VOLUMEN 48
XXXI Verano De la Ciencia
ISSN 2395-9797
www.jovenesenlaciencia.ugto.mx

Synthesis of pyrazolo[5,4-*b*]pyridines: Anticancer agents inhibiting TNF-α induced by NF-κB activation.

Síntesis de pirazolo[5,4-*b*]piridinas: Anticancerígenos inhibidores de TNFα inducidos por la activación de NF-κB.

Juárez Cisneros María Fernanda[1], Núñez Moreno Johana Esmeralda[1], Pérez González Luis Ángel[1], Vázquez Miguel Á.[1*].
Departamento de Química, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, Noria Alta S/N, 36050, Guanajuato, Gto.
mf.juarezcisneros@ugto.mx[1] je.nunezmoreno@ugto.mx [1] la.perezgonzales@ugto.mx [1] mvazquez@ugto.mx [1*]

Resumen

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel global, lo que motiva la búsqueda de moléculas con mayor selectividad terapéutica, como aquellas que inciden en la inhibición de la vía de señalización del Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF-α). Esta vía es crucial en la progresión tumoral, la inflamación y la resistencia a la apoptosis. En este trabajo, se describe la obtención de derivados de pirazolo[5,4-*b*]piridina y se destaca su evaluación mediante la plataforma informática PASS Online (Prediction of Activity Spectra for Substances). Esta herramienta permite estimar, mediante modelos estadísticos y la relación estructura-actividad (SAR), la probabilidad de que los compuestos diseñados y posteriormente sintetizados presenten posible actividad biológica. Todos los productos fueron caracterizados por medio de RMN ^{1}H e IR, confirmando las estructuras propuestas y sentando las bases para futuros estudios de optimización y evaluación biológica.

Palabras clave: TNF-α; inflamación; apoptosis; pirazolo[5,4-*b*]piridinas; agentes terapéuticos; PASS Online.

Introducción

En la actualidad, la comprensión de la oncogénesis ha evolucionado para reconocer la inflamación crónica como el "séptimo sello distintivo del cáncer" (Mantovani et al., 2008). En este contexto, el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF-α) se identifica como una citocina fundamental y el regulador principal del microentorno tumoral. Este factor resulta esencial para la coordinación de procesos biológicos críticos como la proliferación, la angiogénesis, la migración y la invasión de los tejidos por parte de las células malignas (Balkwill et al., 2009).

Desde una perspectiva química y biológica, el TNF-α opera mediante una vía de señalización que se activa cuando la citocina se acopla a sus receptores específicos en la superficie celular. Dicho evento desencadena una serie de interacciones proteicas que finalizan con la liberación del factor nuclear-κB (NF-κB) (Balkwill et al., 2009). Este complejo de factores de transcripción, que normalmente permanece inactivo en el citoplasma unido a proteínas inhibidoras (IκB), se traslada al núcleo tras su activación (Dvoriantchikova et al., 2014). Posteriormente, se une a regiones específicas del ADN para regular la expresión de genes implicados en la respuesta inmunitaria y, de manera determinante para la progresión tumoral, en la supervivencia celular al inhibir las rutas de la apoptosis (Dvoriantchikova et al., 2014). Si bien su activación transitoria es un mecanismo de defensa natural, su activación persistente se vincula directamente con la oncogénesis y el desarrollo de resistencia a diversos fármacos (Panwalkar et al., 2004).

Debido a la alteración de la vía TNF-α/NF-κB es un punto de convergencia en múltiples patologías (incluyendo enfermedades autoinmunes como la artritis y la diabetes, así como neoplasias hematológicas y tumores sólidos), este sistema constituye una diana terapéutica estratégica para el desarrollo de nuevos compuestos(Panwalkar et al., 2004).

Una de las áreas que conectan la síntesis orgánica, bioinformática, bioquímica, farmacodinamia, y farmacocinética y biología es la química medicinal. En este sentido, los sistemas heterocíclicos fusionados son estructuras químicas altamente valoradas en esta área, donde han demostrado ser andamios moleculares (scaffolds) de gran valor para construir fármacos. Particularmente, las estructuras que combinan

fragmentos de pirazol y piridina, como las 3-aminopirazolopiridinas, destacan por su versatilidad biológica, con actividades reportadas como antitumorales, antivirales y antibacterianas. Estudios recientes de las pirazolo[5,4-*b*]piridinas han demostrado inhibir la activación de la vía de señalización NF-α/NF-κB, mecanismo clave en la proliferación, supervivencia y resistencia de las células tumorales. Además, estos compuestos inducen la apoptosis de manera selectiva en células cancerosas (Orlikova et al., 2014). Se ha documentado actividad biológica en donde se han fusionado fragmentos de pirazol y piridina. Dentro de estas sustancias, son particularmente relevantes las 3-aminopirazolo-piridinas, conocidas por su actividad antitumoral (A), antiviral (**B**), antibacteriana (**C**), antioxidante (**D**) y algunas piridinas 3-aminopirazol son potentes inhibidores de la glucógeno sintasa cinasa-3 (GSK-3) (**E**) (Figura 1) (Hoesel et al., 2013).

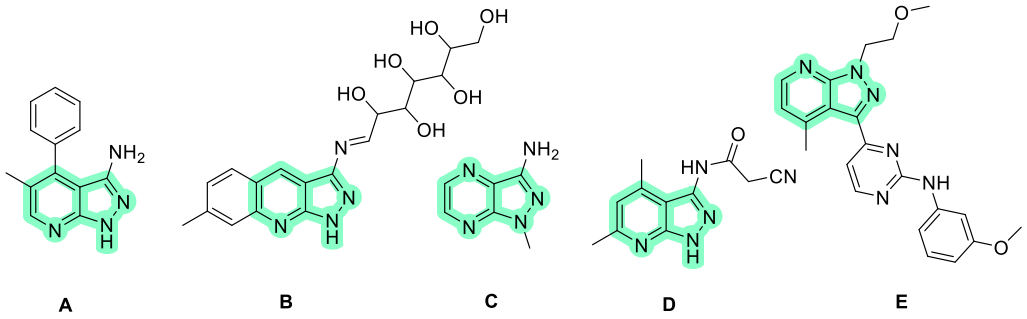


Figura 1. Estructura de pirazolo[5,4-b]piridinas [MV1.1]con propiedades biológicas.

Discusión y Resultados.

Con el objetivo de obtener derivados de pirazolo[5,4-*b*]piridina, se llevó a cabo la síntesis de compuestos precursores mediante una estrategia escalonada que comprendió la obtención de precursores (4*H*-piranos (**4a-d**), 2-piridonas (**7a-d**)), la optimización de la reacción de cloración (6-cloropiridinas (10a-d)) y la funcionalización de este núcleo heterocíclico. Posteriormente, los productos obtenidos (**4**, **7**, y **10a-d**) fueron purificados y caracterizados mediante técnicas espectroscópicas, con el fin de confirmar su estructura química.

Etapa 1. Síntesis de 4*H*-piranos (Sánchez et al., 2012)

Inicialmente, se llevó a cabo la reacción de ciclocondensación de diversos aldehídos aromáticos con grupos electroatractores y electrodonadores (Esquema 1) para obtener los derivados de 4*H*-pirano (Figura 2).

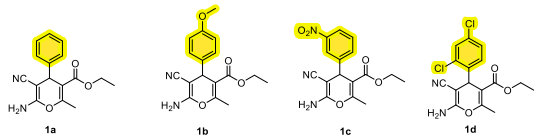
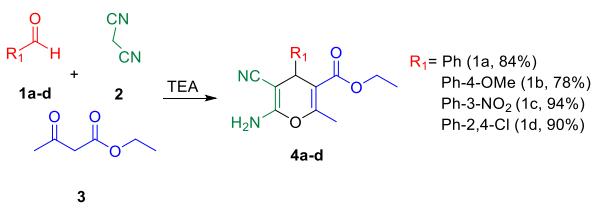
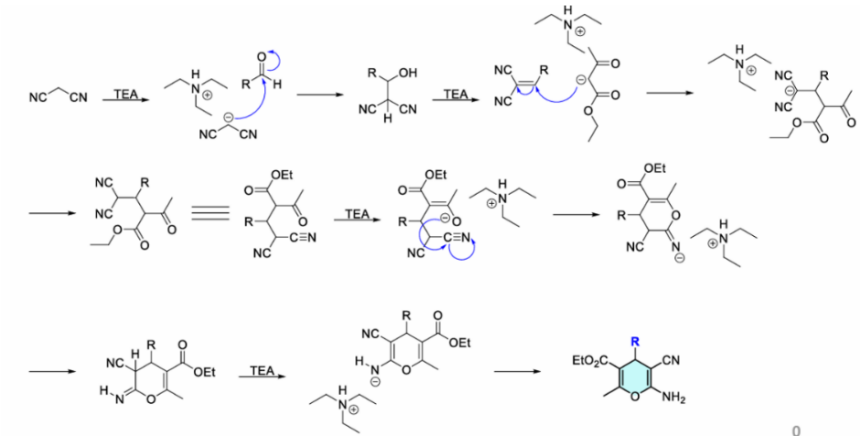


Figura 2. Derivados de 4H-pirano



Esquema 1. Síntesis general de 4H-pirano

La formación de **4a-d** puede explicarse por el posible mecanismo presentado en el Esquema 1. La reacción puede ocurrir mediante la formación inicial del compuesto α,β-insaturado, a partir de la reacción de condensación de Knoevenagel entre el aldehído y el malononitrilo, que sufre un ataque nucleofílico del anión de acetoacetato de etilo para dar el aducto de Michael B, en el cual se promueve la ciclización y la tautomerización posterior da lugar a los 4*H*-piranos polifuncionales **4a-d** (Esquema 2).



*Esquema 2. Mecanismo propuesto para la síntesis de los 4H-piranos **4a-d**.*

Etapa 2. Síntesis de piridonas. (Hernández et al., 2014)

Como siguiente paso, se realizó la síntesis de los derivados de piridona (Figura 3) partiendo de los 4H-piranos anteriormente sintetizados (Esquema 3).

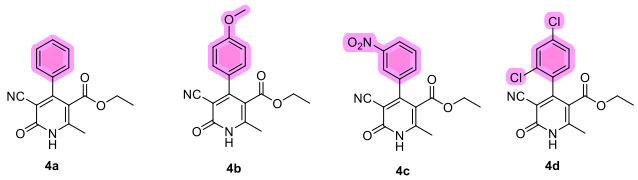
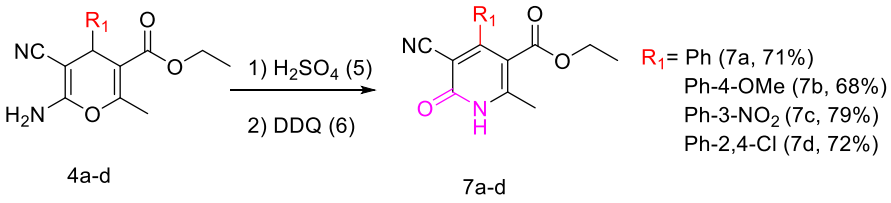


Figura 3. Derivados de piridona

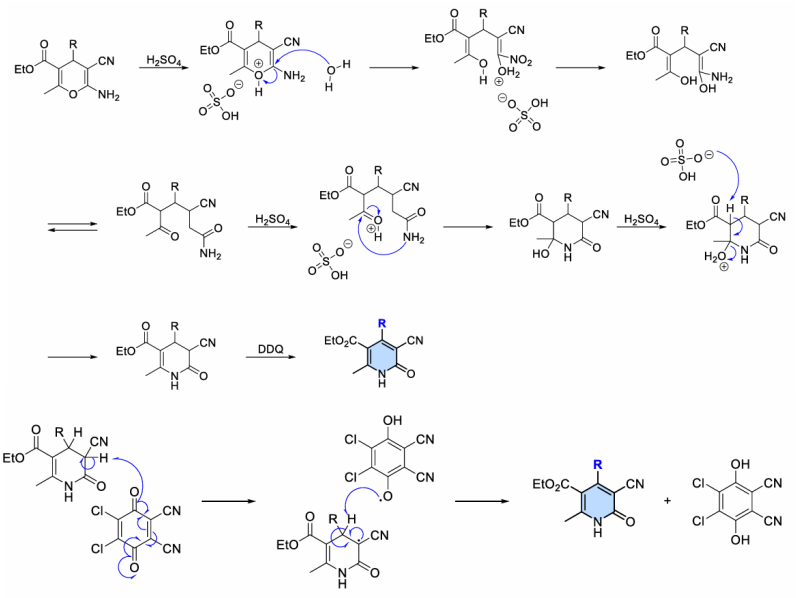


Esquema 3. Síntesis general de 2-piridonas.

En la ruta sintética, la reacción inicia con la protonación del oxígeno del anillo de 4*H*-pirano por una catálisis ácida, favoreciendo la apertura del anillo mediante la ruptura del enlace C–O. El intermediario de cadena abierta generado experimenta una tautomerización ceto-enólica, estabilizando la molécula para la ciclación intramolecular. Posteriormente, el grupo amino ataca nucleofílicamente al carbonilo, promoviendo el cierre

VOLUMEN 48
XXXI Verano De la Ciencia
ISSN 2395-9797
www.jovenesenlaciencia.ugto.mx

del nuevo anillo de seis miembros y la formación de una dihidropiridona. Finalmente, el intermediario es sometido a oxidación con DDQ, el cual actúa como un agente deshidrogenante, favoreciendo la formación de la dihidropiridona, mientras que el DDQ se reduce a su correspondiente hidroquinona (Esquema 4).



*Esquema 4. Mecanismo propuesto para la síntesis de las 2-piridonas **7a-d**.*

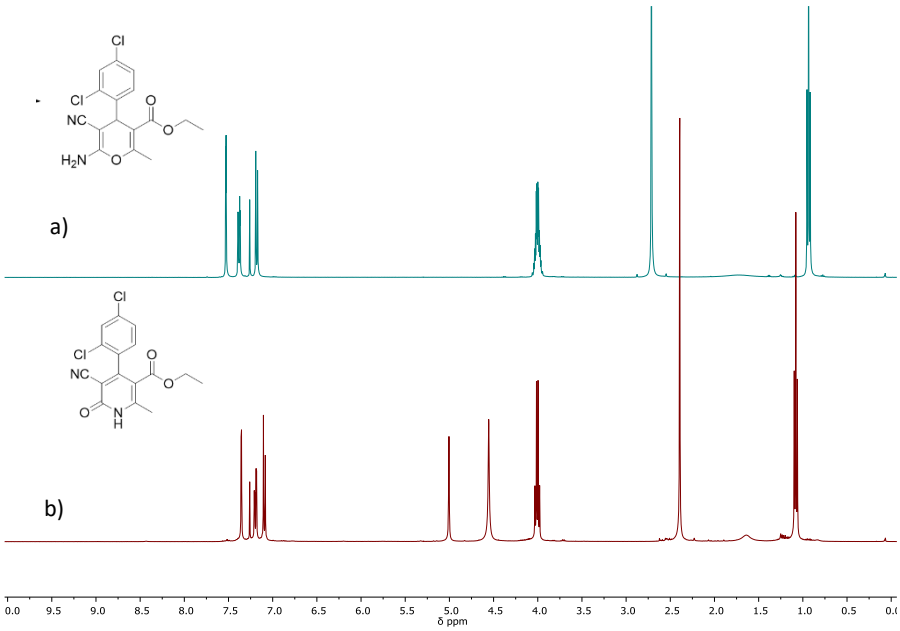


Figura 4. Ejemplo de Resonancia Magnética Nuclear de Protón (RMN ^{1}H) de 2H-piridonas, comparación de a) dihidropiridona 7d y b) 4H-pirano de 4d.

En la caracterización estructural mediante RMN (400 MHz) de ^{1}H (Figura 4), se comparó el espectro obtenido de uno de los 4*H*-piranos sintetizados (b) y de la 2-piridona (a), en los cuales se observa que ambos espectros muestran una señal idéntica a 4.0 ppm, indicando que el grupo etilo del éster se mantiene intacto en la estructura final. El 4*H*-pirano muestra señales bien definidas entre 7.1 y 7.4 ppm, mientras que la 2-piridona

sus señales se desplazan ligeramente hacia campos más bajos (más desprotegidos), apareciendo entre 7.2 y 7.5 ppm. Una señal importante monitoreada fue la del protón en la posición 4 del 4*H*-pirano localizada en 4.5 ppm, la cual desaparece al transformarse en la 2-piridona, confirmando así la transformación del anillo original.

Etapa 3. Síntesis de 6-cloropiridinas (Hernández et al., 2013)

Dentro de la ruta sintética establecida, la obtención de los derivados de 6-cloropiridina constituye una etapa crucial de transformación funcional. Estos compuestos actúan como precursores clave del andamiaje de las 3-aminopirazolopiridinas. La importancia de este intermedio radica en la reactividad de la posición C6 del anillo de piridina. La presencia de un átomo de cloro actúa como un buen grupo saliente, lo cual facilita reacciones de sustitución nucleofílica aromática**.** Se llevó a cabo la reacción de los diversos derivados de 2-piridona (Esquema 5) a las 6-cloropiridinas (Figura 5).

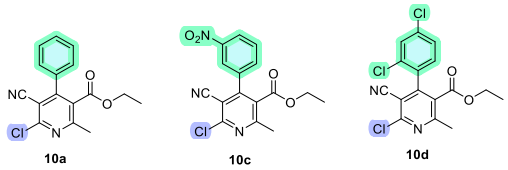
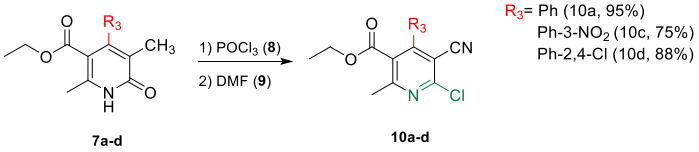
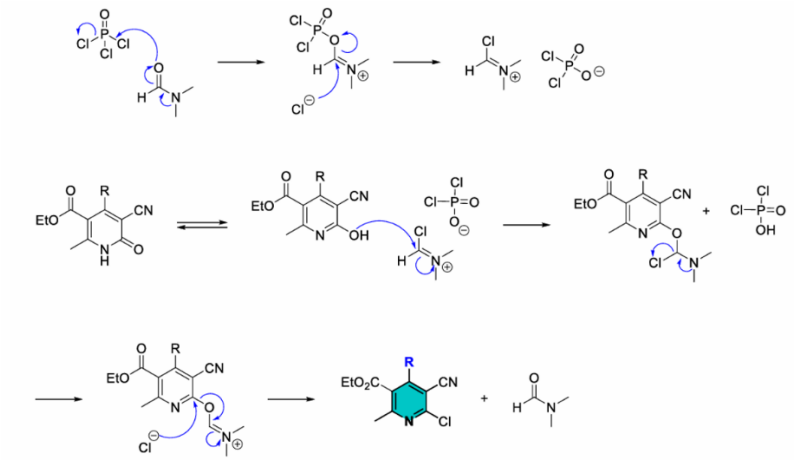


Figura 5. Derivados de 6-cloropiridina



Esquema 5. Síntesis general de 6-cloropiridinas

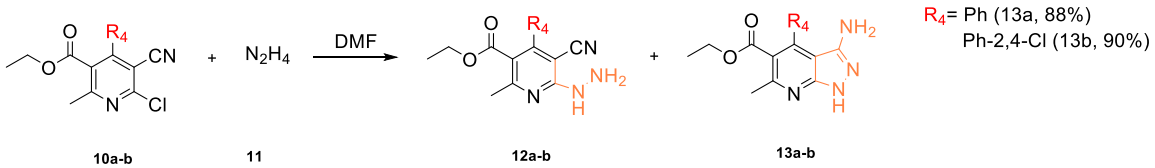
La reacción inicia con la formación *in situ* del reactivo de Vilsmeier mediante la interacción del DMF con $POCl_3$. El ataque nucleofílico del oxígeno carbonílico del DMF al centro fosforado genera un intermediario fosforilado que, tras la eliminación de cloruro y posterior reorganización electrónica, produce un catión cloroiminio altamente electrofílico. Paralelamente, la 2-piridona establece un equilibrio tautomérico con su forma 2-hidroxipiridina, siendo esta última la especie reactiva. El átomo de oxígeno del grupo hidroxilo ataca al carbono electrofílico del reactivo de Vilsmeier, originando un intermediario O-iminio que convierte al hidroxilo en un grupo saliente. Finalmente, el ion cloruro ataca nucleofílicamente el carbono C-2 del heterociclo, desplazando al grupo activado y restableciendo la aromaticidad del sistema, con la consecuente formación de la 6-cloropiridina. Este proceso constituye una sustitución nucleofílica favorecida por la activación previa del grupo hidroxilo, mientras que el DMF se regenera al finalizar la reacción (Esquema 5).



*Esquema 6. Mecanismo propuesto para la síntesis de 6-cloropiridinas **10a-d**.*

Etapa 4. Síntesis de pirazolo[5,4-*b*]piridina (Wu et al., 2007)

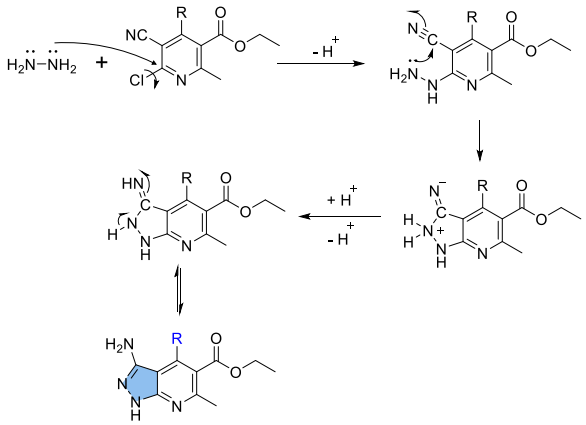
Las 6-cloropiridinas obtenidas en la etapa anterior se emplearon como precursores para la síntesis de derivados de pirazolo[5,4-*b*]piridina. Esta transformación constituye una etapa clave de la ruta sintética, ya que permite la construcción del sistema heterocíclico fusionado mediante una sustitución nucleofílica aromática seguida de una ciclación intramolecular (Esquema 7).



Esquema 7. Síntesis general de pirazolo[5,4-b]piridina

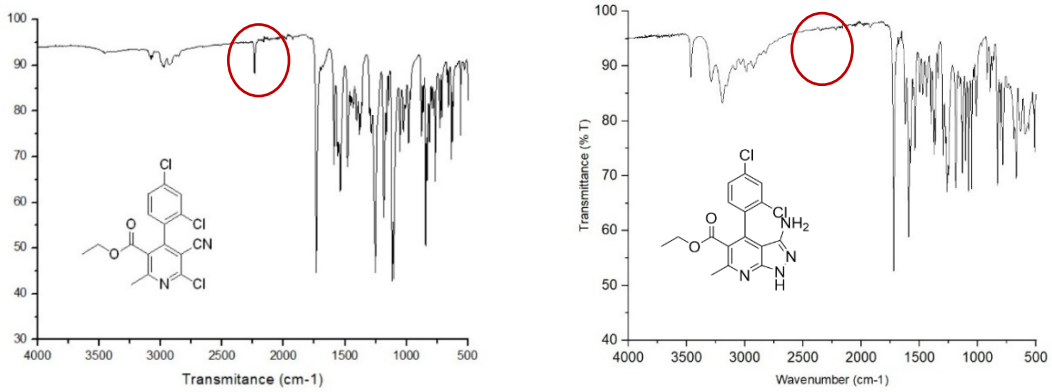
El mecanismo inicia con el ataque nucleofílico de la hidrazina al carbono C-6 de la 6-cloropiridina, promoviendo la sustitución del átomo de cloro mediante un proceso de sustitución nucleofílica aromática (SNAr). Posteriormente, el grupo amino ataca intramolecularmente al carbono del grupo nitrilo, dando lugar al cierre del anillo de cinco miembros. Finalmente, una serie de transferencias de protones y la rearomatización del sistema conducen a la formación del núcleo pirazolo, el cual puede representarse mediante sus formas tautoméricas amino e imino.

VOLUMEN 48
XXXI Verano De la Ciencia
ISSN 2395-9797
www.jovenesenlaciencia.ugto.mx



Esquema 8. Mecanismo propuesto para la síntesis de pirazolo[5,4-b]piridina

Para identificar la transformación, además de la RMN, otra técnica importante es la comparación del espectro de infrarrojo (IR), el espectro a) mostró bandas entre 2980-2870 cm-1 (CH) alifáticas de los grupos etilo y metilo, 2210-2230 cm-1 (CN), 1670 cm-1 (C=O) y 760-700 cm^{-1} (CCl). La desaparición de las bandas NH características de la piridona precursora, y 1640 cm^{-1} (C=O) de la piridona son evidencia de la formación de 6-cloropiridina, mientras que el espectro b) muestra bandas entre 3200-3400 cm^{-1} (NH) del anillo de pirazol, 1715-1730 cm^{-1} (C=O) del éster. La desaparición de la banda característica del grupo nitrilo (CN), indica la formación del sistema fusionado (Figura 6).



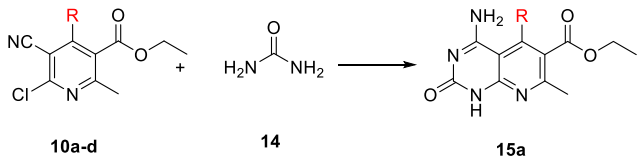
a) *b)*

*Figura 6. Ejemplo de Espectroscopia de Infrarrojo (IR-ATR). El espectro a) corresponde a la 6-cloropiridina **10b** y el espectro b) corresponde a pirazolo[5,4-b]piridina de la estructura **13b**.*

Estudio de optimización metodológica.

Etapa 5. Ciclación para un anillo de seis miembros a partir de la 6-cloropiridina (Soliman et al., 2011) (Wu et al., 2007).

Con el propósito de obtener el sistema bicíclico mediante la ciclación de la 6-cloropiridina con urea, se evaluaron distintas condiciones de reacción, variando el tiempo de reacción, la base, el disolvente y el método de calentamiento. A continuación, se destacan las características más importantes (Tabla 1).

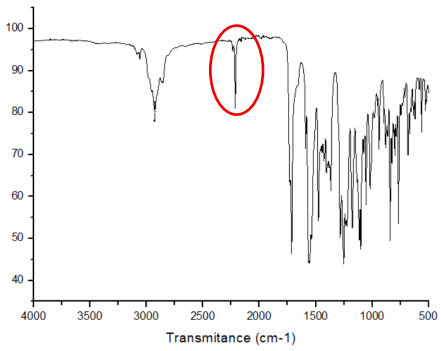


Esquema 9. Síntesis general ciclación con urea

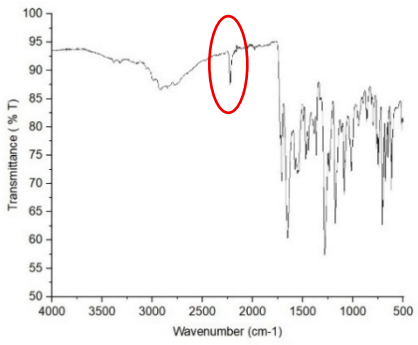
Tabla 1. Estudio de optimización metodológica.

# Exp.	t	Base	Disolvente	Calentamiento	Observación
1	18 h	-	DMF	Reflujo a 60°C	Consumo de la materia prima y formación de dos productos
2	24 h	$CsCO_3$	DMF	Irradiada por luz infrarroja	Consumo de la materia prima y formación de varios productos
3	11 h	$NaHCO_3$	EtOH	Reflujo a 60°C	No se favorece la rxn
4	19 h	t-BuOK	$MeCN/H_2O$	Reflujo a 60°C	No se favorece la rxn

Los productos obtenidos se caracterizaron mediante RMN 1H e IR-ATR. Los resultados indicaron que la transformación mayoritaria corresponde a la sustitución nucleofílica del átomo de cloro por la urea, sin que proceda la ciclación intramolecular para la formación del sistema bicíclico esperado. La interpretación fue apoyada principalmente en los espectros de IR-ATR. Particularmente, la presencia de la banda del grupo nitrilo (2210–2230 cm^{-1}) confirmó que este grupo funcional permaneció sin reaccionar, descartando la ciclación (Figura 8).Por ello, se decidió redirigir la estrategia sintética hacia la funcionalización de la 6-cloropiridina mediante sustitución nucleofílica con otros nucleófilos, con el fin de obtener nuevos derivados de interés biológico.



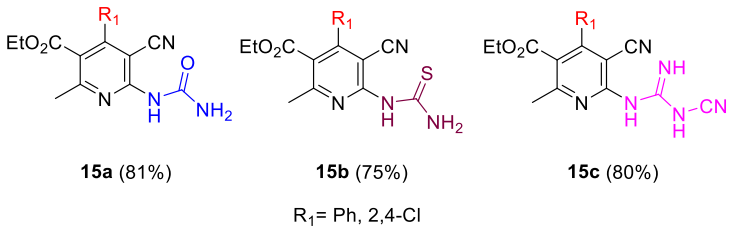
a)



b)

Figura 7. Ejemplo de Espectroscopia de Infrarrojo (IR-ATR). El espectro a) corresponde a al experimento 1 y el espectro b) corresponde al experimento 2.

Considerando los resultados obtenidos, la estrategia sintética se orientó hacia la obtención de diversos derivados funcionalizados mediante reacciones de sustitución nucleofílica. Los compuestos sintetizados fueron caracterizados mediante técnicas espectroscópicas y sus resultados se describen a continuación (Esquema 10).



15a (81%) **15b** (75%) **15c** (80%)

R_1= Ph, 2,4-Cl

Esquema 10. Derivados funcionalizados.

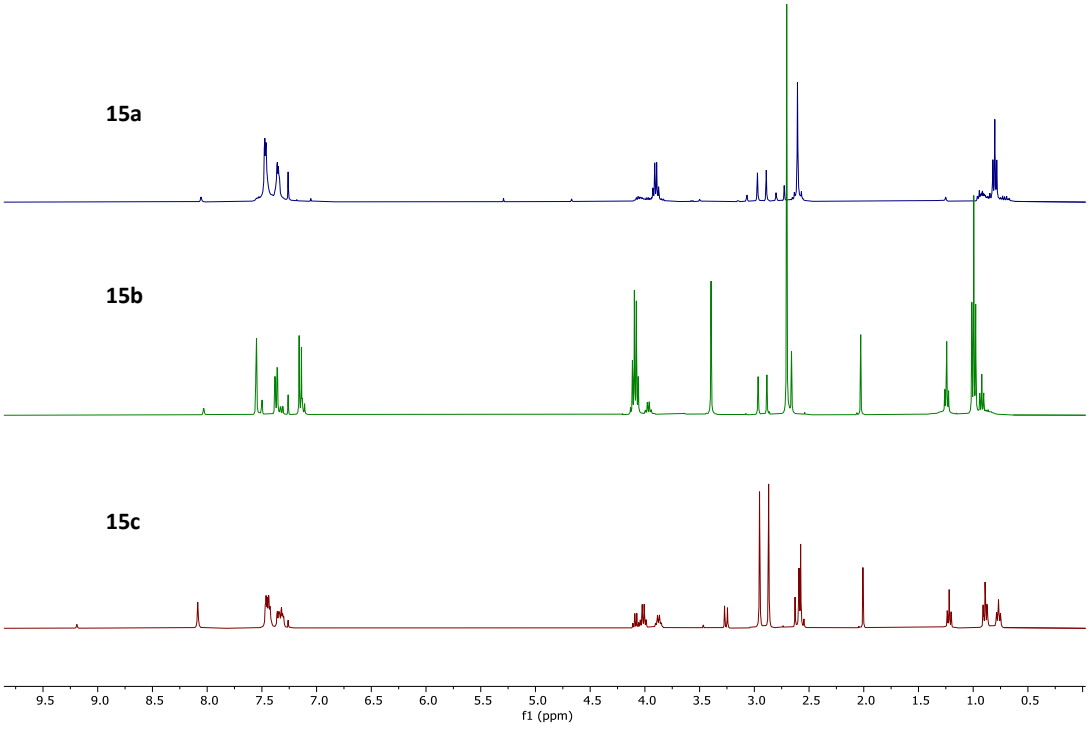
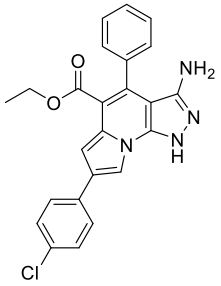


Figura 8. Ejemplo de Resonancia Magnético Nuclear de Protón (RMN 1H) de derivados funcionalizados espectro a) 15a, b) 15b y c) 15c.

Etapa 6.Optimización de 6-cloropiridina y pirazolo[5,4-*b*]piridina

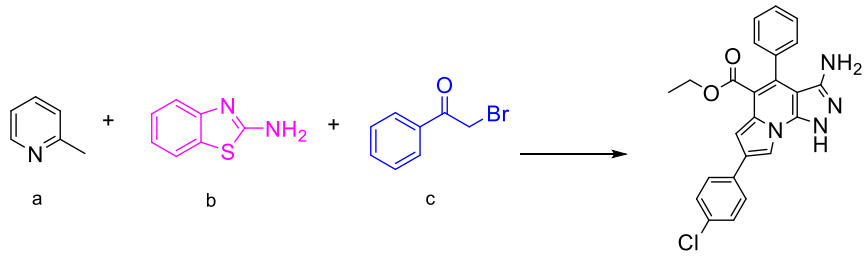
Con el fin de establecer las condiciones adecuadas para la síntesis de los derivados de pirazolo[3,4-*e*]indolizina (Figura 9), se realizó inicialmente un estudio de reactividad empleando sistemas modelo estructuralmente relacionados con los sistemas 1,3-dinucleofílicos tanto del N7 (Gogoi et al., 2011) como el metilo (Liu et al., 2017). Esta estrategia permitió evaluar la influencia del agente alquilante, la base, el disolvente y las condiciones de reacción antes de aplicarlas a los sustratos sintetizados en este trabajo (Tabla 2).



16

Figura 9. Molécula de interés

Tabla 2. Evaluación de reactividad en sistemas modelo



16

Sistema modelo	**Cat.**	**Disolvente**	**T**	**t**	**Resultado**
b	$NaHCO_3$	MeCN	90°c	30 h	Se observa la formación de varios productos, entre ellos la ciclación.
a	K_2CO_3	H_2O	90°C	25 h	Se observa la formación de varios productos, entre ellos la ciclación.

A partir de los resultados con los sistemas modelo, se seleccionaron las condiciones que mostraron la mayor conversión y limpieza de reacción junto con el agente alquilante **c**. Estas condiciones se emplearon posteriormente para evaluar la reactividad de las 6-cloropiridinas sintetizadas y, finalmente, de las correspondientes pirazolo[5,4-*b*]piridinas (Tabla 3).

Tabla 3. Aplicación a los sustratos sintetizados

Sustrato	Cat.	Disolvente	T	t	Resultado
13	$NaHCO_3$	MeCN	90°c	41 h	Según la RMN de 1H, se llevó a cabo la sustitución, pero no la ciclación.
10c	K_2CO_3	H_2O	90°C	12 h	Según la RMN de 1H, hubo formación de varios

VOLUMEN 48
XXXI Verano De la Ciencia
ISSN 2395-9797
www.jovenesenlaciencia.ugto.mx

	subproductos entre ellos la ciclación.

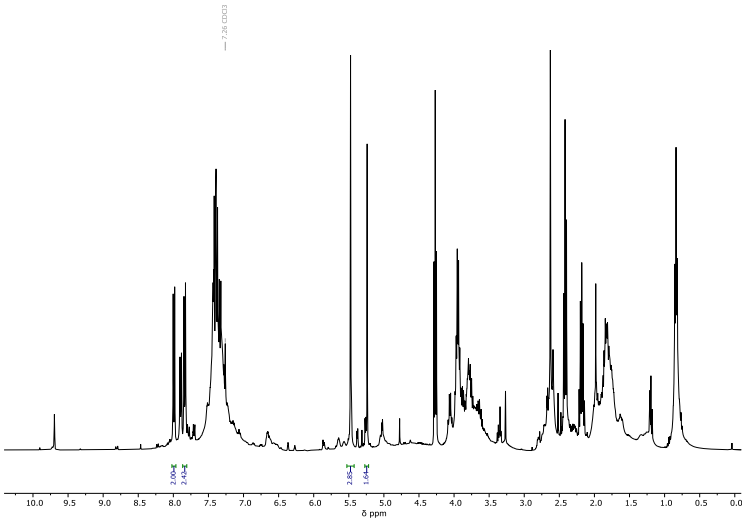


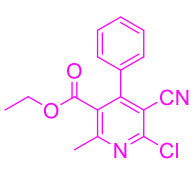
Figura 10. Resonancia Magnético Nuclear de Protón (RMN ^1H) de 3-amino-7-(4-clorofenil)-4-fenil-1H-pirazolo[3,4-b]indolizina-5-carboxilato de H etilo.

En el espectro de RMN de 1H corresponde al crudo de reacción de 3-amino-7-(4-clorofenil)-4-fenil-1H-pirazolo[3,4-b]indolizina-5-carboxilato de etilo, en el cual se observa que no hay transformación, posiblemente sólo se llevó a cabo la cuaternización del sistema, ya que hay un singulete en 2.6 ppm correspondiente al singulete del metilo, lo que explica que hay presencia de materia prima y dos posibles subproductos, entre ellos el de interés (figura 10).

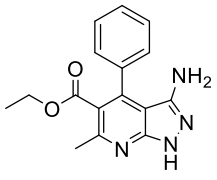
Uso de programa informático PASS Online para predecir actividad biológica

PASS Online estima la probabilidad de que un compuesto presente una determinada actividad biológica (Pa) o carezca de ella (Pi), proporcionando una herramienta útil para priorizar actividades biológicas de interés y orientar la interpretación del potencial farmacológico de nuevas moléculas.

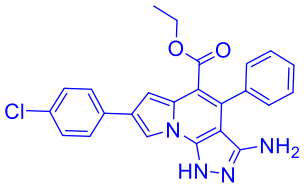
Con el fin de obtener una aproximación preliminar del potencial biológico de los compuestos sintetizados, las estructuras obtenidas fueron sometidas a un análisis in silico mediante la plataforma PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances). Para ello, las estructuras químicas de los compuestos sintetizados se emplearon como datos de entrada, permitiendo predecir su espectro de actividades biológicas potenciales con base en la relación estructura-actividad (SAR) y en modelos estadísticos desarrollados a partir de compuestos previamente caracterizados (Figura 11 y 12).



I



II



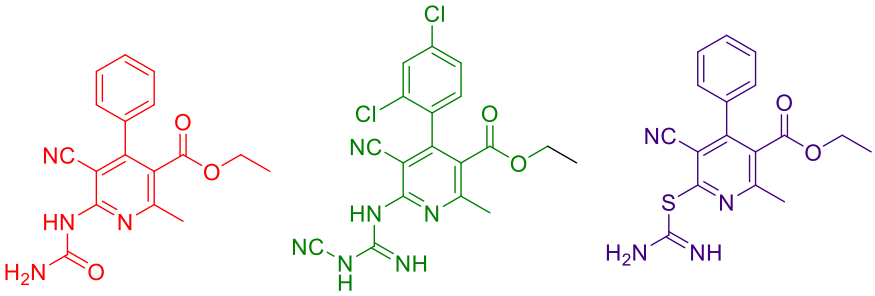
III

Pa	Pi	Activity name
0,773	0,005	Centromere associated protein inhibitor
0,643	0,012	Calcium channel (voltage-sensitive) activator
0,632	0,038	5-O-(4-coumaroyl)-D-quinate 3'-monooxygenase inhibitor
0,611	0,020	Antianginal
0,552	0,014	Antihypertensive
0,543	0,013	Antiviral (Rhinovirus)
0,551	0,028	CYP2C8 substrate
0,541	0,022	tRNA-pseudouridine synthase I inhibitor
0,530	0,015	Cardiotonic
0,538	0,025	CYP2A6 substrate
0,524	0,033	CYP2B6 substrate
		Nitrate reductase (cytochrome)

Pa	Pi	Activity name
0,707	0,005	Calcium channel (voltage-sensitive) activator
0,625	0,016	Anticonvulsant
0,601	0,003	MAP3K5 inhibitor
0,603	0,015	Histidine kinase inhibitor
0,574	0,017	Platelet derived growth factor receptor kinase inhibitor
0,546	0,004	Serum-glucocorticoid regulated kinase 1 inhibitor
0,520	0,004	Calcium channel activator
0,551	0,039	General pump inhibitor
0,532	0,027	Nucleotide metabolism regulator
0,521	0,027	Signal transduction pathways inhibitor
0,442	0,029	CDK9/cyclin T1 inhibitor
0,498	0,085	5-O-(4-coumaroyl)-D-quinate 3'-monooxygenase inhibitor

Pa	Pi	Activity name
0,702	0,008	Centromere associated protein inhibitor
0,615	0,043	5-O-(4-coumaroyl)-D-quinate 3'-monooxygenase inhibitor
0,502	0,024	Antiviral (Rhinovirus)
0,424	0,082	Lipid metabolism regulator
0,413	0,076	Antianginal
0,403	0,072	Nitrate reductase (cytochrome) inhibitor
0,446	0,125	Calcium channel (voltage-sensitive) activator
0,353	0,038	Glycogen synthase stimulant
0,356	0,041	Antialcoholic
0,378	0,070	Cholesterol antagonist
0,388	0,113	Thromboxane B2 antagonist
		Glycosylphosphatidylinositol

Figura 11. Predicción de actividad biológica de I) 5-ciano-6-cloro-2-metil-4-fenilnicotinato de etilo, II) 3-amino-6-metil-4-fenil-1H-pirazolo[3,4-b]piridina-5-carboxilato de etilo y III) 3-amino-7-(4-clorofenil)-4-fenil-1H-pirazolo[3,4-b]indolizina-5-carboxilato de etilo.



a **b** **c**

All Pa>Pi Pa>0,3 Pa>0,7 ok

Pa	Pi	Activity
0,619	0,005	Transcription factor inhibitor
0,557	0,042	Calcium channel (voltage-sensitive) activator
0,540	0,033	Antianginal
0,473	0,036	Centromere associated protein inhibitor
0,488	0,072	Mannotetraose 2-alpha-N-acetylglucosaminyltransferase inhibitor
0,443	0,030	Antihypertensive
0,472	0,064	Antiviral (Picornavirus)
0,446	0,049	Platelet derived growth factor receptor kinase inhibitor
0,458	0,089	Oxidoreductase inhibitor

All Pa>Pi Pa>0,3 Pa>0,7 ok

Pa	Pi	Activity
0,655	0,014	Antianginal
0,622	0,009	Antihypertensive
0,511	0,021	Vasodilator
0,472	0,004	Antineoplastic (endocrine cancer)
0,448	0,016	Cardioprotectant
0,432	0,018	Antiischemic
0,429	0,036	Antiulcerative
0,470	0,103	Calcium channel (voltage-sensitive) activator
0,444	0,079	Antiviral (Picornavirus)
0,424	0,068	Vasodilator, peripheral

All Pa>Pi Pa>0,3 Pa>0,7 ok

Pa	Pi	Activity
0,673	0,012	Antianginal
0,654	0,005	Atherosclerosis treatment
0,608	0,010	Antihypertensive
0,612	0,050	Antiischemic, cerebral
0,502	0,050	Antiviral (Picornavirus)
0,461	0,017	Transcription factor inhibitor
0,468	0,028	Antiviral (Influenza)
0,447	0,016	Antiischemic
0,500	0,078	Calcium channel (voltage-sensitive) activator
0,429	0,009	Septic shock treatment

Figura 12. Predicción de actividad biológica de a) 5-ciano-2-metil-4-fenil-6-ureidonicotinato de etilo, b) 5-ciano-6-(3-cianoguanidino)-2-metil-4-fenilnicotinato de etilo y c) 6-(carbamimidoiltio)-5-ciano-2-metil-4-fenilnicotinato de etilo.

La implementación del estudio *in silico* mediante PASS Online permitió obtener una aproximación preliminar y fundamentada del potencial de los compuestos sintetizados, tales como el derivado de 6-cloropiridina, la pirazolo[3,4-*b*]piridina y la pirazolo[3,4-*b*]indolizina. Los resultados derivados de la plataforma sugieren que la arquitectura molecular de las pirazolo[5,4-*b*]piridinas obtenidas posee el andamiaje (scaffold) adecuado para interactuar con dianas terapéuticas estratégicas, como las cinasas involucradas en la señalización celular.

Conclusiones

Se estableció exitosamente una ruta sintética escalonada y eficiente para la obtención de derivados de pirazolo[5,4-*b*]piridina, logrando la caracterización estructural precisa de cada intermediario mediante técnicas de RMN ^{1}H e IR. El proceso demostró una alta eficiencia, destacando rendimientos de hasta el 95% en etapas críticas de cloración, mientras que los estudios de reactividad en sistemas modelo permitieron identificar las condiciones óptimas de base y disolvente para la funcionalización del núcleo.

Dado que estos compuestos actúan como andamios moleculares estratégicos para inhibir la vía de señalización TNF-α/NF-κB, los resultados obtenidos posicionan a estas moléculas como candidatos prometedores para el desarrollo de nuevas terapias anticancerígenas orientadas a inducir la apoptosis y mitigar la inflamación crónica en el microentorno tumoral. La integración del análisis mediante PASS Online fue determinante para predecir el espectro de actividad biológica de los compuestos, permitiendo vincular de manera eficiente su estructura química con su posible eficacia terapéutica. Los resultados obtenidos confirman que estos sistemas heterocíclicos poseen atributos estructurales prometedores para intervenir en vías críticas de señalización celular, validando el uso de herramientas computacionales para la priorización y el diseño de nuevas moléculas con interés médico.

Perspectivas

Gracias al uso de la plataforma PASS Online, se ha logrado identificar un panorama amplio de dianas terapéuticas potenciales, lo que sugiere que los núcleos de pirazolo[5,4-*b*]piridina y sus derivados poseen una versatilidad farmacológica significativa antes de ser sometidos a ensayos biológicos externos. En este sentido, un objetivo primordial será mejorar las condiciones de reacción (evaluando diversas bases, disolventes y métodos de calentamiento) para favorecer la ciclación intramolecular en aquellos intermediarios donde actualmente sólo se observa la sustitución nucleofílica. La optimización de estos parámetros permitirá obtener de manera más eficiente los sistemas heterocíclicos fusionados, consolidando una biblioteca de agentes terapéuticos con un perfil estructural óptimo para su posterior estudio en modelos de inhibición de cinasas o vías de señalización celular.

Sección experimental

Etapa 1. Síntesis de 4*H*-piranos. Una mezcla de benzaldehído aromático (1 equiv.), malononitrilo (1.1 equiv.), acetoacetato de etilo (1.1 equiv.) y TEA (0.2 equiv.) en 3 mL de etanol a t.a. durante 30 min. Precipitar en hielo, filtrar y lavar en etanol/agua 5:5. En el caso de 1d 70 min de reacción. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.36 (d, J = 2.1 Hz, 1H, Ar–H), 7.20 (dd, J = 8.4, 2.2 Hz, 1H, Ar–H), 7.09 (d, J = 8.3 Hz, 1H, Ar–H), 5.03–4.98 (m, 1H, H-4), 4.56 (s, 2H, NH_2), 4.01 (q, J = 7.1 Hz, 2H, OCH_2CH_3), 2.39 (s, J = 1.1 Hz 3H, CH_3), 1.08 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH_3CH_2O).

Etapa 2. Síntesis de 2-piridonas. Una mezcla de derivado de pirano (1 equiv.), ácido sulfúrico (0.2 equiv.), DDQ (1.2 equiv.) en 5 mL de etanol utilizando irradiación infrarroja como fuente de calor (70°C) durante 90 min. Lavar y filtrar en etanol/agua 5:5 fría. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.53 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.38 (dd, J = 8.3, 2.0 Hz, 1H), 7.18 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 4.00 (qq, J = 7.0, 3.7 Hz, 2H), 2.71 (s, 3H), 0.92 (s, 3H).

Etapa 3. Síntesis de 6-cloropiridinas. Una mezcla de derivado de piridona (1 equiv.), oxicloruro de fósforo (20 equiv.), DMF (0.3 equiv.) a reflujo (60°C) durante 4 h (en el caso de 7c 20 h y 7d 24 h), desactivar lentamente con trozos de hielo a 0°C, lavar y filtrar con agua fría.^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.56 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.37 (dd, J = 8.3, 2.0 Hz, 1H), 7.15 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 4.09 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 2.71 (s, 3H), 1.00 (t, J = 7.1 Hz, 3H).

Etapa 4. Síntesis de pirazolo[5,4-*b*]piridina. Una mezcla de derivados de 6-cloropiridinas (1 equiv.), hidrazina hidratada (2 equiv.) en 1.2 mL de DMF en multiposos a 100 °C durante 2 h, filtrar y lavar con agua fría.^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 12.42 (s, 1H), 7.80 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 7.55 (dd, J = 8.2, 2.2 Hz, 1H), 7.37 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 4.29 (s, 2H), 3.96 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 3.34 (s, 4H), 2.60 (s, 3H), 0.86 (t, J = 7.1 Hz, 3H).

Referencias

- Balkwill, F. (2009). Tumour necrosis factor and cancer. Nature Reviews Cancer, 9(5), 361–371. https://doi.org/10.1038/nrc2628
- Dvoriantchikova, G., & Ivanov, D. (2014). Tumor necrosis factor-alpha mediates activation of NF-κB and JNK signaling cascades in retinal ganglion cells and astrocytes in opposite ways. European Journal of Neuroscience, 40(8), 3171–3178. Portico. https://doi.org/10.1111/ejn.12710
- Gogoi, S., Dutta, M., Gogoi, J., & Boruah, R. C. (2011). Microwave promoted synthesis of cycl[3.2.2]azines in water via a new three-component reaction. Tetrahedron Letters, 52(7), 813–816. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2010.12.036
- Hernández, F., Cruz, F., López, J., Peña, E., Delgado, F., Alcaraz Y., Robles, J., Martínez-Alfaro, M., & Vázquez, M. A. (2014). A Green Approach to the Production of 2-pyridone Derivatives Promoted by Infrared Irradiation. Sociedad Química de México, 58(2), 152-158.
- Hernández, F., Sánchez, A., Rendón Vallejo, P., Millán-Pacheco, C., Alcaraz, Y., Delgado, F., Estrada-Soto, S. (2013). Synthesis, ex vivo and in silico studies of 3-cyano-2 pyridone derivatives with vasorelaxant activity. Eur. J. Med. Chem., 2013, 70, 669-676.
- Hoesel, B., & Schmid, J. A. (2013). The complexity of NF-κB signaling in inflammation and cancer. Molecular Cancer, 12(1), 86. https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-86
- Liu, Y., Yu, Y., Fu, Y., Liu, Y., Shi, L., Li, H., & Wang, W. (2017). Transition-metal-free synthesis of indolizines via [3 + 2]-annulation from α-bromoenals and 2-substituted azaarenes. Organic Chemistry Frontiers, 4(11), 2119–2123. https://doi.org/10.1039/C7QO00529F
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., & Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. Nature, 454(7203), 436–444. https://doi.org/10.1038/nature07205
- Orlikova, B., Chaouni, W., Schumacher, M., Aadil, M., Diederich, M., & Kirsch, G. (2014). Synthesis and bioactivity of novel amino-pyrazolopyridines. European Journal of Medicinal Chemistry, 85, 450–457. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.08.008
- Panwalkar, A., Verstovsek, S., & Giles, F. (2004). Nuclear factor-KappaB modulation as a therapeutic approach in hematologic malignancies. Cancer, 100(8), 1578–1589. Portico. https://doi.org/10.1002/cncr.20182
- Sánchez, A., Hernández, F., Cruz, P. C., Alcaraz, Y., Tamariz, J., Delgado, F & Vázquez, M. A. (2012). Infrared Irradiation-Assisted Multicomponent Synthesis of 2-Amino-3-cyano-4H-pyran Derivatives. Sociedad Química de México, 56(2), 121-127.
- Soliman, A. M. (2011). Synthesis of novel pyrazolopyridine and pyridopyrimidine derivatives. Journal Of Heterocyclic Chemistry, 48(3), 592-596. https://doi.org/10.1002/jhet.547
- Wu, Z., Robinson, R. G., Fu, S., Barnett, S. F., Defeo-Jones, D., Jones, R. E., Kral, A. M., Huber, H. E., Kohl, N. E., Hartman, G. D., & Bilodeau, M. T. (2007). Rapid assembly of diverse and potent allosteric Akt inhibitors. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, *18*(6), 2211-2214. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.10.0