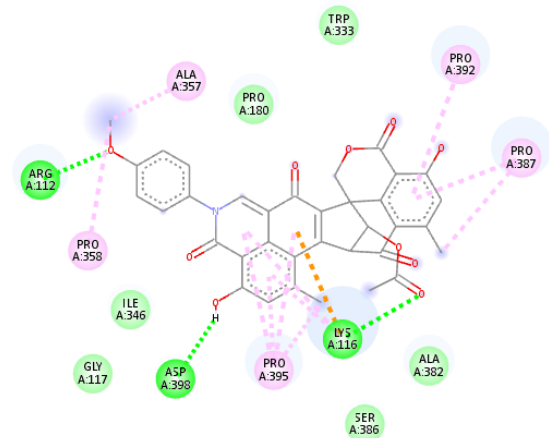
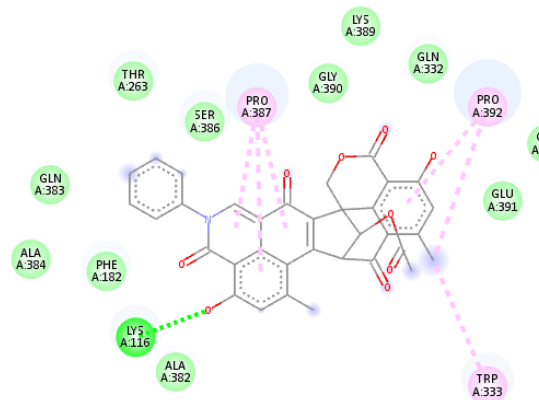
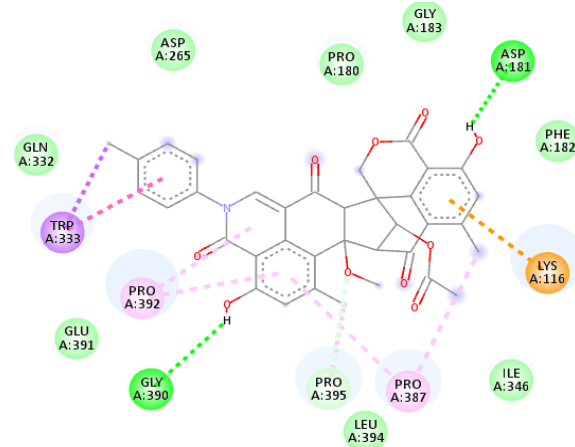
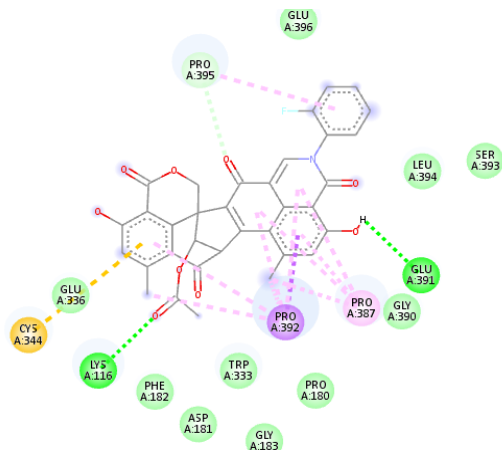
D**E****F****G****H****I**

Figura 21 (Continuación). Modelo estructural predicho por AutoDock 4.0 para la interacción de los productos 16-26 (A-K, respectivamente) con un modelo generado por homología para la enzima *hPTP1B*₁₋₄₀₀.

J



K

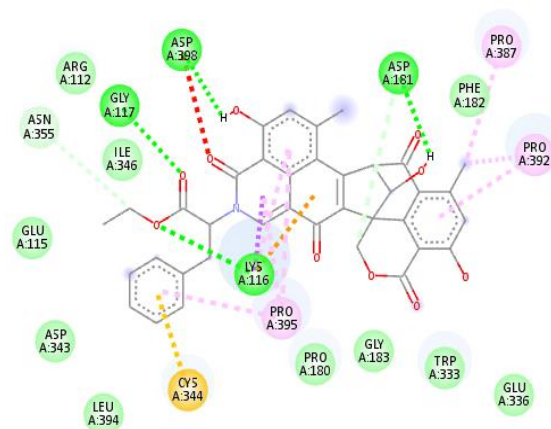


Figura 21 (Continuación). Modelo estructural predicho por AutoDock 4.0 para la interacción de los productos **16-26** (A-K, respectivamente) con un modelo generado por homología para la enzima *hPTP1B*₁₋₄₀₀.

Con base en los resultados obtenidos de las predicciones de acoplamiento molecular, se realizó la síntesis parcial de los productos **16-26** empleando la amina correspondiente y las condiciones indicadas en el **esquema 1**. En el caso de los productos **16**, **21** y **24**, la reacción se llevó a cabo en dimetilsulfóxido (DMSO) a temperatura ambiente por 24 h, mientras que los productos **17-20**, **22**, **23** y **25** se prepararon empleando las mismas condiciones de reacción más trietilamina (TEA). Las condiciones de reacción para la obtención de **26** fueron similares a las descritas previamente, con excepción de la temperatura (60 °C) y el transcurso de reacción (96 h).

El mecanismo de reacción propuesto para la obtención de los productos involucra una sustitución nucleofílica de la amina correspondiente al carbonilo en C-3 del residuo de isocumarina, para generar el aminoisocromenol **1a**. Posteriormente, la inestabilidad del intermediario formado (**1a**) da origen a la oxopropanbenzamida **1b** y subsecuentemente a **1c**, después de un ataque intramolecular de la amida al aldehído. Finalmente, la eliminación de agua a partir de **1c** da origen a los derivados **16**, **21** y **24** (**Figura 22A**).⁴² Los productos **17-20**, **22**, **23** y **25** se obtienen tras la formación de sus intermediarios correspondientes y la posterior eliminación de MeOH a través de una reacción de tipo E1cB (reacción de eliminación, **Figura 22B**).^{46, 47}

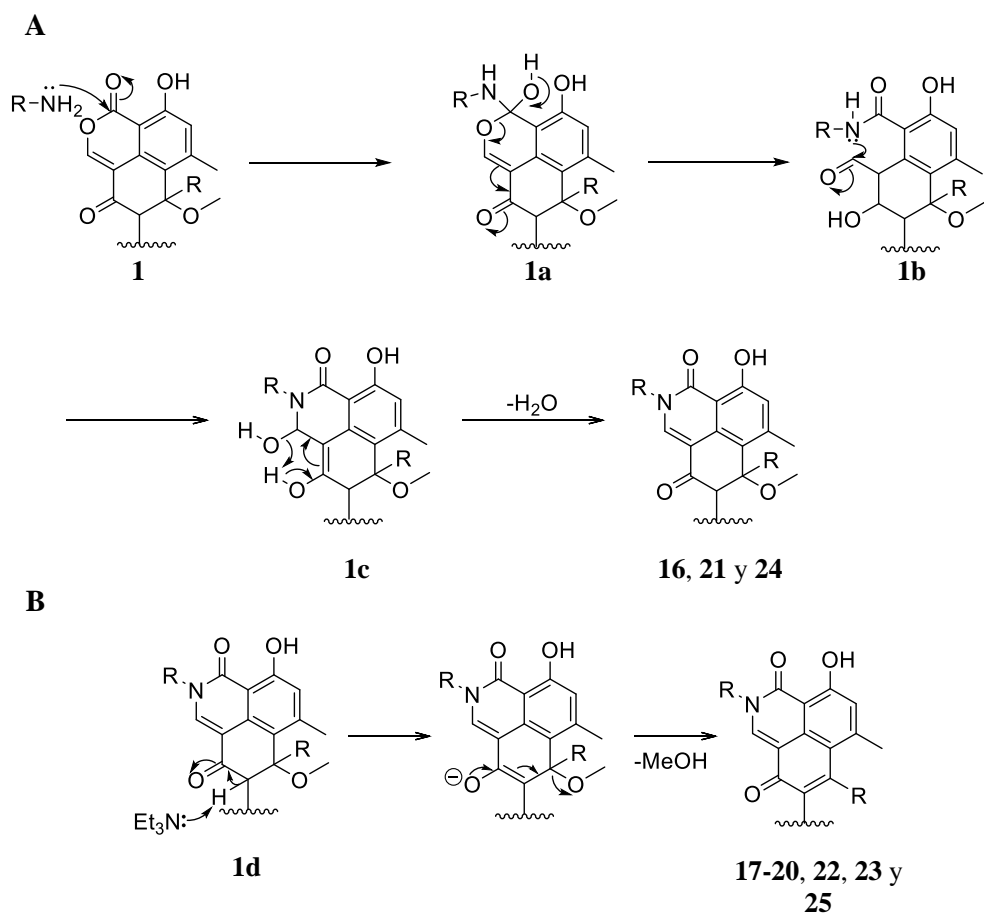


Figura 22. A). Mecanismo de reacción propuesto para la formación de los derivados **16**, **21** y **24**. B) Mecanismo de reacción propuesto para la formación de los derivados **17-20**, **22**, **23** y **25** a partir del precursor correspondiente.

Una vez obtenidos los productos de reacción, se purificaron empleado CLAE-semipreparativo. Todos los productos se caracterizaron por RMN de una (^1H y ^{13}C) y dos dimensiones (HSQC y HMBC) y espectrometría de masas de alta resolución (EM-AR).

A continuación, se describe la elucidación estructural de los productos de semisíntesis. Para su mejor comprensión, el conjunto de moléculas se dividió en tres subconjuntos, el primero integra los derivados **16**, **21** y **24**, el segundo los productos **17-20**, **22**, **23** y **25** y el tercero al producto **26**.

Los compuestos **16**, **21** y **24** se aislaron como sólidos amarillos-naranjas. Su fórmula molecular se determinó por EM-AR-DART con base en la relación masa/carga (m/z) obtenida para el pseudo ion molecular $[\text{M} + \text{H}]^+$. Algunas características físicas y espectrométricas para estos productos se describen en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Características físicas y datos espectrométricos para los productos **16**, **21** y **24**.

Comp.	Apariencia	m/z $[M + H]^+$ exp.	m/z $[M + H]^+$ calc.	Fórmula	Δ	Ω
16	Polvo naranja	700.0850	700.0813	C ₃₅ H ₂₆ BrNO ₁₀	-5.2	23
21	Polvo amarillo	656.1310	656.1324	C ₃₅ H ₂₆ ClNO ₁₀	-2.1	23
24	Polvo amarillo	636.1883	636.1870	C ₃₆ H ₂₉ NO ₁₀	-2.0	23

Los espectros de RMN-¹H de **16**, **21** y **24** guardan una relación estructural estrecha con duclauxina (**1**),^{48, 49} destacando como diferencias apreciables las señales que corresponden a los protones aromáticos de la anilina correspondiente (**Tablas 2 y 3, Figura 23**). En referencia al esqueleto base, en sus espectros de ¹H se observan dos señales para hidrógenos aromáticos (H-5 y H-5' en δ_H ~6.9 y ~6.6 ppm, respectivamente), una señal para un protón vinílico alrededor de 7.6 ppm (H-1), un par de señales dobles en δ_H ~4.8 y ~5.1 ppm con valores de J de ~12 Hz, asignables a los hidrógenos de H-1', dos señales simples para metinos en δ_H ~4.0 y ~4.2 asignables a los hidrógenos H-8 y H-8', una señal simple de oximetino en δ_H ~5.2 ppm, cuatro señales para grupos metilo, dos de ellas para metilos unidos a anillos aromáticos (H-10 y H-10'), un metilo de acetato (δ_H ~2.2 ppm) y un metoxilo (δ_H ~3.0 ppm). En el espectro de ¹³C, además de las señales asignables a las aminas sustituyentes, la diferencia principal se observa en el carbono C-1 que se desplaza a campo alto por la sustitución del átomo de oxígeno por uno de nitrógeno.

Las diferencias apreciables de **16** con respecto a **1** observadas en los espectros de resonancia de ¹H y ¹³C corresponden a los protones aromáticos de la *p*-bromoanilina, por ejemplo, los hidrógenos H-2''/H-6'' y H-3''/H-5'' que por simetría del sistema aromático se despliegan como dos señales dd en δ_H 7.13 ($J = 8.5, 4.6$ Hz) y 7.68 ($J = 8.5, 4.6$ Hz) respectivamente (**Tabla 2, Figura 23**). En el caso del espectro de ¹³C las diferencias principales se observan en los carbonos de la posición C-3 que aparecen en δ_C 148.8 en **1** y 134.7 en **16**; esta diferencia se atribuye al remplazo de la función lactona por una lactama. Los carbonos del anillo de *p*-bromoanilina acoplada a la molécula base (**1**) se observan en δ_C 123.9 (C-4''), 137.3 (C-1''), mientras que los carbonos C-2''/C-6'' y C-3''/C-5'' tienen desplazamientos en δ_C 128.2 y 133.2 ppm, respectivamente (**Tabla 3**).

Para el producto **21** las señales de RMN-¹H que se destacan con respecto a **1** son las de los protones del anillo aromático, por ejemplo, las señales correspondientes a H-4'' y H-5'' se observan como una señal compleja que integra para dos protones en δ_H 7.48 ppm, H-2'' se

despliega como una señal dd en δ_H 7.29 ppm por el acoplamiento con los hidrógenos aromáticos en posiciones *meta* y *para* ($J = 2.4$ y 0.9 Hz), finalmente, la señal para H-6'' se observa en δ_H 7.14 ppm (**Tabla 2** y **Figura 23**). En los espectros de RMN- ^{13}C destacan los carbonos (C-1''-C-6'') de la *m*-cloroanilina en $\delta_C = 135.5, 127.2, 135.0, 130.9, 130.1$ y 124.8 ppm, respectivamente (**Tabla 3**).

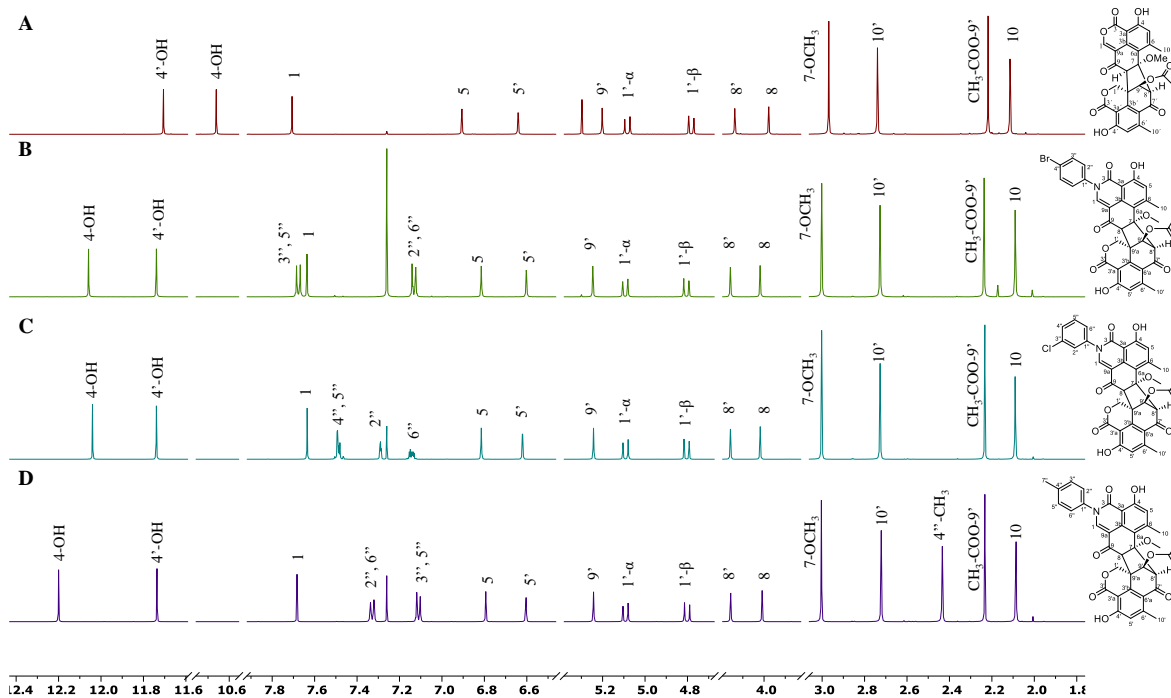


Figura 23. Espectros de RMN- 1H colectados en $CDCl_3$ a 500 MHz para los productos A) **1**, B) **16**, C) **21** y D) **24**.

Para **24**, además de las señales del núcleo base, en el espectro de RMN- 1H se destacan tres señales que corresponden a los protones de la toluidina, dos dobles (d) con valores de J de 8.3 Hz (acoplamiento *orto*) que corresponden a los átomos H-2''/H-6'' y H-3''/H-5'' en δ_H 7.33 y 7.11 y una señal simple correspondiente al metilo en C-4'' en δ_H 2.43 ppm (**Tabla 2**). En el espectro de ^{13}C se ven las señales de los átomos C-1''-C-6'' en $\delta_C = 135.9, 130.5, 126.2, 140.0, 126.2$ y 130.5 ppm, respectivamente y la resonancia de 4''-CH $_3$ en 21.3 ppm (**Tabla 3**).

Tabla 2. Datos espectroscópicos de RMN-¹H para los productos **16**, **21** y **24**, registrados en CDCl₃ a 500 MHz.

Posición	δ_H , mult. (J en Hz)			
	1	16	21	24
1	7.71, s	7.64, s	7.64, s	7.68, s
5	6.91, s	6.81, s	6.81, s	6.79, s
8	3.98, s	4.02, s	4.02, s	4.01, s
10	2.74, s	2.73, s	2.73, s	2.72, s
1' α	5.08, d (12.2)	5.09, d (12.2)	5.09, d (12.2)	5.09, d (12.2)
1' β	4.78, d (12.2)	4.81, d (12.2)	4.80, d (12.2)	4.80, d (12.2)
5'	6.64, d (0.7)	6.60, s	6.62, d (1.0)	6.60, s
8'	4.14, s	4.16, s	4.16, s	4.16, s
9'	5.20, s	5.25, s	5.24, brs	5.24, s
10'	2.11, s	2.09, s	2.09, s	2.09, s
4-OH	10.66, s	12.06, s	12.04, s	12.20, s
4'-OH	11.71, s	11.74, s	11.74, s	11.74, s
7-OCH ₃	2.97, s	3.00, s	3.00, s	3.00, s
CH ₃ COO-9'	2.22, s	2.24, s	2.23, s	2.23, s
2''	-	7.13, dd (8.5, 4.6)	7.29, dd (2.4, 0.9)	7.33, d (8.3)
3''	-	7.68, dd (8.5, 4.6)	-	7.11, d (8.3)
4''	-	-	7.49, m	-
5''	-	7.68, dd (8.5, 4.6)	7.48, brt (7.9)	7.11, d (8.3)
6''	-	7.13, dd (8.5, 4.6)	7.14, m	7.33, d (8.3)
4''-CH ₃	-	-	-	2.43, s

Tabla 3. Datos espectroscópicos de RMN-¹³C para los productos **16**, **21** y **24**, registrados en CDCl₃ a 125 MHz.

Posición	δ_C			
	1	16	21	24
1	148.8	134.7	134.7	135.8
3	164.0	165.0	164.9	165.3
3a	101.5	107.2	107.2	107.3
3b	133.0	135.0	139.2	134.9
4	161.9	162.0	162.0	162.0
5	120.9	119.2	119.2	118.8
6	152.1	149.8	149.8	149.4
6a	118.4	117.2	117.2	116.9
7	88.9	88.8	88.8	88.8
8	64.2	64.2	64.2	64.2
9	193.8	194.2	194.2	194.3
9a	113.4	112.4	112.4	112.0
10	22.6	22.0	22.0	22.0
1'	71.5	71.5	71.5	71.5
3'	167.4	167.6	167.6	167.6
3'a	104.9	105.2	105.2	105.1
3'b	143.0	143.0	143.0	143.0
4'	164.9	164.4	164.4	164.4
5'	121.5	120.7	120.8	120.7
6'	152.1	152.3	152.3	152.2
6'a	121.1	121.9	121.9	121.9
7'	191.0	191.1	191.1	191.1
8'	67.5	68.0	68.0	68.1
9'	79.0	78.6	78.6	78.7
9'a	51.2	51.7	51.7	51.7
10'	22.3	22.6	22.5	22.5
7-OCH ₃	51.9	51.8	51.8	51.8
CH ₃ COO-9'	21.1	21.1	21.1	21.1

Tabla 3 (Continuación). Datos espectroscópicos de RMN-¹³C para los productos **16**, **21** y **24**, registrados en CDCl₃ a 125 MHz.

Posición	δ_c			
	1	16	21	24
CH ₃ COO-9'	169.7	169.7	169.7	169.7
1''	-	137.3	135.5	135.9
2''	-	128.2	127.2	130.5
3''	-	133.2	135.0	126.2
4''	-	123.9	130.9	140.0
5''	-	133.2	130.1	126.2
6''	-	128.2	124.8	130.5
4''-CH ₃	-	-	-	21.3

A diferencia de los productos **16**, **21** y **24**, que guardan una estrecha relación con **1**, los compuestos **17-20**, **22**, **23** y **25** presentan diferencias notables en su estructura, por ejemplo, la pérdida de MeOH a través de una eliminación de tipo E1cB y la concomitante formación de un enlace doble entre los carbonos C-7 y C-8 que extiende la conjugación del sistema isocumarina-dihidroisocumarina. Estos cambios estructurales imponen un mayor grado de rigidez en las moléculas, mismo que se ve reflejado en la alteración de sus propiedades tanto físicas como químicas.^{8, 42}

La fórmula molecular para este subconjunto de moléculas se determinó por EM-AR-DART con base a la relación masa/carga obtenida para el pseudo ion molecular [M + H]⁺. Algunas características físicas y espectrométricas para estos productos se enlistan en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Características físicas y datos espectrométricos para los productos **17-20**, **22**, **23** y **25**.

Comp.	Apariencia	m/z [M + H] ⁺ exp.	m/z [M + H] ⁺ calc.	Fórmula	Δ	Ω
17	Polvo naranja	668.0588	668.0556	C ₃₄ H ₂₂ BrNO ₉	4.7	24
18	Polvo naranja	635.1317	635.1302	C ₃₄ H ₂₂ N ₂ O ₁₁	2.4	25
19	Polvo naranja	651.1238	651.1251	C ₃₄ H ₂₂ N ₂ O ₁₂	-2.0	25
20	Polvo naranja	716.0450	716.0418	C ₃₄ H ₂₂ INO ₉	3.3	24
22	Polvo naranja	620.1537	620.1557	C ₃₅ H ₂₅ NO ₁₀	-3.1	24
23	Polvo naranja	590.1451	590.1451	C ₃₄ H ₂₃ NO ₉	0.1	24
25	Polvo naranja	608.1341	608.1357	C ₃₄ H ₂₂ FNO ₉	-2.6	24

Los espectros de RMN-¹H para los compuestos **17**, **22**, **23** y **25** despliegan las señales características para los hidrógenos de H-1, H-1', H-5, H-5', H-8', H-9', H-10, H-10', 4-OH y 4'-OH. Las diferencias principales se observan en las resonancias correspondientes a la anilina sustituyente, por ejemplo, para **17** y **22** se despliegan un conjunto de dos señales típicas de anillos aromáticos disustituídos en posición *para*, con valores de *J* entre 7.2-9.0

Hz, indicativo de hidrógenos adyacentes (*orto*). Adicionalmente, en el espectro de **22** se aprecia una señal simple que integra para tres hidrógenos, correspondiente con el grupo -OCH₃ de la anisidina en δ_H 3.87 ppm (**Figura 24, Tabla 5**). En el caso del producto **23**, se observan las señales correspondientes al residuo de anilina, entre ellas una señal doble de dobles ($J = 8.9, 4.6$) que integra para dos hidrógenos en δ_H 7.37 y que corresponde a los hidrógenos H-2'' y H-6'', además de una señal múltiple centrada en δ_H 7.55 que integra para tres, asignable a los hidrógenos H-3''-H-5'' (**Figura 24, Tabla 5**). Para el compuesto **25** las señales observadas en los espectros de RMN de ¹H y ¹³C son muy características para anillos aromáticos fluorados.⁵³ Por ejemplo, la resonancia para el hidrógeno de la posición H-6'' se presenta como una señal ddd con constantes de acoplamiento (J) de 9.4, 8.3 y 4.0 Hz, mientras que las resonancias para los hidrógenos H-3''-H-5'' se despliegan en el rango de 7.30-7.37 ppm como señales dobles de dobles o triples traslapadas, con valores de J que van de 4.7-9.0 Hz. En el espectro de ¹³C se observan cinco señales dobles (δ_C 125.5, 157.1, 117.3, 125.5 y 132.3 ppm) y una señal simple en δ_C 128.4 ppm.⁵⁰⁻⁵³ Este comportamiento en las señales de ¹³C en un experimento de RMN ¹H-desacoplado confirmó la incorporación de *o*-F-anilina en el producto **25**.

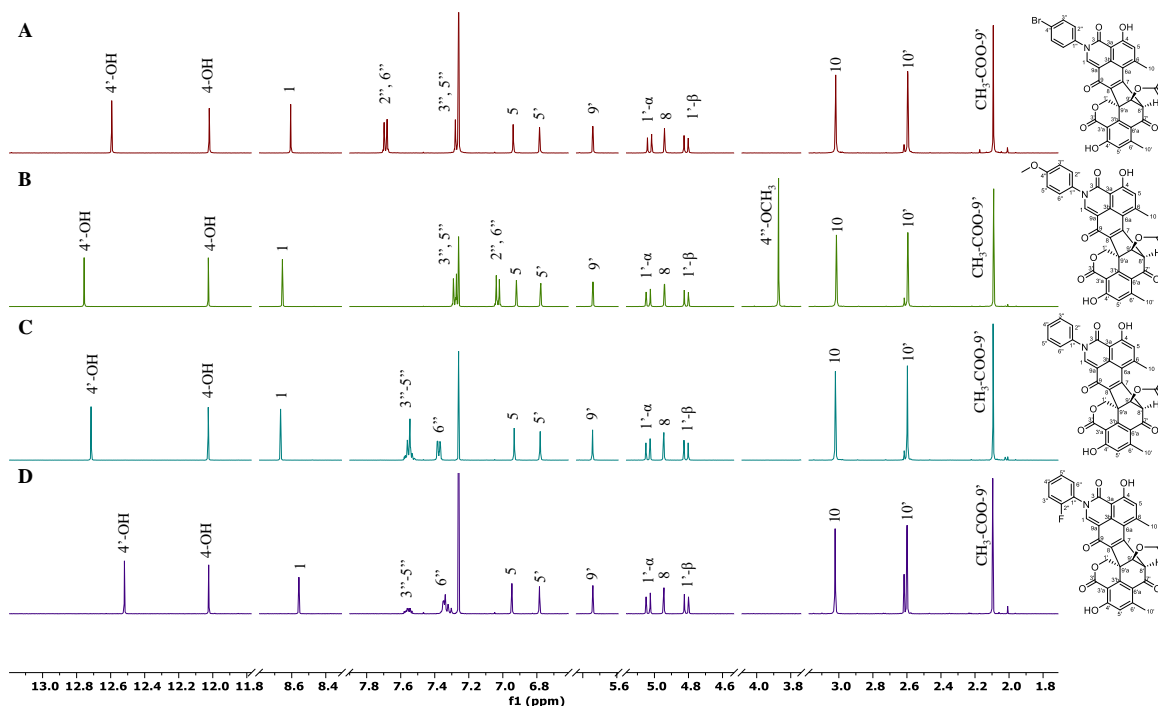


Figura 24. Espectros de RMN-¹H colectados en CDCl₃ a 500 MHz para los productos A) **17**, B) **22**, C) **23**, y D) **25**.

Los espectros de RMN (^1H y ^{13}C) para los productos **18-20** fueron especialmente diferentes al resto de los derivados obtenidos. En todos los casos para las resonancias asignables a los hidrógenos de las anilinas correspondientes los protones H-1', H-5', H-8', H-10' y 4'-OH se observan como un conjunto de dos señales en proporciones que van de 1:1 a 3:2 (**Figura 25**). Esta evidencia sugiere que el acoplamiento de anilinas sustituidas en posición *orto* con sustituyentes voluminosos ($-\text{NO}_2$ y I) impiden el libre giro del enlace σ establecido entre el anillo aromático de la anilina correspondiente y el átomo de nitrógeno de la lactama, conduciendo a una racemización de las moléculas por la imposición de una quiralidad conformacional o atropoisómerismo (**Figura 26**) en estos derivados, mismo que se refleja en cambios tanto en el ambiente químico como magnético de los átomos de hidrógeno y carbono.⁵⁴ De acuerdo con la clasificación de LaPlante (basada en los tiempos de vida media de los atropoisómeros -clase 1 ($t_{1/2} < 60$ s), clase 2 ($60 \text{ s} < t_{1/2} < 4.5$ años),⁵⁵ y clase 3 ($t_{1/2} > 4.5$ años),^{55, 56} los productos **18-20** se clasifican en la clase 2, es decir, tiempos de vida media superiores a 60 segundos y menores de 4.5 años, de acuerdo con los resultados obtenidos por CLAE (datos no mostrados). Estos resultados permiten inferir que las sustancias se obtuvieron como mezclas de los isómeros axiales *Ra* (*P*) y *Sa* (*M*).

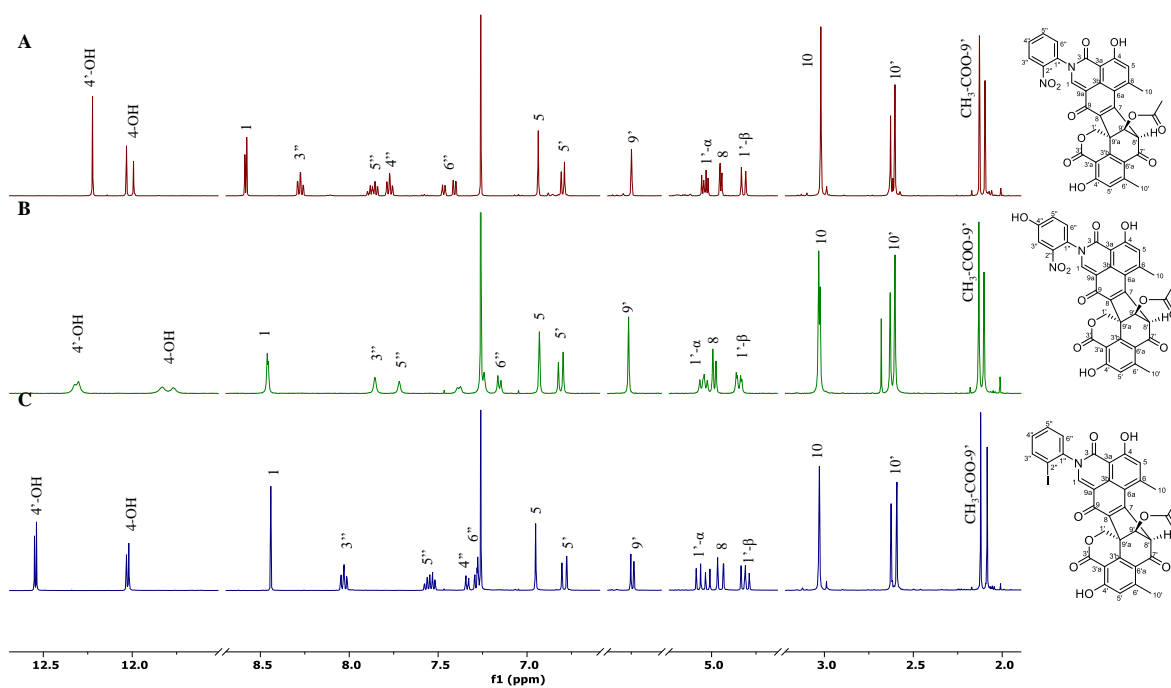


Figura 25. Espectros de RMN- ^1H colectados en CDCl_3 a 500 MHz para los productos A) **18**, B) **19** y C) **20**.

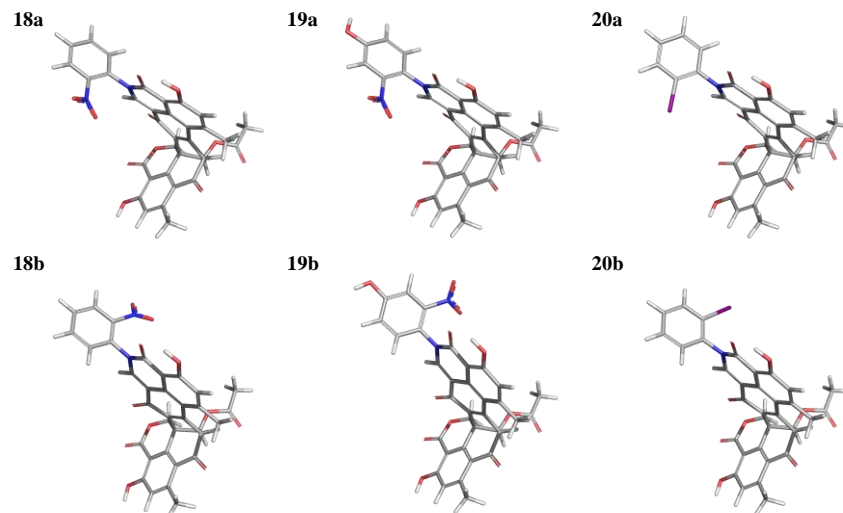


Figura 26. Modelos estructurales generados para los atropoisómeros de las moléculas **18-20**. Las estructuras se construyeron en Spartan10® y se optimizaron geoméricamente empleando el método semiempírico PM3. Todas las moléculas de la serie “a” tienen una configuración axial *Ra* (*P*), mientras que las moléculas de la serie “b” tienen la configuración opuesta *Sa* (*M*).

Tabla 5. Datos espectroscópicos de RMN-¹H para los productos **17-20**, **22**, **23** y **25**, registrados en CDCl₃ a 500 MHz.

Posición	δ_H , mult. (<i>J</i> en Hz)						
	17	18	19	20	22	23	25
1	8.61, s	8.58, s	8.46, s	8.44, s	8.65, s	8.67, s	8.56, s
5	6.94, s	6.94, d (1.0)	6.93, s	6.95, s	6.92, brs	6.93, s	6.95, s
10	3.02, s	3.02, s	3.02, s	3.03, s	3.01, s	3.02, s	3.02, s
1' α	5.03, d (12.4)	5.04, d (12.3)	5.05, d (12.3)	4.81, d (12.3)	5.04, d (12.3)	5.04, d (12.2)	5.04, d (12.3)
1' β	4.81, d (12.3)	4.82, d (12.3)	4.85, d (12.3)	5.05, d (12.3)	4.81, d (12.3)	4.82, d (12.2)	4.81, d (12.3)
5'	6.78, d (0.9)	6.80, d (0.9)	6.81, s	6.79, d (0.9)	6.92, d (0.9)	6.78, d (0.8)	6.79, d (0.9)
8'	4.94, d (1.1)	4.95, d (1.0)	4.98, d (0.5)	4.95, d (1.0)	4.94, d (1.1)	4.95, d (1.0)	4.95, d (1.1)
9'	5.74, d (1.0)	5.75, d (1.3)	5.77, s	5.74, d (1.0)	5.74, d (1.1)	5.75, d (1.0)	5.74, d (1.0)
10'	2.60, brs	2.61, s	2.62, s	2.61, d (0.8)	2.59, brs	2.60, s	2.60, brs
4-OH	12.59, s	12.00, s	11.79, s	12.03, s	12.76, s	12.72, s	12.52, s
4'-OH	12.02, s	12.22, s	12.32, s	12.54, s	12.03, s	12.03, s	12.02, s
CH ₃ COO-9'	2.09, s	2.11, s	2.11, s	2.10, s	2.09, s	2.09, s	2.10, s
2''	7.69, d (7.2)	-	-	-	7.03, d (9.0)	7.37, dd (8.9, 4.6)	-
3''	7.28, d (7.2)	8.27, dd (7.5, 1.5)	7.79, s	8.03, dd (8.2, 1.3)	7.28, d (9.0)	7.55, m	7.30-7.36, m
4''	-	7.77, td (7.7, 1.4)	-	7.34, t (7.9, 1.5)	-	7.55, m	7.30-7.36, m
5''	7.28, d (7.2)	7.87, td (7.8, 1.5)	7.31, d (8.6)	7.55, td (7.7, 1.4)	7.28, d (9.0)	7.55, m	7.30-7.36, m
6''	7.69, d (7.2)	7.44, dd (7.8, 1.4)	7.20, d (8.6)	7.28, dd (7.7, 1.7)	7.03, d (9.0)	7.37, dd (8.9, 4.6)	7.56, ddd (9.4, 8.3, 4.0)
4''-OCH ₃	-	-	-	-	3.87, s	-	-

Tabla 6. Datos espectroscópicos de RMN-¹³C para los productos **17-20**, **22**, **23** y **25**, registrados en CDCl₃ a 125 MHz.

Posición	δ_c						
	17	18	19	20	22	23	25
1	142.3	141.4	143.0	142.8	143.3	143.0	143.0
3	164.9	164.9	165.4	164.9	165.5	165.2	164.7
3a	108.9	108.6	108.5	109.1	108.9	108.9	108.9
3b	135.5	135.5	135.6	135.8	135.6	135.8	135.7
4	165.0	164.5	165.0	165.2	165.3	165.3	165.1
5	119.4	119.5	119.6	119.3	119.1	119.4	119.4
6	149.8	150.1	150.4	149.8	149.6	149.6	149.7
6a	115.1	115.6	115.2	115.0	114.7	114.9	115.0
7	152.6	152.8	153.7	152.6	152.3	152.5	152.6
8	139.1	139.2	138.8	139.2	139.1	139.1	139.2
9	177.8	177.8	178.1	177.8	177.9	177.9	177.8
9a	114.9	115.1	115.0	115.0	114.8	114.8	115.1
10	25.5	25.6	25.6	25.6	25.5	25.5	25.5
1'	68.5	68.5	68.6	68.5	68.5	68.5	68.5
3'	167.6	167.7	168.0	167.7	167.7	167.7	167.7
3'a	104.3	104.3	104.1	104.3	104.3	104.3	104.3
3'b	146.1	146.0	146.1	146.1	146.1	146.1	146.1
4'	165.2	164.8	164.9	164.8	164.9	164.9	164.9
5'	121.2	121.2	121.4	121.2	121.1	121.1	121.2
6'	153.9	154.0	154.2	153.9	153.8	153.8	153.9
6'a	116.8	117.0	117.0	116.9	116.9	116.9	116.9
7'	189.6	189.6	189.4	189.7	189.7	189.7	189.6
8'	63.5	63.6	63.7	63.5	63.5	63.5	63.6
9'	84.6	84.7	84.5	84.7	84.7	84.6	84.7
9'a	48.3	48.3	48.4	48.3	48.3	48.3	48.3
10'	24.0	24.0	24.1	24.1	24.0	24.0	24.0
CH ₃ COO-9'	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0
CH ₃ COO-9'	170.2	170.2	170.3	170.2	170.2	170.2	170.2
1''	137.4	131.5	130.3	141.3	131.1	138.5	125.5, d (4.6)
2''	133.2	145.4	145.7	96.6	115.1	126.4	157.1, d (256.3)
3''	128.0	126.2	113.6	140.6	127.5	129.9	117.3, d (18.8)
4''	124.2	132.0	159.1	128.3	160.5	130.0	125.5, d (4.5)
5''	128.0	135.5	121.9	130.1	127.5	129.9	128.4, s
6''	133.2	129.4	130.4	131.9	115.1	126.4	132.3, d (8.2)
4''-OCH ₃	-	-	-	-	55.8	-	-

El compuesto **26** se aisló como un sólido de color amarillo. Su fórmula molecular se determinó como C₃₄H₂₉NO₁₀ con base en el ion pseudomolecular [M + H]⁺ observado en una relación $m/z = 648.1867$ ($\Delta = -0.5$, calcd. para 648.1870), permitiendo 24 insaturaciones. Los datos de RMN-¹H para esta molécula fueron muy similares a los del producto reportado por Aguilar-Ramírez para la azafenalenona obtenida del acoplamiento del éster metílico de fenilalanina con duclauxina (**8**).⁸ Las diferencias principales observadas en el espectro fueron la desaparición de una señal simple que integra para tres protones en δ_H 2.22, así como el desplazamiento a campo alto de H-9' de 5.71 ppm en **8** a 4.71 ppm en **26** a consecuencia de la pérdida de un residuo de etanoilo. Esta evidencia, en conjunto con la ausencia de una señal asignable a un carbonilo y a un metilo de acetato en el espectro de ¹³C, acompañada de una

diferencia de 45 unidades de masa en el espectro de masas confirmaron la estructura de **26** como el derivado desacetilado de **8** (Tabla 7).⁸

Tabla 7. Datos espectroscópicos de RMN para los productos **26** y **8**, registrados en CDCl₃ a 500 MHz para ¹H y 125 MHz para ¹³C.

Posición	δ_C	δ_H , mult. (J en Hz)	
		26	8
1	140.8	8.57, s	8.57, s
3	165.1	-	-
3a	108.3	-	-
3b	135.1	-	-
4	164.9	-	-
5	118.9	6.83, s	6.89, s
6	149.4	-	-
6a	115.0	-	-
7	152.3	-	-
8	138.6	-	-
9	178.0	-	-
9a	114.7	-	-
10	25.4	2.99, s	2.96
4-OH		12.53, s	12.55, s
1'	69.6	5.13, d (12.5)	5.03, d (12.0)
3'		4.94, d (12.5)	4.80, d (12.0)
3'a	168.1	-	-
3'b	104.4	-	-
4'	147.0	-	-
5'	164.9	-	-
6'	120.8	6.76, d (0.9)	6.79, s
6'a	153.6	-	-
7'	117.1	-	-
8'	190.7	-	-
9'	66.9	4.83, d (1.0)	4.89, d (1.1)
9'a	85.4	4.71, brs	5.71, d (1.1)
10'	49.8	-	-
4'-OH	24.0	2.58, s	2.59, s
CH ₃ COO-9'		12.05, s	12.04, s
1''	-	-	2.22, s
2''	168.5	-	-
3''	60.0	5.84, dd (10.8, 5.3)	5.84, dd (10.9, 5.6)
4''	36.5	3.70, dd (14.7, 5.4)	3.75, dd (14.5, 5.6)
5''		3.32, dd (14.7, 10.9)	3.33, dd (14.5, 10.9)
6''	134.7	-	-
7''	128.8	7.16, m	7.18, m
8''	129.1	7.17, m	7.18, m
9''	127.6	7.17, m	7.18, m
1'''a		4.20, qd (7.1, 3.7)	4.20, q (7.2)
1'''b	62.9	4.22, qd (7.1, 3.7)	4.22, q (7.2)
2'''	14.2	1.23, t (7.1)	1.23, t (7.1)

Una vez sintetizados los productos de interés y con el antecedente establecido por Aguilar-Ramírez que demostró que las duclauxamidas acopladas con anilinas sustituidas mejoran notablemente su actividad inhibitoria sobre la enzima *h*PTP1B₁₋₄₀₀, respecto a duclauxamidas acopladas con aminoácidos,⁸ se evaluó su actividad inhibitoria utilizando un modelo *in vitro*

establecido y validado en el grupo de trabajo. Todos los productos obtenidos inhibieron la actividad de la proteína de manera dependiente de la concentración, con valores de CI_{50} en el rango de 9 a 78 μM (**Figura 27** y **Tabla 8**).

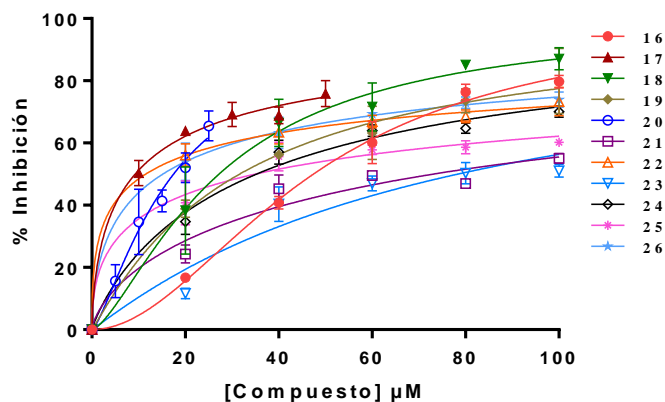


Figura 27. Curvas de inhibición concentración respuesta para los compuestos **16-26** frente a la enzima *hPTP1B*₁₋₄₀₀.

Tabla 8. Valores de CI_{50} calculados para los productos de semisíntesis obtenidos en este trabajo.

Compuesto	CI_{50} (μM)	Compuesto	CI_{50} (μM)
1	12.7 ± 0.5^a	19	31.6 ± 2.3
12	7.5 ± 0.5^a	20	17.5 ± 0.9
13	2.7 ± 0.2^a	21	73.1 ± 5.5
14	12.2 ± 0.9^a	22	11.5 ± 2.3
15	8.0 ± 0.2^a	23	78.4 ± 5.8
16	47.4 ± 1.0	24	35.3 ± 1.9
17	9.3 ± 1.0	25	35.0 ± 3.7
18	27.2 ± 2.1	26	15.2 ± 2.0

^aValor obtenido del trabajo reportado por Aguilar Ramírez.

En este orden de ideas, en este trabajo se exploró con mayor detalle el impacto de variar la sustitución del anillo aromático de la anilina sobre la actividad de la enzima. Para comenzar, se generó el híbrido de duclauxina (**1**) con una anilina no sustituida, con el fin de disponer de una molécula de referencia (**23**, $CI_{50} = 78.4 \mu\text{M}$). Posteriormente, se generaron derivados sustituidos en posición *orto* (**18**, **20** y **25**), observándose que a medida que aumenta el volumen del sustituyente, mejora la actividad inhibitoria de la molécula (**Figura 28**). De igual manera, se obtuvieron derivados sustituidos en posición *para* de la anilina (**16** y **22**), que al comparar con la bioactividad previamente reportada para **12** (**Figura 28**), se manifiesta el mismo patrón: de manera general, la actividad inhibitoria de híbridos de duclauxina (**1**) y anilinas sustituidas mejora con sustituyentes voluminosos.

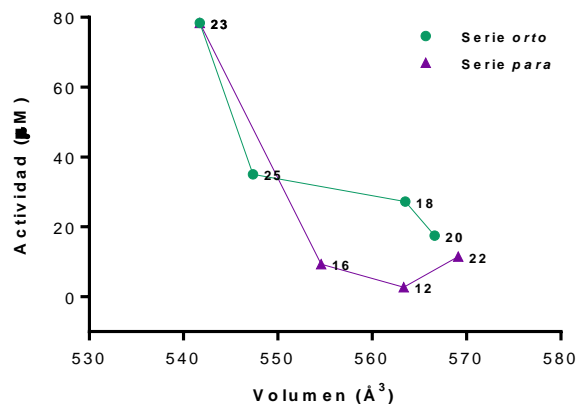


Figura 28. Variación de la actividad de derivados de duclauxina (1) acoplados con anilinas sustituidas en posición *orto* (verde) y anilinas sustituidas en posición *para* (morado), en función del volumen de la molécula (calculado a partir de un modelo CPK -que toma en cuenta los radios atómicos de van der Waals).

A partir de estas observaciones, se desprende que los derivados sustituidos en la posición *para* de la anilina son los que se comportan como inhibidores más potentes. Esta tendencia se vuelve más clara al comparar la actividad inhibitoria de isómeros de duclauxamidas que contienen una anilina sustituida con un grupo nitro en diferentes posiciones (*orto*, *meta* y *para*, en las moléculas **18**, **15** y **13**, respectivamente), véase **Figura 29**. Adicionalmente, con relación a la bioactividad determinada para los productos **18** y **19**, no se advierte alguna diferencia significativa, sugiriéndose entonces que el hidroxilo en H-4'' no tiene una participación importante en la interacción del producto con su blanco, posiblemente a causa de su menor volumen respecto al grupo nitro.

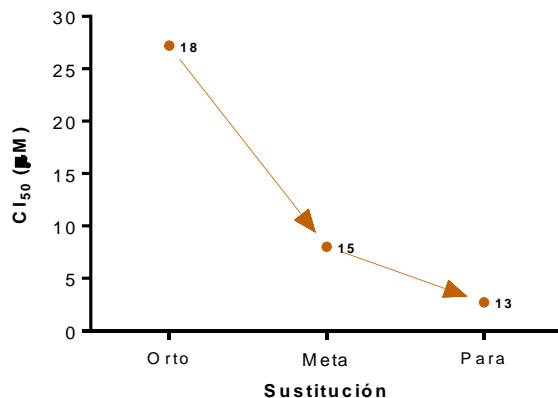


Figura 29. Variación de actividad de derivados de duclauxina (**13**, **15** y **18**) acoplados con nitroanilinas sustituidas en posición *orto*, *meta* y *para*.

Todos los productos mencionados pertenecen a una serie de moléculas de las que se eliminó un metoxilo (de C-7) y simultáneamente se formó un doble enlace entre C-7 y C-8; ya que previamente se había demostrado que esta clase de moléculas reúnen las características estructurales con las que se incrementa considerablemente la interacción con el blanco molecular PTP1B. En aras de confirmar que esta tendencia se aplica a otra clase de sustituyentes, se generaron un par de derivados *para* sustituidos con bromo en la anilina; un derivado incluye un metoxilo en C-7 y el otro en su lugar, contiene un doble enlace que aumenta la rigidez de la molécula. El resultado fue el esperado: el derivado más rígido (**17**) posee una actividad inhibitoria considerablemente más elevada respecto a su análogo metoxilado en C-7 (**16**) (**Figura 30**). Una tendencia equivalente se observa para las moléculas **21** y **24**, que son metoxiladas en C-7 (menos rígidas), y no se destacan como inhibidores frente a sus análogos.

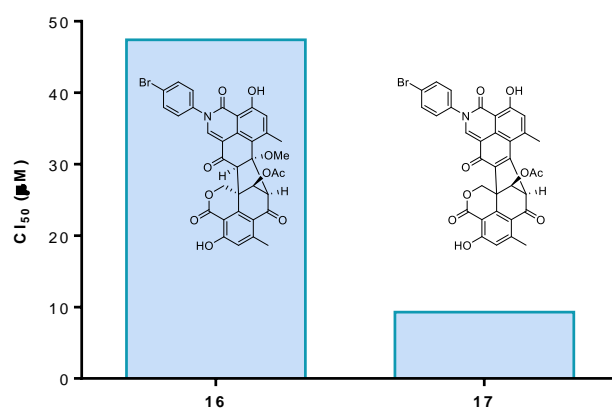


Figura 30. Comparación de actividad inhibitoria de un par de derivados de duclauxina acoplados con *p*-bromoanilina, Uno contiene un metoxilo en C-7 (**16**) y el otro un doble enlace entre los carbonos C-7 y C-8 (**17**) que impone una mayor rigidez en la molécula.

7. Conclusiones

- El desarrollo de este trabajo puso de manifiesto la importancia del estudio de la reactividad química de productos naturales como duclauxina (**1**), conducentes al incremento del espacio químico de moléculas con arquitecturas químicas complejas difícilmente accesibles vía síntesis total. Además, esta investigación mostró la pertinencia de emplear una combinación de estrategias teórico experimentales, como acoplamiento molecular (*docking*) y síntesis parcial encaminadas a la optimización de las propiedades biodinámicas de un conjunto de azafenalenonas diméricas.
- La aplicación de esta metodología dirigió la obtención de 11 azafenalenonas (**16-26**) activas frente al blanco molecular estudiado. Finalmente, los resultados de este trabajo permitieron la identificación de algunas características estructurales que impactan significativamente en la actividad inhibitoria sobre *h*PTP1B₁₋₄₀₀, como la posición (*orto*, *meta*, *para*) y el volumen del sustituyente, así como la rigidez del sistema, y corroboraron algunos de los patrones previamente reconocidos.

8. Perspectivas

- Elaborar derivados semisintéticos de duclauxina (**1**) aprovechando el conocimiento adquirido de las características biodinámicas exhibidas en función de los volúmenes de los sustituyentes y su posición en un anillo aromático; para así optimizar el diseño racional de inhibidores de *h*PTP1B₁₋₄₀₀ más potentes.

9. Bibliografía

1. Atlas I. D., *IDF Diabetes Atlas*. 10th ed.; International Diabetes Federation: 2021.
2. DeFronzo R. A., Ferrannini, E., Groop, L., Henry, R. R., Herman, W. H., Holst, J. J., Hu, F. B., Kahn, C. R., Raz, I., Shulman, G. I., Simonson, D. C., Testa, M. A., Weiss, R., Type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers* **2015**, *1* (1), 15019.
3. Liu R., Mathieu, C., Berthelet, J., Zhang, W., Dupret, J. M., Rodrigues Lima, F., Human Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B): From Structure to Clinical Inhibitor Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences* **2022**, *23* (13).
4. Guo Z., The modification of natural products for medical use. *Acta Pharmacologica Sinica* **2017**, *7* (2), 119-136.
5. Chassagne F., Cabanac, G., Hubert, G., David, B., Marti, G., The landscape of natural product diversity and their pharmacological relevance from a focus on the Dictionary of Natural Products®. *Phytochemistry Reviews* **2019**, *18* (3), 601-622.
6. Jiménez-Arreola B. S., Aguilar-Ramírez, E., Cano-Sánchez, P., Morales-Jiménez, J., González-Andrade, M., Medina-Franco, J. L., Rivera-Chávez, J., Dimeric phenalenones from *Talaromyces* sp. (IQ-313) inhibit hPTP1B(1-400): Insights into mechanistic kinetics from in vitro and in silico studies. *Bioorganic Chemistry* **2020**, *101*, 103893.
7. Shahid H., Cai, T., Wang, Y., Zheng, C., Yang, Y., Mao, Z., Ding, P., Shan, T., Duclauxin Derivatives From Fungi and Their Biological Activities. *Front Microbiol* **2021**, *12*, 766440.
8. Aguilar-Ramírez E. Aislamiento y síntesis parcial de análogos de duclauxina: evidencias teórico-experimentales de su interacción con la proteína tirosina fosfatasa 1B (*hPTP1B*₁₋₄₀₀). Experimental, Universidad Nacional Autónoma de México 2021.
9. Cheng H.-C., Qi, R. Z., Paudel, H., Zhu, H.-J., Regulation and Function of Protein Kinases and Phosphatases. *Enzyme Research* **2011**, *2011*, 794089.
10. Ruddraraju K. V., Zhang, Z.-Y., Covalent inhibition of protein tyrosine phosphatases. *Molecular BioSystems* **2017**, *13* (7), 1257-1279.
11. Sharma B., Xie, L., Yang, F., Wang, W., Zhou, Q., Xiang, M., Zhou, S., Lv, W., Jia, Y., Pokhrel, L., Shen, J., Xiao, Q., Gao, L., Deng, W., Recent advance on PTP1B inhibitors and their biomedical applications. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2020**, *199*, 112376.
12. Choy M. S., Li, Y., Machado, L. E. S. F., Kunze, M. B. A., Connors, C. R., Wei, X., Lindorff-Larsen, K., Page, R., Peti, W., Conformational Rigidity and Protein Dynamics at Distinct Timescales Regulate PTP1B Activity and Allostery. *Molecular Cell* **2017**, *65* (4), 644-658.e5.
13. Fauman E. B., Saper, M. A., Structure and function of the protein tyrosine phosphatases. *Trends in Biochemical Science* **1996**, *21* (11), 413-7.
14. Feldhammer M., Uetani, N., Miranda-Saavedra, D., Tremblay, M. L., PTP1B: A simple enzyme for a complex world. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **2013**, *48* (5), 430-445.

15. Zhang S., Zhang, Z. Y., PTP1B as a drug target: recent developments in PTP1B inhibitor discovery. *Drug Discov Today* **2007**, *12* (9-10), 373-81.
16. Martínez-Aldino I. Y., Villaseca-Murillo, M., Morales-Jiménez, J., Rivera-Chávez, J., Absolute configuration and protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory activity of xanthoepocin, a dimeric naphthopyrone from *Penicillium* sp. IQ-429. *Bioorganic Chemistry* **2021**, *115*, 105166.
17. Baskaran S. K., Goswami, N., Selvaraj, S., Muthusamy, V. S., Lakshmi, B. S., Molecular Dynamics Approach to Probe the Allosteric Inhibition of PTP1B by Chlorogenic and Cichoric Acid. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2012**, *52* (8), 2004-2012.
18. Wiesmann C., Barr, K. J., Kung, J., Zhu, J., Erlanson, D. A., Shen, W., Fahr, B. J., Zhong, M., Taylor, L., Randal, M., McDowell, R. S., Hansen, S. K., Allosteric inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B. *Nature Structure and Molecular Biology* **2004**, *11* (8), 730-7.
19. Sarmiento M., Zhao, Y., Gordon, S. J., Zhang, Z.-Y., Molecular Basis for Substrate Specificity of Protein-tyrosine Phosphatase 1B. *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273* (41), 26368-26374.
20. Zhang Z. Y., Lee, S. Y., PTP1B inhibitors as potential therapeutics in the treatment of type 2 diabetes and obesity. *Expert Opin Investig Drugs* **2003**, *12* (2), 223-33.
21. Tamrakar A. K., Maurya, C. K., Rai, A. K., PTP1B inhibitors for type 2 diabetes treatment: a patent review (2011 – 2014). *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **2014**, *24* (10), 1101-1115.
22. Proença C., Ribeiro, D., Freitas, M., Carvalho, F., Fernandes, E., A comprehensive review on the antidiabetic activity of flavonoids targeting PTP1B and DPP-4: a structure-activity relationship analysis. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2022**, *62* (15), 4095-4151.
23. Rivera-Chávez J., Coporo-Blancas, D., Morales-Jiménez, J., One-step partial synthesis of (\pm)-asperteretone B and related hPTP1B1–400 inhibitors from butyrolactone I. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2020**, *28* (24), 115817.
24. Sun J. P., Fedorov, A. A., Lee, S. Y., Guo, X. L., Shen, K., Lawrence, D. S., Almo, S. C., Zhang, Z. Y., Crystal structure of PTP1B complexed with a potent and selective bidentate inhibitor. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278* (14), 12406-14.
25. Krishnan N., Koveal, D., Miller, D. H., Xue, B., Akshinthala, S. D., Kragelj, J., Jensen, M. R., Gauss, C.-M., Page, R., Blackledge, M., Muthuswamy, S. K., Peti, W., Tonks, N. K., Targeting the disordered C terminus of PTP1B with an allosteric inhibitor. *Nature Chemical Biology* **2014**, *10* (7), 558-566.
26. Hjortness M. K., Riccardi, L., Hongdusit, A., Ruppe, S., Zhao, M., Kim, E. Y., Zwart, P. H., Sankaran, B., Arthanari, H., Sousa, M. C., De Vivo, M., Fox, J. M., Abietane-Type Diterpenoids Inhibit Protein Tyrosine Phosphatases by Stabilizing an Inactive Enzyme Conformation. *Biochemistry* **2018**, *57* (40), 5886-5896.
27. Singh S., Singh Grewal, A., Grover, R., Sharma, N., Chopra, B., Kumar Dhingra, A., Arora, S., Redhu, S., Lather, V., Recent updates on development of protein-tyrosine phosphatase 1B inhibitors for treatment of diabetes, obesity and related disorders. *Bioorganic Chemistry* **2022**, *121*, 105626.

28. Abdel-Magid A. F., The Inhibitors of Protein Tyrosine Phosphatase Nonreceptor Type 2 (PTPN2) as Potential Enhancers of Cancer Immunotherapy and Type 1 (PTPN1) as Treatment of Metabolic Diseases. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2022**, *13* (1), 19-21.
29. Krishnan N., Konidaris, K. F., Gasser, G., Tonks, N. K., A potent, selective, and orally bioavailable inhibitor of the protein-tyrosine phosphatase PTP1B improves insulin and leptin signaling in animal models. *Journal of Biological Chemistry* **2018**, *293* (5), 1517-1525.
30. Dethoup T., Manoch, L., Kijjoa, A., Nascimento, M. S., Puaparoj, P., Silva, A. M., Eaton, G., Herz, W., Bacillisporins D and E, new oxyphenalenone dimers from *Talaromyces bacillisporus*. *Planta Medica* **2006**, *72* (10), 957-60.
31. Cao P., Yang, J., Miao, C. P., Yan, Y., Ma, Y. T., Li, X. N., Zhao, L. X., Huang, S. X., New duclauxamide from *Penicillium manginii* YIM PH30375 and structure revision of the duclauxin family. *Org Lett* **2015**, *17* (5), 1146-9.
32. Dramae A., Intaraudom, C., Bunbamrung, N., Saortep, W., Srichomthong, K., Pittayakhajonwut, P., Heptacyclic oligophenalenones from the soil fungus *Talaromyces bacillisporus* BCC17645. *Tetrahedron* **2020**, *76* (9), 130980.
33. Chaiyosang B., Kanokmedhakul, K., Sanmanoch, W., Boonlue, S., Hadsadee, S., Jungsuttiwong, S., Kanokmedhakul, S., Bioactive oxaphenalenone dimers from the fungus *Talaromyces macrosporus* KKU-1NK8. *Fitoterapia* **2019**, *134*, 429-434.
34. Wu B., Ohlendorf, B., Oesker, V., Wiese, J., Malien, S., Schmaljohann, R., Imhoff, J. F., Acetylcholinesterase inhibitors from a marine fungus *Talaromyces* sp. strain LF458. *Mar Biotechnol (NY)* **2015**, *17* (1), 110-9.
35. Majhi S., Das, D., Chemical derivatization of natural products: Semisynthesis and pharmacological aspects- A decade update. *Tetrahedron* **2021**, *78*, 131801.
36. Newman D. J., Cragg, G. M., Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products* **2020**, *83* (3), 770-803.
37. Chen J., Li, W., Yao, H., Xu, J., Insights into drug discovery from natural products through structural modification. *Fitoterapia* **2015**, *103*, 231-41.
38. Benet L. Z., Hosey, C. M., Ursu, O., Oprea, T. I., BDDCS, the Rule of 5 and drugability. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2016**, *101*, 89-98.
39. Lipinski C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., Feeney, P. J., Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews* **1997**, *23* (1), 3-25.
40. Gschwend D. A., Good, A. C., Kuntz, I. D., Molecular docking towards drug discovery. *Journal of Molecular Recognition* **1996**, *9* (2), 175-86.
41. Curatolo W., Physical chemical properties of oral drug candidates in the discovery and exploratory development settings. *Pharmaceutical Science & Technology Today* **1998**, *1* (9), 387-393.

42. Chaudhary N. K., Crombie, A., Vuong, D., Lacey, E., Piggott, A. M., Karuso, P., Talauxins: Hybrid Phenalenone Dimers from *Talaromyces stipitatus*. *Journal of Natural Products* **2020**, *83* (4), 1051-1060.
43. Meng X. Y., Zhang, H. X., Mezei, M., Cui, M., Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Curr Comput Aided Drug Des* **2011**, *7* (2), 146-57.
44. Pinzi L., Rastelli, G., Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. *International Journal of Molecular Sciences* **2019**, *20* (18).
45. Guedes I. A., de Magalhães, C. S., Dardenne, L. E., Receptor-ligand molecular docking. *Biophysical Reviews* **2014**, *6* (1), 75-87.
46. Fedor L. R., Base-catalyzed β -elimination reactions in aqueous solution. II. ElcB elimination from .beta.-methoxy ketones. *Journal of the American Chemical Society* **1969**, *91* (4), 908-913.
47. O'Ferrall R. A. M., Slae, S., β -Elimination of 9-fluorenylmethanol in aqueous solution: an ElcB mechanism. *Journal of the Chemical Society B: Physical Organic* **1970**, (0), 260-268.
48. Ogihara Y., Tanaka, O., Shibata, S., On the metabolites of penicillium duclauxi delacroix -- III The reactions of duclauxin with ammonia and primary amines. The structures of desacetylduclauxin, neoclauxin, xenoclauxin and cryptoclauxin. *Tetrahedron Letters* **1966**, *7* (25), 2867-2873.
49. Cao P. J., Yang, J., Miao, C., Yan, Y., Ma, Y.-T., Li, X.-N., Zhao, L.-X., Huang, S.-X., New duclauxamide from *Penicillium manginii* YIM PH30375 and structure revision of the duclauxin family. *Organic letters* **2015**, *17* 5, 1146-9.
50. Barnes-Seeman D., Beck, J., Springer, C., Fluorinated compounds in medicinal chemistry: recent applications, synthetic advances and matched-pair analyses. *Curr Top Med Chem* **2014**, *14* (7), 855-64.
51. Harper D. B., O'Hagan, D., The fluorinated natural products. *Nat Prod Rep* **1994**, *11* (2), 123-33.
52. Rivera-Chávez J., Raja, H. A., Graf, T. N., Burdette, J. E., Pearce, C. J., Oberlies, N. H., Biosynthesis of Fluorinated Peptaibols Using a Site-Directed Building Block Incorporation Approach. *Journal of Natural Products* **2017**, *80* (6), 1883-1892.
53. Walker M. C., Chang, M. C., Natural and engineered biosynthesis of fluorinated natural products. *Chem Soc Rev* **2014**, *43* (18), 6527-36.
54. Basilaia M., Chen, M. H., Secka, J., Gustafson, J. L., Atropisomerism in the Pharmaceutically Relevant Realm. *Accounts of Chemical Research* **2022**, *55* (20), 2904-2919.
55. LaPlante S. R., Edwards, P. J., Fader, L. D., Jakalian, A., Hucke, O., Revealing Atropisomer Axial Chirality in Drug Discovery. *ChemMedChem* **2011**, *6* (3), 505-513.
56. LaPlante S. R., Fader, L. D., Fandrick, K. R., Fandrick, D. R., Hucke, O., Kemper, R., Miller, S. P. F., Edwards, P. J., Assessing Atropisomer Axial Chirality in Drug Discovery and Development. *Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, *54* (20), 7005-7022.

ANEXO 1

Espectros de RMN y Masas de Alta Resolución para los productos 16-26

Índice

Figura A1. Espectro de masas de alta resolución adquirido por análisis directo en tiempo real (EM-AR-DART) para el compuesto 16	55
Figura A2. Espectro de RMN- ¹ H para el producto 16 registrado en CDCl ₃ a 500 MHz.....	55
Figura A3. Espectro de RMN- ¹³ C para el producto 16 registrado en CDCl ₃ a 125 MHz.....	55
Figura A4. Espectro de HSQC a 500 MHz del compuesto 16	56
Figura A5. Espectro de HMBC a 500 MHz del compuesto 16	56
Figura A6. Espectro de masas de alta resolución adquirido por análisis directo en tiempo real (EM-AR-DART) para el compuesto 17	57
Figura A7. Espectro de RMN- ¹ H para el producto 17 registrado en CDCl ₃ a 500 MHz.....	57
Figura A8. Espectro de RMN- ¹³ C para el producto 17 registrado en CDCl ₃ a 125 MHz.....	57
Figura A9. Espectro de HSQC a 500 MHz del compuesto 17	58
Figura A10. Espectro de HMBC a 500 MHz del compuesto 17	58
Figura A11. Espectro de masas de alta resolución adquirido por análisis directo en tiempo real (EM-AR-DART) para el compuesto 18	59
Figura A12. Espectro de RMN- ¹ H para el producto 18 registrado en CDCl ₃ a 500 MHz.....	59
Figura A13. Espectro de RMN- ¹³ C para el producto 18 registrado en CDCl ₃ a 125 MHz.....	59
Figura A14. Espectro de HSQC a 500 MHz del compuesto 18	60
Figura A15. Espectro de HMBC a 500 MHz del compuesto 18	60
Figura A16. Espectro de masas de alta resolución adquirido por análisis directo en tiempo real (EM-AR-DART) para el compuesto 19	61
Figura A17. Espectro de RMN- ¹ H para el producto 19 registrado en CDCl ₃ a 500 MHz.....	61
Figura A18. Espectro de RMN- ¹³ C para el producto 19 registrado en CDCl ₃ a 125 MHz.....	61
Figura A19. Espectro de HSQC a 500 MHz del compuesto 19	62
Figura A20. Espectro de HMBC a 500 MHz del compuesto 19	62
Figura A21. Espectro de masas de alta resolución adquirido por análisis directo en tiempo real (EM-AR-DART) para el compuesto 20	63
Figura A22. Espectro de RMN- ¹ H para el producto 20 registrado en CDCl ₃ a 500 MHz.....	63
Figura A23. Espectro de RMN- ¹³ C para el producto 20 registrado en CDCl ₃ a 125 MHz.....	63
Figura A24. Espectro de HSQC a 500 MHz del compuesto 20	64
Figura A25. Espectro de HMBC a 500 MHz del compuesto 20	64
Figura A26. Espectro de masas de alta resolución adquirido por análisis directo en tiempo real (EM-AR-DART) para el compuesto 21	65
Figura A27. Espectro de RMN- ¹ H para el producto 21 registrado en CDCl ₃ a 500 MHz.....	65
Figura A28. Espectro de RMN- ¹³ C para el producto 21 registrado en CDCl ₃ a 125 MHz.....	65
Figura A29. Espectro de HSQC a 500 MHz del compuesto 21	66
Figura A30. Espectro de HMBC a 500 MHz del compuesto 21	66
Figura A31. Espectro de masas de alta resolución adquirido por análisis directo en tiempo real (EM-AR-DART) para el compuesto 22	67
Figura A32. Espectro de RMN- ¹ H para el producto 22 registrado en CDCl ₃ a 500 MHz.....	67
Figura A33. Espectro de RMN- ¹³ C para el producto 22 registrado en CDCl ₃ a 125 MHz.....	67
Figura A34. Espectro de HSQC a 500 MHz del compuesto 22	68
Figura A35. Espectro de HMBC a 500 MHz del compuesto 22	68

Figura A36. Espectro de masas de alta resolución adquirido por análisis directo en tiempo real (EM-AR-DART) para el compuesto 23	69
Figura A37. Espectro de RMN- ¹ H para el producto 23 registrado en CDCl ₃ a 500 MHz.....	69
Figura A38. Espectro de RMN- ¹³ C para el producto 23 registrado en CDCl ₃ a 125 MHz.....	69
Figura A39. Espectro de HSQC a 500 MHz del compuesto 23	70
Figura A40. Espectro de HMBC a 500 MHz del compuesto 23	70
Figura A41. Espectro de masas de alta resolución adquirido por análisis directo en tiempo real (EM-AR-DART) para el compuesto 24	71
Figura A42. Espectro de RMN- ¹ H para el producto 24 registrado en CDCl ₃ a 500 MHz.....	71
Figura A43. Espectro de RMN- ¹³ C para el producto 24 registrado en CDCl ₃ a 125 MHz.....	71
Figura A44. Espectro de HSQC a 500 MHz del compuesto 24	72
Figura A45. Espectro de HMBC a 500 MHz del compuesto 24	72
Figura A46. Espectro de masas de alta resolución adquirido por análisis directo en tiempo real (EM-AR-DART) para el compuesto 25	73
Figura A47. Espectro de RMN- ¹ H para el producto 25 registrado en CDCl ₃ a 500 MHz.....	73
Figura A48. Espectro de RMN- ¹³ C para el producto 25 registrado en CDCl ₃ a 125 MHz.....	73
Figura A49. Espectro de HSQC a 500 MHz del compuesto 25	74
Figura A50. Espectro de HMBC a 500 MHz del compuesto 25	74
Figura A51. Espectro de masas de alta resolución adquirido por análisis directo en tiempo real (EM-AR-DART) para el compuesto 26	75
Figura A52. Espectro de RMN- ¹ H para el producto 26 registrado en CDCl ₃ a 500 MHz.....	75
Figura A53. Espectro de RMN- ¹³ C para el producto 26 registrado en CDCl ₃ a 125 MHz.....	75
Figura A54. Espectro de HSQC a 500 MHz del compuesto 26	76
Figura A55. Espectro de HMBC a 500 MHz del compuesto 26	76

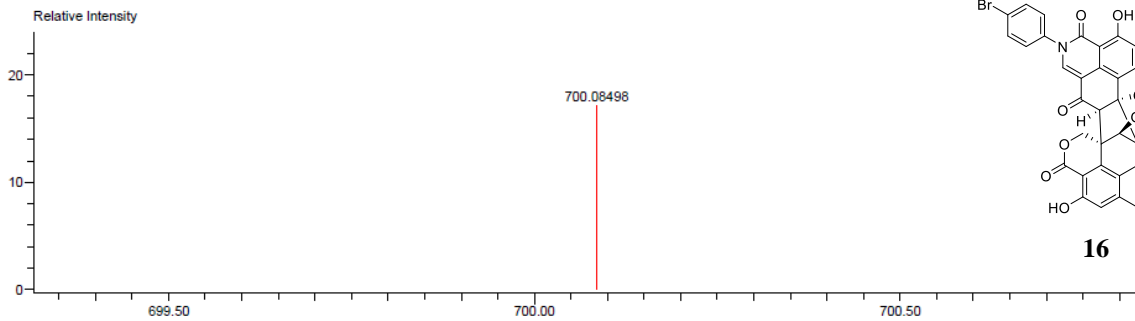


Figura A1. Espectro de masas de alta resolución adquirido por análisis directo en tiempo real (EM-AR-DART) para el compuesto **16**.

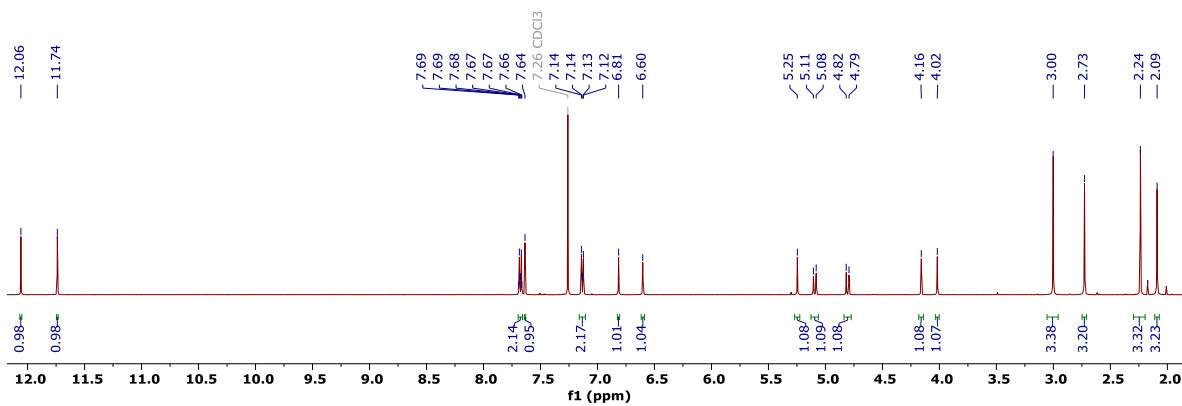


Figura A2. Espectro de RMN-¹H para el producto **16** registrado en CDCl₃ a 500 MHz.

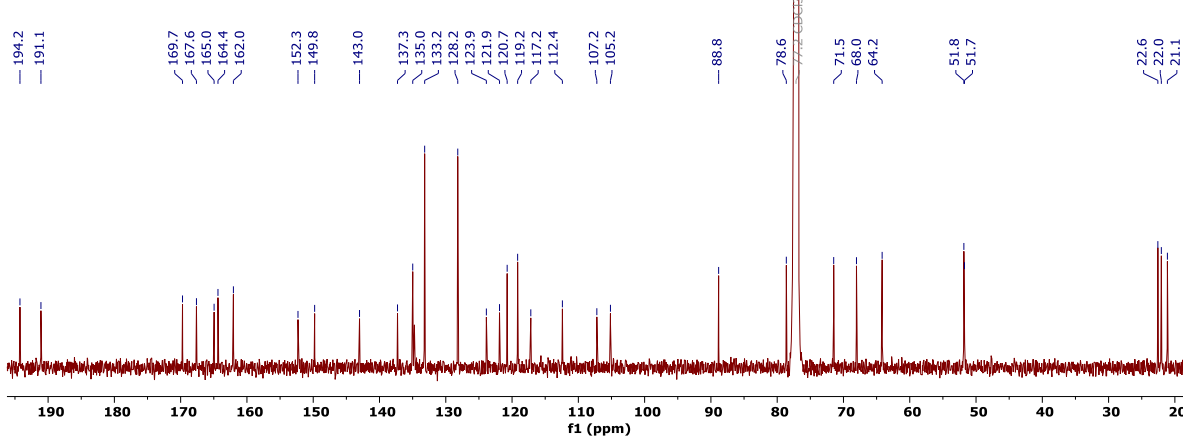


Figura A3. Espectro de RMN-¹³C para el producto **16** registrado en CDCl₃ a 125 MHz.

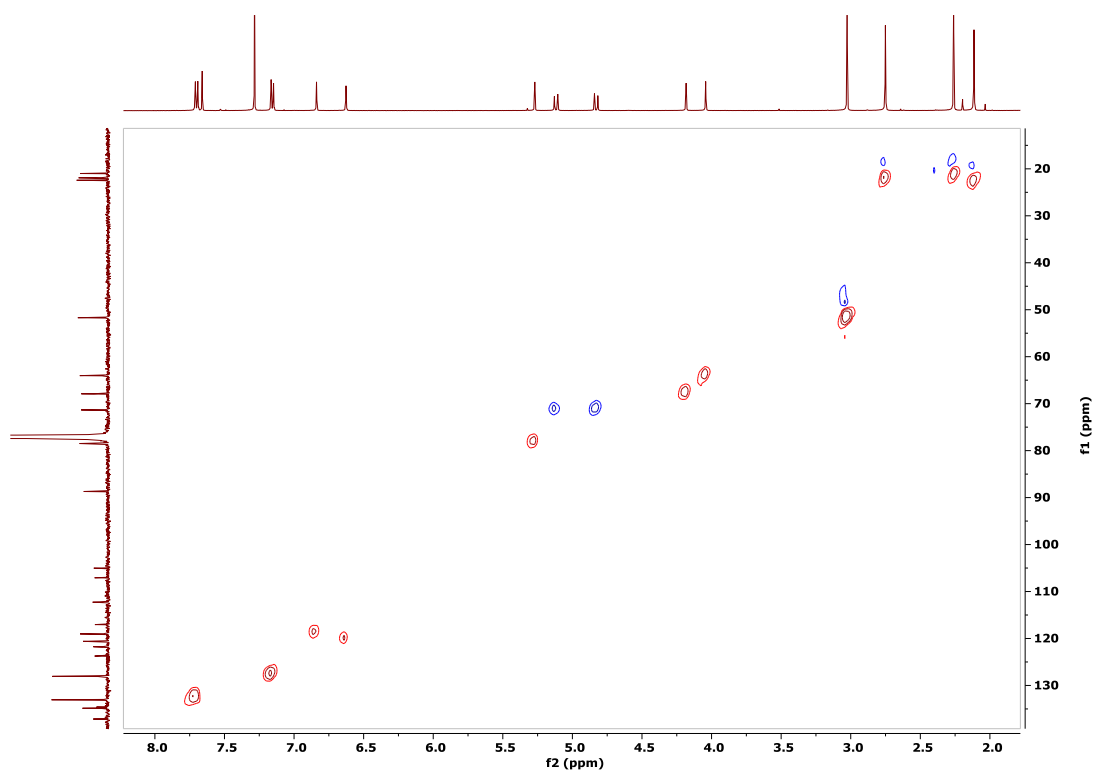


Figura A4. Espectro de HSQC a 500 MHz del compuesto **16**.

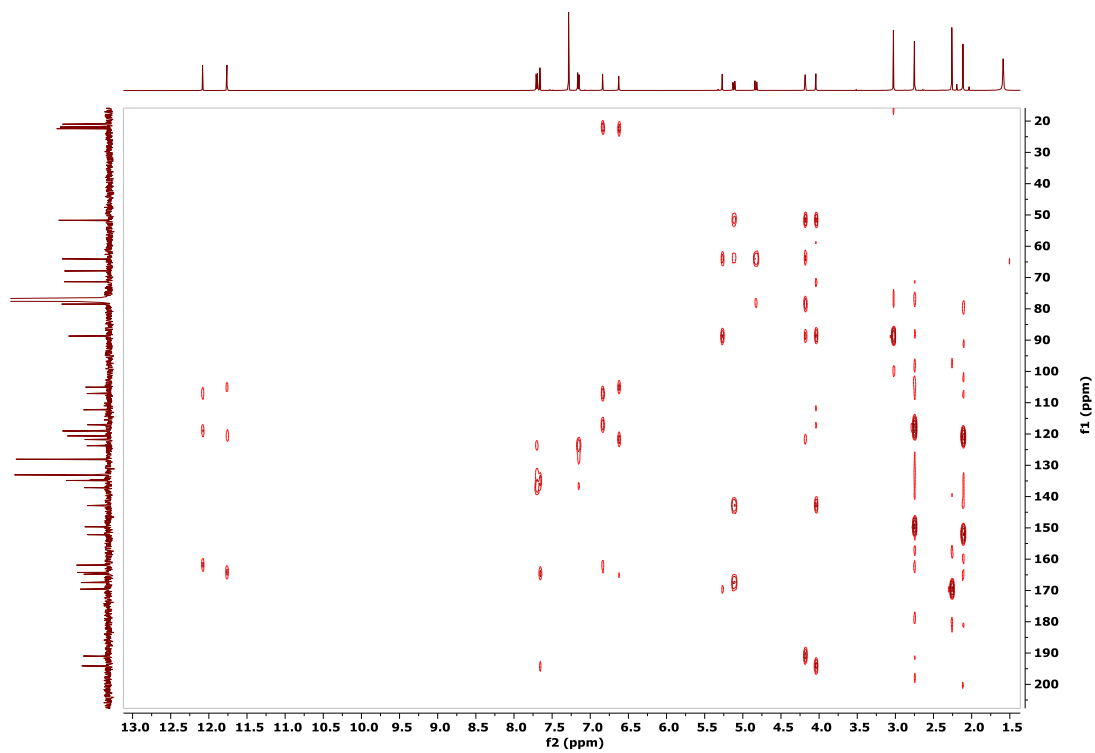


Figura A5. Espectro de HMBC a 500 MHz del compuesto **16**.

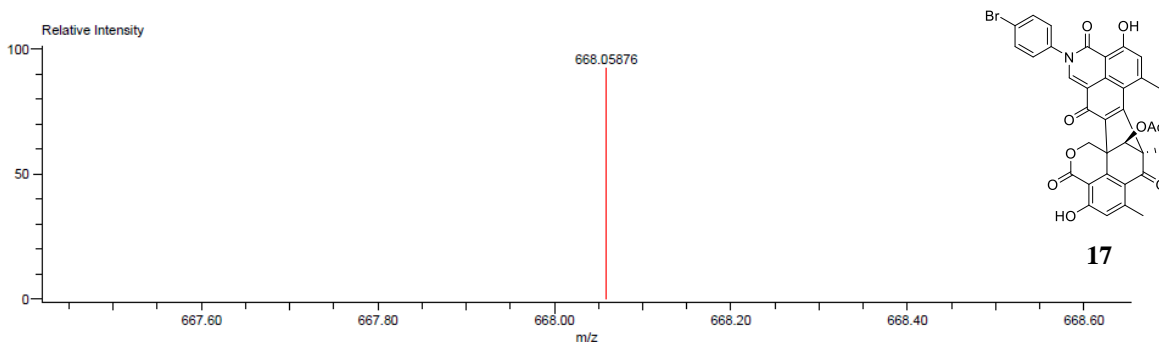


Figura A6. Espectro de masas de alta resolución adquirido por análisis directo en tiempo real (EM-AR-DART) para el compuesto **17**.

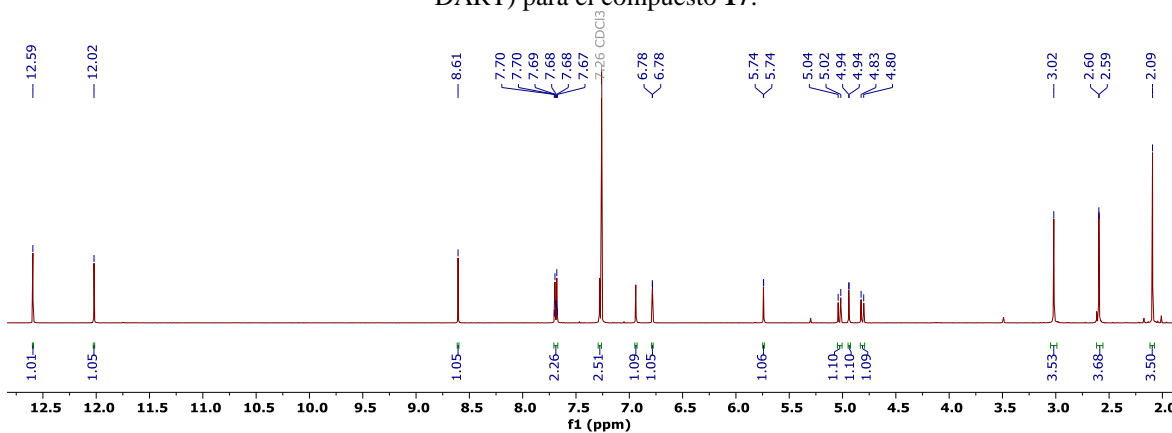


Figura A7. Espectro de RMN-¹H para el producto **17** registrado en CDCl₃ a 500 MHz.

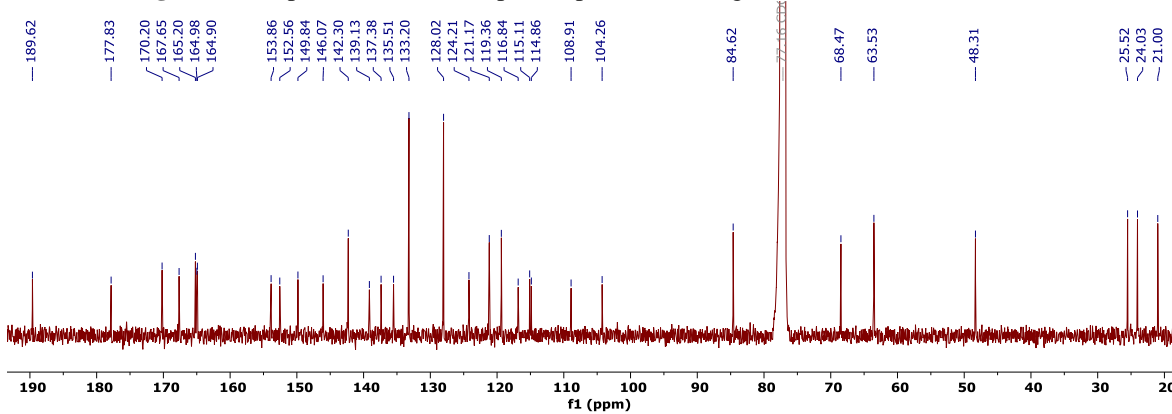


Figura A8. Espectro de RMN-¹³C para el producto **17** registrado en CDCl₃ a 125 MHz.

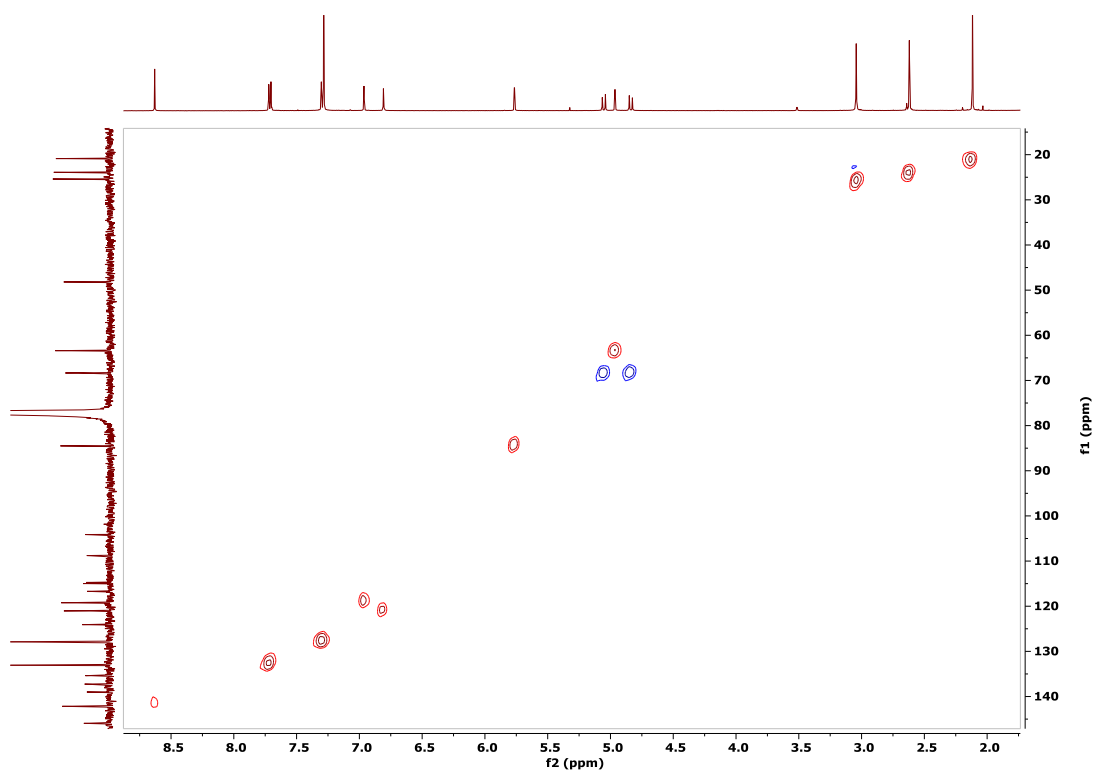


Figura A9. Espectro de HSQC a 500 MHz del compuesto 17.

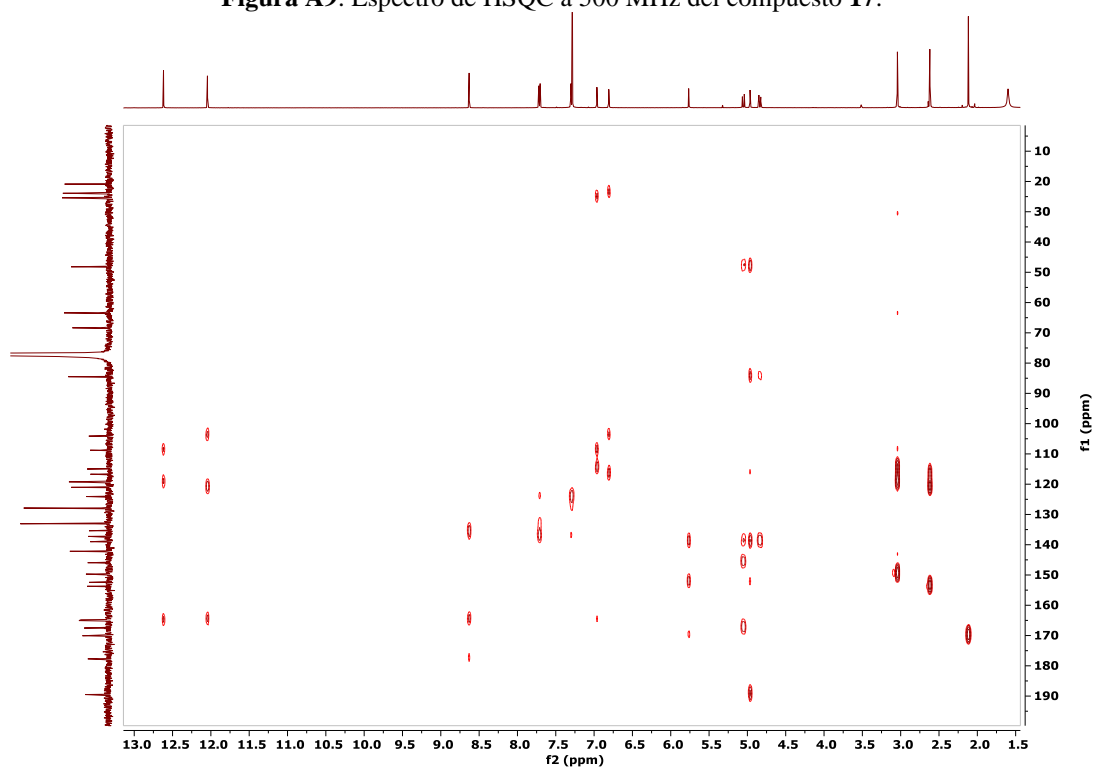


Figura A10. Espectro de HMBC a 500 MHz del compuesto 17.

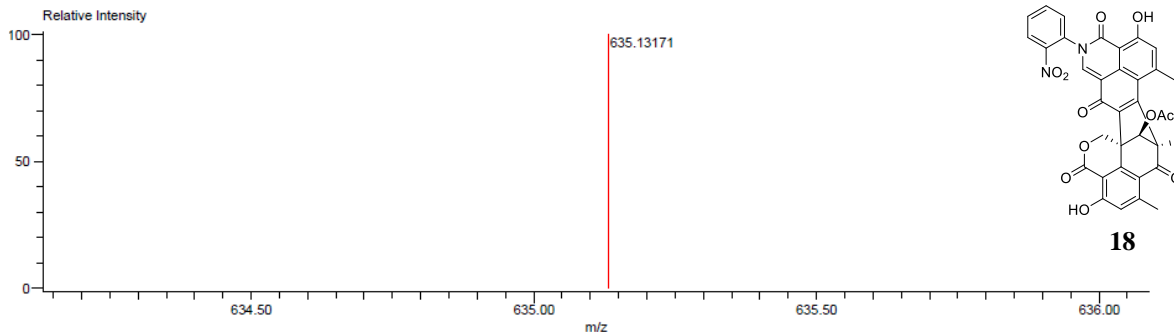


Figura A11. Espectro de masas de alta resolución adquirido por análisis directo en tiempo real (EM-AR-DART) para el compuesto **18**.

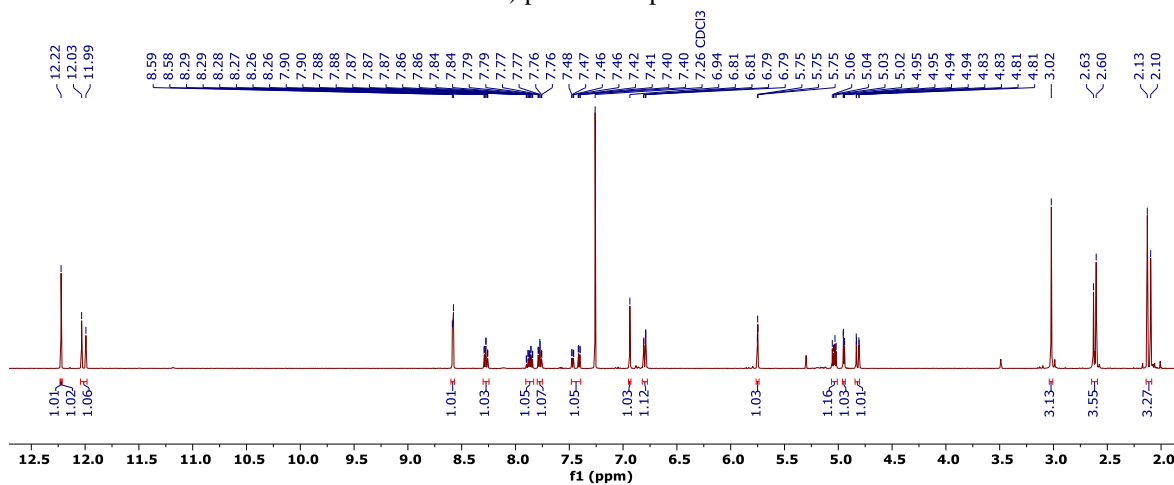


Figura A12. Espectro de RMN- ^1H para el producto **18** registrado en CDCl_3 a 500 MHz.

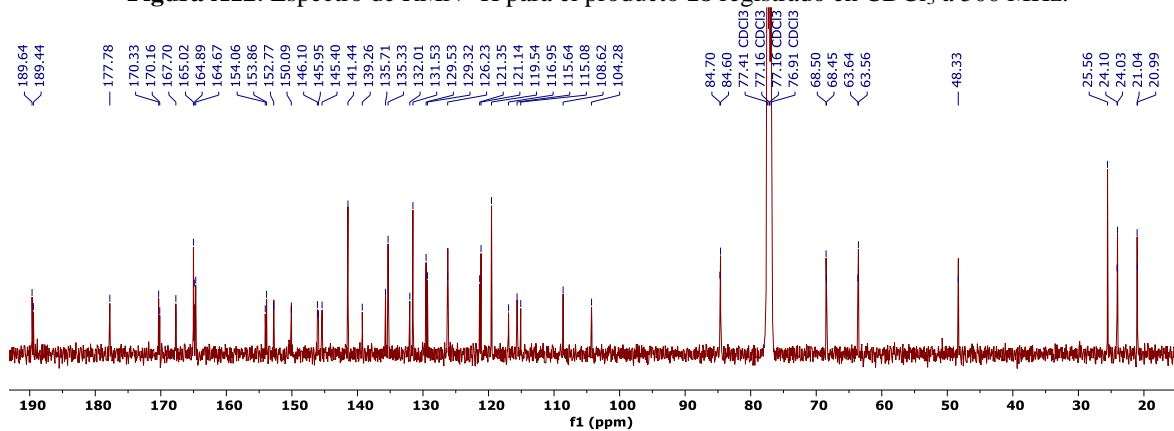


Figura A13. Espectro de RMN- ^{13}C para el producto **18** registrado en CDCl_3 a 125 MHz.

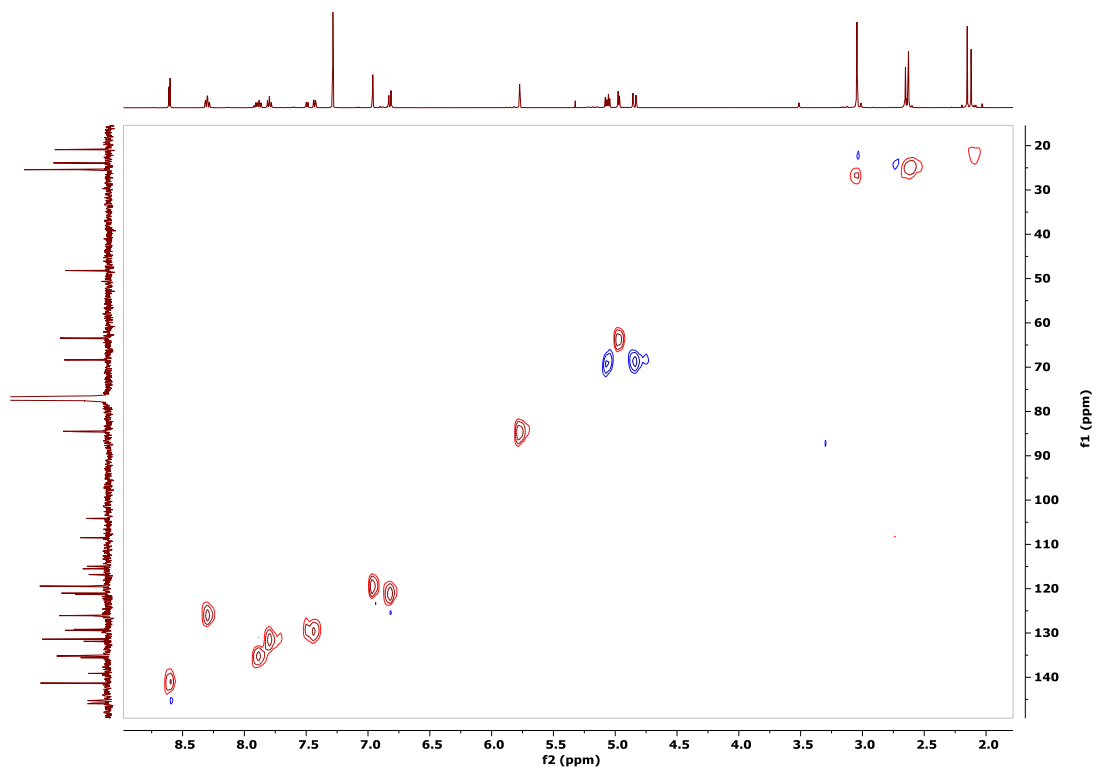


Figura A14. Espectro de HSQC a 500 MHz del compuesto 18.

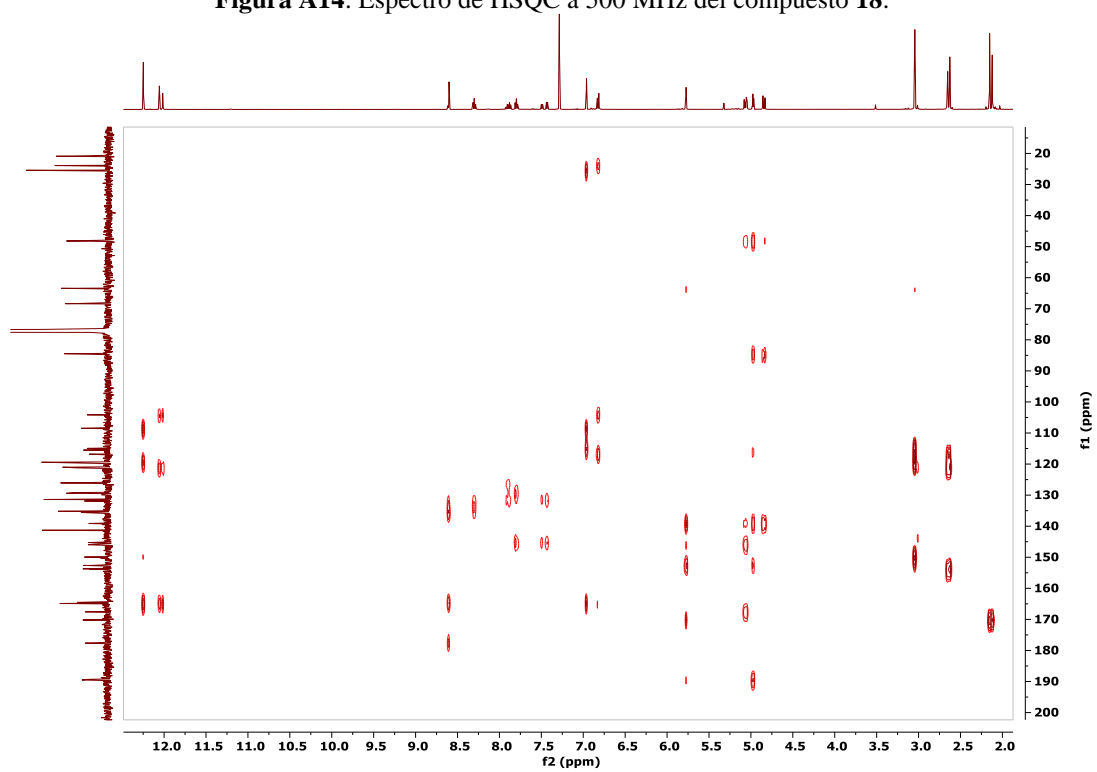


Figura A15. Espectro de HMBC a 500 MHz del compuesto 18.

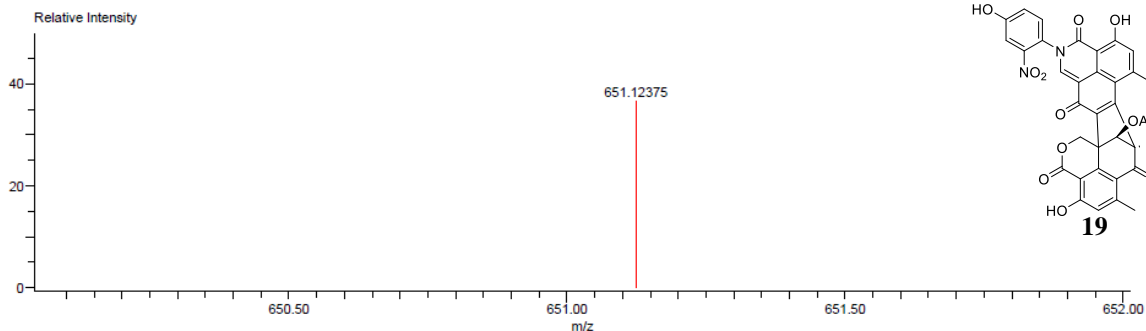


Figura A16. Espectro de masas de alta resolución adquirido por análisis directo en tiempo real (EM-AR-DART) para el compuesto **19**.

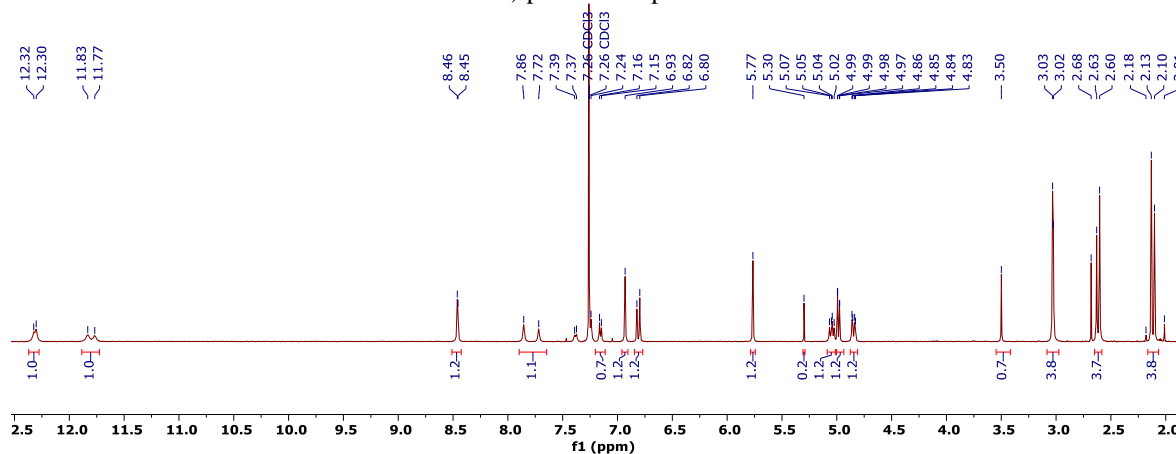


Figura A17. Espectro de RMN- ^1H para el producto **19** registrado en CDCl_3 a 500 MHz.

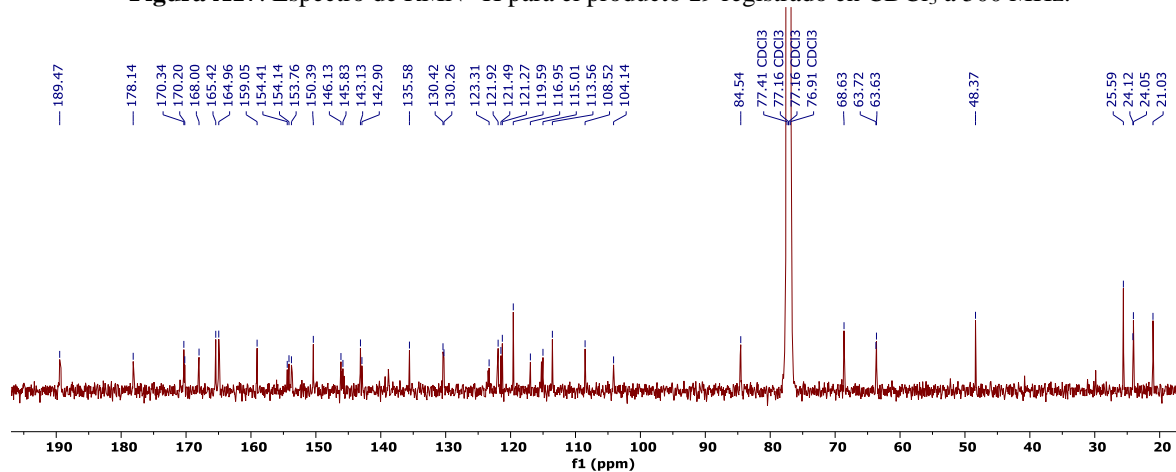


Figura A18. Espectro de RMN- ^{13}C para el producto **19** registrado en CDCl_3 a 125 MHz.

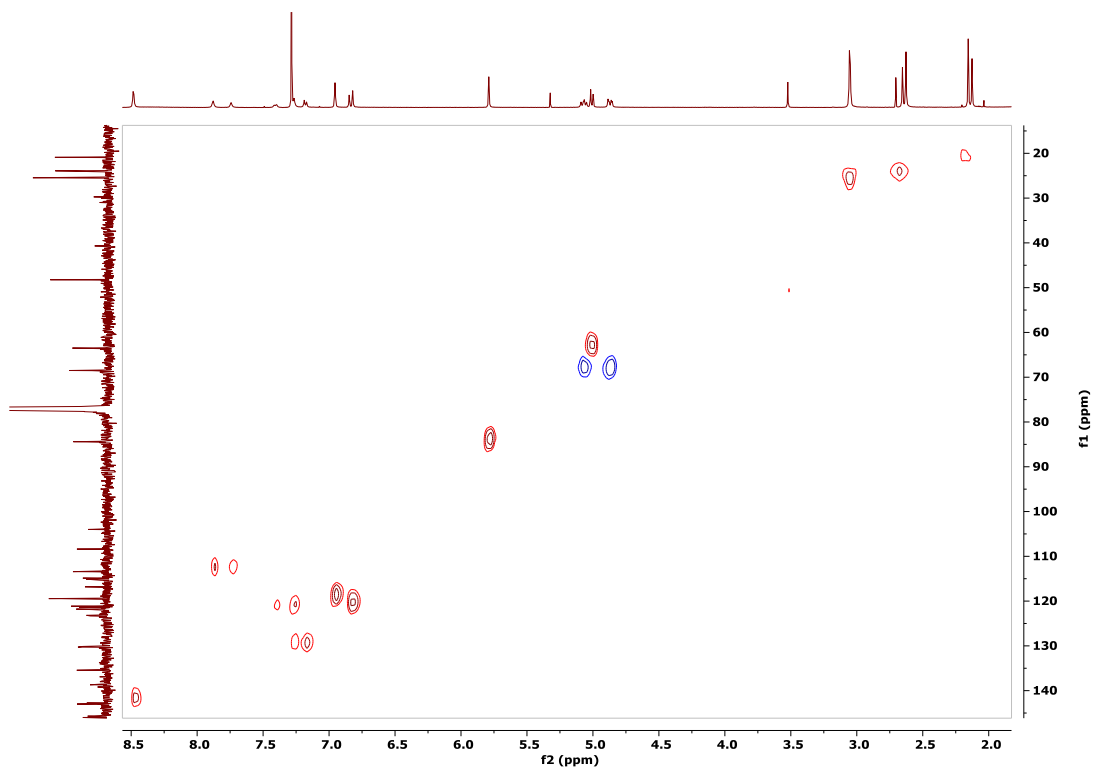


Figura A19. Espectro de HSQC a 500 MHz del compuesto 19.

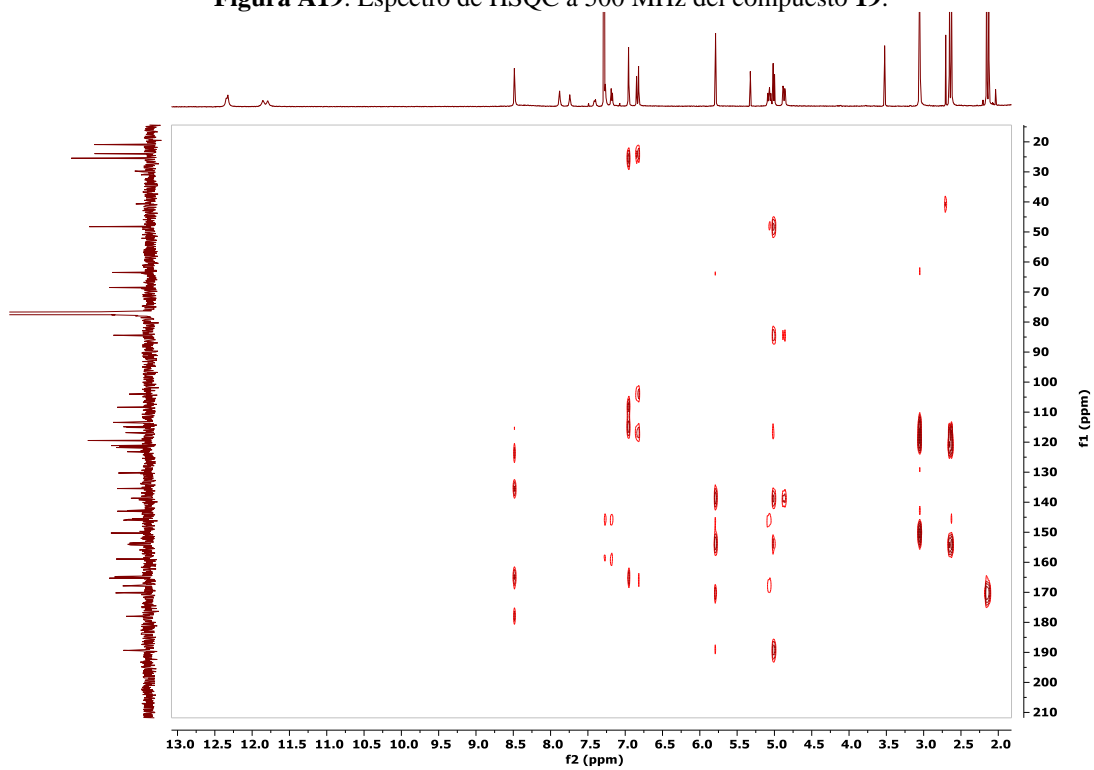


Figura A20. Espectro de HMBC a 500 MHz del compuesto 19.

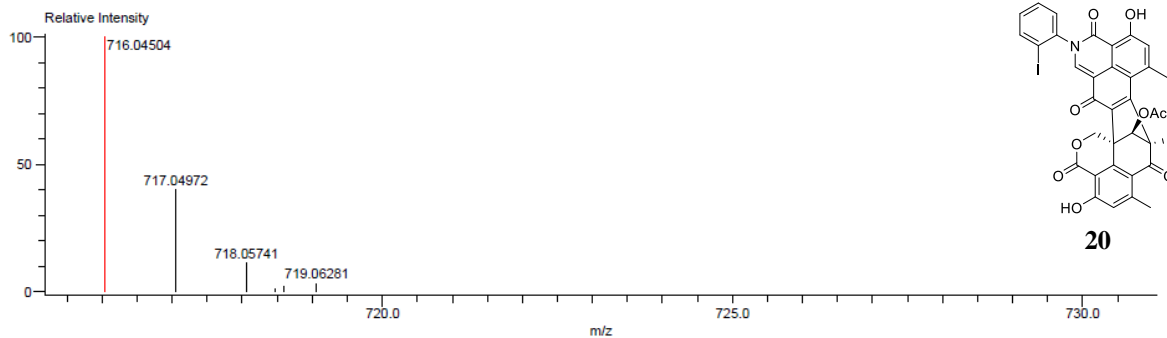


Figura A21. Espectro de masas de alta resolución adquirido por análisis directo en tiempo real (EM-AR-DART) para el compuesto **20**.

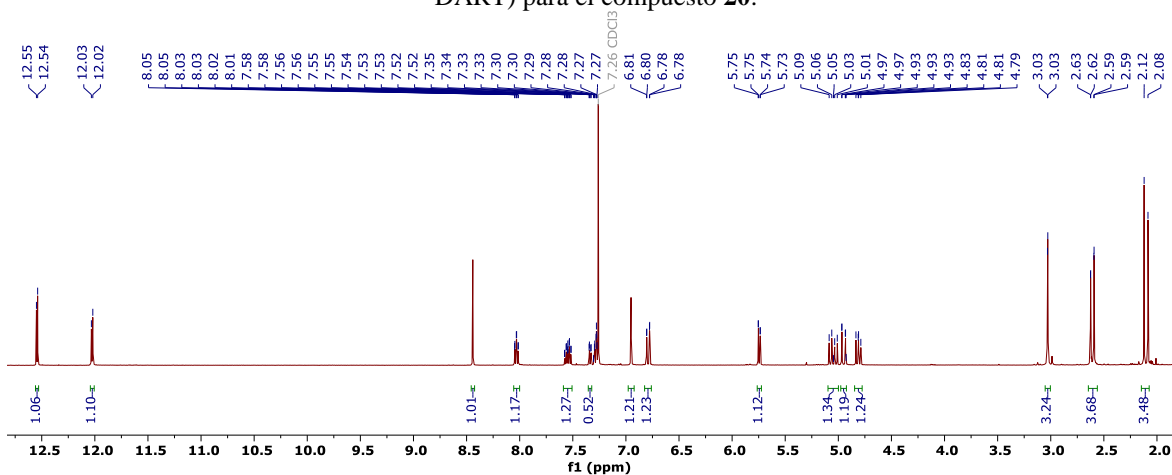


Figura A22. Espectro de RMN-¹H para el producto **20** registrado en CDCl₃ a 500 MHz.

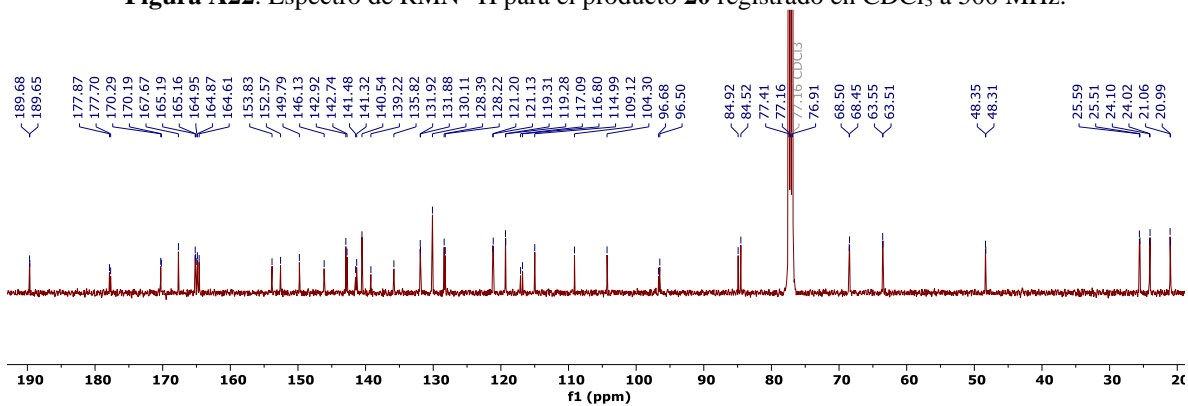


Figura A23. Espectro de RMN-¹³C para el producto **20** registrado en CDCl₃ a 125 MHz.

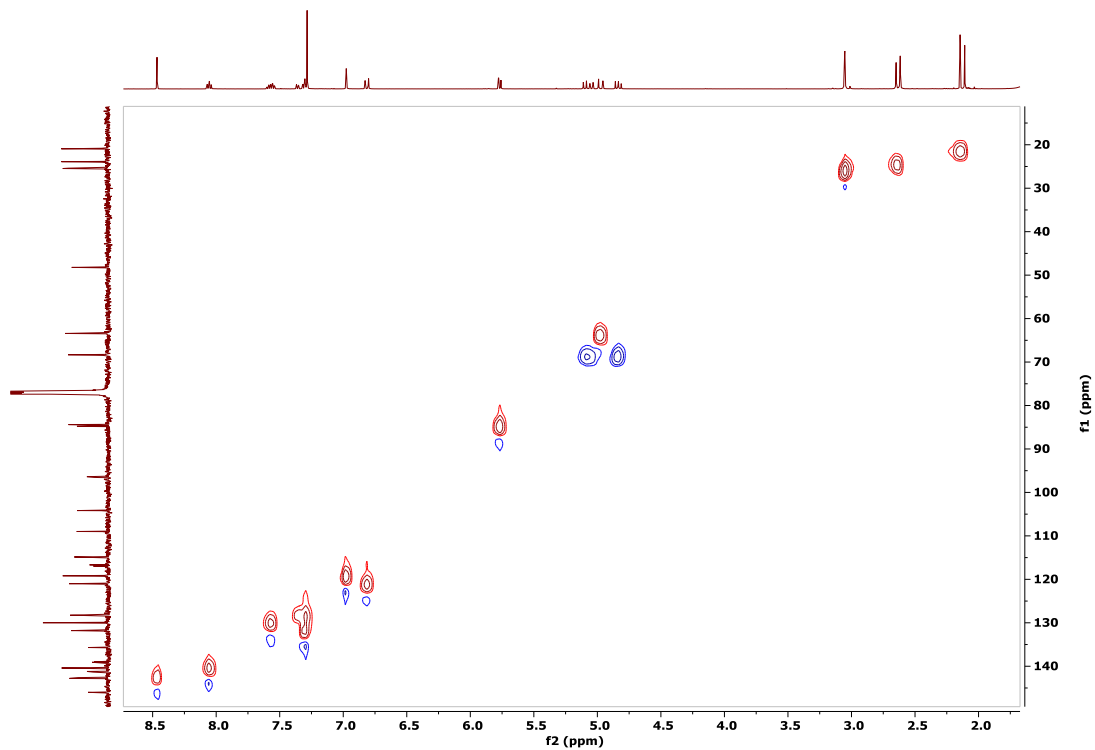


Figura A24. Espectro de HSQC a 500 MHz del compuesto **20**.

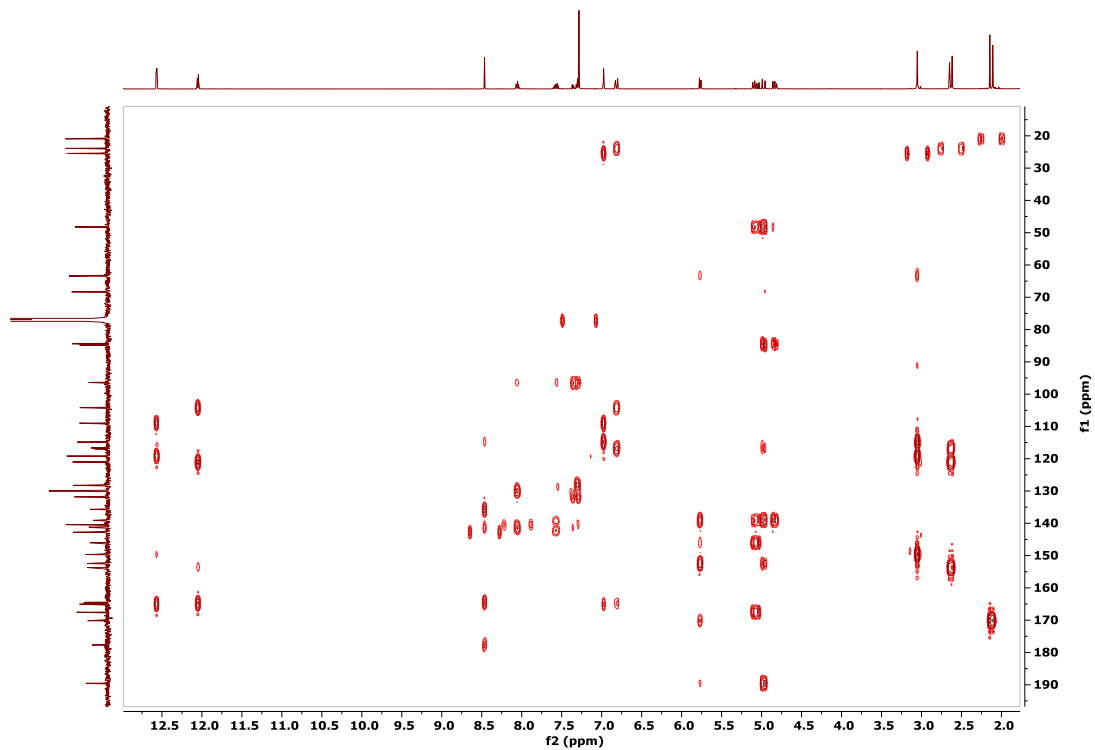


Figura A25. Espectro de HMBC a 500 MHz del compuesto **20**.

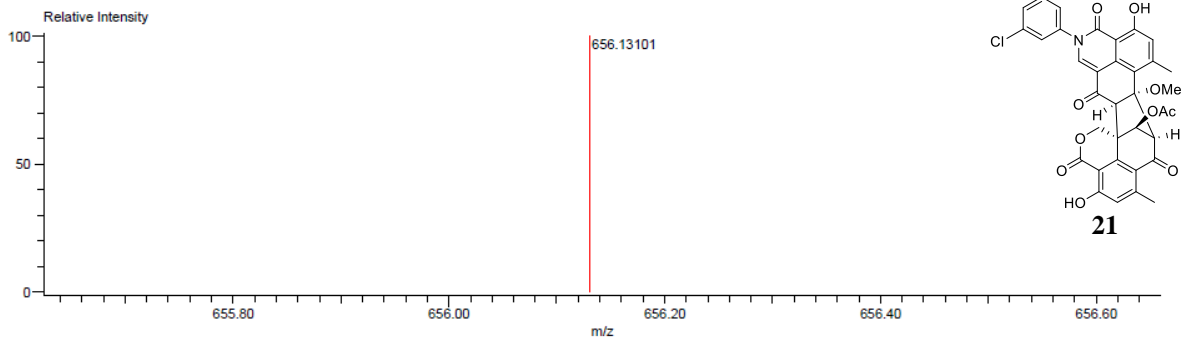


Figura A26. Espectro de masas de alta resolución adquirido por análisis directo en tiempo real (EM-AR-DART) para el compuesto **21**.

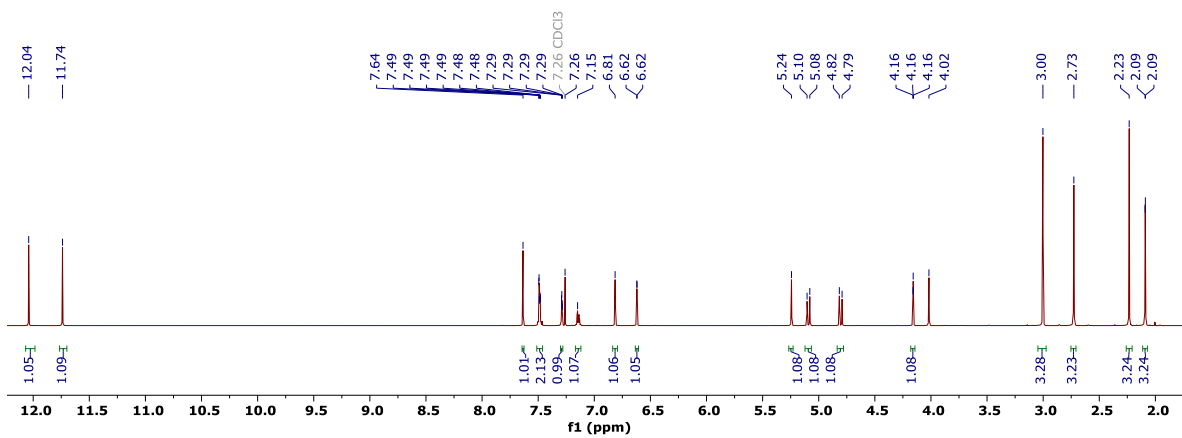


Figura A27. Espectro de RMN-¹H para el producto **21** registrado en CDCl₃ a 500 MHz.

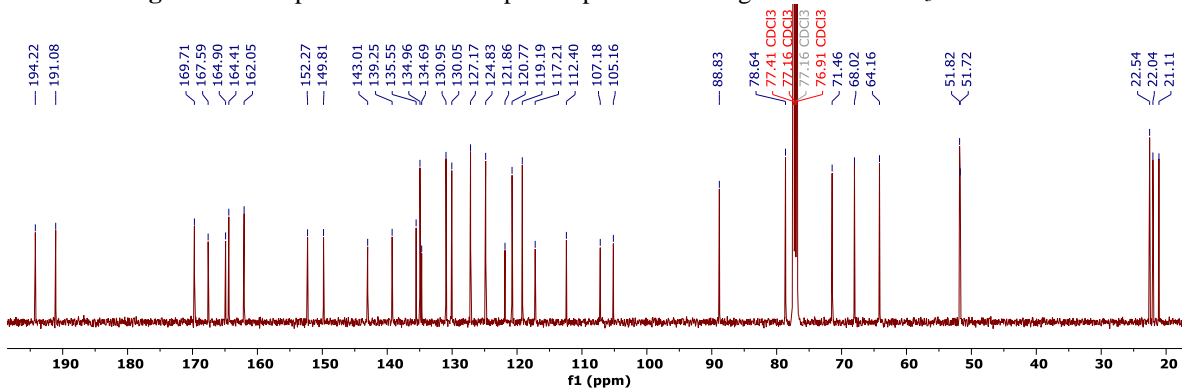


Figura A28. Espectro de RMN-¹³C para el producto **21** registrado en CDCl₃ a 125 MHz.

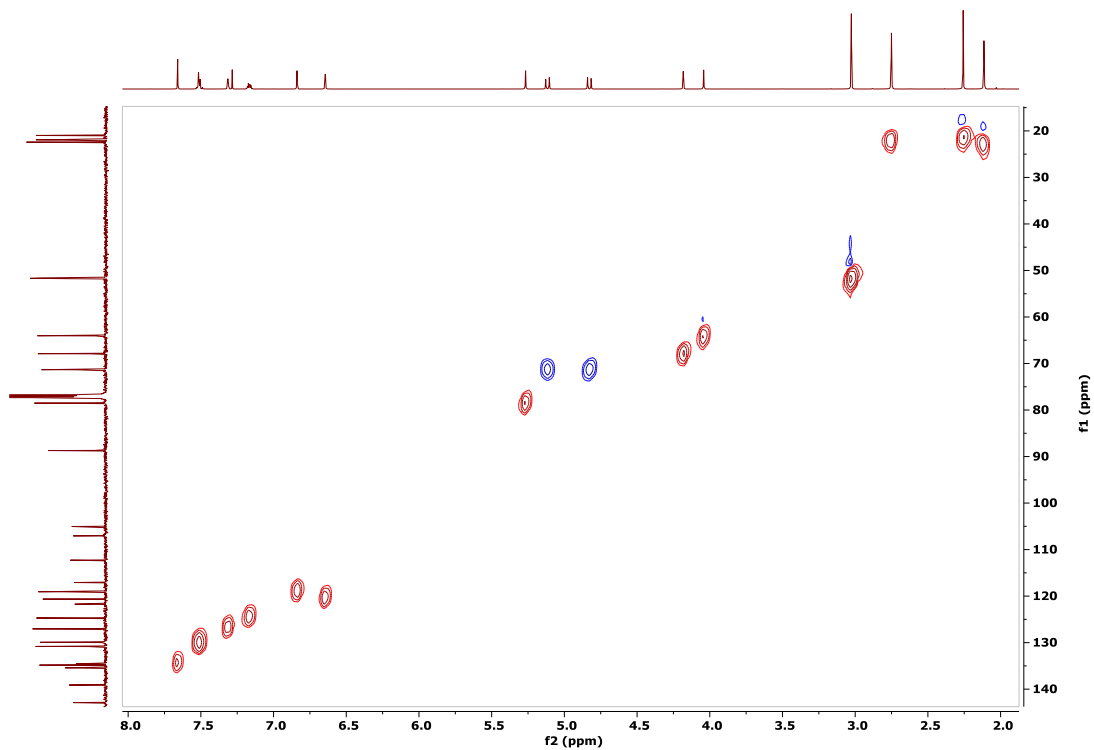


Figura A29. Espectro de HSQC a 500 MHz del compuesto 21.

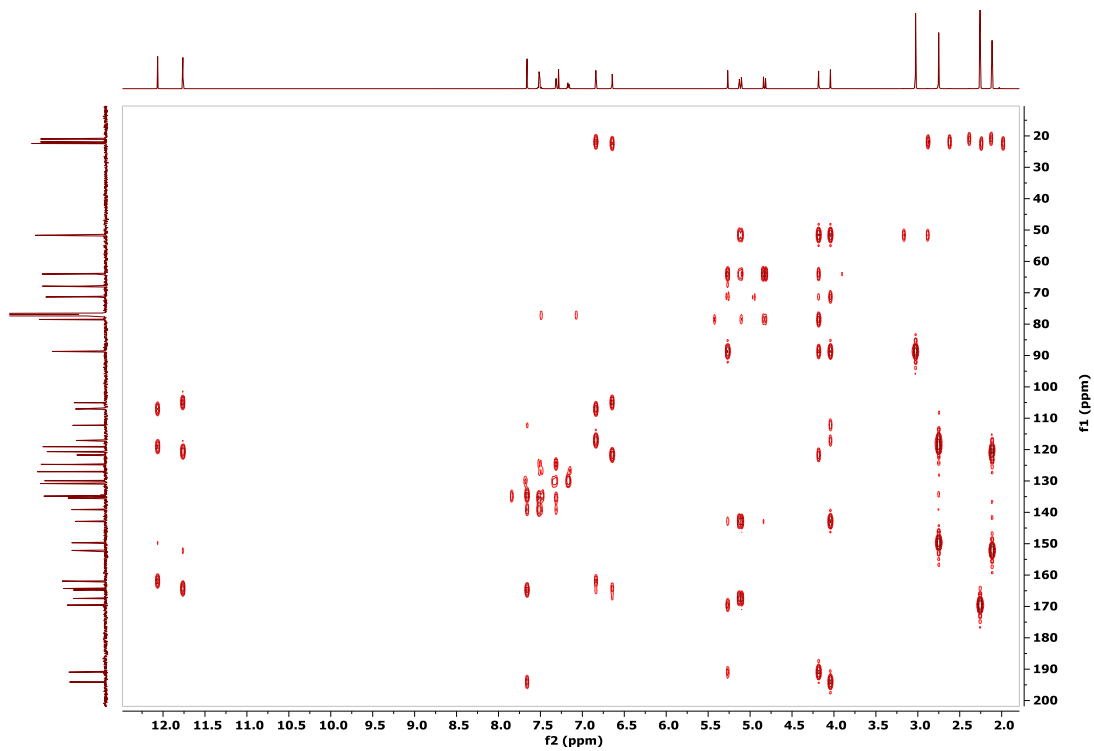


Figura A30. Espectro de HMBC a 500 MHz del compuesto 21.

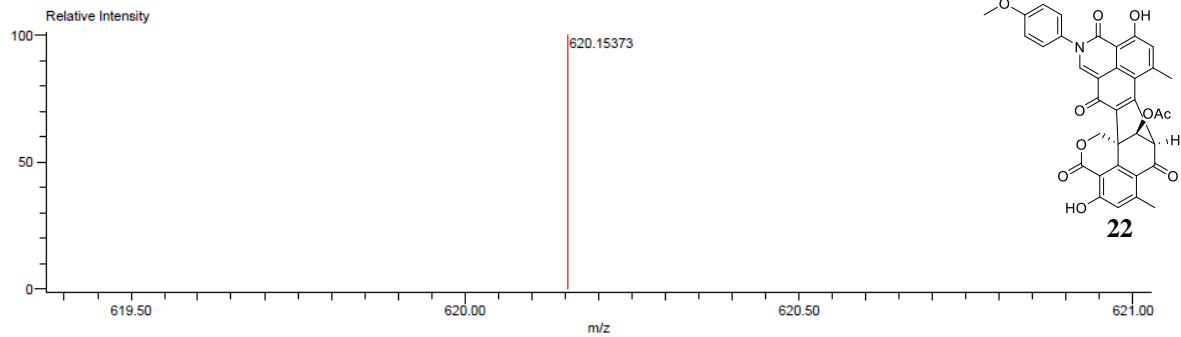


Figura A31. Espectro de masas de alta resolución adquirido por análisis directo en tiempo real (EM-AR-DART) para el compuesto **22**.

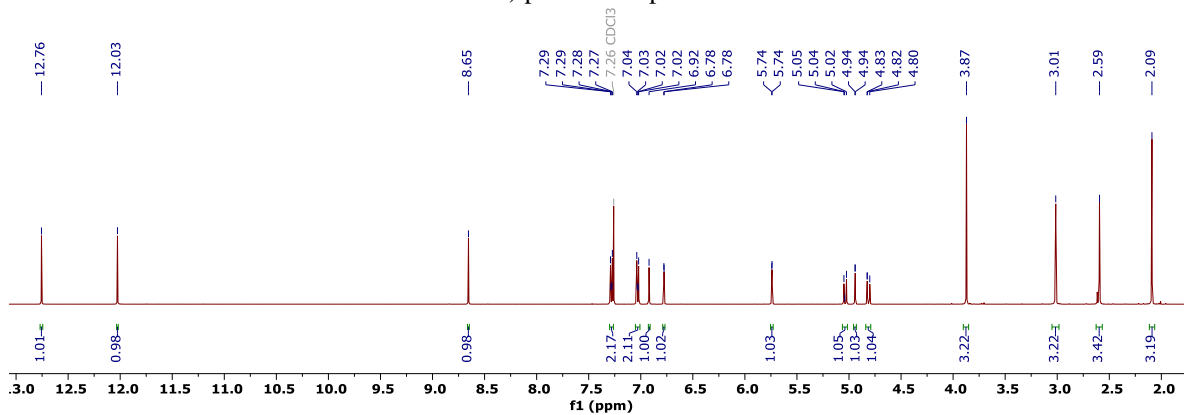


Figura A32. Espectro de RMN-¹H para el producto **22** registrado en CDCl₃ a 500 MHz.

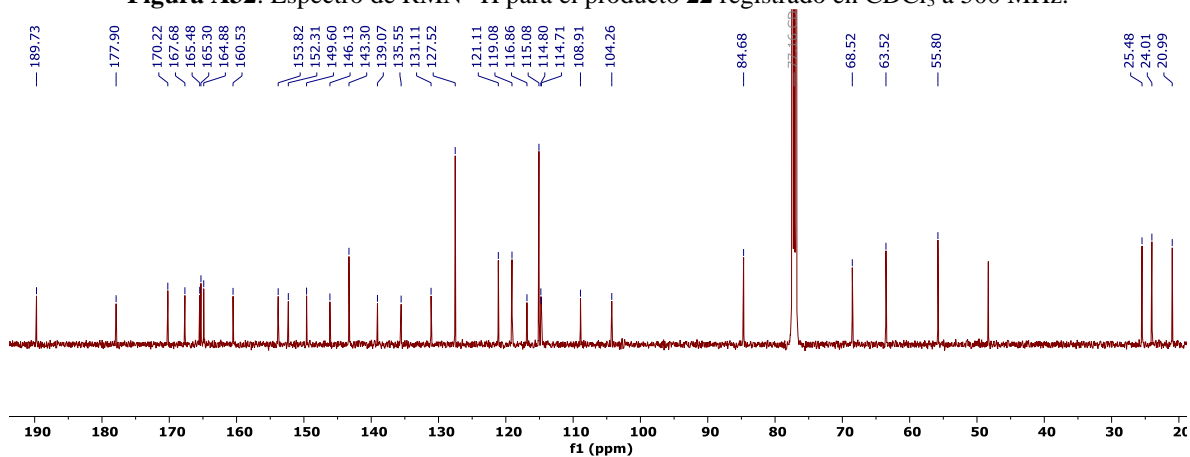


Figura A33. Espectro de RMN-¹³C para el producto **22** registrado en CDCl₃ a 125 MHz.

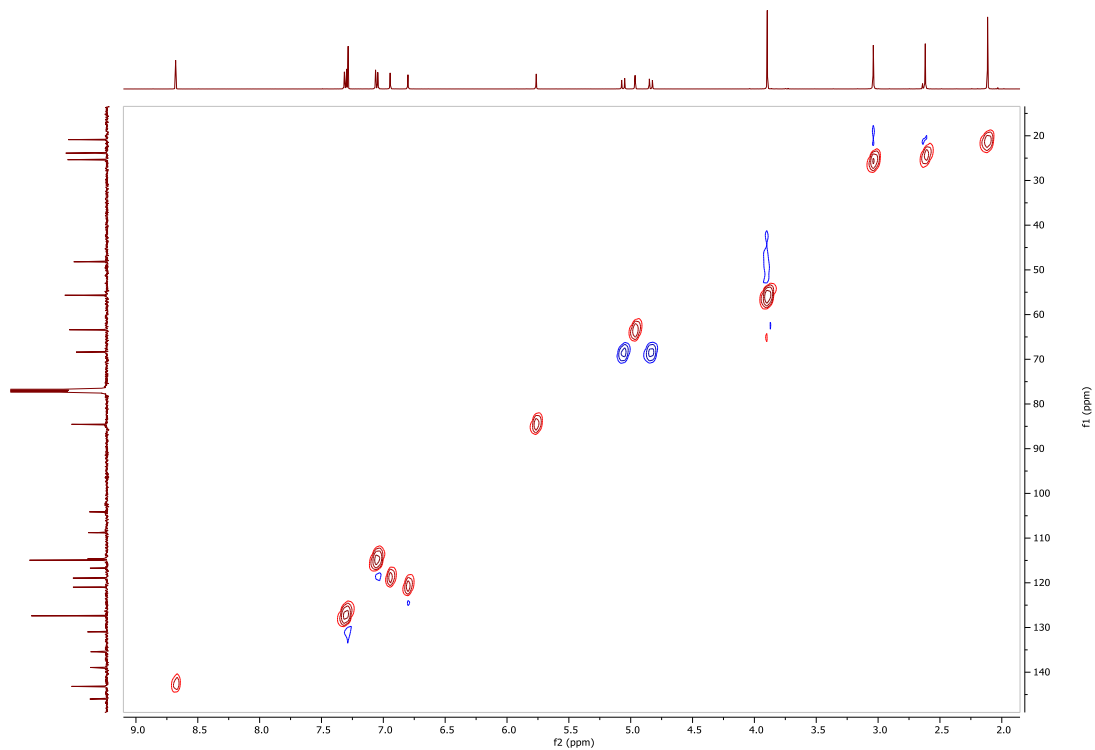


Figura A34. Espectro de HSQC a 500 MHz del compuesto **22**.

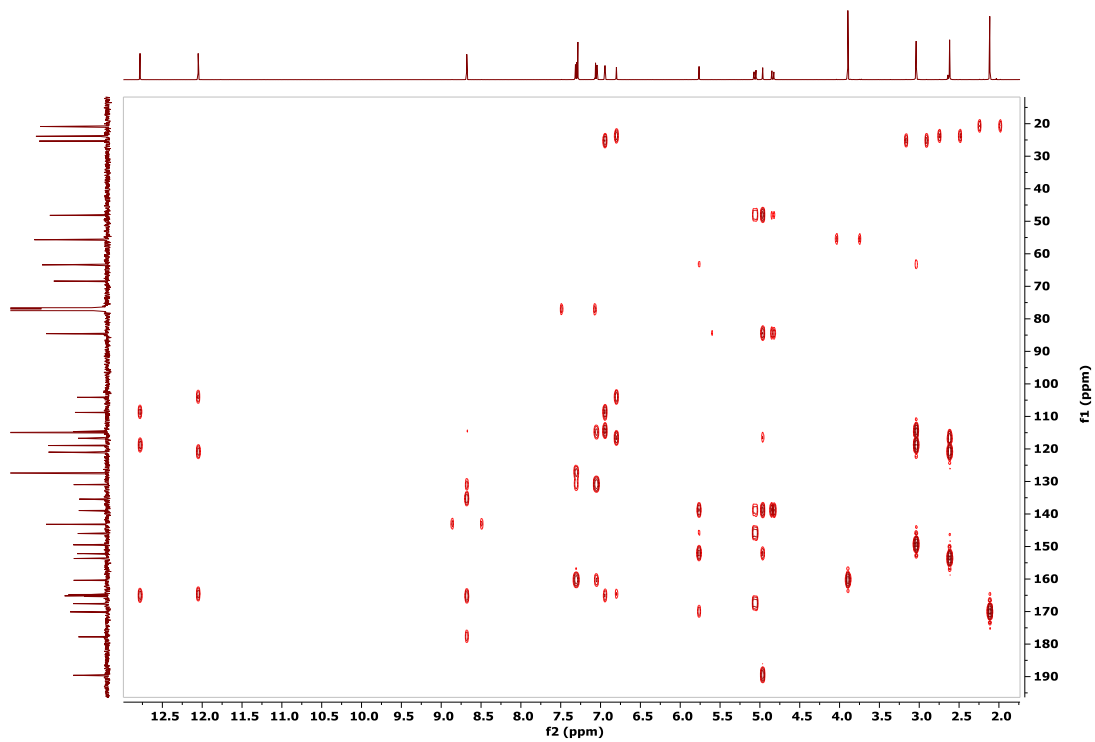


Figura A35. Espectro de HMBC a 500 MHz del compuesto **22**.

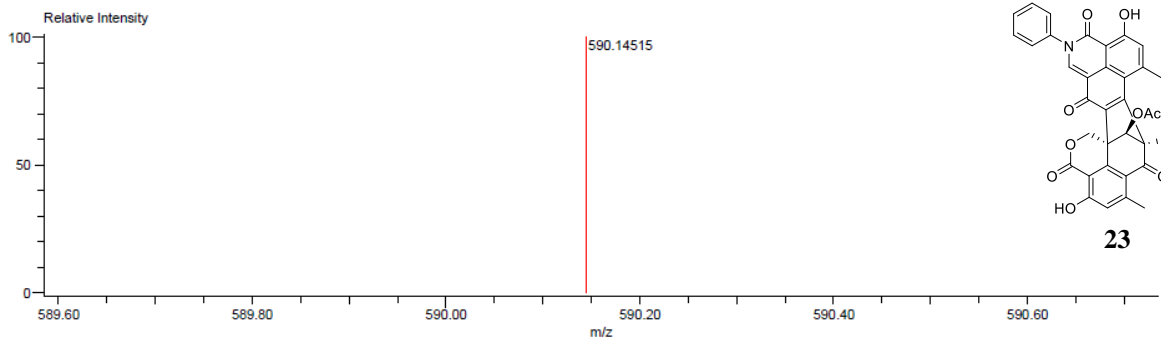


Figura A36. Espectro de masas de alta resolución adquirido por análisis directo en tiempo real (EM-AR-DART) para el compuesto **23**.

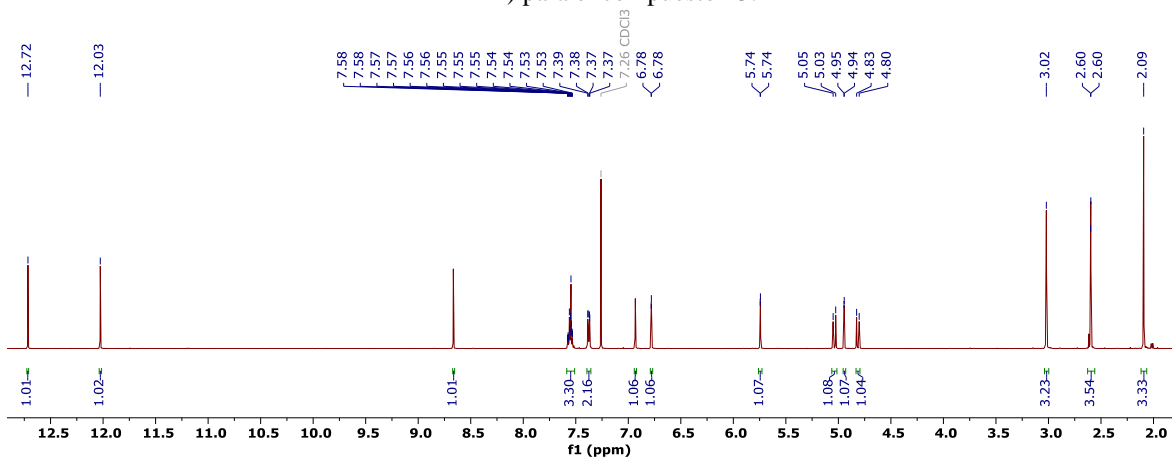


Figura A37. Espectro de RMN-¹H para el producto **23** registrado en CDCl₃ a 500 MHz.

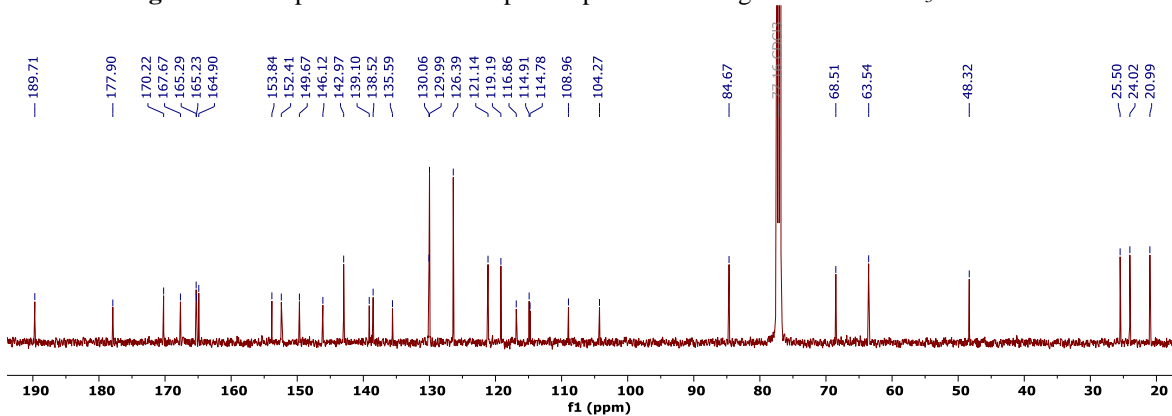


Figura A38. Espectro de RMN-¹³C para el producto **23** registrado en CDCl₃ a 125 MHz.

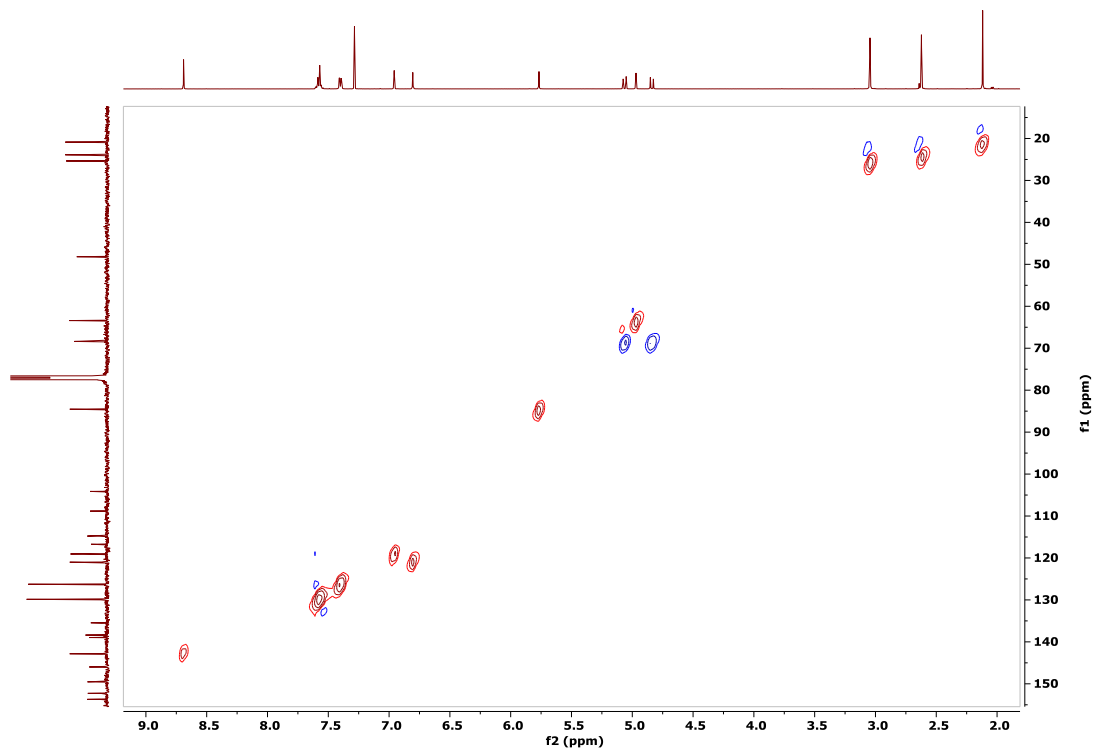


Figura A39. Espectro de HSQC a 500 MHz del compuesto 23.

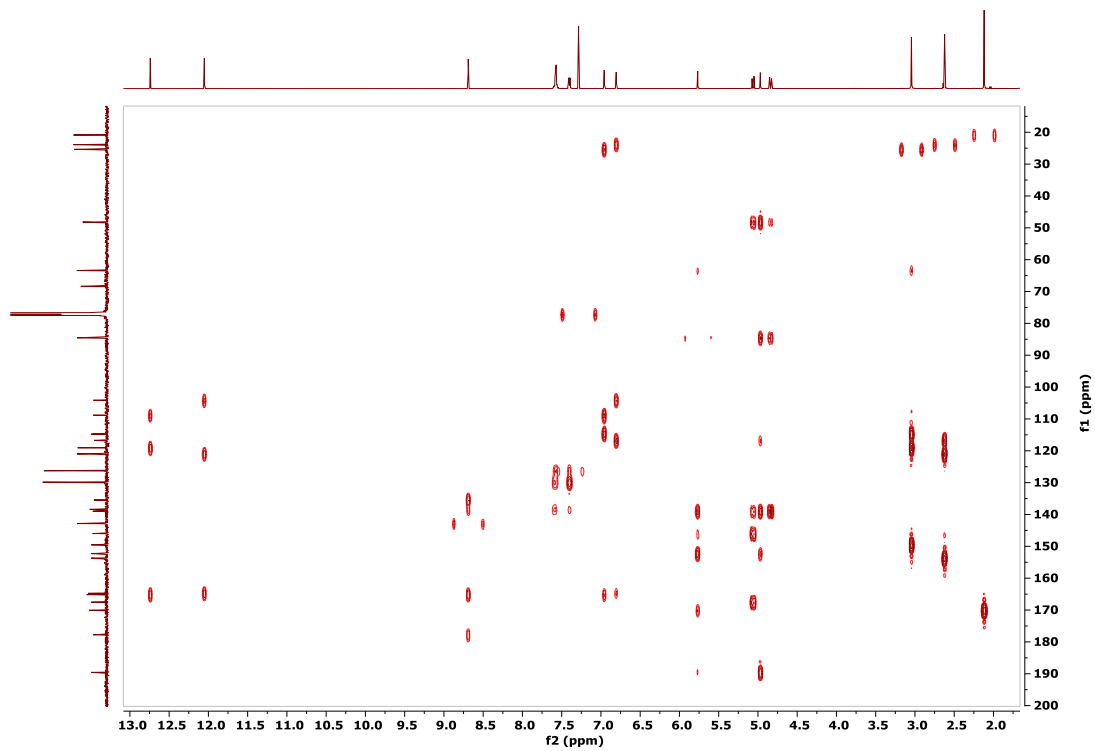


Figura A40. Espectro de HMBC a 500 MHz del compuesto 23.

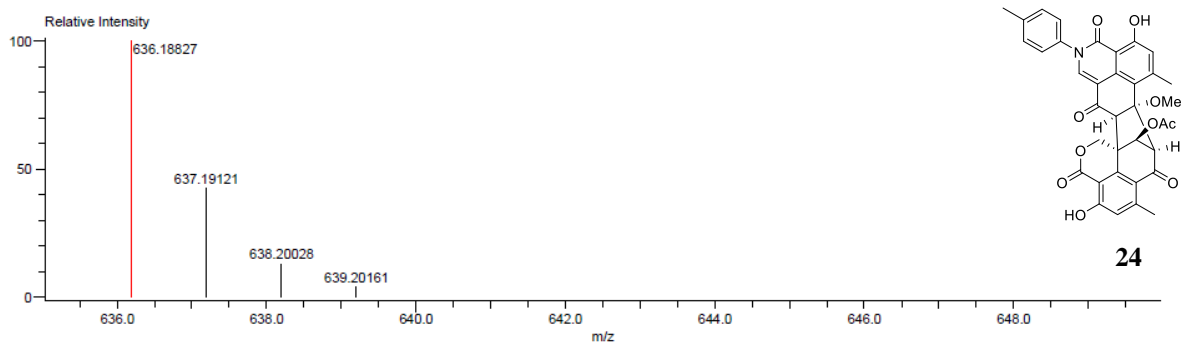


Figura A41. Espectro de masas de alta resolución adquirido por análisis directo en tiempo real (EM-AR-DART) para el compuesto **24**.

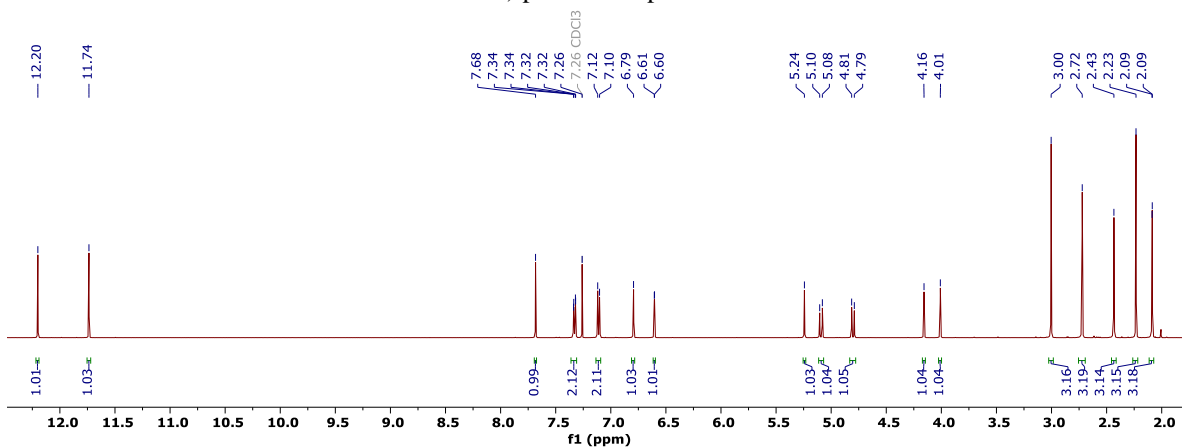


Figura A42. Espectro de RMN-¹H para el producto **24** registrado en CDCl₃ a 500 MHz.

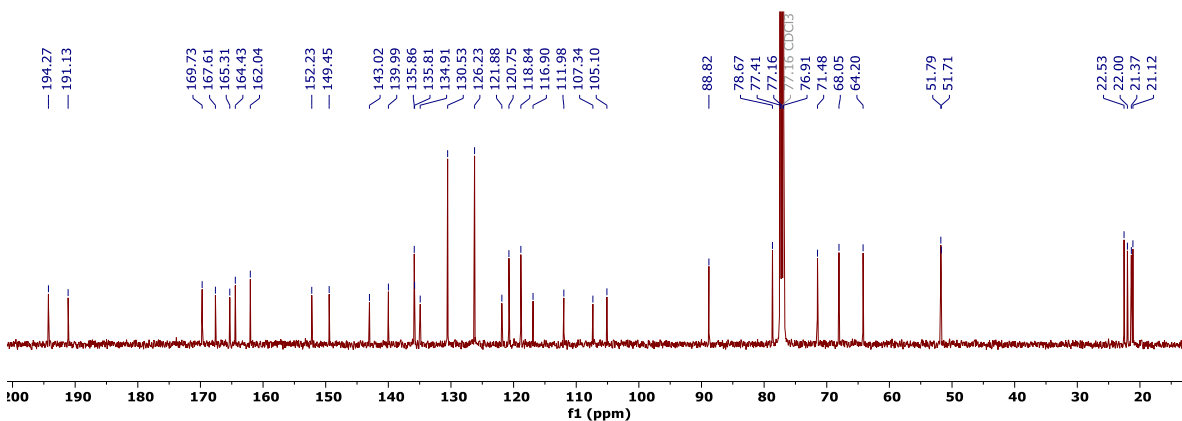


Figura A43. Espectro de RMN-¹³C para el producto **24** registrado en CDCl₃ a 125 MHz.

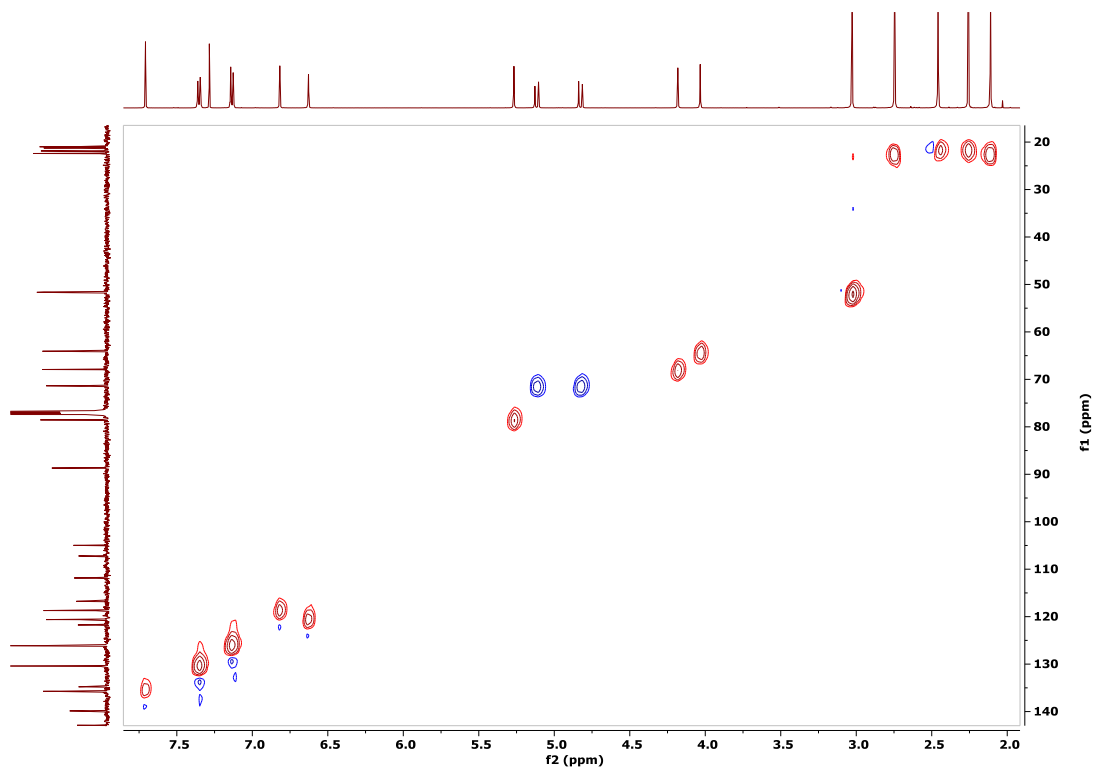


Figura A44. Espectro de HSQC a 500 MHz del compuesto 24.

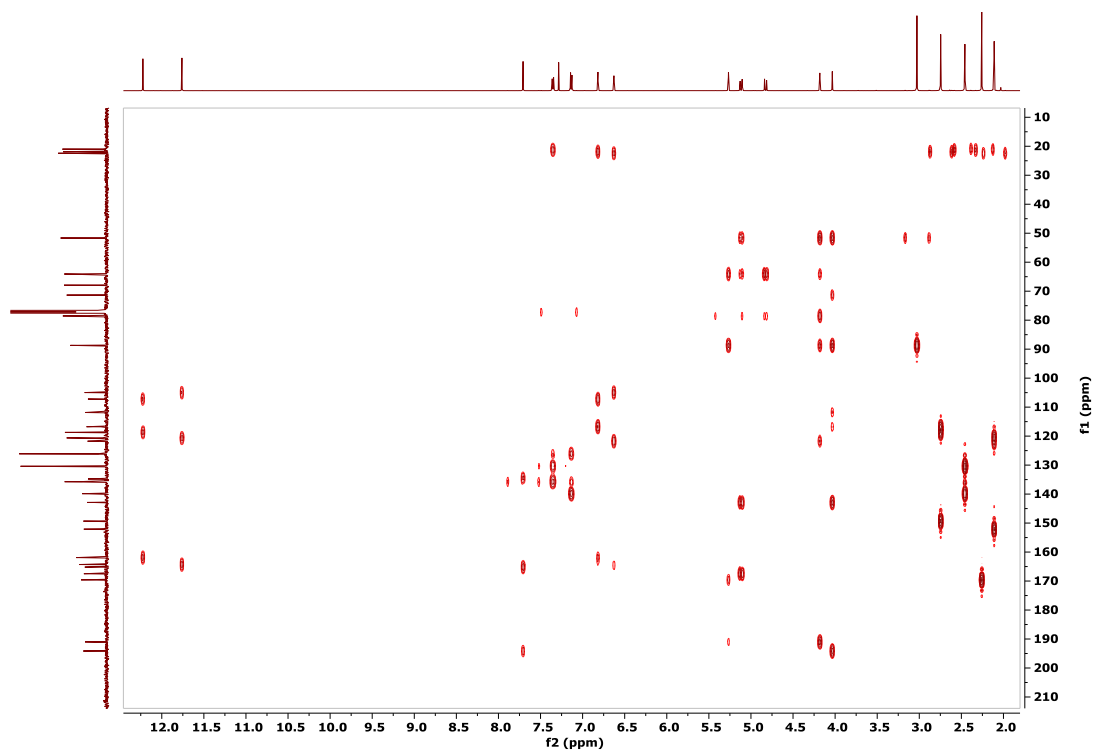


Figura A45. Espectro de HMBC a 500 MHz del compuesto 24.

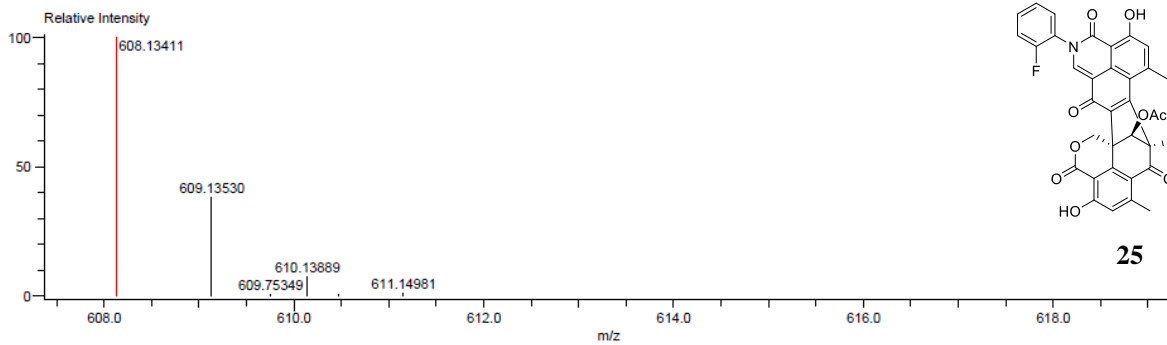


Figura A46. Espectro de masas de alta resolución adquirido por análisis directo en tiempo real (EM-AR-DART) para el compuesto **25**.

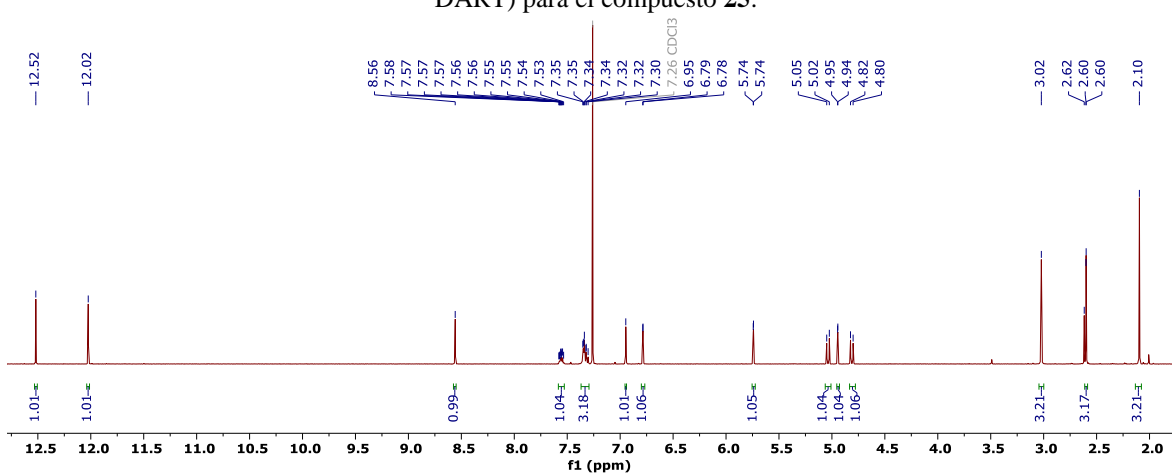


Figura A47. Espectro de RMN-¹H para el producto **25** registrado en CDCl₃ a 500 MHz.

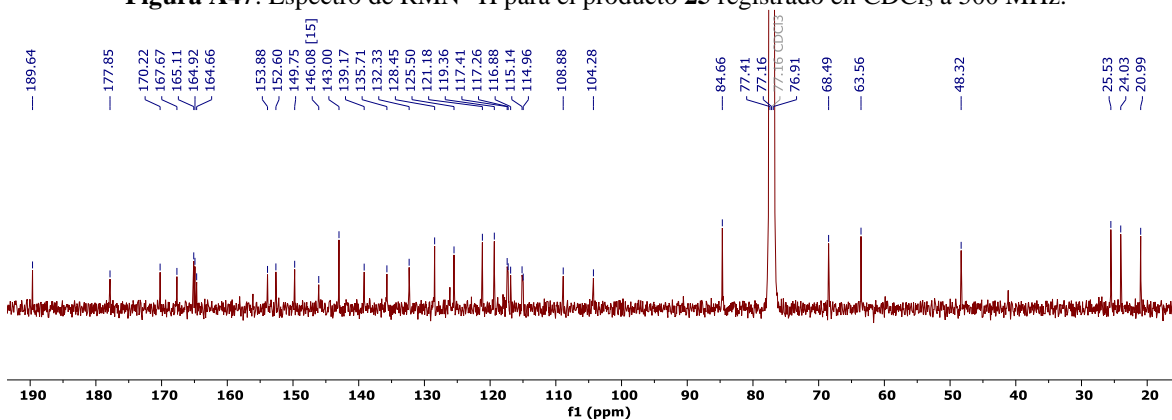


Figura A48. Espectro de RMN-¹³C para el producto **25** registrado en CDCl₃ a 125 MHz.

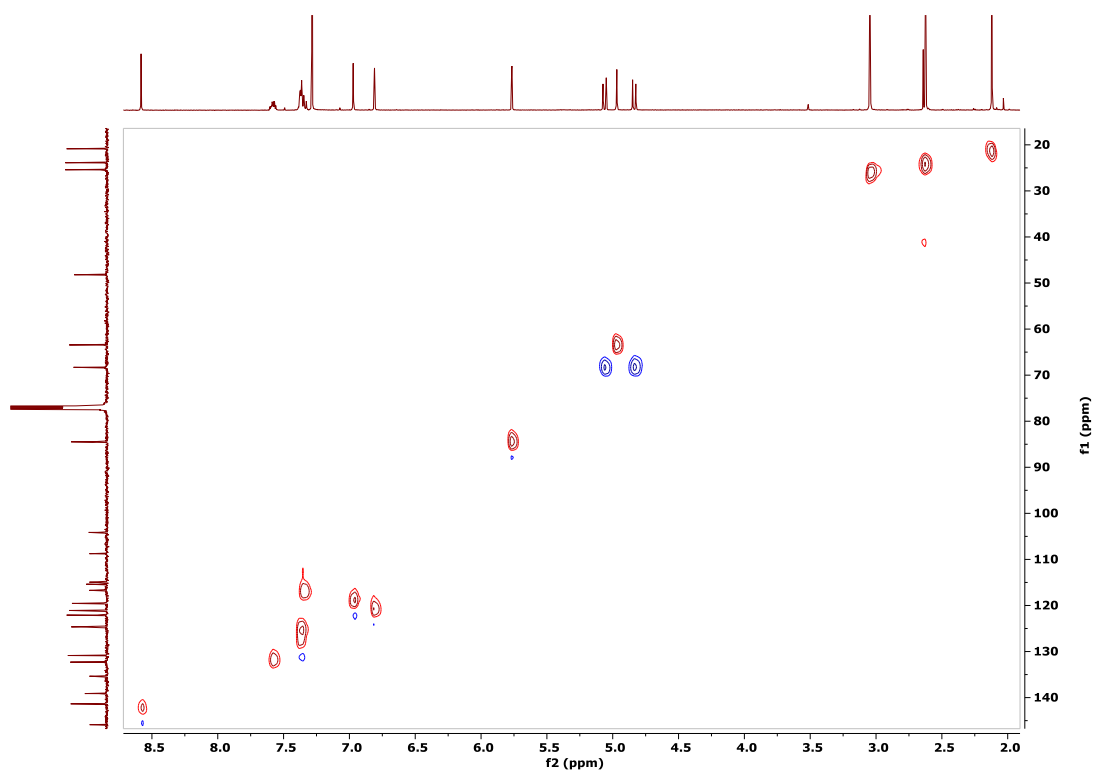


Figura A49. Espectro de HSQC a 500 MHz del compuesto 25.

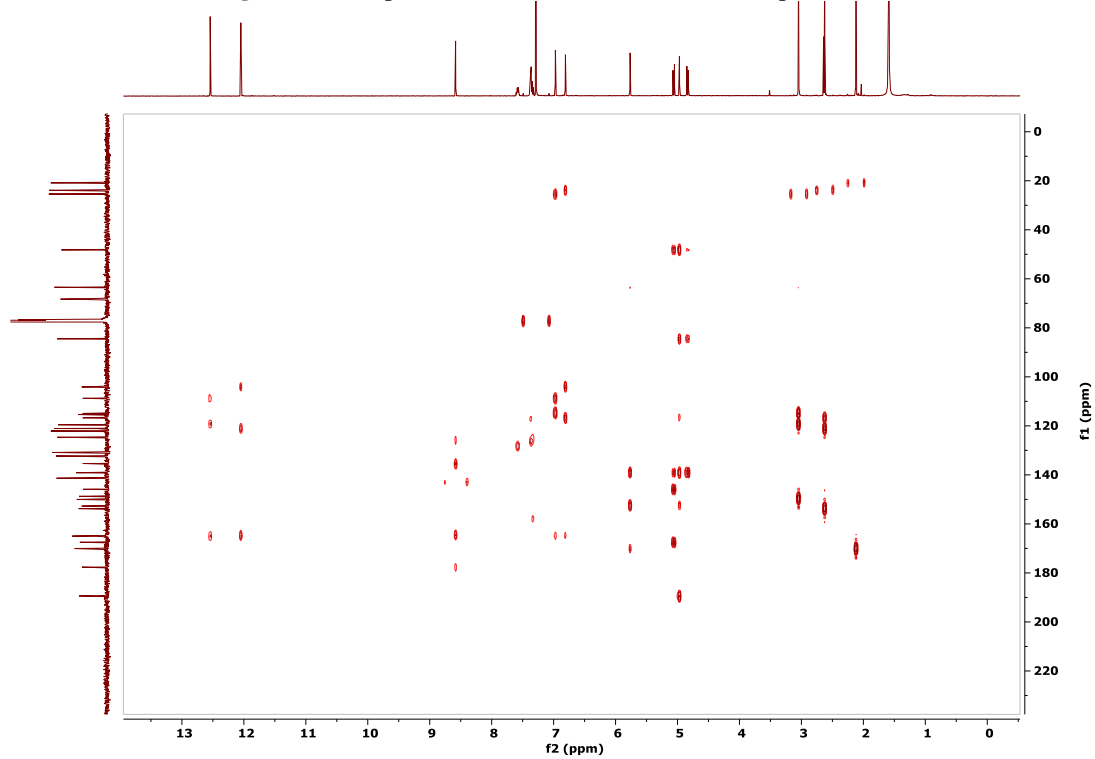


Figura A50. Espectro de HMBC a 500 MHz del compuesto 25.

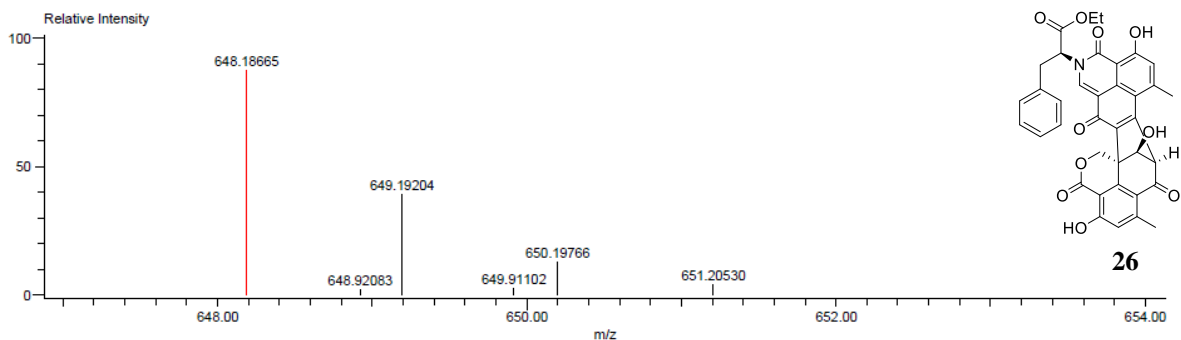


Figura A51. Espectro de masas de alta resolución adquirido por análisis directo en tiempo real (EM-AR-DART) para el compuesto **26**.

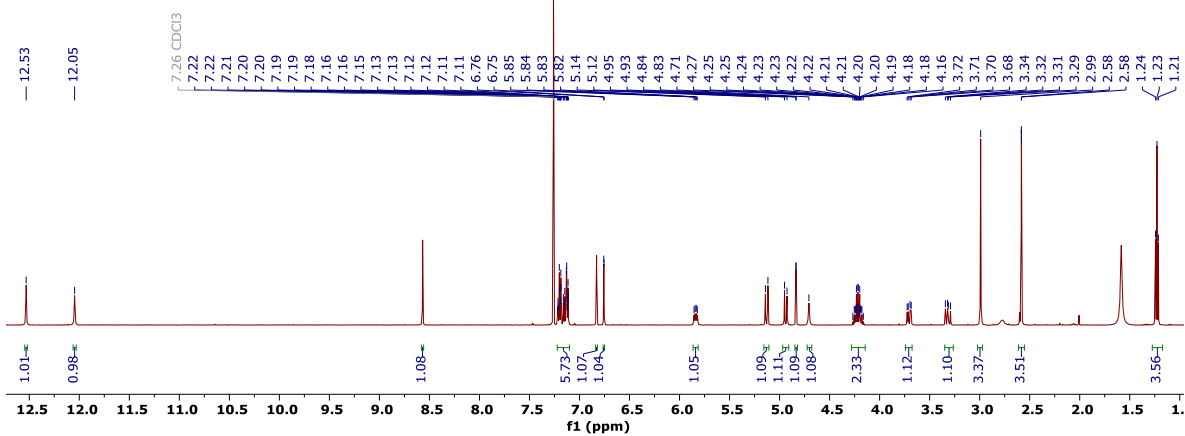


Figura A52. Espectro de RMN-¹H para el producto **26** registrado en CDCl₃ a 500 MHz.

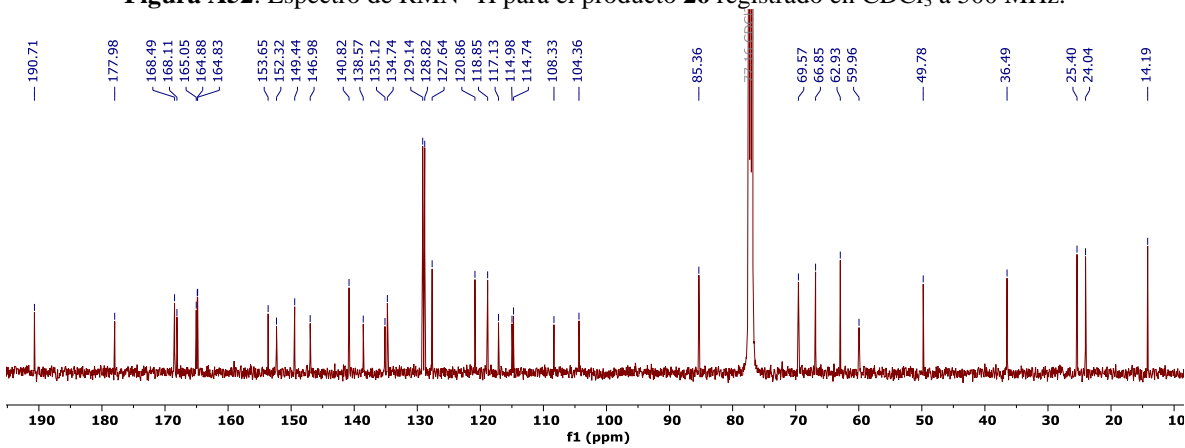


Figura A53. Espectro de RMN-¹³C para el producto **26** registrado en CDCl₃ a 125 MHz.

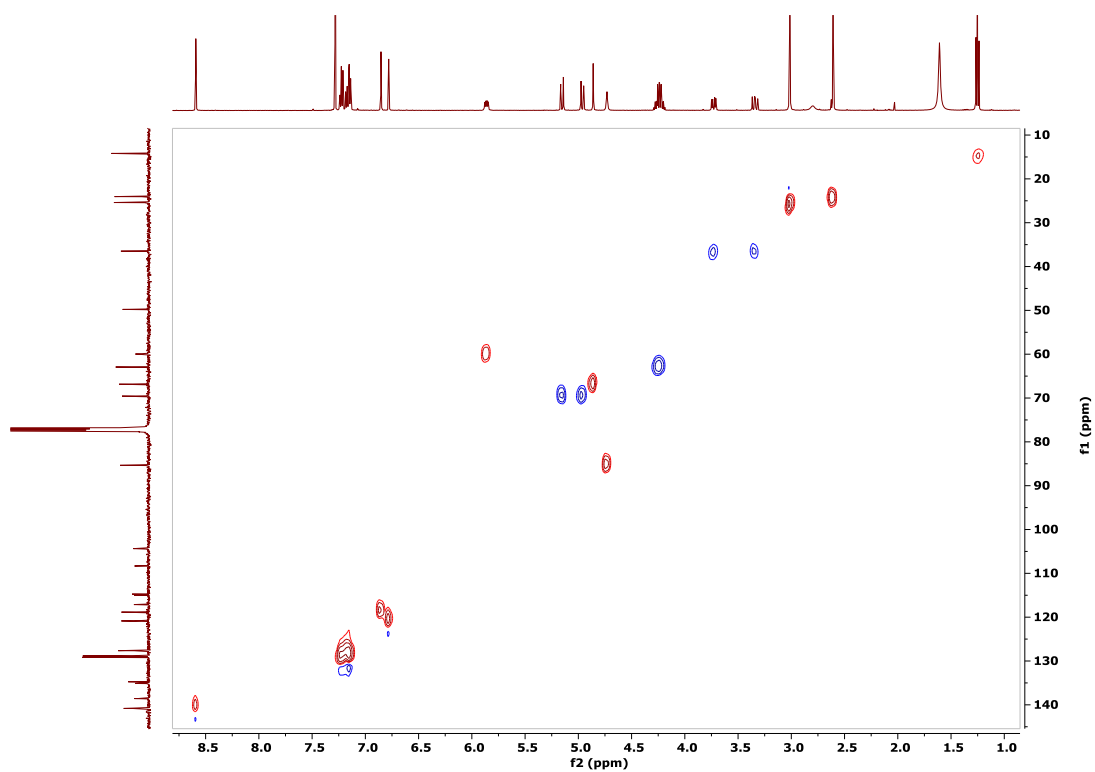


Figura A54. Espectro de HSQC a 500 MHz del compuesto 26.

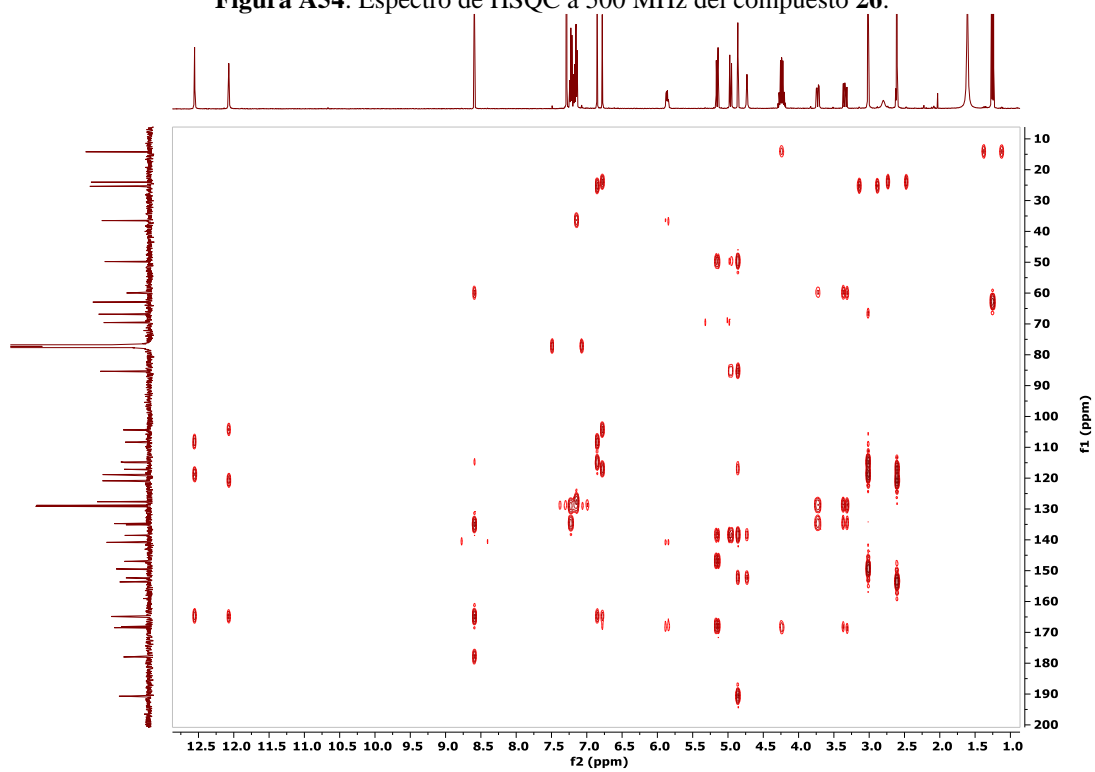


Figura A55. Espectro de HMBC a 500 MHz del compuesto 26.