



FACULTAD DE QUÍMICA Y DE FARMACIA
PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA

**DISEÑO, SÍNTESIS, EVALUACIÓN CITOTÓXICA EN LÍNEAS
CELULARES DE CÁNCER DE PÁNCREAS Y ESTUDIOS DE
ACOPLAMIENTO MOLECULAR EN EL RECEPTOR SMOOTHENED DE
NUEVOS DERIVADOS DE PURINAS TRISUSTITUIDAS**

ALONDRA ELENA VILLEGAS MENARES

**Tesis para optar al Grado
Académico de Doctor en Química**

Director de Tesis : Dr. Cristian O. Salas Sánchez

Santiago, agosto, 2021

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE
FACULTAD DE QUÍMICA Y DE FARMACIA
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO

“DISEÑO, SÍNTESIS, EVALUACIÓN CITOTÓXICA EN LÍNEAS
CELULARES DE CÁNCER DE PÁNCREAS Y ESTUDIOS DE
ACOPLAMIENTO MOLECULAR EN EL RECEPTOR SMOOTHENED DE
NUEVOS DERIVADOS DE PURINAS TRISUSTITUIDAS”

Tesis presentada por:

Alondra Elena Villegas Menares

Para optar al Grado Académico de Doctor en
Química.

Aprobado por:

Dr. David Pessoa M.

Prof. Examinador



.....

Dr. Mauricio Cuellar F.

Prof. Examinador



.....

Dr. Patricio Iturriaga V.

Prof. Examinador



.....

Dr. Marcos Caroli R.

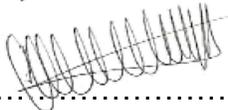
Prof. Examinador



.....

Dr. Cristian Salas S.

Director de Tesis



.....

Agosto - 2021

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer a las becas y proyecto que facilitaron el desarrollo de esta tesis:

- Beca Doctorado Nacional CONICYT 2015 N° 21150586.
- FONDECYT Regular N° 1161816.
- Beca Estadía en el extranjero para tesis de Doctorado, convocatoria año 2019, Pontificia Universidad Católica de Chile.
- Beca de apoyo a Casos Críticos para el término de Tesis, convocatoria año 2020, Pontificia Universidad Católica de Chile.

En segundo lugar, agradezco al Dr. Cristian Salas, quien durante todos estos años me guió y apoyó con paciencia, en cada presentación, reunión que tuvimos como grupo de laboratorio y por la ayuda en los diferentes hitos de esta tesis. Creo que sin su ayuda esta tesis no hubiera llegado a término.

Agradezco a la Dra. Margot Paulino, de la Universidad de la Republica de Uruguay, por aceptarme en su laboratorio para realizar la pasantía doctoral con tan poco tiempo de organización. Gracias también al Mg. Jorge Cantero, quien también estuvo dispuesto a enseñarme y guiarme para obtener buenos resultados.

A los correctores de esta tesis, Dr. David Pessoa, Dr. Mauricio Cuellar, Dr. Patricio Iturriaga y Dr. Marcos Caroli, quienes en cada avance de Tesis mostraron una gran disposición, apoyo y recomendaciones para que esta tesis culminara de la mejor manera, a pesar de que algunas no se llevaron a cabo por la pandemia que estamos pasando.

A los integrantes del grupo de laboratorio del Dr. Salas que me acompañaron durante los años de desarrollo de esta tesis: Dra. Ana María Zarate, Dr.

Christian Espinosa, Dr. Marcos González, Daniela Ibarra, Thalía Delgado, Dr. Rajendran Satheeshkumar y, en especial, a Jean Luc Bertrand, por ayudar en la síntesis de varios de los ligandos de la presente tesis. A cada uno de ellos les agradezco por los momentos vividos, tanto en el ámbito profesional como en el personal. También agradecer a B. Andrés Olivares por su apoyo y compañía en momentos cruciales. Al Dr. Carlos Gallardo y todo el tercer piso del Departamento de Farmacia que estuvo presente en mi paso por el laboratorio.

Agradezco profundamente a mi familia, sobre todo a mi madre Luisa, que sin ella no hubiese logrado ninguna de las metas que me he propuesto. A mi hijo Alexander (Cachorro) por ser el motor fundamental de todo en mi vida y por ser quien me ha apañado y comprendido incluso en los momentos más difíciles. A mis hermanos Natalia, Fabián y a mi padre Luis por brindarme siempre su apoyo y palabras de aliento.

Agradezco infinitamente al Dr. Alan Cabrera, quien en los últimos años ha sido un apoyo incondicional en todo, gracias por ser tú, por el amor y compañía que me entregas, hasta por los “retos” para que terminara la tesis.

Por último, muchas gracias a todos quienes formaron parte de mi desarrollo académico y personal en éstos ya 6 años de camino que no fueron nada fáciles.

Si te dan, agradece... la vida es así de simple.

LISTA DE ABREVIACIONES

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Boc	terc-butiloxicarbonilo
CCB	Carcinoma de células basales
Cdks	Quinasas dependientes de ciclinas
CLAE	Cromatografía líquida de alta eficacia
CMC	Células madres cancerígenas
CRD	Dominio rico en cisteínas
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropiletilamina
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECD	Dominio extra celular
EGFR	Receptor de crecimiento epidermal
Eq	Equivalente
Et₃N	Trietilamina
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
h	Hora
IR-TF	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier
M	Molar
MINSAL	Ministerio de Salud
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
MW	Microondas
OCDE	Organización para la Cooperación y el desarrollo económicos
P.A.	Para análisis
pip	Piperidina
pipz	Piperazina
p.f.	Punto de fusión
ppm	Partes por millón

Ptch	Patched
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SHh	Sonic Hedgehog
Smo	Smoothened
S_NAr	Sustitución nucleofílica aromática
t.a.	Temperatura ambiente
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
TM	Transmembranal
Xantphos	4,5-Bis(difenilfosfina)-9,9-dimetilxanteno

INDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE ESQUEMAS	XIV
RESUMEN	XV
ABSTRACT	XVII
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
1.1. EL CÁNCER, UN PROBLEMA DE SALUD MUNDIAL	1
1.2 CANCER DE PANCREAS Y SU INCIDENCIA EN CHILE	2
1.3 VÍA DE SEÑALIZACIÓN HEDGEHOG Y SU RELACION CON EL CÁNCER	2
1.4 CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE SMO	7
1.5 SITIOS DE UNIÓN DE LIGANDOS A SMOOTHENED	8
1.6 CÁNCER DE PÁNCREAS Y SU RELACIÓN CON LA VÍA HH	12
1.7 DISEÑO DE NUEVOS LIGANDOS SMO:	17
1.7.1 Basado en fragmentos	17
1.7.2 Basado en el receptor	26
1.8 ACOPLAMIENTO REVERSO	27
1.9 INVESTIGACIÓN PROPUESTA	30
CAPÍTULO II: HIPÓTESIS	32
2 HIPÓTESIS	33
CAPÍTULO III: OBJETIVOS	34
3 OBJETIVO GENERAL	35

3.7	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
3.7.1	Objetivos sintéticos	35
3.7.2	Objetivos biológicos	35
3.7.3	Objetivos computacionales	35
<i>CAPÍTULO IV. PARTE EXPERIMENTAL.....</i>		37
4.1.	<i>MÉTODOS GENERALES SINTÉTICOS Y BIOLÓGICOS.....</i>	38
4.2.	<i>METODOLOGÍA SINTÉTICA</i>	39
4.2.1.	Procedimiento de síntesis de 6-cloro-2-fluoro-9-hexil-9H-purina, 6-cloro-2-fluoro-9-metilciclopropil-9H-purina y 2,6-dicloro-9-metilciclopropil-9H-purina (Serie I y II)	42
4.2.2.	Procedimiento general para la síntesis de 2-fluoro-9-hexil-6-(4-(R ² -fenil)-9H-purina y 2-fluoro-9-metilciclopropil-6-(4-R ² -fenil)-9H-purina (Serie I y II).....	43
4.2.3.	Procedimiento general para la síntesis de derivados de <i>tert</i> -butil-4-(benzamido) piperidin-1-carboxilato (Serie I)	44
4.2.4.	Procedimiento general para la síntesis de 4-(4-metilpiperazin-1il)anilina y 3-fluoro-4-(4-metilpiperazin-1il)anilina	44
4.2.5.	Procedimiento general para la síntesis de derivados finales de la Serie I y Serie II	45
4.3.	<i>METODOLOGÍA BIOLÓGICA.....</i>	46
4.3.4.	Mantenimiento de cultivos celulares.....	46
4.3.5.	Estudio de citotoxicidad	46
4.4.	<i>METODOLOGÍA COMPUTACIONAL.....</i>	47
<i>CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</i>		50
5.1.	<i>SÍNTESIS DE DERIVADOS DE PURINA</i>	51

5.1.1.	Síntesis de 6-cloro-2-fluoro-9-hexil-9 <i>H</i> -purina, 6-cloro-2-fluoro-9-metilciclopropil-9 <i>H</i> -purina y 2,6-dicloro -9-metilciclopropil-9 <i>H</i> -purina	51
5.1.2.	Síntesis de 2-fluoro-9-hexil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9 <i>H</i> -purina, 2-fluoro-9-metilciclopropil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9 <i>H</i> -purina y derivados	55
5.1.3.	Síntesis de derivados de <i>tert</i> -butil-4-(benzamido)-piperidin-1-carboxilato	59
5.1.4.	Síntesis de derivados finales Serie I y Serie II	61
5.2.	<i>EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE LOS COMPUESTOS FINALES SERIE I y II</i>	66
5.3.	<i>ESTUDIO COMPUTACIONAL</i>	77
5.3.1.	Acoplamiento molecular	78
5.3.2.	Anclaje reverso para ligandos Serie I.	91
	<i>CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES</i>	95
6.	<i>CONCLUSIONES</i>	96
	<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	98
	<i>ANEXO 1: Data espectroscópica</i>	111
	<i>ANEXO 2: Estudios biológicos</i>	212

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores de IC ₅₀ (nM) de ensayos de gen reportero Gli-luciferasa para ligandos sintetizados y fármacos de referencia.....	18
Tabla 2. Valor de RMSD para la conformación de menor energía en el cristal 4QIM con tamaño de bolsillo 4,5 Å.	49
Tabla 3. Valor de RMSD para la conformación de menor energía en el cristal 4N4W con tamaño de bolsillo 4,5 Å.	49
Tabla 4. Rendimientos de la reacción (%) para la obtención de <i>tert</i> -butil-4-(benzamido)-piperidin-1-carboxilatos.....	60
Tabla 5. Rendimientos de reacción (%) para la obtención de los productos finales de las Series I y II	62
Tabla 6. Rendimiento de reacción (%) para los compuestos restantes de la Serie II	65
Tabla 7. Valores de IC ₅₀ (μM) de los ligandos 10a-p , frente a las líneas celulares cancerígenas de páncreas (AsPC-1 y BxPC-3) en dos experimentos independientes (n=2).....	71
Tabla 8. Valores de IC ₅₀ (μM) de los ligandos de Serie II , frente a las líneas celulares cancerígenas de páncreas (AsPC-1, BxPC-3 y MIA-PaCa-2) en tres experimentos independientes (n=3).....	72
Tabla 9. Valores de IC ₅₀ (μM) en células HEK293 e Índice de Selectividad (IS) en la líneas de cáncer de páncreas de ligandos de la Serie II	74
Tabla 10. Cristales Smo disponibles en <i>Protein Data Bank</i> (PDB).	78
Tabla 11. Valor de energía/ <i>scoring</i> (kcal/mol) e interacciones que presenta la mejor conformación en el cristal 4QIM con sitio de 4,5 Å.	81
Tabla 12. Valor de <i>scoring</i> (kcal/mol) e interacciones que presenta la mejor conformación en el cristal 4N4W con sitio de 4,5 Å.	88
Tabla 13. Modelos farmacológicos con mejor <i>score</i> , para el ligando 10a , en PharmMapper y ChemMapper.	94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Descripción general de la vía Hedgehog, a) en presencia de ligando (activa); y b) en ausencia de ligando (inactiva).[14]	5
Figura 2. Modelos para el desarrollo de cáncer que implican la vía de señalización Hh. a) Ligando independiente, b) autocrina; c) paracrina; d) paracrina inversa.[21]	6
Figura 3. Modelo para la estructura del receptor Smo basado en evidencia cristalográfica existente de los principales dominios resueltos. [27]	8
Figura 4. Modelo para los sitios de unión de agonistas y antagonistas en Smo, obtenidos por estructuras cristalográficas.[28]	9
Figura 5. Estructura de ciclopamina, primer antagonista Smo.	10
Figura 6. Estructura de los agonistas purmorfamina y SAG1.5; y antagonista vismodegib.	11
Figura 7. Estructuras químicas de algunos antagonistas de Smo.	11
Figura 8. Fármacos de primera línea en el tratamiento del adenocarcinoma pancreático.....	13
Figura 9. Relación estructural para el diseño de nuevos análogos de vismodegib.	14
Figura 10. a) Interacciones Smo con ligandos MDB5; b) vismodegib. Las interacciones tipo puentes de hidrógeno se representan como líneas de puntos naranjas.[46]	15
Figura 11. Efecto de MDB5 en la vía Hh y genes diana. a) Análisis de <i>Western blot</i> para Gli-1, SHh, Bcl-2, Bax y GAPDH en células MIA-PaCa-2 tratadas con GDC-0449, MDB2 y MDB5; b) Análisis de RT-PCR en tiempo real de Gli-1, Gli-2, Ptch-1 y SHh en las células MIA-PaCa-2 tratadas con GDC-0449 y MDB5; y c) Análisis de <i>Western blot</i> para Gli-1, SHh, Bcl-2, Bax y GAPDH en células PANC-1 tratadas con GDC-0449 y MDB5.[46]	16
Figura 12. Modificación estructural de III para el diseño de nuevos derivados de <i>N</i> -(2-pirimidinilamino)benzamida.[56]	19

Figura 13. Diseño de derivados de pirimidina fusionada con anillo heteroaromático de cinco miembros.	20
Figura 14. Estructuras químicas de derivados de tetrazina con actividad antitumoral.	21
Figura 15. Estructura química del núcleo de purina y algunos medicamentos que contienen este núcleo.	22
Figura 16. Estructuras químicas de derivados de purina con actividad sobre CdKs.	22
Figura 17. Estructura de mioseverina.	23
Figura 18. Síntesis de compuestos derivados de mioseverina. <i>Reactivos y condiciones:</i> (i) haluro de alquilo, K ₂ CO ₃ , DMF, 6 h, t.a.; (ii) bencilamina o 4-metoxibencilamina, DIPEA, <i>n</i> -butanol, 12 h, 110 °C; (iii) bencilamina, DIPEA, <i>n</i> -butanol, 1 h, 150 °C, MW.[59].....	24
Figura 19. Estructura de ligandos optimizados como nuevos inhibidores de EGFR.	25
Figura 20. Estructura química de VII y VIII	26
Figura 21. a) Modelo para sitios de unión de agonistas (rojo) y antagonistas (azul) en Smo; modo de unión y principales interacciones de Smo en 2D para: b) Purmorfamina (agonista); y c) Taladegib (antagonista).	27
Figura 22. Ligandos moduladores de Smo, de los cuales se basa la propuesta de investigación.	31
Figura 23. Estructuras químicas de derivados heterocíclicos propuestos en esta tesis, destacándose en color los fragmentos considerados de moduladores de Smo.	31
Figura 24. Equilibrio tautomérico del núcleo de purina.	52
Figura 25. Solapamiento de espectros de RMN- ¹ H, CDCl ₃ , de los regioisómeros 3a' (azul) y 3a (rojo).	53
Figura 26. Espectros de ¹ H/ ¹³ C HMBC, en CDCl ₃ , ampliados en las zonas de acoplamiento de H1' con los respectivos carbonos, compuesto 3a' (izquierda); compuesto 3a (derecha).	54

Figura 27. Espectro de RMN- ¹ H (ampliado en zona alifática), en CDCl ₃ , para ligando 3b .	54
Figura 28. Espectro de RMN- ¹³ C, en CDCl ₃ , para ligando 3b .	55
Figura 29. Espectro de RMN- ¹ H, en CDCl ₃ , del compuesto 4a .	58
Figura 30. Espectro de RMN- ¹³ C, en CDCl ₃ , ampliado en las señales de los carbonos cuaternarios unidos/cercano a átomos de flúor, correspondiente al compuesto 4a .	58
Figura 31. Espectro de RMN- ¹ H, en CDCl ₃ , del <i>tert</i> -butil-4-(3-metil-2-fenil-1-piperidin-1-carboxilato)piperidin-1-carboxilato 7l .	61
Figura 32. Espectro de RMN- ¹ H, en DMSO- <i>d</i> ₆ , del compuesto final 9n .	63
Figura 33. Espectro de RMN- ¹ H, en CDCl ₃ , del ligando final 16a .	66
Figura 34. Gráficos de viabilidad celular a concentración constante (25 μM), de los ligandos 9a-p frente a las líneas celulares cancerígenas y sanas, (<i>t</i> - <i>student</i> no paramétrico comparando con el control; *: p < 0,05, **: p < 0,01 y #: p < 0,001).	68
Figura 35. Gráficos de viabilidad celular a 50 μM de los ligandos 9a-p , (<i>t</i> - <i>student</i> no paramétrico comparando con el control; *: p < 0,05, **: p < 0,01 y #: p < 0,001).	69
Figura 36. Gráficos de viabilidad celular a 50 μM de los ligandos 10a-p , (<i>t</i> - <i>student</i> no paramétrico comparando con el control; *: p < 0,05, **: p < 0,01 y #: p < 0,001).	70
Figura 37. Compuestos con mejor potencia y selectividad frente a líneas celulares de cáncer de páncreas.	76
Figura 38. Estructuras químicas de los compuestos VII y 11c , remarcando diferencia estructural (azul).	77
Figura 39. Superposición de receptores con sus ligandos de co-cristalización, Anta XV (magenta) y SANT-1 (verde claro).	79
Figura 40. Superposición de Anta XV (verde claro) y ligando 11a (magenta), en cristal 4QIM con sitio de 4,5 Å.	80

Figura 41. Huellas dactilares de las interacciones proteína-ligando en cristal 4QIM , a) códigos de barras y b) población.....	83
Figura 42. Interacciones intermoleculares entre ligando 11c (magenta) y residuos Arg400, Asp473 y Tyr394.....	83
Figura 43. Interacciones del tipo puente de hidrógeno entre ligando 16g (magenta) y residuos Arg400, Asp473.	84
Figura 44. Interacción tipo puente de hidrógeno entre residuo Asp473 y ligando 16d	85
Figura 45. Interacción entre vismodegib y residuo Phe484.	86
Figura 46. Superposición de SANT-1 (amarillo) y 11a (magenta) en sitio de unión de cristal 4N4W	87
Figura 47. Interacción catión- π , entre el residuo Arg400 y el ligando 11g . ..	89
Figura 48. Huellas dactilares de las interacciones proteína – ligando del cristal 4N4W , a) códigos de barras y b) población.....	90
Figura 49. Interacción entre ligando VII y residuos Arg400 y Tyr394 en cristal 4QIM	91
Figura 50. Grafico circular de los resultados obtenidos de PhamMapper para el ligando 10a	93
Figura 51. Gráfico circular de los resultados de ChemMapper para el ligando 10a	94

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Retrosíntesis general para los tres tipos de compuestos finales propuestos de las Series I y II	40
Esquema 2. Síntesis de compuestos de la Serie I . <i>Reactivos y condiciones:</i> i) K ₂ CO ₃ , DMF, 6 h, t.a.; ii) ácido 4-trifluorometoxifenil borónico, Pd(PPh ₃)Cl ₂ , K ₂ CO ₃ 2 M, dioxano, 2 h, reflujo; iii) Et ₃ N, THF, 3 h, t.a.; iv) TFA, CH ₂ Cl ₂ , 2 h, t.a. luego tolueno; v) DIPEA, <i>n</i> -butanol, 12 h, reflujo.	41
Esquema 3. Síntesis de compuestos de la Serie II . <i>Reactivos y condiciones:</i> i) K ₂ CO ₃ , DMF, 6 h, t.a.; ii) ácidos borónicos, Pd(PPh ₃)Cl ₂ , K ₂ CO ₃ 2 M, dioxano, 2 h, reflujo; iii) DIPEA, <i>n</i> -butanol, 12 h, reflujo; iv) <i>N</i> -metilpiperazina, K ₂ CO ₃ , DMF, 2 h v) hidracina, Pd-C, etanol, 70 °C, 2 h. vi) 15a/15b , Pd(OAc) ₂ , XantPhos, K ₂ CO ₃ 2 M, dioxano, 12 h, reflujo.	42
Esquema 4. Reacción de alquilación de 2-cloro-6-fluoro-9 <i>H</i> -purina y 2,6-dicloro-9 <i>H</i> -purina (1). <i>Reactivos y condiciones:</i> K ₂ CO ₃ , DMF, 6 h, t.a.	52
Esquema 5. Reacción general de acoplamiento carbono-carbono tipo Suzuki-Miyaura.	56
Esquema 6. Ciclo catalítico de la reacción de acoplamiento carbono – carbono tipo Suzuki-Miyaura.	57
Esquema 7. Síntesis convergente general para los derivados de <i>tert</i> -butil-4-(benzamido)piperidin-1-carboxilato y sus respectivos sustituyentes.	59
Esquema 8. Reacción ejemplo de sustitución nucleofílica aromática entre el compuesto 4a y el derivado de benzamida 8n	62
Esquema 9. Ciclo catalítico de la reacción Buchwald – Hartwing para la obtención de los ligandos restantes de la Serie II	64

RESUMEN

Diferentes estudios han demostrado que la activación aberrante de la vía de señalización Hedgehog (Hh), estaría involucrada en el origen de diversos tipos de cáncer humanos, entre ellos, el de pulmón, colon y páncreas. Hay numerosos estudios que demuestran que diferentes moléculas pequeñas presentan un efecto inhibitorio en la vía de señalización Hedgehog (Hh). Específicamente, estos moduladores de Hh tienen como blanco farmacológico al receptor Smoothened (Smo). Ejemplo de ello, es el fármaco vismodegib, un antagonista de Smo, utilizado en el tratamiento del carcinoma de células basales y meduloblastoma. Sin embargo, en reportes recientes, se ha detectado resistencia a este fármaco debido a nuevas mutaciones en Smo, lo que obliga a desarrollar nuevos ligandos más eficaces.

En función de lo anterior, en esta tesis se diseñaron y sintetizaron 50 nuevos derivados de purina 2,6,9-trisustituida (**Series I y II**), basados en fragmentos de moléculas bioactivas y con actividad sobre Smo. Las metodologías de síntesis para acceder a estos nuevos compuestos involucraron reacciones de química orgánica clásica. Los compuestos obtenidos fueron caracterizados a través de diferentes técnicas. Por un lado, se evaluó la viabilidad celular en líneas cancerígenas de páncreas, meduloblastoma y células no neoplásicas. Estos fueron comparados con los controles vismodegib y gemcitabina (fármaco utilizado para el tratamiento de adenocarcinoma pancreático), dando cuenta que 10 ligandos de la **Serie II** presentaron un IC_{50} menor a 10 μ M en diferentes líneas celulares cancerígenas de páncreas, pero solo 4 de éstos (**11c**, **16c**, **16g** y **16f**) presentaron un índice de selectividad razonable para futuros estudios biológicos. Para el caso de la **Serie I**, no se pudo evaluar su citotoxicidad debido a la baja solubilidad. Luego se realizó un estudio bioinformático para determinar los diferentes modos de unión de los ligandos de la **Serie II** con el receptor Smo, dando cuenta que varios de estos ligandos

presentan interacciones del tipo puente de hidrógeno con aminoácidos del sitio de unión esperado en este estudio. Para ligandos de la **Serie I**, se realizó un estudio de anclaje reverso para encontrar un modelo farmacológico adecuado para este tipo de ligandos, siendo el receptor de adenosina A₁ uno de ellos.

ABSTRACT

Different studies have shown that aberrant activation of the Hedgehog (Hh) signaling pathway could be involved in the origin of several types of human cancer, including lung, colon, and pancreas. In addition, numerous studies showed that different small molecules have an inhibitory effect on the Hh signaling pathway. Specifically, these Hh modulators target the Smoothed (Smo) receptor. An example of this is the drug vismodegib, a Smo antagonist, used to treat basal cell carcinoma and medulloblastoma. However, in recent reports, resistance to this drug has been detected due to new mutations in Smo, which requires the development of new, more efficient ligands.

Based on the above, in this thesis, new fifty 2,6,9-trisubstituted purine derivatives (**Series I** and **II**) were designed and synthesized based on fragments of Smo bioactive molecules. Synthetic methodologies to obtain these new compounds involved classical organic chemistry reactions. The compounds obtained were structurally characterized through different techniques. Also, cell viability was evaluated in pancreatic cancer lines, medulloblastoma, and no-neoplastic cells. These were compared with the controls vismodegib and gemcitabine, the latter used to treat pancreatic adenocarcinoma, showing that ten ligands of **Series II** presented an IC₅₀ value of less than 10 µM in different pancreatic cancer cell lines. However, only four of these (**11c**, **16c**, **16g**, and **16f**) presented a good selectivity index for this cancer. On the other hand, the ligands of **Series I** did not was determined their cytotoxicity, due to their low solubilities. A bioinformatic study to determine the different binding modes of the **Series II** ligands with the receptor was carried out, realizing that several of these ligands have hydrogen-bridge-type interactions with amino acids of the binding site expected in this study. For **Series I** ligands, a reverse docking study was carried out to find a suitable

pharmacological model for this type of ligands, where adenosine A₁ receptor was one of them.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1. EL CÁNCER, UN PROBLEMA DE SALUD MUNDIAL

El cáncer es una de las principales patologías que afectan a la población a nivel mundial, lo que la convierte en la segunda causa de muerte después de las enfermedades cardiovasculares.[1] La Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) y el Ministerio de Salud de Chile (MINSAL), indicaron que, en el año 2013, Chile tuvo una tasa de incidencia de 175,5 nuevos casos por cada 100.000 habitantes y una tasa de mortalidad de 139 por cada 100.000 habitantes. Además, todo indica que estas cifras aumentarán en los próximos años. Por definición, el cáncer es el proceso de proliferación descontrolado de células anormales con capacidad de invasión a otras regiones del cuerpo, a través del proceso conocido como metástasis, siendo este proceso la causa del 90 % de las muertes por esta enfermedad.[2] Uno de los grandes problemas en relación al tratamiento del cáncer es que esta patología no presenta un solo tipo, sino que existen más de 200 clases diferentes de cáncer, por lo que un tratamiento que es eficaz en el control de uno puede ser ineficaz en otro. Los cánceres de mayor incidencia son: de estómago, pulmón, mama, colon, cervicouterino, próstata y páncreas.[3,4] A raíz de lo cual, se hace necesario contar con nuevas terapias más eficientes, que ayuden a aumentar la esperanza y calidad de vida de los pacientes que padecen esta enfermedad.

Esta enfermedad puede ser iniciada por un carcinógeno, del tipo químico, físico o biológico. Ejemplo de ellos son la radiación ionizante, ultravioleta, productos químicos procedentes de la industria, humo del tabaco y de la contaminación en general, estilos de vida no saludables, agentes infecciosos como el virus del papiloma humano y *Helicobacter pylori*, las alteraciones genéticas, entre otras. Los defectos genéticos pueden dar lugar a diversas anomalías celulares que están asociadas al cáncer, dentro de las cuales se encuentra la insensibilidad a las señales de inhibición de crecimiento, anomalías en la regulación del ciclo celular,

evasión de la muerte celular programada (apoptosis), división celular ilimitada, reprogramación del metabolismo y vías de señalización anormales, entre otros.[2,5]

1.2 CANCER DE PANCREAS Y SU INCIDENCIA EN CHILE

El cáncer de páncreas es una de las enfermedades más letales dentro de los distintos tipos de carcinomas. En países desarrollados la sobrevida estimada para esta enfermedad no supera el 5 % luego de 5 años de seguimiento.[6] En Chile, la incidencia de cáncer de páncreas estimada es de 5,5 casos por 100.000 habitantes hombres y 4,9 casos por 100.000 habitantes mujeres.[7] Además, en 2015, el carcinoma pancreático se situó como la quinta causa de muerte por cáncer a nivel nacional, con una tasa de 7,5 muertes por cada 100.000 habitantes para ambos sexos, observándose un aumento sostenido en la mortalidad por esta causa en el periodo 1997 – 2015 (MINSAL, 2015). Pese a los intentos de mejorar las expectativas de vida de los pacientes con cáncer de páncreas, los logros y el impacto real han sido mínimos comparado con los éxitos en el manejo de otros tipos de cáncer. El tratamiento para escoger va a depender del avance del carcinoma, ya sea la quimioterapia y/o la extracción quirúrgica del tumor, donde ésta última es la única opción terapéutica potencialmente curativa. Sin embargo, debido a la falta de síntomas tempranos, a la gran mayoría de los pacientes se les detecta en su etapa metastásica, lo que en muchos casos es inoperable.

1.3 VÍA DE SEÑALIZACIÓN HEDGEHOG Y SU RELACION CON EL CÁNCER

Diversos estudios han demostrado que la activación aberrante de la vía de señalización Hedgehog (Hh) estaría involucrada en el origen de diversos tipos de cáncer.[8–10] Por lo tanto, esta vía de señalización representa un atractivo blanco terapéutico para el desarrollo de nuevos fármacos que puedan contribuir en el tratamiento de esta enfermedad.

La vía de señalización Hedgehog en su estado normal, está altamente conservada en los seres humanos y es esencial para el desarrollo normal del embrión. En los mamíferos, la vía Hh regula la embriogénesis temprana y la morfogénesis de órganos, tejidos específicos y mantenimiento de células madre. La vía Hh está silenciada en la mayoría de los tejidos adultos, pero puede reactivarse después de una lesión, para promover la reparación y regeneración,[11] como en los tejidos que se renuevan continuamente, por ejemplo el epitelio que recubre el intestino.[8] La señalización aberrante puede ser consecuencia de mutaciones en genes de la ruta o la sobreexpresión de la señalización, por lo cual está implicado en el desarrollo de varios tipos de cáncer humanos, como el carcinoma de células basales (CCB),[12,13] meduloblastomas,[14] adenocarcinoma pancreático,[1,15,16] mamas, colón, ovario y próstata.[17]

Los componentes centrales de la vía Hh en mamíferos se muestran en la **Figura 1**, y estos consisten en: un regulador negativo llamado *Patched* (Ptch), el cual es un receptor de 12 dominios de transmembrana al cual se une un ligando Hh (polipéptido secretado por células del entorno que actúa como molécula señalizadora), iniciando la transducción de la señal. En segundo lugar, encontramos un regulador positivo, el receptor *Smoothed* (Smo), de 7 dominios transmembrana, clasificable como tipo receptor acoplado a proteína G (GPCR) de clase Freezle.[18] Además, esta vía Hh está compuesta por factores transcripcionales llamados Gli (Gli1, Gli2 y Gli3), que presentan funciones reguladoras y represoras dentro de ésta;[19] un gen supresor tumoral (SuFu) y diversas proteínas quinasas, entre otros componentes.[14]

Esta vía se puede localizar en el cilio primario, que es una proyección celular o antena, que incluye la mayor parte de la maquinaria de señalización en células y contiene una familia de proteínas quinasas que regulan el transporte intraflagelar. Estudios recientes han demostrado que este tipo de transporte es esencial para el ensamblaje y función de los cilios primarios, por lo cual se hacen necesarios para la señalización Hh.[20]

La Figura 1 presenta un esquema donde se representan los dos estados dinámicos que involucran la vía canónica de señalización Hh, la forma activa e inactiva. La vía Hh activa, en la cual el ligando Hh se une al receptor Ptch, produce una internalización endosomal del complejo al citoplasma. Esto provoca que no exista localización en el cilio, para luego ser degradado por los lisosomas. Luego, el receptor Smo es fosforilado por proteínas quinasa (CK1 α y GSK3 β), acumulándose en el cilio primario, activando la cascada de señalización. Esto da como resultado la traslocación del complejo de SuFu-Gli al cilio, seguido por la disociación de éste, generando la internalización de Gli-2 y Gli-3 en sus formas activas al núcleo. De esta manera, se inicia la transcripción de genes diana Hh que favorecen la proliferación y diferenciación celular.

El estado inactivo de la vía Hh (Figura 1b), se caracteriza por la ausencia de un ligando Hh. Esto conlleva a que Ptch suprima la fosforilación de Smo, evitando su acumulación en el cilio e internalizándolo al citoplasma mediante vesículas endosomales. Sin embargo, es importante destacar que aún no se ha logrado demostrar completamente este mecanismo. Por otro lado, SuFu inhibe los factores de transcripción Gli-2 y Gli-3 a través de una interacción directa, seguido por la fosforilación de Gli-2 y Gli-3 por las proteínas quinasa (PKA, CK1 α y GSK3 β). Así, se promueve el procesamiento proteolítico a través del proteosoma, dando paso a sus formas represoras (Gli-2R y Gli-3R). Finalmente, Gli-3R es traslocado al núcleo, impidiendo la transcripción de genes diana de Hh.

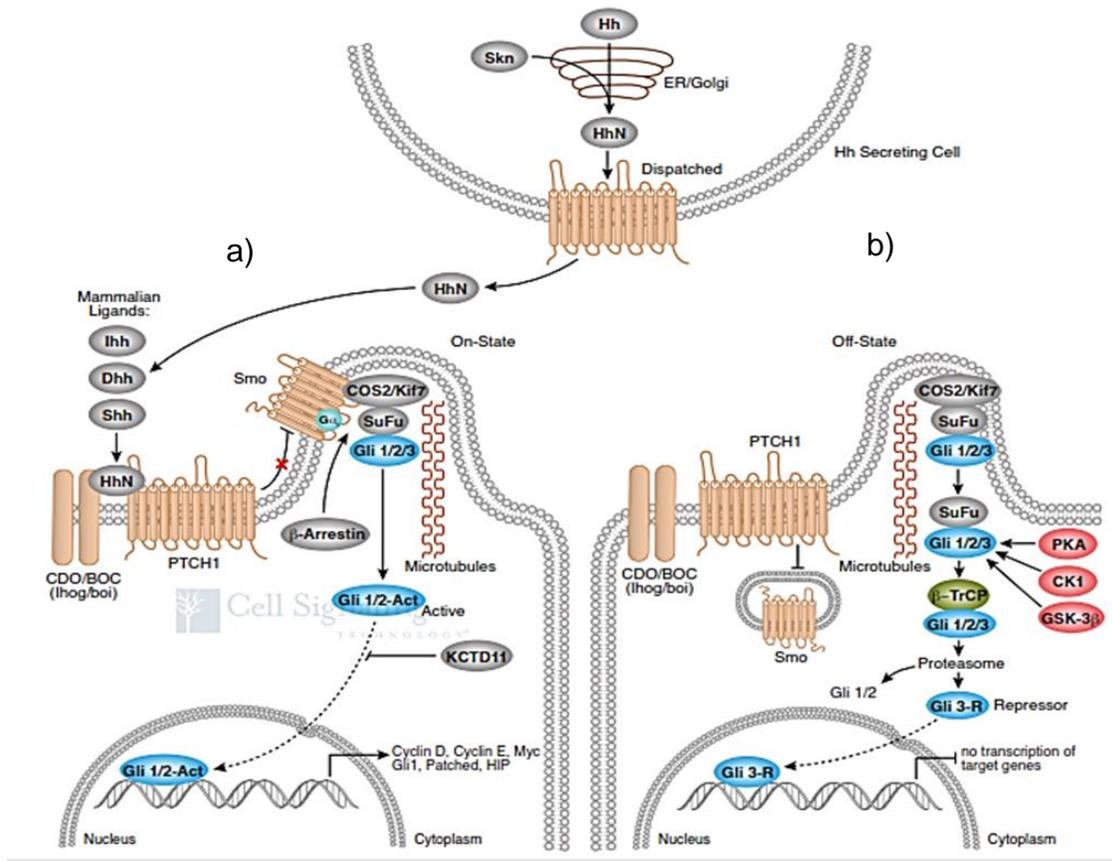


Figura 1 Descripción general de la vía Hedgehog, a) en presencia de ligando (activa); y b) en ausencia de ligando (inactiva).[14]

El mecanismo por el cual se generan ciertos tipos de cáncer, como consecuencia de la alteración y activación de la vía Hh, puede ocurrir tanto por una sobreexpresión de ligandos Hh, denominado ligando dependiente, o por la mutación de proteínas u otros elementos que componen la vía, denominado ligando independiente. Los principales mecanismos para explicar la activación aberrante de la vía celular descrita en literatura son:[21–25]

- *Ligando independiente*: impulsado por mutación en Ptch, la que fue descubierta en pacientes con síndrome de Gorlin, un trastorno genético hereditario, donde las personas que padecen este síndrome tienen una alta incidencia de CCB, meduloblastoma y rabdomiosarcoma (Figura 2a). También se han descubierto

mutaciones en el gen supresor tumoral SuFu e incluso mutaciones en los factores transcripcionales Gli y Smo.

- *Dependiente de ligandos Hh, tipo autocrina*: las células cancerígenas secretan el ligando Hh activando la cascada de señalización. Este tipo existe en líneas celulares humanas de cáncer de colon (Figura 2b)
- *Dependiente de ligandos Hh, tipo paracrina*: proteínas Hh pueden estimular las células del estroma cerca del tumor (células endoteliales, células epiteliales, fibroblastos y células del sistema inmune). Esto resulta en un apoyo indirecto para el crecimiento tumoral a través de mecanismos originarios de las células del estroma. En este caso existe una mayor incidencia en cáncer de páncreas y colorrectal (Figura 2c).
- *Dependiente de ligandos Hh, tipo paracrina inversa*: es una variante del tipo paracrina, en la que los ligandos Hh se secretan a partir de células estromales para recibir células en un tumor (Figura 2d).

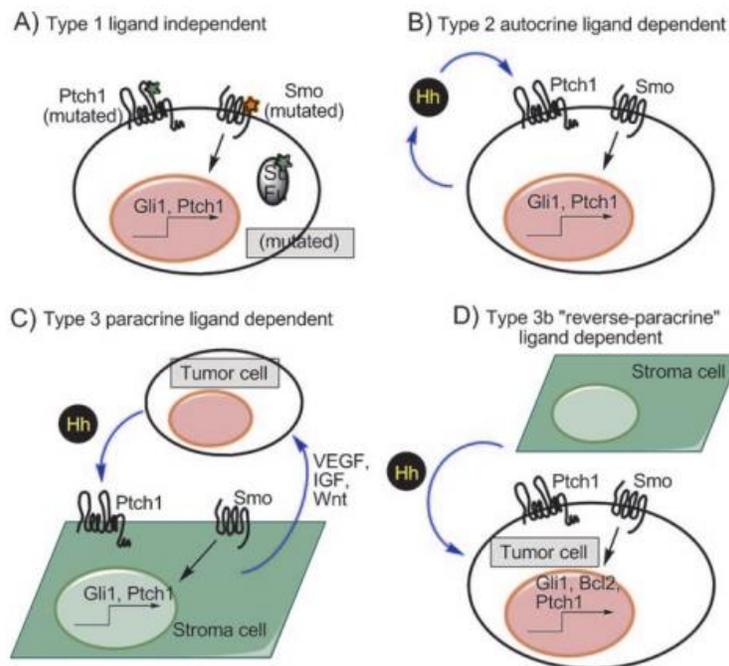


Figura 2. Modelos para el desarrollo de cáncer que implican la vía de señalización Hh. **a)** Ligando independiente, **b)** autocrina; **c)** paracrina; **d)** paracrina inversa.[21]

El desarrollo de estrategias dirigidas a esta vía se podría destinar a cualquiera de los componentes de la cascada de señalización. Sin embargo, casi todos los moduladores de esta vía de señalización tienen como objetivo al receptor Smo, debido a la versatilidad farmacológica de las proteínas tipo GPCR.

1.4 CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE SMO

La alta resolución de diversos dominios de Smo correspondientes a la región extracelular o transmembranal, obtenidos por técnicas cristalográficas y de resonancia magnética nuclear (RMN), han permitido comprender las particularidades de este receptor. La secuencia completa para Smo comprende 787 aminoácidos, pero las estructuras cristalográficas solo implican la mayoría de estos residuos establecidos en varios dominios los cuales se encuentran organizados de la siguiente forma (Figura 3): i) Dominio Extracelular (ECD, por su sigla en inglés) seguido de un dominio *linker* extracelular, ii) Dominio transmembrana de 7 hélices (TM) y iii) Dominio citoplasmático, según se representa en la Figura 3. Aunque su acoplamiento a proteínas G ha sido motivo de gran debate, Smo fue clasificado como un tipo especial de GPCR de la familia Frizzled (clase F). Esto último obedece al hecho que la región N-terminal del ECD está compuesta de un dominio rico en cisteínas (CRD, por su sigla en inglés), característica altamente conservada en las GPCR's de clase F y a la alta identidad de secuencia entre éstas. Por otro lado, estas cisteínas están implicadas en la formación de puentes disulfuros que cumplen el rol de mantener la integridad estructural del receptor Smo en un estado inactivo. Mutaciones en éstas cisteínas se han visto involucradas en un aumento de la actividad de este receptor.[26]

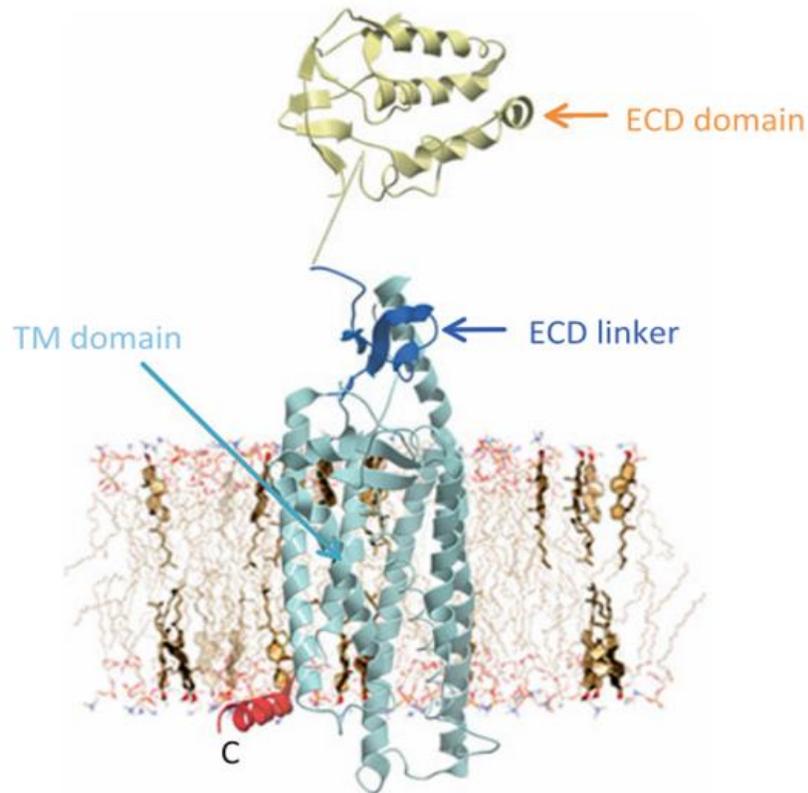


Figura 3. Modelo para la estructura del receptor Smo basado en evidencia cristalográfica existente de los principales dominios resueltos. [27]

1.5 SITIOS DE UNIÓN DE LIGANDOS A SMOOTHENED

Respecto a sitios de unión de ligandos a Smo, se han descrito dos lugares que pueden albergar a diferentes tipos de ligandos, ubicados en CRD y TM. Estudios recientes han confirmado que el colesterol es un agonista endógeno de Smo y que activa al receptor por unión a un sitio en la región CRD. A este mismo sitio también se unen otros derivados del tipo esteroides, como hidroxi-esteroides y corticosteroides.[29] Sin embargo, es el sitio ortoestérico (por analogía a sitio de unión primario de GPCR), de la región TM, el que ha sido estudiado mayormente, debido a que diversos ligandos han sido cristalizados en este dominio. Este sitio ortoestérico, puede alojar numerosos moduladores de Smo (Figura 4).

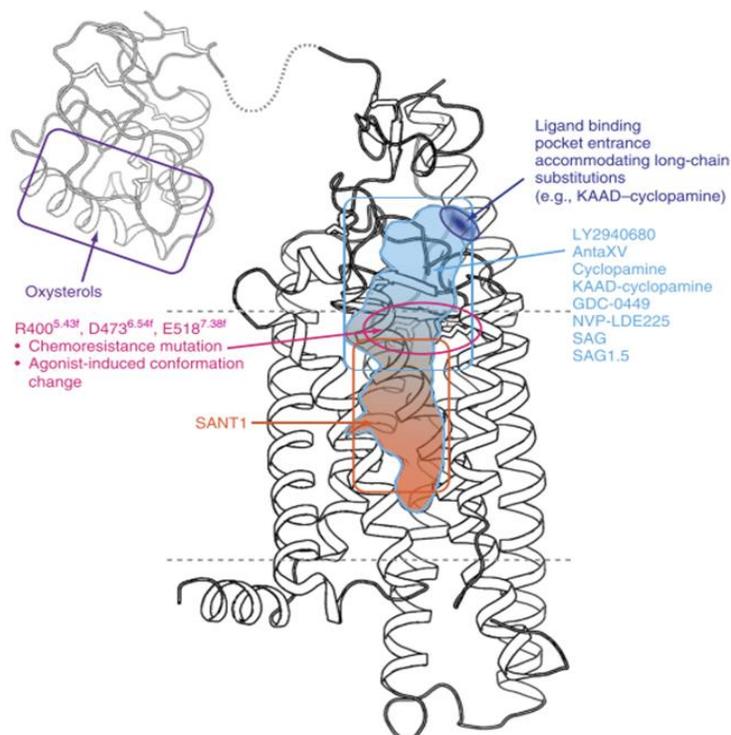


Figura 4. Modelo para los sitios de unión de agonistas y antagonistas en Smo, obtenidos por estructuras cristalográficas.[28]

La primera molécula pequeña en ser descubierta fue ciclopamina (Figura 5), que corresponde a un alcaloide esteroidal derivado de la planta *Veratrum californicum*,[21] el cual se ha utilizado ampliamente para estudiar la señalización Hh. Se ha demostrado que ésta se une directamente al receptor Smo provocando un cambio conformacional inhibiendo su actividad, lo que se traduce en la inhibición de la vía de señalización Hh.[11,12,30,31] Sin embargo, ciclopamina presenta una baja afinidad con el receptor, una biodisponibilidad oral deficiente, una farmacocinética ineficiente y una baja estabilidad metabólica con el paso de los años. A raíz de esto, se realizaron diversas modificaciones en los anillos de la ciclopamina que condujeron a nuevos derivados que aumentaron tanto en potencia como en estabilidad.[32,33]

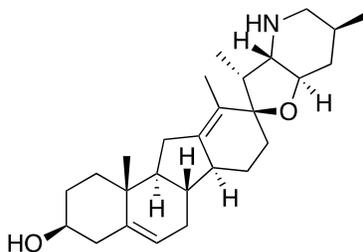


Figura 5. Estructura de ciclopamina, primer antagonista Smo.

Para sobrellevar las deficiencias mencionadas, hasta la fecha se han sintetizado variados ligandos que presentan la capacidad de unirse al receptor Smo. Ejemplo de agonistas de este receptor podemos encontrar a SAG1.5[27] y purmorfamina (Figura 6).[34] En cuanto a la industria farmacéutica, ésta ha elaborado una variedad importante de ligandos antagonistas de esta vía de señalización, que se encuentran en ensayos preclínicos y clínicos, siendo eficaces en modelos de meduloblastoma,[35] adenocarcinoma de páncreas[23] y otros tumores. Robarge y colaboradores, a través de estudios de relación estructura-actividad en una variedad de heterociclos y ensayos de gen reportero Gli-luciferasa, determinaron que 2-pirimidilaminas funcionalizadas, presentan mejor perfil farmacológico en la vía Hh. Por lo tanto, realizaron modificaciones en una porción amida para aumentar la potencia de éstos, concluyendo que el compuesto GDC-0449 (vismodegib, Figura 6) era el mejor candidato. A la fecha, este ligando está aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA, 2012) para el tratamiento de carcinoma de células basales[36] y meduloblastoma.[37] La actividad de vismodegib ha sido contrarrestada por el desarrollo de mutaciones generando formas resistentes de Smo que dan lugar a su completa pérdida de eficacia.[27]

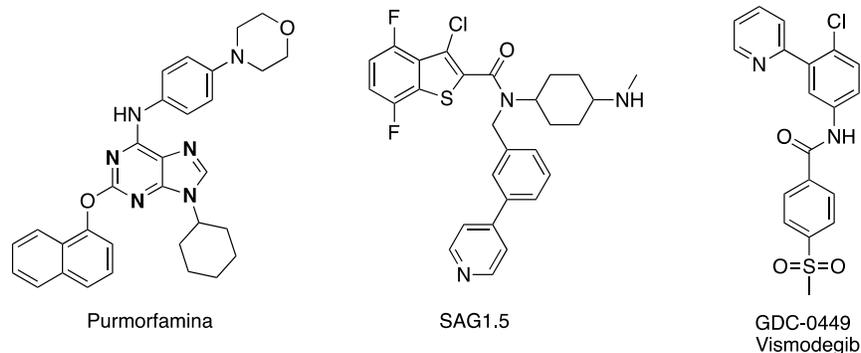


Figura 6. Estructura de los agonistas purmorfamina y SAG1.5; y antagonista vismodegib.

El segundo inhibidor que ha demostrado eficacia clínica es NVP-LDE225 (Sonidegib, Figura 7), un compuesto desarrollado por Novartis.[38] Este fue aprobado en el año 2015 por la FDA para el tratamiento de carcinoma de células basales avanzada y para meduloblastoma.[39] Otros inhibidores de la vía de señalización Hh que han demostrado ser antagonistas eficaces de la misma se encuentran LY2940680 (Taladegib), [40,41] Anta XV y BMS-833923 (Dasatinib, Figura 7), este último se encuentra en estudios clínicos de fase I y II para tumores sólidos avanzados de carcinoma de células basales, leucemia mieloide crónica, esofágico, gástrico, mieloma múltiple y células pequeñas de pulmón.[9]

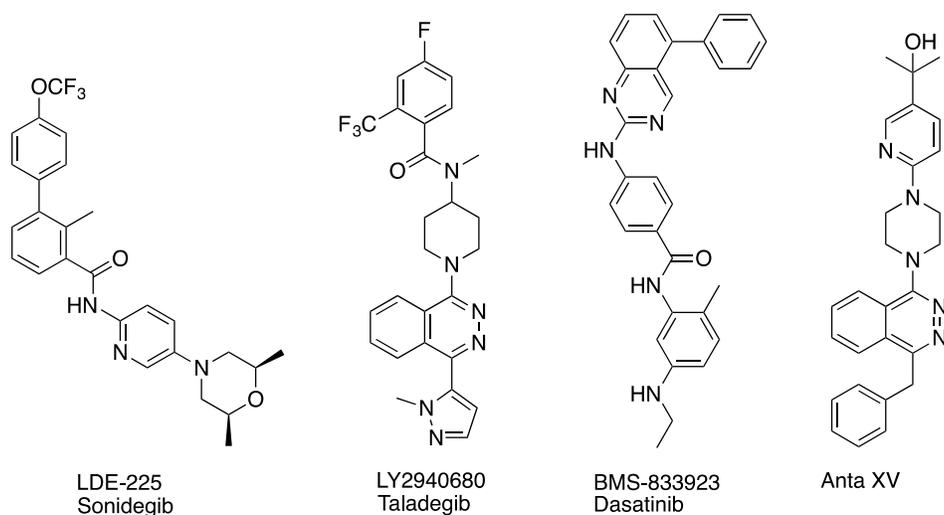


Figura 7. Estructuras químicas de algunos antagonistas de Smo.

Hasta la fecha, se han propuesto tres tipos de mecanismos para explicar esta resistencia: mutaciones en Smo que impiden que los ligandos se unan, amplificación cromosómica de los efectores descendentes de la vía de señalización de Hh, como Gli-2, y el aumento de la actividad oncogénica de algunas vía de señalización que se cruzan con Hh. Estos tres mecanismos pueden reactivar la señalización de Hh y restauran el crecimiento tumoral. Siendo las mutaciones en Smo las causas más comunes en tumores resistentes de CCB.[42] Las mutaciones estudiadas que influyen en la resistencia de fármacos como vismodegib, se encuentra Asp473 (Hys) y Glu518 (Lys),[27,43] por lo tanto, es fundamental considerar esta mutación en el diseño de nuevas moléculas.

1.6 CÁNCER DE PÁNCREAS Y SU RELACIÓN CON LA VÍA HH

Como se mencionó anteriormente, el tratamiento a escoger para tratar el cáncer de páncreas dependía del avance del carcinoma, los medicamentos más utilizados para tratamiento son los quimioterapéuticos: 5-fluorouracilo, irinotecan, oxaliplatino, nab-paclitaxel, gemcitabina y la terapia combinada FOLFIRINOX, donde éstos dos últimos son de primera línea en el tratamiento (Figura 8).[44,45] Aunque son la mejor alternativa para los pacientes que padecen esta enfermedad, estas terapias eliminan la mayoría de las células tumorales diferenciadas, excepto las células madres cancerígenas (CMC).[46] Estas CMC favorecen la reactivación del crecimiento tumoral y son de difícil erradicación, a pesar de que comprenden una pequeña fracción de las células del cáncer de páncreas (0,2 a 0,8 %). Además, como son muy tumorigénicas y poseen la capacidad de autorrenovación, producen una progenie diferenciada que ha mostrado resistencia a los fármacos de quimioterapia y un papel en la progresión de la enfermedad metastásica.[47]

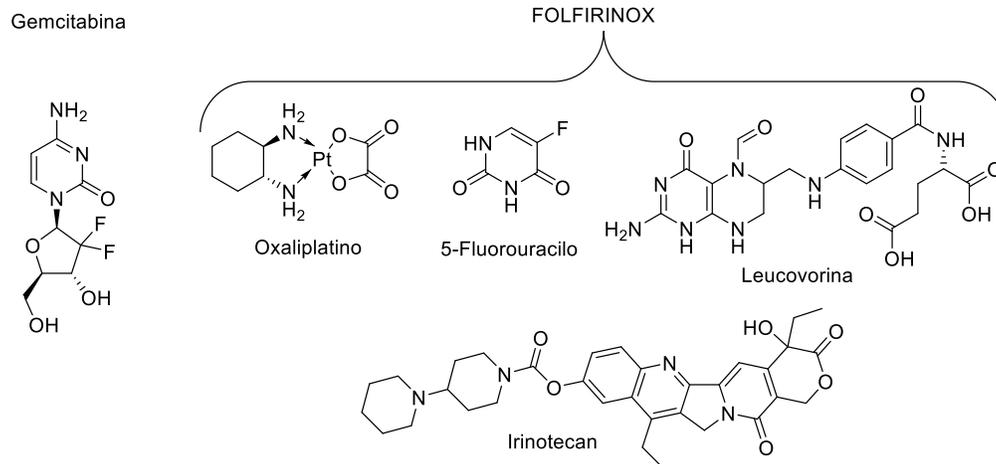


Figura 8. Fármacos de primera línea en el tratamiento del adenocarcinoma pancreático.

La vía de señalización Hh está genéticamente alterada en la mayoría de los tipos de cáncer de páncreas,[48,49] donde en casi el 70 %, los componentes Ptch y Smo se presentaron mutaciones. En consecuencia, la vía de señalización Hh puede desempeñar un papel crítico en la génesis de las células de cáncer de páncreas.[50] Estudios *in vitro* e *in vivo* dan cuenta que esta vía de señalización se reactiva aberrantemente y se reconoce como uno de los mediadores del cáncer de páncreas, debido a que las CMC son las que desempeñan un papel clave en la sobrevivencia y proliferación de éste.[6,50,51] Estas células son responsables del inicio, autorrenovación, mantenimiento y metástasis del tumor debido a su capacidad para expresar proteínas antiapoptóticas y resistentes a fármacos.

Mahato y colaboradores estudiaron el efecto de vismodegib en líneas celulares de cáncer de páncreas humanas, que incluyen CMC de páncreas.[6] Por otro lado, ensayaron la combinación de vismodegib/gemcitabina (nanoemulsionadas), en una línea celular de cáncer de páncreas (MIA-PaCa-2), donde observaron una regulación negativa sinérgica en los componentes de la vía Hh, induciendo apoptosis y disminución del tamaño del tumor.[51] Gracias a esto, diseñaron, a través de estudios de simulación molecular en el receptor Smo, nuevos análogos

de vismodegib, los cuales tienen en común el núcleo de *N*-[3-(2-piridinil)fenil]benzamida (Figura 9).[46]

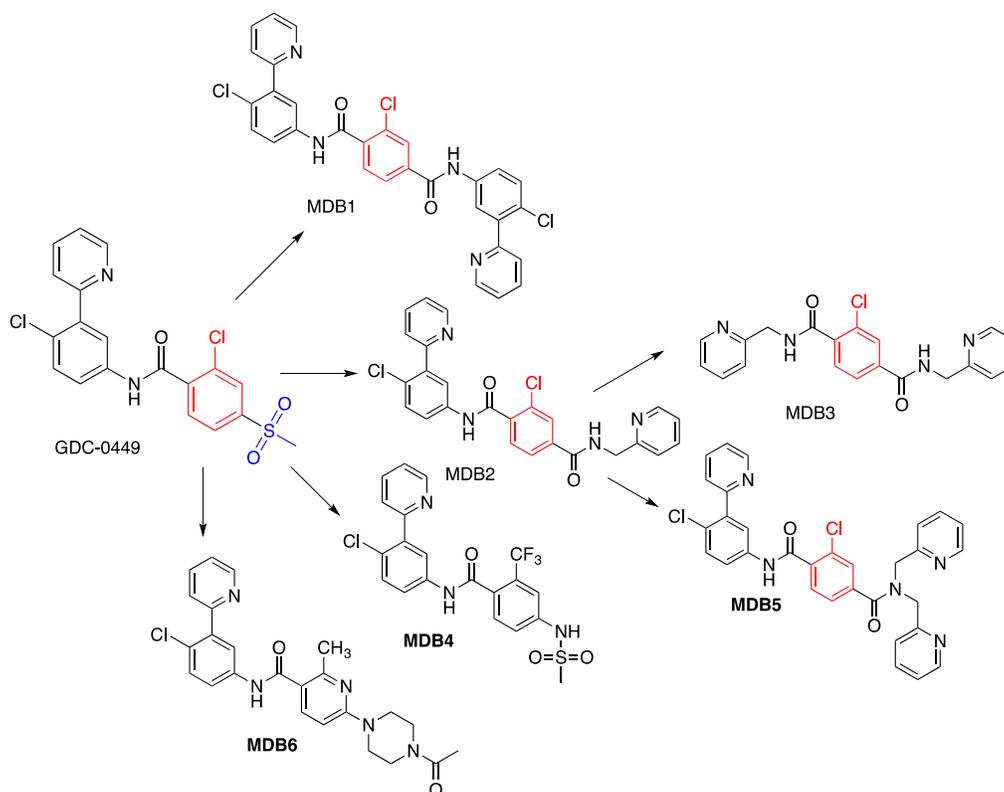


Figura 9. Relación estructural para el diseño de nuevos análogos de vismodegib.

Este estudio reveló que el ligando 2-cloro-*N*¹-[4-cloro-3-(2-piridinil)fenil]-*N*⁴,*N*⁴-bis(2-piridinilmetil)-1,4-benzenodicarboxamida (MDB5, Figura 9) es el análogo que presentó un mejor score de acoplamiento con el receptor “nativo (*Wild Type*)” (-12,84 kcal/mol), con respecto al fármaco vismodegib (-9,41 kcal/mol). Ambos ligandos comparten las mismas interacciones del tipo puente de hidrógeno en el sitio activo, con Asp384, Arg400 Tyr394 (Figura 10). Además, los grupos piridinilmetilo en MDB5 permiten interacciones adicionales con Asp382, Tyr397 y Phe484. La disminución del valor de acoplamiento en el receptor Smo mutado Asp473Hys, también es mejor en MDB5 que vismodegib, pero en ambos bajó el score, -10,76 kcal/mol y -7,21 kcal/mol respectivamente. En relación con los resultados biológicos, la evaluación de citotoxicidad en la línea celular de cáncer de

páncreas mostró que MDB5 es el mejor candidato (55,57 μM) frente a los demás derivados, incluyendo vismodegib (97,36 μM).

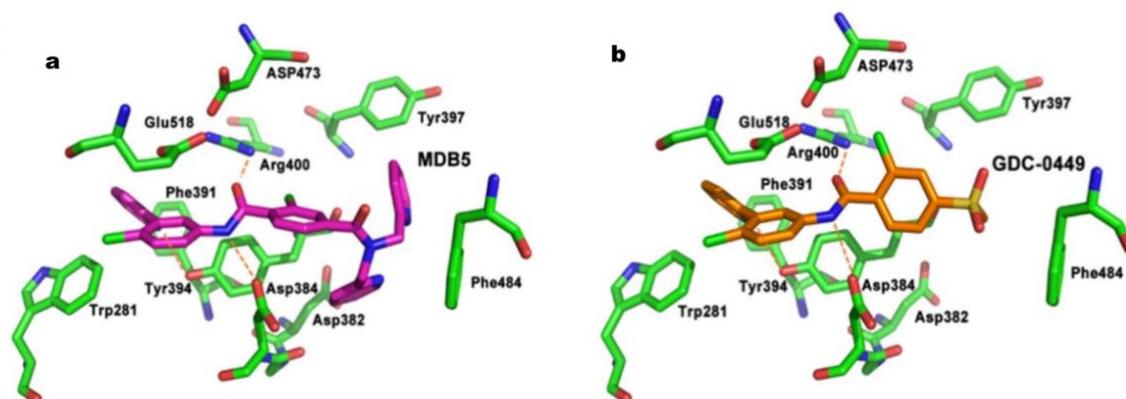


Figura 10. a) Interacciones Smo con ligandos MDB5; **b)** vismodegib. Las interacciones tipo puentes de hidrógeno se representan como líneas de puntos naranjas.[46]

Por otra parte, los estudios específicos de inhibición de la vía Hh mostraron nuevamente que MDB5 fue más eficiente en la inhibición de los componentes de la vía, medida por Gli-1 y SHh, en los niveles de transcripción y traducción (Figura 11a y b). Además, se observó una reducción significativa de ALDH1, CD44 y Oct-3/4, marcadores claves de las CMC pancreáticas, cuando las células MIA-PaCa-2 se trataron con MDB5 en comparación con vismodegib (Figura 11c). Por otro lado, un modelo de ratón tumoral pancreático fue tratado con nanopartículas que contenían MDB5, mostrando una inhibición significativa del crecimiento tumoral, sin pérdida de peso corporal. Estas pruebas destacan la mejora de la inhibición de la vía Hh y las propiedades anticancerígenas de MDB5, dejando una plataforma para terapia única o combinada.[46]

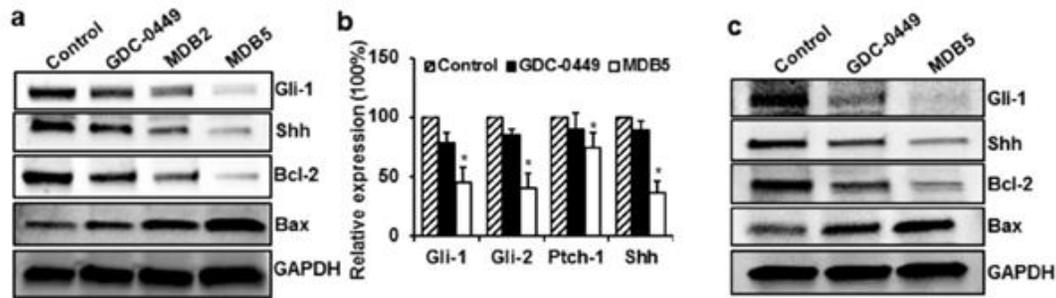


Figura 11. Efecto de MDB5 en la vía Hh y genes diana. **a)** Análisis de *Western blot* para Gli-1, SHh, Bcl-2, Bax y GAPDH en células MIA-PaCa-2 tratadas con GDC-0449, MDB2 y MDB5; **b)** Análisis de RT-PCR en tiempo real de Gli-1, Gli-2, Ptch-1 y SHh en las células MIA-PaCa-2 tratadas con GDC-0449 y MDB5; y **c)** Análisis de *Western blot* para Gli-1, SHh, Bcl-2, Bax y GAPDH en células PANC-1 tratadas con GDC-0449 y MDB5.[46]

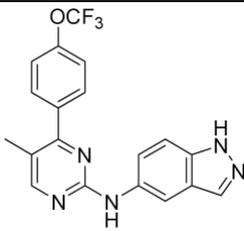
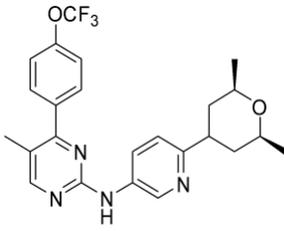
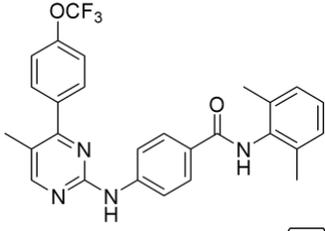
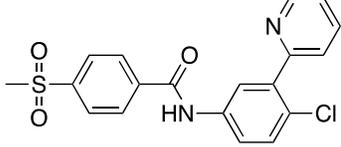
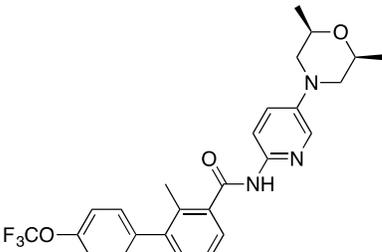
En un reciente estudio clínico de Fase II, en pacientes con adenocarcinoma de páncreas metastásico no tratado, Jesús-Acosta y colaboradores realizaron dos ciclos de quimioterapia: un primer ciclo usó gemcitabina y nab-paclitaxel y en el segundo ciclo usaron gemcitabina, nab-paclitaxel más vismodegib. Luego, realizaron biopsias antes y después de cada ciclo, y llegaron a la conclusión que agregar vismodegib a la quimioterapia no mejoró la eficacia en comparación con las tasas históricas observadas con quimioterapia sola en pacientes con cáncer de páncreas metastásico recién diagnosticado.[52] Hasta la fecha, todos los ensayos clínicos dirigidos a Smo en pacientes con cáncer de páncreas han fracasado o no han mostrado mejoras, probablemente por las variadas mutaciones que se producen en el receptor Smo o por lo mencionado anteriormente en relación a las CMC. Sin embargo, hay que tener en consideración que ninguno de los participantes de los ensayos fue examinado para detectar mutaciones en la vía de señalización Hh.[53]

1.7 DISEÑO DE NUEVOS LIGANDOS SMO:

1.7.1 Basado en fragmentos

En el contexto del desarrollo de biomoléculas inhibitorias, Xin y colaboradores han sintetizado una gran cantidad de estructuras que han sido probadas en líneas celulares cancerígenas con alteración de la vía de señalización Hh. En una primera instancia, diseñaron una nueva serie de derivados de *N*-(2-pirimidinilamino)benzamida, a través de estudios de relación estructura-actividad y el diseño basado en fragmentos. Este fragmento se presenta comúnmente en fármacos tales como imatinib, nilotinib, etc. Es por esto, que sintetizaron compuestos derivados de sonidegib (LDE-225) y ALLO-2, que contienen el fragmento 4-(trifluorometoxi)fenilpirimidinilamina, con diferentes sustituyentes como indazol, piridinilmorfolina, fenilbenzamida. Esto, con el fin de tener una diversidad molecular que permita determinar la estructura base para nuevos ligandos. De esta síntesis se obtuvieron los compuestos **I**, **II** y **III** (Tabla 1), donde el fragmento *N*-(2-pirimidinilamino)benzamida tuvo una ventaja sobresaliente sobre el resto de los derivados, correspondiente al compuesto **III**. Este mostró la mayor potencia, IC₅₀ de 1,3 nM, en el ensayo de gen reportero Gli-luciferasa, mejor que vismodegib (7,2 nM) y sonidegib (5,5 nM).

Tabla 1. Valores de IC₅₀ (nM) de ensayos de gen reportero Gli-luciferasa para ligandos sintetizados y fármacos de referencia.

Compuestos	Estructura	IC ₅₀ (nM)
I		125
II		>500
III		1,3
vismodegib		7,2
sonidegib		5,5

A raíz de estos resultados, Xin y colaboradores realizaron modificaciones al compuesto **III**, dividiéndolo en cuatro fragmentos importantes, dando como resultado una serie de 39 nuevos ligandos (Figura 12). Estos presentaron diferentes actividades en el ensayo Gli-luciferasa, aunque ninguno de esto fue mejor que **III**. Sin embargo, con este estudio y posteriores[54,55] se demostró la importancia del grupo 4-trifluorometoxifenilo y la presencia del grupo benzamida, como fragmentos claves para un mejor efecto inhibitorio en la vía de señalización Hh.

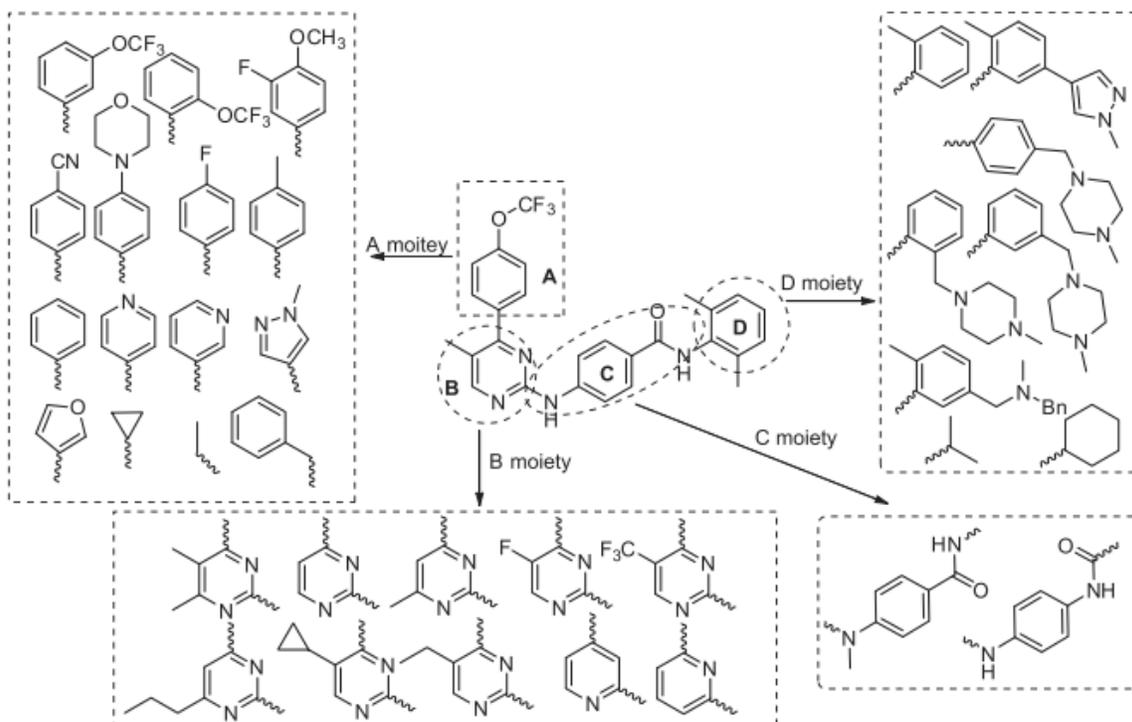


Figura 12. Modificación estructural de **III** para el diseño de nuevos derivados de *N*-(2-pirimidinilamino)benzamida.[56]

Finalmente, demostraron que el compuesto **III** presentaba propiedades farmacocinéticas moderadas, considerándolo como compuesto líder, para obtener nuevos derivados con mejor perfil farmacocinético.[57] Además, compararon los valores de IC_{50} de moléculas que poseían como núcleo anillos heteroaromáticos de 5 miembros fusionados a pirimidina (Figura 13). Los resultados demostraron que los derivados con mayor actividad fueron los que poseían como núcleo central a la molécula de purina. Cabe destacar que el valor de IC_{50} disminuyó al sustituir el núcleo de purina en posición N9 con un grupo metilo, es por esto que una cadena alquílica en esta posición, mejoraría la potencia de este tipo de ligandos.[57]

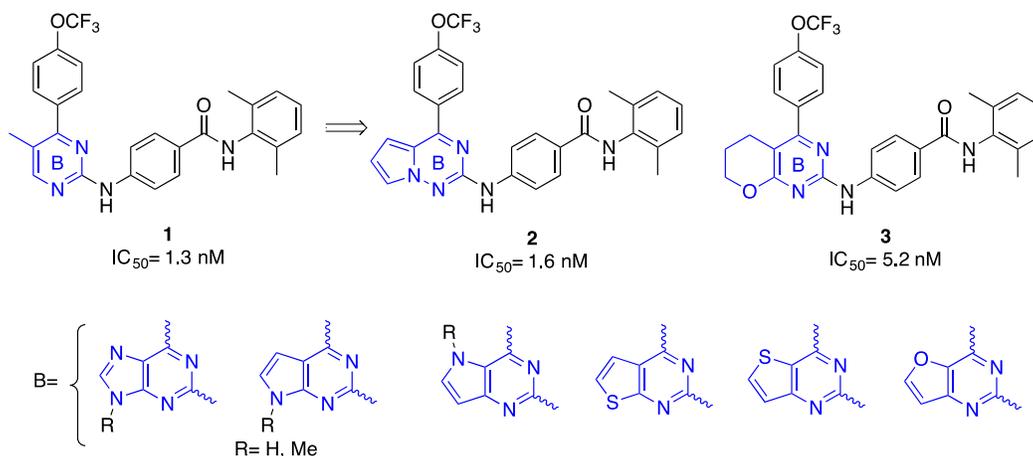


Figura 13. Diseño de derivados de pirimidina fusionada con anillo heteroaromático de cinco miembros.

Otro estudio, que consideró la búsqueda de nuevos fragmentos que presentaran actividad citotóxica, fue el realizado por Salas y colaboradores.[58] En este trabajo se sintetizaron dos nuevas series de derivados de 3,6-(2,5-dimetilpirazol-1-il)-1,2,4,5-tetrazinas, basados en los antagonistas Smo, Anta XV y taladegib (Figura 14). Se sintetizaron 22 nuevos compuestos y se determinó su acción sobre cuatro líneas celulares cancerígenas (HL-60, HCT-116, HeLa y H1975), mediante las técnicas de viabilidad celular por el método de reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) y citometría de flujo. Las interesantes propiedades antitumorales y de inducción de apoptosis de parte de algunos ellos, justifica que actualmente estos estén siendo estudiados como potenciales inhibidores de la vía Hh.

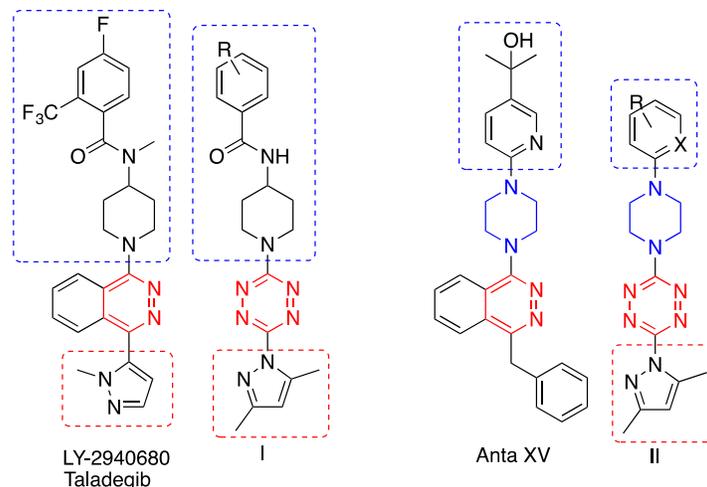


Figura 14. Estructuras químicas de derivados de tetrazina con actividad antitumoral.

Considerando los antecedentes anteriormente expuestos, queda de manifiesto que el diseño molecular de nuevos antagonistas de Smo o inhibidores de Hh, debe contemplar una estructura central que posea un anillo heterocíclico. Una de las estructuras interesante de considerar es la base nitrogenada purina (Figura 15), debido a que este núcleo está presente en diversas moléculas biológicas que desempeñan un papel clave en las vías de señalización en todos los organismos vivos.[59] Por esta razón, el núcleo de purina se denomina "*privileged scaffold*", un término que se utiliza en Química Medicinal para referirse a múltiples moléculas que presentan la misma estructura base y con considerables propiedades farmacológicas.[60] Prueba de ello, es que el núcleo de purina es un fragmento estructural que está siendo incorporado en nuevos medicamentos (Figura 15). Algunos ejemplos son: agentes contra el cáncer (6-mercaptopurina, tioguanina), agentes antivirales para infecciones como el herpes o el virus de la inmunodeficiencia humana (aciclovir, ganciclovir, carbovir, abavavir, entre otros) y agentes para prevenir el rechazo de órganos (azatioprina).[59]

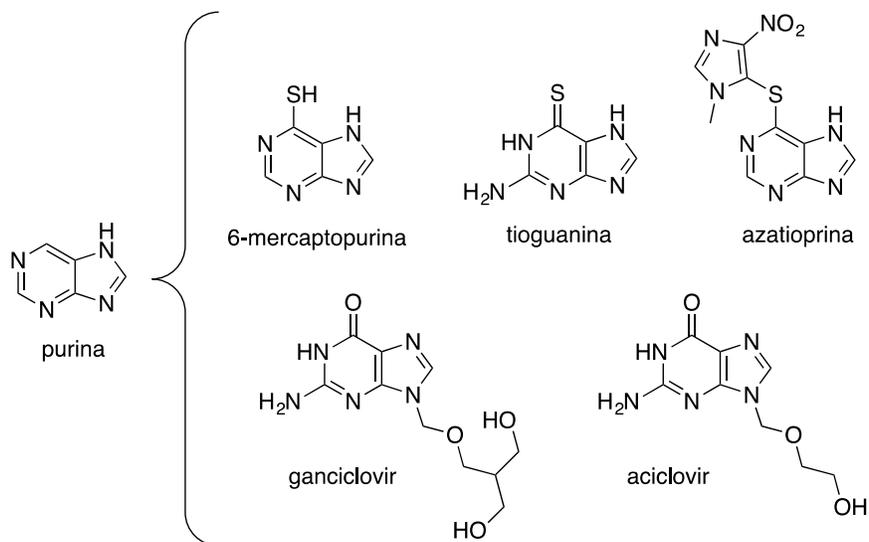


Figura 15. Estructura química del núcleo de purina y algunos medicamentos que contienen este núcleo.

Diversos estudios han demostrado que diferentes moléculas que exhiben el núcleo de purina presentan actividad citotóxica. Uno de ellos indica que la síntesis de moléculas inhibitoras de quinasas dependientes de ciclinas (Cdk_s) derivadas de olomucina (Figura 16), mejoran su actividad al presentar diferentes sustituyentes alquílicos en la posición N9 del núcleo. Dentro de estos sustituyentes, los grupos alquílicos isopropilo, etilo y ciclopentilo presentaron una mejor actividad inhibitora (Figura 16). Por lo tanto, esto confirma lo reportado por el grupo de investigación de Xin, donde al incorporar un grupo alquilo al núcleo de purina, aumenta la citotoxicidad.

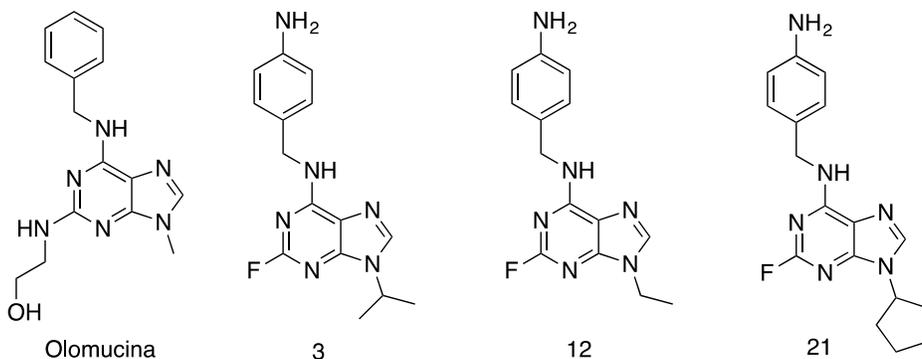


Figura 16. Estructuras químicas de derivados de purina con actividad sobre Cdk_s.

Otra molécula importante de destacar es la molécula mioseverina (Figura 17), molécula derivada de olomucina, con la cual se han realizado estudios *in vitro* que sugieren que el ciclo celular en la transición G2/M puede ser detenido. En su estructura se observa que, al igual que los derivados de olomucina anteriormente expuestos, mioseverina posee un grupo isopropilo en la posición N9 de su estructura. Por lo tanto, las modificaciones con diferentes grupos alquílicos, puede mejorar o mantener la citotoxicidad en células de leucemia.[61]

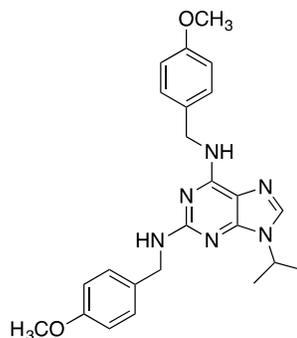


Figura 17. Estructura de mioseverina.

Basados en las características mostradas por mioseverina, Salas y colaboradores obtuvieron 12 nuevos compuestos derivados de purina, mediante un procedimiento sintético de tres pasos (Figura 18), donde se modificó el grupo alquilo en N9 (R₁: propilo, butilo, pentilo y hexilo) y el grupo sustituyente en uno de los fragmentos aromáticos unido al C1 del fragmento benzilamino unido a la purina (R₂: H o metoxilo).[59] Todos estos compuestos se evaluaron *in vitro* para determinar su potencial efecto sobre la toxicidad celular mediante el método de reducción del MTT y el análisis de citometría de flujo en cuatro líneas de células cancerígenas (H1975, HL-60, HCT-116 y HeLa). Tres de los doce compuestos resultaron ser agentes prometedores en comparación con el fármaco anticancerígeno control, etopósido. Los datos preliminares de citometría de flujo sugieren que los compuestos inducen apoptosis en estas células. Además, por medio del estudio a partir de un modelo farmacofórico preliminar, se obtuvieron los requisitos estructurales para su actividad en cada línea celular estudiada. Así, se identificaron los principales fragmentos que

deberían estar presentes en las moléculas activas, los cuales son centros aromáticos, aceptor de hidrógeno/centro donante y un área hidrofóbica.

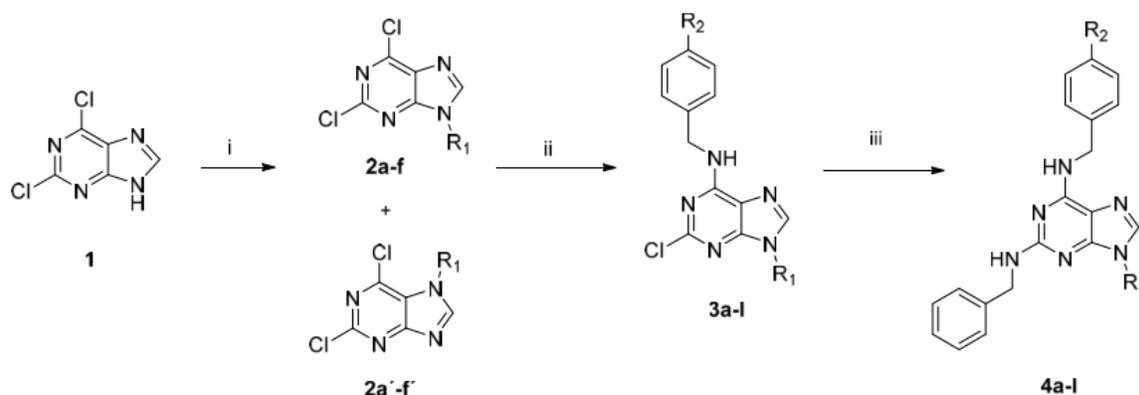


Figura 18. Síntesis de compuestos derivados de mioseverina. *Reactivos y condiciones:* (i) haluro de alquilo, K_2CO_3 , DMF, 6 h, t.a.; (ii) benzilamina o 4-metoxibenzilamina, DIPEA, *n*-butanol, 12 h, 110 °C; (iii) benzilamina, DIPEA, *n*-butanol, 1 h, 150 °C, MW.[59]

Por otro lado, Yang y colaboradores diseñaron y sintetizaron una nueva clase de inhibidores de quinasa reversibles dirigidos a mutaciones de resistencia y activación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Realizaron la optimización estructural de derivados de *N*²-(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-*N*⁶-fenil-9*H*-purina-2,8-diamina, debido a que este presentaba una baja afinidad de unión al receptor. De las modificaciones realizadas se concluyó que los fragmentos metilpiperazinilo y alquilo disminuyen significativamente el efecto citotóxico en líneas celulares cancerígenas de pulmón e hígado, que albergan mutaciones de resistencia a fármacos y de activación de EGFR. El compuesto **IV** (Figura 19) fue el inhibidor de quinasa más potente contra mutaciones de resistencia y activación de EGFR.[62] Siguiendo la línea de optimización de ligandos, en el grupo de investigación liderado por Zhang, y basados en el estudio previo de Yang, realizaron la síntesis y evaluación biológica de inhibidores de EGFR que contienen el andamio 8-feniltio/fenilsulfinil-9*H*-purina-2,9-disustituida. Éstas nuevas moléculas fueron evaluadas frente a líneas celulares del tipo epitelial y de cáncer de pulmón con

diferentes mutaciones de EGFR, dando cuenta que los ligando **V** y **VI** (Figura 18) mejoraban la propiedades obtenidas por el ligando **IV**.^[63]

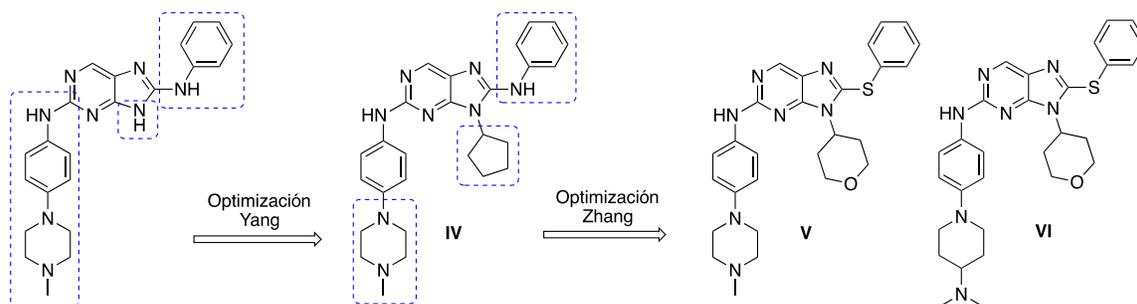


Figura 19. Estructura de ligandos optimizados como nuevos inhibidores de EGFR.

En el grupo de investigación del Dr. Salas se ha realizado el diseño de nuevas series de purinas 2,6,9-trisustuidas, considerando fragmentos de antagonistas y agonista del receptor Smo, tales como sonidegib, BMS-833283 y purmorfamina, y de fragmentos que demostraron actividad biológica importante, como las mencionadas anteriormente. En primer lugar, se sintetizaron 49 derivados de purina, con diferentes sustituyentes: alquílicos en posición N9 del núcleo heterocíclico, derivados de pirinidilpiperazinas unidos a C2 del anillo y por último en C6 el fragmento trifluorometoxifenilo. En este estudio se realizó una serie de estudios tanto biológicos como bioinformáticos, para determinar el antagonismo de éstos en la vía de señalización Hh. El compuesto **VII** (Figura 20) fue capaz de inhibir la expresión génica de esta vía, y además unirse al sitio activo del receptor Smo.^[64] En una segunda instancia, se sintetizaron doce nuevos ligandos, donde se destaca el ligando **VIII** (Figura 20), que presentó un IC_{50} de 1,94 μ M en la línea celular cancerígena de páncreas AsPC-1, y una baja citotoxicidad en células sanas. Éste ligando presenta un fragmento 4-(*N*-metilpiperazina) anilina unido a C2 de la purina, un fragmento trifluorometoxifenilo en C6 y por último el sustituyente alquílico metilciclopropilo. Ambas moléculas dan cuenta de que las modificaciones estructurales basadas en fragmentos son importantes cuando queremos mejorar las propiedades frente a una vía de señalización o un cáncer en específico.

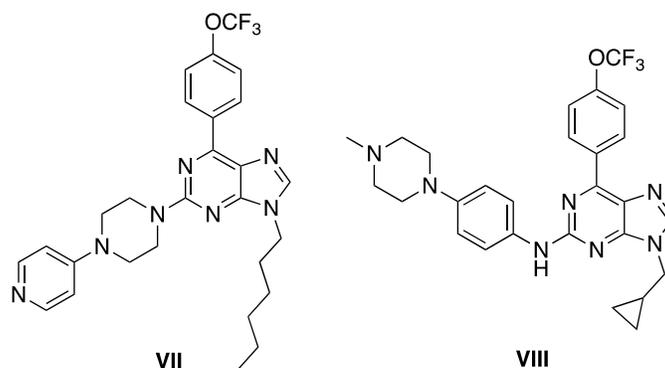


Figura 20. Estructura química de **VII** y **VIII**.

1.7.2 Basado en el receptor

El desconocimiento y la complejidad asociada al mecanismo y estructura del receptor Smo han llevado a que el diseño de nuevos agonistas y/o antagonistas de este receptor no sea una tarea sencilla. Es por esto, que en el grupo de investigación del Dr. Salas han trabajado en comprender los aspectos estructurales claves de este receptor basado en la evidencia cristalográfica existente. De esta forma, es posible recopilar la información necesaria para la determinación de los requerimientos estructurales de nuevos ligandos, en función de una estructura tridimensional construida en dicho grupo para este receptor (datos no publicados). Con este modelo, se han realizado estudios de acoplamiento y dinámica molecular para determinar los sitios y poses de unión a Smo por parte de ligandos del tipo antagonistas y agonistas conocidos, y contrastando estos resultados con los datos cristalográficos.

De acuerdo con resultados preliminares, se comprueba el hecho que tanto agonistas como antagonistas se unen a un sitio similar en el dominio TM de este receptor (Figura 21a). Entre los ligandos estudiados se encuentra el agonista purmorfamina (Figura 21b), donde el anillo purínico presenta una interacción del tipo π - π con el residuo Tyr309 del receptor Smo. Esto valida el hecho de que el núcleo

de purina es importante de considerar en el diseño de nuevos ligandos que presenten actividad en la vía de señalización Hh. Por otro lado, en la Figura 21c se presentan las interacciones que posee el antagonista taladegib con dicho receptor, donde se destaca la interacción del fragmento benzamida con los residuos Asn219 y Phe484.

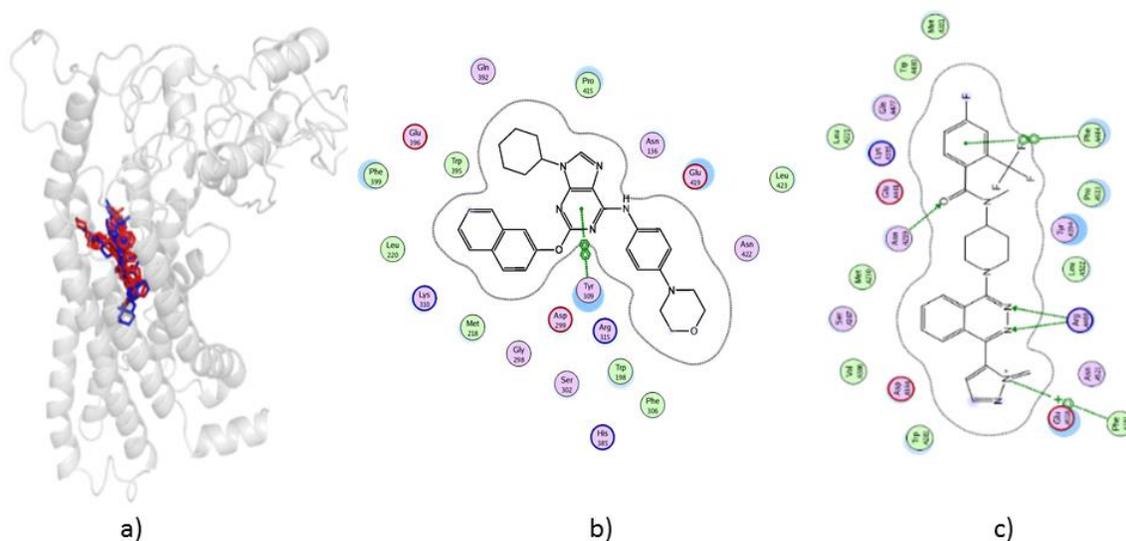


Figura 21. a) Modelo para sitios de unión de agonistas (rojo) y antagonistas (azul) en Smo; modo de unión y principales interacciones de Smo en 2D para: **b)** Purmorphamina (agonista); y **c)** Taladegib (antagonista).

Como se mencionó en los apartados 1.5 y 1.6, los aminoácidos que también debemos recalcar por las interacciones que presentarían con los diferentes fragmentos de ligandos antagonistas de Smo, como vismodegib, son Asp382, Asp384, Tyr397, Arg400, Asp473, Phe484 y Glu518 que favorecerían el efecto inhibitorio de la vía Hh y antiproliferativo de diferentes tipos de cáncer.

1.8 ACOPLAMIENTO REVERSO

Las herramientas bioinformáticas pueden ser uno de los pasos iniciales en el desarrollo de nuevos fármacos para determinar el enfoque y la estrategia de la investigación, siendo uno de ellos el acoplamiento molecular. Como se mencionó

anteriormente, uno de sus objetivos es buscar una posible pose de unión entre un ligando dado y una proteína específica. Sin embargo, esta herramienta también puede ser utilizada en etapas posteriores en el desarrollo de fármacos, incluso luego de la obtención de ligandos. En estos casos, y en especial cuando no se conoce el blanco objetivo de un ligando, se puede realizar una predicción computacional de blancos farmacológicos a partir de la estructura del ligando. Ésta técnica comúnmente se conoce como acoplamiento reverso, predicción de objetivos *in silico*, identificación de objetivos o pesca de objetivos (*Target Fishing*).[65] Los componentes necesarios de esta técnica son similares a los de los métodos de acoplamiento directo, como preparar conjuntos de datos, buscar poses del ligando, puntuar y clasificar. El anclaje reverso se basa en diferentes métodos, siendo el fundamental la similitud química, donde se establece que “moléculas similares, tienen un efecto biológico similar”. [66] Ésta se apoya en descripciones unidimensionales, bidimensionales y tridimensionales, como por ejemplo propiedades fisicoquímicas, reglas de Lipinsky, conectividad, farmacóforo, entre otros. Si bien estos experimentos pueden ser extensos en tiempo y costo computacional, las alternativas informáticas de predicción rápida han ganado impulso, a la vez que se han desarrollado una gran cantidad de bases de datos de blancos farmacológicos que ayudan en esta tarea.

Existen diversos *softwares* de búsqueda de similitudes que se pueden clasificar en dos clases generales, similitud 2D y similitud 3D. Los algoritmos de cálculo de similitud 2D más comunes utilizan huellas digitales moleculares como medida de semejanza y encapsulan la conectividad molecular/subestructura/información de características químicas en una cadena de bits. Luego, se pueden usar algunas métricas analíticas para comparar la relación implícita entre dos compuestos, como por ejemplo el coeficiente de Tanimoto. Los métodos de similitud 3D generalmente involucran información geométrica de objetivos predefinidos de las conformaciones moleculares 3D, que incluyen farmacóforos, formas moleculares y campos moleculares. Dentro de los métodos de similitud en tres dimensiones debemos destacar dos plataformas que están disponibles de forma gratuita.[67] En primer

lugar PharmMapper, que es un servidor web para la identificación de posibles objetivos farmacológicos mediante un farmacóforo inverso, que compara el compuesto de consulta con una base de datos de modelos farmacofóricos internos. PharmMapper incluye más de 7.000 modelos derivados de estructuras cristalinas complejas.[68,69] Por otro lado, tenemos a ChemMapper, que al igual que PharmMapper, es una plataforma *online* gratuita que predice efectos polifarmacológicos y posibles modos de acción de moléculas pequeñas basándose en la similitud estructural 3D.[70] Ambos entregan un ranking de modelos, basado en una matriz de puntuación de farmacóforos que tiene la biblioteca del servidor. Por lo tanto, estas herramientas permiten obtener valiosa información a partir de la estructura molecular de los ligandos diseñados, pudiendo predecir si estos tendrán alguna respuesta en algún modelo farmacológico.

1.9 INVESTIGACIÓN PROPUESTA

Por lo tanto, teniendo en cuenta las principales interacciones dentro del sitio de unión de ligandos en Smo observadas en los estudios cristalográficos y de *docking*, y considerando ciertos fragmentos importantes de los ligandos antagonistas y agonistas de la vía de señalización Hh (Figura 22) que presentan un mecanismo de acción mediante la interacción con el receptor Smo, se propone el diseño de nuevos compuestos divididos en dos series principales (Figura 23), que presentan la siguiente estructura general:

- **Serie I:** i) Núcleo de purina como elemento central, ii) Grupo trifluorometoxifenilo unido en C6 de la purina; iii) Radical alquílico unido a purina en N9 y iv) Fragmento benzamida unida por un anillo piperidínico en C2 del núcleo. Estas nuevas purinas 2,6,9-trisustituidas a sintetizar se espera que se comporten como potenciales antagonistas selectivos del receptor Smo, conforme a un conjunto de evaluaciones biológicas que den información de este comportamiento (33 compuestos).
- **Serie II:** se proponen modificaciones en el fragmento unido al C2 de la purina, reemplazando el grupo benzamida por los grupos *N*-(4-metilpiperazinil)anilina y 1-(piridin-4-il)piperazina. Además, reemplazar el grupo trifluorometoxilo del anillo aromático por otros grupos con diferente o igual propiedad electrónica (17 nuevos compuestos), basándonos en los ligandos **VII** y **VIII** mostrados en la Figura 20, esperando que mejoren las propiedades inhibitorias de la vía Hh.

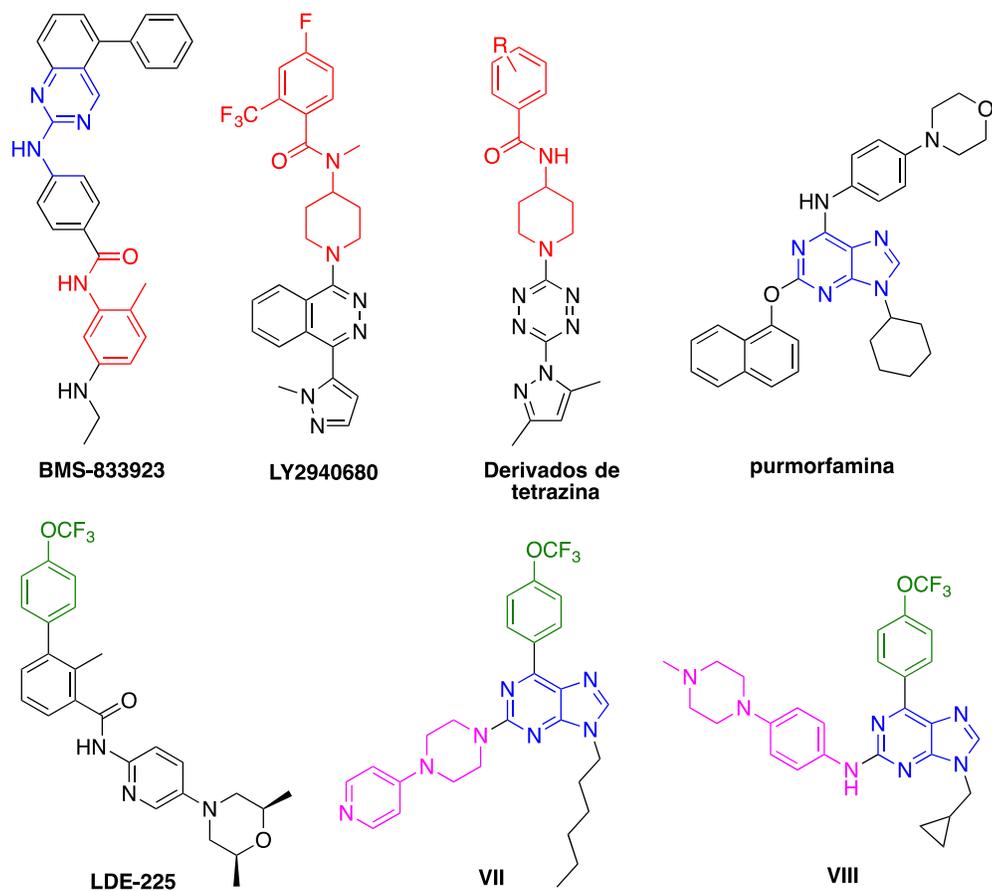


Figura 22. Ligandos moduladores de Smo, de los cuales se basa la propuesta de investigación.

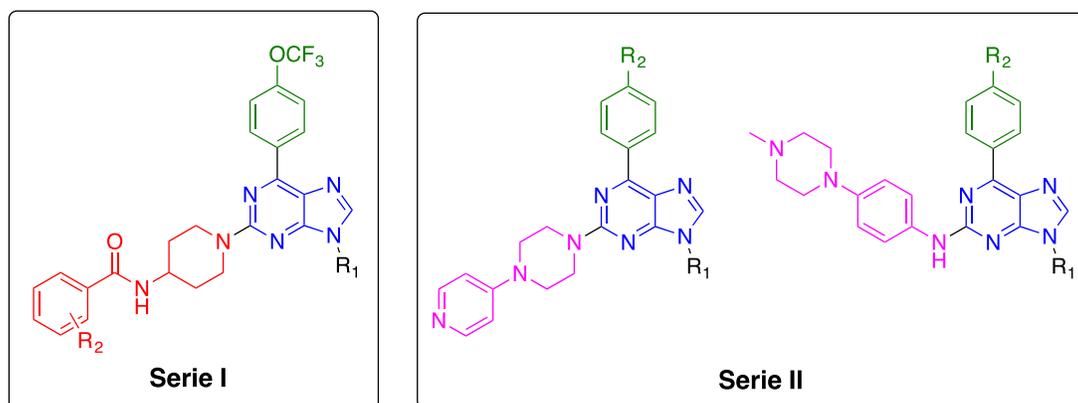


Figura 23. Estructuras químicas de derivados heterocíclicos propuestos en esta tesis, destacándose en color los fragmentos considerados de moduladores de Smo.

CAPÍTULO II: HIPÓTESIS

2 HIPÓTESIS

Basados en el conocimiento de las características del receptor Smoothened y sus ligandos, sumado a trabajos previos realizados en nuestro laboratorio, la hipótesis que se postula es:

El diseño y obtención de nuevos derivados de purina 2,6,9-trisustituida, permitirá generar una nueva familia de compuestos con efectos citotóxicos en células de cáncer de páncreas, y serán capaces de interactuar con el receptor Smoothened, al igual que vismodegib según estudios *in silico*.

CAPÍTULO III: OBJETIVOS

3 OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este proyecto es aportar a la Química Medicinal, a través del diseño, síntesis, ensayos biológicos y estudios de acoplamiento molecular de nuevos compuestos con la capacidad de inhibir la vía de señalización Hedgehog, a través del efecto antagonista del receptor Smoothened, de esta forma ampliar la biblioteca de moléculas que sean de utilidad terapéutica para el cáncer.

3.7 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.7.1 Objetivos sintéticos

1. Sintetizar ligandos correspondientes a la **Serie I**.
2. Sintetizar ligandos correspondientes a la **Serie II**.
3. Caracterizar cada uno de los intermediarios y compuestos finales, mediante técnicas espectroscópicas y espectrométrica.

3.7.2 Objetivos biológicos

1. Evaluar la viabilidad celular en líneas comerciales de cáncer de páncreas (AsPC-1, BxPC-3 y MIA-PaCa-2), meduloblastoma (DAOY), además de células no cancerígenas (HEK293).

3.7.3 Objetivos computacionales

1. Realizar estudios de acoplamiento molecular para los ligandos de mejor perfil farmacológico, con nuestro modelo del receptor Smo.
2. Evaluar *in silico* los modos de unión para estos ligandos y en conjunto con los resultados biológicos poder rediseñar o continuar con los objetivos sintéticos planteados.

3. Predecir proteínas blanco mediante anclaje reverso para ligandos de menor perfil farmacológico.

CAPÍTULO IV. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. MÉTODOS GENERALES SINTÉTICOS Y BIOLÓGICOS

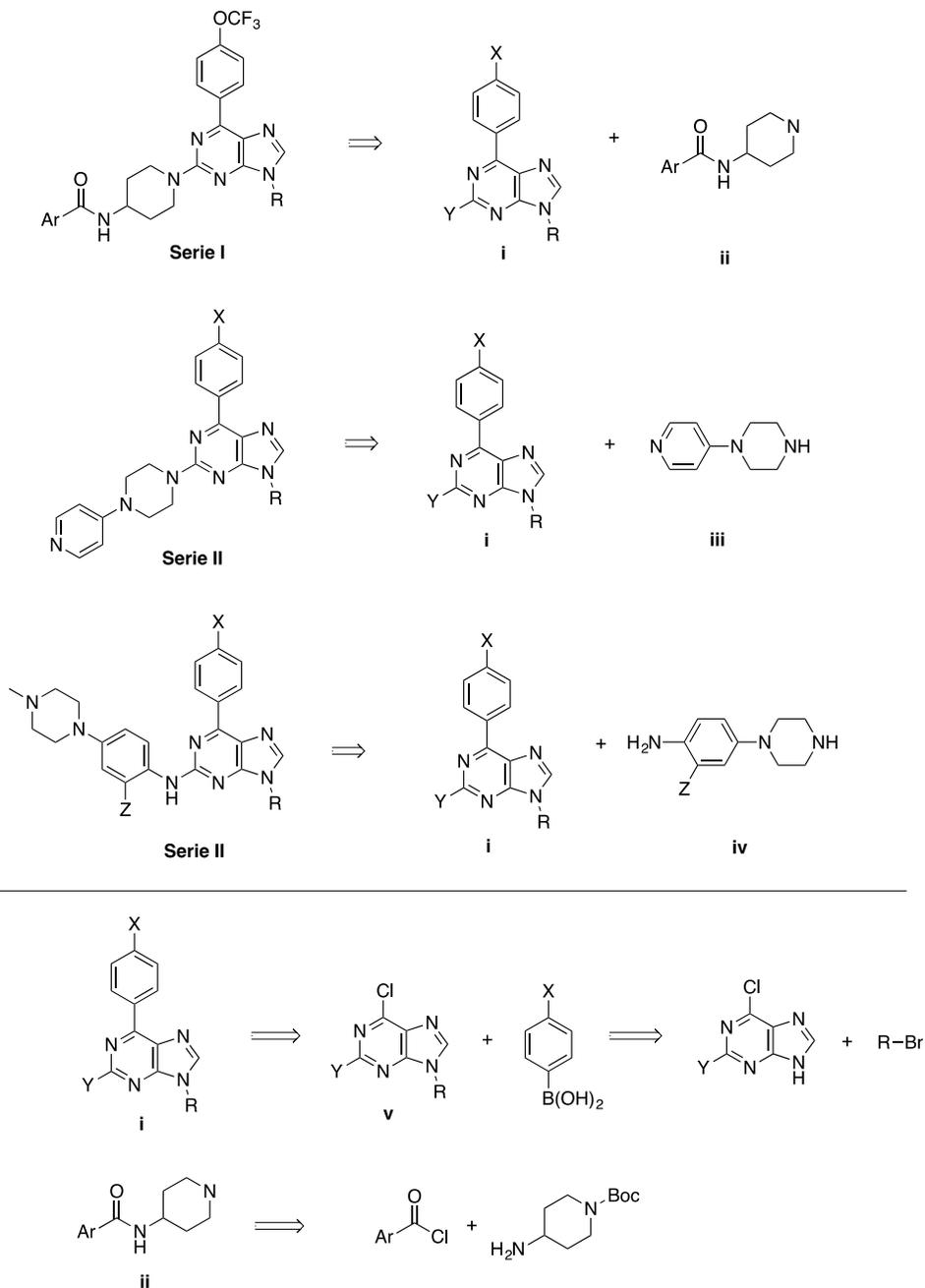
- Los disolventes utilizados fueron de grado P.A y CLAE.
- Cromatografía en capa fina sobre soporte de aluminio de 0,2 mm de espesor con sílica gel 60 F254 Merck.
- Cromatografía en columna por gravedad con gel de sílice tipo 60G de tamaño de partícula 70 – 230 mallas Merck.
- Los espectros de RMN-¹H, ¹³C, DEPT-135, ¹³C/¹H-HMQC, ¹³C/¹H-HMBC, ¹H/¹H-COSY y RMN-¹⁹F se registraron en disolución de CDCl₃ y DMSO-*d*₆ según la muestra, en un equipo Bruker modelo AM-400 (400 MHz canal ¹H y ¹⁹F, 100,57 MHz ¹³C).
- Los espectros de IR-TF se registraron en un equipo de marca Bruker modelo Vector 22, empleando pastillas de KBr.
- Los puntos de fusión (p.f) se determinaron en un aparato modelo Stuart scientific SMP3, con rampas de 4 °C/min. Los valores no están corregidos y se expresan en grados Celsius (°C).
- Medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium/F-12* (DMEM/F-12) con L-glutamina, N° catálogo 11-170-1N.
- Medio de cultivo RPMI 1640, con L-glutamina, N° catálogo 01-100-1a.
- Suero Bovino Fetal, N° catálogo 04-121-1A, *Biological Industries*.
- Penicilina/Estreptomina 10.000 U/mL, 10.000 µg/mL, N° catálogo 03-033-1B, *Biological Industries*.
- Tripsina EDTA, 10X 0,5 %, N° catálogo 03-051-5B, *Biological Industries*.
- Líneas celulares: la mayoría fueron obtenidas a través de colaboración con grupos de investigación de la Pontificia Universidad Católica de Chile y Universidad de Chile.
 - i) AsPC-1, provenientes de un adenocarcinoma pancreático en fase metastásica, ATCC.
 - ii) BxPC-3, provenientes de un adenocarcinoma pancreático, ATCC.

- iii) MIA-PaCa-2, corresponde a una línea celular de carcinoma pancreático, ATCC, *Sigma Aldrich*.
- iv) Daoy, originada a partir de un meduloblastoma desmoplástico cerebral humano, ATCC.
- v) HEK293, originadas desde riñón embrionario humano, ATCC.
- vi) VERO, provenientes del hígado de la especie *Cercopithecus aethiops* (primate verde), ATCC.
- Fármacos control:
 - i) Vismodegib (GDC-0449) CAS [879085-55-9], 99 % (CLAE), AK Scientific, Inc.
 - ii) Gemcitabina, CAS [95058-81-4], 98 % (CLAE), AK Scientific, Inc.

4.2. METODOLOGÍA SINTÉTICA

La preparación de los compuestos propuestos se ejecutó a través de reacciones clásica de Química Orgánica, que han sido estudiadas previamente por nuestro grupo de investigación.

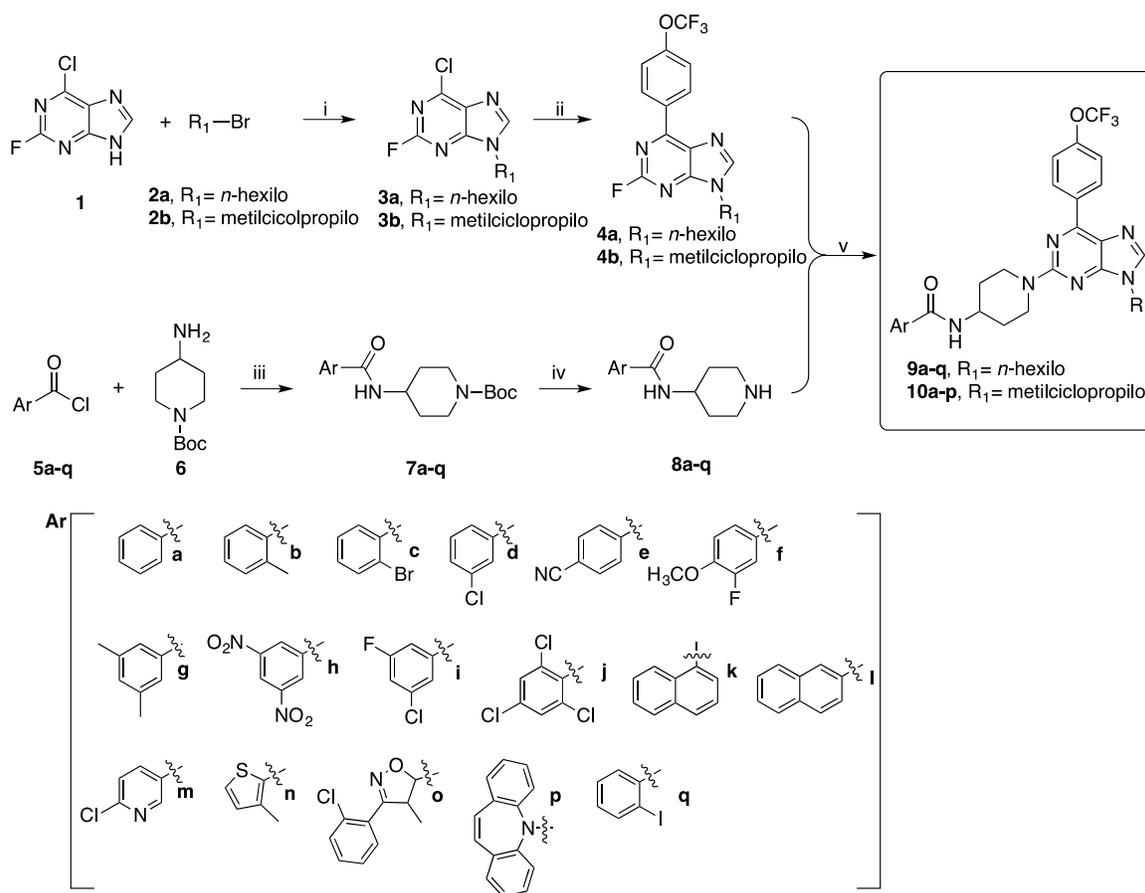
En primer lugar, se presenta el análisis retrosintético de la síntesis de los compuestos de las **Serie I** y **II** (Esquema 1). En este esquema se muestra una desconexión carbono-nitrógeno de los compuestos de ambas series, de los cuales se obtienen el equivalente sintético **i** con los respectivos derivados de aminas **ii**, **iii** y **iv**. Los equivalentes **i** con las aminas **ii** y **iii** reaccionan mediante una reacción tipo S_NAr . En cambio, los equivalentes **i** y **iv**, de la **Serie II**, corresponden a un acoplamiento del tipo Buchwald – Hartwig.[71] El compuesto **vi** se formaría a partir de su cloruro de ácido respectivo y la 4-amino-1-Boc-piperidina. Basándonos en la desconexión del compuesto **i**, se tiene que éste se formaría a partir de la reacción de acoplamiento carbono-carbono tipo Suzuki-Miyaura, entre **v** y el ácido borónico respectivo.[72] Finalmente el compuesto **v**, se formaría mediante una reacción de *N*-alquilación con el correspondiente halogenuro de alquilo.



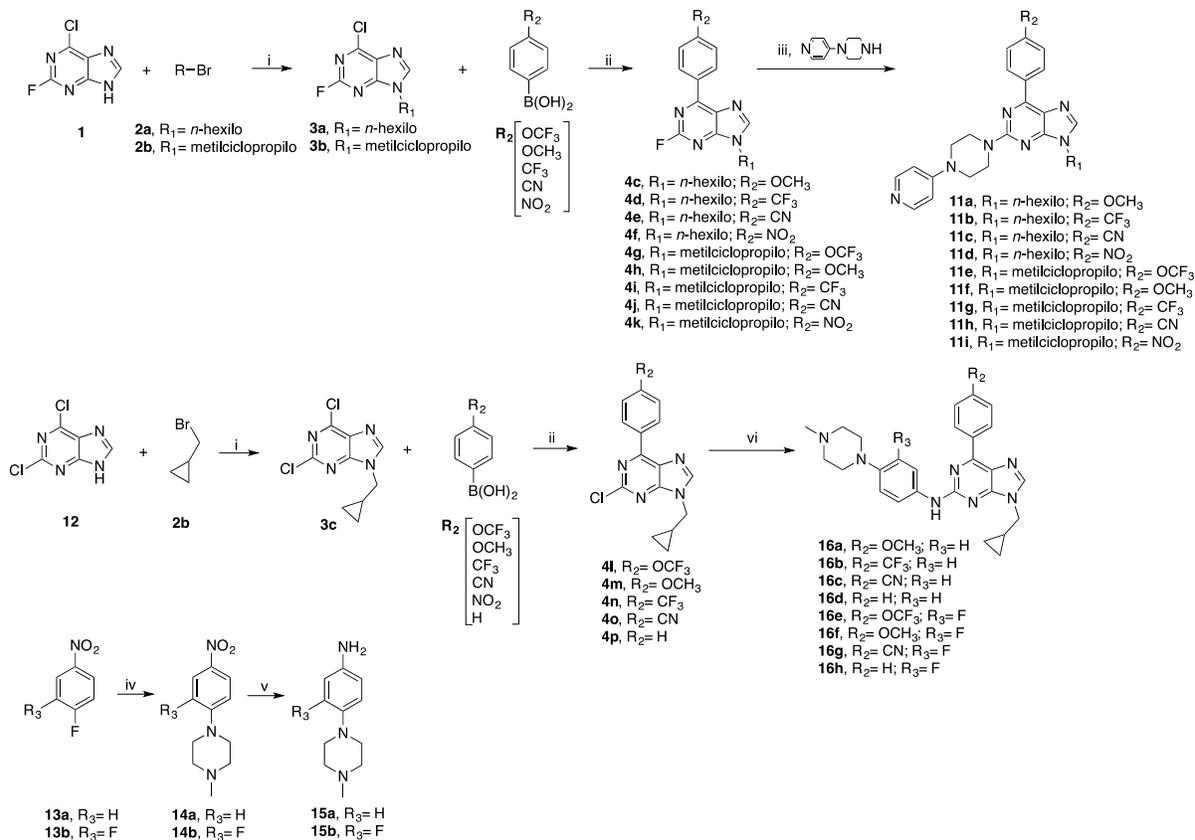
Esquema 1. Retrosíntesis general para los tres tipos de compuestos finales propuestos de las **Serie I** y **II**.

A partir del análisis retrosintético planteado, se realizó la síntesis de 50 ligandos (Esquemas 2 y 3), los cuales se diferenciaron en el patrón estructural del fragmento unido al C2 del anillo de purina. Por otro lado, las 17 moléculas de la **Serie II** se

diferencian además en el sustituyente presente en el sistema aromático unido a C6. El Esquema 2 corresponde a la síntesis de la **Serie I** de compuestos denominados **9a-q** y **10a-p**. El Esquema 3 corresponde a la síntesis de los compuestos de la **Serie II** denominados **11a-i** y **16a-h**.

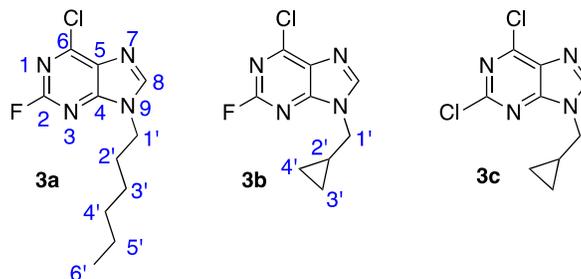


Esquema 2. Síntesis de compuestos de la **Serie I**. *Reactivos y condiciones:* i) K_2CO_3 , DMF, 6 h, t.a.; ii) ácido 4-trifluorometoxifenil borónico, $Pd(PPh_3)Cl_2$, K_2CO_3 2 M, dioxano, 2 h, reflujo; iii) Et_3N , THF, 3 h, t.a.; iv) TFA, CH_2Cl_2 , 2 h, t.a. luego tolueno; v) DIPEA, *n*-butanol, 12 h, reflujo.



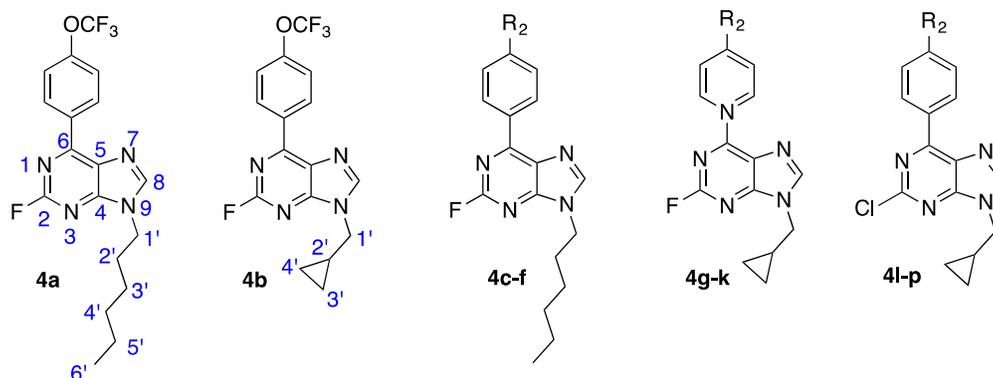
Esquema 3. Síntesis de compuestos de la **Serie II**. *Reactivos y condiciones*; i) K₂CO₃, DMF, 6 h, t.a.; ii) ácidos borónicos, Pd(PPh₃)Cl₂, K₂CO₃ 2 M, dioxano, 2 h, reflujo; iii) DIPEA, *n*-butanol, 12 h, reflujo; iv) *N*-metilpiperazina, K₂CO₃, DMF, 2 h v) hidracina, Pd-C, etanol, 70 °C, 2 h. vi) **15a/15b**, Pd(OAc)₂, XantPhos, K₂CO₃ 2 M, dioxano, 12 h, reflujo.

4.2.1. Procedimiento de síntesis de 6-cloro-2-fluoro-9-hexil-9*H*-purina, 6-cloro-2-fluoro-9-metilciclopropil-9*H*-purina y 2,6-dicloro-9-metilciclopropil-9*H*-purina (Serie I y II)



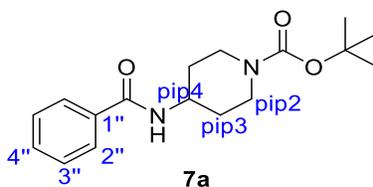
A una disolución de 1 equivalente (eq) de 6-cloro-2-fluoro-9*H*-purina (1,00 g, 5,796 mmol) en DMF se agregó 1,5 eq del haluro de alquilo respectivo (1-bromohexano/bromometil ciclopropano) y 3 eq de carbonato de potasio. Esta mezcla fue agitada por 6 horas (h) a temperatura ambiente. Posteriormente fue filtrada en sistema de filtración simple y luego el disolvente fue removido bajo destilación al vacío. El crudo obtenido fue purificado por cromatografía en columna de sílica gel usando como fase móvil diclorometano: acetato de etilo (3:2).

4.2.2. Procedimiento general para la síntesis de 2-fluoro-9-hexil-6-(4-(R₂-fenil)-9*H*-purina y 2-fluoro-9-metilciclopropil-6-(4-(R₂-fenil)-9*H*-purina (Serie I y II)



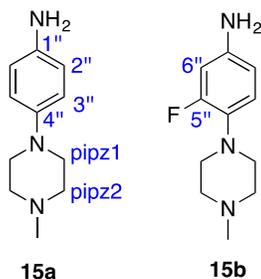
A una disolución de 1 eq de 6-cloro-2-fluoro-9-hexil-9*H*-purina/6-cloro-2-fluoro-9-metilciclopropil-9*H*-purina/2-6-dicloro-9-metilciclopropil-9*H*-purina en dioxano, se agregó 1,1 eq de ácido 4-R₂-fenilborónico correspondiente y 0,1 eq del catalizador Pd(PPh₃)₂Cl₂. Además, se añadieron 5 mL de una disolución de K₂CO₃ 2 M, se agitó en condiciones de reflujo durante 2 h y luego se filtró con sílice en sistema de filtración al vacío. A la disolución resultante se agregó agua y se realizó extracciones con porciones de acetato de etilo. El disolvente fue removido por sistema de destilación al vacío y el crudo resultante fue purificado por cromatografía en columna de sílica gel usando como fase móvil éter de petróleo: acetato de etilo (3:1 y 3:2 respectivamente).

4.2.3. Procedimiento general para la síntesis de derivados de *tert*-butil-4-(benzamido) piperidin-1-carboxilato (Serie I)



Se realizó la reacción con 1,1 eq de los cloruros de ácidos correspondientes, 1 eq de *tert*-butil-4-aminopiperidin-1-carboxilato y 1,3 eq de trietilamina en THF seco. Se dejó con agitación a temperatura ambiente durante 2 h y luego se filtró por sistema de filtración al vacío. El disolvente fue removido por destilación al vacío y luego el crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna de sílica gel usando como fase móvil éter de petróleo: acetato de etilo (a distintas proporciones dependiendo del crudo obtenido para cada derivado). Luego las amidas obtenidas **7a-q** fueron desprotegidas, eliminando el grupo Boc, con 1 eq de TFA y CH₂Cl₂ como disolvente con agitación durante 2 h, el TFA restante fue removido por destilación al vacío agregando porciones de tolueno, obteniéndose la sal respectiva de estos derivados **8a-q**.

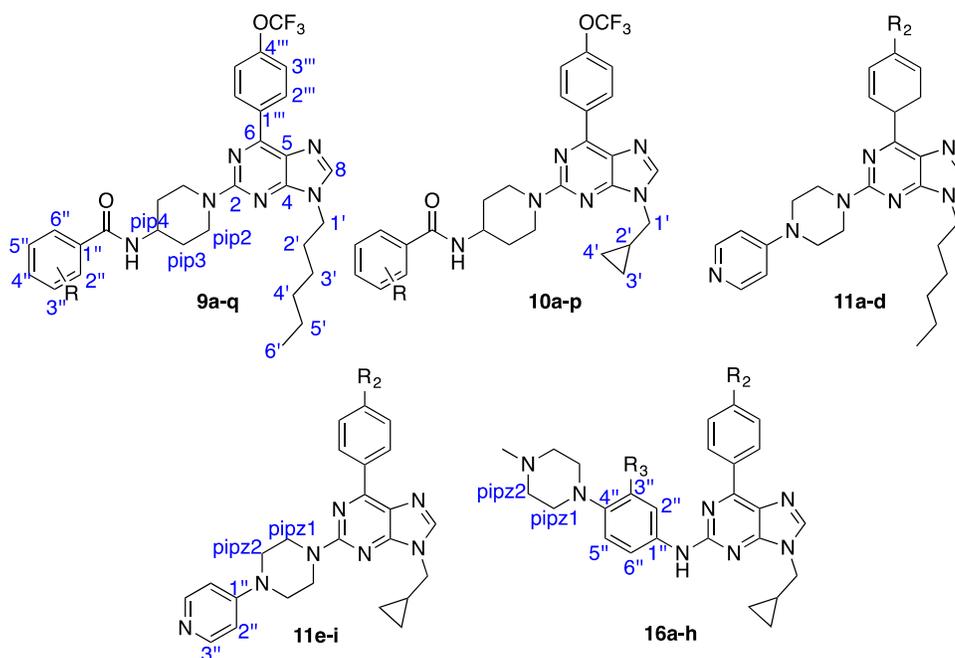
4.2.4. Procedimiento general para la síntesis de 4-(4-metilpiperazin-1il)anilina y 3-fluoro-4-(4-metilpiperazin-1il)anilina



Ambas anilinas obtenidas en esta reacción, metilpiperazinanilina y 3-fluoro-4-metilpiperazinanilina, fueron preparadas en dos etapas. La primera etapa corresponde a la reacción entre *N*-metilpiperazina y el 4-fluoronitrobenceno/1,2-difluoronitrobenceno correspondiente en presencia de K₂CO₃ con disolvente DMF

durante 2 h a temperatura ambiente, obteniendo un rendimiento superior al 90 % de **14a** y **14b**. Posteriormente, la reducción del grupo nitro a la anilina correspondiente se realizó preparando una disolución de **14a/14b** (1,35 mmol) en etanol (20 mL), se le añadió Pd/C (30 mg) y la mezcla se agitó a reflujo durante 1 h. Luego, se añadió gota a gota hidrazina (2,6 mL) a la mezcla y se agitó a reflujo durante 2 h más. Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se filtró en célite y se removió el disolvente mediante destilación a presión reducida para dar **15a/15b**, obteniendo un rendimiento superior al 97 %.

4.2.5. Procedimiento general para la síntesis de derivados finales de la Serie I y Serie II



Para la obtención de los ligandos **9a-q**, **10a-p** y **11a-i**, a una disolución de 1 eq de ligando **4a-k** se agregó 2 eq de las aminas **8a-q** (**Serie I**) o 1-(piridin-4-il)piperazina (**Serie II**), en *n*-butanol como disolvente. Además, se adicionó 6 eq de DIPEA y se dejó con agitación constantes en condiciones de reflujo por 12 h aproximadamente. Al completarse la reacción, el disolvente fue evaporado por medio de destilación al vacío y el crudo obtenido fue purificado por cromatografía en columna de gel de

sílice, con una fase móvil de éter de petróleo: acetato de etilo (en diferentes proporciones según corresponda).

Para los ligandos **16a-h** se realizó la reacción de Buchwald – Hartwig, para acoplar el nitrógeno de la anilina y el carbono C2 de la purina, bajo las siguientes condiciones: se mezcló 1 eq de ligando **4l-p** correspondiente con 1 eq de 4-(4-metilpiperazin-1il)anilina para ligandos **16a-d** o 3-fluoro-4-(4-metilpiperazin-1il)anilina para compuestos del tipo **16e-h**. Además, se añadió a ésta mezcla 0,2 eq del catalizador de paladio Pd(OAc)₂, 0,4 eq de Xantphos y 2 eq de K₂CO₃ 2 M en dioxano como disolvente, bajo reflujo durante 12 horas. Luego, el disolvente fue evaporado por medio de destilación al vacío y el crudo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, con una fase móvil de éter de petróleo: acetato de etilo (en diferentes relaciones según corresponda).

4.3. METODOLOGÍA BIOLÓGICA

4.3.4. Mantenimiento de cultivos celulares

Las líneas celulares cancerígenas AsPC-1, BxPC-3, MIA-PaCa-2, DAOY y células sanas VERO/HEK293 fueron mantenidas en medio de cultivo RPMI 1640 y/o DMEM/F12 a pH 7,4 suplementado con 10 % de suero bovino fetal inactivado, 100 U/m de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina, aminoácidos no esenciales 10 µg/mL y bicarbonato de sodio (2 g/L y 3,7 g/L). Las células se mantuvieron en una incubadora humidificada a 37 °C en presencia de 5 % de CO₂. Los ensayos biológicos se llevaron a cabo en cultivos celulares con un 80 % de confluencia.

4.3.5. Estudio de citotoxicidad

La evaluación del efecto citotóxico de los ligandos sintetizados se realizó por medio del ensayo colorimétrico de sales de tetrazolio de MTT (bromuro de 3-[4,5-

dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazol), por su capacidad de ser transformado en formazán cuando las células se encuentran metabólicamente activas.[73]

Se sembraron 5.000 células por pocillo en 100 μ L de medio (en placas de 96 pocillos), se dejaron en incubadora a 37 °C con 5 % de CO₂ durante 12 h, o hasta que estuvieran adheridas en la placa de cultivo. Luego se agregó 100 μ L de cada ligando (disueltos en medio de cultivo respectivo) y los controles (vismodegib y gemcitabina), además del control con vehículo (DMSO), cada uno por triplicado y a distintas concentraciones, según corresponda. Los diferentes tratamientos se mantuvieron en cultivo durante 72 h. Transcurrido ese tiempo, a cada pocillo se agregó 10 μ L de MTT (5 μ m/ μ L) y fueron incubadas por 4 h a 37 °C con 5 % de CO₂, luego de lo cual se agregó 100 μ L de SDS 10 % con HCl 0,1 mM. Las placas fueron nuevamente incubadas por 12 h adicionales a 37 °C con 5 % de CO₂. La absorbancia se cuantificó en un multilector Cytation 5 (Biotek) a una longitud de onda de 540 y 720 nm. Este procedimiento se repitió tres veces para cada línea celular. Los datos fueron tratados con el programa *GraphPad Prism* versión 6.01 (GraphPad Software Inc.).

4.4. METODOLOGÍA COMPUTACIONAL

4.4.1. Protocolo acoplamiento molecular:

Un protocolo de acoplamiento molecular adecuado trata de identificar la mejor combinación de un algoritmo de *docking* y una función de *scoring*. Para el presente trabajo, se usó el algoritmo del programa *Molecular Operating Environment* (MOE), el cual posee un *docking* flexible (ligando libre y proteína rígida). Para determinar la mejor función, se realizó el acoplamiento del receptor, 4QIM y 4N4W, con sus respectivos ligandos de cristalización (Anta XV y SANT-1), en un tamaño de caja/bolsillo de 4,5 Å. Para esto, se utilizaron dos metodologías *Placement* o generador de conformaciones y dos funciones de *scoring*, obteniendo diferentes poses en el sitio de unión con un valor energético. La conformación obtenida de este

análisis, que se asemeje a la conformación cristalizada del ligando, será utilizada como punto de partida para el estudio de *docking* de los ligandos de la **Serie II** y el fármaco control vismodegib. Este protocolo consta de los siguientes pasos:

El campo de fuerza corresponde a MMFF94x (Merck Molecular Force Field), parametrizado para moléculas pequeñas. Cargas parciales se basan en el incremento enlace – carga, adecuado para modelos de solvatación generalizado de Born. Los nitrógenos conjugados son considerados planares.

- 1) **Análisis conformacional:** se apartaron los ligandos Anta XV y SANT-1 de sus respectivos cristales (4QIM y 4N4W), y se realizó el análisis conformacional para cada uno, a través del método *LowModeMD*, el que consiste en pequeñas dinámicas moleculares, que involucra los enlaces rotables, dando como resultado una base de datos con las conformaciones de las moléculas.
- 2) **Ubicación (*placement*):** generación de las poses en el sitio de unión. Se consideraron los siguientes protocolos: *Alpha PMI* y *Proxy Triangle*.
 - *Alpha PMI:* Alinea los momentos principales de inercia de las conformaciones con un subconjunto de esperas del sitio de unión, seleccionadas al azar.
 - *Proxy triangle:* se utiliza para ligandos medianos y grandes, donde existe una mayor cantidad de conformaciones. Se realizan superposiciones previas de los confórmers para ahorrar tiempo.
- 3) ***Scoring:*** evaluación energética de la pose obtenida. Se usaron las siguientes funciones de *scoring*: London ΔG y GBVI/WSA ΔG .

Para determinar cual de los dos protocolos de *docking* es el adecuado para continuar este estudio, se superpone la conformación que presenta el mejor valor de *scoring* con el ligando cristalográfico, lo que arroja un valor *Root Mean Square Deviation* (RMSD), que indica cuanto se movieron los átomos del ligando según el de referencia. Mientras menor sea el valor de RMSD, significa que más se acerca a

la conformación cristalográfica de referencia. A continuación, se presentan los resultados de los protocolos, donde las Tablas 2 y 3 muestra los valores de *scoring* de la conformación de mínima energía y RMSD correspondiente a cada *placement*, obtenidos a partir del software VMD 1.9.4.

Tabla 2. Valor de RMSD para la conformación de menor energía en el cristal 4QIM con tamaño de bolsillo 4,5 Å.

<i>Placement</i>	<i>Scoring</i> (kcal/mol)	RMSD
Alpha PMI	-11,53	0,76
Proxy Triangle	-11,83	0,83

Tabla 3. Valor de RMSD para la conformación de menor energía en el cristal 4N4W con tamaño de bolsillo 4,5 Å.

<i>Placement</i>	<i>Scoring</i> (kcal/mol)	RMSD
Alpha PMI	-7,82	2,26
Proxy Triangle	-6,43	10,04

Por lo tanto, para ambos casos, cuando se tiene un sitio de unión de 4,5 Å el mejor protocolo es *Alpha PMI*.

4.4.2. Protocolo acoplamiento molecular reverso

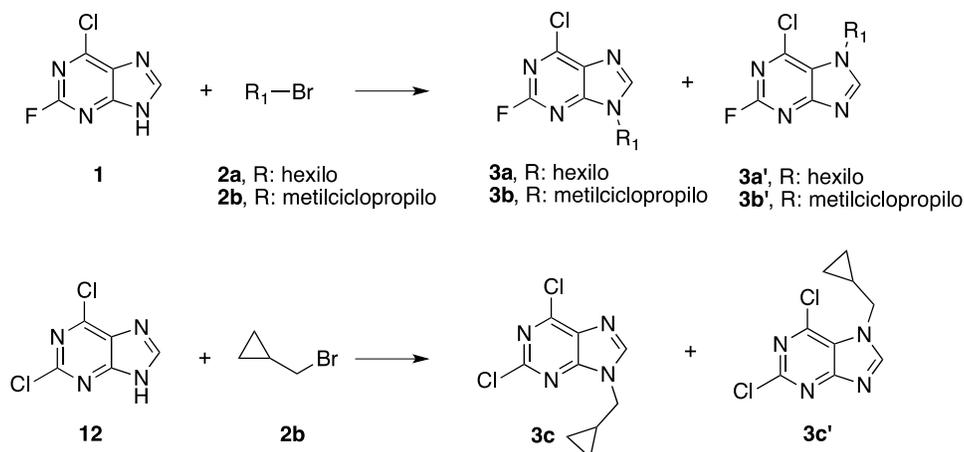
Las estructuras moleculares de los dos derivados de purina estudiados se construyeron con el programa *Molecular Operating Environment* (MOE). Los archivos (.mol) de las estructuras se enviaron a los servidores PharmMapper (<http://lilab.ecust.edu.cn/pharmmapper/>) y ChemMapper (<http://www.lilab-ecust.cn/chemmapper/>) se eligieron las opciones predeterminadas. La búsqueda se limitó a proteínas humanas con ayuda del *Protein Data Bank* (<https://www.rcsb.org>) para determinar la naturaleza de los blancos, para luego ser clasificados.

CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. SÍNTESIS DE DERIVADOS DE PURINA

5.1.1. Síntesis de 6-cloro-2-fluoro-9-hexil-9*H*-purina, 6-cloro-2-fluoro-9-metilciclopropil-9*H*-purina y 2,6-dicloro -9-metilciclopropil-9*H*-purina

La síntesis de los compuestos **3a**, **3b** y **3c** se realizó a través de una reacción de *N*-alquilación en condiciones básicas, utilizando la purina comercial 2-fluoro-6-cloro-9*H*-purina/dicloro-9*H*-purina y los haluros de alquilo correspondientes, utilizando como solvente dimetilformamida a temperatura ambiente (Esquema 4). En ambas reacciones se obtiene una mezcla de compuestos, que en primera instancia fue observada a través de cromatografía en capa fina de gel de sílice y confirmado a través de resonancia magnética nuclear (RMN). Esta mezcla se trataba de los isómeros alquilados en las posiciones N9 y N7 de la purina y en una proporción de 4:1 respectivamente, para ambos casos, dando cuenta que esta reacción no es regioespecífica. Según bibliografía,[74,75] la relación de los regioisómeros formados puede variar debido a: (1) el tamaño y naturaleza química del sustituyente en el C6 de la purina, (2) a la naturaleza del haluro de alquilo y (3) a la naturaleza química propia del núcleo de purina. Las características ácidas del -NH libre en el núcleo de purina y el carácter básico del N7 de este mismo, da cuenta que este sistema se encuentra en un equilibrio tautomérico, favoreciendo la formación de los regioisómeros (Figura 24). El rendimiento de esta reacción fue de 30 % para ambos compuestos **3a** y **3b**, mientras que para **3c** fue un poco mayor al 40 %. Cabe destacar que se cambiaron las condiciones de reacción para optimizar este paso de reacción, consiguiendo resultados desfavorables.



Esquema 4. Reacción de alquilación de 2-cloro-6-fluoro-9*H*-purina y 2,6-dicloro-9*H*-purina (**1**). *Reactivos y condiciones:* K_2CO_3 , DMF, 6 h, t.a.

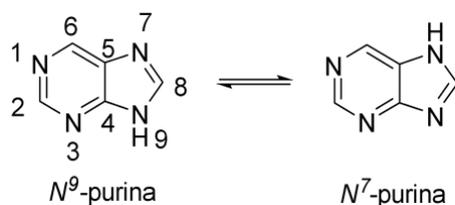


Figura 24. Equilibrio tautomérico del núcleo de purina.

La separación de estos isómeros se realizó a través de una cromatografía en columna de gel de sílice, usando como fase móvil diclorometano/acetato de etilo. La caracterización de estos fue realizada a través de RMN mono y bidimensional. A partir de estos espectros se pudo diferenciar cada uno de los isómeros, siendo el espectro de $^1H/^{13}C$ HMBC concluyente para la diferenciación de ambos intermediarios. En la Figura 25, se observa el solapamiento de los espectros de RMN- 1H de ambos regioisómeros, los cuales presentan una diferencia en los desplazamientos en los espectros de 1H , correspondientes a los protones H8 y H1', donde el isómero principal N9 (**3a**, rojo) presenta un singlete para el H8 con un desplazamiento de 8,08 ppm. En cambio, el isómero N7 (**3a'**, azul) está a campo más bajo, a 8,24 ppm. Lo mismo ocurre para el protón H1', donde el compuesto **3a** presenta un menor desplazamiento que el isómero **3a'**, 4,21 ppm y 4,44 ppm

respectivamente. Por otro lado, en el espectro de HMBC (Figura 26) del compuesto **3a'** podemos observar el acoplamiento a tres enlaces entre el H1' y el C5 (δ 121,23) y el C8 (δ 150,83) de la purina. Por otra parte, para el compuesto **3a** se observa el acoplamiento entre el protón H1' y los carbonos C4 (δ 153,78) y C8 (δ 145,91) respectivamente.

La caracterización de los carbonos cuaternarios C2, C4, C5 y C6, se realizó por medio de RMN- ^{13}C , debido a que se observan las resonancias características de los acoplamientos C-F. Para el caso del regioisómero **3a** se observan los siguientes dobletes: C2 con desplazamiento de 157,35 ppm con una constante de acoplamiento J^1 de 219,7 Hz, C4 con δ 153,78 ppm con una constante J^3 de 16,9 Hz, C6 con δ 152,69 ppm con una constante J^3 de 17,6 Hz y por último el carbono C5 con un desplazamiento 130,38 ppm con una constante J^4 de 4,8 Hz, que fueron confirmadas por bibliografía.[76]

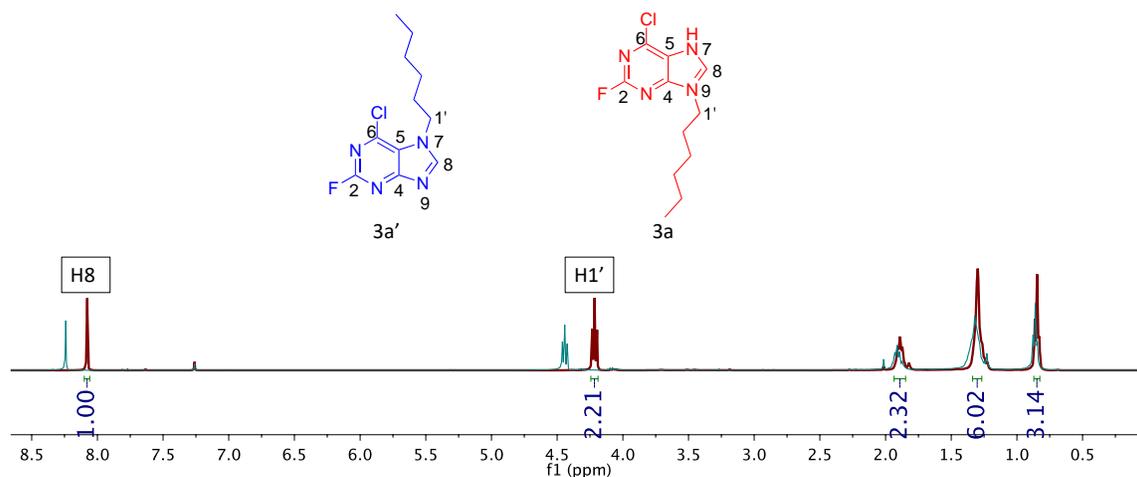


Figura 25. Solapamiento de espectros de RMN- ^1H , CDCl_3 , de los regioisómeros **3a'** (azul) y **3a** (rojo).

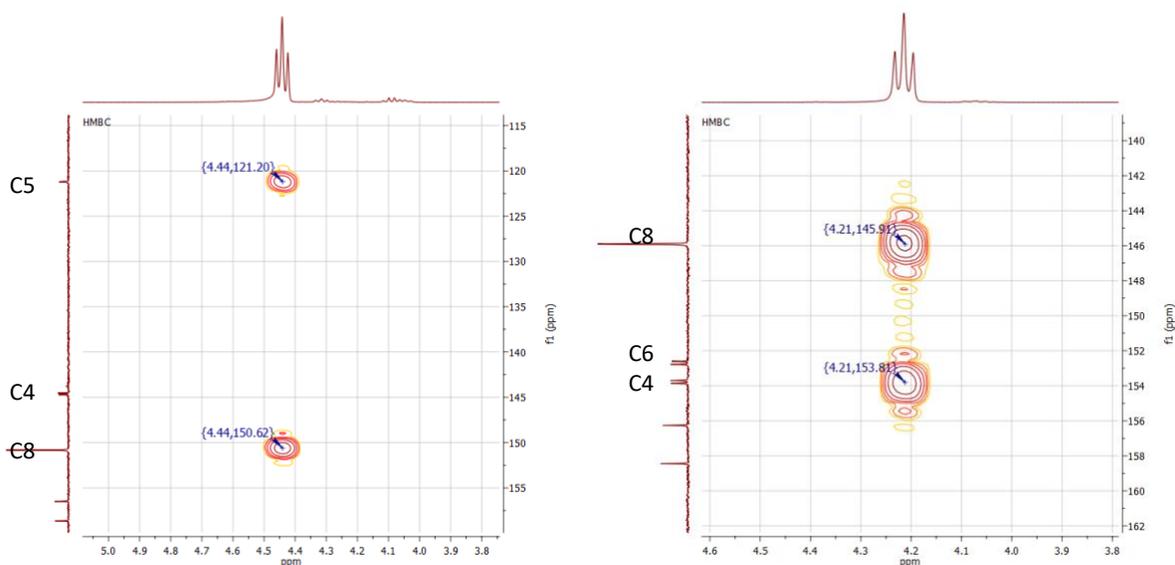


Figura 26. Espectros de $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HMBC, en CDCl_3 , ampliados en las zonas de acoplamiento de $\text{H}1'$ con los respectivos carbonos, compuesto **3a'** (izquierda); compuesto **3a** (derecha).

La caracterización de los regioisómeros **3b** y **3b'** presentó casi las mismas características de desplazamiento químicos en RMN- ^1H que las vistas para los compuestos **3a** y **3a'**. La principal diferencia reside en la zona alifática, donde los protones del ciclopropilo al ser simétricos y geminales no presentan el mismo entorno químico, por lo tanto, observamos dos señales donde diferenciamos estos protones como $\text{H}3'$ y $\text{H}4'$ (Figura 27).

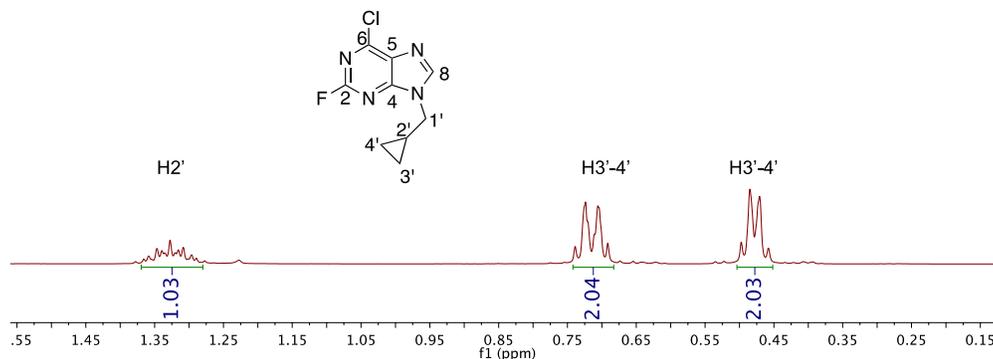


Figura 27. Espectro de RMN- ^1H (ampliado en zona alifática), en CDCl_3 , para ligando **3b**.

En cuanto a los desplazamientos químicos de los carbonos de **3b**, hubo grandes similitudes con los de **3a**, lo que podemos observar en la Figura 28, ampliando la zona de los carbonos cuaternarios, con sus constantes de acoplamiento C-F.

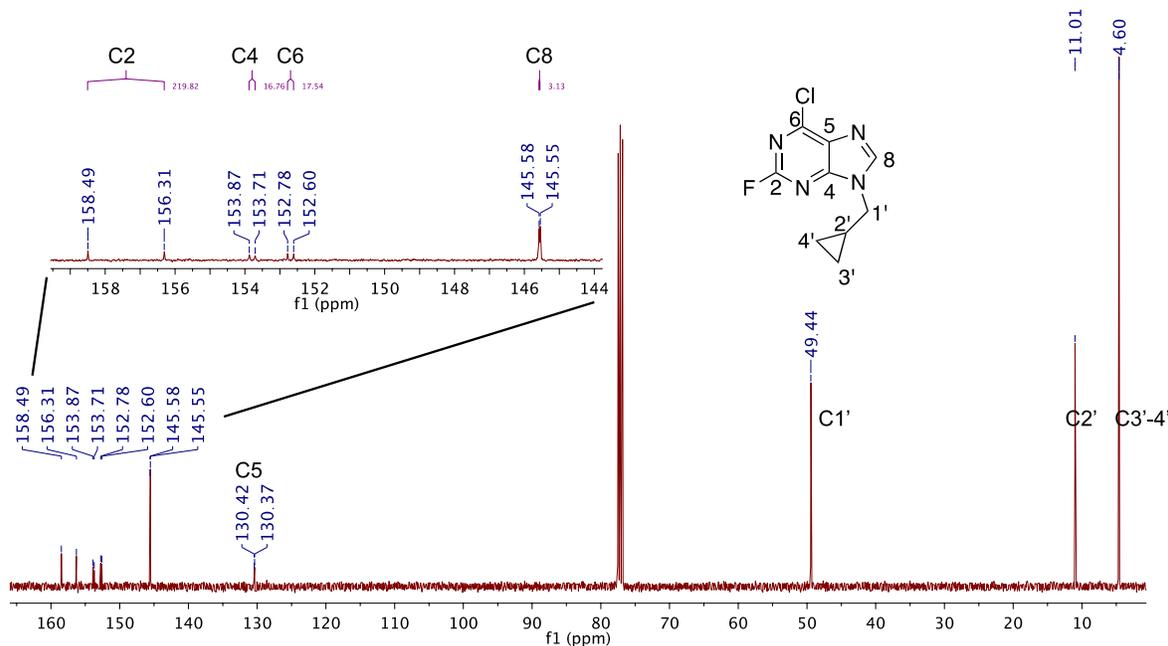


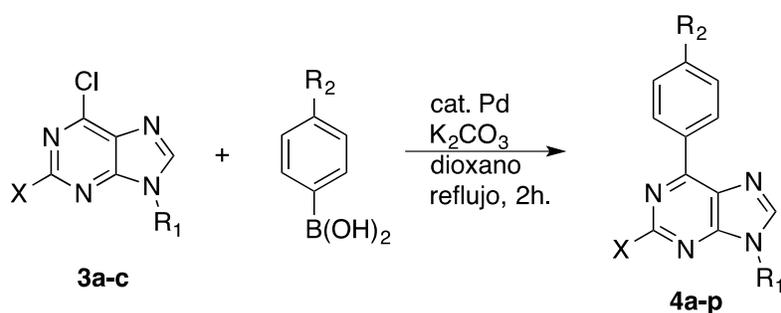
Figura 28. Espectro de RMN- ^{13}C , en CDCl_3 , para ligando **3b**.

5.1.2. Síntesis de 2-fluoro-9-hexil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9H-purina, 2-fluoro-9-metilciclopropil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9H-purina y derivados

Debido a la alta densidad de electrones π que reside sobre los átomos de nitrógeno del heterociclo purínico, los átomos de carbono adyacentes a estos muestran un carácter más electrofílico. De esta manera, sobre estos puede ocurrir una sustitución nucleofílica que estaría regida por el patrón de sustitución de la molécula al momento del ataque. En el caso del heterociclo purínico con N9 sin sustituir, el C8 es más deficiente de electrones que los C6 y C2.[77] Sin embargo, la sustitución en este nitrógeno por un grupo alquílico, modifica electrónicamente el entorno de N9. Como consecuencia, el C6 se torna más electrofílico que C8 y C2, lo que

eventualmente dirigiría un ataque nucleofílico hacia el fragmento de pirimidina, obteniendo un orden de reactividad $C6 > C2 > C8$. [78]

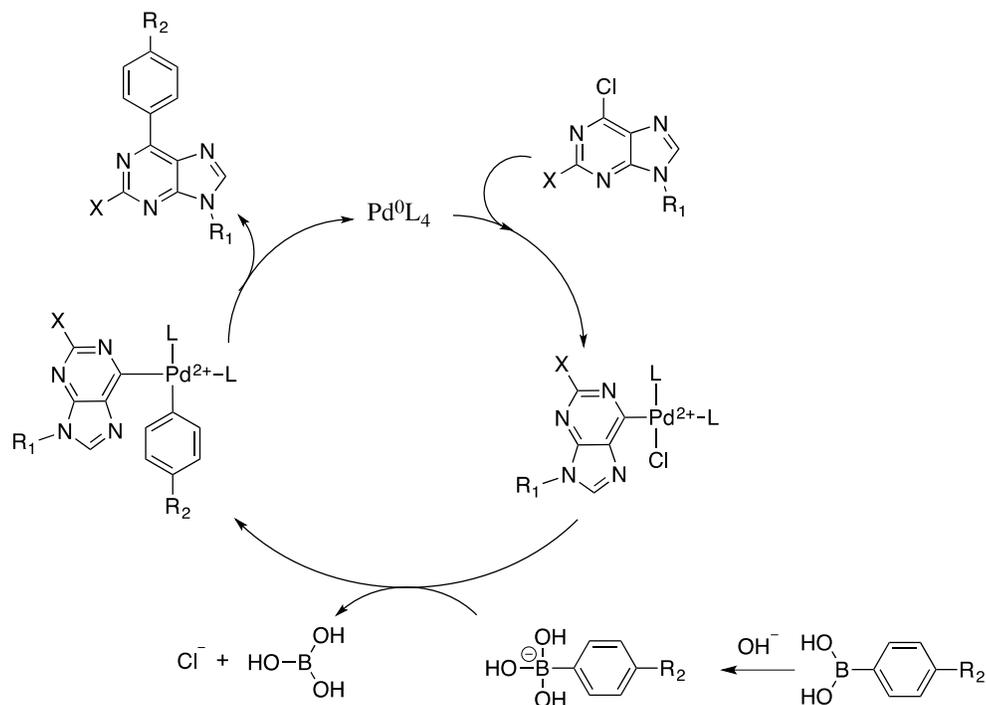
Debido a estas razones es que se realizó una reacción de acoplamiento carbono-carbono tipo Suzuki-Miyaura, entre los compuestos **3a-c** con los diferentes ácidos borónicos para la formación de los compuestos **4a-k**, respectivamente (Esquema 5). La reacción de acoplamiento cruzado de reactivos de organoboranos con haluros orgánicos o electrófilos, representa uno de los métodos más sencillos para la formación de enlaces carbono-carbono. La reacción transcurre en condiciones suaves, no se ve afectada en gran medida por la presencia de agua, tolera un amplio rango de funcionalidad, produce subproductos no tóxicos de fácil eliminación y por último es estereo y regio selectiva.



Esquema 5. Reacción general de acoplamiento carbono-carbono tipo Suzuki-Miyaura.

El Esquema 6 muestra el ciclo catalítico general para este tipo de acoplamiento. Para iniciar la reacción catalítica se requiere que el complejo de paladio tenga un estado de oxidación cero (0), pero debido a la inestabilidad de la sal de Pd(0), se utilizó el complejo de Pd(II), Pd(PPh₃)₂Cl₂. Este precatalizador se reduce en el medio y se obtiene *in-situ* el catalizador necesario para realizar la primera etapa del ciclo catalítico, denominada adición oxidativa. Esta etapa es la determinante de este ciclo, donde el paladio cambia su estado de oxidación de Pd(0) a Pd(II) acoplándose con la piridina alquilada para producir un complejo organopaladio (II). A continuación, se produce una transmetalación con el anión hidroxiboronato, donde se transfiere el grupo arilo al organopaladio (II). El compuesto organoborato se genera a partir de

la reacción entre el organoborano comercial y la base K_2CO_3 . [79] En la etapa final, ocurre una eliminación reductiva del complejo de Pd (II), formando el producto deseado 2-fluoro-6-cloro-9-alkil purina (**4a/4b**) con rendimientos del 80 % y regenerando el catalizador Pd (0).



Esquema 6. Ciclo catalítico de la reacción de acoplamiento carbono – carbono tipo Suzuki-Miyaura.

Los productos **4a-k** fueron caracterizados mediante RMN mono y bidimensional. En el espectro protónico, para el caso del ligando **4a**, se observan dos dobletes correspondientes a los cuatro protones aromáticos del fragmento 4-trifluorometoxifenilo, denominados H2'' y H3'' (Figura 29), con desplazamientos de 8,88 y 7,37 ppm, respectivamente. Por otro lado, en el espectro de RMN- ^{13}C (Figura 30) se observan un doblete y un cuarteto, que presentan constantes de acoplamiento mayor a 200 Hz, constantes J^1 de carbono-flúor, que corresponden a las señales de los carbonos cuaternarios unidos a átomos de flúor. Además, con el espectro de ^{19}F se corrobora la presencia de los átomos de flúor.

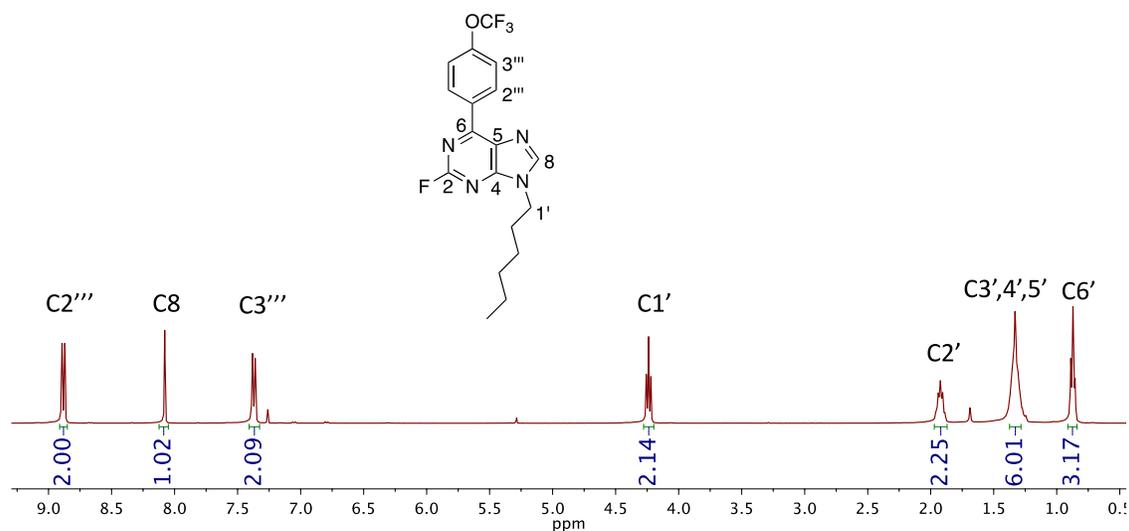


Figura 29. Espectro de RMN-¹H, en CDCl₃, del compuesto 4a.

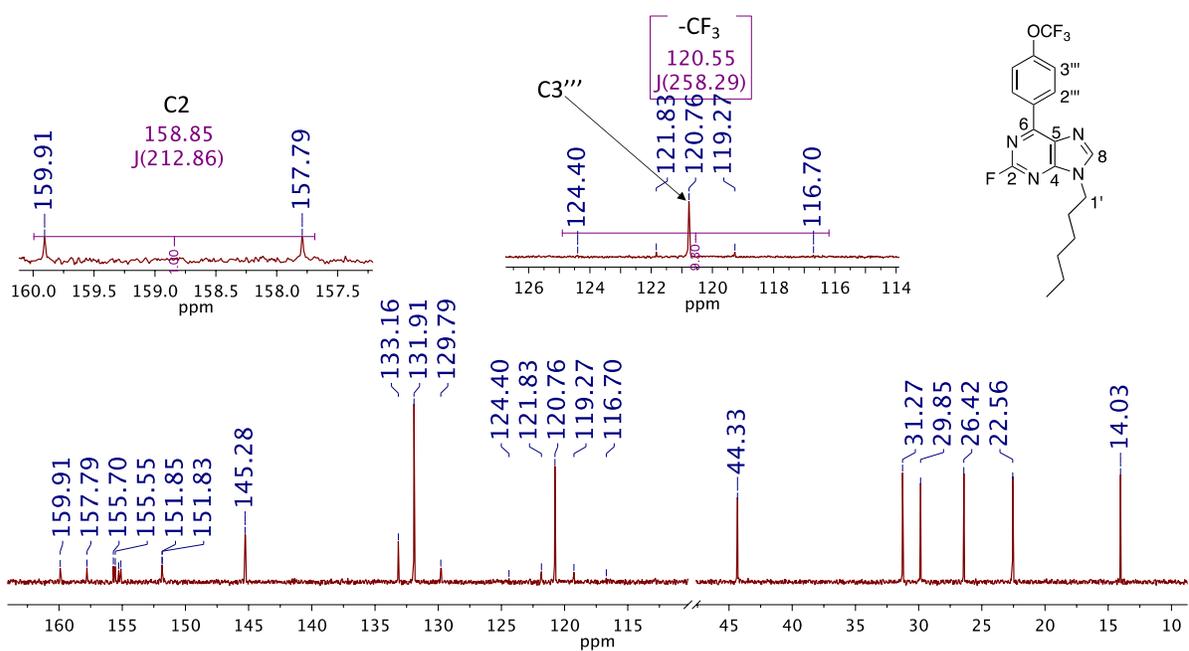
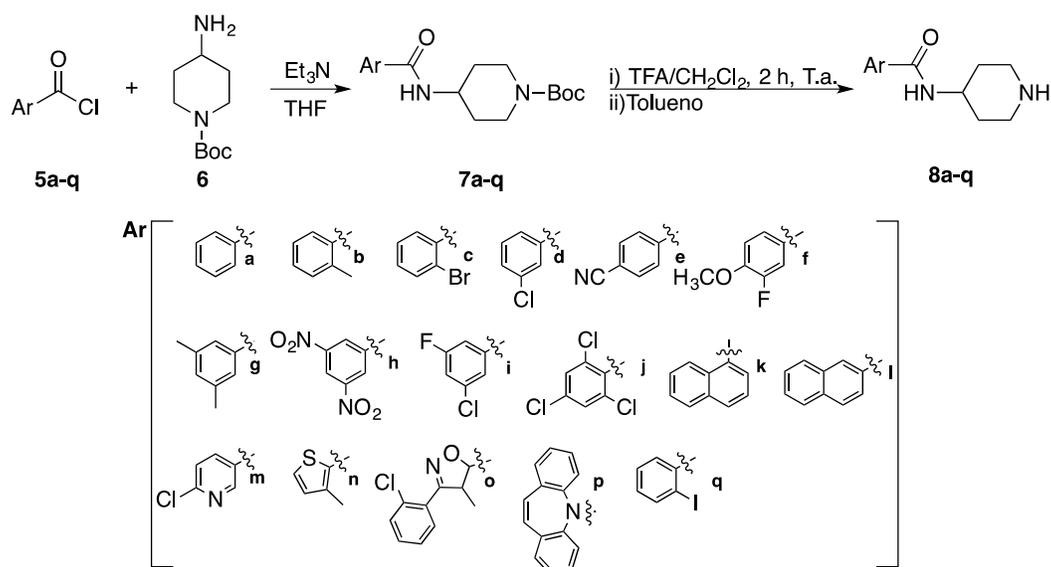


Figura 30. Espectro de RMN-¹³C, en CDCl₃, ampliado en las señales de los carbonos cuaternarios unidos/cercano a átomos de flúor, correspondiente al compuesto 4a.

5.1.3. Síntesis de derivados de *tert*-butil-4-(benzamido)-piperidin-1-carboxilato

Para optimizar los pasos de síntesis, se realizó de manera convergente la síntesis de los derivados de benzamida para la primera serie de compuestos (**9a-q** y **10a-p**, Esquema 7). Estos presentan diferentes sustituyentes del tipo aromático, con el fin de observar si las propiedades electrónicas de cada uno de ellos afectan o no la actividad biológica de estos ligandos.



Esquema 7. Síntesis convergente general para los derivados de *tert*-butil-4-(benzamido)piperidin-1-carboxilato y sus respectivos sustituyentes.

La síntesis de estos intermediarios se realizó mediante la reacción entre *tert*-butil-4-aminopiperidin-1-carboxilato y diferentes cloruros de ácido comerciales. Esta reacción permite formar el enlace amida y, en una etapa posterior, la desprotección del grupo amina por la eliminación del grupo protector *N*-Boc con ácido trifluoroacético. Este último es eliminado a presión reducida mediante la formación de un azeótropo de mínima con tolueno, dando lugar a la amina libre de manera cuantitativa. En cuanto a los rendimientos del segundo paso de la reacción, la mayor parte de estos derivados está sobre el 80 % (Tabla 4), siendo un rendimiento óptimo para la formación de las diferentes benzamidas.

Tabla 4. Rendimientos de la reacción (%) para la obtención de *tert*-butil-4-(benzamido)-piperidin-1-carboxilatos.

Derivados benzamida	Rendimiento (%)
7a	83
7b	65
7c	89
7d	86
7e	89
7f	98
7g	88
7h	89
7i	84
7j	60
7k	81
7l	82
7m	86
7n	80
7o	82
7p	52
7q	63

La Figura 31 muestra el espectro de RMN-¹H del compuesto **7l** (*tert*-butil-4-(3-metiltiofenobenzamido)piperidin-1-carboxilato) antes de su desprotección, donde se destaca la señal con multiplicidad de doblete con desplazamiento de 5,75 ppm, correspondiente al protón de la amida formada. Además, se observan las señales de los protones del fragmento piperidina, con desplazamientos de 4,10 – 3,99 ppm que integra para tres protones, 2,88 ppm que integra para dos protones, 2,00 – 1,95 ppm y 1,41 – 1,33 ppm, ambas resonancias integran para dos protones cada una. Cabe destacar que los protones geminales no presentan el mismo entorno químico debido a la conformación que adopta el fragmento piperidina. Por lo tanto, estos presentan diferentes desplazamientos, que se indican en la imagen, como H-pip2 y H-pip3. Esto fue corroborado a través del espectro ¹H/¹³C HMQC, donde se observaron los acoplamientos C – H unidos directamente, en el cual las señales de los protones piperidínicos acoplaban cada una a dos carbonos diferentes.

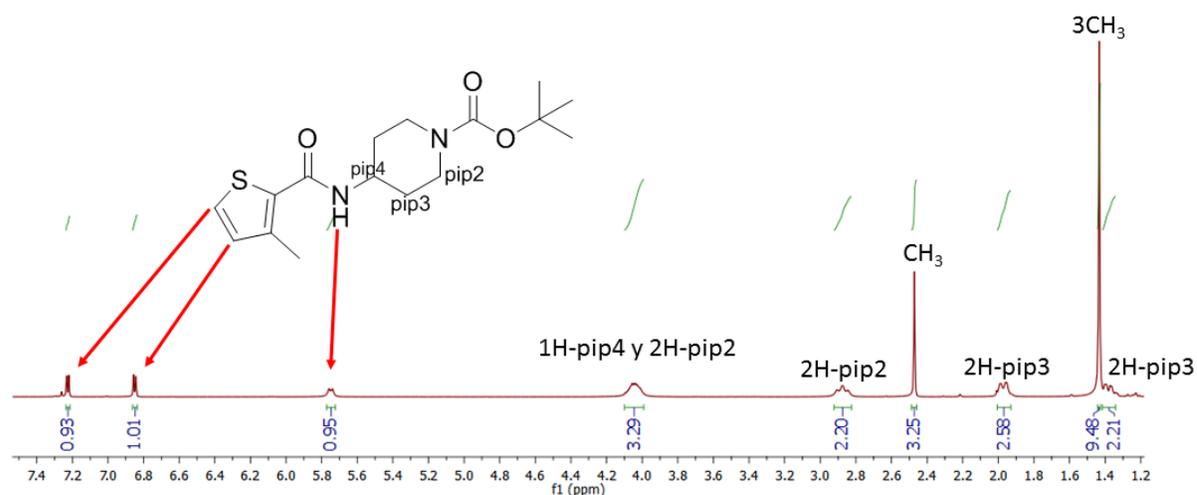
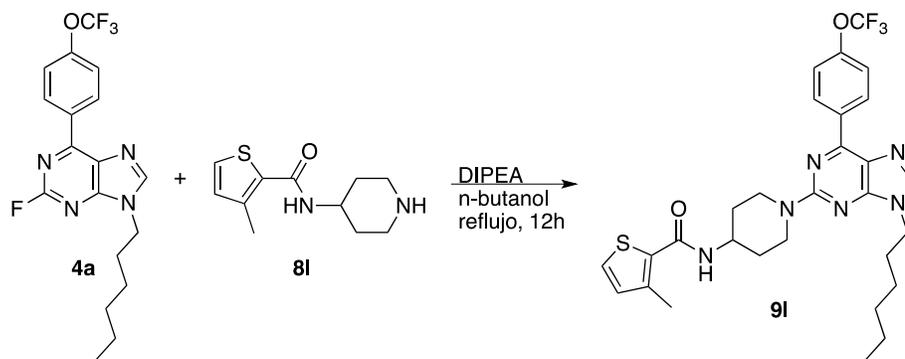


Figura 31. Espectro de RMN-¹H, en CDCl₃, del *tert*-butil-4-(3-metiltiofenobenzamido)piperidin-1-carboxilato **7I**.

5.1.4. Síntesis de derivados finales Serie I y Serie II

Como último paso de reacción, para la obtención de los productos finales de la **Serie I: 9a-q y 10a-p** y **Serie II: 11a-i, 16a-h**, se realizó una sustitución nucleofílica aromática. La cual se realizó con los productos de la reacción de acoplamiento tipo Suzuki (Esquema 8) y las aminas alicíclicas y cíclicas respectivas. Esta reacción ocurre mediante el mecanismo de adición-eliminación, donde el nucleófilo se adiciona a la posición del átomo de flúor (C2 del heterociclo de purina), el cual presenta características de ser un buen grupo saliente[80] y por consiguiente es eliminado, recuperándose la aromaticidad del anillo de purina. Además, se utiliza DIPEA como base debido a que esta presenta una menor reactividad como nucleófilo en comparación con la amina alicíclica.



Esquema 8. Reacción ejemplo de sustitución nucleofílica aromática entre el compuesto **4a** y el derivado de benzamida **8n**.

A diferencia de la reacción de formación de amidas, los rendimientos de reacción de esta sustitución fueron variados. Sin embargo, fueron todos mayores al 56 %, por lo que se consideran rendimientos de óptimos a buenos (Tabla 5).

Tabla 5. Rendimientos de reacción (%) para la obtención de los productos finales de las **Series I y II**.

Compuesto	Rdto. (%)	Compuesto	Rdto (%)	Compuesto	Rdto.(%)
9a	63	10a	70	11a	57
9b	79	10b	67	11b	72
9c	77	10c	80	11c	68
9d	56	10d	78	11d	70
9e	71	10e	81	11e	61
9f	75	10f	65	11f	30
9g	67	10g	89	11g	56
9h	66	10h	71	11h	60
9i	92	10i	86	11i	75
9j	73	10j	77		
9k	61	10k	79		
9l	93	10l	87		
9m	65	10m	82		
9n	60	10n	75		
9o	87	10a	79		
9p	84	10p	83		
9q	79				

Al igual que los diferentes intermediarios, los productos finales fueron caracterizados mediante RMN. A modo de ejemplo, en el espectro de RMN-¹H

mostrado en la Figura 32 se observan las diferentes resonancias de los respectivos protones del compuesto **9l**. En este se observan las señales aromáticas correspondientes al fragmento tiofeno y un singlete en la zona alifática de los tres protones del grupo metilo, en la posición C3 del tiofeno, indicada con la flecha.

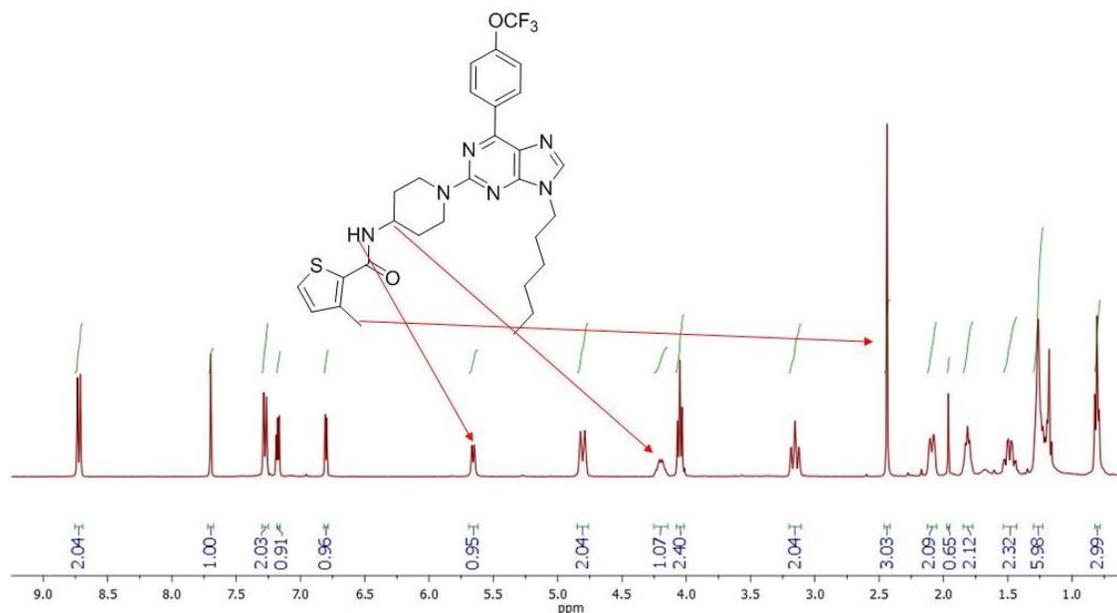


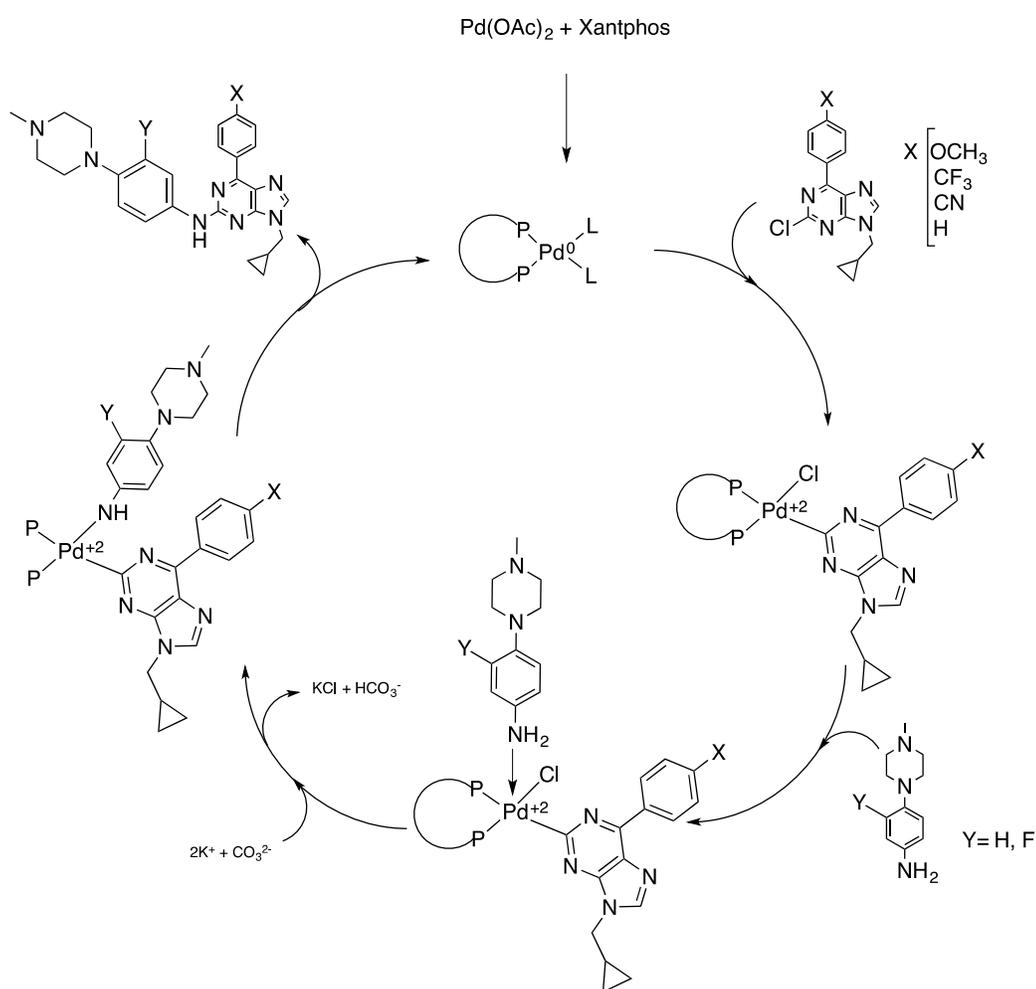
Figura 32. Espectro de RMN-¹H, en DMSO-*d*₆, del compuesto final **9n**.

Cabe destacar que los compuestos de la **Serie I** presentan una baja solubilidad. Se probaron diferentes disolventes para realizar el análisis de RMN, siendo solubles solo en DMSO-*d*₆ a una elevada temperatura. Por el contrario, esto no ocurrió para los compuestos de la **Serie II**, que presentaron una mejor solubilidad en la mayoría de los disolventes.

Para el caso de los compuestos de la **Serie II 16a-h**, el último paso de reacción no fue una sustitución nucleofílica aromática, sino una reacción de acoplamiento Buchwald – Hartwig. Esto debido a que el nuevo fragmento que se está incorporando contiene una amina aromática. Este acoplamiento es una reacción catalítica organometálica para la formación de enlaces C–N entre aminas aromática y haluros de arilo. Esta corresponde a un acoplamiento cruzado mediado por paladio en presencia de una cantidad estequiométrica de base. El catalizador se compleja, generalmente, con quelantes tipo fosfinas, como, por ejemplo: BINAP, DPPF,

XantPhos y DPBP. En este caso se escogió como ligando a XantPhos ya que es uno de los más utilizados en este tipo de reacción.[81]

En el **Esquema 9** se observa el ciclo catalítico de la reacción, contextualizado en la síntesis de la segunda serie. El primer paso del ciclo consiste en la formación del complejo de XantPhos con paladio. La formación de este complejo aumenta la estabilidad de la catálisis por un aumento de la densidad electrónica en el centro metálico, lo que aumenta la reactividad del catalizador, favoreciendo el paso de adición oxidativa.[82]



Esquema 9. Ciclo catalítico de la reacción Buchwald – Hartwig para la obtención de los ligandos restantes de la **Serie II**.

Como segundo paso tenemos la adición oxidativa, que ocurre entre el complejo de paladio con el haluro de arilo. En este caso, el haluro de arilo corresponde a la molécula resultante de la reacción de Suzuki – Miyaura. Luego, se coordina el derivado de anilina al centro metálico de paladio (II). La anilina coordinada se desprotona por medio de la base, lo que permite una estabilización de la unión de esta con el paladio. Finalmente, ocurre la eliminación reductiva producto de la formación del enlace C – N deseado,[82,83] lo que da como resultado los productos finales **16a-h** de la **Serie II**, con rendimientos de moderados a buenos (**Tabla 6**), y la recuperación del catalizador de paladio.

Tabla 6. Rendimiento de reacción (%) para los compuestos restantes de la **Serie II**.

Compuesto	Rdto. (%)
16a	62
16b	59
16c	72
16d	70
16e	66
16f	57
16g	59
16h	68

En la Figura 33, se puede observar el espectro de RMN-¹H para el ligando **16a**, con la asignación de los protones correspondientes, donde la mayoría de los ligandos siguen el mismo patrón.

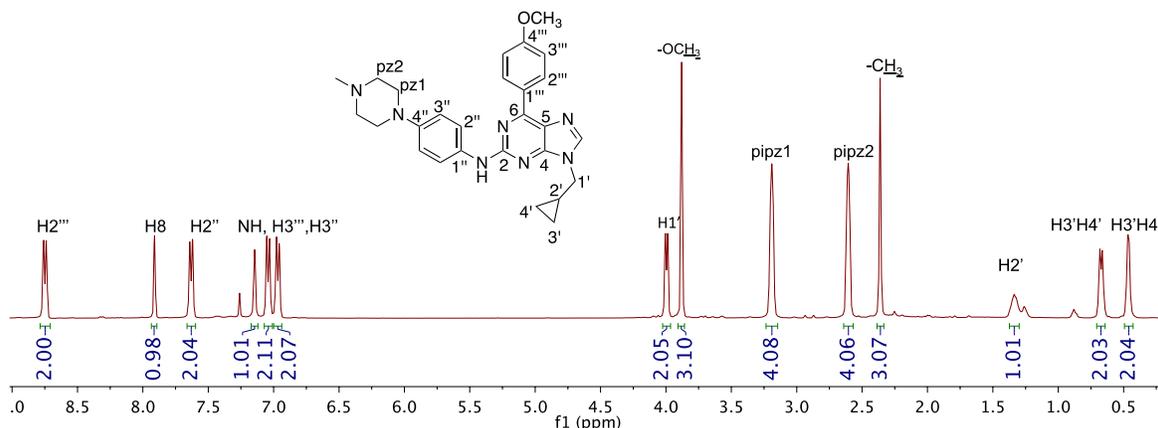


Figura 33. Espectro de RMN-¹H, en CDCl₃, del ligando final **16a**.

5.2. EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE LOS COMPUESTOS FINALES SERIE I y II

Una vez obtenidos y caracterizados los compuestos finales correspondientes a las purinas 2,6,9-trisustituidas, se realizó la evaluación de la citotoxicidad utilizando para ello un panel de diferentes líneas celulares cancerígenas de páncreas (AsPC-1, BxPC-3 y MIA-PaCa-2), meduloblastoma (DAOY) y células no cancerígenas (VERO y HEK293), dependiendo del caso. Todas estas líneas celulares, expresan en mayor o menor proporción los componentes de la vía de señalización Hedgehog, tales como Gli y Ptch.

Con el fin de realizar un filtro y seleccionar sólo aquellos compuestos que exhibiesen una citotoxicidad significativa (superior al 50 %) en las líneas celulares indicadas anteriormente y que pudieran considerarse candidatos para el estudio de inhibición de la vía de señalización Hedgehog, se evaluó la viabilidad celular frente a los ligandos finales sintetizados mediante la técnica colorimétrica de reducción del MTT. Por lo tanto, se busca encontrar compuestos que sean citotóxicos y selectivos para líneas celulares cancerígenas, en especial del tipo pancreáticas, y además presenten una inhibición en la vía de señalización Hh. Para poder determinar esto último se requiere experimentos biológicos, donde se pueda observar esta

característica como: el ensayo de gen reportero Gli-Luciferasa, PCR-rt, *Western Blot*, entre otros. Para efectos de este trabajo de tesis no fue posible realizar estos experimentos debido a diferentes factores, por lo que solo se abarcará el efecto citotóxico de ambas series de compuestos sintetizadas.

En una primera instancia, se realizó el *screening* para los compuestos **9a-q** y **10a-p** a una concentración fija de los ligandos (25 μ M), en tres experimentos independientes por triplicado cada uno de ellos. Las células HEK293 fueron utilizadas como células control. El compuesto vismodegib, antagonista comercial de Smo, que sirvió como control positivo para la vía de transducción y gemcitabina como control de terapia antineoplásica de cáncer pancreático. Se eligió esta concentración de *screening*, debido a que se busca obtener compuestos que tengan una alta citotoxicidad en las líneas celulares cancerígenas, que posean un valor de IC₅₀ que se encuentre en un rango de escala de acción micro y/o nanomolar.

Todos los análisis estadísticos y los gráficos mostrados a continuación se hicieron con el programa *GraphPad Prism 6* y para estudiar las diferencias de los ligandos sintetizados con el control, se aplicó el análisis no paramétrico *t-Student* de dos colas, considerando los resultados significativamente diferentes cuando el valor $p < 0,05$.

En la Figura 34, se observa que frente a la adición de estos derivados de purinas y/o vismodegib, todas las líneas celulares exhibieron una viabilidad mayor al 50 %, lo cual indica que estos compuestos no presentaron una acción citotóxica a la concentración ensayada. Por su parte, gemcitabina, mostró tener una citotoxicidad mucho mayor a esta concentración en las diferentes líneas celulares estudiadas. La baja citotoxicidad para vismodegib en células de cáncer pancreático ya había sido reportada,[46] donde sus valores de IC₅₀ están alrededor de 100 μ M en MiaPaCa-2 y BxPC-3, lo cual indica que nuestros resultados serían comparables a lo descrito para este compuesto. De esta manera, podemos concluir que la baja citotoxicidad de estos ligandos no necesariamente da cuenta del efecto que producirá en la

cascada de señalización. No obstante, cabe destacar que éstos derivados de purinas, no ejercen una toxicidad en las células sanas, lo que es favorable al comparar con el control gemcitabina, que muestra una citotoxicidad de aproximadamente del 50 % en las células sanas. De los gráficos mostrados en la Figura 34, se puede concluir preliminarmente que el compuesto **9m** para el caso de células cancerígenas BxPC-3, y el compuesto **9k** para las células AsPC-1, son los únicos que presentaron un efecto citotóxico estadísticamente significativo comparado al control ($p < 0,05$).

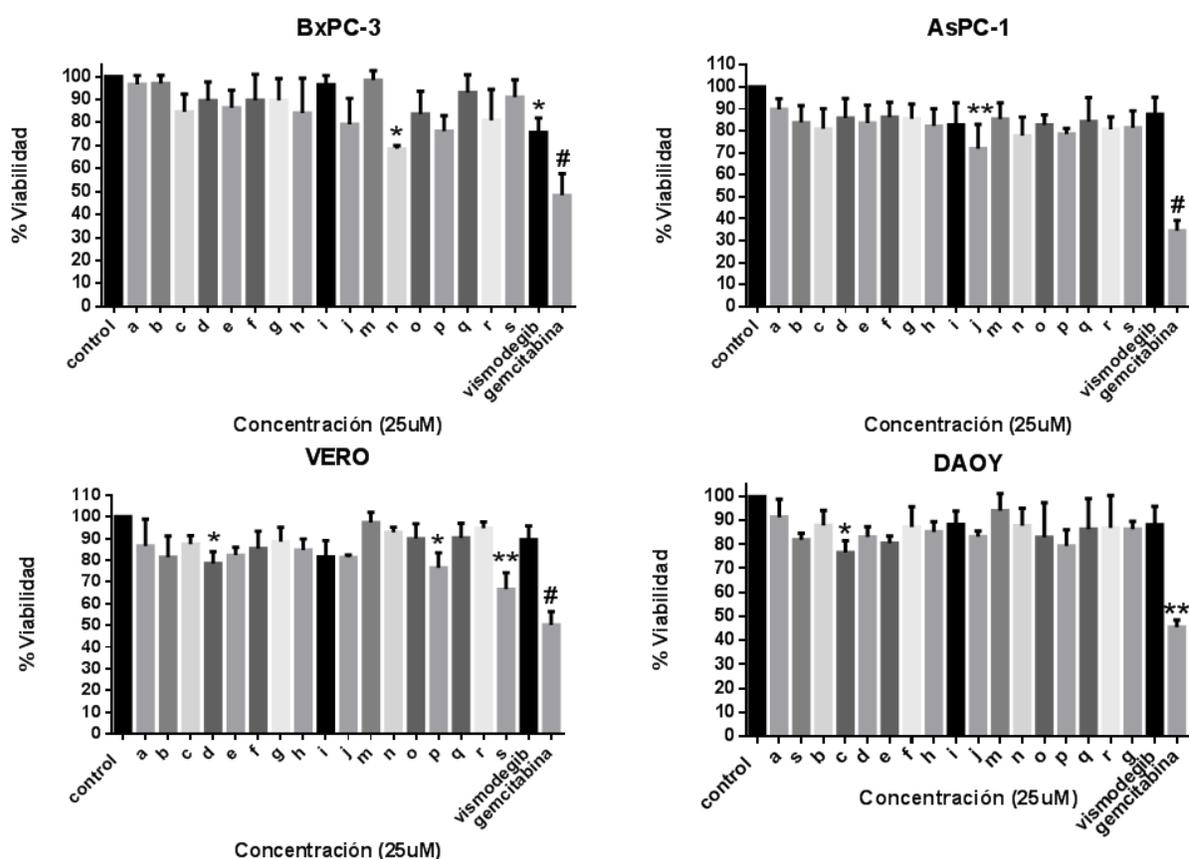


Figura 34. Gráficos de viabilidad celular a concentración constante (25 μ M), de los ligandos **9a-p** frente a las líneas celulares cancerígenas y sanas, (*t-student* no paramétrico comparando con el control; *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ y #: $p < 0,001$).

Como una manera de extender nuestro análisis, y considerando que vismodegib presenta efectos de inhibición celular a concentraciones superiores a la ensayada

anteriormente, se decidió explorar el efecto de los compuestos sintetizados a una mayor concentración (50 μM) en relación con los experimentos anteriores y evaluar un efecto citotóxico en las diferentes líneas celulares. Los resultados mostraron que, a esta concentración, varios de los derivados de purina precipitaron en las condiciones de cultivo. Por esta razón, se decidió cambiar el disolvente DMSO por DMF, siendo estos un poco más solubles. Los resultados de citotoxicidad para los compuestos en estudio y sus controles, a 50 μM en DMF, se muestran en la Figura 35. Se puede observar que estos compuestos no mostraron, globalmente, un mayor efecto citotóxico al ya exhibido a 25 μM . Además, de estos resultados, se hace necesario comparar el efecto de algunos de nuestros compuestos con vismodegib, que sí mostraron diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$). De esta manera, se puede determinar el valor de IC_{50} , dependiendo de la línea celular, entre ellos **9h** y **9p** en células BxPC-3 y **9i**, **9J**, **9k**, **9m** y **9n** en caso de células DAOY.

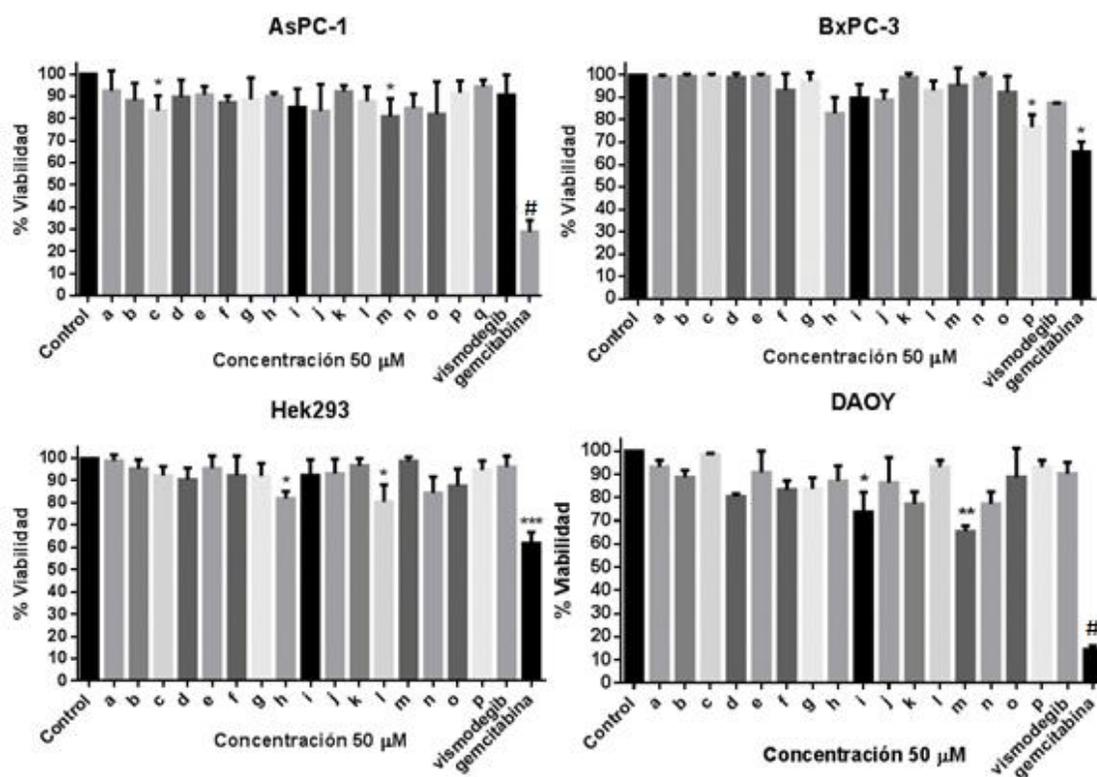


Figura 35. Gráficos de viabilidad celular a 50 μM de los ligandos **9a-p**, (*t*-student no paramétrico comparando con el control; *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ y #: $p < 0,001$).

Por otro lado, considerando la actividad biológica de los derivados **9a-q** a una concentración 50 μM , se decidió realizar un *screening* a la misma concentración de los compuestos **10a-p** en DMF como disolvente, para poder realizar luego las comparaciones pertinentes. La Figura 36, muestra los porcentajes de viabilidad que presentaron las líneas celulares tratadas con los ligandos **10a-p**, las que exhibieron una respuesta similar a la de sus análogos **9a-q**.

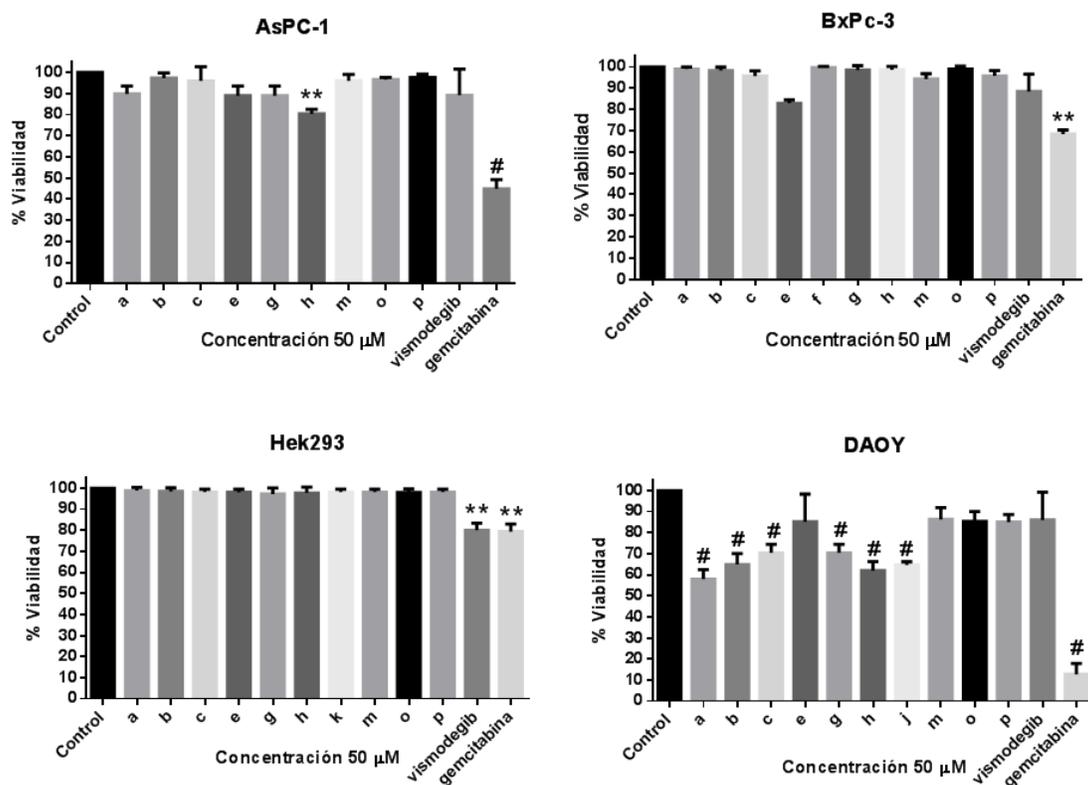


Figura 36. Gráficos de viabilidad celular a 50 μM de los ligandos **10a-p**, (*t-student* no paramétrico comparando con el control; *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ y #: $p < 0,001$).

A pesar de que los ligandos sintetizados no presentaron una citotoxicidad considerablemente mayor a vismodegib o cercana a gemcitabina, no podemos descartar estos compuestos, debido a que uno de los objetivos es determinar si estos ejercen o no una inhibición en la vía de señalización Hh, la cual no estaría relacionada directamente con la viabilidad celular. Por lo tanto, se procedió a realizar un nuevo estudio de citotoxicidad por el mismo método colorimétrico de MTT

(usando como solvente DMF), pero ampliando el rango de concentraciones en escalas de 0,5, 5, 10, 25, 50 y 100 μM , para obtener los valores de IC_{50} de los compuestos **10a-p** (Tabla 7). Es fundamental conocer el valor del IC_{50} , ya que define la concentración necesaria del compuesto para reducir la viabilidad celular en un 50 % en ensayos *in vitro*.

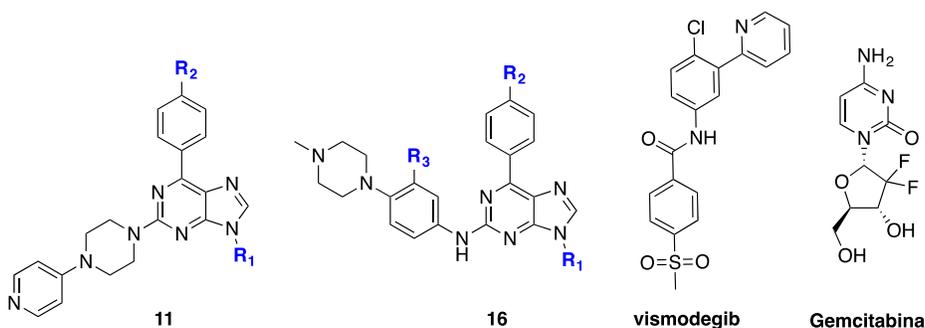
Tabla 7. Valores de IC_{50} (μM) de los ligandos **10a-p**, frente a las líneas celulares cancerígenas de páncreas (AsPC-1 y BxPC-3) en dos experimentos independientes (n=2).

Compuesto	$\text{IC}_{50}(\mu\text{M})$	
	AsPC-1 n=1	BxPC-3 n=2
10a	>100	>100
10b	>100	>100
10c	>100	99
10d	>100	>100
10e	>100	>100
10f	73	>100
10g	>100	$43 \pm 1,3\text{E}-6$
10h	>100	$44 \pm 4,4\text{E}-5$
10i	>100	>100
10j	>100	>100
10k	>100	>100
10l	>100	>100
10m	>100	>100
10n	>100	>100
10o	>100	>100
10p	>100	>100
Vismodegib	~100	~100

Como se observa en la Tabla anterior, de dos experimentos independientes se obtuvieron los valores de IC_{50} de los compuestos **10a-p**, donde la mayoría presentó valores mayores a 100 μM , Aún con estos valores, no se pueden descartar estos compuestos, ya que como se ha mencionado vismodegib presenta un IC_{50} aproximadamente de 100 μM y tiene la capacidad de inhibir la vía de señalización Hh, mediante su unión con el receptor Smo. A pesar de que los compuestos **10g** y **10h** presentaron un IC_{50} aproximado de 44 μM .

Seguendo el procedimiento anterior, se determinó el IC₅₀ para los compuestos **11a-i** y **16a-h** (Tabla 8), cabe destacar que la solubilidad de estos compuestos es mucho mejor en relación con la serie anterior de ligandos.

Tabla 8. Valores de IC₅₀ (μM) de los ligandos de **Serie II**, frente a las líneas celulares cancerígenas de páncreas (AsPC-1, BxPC-3 y MIA-PaCa-2) en tres experimentos independientes (n=3).



Compuesto	Sustituyentes			IC ₅₀ (μM)		
	R ₁	R ₂	R ₃	BxPC-3	AsPC-1	MIA-PaCa-2
11a	<i>n</i> -hexilo	OCH ₃	-	7,13 ± 0,47	5,14 ± 1,39	3,96 ± 0,23
11b	<i>n</i> -hexilo	CF ₃	-	5,65 ± 0,86	5,37 ± 0,21	1,39 ± 0,09
11c	<i>n</i> -hexilo	CN	-	4,48 ± 0,36	4,68 ± 0,74	1,56 ± 0,02
11d	<i>n</i> -hexilo	NO ₂	-	10,6 ± 1,82	5,24 ± 2,37	9,21 ± 0,37
11e	metilciclopropilo	OCF ₃	-	3,28 ± 0,11	5,28 ± 0,49	2,88 ± 0,02
11f	metilciclopropilo	OCH ₃	-	>25	9,66 ± 3,52	4,55 ± 0,50
11g	metilciclopropilo	CF ₃	-	5,07 ± 0,16	5,75 ± 0,22	2,96 ± 0,11
11h	metilciclopropilo	CN	-	>25	>25	>25
11i	metilciclopropilo	NO ₂	-	>25	2,31 ± 0,23	>25
16a	metilciclopropilo	OCH ₃	-	>25	4,35 ± 4,73	2,97 ± 1,32
16b	metilciclopropilo	CF ₃	-	5,12 ± 0,07	6,85 ± 0,38	1,76 ± 0,58
16c	metilciclopropilo	CN	-	>25	5,35 ± 3,27	>25
16d	metilciclopropilo	-	-	>25	>25	>25
16e	metilciclopropilo	OCF ₃	F	5,80 ± 0,07	9,59 ± 1,60	3,08 ± 0,29
16f	metilciclopropilo	OCH ₃	F	10,1 ± 0,79	>25	4,56 ± 0,16
16g	metilciclopropilo	CN	F	>25	3,95 ± 1,63	4,11 ± 1,12
16h	metilciclopropilo	-	F	>25	>25	8,30 ± 0,17
Vismodegib	-	-	-	>25	>25	>25
Gemcitabina	-	-	-	12,12 ± 1,67	1,33 ± 0,29	13,45 ± 1,33

La tabla anterior da cuenta que la citotoxicidad de los compuestos de esta serie es algo heterogénea y que depende de la línea celular. Sin embargo, algunas observaciones generales se pueden apreciar como que, existen varios derivados purínicos que son más activos que vismodegib y gemcitabina. Por otro lado, se

puede evidenciar que las células BxPC-3 fueron mas resistentes a la acción de estos derivados purínicos (8 compuestos con $IC_{50} > a 25 \mu M$) en comparación con AsPC-1 y MIA-PaCa-2 (4 compuestos con $IC_{50} > a 25 \mu M$). Así mismo, del punto de vista químico, al comparar los compuestos de la **Serie II** con los de la **Serie I**, resulta interesante evidenciar el efecto de la sustitución en C2 del anillo purínico, como punto clave para la actividad citotóxica. La diferencia de actividad, si bien pudiera inicialmente será atribuida a la solubilidad en las condiciones de los experimentos de citotoxicidad, es algo que requiere estudiar más en detalle. Por su parte, dentro de la misma **Serie II** existen dos subfamilias, unos análogos de **VII (11a-i)** y los análogos de **VIII (16a-h)**, que se diferencian por el fragmento nitrogenado unido al anillo de purina en C2. Considerando esta subdivisión, los compuestos del tipo aril-piperazina (**11a-i**) parecieran ser mas activos que los del tipo *N*-metil-piperazinil-anilina (**16a-h**).

Por otro lado, teniendo en cuenta que, para el desarrollo de nuevas drogas antitumorales es de gran importancia que estos presenten baja toxicidad en células no neoplásicas, los compuestos de la **Serie II** que presentaron valores de IC_{50} menor a $25 \mu M$, se les determinó su efecto citotóxico en células HEK293 (Tabla 9). A partir de los valores de IC_{50} en esta línea celular, se calculó el Índice de Selectividad (IS), para así analizar la selectividad de estos compuestos frente a la líneas cancerígenas ensayadas, según se indica en la Tabla 9.

Tabla 9. Valores de IC₅₀ (μM) en células HEK293 e Índice de Selectividad (IS) en la líneas de cáncer de páncreas de ligandos de la **Serie II**.

Compuesto	IC ₅₀ (μM)	IS BxPC-3	IS AsPC-1	IS MIA-PaCa-2
11a	7,07 ± 3,95	0,99	1,38	1,79
11b	4,69 ± 1,82	0,83	0,87	3,37
11c	41,18 ± 3,84	9,19	8,80	26,40
11d	3,93 ± 1,65	0,37	0,75	0,43
11e	3,76 ± 1,57	1,15	0,71	1,31
11f	8,98 ± 5,95	-	0,93	-
11g	2,99 ± 3,07	0,59	0,52	1,01
11h	>50	-	-	-
11i	1,33 ± 1,74	-	0,58	-
16a	11,88 ± 2,06	-	2,73	4,00
16b	5,37 ± 2,97	1,05	0,78	3,05
16c	61,10 ± 4,08	-	11,42	-
16d	>50	-	-	-
16e	10,93 ± 5,57	1,88	1,14	3,55
16f	41,16 ± 6,27	4,08	-	9,03
16g	>50	-	12,66	12,17
16h	>50	-	-	6,02
Vismodegib	>50	-	-	-
Gemcitabina	29,62 ± 1,44	2,44	22,27	2,20

A partir de los valores de IC₅₀ de las Tablas 8 y 9, es posible relacionar la estructura química de los compuestos ensayados con la citotoxicidad y selectividad por cada línea celular, de donde se puede observar que:

- i) Para células BxPC-3, el compuesto más activo fue **11e**, siendo casi 4 veces mas citotóxico que gemcitabina. Sin embargo, el valor de IS de **11e** es solo 1,2. También, señalar que al comprar **11e** con sus análogos **11f-i**, la presencia del grupo trifluorometoxilo (en posición *para* del grupo fenilo unido a C6 de la purina), es un factor importante para la actividad. Así mismo, su análogo trifluorometilo (**11g**) tuvo un actividad similar, pudiendo indicar que mas que un grupo aceptor de electrones en esta posición, la presencia de átomos de flúor en estas purinas pudiera tener algún rol en la actividad para esta línea tumoral. Del punto de vista de la selectividad, el compuesto **11c**

presentó el valor más alto de IS, lo cual era de esperarse debido a que fue el compuesto junto con **16f**, que presentaron los valores más altos de IC₅₀ en células HEK. **11c** y **16f** resultaron ser casi 4 y 2 veces más selectivos que gemcitabina. Por último, no queda claro si el efecto del radical alquílico en N9 tiene alguna importancia en la actividad al analizar los resultados para **11a-i**. Para los compuestos del tipo *N*-metil-piperazinil-anilina (**16a-h**) es posible hipotetizar que la sustitución del H en la posición *para* del grupo fenilo único en C6, favorece la actividad citotóxica.

ii) Para AsPC-1, el compuesto más activo fue **11i** (IC₅₀ = 2,31 μM), pero no más citotóxico que gemcitabina y además posee un IS menor a 1. Por esta razón, los compuestos a destacar por su actividad y selectividad en esta línea celular son **16g** y **16c** (IC₅₀ = 3,95 y 5,35 μM e IS = 12,7 y 11,4 respectivamente). Del punto de vista estructural, ambos son compuestos que poseen el fragmento *N*-metil-piperazinil-anilina unida a la purina en C2 e interesantemente tienen como sustituyente en la posición *para* del grupo fenilo único en C6, el grupo nitrilo. Este mismo grupo nitrilo también está presente en el compuesto **11c**, otro derivado purínico que resultó ser activo y selectivo frente a AsPC-1 y BxPC-3. De igual forma, al comprar los resultados para esta línea celular, se puede indicar que para los compuestos del tipo aril-piperidinas (**11a-i**) no queda claro la influencia del patrón de sustitución en N9, así como en C2 de la purina. Sin embargo, al igual para BxPC-3, para los compuestos del tipo *N*-metil-piperazinil-anilina (**16a-h**) se requiere la sustitución del H en la posición *para* del grupo fenilo único en C6, para favorecer la citotoxicidad.

iii) Para MIA-PaCa-2, vale la pena destacar el compuesto **11c** (IC₅₀ = 1,56 μM), pese a que existe uno ligeramente más activo (**11b**, IC₅₀ = 1,39 μM), **11c** no es solo más citotóxico que gemcitabina (casi diez veces) sino que, además posee un IS casi doce veces mayor a este fármaco (**11b** solo posee un IS = 3,4). De igual forma es interesante el compuesto **16g**, por tener un valor de

IS = 12,1. Al igual que para las otras líneas de cáncer pancreático, el patrón estructural de estas purinas es algo difuso al analizar las sustituciones en N9 y C2. Pese a esto, para los compuestos **16a-h** se requiere la sustitución del H en la posición *para* del grupo fenilo único en C6, para favorecer la citotoxicidad, así como para la subserie **11a-i**, **11h** fue muy poco citotóxico.

En resumen, los compuestos mas interesantes de estudiar, basándonos en su citotoxicidad y selectividad, y poder determinar si interaccionan con el receptor Smo serían: **11c**, **16c**, **16f** y **16g** (Figura 37). En cuanto a sus estructuras, podemos observar que los compuestos **11c**, **16c** y **16g** presentan el mismo grupo nitrilo como sustituyente en el anillo aromático. Interesantemente, al comparar **16f** y **16g**, se observa que la naturaleza electrónica del grupo que los diferencia (OCH₃ vs CN), no sería relevante para la citotoxicidad en estas líneas de cáncer de páncreas.

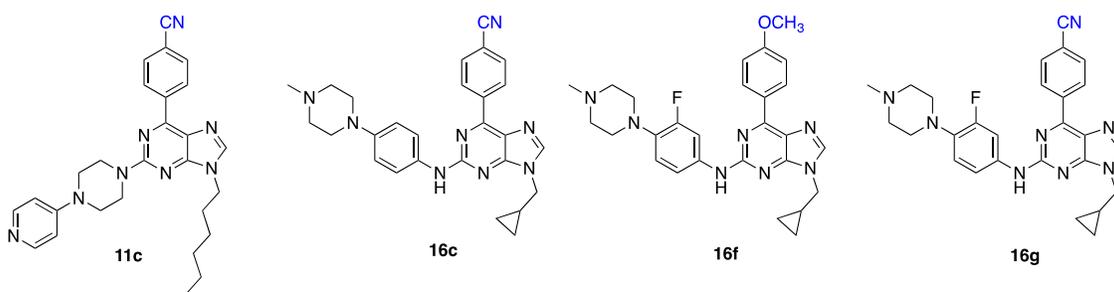


Figura 37. Compuestos con mejor potencia y selectividad frente a líneas celulares de cáncer de páncreas.

De acuerdo con la hipótesis inicial de esta tesis, es que estos derivados de purinas sean antagonistas de Smo y por consecuencia inhibidores de la vía Hh, es por lo que, frente a la imposibilidad de evaluar todos los compuestos sintetizados en ensayos biológicos posteriores, se requería de un filtro previo para seleccionar aquellos que fueran mas citotóxicos y selectivos. Por esta razón, es particularmente importante los resultados frente a la línea celular MIA-PaCa-2, debido a que células de cáncer de páncreas es una de las que presenta mayor expresión de genes de la vía Hh.[46] Además, gracias a la colaboración con la Dra. Lucia Di Marcotullio, de

la Universidad de La Sapienza en Roma, se logró determinar que el compuesto **VII** es un antagonista de Smo (datos no publicados), por lo que resulta muy prometedor evaluar el ligando **11c** debido a que es un análogo de **VII** (Figura 38). Sin embargo, los compuestos **11c**, **16c**, **16f** y **16g** fueron enviados donde la Dra. Di Marcotullio, a fines del año 2019, pero por los temas de pandemia, aun no se han logrado evaluar.

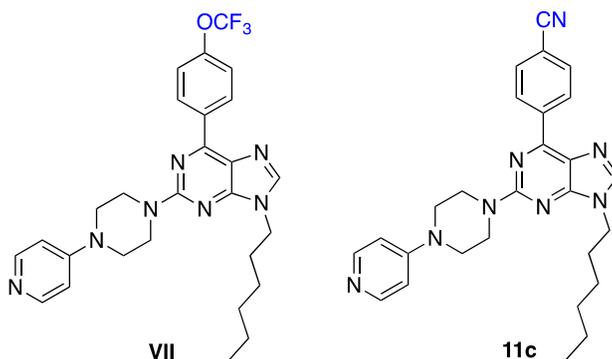


Figura 38. Estructuras químicas de los compuestos **VII** y **11c**, remarcando diferencia estructural (azul).

5.3. ESTUDIO COMPUTACIONAL

Debido a lo mencionado en el párrafo anterior, es que debido a la imposibilidad de evaluar experimentalmente el efecto antagonista en Smo de los compuestos de la **Serie II**, es que se realizó un estudio *in silico* de acoplamiento molecular de estos ligandos. De esta forma, al compararlo con vismodegib se puede tener una idea acerca del comportamiento como ligandos que tendrían sobre el receptor basándonos en el modo de unión.

En paralelo, se realizó un estudio de anclaje reverso para los ligandos de la **Serie I**, los que no cumplieron con el criterio de filtro de viabilidad celular, por lo que este estudio se realiza con la finalidad de buscar un blanco molecular adecuado para una posible aplicación en el futuro.

5.3.1. Acoplamiento molecular

Para este estudio *in silico* se consideraron todos los compuestos finales de la **Serie II**, y no solo los que presentaron mejor perfil biológico. Esto nos ayudará a tener una mejor perspectiva y poder obtener una relación más acabada de la estructura y la actividad biológica observada. Para ello, se utilizó el programa MOE2015.10 (según protocolo del apartado 4.4) donde en primer lugar, se realizó la búsqueda del cristal adecuado. Para ello se efectuó una exploración en el *Protein Data Bank* (PDB), donde se encuentran los cristales de Smo, presentados en la **Tabla 10**, junto con sus propiedades y ligandos de cristalización.

Tabla 10. Cristales Smo disponibles en *Protein Data Bank* (PDB).

Código PDB	Resolución (Å)	Ligando	Tipo
4QIN	2,60	SAG1.5	Agonista
4O9R	3,20	Ciclopamina	Antagonista
4QIM	2,61	Anta XV	Antagonista
4JKV	2,45	LY2940680	Antagonista
4N4W	2,8	SANT-1	Antagonista
5L7I	3,3	Vismodegib	Antagonista
5L7D	3,2	Colesterol	Antagonista

De los cristales ya mencionados, se seleccionaron dos, en primer lugar, el cristal de código **4QIM**, debido a que presenta una resolución óptima en relación con su cadena aminoacídica del sitio transmembranal (TM), y también debido a que el sitio de unión del ligando Anta XV es común para la mayoría de los ligandos antagonistas (Figura 39). Además, se eligió el cristal con código **4N4W**, debido a que el sitio de unión del antagonista SANT-1 corresponde a una cavidad que se encuentra más profunda en el sitio TM. Esta selección se efectuó para poder conocer el comportamiento en los sitios de unión más probables que presenta el receptor Smo y discutir en base a los tipos de interacciones que presentarían los ligandos sintetizados con los aminoácidos de las cavidades seleccionadas y relacionar estas interacciones con la actividad biológica *in vitro*.

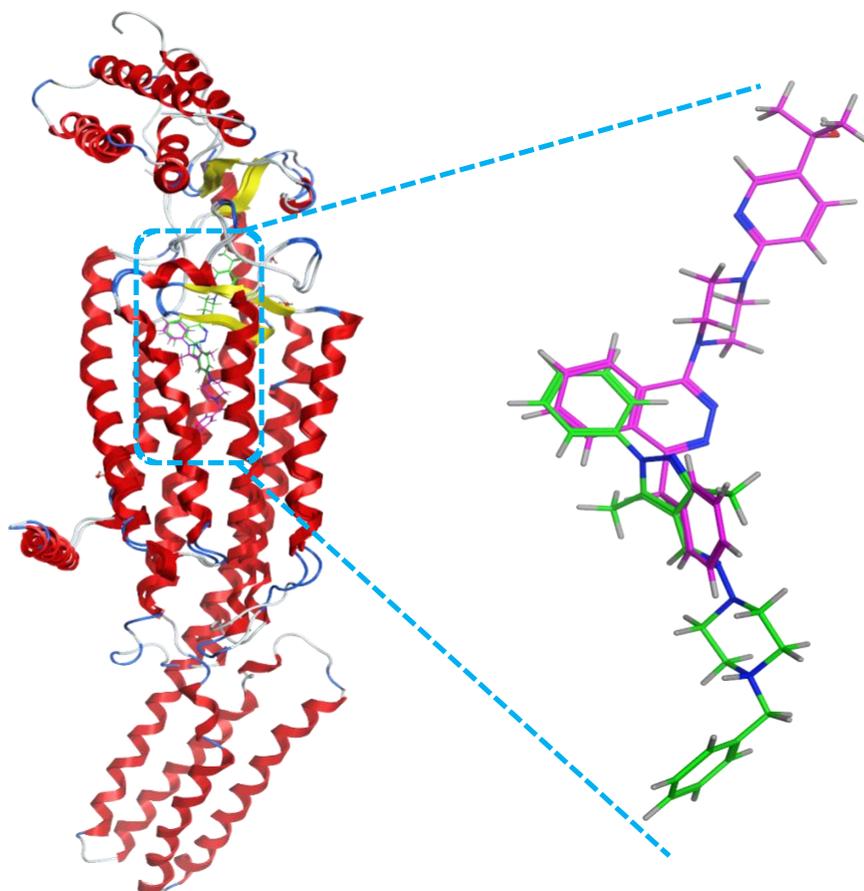


Figura 39. Superposición de receptores con sus ligandos de co-cristalización, Anta XV (magenta) y SANT-1 (verde claro).

Una vez seleccionado el protocolo adecuado para cada cristal (Apartado 4.4.), se realizó el acoplamiento molecular con los ligandos de la **Serie II**, en el sitio de unión de cada cristal con un área de 4,5 Å. Se obtuvieron las conformaciones más estables, de menor energía (*scoring* en kcal/mol) para cada uno de los ligandos en los cristales **4QIM** (Tabla 11) y **4N4W** (Tabla 12). Los resultados se presentarán primero para el cristal 4QIM y por consiguiente de **4N4W**.

Para comprobar que los ligandos se sitúan en la misma cavidad del compuesto de cristalización, se realizó una superposición, donde en la Figura 40 se observa una representación ejemplo, del ligando **11a**, en su conformación más estable, junto a

Anta XV en el cristal **4QIM**, el cual efectivamente se ubica en la posición del antagonista, repitiéndose este mismo patrón en todos los ligandos en este cristal.

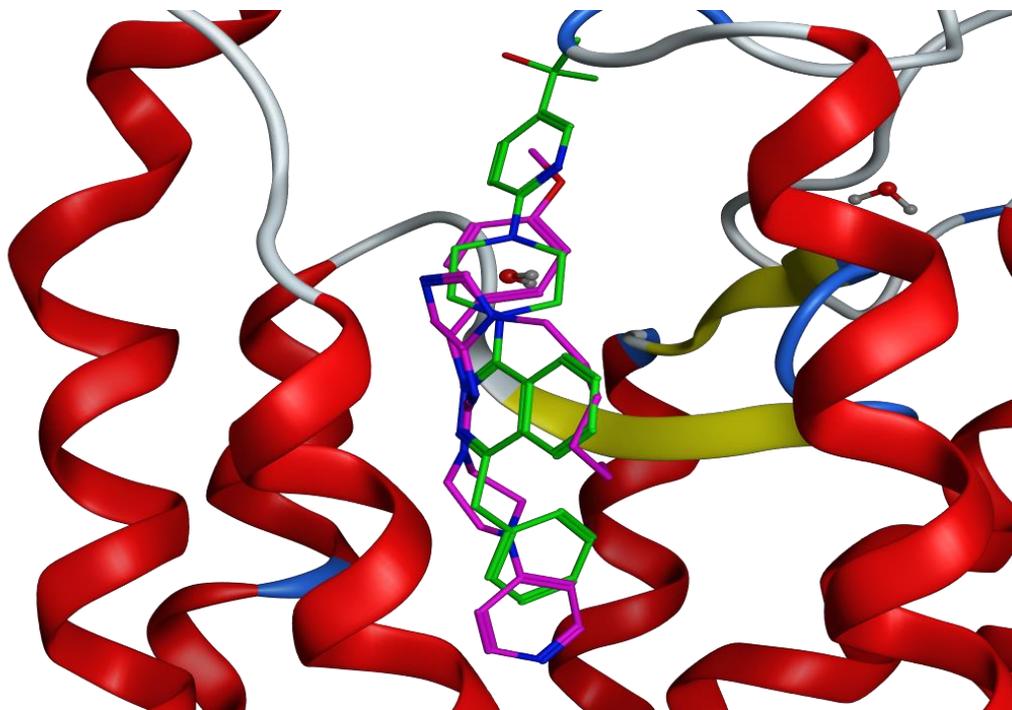


Figura 40. Superposición de Anta XV (verde claro) y ligando **11a** (magenta), en cristal **4QIM** con sitio de 4,5 Å.

La Tabla 11 muestra los valores correspondientes de las conformaciones de menor energía de cada ligando, donde se identificaron las interacciones ligando – receptor en el bolsillo situado en TM más cercano al medio extracelular del receptor Smo.

Tabla 11. Valor de energía/*scoring* (kcal/mol) e interacciones que presenta la mejor conformación en el cristal **4QIM** con sitio de 4,5 Å.

Ligando	<i>Scoring</i> (kcal/mol)	Receptor (aa)	Interacción	Distancia (Å)	E (kcal/mol)
11a	-1,82	Asp 384	Pte. H (donor)	3,12	12,50
11b	-1,66	Arg 400	Pte. H (acceptor)	3,05	-3,20
11c	-2,18	Asp 473	Pte. H (donor)	3,11	-1,00
		Arg 400	Pte. H (acceptor)	3,71	-0,70
		Tyr 394	Pi-pi	3,60	-0,00
11d	-2,51				
11e	-4,05				
11f	-5,73	Arg 400	Pte. H (acceptor)	3,01	-3,70
		Tyr 394	H-pi	3,98	-0,70
		Glu 518	Pi-H	4,52	-0,60
11g	-5,35	Arg 400	Pte. H (acceptor)	3,03	-2,70
		Tyr 394	H-pi	3,73	-0,60
		Tyr 394	Pi-H	4,33	-0,80
11h	-3,64				
11i	-0,34	Arg 400	Pte. H (acceptor)	3,52	-0,70
		Hys 470	Pi-H	3,94	-0,90
16a	-6,46	Arg 400	Pte. H (acceptor)	2,86	-6,70
		Lys 395	Pte. H (acceptor)	3,80	-0,70
		Ser 387	pi-H	3,97	-0,90
16b	-7,60	Asp 473	Pte. H (donor)	3,84	-1,50
		Arg 400	Pte. H (acceptor)	2,72	-4,40
		Ser 387	Pi-H	4,04	-0,80
16c	-7,69	Asp 473	Pte. H (donor)	2,81	-6,60
		Arg 400	Pte. H (acceptor)	2,81	-3,20
		Arg 400	Pi-cación	4,87	-0,70
16d	-7,68	Asp 473	Pte. H (donor)	2,81	-6,60
		Arg 400	Pte. H (acceptor)	2,86	-2,50
		Arg 400	Pi-cación	4,81	-0,60
16e	-5,56	Asp 384	Pte. H (donor)	2,99	-2,40
		Lys 395	Pte. H (acceptor)	2,73	-1,80
		Arg 400	Pte. H (acceptor)	2,92	-0,90
		Tyr 394	pi-pi	3,94	-0,00
16f	-7,61	Asp 473	Pte. H (donor)	3,28	-1,40
		Arg 400	Pte. H (acceptor)	2,73	-4,60
		Ser 387	pi-H	4,00	-0,70
16g	-7,66	Asp 473	Pte. H (donor)	2,85	-6,60
		Arg 400	Pte. H (acceptor)	2,80	-3,30
16h	-6,88	Asp 473	Pte. H (donor)	3,18	-2,10
		Arg 400	Pte. H (acceptor)	2,74	-0,80
vismodegib	-8,24	Phe 484	H-pi	3,62	-0,70

En la tabla anterior, podemos observar que la mayoría de las interacciones efectuadas entre los ligandos y el sitio de unión de receptor son del tipo puente de hidrógeno, en especial con los residuos Arg400 y Asp473. Por otro lado, los ligandos que no presentan un tipo de interacción con algún residuo se debe a que solo presentan interacciones del tipo Dispersión de London. Se utilizó la herramienta del programa MOE, *Protein Ligand Interaction Fingerprints* (PLIF), que entrega un resumen de las interacciones proteína–ligando, mediante esquemas de huellas/códigos de barra y de población (Figura 41). Así, se corrobora que la mayoría de los ligandos presenta interacciones del tipo puente de hidrógeno entre los hidrógenos de las aminas del residuo de Arg400 y el N2 del anillo de purina de cada ligando, como el que se representa en la Figura 42, con el ligando **11c**, además, de la interacciones tipo π - π y dipolo-dipolo. Para el caso de **16e**, dicha interacción se forma con el flúor del fragmento *N*-metil-piperazinilánilina. Estas diferencia ocurren debido a la conformación que presentaron ambos compuestos, donde la disposición del N2 del núcleo se posiciona a una distancia que no alcanza a interactuar con los hidrógenos de Arg400. Los ligandos que no presentaron esta interacción son **11a**, **11d**, **11e**, **11h** y **vismodegib**, ya que la conformación mas estable de estos ligandos muestra el par electrónico del N2 orientado hacia otra dirección, más alejada del hidrógeno del residuo Arg400. Para el caso del ligando **16g**, destacado por su citotoxicidad en MIA-PaCa-2, presentó un *score* de -7,66 kcal/mol e interacciones del tipo puente de hidrogeno entre el -NH unido a C2 del núcleo con Glu518 y el N1 de la purina con Arg400 (Figura 43). Comparando los ligandos de mejor citotoxicidad **11c**, **16c**, **16f** y **16g**, éste último presentó el *score* más alto, pero no supera el *score* obtenido para vismodegib que fue de -8,24 kcal/mol, esta diferencia posiblemente sea por el tamaño y conformación que presenta éste vismodegib con respecto a los ligandos sintetizados.

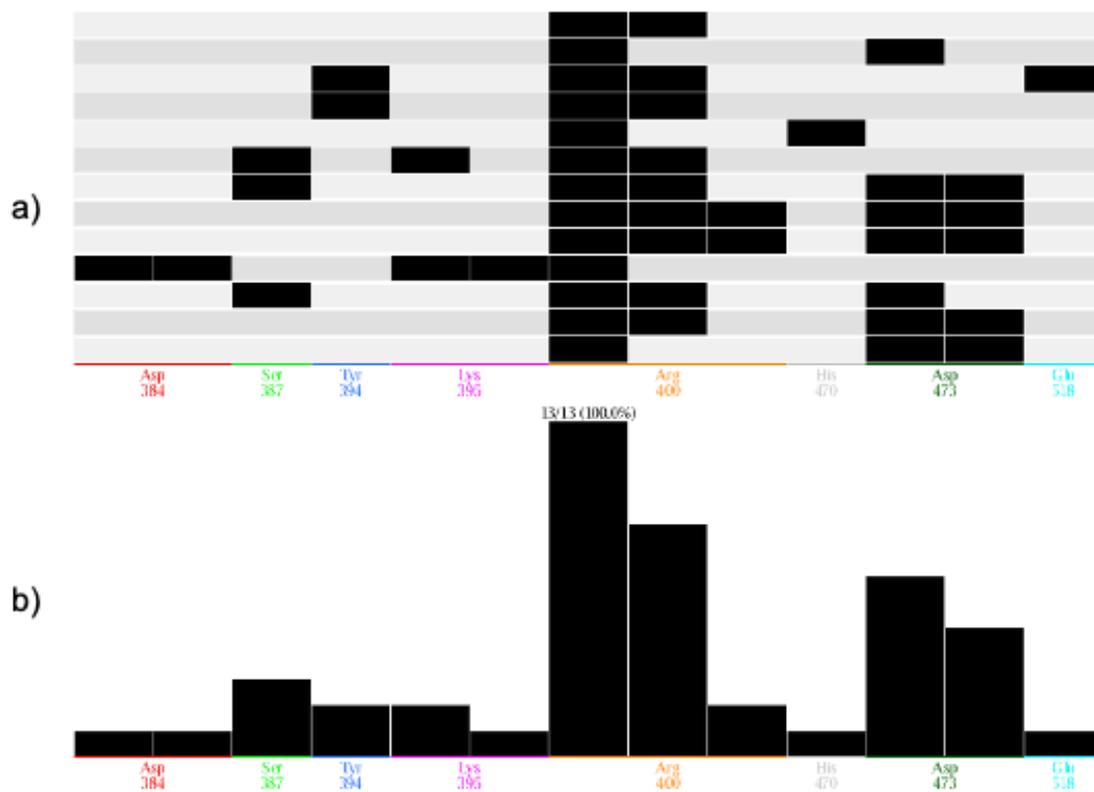


Figura 41. Huellas dactilares de las interacciones proteína-ligando en cristal **4QIM**, a) códigos de barras y b) población.

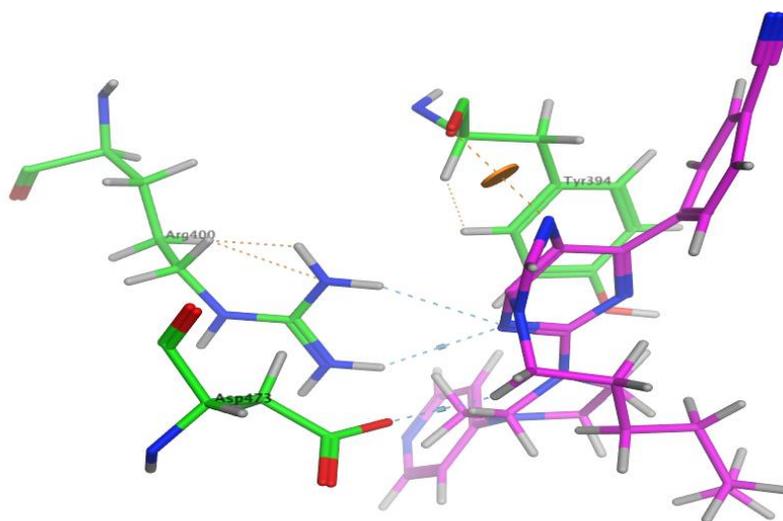


Figura 42. Interacciones intermoleculares entre ligando **11c** (magenta) y residuos Arg400, Asp473 y Tyr394.

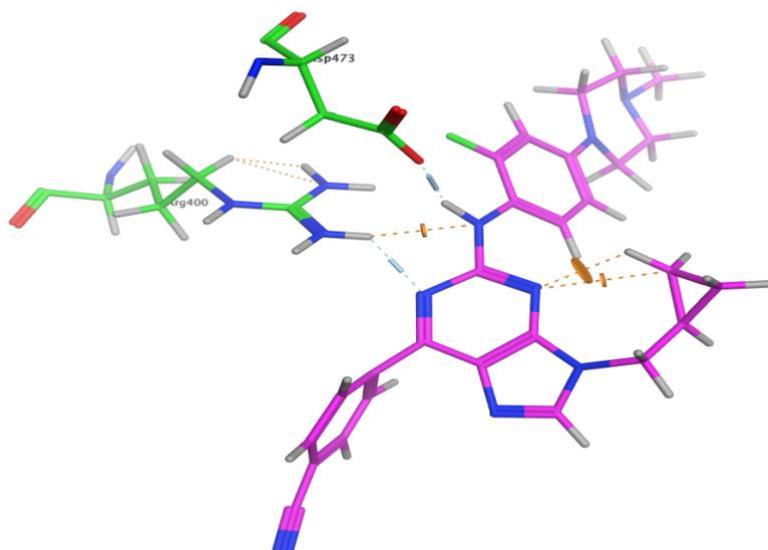


Figura 43. Interacciones del tipo puente de hidrógeno entre ligando **16g** (magenta) y residuos Arg400, Asp473.

La interacción con el aminoácido Asp473 es importante de recalcar, debido a que ese residuo se encontraría mutado en células cancerígenas (Hys473), interrumpiendo la unión de fármacos y, por consiguiente, la eficacia de éstos disminuye.[29] Para este caso los ligandos **16b**, **16c**, **16f**, **16g** y **16h** presentan interacción tipo puente de hidrogeno entre el hidrógeno de la amina unida a C2, que conecta el núcleo de purina y el fragmento *N*-metil-piperazinilánilina, con el oxígeno del residuo (Figura 44). Para el caso de **11c** hay la interacción fue entre el hidrógeno de la cadena alifática lateral en posición α al N9, con el oxígeno del residuo Asp473, como se mostró en la Figura 42.

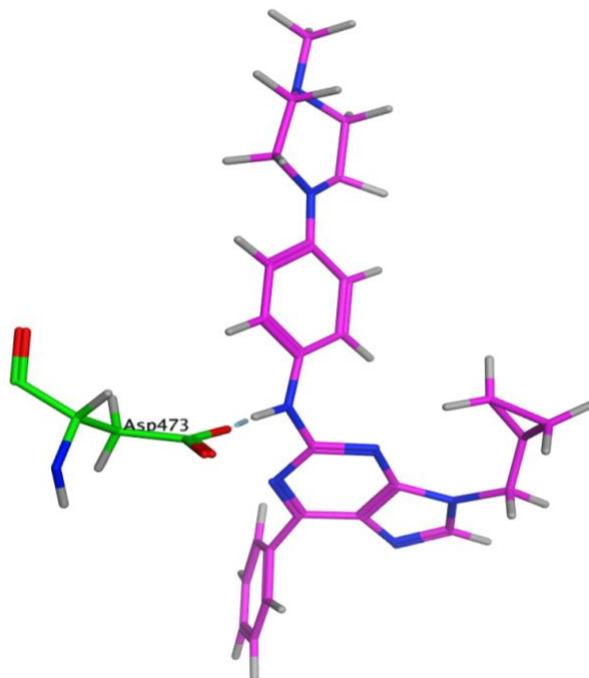


Figura 44. Interacción tipo puente de hidrógeno entre residuo Asp473 y ligando **16d**.

Para el caso de vismodegib, se esperaba que este tuviera interacción con el residuo aminoacídico Asp473, ya que en distintas publicaciones la nombran junto con la de Arg400 y Phe484.[29,84,85] Sin embargo, solo con este último es que se pudo observar una interacción del tipo H- π (Figura 45). Estas diferencias se deben a que el cristal con el cual trabajaron en las investigaciones es distinto, PDB: 5L7I (Tabla 10), el cual fue co-cristalizado con vismodegib, por lo tanto, la conformación sería levemente distinta.

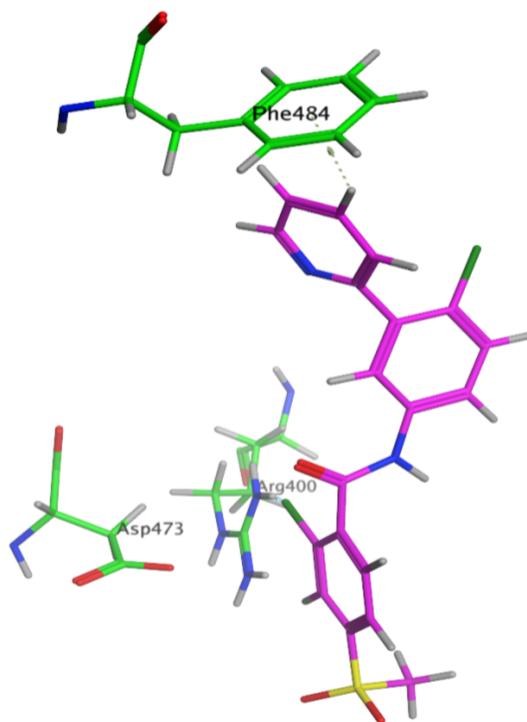


Figura 45. Interacción entre vismodegib y residuo Phe484.

A continuación, se presentan los resultados y discusión en base al cristal **4N4W**, el cual está co-cristalizado con el ligando antagonista SANT-1. En la Figura 46 podemos observar la superposición del antagonista control y el ligando **11a**, éste último se sitúa aun más profundo de la cavidad en relación con SANT-1, con una conformación muy compactada, donde el fragmento alifático hexilo está rotado hacia el fragmento pirinidil-piperazina.

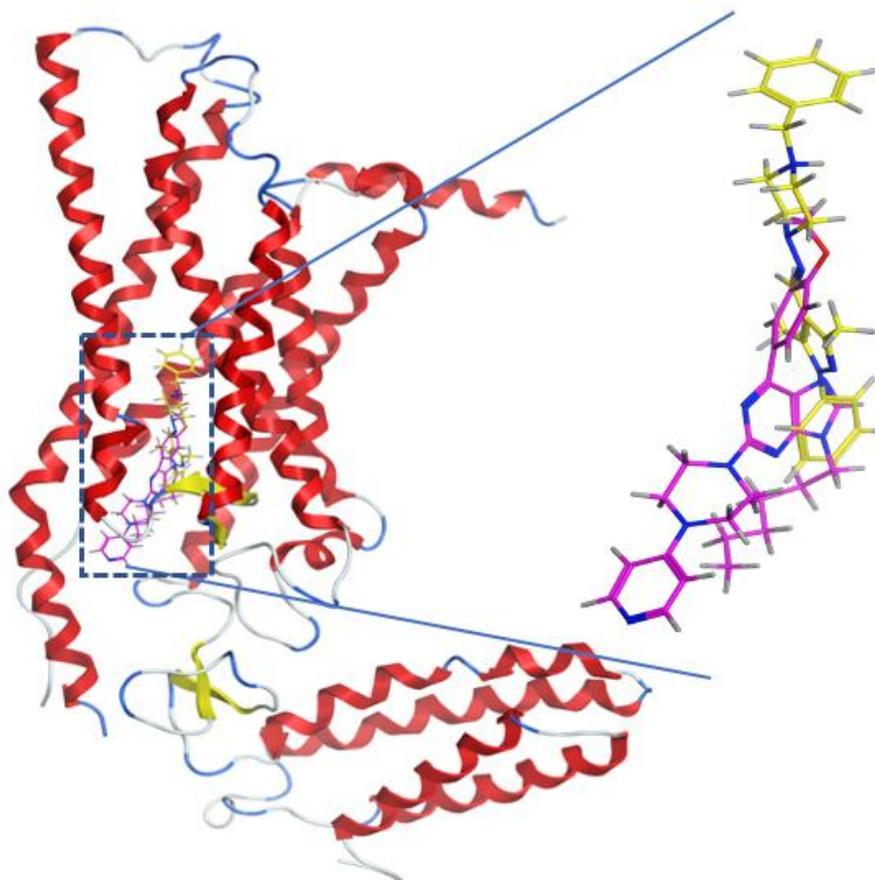


Figura 46. Superposición de SANT-1 (amarillo) y **11a** (magenta) en sitio de unión de cristal **4N4W**.

En la Tabla 12 se presentan los resultados en base a las interacciones que presentaron los diferentes ligandos con el receptor, al igual como fue para los resultados anteriores para el cristal **4QIM**.

Tabla 12. Valor de *scoring* (kcal/mol) e interacciones que presenta la mejor conformación en el cristal **4N4W** con sitio de 4,5 Å.

Ligando	Scoring (kcal/mol)	Receptor (aa)	Interacción	Distancia (Å)	E (kcal/mol)
11a	-7,05	Glu 518	Pi-H	3,82	-0,70
11b	-7,44	Arg 400 Glu 518	Pte. H (aceptor) Pi-H	3,30 3,80	1,5 -0,70
11c	-5,23				
11d	-7,02	Hys 470 Glu 518	Pte. H (aceptor) Pi-H	3,21 3,82	-1,5 -0,70
11e	-8,17	Arg 400	Pi-cati3n	4,60	-1,30
11f	-8,32				
11g	-8,17	Arg 400	Pi-cati3n	4,65	-1,20
11h	-8,15	Arg 400	Pi-cati3n	4,62	-1,20
11i	-8,60	Arg 400	Pi-cati3n	4,61	-1,20
16a	-8,65	Arg 400	Pi-cati3n	4,86	-0,70
16b	-9,73	Arg 400	Pi-cati3n	4,77	-0,70
16c	-8,19				
16d	-8,67				
16e	-8,51	Arg 400	Pi-cati3n	4,96	-0,6
16f	-9,25				
16g	-4,17				
16h	-8,71				
vismodegib	-9,00	Tyr 394	Pte. H (aceptor)	2,97	-2,20

Las interacciones expuestas con anterioridad para el cristal **4QIM** son muy diferentes a las observadas para el cristal **4N4W**. En este, se generan interacciones del tipo cati3n- π , debido a la protonaci3n de la porci3n de guanidina del residuo Arg400 a pH fisiol3gico, donde la conformaci3n del ligando favorece esta atracci3n electrostática con el fragmento aromático unido al C2 al anillo de purina (Figura 47). En el caso de los ligandos **11c**, **11f**, **16c**, **16d**, **16f**, **16g** y **16h**, solo existen interacciones más débiles con el receptor, del tipo Van der Waals, como se vi3 también en el cristal **4QIM**.

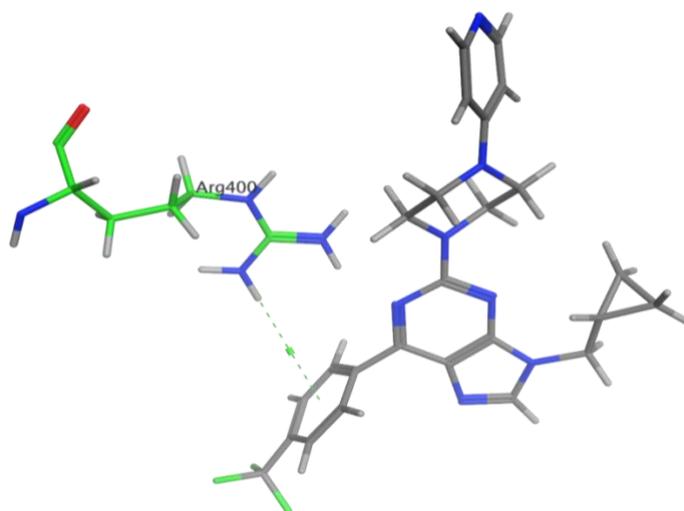


Figura 47. Interacción catión- π , entre el residuo Arg400 y el ligando **11g**.

La Figura 48 presenta el resumen de las interacciones expuestas en la Tabla 12 mediante la herramienta PLIF, donde se presentan solo las interacciones más fuertes entre el receptor y los ligandos. A diferencia con el cristal **4QIM**, predominan en este caso las fuerza de Van der Waals, pero debemos destacar que la energía de conformación de estos ligandos en su conjunto es mayor a las obtenidas en **4QIM**, llegando a valores de -8,0 kcal/mol aproximadamente.

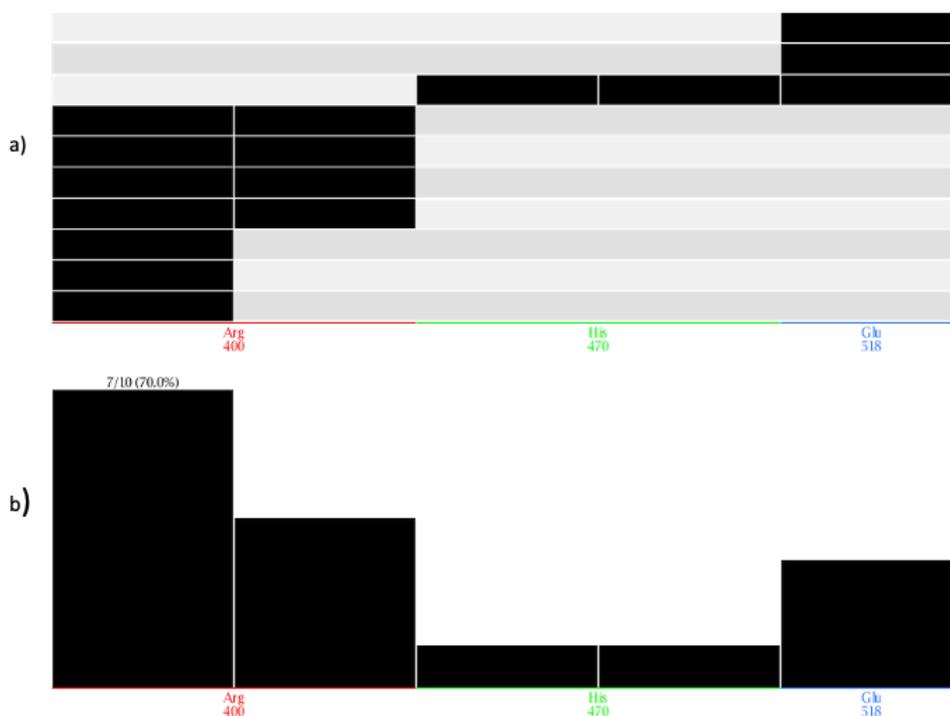


Figura 48. Huellas dactilares de las interacciones proteína – ligando del cristal **4N4W**, a) códigos de barras y b) población.

En general, los ligandos del tipo **16** presentaron mejores puntuaciones en los acoplamientos para ambos cristales, en comparación a los ligandos del tipo **11**. En específico, para el cristal **4QIM**, el ligando **16c** presentó el mejor *score*, de -7,69 kcal/mol, entre los ligandos sintetizados. Sin embargo, este ligando no supera a vismodegib, que presenta un *score* de -8,24 kcal/mol. Para el caso del cristal **4N4W**, el ligando con mejor *score* fue **16b**, con un valor de -9,73 kcal/mol. En este caso, el ligando supera levemente el valor de *score* del fármaco vismodegib (-9,00 kcal/mol).

Por otra parte, la cavidad que suscita mayor interés en el estudio de antagonistas del receptor Smo es como la que se exhibe en el cristal **4QIM**. Por esto, y debido a los buenos resultados obtenidos para el ligando **VII** (sintetizado por el grupo de laboratorio del Dr. Salas), se realizó su acoplamiento molecular con el cristal **4QIM** y sus resultados fueron comparados con los obtenidos para los ligandos de la **Serie**

II. El ligando **VII** presentó un *score* de acoplamiento de -2,25 kcal/mol y, en la Figura 49, se muestran las interacciones del ligando con los residuos Arg400 (puente de hidrógeno) y Tyr394 (H- π). Estas interacciones fueron congruentes con el tipo de ligando. El valor de *score* obtenido para **VII** fue menor en relación con los ligandos del tipo **16** (-7,60 kcal/mol aprox.), pero similar al obtenido para **11c** (-2,18 kcal/mol). La similitud con éste último es debido a que son estructuralmente parecidos, salvo por el sustituyente en el fenilo unido a C2 de la purina (como se vio en la discusión de citotoxicidad). Estos resultados nos permiten inferir que los ligandos de la **Serie II** serían candidatos adecuados para experimentos *in vitro* con el receptor Smo.



Figura 49. Interacción entre ligando **VII** y residuos Arg400 y Tyr394 en cristal **4QIM**.

5.3.2. Anclaje reverso para ligandos Serie I.

Con el fin de encontrar una posible aplicabilidad a los compuestos de la **Serie I**, los cuales presentaron una escasa citotoxicidad frente a las líneas celulares cancerígenas, se seleccionó el compuesto **10a** como representativo de la **Serie I**. Este compuesto no presenta sustituyentes en el grupo fenilo unido al C6 del anillo

de purina. Para ello, se utilizó el método computacional de “*target fishing*” para identificar el objetivo más probable para la molécula designada. Como se mencionó en el Apartado 1.8 las plataformas PharmMapper y ChemMapper se basan en el principio de similitud química, es decir, que moléculas similares pueden unirse a los mismos objetivos y tener bioactividades similares.

Como resultado, ambas plataformas entregaron una lista con 300 modelos farmacológicos probables, de los cuales se hizo una búsqueda según código PDB o Uniprot (según el caso) para determinar a que tipo de organismo corresponde cada modelo, haciendo un tamizaje solo se consideraron los modelos humanos. De los resultados entregados por PharmMapper, 67 correspondían a modelos humanos. En la Figura 50 se observa un gráfico circular, que da cuenta de los grandes grupos de clasificación que se hizo, donde un 53,7 % corresponde a diferentes tipos de blancos nombrado como “Otros”. En este último grupo se encuentran factores de crecimiento, proteínas transportadoras, regulación de genes, proteínas de unión, transcripción, entre otros. Luego, tenemos 41,8 % de blancos del tipo enzimático (transferasas, hidrolasas, entre otras) y por último, en un menor porcentaje, los blancos del tipo receptor. El modelo que presentó el mejor *score* fue la proteína quinasa dependiente de ARN PKR (Tabla 13), de doble cadena inducida por interferón (PDB: 1QU6), la cual presenta actividades antivirales y antitumorales.[86]

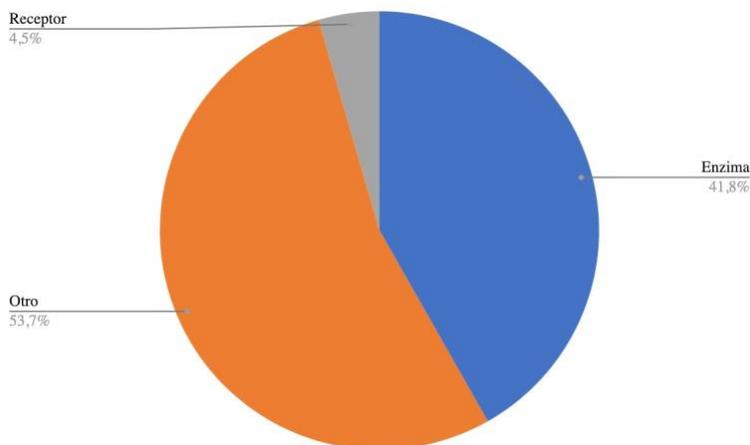


Figura 50. Gráfico circular de los resultados obtenidos de PhamMapper para el ligando **10a**.

Para el caso de ChemMapper (Figura 51), solo 64 de los 300 resultados correspondían a modelo humano. El 50 % de modelos corresponden al tipo enzimático, donde el receptor de adenosina A1 presentó el mejor score para **10a** en este anclaje reverso (Tabla 13). Los receptores A1 están presentes en la superficie de las células de los órganos de todo el cuerpo. Las acciones mediadas por los receptores A1 incluyen enlentecimiento de la frecuencia cardíaca, reducción de la contractilidad auricular, atenuación de las acciones estimulantes de las catecolaminas sobre los receptores beta-adrenérgicos, reducción de la lipólisis en el tejido adiposo, reducción de la formación de orina e inhibición de la actividad neuronal, entre otras funciones.[87]

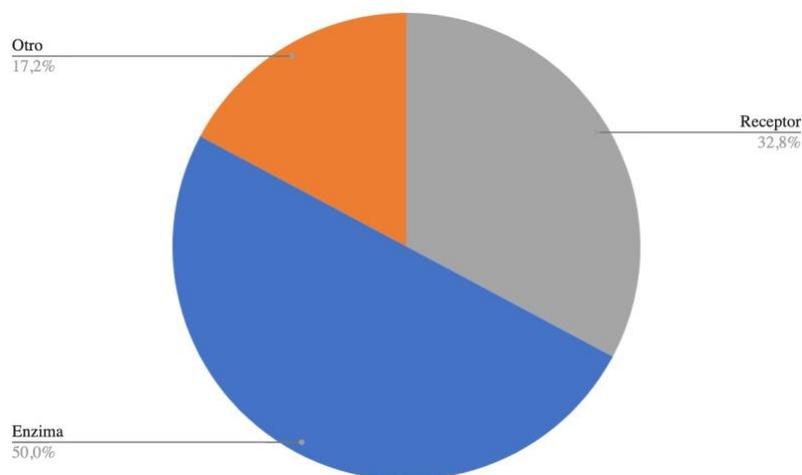


Figura 51. Gráfico circular de los resultados de ChemMapper para el ligando **10a**.

Tabla 13. Modelos farmacológicos con mejor *score*, para el ligando **10a**, en PharmMapper y ChemMapper.

PharmMapper			ChemMapper		
Uniprot	Score	Nombre	Uniprot	Score	Nombre
P19525	0,9955	Proteína quinasa activada por ARN bicatenario inducida por interferón	P30542	1,000	Receptor de adenosina A1
Q96EP0	0,9873	Proteína <i>ring finger</i> 31	P29274	0,920	Receptor de adenosina A2a
MDM2	0,9840	E3 ubiquitina-proteína ligasa Mdm2	P33765	0,812	Receptor de adenosina A3
Q53HL2	0,9805	Borealina	P42345	0,474	Serina/treonina-proteína quinasa mTOR
RAC1	0,9773	Sustrato 1 de toxina botulínica C3 relacionada con Ras	P42336	0,339	Isoforma alfa de la subunidad catalítica de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato 3-quinasa

A grandes rasgos, este estudio entrega herramientas de partida para encontrar una utilidad terapéutica a los ligandos de la **Serie I**, dando como puntapié inicial realizar un acoplamiento molecular con los modelos de mejor puntaje.

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

- Se sintetizaron 50 nuevas moléculas derivadas de purinas 2,6,9-trisustituidas, utilizando reacciones clásicas de la química orgánica, con rendimientos en su etapa final del 30 al 92 %.
- Todos los intermediarios y ligandos finales fueron caracterizados mediante las técnicas espectroscopias de resonancia magnética nuclear e infrarrojo, las que confirmaron las estructuras químicas propuestas.
- Se evaluó el efecto citotóxico de los ligandos finales de las **Serie I** y **II**, de derivados de purinas, mediante la reducción de MTT en las líneas celulares cáncer de páncreas (AsPC-1, BxPC-3, MIA-PaCa-2) y células sanas (HEK293). Los ligandos de la **Serie I** mostraron una baja citotoxicidad en las diferentes líneas celulares ensayadas. Se concluyó que este efecto fue debido a la baja solubilidad de los ligandos en el medio de cultivo. En relación con los ligandos de la **Serie II**, en general se observaron mejores resultados citotóxicos en relación con la **Serie I**. De los resultados obtenidos, los derivados purínicos **11c**, **16c**, **16f** y **16g** exhibieron prometedoras propiedades citotóxicas y de selectividad en las líneas celulares de cáncer de páncreas estudiadas.
- Se realizó un estudio de acoplamiento molecular de los ligandos de la **Serie II**, usando dos cristales del receptor Smo (**4QIM** y **4N4W**) con sitios de unión diferentes. Para el caso del cristal **4QIM**, se observó que la mayoría de los compuestos sintetizados presentaron interacciones del tipo puente de hidrógeno con los residuos Asp473 y Arg400. Además, el ligando **16c** fue el que mostró el mejor valor de *score* (-7,69 kcal/mol) para el sitio de unión estudiado. Para el cristal **4N4W** se observaron principalmente interacciones

del tipo Van der Waals, y el ligando **16b** fue el que obtuvo el valor de score (-9,73 kcal/mol) más alto para la serie.

- En vista de los resultados obtenidos en citotoxicidad para la **Serie I**, se realizó un estudio de anclaje reverso utilizando las plataformas virtuales PharmMapper y ChemMapper. El ligando **10a** mostró que pueden ser potencial candidato para estudios en el receptor de Adenosina y/o Proteína quinasa activada por ARN bicatenario inducida por interferón.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] M.L. Garmendia, P. Ruiz, R. Uauy, Obesity and cancer in Chile: estimation of population attributable fractions, *Rev. Médica Chile*. 141 (2013) 987–994. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872013000800004>.
- [2] C. Avendaño, J.C. Menéndez, General Aspects of Cancer Chemotherapy, *Med. Chem. Anticancer Drugs*. (2015) 1–22. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62649-3.00001-6>.
- [3] P.B. Bach, J.N. Mirkin, T.K. Oliver, C.G. Azzoli, D.A. Berry, O.W. Brawley, T. Byers, G.A. Colditz, M.K. Gould, J.R. Jett, A.L. Sabichi, R. Smith-Bindman, D.E. Wood, A. Qaseem, F.C. Detterbeck, Benefits and Harms of CT Screening for Lung Cancer, *J. Am. Med. Assoc.* 307 (2012) 2418. <https://doi.org/10.1001/jama.2012.5521>.
- [4] Estrategia Nacional de Cáncer. Chile 2016, 2016.
- [5] P. Graham, *An Introduction to Medicinal chemistry*, 5ta editio, Oxford, 2013. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- [6] B.N. Singh, J. Fu, R.K. Srivastava, S. Shankar, Hedgehog Signaling Antagonist GDC-0449 (Vismodegib) Inhibits Pancreatic Cancer Stem Cell Characteristics : Molecular Mechanisms, *PLoS One*. 6 (2011) e27306. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027306>.
- [7] C. Caglevic, J. Gallardo, M. de la Torre, M. Mahave, B. Müller, S. Solé, Y. Moscoso, H. de la Fuente, J.C. Roa, S. Hoefler, J.M. Butte, P. González M, J.M. O'Connor, J. Torres, V.P. Encalada, D.A. Cano, L. Ubillos, C. Rolfo, A. Lingua, C. Díaz Romero, A. Padilla Rosciano, V. Cuartero, G. Calderillo Ruiz, G. Schwartzmann, X. Kon Jara, A. Andrade G, L. Mas López, O. Barajas, M. Carballido, H. Lembach, L. Morillas G, E. Roca, J. Lobatón, P. Montenegro B, A. Yepes, H. Marsiglia, Recomendaciones sobre el manejo del cáncer de páncreas tipo adenocarcinoma en Latinoamérica. Reunión del consenso del

simposio Latinoamericano de gastroenterología oncológica (SLAGO) y de la asociación ibero Latinoamericana de terapia radiante (ALATRO), V, Rev. Med. Chil. 144 (2016) 1305–1318. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872016001000010>.

- [8] J.M. Ruch, E.J. Kim, Hedgehog signaling pathway and cancer therapeutics: Progress to date, *Drugs*. 73 (2013) 613–623. <https://doi.org/10.1007/s40265-013-0045-z>.
- [9] T.L. Lin, W. Matsui, Hedgehog pathway as a drug target: Smoothened inhibitors in development, *Onco. Targets. Ther.* 5 (2012) 47–58.
- [10] N. Mahindroo, C. Punchihewa, N. Fujii, Hedgehog-Gli Signaling Pathways Inhibitors as Anticancer Agents, *J. Med. Chem.* 52 (2009) 3829–3845. <https://doi.org/10.1021/jm060379l>.
- [11] R. Mcmillan, W. Matsui, Molecular Pathways: The Hedgehog Signaling Pathway in Cancer, *Clin. Cancer Res.* 18 (2012) 4883–4889. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-2509>.
- [12] A.I. Rubin, E.H. Chen, D. Ratner, Basal-Cell Carcinoma, *N. Engl. J. Med.* 353 (2005) 2262–2269. <https://doi.org/10.1056/NEJMra044151>.
- [13] S. Teglund, R. Toftgård, Hedgehog beyond medulloblastoma and basal cell carcinoma, *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer.* 1805 (2010) 181–208. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2010.01.003>.
- [14] H.J. Sharpe, W. Wang, R.N. Hannoush, F.J. De Sauvage, Regulation of the oncoprotein Smoothened by small molecules, *Nat. Chem. Biol.* 11 (2015) 246–255. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1776>.
- [15] F.G. Xu, Q.Y. Ma, Z. Wang, Blockade of hedgehog signaling pathway as a therapeutic strategy for pancreatic cancer, *Cancer Lett.* 283 (2009) 119–124. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.01.014>.

- [16] T. Mazumdar, J. DeVecchio, A. Agyeman, T. Shi, J.A. Houghton, Blocking hedgehog survival signaling at the level of the GLI genes induces DNA damage and extensive cell death in human colon carcinoma cells, *Cancer Res.* 71 (2011) 5904–5914. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-4173>.
- [17] M. Saqui-Salces, J.L. Merchant, Hedgehog signaling and gastrointestinal cancer, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1803 (2010) 786–795. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.03.008>.
- [18] J. Briscoe, P.P. Théron, The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14 (2013) 418–431. <https://doi.org/10.1038/nrm3598>.
- [19] A. Ruiz, C. Mas, B. Stecca, The Gli code : an information nexus regulating cell fate , stemness and cancer, *TRENDS Cells Biol.* 17 (2007) 438–447. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2007.06.007>.
- [20] K.D. Marini, B.J. Payne, D.N. Watkins, L.G. Martelotto, Mechanisms of Hedgehog signalling in cancer, *Growth Factors.* 29 (2011) 221–234. <https://doi.org/10.3109/08977194.2011.610756>.
- [21] P. Heretsch, L. Tzagkaroulaki, A. Giannis, Cyclopamine and hedgehog signaling: Chemistry, biology, medical perspectives, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 49 (2010) 3418–3427. <https://doi.org/10.1002/anie.200906967>.
- [22] D. Amakye, Z. Jagani, M. Dorsch, Unraveling the therapeutic potential of the Hedgehog pathway in cancer, *Nat. Med.* 19 (2013) 1410–1422. <https://doi.org/10.1038/nm.3389>.
- [23] R.L. Yauch, S.E. Gould, S.J. Scales, T. Tang, H. Tian, C.P. Ahn, D. Marshall, L. Fu, T. Januario, D. Kallop, M. Nannini-pepe, K. Kotkow, J.C.M. Jr, L.L. Rubin, F.J. De Sauvage, A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer, *Nat. Lett.* 455 (2008). <https://doi.org/10.1038/nature07275>.

- [24] I. Vořechovský, K.P. Benediktsson, R. Toftgård, The patched/hedgehog/smoothened signalling pathway in human breast cancer: No evidence for H133Y SHH, PTCH and SMO mutations, *Eur. J. Cancer.* 35 (1999) 711–713. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(99\)00017-9](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(99)00017-9).
- [25] M.D. Taylor, L. Liu, C. Raffel, C. Hui, T.G. Mainprize, X. Zhang, R. Agatep, S. Chiappa, L. Gao, A. Lowrance, A. Hao, A.M. Goldstein, T. Stavrou, S.W. Scherer, W.T. Dura, B. Wainwright, J.A. Squire, J.T. Rutka, D. Hogg, Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma, *Nat. Genet.* 31 (2002) 306–310. <https://doi.org/10.1038/ng916>.
- [26] C. Wang, H. Wu, V. Katritch, G.W. Han, X. Huang, W. Liu, F.Y. Siu, B.L. Roth, V. Cherezov, R.C. Stevens, Structure of the human smoothened receptor bound to an antitumour agent, *Nature.* 497 (2013) 338–343. <https://doi.org/10.1038/nature12167>.
- [27] C. Wang, H. Wu, T. Evron, E. Vardy, G.W. Han, X.P. Huang, S.J. Hufeisen, T.J. Mangano, D.J. Urban, V. Katritch, V. Cherezov, M.G. Caron, B.L. Roth, R.C. Stevens, Structural basis for Smoothened receptor modulation and chemoresistance to anticancer drugs, *Nat. Commun.* 5 (2014) 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms5355>.
- [28] M. Ruat, *The Smoothened Receptor in Cancer and Regenerative Medicine*, 2015. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-19755-5>.
- [29] E.F.X. Byrne, R. Sircar, P.S. Miller, G. Hedger, G. Luchetti, S. Nachtergaele, M.D. Tully, L. Mydock-McGrane, D.F. Covey, R.P. Rambo, M.S.P. Sansom, S. Newstead, R. Rohatgi, C. Siebold, Structural basis of Smoothened regulation by its extracellular domains, *Nature.* 535 (2016). <https://doi.org/10.1038/nature18934>.
- [30] D.M. Berman, S.S. Karhadkar, A. Maitra, R.M. De Oca, M.R. Gerstenblith, K. Briggs, A.R. Parker, Y. Shimada, J.R. Eshleman, D.N. Watkins, P.A. Beachy,

Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours, *Nature*. 425 (2003) 846–851. <https://doi.org/10.1038/nature01972>.

- [31] J.K. Chen, J. Taipale, M.K. Cooper, P.A. Beachy, Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothed, *Genes Dev.* 16 (2002) 2743–2748. <https://doi.org/10.1101/gad.1025302>.
- [32] J. Taipale, J.K. Chen, M.K. Cooper, B. Wang, R.K. Mann, L. Milenkovic, M.P. Scott, P.A. Beachy, Effects of oncogenic mutations in Smoothed and Patched can be reversed by cyclopamine, *Nature*. 406 (2000) 1005–1009. <https://doi.org/10.1038/35023008>.
- [33] P. Heretsch, A. Büttner, L. Tzagkaroulaki, S. Zahn, B. Kirchner, A. Giannis, Exo-Cyclopamine - A stable and potent inhibitor of hedgehog-signaling, *Chem. Commun.* 47 (2011) 7362–7364. <https://doi.org/10.1039/c1cc11782c>.
- [34] X. Wu, W. John, J. ZHANG, S. Ding, P.G. Schultz, Purmorphamine Induces Osteogenesis by Activation of the Hedgehog Signaling Pathway, *Chem. Biol.* 11 (2004) 1229–1238. <https://doi.org/10.1016/j>.
- [35] D.M. Berman, S.S. Karhadkar, A.R. Hallahan, J.I. Pritchard, C.G. Eberhart, D.N. Watkins, J.K. Chen, M.K. Cooper, J. Taipale, J.M. Olson, P.A. Beachy, Medulloblastoma growth inhibition by Hedgehog pathway blockade, *Science* (80-.). 297 (2002) 1559–1561. <https://doi.org/10.1126/science.1073733>.
- [36] A. Dlugosz, S. Agrawal, P. Kirkpatrick, Vismodegib, *Nat. Rev. Drug Discov.* 11 (2012) 437–438. <https://doi.org/10.1038/nrd3753>.
- [37] J. Laterra, D. Ph, R.L. Yauch, D. Ph, C.A. Callahan, D. Ph, L. Fu, T. Holcomb, J. Stinson, S.E. Gould, D. Ph, B. Coleman, P.M. Lorusso, D.D. Von Hoff, F.J. De Sauvage, D. Ph, J.A. Low, D. Ph, Treatment of Medulloblastoma with Hedgehog Pathway Inhibitor GDC-0449, *N. Engl. J. Med.* 361 (2009) 1173–1178.

- [38] S. Pan, X. Wu, J. Jiang, W. Gao, Y. Wan, D. Cheng, D. Han, J. Liu, N.P. Englund, Y. Wang, S. Peukert, K. Miller-Moslin, J. Yuan, R. Guo, M. Matsumoto, A. Vattay, Y. Jiang, J. Tsao, F. Sun, A.C. Pferdekamper, S. Dodd, T. Tuntland, W. Maniara, J.F. Kelleher, Y.M. Yao, M. Warmuth, J. Williams, M. Dorsch, Discovery of NVP-LDE225, a potent and selective smoothed antagonist, *ACS Med. Chem. Lett.* 1 (2010) 130–134. <https://doi.org/10.1021/ml1000307>.
- [39] L. Ye, K. Ding, F. Zhao, X. Liu, Y. Wu, Y. Liu, D. Xue, F. Zhou, X. Zhang, R.C. Stevens, F. Xu, S. Zhao, H. Tao, A structurally guided dissection-then-evolution strategy for ligand optimization of smoothed receptor, *Med. Chem. Commun.* 8 (2017) 1332–1336. <https://doi.org/10.1039/c7md00104e>.
- [40] L. Hoch, H. Faure, H. Roudaut, A. Schoenfelder, A. Mann, N. Girard, L. Bihannic, O. Ayrault, E. Petricci, M. Taddei, D. Rognan, M. Ruat, MRT-92 inhibits Hedgehog signaling by blocking overlapping binding sites in the transmembrane domain of the Smoothed receptor, *FASEB J.* 29 (2015) 1817–1829. <https://doi.org/10.1096/fj.14-267849>.
- [41] H. Ueno, S. Kondo, S. Yoshikawa, K. Inoue, V. Andre, M. Tajimi, H. Murakami, PHASE I STUDIES A phase I and pharmacokinetic study of taladegib, a Smoothed inhibitor, in Japanese patients with advanced solid tumors, (n.d.). <https://doi.org/10.1007/s10637-017-0544-y>.
- [42] C. Espinosa-Bustos, J. Mella, J. Soto-Delgado, C.O. Salas, State of the art of Smo antagonists for cancer therapy: Advances in the target receptor and new ligand structures, *Future Med. Chem.* 11 (2019) 617–638. <https://doi.org/10.4155/fmc-2018-0497>.
- [43] R.L. Yauch, G.J.P. Dijkgraaf, B. Alicke, T. Januario, C.P. Ahn, T. Holcomb, K. Pujara, J. Stinson, C.A. Callahan, T. Tang, J. Fernando Bazan, Z. Kan, S. Seshagiri, C.L. Hann, S.E. Gould, J.A. Low, C.M. Rudin, F.J. De Sauvage, Smoothed Mutation Confers Resistance to a Hedgehog Pathway Inhibitor

in Medulloblastoma, *Science* (80-.). 23 (2009) 572–574.
<https://doi.org/10.1126/science.1179386>.

- [44] T. Conroy, F. Desseigne, M. Ychou, O. Bouché, R. Guimbaud, Y. Bécouarn, A. Adenis, J.-L. Raoul, S. Gourgou-Bourgade, C. de la Fouchardière, J. Bennouna, J.-B. Bachet, F. Khemissa-Akouz, D. Péré-Vergé, C. Delbaldo, E. Assenat, B. Chauffert, P. Michel, C. Montoto-Grillot, M. Ducreux, G.T.D. of U. and the P. Intergroup, FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer, *N. Engl. J. Med.* 364 (2011) 1817–1825.
<https://doi.org/10.1056/NEJMc1107627#SA1>.
- [45] M. Ducreux, T. Seufferlein, J. Van Laethem, P. Laurent-puig, C. Smolenschi, D. Malka, V. Boige, A. Hollebecque, T. Conroy, Systemic treatment of pancreatic cancer revisited, *Semin. Oncol.* (2018).
<https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2018.12.003>.
- [46] V. Kumar, A.K. Chaudhary, Y. Dong, H.A. Zhong, G. Mondal, F. Lin, V. Kumar, R.I. Mahato, Design, Synthesis and Biological Evaluation of novel Hedgehog Inhibitors for treating Pancreatic Cancer, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–15.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-01942-7>.
- [47] C. Li, D.G. Heidt, P. Dalerba, C.F. Burant, L. Zhang, V. Adsay, M. Wicha, M.F. Clarke, D.M. Simeone, Identification of Pancreatic Cancer Stem Cells, (2007).
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2030>.
- [48] M. Hidalgo, A. Maitra, The Hedgehog Pathway and Pancreatic Cancer, *World Wide Web Internet Web Inf. Syst.* 361 (2009) 2094–2096.
<https://doi.org/10.1056/NEJMcibr0905857>.
- [49] S.P. Thayer, M. Pasca, P.W. Heiser, C.M. Nielsen, D.J. Roberts, G.Y. Lauwers, Y.P. Qi, S. Gysin, F. Castillo, V. Yajnik, B. Antoniu, M. McMahon, L. Andrew, Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis, *Nature.* 425 (2003) 851–856.

<https://doi.org/10.1038/nature02009.Hedgehog>.

- [50] H. Onishi, M. Katano, Hedgehog signaling pathway as a new therapeutic target in pancreatic cancer, *World J. Gastroenterol.* 20 (2014) 2335–2342. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i9.2335>.
- [51] M. Karaca, R. Dutta, Y. Ozsoy, R.I. Mahato, Micelle Mixtures for Co-administration of Gemcitabine and GDC-0449 to treat Pancreatic Cancer Department of Pharmaceutical Sciences , University of Nebraska Medical Center , Department of Pharmaceutical Sciences University of Nebraska Medical Center, *Mol. Pharm.* (2016). <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00971>.
- [52] A. De Jesus-Acosta, E.A. Sugar, P.J. O'Dwyer, R.K. Ramanathan, D.D. Von Hoff, Z. Rasheed, L. Zheng, A. Begum, R. Anders, A. Maitra, F. McAllister, N. V. Rajeshkumar, S. Yabuuchi, R.F. de Wilde, B. Batukbhai, I. Sahin, D.A. Laheru, Phase 2 study of vismodegib, a hedgehog inhibitor, combined with gemcitabine and nab-paclitaxel in patients with untreated metastatic pancreatic adenocarcinoma, *Br. J. Cancer.* 122 (2020) 498–505. <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0683-3>.
- [53] A. Lambert, T. Conroy, M. Ducreux, Future directions in drug development in pancreatic cancer, *Semin. Oncol.* (2021). <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2021.02.002>.
- [54] L. Zhang, M. Xin, H. Shen, J. Wen, F. Tang, C. Tu, X. Zhao, P. Wei, Five-membered heteroaromatic ring fused-pyrimidine derivatives: Design, synthesis, and hedgehog signaling pathway inhibition study, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 24 (2014) 3486–3492. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.05.066>.
- [55] M. Xin, L. Zhang, Q. Jin, F. Tang, J. Wen, L. Gu, L. Cheng, Y. Zhao, Discovery of novel 4-(2-pyrimidinylamino)benzamide derivatives as highly potent and

orally available hedgehog signaling pathway inhibitors, *Eur. J. Med. Chem.* 110 (2016) 115–125. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.01.018>.

- [56] L. Zhang, M. Xin, H. Shen, J. Wen, F. Tang, C. Tu, X. Zhao, P. Wei, Five-membered heteroaromatic ring fused-pyrimidine derivatives: Design, synthesis, and hedgehog signaling pathway inhibition study, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 24 (2014) 3486–3492. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.05.066>.
- [57] M. Xin, J. Wen, F. Tang, C. Tu, W. Huang, H. Shen, X. Zhao, L. Cheng, M. Wang, L. Zhang, Synthesis and evaluation of 4-(2-pyrimidinylamino) benzamides inhibitors of hedgehog signaling pathway, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 24 (2014) 983–988. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.12.050>.
- [58] Á. Cañete-Molina, C. Espinosa-Bustos, M. González-Castro, M. Faúndez, J. Mella, R.A. Tapia, A.R. Cabrera, I. Brito, A. Aguirre, C.O. Salas, Design, synthesis, cytotoxicity and 3D-QSAR analysis of new 3,6-disubstituted-1,2,4,5-tetrazine derivatives as potential antitumor agents, *Arab. J. Chem.* (2017). <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.04.002>.
- [59] J. Calderón-Arancibia, C. Espinosa-Bustos, Á. Cañete-Molina, R.A. Tapia, M. Faúndez, M.J. Torres, A. Aguirre, M. Paulino, C.O. Salas, Synthesis and pharmacophore modelling of 2,6,9-trisubstituted purine derivatives and their potential role as apoptosis-inducing agents in cancer cell lines, *Molecules.* 20 (2015) 6808–6826. <https://doi.org/10.3390/molecules20046808>.
- [60] M.E. Welsch, S.A. Snyder, B.R. Stockwell, Privileged scaffolds for library design and drug discovery, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 14 (2010) 347–361. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.02.018>.
- [61] Y.T. Chang, S.M. Wignall, G.R. Rosania, N.S. Gray, S.R. Hanson, A.I. Su, J. Merlie, H.S. Moon, S.B. Sangankar, O. Perez, R. Heald, P.G. Schultz, Synthesis and biological evaluation of myoseverin derivatives: Microtubule

assembly inhibitors, *J. Med. Chem.* 44 (2001) 4497–4500. <https://doi.org/10.1021/jm010451+>.

- [62] J. Yang, L.J. Wang, J.J. Liu, L. Zhong, R.L. Zheng, Y. Xu, P. Ji, C.H. Zhang, W.J. Wang, X.D. Lin, L.L. Li, Y.Q. Wei, S.Y. Yang, Structural optimization and structure-activity relationships of N 2-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)- N 8-phenyl-9 H -purine-2,8-diamine derivatives, a new class of reversible kinase inhibitors targeting both EGFR-activating and resistance mutations, *J. Med. Chem.* 55 (2012) 10685–10699. <https://doi.org/10.1021/jm301365e>.
- [63] Y.Y. Hei, Y. Shen, J. Wang, H. Zhang, H.Y. Zhao, M. Xin, Y.X. Cao, Y. Li, S.Q. Zhang, Synthesis and evaluation of 2,9-disubstituted 8-phenylthio/phenylsulfinyl-9H-purine as new EGFR inhibitors, *Bioorganic Med. Chem.* 26 (2018) 2173–2185. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.03.025>.
- [64] A.M. Zarate, C. Espinosa-bustos, S. Guerrero, A. Fierro, F. Oyarzún-Ampuero, A.F.G. Quest, L. Di Marcotullio, E. Loricchio, M. Caimano, A. Calcaterra, M. González-Quiroz, A. Aguirre, J. Meléndez, C.O. Salas, A New Smoothed Antagonist Bearing the Purine Scaffold Shows Antitumour Activity In Vitro and In Vivo, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 8372.
- [65] D. Sydow, L. Burggraaff, A. Szengel, H.W.T. Van Vlijmen, A.P. Ijzerman, G.J.P. Van Westen, A. Volkamer, Advances and Challenges in Computational Target Prediction, *J. Chem. Inf. Model.* 59 (2019) 1728–1742. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.8b00832>.
- [66] A. Lee, K. Lee, D. Kim, Using reverse docking for target identification and its applications for drug discovery, *Expert Opin. Drug Discov.* 11 (2016) 707–715. <https://doi.org/10.1080/17460441.2016.1190706>.
- [67] W. Lu, X. Liu, X. Cao, M. Xue, K. Liu, Z. Zhao, X. Shen, H. Jiang, Y. Xu, J. Huang, H. Li, SHAFTS: A hybrid approach for 3D molecular similarity calculation. 2. Prospective case study in the discovery of diverse p90

ribosomal S6 protein kinase 2 inhibitors to suppress cell migration, *J. Med. Chem.* 54 (2011) 3564–3574. <https://doi.org/10.1021/jm200139j>.

- [68] X. Liu, S. Ouyang, B. Yu, Y. Liu, K. Huang, J. Gong, S. Zheng, Z. Li, H. Li, H. Jiang, PharmMapper server: A web server for potential drug target identification using pharmacophore mapping approach, *Nucleic Acids Res.* 38 (2010) 5–7. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq300>.
- [69] X. Wang, Y. Shen, S. Wang, S. Li, W. Zhang, X. Liu, L. Lai, J. Pei, H. Li, PharmMapper 2017 update: A web server for potential drug target identification with a comprehensive target pharmacophore database, *Nucleic Acids Res.* 45 (2017) W356–W360. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx374>.
- [70] J. Gong, C. Cai, X. Liu, X. Ku, H. Jiang, D. Gao, H. Li, ChemMapper: A versatile web server for exploring pharmacology and chemical structure association based on molecular 3D similarity method, *Bioinformatics.* 29 (2013) 1827–1829. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt270>.
- [71] J.C. Antilla, J.M. Baskin, T.E. Barder, S.L. Buchwald, Copper-diamine-catalyzed N-arylation of pyrroles, pyrazoles, indazoles, imidazoles, and triazoles, *J. Org. Chem.* 69 (2004) 5578–5587. <https://doi.org/10.1021/jo049658b>.
- [72] N. Miyaura, A. Suzuki, Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organoboron Compounds, *Chem. Rev.* 95 (1995) 2457–2483. <https://doi.org/10.1021/cr00039a007>.
- [73] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods.* 65 (1983) 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- [74] G.R. Geen, T.J. Gritnet, P.M. Kincey, R.L. Jarvest, The Effect of the C-6 Substituent On the Regioselectivity of N-Alkylation Of 2-Aminopurines, *Tetrahedron.* 46 (1990) 6903–6914.

- [75] M.G. Sunagar, S. Gaonkar, S.G. Sunagar, N. Deshapande, N.S. Belavagi, I.A.M. Khazi, Synthesis of novel N-9 substituted 6-(4-(4-propoxyphenyl)piperazin-1-yl)-9H-purine derivatives as inducers of apoptosis in MCF-7 breast cancer cells, *RSC Adv.* 6 (2016) 15286–15297. <https://doi.org/10.1039/C5RA23242B>.
- [76] E. Pretsch, P. Bühlmann, M. Badertscher, *Structure Determination of Organic Compounds*, 4th ed., 2009. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-93810-1>.
- [77] D.T. Hurst, *Introduction to the Chemistry and Biochemistry of Pyrimidines, Purines, and Pteridines*, J Wiley, 1980.
- [78] S. Ostrowski, Synthesis of Fused Pyrimidines and Purines by Vicarious Nucleophilic Substitution of Hydrogen (A Microreview), *Jordan J. Chem.* 4 (2009) 1–15.
- [79] L. Kürti, B. Czakó, Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis: Background and Detailed Mechanisms, *J. Chem. Educ.* 82 (2005) 1780. <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ed082p1780.3> (accessed June 8, 2018).
- [80] J. Liu, M.J. Robins, S N Ar Displacements with 6- (Fluoro , Chloro , Bromo , Iodo , and Alkylsulfonyl) purine Nucleosides : Synthesis , Kinetics , and, *Tetrahedron.* (2007) 5962–5968.
- [81] M.M. Heravi, Z. Kheilkordi, V. Zadsirjan, M. Heydari, M. Malmir, Buchwald-Hartwig reaction: An overview, *J. Organomet. Chem.* 861 (2018) 17–104. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2018.02.023>.
- [82] D.S. Surry, S.L. Buchwald, Biaryl phosphane ligands in palladium-catalyzed amination, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 47 (2008) 6338–6361. <https://doi.org/10.1002/anie.200800497>.
- [83] Y. Sunesson, E. Limé, S.O. Nilsson Lill, R.E. Meadows, P.O. Norrby, Role of

the base in Buchwald-Hartwig amination, *J. Org. Chem.* 79 (2014) 11961–11969. <https://doi.org/10.1021/jo501817m>.

- [84] S. Liao, C. Floyd, N. Verratti, L. Leung, C. Wu, Analysis of vismodegib resistance in D473G and W535L mutants of SMO receptor and design of novel drug derivatives using molecular dynamics simulations, *Life Sci.* 244 (2020) 117302. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117302>.
- [85] N. Sinha, S. Chowdhury, R.R. Sarkar, Molecular basis of drug resistance in Smoothed receptor: An in silico study of protein resistivity and specificity, *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* (2019) 1–13. <https://doi.org/10.1002/prot.25830>.
- [86] R.C. Patel, P. Stanton, N.M.J. Mcmillan, B.R.G. Williams, G.C. Sen, The interferon-inducible double-stranded RNA-activated protein kinase self-associates in vitro and in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92 (1995) 8283–8287. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.18.8283>.
- [87] A. Dhalla, J. Shryock, R. Shreeniwas, L. Belardinelli, Pharmacology and Therapeutic Applications of A1 Adenosine Receptor Ligands, *Curr. Top. Med. Chem.* 3 (2005) 369–385. <https://doi.org/10.2174/1568026033392246>.

ANEXO 1: Data espectroscópica

6-Cloro-2-fluoro-9-hexil-9H-purina (3a)

Rendimiento: 30 %; Sólido blanco; Punto de Fusión: 50,4 – 53,6° C. RMN-¹H (400 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 8,08 (s, 1H, H8), 4,21 (t, *J* = 7,1 Hz; 2H, H1'), 1,88 (dd, *J* = 14,0, 7,1 Hz, 2H, H2'), 1,30 (m, 6H, H3', H4', H5'), 0,85 (t, *J* = 6,9 Hz, 3H, H6'). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K CDCl₃) δ/ppm 157,35 (C2, d, *J*_{C-F} = 219,7 Hz), 153,78 (C4, d, *J*_{C-F} = 16,9 Hz), 152,69 (C6, d, *J*_{C-F} = 17,6 Hz), 145,91 (C8), 130,38 (C5), 44,78 (C1'), 31,16 (C3'), 29,74 (C2'), 26,31 (C4'), 22,48 (C5'), 13,98 (C6'). FT-IR (KBr, cm⁻¹): 3070, 2931, 2854, 1604, 1489, 1442, 1033, 933, 640.

6-Cloro-2-fluoro-9-hexil-7H-purina (3a')

Rendimiento: 7 %; Sólido blanco; Punto de Fusión: 54,8 – 58,3° C; RMN-¹H (400 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 8,24 (s, 1H, H8), 4,44 (t, *J* = 7,4 Hz; 2H, H1'), 1,95-1,85 (m, 2H, H2'), 1,39 – 1,25 (m, 6H, H3', H4', H5'), 0,86 (t, *J* = 6,7 Hz, 3H, H6'). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 164,37 (C6, d, *J*_{C-F} = 17,2 Hz), 157,58 (C2, d, *J*_{C-F} = 217,4 Hz), 150,83 (C8), 144,62 (C4, d, *J*_{C-F} = 178,4 Hz), 121,23 (C5), 47,82 (C1'), 31,58 (C2'), 29,31 (C3'), 26,12 (C4'), 22,49 (C5'), 13,96 (C6').

6-Cloro-2-fluoro-9-metilciclopropil-9H-purina (3b)

Rendimiento: 28 %; Sólido blanco; Punto de Fusión: 82,3 – 83,7° C; RMN-¹H: (400 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 8,21 (s, 1H, H8), 4,10 (d, *J* = 7,4 Hz, 2H, H1'), 1,37 – 1,28 (m, 1H, H2'), 0,75 – 0,68 (m, 2H, H3' y H4'), 0,48 (q, *J* = 5,1 Hz, 2H, H3' y H4'). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 153,30 (C2), 152,98 (C4), 151,76 (C6), 145,53 (C8), 130,85 (C5), 49,46 (C1'), 11,01 (C2'), 4,62 (2C, C3' y C4').

6-Cloro-2-fluoro-9-metilciclopropil-7H-purina (3b')

Rendimiento: 5 %; Sólido blanco; Punto de Fusión: 104,6 – 107,9° C; RMN-¹H (400 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 8,39 (s, 1H, H8), 4,33 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H, H1''), 1,46 – 1,31 (m, 1H, H2''), 0,76 (q, *J* = 5,7 Hz, 2H, H3' y H4'), 0,48 (q, *J* = 5,2 Hz, 2H, H3' y H4'). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 163,68 (C4), 153,00 (C2), 149,91 (C8), 143,76 (C6), 121,80 (C5), 52,49 (C1''), 11,56 (C2''), 4,67 (2C, C3'', C4'').

2,6-Dicloro-9-metilciclopropil-7H-purina (3c)

RMN-¹H (200 MHz, 298 K CDCl₃) δ/ppm 8,22 (s, 1H, H8), 4,10 (d, *J* = 7,3 Hz, 2H, H1'), 1,40 – 1,25 (m, 1H, H2'), 0,77 – 0,66 (m, 2H, H3' y H4'), 0,47 (dt, *J* = 6,3, 4,9 Hz, 2H, H3' y H4'). RMN-¹³C (50 MHz, 298 K CDCl₃) δ/ppm 153,29 (C2), 152,98 (C4), 151,76 (C6), 145,53 (C8), 130,85 (C5), 49,46 (C1'), 11,01 (C2'), 4,62 (2C, C3' y C4').

2-Fluoro-9-hexil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9H-purina (4a)

Rendimiento: 82 %; sólido blanco; Punto de fusión: 50,0 – 53,2 °C. RMN-¹H (400 MHz, 298 K CDCl₃) δ/ppm 8,88 (d, *J* = 8,65, 2H, H2'''), 8,08 (s, 1H, H8), 7,37 (d, *J* = 8,5, 2H, H3'''), 4,24 (t, *J* = 7,24, 2H, H1'), 1,91 (dd, *J* = 14,0 – 7,0 Hz, 2H, H2'), 1,39 – 1,25 (m, 6H, H3', H4' y H5'), 0,87 (t, *J* = 6,7, 3H, H6'). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K CDCl₃) δ/ppm 158,85 (C2, d, *J*_{C-F} = 212,9 Hz), 155,62 (C6, d, *J*_{C-F} = 15,3 Hz), 155,19 (C4, d, *J*_{C-F} = 16,9 Hz), 151,87 (C4''', d, *J*_{C-F} = 1,6 Hz), 145,28 (C8, d, *J*_{C-F} = 3,0 Hz), 133,16 (1'''), 131,91 (C2'''), 129,77 (C5, d, *J*_{C-F} = 4,2 Hz), 124,40 – 116,70 (-OCF₃, q, *J*_{C-F} = 260,0 Hz), 120,76 (C3'''), 44,33 (C1'), 31,27 (C3'), 29,85 (C2'), 26,42 (C4'), 22,56 (C5'), 14,03 (C6'). RMN-¹⁹F (376 MHz, 298 K, CDCl₃) -57,58, -50,7. IR-FT (KBr, cm⁻¹): 3093, 2924, 2862, 1597, 1465, 1350, 1203, 1157, 902.

2-Fluoro-9-metilciclopropil-6-(4-(trifluorometoxi) fenil)-9H-purina (4b)

Rendimiento: 75 %; sólido blanco; Punto de fusión: 116,8 – 120,3. RMN-¹H (400 MHz, 298 K CDCl₃) δ/ppm 8,86 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H, H2'''), 8,21 (s, 1H, H8), 7,37 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H, H3'''), 4,12 (d, *J* = 7,2 Hz, 2H, H1'), 1,42 – 1,29 (m, 1H, H2'), 0,72 (d, *J* = 7,0 Hz, 2H, H3' y H4'), 0,49 (d, *J* = 4,0 Hz, 2H, H3' y H4'). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K CDCl₃) δ/ppm 154,93 (C6), 154,48 (C4), 154,25 (C2), 151,74 (C4'''), 144,91 (C8), 133,17 (C1'''), 131,94 (2C, C2'''), 130,14 (C5), 121,83 – 119,26 (*J*_{C-F} = 259,6 Hz, OCF₃), 120,77 (2C, C3'''), 48,93 (C1'), 11,05 (C2'), 4,56 (2C, C3'). FT-IR (KBr, cm⁻¹): 3093, 3016, 2939, 1597, 1365, 902.

2-Fluoro-9-hexil-6-(4-(trifluorometil) fenil)-9H-purina (4d)

RMN-¹H (200 MHz, 298 K CDCl₃) δ/ppm 8,94 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H, H2'''), 8,12 (s, 2H, H8), 7,80 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H, H3'''), 4,26 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H, H1'), 1,94 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H, H2'), 1,42 – 1,27 (m, 6H, H3', H4' y H5'), 0,94 – 0,78 (m, 3H, H6'). RMN-¹³C (50 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 160,98, 156,74, 155,59, 155,24, 145,66, 145,60, 137,95,

133.48, 132.84, 132.19, 130.40, 130.23, 130.14, 126.76, 125.80, 125.72, 125.65, 125.57, 122.44, 121.34, 44.40, 31.28, 30.45, 29.86, 26.44, 22.57, 14.04.

2-Fluoro-9-hexil-6-(4-nitrofenil)-9H-purina (4f)

RMN-¹H (200 MHz, 298 K CDCl₃) δ/ppm 9,05 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H, H2'''), 8,41 – 8,35 (m, 2H, H3'''), 8,15 (s, 1H, H8), 4,28 (t, $J = 7,2$ Hz, 1H, H1'), 1,93 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H, H2'), 1,42 – 1,27 (m, 6H, H3', H4' y H5'), 0,94 – 0,82 (m, 3H, H6').). RMN-¹³C (50 MHz, 298 K CDCl₃) δ/ppm 160.79, 153.82, 149.47, 145.94, 145.88, 140.29, 130.88, 128.31, 124.37, 123.70, 65.25, 44.33, 31.12, 29.70, 26.29, 22.41, 13.90.

2-Fluoro-9-metilciclopropil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9H-purina (4g)

RMN-¹H (200 MHz, 298 K CDCl₃) δ/ppm 8,89 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H, H2'''), 8,21 (s, 1H, H8), 7,43 – 7,32 (m, 2H, H3'''), 4,10 (d, $J = 7,3$ Hz, 2H, H1'), 1,44 – 1,27 (m, 1H, H2') 0,80 – 0,65 (m, 2H, H3' y H4'), 0.50 (dt, $J = 6,3, 4,8$ Hz, 2H, H3' y H4'). RMN-¹³C (50 MHz, 298 K CDCl₃) δ/ppm 160.99, 156.76, 155.75, 155.45, 155.36, 155.03, 151.86, 151.82, 144.95, 144.89, 133.18, 131.92, 129.79, 129.71, 123.12, 120.78, 117.99, 48.93, 11.07, 4.55.

2-Fluoro-9-metilciclopropil-6-(4-(trifluorometil)fenil)-9H-purina (4i)

RMN-¹H (200 MHz, 298 K CDCl₃) δ/ppm 8,95 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H2'''), 8,24 (s, 1H, H8), 7,80 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H, H3'''), 4,12 (d, $J = 7,3$ Hz, 2H, H1'), 1,44 – 1,29 (m, 1H, H2'), 0.80 – 0.67 (m, 2H, H3' y H4'), 0.51 (dt, $J = 6.3, 4.8$ Hz, 2H, H3' y H4'). RMN-¹³C (50 MHz, 298 K CDCl₃) δ/ppm 177.64, 175.81, 161.01, 156.77, 155.50, 155.21, 145.32, 145.26, 137.97, 133.48, 132.83, 132.18, 130.40, 130.23, 130.14, 126.76, 125.81, 125.73, 125.65, 125.58, 121.35, 49.00, 29.83, 11.08, 4.59.

2-Cloro-9-metilciclopropil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9H-purina (4l)

RMN-¹H (200 MHz, 298 K CDCl₃) δ/ppm 8,87 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H, H2'''), 8,22 (s, 1H, H8), 7,44 – 7,32 (m, 2H, H3'''), 4,13 (d, $J = 7,3$ Hz, 2H, H1'), 1,43 – 1,29 (m, 1H, H2'), 0.79 – 0.66 (m, 2H, H3' y H4'), 0.50 (dt, $J = 6.4, 4.9$ Hz, 2H, H3' y H4'). RMN-¹³C (50 MHz, 298 K CDCl₃) δ/ppm 177.63, 154.97, 154.50, 154.28, 151.79, 151.75, 144.90, 133.19, 131.96, 130.15, 123.12, 120.79, 117.99, 48.95, 31.04, 11.08, 4.59.

2-Cloro-9-metilciclopropil-6-(4-metoxifenil)-9H-purina (4m)

RMN-¹H (200 MHz, 298 K CDCl₃) δ/ppm 8,83 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H, H2'''), 8,18 (s, 1H, H8), 7.06 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H3'''), 4.11 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H, H1'), 3,90 (s, 3H) 1,43 –

1,31 (m, 1H, H2'), 0.79 – 0.66 (m, 2H, H3' y H4'), 0.50 (dd, $J = 5.9, 4.3$ Hz, 2H, H3' y H4'). RMN-¹³C (50 MHz, 298 K CDCl₃) δ/ppm 177.64, 162.72, 144.07, 139.01, 132.10, 127.46, 114.26, 85.66, 55.58, 48.80, 31.07, 11.13, 4.56.

2-Cloro-9-metilciclopropil-6-(4-(trifluorometil)fenil)-9H-purina (4n)

RMN-¹H (200 MHz, 298 K CDCl₃) δ/ppm 8,93 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H, H2'''), 8,25 (s, 1H, H8), 7,79 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H, H3'''), 4,14 (d, $J = 7,3$ Hz, 2H, H1'), 1,37 (tt, $J = 7.7, 4.8$ Hz, 1H, H2'), 0,80 – 0,67 (m, 2H, H3' y H4'), 0,50 (dt, $J = 6.3, 4.8$ Hz, 2H, H3' y H4'). RMN-¹³C (50 MHz, 298 K CDCl₃) δ/ppm 154.72, 154.33, 145.25, 137.99, 133.37, 132.73, 130.55, 130.44, 127.76, 126.77, 126.04, 125.78, 125.71, 125.63, 125.56, 121.36, 49.01, 31.04, 11.08, 4.61.

2-Cloro-9-metilciclopropil-6-fenil-9H-purina (4p)

RMN-¹H (200 MHz, 298 K CDCl₃) δ/ppm 8,85 – 8,74 (m, 2H, H2'''), 8,21 (s, 1H, H8), 7,56 – 7,51 (m, 3H, H3''' y H4'''), 4,13 (d, $J = 7,3$ Hz, 2H, H1'), 1,46 – 1,28 (m, 1H, H2'), 0,78 – 0,66 (m, 2H, H3' y H4'), 0,49 (dt, $J = 6.3, 4.8$ Hz, 2H, H3' y H4'). RMN-¹³C (50 MHz, 298 K CDCl₃) δ/ppm 156.71, 154.39, 154.30, 144.64, 134.76, 131.78, 130.26, 130.19, 128.84, 48.87, 31.06, 11.11, 4.57.

tert-Butil-4-(benzamido) piperidin-1-carboxilato (8a)

Rendimiento: 83 %; sólido blanco; Punto de Fusión: 98,7 – 101,7 RMN-¹H (400 MHz, 298 K CDCl₃) δ/ppm 7,32-7,66 (m, 2H, H6'' y H4''), 7,21-7,16 (m, 3H, H3'' y H5'', H2''), 5,81 - 5,72 (m, 1H, -NH), 4,14 - 4,00 (m, 3H, H-pip4 y H-pip2), 2,89 (t, $J = 12,1$ Hz, 2H, H-pip2), 2,41 (s, 3H), 2,00 (d, $J = 12,0$ Hz, 2H, H-pip3), 1,44 (s, 9H, 3 x CH₃), 1,42-1,32 (m, 2H, H-pip3). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 169,63 (C=O/amida), 154,83 (C=O/carbamato), 136,53 (C1''), 131,09 (C3''), 129,99 (C4''), 126,69 (C6''), 125,85 (C5''), 79,83 (C=O/carbamato), 47,14 (C-pip4), 42,74 (C-pip2), 32,17 (C-pip3), 28,53 (3 x -CH₃), 19,78 (C1''').

tert-Butil-4-(2-metilbenzamido)piperidin-1-carboxilato (8b)

Rendimiento: 65 %; sólido blanco; Punto de Fusión: 113,5 – 117,5° C. RMN-¹H (400 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 7,32-7,66 (m, 2H, H6'' y H4''), 7,21-7,16 (m, 2H, H3'' y H5''), 5,81-5,72 (m, 1H, -NH), 4,14 - 4,00 (m, 3H, H-pip4 y H-pip2), 2,89 (t, $J = 12,1$ Hz, 2H, H-pip2), 2,41 (s, 3H, -CH₃ arom), 2,00 (d, $J = 12,0$ Hz, 2H, H-pip3), 1,44 (s, 9H, 3 -CH₃), 1,42 – 1,32 (m, 2H, H-pip3). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm

169,63 (CO/amida), 154,83 (CO/carbamato), 136,53 (C1''), 131,09 (C3''), 129,99 (C4''), 126,69 (C6''), 125,85 (C5''), 79,83 (C/carbamato), 47,14 (C-pip4), 42,74 (2C, C-pip2), 32,17 (2C, C-pip3), 28,53 (3C, -CH₃/carbamato), 19,78 (CH₃/arom). FT-IR (KBr, cm⁻¹): 3271, 3062, 2970, 2862, 1697, 1543, 1064, 941.

***tert*-Butil 4-(2-bromobenzamido)piperidin-1-carboxilato (8c)**

Rendimiento: 88 %, sólido blanco, punto de fusión: 120,0 – 122,5° C. RMN-¹H (400 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 7,59 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H, H6''), 7,51 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H, H3''), 7,36 (t, *J* = 7,4 Hz, 1H, H4''), 7,29 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H, H5''), 6,05 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H, -NH), 4,2 – 4,1 (m, 1H, H-pip4), 4,07 (d, *J* = 13,0 Hz, 2H, H-pip2), 2,95 (t, *J* = 12,4 Hz, 2H, H-pip2), 2,05 (d, *J* = 12,4 Hz, 2H, H-pip3), 1,47 (s, 9H, 3 x CH₃), 1,46 – 1,8 (m, 2H, H-pip3). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 167,04 (CO/amida), 154,78 (CO/carbamato), 137,87 (C1''), 133,40 (C6''), 131,35 (C5''), 129,63 (C3''), 127,69 (C4''), 119,30 (C2''), 79,80 (C/carbamato), 47,50 (C-pip4), 42,68 (2C, C-pip2), 31,89 (2C, C-pip3), 28,52 (3C, -CH₃). FT-IR (KBr, cm⁻¹): 3271, 3062, 2978, 2854, 1689, 1026, 902, 686.

***tert*-Butil 4-(3-clorobenzamido)piperidin-1-carboxilato (8d)**

Rendimiento: 89 %, sólido blanco; Punto de fusión: 157,3 – 158,8° C. RMN-¹H (400 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 7,73 (s, 1H, H2''), 7,62 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H, H4''), 7,45 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H, H6''), 7,34 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H, H5''), 6,23 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H, -NH), 4,14 – 4,03 (m, 3H, H-pip4 y H-pip2), 2,87 (t, *J* = 12,4 Hz, 2H, H-pip2), 1,99 (d, *J* = 10,4 Hz, 2H, H-pip3), 1,45 (s, 9H, 3 -CH₃), 1,43 – 1,35 (m, 2H, H-pip3). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 165,65 (CO/amida), 154,83 (CO/carbamato), 136,47 (C1''), 134,82 (C3''), 131,62 (C4''), 130,00 (C5''), 127,39 (C6''), 125,19 (C2''), 79,88 (C_{cuat}/carbamato), 47,57 (C-pip4), 42,90 (2C, C-pip2), 32,16 (2C, C-pip3), 28,54 (3C, -CH₃). FT-IR (KBr, cm⁻¹): 3271, 3070, 2978, 2931, 2854, 1689, 1473, 1080, 902.

***tert*-Butil 4-(4-cianobenzamido)piperidin-1-carboxilato (8e)**

Rendimiento: 98 %; sólido blanco; Punto de fusión: 159,7 – 161,5° C. RMN-¹H (400 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 7,87 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H, H2''), 7,71 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H, H3''), 6,36 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H, -NH), 4,17 – 4,04 (m, 3H, H-pip4 y H-pip2), 2,87 (t, *J* = 12,4 Hz, 2H, H-pip2), 2,00 (d, *J* = 13,4 Hz, 2H, H-pip3), 1,43 (s, 9H, 3 x CH₃), 1,46 – 1,34 (m, 2H, H-pip3). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 165,05 (CO/amida),

154,69 ($\underline{\text{C}}\text{O}/\text{carbamato}$), 138,44 ($\text{C}1''$), 132,39 ($\text{C}3''$) 127,75 ($\text{C}2''$), 118,04 ($-\underline{\text{C}}\text{N}$), 115,04 ($\text{C}4''$), 79,85 ($\text{C}_{\text{cuat}}/\text{carbamato}$), 47,65 (C-pip4), 42,75 (2C, C-pip2), 32,00 (2C, C-pip3), 28,41 (3C, $-\underline{\text{C}}\text{H}_3$). FT-IR (KBr, cm^{-1}): 3363, 3286, 3055, 2993, 2939, 2854, 2229, 1535, 1234, 1072, 894.

***tert*-Butil 4-(3-fluoro-4-metoxibenzamido)piperidin-1-carboxilato (8f)**

Rendimiento: 89 %; sólido blanco; Punto de fusión: 152,9 – 153,8° C. RMN- ^1H (400 MHz, 298 K, CDCl_3) δ/ppm 7,52 (d, $J = 9,9$ Hz, 2H, $\text{H}6''$ y $\text{H}5''$), 6,39 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, $\text{H}2''$), 6,22 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, $-\text{NH}$), 4,07 (d, $J = 11,6$ Hz, 3H, H-pip4 y H-pip2), 3,90 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 2,86 (t, $J = 12,6$ Hz, 2H, H-pip2), 1,97 (d, $J = 11,8$ Hz, 2H, H-pip3), 1,43 (s, 9H, 3 $-\text{CH}_3$), 1,42 – 1,32 (m, 2H, H-pip3). RMN- ^{13}C (101 MHz, 298 K, CDCl_3) δ/ppm 165,44 ($\underline{\text{C}}\text{O}/\text{amida}$), 154,82 ($\underline{\text{C}}\text{O}/\text{carbamato}$), 151,87 (d, $J_{\text{C}=\text{F}} = 266,8$ Hz, $\text{C}3''$), 150,58 (d, $J_{\text{C}=\text{F}} = 30,3$ Hz, $\text{C}4''$), 127,40 ($\text{C}1''$) 123,60 ($\text{C}5''$), 115,17 ($\text{C}6''$), 112,73 ($\text{C}2''$), 79,81 ($\text{C}_{\text{cuat}}/\text{carbamato}$), 56,37 ($-\text{OCH}_3$), 47,44 (C-pip4), 42,77 (2C, C-pip2), 31,97 (2C, C-pip3), 28,42 (3C, $-\underline{\text{C}}\text{H}_3$). RMN- ^{19}F (400 MHz, 298 K, CDCl_3) δ/ppm -134,16. FT-IR (KBr, cm^{-1}): 3348, 3055, 2978, 2947, 2846, 1242, 1134, 1018, 871.

***tert*-Butil 4-(3,5-dimetilbenzamido)piperidin-1-carboxilato (8g)**

Rendimiento: 89 %, sólido blanco, punto de fusión: 173,3 – 173,7° C. RMN- ^1H (400 MHz, 298 K, CDCl_3) δ/ppm 7,33 (s, 2H, $\text{H}2''$), 7,09 (s, 1H, $\text{H}4''$), 6,14 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, $-\text{NH}$), 4,06 (d, $J = 11,6$ Hz, 3H, H-pip4 y H-pip2), 2,87 (t, $J = 12,4$ Hz, 2H, H-pip2), 2,32 (s, 6H, $\text{H}1'''$), 1,97 (d, $J = 12,2$ Hz, 2H, H-pip3), 1,44 (s, 9H, 3 $-\text{CH}_3$), δ 1,43-1,31 (m, 2H, H-pip3). RMN- ^{13}C (101 MHz, 298 K, CDCl_3), 167,33 ($\underline{\text{C}}\text{O}/\text{amida}$), 154,81 ($\underline{\text{C}}\text{O}/\text{carbamato}$), 138,31 ($\text{C}1''$), 134,67 ($\text{C}3''$), 133,12 ($\text{C}4''$), 124,75 ($\text{C}2''$), 79,73 (C/carbamato), 47,21 (C-pip4), 42,86 (2C, C-pip2), 32,20 (2C, C-pip3), 28,52 (3C, $-\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 21,29 (2C, $-\underline{\text{C}}\text{H}_3/\text{arom}$). FT-IR (KBr, cm^{-1}): 3263, 3070, 2846, 2777, 1635, 1411, 1334, 864, 756.

***tert*-Butil 4-(3,5-dinitrobenzamido)piperidin-1-carboxilato (8h)**

Rendimiento: 84 %, sólido blanco, punto de fusión: 205,2 – 207,6° C. RMN- ^1H (400 MHz, 298 K, CDCl_3) δ/ppm 9,16 – 9,00 (m, 1H, $\text{H}4''$), 9,02 – 8,96 (m, 2H, $\text{H}2''$), 6,88 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, $-\text{NH}$), 4,28 – 4,06 (m, 3H, H-pip4 y H-pip2), 2,90 (t, $J = 12,7$ Hz, 2H, H-pip2), 2,11 – 1,97 (m, 2H, H-pip3), 1,60 – 1,45 (m, 2H, H-pip3), 1,43 (s, 9H, 3 x $\underline{\text{C}}\text{H}_3$). RMN- ^{13}C (101 MHz, 298 K, CDCl_3) δ/ppm 167,75 ($\underline{\text{C}}\text{O}/\text{amida}$), 159,61

(C=O/carbamato), 148,97 (C3''), 136,07 (C1''), 129,91 (C2''), 123,21 (C4''), 79,87 (C/carbamato), 48,17 (C-pip4), 43,66 (2C, C-pip2), 33,27 (2C, C-pip3), 28,47 (3C, -CH₃). FT-IR (KBr, cm⁻¹): 3248, 3100, 2931, 2854, 1643, 1543, 1411, 1342, 1072, 918, 717.

tert-Butil 4-(3-cloro-5-fluorobenzamido)piperidin-1-carboxilato (8i)

Rendimiento: 86 %, sólido blanco, punto de fusión: 170,1 – 171,8° C. RMN-¹H (400 MHz, 298 K CDCl₃) δ/ppm 7,52 (s, 1H, H4''), 7,39 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H, H2''), 7,20 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H, H6''), 6,36 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H, -NH), 4,15 – 4,04 (m, 3H, H-pip4 y H-pip2), 2,87 (t, *J* = 12,2 Hz, 2H, H-pip2), 1,98 (d, *J* = 11,8 Hz, 2H, H-pip3), 1,44 (s, 9H, 3 -CH₃), δ 1.39-1.31 (m, 2H, H-pip3). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 164,34 (C=O/amida), 162,54 (d, *J*_{C-F} = 251,6 Hz, C5''), 154,70 (C=O/carbamato), 137,76 (C3''), 135,49 (C1''), 123,12 (d, *J*_{C-F} = 3,1 Hz, C4''), 119,07 (d, *J*_{C-F} = 24,8 Hz, C6''), 112,98 (d, *J*_{C-F} = 22,9 Hz, C2''), 79,84 (C_{cuat}/carbamato), 47,64 (C-pip4), 42,77 (2C, C-pip2), 31,97 (2C, C-pip3), 28,42 (3C, -CH₃).

tert-Butil 4-(2,4,6-triclorobenzamido)piperidin-1-carboxilato (8j)

Rendimiento: 59 %, sólido blanco, punto de fusión: 162,3 – 166,8° C. RMN-¹H (400 MHz, 298 K, DMSO-*d*₆) δ/ppm 8,9 (m, 2H, H2''), 8,15 (s, 1H, H8), 7,94 (d, *J* = 7,55 Hz, 1H, -NH), 7,84 (m, 2H, H2), 7,45 (m, 5H, H13, H4 y H5''), 4,79 (m, 2H, H1'), 4,16 (m, 3H, H-pipe), 3,3 (m, 2H, H-pipe), 1,93 (m, 4H, H-pipe), 1,66 (m, 2H, H2'), 1,33 (m, 6H, H3', H4' y H5'), 0,86 (m, 9H, -CH₃). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, DMSO-*d*₆) δ/ppm 165,36, 157,83, 154,40, 151,02, 149,54, 142,81, 134,94, 134,67, 130,65, 130,22, 127,47, 126,68, 123,55, 49,89, 46,68, 43,04, 42,15, 30,53, 30,00, 29,08, 28,01, 25,11, 21,17, 12,99, IR-FT (KBr, cm⁻¹): 3255,84, 3086,11, 2978,09, 2854,65, 1651,07, 1550,77, 1427,32, 1319,31, 1141,86, 894,97, 848,68

tert-Butil 4-(1-naftoamido)piperidin-1-carboxilato (8k)

Rendimiento: 80 %; sólido blanco; punto de fusión: 160,1 - 161,2 ° C, RMN-¹H (400 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 8,23 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H, H8''), 7,88 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H, H2''), 7,86 - 7,82 (m, 1H, H5''), 7,55 - 7,47 (m, 3H, H4'' H7'' y H6''), 7,43 - 7,38 (m, 1H, H5''), 6,05 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H, -NH), 4,23 - 4,13 (m, 1H, H-pip4), 4,07 (d, *J* = 9,7 Hz, 2H, H-pip2), 2,91 (t, *J* = 11,8 Hz, 2H, H-pip2), 2,04 (d, *J* = 10,8 Hz, 2H, H-pipe3), 1,45 (s, 9H, -CH₃), 1,43 - 1,33 (m, 2H, H-pip3). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, CDCl₃)

δ /ppm 168,97 (CO/amida), 154,71 (CO/carbamato), 134,46 (C1''), 133,66 (C10''), 130,55 (C2''), 130,05 (C9''), 128,34 (C6''), 127,13 (C6''), 126,45 (C7''), 125,21 (C8''), 124,84 (C4''), 124,70 (C3''), 79,71 (C_{cuat}/carbamato), 47,27 (C-pip4), 42,62 (2C, C-pip2), 32,05 (2C, C-pip3), 28,43 (3C, -CH₃). FT-IR (KBr, cm⁻¹): 3278, 3055, 2978, 2931, 2854, 1689, 1627, 1327, 1087, 871, 779.

tert-Butil-4-(2-naftoamido)piperidin-1-carboxilato (8l)

Rendimiento: 83 %; sólido blanco; punto de fusión: 144,1 – 147,1 °C, RMN-¹H (400 MHz, 298 K, CDCl₃) δ /ppm 8,23 (d, J = 8,0 Hz, 1H, H8'), 7,88 (d, J = 8,0 Hz, 1H, H2'), 7,86 - 7,82 (m, 1H, H4'), 7,55 - 7,47 (m, 3H, H3' H5' y H7'), 7,43 - 7,38 (m, 1H, H6'), 6,05 (d, J = 7,8 Hz, 1H, -NH), 4,23 - 4,13 (m, 1H, H-pip4), 4,07 (d, J = 9,7 Hz, 2H, H-pip2), 2,91 (t, J = 11,8 Hz, 2H, H-pip2), 2,04 (d, J = 10,8 Hz, 2H, H-pip3), 1,45 (s, 9H, CH₃), 1,43 - 1,33 (m, 2H, H-pip3). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, CDCl₃) δ /ppm 13C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 167.05 (CO/amida), 154.87 (CO/carbamato), 134.85, 132.72, 131.90, 128.99, 128.58, 127.87, 127.78, 127.44, 126.90, 123.68, 79.83 (C_{cuat}/carbamato), 47.48 (C-pip4), 42.88 (2C, C-pip2), 32.29 (2C, C-pip3), 28.56 (3C, -CH₃). FT-IR (KBr, cm⁻¹): 3278, 3055, 2978, 2939, 2854, 1689, 1627, 1327, 1242, 1087, 871, 779.

tert-Butil 4-(6-cloronicotinamido)piperidin-1-carboxilato (8m)

Rendimiento: 81 %, sólido blanco, punto de fusión: 176,0 – 178,5 °C, RMN-¹H (400 MHz, 298 K, CDCl₃) δ /ppm 8,73 (d, J = 1,7 Hz, 1H, H2''), 8,70 (dd, J = 8,3 Hz, 1H, H6''), 7,37 (d, J = 8,3 Hz, 1H, H3''), 6,58 (d, J = 7,4 Hz, 1H, -NH), 4,16 - 4,04 (m, 3H, H-pip4 y H-pip2), 2,85 (t, J = 12,0 Hz, 2H, H-pip2), 1,98 (d, J = 11,5 Hz, 2H, H-pip3), 1,42 (s, 9H, 3 -CH₃), 1,41 - 1,34 (m, 2H, H-pip3). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, CDCl₃) δ /ppm 164,06 (CO/amida), 154,79 (CO/carbamato), 154,28 (C6'') 148,25 (C2''), 138,08 (C4''), 129,24 (C3''), 126,42 (C5''), 79,73 (C/carbamato), 47,71 (C-pip4), 42,90 (2C, C-pip2), 32,10 (2C, C-pip3), 28,49 (3C, -CH₃), FT-IR (KBr, cm⁻¹): 3340, 2970, 2368, 1658, 1543, 1149, 1064 y 887.

tert-Butil 4-(3-metiltiofeno-2-carboxamido)piperidin-1-carboxilato (8n)

Rendimiento: 82 %, sólido blanco, punto de fusión: 118,7 – 119,8 °C, RMN-¹H (400 MHz, 298 K, CDCl₃) δ /ppm 7,23 (d, J = 5,0 Hz, 1H, H5''), 6,85 (d, J = 5,0 Hz, 1H, H4''), 5,75 (d, J = 7,4 Hz, 1H, -NH), 4,10 – 4,00 (m, 3H, H-pip4 y H-pip2), 2,88 (t, J =

12,0 Hz, 2H, H-pip2), 2,47 (s, 3H, -CH₃), 2,00-1,95 (m, 2H, H-pip3), 1,43 (s, 9H, 3 x -CH₃), 1,41-1,33 (m, 2H, H-pip3). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 162,51 (C=O/amida), 154,74 (C=O/carbamato), 141,19 (C2''), 132,06 (C4''), 130,93 (C3''), 126,42 (C5''), 79,73 (C1'''), 47,26 (C-pip4), 42,77 (2C, C-pip2), 32,20 (2C, C-pip3), 28,49 (9C, -CH₃/carbamato), 15,76 (3C, -CH₃). FT-IR (KBr, cm⁻¹): 3263, 3093, 2978, 2954, 1689, 1627, 1427, 1080, 864, 763.

tert-Butil-4-(3-(2-clorofenil)-5-metilisoxazol-4-carboxamido)piperidin-1-carboxilato (8o)

Rendimiento: 86 %; sólido blanco; punto de fusión: 145,4 -147,0 °C, RMN-¹H (400 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 7,56 - 7,40 (m, 4H, H-arom), 5,60 (d, J= 7,5 Hz, 1H, -NH), 3,96 - 3,86 (m, 1H, H-pip4), 3,67 (d, J= 13,0 Hz, 1H, H-pip2), 2,86 (t, J= 11,3 Hz, 2H, H-pip2), 2,74 (s, 3H, -CH₃), 1,72 (d, J= 10,2 Hz, 2H, H-pip3), 1,42 (s, 9H, 3 -CH₃), 1,01-0,91 (m, 2H, H-pip3). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 174,41 (C5''), 160,44 (C=O/amida), 158,17 (C3''), 154,73 (C=O/carbamato), 134,25 (C-arom), 132,20 (C-arom), 131,68 (C-arom), 130,38 (C-arom), 127,94 (C-arom), 127,73 (C-arom), 111,86 (C4''), 79,82, 46,12 (C-pip4), 42,14 (2C, C-pip2), 31,49 (2C, C-pip3), 28,48 (9C, -CH₃), 13,08 (3C, -CH₃). FT-IR (KBr, cm⁻¹): 3425, 3255, 3078, 2978, 2854, 2368, 1697, 1550, 1427, 1141, 1080, 879, 763.

tert-Butil-4-(5H-dibenzo[b,f]azepin-5-carboxamido)piperidin-1-carboxilato (8p)

Rendimiento: 52 %; sólido blanco; punto de fusión: 68,3 – 74,7 °C, RMN-¹H (400 MHz, 298 K, DMSO-d₆) δ/ppm 7,44-7,40 (m, 4H, H3'', H6''), 7,38 - 7,29 (m, 4H, H5'', H4''), 6,91 (s, 2H, H8''), 4,11 (d, J= 7,5 Hz, 1H, -NH), 3,84 (d, J= 13,3 Hz, 2H, H-pip2), 3,73 (d, J= 7,3 Hz, 1H, H-pip4), 2,81 (t, J= 12,4 Hz, 2H, H-pip2), 1,81 (d, J= 11,4 Hz, 2H, H-pip3), 1,41 (s, 9H, 3 -CH₃), 1,10 (q, J= 10,5 Hz, 2H, H-pip3). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 155,68 (C=O/amida), 154,71 (C=O/carbamato), 140,03 (2C, C2''), 135,31 (2C, C7''), 130,53 (2C, C8''), 129,75 (2C, C3''), 129,50 (2C, C6''), 129,15 (2C, C4''), 127,79 (2C, C5''), 79,58 (C_{quat}/carbamato), 47,80 (C-pip4), 42,58 (2C, C-pip2), 32,46 (2C, C-pip3), 28,50 (3C, -CH₃). FT-IR (KBr, cm⁻¹): 2970, 2854, 1681, 1496, 1327, 879, 771.

tert-Butil-4-(2-iodobenzamido)piperidin-1-carboxilato (8q)

Rendimiento: 63 %, sólido blanco; punto de fusión: 210 – 212 °C. RMN-¹H (400 MHz, 298 K, DMSO-*d*₆) δ/ppm 7,84 (d, *J*= 7.9 Hz, 1H, H6''), 7,41 – 7,32 (m, 2H, H4'', H3''), 7,09 (ddd, *J*= 8,0, 5,2, 4,0 Hz, 1H, H5''), 5,72 (d, *J*= 8,1 Hz, 1H, -NH), 4,16 – 3,99 (m, 3H, H-pip4, H-pip2), 2,92 (ddd, *J*= 14,0, 11,6, 2,8 Hz, 2H, H-pip2), 2,13 – 1,98 (m, 2H, H-pip3), 1,45 (s, 9H, 3 -CH₃), 1,43 – 1.33 (m, 2H, H-pip3). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, DMSO-*d*₆) δ/ppm 165,26, 159.93, 154,40 (CO/amida), 151,02 (CO/carbamato), 142,43 (C1''), 141,56 (C3''), 131,23 (C5''), 130.71 (C4''), 127.73 (C6''), 92,80 (C2''), 79,81 (C_{cuat}/carbamato), 48,50 (C-pip4), 43,67 (2C, C-pip2), 31,77 (2C, C-pip3), 28,40 (3C, -CH₃). FT-IR (KBr, cm⁻¹): 3287, 1635, 1526, 1266.

Ligandos Finales Serie I

***N*-(1-(9-hexil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9*H*-purin-2-il)piperidin-4-il) benzamida (9a)**

Rendimiento: 63 %, sólido blanco. RMN-¹H (400 MHz, 298 K, DMSO-*d*₆) δ/ppm 8,9 (m, 2H, H2'''), 8,15 (s, 1H, H8), 7,94 (d, *J*= 7,55 Hz, 1H, -NH), 7,84 – 7,80 (m, 3H, H3''', H4'''), 4,79 (m, 2H, H1'), 4,16 (m, 3H, H-pip4 y H-pip1), 3,3 (m, 2H, H-pip2), 1,93 (m, 4H, H-pip3), 1,66 (m, 2H, H2'), 1,33 (m, 6H, H3', H4' y H5'), 0,86 (m, 3H, -CH₃). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, DMSO-*d*₆) 165,36, 157,83, 154,40, 151,02, 149,54, 142,81, 134,94, 134,67, 130,65, 130,22, 127,47, 126,68, 123,55, 49,89, 46,68, 43,04, 42,15, 30,53, 30,00, 29,08, 28,01, 25,11, 21,17, 12.99. RMN-¹⁹F (400 MHz, 298 K, DMSO-*d*₆) δ/ppm -56,59. FT-IR (KBr, cm⁻¹): 3287, 1635, 1526, 1266.

***N*-(1-(9-hexil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9*H*-purin-2-il)piperidin-4-il)-2-metilbenzamida (9b)**

Rendimiento: 79 %; sólido; punto de fusión: 204,3 – 209,2° C, RMN-¹H (400 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 8,72 (d, *J*= 8,3 Hz, 2H, H2'''), 7,66 (s, 1H, H8), 7,24 (d, *J*= 8,6 Hz, 3H, H3''', H6''), 7,20 – 7,14 (m, 1H, H4''), 7,12 – 7,05 (m, 2H, H5'', H3''), 5,62 (d, *J*= 8.0 Hz, 1H, -NH), 4,79 (d, *J*= 13,5 Hz, 2H, H-pip1), 4,25 – 4,13 (m, 1H, H-pip4), 4,02 (t, *J*= 7,2 Hz, 2H, H1'), 3,12 (t, *J*= 12,5 Hz, 2H, H-pip2), 2,35 (s, 3H, -CH₃), 2,08 (d, *J*= 12,5 Hz, 2H, C-pip3), 1,78 (p, *J*= 7,0 Hz, 2H, H2'), 1,44 (qd, *J*= 11,9, 3,8 Hz, 2H, C-pip3), 1,23 (s, 6H, H3', H4' y H5'), 0.80 – 0.75 (m, 3H, H6'). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 169,66 (CO/amida), 158,75 (C2), 154.89 (C4), 153,17

(C6), 150,89 (C4'''), 141,81 (C8), 136,68 (C1''), 135,97 (C2''), 135,28 (C1'''), 131,28 (2C, C2'''), 131,13 (C3''), 129,99 (C4''), 126,70 (2C, C3'''), 125,89 (C5''), 124,53 (C5), 120,66 (C6''), 120,61 (d, $J = 257,6$ Hz, $-\underline{C}F_3$), 47,67 (C-pip4), 43,71 (2C, C-pip2), 43,35 (C1'), 32,18 (2C, C-pip3), 31,31 (C3'), 29,77 (C2'), 26,43 (C4'), 22,60 (C5'), 19,83 ($-\underline{C}H_3$), 14,11 (C6'). RMN- ^{19}F (376 MHz, 298 K, $CDCl_3$) δ/ppm -56,59, FT-IR (KBr, cm^{-1}): 3287, 1635, 1526, 1266. MS para ($C_{31}H_{35}F_3N_6O_2$) m/z (%) = 581.0 (M+1, 100)

2-Bromo-*N*-(1-(9-hexil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9*H*-purin-2-il)piperidin-4-il)benzamida (9c)

Rendimiento: 47 %, sólido, punto de fusión: 211 - 213° C, RMN- 1H (400 MHz, 298 K, DMSO- d_6) δ/ppm 8.89 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H2'''), 8.40 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, $-\underline{NH}$), 8.26 (s, 1H, H8), 7.63 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H6''), 7.55 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H3'''), 7.45 – 7.29 (m, 3H, H3'', H4'' y H5''), 4.83 – 4.66 (m, 2H, H1'), 4.13 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, H-pip), 3.26 – 3.17 (m, 2H, H2'), 2.0 – 1.92 (m, 2H, H-pip), 1.83 (p, $J = 6.9$ Hz, 2H, H-pip), 1.60 – 1.45 (m, 2H, H2'), 1.32 – 1.24 (m, 6H, H3', H4' y H5'), 0.83 (t, $J = 6.6$ Hz, 3H, H6'). ^{13}C NMR (101 MHz, 298 K, DMSO- d_6) 166,49 (CO), 157,91 (C2), 154,72 (C4), 151,14 (C6), 149,84 (C4'''), 143,63 (C8), 139,39 (C1''), 135,22 (C1'''), 132,56 (C3''), 131,13 (2C, C2'''), 130,66 (C5''), 128,66 (C4''), 127,51 (C6''), 123,72 (C5), 120,76 (2C, C3'''), 120,04 (d, $J_{C-F} = 256,28$ Hz, $-\underline{C}F_3$), 118,95 (C2''), 46,77 (C-pip4), 43,00 (C1'), 42,42 (2C, C-pip2), 30,88 (2C, C-pip3), 30,52 (C3'), 28,81 (C2'), 25,57 (C4'), 21,88 (C5'), 13,81 (C6'). RMN- ^{19}F (376 MHz, 298 K, DMSO- d_6) δ/ppm -56,59. FT-IR (KBr, cm^{-1}): 3265, 1636, 1527, 1259.

3-Cloro-*N*-(1-(9-hexanoil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9*H*-purin-2-il) piperidin-4-il) benzamida (9d)

Rendimiento: 77 %, sólido, punto de fusión: 208 - 209° C. RMN- 1H (400 MHz, 298 K, DMSO- d_6) δ/ppm 8,90 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, H2'''), 8,40 (d, $J = 7,85$ Hz, 1H, $-\underline{NH}$), 8,28 (s, 1H, H8), 7,89 (s, 1H, H2''), 7,81 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H, H4''), 7,60 – 7,53 (m, 3H, H6'' y H3'''), 7,49 (t, $J = 7,9$ Hz, 1H, H5''), 4,84 (d, $J = 13,2$ Hz, 2H, H-pip2), 4,14 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, H-pip4, H1'), 3,12 (t, $J = 12,5$ Hz, 2H, H-pip2), 1,95 – 1,89 (m, 2H, H-pip3), 1,86 – 1,79 (m, 2H, H-pip3), 1,58 (qd, $J = 12.2, 4.0$ Hz, 2H, H2'), 1,29 – 1,24

(m, 6H, H3', H4' y H5'), 0,84 (t, $J = 6,7$ Hz, 3H, H6'). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, DMSO-*d*₆) δ /ppm 164,05 (C=O/amida), 158,04 (C2), 154,73 (C4), 151,19 (C6''), 149,86 (C6), 149,69 (C4'''), 148,68 (C2''), 143,71 (C8), 136,60 (C4''), 135,22 (C1'''), 131,14 (2C, C2'''), 130,91 (C3''), 127,01 (C5), 123,80 (C5''), 120,79 (2C, C3'''), 120,06 (d, $J_{C-F} = 257,2$ Hz), 47,18 (C-pip4), 43,49 (2C, C-pip2), 42,44 (C1'), 30,95 (2C, C-pip3), 30,53 (C3') 28,86 (C2'), 25,58 (C4'), 21,89 (C5'), 13,81 (C6'). RMN-¹⁹F (376 MHz, 298 K DMSO-*d*₆) δ /ppm -56,58. FT-IR (KBr, cm⁻¹): 3294, 3078, 2924, 2854, 1635, 1527, 1373, 1303, 1265, 1080, 856. MS para (C₃₀H₃₂ClF₃N₆O₂) m/z (%) = 601.0 (M⁺, 100)

4-Ciano-*N*-(1-(9-hexil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9*H*-purin-2-il)piperidin-4-il)benzamida (9e)

Rendimiento: 75 %; sólido; punto de fusión: 262 - 263° C. RMN-¹H (400 MHz, 298 K, DMSO-*d*₆) δ /ppm 8,9 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, H2'''), 8,53 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H, -NH), 8,28 (s, 1H, H8), 8,00 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H, H2''), 7,94 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H, H3''), 7,55 (d, $J = 8,52$ Hz, 2H, H3'''), 4,87 – 4,79 (m, 2H, H-pip2), 4,14 (t, $J = 7,0$ Hz, 2H, H-pip4, H1'), 3,17 – 3,08 (m, 2H, H-pip2), 1,98 – 1,91 (m, 2H, H2'), 1,83 (p, $J = 6,9$ Hz, 2H, H-pip3), 1,59 (qd, $J = 12,3, 4,2$ Hz, 2H, H2') 1,29 – 1,24 (m, 6H, H3', H4' y H5'), 0,83 (t, $J = 6,4$ Hz, 3H, H6'). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, DMSO-*d*₆) 164,60 (CO), 158,50 (C2), 155,20 (C4), 151,66 (C6), 150,33 (C4''') 144,18 (C8), 139,08 (C1''), 135,69 (C1'''), 132,80 (2C, C3''), 131,61 (2C, C2'''), 128,60 (C2'') 124,26 (C5), 121,26 (2C, C3'''), 118,81 (-CN), 113,95 (C4''), 47,76 (C-pip4), 43,91 (C1'), 42,92 (2C, C-pip2), 31,39 (2C, C-pip3), 31,00 (C3'), 29,30 (C2'), 26,05 (C4'), 22,36 (C5'), 14,29 (C6'). RMN-¹⁹F (376 MHz, 298 K, DMSO-*d*₆) δ /ppm -56,60. FT-IR (KBr, cm⁻¹): 3311, 2231, 1634, 1527, 1257.

3-Fluoro-*N*-(1-(9-hexil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9*H*-purin-2-il)piperidin-4-il)-4-metoxibenzamida (9f)

Rendimiento: 71 %, sólido verde claro, punto de fusión: 205 – 208° C. RMN-¹H (400 MHz, 298 K, DMSO-*d*₆) δ /ppm 8,90 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H, H2'''), 8,28 (s, 1H, H8), 8,19 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H, -NH) 7,71 (d, $J = 8,48$ Hz, 2H, H2'', H6''), 7,56 (t, $J = 8,3$ Hz, 1H, H3'''), 7,22 (st, $J = 8,5$ Hz, 1H, H5''), 4,84 (d, $J = 13,0$ Hz, 2H, H-pip2), 4,19 – 4,08 (m, 3H, H-pip4, H1'), 3,88 (s, 3H, -CH₃) 3,13 (t, $J = 12,6$ Hz, 2H, H-pip2), 1,97 – 1,79 (m,

4H, H-pip3, H2'), 1,64 – 1,51 (m, 2H, H-pip3), 1,3 – 1,24 (m, 6H, H3', H4' y H5'), 0,86 – 0,80 (m, 3H, H6'). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, DMSO-*d*6) 164,33 (CO), 158,53 (C2), 155,22 (C4), 151,67 (C4''), 151,20 (d, *J*= 257,88 Hz, C3''), 150,34 (C4''') 144,19 (C8), 135,70 (C1'''), 131,62 (2C, C2'''), 124,82 (C6''), 124,26 (C5), 121,28 (2C, C3'''), 119,27 (d, *J*_{C-F}= 260 Hz, -CF₃), 115,31 (C2''), 113,55 (C5''), 56,62 (-OCH₃), 47,54 (C-pip4), 44,02 (C1'), 42,92 (2C, C-pip2), 31,54 (2C, C-pip3), 31,00 (C3'), 29,30 (C2'), 26,05 (C4'), 22,36 (C5'), 14,29 (C6'). RMN-¹⁹F (376 MHz, 298 K, DMSO-*d*6) δ/ppm -56,59, -135,48. FT-IR (KBr, cm⁻¹): 3292, 1631, 1512, 1265, 1215, 1164. MS para (C₃₁H₃₄F₄N₆O₃) m/z (%)= 615,5 (M⁺1, 100)

***N*-(1-(9-hexil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9*H*-purin-2-il)piperidin-4-il)-3,5-dimetilbenzamida (9g)**

Rendimiento: 66 %; sólido; punto de fusión: 202 - 204° C, RMN-¹H (400 MHz, 298 K, DMSO-*d*6) δ/ppm 8.9 (d, *J*= 8.6 Hz, 2H, H2'''), 8.28 (s, 1H, H8), 8.16 (d, *J*= 7.9 Hz, 1H, -NH), 7.56 (d, *J*= 8.5 Hz, 1H, H3'''), 7.44 (s, 2H, H2''), 7.12 (s, 1H, H4''), 4.84 (d, *J*= 12.71 Hz, 2H, H1'), 4.14 (t, *J*= 6.79 Hz, 3H, H-pip4,, H-pip2), 3.11 (t, *J*= 12,6 Hz, 2H, H-pip2), 2.29 (s, 6H, 2 -CH₃), 1.95 – 1,87(m, 2H, H-pip3), 1,87 – 1,80 (m, 2H, H2') 1,65 – 1,51 (m, 2H, H-pip3), 1.31 – 1.24 (m, 6H, H3', H4' y H5'), 0,83 (t, *J*= 6,7 Hz, 3H, H6'). ¹³C NMR (101 MHz, 298 K, DMSO-*d*6) 166,19 (CO), 158,52 (C2), 155,20 (C4), 151,65 (C6), 150,32 (C4'''), 144,16 (C8), 137,70 (C3'''), 135,70 (C1'''), 135,17 (C1'''), 132,71 (C4'') 131,61 (2 C, C2'''), 125,45 (C2''), 124,25 (C), 121,26 (2C, C3'''), 120,53 (d, *J*_{C-F}= 257,0 Hz, -CF₃) 47.38 (C-pip4), 44.04 (C1'), 42.92 (2C, H-pip2), 31.55 (2C, C-pip3), 31.06 (C3'), 29.31 (C2'), 26.06 (C4'), 22.37 (C5'), 21,27 (2C, -CH₃), 14.30 (C6'). RMN-¹⁹F (376 MHz, 298 K, DMSO-*d*6) δ/ppm -56,59. FT-IR (KBr, cm⁻¹): 3282, 1633, 1526, 1261. MS para (C₃₂H₃₇F₃N₆O₂) m/z (%)= 595,3 (M⁺1, 100)

***N*-(1-(9-hexil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9*H*-purin-2-il)piperidin-4-il)-3,5-dinitrobenzamida (9h)**

Rendimiento: 92 %; sólido; punto de fusión: 268 - 270° C, RMN-¹H (400 MHz, 298 K, DMSO-*d*6) δ/ppm 9,05 (s, 2H, H6''), 8,99 (d, *J*= 7,7 Hz, 1H, H2''), 8,91 (d, *J*= 6,28 Hz, 2H, H2'''), 8,88 (s, 1H, -NH), 8,28 (s, 1H, H8), 7,55 (d, *J*= 8,25 Hz, 2H, H3'''), 4,85 (d, *J*= 13,0 Hz, 2H, H-pip2), 4,27 – 4,18 (m, 1H, H-pip4), 4,14 (m, 2H, H1'), 3,15

(t, $J = 12,5$ Hz, 2H, H-pip2), 1,99 (m, 2H, H-pip3), 1,84 (m, 2H, H2'), 1,63 (m, 2H, H-pip3), 1,28 (m, 6H, H3', H4' y H5'), 0,83 (t, $J = 13,43, 6,99$ Hz, 3H, -CH₃). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, DMSO-*d*₆) 161,23 (CO), 158,01 (C2), 154,70 (C4), 151,17 (C6), 149,85 (C4'''), 148,09 (C3''), 143,73 (C8), 137,02 (C1''), 135,17 (C1'''), 131,11 (2C, C2'''), 127,49 (C2''), 123,82 (C5), 120,76 (C4''), 120,71 (2C, C3'''), 120,04 (d, $J = 256,8$ Hz, -CF₃), 99,51, 47,75 (C-pip4), 43,50 (C1'), 42,45 (2C, C-pip2), 30,78 (2C, C-pip3), 30,53 (C3'), 28,82 (C2'), 25,58 (C4'), 21,89 (C5'), 13,81 (C6'). RMN,¹⁹F (376 MHz, 298 K, DMSO-*d*₆) δ /ppm -56,59, FT-IR (KBr, cm⁻¹): 3267, 1647, 1542, 1341, 1262.

3-Cloro-5-fluoro-*N*-(1-(9-hexil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9*H*-purin-2-il) piperidin-4-il)benzamida (9i)

Rendimiento: 56 %, sólido, punto de fusión: 216-217° C, RMN-¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ /ppm 8,90 (d, $J = 8,78$, 2H, H2'''), 8,46 (d, $J = 7,61$, 1H, -NH), 8,28 (s, 1H, H8), 7,78 (s, 1H, H2''), 7,68 – 7,51 (m, 4H, H4'', H6'', H3'''), 4,83 (d, $J = 12,95$, 2H, H-pip2), 4,14 (t, $J = 13,44, 6,69$ Hz, 3H, H-pip4, H1'), 3,12 (t, $J = 24,27, 12,29$ Hz, 2H, H-pip2), 2,01 – 1,78 (m, 4H, H-pip3, H2'), 1,69 – 1,46 (m, 2H, H-pip3), 1,32 – 1,23 (m, 6H, H3', H4' y H5'), 0,87 – 0,78 (m, 3H, H6'). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, DMSO-*d*₆) 161,91 (C5''), 158,01 (C2), 154,69 (C4), 151,16 (C6), 149,80 (C4'''), 143,68 (C8), 138,09 (C1'') 135,18 (C1'''), 134,06 (C3''), 131,10 (2C, C2'''), 123,77 (C5), 123,52 (C2''), 120,75 (2C, C3'''), 120,02 (d, $J = 236,3$ Hz), 118,77 (C6'') 113,30 (C4''), 47,31 (C-pip4), 43,41 (2C, C-pip2), 42,41 (C1'), 30,81 (2C, C-pip3), 30,49 (C3'), 28,79 (C2'), 25,54 (C4'), 21,85 (C5'), 13,77 (C6'). RMN-¹⁹F (376 MHz, 298 K, DMSO-*d*₆) δ /ppm -56,56, -110,18. FT-IR (KBr, cm⁻¹): 3259, 1637, 1526, 1272. MS para (C₃₀H₃₁ClF₄N₆O₂) m/z (%) = 619,1 (M⁺1, 100)

2,4,6-Tricloro-*N*-(1-(9-hexil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9*H*-purin-2-il) piperidin-4-il)benzamida (9j)

Rendimiento: 73 %, sólido, punto de fusión: 239 - 241° C, RMN-¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ /ppm 8,89 (d, $J = 8,85$ Hz, 2H, H2'''), 8,69 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H, -NH), 8,27 (s, 1H, H8), 7,73 (s, 2H, H3'''), 7,55 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, H3'''), 4,68 (d, $J = 13,33$ Hz, 2H, H-pip2), 4,12 (m, 3H, H-pip4, H1'), 3,26 (m, 2H, H-pip2), 2,02 -1,93 (m, 2H, H-pip3), 1,83 (m, 2H, H2'), 1,51 (m, 2H, H-pip3), 1,26 (m, 7H, H3', H4' y H5'), 0,83 (t,

$J = 13,64, 6,87$ Hz, 3H, H6'). RMN- ^{13}C (101 MHz, 298 K, DMSO- d_6) 162,47 (CO), 158,37 (C2), 155,20 (C4), 151,64 (C6), 150,33 (C4'''), 144,15 (C8), 136,12 (C4''), 135,68 (C1'''), 134,67 (C2''), 132,52 (C1''), 131,62 (2C, C2'''), 128,36 (C3'') 124,23 (C5), 121,26 (2C, C3'''), 47,20 (C-pip4), 43,28 (C1'), 42,91 (2C, C-pip2), 31,17 (2C, C-pip3), 30,99 (C3'), 29,29 (C2'), 26,04 (C4'), 22,36 (C5'), 14,29 (C6'). RMN- ^{19}F (376 MHz, 298 K, DMSO- d_6) δ/ppm -56,59. FT-IR (KBr, cm^{-1}): 3261, 1650, 1527, 1261.

***N*-(1-(9-hexil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9*H*-purin-2-il)piperidin-4-il)-1-naftamida (9k)**

Rendimiento: 60 %; sólido; punto de fusión: 226,3 – 230,1 °C, RMN- ^1H (400 MHz, 298 K, CDCl_3) δ/ppm 8,80 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, H2'''), 8,30 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, H8''), 7,89 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, H4''), 7,85 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H, H5'') 7,77 (s, 1H, H8) 7,59 – 7,49 (m, 3H, H2'', H7'' y H6''), 7,46 – 7,39 (m, 1H, H3''), 7,36 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, H3'''), 6,01 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H, -NH), 4,93 (d, $J = 13,4$ Hz, 2H, H-pip2), 4,47 – 4,34 (m, 1H, H-pip4), 4,12 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H, H1'), 3,25 (t, $J = 11,6$ Hz, 2H, H-pip2), 2,25 (d, $J = 10,0$ Hz, 2H, H-pip3), 1,94 – 1,83 (m, 2H, H2'), 1,64 – 1,53 (m, 2H, H-pip3), 1,36 – 1,30 (m, 6H, H3' H4' y H5'), 0,89 (t, $J = 6,8$ Hz, 3H, H6'). RMN- ^{13}C (101 MHz, 298 K, CDCl_3) δ/ppm 169,12 (CO amida), 158,74, 154,87, 153,16, 150,91, 141,79 (C8), 135,72, 134,72, 133,80, 131,29 (C2'''), 130,67, 130,19, 128,48, 127,25, 126,56, 125,35, 124,94, 124,83, 120,61 (d, $J_{\text{C-F}} = 257,6$ Hz, -CF₃), 120,67 (C3'''), 47,92 (C-pip-4), 43,72 (2 C-pip2), 43,34 (C1'), 32,18 (2 C-pip3), 31,80 (C3''), 29,75 (C2'), 26,42 (C4'), 22,59 (C5'), 14,10 (C6'), RMN- ^{19}F (376 MHz, 298 K, CDCl_3) δ/ppm -57,58. IRFT (KBr, cm^{-1}): 3271, 3078, 2931, 2854, 1527, 1327, 1219, 856, 786, 632.

***N*-(1-(9-hexil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9*H*-purin-2-il)piperidin-4-il)-2-naftamida (9l)**

Rendimiento: 87 %; sólido; punto de fusión: 205 – 207° C, RMN- ^1H (400 MHz, 298 K, DMSO- d_6) δ/ppm 8,91 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, H2'''), 8,46 (sd, $J = 7,3$ Hz, 2H, H1'' y H3''), 8,29 (s, 1H, H8), 8,03 – 7,92 (m, 4H, -NH, H4'' y H3'''), 7,63 – 7,54 (m, 4H, H5'', H6'', H7'' y H8''), 4,87 (d, $J = 13$ Hz, 2H, H1'), 4,27 – 4,19 (m, 1H, H-pip), 4,15 (t, $J = 7,0$ Hz, 2H, H-pip), 3,15 (t, $J = 12,6$ Hz, 2H, H-pip), 2,04 – 1,94 (m, 2H, H-pip), 1,85 (p, $J = 6,9$ Hz, 2H, H-pip), 1,65 (qd, $J = 12,3, 4,0$ Hz, 2H, H2'), 1,31 – 1,24 (m, 6H, H3', H4' y H5'), 0,83 (t, $J = 6,7$ Hz, 3H, -CH₃). RMN- ^{13}C (101 MHz, 298 K, DMSO-

d6) δ /ppm 159,57, 158,07, 154,74, 151,19, 149,86, 143,71, 135,23, 134,05, 132,10, 132,10, 131,99, 131,14, 128,75, 127,72, 127,56, 127,37, 126,65, 124,28, 123,79, 120,80, 99,50, 99,50, 47,12, 43,57, 42,45, 31,11, 30,53, 28,83, 25,58, 21,89, 13,83. RMN-¹⁹F (376 MHz, 298 K, DMSO-d6) δ /ppm -56,56. IRFT (KBr, cm⁻¹): 3280, 1638, 1528, 1234.

6-Cloro-N-(1-(9-hexil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9H-purin-2-il)piperidin-4-il)nicotinamida (9m)

Rendimiento: 61 %; sólido; punto de fusión: 254,4 - 258,2° C, RMN-¹H (400 MHz, 298 K, DMSO-d6) δ /ppm 8,9 (d, J = 8,7 Hz, 2H, H2'''), 8,83 (s, 1H, H2''), 8,42 (d, J = 7,4 Hz, 1H, -NH), 8,25 – 8,21 (m, 2H, H8, H6''), 7,59 (d, J = 8,3 Hz, 1H, H5''), 7,53 (d, J = 8,4 Hz, 2H, H3'''), 4,81 (d, J = 13,3 Hz, 2H, H-pip2), 4,15 (t, J = 7,0 Hz, 3H, H-pip4 y H1'), 1,98 (d, J = 12,8 Hz, 2H, H-pip3), 1,90 – 1,81 (m, 2H, H2'), 1,62 (qd, J = 12,0, 4,1 Hz, 2H, H-pip3), 1,34 – 1,28 (m, 6H, H3', H4', H5'), 1,84 (t, J = 6,7 Hz, 3H, H6'). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, CDCl₃) 162,8 (C=O), 157,90 (C2), 154,55 (C4), 152,17 (C4''), 151,09 (C6), 149,69 (C4'''), 148,68 (C2''), 143,29 (C8), 138,27 (C6''), 135,05 (C1'''), 130,89 (C2'''), 129,39 (C1''), 123,68 (C5), 123,64 (C5''), , 120,33 (C3'''), 119,84 (d, J = 257,1 Hz, -CF₃) 47,03 (C-pip4), 43,7 (C1'), 42,29 (2C, C-pip2), 30,65 (2C, C-pip3), 30,26 (C3'), 28,56 (C2'), 25,33 (C4'), 21,53 (C5'), 13,41 (C6'). RMN-¹⁹F (376 MHz, 298 K, CDCl₃) δ /ppm -56,60. FT-IR (KBr, cm⁻¹): 3294, 3078, 2924, 2854, 2368, 1635, 1465, 1373, 1265, 840, 732.

N-(1-(9-hexil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9H-purin-2-il)piperidin-4-il)-3-metiltiofeno-2-carboxamida (9n)

Rendimiento: 93 %; sólido; punto de fusión: 185,2 – 188,1° C. RMN-¹H (400 MHz, 298 K, DMSO-d6) δ /ppm 8,72 (d, J = 8,7 Hz, 2H, H2'''), 7,70 (s, 1H, H8), 7,28 (d, J = 8,4 Hz, 2H, H3'''), 7,17 (d, J = 5,0, 1H, H5''), 6,80 (d, J = 5,0 Hz, 1H, H4''), 5,66 (d, J = 7,7 Hz, 1H, -NH), 4,81 (d, J = 13,15 Hz, 2H, H-pip2), 4,25 - 4,15 (m, 1H, H-pip4), 4,05 (t, J = 11,7 Hz, 2H, H1'), 3,15 (t, J = 11,7 Hz, 2H, H-pip2), 2,44 (s, 3H, -CH₃), 2,09 (d, J = 10,2 Hz, 2H, H-pip3), 1,85 - 1,77 (m, 2H, H2'), 1,53 - 1,44 (m, 2H, H-pip3), 1,30 - 1,23 (m, 6H, H3', H4' y H5'), 0,81 (t, J = 13,43, 6,99 Hz, 3H, H6'). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, DMSO-d6) δ /ppm 162,57 (C=O), 158,74 (C2), 154,03 (C4), 153,16 (C6), 150,89 (C4'''), J_{C-F} = 1,5 Hz), 141,80 (C8), 135,29 (C1'''), 132,15 (C4''),

131,28 (C3''), 131,15 (C2'''), 126,44 (C5''), 124,55 (C5), 120,66 (C3'''), 120,60 (d, $J_{C-F} = 257,6$ Hz, CF₃), 47,78 (C-pip4), 43,71 (C-pip2), 43,33 (C1'), 32,21 (C-pip3), 31,29 (C3'), 29,76 (C2'), 26,42 (C4'), 22,58 (C5'), 14,09 (C6'). RMN-¹⁹F (376 MHz, 298 K DMSO-*d*₆) δ/ppm -57,58. FT-IR (KBr, cm⁻¹): 3271, 3086, 3008, 2931, 2854, 1627, 1327, 1273, 1157, 856, 717. MS para (C₂₉H₃₃F₃N₆O₂S) m/z (%)= 587,4 (M⁺, 100)

3-(2-clorofenil)-N-(1-(9-hexil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9H-purin-2-il)piperidin-4-il)-5-metilisoxazol-4-carboxamida (9o)

Rendimiento: 65 %; sólido; punto de fusión: 175,0 – 176,6 °C, RMN-¹H (400 MHz, 298K, CDCl₃) δ/ppm 8,68 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, H2'''), 7,70 (s, 1H, H8), 7,47-7,31 (m, 4H, H-arom), 7,27 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, H3'''), 5,09 (d, $J = 7,7$, Hz, 1H, -NH), 4,38 (d, $J = 13,7$ Hz, 2H, H-pip2), 4,03 (t, $J = 7,0$ Hz, 3H, H-pip4, H1'), 3,17 (t, $J = 11,0$ Hz, 2H, H-pip2), 2,72 (s, 3H, -CH₃), 1,81 (dd, $J = 18,1, 10,2$ Hz, 4H, Hpip3, H2'), 1,29-1,22 (m, 6H, H3', H4', H5'), 1,07 (td, $J = 13,7, 3,8$ Hz, 2H, H-pip3), 0,81 (t, $J = 6,7$ Hz, 3H, H6'). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, DMSO-*d*₆) δ/ppm 174,35 (C5''), 160,40 (CO), 158,50 (C3''), 158,09 (C2), 154,68 (C4), 152,99 (C6), 150,81 (C4'''), 141,67 (C8), 135,06 (C1'''), 134,19 (C arom), 132,03 (C arom), 131,59 (C arom), 131,13 (2C, C2'''), 130,28 (C arom), 127,90 (C arom), 127,59 (C arom), 124,30 (C5), 120,55 (2C, C3'''), 120,48 (d, $J = 257,6$ Hz, -CF₃) 111,84 (C1''), 46,49 (C-pip4), 43,20 (C1'), 42,83 (2C, Hpip2), 31,44 (3C, H-pip3, C3'), 31,16 (C2'), 26,27 (C4'), 22,45 (H5'), 13,97 (-CH₃), 13,03 (H6'). IR-FT (KBr, cm⁻¹): 3271, 3078, 2931, 2854, 1643, 1450, 1157, 918, 12, 740, 632.

N-(1-(9-hexil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9H-purin-2-il)piperidin-4-il)-5H-dibenzo[*b,f*]azepin-5-carboxamida (9p)

Rendimiento: 84 %; sólido; punto de fusión: 214,5 – 217,8 °C, RMN-¹H (400 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 8,85 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H, H2'''), 8,23 (s, 1H, H8), 7,53 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H, H3'''), 7,44-7,38 (m, 6H, H3'', H4'', H6''), 7,34-7,27 (m, 2H, H5''), 6,96 (s, 2H, H8''), 5,16 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H, -NH), 4,64 (d, $J = 12,9$, 2H, H-pip2), 4,09 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H, H1'), 3,80-3,69 (m, 1H, H-pip4), 3,01 (t, $J = 12,2$ Hz, 2H, H-pip2), 1,84-1,75 (m, 2H, H-pip3), 1,69 (d, $J = 10,9$ Hz, 2H, H2'), 1,40-1,28 (m, 2H, Hpip3), 1,27-1,21 (m, 6H, H3', H4', H5'), 0,82 (t, $J = 6,73$, 3H, H6'). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, CDCl₃)

δ /ppm 157,88 (C3), 154,86 (CO), 154,70 (C5), 151,14 (C1), 149,80 (C4'''), 143,55 (C8), 140,26 (2C, C2''), 135,22 (C1'''), 134,91 (2C, C7''), 131,08 (2C, C2''), 130,26 (2C, C8''), 129,22 (2C, C3''), 129,12 (2C, C6'', C4''), 127,14 (2C, C5''), 123,70 (C6), 120,74 (2C, C3'''), 120,05 (d, J = 256,8 Hz), 47,94 (C-pip4), 43,52 (2C, C-pip2), 42,38 (C1'), 31,19 (2C, C-pip3), 30,50 (C3'), 28,79 (C2'), 25,55 (C4'), 21,86 (C5'), 13,81 (C6'). RMN-¹⁹F (376 MHz, 298 K, DMSO-*d*₆) δ /ppm -56,60. IR-FT (KBr, cm⁻¹): 3278, 2924, 2376, 1735, 1373, 1165, 856, 632. MS para (C₃₈H₃₈F₃N₇O₂) m/z (%) = 682.0 (M⁺1, 100)

***N*-(1-(9-hexil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9*H*-purin-2-il)piperidin-4-il)-2-iodobenzamida (9q)**

Rendimiento: 79 %; sólido; punto de fusión: 219 – 221 °C, RMN-¹H (400 MHz, 298 K, DMSO-*d*₆) δ /ppm 8,89 (d, J = 8,5 Hz, 2H, H2'''), 8,35 (d, J = 7,8 Hz, -NH), 8,26 (s, 1H, H8), 7,86 (d, J = 7.8 Hz, 1H, H3''), 7,55 (d, J = 8,4 Hz, 2H, H3'''), 7,42 (t, J = 7.5 Hz, 1H, H5''), 7,31 (d, J = 7.5 Hz, 1H, H6''), 7,15 (t, J = 7.7 Hz, 1H, H4''), 4,76 (d, J = 13,5 Hz, 2H, H1'), 4,13 (t, J = 7.0 Hz, 2H, H-pip), 4,09 – 4,03 (m, 1H, H-pip), 3,22 (t, J = 11,8 Hz, 2H, H-pip), 1,98 (m, 2H, H-pip), 1,82 (q, J = 6,9 Hz, 2H, H-pip), 1,54 (qd, J = 11,9, 4,1 Hz, 2H, H2'), 1,27 (m, 6H, H3', H4' y H5'), 0,83 (t, J = 13,43, 6,99 Hz, 3H, CH₃). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, DMSO-*d*₆) 168,75, 158,38, 155,21, 151,63, 150,33, 144,12, 143,78, 138,38, 135,71, 131,62, 131,03 (2C), 128,45, 128,31 (2C) 124,20, 121,81, 121,26 (2C), 119,25, 94,07, 47,24, 43,49, 42,91, 31,38, 31,01, 29,30, 26,06, 22,38, 14,32. RMN-¹⁹F (376 MHz, 298 K, DMSO-*d*₆) δ /ppm -56,58. IRFT (KBr, cm⁻¹): 3262, 1633, 1527, 1259.

***N*-(1-(9-metilciclopropil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9*H*-purin-2-il)piperidin-4-il)benzamida (10a)**

Rendimiento: 70 %; sólido; punto de fusión: 210-212 °C, RMN-¹H (400 MHz, 298 K, DMSO-*d*₆) δ /ppm 8,86 (d, J = 8,0 Hz, 2H, H2'''), 8,21 (s, 1H, H8), 7,94 (d, J = 7,55 Hz, 1H, -NH) δ 7,84-7,80 (m, 5H, H2'' H3'', H4''), 7,37 (d, J = 8,3 Hz, 2H, H3'''), 4,79 (m, 2H, H1'), 4,16 (m, 3H, H-pip), 4,12 (d, J = 7,2 Hz, 2H, H1'), 3,3 (m, 2H, H-pip), 1,93 (m, 4H, H-pip), 1,42 – 1,29 (m, 1H, H2'), 0,72 (d, J = 7,0 Hz, 2H, H3' y H4'), 0,49 (d, J = 4,0 Hz, 2H, H3' y H4'). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, DMSO-*d*₆) RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, DMSO-*d*₆) δ /ppm 165,36, 157,83, 154,93, 154,48, 151,74, 144,91,

133,17, 130,65, 130,22, 121,68, 119,55, 120,77, 48,93 (C1'), 47,03 (C-pip4), 47,78 (C-pip2), 32,20 (C-pip3) 11,05 (C2'), 4,56 (2C, C3', C4'). RMN-¹⁹F (376 MHz, 298 K, DMSO-*d*₆) δ/ppm -56,59. IR-FT (KBr, cm⁻¹): 3278, 2931, 2854, 2376, 1635, 1527, 1265, 1165, 856, 725, 632.

***N*-(1-(9-metilciclopropil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9*H*-purin-2-il)piperidin-4-il)-2-metilbenzamida (10b)**

Rendimiento: 67 %; sólido; punto de fusión: 204,3 – 209,2 °C, RMN-¹H (400 MHz, 298 K, DMSO-*d*₆) δ/ppm 8,88 (d, *J*= 8.8 Hz, 2H, H2'''), 8,29 (s, 1H, H8), 8,18 (d, *J*= 7,9 Hz, 1H, -NH), 7,54 (d, *J*= 8.4 Hz, 2H, H3'''), 7,32 – 7,25 (m, 2H, H6'', H3''), 7,23 – 7,17 (m, 2H, H4'', H5''), 4,78 (m, 2H, H-pip2), 4,15 – 4,03 (m, 1H, H-pip4), 3,99 (d, *J*= 7,3 Hz, 2H, H1'), 3,21 – 3,11 (m, 2H, H-pip2), 2,32 (s, 3H, -CH₃), 1,98 – 1,90 (m, 2H, H-pip3), 1,51 (qd, *J*=12,0, 4,1 Hz, 2H, H-pip3), 1,34 – 1,26 (m, 1H, H2'), 0,56 – 0,51 (m, H3', H4'), 0,49 – 0,45 (H3', H4'). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, DMSO-*d*₆) δ/ppm 168,39 (-CO), 157,99 (C2), 154,65 (C4), 151,22 (C6), 149,86 (C4'''), 143,42 (C8), 137,53 (C1''), 135,25 (C1'''), 134,87 (C2''), 131,15 (2C, C2'''), 130,27, 129,04, 126,94, 125,42, 123,75 (C5), 120,80 (2C, C3'''), 120,08 (d, *J*= 256,8 Hz, -CF₃), 47,15 (C1'), 46,64 (C-pip4), 43,24 (2C, C-pip2), 31,09 (2C, C-pip3), 19,23 (-CH₃), 11,15 (C2'), 3,82 (2C, C3', C4'). RMN-¹⁹F (376 MHz, 298 K, DMSO-*d*₆) δ/ppm -56,59. IR-FT (KBr, cm⁻¹): 3278, 2931, 2854, 2376, 1635, 1527, 1265, 1165, 856, 725, 632. MS para (C₃₉H₂₉F₃N₆O₂) *m/z* (%)= 551,2 (M⁺1, 100)

2-Bromo-*N*-(1-(9-metilciclopropil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9*H*-purin-2-il)piperidin-4-il)benzamida (10c)

Rendimiento: 89 %, sólido, punto de fusión: 229,1 – 231,1 °C. RMN-¹H (400 MHz, 298 K, DMSO-*d*₆) δ/ppm 8,89 (d, *J*= 8,52 Hz, 2H, H2''), 8,40 (d, *J*= 7,84 Hz, 1H, -NH), 8,26 (s, 1H, H8), 7,63 (d, *J*= 7,95 Hz, 1H, H6), 7,55 (d, *J*= 8,51 Hz, 2H, H3''), 4,75 (d, *J*= 13 Hz, 2H, H1'), 4,12 (m, 3H, H-pipe), 3,21 (t, *J*= 23,96, 11,98 Hz, 2H, H2'), 1,97 (m, 2H, H-pipe), 1,83 (m, 2H, H-pipe), 1,53 (m, 2H, H2'), 1,27 (m, 6H, H3', H4' y H5'), 0,83 (m, 3H, CH₃). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, DMSO-*d*₆) δ/ppm 166,97, 158,39, 155,20, 151,62, 150,32, 144,11, 139,87, 135,70, 133,04, 131,61, 131,14, 129,14, 127,99, 124,21, 121,25, 119,43, 48,93 (C1'), 47,03 (C-pip4), 47,78 (C-pip2),

32,20 (C-pip3) 11,05, 4,56. IRFT (KBr, cm^{-1}): 3286, 3062, 3001, 2939, 1643, 1612, 1334, 1096, 864, 794, 632.

3-Cloro-N-(1-(9-metilciclopropil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9H-purin-2-il) piperidin-4-il) benzamida (10d)

Rendimiento: 80 %, sólido, punto de fusión: °C, RMN- ^1H (400 MHz, 298 K, DMSO- d_6) δ /ppm 8,79 (d, $J= 8,6$ Hz, 2H, H2'''), 7,88 (s, 1H, H8), 7,74 (s, 1H, H2''), 7,62 (d, $J= 7,7$ Hz, 1H, H4''), 7,45 (d, $J= 8,0$ Hz, 1H, H6'), 7,37-7,32 (m, 3H, H3''', H5''), 6,09 (d, $J= 7,8$ Hz, 1H, -NH), 4,92 (dt, $J= 13,5, 3,7$ Hz, 2H, Hpip2), 4,35-4,23 (m, 1H, Hpip4), 3,97 (d, $J= 7,1$ Hz, 2H, H1'), 3,23 – 3,13 (m, 2H, H-pip2), 2,16 (dd, $J= 13,0, 3,8$ Hz, 2H, H-pip3), 1,56 (qd, $J= 119, 4,1$ Hz, 2H, H-pip3), 1,36-1,24 (m, 2H, H2'), 0,70 – 0,63 (m, 2H, H3', H4'), 0,49 – 0,44 (m, 2H, H3', H4'). RMN- ^{13}C (101 MHz, 298 K, DMSO- d_6) δ /ppm 165,69 (-CO), 158,77 (C2), 154,86 (C4), 153,16 (C4'''), 150,91 (C6), 141,51 (C8), 136,60 (C1''), 135,28 (C1'''), 134,89 (C3''), 131,63 (C6''), 131,30 (2C, C2'''), 130,03 (C5''), 127,38 (C2''), 125,12 (C4''), 124,59 (C5), 120,67 ("C, C3''') 120,61 (d, $J_{\text{C-F}}= 257,6$ Hz, -CF $_3$), 48,09 (C1'), 47,10 (C-pip4) 43,78 (2C, C-pip2), 32,20 (C-pip3) 11,05 (C2'), 4,56 (2C, C3', C4'). RMN- ^{19}F (376 MHz, 298 K, DMSO- d_6) RMN- ^{13}C (101 MHz, 298 K, DMSO- d_6) δ /ppm -57,58. IR-FT (KBr, cm^{-1}): 3295, 3078, 3001, 2939, 2854, 1527, 1458, 1157, 918, 794, 632. MS para (C $_{28}$ H $_{26}$ ClF $_3$ N $_6$ O $_2$) m/z (%)= 571.0 (M $^{+1}$, 100)

4-Ciano-N-(1-(9-metilciclopropil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9H-purin-2-il) piperidin-4-il) benzamida (10e)

Rendimiento: 65 %; sólido; punto de fusión: 293,5 – 296,3 °C, RMN- ^1H (400 MHz, 298 K, DMSO- d_6) δ /ppm 8,89 (d, $J= 8,85$ Hz, 2H, H2''), 8,53 (d, $J= 7,92$ Hz, 1H, -NH), 8,28 (s, 1H, H8), 8,00 (d, $J= 8,33$ Hz, 2H, H2), 7,94 (d, $J= 8,31$ Hz, 2H, H3), 7,55 (d, $J= 8,52$ Hz, 2H, H3''), 4,83 (d, $J= 13,23$ Hz, 2H, H1'), 4,16 (m, 3H, H-pipe), 3,40 (m, 2H, H-pipe), 3,13 (t, $J= 25,26, 12,83$ Hz, 2H, H-pipe), 1,94 (m, 2H, H-pipe), 1,83 (m, 2H, H2'), 1,26 (m, 6H, H3', H4' y H5'), 0,83 (t, $J= 13,64, 6,87$ Hz, 3H, CH $_3$). RMN- ^{13}C (101 MHz, 298 K, DMSO- d_6) δ /ppm 165,15 (CO), 158,69 (C2), 155,68 (C4), 150,89 (C6), 143,89 (C8), 135,30 (C1'''), 134,68 (C1''), 132,68 (2C, C3''), 129,09 (2C, C2''') 125,84 (C5), 121,72 (2C, C3'''), 118,00 (-CN), 113,34 (C4''), 48,93 (C1'), 47,03 (Cpip4), 47,78 (2C, C-pip2), 32,20 (2C, C-pip3) 11,05 (C2'), 4,56 (2C,

H3', H4'). RMN-¹⁹F (376 MHz, 298 K, DMSO-*d*₆) δ/ppm -56,66. IRFT (KBr, cm⁻¹): 3309, 2229, 1527, 1381, 1334, 1257, 856, 632.

3-Fluoro-*N*-(1-(9-metilciclopropil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9*H*-purin-2-il)piperidin-4-il)-4-metoxibenzamida (10f)

Rendimiento: 81 %; sólido; punto de fusión: 220 - 224 °C, RMN-¹H (400 MHz, 298 K, DMSO-*d*₆) δ/ppm 8,90 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H, H2'''), 8,32 (s, 1H, H8), 8,19 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H, -NH), 7,74 – 7,68 (m, 2H, H2'', H6''), 7,56 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H, H3'''), 7,22 (t, *J* = 8,5 Hz, 1H, H5''), 4,85 (d, *J* = 13,0 Hz, 2H, H-pip2), 4,17 – 4,09 (m, 1H, H-pip4), 4,01 (d, *J* = 7,1 Hz, 2H, H1'), 3,88 (s, 3H, -CH₃), 3,17 – 3,06 (m, 2H, H-pip2), 1,92 (dd, *J* = 13,0, 3,8 Hz, 2H, H-pip3), 1,58 (qd, *J* = 12,4, 4,2 Hz, 2H, H-pip3), 1,34 – 1,29 (m, 1H, H2'), 0,58 – 0,51 (m, 2H, H3', H4'), 0,50 – 0,46 (m, 2H, H3', H4'), RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, DMSO-*d*₆) δ/ppm 163,84 (CO), 158,10 (C2), 154,65 (C4), 152,00 (C3''), 151,23 (C4''), 149,87 (C4'''), 149,54 (C1''), 149,40 (C6), 143,95 (C8), 135,24 (C1'''), 131,14 (2C, C2'''), 124,31 (C6''), 123,80 (C5), 120,80 (2C, C3'''), 120,06 (d, *J* = 256,8 Hz, -CF₃), 114,83 (C2''), 113,06 (C5''), 56,61 (-CH₃), 47,14 (C-pip4), 47,07 (C1'), 43,59 (2C, C-pip2), 31,06 (2C, C-pip3), 11,62 (C2'), 3,80 (2C, C3', C4'). IRFT (KBr, cm⁻¹): 3317, 2931, 2846, 2368, 1512, 1273, 1149, 1026, 864, 632. MS para (C₂₉H₂₈F₄N₆O₃) m/z (%) = 585,4 (M⁺¹, 100)

***N*-(1-(9-metilciclopropil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9*H*-purin-2-il)piperidin-4-il)-3,5-dimetilbenzamida (10g)**

Rendimiento: 71 %; sólido; punto de fusión: 194,8 – 198,1 °C, RMN-¹H (400 MHz, 298 K, DMSO-*d*₆) δ/ppm 8,9 (d, *J* = 8,49 Hz, 2H, H2'''), 8,32 (s, 1H, H8), 8,19 – 8,13 (m, 1H, -NH), 7,56 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H, H3'''), 7,46 – 7,42 (m, 2H, H2''), 7,12 (s, 1H, H4''), 4,85 (d, *J* = 13,0 Hz, 2H, H-pip2), 4,20 – 4,08 (m, 1H, H-pip4), 4,01 (d, *J* = 7,2 Hz, 2H, H1'), 3,16 – 3,05 (m, 2H, H-pip2), 2,30 (s, 6H, 2 -CH₃), 1,95 – 1,88 (m, 2H, H-pip3), 1,58 (qd, *J* = 12,1, 4,0 Hz, 2H, H-pip3), 1,36 – 1,28 (m, 1H, H2'), 0,58 – 0,52 (m, 2H, H3', H4'), 0,51 – 0,46 (m, 2H, H3', H4'). RMN-¹³C (101 MHz, 298K, DMSO-*d*₆) δ/ppm 165,76 (CO), 158,11 (C2), 154,65 (C4), 151,24 (C6), 149,86 (C4'''), 143,46 (C8), 137,24 (C3''), 135,25 (C1'''), 134,69 (C1''), 131,62 (2C, C2'''), 124,99 (C2''), 123,80 (C5), 120,80 (2C, C3'''), 120,07 (d, *J*_{C-F} = 256,7 Hz, -CF₃), 47,15 (C1'), 46,91 (C-pip4), 43,62 (2C, C-pip2), 31,07 (2C, C-pip3), 20,80 (2C, -CH₃), 11,15 (C2'), 3,81

(C3', C4'). IRFT (KBr, cm⁻¹): 3271, 3078, 2924, 2854, 1697, 1527, 1334, 1265, 1056, 864, 632. MS para (C₃₀H₃₁F₃N₆O₂) m/z (%)= 565,2 (M⁺1, 100)

***N*-(1-(9-metilciclopropil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9*H*-purin-2-il)piperidin-4-il)-3,5-dinitrobenzamida (10h)**

Rendimiento: 86 %; sólido; punto de fusión:., RMN-¹H (400 MHz, 298 K, DMSO-*d*₆) δ/ppm 8,99 (s, 2H, H2''), 8,96 (d, *J*= 7,7 Hz, 1H, H6''), 8,91 (d, *J*= 8,28 Hz, 2H, H2'''), 8,88 (s, 1H, -NH), 8,26 (s, 1H, H8), 7,55 (d, *J*= 8,25 Hz, 2H, H3'''), 4,85 (d, *J*= 13,0 Hz, 2H, H-pip2), 4,22 – 4,10 (m, 1H, H-pip4), 4,08 – 3,98 (m, 2H, H1'), 3,15 (t, *J*= 13,0 Hz, 2H, H-pip2), 1,99 - 1,89 (m, 2H, H-pip3), 1,62 – 1,57 (m, 2H, H-pip3), 1,36 – 1,28 (m, 1H, H2'), 0,56 – 0,50 (m, 2H, H3', H4'), 0,49 – 0,46 (m, 2H, H3', H4'). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, DMSO-*d*₆) δ/ppm 162,8 (CO), 157,90 (C2), 154,55 (C4), 151,09 (C6), 149,69 (C4'''), 148,30 (2C, C3'') 143,29 (C8), 137,81 (C1'') 135,05 (C1'''), 130,89 (2C, C2'''), 127,39 (2C, C2''), 123,68 (C5), 123,64 (C5''), 121,29 (C4'') 120,82 (-CF₃), 120,34 (2C, C3'''), 48,93 (C1'), 47,03 (Cpip4), 47,78 (2C, C-pip2), 32,20 (2C, C-pip3) 11,05 (C2'), 4,10 (2C, C3', C4').

***3*-Cloro-5-fluoro-*N*-(1-(9-metilciclopropil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9*H*-purin-2-il) piperidin-4-il)benzamida (10i)**

Rendimiento: 78 %, sólido, punto de fusión 210 - 214 °C. RMN-¹H (400 MHz, 298 K, DMSO-*d*₆) δ/ppm 8,86 (d, *J*= 8,9 Hz, 2H, H2'''), 8,44 (d, *J*= 7,8 Hz, 1H, -NH), 8,28 (s, 1H, H8), 7,76 – 7,72 (m, 1H, H2''), 7,64 – 7,55 (m, 2H, H4'', H6''), 7,52 (d, *J*= 8,4 Hz, 2H, H3'''), 4,80 (d, *J*= 13,1 Hz, 2H, Hpip2), 4,67 – 4,05 (m, 1H, H-pip4), 3,98 (d, *J*= 7,2 Hz, 2H, H1'), 3,14 – 3,05 (m, 2H, H-pip2), 1,91 (d, *J*= 10,2 Hz, 2H, H-pip3), 1,55 (dt, *J*= 11,7, 8,6 Hz, 2H, H-pip3), 1,33 – 1,22 (m, 1H, H2'), 0,55 – 0,48 (m, 2H, H3', H4'), 0,48 – 0,42 (m, 2H, H3', H4'). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, DMSO-*d*₆) δ/ppm 162.80 (CO), 161.98 (d, *J*= 247.5 Hz, -CF), 158,12 (C2), 154,67 (C4), 151,28 (C6), 149,90 (C4'''), 143.52 (C8), 138.11 (C1''), 135.25 (C1'''), 134.13 (C3''), 131.18 (2C, C2'''), 123.85 (C5), 123.57 (C2'') , 120.83 (2C, C3'''), 118.59 (C6''), 113.37 (C4''), 47,39 (C-pip4), 47,19 (C1'), 43,52 (2C, C-pip2), 30,87 (2C, C-pip3) 11,18 (C2', 3,84 (2C, H3', H4'). RMN-¹⁹F (376 MHz, 298 K, DMSO-*d*₆) δ/ppm -56,59, -110,16, IRFT (KBr, cm⁻¹): 3278, 2924, 2368, 1635,1527, 1265, 1219, 1165. MS para (C₂₈H₂₅ClF₄N₆O₂) m/z (%)= 589,4 (M⁺1, 100)

2,4,6-Tricloro-*N*-(1-(9-metilciclopropil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9*H*-purin-2-il) piperidin-4-il)benzamida (10j)

Rendimiento: 77 %, sólido, punto de fusión: 288,4 – 290,4 °C, RMN-¹H (400 MHz, 298 K, DMSO-*d*₆) δ/ppm 8,89 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H, H2'''), 8,70 (d, 7,8 Hz, 1H, -NH), 8,31 (s, 1H, H8), 7,72 (s, 2H, H3''), 7,55 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H3'''), 4,69 (dt, *J* = 13,6, 4,2 Hz, 2H, H-pip2), 4,16 – 4,05 (m, 1H, H-pip4), 4,00 (d, *J* = 7,3 Hz, 2H, H1'), 3,31 – 3,24 (m, 2H, H-pip2), 2,02 – 1,93 (m, 2H, H-pip3), 1,57 – 1,44 (m, 2H, H-pip3), 1,34 – 1,27 (m, 1H, H2'), 0,57 – 0,51 (m, 2H, H3'), 0,50 – 0,45 (m, 2H, H3'). RMN-¹³C (101 MHz, 298K, DMSO-*d*₆) 162,00 (CO), 157,96 (C2), 154,63 (C4), 151,21 (C1), 149,85 (C4'''), 143,43 (C8), 135,64 (C1''), 135,43 (C1'''), 134,19 (2C, C2''), 132,05 (C4''), 131,15 (2C, C2'''), 127,87 (2C, C3''), 123,77 (C5), 120,78 (2C, C3'''), 120,06 (d, *J* = 257,1 Hz), 47,14 (C1'), 46,73 (C-pip4), 42,84 (2C, Cpip2), 30.70 (2C, C-pip3), 11.13 (C2'), 3.81 (2C, H3', H4'). (KBr, cm⁻¹): 3271, 3078, 3001, 2931, 2854, 1612, 1527, 1388, 1273, 1149, 1056, 848, 632.

6-Cloro-*N*-(1-(9-metilciclopropil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9*H*-purin-2-il)piperidin-4-il)nicotinamida (10k)

Rendimiento: 79 %; sólido; punto de fusión: 257,7 – 260,1 °C, RMN-¹H (400 MHz, 209 K, DMSO-*d*₆) δ/ppm 8,9 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H, H2'''), 8,83 (d, Hz, 1H, H2''), 8,42 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H, -NH), 8,26-8,20 (m, 2H, H8 y H4''), 7,59 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H, H5''), 7,53 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H, H3'''), 4,81 (d, *J* = 13,3 Hz 2H,), 4,15 (t, *J* = 6,9 Hz, 3H, H-pip) RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, DMSO-*d*₆) δ/ppm 162,8 (amida), 157,90 (C2), 154,55 (C6), 152,17 (C6''), 151,09 (C4), 149,69 (C4'''), 148,68 (C2''), 143,29 (C8), 138,27 (C4''), 135,05 (C1'''), 130,89 (C2'''), 129,39 (C3''), 123,68 (C5), 123,64 (C5''), 121,13 (-CF₃), 120,34 (C3'''), 48,93 (C1'), 47,03 (Cpip4), 47,78 (C-pip2), 32,20 (C-pip3) 11,05, 4,56. IRFT (KBr, cm⁻¹): 3294, 3078, 2931, 2846, 1519, 1334, 1265, 1157, 1064, 918, 848, 732, 632.

***N*-(1-(9-metilciclopropil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9*H*-purin-2-il)piperidin-4-il)-1-naftamida (10l)**

Rendimiento: 75 %; sólido; punto de fusión: 212,2 – 215,4 °C. RMN-¹H (400 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 8,90 (d, *J* = 9,0 Hz, 2H, H2'''), 8,49 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H, -NH,) 8,32 (s, 1H, H8), 8,19 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H, H), 8,01 – 7,95 (m, 3H,), 7,74 – 7,62 (m,

2H), 7,59 – 7,57 (m, 2H), 4,83 (d, $J = 13,2$ Hz, 2H, H-pip2), 4,30-4,14 (m, 3H, H-pip4, H1'), 3,36 – 3,17 (m, 2H, H-pip2), 2,07 – 1,96 (m, 2H, H-pip3), 21,54 – 1,48 (m, 2H, H-pip3), 1,33-1,31 (m, 2H, H2'), 0,57 – 0,52 (m, 2H, H3', H4'), 0,51 – 0,46 (m, 2H, H3', H4'). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, CDCl₃) δ /ppm 165,99, 158,90, 155,38, 154,36, 148,70, 138,54, 131,16, , 129,54, 128,17, 126,66, 126,17, 125,27, 125,03, 124,96, 123,76, 120,82, 120,67 (d, $J = 257,6$ Hz), 47,14 (C1'), 46,89 (C-pip4), 43,30 (2C, C-pip2), 31,44 (2C, C-pip3) 11,15 (C2'), 3,82 (2C, C3', C4'). IRFT (KBr, cm⁻¹): 3278, 3078, 2931, 2854, 2360, 1527, 1327, 1265, 1165, 925, 856, 632.

***N*-(1-(9-metilciclopropil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9*H*-purin-2-il)piperidin-4-il)-2-naftamida (10m)**

Rendimiento: 79 %; sólido; punto de fusión: °C, RMN-¹H (400 MHz, 298 K, DMSO-*d*₆) δ /ppm 8,91 (d, $J = 8,43$ Hz, 2H, H2'''), 8,45 (d, $J = 7,37$ Hz, 2H, H1 y H3), 8,29 (s, 1H, H8), 7,98 (m, 4H, NH H4, H3''), 7,58 (m, 4H, H5, H6, H7 y H8), 4,87 (d, $J = 12,95$, 2H, H1'), 4,22 (m, 1H, H-pip), 4,15 (t, $J = 13,77$, 7,0 Hz, 2H, H-pip), 3,15 (t, $J = 24,69$, 12,39 Hz, 2H, H-pipe), 1,99 (m, 2H, H-pip), 1,85 (m, 2H, H-pip), 1,33-1,31 (m, 2H, H2'), 0,57 – 0,52 (m, 2H, H3', H4'), 0,51 – 0,46 (m, 2H, H3', H4'). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, DMSO-*d*₆) δ /ppm 165,99, 158,90, 155,38, 154,36, 148,70, 138,54, 131,16, , 129,54, 128,17, 126,66, 126,17, 125,27, 125,03, 124,96, 123,76, 120,82, 120,67 (d, $J = 257,6$ Hz 47,93 (C1'), 47,03 (C-pip4), 43,56 (C-pip2), 31,20 (C-pip3) 11,05 (C2'), 4,56 (C3', C4'). IRFT (KBr, cm⁻¹): 3278, 3078, 2931, 2854, 2360, 1527, 1327, 1265, 1165, 925, 856, 632.

***N*-(1-(9-metilciclopropil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9*H*-purin-2-il)piperidin-4-il)-3-metiltiofeno-2-carboxamida (10n)**

Rendimiento: 87 %; sólido; punto de fusión: , RMN-¹H (400 MHz, 298 K, DMSO-*d*₆) δ /ppm 8,88 (d, $J = 8,95$ Hz, 2H, H2'''), 8,31 (s, 1H, H8), 7,81 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H, -NH), 7,59 – 7,51 (m, 3H, H3''' y H4''), 6,93 (d, $J = 5,0$ Hz, 1H, H3''), 4,85 – 4,75 (m, 2H, H-pip2), 4,14 – 4,04 (m, 2H, H1'), 4,00 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H, H-pip4), 3,17 – 3,07 (m, 2H, H-pip2), 2,39 (s, 3H, CH₃), 1,91 (dd, $J = 13,1$, 3,8 Hz, 2H, H-pip3), 1,59 (qd, $J = 12,2$, 4,1 Hz, 2H, H-pip3), 1,35 – 1,26 (m, 2H, H2'), 0,58 – 0,51 (m, 2H, H3'), 0,50 – 0,45 (m, 2H, H3'). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, DMSO-*d*₆) δ /ppm 161.80 (CO), 158.04 (C2), 154.65 (C4), 151.23 (C6), 149.86 (C4'''), 143.43 (C8), 139.29 (C1''), 135.25

(C1'''), 131.96 (C2''), 131.20 (C3''), 131.15 (2C, C2'''), 126.82 (C4''), 123.78 (C5), 120.80 (2C, C3'''), 120,07 (d, $J = 257,1$ Hz, $-\underline{C}F_3$), 47.15 (C1'), 47.08 (C-pip4), 43.47 (2C, H-pip2), 30.97 (2C, H-pip3), 15.19 ($\underline{C}H_3$), 11.15 (C2'), 3.82 (2C, C3', C4'). MS para (C₂₇H₂₇F₃N₆O₂S) m/z (%) = 556,9 (M⁺¹, 100)

3-(2-Clorofenil)-N-(1-(9-metilciclopropil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9H-purin-2-il) piperidin-4-il)-5-metilisoxazol-4-carboxamida (10o)

Rendimiento: 82 %; sólido; punto de fusión: 257,7 – 260,1 °C, RMN-¹H (400 MHz, 298 K, DMSO-*d*₆) δ/ppm 8,9 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, H2'''), 8,83 (d, Hz, 1H, H2''), 8,42 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H, $-\underline{NH}$), 8,26-8,20 (m, 2H, H8 y H4''), 7,59 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H, H5''), 7,53 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, H3'''), 4,81 (d, $J = 13,3$ Hz 2H,), 4,15 (t, $J = 6,9$ Hz, 3H, H-pip) RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, DMSO-*d*₆) 162,8 (amida), 157,90 (C2), 154,55 (C6), 152,17 (C6''), 151,09 (C4), 149,69 (C4'''), 148,68 (C2''), 143,29 (C8), 138,27 (C4''), 135,05 (C1'''), 130,89 (C2'''), 129,39 (C3''), 123,68 (C5), 123,64 (C5''), 121,13 ($-\underline{C}F_3$), 120,34 (C3'''), 48,93 (C1'), 47,03 (C-pip4), 47,78 (C-pip2), 32,20 (C-pip3) 11,05, 4,56.

N-(1-(9-metilciclopropil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9H-purin-2-il)piperidin-4-il)-5H-dibenzo[*b,f*]azepin-5-carboxamida (10p)

Rendimiento: 83 %; sólido; punto de fusión: 213,7 – 217,8 °C, RMN-¹H (400 MHz, 298 K, DMSO-*d*₆) δ/ppm 8,84 (d, $J = 8,99$ Hz, 2H, H2'''), 8,28 (s, 1H, H8), 7,54 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, H3'''), 7,44 – 7,37 (m, 6H, H3'', H4'' y H6''), 7,34 – 7,28 (m, 2H, H5''), 6,97 (s, 2H, H8''), 5,19 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, $-\underline{NH}$), 4,65 (d, $J = 13,3$ Hz, 2H, H-pip2), 3,96 (d, $J = 7,1$ Hz, 2H, H1'), 3,82 – 3,70 (m, 1H, H-pip4), 3,06 – 2,95 (m, 2H, H-pip2), 1,73 – 1,65 (m, 2H, H-pip3), 1,40 – 1,25 (m, 3H, H-pip3 y H2'), 0,56 – 0,48 (m, 2H, H3', H4'), 0,48 – 0,42 (m, 2H, H3', H4'). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, DMSO-*d*₆) δ/ppm 157,93 (C2), 154,87 (CO), 154,62 (C4), 151,19 (C6), 149,83 (C4'''), 143,34 (C8), 140,27 (C2''), 135,24 (C1'''), 134,91 (2C, C7''), 131,10 (C2'''), 130,27 (2C, C8''), 129,23 (2C, C3''), 194,14 (4C, C6'', C4'') 127,14 (2C, C5''), 123,70 (C5), 120,77 (C3'''), 120,06 (d, $J_{C-F} = 256,90$ Hz), 47,97 (C-pip4), 47,10 (C1'), 43,57 (2C, C-pip2), 31,19 (2C, C-pip3), 11,11 (C2'), 3,80 (2C, H3', H4'). IRFT (KBr, cm⁻¹): 3363, 3078, 3008, 2924, 2854, 1658, 1604, 1512, 1327, 1257, 1165, 918, 856, 632. MS para (C₃₆H₃₂F₃N₇O₂) m/z (%) = 625,5 (M⁺¹, 100)

Ligandos finales Serie II (parte I)

9-Hexil-6-(4-metoxifenil)-2-(4-(piridin-4-il)piperazin-1-il)-9H-purina (11a)

Rendimiento: 57 %, sólido blanco. RMN-¹H (400 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 8,76 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, H2'''), 8,26 (d, $J = 5,4$ Hz, 2H, H2''), 7,77 (s, 1H, H8), 7,04 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, H3'''), 6,73 (d, $J = 5,6$ Hz, 2H, H3''), 4,11 (dd, $J = 15,0, 6,6$ Hz, 6H, H-pipz2, H1'), 3,88 (s, 3H, -OCH₃), 3,54 – 3,47 (m, 4H, H-pipz1), 1,88 (d, $J = 6,4$ Hz, 2H, H2'), 1,34 – 1,30 (m, 6H, H3', H4', H5'), 0,87 (dd, $J = 13,0, 6,8$ Hz, 3H, H6'). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 158,74 (C2), 155,24 (C4), 155,15 (C1''), 152,14, (C6) 151,76 (C3''), 142,53 (C8), 140,81 (C1'''), 132,22 (C4''') 130,48 (2C, C2'''), 125,56 (2C, C3'''), 123,60 (C5), 108,52 (C2''), 55,47 (-OCH₃)45,97 (2C, C-pipz2), 44,02 (2C, C-pipz1), 43,53 (C1'), 31,30 (C3'), 29,75 (C2'), 26,45 (C4'), 22,60 (C5'), 14,11 (C6').

9-Hexil-2-(4-(piridin-4-il)piperazin-1-il)-6-(4-(trifluorometil)fenil)-9H-purina (11b)

Rendimiento: 72 %, sólido blanco. RMN-¹H (400 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 8,87 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H, H2'''), 8,31 (d, $J = 5,7$ Hz, 2H, H2''), 7,87 – 7,69 (m, 3H, H8, H3'''), 6,79 – 6,66 (m, 2H, H3''), 4,22 – 4,04 (m, 6HH-pipz2, H1'), 3,59 – 3,42 (m, 4H, H-pipz1), 1,90 (p, $J = 6,8$ Hz, 2H, H2'), 1,41 – 1,27 (m, 6H, H3', H4', H5'), 0,92 – 0,83 (m, 3H, H6'). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 158.62 (C2), 155.11 (C4), 154.98 (C1''), 153.03 (C6), 150.29 (2C, C3''), 142.35 (C8), 139.90 (C1'''), 132.38 (C4'''), 129.92 (2C, C2'''), 125.43 (2C, C3'''), 125,35 (C5) 124,26 (d, $J = 271,78$ Hz, -CF₃), 108.54 (C2''), 85.64, 45.97 (C1'), 44.05 (2C, C-pipz2) (2C, C-pipz1), 43.46 (C1'), 31.30 (C3'), 29.76 (C2'), 26.45 (C4'), 22.60 (C5'), 14.10 (C6').

4-(9-Hexil-2-(4-(piridin-4-il)piperazin-1-il)-9H-purin-6-il)benzonitrilo (11c)

Rendimiento: 68 %, sólido blanco. RMN-¹H (400 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 8,89 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H, H2''), 8,31 (d, $J = 4,9$ Hz, 2H, H3''), 7,83 (s, 1H, H8), 7,79 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H, H3'''), 6,72 (d, $J = 5,9$ Hz, 2H, H2''), 4,15 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H, H1'), 4,13 – 4,08 (m, 4H, H-pipz1), 3,53 – 3,47 (m, 4H, H-pipz2), 1,94 – 1,86 (m, 2H, H2'), 1,39 – 1,30 (m, 6H, H3', H3', H5'), 0,88 (t, $J = 6,9$ Hz, 3H, H6'). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 158,55 (C2), 155,13 (C4), 155,05 (C1''), 152,14 (C6), 150,27 (2C, C3''), 142,56 (C8), 140,75 (C1'''), 132,22 (2C, C3'''), 130,07 (2C, C2'''), 125,38 (C5),

118,98 (-CN), 113,69 (C4'''), 108,53 (2C, C2''), 45,94 (2C, C-pipz2), 44,00 (2C, C-pipz1), 43,48 (C1'), 31,26 (C3'), 29,72 (C2'), 26,41 (C4'), 22,57 (C5'), 14,08 (C6').

9-Hexil-6-(4-nitrofenil)-2-(4-(piridin-4-il)piperazin-1-il)-9H-purina (11d)

Rendimiento: 70 %, sólido amarillo. RMN-¹H (400 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 8,96 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H, H3'''), 8,34 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H, H2'''), 8,31 (d, *J* = 5,0 Hz, 2H, H3''), 7,85 (s, 1H, H8), 6,74 (d, *J* = 5,5, 2H, C2''), 4,17 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H, H1'), 4,14 - 4,10 (m, 4H, H-pipz1), 3,56 – 3,50 (m, 4H, H-pipz2), 1,95 - 1,87 (m, 2H, H2'), 1,39 - 1,31 (m, 6H, H3', H4', H5'), 0,89 (t, *J* = 6,7 Hz, 3H, H6'). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 158,56 (C2), 155,24 (C4), 155,15 (C1'''), 151,76 (C6), 149,98 (2C, C3'''), 148,94 (C4'''), 142,76 (C8), 142,53 (C1'''), 130,48 (2C, C3'''), 125,56 (C5), 123,60 (2C, C2'''), 108,52 (2C, C2''), 45,97 (2C, C-pipz2), 44,02 (2C, C-pipz1), 43,53 (C1'), 31,30 (C3'), 29,75 (C2'), 26,45 (C4'), 22,60 (C5'), 14,11 (C6').

9-(Metilciclopropil)-2-(4-(piridin-4-il)piperazin-1-il)-6-(4-(trifluorometoxifenil)-9H-purina (11e)

Rendimiento: 61 %, sólido blanco. RMN-¹H (400 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 8,81 (d, *J* = 7,7 Hz, 2H, H2'''), 8,35 – 8,24 (m, 2H, H2''), 7,93 (s, 1H, H8), 7,36 (d, *J* = 8,1 Hz, 2H, H3'''), 6,75 (d, *J* = 4,9 Hz, 2H, H2''), 4,15 – 4,09 (m, 4H, H-pipz2), 4,01 (d, *J* = 7,0 Hz, 2H, H1'), 3,58 – 3,50 (m, 4H, H-pipz1), 1,39 – 1,28 (m, 1H, H2'), 0,73 – 0,65 (m, 2H, H3', H4'), 0,52 – 0,45 (m, 2H, H3', H4'). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 158,58 (C2), 155,25 (C4), 154,77 (C1'''), 153,24 (C6), 151,00 (C4'''), 149,64, (2C, C3'''), 141,78 (C8), 135,09 (C1'''), 131,33 (2C, C2'''), 125,00 (C5), 120,69 (C3'''), 120,60 (d, *J*_{C-F} = 257,7 Hz), 108,43 (2C, C2''), 48,18 (C1'), 45,93 (2C, C-pipz2), 44,02 (2C, C-pipz1), 11,18 (C2'), 4,45 (2C, C3', C4').

9-(Metilciclopropil)-6-(4-metoxifenil)-2-(4-(piridin-4-il)piperazin-1-il)-9H-purina (11f)

Rendimiento: 30 %, sólido blanco. RMN-¹H (400 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 8,77 (d, *J* = 8,9 Hz, 2H, C2'''), 8,28 (d, *J* = 4,8 Hz, 2H, H3''), 7,88 (s, 1H, H8), 7,04 (d, *J* = 8,9 Hz, 2H, H3'''), 6,72 (d, *J* = 6,1 Hz, 2H, C2''), 4,11 – 4,06 (m, 4H, H-pipz2), 3,97 (d, *J* = 7,2 Hz, 2H, H1'), 3,88 (s, 3H, -OCH₃), 3,52 – 3,47 (m, H4, H-pipz1), 1,36 – 1,27 (m, 1H, H2'), 0,69 – 0,63 (m, 2H, H3', H4'), 0,46 (q, *J* = 5,0 Hz, 2H, H3', H4'). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 161,80 (C4'''), 158,54 (C1'''), 155,25 (C2),

154,38 (2C, C4, C6), 149,52 (2C, C3''), 141,08 (C8), 131,34 (2C, C2'''), 129,22 (C1'''), 124,59 (C5), 113,90 (2C, C3'''), 108,40 (C2''), 55,47 (-OCH₃), 48,03 (C1'), 45,95 (2C, C-pipz2), 44,03 (2C, C-pipz1), 11,18 (C2'), 4,39 (2C, C3', C4').

9-(Metilciclopropil)-2-(4-(piridin-4-il)piperazin-1-il)-6-(4-(trifluorometil)fenil)-9H-purina (11g)

Rendimiento: 56 %, sólido blanco. RMN-¹H (400 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 8,87 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H, H2'''), 8,30 (d, *J* = 6,0 Hz, 2H, H3''), 7,94 (s, 1H, H8), 7,77 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H, H3'''), 6,77 – 7,70 (m, 2H, H2''), 4,15 – 4,08 (m, 4H, H-pipz2), 4,01 (d, *J* = 7,2 Hz, 2H, H1'), 3,56 – 3,48 (m, 4H, H-pipz2), 1,35 – 1,28 (m, 1H, H2'), 0,73 – 0,66 (m, 2H, H3', H4'), 0,49 (dt, *J* = 6,2 4,7 Hz, 2H, H3', H4'). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 158,61 (C2), 155,20 (C4), 154,96 (C1''), 153,03 (C4'''), 149,81 (C3''), 142,05 (C8), 139,90 (C6), 132,07 (C1'''), 129,92 (2C, C2'''), 125,61 (C5), 125,38 (2C, C3'''), 122,91 (-CF₃), 108,48 (C2''), 48,22 (C1'), 45,97 (2C, C-pipz2), 44,03 (2C, C-pipz1), 11,18 (C2'), 4,47 (2C, C3', C4'). RMN- F¹⁹ (400 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm - 62,74.

4-(9-(Metilciclopropil)-2-(4-(piridin-4-il)piperazin-1-il)-9H-purin-6-il)benzoniitrilo (11h)

Rendimiento: 60 %, sólido blanco. RMN-¹H (400 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 8,90 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H, H2'''), 8.342 – 8,23 (m, 2H, H3''), 7.95 (s, 1H), , 7.81 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H, H8), 6.81 – 6,66 (m, 2H, H2''), 4.19 – 4,07 (m, 4H, H-pipz2), 4.02 (d, *J* = 7,2 Hz, 2H, H1'), 3.61 – 3,43 (m, 4H, H-pipz1), 1.39 – 1,29 (m, 1H, H2'), 0.78 – 0,65 (m, 2H, H3', H4'), 0.57 – 0,45 (m, 2H, H3', H4'). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 158,62 (C2), 155,15 (C4), 155,11 (C1''), 152,21 (C6), 150,23 (2C, C3''), 142,27 (C8), 140,78 (C1'''), 132,27 (2C, C3'''), 130,12 (2C, C2'''), 125,43 (C5), 119,02 (-CN), 113,77 (C4'''), 108,55 (2C, C2''), 48,27 (C1'), 45,97 (2C, C-pipz2), 44,05 (2C, C-pipz1), 11,18 (C2'), 4,49 (2C, C3', C4').

9-(Metilciclopropil)-6-(4-nitrofenil)-2-(4-(piridin-4-il)piperazin-1-il)-9H-purina (11i)

Rendimiento: 75 %, sólido blanco. RMN-¹H (400 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 9,05 – 8,84 (m, 2H, H3'''), 8,42 – 8,19 (m, 4H, (H2''', H3'')), 7,97 (s, 1H, H8), 6,80 – 6,66 (m, 2H, H2''), 4,19 – 4,06 (m, 4H, H-pipz2), 4,06 – 3,92 (m, 2H, H1'), 3,61 (m, 4H, H-

pipz1), 1,39 – 1,27 (m, 1H, H2'), 0,79 – 0,61 (m, 2H, H3', H4'), 0,57 – 0,39 (m, 2H, H3', H4'). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 158,55 (C2), 155,11 (C4), 151,69 (C1''), 149,99 (2C, C3''), 148,89 (C4'''), 142,47 (C8), 130,46 (2C, C3'''), 125,54 (C5), 123,56 (2C, C2'''), 108,49 (2C, C2''), 48,27 (C1'), 45,94 (2C, C-pipz2), 44,01 (2C, C-pipz1), 11,15 (C2'), 4,48 (2C, C3', C4').

Derivados de Anilina

1-Metil-4-(4-nitrofenil)piperazina (14a)

Rendimiento: 70 %, sólido anaranjado/marrón. RMN-¹H (400 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 8,15 – 8,05 (m, 2H, H1''), 6,86 – 6,75 (m, 2H, H2''), 3,48 – 3,36 (m, 4H, H-pipz1), 2,59 – 2,49 (m, 4H, Hpipz2), 2,34 (s, -CH₃). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 154,96 (C1''), 138,55 (C4''), 126,05 (2C, C3''), 112,78 (2C, C2''), 54,65 (2C, C-pipz2), 47,10 (2C, C-pipz1), 46,18 (-CH₃).

1-(2-fluoro-4-nitrofenil)-4-metilpiperazina (14b)

Rendimiento: 70 %, sólido anaranjado/marrón. RMN-¹H (400 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 8,0 – 7,83 (m, 2H), 6,90 (st, *J* = 8,8 Hz, 1H), 3,36 -3,26 (m, 4H), 2,63 – 2,53 (m, 4H), 2,35 (s, 3H). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 153, 12 (d, *J*_{C-F} = 249,1 Hz), 150,64, 145, 72, 140,52, 121,10, 117, 20, 112,60, 54,88 (2C), 49, 68 (2C), 46,19.

4-(4-Metilpiperazin-1-il)anilina (15a)

Rendimiento: 98 %, sólido negro, p.f.: 128 – 130 °C. RMN-¹H (400 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 6,80 (t, *J* = 9,1 Hz, 1H), 6,48 – 6,33 (m, 2H), 3,53 (s, 2H), 3,10 – 2,83 (m, 4H), 2,66 – 2,54 (m, 4H), 2,34 (s, 3H). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 144,55, 140,23, 118,67, 116,29, 77,16, 55,39, 50,89, 46,17. ESI/MS para (C₁₁H₁₇N₃ [M+H]⁺). Calcd: 192,2. Encontrado: 191,9.

3-Fluoro-4-(4-metilpiperazin-1-il)anilina (15b)

Rendimiento: 98 %, sólido negro, p.f.: 120 – 125 °C. RMN-¹H (400 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 6,80 (t, *J* = 9,1 Hz, 1H), 6,48 – 6,33 (m, 2H), 3,53 (s, 2H), 3,10 – 2,83 (m, 4H), 2,66 – 2,54 (m, 4H), 2,34 (s, 3H). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 159,14, 154,27, 142,94, 142,73, 131,59, 131,39, 120,56, 120,47, 110,65, 110,59, 104,06, 103,59, 55,13, 50,81, 50,77, 45,73. RMN-¹⁹F (376 MHz, 298 K, CDCl₃)

δ /ppm -122,56 (s, 1F). ESI/MS para (C₁₁H₁₆FN₃ [M+H]⁺). Calcd: 210,1. Found: 210,3.

Ligando Serie II (parte II)

9-(Metilciclopropil)-6-(4-metoxifenil)-N-(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-9H-purin-2-amina (16a)

Rendimiento: 62 %, sólido blanco. RMN-¹H (400 MHz, 298 K, CDCl₃) δ /ppm 8,75 (d, $J = 7,9$ Hz, 2H, H₂''), 7,91 (s, 1H, H₈), 7,66 – 7,60 (m, 2H, C₂''), 7,15 (s, 1H, -NH), 7,06 – 7,02 (m, 2H, C₃''), 7,00 -6,93 (m, 2H, C₃''), 4,00 (d, $J = 7,1$ Hz, 2H, H₁'), 3,88 (s, 3H, -OCH₃), 3,24 – 3,15 (m, 4H, H-pipz1), 2,64 – 2,56 (m, 4H, H-pipz2), 2,36 (s, 3H, -CH₃), 1,38 – 1,30 (m, 1H, H₂'), 0,70 – 0,64 (m, 2H, H₃', H₄'), 0,49 – 0,43 (m, 2H, H₃', H₄'). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, CDCl₃) δ /ppm 161,84 (C₄''), 156,61 (C₂), 155,15 (C₁''), 153,94 (C₄), 146,70 (C₄''), 141,08 (C₈), 133,53 (C₁'), 131,42 (2C, C₂''), 128,91 (C₆), 125,46 (C₅), 120,18 (2C, C₂''), 117,19 (2C, C₃''), 113,99 (2C, C₃''), 55,47 (-OCH₃), 55,35 (2C, C-pipz2), 50,16 (2C, C-pipz1), 48,17 (C₁'), 46,26 (-CH₃), 11,13 (C₂'), 4,4 (2C, C₃', C₄').

9-(Metilciclopropil)-N-(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-6-(4-(trifluorometil)fenil)-9H-purin-2-amina (16b)

Rendimiento: 59 %, sólido blanco. RMN-¹H (400 MHz, 298 K, CDCl₃) δ /ppm 8,85 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H, H₂''), 7,95 (s, 1H, H₈), 7,77 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H, H₃''), 7,61 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H, H₂''), 7,18 (s, 1H, -NH), 6,97 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, H₃''), 4,00 (d, $J = 7,2$ Hz, 2H, H₁'), 3,20 (d, $J = 3,9$ Hz, 4H, H-pipz1), 2,61 (d, $J = 3,9$ Hz, 4H, H-pipz2), 2,36 (s, 3H, -CH₃), 1,37 – 1,28 (m, 1H, H₂'), 0,72 – 0,65 (m, 2H, H₃', H₄'), 0,49 – 0,43 (m, 2H, H₃', H₄'). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, CDCl₃) δ /ppm 156,69 (C₂), 154,48 (C₄), 153,63 (C₄''), 146,99 (C₄''), 142,01 (C₈), 133,03 (C₁'), 132,08 (C₆), 129,95 (2C, C₂''), 126,16 (C₅), 125,44 (2C, C₃''), 124, 24 (d, $J = 272,6$ Hz, -CF₃), 120,39 (2C, C₂''), 117,09 (2C, C₃''), 55,33 (2C, C-pipz2), 50,05 (2C, C-pipz1), 48,30 (C₁'), 46,26 (-CH₃), 11,07 (C₂'), 4,46 (2C, C₃', C₄').

4-(9-(Metilciclopropil)-2-(4-(piridin-4-il)piperazin-1-il)-9H-purin-6-il)benzonitrilo (16c)

Rendimiento: 72 %, sólido blanco. RMN-¹H (400 MHz, 298 K, CDCl₃) δ /ppm 8,89 (d, $J = 7,3$ Hz, 2H), 7,94 (s, 1H), 7,63 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 7,57 – 7,46 (m, 4H), 7,19 (s,

1H), 6,97 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H), 4,01 (d, $J = 7,1$ Hz, 2H), 3,23 – 3,16 (m, 4H), 2,62(d, $J = 4,0$ Hz, 2H), 2,37 (s, 3H), 1,34 (dd, $J = 12,5, 6,6$ Hz, 1H), 0,68 (d, $J = 7,5$ Hz, 2H), 0,47 (d, $J = 4,7$ Hz, 2H). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 158,68, 155,08, 152,23, 150,24, 142,78, 141,34, 133,33, 132,04, 125,94, 120,22, 117,20, 113,76, 108,76, 55,33, 50,12, 48,23, 46,97, 11,14, 4,49.

9-(Metilciclopropil)-N-(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-6-fenil-9H-purin-2-amina (16d)

Rendimiento: 70 %, sólido blanco. RMN-¹H (400 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 8,72 (d, $J = 7,8$ Hz, 2H, H2'''), 7,94 (s, 1H, H8), 7,64 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, H2''), 7,55 – 7,47 (m, 3H, H3''', H4'''), 7,19 (s, 1H, -NH), 6,97 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, H3''), 4,01 (d, $J = 7,1$ Hz, 2H, H1'), 3,23 – 3,16 (m, 4H, H-pipz1), 2,64 – 2,59 (m, 4H, H-pipz2), 2,37 (s, 3H, -CH₃), 1,38 – 1,30 (m, 1H, H2'), 0,71 – 0,65 (m, 2H, H3', H4'), 0,50 – 0,44 (m, 2H, H3', H4'). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 156,68 (C2), 155,59 (C1'''), 154,16 (C4), 146,78 (C4''), 141,52 (C8), 136,21 (C1''), 133,41 (C6), 130,74 (C4'''), 129,70 (2C, C2'''), 128,61 (2C, C3'''), 125,94 (C5), 120,22 (2C, C2''), 117,20 (2C, C3''), 55,33 (2C, C-pipz2), 50,12 (2C, C-pipz1), 48,23 (C1'), 46,24 (-CH₃), 11,12 (C2'), 4,44 (2C, C3', C4').

9-(Metilciclopropil)-N-(3-fluoro-4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9H-purin-2-amina (16e)

Rendimiento: 66 %, sólido blanco RMN-¹H (400 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 8,80 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, H2'''), 7,97 (s, 1H,H8), 7,76 (dd, $J = 14,8, 2,2$ Hz, 1H, H6''), 7,36 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, H3'''), 7,24 – 7,18 (m, 2H, H2'', -NH) 6,96 (t, $J = 9,1$ Hz, 1H, H5''), 4,03 (d, $J = 7,2$ Hz, 2H, H1'), 3,12 (m, 4H, H-pipz1), 2,63 (m, 4H, H-pipz2), 2,37 (s, 3H, -CH₃), 1,39 – 1,30 (m, 1H, H2'), 0,74 – 0,66 (m, 2H, H3', H4'), 0,51 – 0,45 (m, 2H, H3', H4'). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 157,09 (C3''), 156,08 (C2), 154,66 (C4'''), 154,09 (C4), 151,13 (C6), 142,08 (C8), 135,71 (C4''), 134,78 (C1''), 134,56 (C1'''), 131,43 (2C, C2'''), 126,16 (C5), 121,88 (-OCF₃), 120,75 (C2''), 119,37 (C5''), 114,36 (C2''), 107,68 (C6''), 55,42 (2C, C-pipz2), 51,09 (2C, C-pipz1), 48,42 (C1') , 46,30 (-CH₃), 11,10 (C2'), 4,50 (2C, C3', C4').

9-(Metilciclopropil)-N-(3-fluoro-4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-6-(4-metoxifenil)-9H-purin-2-amina (16f)

Rendimiento 57 %, sólido blanco, p.f.: 85-86 °C. RMN-¹H (400 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 8,75 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H2''), 7,95 (s, 1H, H8), 7,79 (dd, *J* = 14,9, 2,5 Hz, 1H, H6''), 7,25 – 7,16 (m, 2H, H3'''), 7,10 – 6,90 (m, 3H, H2'', -NH, H5''), 4,03 (d, *J* = 7,1 Hz, 2H, H1'), 3,89 (s, 3H, -CH₃), 3,19 – 3,05 (m, 4H, -pipz1), 2,70 – 2,56 (m, 4H, H-pipz1), 2,37 (s, 3H, -CH₃), 1,40 – 1,29 (m, 1H, H2'), 0,77 – 0,63 (m, 2H, H3', H4'), 0,54 – 0,43 (m, 2H, H3', H4'). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 161,99 (C4''), 158,36, 156,04, 155,28 (C1'''), 153,80 (C4), 141,43 (C8), 131,48 (2C, C2'''), 128,73 (C6), 125,78 (C5), 119,44 (C5'), 114,17 (C2''), 107,55 (C6''), 65,40 (-CH₃), 55,49 (2C, C-pipz2), 51,95 (2C, C-pipz1), 48,33 (C1'), 46,28 (-CH₃), 11,15 (C2'), 4,48 (2C, C3', C4'). RMN-¹⁹F (376 MHz, CDCl₃) δ -121.55.

4-(9-(Metilciclopropil)-2-((3-fluoro-4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)amino)-9H-purin-6-il)benzonitrilo (16g)

Rendimiento: 59 %, sólido blanco. RMN-¹H (400 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 8,87 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H, H2'''), 7,99 (s, 1H, H8), 7,79 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H, H3'''), 7,73 (dd, *J* = 14,7, 2,1 Hz, 1H, H6''), 7,24 (s, 1H, -NH), 7,20 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H, H2''), 6,96 (t, *J* = 9,1 Hz, 1H, H5''), 4,04 (d, *J* = 7,2 Hz, 2H, H1'), 3,15 – 3,05 (m, 4H, H-pipz1), 2,67 – 2,58 (m, 4H, H-pipz2), 2,37 (s, 3H, -CH₃), 1,41 – 1,29 (m, 1H, H2'), 0,74 – 0,66 (m, 2H, H3', H4'), 0,49 (q, *J* = 5,1 Hz, 2H, H3', H4'). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 157,03 (C3''), 156,07 (C2), 154,60 (C), 154,51 (C4), 152,88 (C6), 142,57 (C8), 140,19 (C1'''), 135,56 (C4''), 134,93 (C1''), 132,31 (2C, C3'''), 130,14 (2C, C2'''), 126,54 (C5), 119,37 (-CN), 118,89 (C5''), 114,45 (C4'''), 113,94 (C2''), 107,75 (C6''), 55,38 (2C, C-pipz2), 51,02 (2C, C-pipz-1), 48,49 (C1'), 46,27 (-CH₃), 11,06 (C2'), 4,52 (2C, C3'), C4'. RMN-¹⁹F (376 MHz, CDCl₃) δ -121.22.

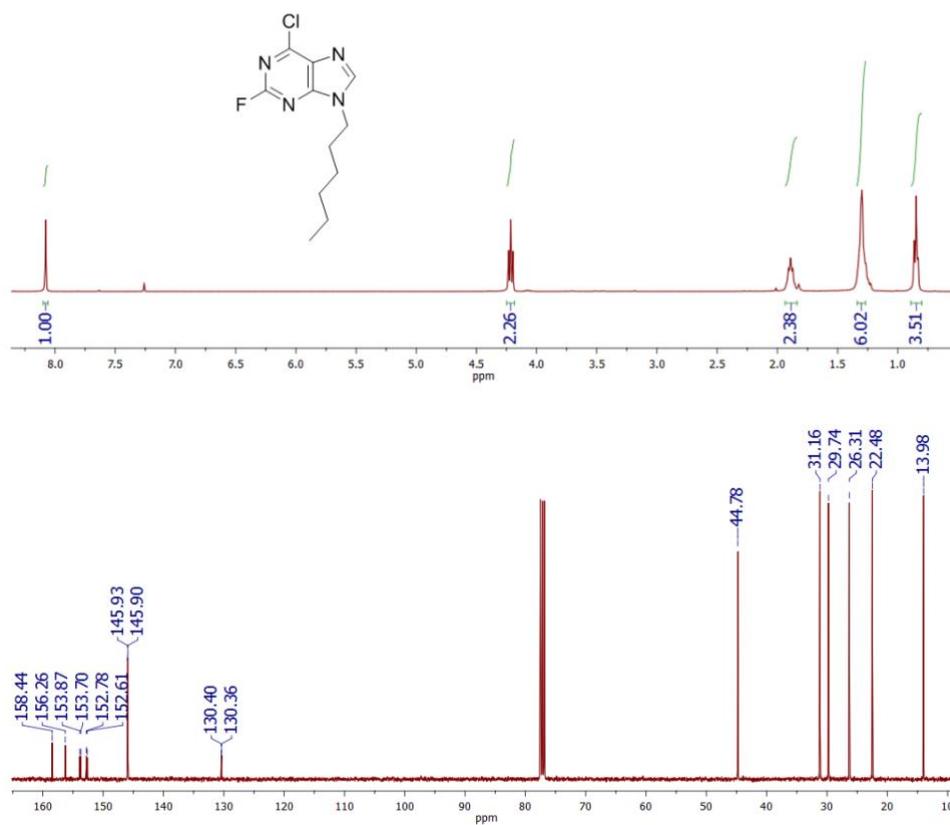
9-(Metilciclopropil)-N-(3-fluoro-4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-6-fenil-9H-purin-2-amina (16h)

Rendimiento: 68 %, sólido blanco. RMN-¹H (400 MHz, 298 K, CDCl₃) δ/ppm 8,50 (d, *J* = 6,7 Hz, 2H, H2'''), 7,75 (s, 1H, H8), 7,57 (dd, *J* = 15,0, 2,4 Hz, 1H, C6''), 7,35 – 7,27 (m, 3H, H3''', H4'''), 7,04 (s, 1H, -NH), 6,99 (dd, *J* = 8.7, 2,7 Hz, 1H, H2''), 6,73, (t, *J* = 9,1 Hz, 1H, H5''), 3,81 (d, *J* = 7,1 Hz, 2H, H1'), 2,93 – 2,85 (m, 4H, H-pipz1), 2,41- 2,36 (m, 4H H-pipz2), 2,15 (s, 3H, -CH₃), 1,16 – 1,01 (m, 1H, H2'), 0,50 – 0,44 (m, 2H, H2', H4'), 0,27 (q, *J* = 5,2 Hz, 2H, H3', H4'). RMN-¹³C (101 MHz, 298 K,

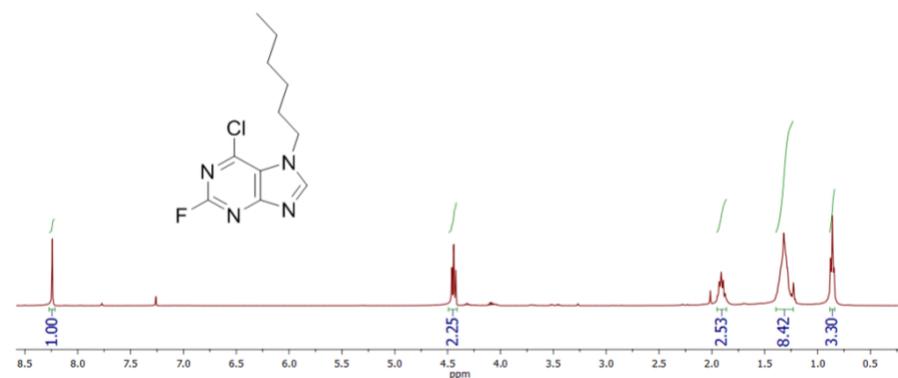
CDCl₃ δ/ppm 157,10 (C3''), 156,09 (C2), 155,67 (C1'''), 154,68 (C4) 154,00, 141,83 (C8) 136,02 (C6), 135,93 (C4''), 134,58 (C1''), 130,89 (2C, C3'''), 129,72 (2C, C2'''), 129,67 (C4'''), 126,23 (C5), 119,36 (C5''), 114,22 (C2''), 107,55 (C6''), 55,38 (2C, Cpipz2), 51,01 (2C, C-pipz1), 48,27 (C1'), 46,26 (-CH₃), 11,10, (C2'), 4,44 (2C, C3', C4'). RMN-¹⁹F (376 MHz, CDCl₃) δ -121.48.

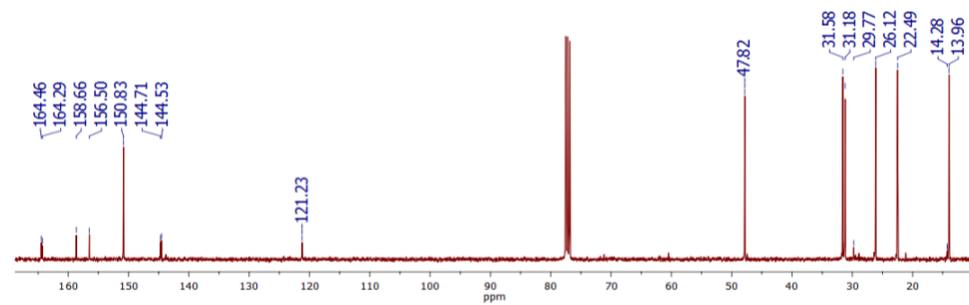
Espectros:

6-Cloro-2-fluoro-9-hexil-9H-purina (3a)

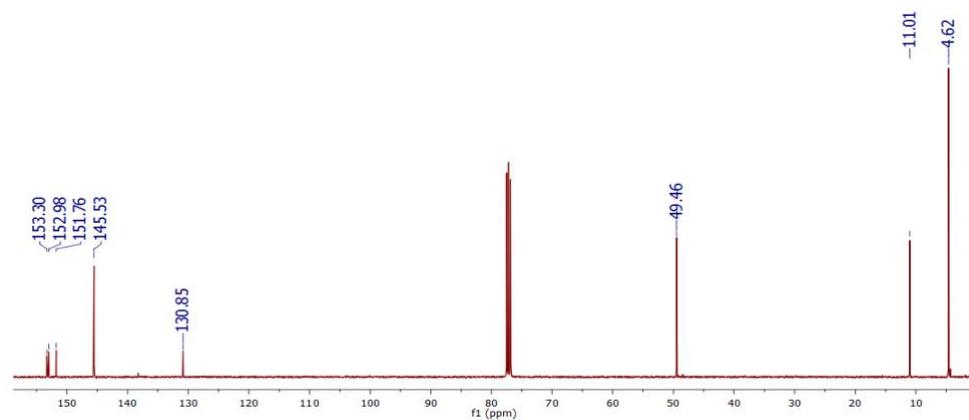
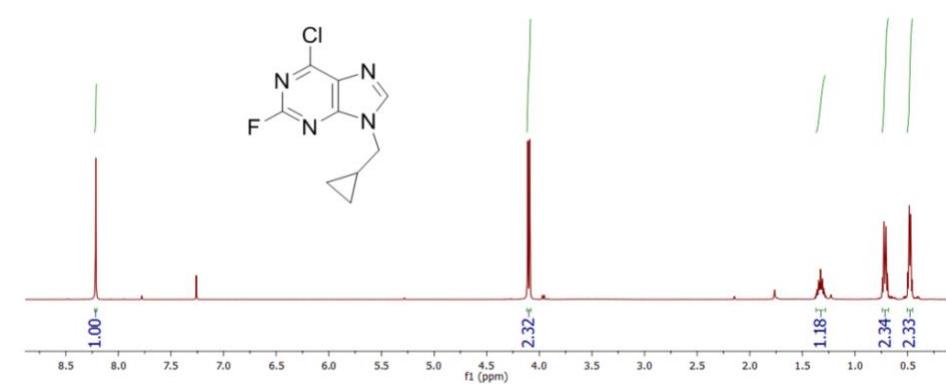


6-cloro-2-fluoro-9-hexil-7H-purina (3a')

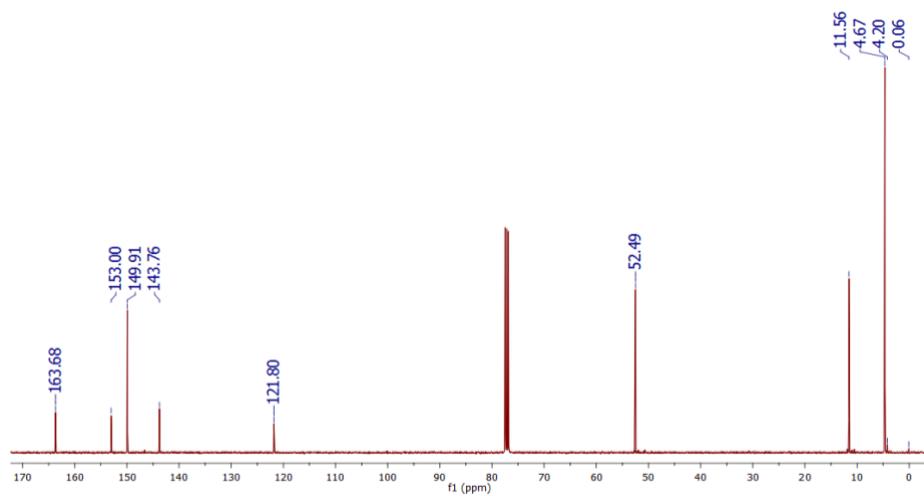
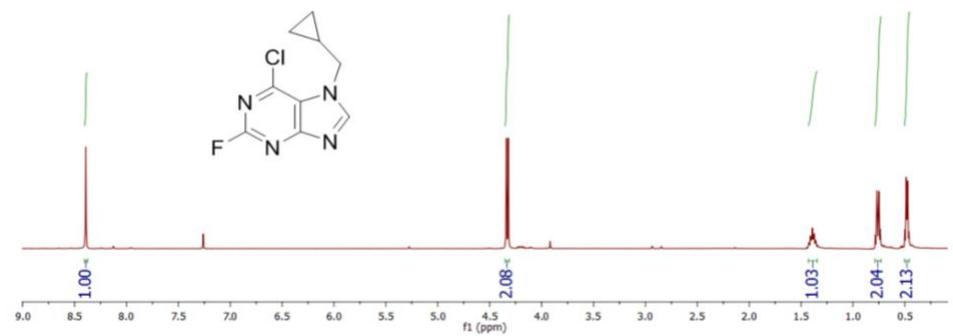




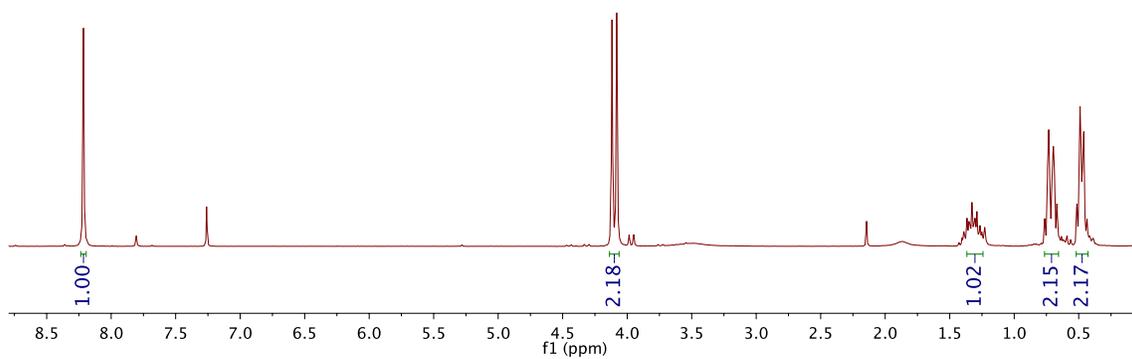
6-cloro-2-fluoro-9-metilciclopropil-9H-purina (3b)

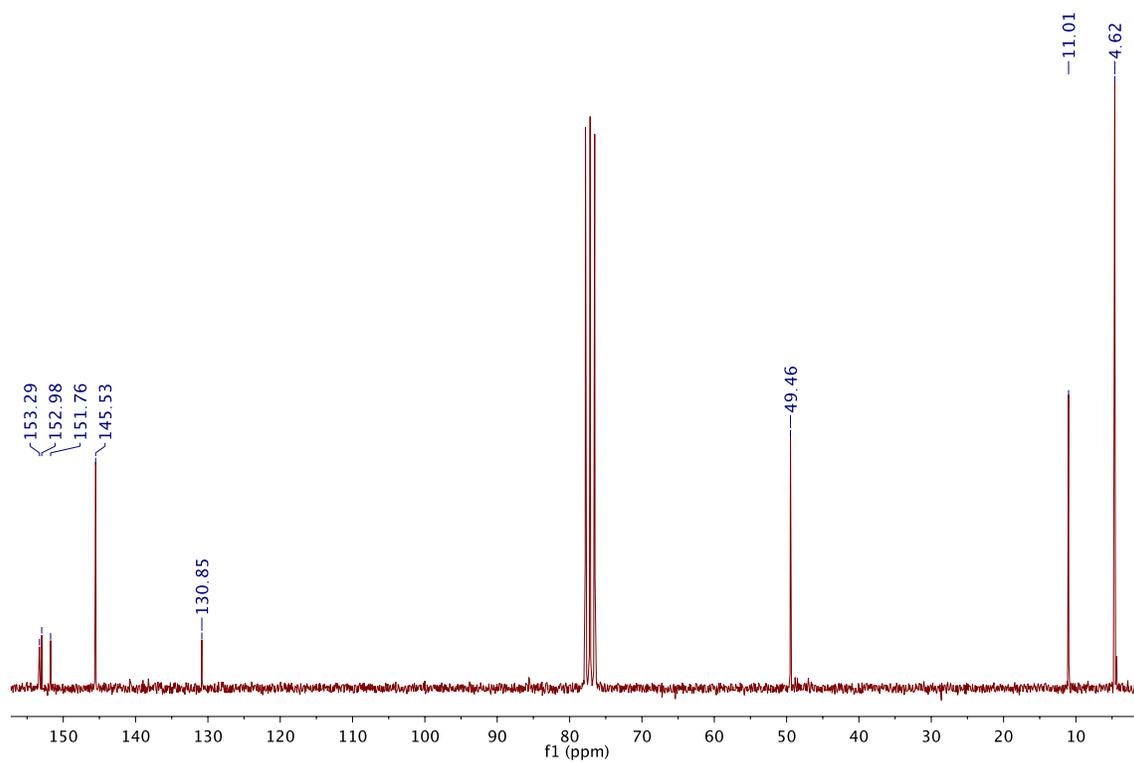


6-cloro-2-fluoro-9-metilciclopropil-7H-purina (3b')

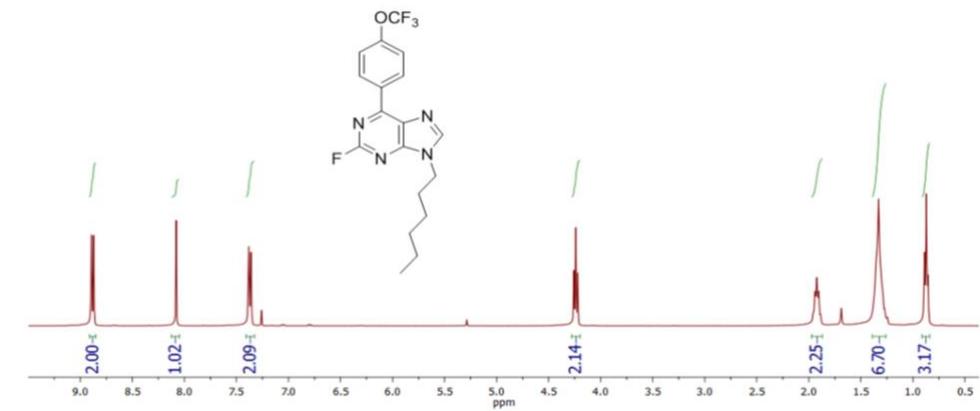


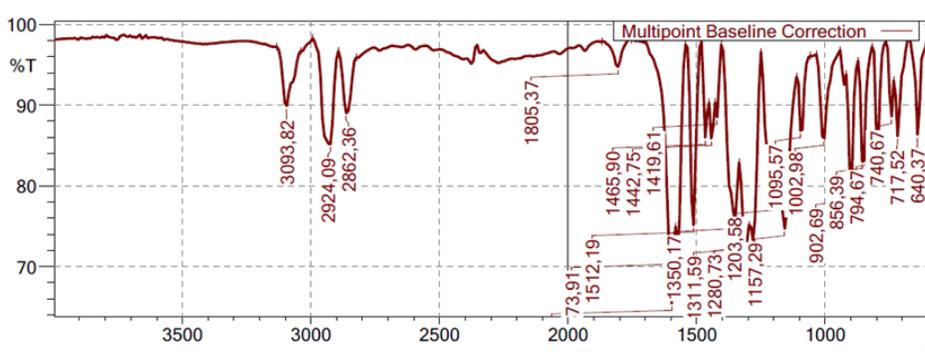
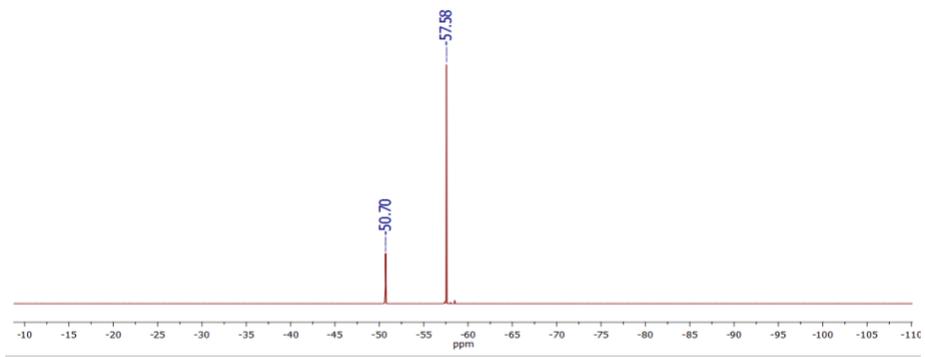
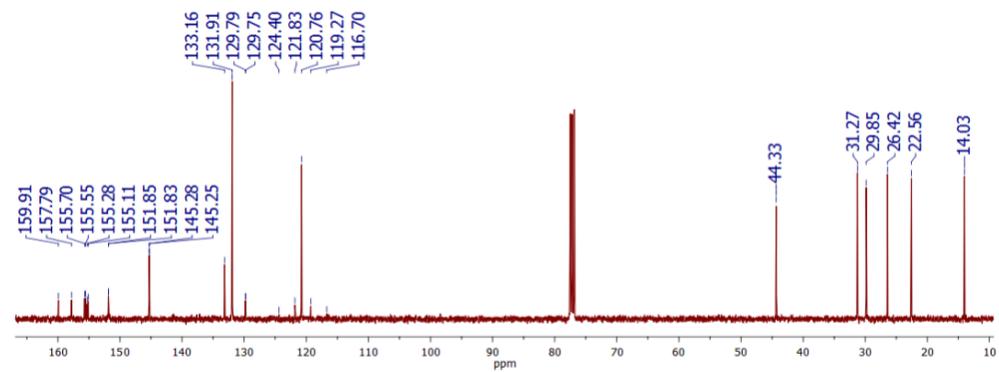
2,6-Dicloro-9-metilciclopropil-9H-purina (3b)



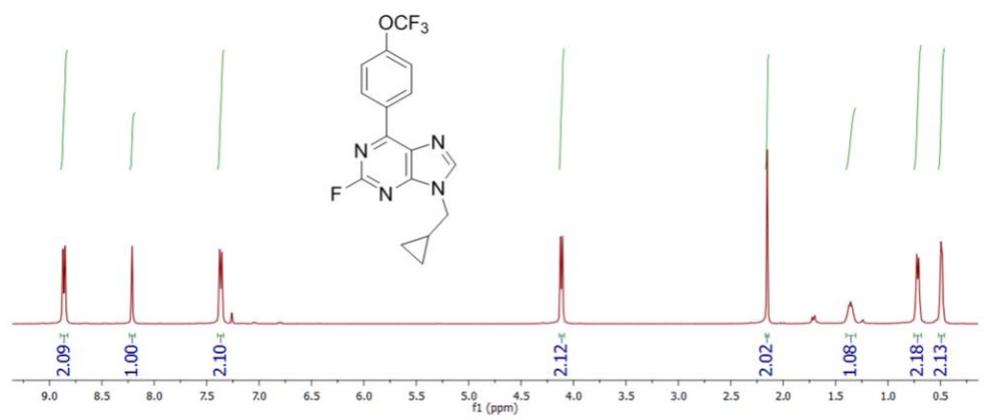


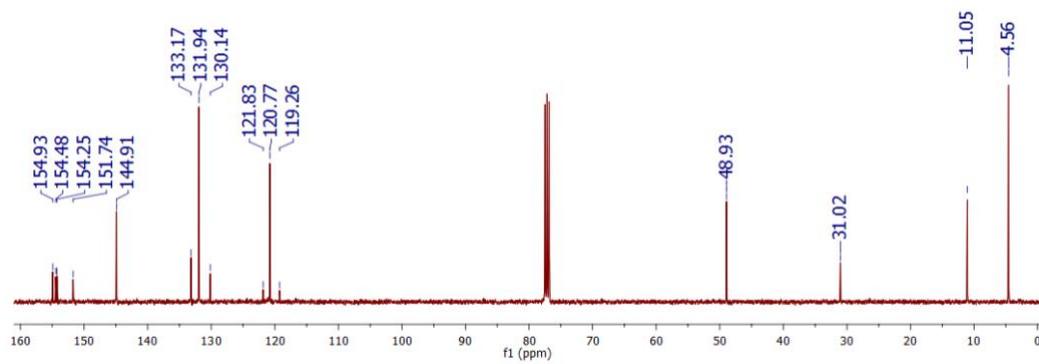
2-fluoro-9-hexil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9H-purina (4a)



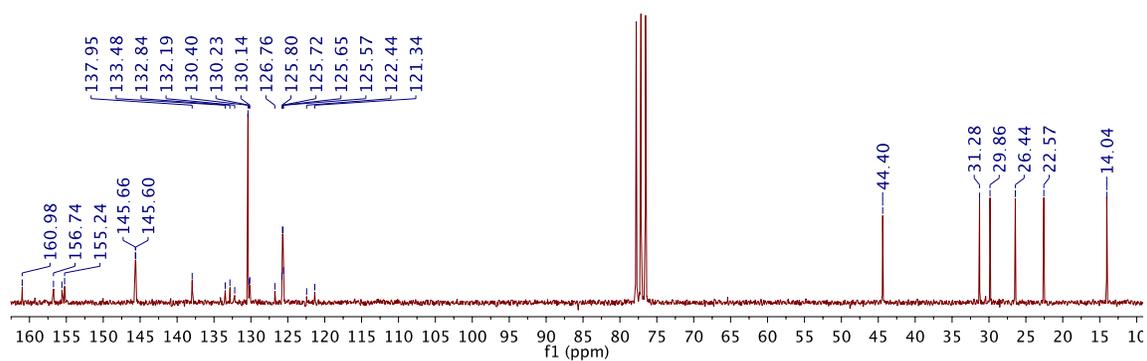
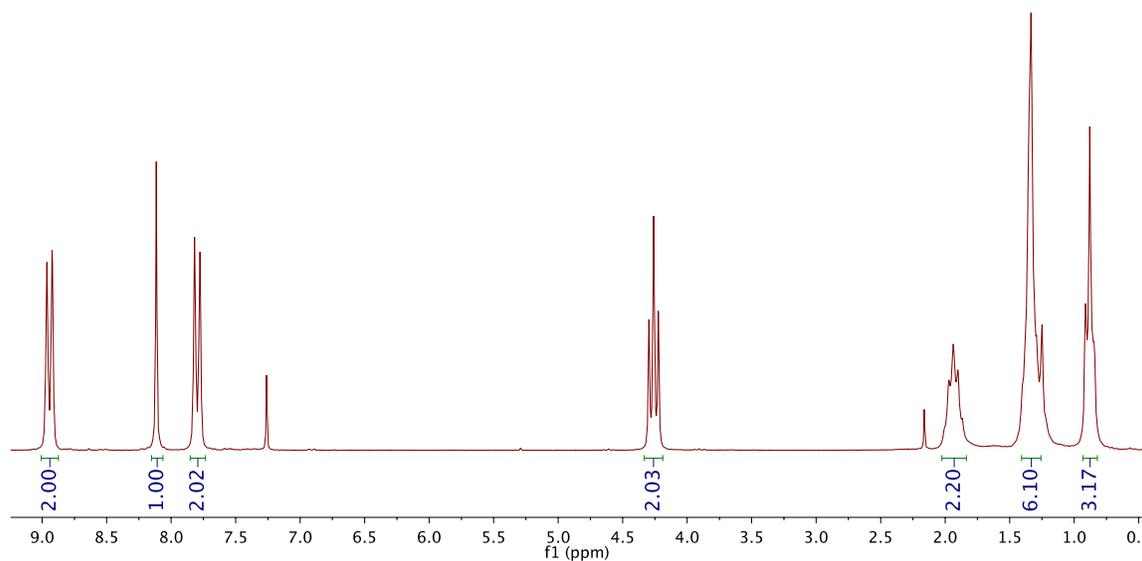


2-fluoro-9-metilciclopropil-6-(4-(trifluorometoxi) fenil)-9H-purina (4b)

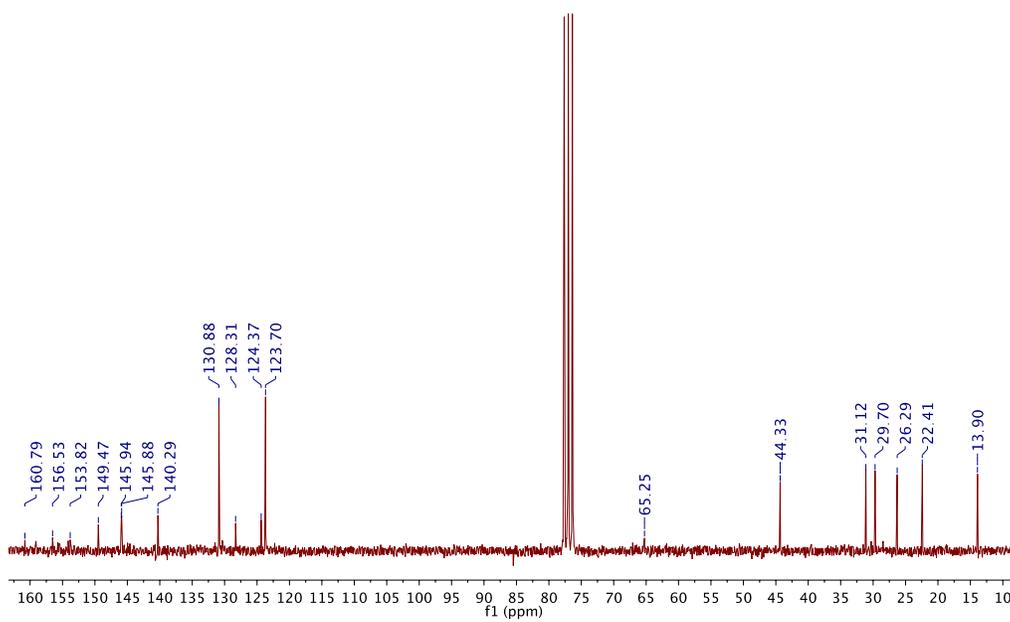
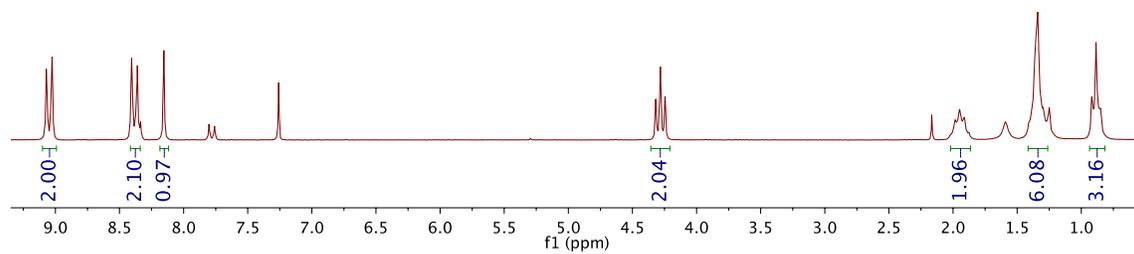




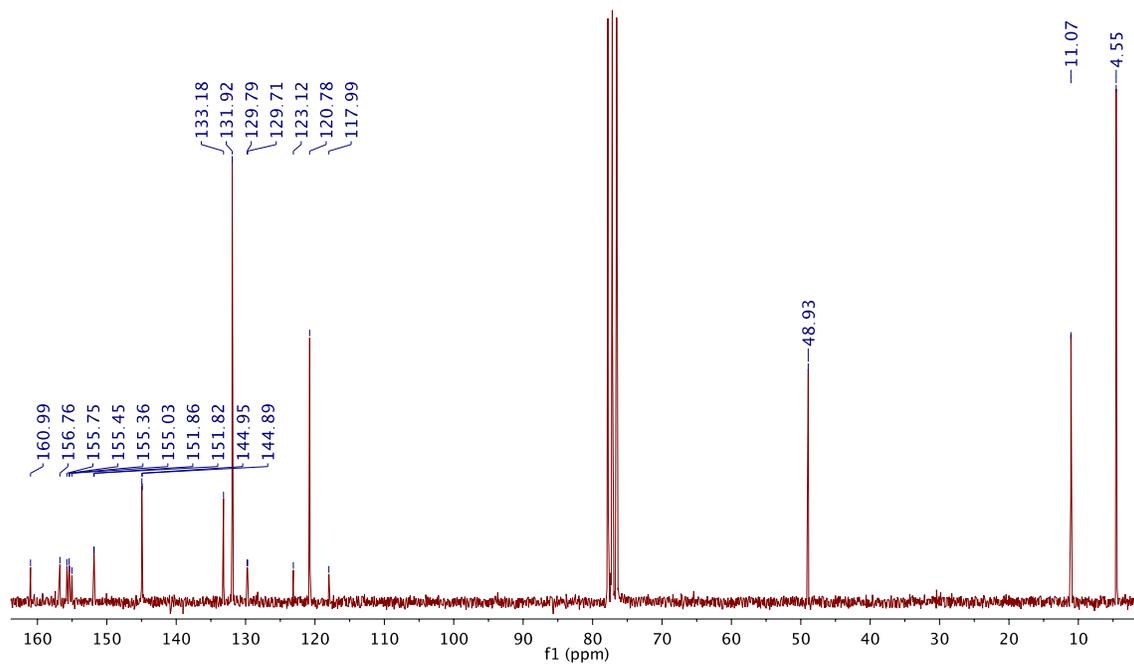
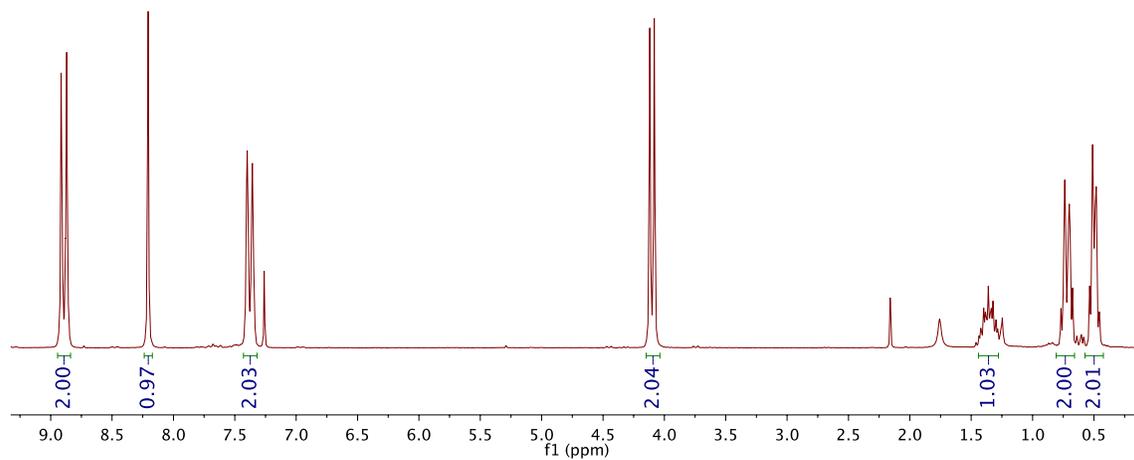
2-fluoro-9-hexil-6-(4-(trifluorometil) fenil)-9H-purina (4d)



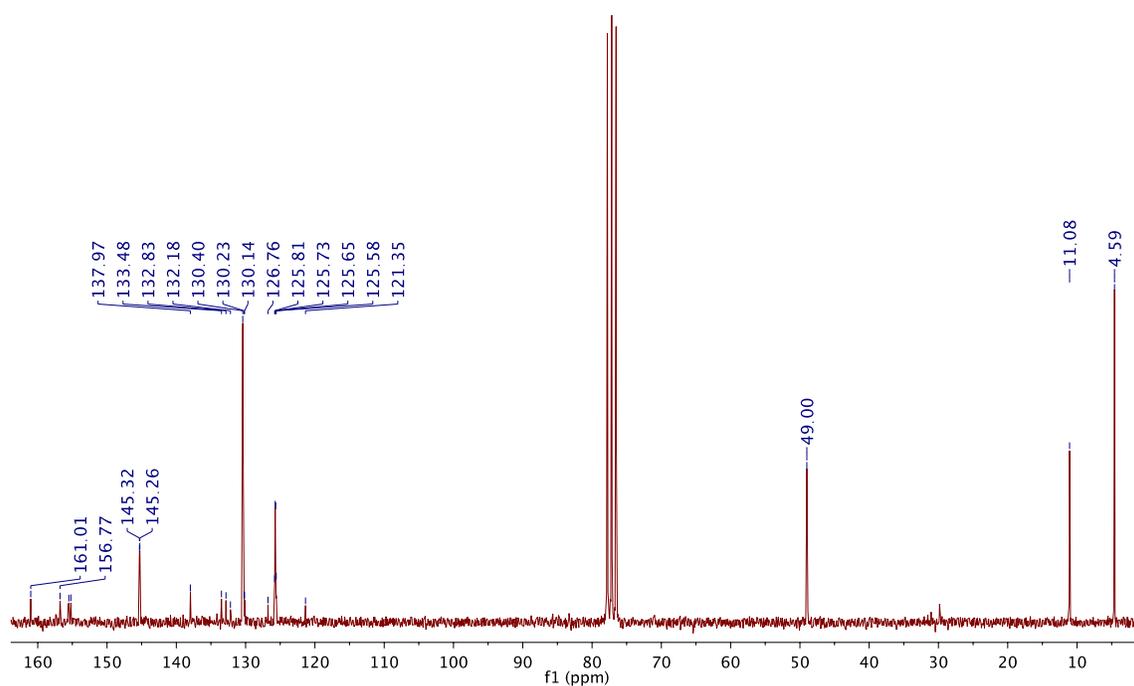
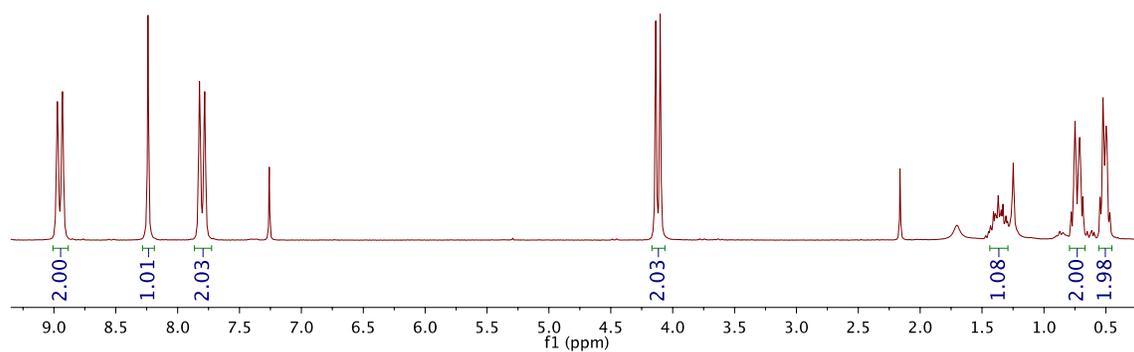
2-fluoro-9-hexil-6-(4-nitrofenil)-9H-purina (4f)



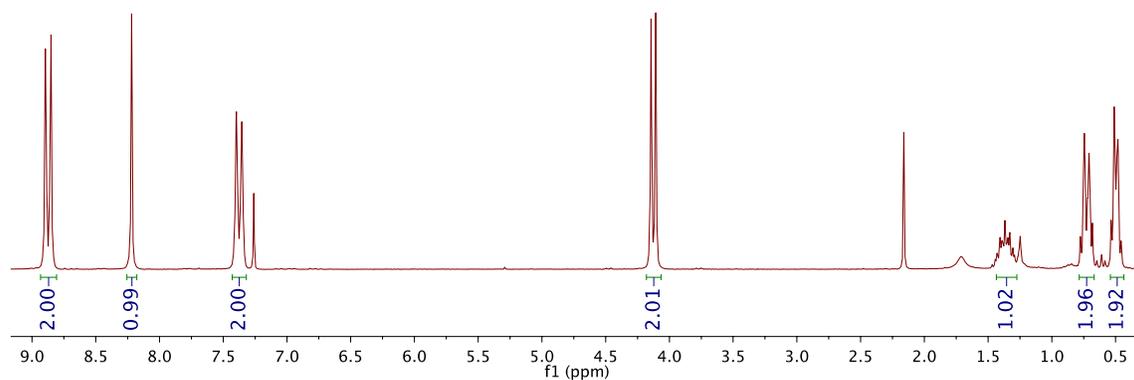
2-fluoro-9-metilciclopropil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9H-purina (4g)

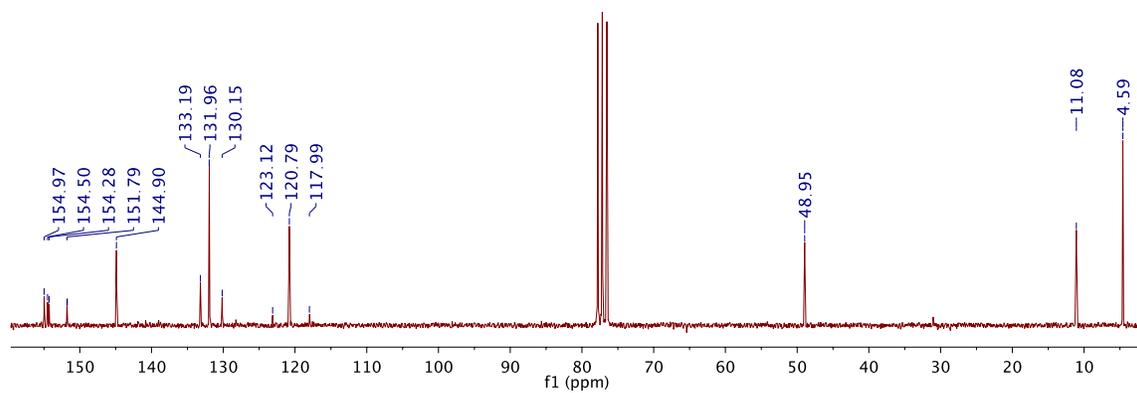


2-fluoro-9-metilciclopropil-6-(4-(trifluorometil)fenil)-9H-purina (4i)

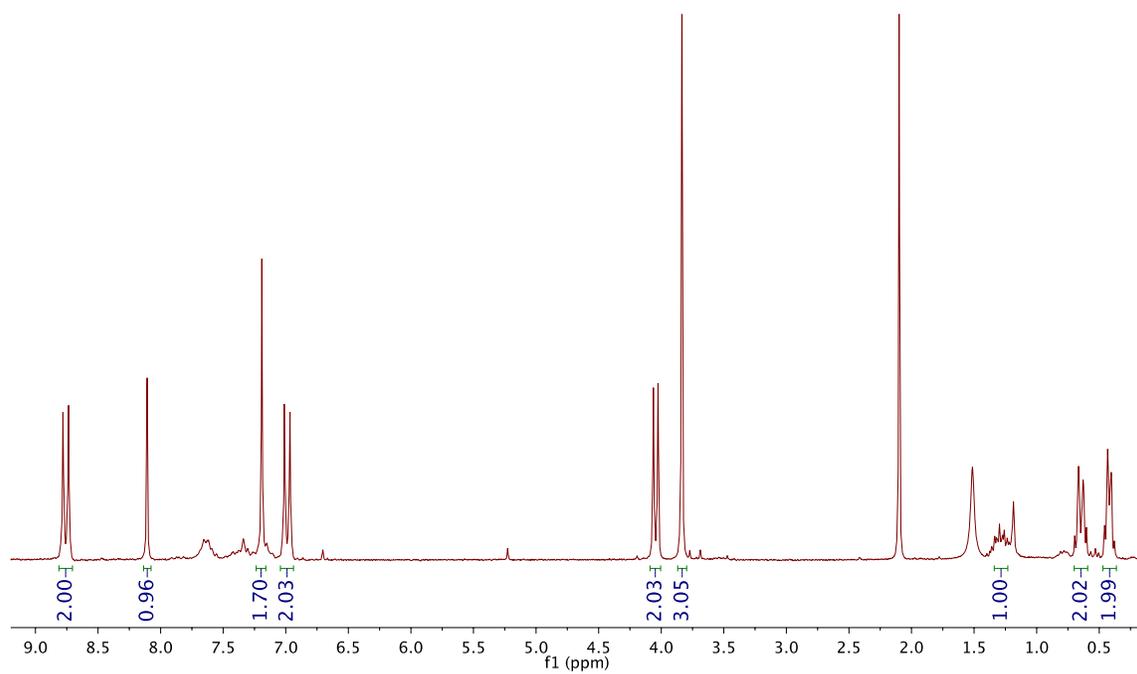


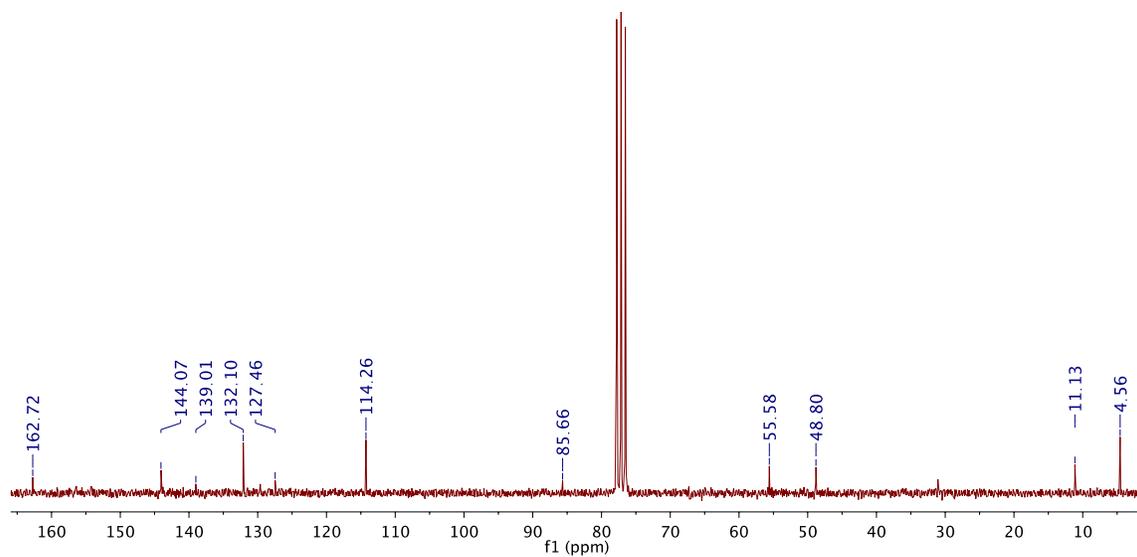
2-cloro-9-metilciclopropil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9H-purina (4l)



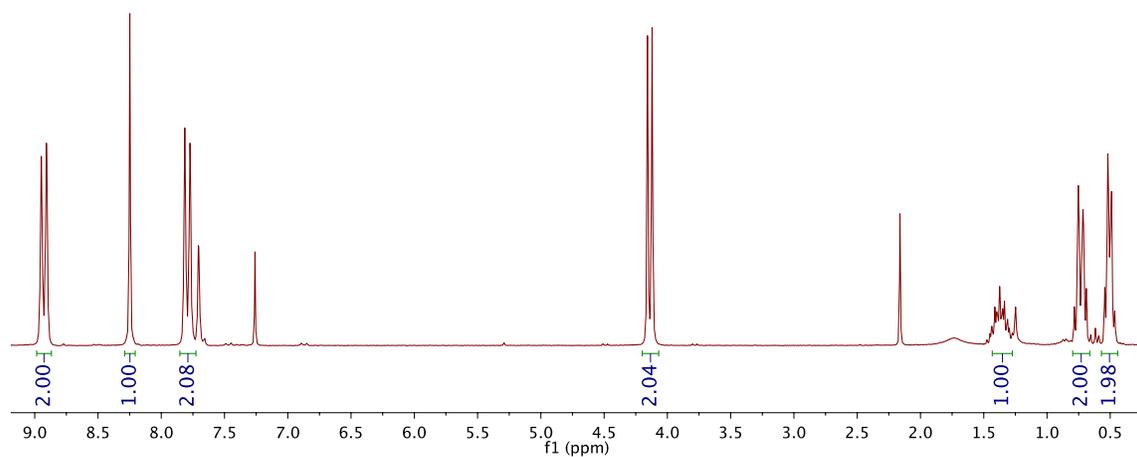


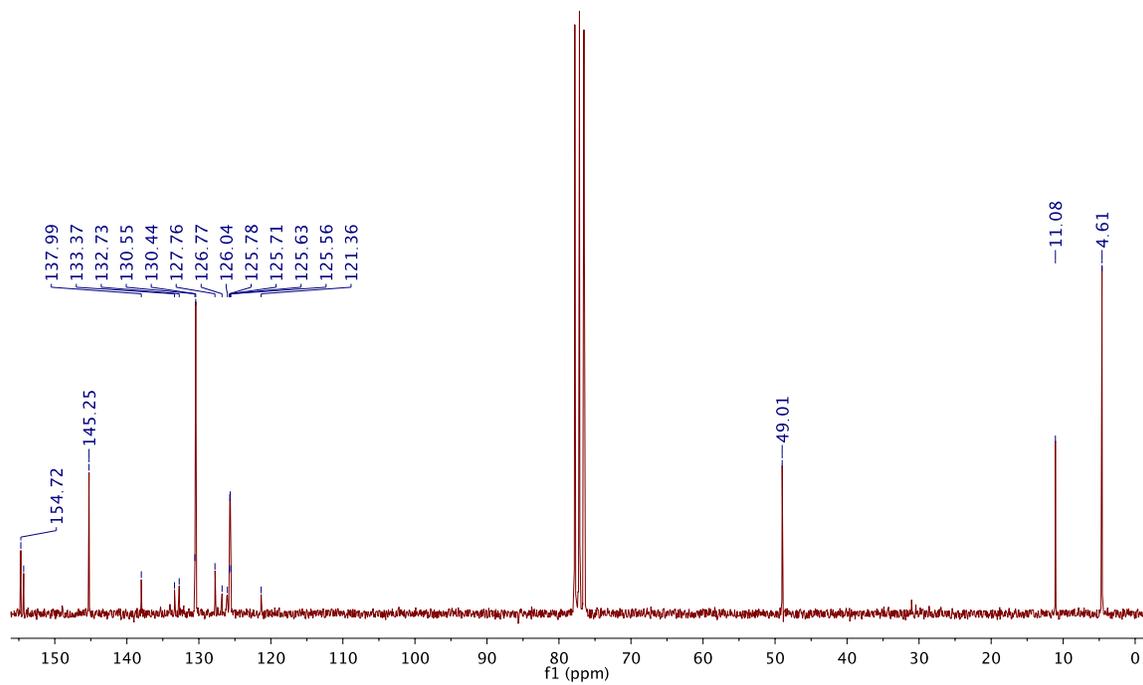
2-cloro-9-metilciclopropil-6-(4-metoxifenil)-9H-purina (4m)



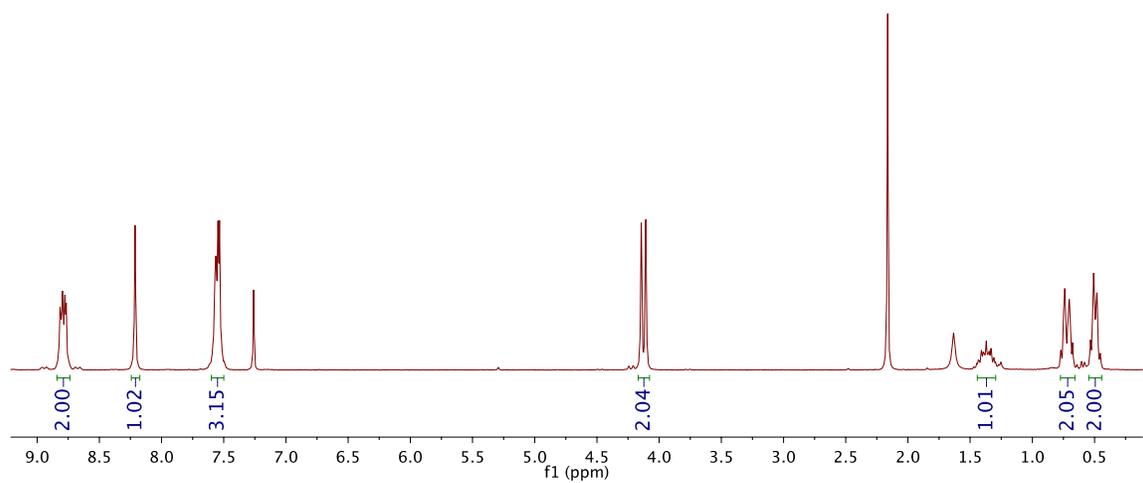


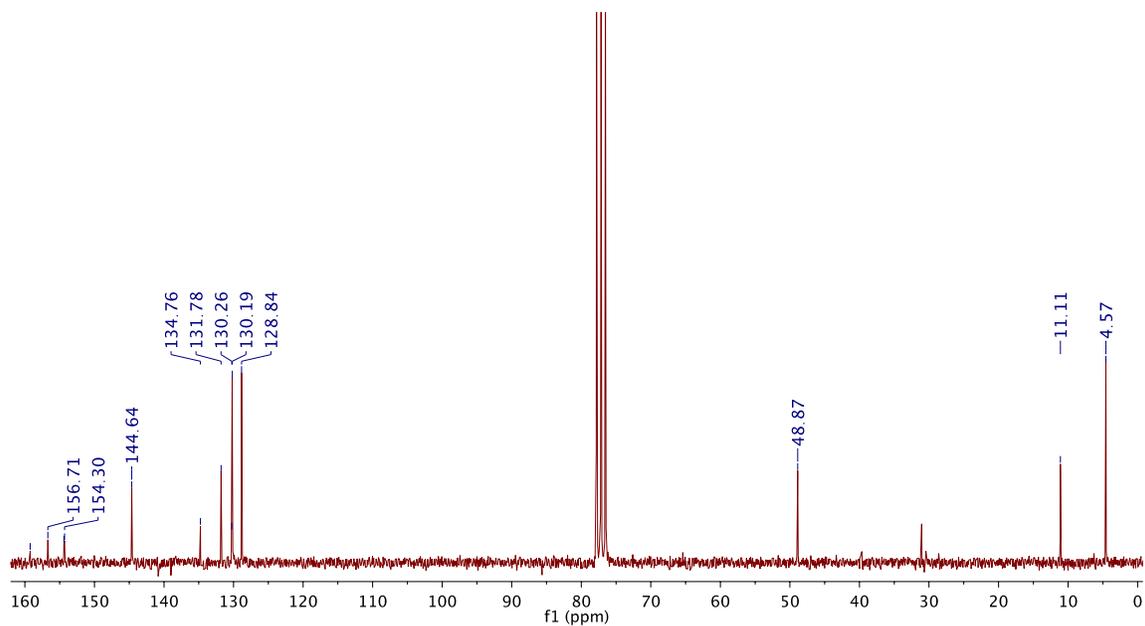
2-cloro-9-metilciclopropil-6-(4-(trifluorometil)fenil)-9H-purina (4n)



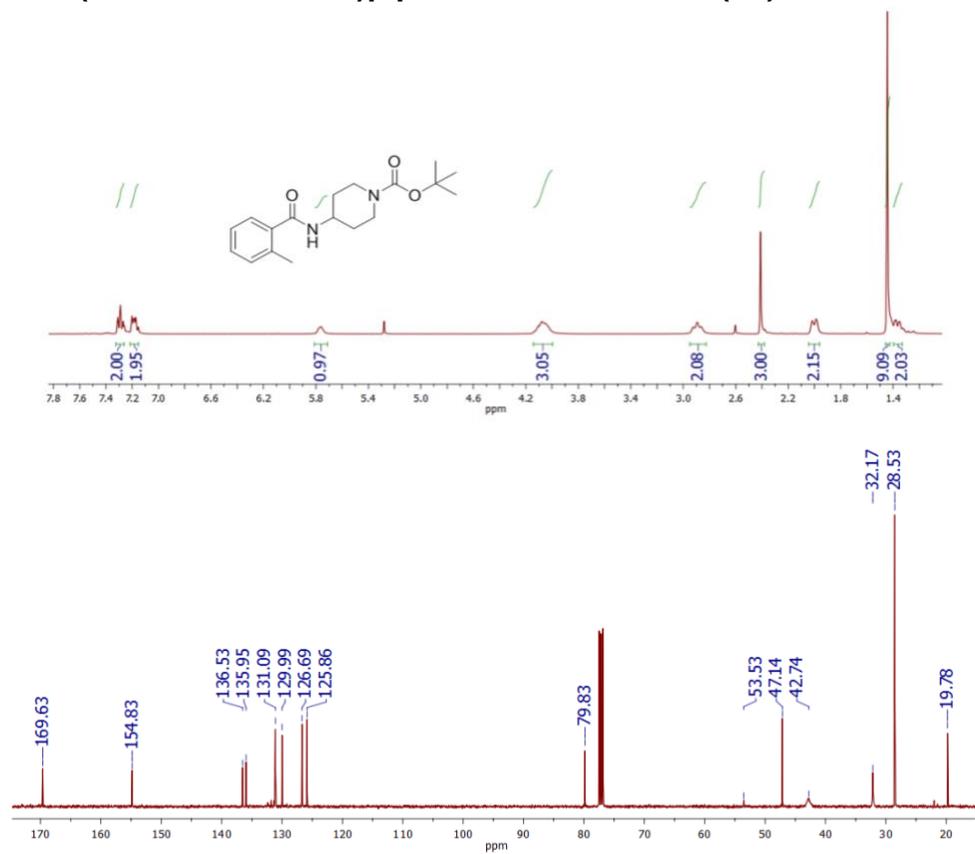


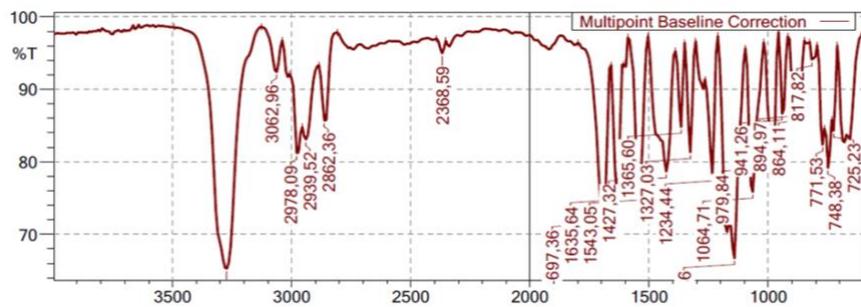
2-cloro-9-metilciclopropil-6-fenil-9H-purina (4p)



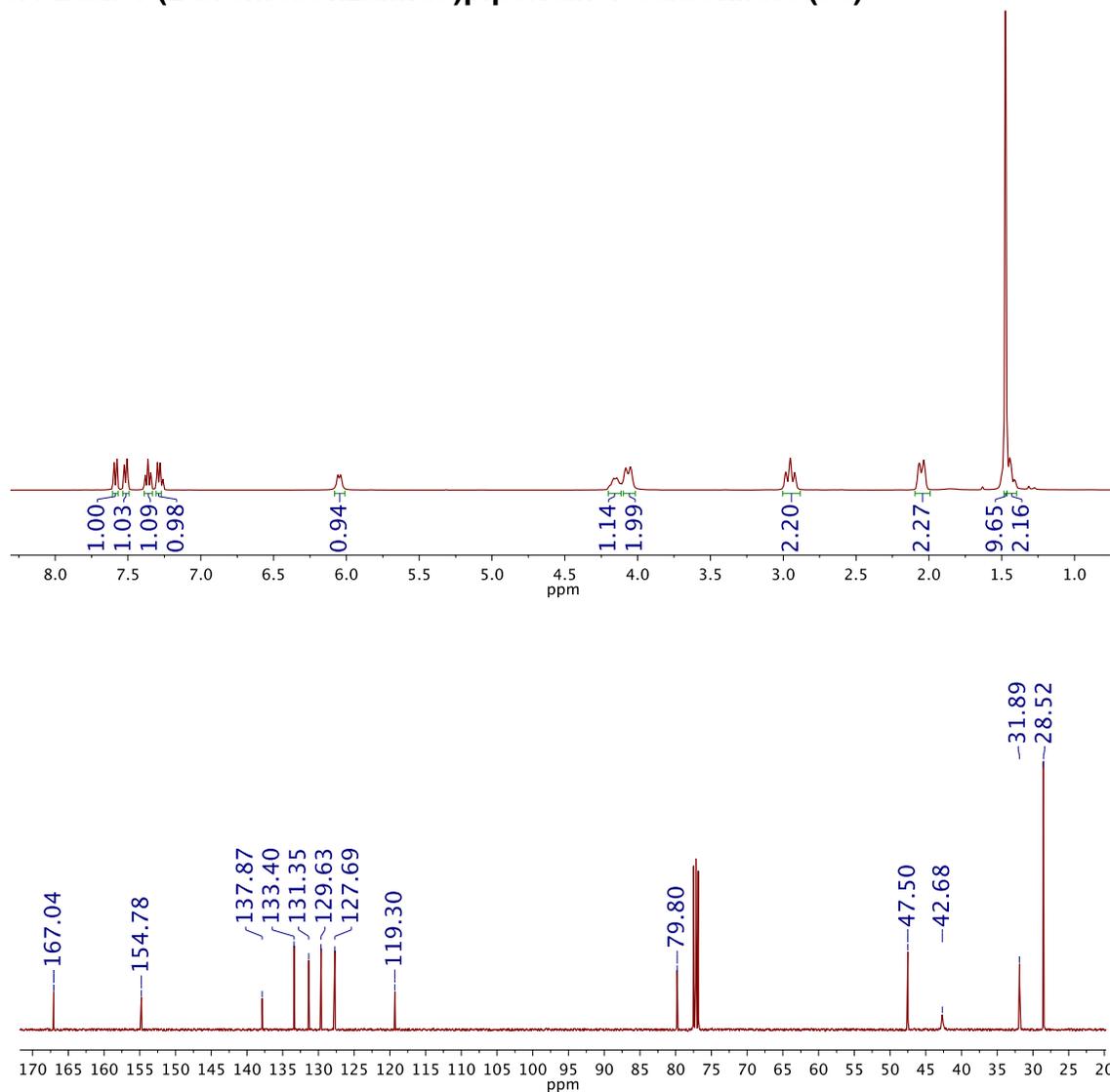


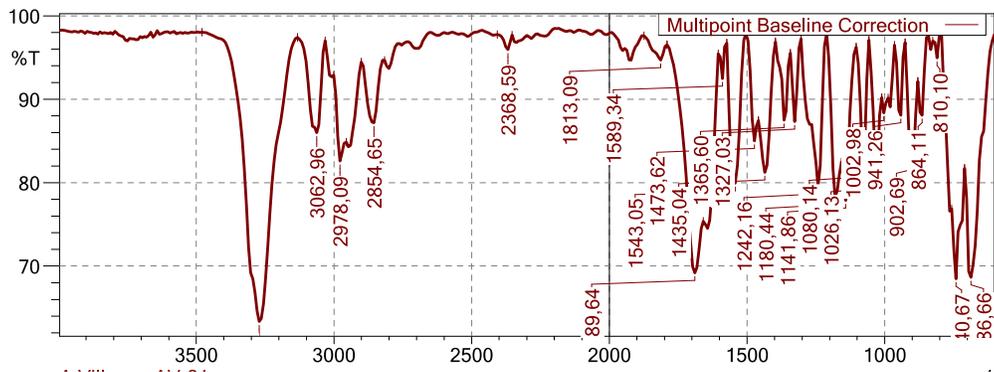
tert-butyl-4-(2-metilbenzamido)piperidin-1-carboxilato (8b)



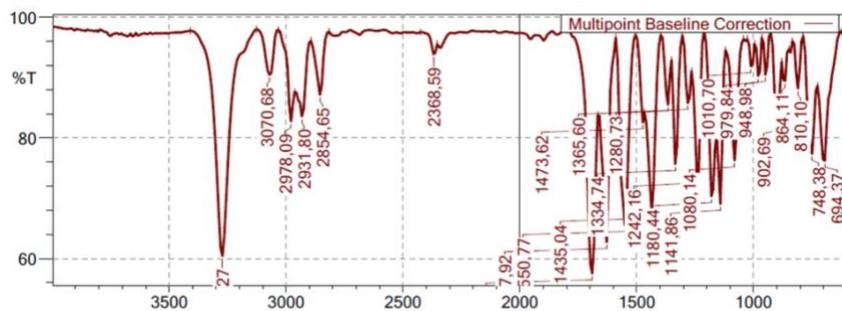
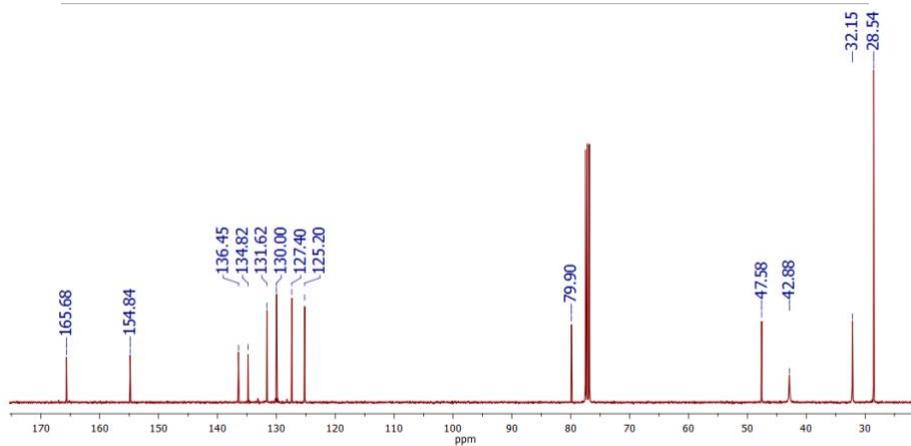
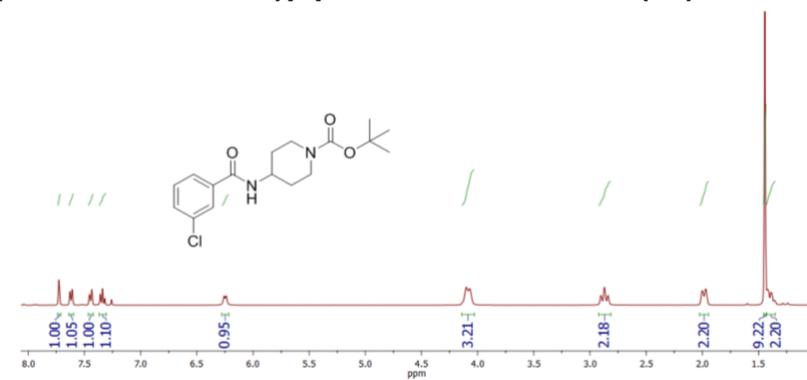


tert-Butyl 4-(2-bromobenzamido)piperidin-1-carboxylate (8c)

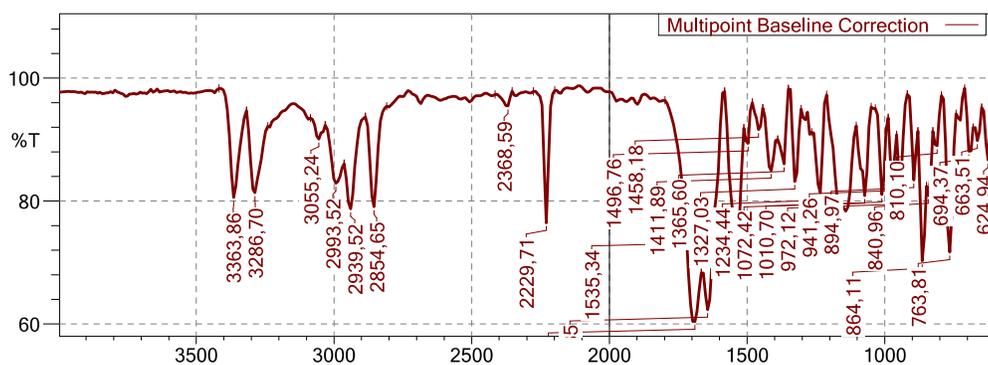
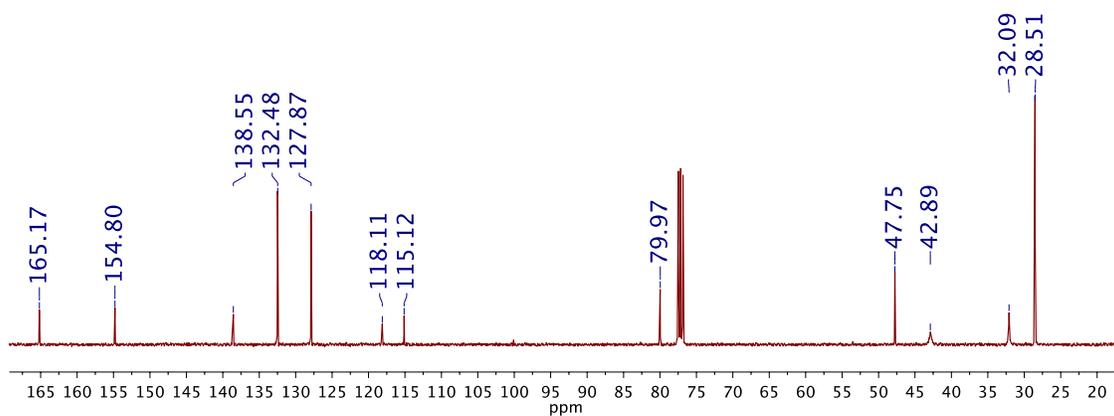
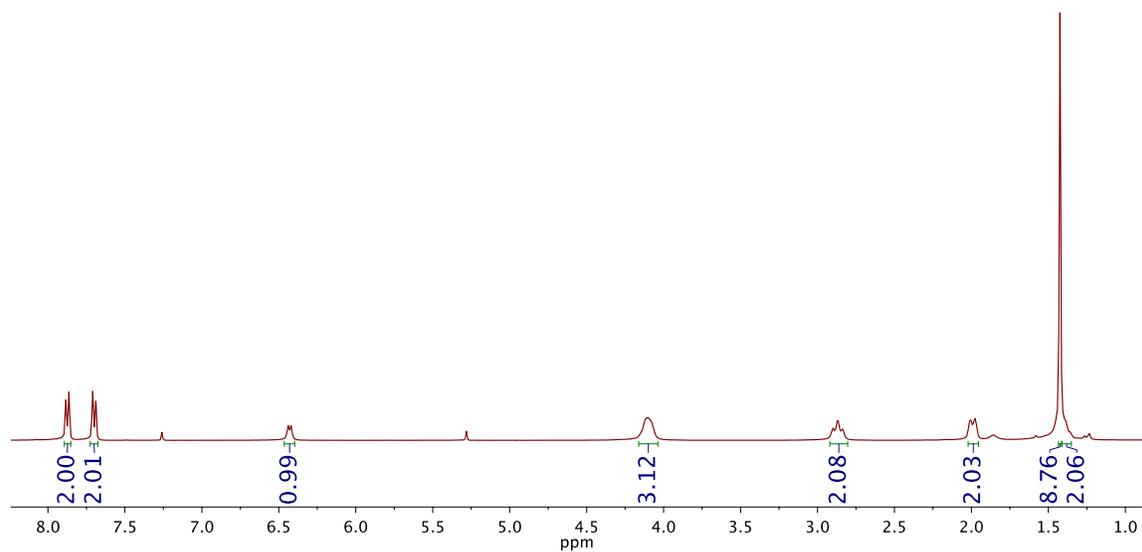




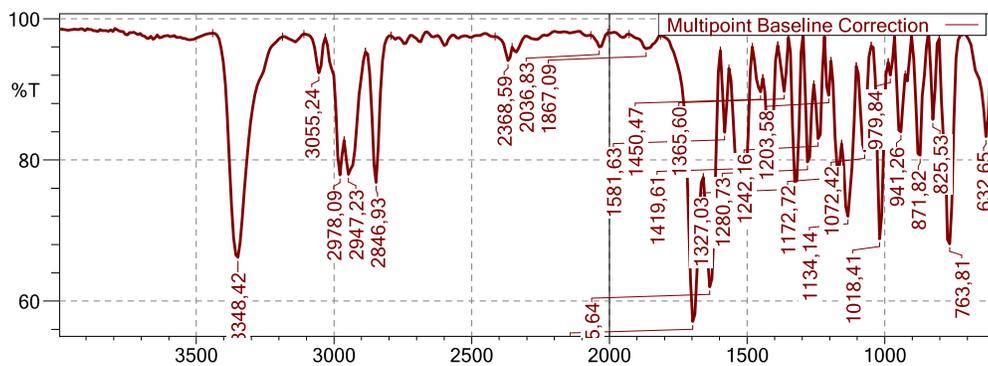
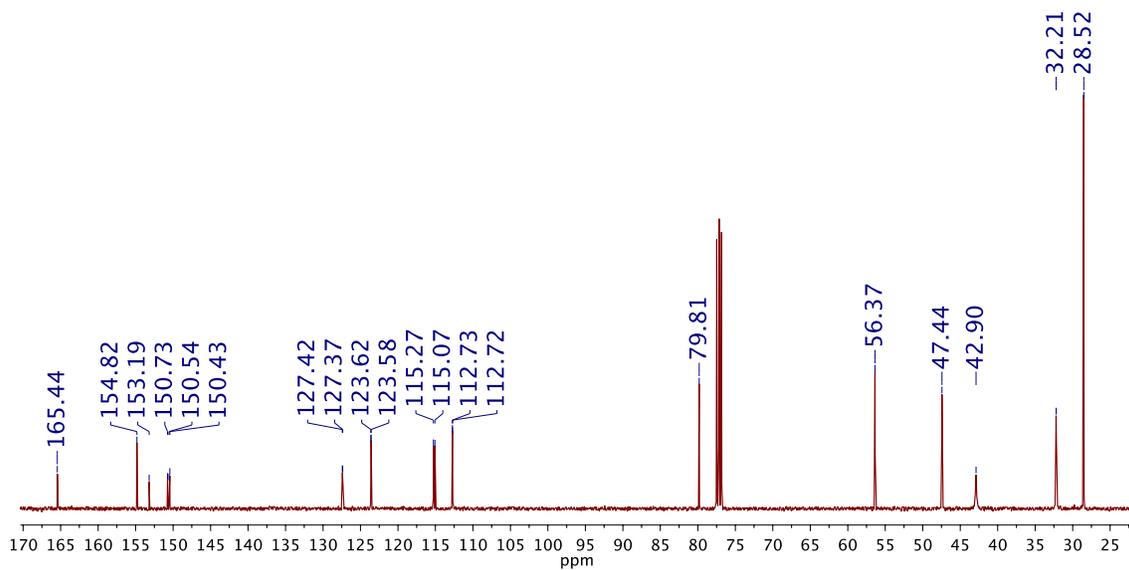
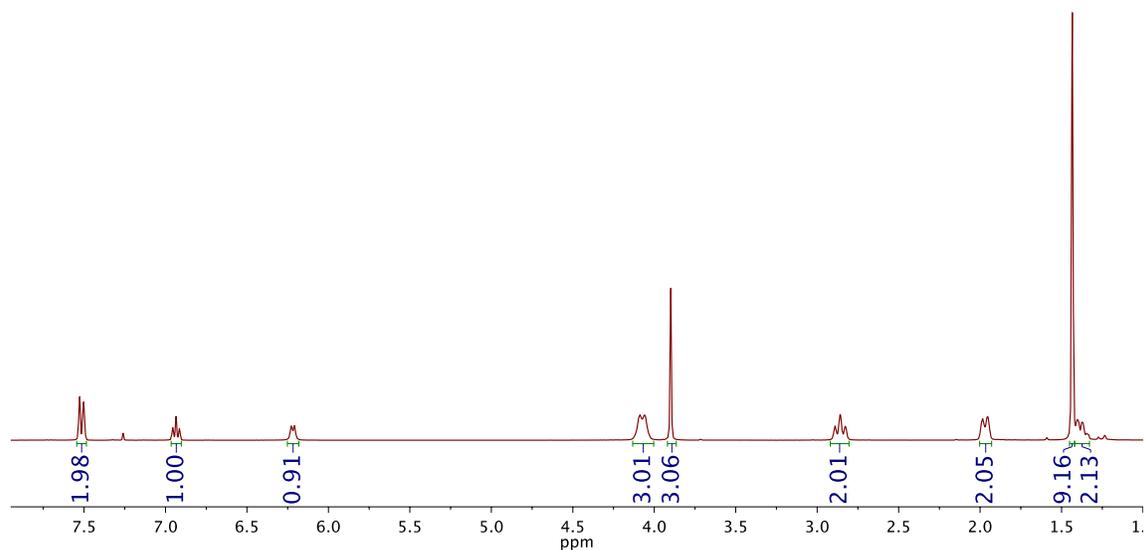
tert-butyl 4-(3-chlorobenzamido)piperidin-1-carboxylate (8d)



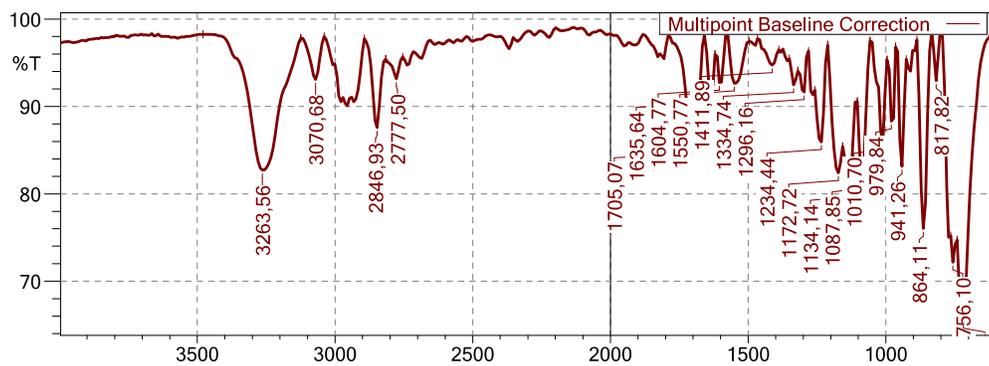
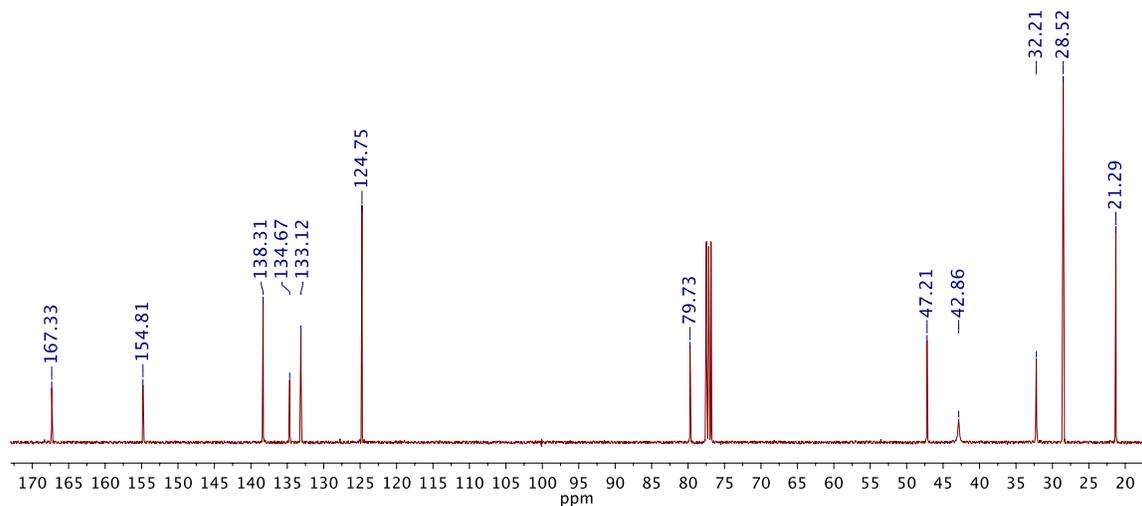
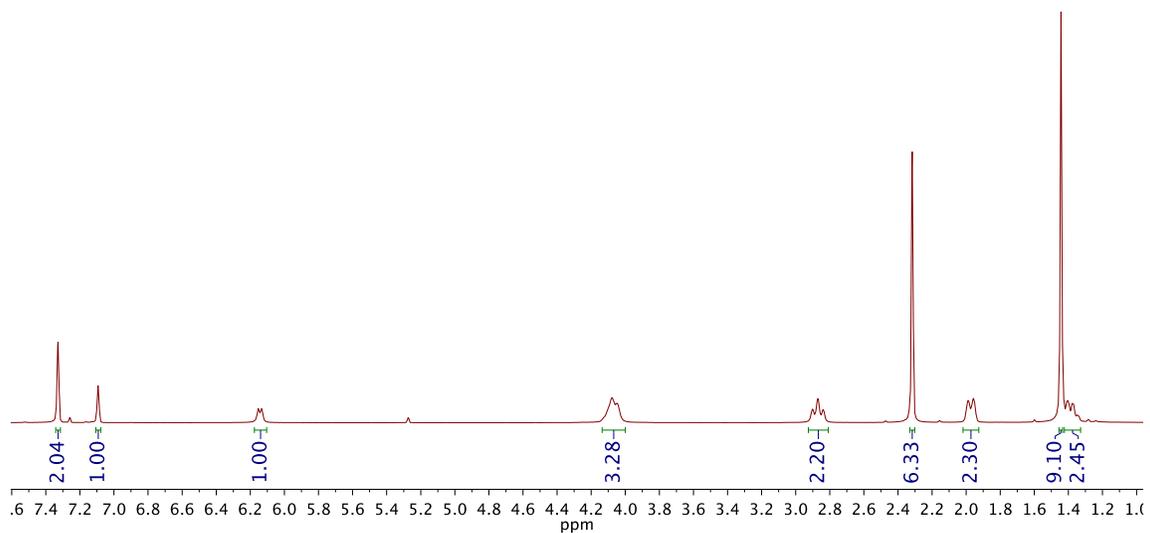
tert-Butil 4-(4-cianobenzamido)piperidin-1-carboxilato (8e)



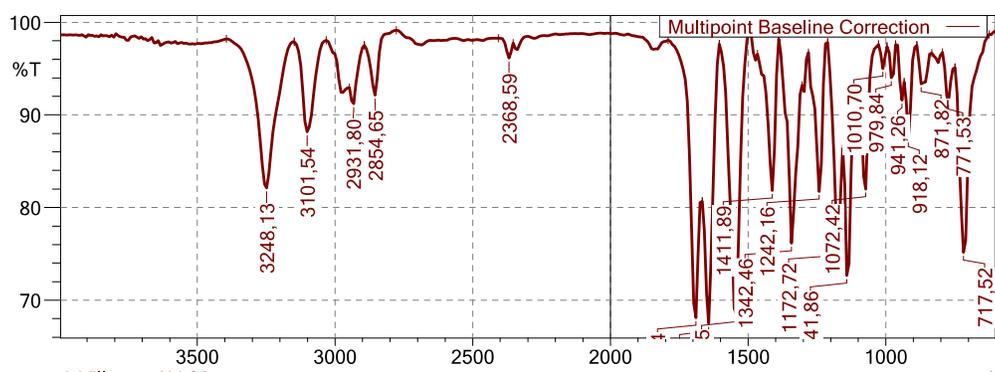
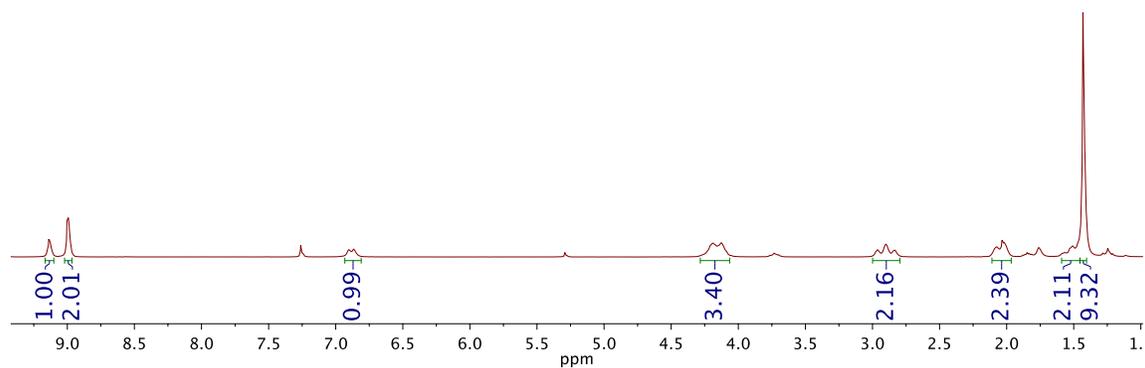
tert-Butil 4-(3-fluoro-4-metoxibenzamido)piperidin-1-carboxilato (8f)



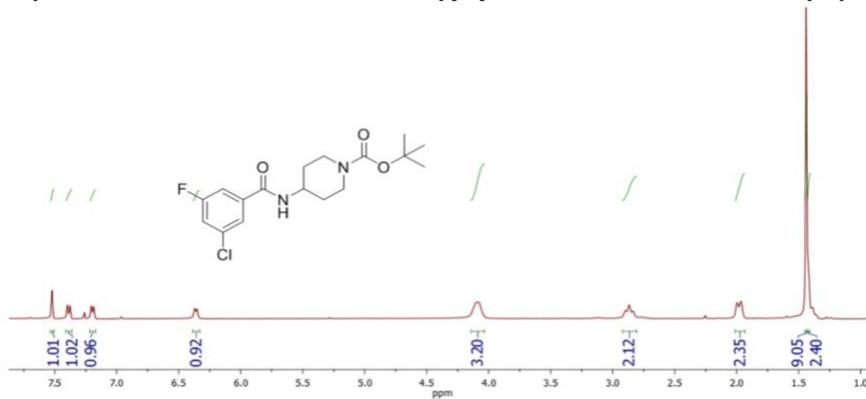
tert-Butil 4-(3,5-dimetilbenzamido)piperidin-1-carboxilato (8g)

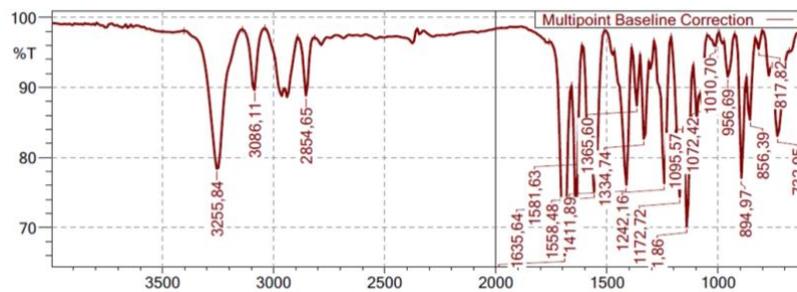
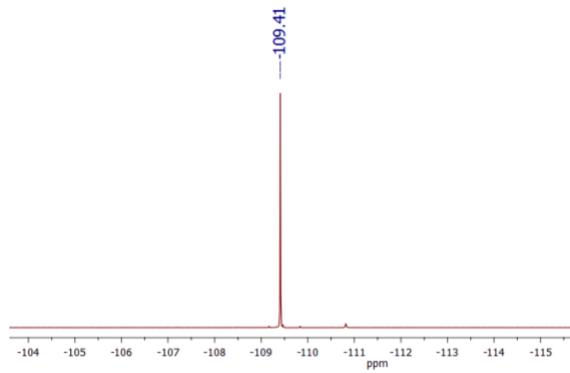
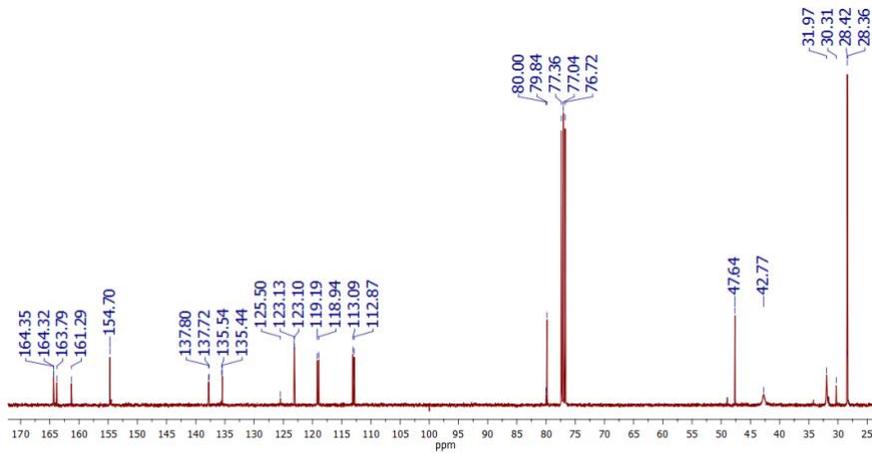


tert-Butil 4-(3,5-dinitrobenzamido)piperidin-1-carboxilato (8h)

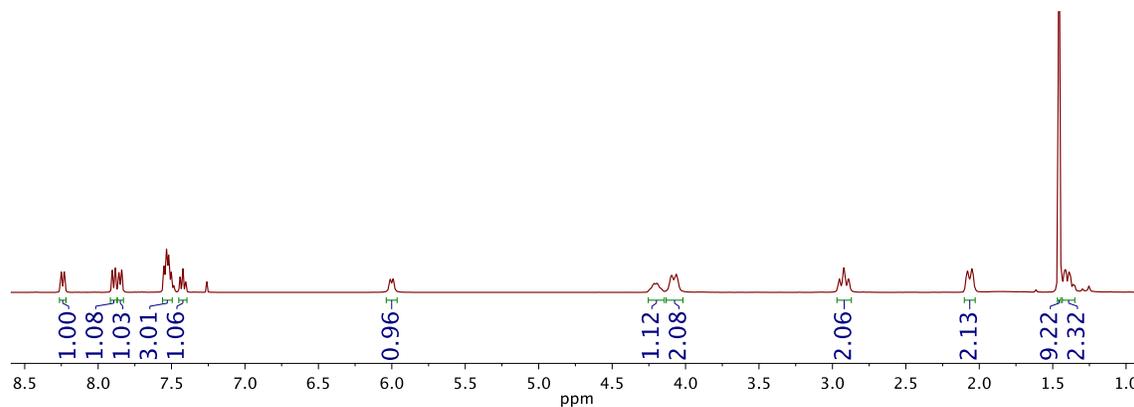


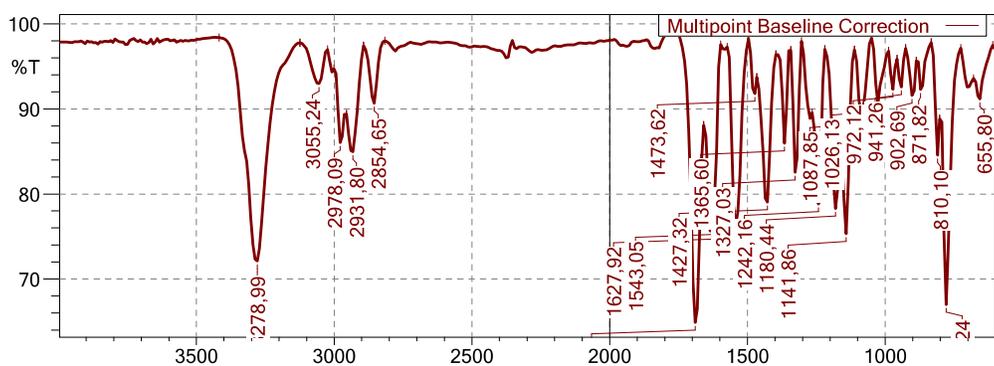
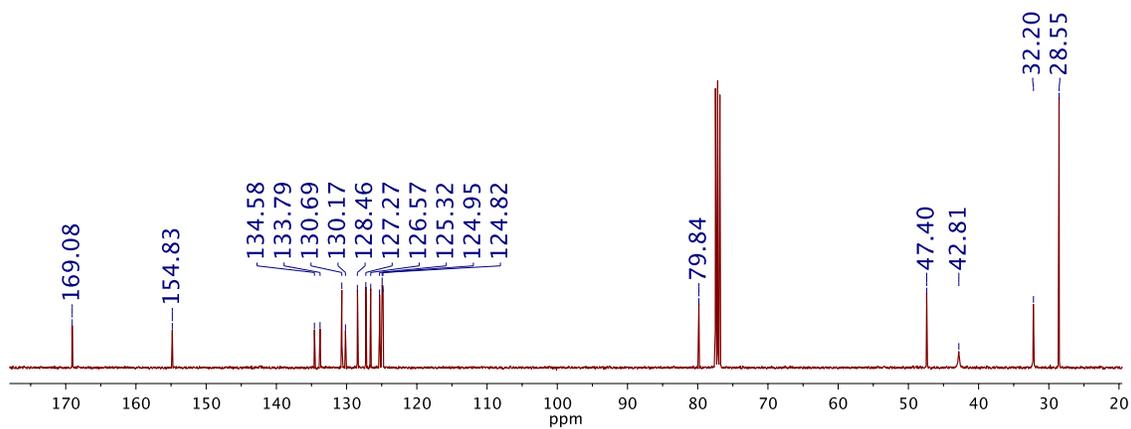
tert-Butil 4-(3-cloro-5-fluorobenzamido)piperidin-1-carboxilato (8i)



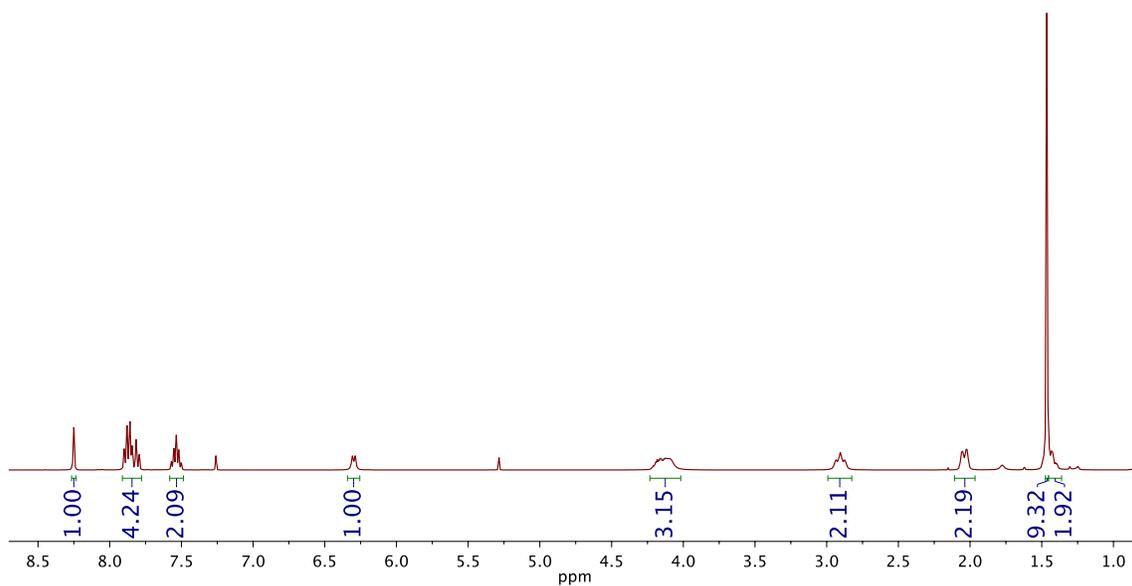


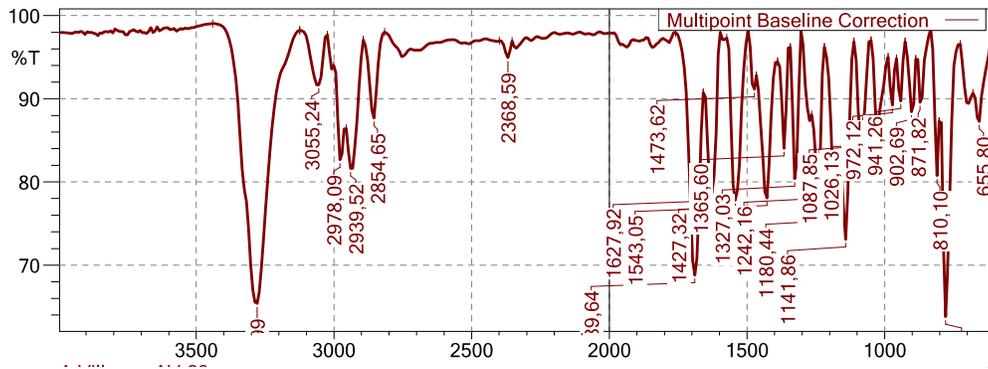
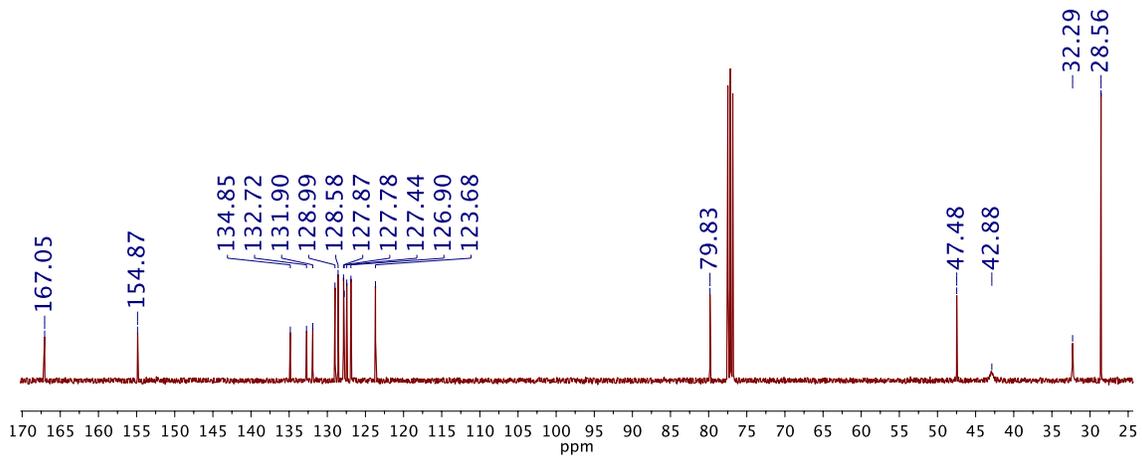
tert-Butyl 4-(1-naftoamido)piperidin-1-carboxylato (8k)



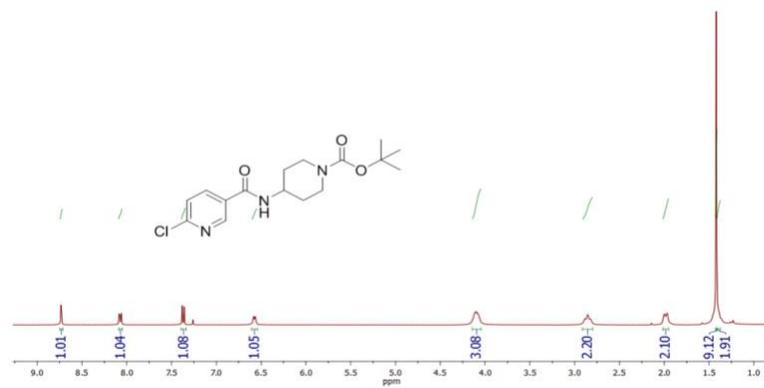


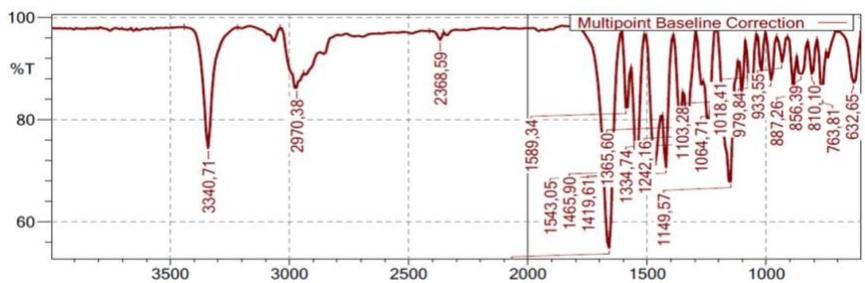
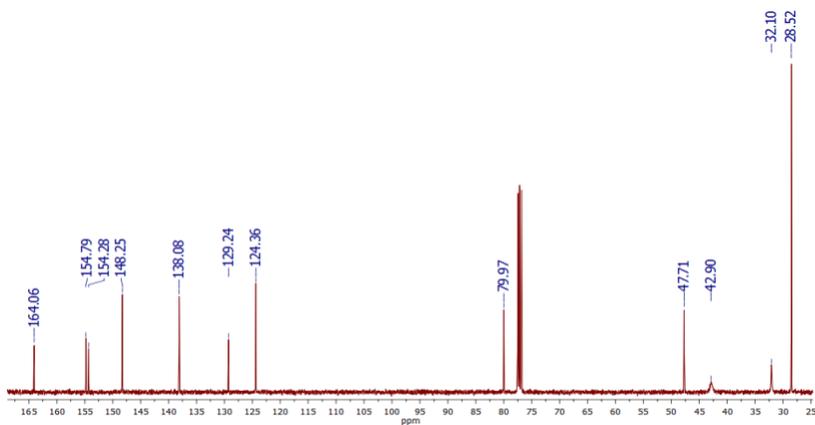
tert-Butyl-4-(2-naftoamido)piperidin-1-carboxilato (8l)



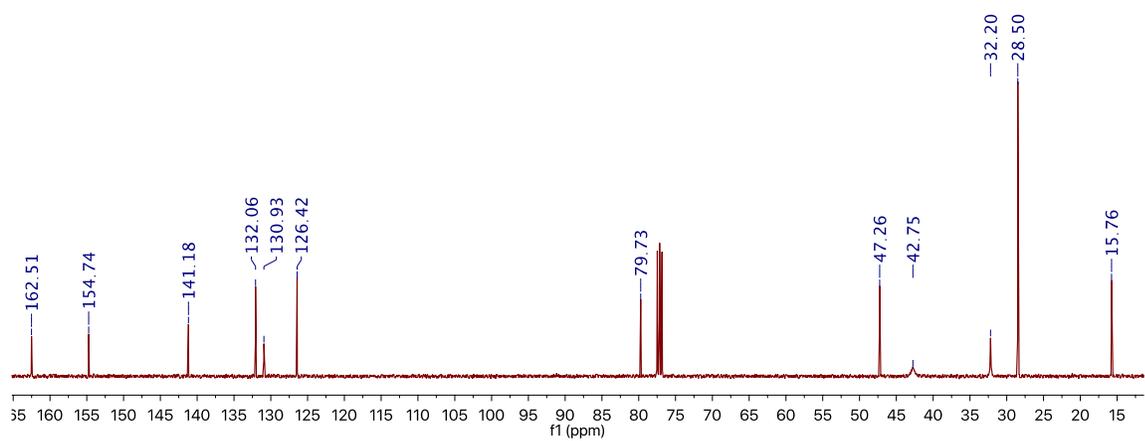
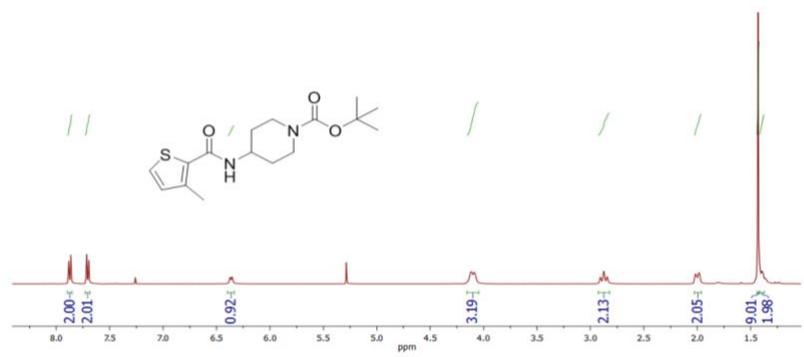


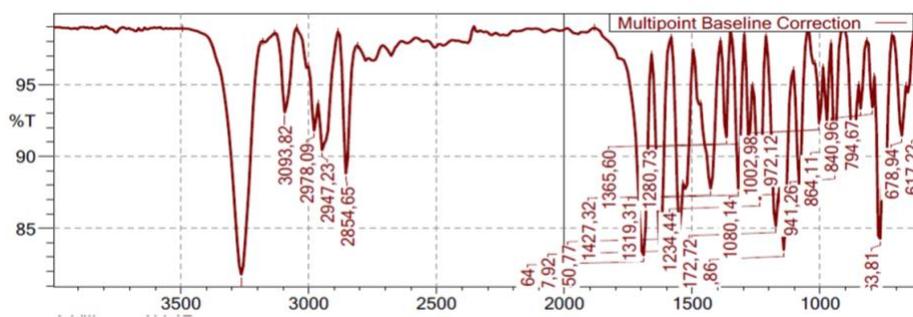
tert-Butil 4-(6-cloronicotinamido)piperidin-1-carboxilato (8m)



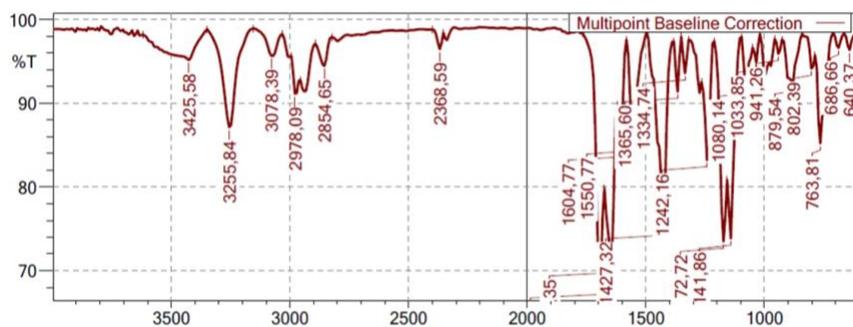
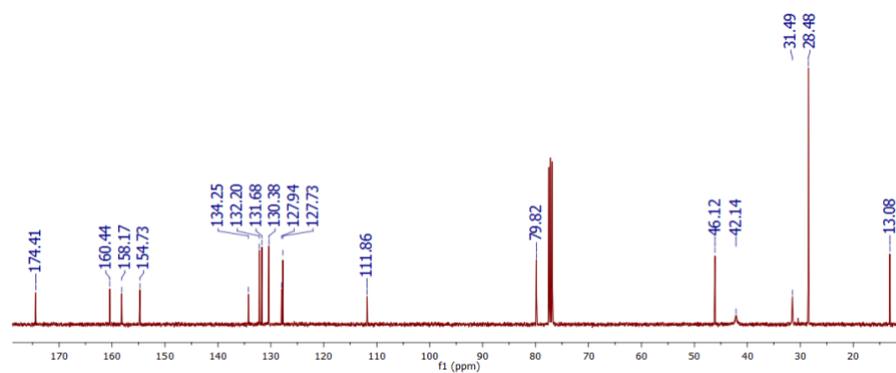
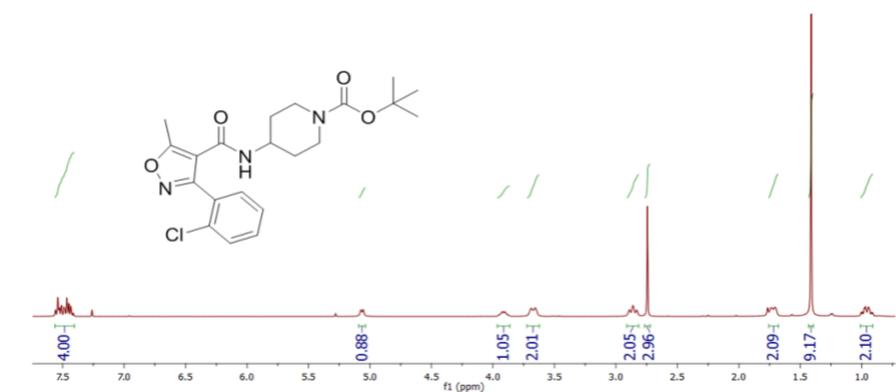


tert-Butil 4-(3-metilthiopheno-2-carboxamido)piperidin-1-carboxilato (8n)

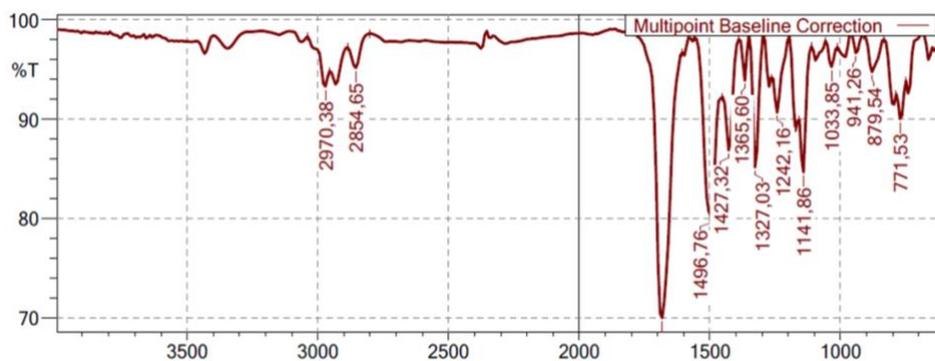
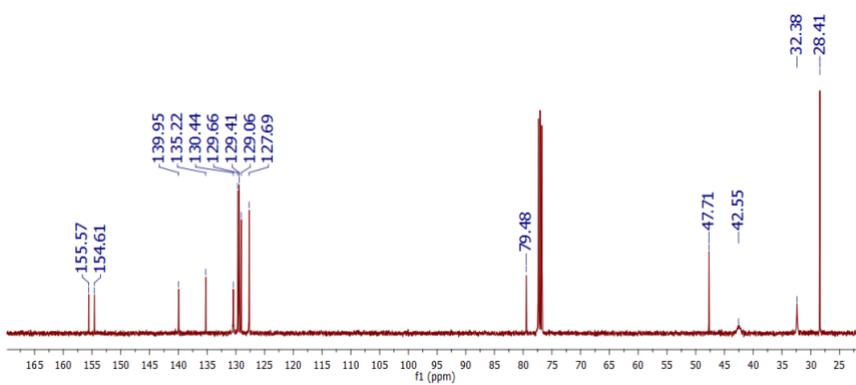
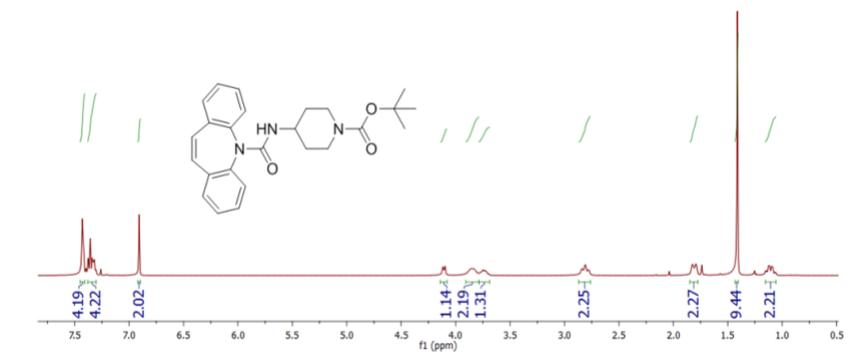




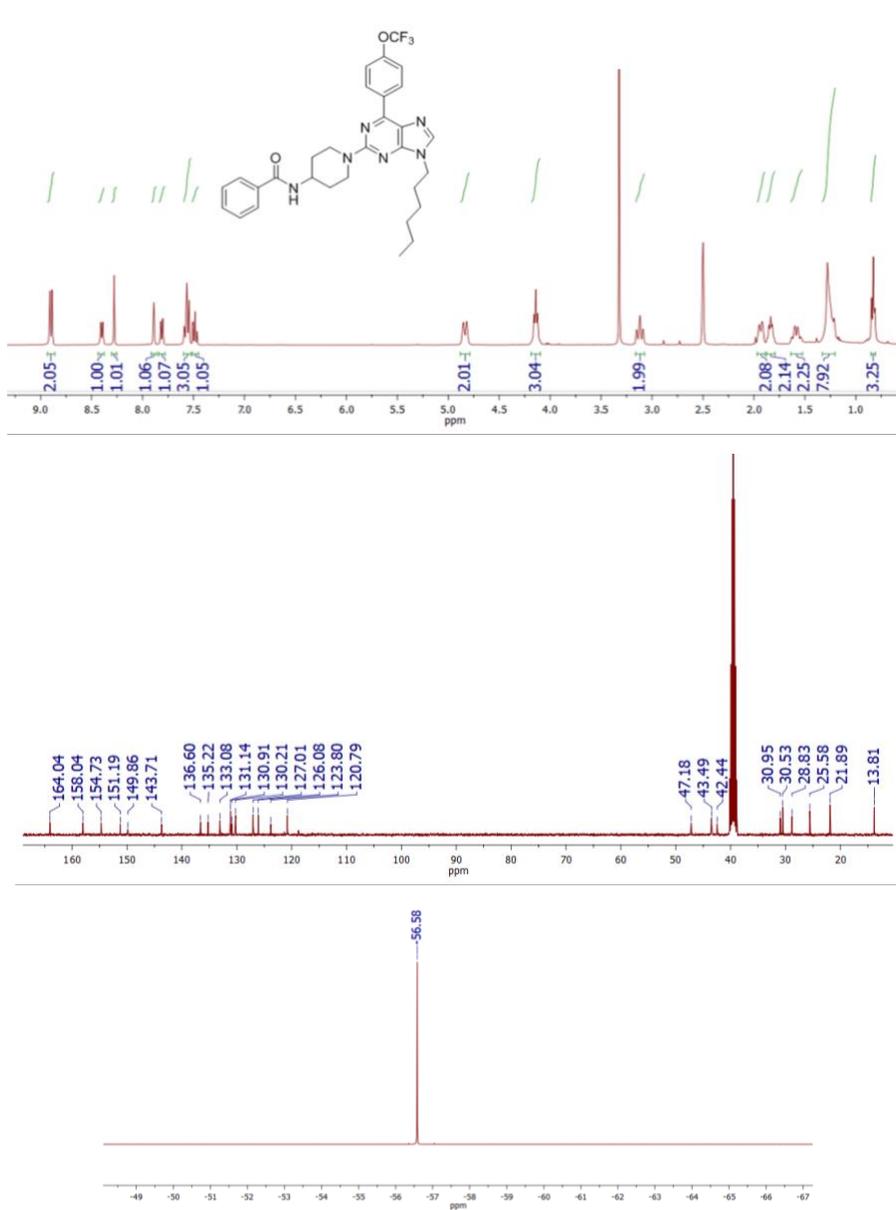
***tert*-Butil-4-(3-(2-clorofenil)-5-metilisoxazol-4-carboxamido)piperidin-1-carboxilato (8o)**

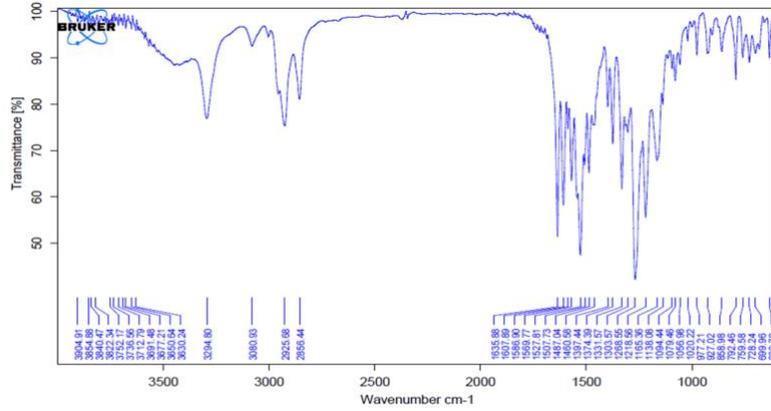


tert-Butyl-4-(5H-dibenzo[b,f]azepin-5-carboxamido)piperidin-1-carboxilato (8p)

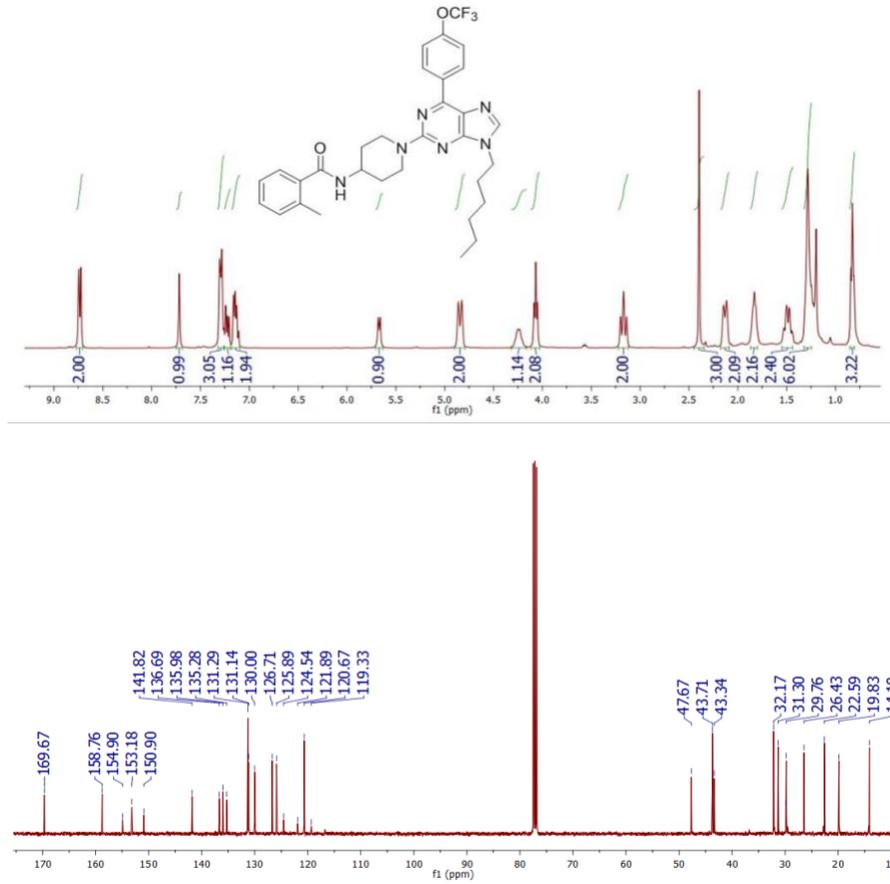


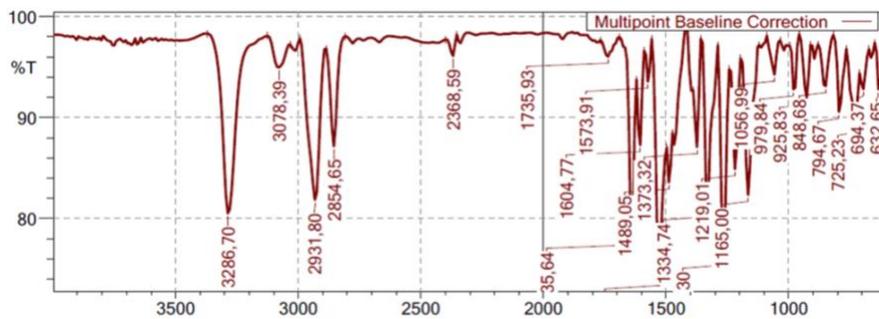
***N*-(1-(9-hexil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9*H*-purin-2-il)piperidin-4-il) benzamida (9a)**



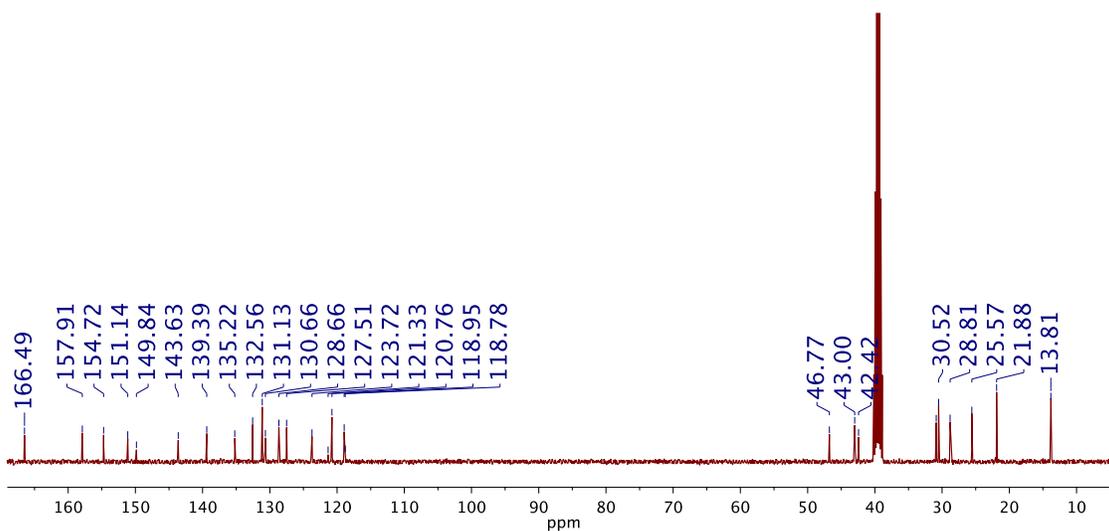
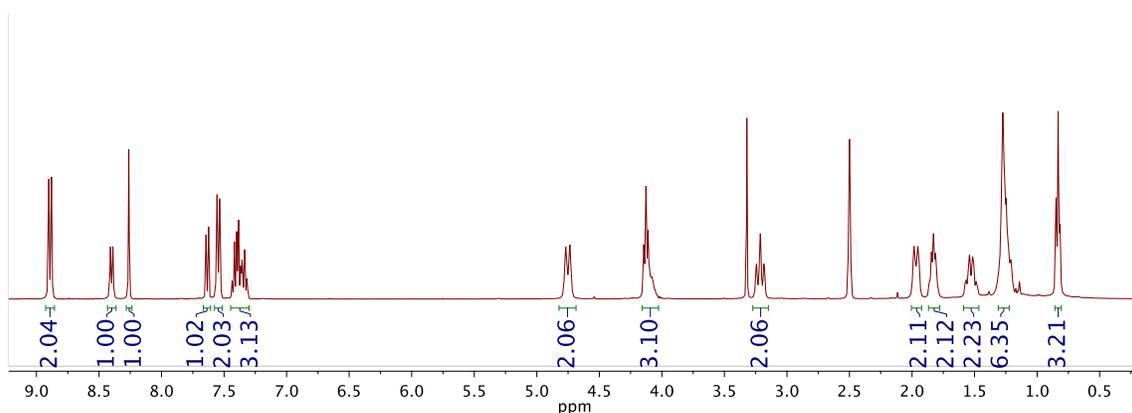


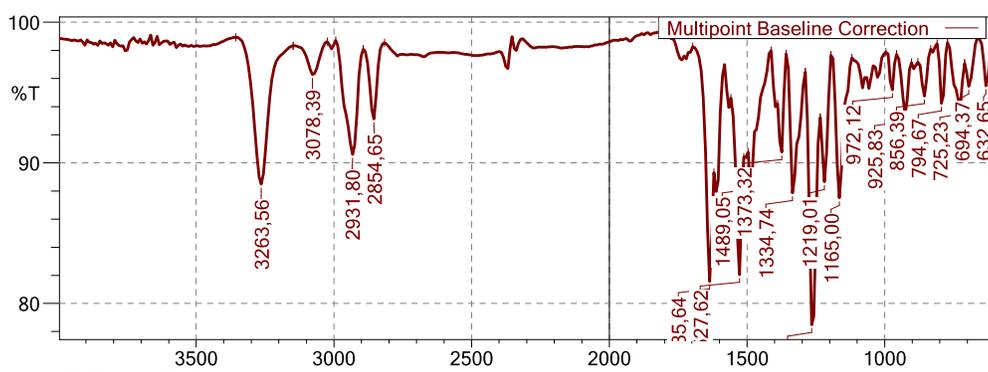
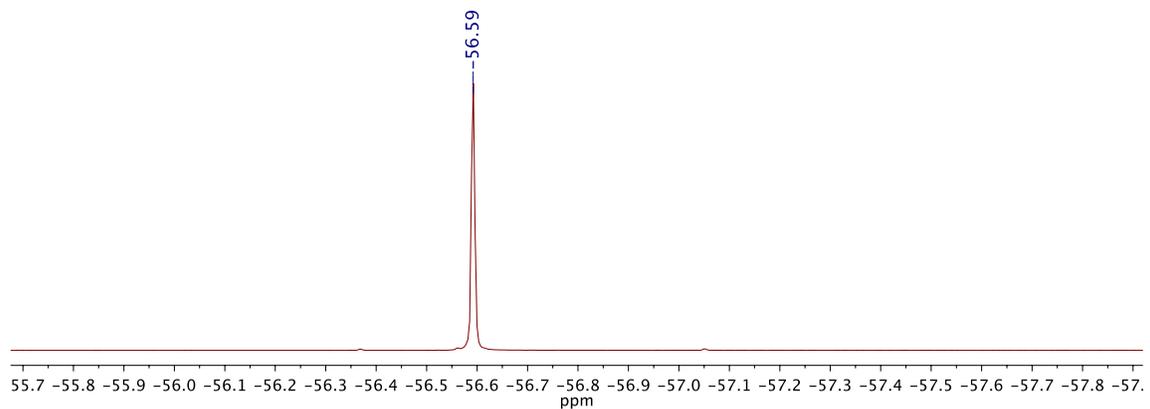
***N*-(1-(9-hexyl-6-(4-(trifluoromethoxy)fenil)-9*H*-purin-2-il)piperidin-4-il)-2-metilbenzamida (9b)**



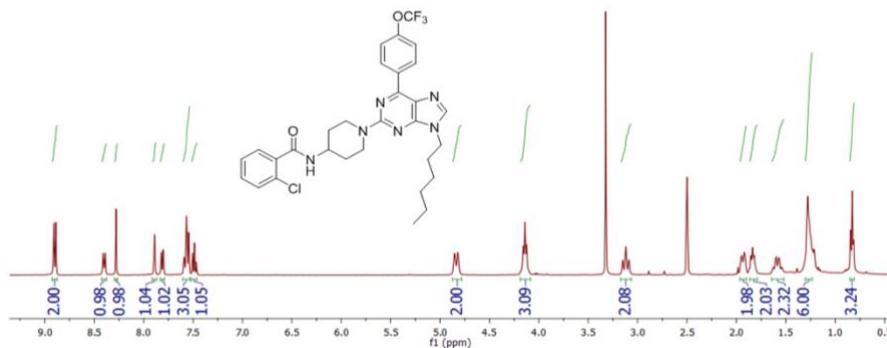


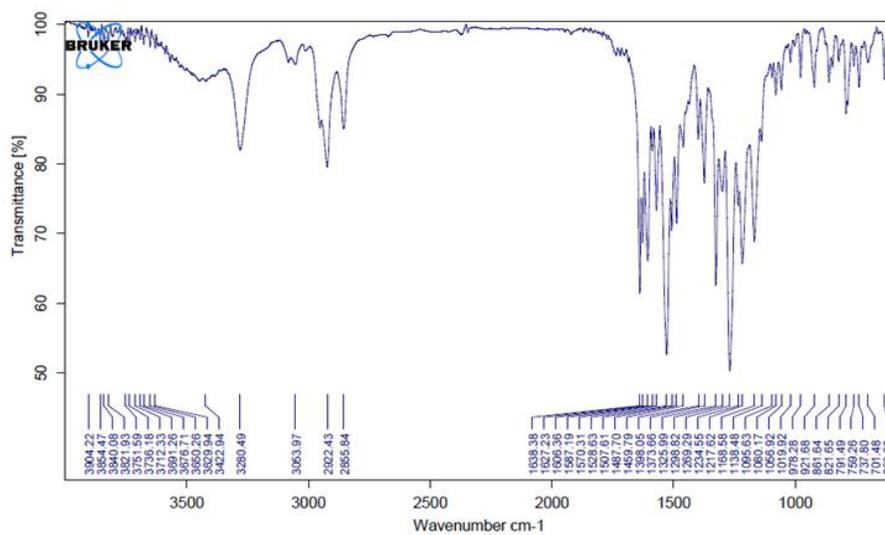
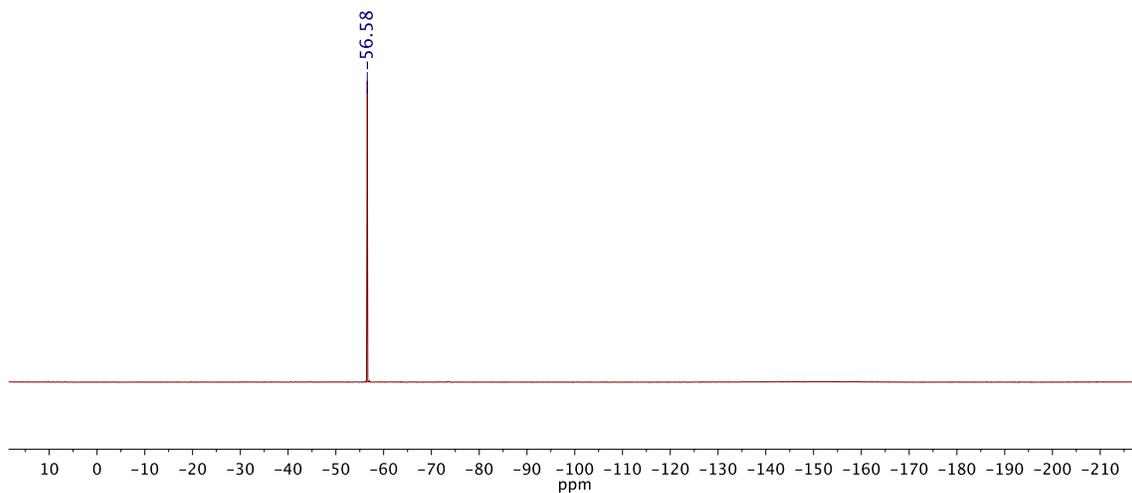
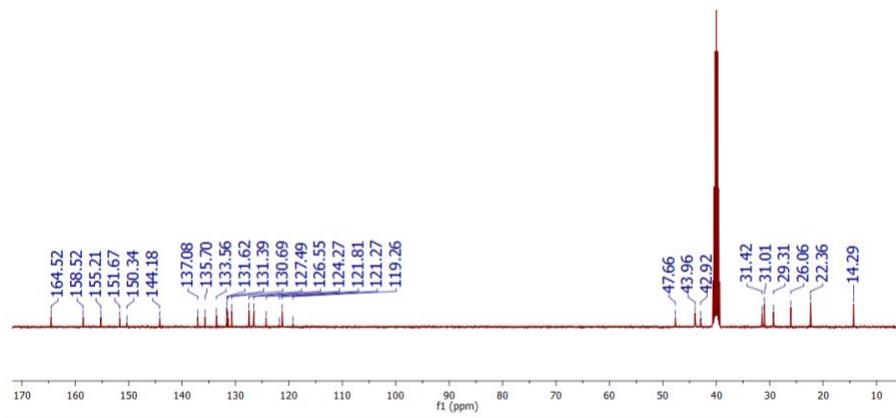
2-Bromo-N-(1-(9-hexil-6-(4-(trifluoromethoxy)phenyl)-9H-purin-2-yl)piperidin-4-yl)benzamide (9c)



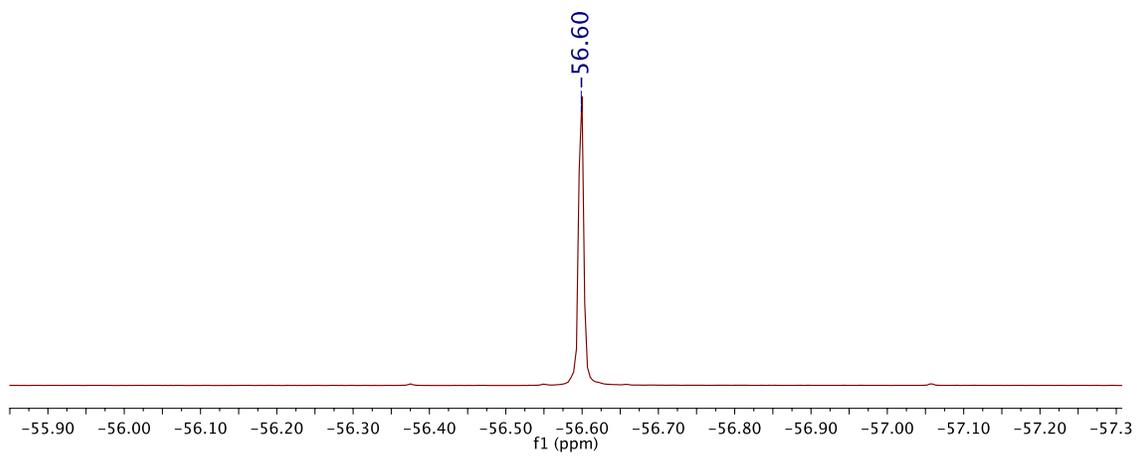
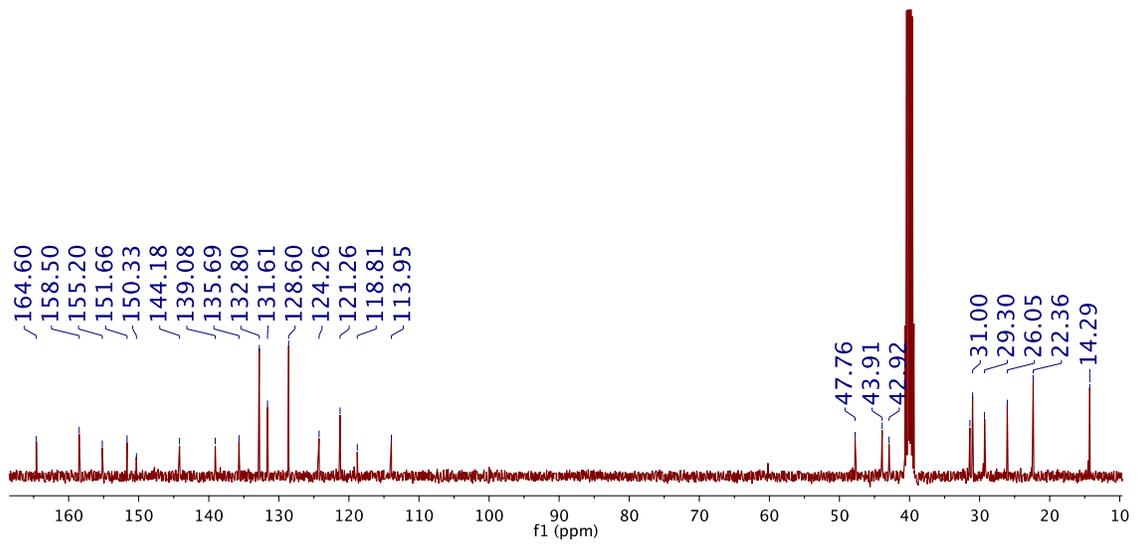
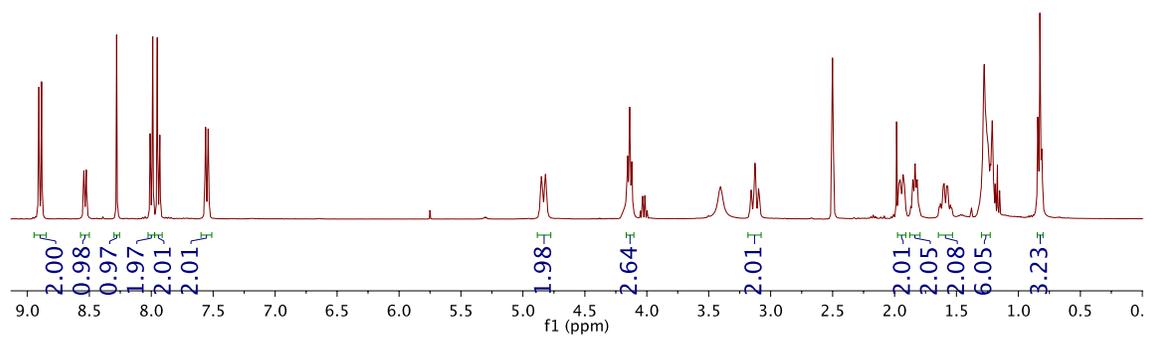


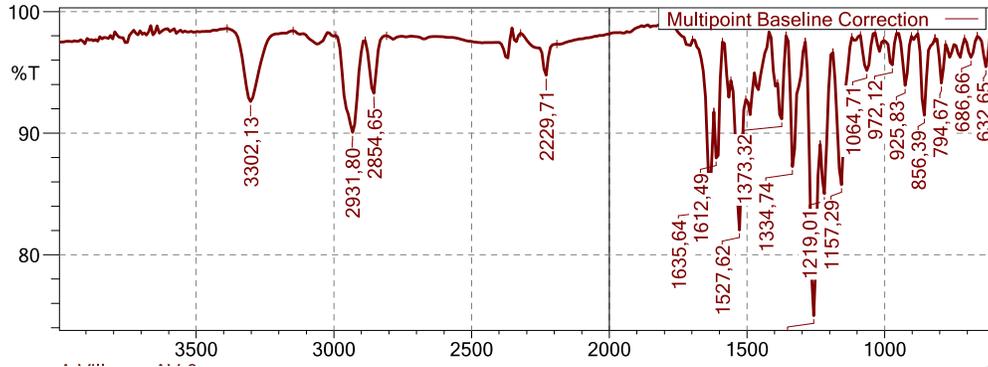
3-Cloro-N(1-(9-hexanoil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9H-purin-2-il) piperidin-4-il) benzamida (9d)



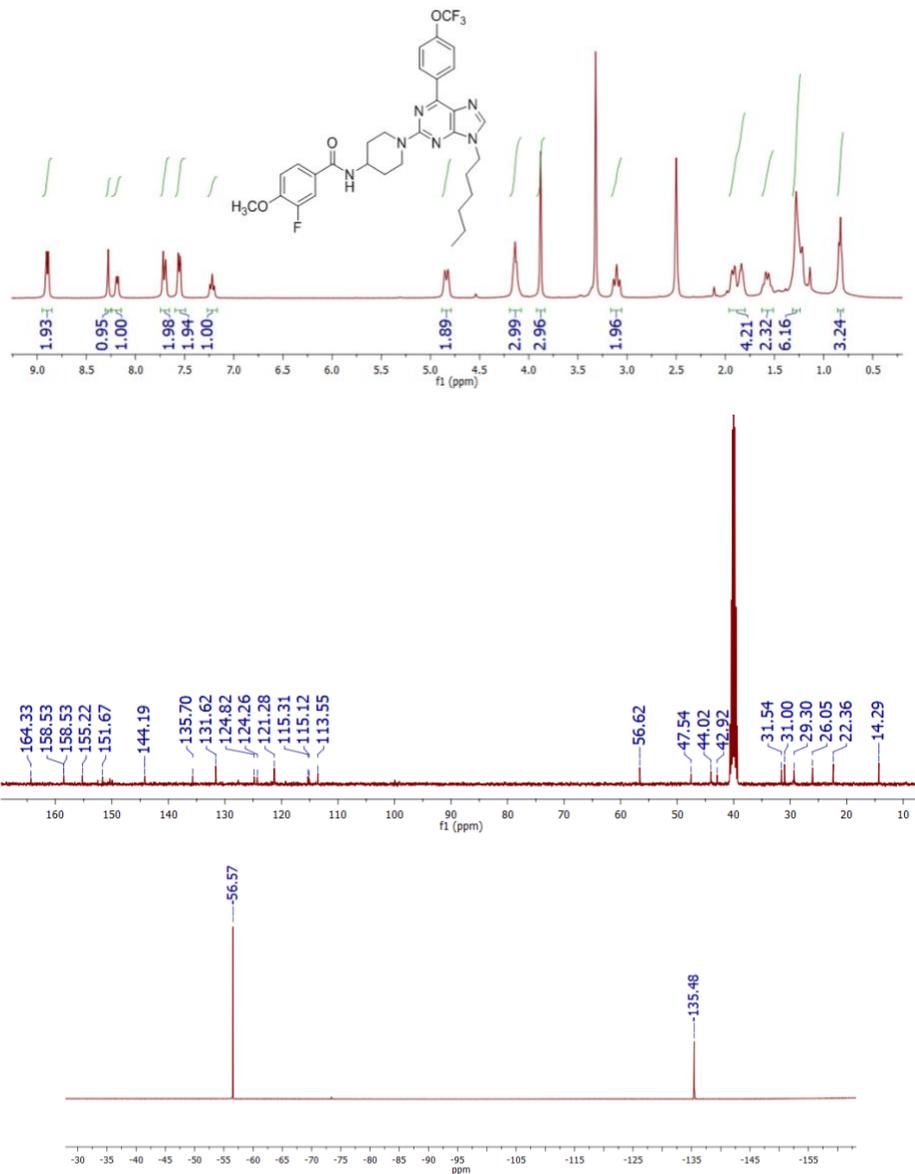


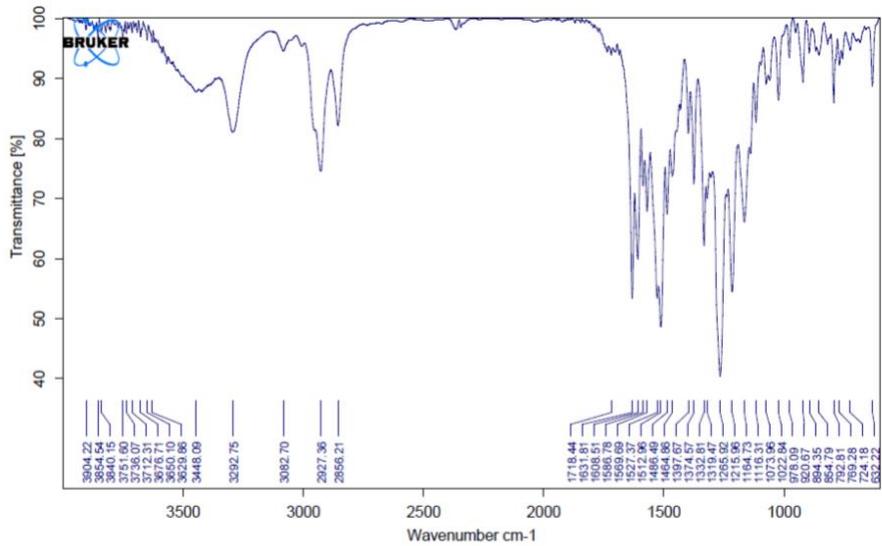
4-Ciano-*N*-(1-(9-hexil-6-(4-(trifluoromethoxy)fenil)-9*H*-purin-2-il)piperidin-4-il)benzamida (9e)



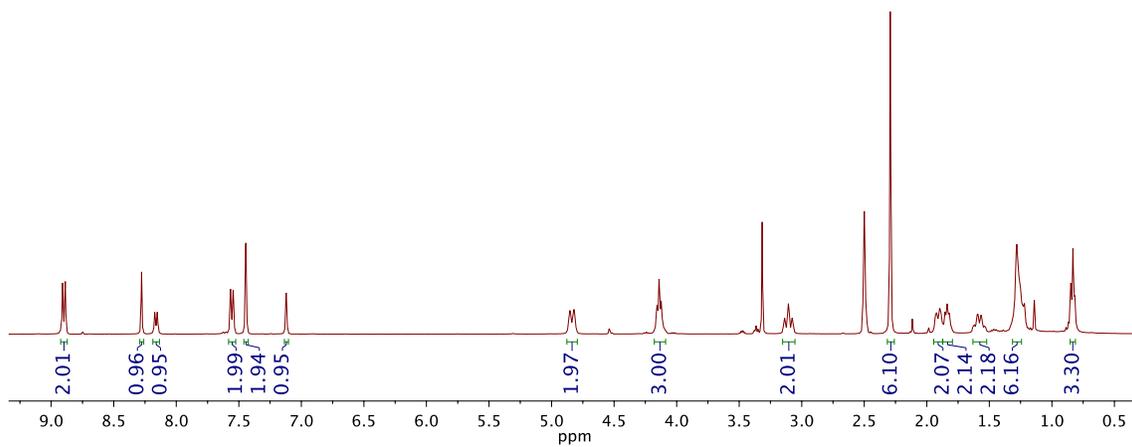


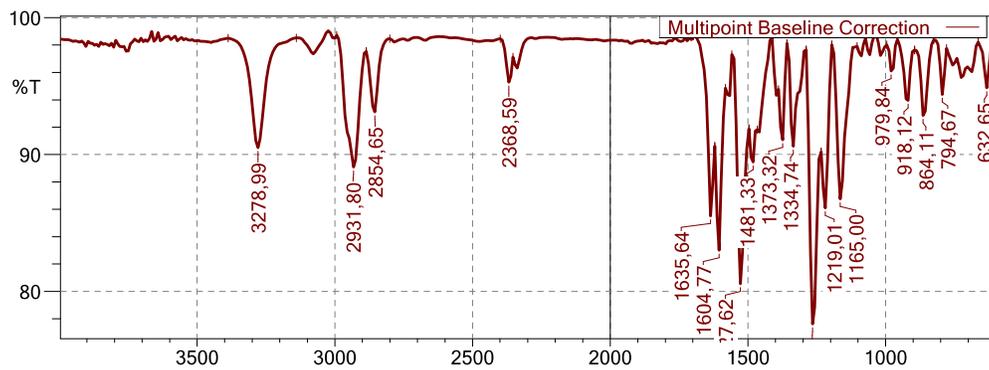
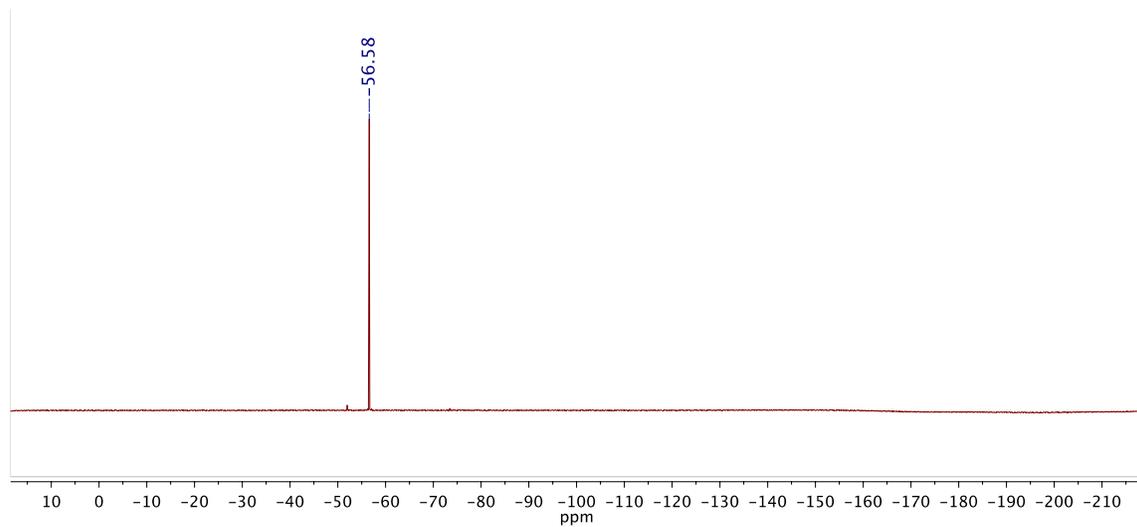
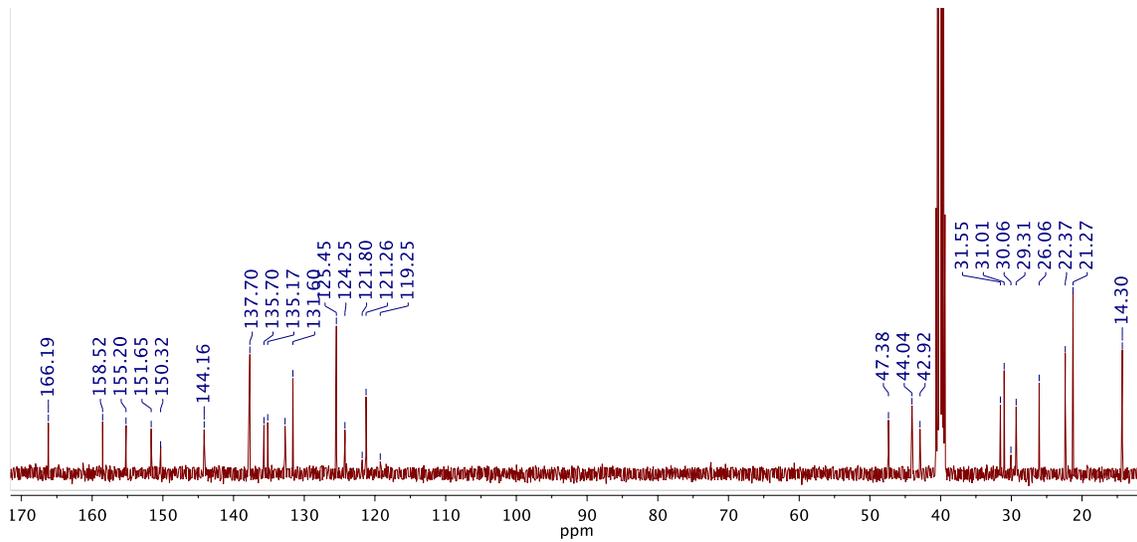
3-Fluoro-N-(1-(9-hexil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9H-purin-2-il)piperidin-4-il)-4-metoxibenzamida (9f)



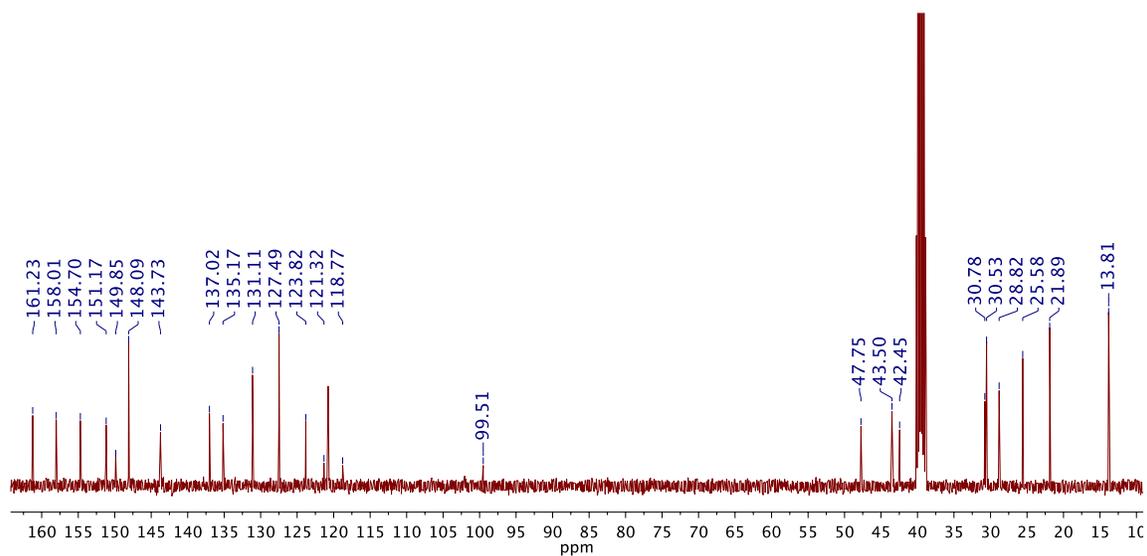
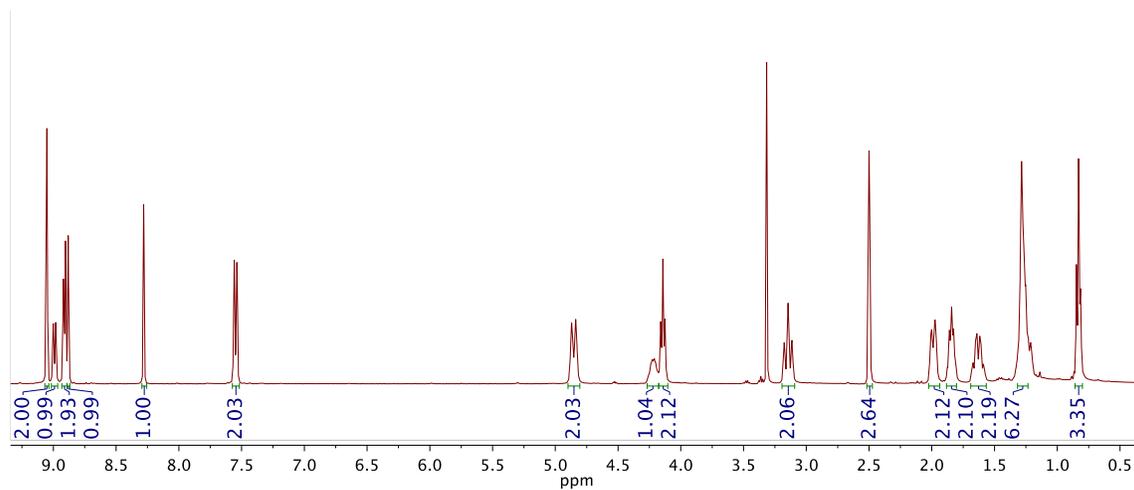


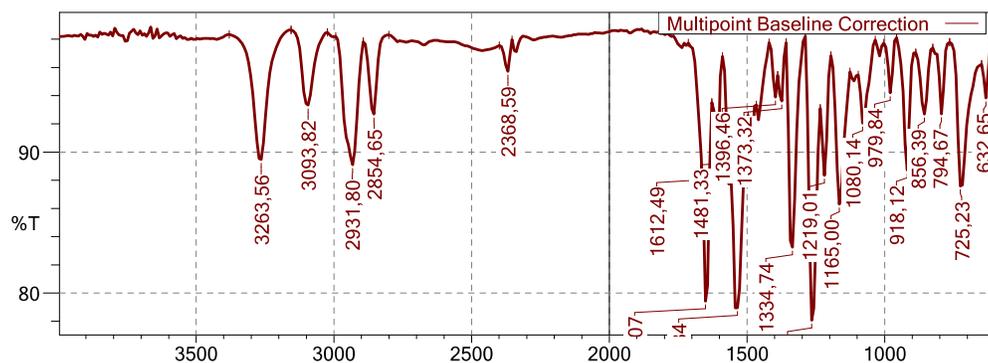
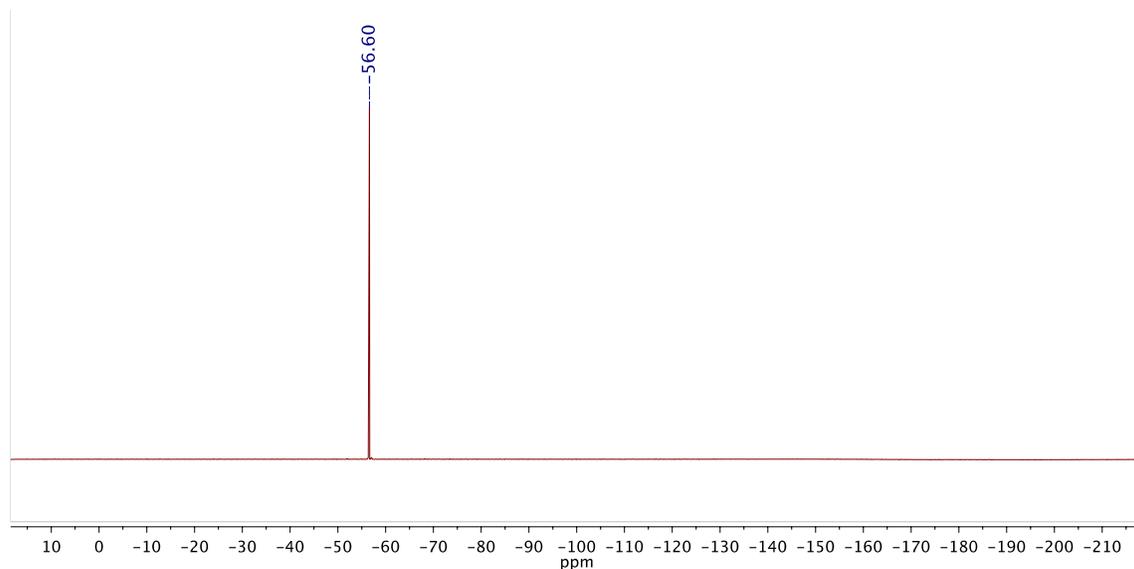
***N*-(1-(9-hexil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9*H*-purin-2-il)piperidin-4-il)-3,5-dimetilbenzamida (9g)**



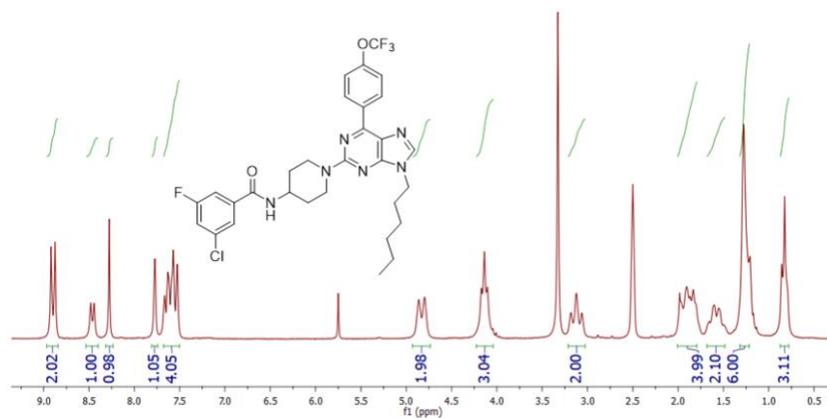


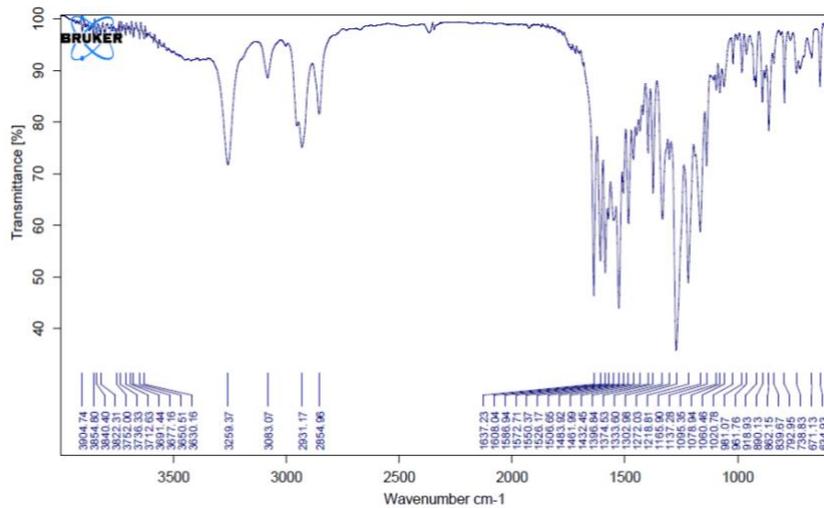
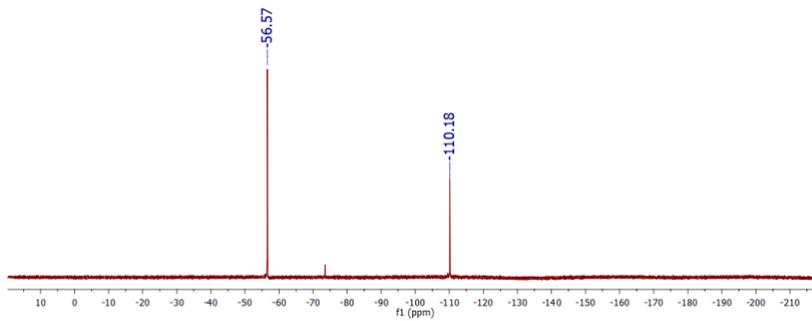
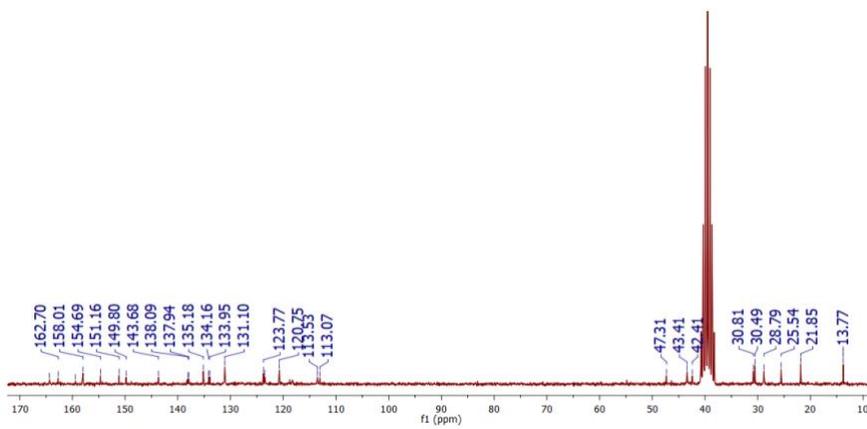
***N*-[1-(9-hexil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9*H*-purin-2-il)piperidin-4-il]-3,5-dinitrobenzamida (9h)**



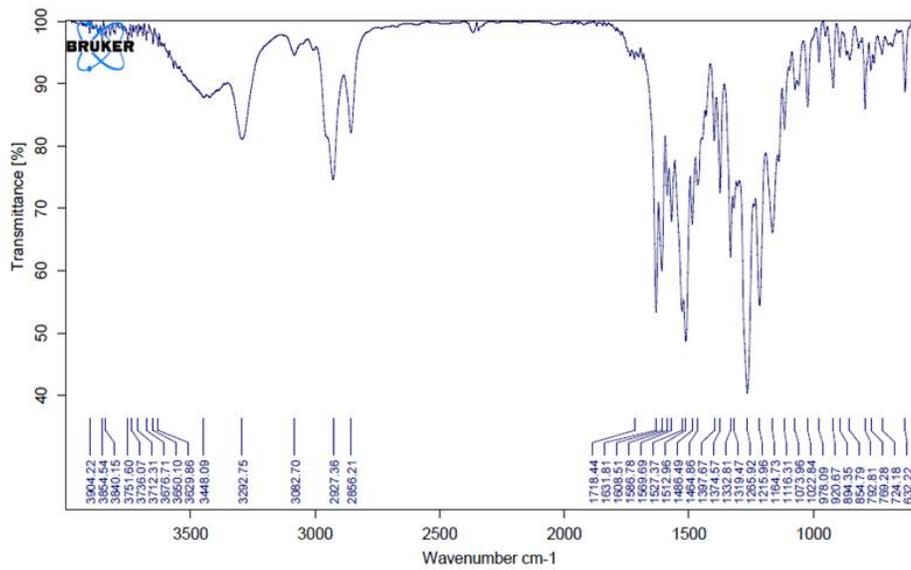
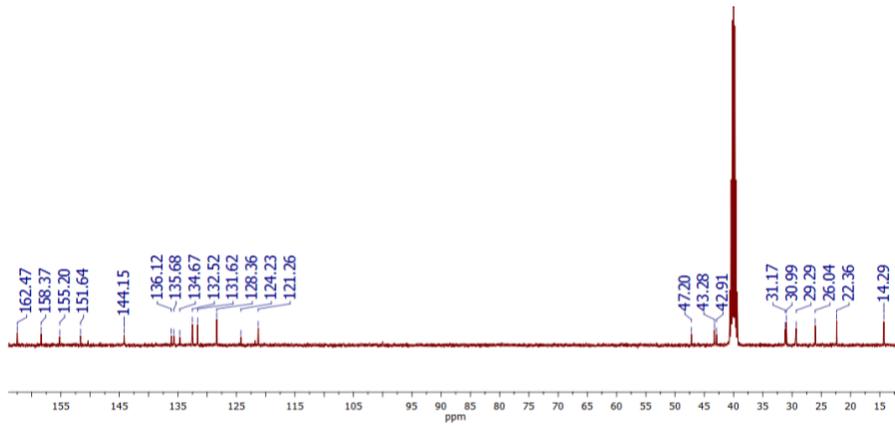
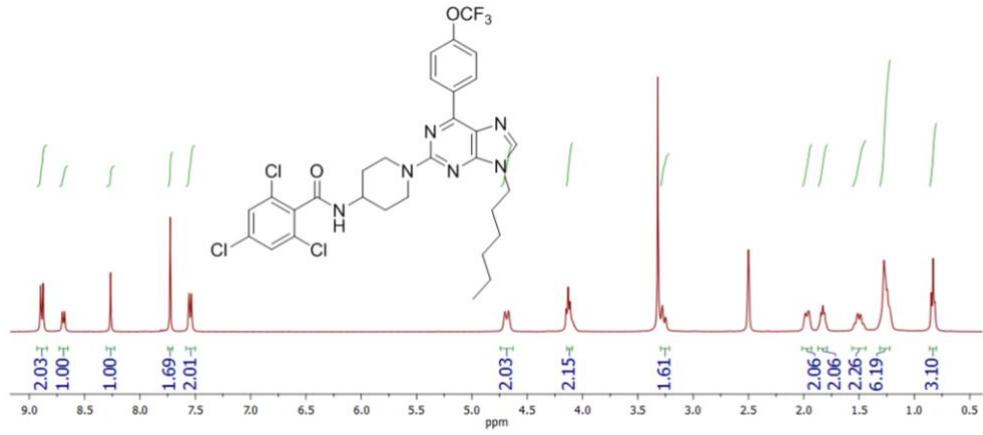


3-Cloro-5-fluoro-N-(1-(9-hexil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9H-purin-2-il) piperidin-4-il)benzamida (9i)

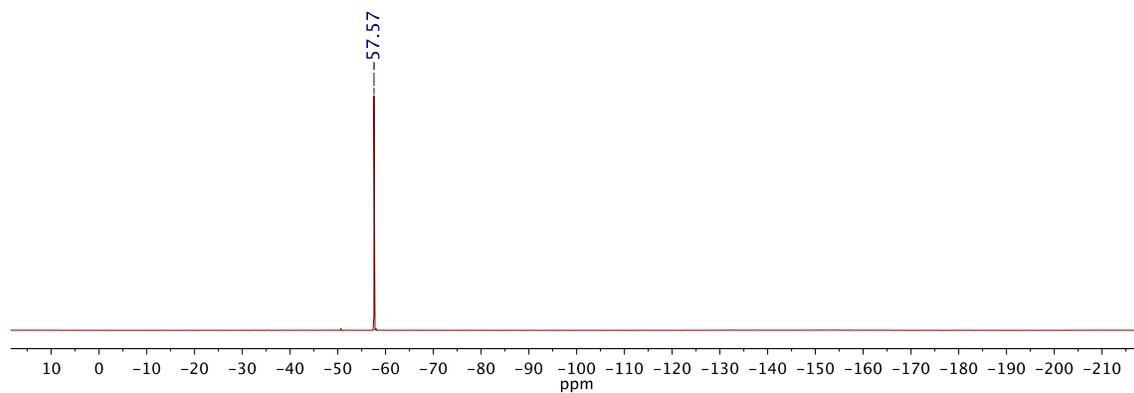
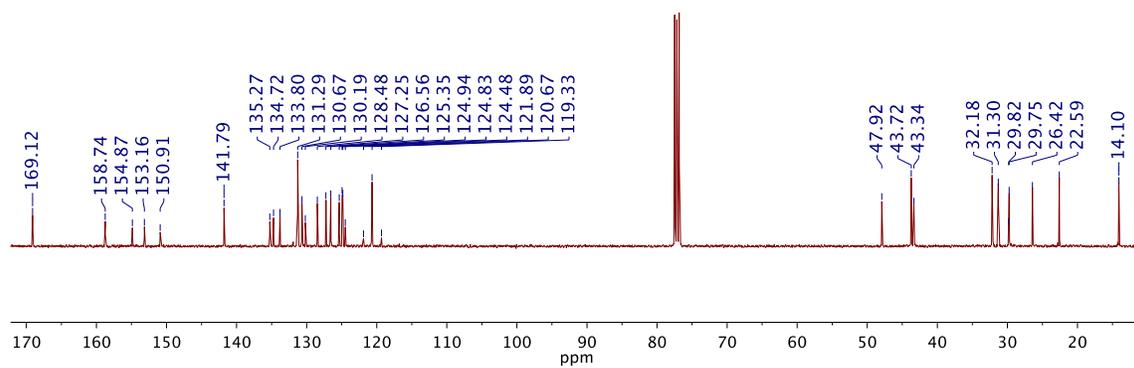
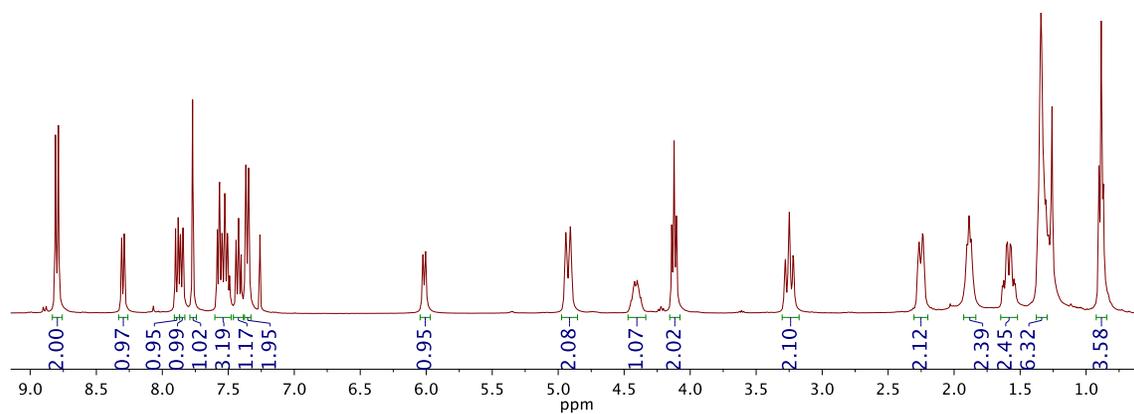


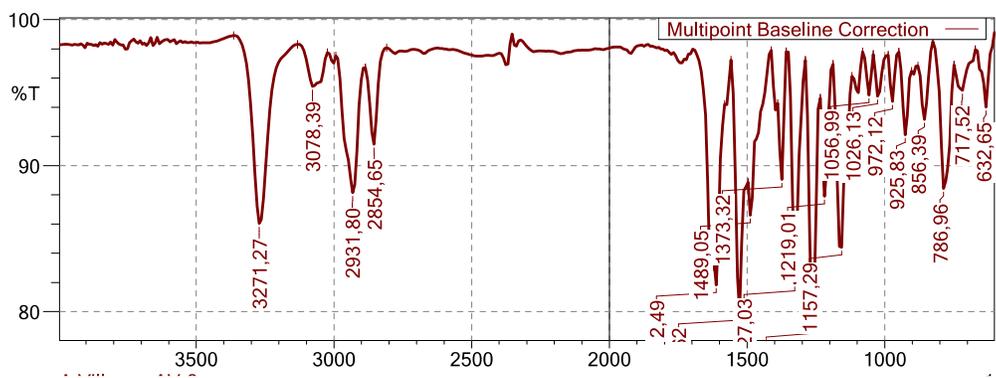


2,4,6-Trichloro-N-(1-(9-hexyl-6-(4-(trifluoromethoxy)fenyl)-9H-purin-2-il) piperidin-4-il)benzamida (9j)

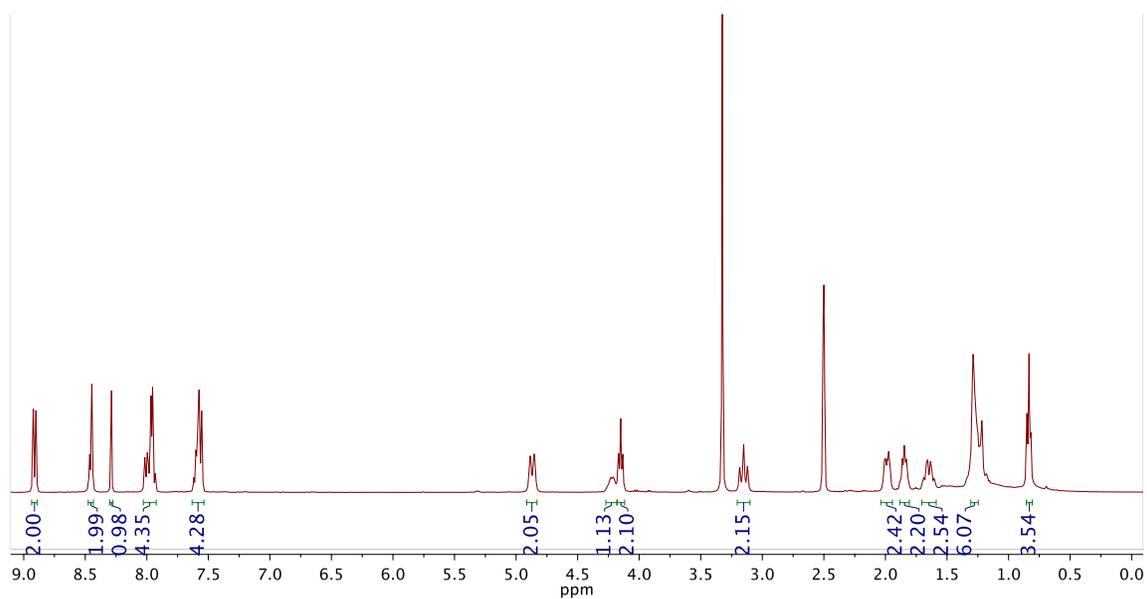


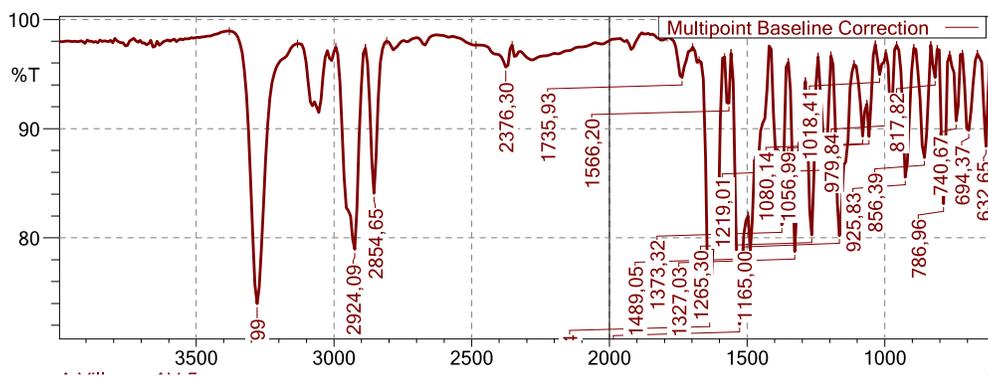
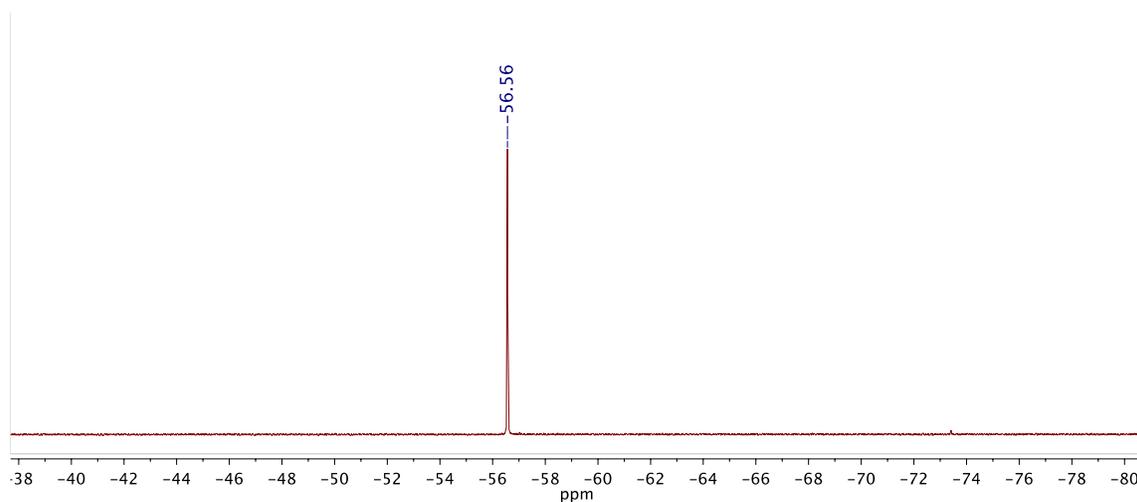
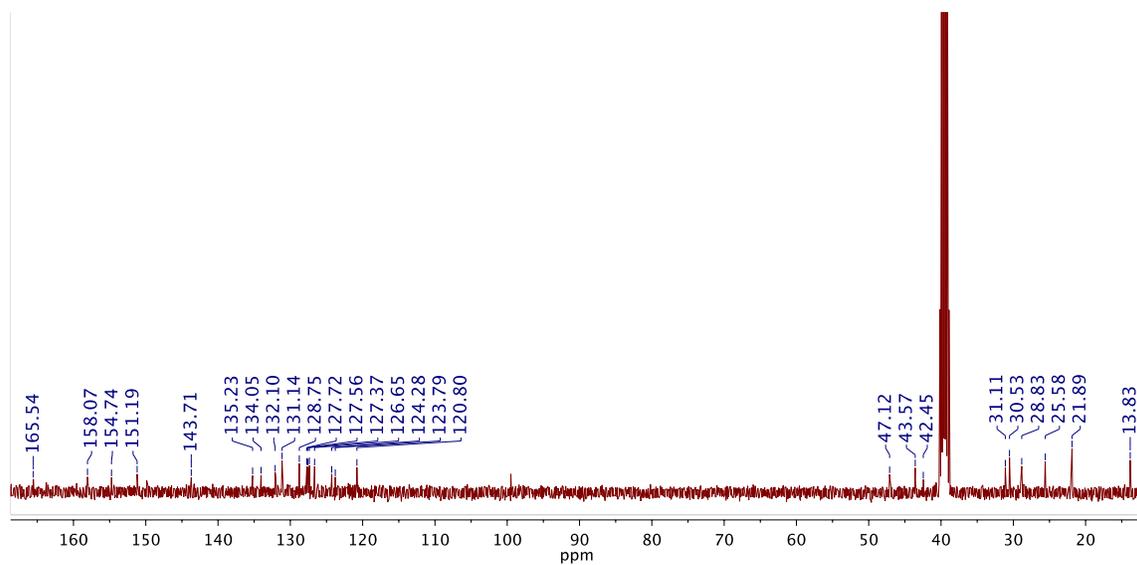
***N*-1-(9-hexil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9*H*-purin-2-il)piperidin-4-il)-1-naftamida (9k)**



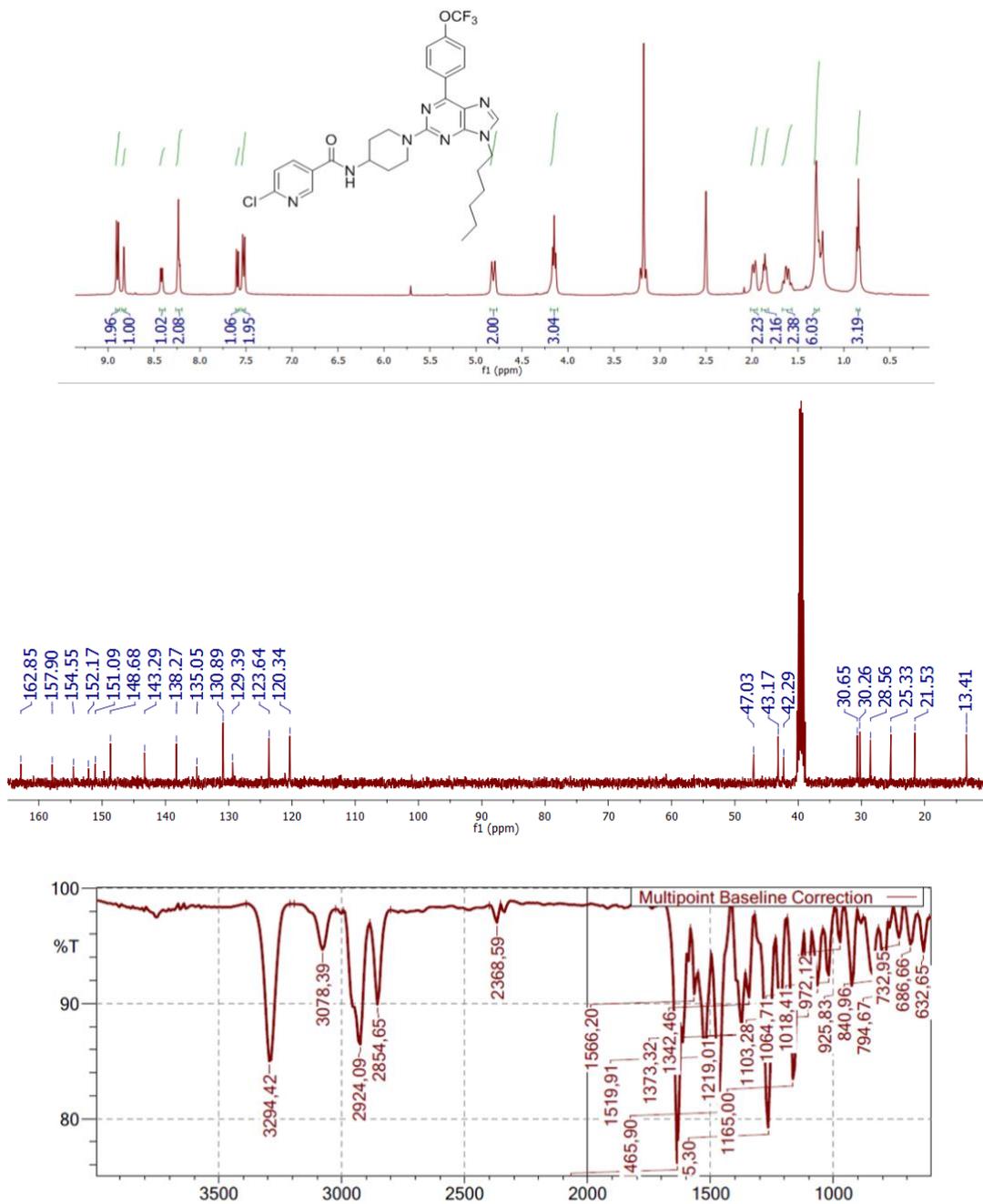


***N*-(1-(9-hexil-6-(4-(trifluoromethoxy)fenil)-9*H*-purin-2-il)piperidin-4-il)-2-naftamida (9I)**

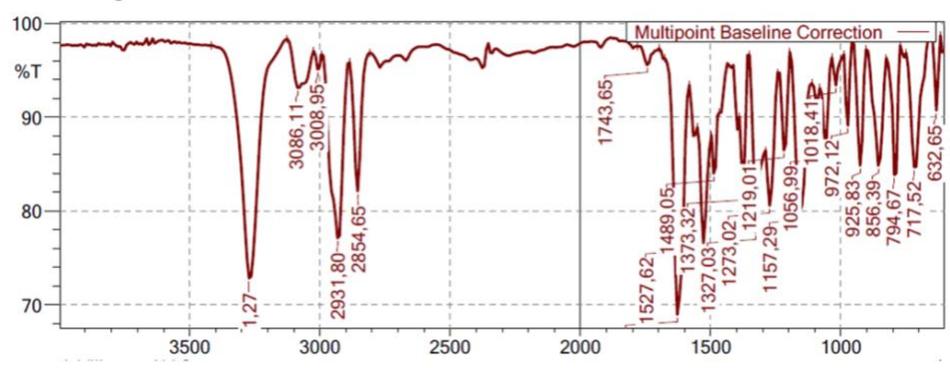
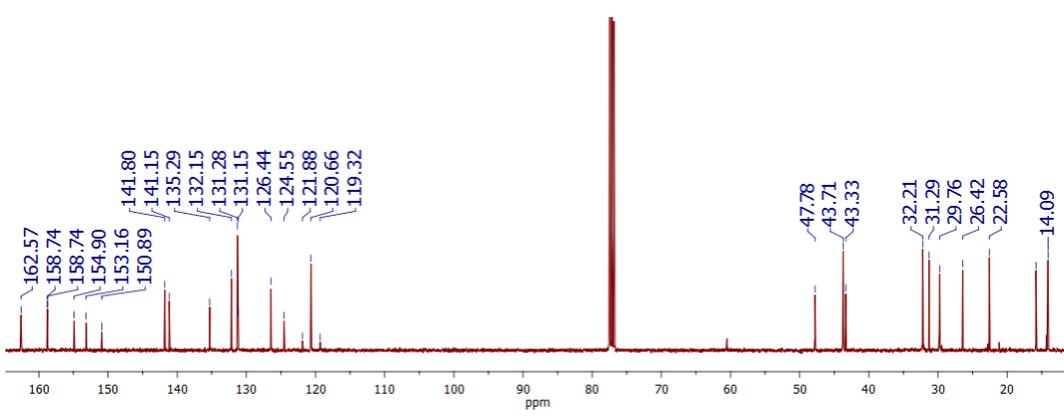
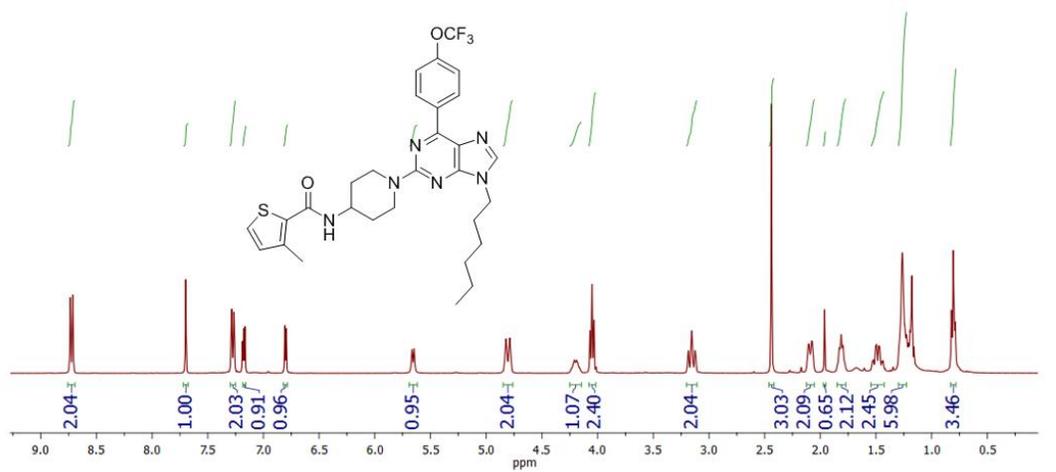




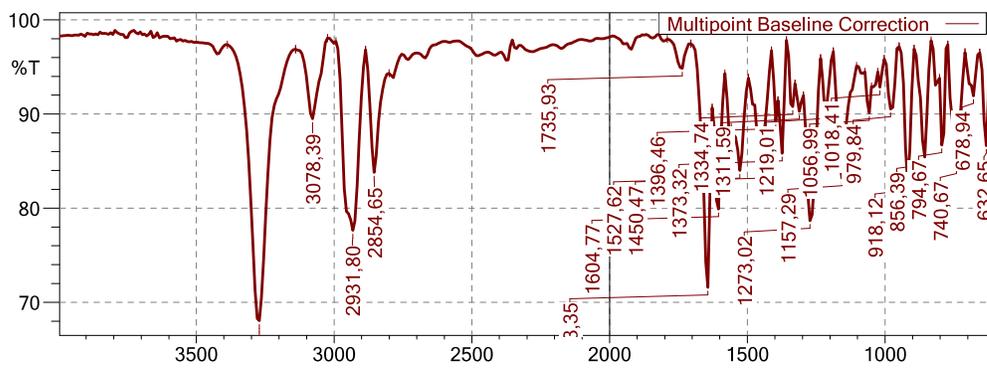
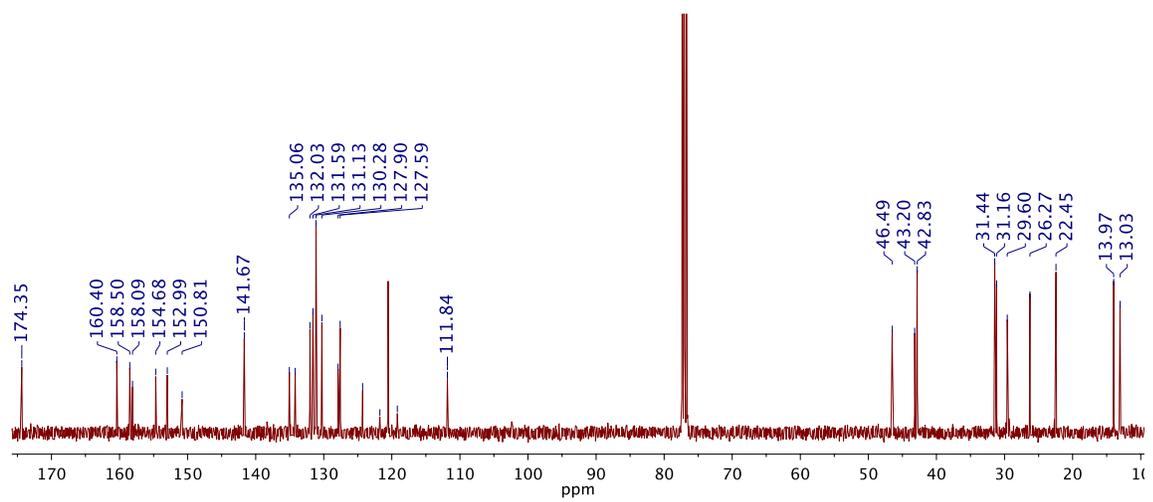
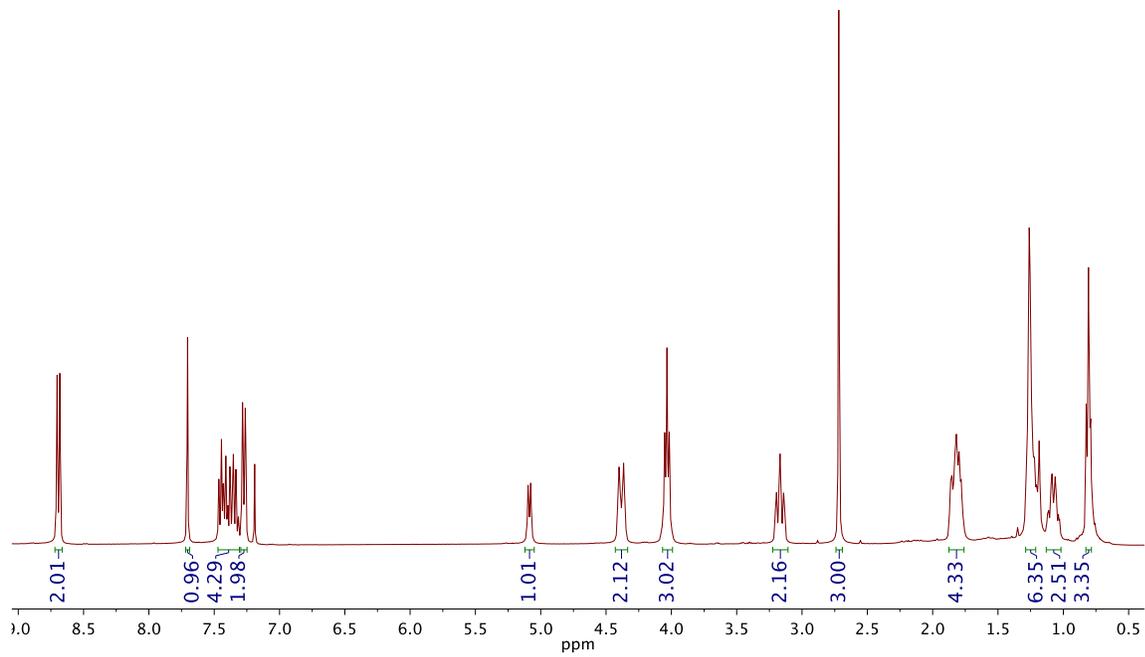
6-Chloro-N-(1-(9-hexyl-6-(4-(trifluoromethoxy)fenil)-9H-purin-2-il)piperidin-4-il)nicotinamida (9m)



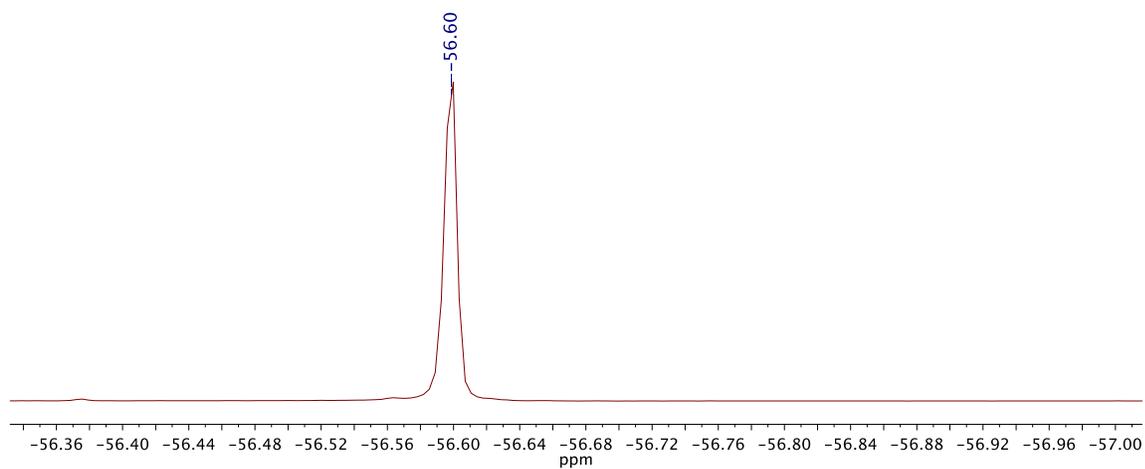
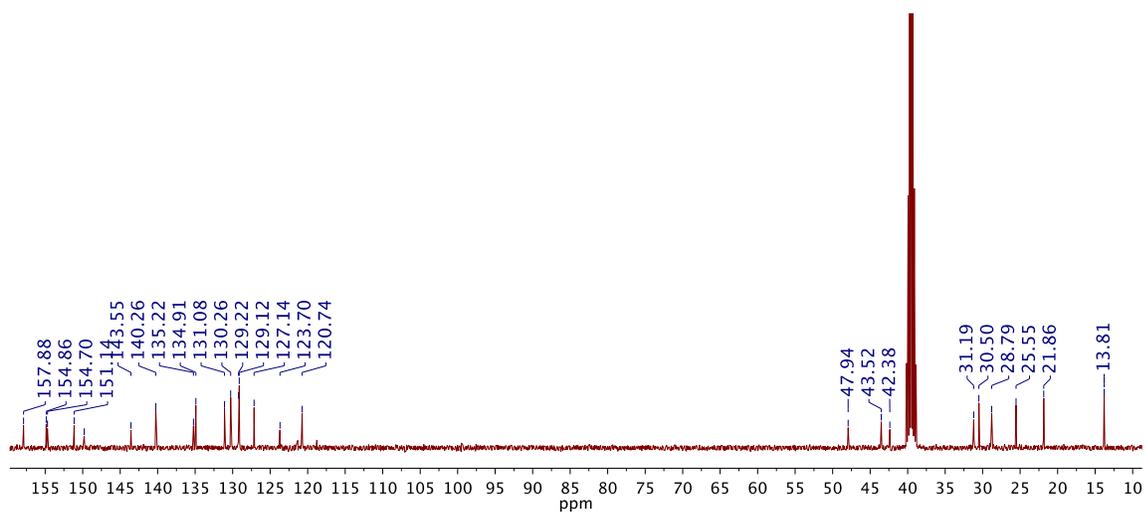
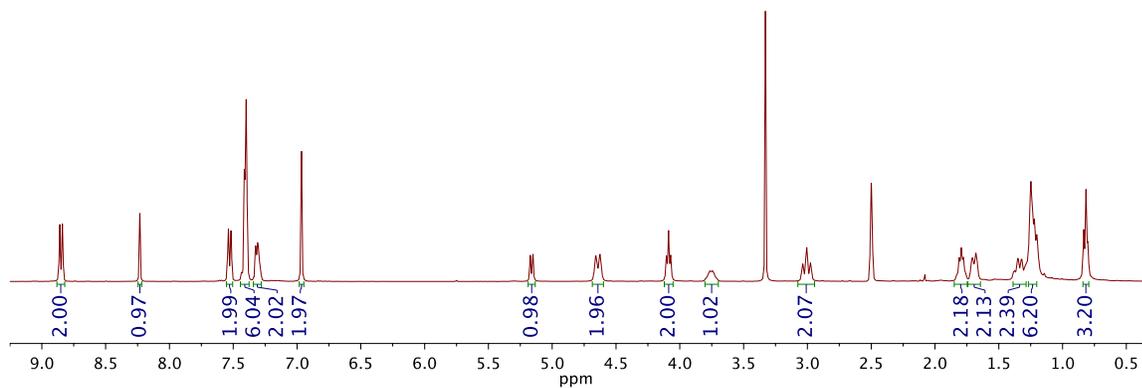
***N*-[1-(9-hexil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9*H*-purin-2-il)piperidin-4-il]-3-metiltiofeno-2-carboxamida (9n)**

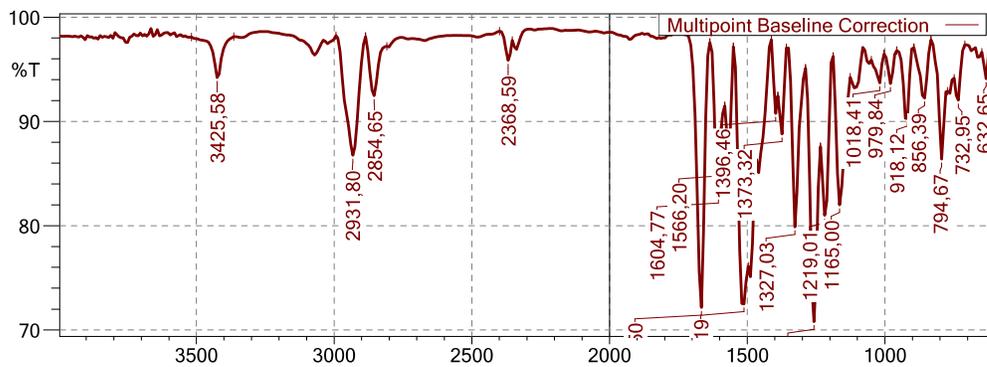


3-(2-clorofenil)-N-(1-(9-hexil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9H-purin-2-il)piperidin-4-il)-5-metilisoxazol-4-carboxamida (9o)

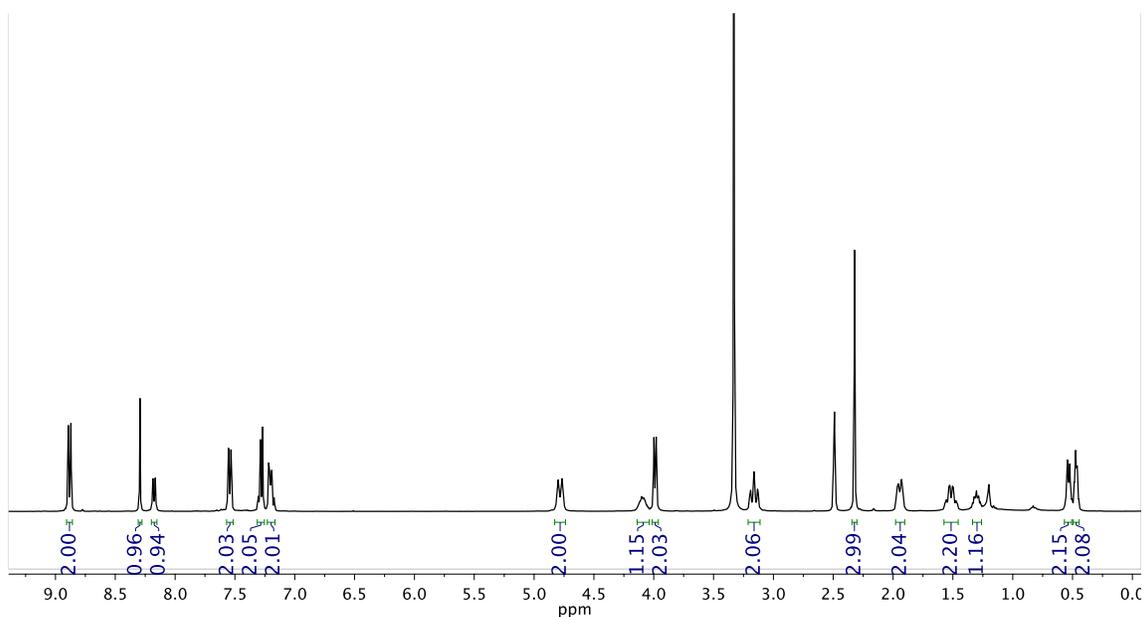


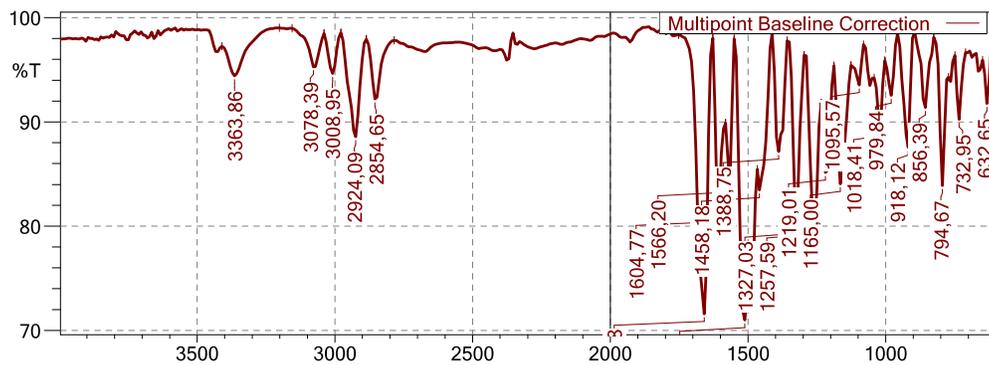
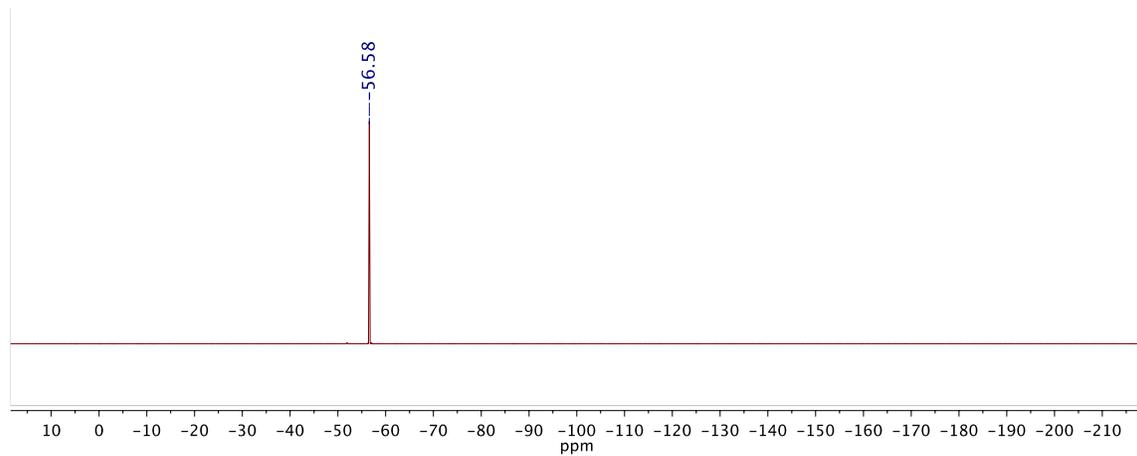
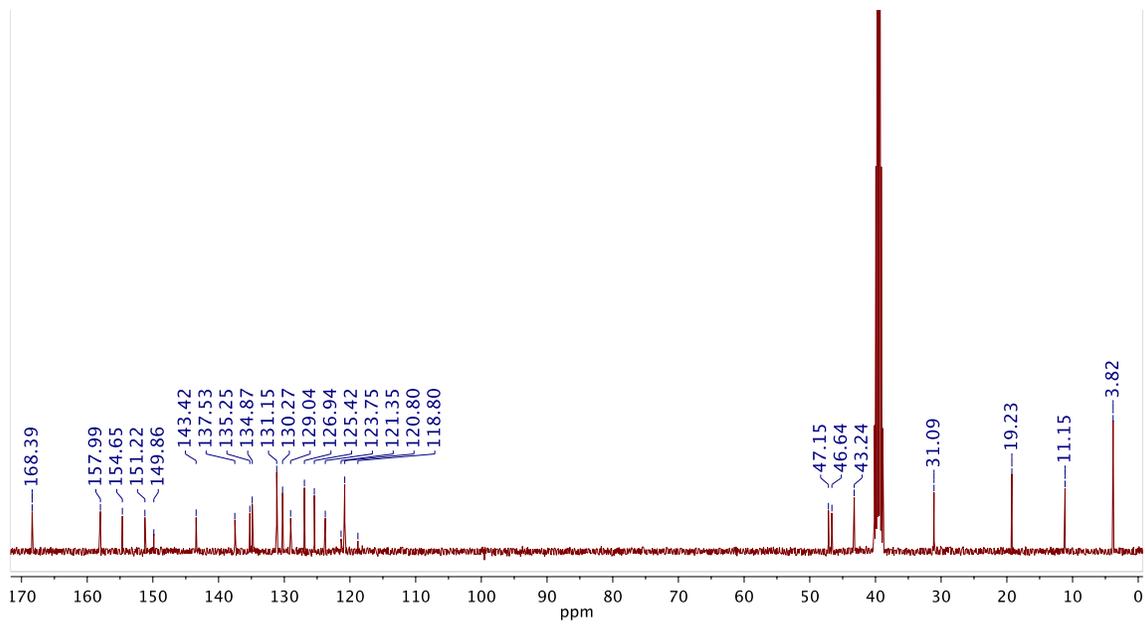
***N*-[1-(9-hexil-6-(4-(trifluoromethoxy)fenil)-9*H*-purin-2-il)piperidin-4-il]-5*H*-dibenzo[*b,f*]azepin-5-carboxamida (9p)**



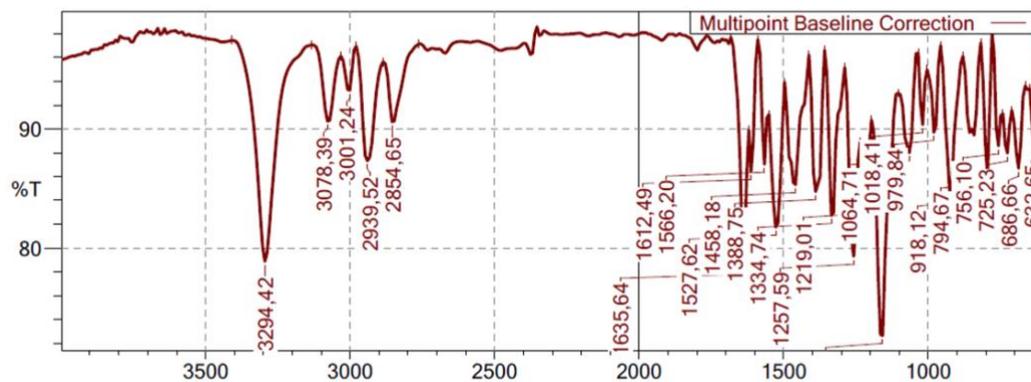
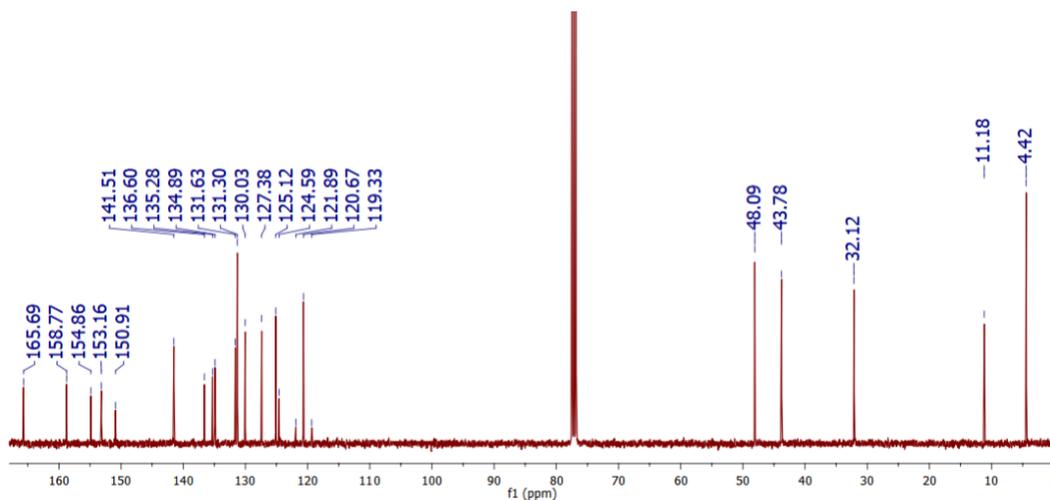
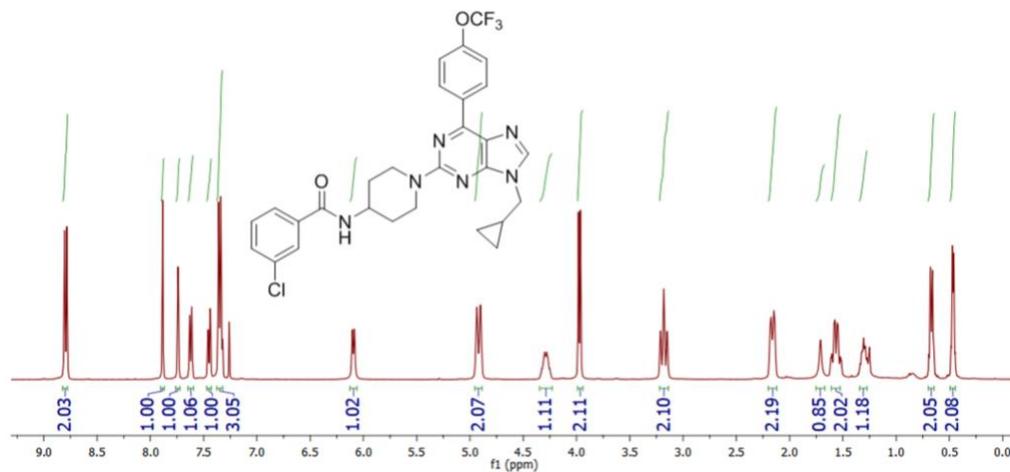


***N*-(1-(9-metilciclopropil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9*H*-purin-2-il)piperidin-4-il)-2-metilbenzamida (10b)**

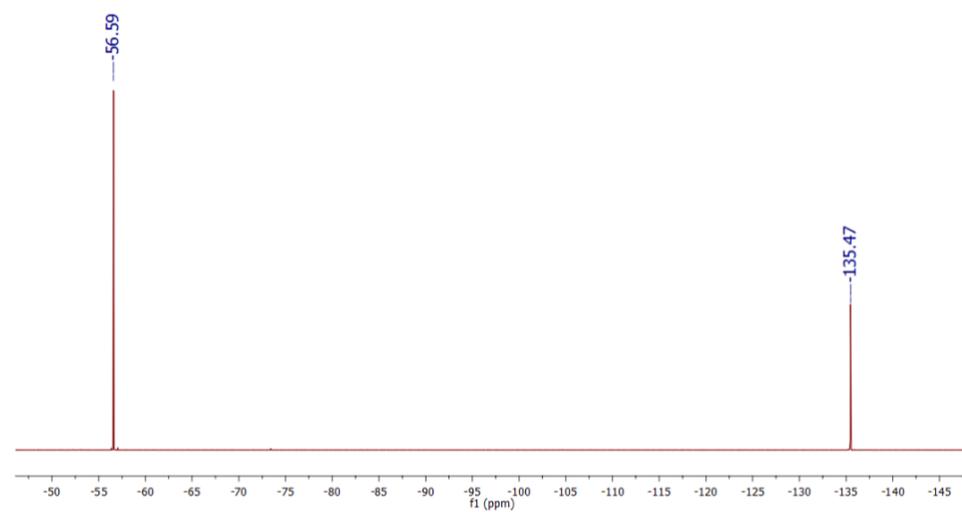
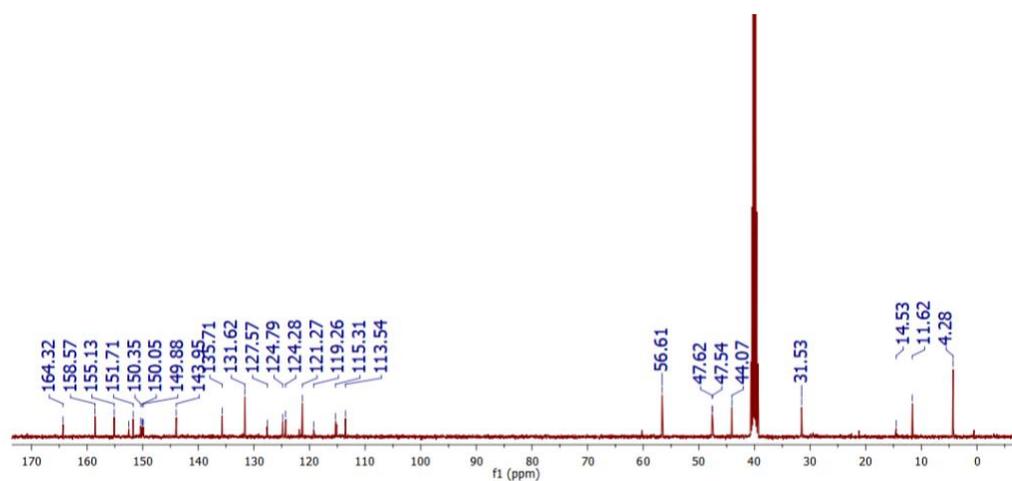
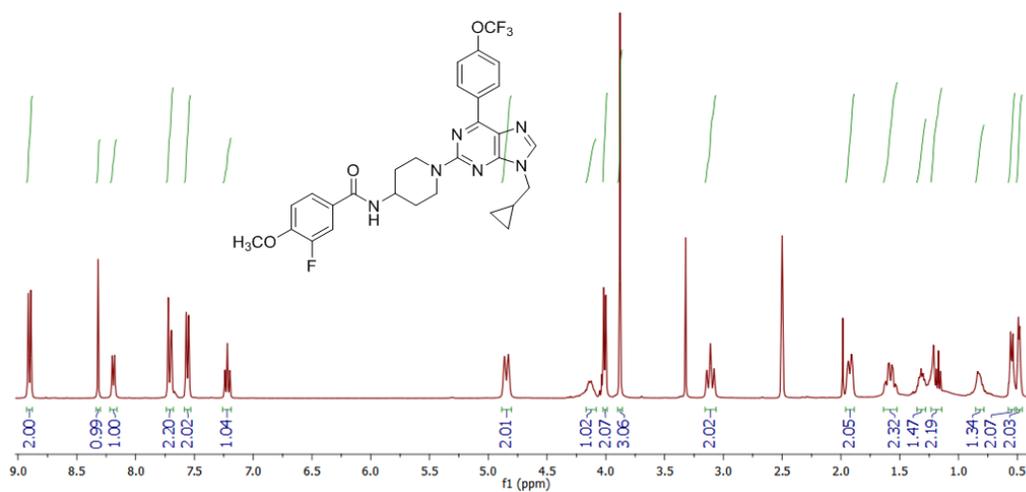


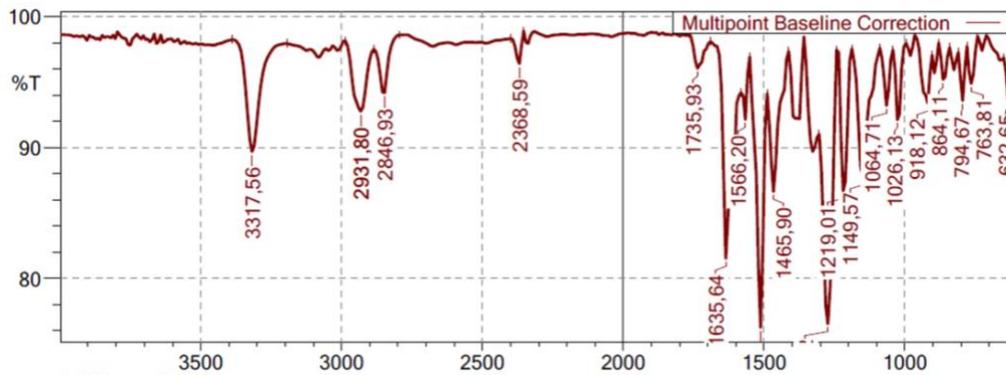


3-cloro-*N*-(1-(9-metilciclopropil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9*H*-purin-2-il) piperidin-4-il) benzamida (10d)

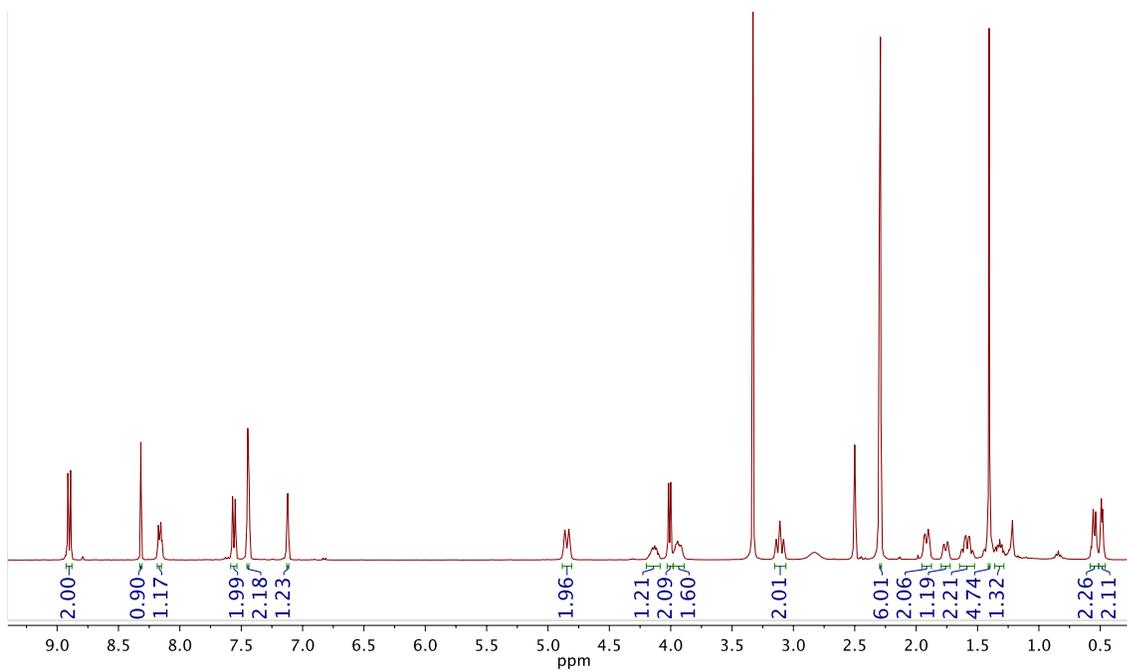


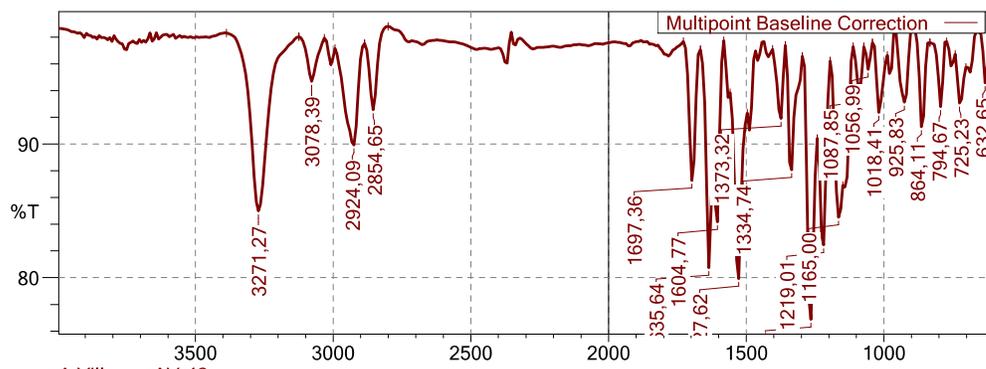
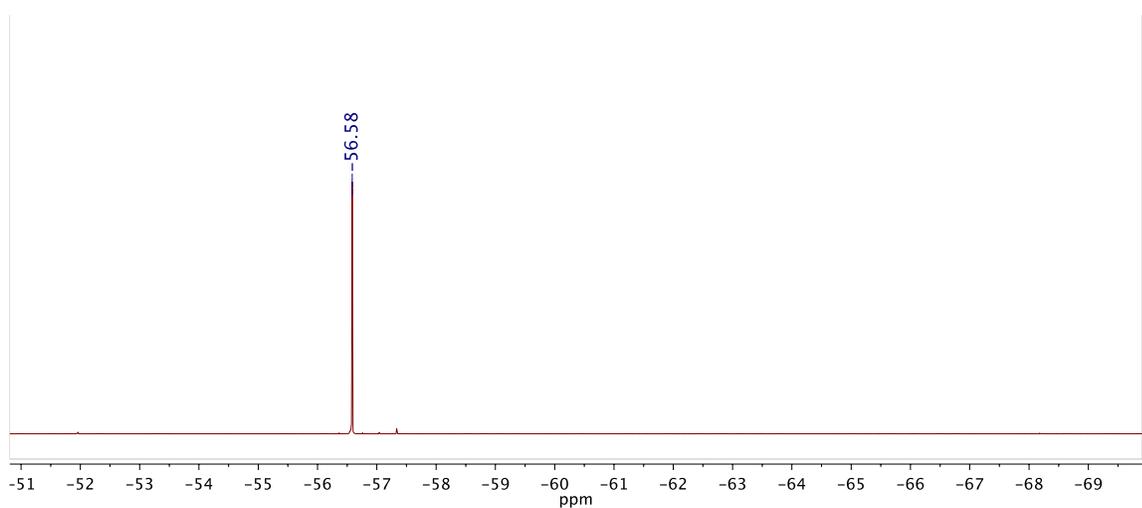
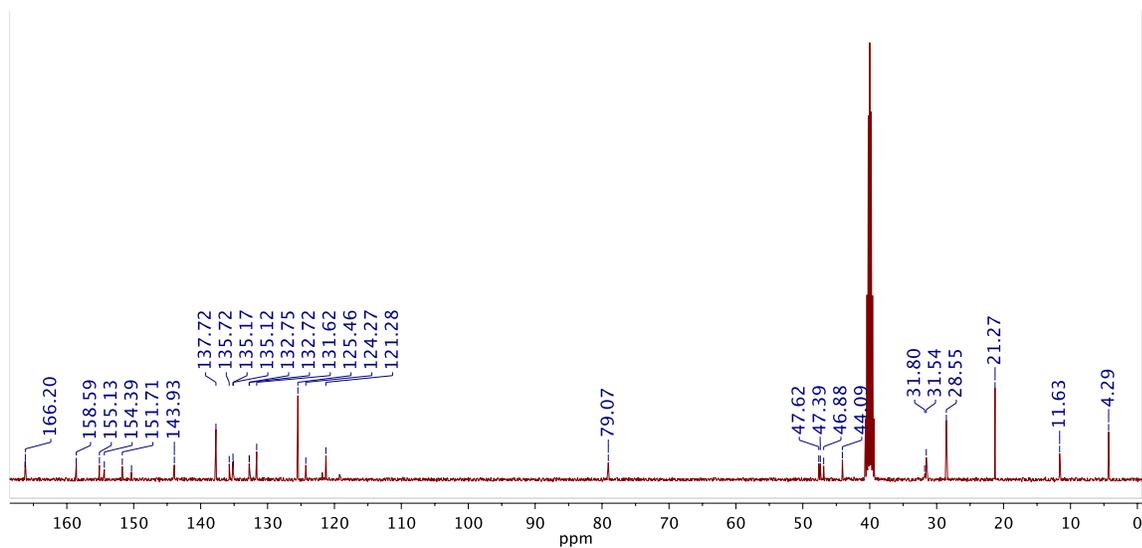
3-fluoro-N-(1-(9-metilciclopropil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9H-purin-2-il)piperidin-4-il)-4-metoxibenzamida (10f)



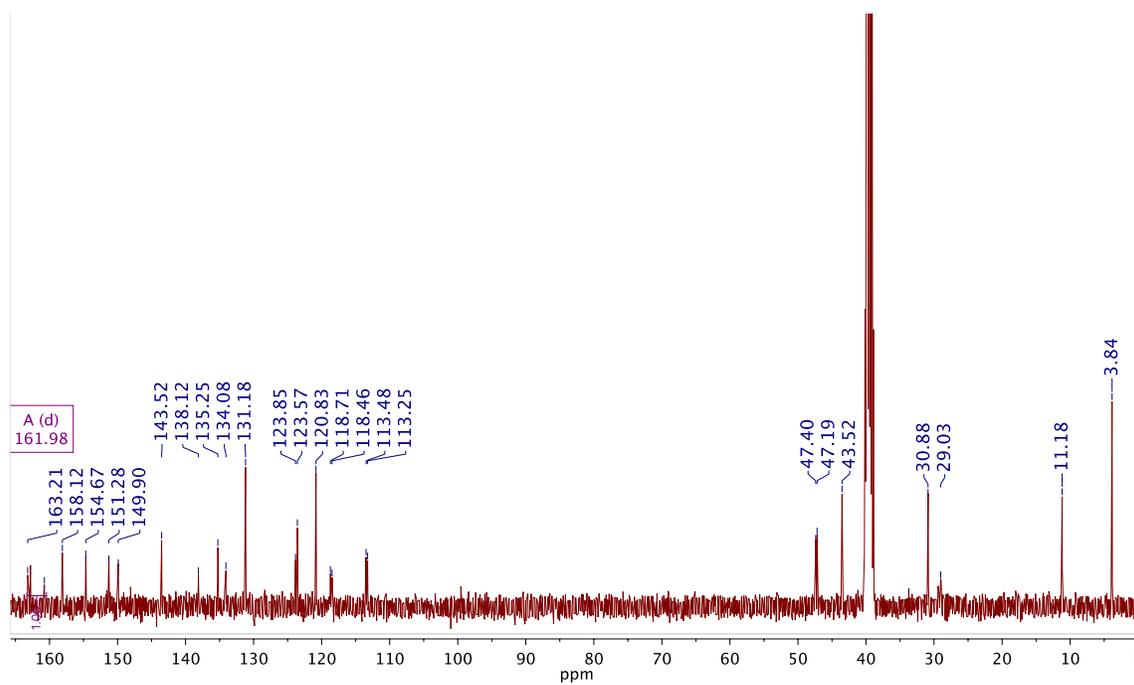
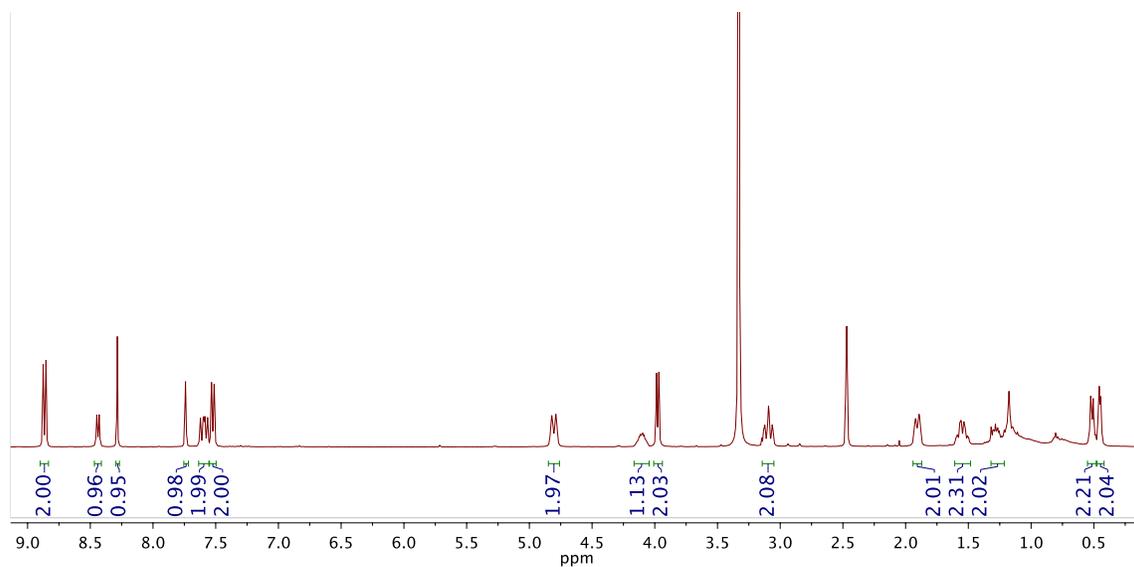


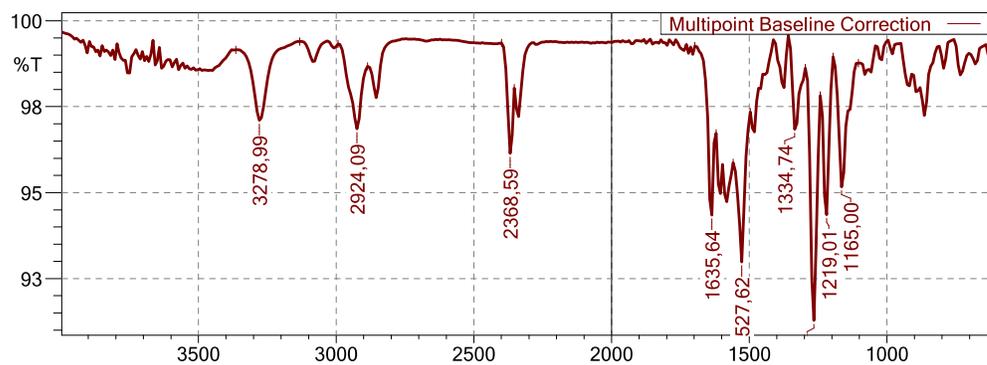
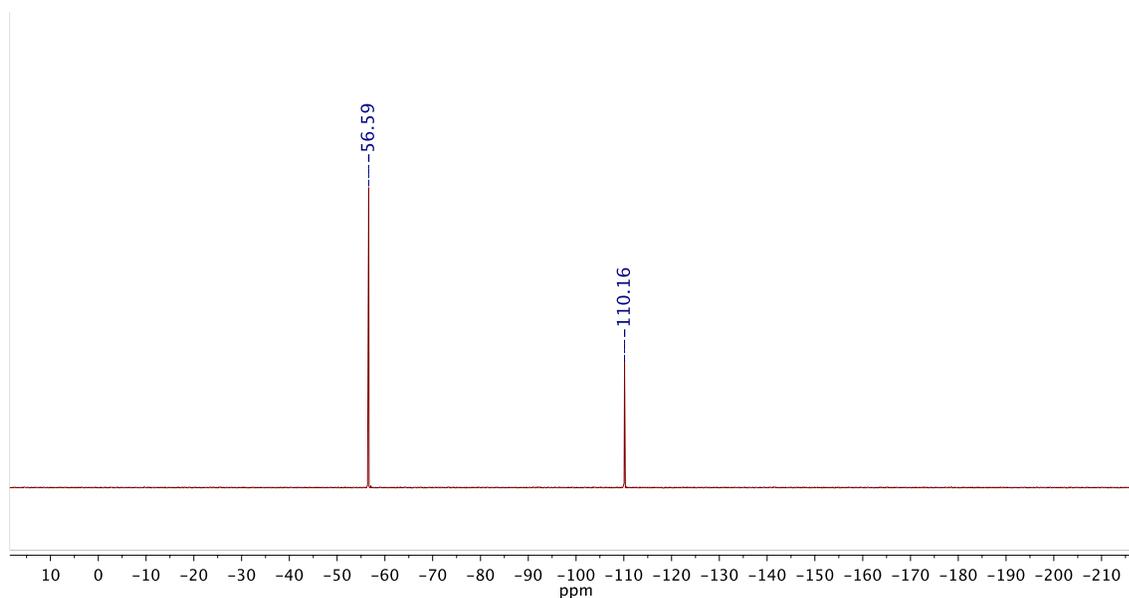
***N*-(1-(9-metilciclopropil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9*H*-purin-2-il)piperidin-4-il)-3,5-dimetilbenzamida (10g)**



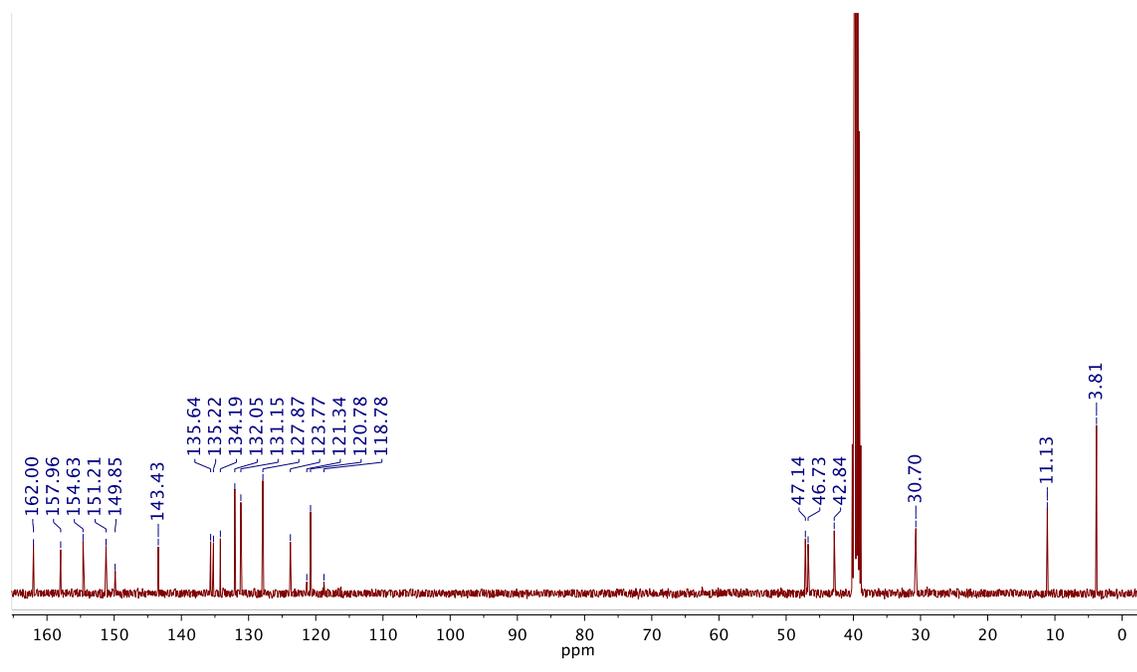
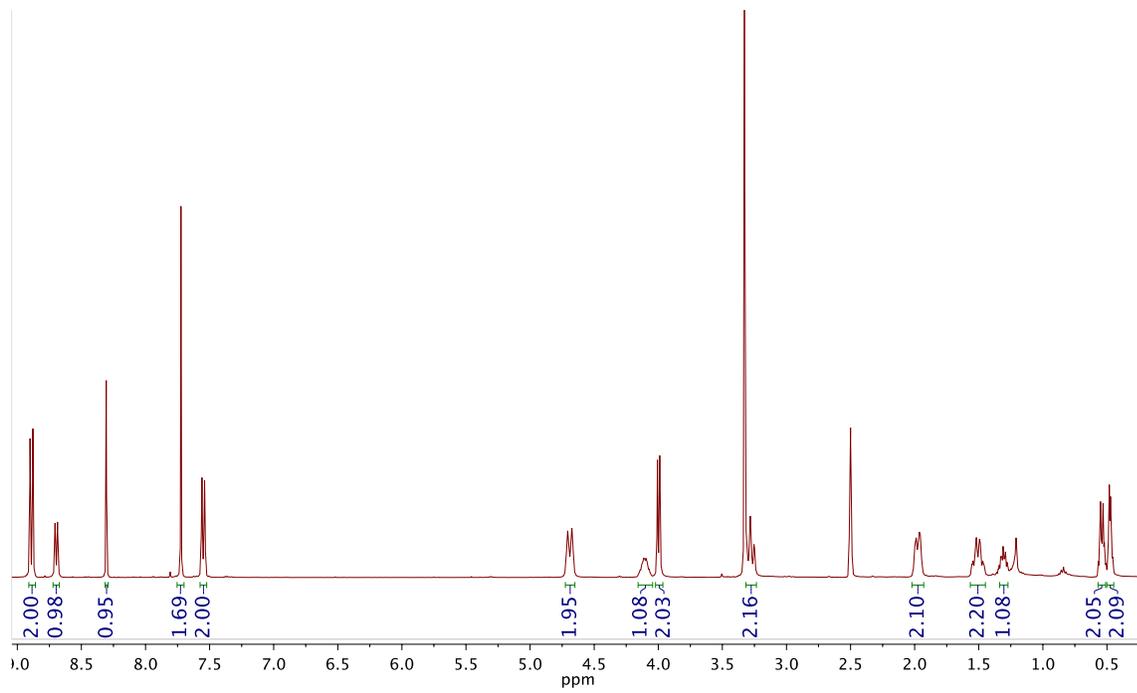


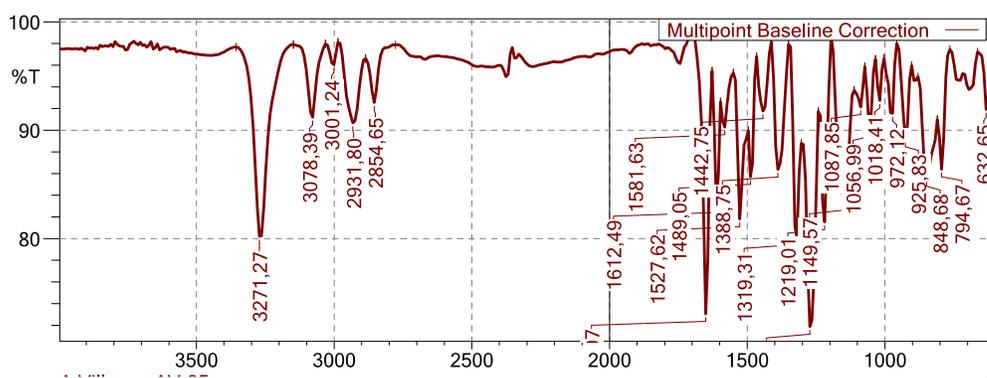
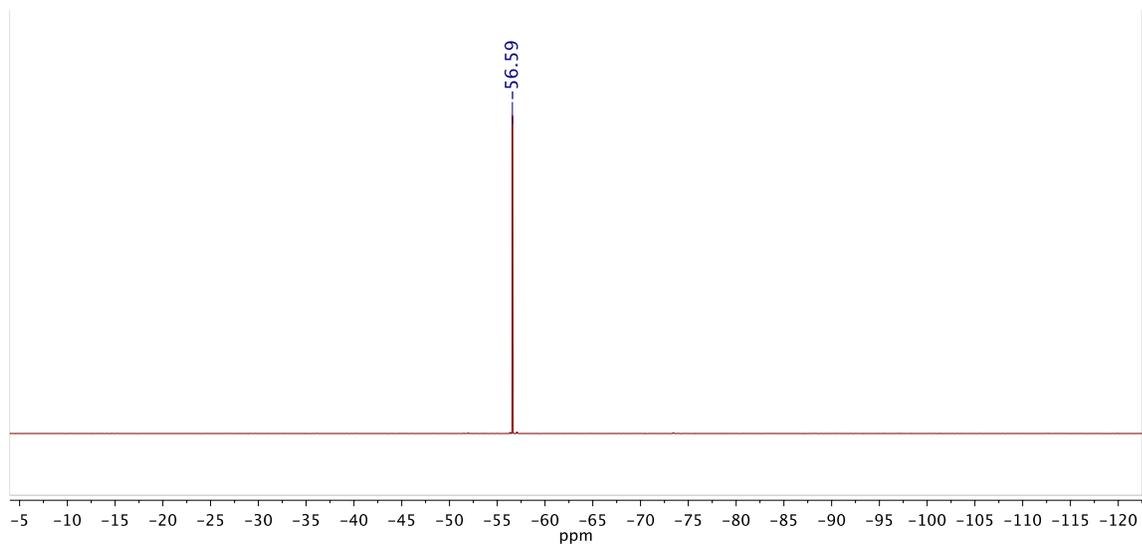
3-Cloro-5-fluoro-N-(1-(9-metilciclopropil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9H-purin-2-il) piperidin-4-il)benzamida (10i)



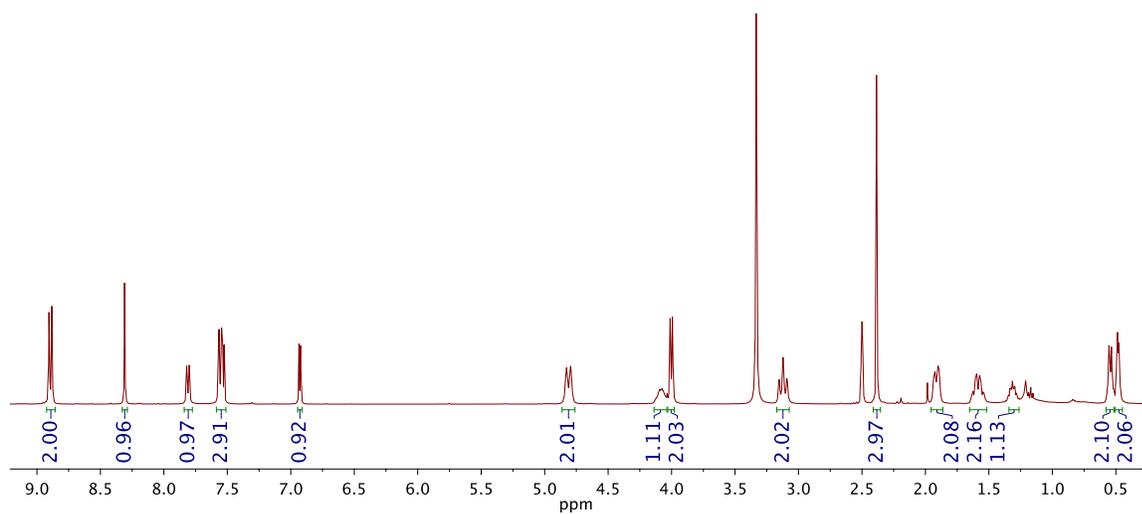


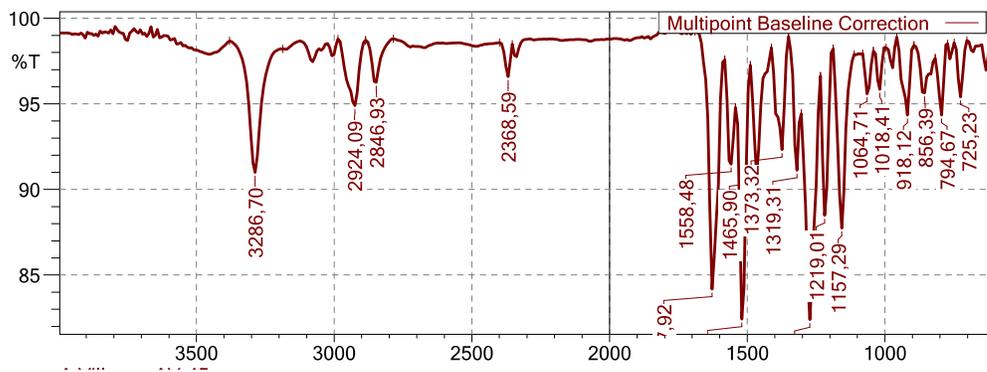
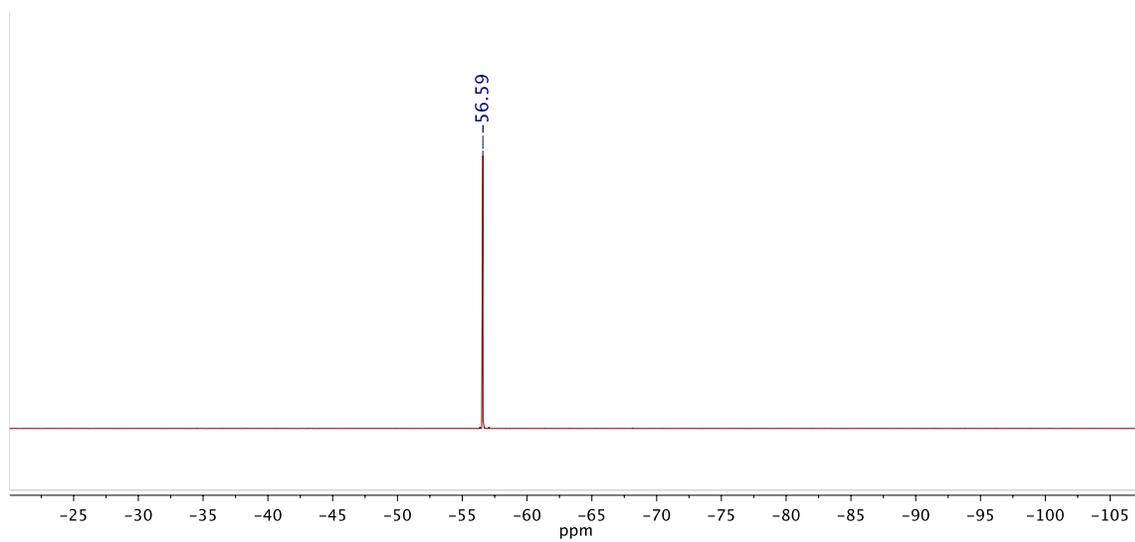
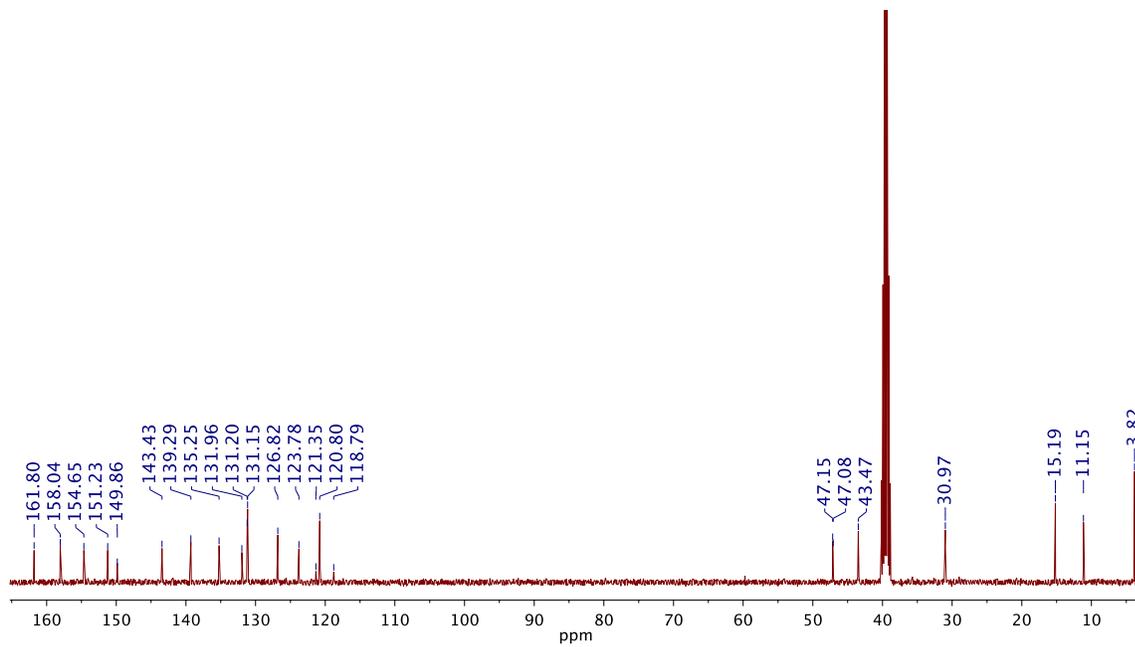
2,4,6-tricloro-N-(1-(9-metilciclopropil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9H-purin-2-il) piperidin-4-il)benzamida (10j)



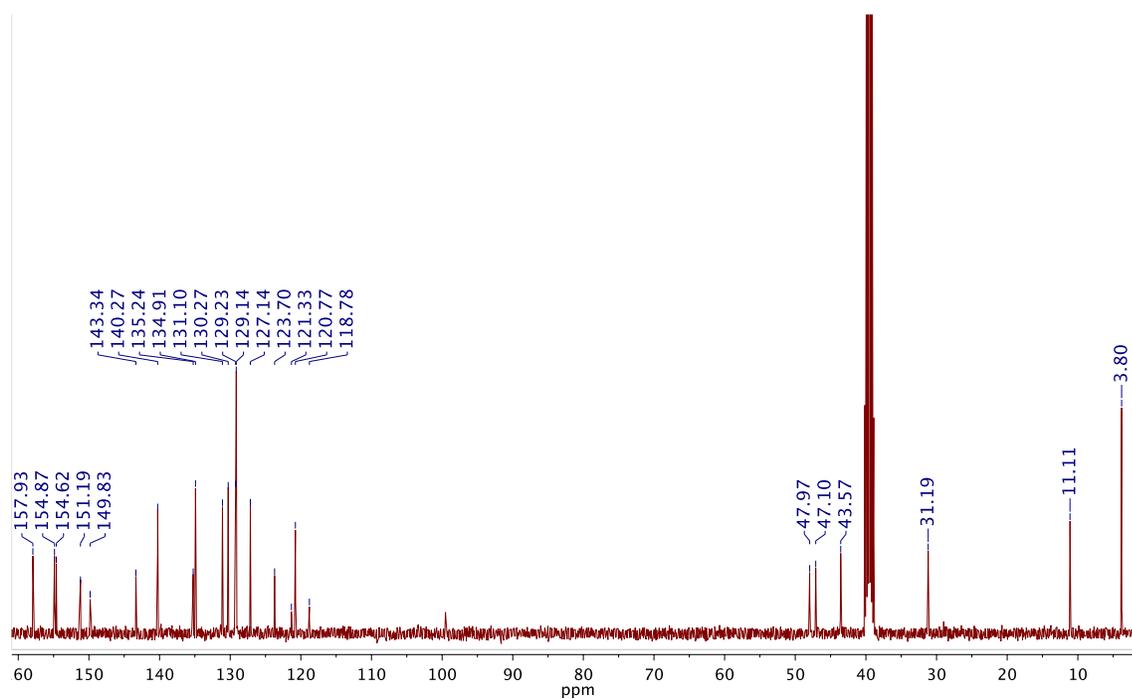
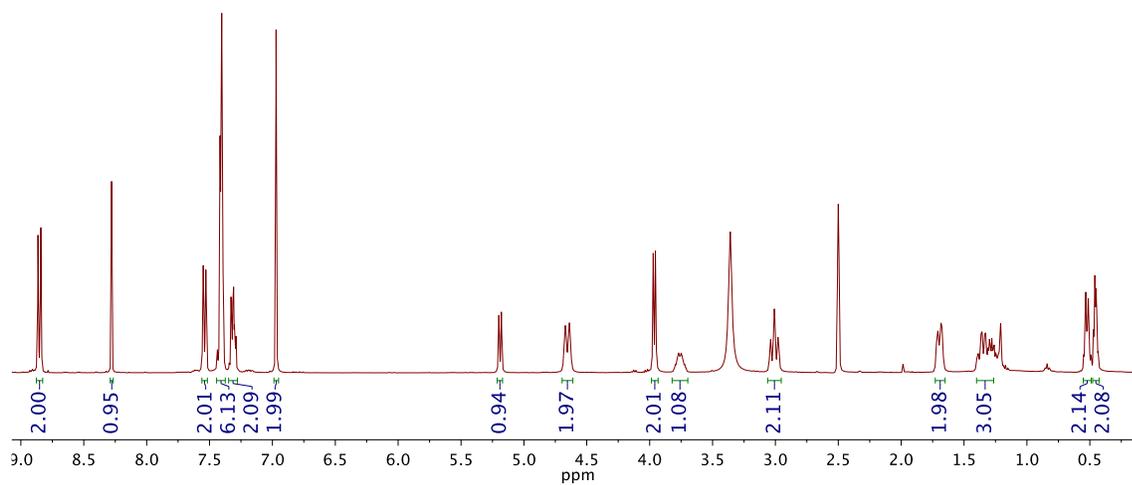


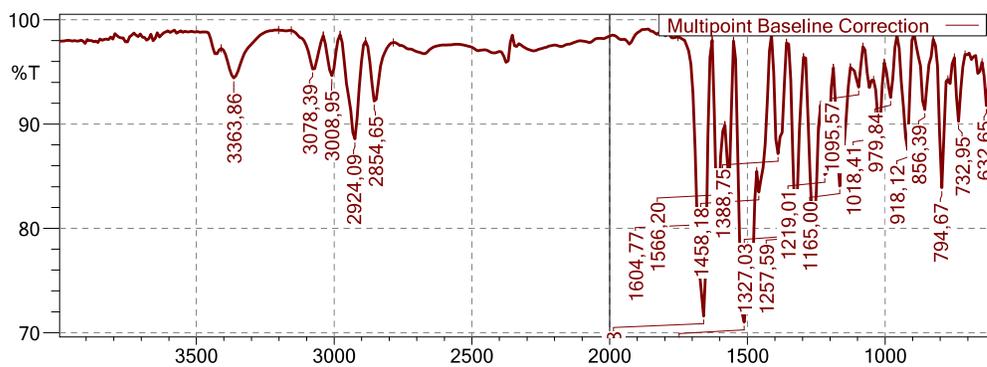
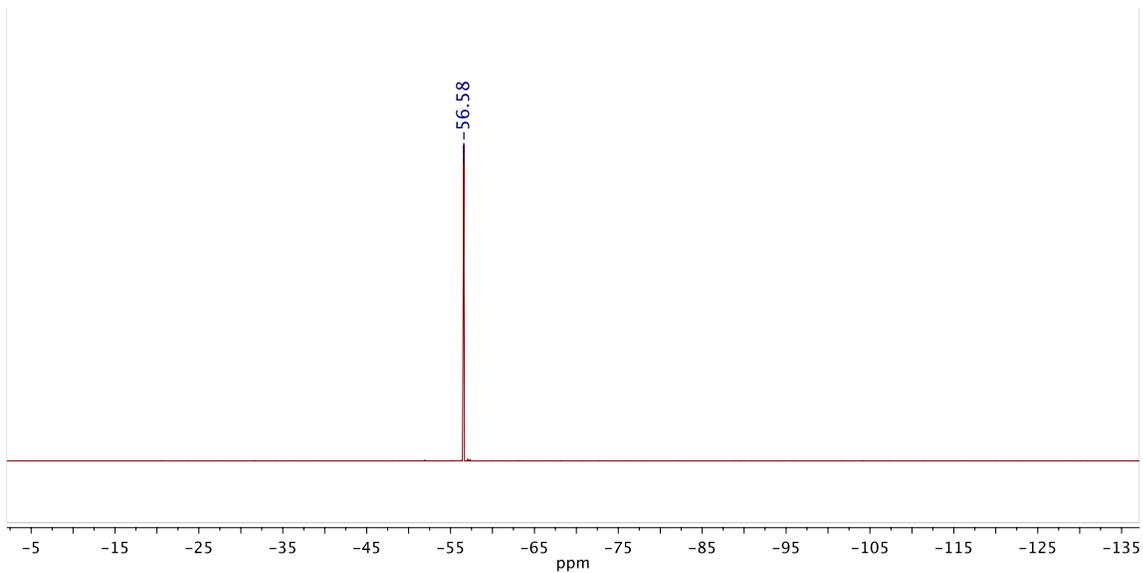
***N*-(1-(9-metilciclopropil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9*H*-purin-2-il)piperidin-4-il)-3-metilieno-2-carboxamida (10n)**



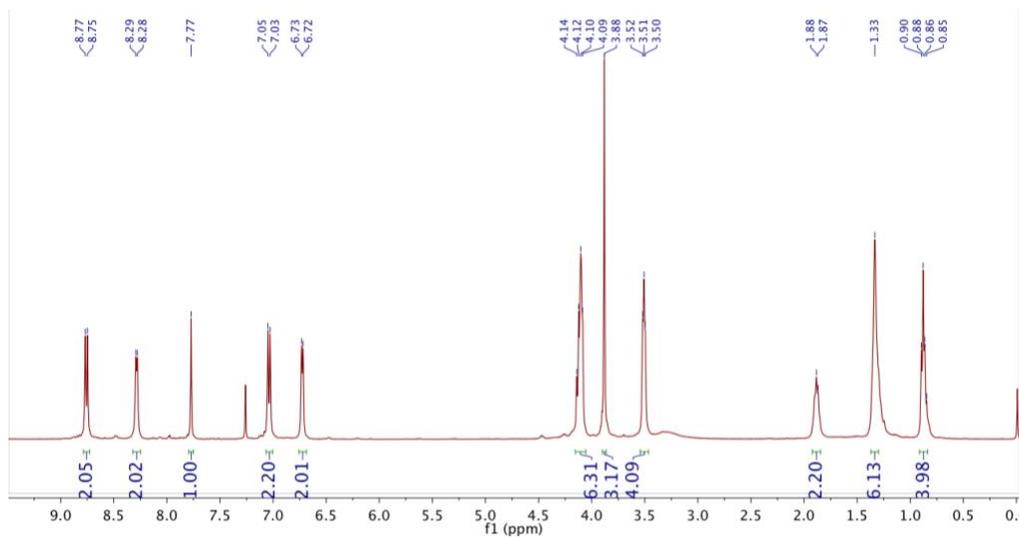


***N*-(1-(9-metilciclopropil-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9*H*-purin-2-il)piperidin-4-il)-5*H*-dibenzo[*b,f*]azepin-5-carboxamida (10p)**

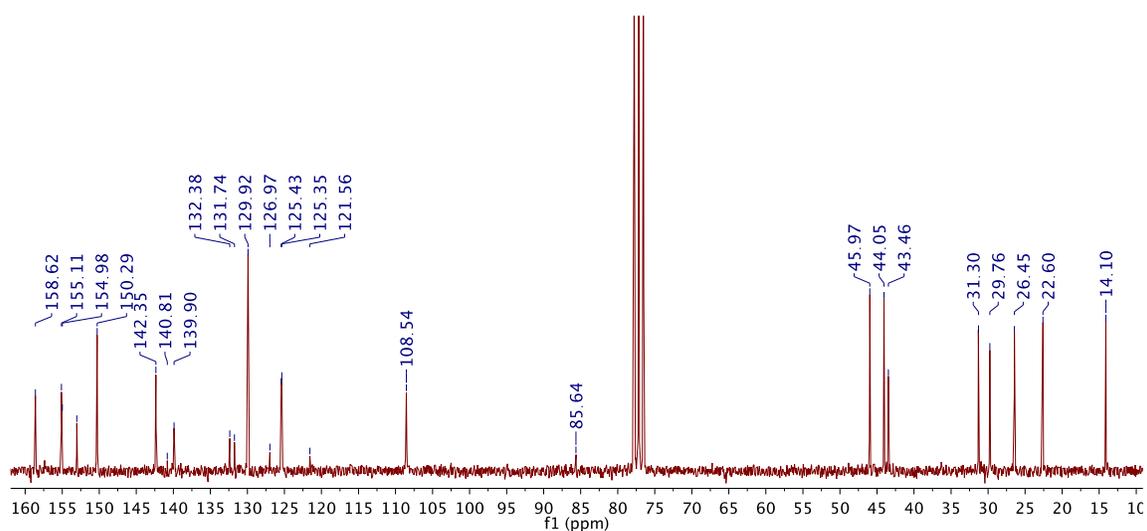
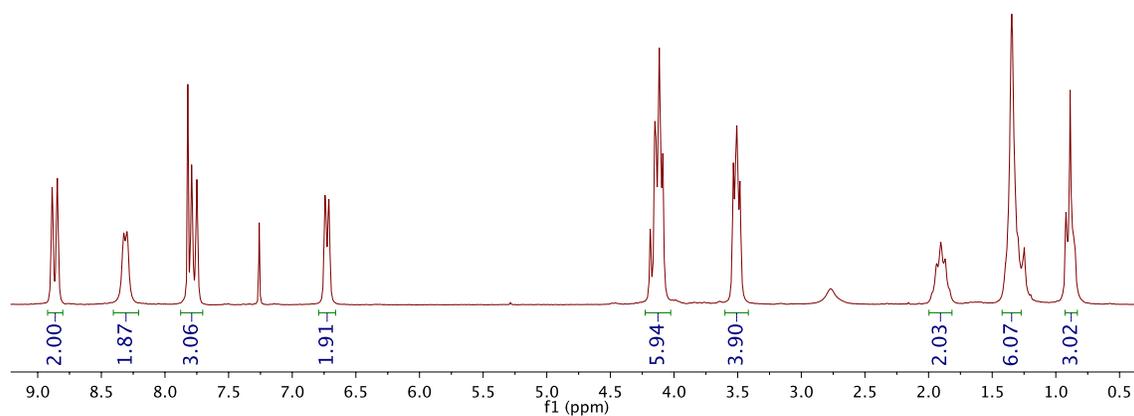




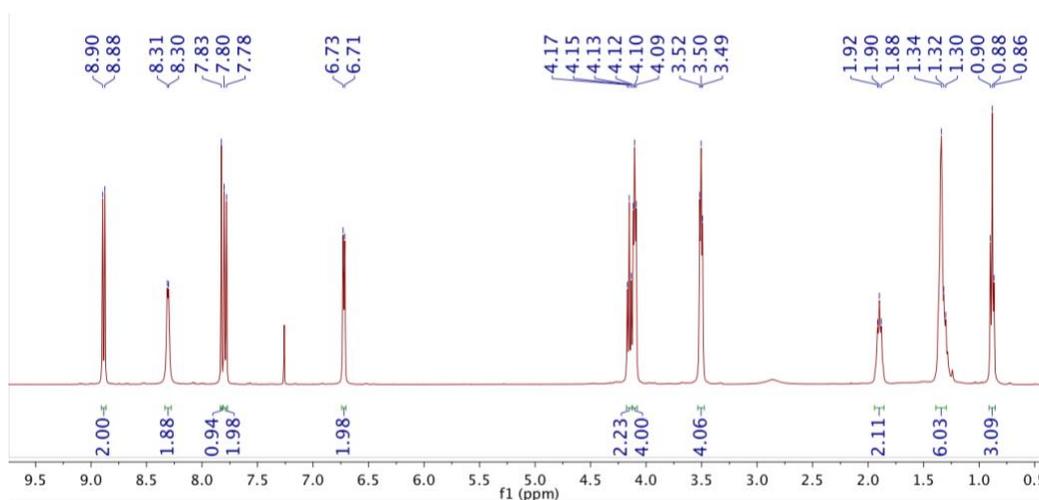
9-hexil-6-(4-metoxifenil)-2-(4-(piridin-4-il)piperazin-1-il)-9H-purina (11a)

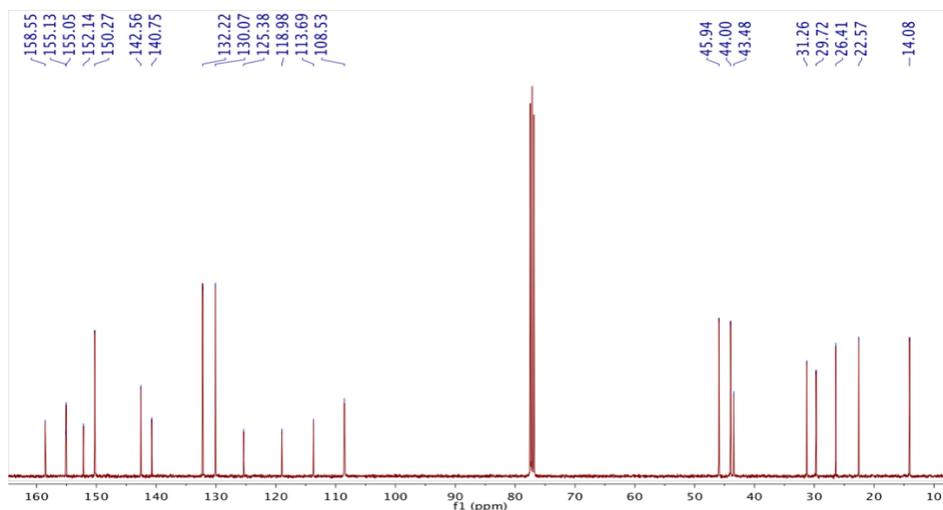


9-hexil-6-(4-(trifluorometil)fenil)-2-(4-(piridin-4-il)piperazin-1-il)-9H-purina (11b)

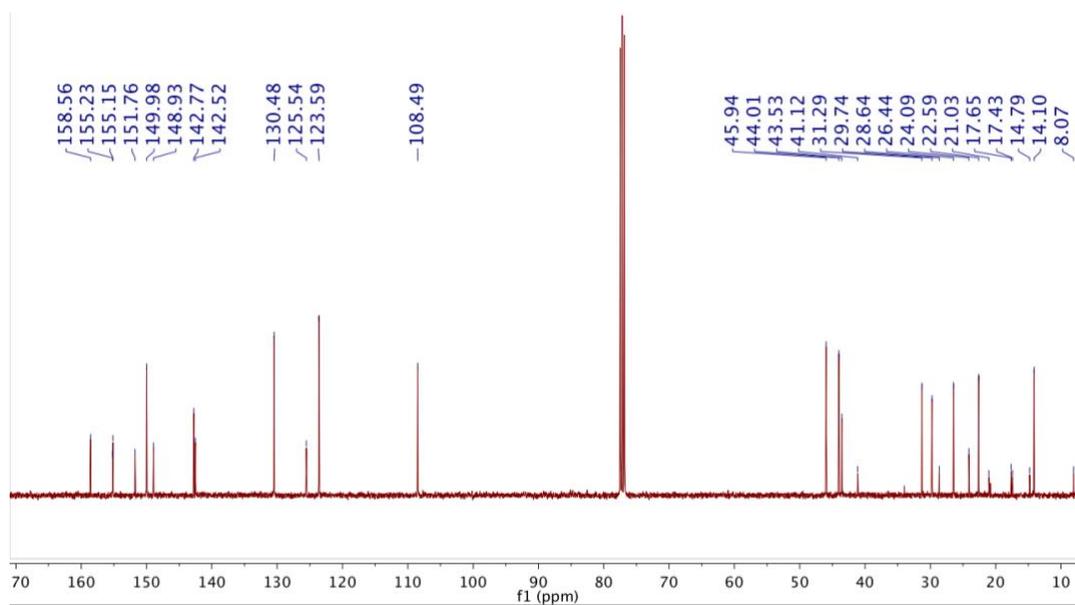
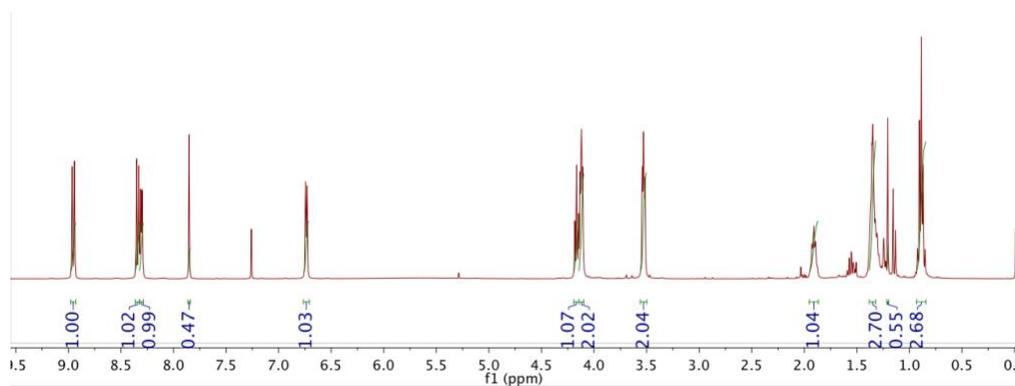


4-(9-hexil-2-(4-(piridin-4-il)piperazin-1-il)-9H-purin-6-il)benzonitrilo (11c)

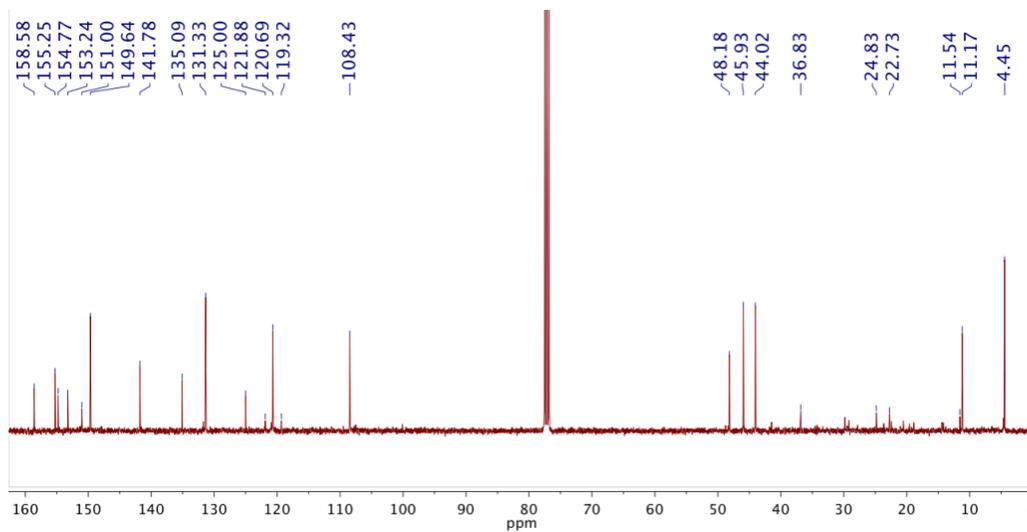
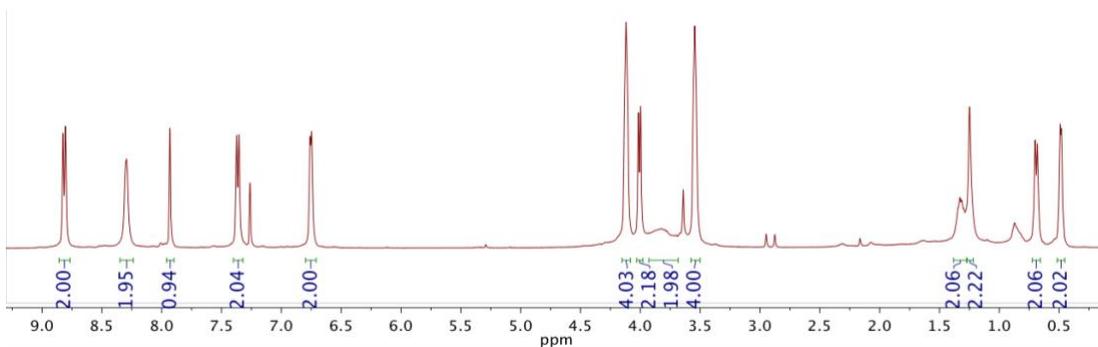




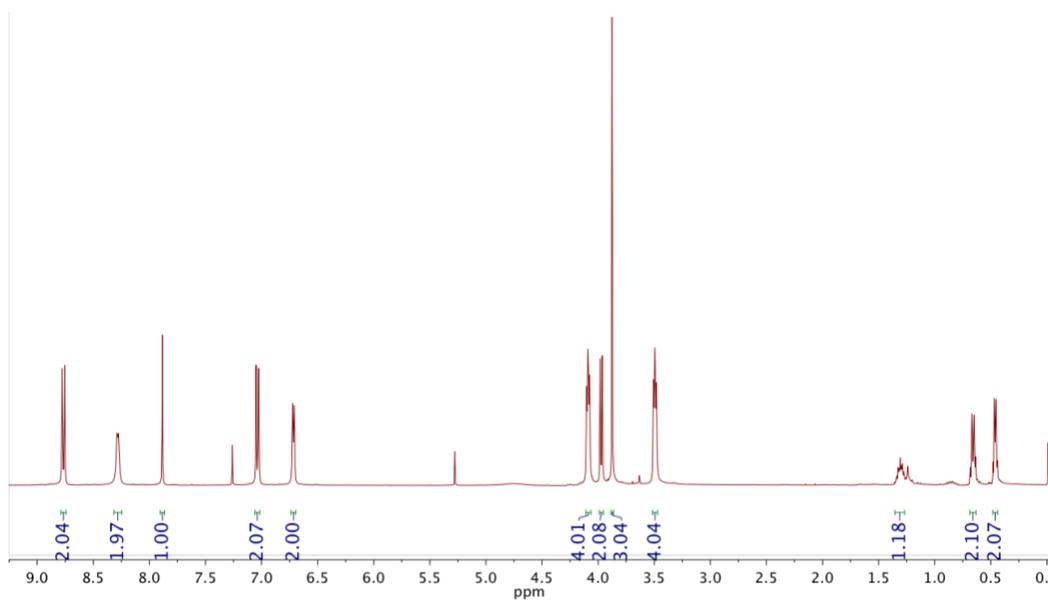
9-hexil-6-(4-nitrophenil)-2-(4-(piridin-4-il)piperazin-1-il)-9H-purina (11d)

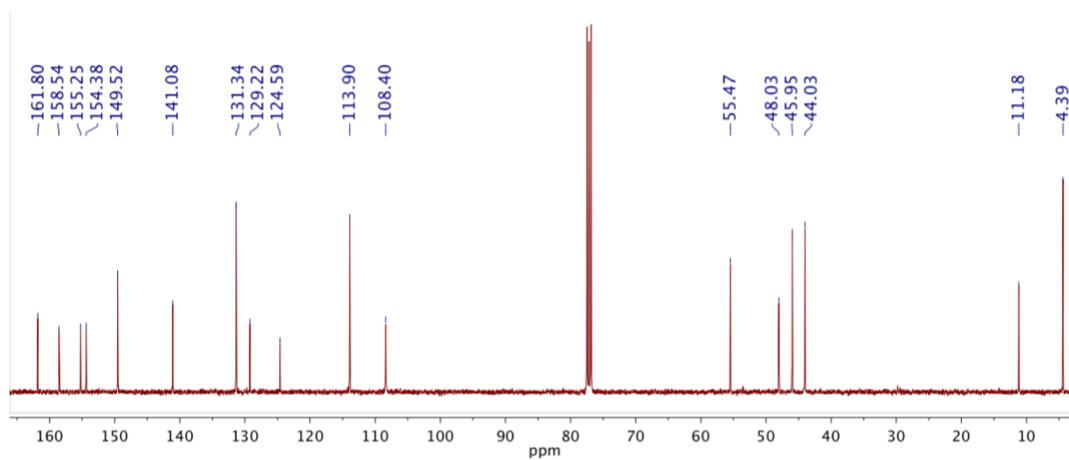


9-(cyclopropylmethyl)-2-(4-(pyridin-4-yl)piperazin-1-yl)-6-(4-(trifluoromethoxy)phenyl)-9H-purine (11e)

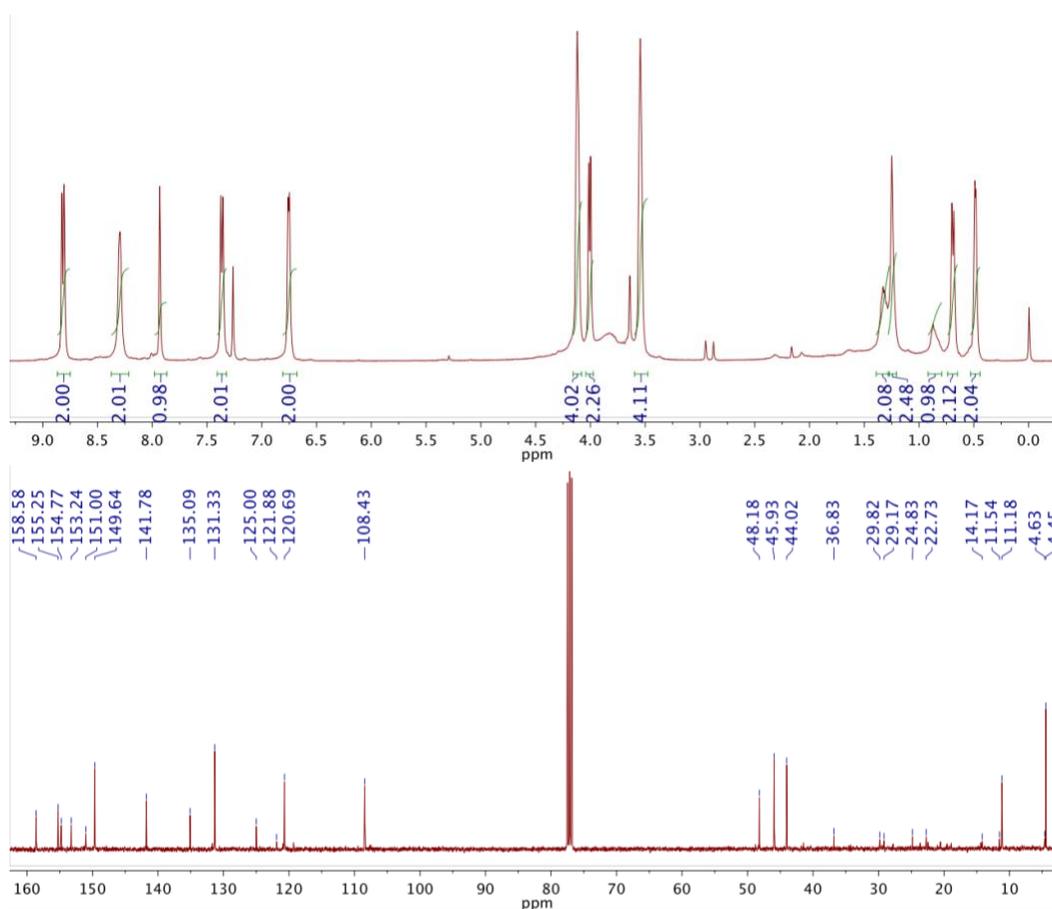


9-(metilciclopropil)-6-(4-metoxifenil)-2-(4-(piridin-4-il)piperazin-1-il)-9H-purina (11f)

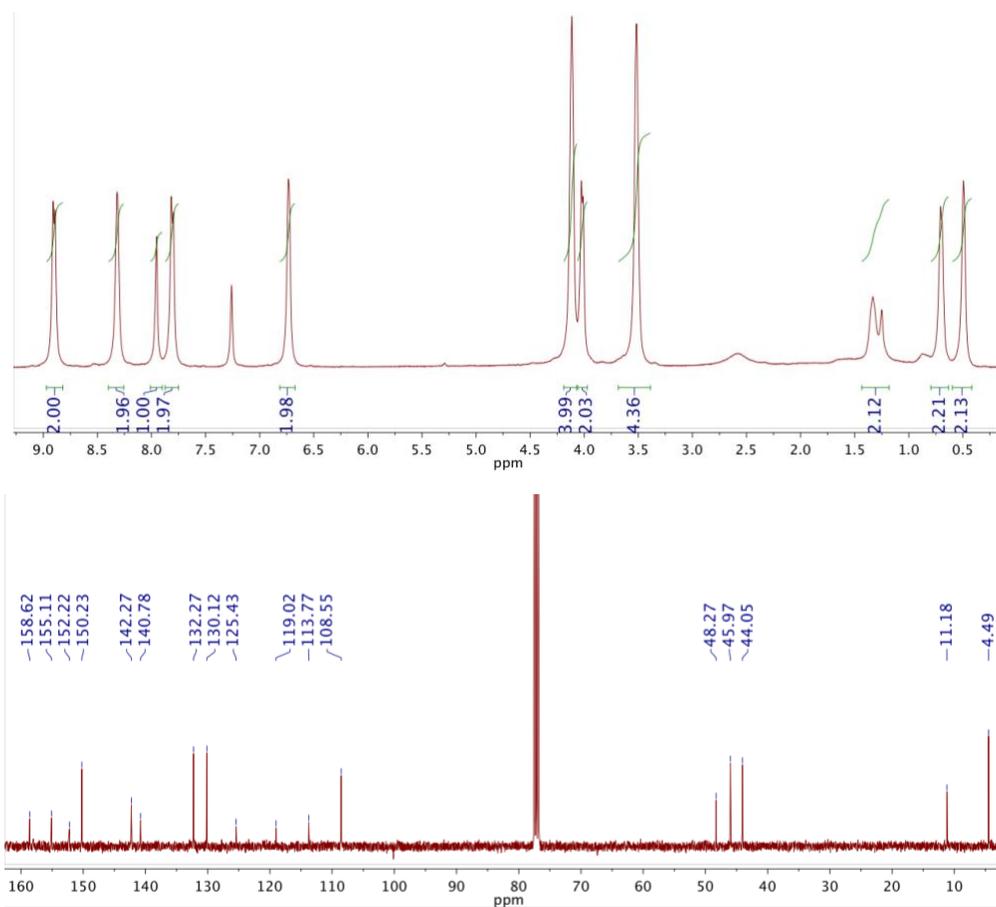




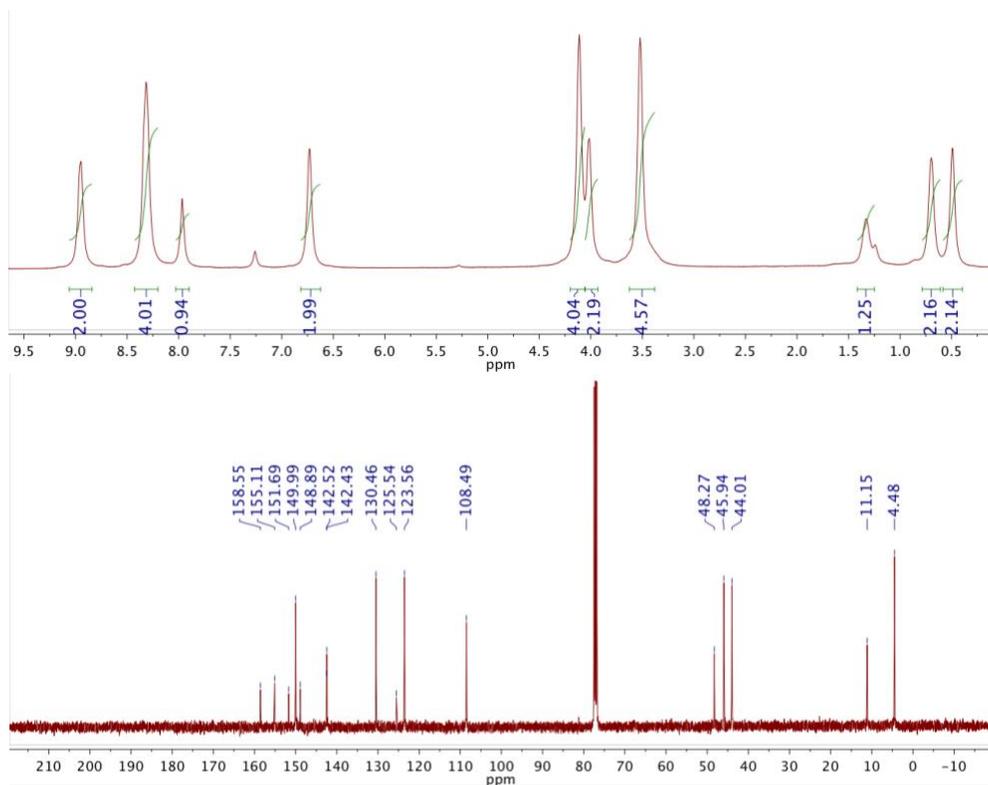
9-(metilciclopropil)-2-(4-(piridin-4-il)piperazin-1-il)-6-(4-(trifluorometil)fenil)-9H-purina (11g)



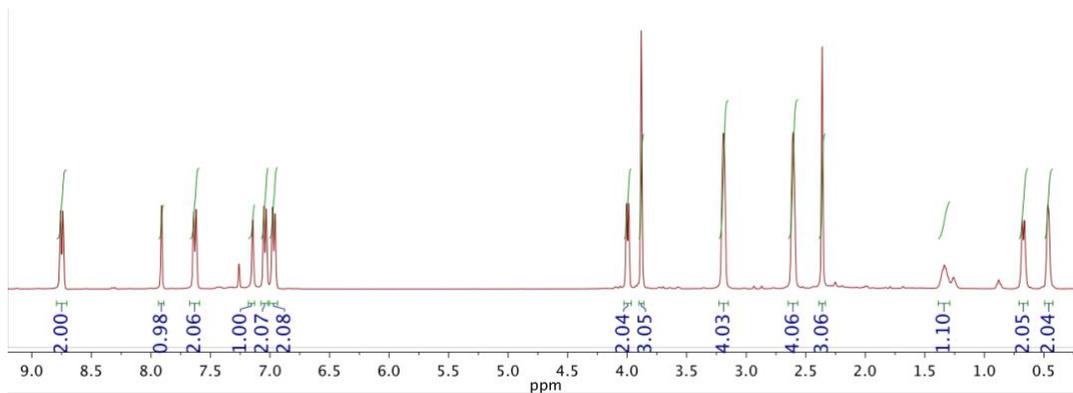
4-(9-(metilciclopropil)-2-(4-(piridin-4-il)piperazin-1-il)-9H-purin-6-il)benzonitrilo (11h)

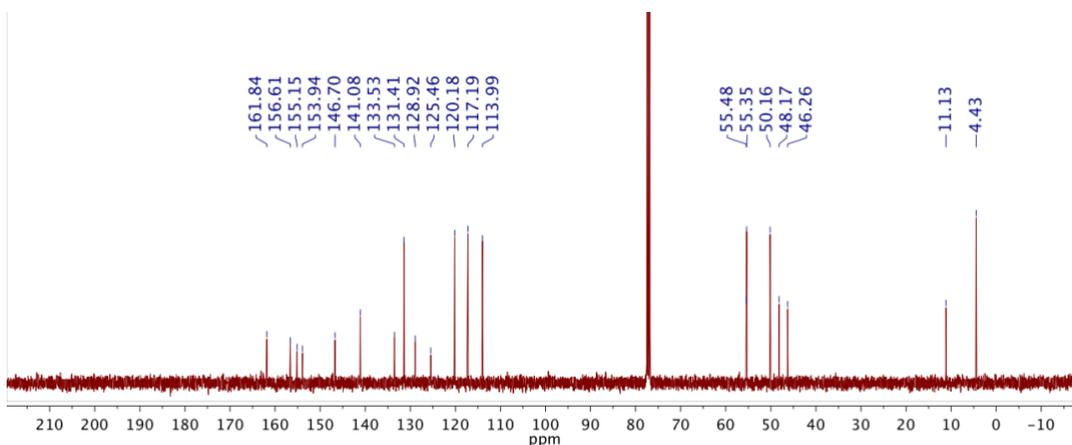


9-(metilciclopropil)-6-(4-nitrofenil)-2-(4-(piridin-4-il)piperazin-1-il)-9H-purina (11i)

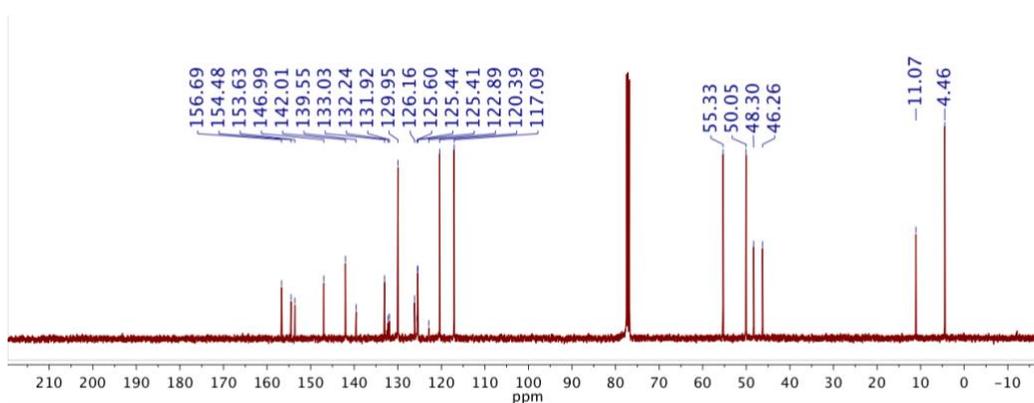
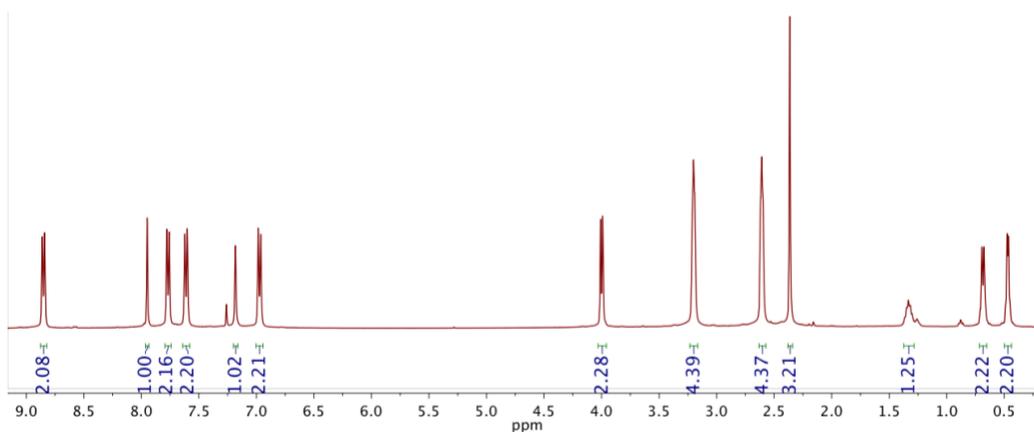


9-(metilciclopropil)-6-(4-metoxifenil)-N-(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-9H-purin-2-amina (16a)

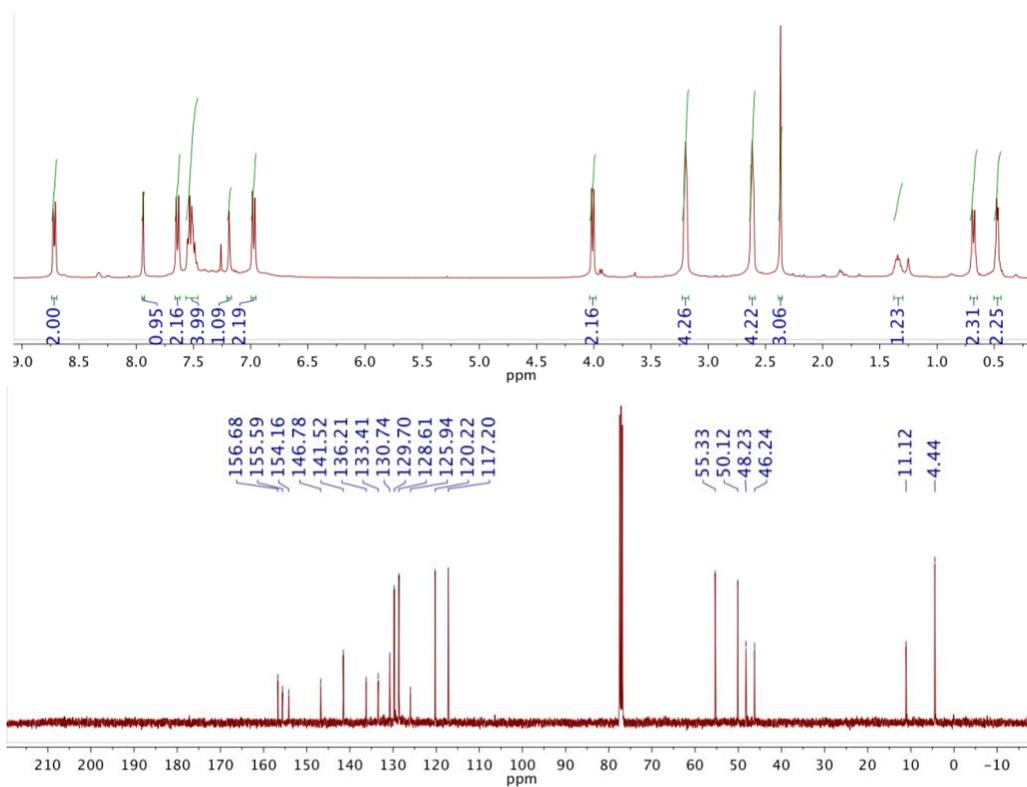




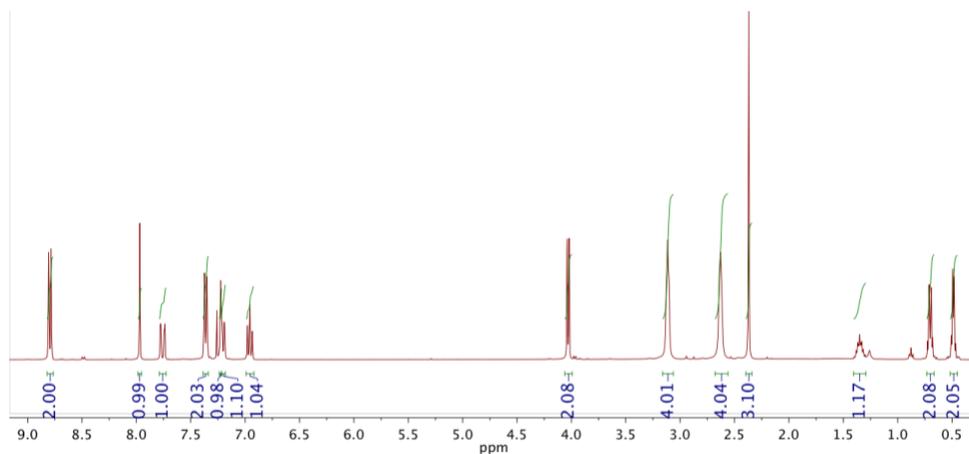
9-(metilciclopropil)-N-(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-6-(4-(trifluorometil)fenil)-9H-purin-2-amina (16b)

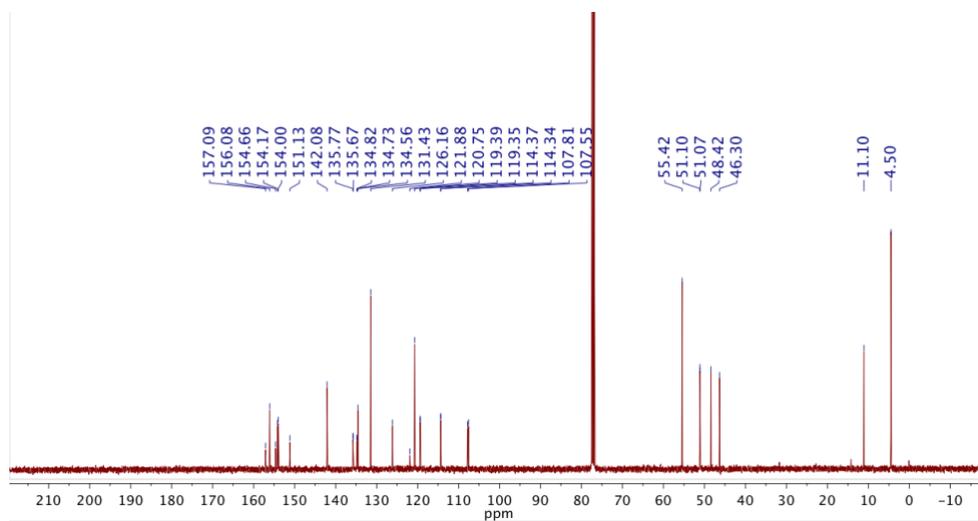


9-(cmetilciclopropil)-N-(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-6-fenil-9H-purin-2-amina (16d)

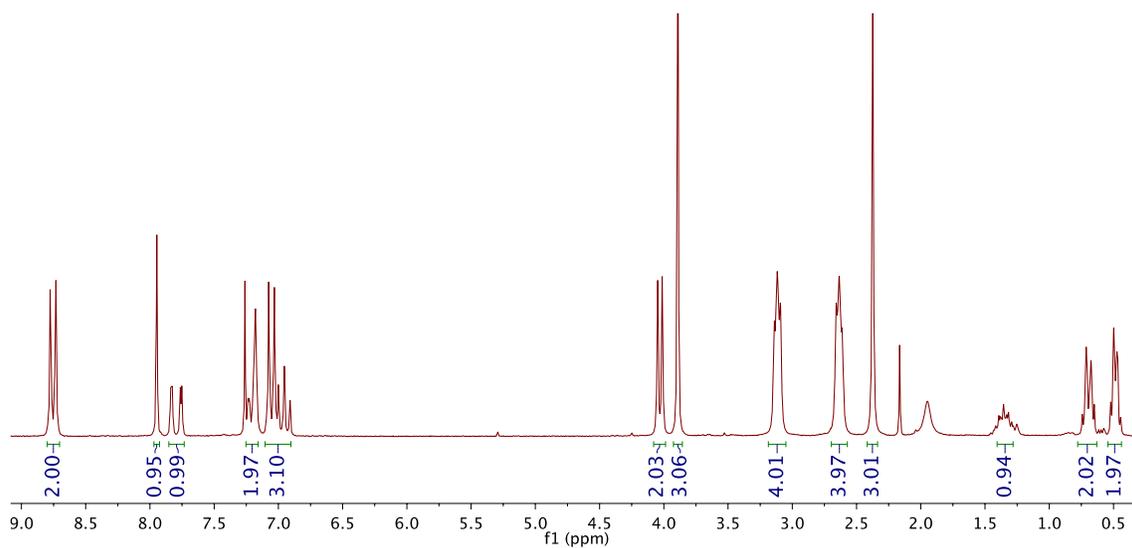


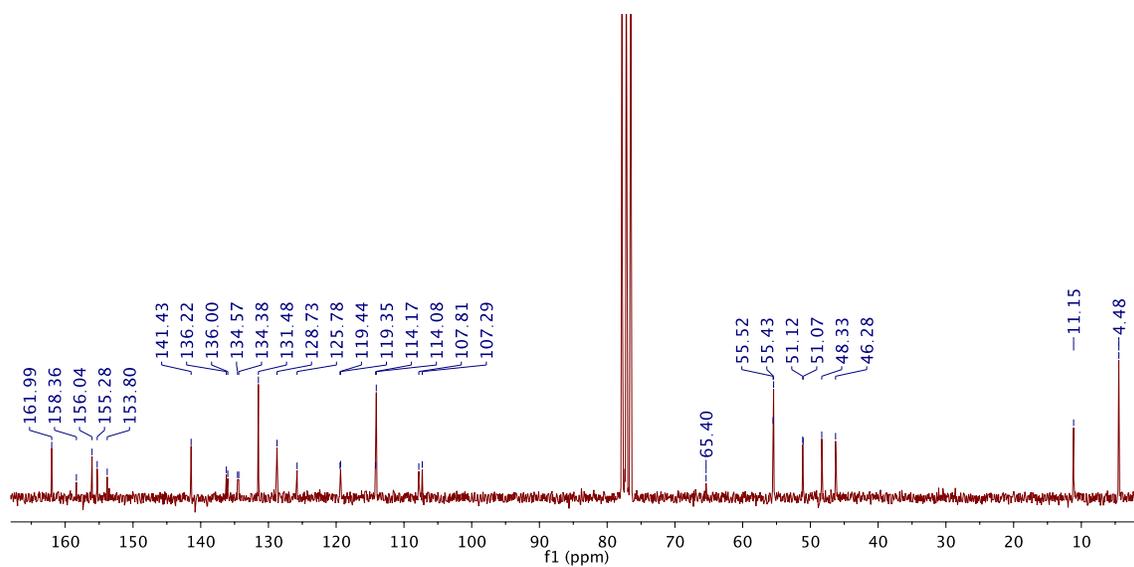
9-(metilciclopropil)-N-(3-fluoro-4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-6-(4-(trifluorometoxi)fenil)-9H-purin-2-amina (16e)



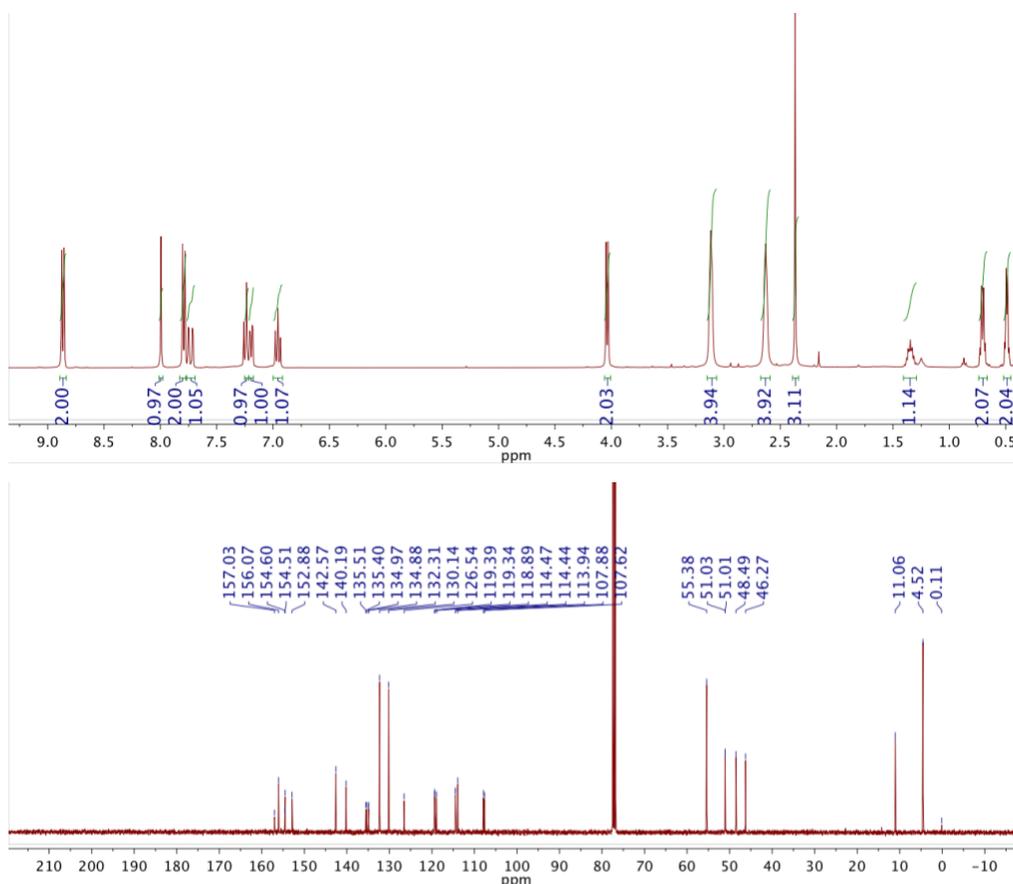


9-(metilciclopropil)-N-(3-fluoro-4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-6-(4-(metoxi)fenil)-9H-purin-2-amina (16f)

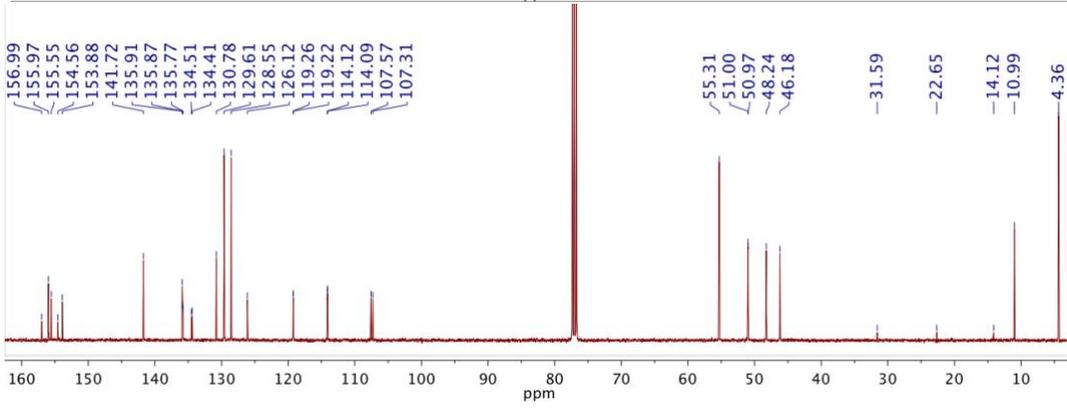
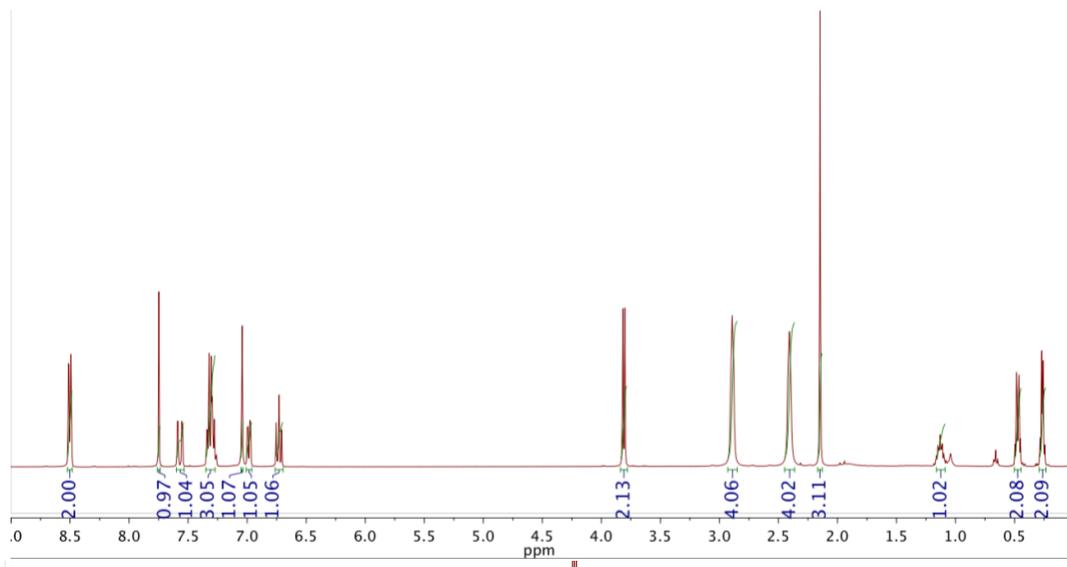




4-(9-(metilciclopropil)-2-((3-fluoro-4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)amino)-9H-purin-6-il)benzonitrilo (16g)

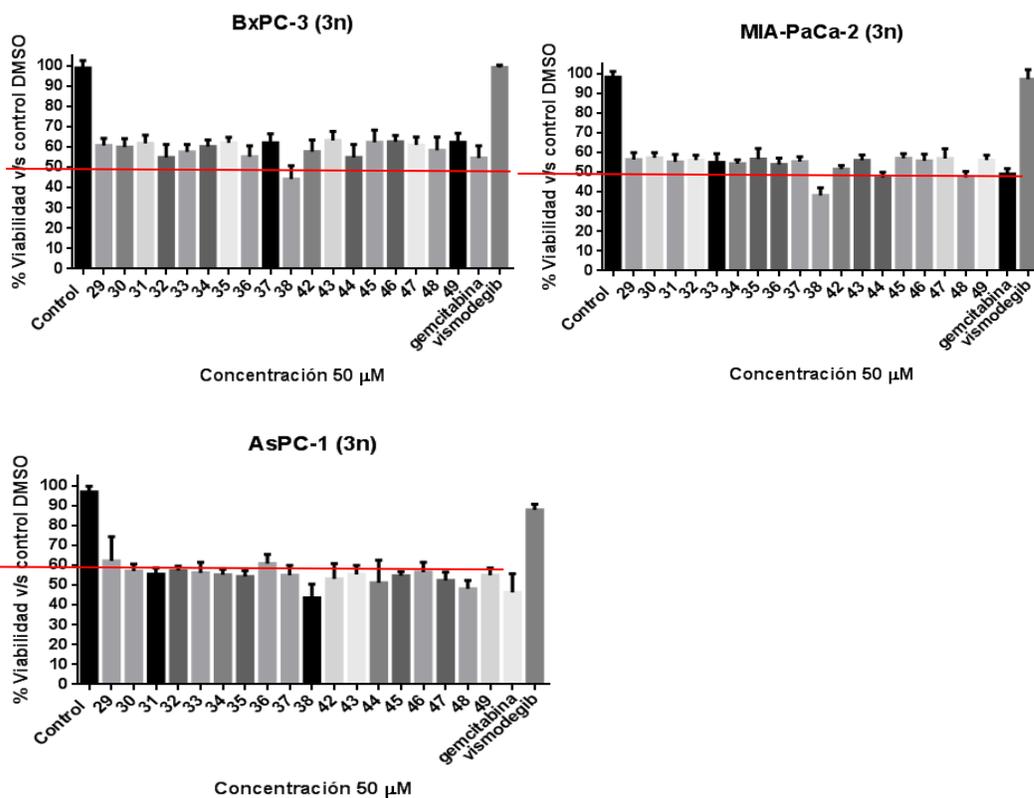


9-(metilciclopropil)-N-(3-fluoro-4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-6-fenil-9H-purin-2-amina (16h)



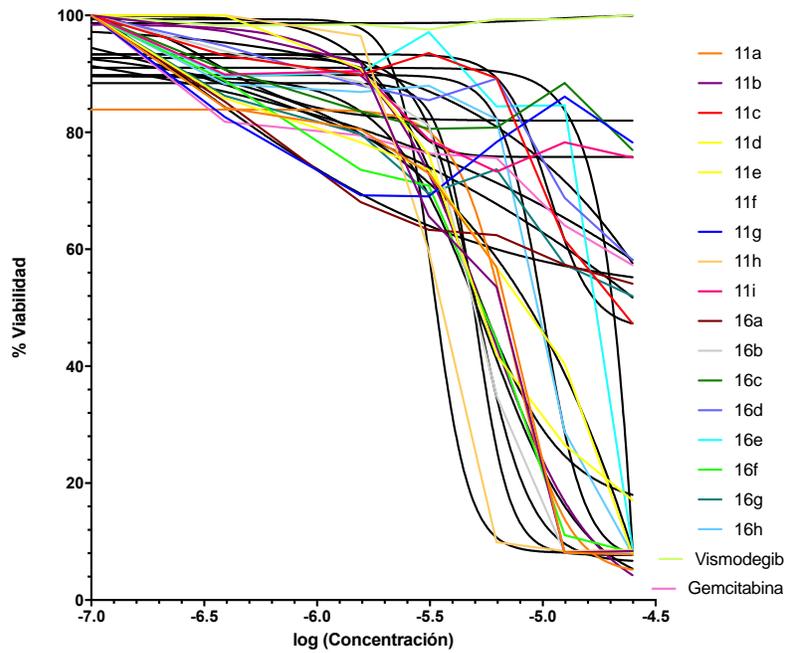
ANEXO 2: Estudios biológicos

Screening de MTT a una concentración de 50 μM de cada compuesto y los respectivos controles, en las células anteriormente expuestas

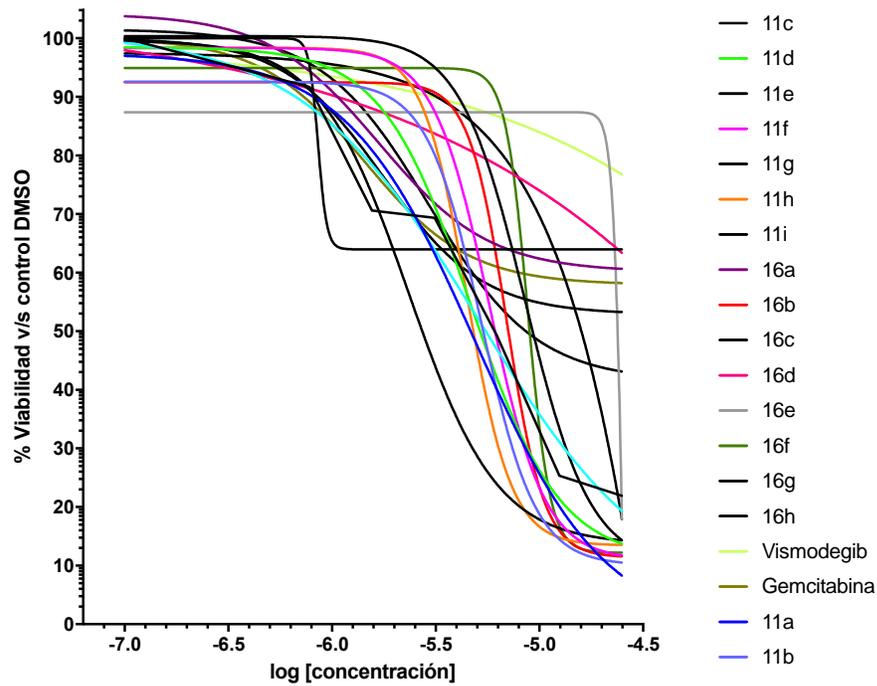


Gráficos IC_{50} obtenidos para las líneas celulares cancerígenas y sanas para ligandos de la **Serie II**.

1. BxPC-3



2. AsPC-1



3. MIA-PaCa-2

