

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

DISEÑO, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE INHIBIDORES DE SGK1 COMO
HERRAMIENTAS FARMACOLÓGICAS FRENTE A LA NEURODEGENERACIÓN

DESIGN, SYNTHESIS, AND EVALUATION OF SGK1 INHIBITORS AS
PHARMACOLOGICAL TOOLS AGAINST NEURODEGENERATION

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

ENRIQUE MADRUGA MAYORDOMO

DIRECTORA

ANA MARTÍNEZ GIL

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

DISEÑO, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE INHIBIDORES DE SGK1 COMO
HERRAMIENTAS FARMACOLÓGICAS FRENTE A LA NEURODEGENERACIÓN

DESIGN, SYNTHESIS, AND EVALUATION OF SGK1 INHIBITORS AS
PHARMACOLOGICAL TOOLS AGAINST NEURODEGENERATION

PROGRAMA DE DOCTORADO DE QUÍMICA MÉDICA

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

ENRIQUE MADRUGA MAYORDOMO

DIRECTORA

ANA MARTÍNEZ GIL

*A mi madre, a mi padre, a mi
hermano y a Silvia. A mi familia.*

AGRADECIMIENTOS

Es posible que quien sostiene esta tesis se encuentre dentro de dos grandes grupos de personas. Al primero, formado por aquellos interesados en el contenido científico del texto: espero que no encontréis estos agradecimientos demasiado extensos. Es de bien nacido ser agradecido, y aquí hay mucho que agradecer. Al segundo grupo, compuesto por quienes buscarán su nombre en estas páginas, confío en que lo encontréis. De no ser así, el problema probablemente sea de mi memoria, y no vuestro. Y para aquellos *rara avis* que pertenecéis a ambos grupos: gracias. Una parte incuantificable de esta tesis es gracias a cada uno de vosotros, sin duda.

Es de recibo agradecer en primer lugar a mi directora de tesis, la Prof.^a Ana Martínez. Estos años como investigador predoctoral han sido los más estimulantes de mi vida, lo cual habría sido imposible sin la oportunidad de poder trabajar bajo tu dirección. Gracias por tener siempre la puerta de tu despacho abierta, dispuesta a dar el consejo que uno necesita con la calidez humana que te caracteriza. Y, sobre todo, gracias por confiar en la capacidad de tus doctorandos para formarse, equivocarse y sacar el trabajo adelante (en ese orden, concretamente). Si algún día llego a ser la mitad de buen mentor que tú, me daré por satisfecho.

A la Dra. Carmen Gil, el otro pilar del laboratorio, gracias por tu paciencia y tu capacidad incansable de trabajo. Ha sido un placer competir contigo por ver quién cerraba más tarde el laboratorio durante esta última etapa. Tu preocupación por la gente que forma este laboratorio es envidiable, y creo que es una de las claves que hacen de este sitio un lugar de trabajo realmente agradable.

Quiero también agradecer a la Dra. Valle Palomo el tiempo que hemos compartido, quizá demasiado poco. Las conversaciones que hemos tenido hacen que admire tu capacidad como científica y, sobre todo, tus extraordinarios valores. A la Prof.^a Isabel Lastres, gracias por acogerme en tu laboratorio en mis comienzos como investigador. Y a Mercedes Villacampa y María Pilar Hoyos, profesoras de la Universidad Complutense de Madrid, por tutelar mi tesis y coordinar mi periodo como docente. Por supuesto, gracias al Ministerio de Universidades por financiar el contrato que ha hecho posible este trabajo.

Esta tesis sería impensable si no hubiera caminado a hombros de verdaderos gigantes. Los doctores de este laboratorio han evitado y corregido muchos de mis fracasos durante estos años. Ha habido y seguirá habiendo fallos, pero eso es culpa exclusivamente del alumno, lo prometo.

Alfonso, gracias por tu ayuda en la síntesis de estos compuestos. Ha sido un placer trabajar contigo en muchos de mis proyectos, será por nuestras raíces charras. Espero estar presente el día que no consigas sintetizar alguna molécula, siempre he querido presenciar un suceso paranormal en directo. Eva, casi toda mi formación en la rama biológica te la debo a ti. Gracias por la paciencia. Has conseguido que un apasionado de la quimioinformática como yo madrugue para hacer experimentos en la sala de cultivos, mucho mérito por tu parte. Espero poder seguir aprendiendo contigo durante mucho tiempo. Gracia, siempre me he sentido muy arropado contigo. Muchísimas gracias por todos los consejos y conversaciones, eres una excelente compañera de trabajo. Elnaz, ha sido un lujo trabajar contigo estos últimos años. Gracias por estar siempre dispuesta a echar una mano cuando se te necesita.

Loreto, mujer todoterreno, creo que nuestras espaldas se conocen incluso más que nosotros dos. Eres la persona que cualquier grupo de trabajo debería tener. Y no solo por sacar toneladas ingentes de trabajo, sino por tu capacidad de relativizar y ayudar a tus compañeros. Gracias por compartir horas de música, carcajadas, y algún que otro chisme a destiempo conmigo. Te mereces todo y más. Y hablando de mujeres todoterreno. Inés, contigo empezó todo, espero haber tratado a tu quinasa como se merece. Guardo con especial cariño el tiempo que pasamos juntos en el laboratorio, ya nadie aprecia mis chistes como tú. Nunca pude seguirte el ritmo trabajando, pero, ¡qué bien lo hemos pasado! Carlota, gran bióloga, mejor compañera de cervezas si cabe. Gracias por todas las charlas en la cafetería a altas horas de la tarde. Eres una de las mejores trabajadoras que conozco, estoy deseando ver qué te depara el futuro.

Vanesa, sé que parece mentira, pero tu pupilo favorito (da igual lo que diga el resto) está en la recta final. Sé que te debo muchas cosas. Quizá la más importante sea haber sido el pegamento de los recién llegados cuando todo esto comenzó. ¡Viva la *roulotte* de la divulgación científica! Gracias por todo el cariño, espero que nuestros caminos sigan cruzándose como hasta ahora. Marcos, gracias por compartir casi todo el viaje conmigo. Creo que muchos deberíamos aprender de tu manera de ver el mundo. La vida es un regalo, y tú, desde luego, sabes cómo disfrutarlo. Gracias por las charlas, los consejos, tu amistad y el resto de cosas que es mejor no dejar por escrito. Siempre tendrás un amigo donde me lleve la vida.

Mikel y Javi, es imposible referirme a vosotros por separado. La temporada que estuvimos los tres juntos compartiendo escritorio ha sido de las más divertidas. Desde que os fuisteis, mi consumo de café se ha reducido drásticamente, por sacar algo bueno del asunto. Ahora tomo más infusiones, pero el resto de carencias son insustituibles. Podríamos ir a una clase de Javi en la universidad un día de estos, solo se admiten preguntas de pontífices, PAMPA y supervivencia en bodas. Sandra, no existen palabras suficientes para darte las gracias. Eres, de lejos, la persona que más se preocupa por sus compañeros, siempre dispuesta a echar una mano antes de que la pidamos. Tu bondad solo es equiparable a tus gustos musicales, salvo honrosas excepciones. Recuerda: viaje antes que destino.

Eli, Javier, Ana María, Eugenia y Tiziana. Aunque no hemos compartido mucho tiempo juntos en este viaje, os recuerdo con gran cariño. De todos aprendí algo en ese corto periodo de tiempo, y eso debe quedar por escrito. Os deseo lo mejor.

Y a los que vienen después de mí, como escribió Pedro Salinas: *os confío mis fracasos y os deseo la victoria*. Espero haber influido en vuestro desarrollo como científicos y como personas una milésima parte de lo que vosotros me habéis aportado a mí.

Elena, calienta que sales. Sé que parece duro, pero podrás con esto y con mucho más. Gracias por tu cariño, tu comprensión, las largas charlas, los congresos, los partidos de pádel que algún día ganaré, y por ser la mejor compañera de tesis. Eres brillante y estoy seguro de que te espera un gran futuro. Ceci, ha sido un verdadero placer compartir laboratorio contigo. Las largas charlas de termodinámica se van quedando atrás, y como alumna aventajada, ya no queda nada que pueda enseñarte. Por el contrario, nunca aprendí a ser tan gracioso como tú, supongo que esa naturalidad es difícil de adquirir. Gracias por alegrar nuestros días y por ser tan bella persona. Carlos, joven debutante en el equipo de los *Chemfidlers*. Espero que seas capaz de manejar todo ese potencial que tienes. ¡No te olvides de disfrutar! Puedes ser buen químico, pero el laboratorio no puede perder a alguien que cuente sus historias como tú. Y a las nuevas biólogas, Lucía y Virginia, muchísima suerte. El 242 queda en buenas manos, estoy seguro. No desesperéis, los experimentos terminan saliendo, os lo digo yo.

Y a los que pasaron un breve tiempo con nosotros en el laboratorio desde otras partes del mundo: Luke, Aurora, Savu, Thomas, Rebecca, Letizia, y muchos más. *Danke schön, grazie mille, thank you so much*.

Me gustaría agradecer también a las personas que me han acompañado durante mis estancias predoctorales. Al Dr. Víctor Guallar, por darme la oportunidad de pasar un mes en el Centro Nacional de Supercomputación, y en especial a Ignasi, con el cual aprendí en unos días lo que me hubiera costado años por mi cuenta y riesgo. Al Dr. David Ramírez, por acogerme en la Universidad de Concepción como uno más desde el primer día. Nacho, Carlos, Jessica, y a los demás, gracias por todo.

Y a los que me habéis acompañado y empujado durante este viaje, la mayoría sin dedicaros a la ciencia. Habéis soportado mis monólogos con una paciencia hercúlea, os lo agradezco enormemente. Dani, Fuentes, Andrea, al grupo en general, siempre habéis estado cerca, de una manera u otra. No puedo hacer otra cosa que sentirme afortunado por ser vuestro amigo. Mario y Álvaro, habéis sido uno de mis principales apoyos estos últimos años. Gracias por las cervezas, las cenas, y las distendidas charlas. Carol, Edurne, Rosa, Clara y Nora, y a los mal llamados +1 (entre los cuales me incluyo), Sergio, Dani, Marcos, Pablo y Aner. Gracias por vuestra preocupación y vuestro ánimo. Sobra decir que hace tiempo que pasé a consideraros mis amigos, en casa tenemos mucha suerte de teneros.

Por último, a mi familia. A mis abuelos, que hicieron de padres cuando me mudé a Salamanca. A Ana y Javi, que me acogieron como un hijo más cuando estuve en Barcelona. No os preocupéis, algún día os lo devolveré, ya sabéis que Nil y Lia son como hermanos para nosotros. A Javier y Nieves, por aceptarme en su familia desde el primer día. A mi madre, que me enseñó lo que es el cariño incondicional, y a mi padre, que me enseñó que para saber a dónde se va, no hay que olvidar de dónde se viene. Soy quien soy gracias a vosotros, y eso sí que no podré devolvéroslo nunca. A mi hermano, por ser un ejemplo de superación. Pronto celebraremos por mí, pero espero aún con más ganas que llegue tu momento. Estamos orgullosos de ti. Y a Silvia, por ponerte en mi camino. Por hacer con tus brazos que los míos no caigan. Por hacer de mis penas y alegrías, las tuyas. Solo tú has sido consciente del esfuerzo que ha supuesto todo esto. A mis padres les debo la vida, pero a ti te debo que pueda disfrutarla. Gracias por todo.

ÍNDICE

Abreviaturas	1
Resumen	7
Abstract	11
Introducción	15
1. Enfermedades neurodegenerativas	17
1.1. Envejecimiento y salud pública.....	17
1.2. La neurodegeneración, una pandemia silenciosa	19
2. Bases de la neurodegeneración.....	22
2.1. Anatomía y genética de las enfermedades neurodegenerativas	22
2.2. Mecanismos moleculares de las enfermedades neurodegenerativas	23
2.2.1. Proteostasis alterada y agregados proteicos.....	24
2.2.2. Alteraciones del citoesqueleto	27
2.2.3. Neurotransmisión alterada	28
2.2.4. Neuroinflamación	30
2.2.5. Alteraciones mitocondriales y estrés oxidativo	31
3. Tratamientos frente a la neurodegeneración.....	33
3.1. Tratamientos para la enfermedad de Alzheimer.....	33
3.2. Tratamientos para la enfermedad de Parkinson.....	34
3.3. Tratamientos para la esclerosis lateral amiotrófica	36
4. Abordando la complejidad: un fármaco frente a diferentes mecanismos patológicos	37

4.1. Proteínas quinasas como dianas frente a la neurodegeneración	38
5. SGK1 como diana terapéutica frente a la neurodegeneración.....	41
5.1. SGK1: expresión, estructura y regulación.....	41
5.2. Vías moleculares relacionadas con SGK1.....	43
5.3. Funciones fisiológicas de SGK1	44
5.4. Papel de SGK1 en diferentes mecanismos neuropatológicos	46
5.5. Inhibición de SGK1 como herramienta terapéutica frente a la neurodegeneración.....	48
5.5.1. SGK1 y su inhibición en enfermedades de Alzheimer, Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica	48
5.6. Estado del arte de los inhibidores de SGK1	49
Objetivos	53
Resultados y discusión	57
Capítulo 1. Caracterización de los niveles de SGK1 en diferentes modelos representativos de la neurodegeneración.....	59
1. Introducción.....	61
2. Caracterización de muestras relacionadas con TDP43-patías	63
2.1. Muestras de modelos animales relacionados con TDP43-patías.....	64
2.2. Muestras humanas relacionadas con TDP43-patías	66
3. Caracterización de muestras relacionadas con tauopatías	68
3.1. Muestras de modelos animales relacionados con tauopatías.....	68

3.2. Muestras humanas relacionadas con tauopatías	69
4. Caracterización de muestras relacionadas con α -sinucleinopatías	70
5. Conclusiones.....	71
Capítulo 2. Búsqueda de nuevos inhibidores de SGK1	73
1. Antecedentes.....	75
2. Las quimiotecas MBC y ECBL como fuente de moléculas tipo fármaco.....	75
2.1. Análisis de las propiedades fisicoquímicas y farmacéuticas de la MBC y ECBL	77
3. Estrategias de cribado virtual	79
3.1. Cribados virtuales basados en la estructura de la diana	80
3.2. Cribados virtuales basados en la estructura del ligando.....	81
4. Cribado de la quimioteca MBC.....	82
5. Cribado de la quimioteca ECBL.....	84
5.1. Cribado basado en la estructura del ligando: <i>shape screening</i>	85
5.2. Cribado basado en la estructura de la diana: <i>ensemble docking</i>	89
5.3. Evaluación <i>in vitro</i> de los compuestos	91
6. Estudio del modo de unión del Hit 3	93
7. Conclusiones.....	97
Capítulo 3. Optimización del compuesto H3	99
1. Introducción.....	101
2. Análisis retrosintético del compuesto H3	102

3. Síntesis y evaluación de la actividad de los derivados de H3	103
3.1. Evaluación del papel de los enlaces de hidrógeno del indazol y la amida	103
3.1.1. Síntesis de derivados tipo indol, benzimidazol y carboxilato.....	103
3.1.2. Evaluación de derivados tipo indol, benzimidazol y carboxilato	105
3.2. Modificaciones del anillo de fenilo	106
3.2.1. Síntesis alternativa de los derivados de H3	106
3.2.2. Síntesis optimizada de los derivados de H3	108
3.2.3. Evaluación de derivados con modificaciones en el anillo de fenilo	109
3.3. Modificaciones en el anillo de pirrol.....	112
3.3.1. Síntesis de los derivados alquilados en el NH pirrólico	112
3.3.2. Síntesis de los derivados tipo pirazol.....	113
3.3.3. Síntesis de los derivados de isoxazol/oxazol	114
3.3.4. Evaluación de los derivados con modificaciones en el anillo de pirrol...	115
3.4. Resumen de la relación estructura-actividad de los inhibidores sintetizados .	116
4. Caracterización de las propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas de los inhibidores sintetizados	117
4.1. Estudio del paso de la barrera hematoencefálica de los inhibidores de SGK1	117
4.2. Estudio de inhibición de citocromos, mutagenicidad, cardiotoxicidad y selectividad frente a otras quinasas	120
4.3. Estudio farmacocinético <i>in vivo</i> del compuesto 54	122

4.4. Análisis del transporte activo mediado por la glicoproteína-P.....	124
4.4.1. Predicción in silico de la relación gp-P y el compuesto 54	125
4.4.2. Predicción in silico de la relación gp-P y el compuesto 70	126
4.4.3. Estudio de permeabilidad bidireccional de los compuestos 54 y 70	127
4.5. Diseño de un nuevo inhibidor de SGK1 no sustrato de la gp-P	129
5. Conclusiones.....	132
Capítulo 4. Evaluación de la neuroprotección de los inhibidores de SGK1	135
1. Elección de modelos y compuestos.....	137
2. Evaluación de la citotoxicidad de los inhibidores de SGK1	137
3. Evaluación de la neuroprotección de los inhibidores de SGK1 en modelos de la enfermedad de Alzheimer.....	138
3.1. Neuroprotección de los inhibidores de SGK1 frente al ácido okadaico.....	138
3.2. Caracterización de los niveles de tau en presencia de los inhibidores de SGK1 ..	140
3.2.1. Cuantificación de los niveles de p-Ser396 tau.....	140
3.2.2. Cuantificación de los niveles de p-Ser214 tau.....	142
3.3. Elucidación del papel de SGK1 en la enfermedad de Alzheimer mediante farmacología de sistemas.....	143
3.3.1. Red de interacciones proteína-proteína en la enfermedad de Alzheimer	144
3.3.2. Análisis del entorno de interacciones de SGK1.....	146
3.3.3. Análisis modular de la red de interacciones proteína-proteína.....	149

4. Evaluación de la neuroprotección de los inhibidores de SGK1 en modelos de la enfermedad de Parkinson	153
4.1. Evaluación de la neuroprotección de los inhibidores de SGK1 en el modelo AAV- α -SYN.....	154
5. Conclusiones.....	156
Conclusiones	157
Conclusions.....	161
Parte experimental.....	165
1. Tratamiento de datos	167
2. Procedimientos biológicos.....	167
2.1. Muestras sanguíneas de pacientes y controles	167
2.2. Cuantificación de los niveles de ARNm mediante RT-qPCR.....	168
2.3. Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad inhibitoria de los compuestos	169
2.4. Ensayo de neuroprotección en el modelo de AO	170
2.5. Obtención de extractos proteicos	170
2.6. Cuantificación de los niveles de tau mediante ELISA	171
2.7. Cuantificación de los niveles de tau mediante <i>western blot</i>	172
2.8. Metodología PAMPA.....	172
2.9. Ensayo de inhibición de citocromos.....	173
2.10. Ensayo de mutagénesis	173
2.11. Ensayos de inhibición de canales iónicos.....	174

2.12. Ensayo de permeabilidad bidireccional en células MDCKII-MDR1	174
2.13. Selectividad en paneles de quinasas	175
2.14. Evaluación de la farmacocinética <i>in vivo</i>	175
3. Procedimientos computacionales	176
3.1. Recursos computacionales.....	176
3.2. Preparación de los ligandos	176
3.3. Cálculo de las propiedades fisicoquímicas y farmacéuticas de las quimiotecas	176
3.4. <i>Shape screening</i>	178
3.5. Preparación de las estructuras cristalográficas de SGK1	178
3.6. Predicción del modo de unión mediante experimentos de <i>docking</i>	179
3.7. Predicción del modo de unión del compuesto 54 con la gp-P mediante <i>induced-fit docking</i>	179
3.8. Simulaciones de dinámica molecular	180
3.9. Cálculo de energía libre de unión	181
3.10. Construcción de la red de interacciones proteína-proteína y cálculos asociados	181
4. Procedimientos químicos.....	182
4.1. Reactivos, instrumental y elucidación estructural	182
4.2. Síntesis de los derivados de 4-(feniltio)-7 <i>H</i> -pirrolo[2,3- <i>d</i>]pirimidina.	183
4.3. Síntesis de los derivados de <i>N</i> -(1 <i>H</i> -indazol-5-il)-4-fenil-1 <i>H</i> -pirrol-3- carboxamida (H3).....	186

4.3.1. Síntesis de los derivados de (<i>E</i>)-3-arilacrilato de metilo 1 , 13-25 , 85	189
4.3.2. Síntesis de los derivados de <i>N</i> -(1 <i>H</i> -indazol-5-il)arilacrilamida 7-9	194
4.3.3. Síntesis de los derivados de 4-aril-1 <i>H</i> -pirrol-3-carboxilato de metilo 2 , 26-38 , 86	195
4.3.4. Síntesis de los derivados de 4-aril-1-metil-1 <i>H</i> -pirrol-3-carboxilato de metilo 68 , 87	200
4.3.5. Síntesis de los derivados de ácido 4-aril-1 <i>H</i> -pirrol-3-carboxílico 3 , 39-51 , 69 , 88	201
4.3.6. Síntesis de los derivados de <i>N</i> -aril-4-aril-1 <i>H</i> -pirrol-3-carboxamida/carboxilato H3 , 4-6 , 10-12 , 52-67 , 70-72 , 89	206
4.3.7. Síntesis de los derivados de ácido 4-aril-1 <i>H</i> -pirazol-3-carboxílico 73-77	220
4.3.8. Síntesis de los derivados de 4-aril- <i>N</i> -(1 <i>H</i> -indazol-5-il)-1 <i>H</i> -pirazol-3-carboxamida 78-82	221
4.3.9. Síntesis de los derivados de oxazol/isoxazol-carboxamida 83 , 84	224
Difusión de resultados	225

ABREVIATURAS

En el siguiente listado se recogen todas las abreviaturas y siglas utilizadas en orden alfabético. Se ha procurado el uso de expresiones derivadas del castellano. En algunas ocasiones se han mantenido las formas originales del inglés para facilitar la comprensión del texto. En caso de que fuera necesario, se aporta el significado original de la sigla o abreviatura.

#

6-OHDA: 6-hidroxidopamina

A

ABL1: quinasa de abelson 1

AcOEt: acetato de etilo

ADME: absorción, distribución, metabolismo y eliminación

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

AEC: ataxia espinal cerebelosa

AMPA: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico

AO: ácido okadaico

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ATP: adenosín trifosfato

B

BHE: barrera hematoencefálica

Boc: *tert*-butiloxicarbonilo

BOP: hexafluorofosfato de 1*H*-benzotriazol-1-iloxitris(dimetilamino)fosfonio

BSA: albúmina de suero bovino, del inglés *bovine serum albumin*

C

CCF: cromatografía en capa fina

CDI: 1,1-carbonildiimidazol

CI: conformación inicial

CI₅₀: concentración inhibitoria 50

CK1: caseína quinasa 1, del inglés *casein kinase 1*

CN: conformación nueva

COMT: catecol *o*-metiltransferasa

CREB1: proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP 1, del inglés *cAMP responsive element binding protein 1*

C α : carbono alfa de una proteína

D

DCL: demencia con cuerpos de Lewy

DCM: diclorometano

DFT: demencia frontotemporal

DIPEA: *N,N*-diisopropiletilamina

DMAP: dimetilaminopiridina

DMSO: dimetilsulfóxido

E

EA: enfermedad de Alzheimer

EAAT: transportador de aminoácidos excitadores, del inglés *excitatory amino acid transporter*

ECBL: *European Chemical Biology Library*

EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

Abreviaturas

ELA: esclerosis lateral amiotrófica

ELAe: esclerosis lateral amiotrófica esporádica

ELAf: esclerosis lateral amiotrófica familiar

EMA: Agencia Europea del Medicamento, del inglés *European Medicines Agency*

ENaC: canales epiteliales de sodio, del inglés *epithelial sodium channels*

EP: enfermedad de Parkinson

EtOH: etanol

F

FBS: suero bovino fetal, del inglés *fetal bovine serum*

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos, del inglés *Food and Drug Administration*

FOXO: proteína de cabeza de horquilla O, del inglés *forkhead box protein O*

G

GEA: grupo electroattractor

GLUT: canal transportador de glucosa, del inglés *glucose transporter*

Gp-P: glicoproteína-P

GSK3 β : quinasa de la glucógeno sintasa 3 beta, del inglés *glycogen synthase kinase-3 beta*

H

HBTU: hexafluorofosfato de *O*-(1H-benzotriazol-1-il)-*N,N,N,N'*-tetrametiluronio

Hex: hexano

HOBT: 1-hidroxibenzotriazol

HRMS: espectroscopía de masas de alta resolución, del inglés *high-resolution mass spectrometry*

HRP: peroxidasa del rábano, del inglés *horseradish peroxidase*

I

IKK α : quinasa IkappaB alfa, del inglés *IkappaB kinase alpha*

IL: interleucina

ISD: índice sociodemográfico

K

kDa: kilodalton

L

L-DOPA: levodopa

M

MAO-B: monoamino oxidasa B

MBC: quimioteca *Medicinal and Biological Chemistry*

MECP2: proteína de unión a CpG metilado 2, del inglés *methyl CpG binding protein 2*

MeOH: metanol

MM-GBSA: mecánica molecular con el modelo generalizado de Born y área de superficie, del inglés *molecular mechanics generalized Born surface area*

MPO: optimización multiparámetro, del inglés *multiparameter optimization*

MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina, del inglés *1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine*

mTOR: diana de rapamicina en células de mamífero, del inglés *mammalian target of rapamycin*

mTORC2: complejo de la diana mamífera de la rapamicina 2, del inglés *mammalian target of rapamycin complex 2*

MTT: bromuro de 2,5-difenil-(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il))tetrazolio

N

MW: microondas, del inglés *microwave*

n.d.: no determinado

NDRG1: gen regulado por debajo de N-myc 1, del inglés *N-myc downstream-regulated gene 1*

NEDD-4-2: proteína de la célula precursora neuronal expresada a la baja en el desarrollo 4-2, del inglés *neuronal precursor cell expressed developmentally downregulated 4-2*

NF- κ B: factor nuclear potenciador de la cadena ligera kappa de las células B activadas, del inglés *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NMDA: N-metil-D-aspartato

O

OCDE: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico

P

P_a-AB: permeabilidad absorptiva

P_a-BA: permeabilidad secretoria

P_a: permeabilidad aparente

PAMPA: del inglés, *parallel artificial membrane permeability assay*

PBS: tampón fosfato salino, del inglés *phosphate-buffered saline*

PDK1: quinasa dependiente de fosfoinosítidos 1, del inglés *phosphoinositide-dependent kinase-1*

P_e: permeabilidad efectiva

PI3K: fosfoinositol-3-quinasa

PIB: producto interior bruto

PM: peso molecular

PP: fosfatasa

PPI_n: red de interacciones proteína-proteína, del inglés *protein-protein interaction network*

PSP: parálisis supranuclear progresiva

R

RE: ratio de eflujo

RMSD: raíz de la desviación cuadrática media, del inglés *root mean square deviation*

RMSF: raíz de la fluctuación cuadrática media, del inglés *root mean square fluctuation*

ROCK: quinasa asociada a la proteína Rho, del inglés *Rho-associated protein kinase*

ROS: especies reactivas de oxígeno, del inglés *reactive oxygen species*

RT-qPCR: PCR cuantitativa

S

SGK: quinasa regulada por suero y glucocorticoide, del inglés *serum/glucocorticoid regulated kinase*

SNC: sistema nervioso central

SOD: superóxido dismutasa

Abreviaturas

T

TD: transportador de dopamina

TDP43: proteína de unión al ADN de respuesta transactiva de 43 kDa, del inglés *transactive response DNA binding protein 43 kDa*

TEA: trietilamina

TH: tirosina hidroxilasa

TK: tirosina quinasas

TMSCI: cloruro de trimetilsililo

TNF: factor de necrosis tumoral, del inglés *tumor necrosis factor*

TosMIC: isocianuro de tosilmetilo

TPSA: área de superficie polar topológica, del inglés *topological polar surface area*

U

ULK1: quinasa activadora de autofagia similar a unc-51 1, del inglés *Unc-51-like autophagy-activating kinase 1*

UV: ultravioleta

V

vs.: versus

VEH: vehículo

α

β A: beta amiloide

Δ G: energía libre de unión

RESUMEN

Las enfermedades neurodegenerativas constituyen un conjunto de patologías caracterizadas por la pérdida de diversas poblaciones neuronales. La neurodegeneración, impulsada por el envejecimiento poblacional, supone un desafío de salud global ante el cual no se han desarrollado alternativas farmacológicas efectivas, lo que compromete no solo la calidad de vida de los pacientes, sino también la sostenibilidad de los sistemas públicos de salud. La presente tesis doctoral, titulada “*Diseño, síntesis y evaluación de inhibidores de SGK1 como herramientas farmacológicas frente a la neurodegeneración*”, tiene como objetivo el descubrimiento de nuevas moléculas inhibitoras de la quinasa SGK1 como estrategia farmacológica frente a diferentes patologías del sistema nervioso central.

En primer lugar, se han caracterizado los niveles de transcripción *SGK1* en diferentes modelos relacionados con enfermedades neurodegenerativas, así como en muestras de pacientes con esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer o enfermedad de Parkinson. Los resultados obtenidos sugieren que patologías como la enfermedad de Alzheimer o de Parkinson podrían constituir escenarios atractivos donde la inhibición de SGK1 sería beneficiosa.

En segundo lugar, en la búsqueda de inhibidores de SGK1 potentes y permeables al sistema nervioso central, se ha realizado un cribado virtual de la quimioteca ECBL mediante una estrategia basada tanto en la estructura del ligando como en la estructura de la diana, previa caracterización de las propiedades fisicoquímicas y farmacéuticas de esta librería química. Este cribado dio como resultado el hallazgo de un *hit* inicial con una notable potencia inhibitoria. Mediante la aplicación de diferentes técnicas *in silico*, se ha logrado dilucidar el modo de unión de este compuesto con SGK1.

Mediante el empleo de estrategias de química médica, se ha diseñado y sintetizado una colección de inhibidores congénicos al *hit* inicial, garantizando tanto su potencia inhibitoria como las propiedades fisicoquímicas necesarias para poder atravesar la barrera hematoencefálica. Se ha estudiado el comportamiento farmacocinético de los compuestos más prometedores, y se ha validado la inhibición del transporte activo de la glicoproteína-P como estrategia para aumentar los niveles en cerebro de esta familia de compuestos.

Finalmente, los inhibidores más prometedores han sido evaluados en diferentes modelos *in vitro* e *in vivo* relacionados con la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson. Estos compuestos han sido capaces de reducir los niveles de fosforilación de

tau, así como de impedir la muerte de las neuronas dopaminérgicas en el modelo de ratón AAV- α -SYN.

En conclusión, la presente tesis doctoral describe la caracterización de SGK1 en modelos relacionados con la neurodegeneración, el diseño y la síntesis de nuevos inhibidores de SGK1 y su posterior validación como herramientas farmacológicas frente a enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer o de Parkinson.

ABSTRACT

Neurodegenerative diseases encompass a group of disorders characterized by the loss of various neuronal populations. Neurodegeneration, driven by population aging, represents a global health challenge for which no effective pharmacological alternatives have been developed, compromising not only patients' quality of life but also the sustainability of public healthcare systems. This doctoral thesis, titled "*Design, synthesis, and evaluation of SGK1 inhibitors as pharmacological tools against neurodegeneration*", aims to discover new SGK1 kinase inhibitors as a pharmacological strategy for various central nervous system disorders.

First, *SGK1* levels have been characterized in different models related to neurodegenerative diseases, as well as in patient samples from individuals with amyotrophic lateral sclerosis, Alzheimer's disease, or Parkinson's disease. The results suggest that conditions such as Alzheimer's and Parkinson's disease could serve as attractive scenarios in which SGK1 inhibition would be beneficial.

Second, in the search for potent SGK1 inhibitors capable of crossing the blood-brain barrier, a virtual screening of the ECBL chemical library was conducted using a strategy based on both ligand- and structure-based drug design, following the characterization of the physicochemical and pharmaceutical properties of this chemical collection. This screening led to the identification of an initial hit with notable inhibitory potency. Through various *in silico* techniques, the binding mode of this compound to SGK1 was elucidated.

Using medicinal chemistry strategies, a collection of inhibitors was designed and synthesized based on the initial hit, ensuring both their inhibitory potency and the necessary physicochemical properties to cross the blood-brain barrier. The pharmacokinetic behavior of the most promising compounds was studied, and the inhibition of P-glycoprotein efflux transport was validated as a strategy to increase brain levels of this family of compounds.

Finally, the most promising inhibitors were evaluated in various *in vitro* and *in vivo* models related to Alzheimer's and Parkinson's disease. These compounds were able to reduce tau phosphorylation levels and prevent the death of dopaminergic neurons in the AAV- α -SYN mouse model.

In conclusion, this doctoral thesis describes the characterization of SGK1 in neurodegeneration-related models, the design and synthesis of novel SGK1 inhibitors, and

Abstract

their subsequent validation as pharmacological tools against neurodegenerative diseases such as Alzheimer's and Parkinson's diseases.

INTRODUCCIÓN

1. Enfermedades neurodegenerativas

1.1. Envejecimiento y salud pública

La esperanza de vida es uno de los mejores indicadores para valorar el desarrollo humano de un país. Si en el año 1900 la esperanza de vida media global era de 32 años, esta cifra fue drásticamente doblada en 2021, alcanzando los 71 años (**Figura 1**).¹ En el siglo XX, los avances en nutrición, el aumento en el número de vacunas y antibióticos, la estandarización del uso del agua potable y, en definitiva, las mejoras en las políticas de salud pública hicieron de contrapeso a distintas catástrofes demográficas.

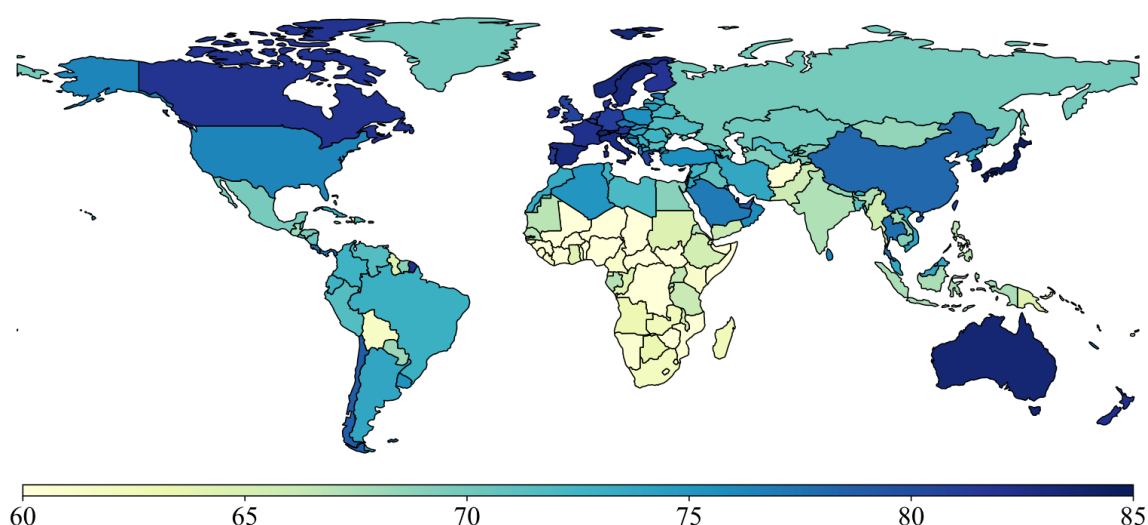


Figura 1. Esperanza de vida a nivel global. Expresada en años para cada país en 2021.

Si bien esto resalta el papel del desarrollo científico en materia de salud pública, este aumento en la esperanza de vida no es homogéneo. Los países con una esperanza de vida mayor de 80 años tienden a acumularse en la parte occidental de Europa, mientras que algunos de los países en vías de desarrollo no superan los 65 años. Una persona nacida en Bolivia está separada de Argentina por solo una frontera política y casi 12 años de esperanza de vida en favor del último.¹ Diferencias geográficas aparte, se estima que antes de 2050 se habrá duplicado la población mayor de 60 años respecto a 2015, pasando del 12 al 22 %. Para entonces, dos tercios de esta población habitará en países de ingresos bajos o

¹ *Our world in data. Life expectancy.* <https://ourworldindata.org/life-expectancy> (Acceso 14/04/2025).

medios.² En el caso de Europa, en torno a 90 millones de personas tienen más de 65 años, previendo que alcancen los 130 millones en 2050.³

Todas las estimaciones apuntan en la misma dirección: la gente vive y vivirá durante más tiempo. Que la población fallezca a edades más avanzadas es, evidentemente, un éxito en términos de salud pública. Sin embargo, las instituciones deben responder a las necesidades derivadas de este hecho, pues el aumento de la esperanza de vida conlleva (y conllevará, en el caso de los países menos desarrollados) un problema demográfico severo: el envejecimiento.

El envejecimiento puede definirse como el deterioro progresivo e irreversible de la funcionalidad de un organismo, inducido por la acumulación de estímulos dañinos a lo largo del tiempo.⁴ En el caso de los seres humanos, estos estímulos dañinos provocan el deterioro tanto de las funciones físicas como de las funciones cognitivas que, a la larga, desencadenan la aparición de patologías y, finalmente, la muerte del individuo. Si el envejecimiento supone en sí mismo una enfermedad o no queda fuera del objeto de este trabajo.⁵ No obstante, existe una clara relación entre el envejecimiento demográfico y la prevalencia de enfermedades crónicas, siendo este el principal factor de riesgo en varias afecciones como diferentes enfermedades neurodegenerativas, distintos cánceres y afecciones cardiovasculares, entre otras.

Al ser Europa la región donde se concentran los países con mayor esperanza de vida, resulta ilustrador cómo el envejecimiento moldea la salud pública de la zona. Según la última encuesta SHARE (*Survey on Health, Ageing and Retirement in Europe*) de la OCDE, el 36 % de los ciudadanos de la Unión Europea mayores de 65 años declaran sufrir 2 o más enfermedades crónicas. En España, este porcentaje asciende al 42 %.⁶ La Comisión Europea estima que las enfermedades crónicas engloban el 80 % de las enfermedades diagnosticadas y, lo que es más preocupante, son la principal causa de muerte en la zona

² Centro de prensa de la Organización Mundial de la Salud. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/ageing-and-health> (Acceso 14/04/2025).

³ Corselli-Nordblad L, Strandell H. *Ageing Europe: looking at the lives of older people in the EU: 2020 edition*; Eurostat, 2020.

⁴ Guo, J.; Huang, X.; Dou, L.; Yan, M.; Shen, T.; Tang, W.; Li, J. Aging and Aging-Related Diseases: From Molecular Mechanisms to Interventions and Treatments. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2022**, *7* (1), 391.

⁵ Bulterijs, S.; Hull, R. S.; Björk, V. C. E.; Roy, A. G. It Is Time to Classify Biological Aging as a Disease. *Front. Genet.* **2015**, *6*, 205.

⁶ OECD. Chronic diseases and disabilities among older people. En *Health at a Glance: Europe 2022: State of Health in the EU Cycle*; OECD Publishing, 2020; pp 104–105.

Europea, representando el 86 % de los fallecimientos.⁷ Las consecuencias económicas del envejecimiento también son alarmantes. Entre el 70 y el 80 % de los presupuestos para los sistemas de salud europeos se destinan a prevenir y tratar este tipo de enfermedades.⁸ Además, fruto de la incapacidad física que provocan algunas de estas enfermedades, se estima una disminución de la producción económica equivalente al 2.5 % del PIB europeo.⁸

Por tanto, la búsqueda de tratamientos frente a estas enfermedades es una necesidad de primer orden, ya que el aumento de la esperanza de vida y el consecuente envejecimiento poblacional amenazan no solo la vida de los pacientes, sino también la viabilidad de los sistemas de salud pública actuales.

1.2. La neurodegeneración, una pandemia silenciosa

Las enfermedades neurodegenerativas son un claro ejemplo de esta relación, siendo la edad el principal factor de riesgo.⁹ Este concepto engloba la pérdida progresiva de neuronas donde los pacientes terminan presentando diferentes patologías con una sintomatología variada, pero siempre devastadora. Dentro de la gran cantidad de enfermedades neurodegenerativas descritas en la actualidad,¹⁰ podemos destacar tres de ellas: la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson (EP) y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA). Las tres enfermedades son consideradas patologías del sistema nervioso central (SNC), siendo la EA el tipo más común de demencia. Si bien las similitudes y diferencias entre estas enfermedades se discuten más adelante en este trabajo, merece la pena detenerse a evaluar el impacto de estas patologías en la actualidad (**Figura 2**).¹¹

Los pacientes diagnosticados con EA se caracterizan por manifestar la pérdida de la memoria reciente como primer síntoma de la enfermedad. A medida que la pérdida neuronal es más agresiva, aparecen periodos de desorientación y alteraciones en la percepción de la realidad. Finalmente, cuando la neurodegeneración es severa, el paciente

⁷ *European Chronic Disease Alliance. Chronic Disease Policy.* <https://alliancechronicdiseases.org/chronic-disease-policy/> (Acceso 14/04/2025).

⁸ *European Commission Newsletter. Towards better prevention and management of chronic diseases.* https://ec.europa.eu/health/newsletter/169/focus_newsletter_en.htm (Acceso 14/04/2025).

⁹ Hou, Y.; Dan, X.; Babbar, M.; Wei, Y.; Hasselbalch, S. G.; Croteau, D. L.; Bohr, V. A. Ageing as a Risk Factor for Neurodegenerative Disease. *Nat. Rev. Neurol.* **2019**, *15* (10), 565–581.

¹⁰ Przedborski, S.; Vila, M.; Jackson-Lewis, V. Neurodegeneration: What Is It and Where Are We? *J. Clin. Invest.* **2003**, *111* (1), 3–10.

¹¹ GBD 2019 Viewpoint Collaborators. Five insights from the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet* **2020**, *396* (10258), 1135–1159.

sufre una dependencia extrema junto a una desconexión cognitiva y emocional total con su entorno.¹² En 2019, se estableció que más de 50 millones de personas en el mundo estaban diagnosticadas con EA u otro tipo de demencia, casi tres veces más que en 1990.¹¹ Las últimas estimaciones apuntan a que este número superará los 150 millones en 2050.⁴ En el caso de Europa, se han diagnosticado en torno a 23 millones de pacientes con EA u otro tipo de demencia,¹¹ lo que supuso un coste de 392000 millones de euros en 2019.¹³

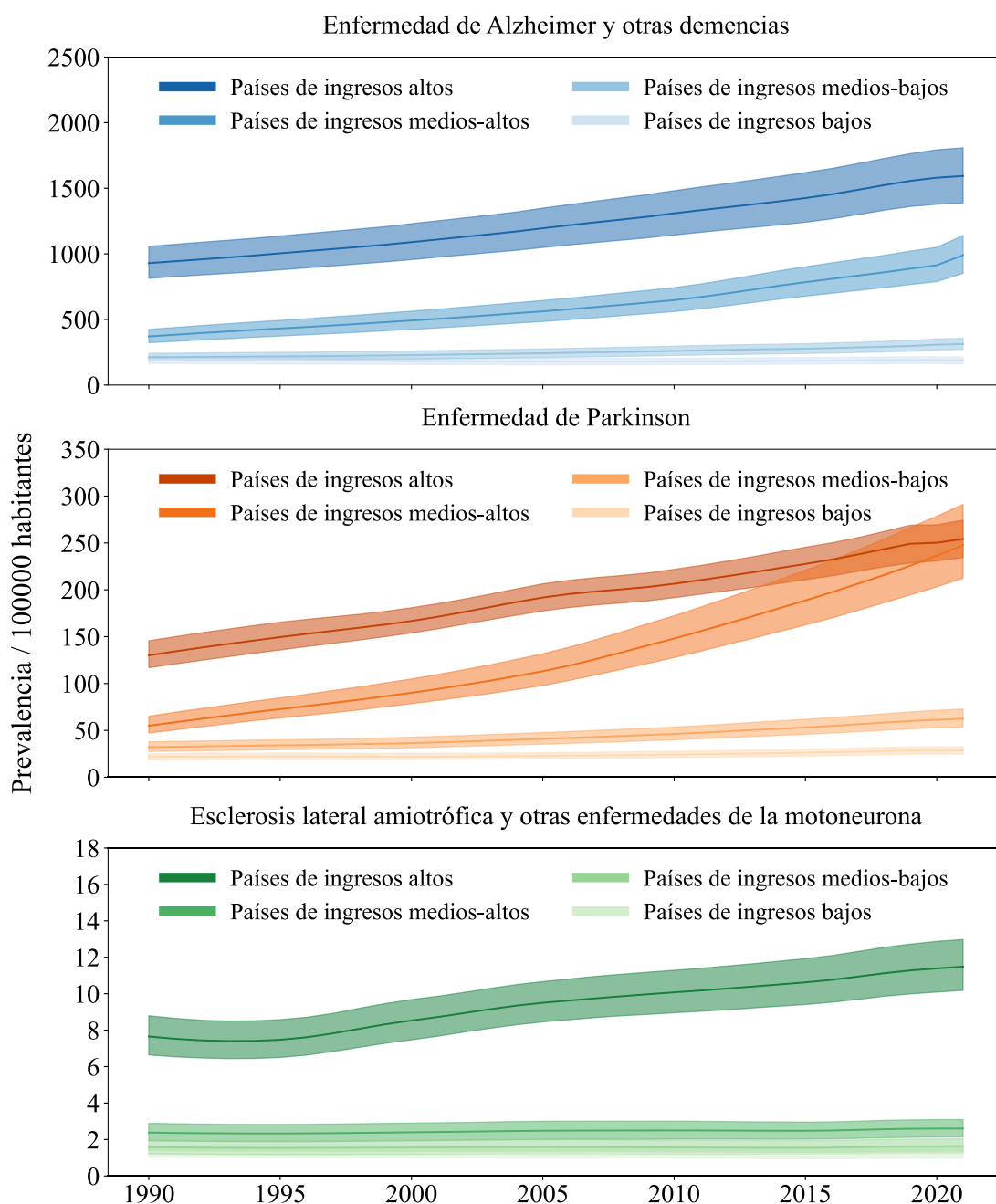


Figura 2. Prevalencia de enfermedades neurodegenerativas. Expresada en casos por cada 100000 habitantes (intervalo de confianza del 95 %). Clasificación de países por nivel de ingresos acorde al Banco Mundial.

¹² Martínez, A. *El Alzheimer*; Catarata-CSIC, 2009.

¹³ Jönsson, L. The Personal Economic Burden of Dementia in Europe. *Lancet Reg. Heal. Eur.* **2022**, *20*, 100472.

La EP ha sido clasificada en algunas ocasiones como un trastorno del movimiento debido a sus síntomas más evidentes: temblor y rigidez en las extremidades, bradicinesia o lentitud de movimiento e inestabilidad postural. No obstante, ciertas alteraciones como la pérdida de memoria o dificultad en el aprendizaje son también características de esta enfermedad.¹⁴ La prevalencia de esta patología fue duplicada de 1990 a 2019, siendo diagnosticados más de 10 millones de pacientes.¹¹ En Europa, se estimó un total de 2 millones de afectados, lo que equivale a un coste anual de 14000 millones de euros.¹⁵

De las tres patologías mencionadas, la ELA destaca por una prevalencia notablemente menor, convirtiéndola en una enfermedad rara. Debido a la degeneración de las motoneuronas, los pacientes sufren consecuencias derivadas de la afectación de los músculos inervados por estas. Algunos síntomas típicos son la atrofia muscular, la disfagia o la disartria (dificultad para tragar o hablar, respectivamente).¹⁶ A diferencia de la EA o la EP, la ELA sí es una enfermedad mortal. Fruto de la incapacidad para respirar, el 80 % de los pacientes fallecen antes del quinto año tras el diagnóstico de la enfermedad.¹⁷ Si bien solo hay diagnosticados en torno a medio millón de pacientes en el mundo, es una de las enfermedades que mayor gasto supone por paciente. En España, cada paciente con ELA equivale a un gasto total de entre 40000 y 50000 euros, frente a los casi 19000 y 30000 euros de la EP y la EA, respectivamente.¹⁸

En definitiva, las enfermedades neurodegenerativas son un conjunto de patologías que, auspiciadas por el rápido envejecimiento de la población, destrozan la vida de los pacientes, suponiendo un alto coste para los sistemas de salud. Si las previsiones son correctas, la creciente prevalencia de estas enfermedades supone un desafío para las instituciones sanitarias. Por tanto, urge la necesidad de desarrollar estrategias terapéuticas frente a estas patologías.

¹⁴ Gil, C.; Martínez, A. *El Parkinson*. Catarata-CSIC, 2015.

¹⁵ *European Parkinsons Disease Association. Let's talk about Parkinson's.* <https://policycommons.net/artifacts/1665344/lets-talk-about-parkinsons/2396992/> (Acceso 14/04/2025).

¹⁶ Feldman, E. L.; Goutman, S. A.; Petri, S.; Mazzini, L.; Savelieff, M. G.; Shaw, P. J.; Sobue, G. Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Lancet* **2022**, *400* (10360), 1363–1380.

¹⁷ *Fundación Luzón. La ELA: Una realidad ignorada.* <http://riberdis.cedid.es/handle/11181/6121> (Acceso 14/04/2025).

¹⁸ Garcés, M. *Prevalencia, Impacto Económico y Social de Las Enfermedades Neurodegenerativas En España*; 2016.

2. Bases de la neurodegeneración

El envejecimiento es un proceso universal, pero no homogéneo. Esto implica que, si bien todos los seres humanos envejecen, no todos terminan presentando el mismo tipo de enfermedad. La neurodegeneración, como extensión del envejecimiento, también muestra esta heterogeneidad. Así, aunque comparten ciertos rasgos comunes, en la población coexisten distintas enfermedades neurodegenerativas que se manifiestan con formas clínicas diversas.

2.1. Anatomía y genética de las enfermedades neurodegenerativas

Un factor que explica parcialmente esta heterogeneidad es el tipo de neurona afectada (**Figura 3**). En la EA, las neuronas del hipocampo y la corteza cerebral son las principales involucradas,¹⁹ mientras que en los pacientes con EP, la región más deteriorada es la sustancia negra, parte de los ganglios basales.²⁰ En la ELA, el tipo neuronal afectado son las motoneuronas, es decir, aquellas que inervan y controlan el músculo esquelético.¹⁶ Sin embargo, aunque la región afectada es algo característico de estas enfermedades, no es suficiente para explicar su etiología. Existen algunos ejemplos bastante ilustrativos de esta problemática. La corteza cerebral sufre neurodegeneración no solo en pacientes con EA, sino también en pacientes con demencia frontotemporal (DFT) o en pacientes con parálisis supranuclear progresiva (PSP).²¹ Por otro lado, los ganglios basales se ven afectados tanto en la EP como en la DFT, la EA o la PSP, y las motoneuronas también se ven afectadas en otras patologías como la ataxia espinal cerebelosa (AEC).^{21,22}

Por otro lado, los factores genéticos son fundamentales en la etiología de muchas enfermedades, dado que las mutaciones asociadas a determinados genes pueden, o bien determinar la heredabilidad de la patología, o bien alterar la susceptibilidad de los casos esporádicos (**Figura 3**). Tanto la EA como la EP son consideradas fundamentalmente esporádicas. No obstante, merece la pena mencionar que mutaciones en los genes de la proteína precursora del β -amiloide (*APP*) o la presenilina 1 y 2 (*PSENI/2*) dan lugar a la

¹⁹ Sengoku, R. Aging and Alzheimer's Disease Pathology. *Neuropathology* **2020**, *40* (1), 22–29.

²⁰ Balestrino, R.; Schapira, A. H. V. Parkinson Disease. *Eur. J. Neurol.* **2020**, *27* (1), 27–42.

²¹ Gan, L.; Cookson, M. R.; Petrucelli, L.; La Spada, A. R. Converging Pathways in Neurodegeneration, from Genetics to Mechanisms. *Nat. Neurosci.* **2018**, *21* (10), 1300–1309.

²² Wilson, D. M.; Cookson, M. R.; Van Den Bosch, L.; Zetterberg, H.; Holtzman, D. M.; Dewachter, I. Hallmarks of Neurodegenerative Diseases. *Cell* **2023**, *186* (4), 693–714.

aparición de EA en edades tempranas de forma autosómica dominante,²³ lo que tradicionalmente ha colocado a la hipótesis amiloide como principal estrategia terapéutica. Para la EP, similar es el caso de las mutaciones en los genes de la α -sinucleína (*SNCA*) o *LRRK2*.²⁴ En la ELA, hasta un 10 % de los casos se consideran familiares (ELAf), y por tanto constituyen casos de ELA con un claro componente genético, generalmente de patrón autosómico dominante. Las mutaciones más encontradas en los casos de ELAf son *C9orf72* (40-50 %), *SOD1* (20-25 %), *TARDBP* (que codifica para la proteína de unión al ADN de respuesta transactiva de 43 kDa (TDP43), 4-5 %) y *FUS* (4-5 %).²⁵

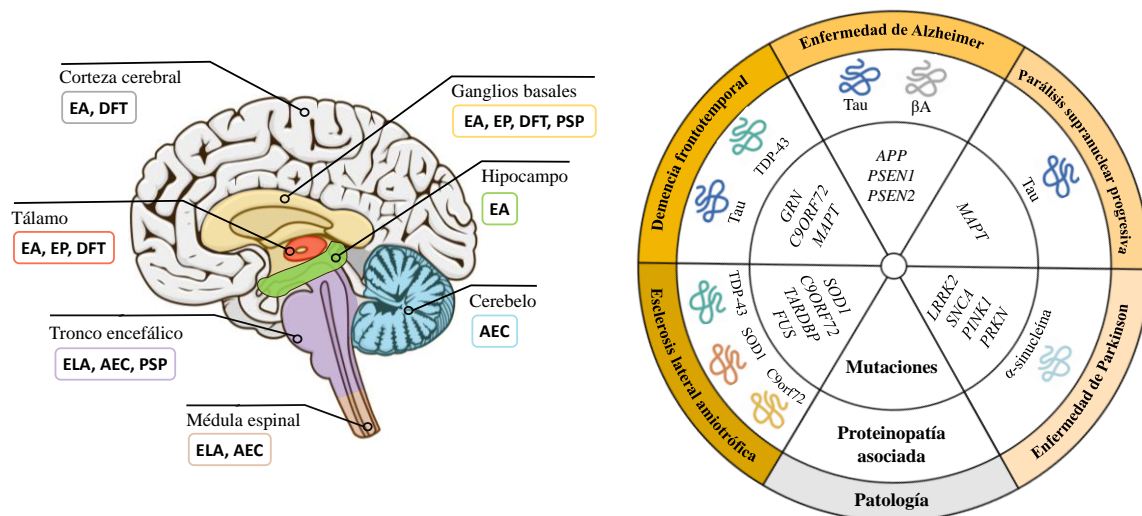


Figura 3. Anatomía, genética y agregación proteica de diferentes enfermedades neurodegenerativas.

2.2. Mecanismos moleculares de las enfermedades neurodegenerativas

Al ser el envejecimiento uno de los principales factores de riesgo de las enfermedades neurodegenerativas, no es de extrañar que la neurodegeneración se interprete como la acumulación de diferentes mecanismos moleculares alterados a lo largo de la vida del paciente (**Figura 4**). De la misma manera, tampoco es de extrañar que diferentes enfermedades neurodegenerativas compartan alteraciones moleculares similares. Por tanto, resulta de vital importancia entender estos mecanismos, cómo se relacionan entre ellos y qué papel juegan en las diferentes formas de neurodegeneración.

²³ Cacace, R.; Sleegers, K.; Van Broeckhoven, C. Molecular Genetics of Early-Onset Alzheimer's Disease Revisited. *Alzheimer's Dement.* **2016**, *12* (6), 733–748.

²⁴ Ye, H.; Robak, L. A.; Yu, M.; Cykowski, M.; Shulman, J. M. Genetics and Pathogenesis of Parkinson's Syndrome. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **2023**, *18*, 95–121.

²⁵ Mehdi, G.; Brown RH Jr. Genetics of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Cold Spring Harbor Perspect. Med.* **2018**, *8* (5), a024125.

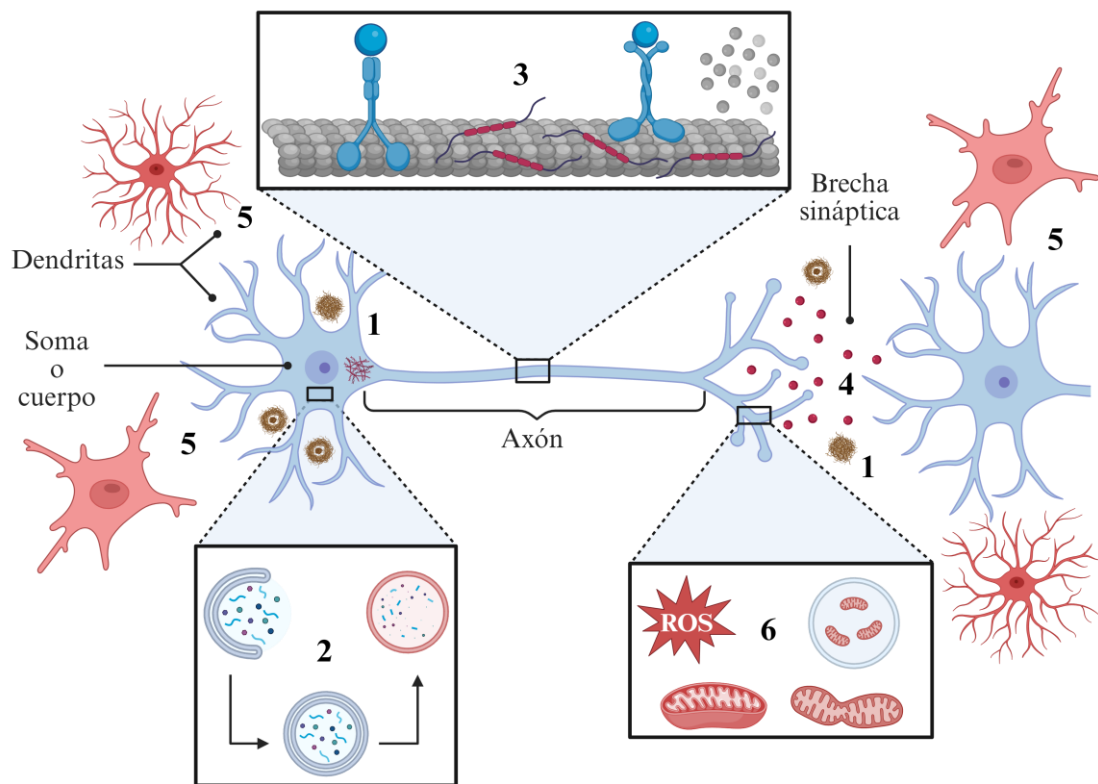


Figura 4. Mecanismos moleculares relacionados con la neurodegeneración. 1. Presencia de agregados proteicos intra o extracelulares. 2. Autofagia alterada. 3. Transporte axonal alterado. 4. Neurotransmisión desregulada. 5. Neuroinflamación persistente. 6. Homeostasis mitocondrial alterada.

2.2.1. Proteostasis alterada y agregados proteicos

La presencia de agregados proteicos insolubles es una de las características más extendidas de las enfermedades neurodegenerativas, hasta el punto de que la mayoría pueden categorizarse como proteinopatías. Si bien estas proteínas no presentan similitudes en términos de secuencia ni estructura, todas ellas comienzan sufriendo un plegamiento erróneo que las hace exponer estructuras de tipo lamina β con tendencia a la agregación, primero en forma de oligómeros y después como agregados fibrilares (**Figura 5**).²⁶ En condiciones fisiológicas, el sistema ubiquitina-proteasoma y la autofagia constituyen dos de los principales mecanismos celulares encargados de mantener la homeostasis proteica y evitar estos agregados. En concreto, la autofagia engloba un proceso que comienza con la identificación de los componentes a degradar, su incorporación dentro de orgánulos de doble membrana (autofagosomas) y, finalmente, su degradación mediante la fusión de este

²⁶ Soto, C.; Pritzkow, S. Protein Misfolding, Aggregation, and Conformational Strains in Neurodegenerative Diseases. *Nat. Neurosci.* **2018**, *21* (10), 1332–1340.

orgánulo con lisosomas, formando lo que conocemos como autolisosomas (**Figura 5**). Existe una amplia evidencia que relaciona una actividad autofágica ineficiente y la aparición de fenotipos neurodegenerativos.²⁷⁻²⁹

La formación de estos agregados está mediada por modificaciones postraduccionales como fosforilaciones, ubiquitinaciones, acetilaciones o cortes proteolíticos, lo que se ha interpretado como una estrategia terapéutica interesante en los últimos años.³⁰ En función de la proteína involucrada, podemos dividir estas enfermedades en distintas proteinopatías, siendo las principales las tauopatías, las α -sinucleinopatías y las TDP43-patías.

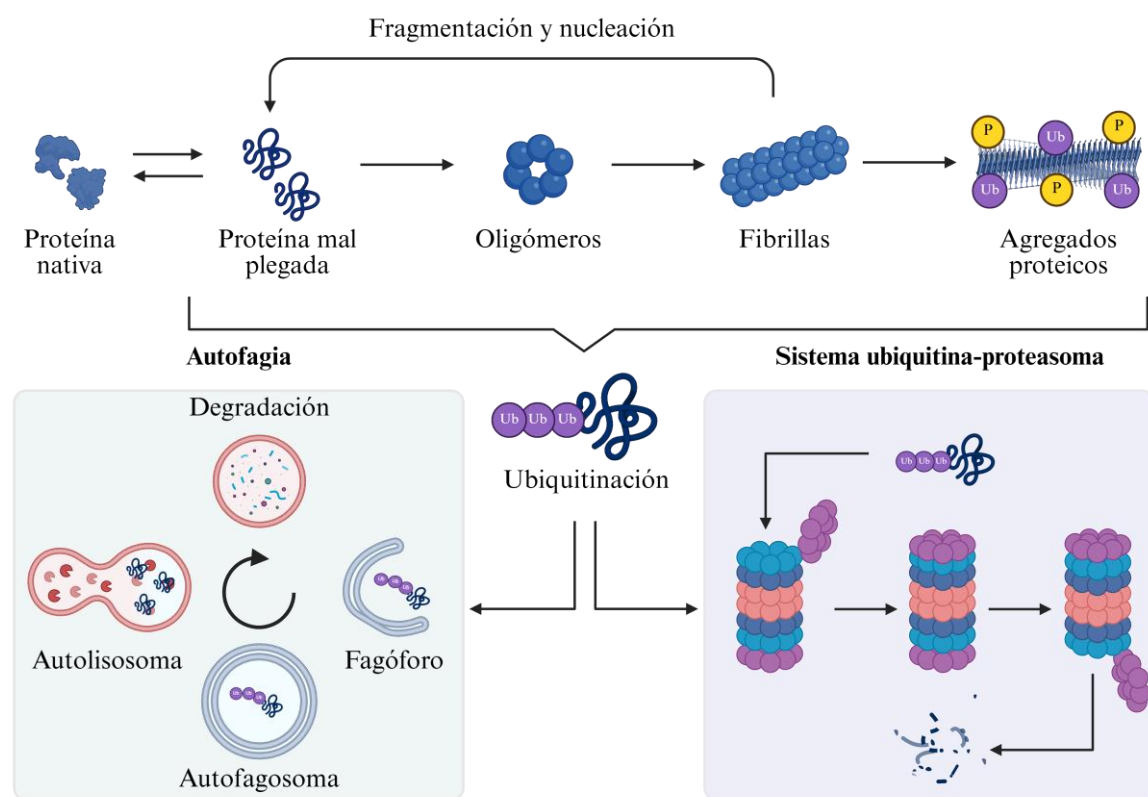


Figura 5. Formación de agregados proteicos en enfermedades neurodegenerativas. Un mal plegamiento de la proteína agregante desemboca en la formación de oligómeros y, posteriormente fibrillas. Estas últimas a su vez pueden fragmentarse y formar un nuevo ciclo de agregación. En condiciones fisiológicas, la proteína mal plegada o sus formas agregadas pueden degradarse vía autofagia o vía ubiquitina-proteasoma.

²⁷ Griffey, C. J.; Yamamoto, A. Macroautophagy in CNS Health and Disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **2022**, *23* (7), 411–427.

²⁸ Guo, F.; Liu, X.; Cai, H.; Le, W. Autophagy in Neurodegenerative Diseases: Pathogenesis and Therapy. *Brain Pathol.* **2018**, *28* (1), 3–13.

²⁹ Yamamoto, H.; Zhang, S.; Mizushima, N. Autophagy Genes in Biology and Disease. *Nat. Rev. Genet.* **2023**, *24* (6), 382–400.

³⁰ Schaffert, L.-N.; Carter, W. G. Do Post-Translational Modifications Influence Protein Aggregation in Neurodegenerative Diseases: A Systematic Review. *Brain Sci.* **2020**, *10* (4), 232.

Las tauopatías se caracterizan por la presencia patológica de agregados de la proteína tau, una proteína asociada a los microtúbulos que estabiliza el citoesqueleto neuronal.³¹ Pueden definirse como primarias o secundarias en función de si los agregados proteicos de tau son el principal componente de la patología (como es el caso de la PSP) o si, en cambio, estos agregados coexisten con otras anomalías proteicas.³² El ejemplo más llamativo de tauopatía secundaria es la EA, donde los pacientes presentan no solo agregados de tau en forma de ovillos neurofibrilares intracelulares, sino también el depósito de placas de β -amiloide (β A) en el espacio extracelular.²²

Las α -sinucleinopatías son conocidas por la acumulación citoplasmática de α -sinucleína. Aunque su función no está clara, se cree que esta proteína regula la liberación de neurotransmisores y mantiene la función sináptica de la neurona. En la EP, esta α -sinucleinopatía toma la forma de enfermedad de cuerpos de Lewy, esto es, el depósito de agregados de α -sinucleína en el soma y dendritas de las neuronas.^{33,34}

Las TDP43-patías presentan agregados proteicos formados principalmente por TDP43. Esta proteína se encarga de la transcripción, maduración y estabilidad de una amplia variedad de ARNs. En condiciones patológicas, TDP43 migra del núcleo, adquiriendo una localización fundamentalmente citosólica, donde diferentes eventos terminan desencadenando su agregación. Este tipo de agregados se encuentra en más del 97 % de pacientes con ELA, así como casi en el 50 % de pacientes con DFT.³⁵

Si bien existe una clara relación entre el avance de la neurodegeneración y la presencia de agregados proteicos, es difícil relacionar un tipo concreto de agregado con una única enfermedad. Por ejemplo, la agregación de α -sinucleína puede encontrarse tanto en pacientes con EP, como en pacientes con demencia con cuerpos de Lewy (DCL), donde los agregados no solo son estructuralmente distintos, sino que se localizan en diferentes partes del cerebro.²¹ Similar es el caso de la proteína tau para más de 26 tauopatías distintas.³¹

³¹ Zhang, Y.; Wu, K. M.; Yang, L.; Dong, Q.; Yu, J. T. Tauopathies: New Perspectives and Challenges. *Mol. Neurodegener.* **2022**, *17* (1), 28.

³² Cummings, J. L.; Gonzalez, M. I.; Pritchard, M. C.; May, P. C.; Toledo-Sherman, L. M.; Harris, G. A. The Therapeutic Landscape of Tauopathies: Challenges and Prospects. *Alzheimer's Res. Ther.* **2023**, *15* (1), 168.

³³ Lamotte, G.; Singer, W. Synucleinopathies. *Handb. Clin. Neurol.* **2023**, *196*, 175–202.

³⁴ Koga, S.; Sekiya, H.; Kondru, N.; Ross, O. A.; Dickson, D. W. Neuropathology and Molecular Diagnosis of Synucleinopathies. *Mol. Neurodegener.* **2021**, *16* (1), 83.

³⁵ Hayes, L. R.; Kalab, P. Emerging Therapies and Novel Targets for TDP-43 Proteinopathy in ALS/FTD. *Neurotherapeutics* **2022**, *19* (4), 1061–1084.

Cabe destacar que no todas las enfermedades neurodegenerativas presentan agregación proteica, como algunos casos genéticos de EP ligados a mutaciones en *LRRK2*.³⁶

El reclutamiento de estas proteínas en forma de agregados insolubles conlleva un efecto tóxico doble. El primero es la pérdida de función que tienen estas proteínas en condiciones normales. Un claro ejemplo es TDP43, cuya agregación citoplasmática impide la correcta transcripción de múltiples ARN necesarios para la homeostasis celular. El segundo es una ganancia de funciones tóxicas por la propia presencia de estos agregados. Es la combinación de ambos lo que explica cómo estos agregados se interrelacionan con otros mecanismos moleculares. Por ejemplo, la agregación de tau impide la correcta funcionalidad de los microtúbulos en la EA, lo que altera severamente el transporte axonal de la neurona.³⁷ También se han detectado proteínas secuestradas involucradas en el transporte pre y postsináptico como la actina, lo que termina afectando la función sináptica en varias enfermedades neurodegenerativas.³⁸

2.2.2. Alteraciones del citoesqueleto

Las neuronas poseen estructuras poliméricas que permiten la organización y el transporte de diferentes cargos intracelulares en función de las necesidades de la célula. Concretamente, las zonas pre y postsinápticas son altamente demandantes en términos energéticos, lo que implica que la neurona debe transportar un gran número de mitocondrias, lípidos y otros cargos desde el soma hasta la zona sináptica a través del axón.³⁹ Por tanto, la integridad de este citoesqueleto es fundamental para el correcto funcionamiento de la neurona. Los defectos en el citoesqueleto, y en concreto del transporte axonal, ocurren mucho antes de la muerte celular en muchas enfermedades neurodegenerativas como la EA, la ELA o la EP, lo que podría situar estos defectos como el desencadenante de otros muchos procesos patológicos.⁴⁰ El transporte incorrecto a lo

³⁶ Takanashi, M.; Funayama, M.; Matsuura, E.; Yoshino, H.; Li, Y.; Tsuyama, S.; Takashima, H.; Nishioka, K.; Hattori, N. Isolated Nigral Degeneration without Pathological Protein Aggregation in Autopsied Brains with LRRK2 p.R1441H Homozygous and Heterozygous Mutations. *Acta Neuropathol. Commun.* **2018**, *6* (1), 105.

³⁷ Cario, A.; Berger, C. L. Tau, Microtubule Dynamics, and Axonal Transport: New Paradigms for Neurodegenerative Disease. *BioEssays* **2023**, *45* (8), e2200138.

³⁸ Cingolani, L. A.; Goda, Y. Actin in Action: The Interplay between the Actin Cytoskeleton and Synaptic Efficacy. *Nat. Rev. Neurosci.* **2008**, *9* (5), 344–356.

³⁹ Theunissen, F.; West, P. K.; Brennan, S.; Petrović, B.; Hooshmand, K.; Akkari, P. A.; Keon, M.; Guennewig, B. New Perspectives on Cytoskeletal Dysregulation and Mitochondrial Mislocalization in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Transl. Neurodegener.* **2021**, *10* (1), 46.

⁴⁰ Berth, S. H.; Lloyd, T. E. Disruption of Axonal Transport in Neurodegeneration. *J. Clin. Invest.* **2023**, *133* (11), e168554.

largo de la neurona compromete la función sináptica, el transporte de ARN y la movilidad de orgánulos y agregados proteicos para su correcta degradación.⁴¹

2.2.3. Neurotransmisión alterada

Las neuronas transmiten la información mediante la sinapsis, la cual a su vez es controlada mediante los niveles de diferentes neurotransmisores. Se han descrito alteraciones en varios de ellos, siendo las vías más importantes la glutamatérgica, la colinérgica y la dopaminérgica (**Figura 6, Tabla 1**).

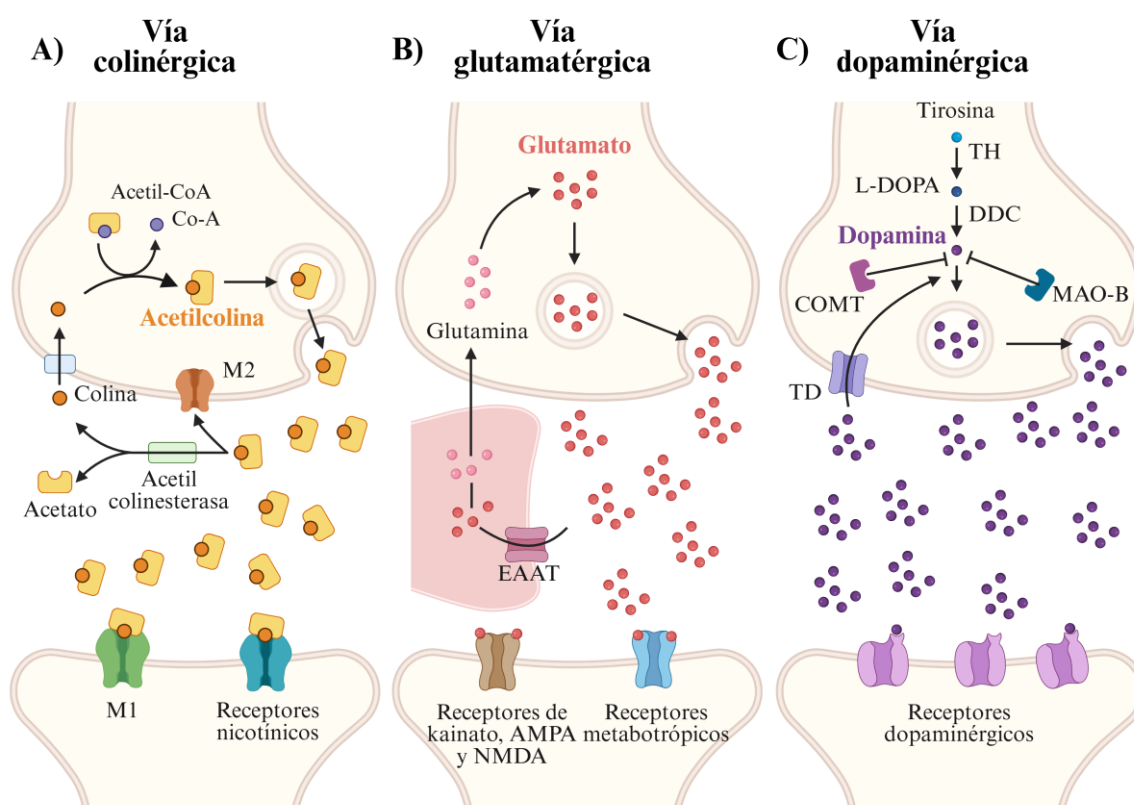


Figura 6. Representación esquemática de las diferentes vías de neurotransmisión. En amarillo, neuronas pre y postsináptica. **A)** Vía colinérgica. M: receptor muscarínico. **B)** Vía glutamatérgica. En rojo, astrocito. **C)** Vía dopaminérgica.

Tabla 1. Resumen de las vías de neurotransmisión alteradas para diferentes enfermedades neurodegenerativas

	Vía colinérgica	Vía glutamatérgica	Vía dopaminérgica
Enfermedad de Alzheimer	Déficit	Exceso	Déficit
Enfermedad de Parkinson	-	Exceso	Déficit
Esclerosis lateral amiotrófica	-	Exceso	-

⁴¹ Yang, Y.; Coleman, M.; Zhang, L.; Zheng, X.; Yue, Z. Autophagy in Axonal and Dendritic Degeneration. *Trends Neurosci.* **2013**, *36* (7), 418–428.

El glutamato es un neurotransmisor fundamentalmente excitatorio que, al ser liberado al espacio sináptico, activa tanto receptores ionotrópicos que favorecen la entrada de iones de Ca^{2+} y Na^{+} (entre los cuales se encuentran los receptores de *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA), receptores de kainato y receptores de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA)) como receptores metabotrópicos (mGlu).⁴² Los astrocitos son los responsables de la recaptación del exceso de glutamato mediante el transportador de aminoácidos excitadores (EAAT) (**Figura 6B**). Una excesiva actividad glutamatérgica conlleva un aumento de la actividad de estos receptores, desencadenando lo que conocemos como excitotoxicidad, siendo algo característico de enfermedades como la ELA o la EP, aunque puede encontrarse en la mayoría de enfermedades neurodegenerativas (**Tabla 1**).^{42,43}

Por otro lado, la acetilcolina es un neurotransmisor encargado de numerosas funciones cognitivas y motoras en el cerebro. Una vez liberado, activa los receptores de acetilcolina en la neurona postsináptica, concretamente los receptores nicotínicos y los receptores muscarínicos M1. Con el objetivo de evitar la acumulación tóxica de este neurotransmisor, la enzima acetilcolinesterasa promueve la degradación del mismo, manteniendo su concentración en un rango óptimo. Por otro lado, la acetilcolina puede activar los receptores M2 presinápticos, lo que impide la liberación excesiva del neurotransmisor (**Figura 6A**). La EA se caracteriza, entre otras cosas, por un déficit de esta actividad colinérgica (**Tabla 1**).⁴⁴

La dopamina es producida y liberada por neuronas dopaminérgicas, que son especialmente abundantes en la sustancia negra. La tirosina es metabolizada en levodopa (L-DOPA) por acción de la tirosina hidroxilasa (TH). Mediante la DOPA-descarboxilasa (DDC), la L-DOPA es transformada en dopamina, la cual interacciona con los diferentes receptores dopaminérgicos de la neurona postsináptica. Como en el caso anterior, las enzimas catecol *o*-metiltransferasa (COMT) y monoamino oxidasa B (MAO-B) se encargan de la degradación del exceso de este neurotransmisor, mientras que los transportadores de dopamina (TD) pueden recaptarlo hacia la neurona presináptica (**Figura**

⁴² Lau, A.; Tymianski, M. Glutamate Receptors, Neurotoxicity and Neurodegeneration. *Pflugers Arch.* **2010**, *460* (2), 525–542.

⁴³ Sheldon, A. L.; Robinson, M. B. The Role of Glutamate Transporters in Neurodegenerative Diseases and Potential Opportunities for Intervention. *Neurochem. Int.* **2007**, *51* (6–7), 333–355.

⁴⁴ Stanciu, G. D.; Luca, A.; Rusu, R. N.; Bild, V.; Chiriac, S. I. B.; Solcan, C.; Bild, W.; Ababei, D. C. Alzheimer's Disease Pharmacotherapy in Relation to Cholinergic System Involvement. *Biomolecules* **2020**, *10* (1), 40.

6C). La EP es conocida por un déficit en la actividad dopaminérgica en la sustancia negra.⁴⁵ No obstante, también se le ha atribuido un papel en los estadios iniciales de la EA en los últimos años (**Tabla 1**).⁴⁶

2.2.4. Neuroinflamación

Las células gliales (mayoritariamente microglía y astrocitos) se encargan de mantener la homeostasis neuronal, promoviendo la supervivencia neuronal, garantizando la integridad de las redes sinápticas, eliminando residuos celulares provenientes de las neuronas o proveyendo aporte metabólico a las mismas (**Figura 7**).⁴⁷

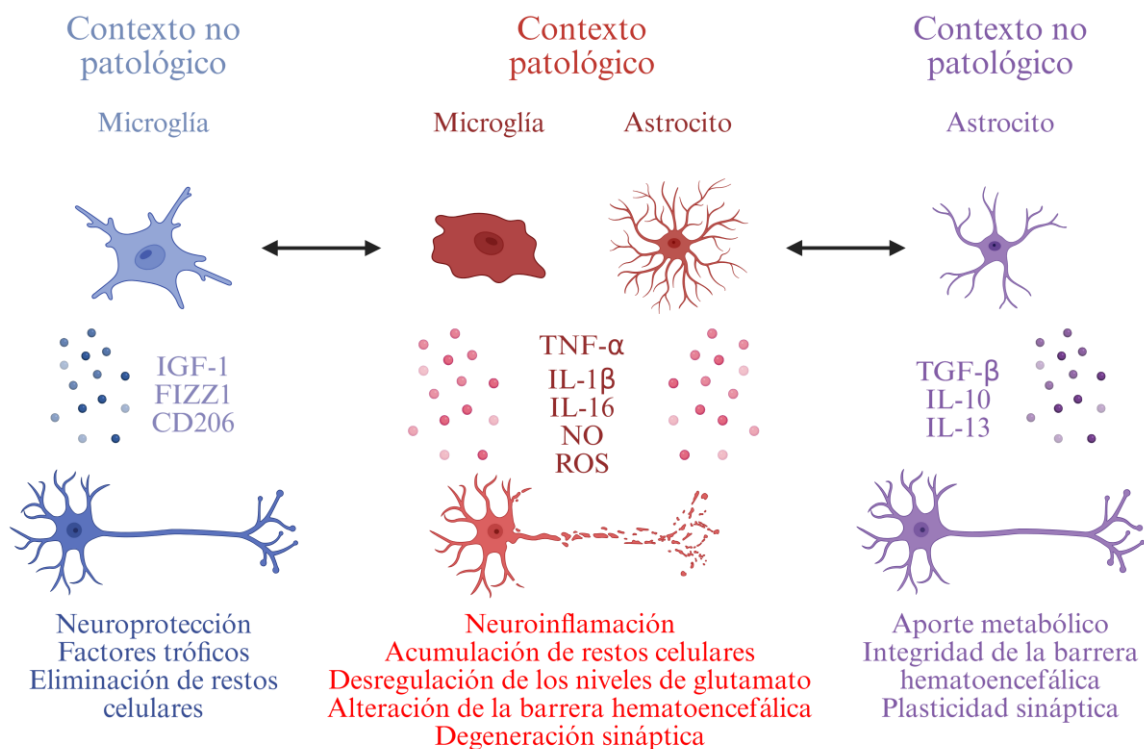


Figura 7. Poblaciones gliales y su relación con la función neuronal y la neuroinflamación.

⁴⁵ Ramesh, S.; Arachchige, A. S. P. M. Depletion of Dopamine in Parkinson's Disease and Relevant Therapeutic Options: A Review of the Literature. *AIMS Neurosci.* **2023**, *10* (3), 200–231.

⁴⁶ Nobili, A.; Latagliata, E. C.; Viscomi, M. T.; Cavallucci, V.; Cutuli, D.; Giacobazzo, G.; Krashia, P.; Rizzo, F. R.; Marino, R.; Federici, M.; De Bartolo, P.; Aversa, D.; Dell'Acqua, M. C.; Cordella, A.; Sancandi, M.; Keller, F.; Petrosini, L.; Puglisi-Allegra, S.; Mercuri, N. B.; Coccarello, R.; Berretta, N.; D'Amelio, M. Dopamine Neuronal Loss Contributes to Memory and Reward Dysfunction in a Model of Alzheimer's Disease. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 14727.

⁴⁷ Quincozes-Santos, A.; Santos, C. L.; de Souza Almeida, R. R.; da Silva, A.; Thomaz, N. K.; Costa, N. L. F.; Weber, F. B.; Schmitz, I.; Medeiros, L. S.; Medeiros, L.; Dotto, B. S.; Dias, F. R. P.; Sovrani, V.; Bobermin, L. D. Gliotoxicity and Glioprotection: The Dual Role of Glial Cells. *Mol. Neurobiol.* **2021**, *58* (12), 6577–6592.

Sin embargo, la activación patológica crónica de estas dos poblaciones celulares, junto con la infiltración de linfocitos T, deriva en una inflamación crónica que termina siendo perjudicial para el SNC.⁴⁸ La sobreactividad de la microglía y los astrocitos en el SNC se caracteriza por la liberación de mediadores proinflamatorios como IL-16, IL-1 β , TNF- α , óxido nítrico (NO) y especies reactivas de oxígeno (ROS), los cuales terminan dañando la neurona (**Figura 7**).⁴⁹ El hecho de que la neuroinflamación se haya descrito en la mayoría de enfermedades neurodegenerativas resalta la interconexión entre este proceso y el resto de alteraciones moleculares. La presencia de agregados proteicos, ya sean placas de β A,⁵⁰ ovillos neurofibrilares de tau⁵¹ o depósitos de α -sinucleína,⁵² provoca la activación de las células gliales en un intento de eliminar dichos agregados, exacerbando la respuesta inflamatoria y, en algunos casos, incrementando la cantidad de los mismos. También se ha descrito la relación entre el aumento de la reactividad de las células gliales y la eliminación de uniones sinápticas, alterando la red de conexiones neuronales,⁵³ entre otros muchos ejemplos.⁵⁴⁻⁵⁶

2.2.5. Alteraciones mitocondriales y estrés oxidativo

La mitocondria es un orgánulo con una alta implicación en la homeostasis neuronal. Fruto de su actividad metabólica, la mitocondria es la encargada de la producción de energía en forma de adenosín trifosfato (ATP), así como del almacenamiento de iones Ca²⁺ y la producción de ROS (**Figura 8**). La neurona requiere que tanto el número como la localización subcelular de estos orgánulos satisfagan las necesidades celulares. Esto implica que las mitocondrias están sometidas a un delicado equilibrio mediado por la fisión

⁴⁸ Vainchtein, I. D.; Molofsky, A. V. Astrocytes and Microglia: In Sickness and in Health. *Trends Neurosci.* **2020**, *43* (3), 144–154.

⁴⁹ Kwon, H. S.; Koh, S. H. Neuroinflammation in Neurodegenerative Disorders: The Roles of Microglia and Astrocytes. *Transl. Neurodegener.* **2020**, *9* (1), 42.

⁵⁰ d'Errico, P.; Ziegler-Waldkirch, S.; Aires, V.; Hoffmann, P.; Mezö, C.; Erny, D.; Monasor, L. S.; Liebscher, S.; Ravi, V. M.; Joseph, K.; Schnell, O.; Kierdorf, K.; Staszewski, O.; Tahirovic, S.; Prinz, M.; Meyer-Luehmann, M. Microglia Contribute to the Propagation of A β into Unaffected Brain Tissue. *Nat. Neurosci.* **2022**, *25* (1), 20–25.

⁵¹ Odfalk, K. F.; Bieniek, K. F.; Hopp, S. C. Microglia: Friend and Foe in Tauopathy. *Prog. Neurobiol.* **2022**, *216*, 102306.

⁵² Song, N.; Chen, L.; Xie, J. Alpha-Synuclein Handling by Microglia: Activating, Combating, and Worsening. *Neurosci. Bull.* **2021**, *37* (5), 751–753.

⁵³ Chung, W. S.; Welsh, C. A.; Barres, B. A.; Stevens, B. Do Glia Drive Synaptic and Cognitive Impairment in Disease? *Nat. Neurosci.* **2015**, *18* (11), 1539–1545.

⁵⁴ Chen, Y.; Qin, C.; Huang, J.; Tang, X.; Liu, C.; Huang, K.; Xu, J.; Guo, G.; Tong, A.; Zhou, L. The Role of Astrocytes in Oxidative Stress of Central Nervous System: A Mixed Blessing. *Cell Prolif.* **2020**, *53* (3), e12781.

⁵⁵ Simpson, D. S. A.; Oliver, P. L. Ros Generation in Microglia: Understanding Oxidative Stress and Inflammation in Neurodegenerative Disease. *Antioxidants* **2020**, *9* (8), 743.

⁵⁶ Chen, Z.; Yuan, Z.; Yang, S.; Zhu, Y.; Xue, M.; Zhang, J.; Leng, L. Brain Energy Metabolism: Astrocytes in Neurodegenerative Diseases. *CNS Neurosci. Ther.* **2023**, *29* (1), 24–36.

y la fusión de las mismas, así como la degradación de las mitocondrias excedentes o defectuosas vía autofagia mitocondrial o mitofagia (**Figura 8**).⁵⁷

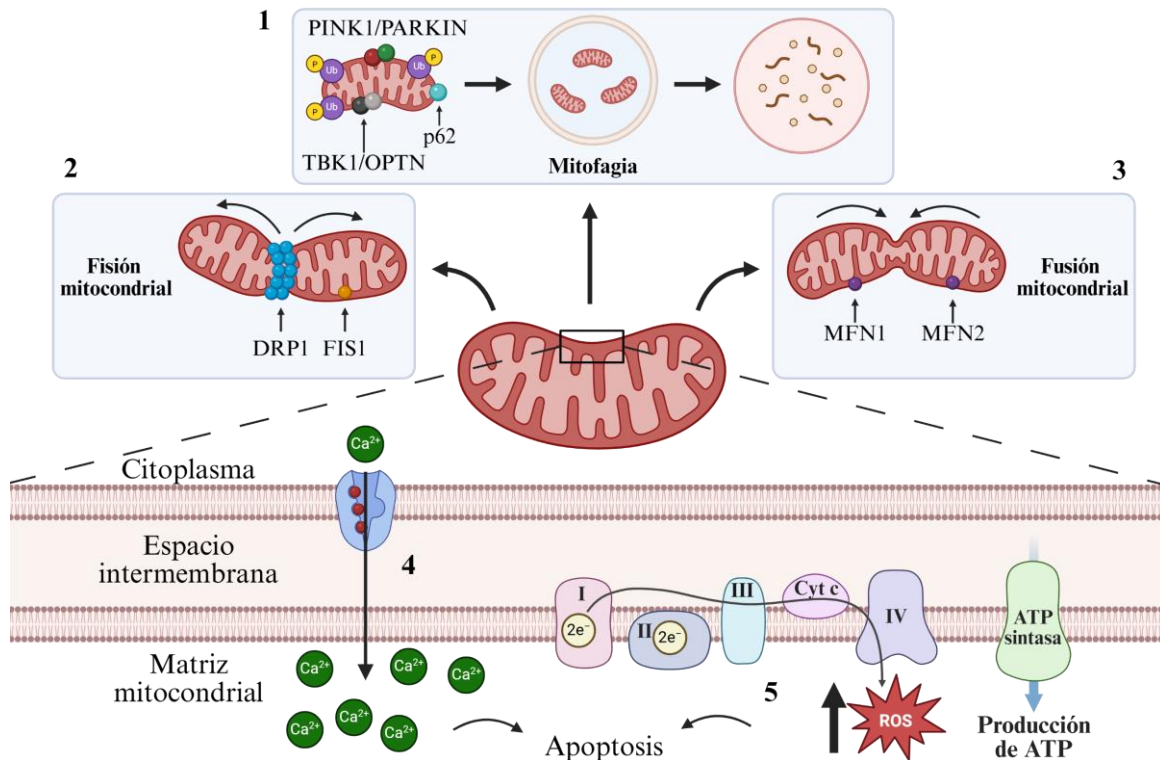


Figura 8. Diferentes aspectos de la disfunción mitocondrial en enfermedades neurodegenerativas. 1. La mitofagia como vertiente selectiva de la autofagia sobre las mitocondrias. Las mitocondrias que requieren ser degradadas son fosforiladas y ubiquitinadas a modo de marcaje. Gracias a esto, terminan englobadas dentro de un autofagosoma y degradadas. 2. Fisión mitocondrial. Mediada principalmente por las proteínas DRP1 y FIS1. 3. Fusión mitocondrial, mediada principalmente por mitofusinas (MFN). 4. Homeostasis de los niveles de Ca^{2+} . Un aumento citoplasmático de este ion produce el acúmulo del mismo dentro de la mitocondria, desencadenando la apoptosis. 5. Fosforilación oxidativa. En un contexto de disfunción mitocondrial, esta cadena puede aumentar los niveles de ROS, pudiendo resultar nocivo para la célula.

Si bien se han descrito tanto alteraciones en la expresión como en la actividad de proteínas involucradas en la fusión y fisión mitocondrial,⁵⁸ la mitofagia ha ocupado un papel fundamental en los intentos por comprender la neurodegeneración. Varios tipos de ELA muestran mutaciones en genes involucrados en la mitofagia, como pueden ser *TBK1*, *OPTN* o *SQSTM1* (p62),⁵⁹ al igual que la EP con los genes *PRKN* y *PINK1* (**Figura 8**).⁶⁰

⁵⁷ Trigo, D.; Avelar, C.; Fernandes, M.; Sá, J.; da Cruz e Silva, O. Mitochondria, Energy, and Metabolism in Neuronal Health and Disease. *FEBS Lett.* **2022**, *596* (9), 1095–1110.

⁵⁸ Yang, D.; Ying, J.; Wang, X.; Zhao, T.; Yoon, S.; Fang, Y.; Zheng, Q.; Liu, X.; Yu, W.; Hua, F. Mitochondrial Dynamics: A Key Role in Neurodegeneration and a Potential Target for Neurodegenerative Disease. *Front. Neurosci.* **2021**, *15*, 654785.

⁵⁹ Madruga, E.; Maestro, I.; Martínez, A. Mitophagy Modulation, a New Player in the Race against ALS. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (2), 740.

⁶⁰ Broadway, B. J.; Boneski, P. K.; Bredenberg, J. M.; Kolichieski, A.; Hou, X.; Soto-beasley, A. I.; Ross, O. A.; Springer, W.; Fiesel, F. C. Systematic Functional Analysis of PINK1 and PRKN Coding Variants. *Cells* **2022**, *11* (15), 2426.

En un contexto de disfunción mitocondrial, el consumo de oxígeno deriva en una elevada producción de ROS que no puede ser contrarrestada por los diferentes mecanismos antioxidantes de la célula, dando lugar al estrés oxidativo (**Figura 8**).⁵⁷ Estas especies reactivas terminan produciendo cambios en el ADN, oxidan los lípidos de las diferentes membranas celulares y modifican la estructura de las proteínas, resultando altamente perjudicial para la célula. Se ha descrito que, al igual que la neuroinflamación, el estrés oxidativo es una constante en la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas.⁶¹

En los últimos años se ha especulado que este orgánulo podría ser un punto de conexión entre diferentes mecanismos moleculares. Por ejemplo, existe una clara relación entre la disfunción mitocondrial y un aumento de la reactividad de las células gliales,^{62,63} una mala función y plasticidad sináptica⁶⁴ y excitotoxicidad debido a una mala regulación de los niveles de Ca^{2+} ,⁶⁵ entre otros.

3. Tratamientos frente a la neurodegeneración

Una característica común a la mayoría de enfermedades neurodegenerativas es la ausencia de un tratamiento efectivo. Si bien algunos fármacos han conseguido llegar al mercado, ninguno de ellos consigue revertir el transcurso de la patología, siendo capaces únicamente de ralentizar el progreso de la enfermedad o de aliviar la sintomatología de los pacientes. A su vez, estos fármacos actúan sobre diferentes mecanismos moleculares que han sido descritos a lo largo del texto.

3.1. Tratamientos para la enfermedad de Alzheimer

Dentro de las alteraciones en la neurotransmisión, la hipótesis colinérgica ha dado lugar a varios fármacos destinados a aumentar la cantidad de acetilcolina en la brecha sináptica. Este es el caso del donepezilo, la rivastigmina, la galantamina y la tacrina (retirada por toxicidad hepática). Estos fármacos impiden la degradación de la acetilcolina

⁶¹ Barnham, K. J.; Masters, C. L.; Bush, A. I. Neurodegenerative Diseases and Oxidative Stress. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3* (3), 205–214.

⁶² Li, Y.; Xia, X.; Wang, Y.; Zheng, J. C. Mitochondrial Dysfunction in Microglia: A Novel Perspective for Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *J. Neuroinflammation* **2022**, *19* (1), 248.

⁶³ Popov, A.; Brazhe, N.; Morozova, K.; Yashin, K.; Bychkov, M.; Nosova, O.; Sutyagina, O.; Brazhe, A.; Parshina, E.; Li, L.; Medyanik, I.; Korzhhevskii, D. E.; Shenkarev, Z.; Lyukmanova, E.; Verkhatsky, A.; Semyanov, A. Mitochondrial Malfunction and Atrophy of Astrocytes in the Aged Human Cerebral Cortex. *Nat. Commun.* **2023**, *14* (1), 8380.

⁶⁴ Guo, L.; Tian, J.; Du, H. Mitochondrial Dysfunction and Synaptic Transmission Failure in Alzheimer's Disease. *J. Alzheimer's Dis.* **2017**, *57* (4), 1071–1086.

⁶⁵ Plotegher, N.; Filadi, R.; Pizzo, P.; Duchon, M. R. Excitotoxicity Revisited: Mitochondria on the Verge of a Nervous Breakdown. *Trends Neurosci.* **2021**, *44* (5), 342–351.

al inhibir la enzima acetilcolinesterasa, aumentando los niveles de este neurotransmisor.⁶⁶ Por otro lado, la hipótesis glutamatérgica derivó en el uso de la memantina, un antagonista del receptor de NMDA, que reduce la excitotoxicidad por glutamato (**Figura 9**).⁶⁶ Recientemente, los anticuerpos monoclonales lecanemab y donanemab se han posicionado como nuevos fármacos para la EA en Estados Unidos. Estos medicamentos biológicos son capaces de reducir los depósitos de β A y frenar modestamente el deterioro cognitivo.⁶⁷

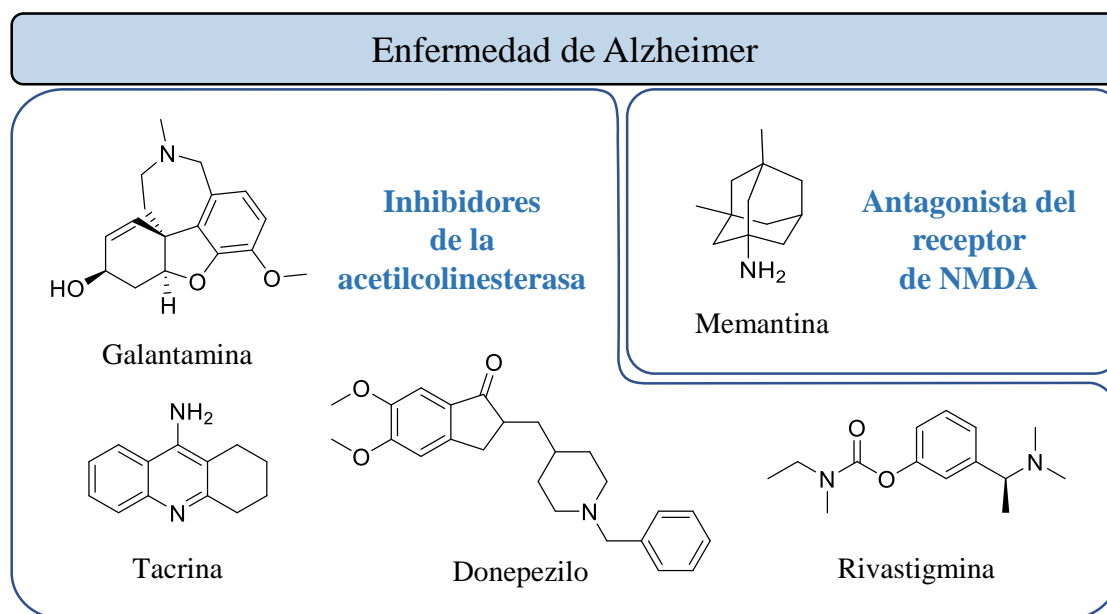


Figura 9. Moléculas pequeñas aprobadas para la enfermedad de Alzheimer.

3.2. Tratamientos para la enfermedad de Parkinson

Para la EP, los tratamientos se han centrado en aumentar los niveles de actividad dopaminérgica en el cerebro para revertir la sintomatología motora de los pacientes (**Figura 10**). Debido a que la dopamina no es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) y alcanzar el cerebro, la estrategia tradicional ha sido la administración de L-DOPA como precursor de la dopamina. Para evitar su degradación, la L-DOPA suele indicarse junto a fármacos inhibidores de la DDC como la carbidopa para evitar su degradación a nivel plasmático. También puede administrarse junto a inhibidores de la COMT plasmática y del SNC (entacapona, opicapona y tolcapona, siendo esta última la única capaz de atravesar la BHE), y/o inhibidores de la MAO-B (selegilina, rasagilina y safinamida).⁶⁸

⁶⁶ Briggs, R.; Kennelly, S. P.; O'Neill, D. Drug Treatments in Alzheimer's Disease. *Clin. Med. (Lond)*. **2016**, *16* (3), 247–253.

⁶⁷ Yadollahikhales, G.; Rojas, J. C. Anti-Amyloid Immunotherapies for Alzheimer's Disease: A 2023 Clinical Update. *Neurotherapeutics* **2023**, *20* (4), 914–931.

⁶⁸ Rizek, P.; Kumar, N.; Jog, M.S. An Update on the Diagnosis and Treatment of Parkinson disease. *Can. Med. Assoc. J.* **2016**, *188* (16), 1157–1165.

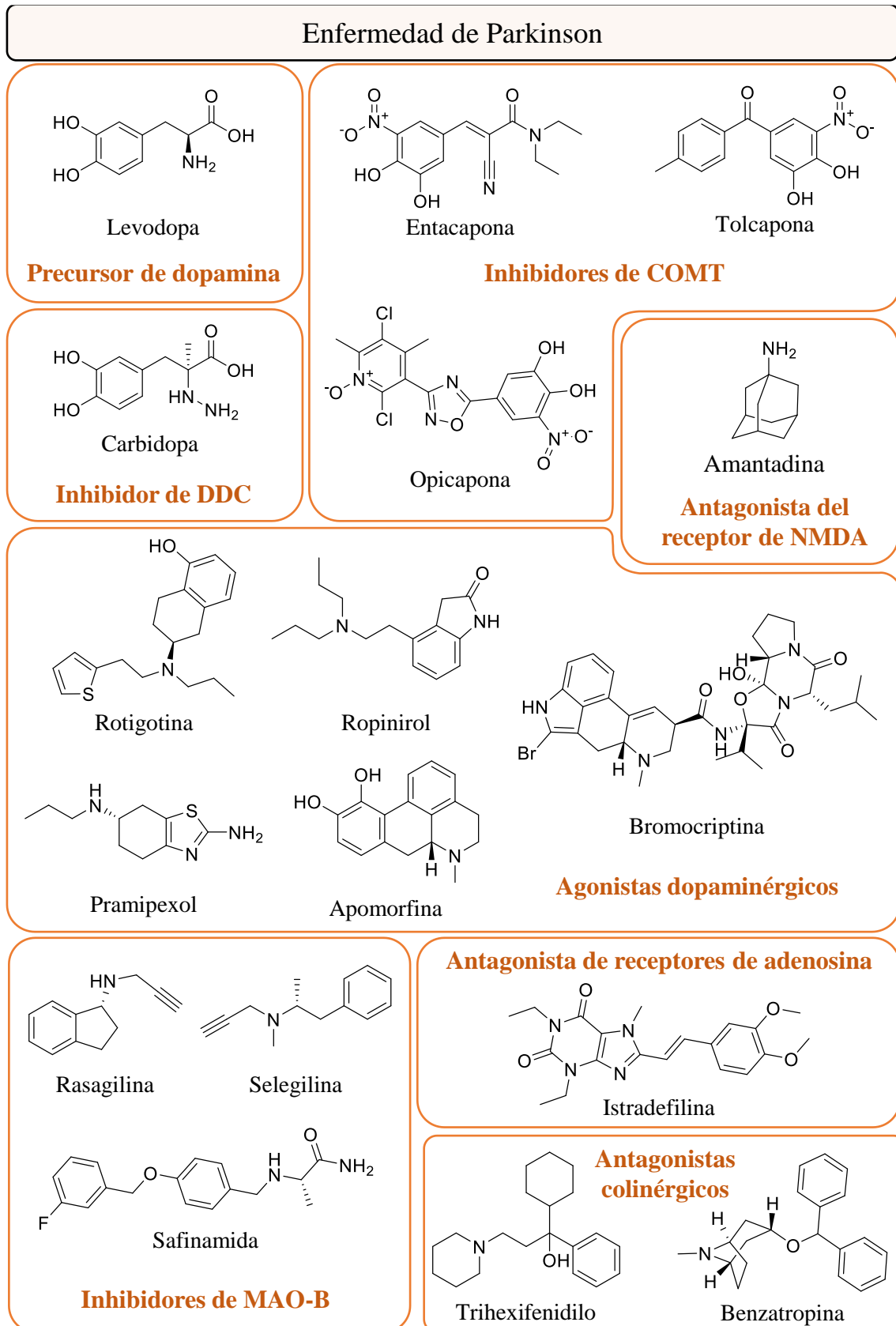


Figura 10. Moléculas pequeñas aprobadas para la enfermedad de Parkinson.

Si bien la L-DOPA ha sido durante décadas el tratamiento de referencia para la EP, su administración crónica conlleva la aparición de episodios intermitentes de ineficacia. Esto se debe, entre otras cosas, a la progresiva incapacidad del cerebro para almacenar dopamina. Además, el uso prolongado de L-DOPA puede causar efectos secundarios como la discinesia. Como estrategia alternativa, se han comercializado agonistas de los receptores dopaminérgicos (pramipexol, ropinirol, apomorfina, rotigotina y bromocriptina) para aumentar la actividad de esta vía de neurotransmisión y retrasar o disminuir el uso de la L-DOPA (**Figura 10**).⁶⁹

Otros fármacos han alcanzado el mercado en base a explorar mecanismos no dopaminérgicos, siendo normalmente utilizados para solventar los problemas asociados a la L-DOPA. Algunos ejemplos son los antagonistas de receptores de NMDA (amantadina) y los antagonistas colinérgicos (trihexifenidilo y benztropina), usados para tratar la discinesia provocada por un exceso de actividad dopaminérgica. Por otro lado, los antagonistas de los receptores de adenosina A_{2A} (istradefilina) aumentan la actividad dopaminérgica de manera indirecta, siendo utilizados cuando la L-DOPA pierde eficacia (**Figura 10**).⁶⁹

3.3. Tratamientos para la esclerosis lateral amiotrófica

De las tres enfermedades, la ELA representa la lista más corta (**Figura 11**). El riluzol fue el primer fármaco aprobado para esta indicación terapéutica en 1995. Si bien su mecanismo de acción no se conoce de manera precisa, distintos estudios sugieren la reducción de la liberación de glutamato, el antagonismo de los receptores de NMDA y el bloqueo de canales de Na⁺ como posibles causas.⁷⁰ Los últimos trabajos estiman que la administración de riluzol podría aumentar la esperanza de vida entre 6 y 19 meses.⁷¹ Por otro lado, la edaravona fue aprobada por primera vez para el tratamiento de la ELA en 2017, actualmente en uso en EE. UU. y Japón. Su mecanismo de acción se desconoce, aunque ha mostrado un notable efecto antioxidante en diferentes estudios.⁷⁰ Sin embargo, de acuerdo al último ensayo clínico de la edaravona en fase III (NCT05178810), la efectividad de este fármaco podría estar gravemente comprometida. En 2023, el medicamento biológico

⁶⁹ Sivanandy, P.; Leey, T. C.; Xiang, T. C.; Ling, T. C.; Wey Han, S. A.; Semilan, S. L. A.; Hong, P. K. Systemic Review on Parkinson's Disease Medications, Emphasizing on Three Recently Approved Drugs to Control Parkinson's Symptoms. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2022**, *19* (1), 364.

⁷⁰ Rokade, A. V.; Yelne, P.; Giri, A. Riluzole and Edavarone: The Hope Against Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Cureus* **2022**, *14* (10), e30035.

⁷¹ Andrews, J. A.; Jackson, C. E.; Heiman-Patterson, T. D.; Bettica, P.; Brooks, B. R.; Pioro, E. P. Real-World Evidence of Riluzole Effectiveness in Treating Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler. Frontotemporal Degener.* **2020**, *21* (7–8), 509–518.

tofersen, un oligonucleótido antisentido, fue aprobado tanto por la FDA como por la EMA para pacientes de ELA con mutaciones en *SOD1* para evitar la producción de agregados de esta proteína, siendo esto un hito en la historia de la medicina personalizada.⁷²

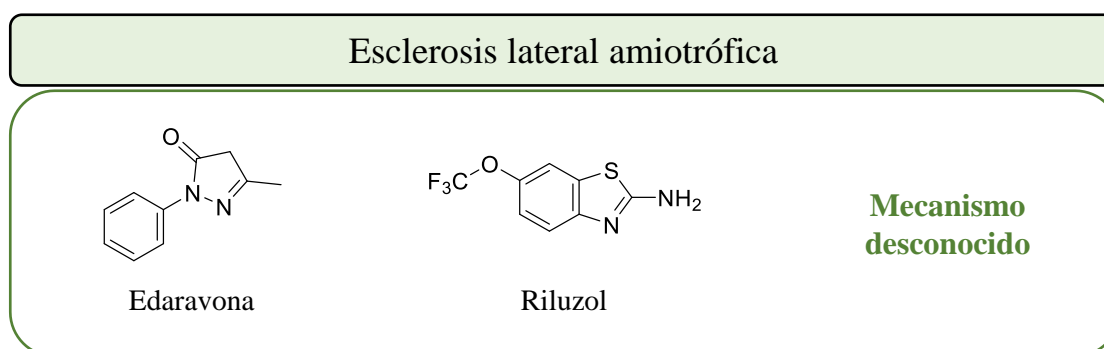


Figura 11. Moléculas pequeñas aprobadas para la esclerosis lateral amiotrófica.

4. Abordando la complejidad: un fármaco frente a diferentes mecanismos patológicos

A lo largo de este texto se han expuesto las diferentes características que componen las enfermedades neurodegenerativas dada su importancia en la actualidad. Independientemente de qué parte del sistema nervioso se vea afectada, tanto la EA como la EP y la ELA se consideran generalmente esporádicas. Esto es, no existe en la mayor parte de los casos una mutación concreta que señale qué mecanismos patológicos se encuentran alterados y, por tanto, nos permita focalizar el diseño de estrategias terapéuticas. Al contrario, lo que subyace en la mayoría de pacientes es una combinación heterogénea de alteraciones moleculares, de etiología desconocida y difíciles de entender como compartimentos estancos.

En este contexto, se han planteado diferentes estrategias para hacer frente a las enfermedades neurodegenerativas. Uno de ellos es la polifarmacología, entendida como el uso de uno o varios fármacos destinados a interactuar con diferentes dianas terapéuticas.⁷³ Dentro de este marco teórico, los fármacos multidiana han tomado relevancia, donde una única molécula es capaz de interactuar selectivamente con varias dianas de interés.⁷⁴ Otra alternativa es el diseño de fármacos enfocado a una única diana que se encuentre involucrada en diferentes mecanismos patológicos. En teoría, este tipo de

⁷² Blair, H. A. Tofersen: First Approval. *Drugs* **2023**, 83 (11), 1039–1043.

⁷³ Makhoba, X. H.; Viegas, C.; Mosa, R. A.; Viegas, F. P. D.; Poee, O. J. Potential Impact of the Multi-Target Drug Approach in the Treatment of Some Complex Diseases. *Drug Des. Devel. Ther.* **2020**, 14, 3235–3249.

⁷⁴ Nozal, V.; García-Rubia, A.; Cuevas, E. P.; Pérez, C.; Tosat-Bitrián, C.; Bartolomé, F.; Carro, E.; Ramírez, D.; Palomo, V.; Martínez, A. From Kinase Inhibitors to Multitarget Ligands as Powerful Drug Leads for Alzheimer's Disease Using Protein-Templated Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2021**, 60 (35), 19344–19354.

fármacos deberían revertir la neurodegeneración de manera efectiva al tener un efecto sistémico en todo este ecosistema de vías moleculares alteradas.

4.1. Proteínas quinasas como dianas frente a la neurodegeneración

En la búsqueda de dianas efectivas, las proteínas quinasas han sido exploradas recurrentemente durante las últimas décadas. El genoma humano contiene más de 500 genes que codifican para este tipo de proteínas, las cuales tienen una tendencia notable a conservarse filogenéticamente (Figura 12).⁷⁵

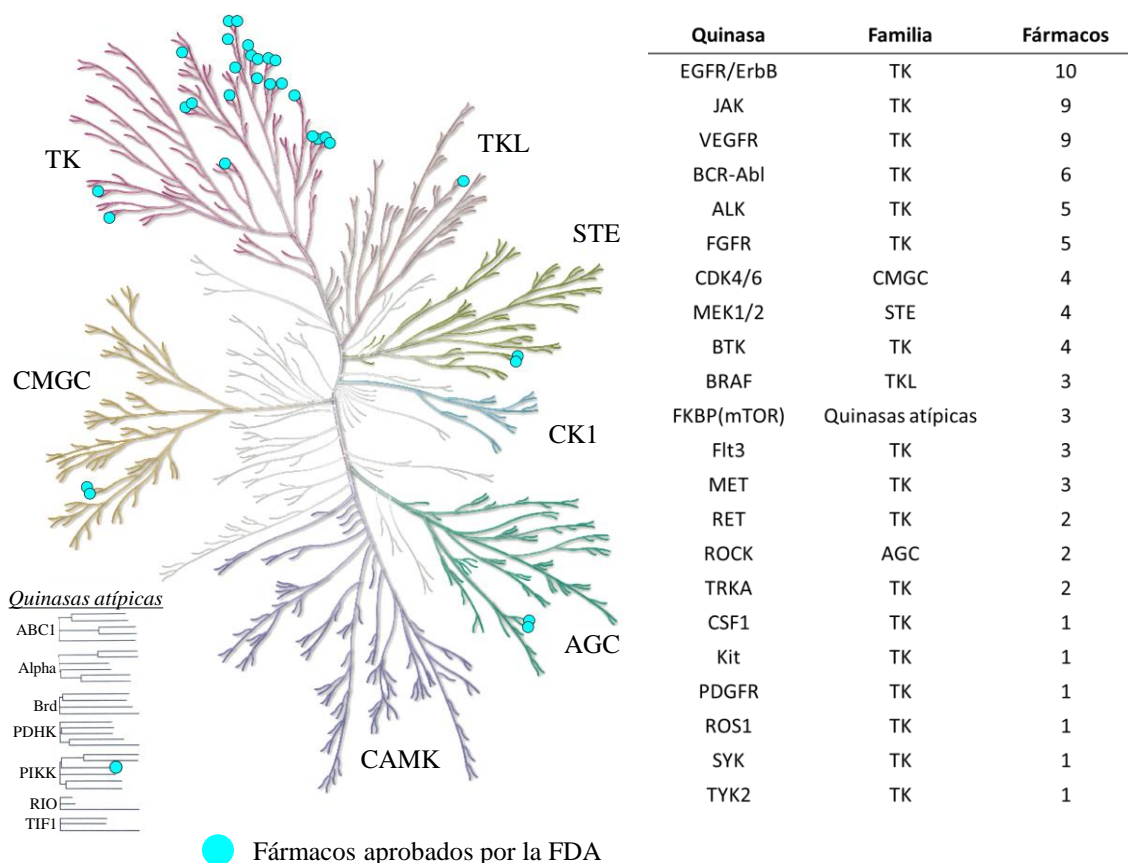


Figura 12. Inhibidores de quinasas aprobados por la FDA en 2024.

Esta conservación es entendible en cuanto que su actividad catalítica es siempre similar, es decir, el traspaso del fosfato terminal de un nucleótido (generalmente ATP)⁷⁶ al sustrato correspondiente (normalmente el aminoácido de otra proteína). La señalización de sustratos mediante grupos fosfatos ocupa un papel fundamental en la mayoría de procesos

⁷⁵ Anderson, B.; Rosston, P.; Ong, H. W.; Hossain, M. A.; Davis-Gilbert, Z. W.; Drewry, D. H. How Many Kinases Are Druggable? A Review of Our Current Understanding. *Biochem. J.* **2023**, *480* (16), 1331–1363.

⁷⁶ Rogne, P.; Dulko-Smith, B.; Goodman, J.; Rosselin, M.; Grundström, C.; Hedberg, C.; Nam, K.; Sauer-Eriksson, A. E.; Wolf-Watz, M. Structural Basis for GTP versus ATP Selectivity in the NMP Kinase AK3. *Biochemistry* **2020**, *59* (38), 3570–3581.

biológicos. Esto hace que niveles de fosforilación aberrantes puedan alterar múltiples vías de señalización, lo que otorga a las quinasas un papel central en diferentes enfermedades.⁷⁷⁻⁷⁹ Tradicionalmente, las quinasas han sido consideradas dianas de interés terapéutico en el ámbito de la oncología. Prueba de ello es que de los 80 fármacos aprobados por la FDA y categorizados como inhibidores de quinasas, 69 están destinados al tratamiento de distintas neoplasias (**Figura 12**).⁸⁰

Gracias a una mayor comprensión de los mecanismos moleculares que caracterizan a las patologías del SNC, varios de estos inhibidores están siendo reposicionados para diferentes enfermedades neurodegenerativas. Algunos ejemplos son el nilotinib, un inhibidor de la quinasa de abelson 1 (ABL1) en Fase III para la EA (NCT05143528), usado comúnmente para algunos tipos de leucemia, o el fasudil, inhibidor de la quinasa asociada a Rho (ROCK) en Fase II para la ELA (NCT03792490), la EP (NCT05931575) y la EA (NCT06362707), aprobado originalmente para el tratamiento de vasoespasmos cerebrales.

Merece la pena destacar algunas quinasas que han tomado relevancia en los últimos años en el campo de la neurodegeneración. La caseína quinasa 1 (CK1) es una serina/treonina quinasa que dispone de siete isoformas, siendo las más relevantes en este ámbito las isoformas δ y ϵ . Estas quinasas hiperfosforilan las proteínas tau y TDP43, a la vez que regulan la transmisión de la señal glutamatérgica, el tráfico de microtúbulos, la apoptosis y vías relacionadas con los ritmos circadianos.⁸¹ Se han diseñado inhibidores, como el IGS2.7 (**Figura 13**), capaces de revertir el fenotipo patológico en un modelo de ratón transgénico de TDP43, a la vez que en diferentes modelos *in vitro* relacionados con esta proteína agregante.^{82,83} Actualmente, este inhibidor se encuentra en desarrollo regulatorio avanzado, esperando alcanzar la primera fase clínica a finales de 2025.

⁷⁷ Castelo-Soccio, L.; Kim, H.; Gadina, M.; Schwartzberg, P. L.; Laurence, A.; O'Shea, J. J. Protein Kinases: Drug Targets for Immunological Disorders. *Nat. Rev. Immunol.* **2023**, *23* (12), 787–806.

⁷⁸ Bhullar, K. S.; Lagarón, N. O.; McGowan, E. M.; Parmar, I.; Jha, A.; Hubbard, B. P.; Rupasinghe, H. P. V. Kinase-Targeted Cancer Therapies: Progress, Challenges and Future Directions. *Mol. Cancer* **2018**, *17* (1), 48.

⁷⁹ Fagiani, F.; Lanni, C.; Racchi, M.; Govoni, S. Targeting Dementias through Cancer Kinases Inhibition. *Alzheimer's Dement. Transl. Res. Clin. Interv.* **2020**, *6* (1), e12044.

⁸⁰ Roskoski, R. Properties of FDA-Approved Small Molecule Protein Kinase Inhibitors: A 2024 Update. *Pharmacol. Res.* **2024**, *200*, 107059.

⁸¹ Perez, D. I.; Gil, C.; Martínez, A. Protein Kinases CK1 and CK2 as New Targets for Neurodegenerative Diseases. *Med. Res. Rev.* **2011**, *31* (6), 924–954.

⁸² Martínez-González, L.; Rodríguez-Cueto, C.; Cabezudo, D.; Bartolomé, F.; Andrés-Benito, P.; Ferrer, I.; Gil, C.; Martín-Requero, Á.; Fernández-Ruiz, J.; Martínez, A.; de Lago, E. Motor Neuron Preservation and Decrease of *in Vivo* TDP-43 Phosphorylation by Protein CK-1 δ Kinase Inhibitor Treatment. *Sci. Rep.* **2020**, *10* (1), 4449.

⁸³ Palomo, V.; Nozal, V.; Rojas-Prats, E.; Gil, C.; Martínez, A. Protein Kinase Inhibitors for Amyotrophic Lateral Sclerosis Therapy. *Br. J. Pharmacol.* **2021**, *178* (6), 1316–1335.

Otra quinasa prometedoras en contextos neurodegenerativos es la quinasa de la glucógeno sintasa 3 beta (GSK3 β). GSK3 β es una quinasa constitutivamente activa relacionada con varias vías moleculares patológicas, entre las que destacan la fosforilación de tau, TDP43 y β A, la activación de mecanismos proinflamatorios y la regulación de distintos neurotransmisores.^{84,85} Se encuentra sobreexpresada tanto en la EA como en la ELA y la EP, y se ha probado sobradamente la eficacia de inhibir esta quinasa en modelos relacionados con estas tres enfermedades en etapas preclínicas.⁸⁶ La dificultad de esta estrategia radica en que la inhibición de GSK3 β puede resultar en cierta toxicidad debido a su papel en mecanismos celulares esenciales. En este contexto, tideglusib es capaz de inhibir de manera alostérica esta quinasa de manera segura (**Figura 13**),⁸⁵ alcanzando la Fase II de ensayos clínicos para pacientes con EA (NCT01350362), PSP (NCT01049399) y trastornos del espectro autista (NCT02586935). Actualmente ha concluido la Fase III para pacientes con distrofia miotónica congénita (NCT03692312) y se encuentra en Fase II para la ELA (NCT05105958).

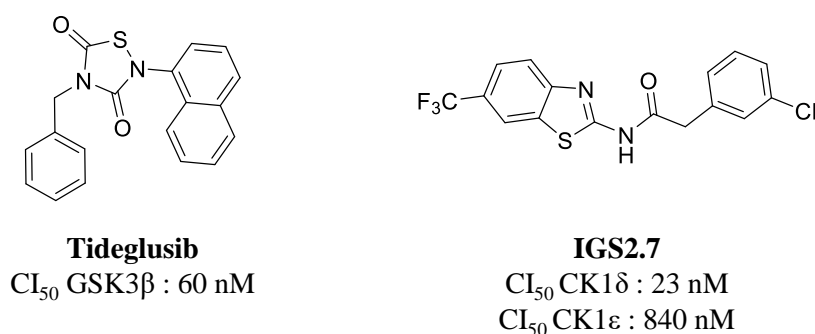


Figura 13. Estructura de los compuestos tideglusib e IGS2.7.^{82,85} CI₅₀: concentración inhibitoria 50, expresada como en la literatura.

Finalmente, resulta llamativo que casi todos los inhibidores de quinazas en ensayos clínicos se dirijan únicamente a unas pocas decenas de ellas. En el diseño de fármacos, la evidencia biológica sobre ciertas dianas suele orientar la búsqueda hacia aquellas que ya han demostrado eficacia terapéutica, como ejemplifica la exhaustiva exploración de las tirosina quinazas (TK) en comparación con otras familias (**Figura 12**). En consecuencia, existe un inmenso número de quinazas que, aun pudiendo presentar un gran potencial, se encuentran subexploradas desde el punto de vista del diseño de fármacos. En el caso de las

⁸⁴ Lauretti, E.; Dincer, O.; Praticò, D. Glycogen Synthase Kinase-3 Signaling in Alzheimer's Disease. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2020**, *1867* (5), 118664.

⁸⁵ Domínguez, J. M.; Fuertes, A.; Orozco, L.; del Monte-Millán, M.; Delgado, E.; Medina, M. Evidence for Irreversible Inhibition of Glycogen Synthase Kinase-3 β by Tideglusib. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287* (2), 893–904.

⁸⁶ Duda, P.; Janusz, W.; Tomasz, W.; Olga, W.; Michał, J.; Dominika, D.-F.; Dariusz, R.; James A., M.; and Gizak, A. Targeting GSK3 Signaling as a Potential Therapy of Neurodegenerative Diseases and Aging. *Expert Opin. Ther. Targets* **2018**, *22* (10), 833–848.

enfermedades neurodegenerativas, a este sesgo hay que sumarle que las proteínas quinasas han sido estudiadas principalmente en el ámbito oncológico. Por tanto, la evidencia que respalda su papel en procesos neurodegenerativos es mucho más limitada. Además, el diseño de fármacos antineurodegenerativos adquiere una capa extra de complejidad al necesitar atravesar la BHE.

Por todo lo expuesto anteriormente, hay una necesidad urgente de explorar otras quinasas que sirvan como blanco farmacológico contra la neurodegeneración. Bajo esta premisa, este trabajo se centra en la modulación farmacológica de la quinasa regulada por suero y glucocorticoide 1 (SGK1), una quinasa poco explorada, implicada en procesos patológicos relacionados con la neurodegeneración y tradicionalmente presentada como una diana terapéutica para enfermedades ajenas al SNC.

5. SGK1 como diana terapéutica frente a la neurodegeneración

5.1. SGK1: expresión, estructura y regulación

SGK1 es una serina/treonina quinasa perteneciente a la familia de quinasas AGC (por sus miembros PKA, PKG y PKC). Como su nombre indica, fue descubierta debida al aumento de los niveles de ARNm ante la presencia de glucocorticoides y suero.⁸⁷ Posteriormente, se descubrió que su regulación también depende del control del volumen celular, siendo altamente sensible a cambios osmóticos.⁸⁸ Por otro lado, se tiene constancia de más isoformas cuya expresión y regulación varía respecto a SGK1. SGK2 se expresa constitutivamente en hígado, páncreas, cerebro y riñón, mientras que SGK3 se expresa en todo el organismo. Sin embargo, si bien la localización de SGK1 se considera ubicua, su transcripción y expresión se encuentran estrictamente controlada por la presencia de determinados estímulos.⁸⁹ Varios de ellos se relacionan con situaciones de estrés celular como la irradiación ultravioleta, el estrés oxidativo o ciertas citoquinas, si bien otros estímulos no son necesariamente patológicos, tales como la insulina o el factor TGF- β .^{89,90}

⁸⁷ Webster, M. K.; Goya, L.; Ge, Y.; Maiyar, A. C.; Firestone, G. L. Characterization of Sgk, a Novel Member of the Serine/Threonine Protein Kinase Gene Family Which Is Transcriptionally Induced by Glucocorticoids and Serum. *Mol. Cell. Biol.* **1993**, *13* (4), 2031–2040.

⁸⁸ Firestone, G. L.; Giampaolo, J. R.; O’Keeffe, B. A. Stimulus-Dependent Regulation of Serum and Glucocorticoid Inducible Protein Kinase (SGK) Transcription, Subcellular Localization and Enzymatic Activity. *Cell. Physiol. Biochem.* **2003**, *13* (1), 1–12.

⁸⁹ Di Cristofano A. SGK1: The Dark Side of PI3K Signaling. *Curr. Top. Dev. Biol.* **2017**, *123*, 49–71.

⁹⁰ Lu, R.-Q.; Zhang, Y.-Y.; Zhao, H.-Q.; Guo, R.-Q.; Jiang, Z.-X.; Guo, R. SGK1, a Critical Regulator of Immune Modulation and Fibrosis and a Potential Therapeutic Target in Chronic Graft-Versus-Host Disease. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 822303.

Esta regulación está acompañada de una corta semivida tanto del ARNm (20 min) como de la propia proteína (30 min), lo que sugiere un fuerte control sobre la presencia o ausencia de la proteína dentro de la célula.⁸⁹

Codificada por el gen *SGK1*, la expresión del mismo da lugar a un único dominio quinasa formado por 431 aminoácidos, los cuales adquieren la estructura terciaria arquetípica de una quinasa (**Figura 14**).⁹¹ Estructuralmente, los residuos 60-179 adoptan estructuras secundarias tipo lámina β , dando lugar a lo que conocemos como el extremo N-terminal de la proteína. El extremo C-terminal (residuos 180-431) se compone de estructuras secundarias tipo hélice α . La unión de ambas partes tiene lugar en dos regiones de gran importancia: la región bisagra (residuos 177-183), donde el ATP se une a la proteína, y el bucle de activación (residuos 240-266), una región desordenada donde diferentes estados de fosforilación determinan su conformación y, por tanto, la entrada del sustrato a fosforilar.⁹¹ Los residuos 1-60 componen una secuencia de unión a la membrana mitocondrial que no se encuentra cristalizada en las diferentes estructuras disponibles de SGK1. Por otro lado, y de manera característica para esta quinasa, no se aprecia la formación de la hélice α C en el extremo N-terminal, observada en la vasta mayoría de quinasas (**Figura 14**).⁹¹⁻⁹³

El centro activo de la quinasa, embebido entre los extremos N-terminal y C-terminal, se define por la región bisagra, la lisina catalítica y el bucle de activación. En conformaciones activas, el ATP se une por la base nitrogenada a la región bisagra, formando un par de enlaces de hidrógeno con los residuos Asp177 e Ile179, así como múltiples interacciones hidrofóbicas. El ATP se extiende a lo largo del bolsillo, disponiendo los grupos fosfato hacia la zona más expuesta al solvente. La presencia de un ión Mg^{2+} permite la geometría adecuada de estos fosfatos que, junto con la interacción de la lisina catalítica (Lys127) y el fosfato β , desencadena la reducción de la energía de activación de la reacción, permitiendo la fosforilación. Consecuentemente, el bucle de

⁹¹ Zhao, B.; Lehr, R.; Smallwood, A. M.; Ho, T. F.; Maley, K.; Randall, T.; Head, M. S.; Koretke, K. K.; Schnackenberg, C. G. Crystal Structure of the Kinase Domain of Serum and Glucocorticoid-regulated Kinase 1 in Complex with AMP-PNP. *Protein Sci.* **2007**, *16* (12), 2761–2769.

⁹² Hammond, M.; Washburn, D. G.; Hoang, H. T.; Manns, S.; Frazee, J. S.; Nakamura, H.; Patterson, J. R.; Trizna, W.; Wu, C.; Azzarano, L. M.; Nagilla, R.; Nord, M.; Trejo, R.; Head, M. S.; Zhao, B.; Smallwood, A. M.; Hightower, K.; Laping, N. J.; Schnackenberg, C. G.; Thompson, S. K. Design and Synthesis of Orally Bioavailable Serum and Glucocorticoid-Regulated Kinase 1 (SGK1) Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19* (15), 4441–4445.

⁹³ Halland, N.; Schmidt, F.; Weiss, T.; Li, Z.; Czech, J.; Saas, J.; Ding-Pfennigdorff, D.; Dreyer, M. K.; Strübing, C.; Nazare, M. Rational Design of Highly Potent, Selective, and Bioavailable SGK1 Protein Kinase Inhibitors for the Treatment of Osteoarthritis. *J. Med. Chem.* **2022**, *65* (2), 1567–1584.

activación se encuentra expuesto hacia el solvente en este tipo de conformaciones, permitiendo la entrada del sustrato a fosforilar (**Figura 14**).

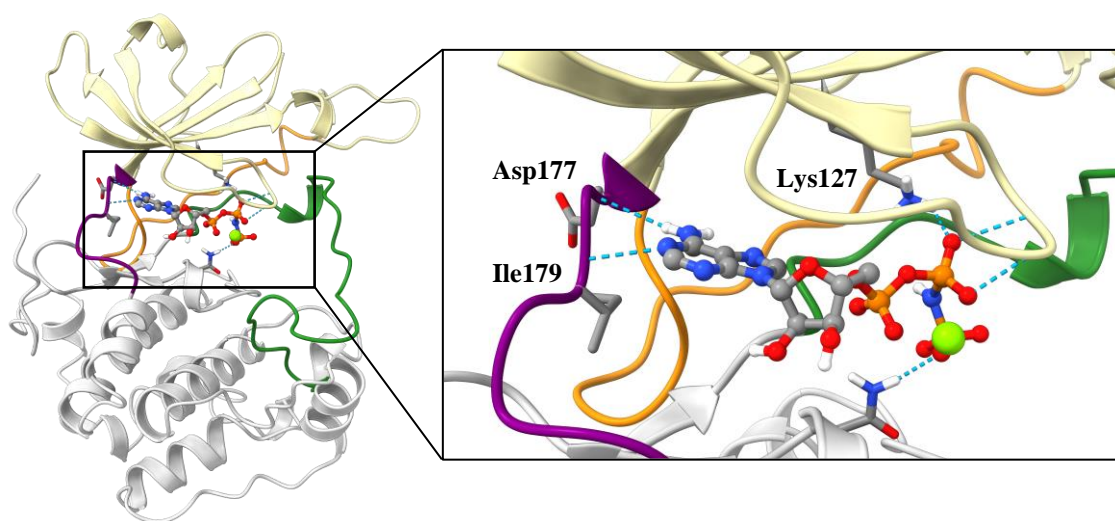


Figura 14. Estructura terciaria de SGK1. Modelo obtenido a partir del PDB 2r5t. La parte N-terminal, C-terminal, región bisagra y bucle de activación se representan de color amarillo, gris, púrpura y verde, respectivamente. En naranja, los residuos que corresponderían a la hélice αC , en este caso sin estructura secundaria definida. A la derecha, se indica el modo de unión del ligando cocrystalizado ANP, análogo de ATP. En verde, el ión Mg^{2+} , actuando como cofactor.

Como muchas otras proteínas, las quinasas sufren modificaciones postraduccionales que condicionan su actividad. En el caso de SGK1, las modificaciones descritas hasta la fecha son fosforilaciones, todas ellas activantes. Concretamente, las fosforilaciones en los residuos Thr256 (en el bucle de activación) y Ser422 (en el extremo C-terminal), han mostrado ser necesarias para la máxima actividad de la quinasa, al igual que otras quinasas de la familia AGC.^{94,95} Si bien se han descrito otros epítomos cuya fosforilación parece promover la activación de SGK1, su implicación en contextos fisiológicos no ha sido elucidada.⁹⁵

5.2. Vías moleculares relacionadas con SGK1

SGK1 se ha englobado típicamente dentro de la vía molecular de la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K). Los diferentes estímulos comentados anteriormente desencadenan el

⁹⁴ Kobayashi, T.; Cohen, P. Activation of Serum- and Glucocorticoid-Regulated Protein Kinase by Agonists That Activate Phosphatidylinositol 3-Kinase Is Mediated by 3-Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase-1 (PDK1) and PDK2. *Biochem. J.* **1999**, *339* (2), 319–328.

⁹⁵ Chen, W.; Chen, Y.; Xu, B. E.; Juang, Y. C.; Stippec, S.; Zhao, Y.; Cobb, M. H. Regulation of a Third Conserved Phosphorylation Site in SGK1. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284* (6), 3453–3460.

reclutamiento de la quinasa dependiente de fosfoinosítidos 1 (PDK1) y promueven la fosforilación de SGK1 en la Thr256, activando la quinasa parcialmente. Paralelamente, la activación del complejo de la diana mamífera de la rapamicina 2 (mTORC2) fosforila a SGK1 en la Ser422, promoviendo la activación total de la quinasa.⁹⁶ SGK1, en consecuencia, cataliza la fosforilación de múltiples sustratos, entre los que destacan NDRG1 (*N-myc Downstream Regulated 1 protein*), NEDD-4-2 (*neuronal precursor cell expressed developmentally downregulated 4-2*), FOXO3 (*forkhead box protein O3*), FOXO1 y algunas quinasas como IKK α (*IkappaB kinase alpha*) (**Figura 15**).^{89,97}

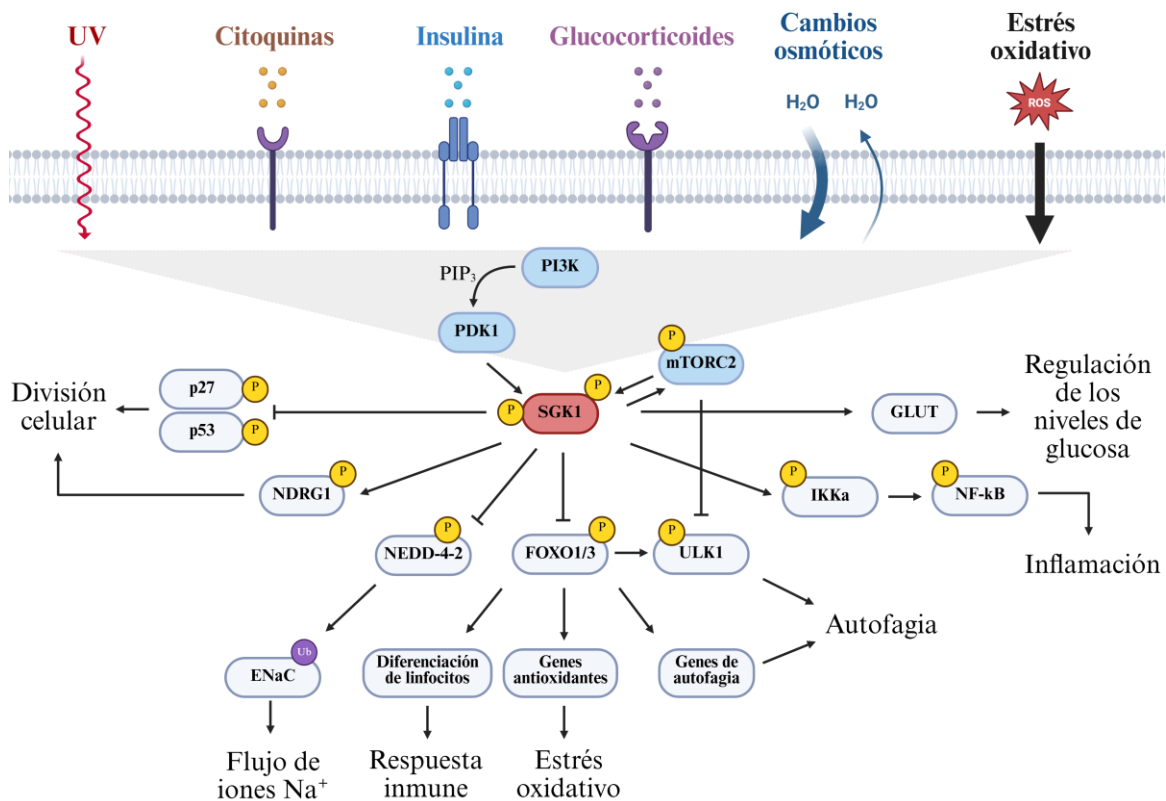


Figura 15. Principales vías moleculares donde SGK1 se encuentra involucrada.

5.3. Funciones fisiológicas de SGK1

Como se ha comentado anteriormente, la expresión de SGK1 se considera ubicua. Por otro lado, está involucrada en la regulación de múltiples sustratos, lo que la hace estar

⁹⁶ Mok, K. W.; Mruk, D. D.; Cheng, C. Y. Regulation of Blood-Testis Barrier (BTB) Dynamics during Spermatogenesis via the “Yin” and “Yang” Effects of Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 (MTORC1) and MTORC2. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **2013**, *301*, 291–358.

⁹⁷ Ruizhe, Z.; Gang, Y.; Zhe, C.; Kexin, S.; Lianfang, Z.; Jianchun, X.; Lei, Y.; Taiping, Z. The Prospect of Serum and Glucocorticoid-Inducible Kinase 1 (SGK1) in Cancer Therapy: A Rising Star. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **2020**, *12*, 1758835920940946.

presente en varias vías de señalización. Por ejemplo, es capaz de regular la toma de glucosa por parte de las células al activar los canales transportadores de glucosa (GLUT), posicionándola como una diana de interés en enfermedades como la diabetes.⁹⁸

Su papel en la regulación del ciclo celular y la apoptosis a través de p27 y p53 ha sido ampliamente estudiado en diferentes tipos de cáncer,⁹⁷ así como en la hipertensión y algunas enfermedades renales debido a su capacidad de modificar diferentes canales iónicos (**Figura 15**).⁹⁹ Además, ha cobrado relevancia como reguladora del sistema inmune debido a que favorece la diferenciación patogénica de linfocitos Th17 vía FOXO1, desencadenando una respuesta proinflamatoria (**Figura 15**).¹⁰⁰ Sin embargo, al tratar SGK1 como una potencial diana frente a la neurodegeneración, cabe preguntarse qué funciones fisiológicas lleva a cabo esta quinasa en el SNC.

El papel de SGK1 en la regulación de la ósmosis está altamente relacionada con su papel como modulador de una amplia cantidad de canales iónicos. SGK1 es capaz de activar los canales epiteliales de sodio (ENaC) a través de la inhibición de la ubiquitina ligasa NEDD-4-2, impidiendo la degradación de estos canales y favoreciendo el flujo de iones Na⁺ (**Figura 15**).¹⁰¹ Esta función se ha mostrado fundamental para el mantenimiento de la integridad de la BHE.^{102,103} La inhibición de la actividad de NEDD-4-2 da lugar a la activación de los canales de K⁺, en concreto Kv7, implicado en el mantenimiento del potencial de membrana neuronal.¹⁰⁴ Además, la regulación de otros canales iónicos (tanto Na⁺ y K⁺ como Ca²⁺ o Cl⁻) está involucrada en la liberación de hormonas, la proliferación celular y la prevención de la apoptosis, lo que podría indicar un papel neuroprotector por

⁹⁸ Lang, F.; Görlach, A.; Vallon, V. Targeting SGK1 in Diabetes. *Expert Opin. Ther. Targets* **2009**, *13* (11), 1303–1311.

⁹⁹ Lu, X.; Crowley, S. D. Inflammation in Salt-Sensitive Hypertension and Renal Damage. *Curr. Hypertens. Rep.* **2018**, *20* (12), 103.

¹⁰⁰ Du, Y. N.; Tang, X. F.; Xu, L.; Chen, W. D.; Gao, P. J.; Han, W. Q. SGK1-FoxO1 Signaling Pathway Mediates Th17/Treg Imbalance and Target Organ Inflammation in Angiotensin II-Induced Hypertension. *Front. Physiol.* **2018**, *9*, 1581.

¹⁰¹ Debonneville, C.; Flores, S. Y.; Kamynina, E.; Plant, P. J.; Tauxe, C.; Thomas, M. A.; Münster, C.; Chraïbi, A.; Pratt, J. H.; Horisberger, J. D.; Pearce, D.; Loffing, J.; Staub, O. Phosphorylation of Nedd4-2 by Sgk1 Regulates Epithelial Na⁺ Channel Cell Surface Expression. *EMBO J.* **2001**, *20* (24), 7052–7059.

¹⁰² Zhang, T.; Fang, S.; Wan, C.; Kong, Q.; Wang, G.; Wang, S.; Zhang, H.; Zou, H.; Sun, B.; Sun, W.; Zhang, Y.; Mu, L.; Wang, J.; Wang, J.; Zhang, H.; Wang, D.; Li, H. Excess Salt Exacerbates Blood-Brain Barrier Disruption via a P38/MAPK/SGK1-Dependent Pathway in Permanent Cerebral Ischemia. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 16548.

¹⁰³ Klug, N. R.; Chechneva, O. V.; Hung, B. Y.; O'Donnell, M. E. High Glucose-Induced Effects on Na⁺-K⁺-2Cl⁻ Cotransport and Na⁺/H⁺ Exchange of Blood-Brain Barrier Endothelial Cells: Involvement of SGK1, PKCβII, and SPAK/OSR1. *Am. J. Physiol.* **2021**, *320* (4), C619–C634.

¹⁰⁴ Andersen, M. N.; Krzystanek, K.; Petersen, F.; Bomholtz, S. H.; Olesen, S. P.; Abriel, H.; Jespersen, T.; Rasmussen, H. B. A Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K)-Serum- and Glucocorticoid-Inducible Kinase 1 (SGK1) Pathway Promotes Kv7.1 Channel Surface Expression by Inhibiting Nedd4-2 Protein. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288* (52), 36841–36854.

parte de la quinasa.¹⁰⁵ Por otro lado, se ha otorgado un papel fundamental a SGK1 en la formación de la memoria a largo plazo. Si bien la razón fundamental se desconoce, se atribuye la capacidad de SGK1 para mantener el potencial de membrana y la regulación de la actividad glutamatérgica como algunas de las posibles causas.¹⁰⁶

5.4. Papel de SGK1 en diferentes mecanismos neuropatológicos

La vía molecular PI3K/mTOR ha sido ampliamente estudiada por su relación con la autofagia. Por un lado, SGK1 es capaz de fosforilar FOXO3, impidiendo su localización celular y la transcripción de genes relacionados con la autofagia (**Figura 15**). Consecuentemente, el tejido muscular de ratones *Sgk1*^{-/-} muestra un incremento en la actividad autofágica.¹⁰⁷ Además, este tejido muestra un aumento en la expresión de la quinasa activadora de autofagia similar a unc-51 1 (ULK1), involucrada en la activación de los primeros pasos de esa vía molecular. Es por ello que se ha planteado la posibilidad de que la inhibición de SGK1 podría estimular la maquinaria autofágica y, por tanto, favorecer la degradación de los agregados proteicos.¹⁰⁸ Además, SGK1 se encuentra involucrada en la fosforilación de tau, lo que podría involucrarla directamente con la presencia de este tipo de agregados.¹⁰⁹

Por otro lado, en su papel como regulador iónico, SGK1 es capaz de activar los receptores AMPA y de kainato.¹⁰⁶ Una sobreactividad de esta quinasa podría desencadenar un aumento de la actividad glutamatérgica, algo característico de algunas enfermedades neurodegenerativas. En cuanto a la neuroinflamación, existe controversia sobre el papel de SGK1. En presencia de un estímulo patológico que active SGK1, como una alta concentración salina en microglía, esta quinasa es capaz de promover la activación del complejo NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), presumiblemente a través de la activación de IKK α . Esto desencadena una cascada proinflamatoria que podría resolverse mediante la inhibición de SGK1 (**Figura 15**).¹¹⁰ Por

¹⁰⁵ Lang, F.; Shumilina, E. Regulation of Ion Channels by the Serum- and Glucocorticoid-Inducible Kinase SGK1. *FASEB J.* **2013**, *27* (1), 3–12.

¹⁰⁶ Lang, F.; Strutz-Seeböhm, N.; Seeböhm, G.; Lang, U. E. Significance of SGK1 in the Regulation of Neuronal Function. *J. Physiol.* **2010**, *588* (18), 3349–3354.

¹⁰⁷ Zuleger, T.; Heinzlbecker, J.; Takacs, Z.; Hunter, C.; Voelkl, J.; Lang, F.; Proikas-Cezanne, T. SGK1 Inhibits Autophagy in Murine Muscle Tissue. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018**, *2018*, 4043726.

¹⁰⁸ Ghani, M. J. SGK1, Autophagy and Cancer: An Overview. *Mol. Biol. Rep.* **2022**, *49* (1), 675–685.

¹⁰⁹ Virdee, K.; Yoshida, H.; Peak-Chew, S.; Goedert, M. Phosphorylation of Human Microtubule-Associated Protein Tau by Protein Kinases of the AGC Subfamily. *FEBS Lett.* **2007**, *581* (14), 2657–2662.

¹¹⁰ Inoue, K.; Morimoto, H.; Ueki, T. Modulation of Microglial Activity by Salt Load and SGK1. *Neuroreport* **2020**, *31* (7), 571–577.

el contrario, en ausencia de ese tipo de estímulos, la inhibición de SGK1 conlleva un aumento de la respuesta inflamatoria.¹¹¹

El hecho de que SGK1 disponga de una secuencia de unión a la mitocondria ha llevado a estudiar su papel como regulador de la homeostasis mitocondrial. Estudios en *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) señalan cómo SGK1 es capaz de suprimir la mitofagia independientemente de su papel regulador de FOXO3 como factor de transcripción de genes autofágicos. La hipótesis actual apunta a que la fosforilación del canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC) promueve un aumento de la actividad mitofágica mediante la alteración de los niveles de ROS.¹¹² Si bien modelos *knock-out* de *Sgk1* en *C. elegans* han mostrado niveles elevados de mitofagia,¹¹³ la inhibición farmacológica de SGK1 ha resultado en el bloqueo de esta actividad en células de osteosarcoma U2OS.¹¹⁴ Por otro lado, la fosforilación de FOXO3 impide la transcripción de genes con una clara función antioxidante, como aquellos que codifican para las proteínas SOD2 o catalasa (**Figura 15**). Por tanto, la inhibición de SGK1 podría conducir hacia una reducción del estrés oxidativo.¹¹⁵ Estos mecanismos se encuentran resumidos en la **Figura 16**.

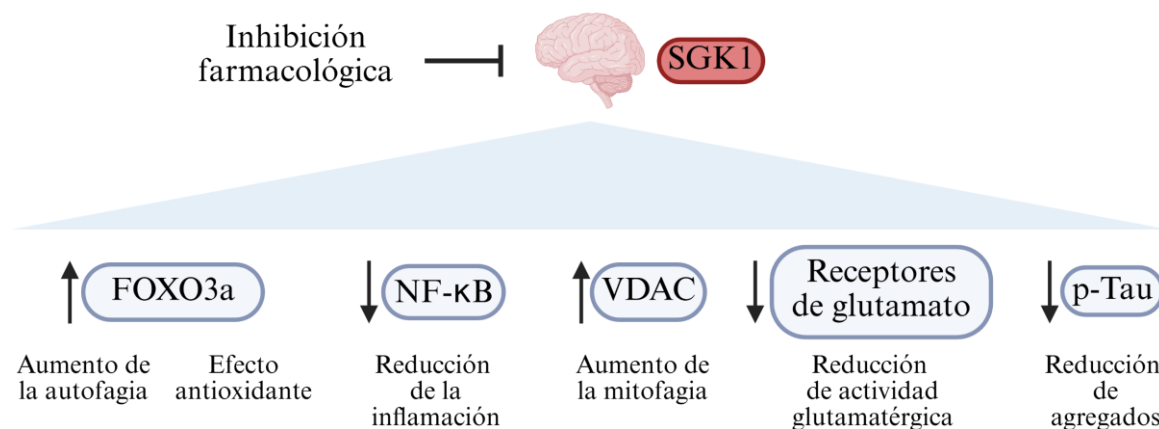


Figura 16. Inhibición de SGK1 como herramienta farmacológica en contextos neurodegenerativos.

¹¹¹ Inoue, K.; Sakuma, E.; Morimoto, H.; Asai, H.; Koide, Y.; Leng, T.; Wada, I.; Xiong, Z. G.; Ueki, T. Serum- and Glucocorticoid-Inducible Kinases in Microglia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, *478* (1), 53–59.

¹¹² Heimbucher, T.; Qi, W.; Baumeister, R. TORC2-SGK-1 Signaling Integrates External Signals to Regulate Autophagic Turnover of Mitochondria via MtROS. *Autophagy* **2020**, *16* (6), 1154–1156.

¹¹³ Aspernig, H.; Heimbucher, T.; Qi, W.; Gangurde, D.; Curic, S.; Yan, Y.; Donner von Gromoff, E.; Baumeister, R.; Thien, A. Mitochondrial Perturbations Couple MTORC2 to Autophagy in *C. Elegans*. *Cell Rep.* **2019**, *29* (6), 1399-1409.e5.

¹¹⁴ Maestro, I.; Madruga, E.; Boya, P.; Martínez, A. Identification of a New Structural Family of SGK1 Inhibitors as Potential Neuroprotective Agents. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2023**, *38* (1), 2153841.

¹¹⁵ González-Herrera, F.; Catalán, M.; Anfossi, R.; Maya, J. D.; Pedrozo, Z.; Díaz-Araya, G.; Vivar, R. SGK1 Is Necessary to FoxO3a Negative Regulation, Oxidative Stress and Cardiac Fibroblast Activation Induced by TGF-β1. *Cell. Signal.* **2023**, *109*, 110778.

5.5. Inhibición de SGK1 como herramienta terapéutica frente a la neurodegeneración

A lo largo de este texto se ha expuesto el papel de SGK1 en el SNC. Si bien en ocasiones la inhibición de SGK1 ha mostrado efectos terapéuticos notables, en otras ocasiones parece desencadenar un efecto deletéreo, situando a SGK1 como una quinasa necesaria para la supervivencia celular. Ante esto, cabe preguntarse si el diseño de inhibidores frente a esta quinasa es una estrategia eficiente contra la neurodegeneración.

En primer lugar, modelos de ratón *knock-out* de *Sgk1* homocigóticos (*Sgk1*^{-/-}) no presentan ninguna patología observable (a excepción de una mala función renal cuando se les administra una dieta baja en sal).¹¹⁶ Esto podría apuntar a que SGK1 no es responsable de ningún mecanismo celular imprescindible que comprometa la funcionalidad del organismo. En segundo lugar, la evidencia sugiere que esta quinasa es altamente dependiente del tipo celular y de los estímulos patológicos que la rodean. Esta combinación, en teoría, podría decantar que SGK1 actúe como una quinasa patológica o una quinasa de supervivencia. Si bien su papel en el SNC no está claro, la inhibición farmacológica de SGK1 ha sido evaluada en algunos modelos relacionados con la neurodegeneración.

5.5.1. SGK1 y su inhibición en enfermedades de Alzheimer, Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica

La transcripción de *SGK1* se ha cuantificado tanto en pacientes con EA como en modelos animales relacionados con esta enfermedad. En concreto, se ha descrito un claro aumento tanto en pacientes como en modelos animales.¹¹⁷⁻¹¹⁹ Estos resultados, junto con los del resto de enfermedades neurodegenerativas, se discuten en profundidad en el primer capítulo de este trabajo. Por otro lado, la inhibición farmacológica de SGK1 en el modelo de ratón Tg-Prp-TAU^{P301S} ha demostrado no solo reducir la fosforilación de tau, sino mejorar la función sináptica mediada por los niveles de glutamato y revertir el fenotipo cognitivo.¹¹⁹ También se ha estudiado el papel de SGK1 en el modelo de ratón Tg-CAMKII-MAPT601 (Tg601) al administrarle dietas altas en grasas, sirviendo como estudio

¹¹⁶ McDonald, F. J. A New SGK1 Knockout Mouse. *Am. J. Physiol.* **2008**, *294* (6), 1296–1297.

¹¹⁷ Elahi, M.; Motoi, Y.; Shimonaka, S.; Ishida, Y.; Hioki, H.; Takanashi, M.; Ishiguro, K.; Imai, Y.; Hattori, N. High-Fat Diet-Induced Activation of SGK1 Promotes Alzheimer's Disease-Associated Tau Pathology. *Hum. Mol. Genet.* **2021**, *30* (18), 1693–1710.

¹¹⁸ Sahin, P.; Mccaig, C.; Jeevahan, J.; Murray, J. T.; Hainsworth, A. H. The Cell Survival Kinase SGK1 and Its Targets FOXO3a and NDRG1 in Aged Human Brain. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **2013**, *39* (6), 623–633.

¹¹⁹ Cao, Q.; Wang, W.; Williams, J. B.; Yang, F.; Wang, Z. J.; Yan, Z. Targeting Histone K4 Trimethylation for Treatment of Cognitive and Synaptic Deficits in Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Sci. Adv.* **2020**, *6* (50), eabc8096.

de enfermedad de Alzheimer asociada a diabetes mellitus tipo 2.¹¹⁷ En este modelo, la inhibición farmacológica de SGK1 podría resultar una estrategia terapéutica adecuada.

La evidencia del papel de SGK1 en la EP es mucho menos abundante que en el caso de la EA. Hasta donde sabemos, la cuantificación de esta quinasa en muestras de pacientes no se ha llevado a cabo, si bien parece haber un claro aumento en muestras de modelos animales.¹²⁰ Recientemente, la inhibición de SGK1 ha mostrado efectos muy prometedores en ratones administrados con la toxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), un modelo ampliamente utilizado en la EP. En este modelo, la inhibición rescata la muerte de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra, así como una recuperación del fenotipo locomotor.¹²¹

Por último, apenas existen datos publicados hasta la fecha de SGK1 en relación con la ELA. Solo se han descrito los niveles de SGK1 en el modelo de ratón Tg-SOD1^{G93A}, mostrando un aumento en cerebro y médula espinal.¹²⁰ En consecuencia, no se encuentran datos sobre el potencial terapéutico de la inhibición de SGK1 en esta enfermedad.

5.6. Estado del arte de los inhibidores de SGK1

A pesar de las múltiples implicaciones de SGK1 en diferentes vías moleculares, así como su potencial como diana terapéutica para varios tipos de enfermedades, solo unas pocas familias de inhibidores han sido desarrolladas (**Figura 17**). Si bien la potencia de estas moléculas está claramente demostrada, su perfil de selectividad y sus propiedades farmacocinéticas no son tan evidentes (**Tabla 2**). Esto último es de vital importancia en el caso de las enfermedades neurodegenerativas, donde los compuestos deben atravesar la BHE para ejercer su acción terapéutica. Cabe destacar que, hasta la fecha, todos los inhibidores de SGK1 descritos son ATP-competitivos, siendo los inhibidores alostéricos un ámbito sin abordar.

¹²⁰ Schoenebeck, B.; Bader, V.; Xin, R. Z.; Schmitz, B.; Lübbert, H.; Stichel, C. C. Sgk1, a Cell Survival Response in Neurodegenerative Diseases. *Mol. Cell. Neurosci.* **2005**, *30* (2), 249–264.

¹²¹ Kwon, O.; Song, J.; Yang, Y.; Kim, S.; Kim, J. Y.; Seok, M.; Hwang, I.; Yu, J.; Karmacharya, J.; Maeng, H.; Kim, J.; Jho, E.; Ko, S. Y.; Son, H.; Chang, M.; Lee, S. SGK1 Inhibition in Glia Ameliorates Pathologies and Symptoms in Parkinson Disease Animal Models. *EMBO Mol. Med.* **2021**, *13* (4), e13076.

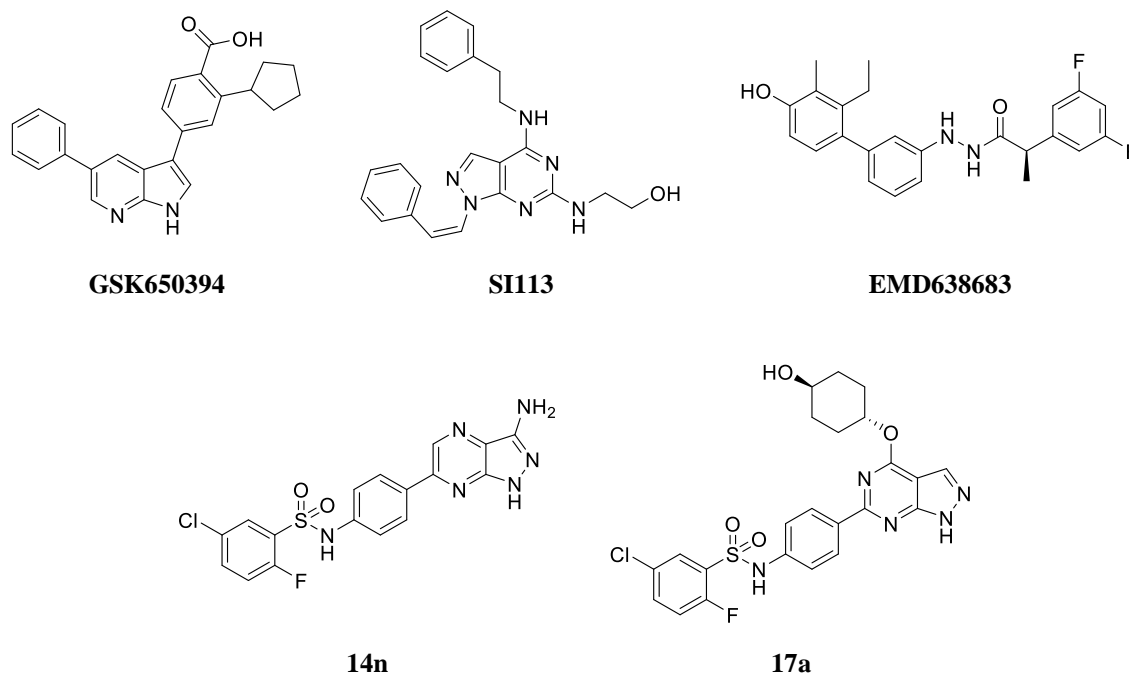


Figura 17. Inhibidores de SGK1 descritos con evidencia preclínica.

Tabla 2. Actividad y propiedades de los inhibidores de SGK1

	CI ₅₀ ^a	Selectividad	FC ^b	Permeabilidad SNC	Actividad <i>in vivo</i>	Actividad en el SNC <i>in vivo</i>
GSK650394	0.062	Comprometida	Comprometida	Comprometida	Sí	Sí
EMD638683	3.35	Buena	No reportada	No reportada	Si	No
SI113	0.6	No reportada	No reportada	No reportada	Si	No
14n	0.003	Buena	Buena	No reportada	No	No
17a	<0.001	Buena	Buena	No reportada	Si ^c	No

^a CI₅₀ expresada en μ M, indicada como en la literatura. ^b Farmacocinética. ^c Datos en modelo *ex vivo*

GSK650394 ha sido desde 2008 el inhibidor de referencia para SGK1, desarrollado por la compañía GlaxoSmithKline (Figura 17).¹²² Con un esqueleto de 7-azaindol, dispone de una concentración inhibitoria 50 (CI₅₀, esto es, la concentración necesaria para inhibir la actividad enzimática al 50 %) de 62 nM, habiendo mostrado un perfil terapéutico notable en modelos celulares de cáncer pese a disponer de propiedades farmacocinéticas (o ADME: absorción, distribución, metabolismo y eliminación) poco prometedoras.⁹² No se han aportado datos robustos de su penetrancia en cerebro, a pesar de haber mostrado eficacia en modelos de ratón tanto para la EA¹¹⁹ como para la EP.¹²¹ En este último caso, los autores

¹²² Sherk, A. B.; Frigo, D. E.; Schnackenberg, C. G.; Bray, J. D.; Laping, N. J.; Trizna, W.; Hammond, M.; Patterson, J. R.; Thompson, S. K.; Kazmin, D.; Norris, J. D.; McDonnell, D. P. Development of a Small-Molecule Serum- and Glucocorticoid-Regulated Kinase-1 Antagonist and Its Evaluation as a Prostate Cancer Therapeutic. *Cancer Res.* **2008**, *68* (18), 7475–7483.

detectan la presencia del compuesto en cerebro ($10.4 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$) a los 30 minutos de su administración intraperitoneal ($3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Ante la ausencia de más datos, parece que la penetrancia de este compuesto en el cerebro podría estar comprometida. Por otro lado, el interés terapéutico de esta molécula ha llevado al estudio exhaustivo de su selectividad. Si bien el compuesto parece mostrar selectividad sobre el resto de quinasas pertenecientes a la familia AGC, es capaz de inhibir las quinasas AMPK, CAMKK β , CDK2, GCK, MNK1 y PHK con una potencia similar a SGK1.¹²³

En 2009, el compuesto EMD638683 fue descrito por Merck como un nuevo inhibidor SGK1 con potencial terapéutico frente a la hipertensión.¹²⁴ Si bien muestra una CI_{50} de tan solo $3 \mu\text{M}$, dispone de un perfil de selectividad más notable que el anterior. No se encuentran datos en la literatura sobre sus propiedades farmacocinéticas.

No fue hasta 2012 cuando el compuesto SII13 se posicionó como un inhibidor selectivo de SGK1 ($\text{CI}_{50} = 600 \text{ nM}$). Si bien ha sido evaluado *in vivo* como potencial anticancerígeno,¹²⁵ no se han descrito datos farmacocinéticos, aunque en su momento fue descartado debido a la baja solubilidad en medio acuoso.¹²⁶ Al igual que en el caso anterior, no existen hasta el momento datos sobre su capacidad de atravesar la BHE.

Por último, el estudio del modo de unión de EMD638683 con SGK1 dio lugar a los derivados de pirazolopirazina (compuesto 14n) como inhibidores con una potencia ($\text{CI}_{50} = 3 \text{ nM}$) y una selectividad sobresaliente.¹²⁷ Por otro lado, estos compuestos muestran buenas propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas, a excepción de una baja distribución del compuesto en tejidos, incluido el cerebro. Además, no se ha mostrado su potencial terapéutico en enfermedades neurodegenerativas. Un segundo ciclo de química médica dio lugar a los derivados de pirazolopirimidina (compuesto 17a) como segunda generación de

¹²³ Maestro, I.; Boya, P.; Martinez, A. Serum- and Glucocorticoid-Induced Kinase 1, a New Therapeutic Target for Autophagy Modulation in Chronic Diseases. *Expert Opin. Ther. Targets* **2020**, *24* (3), 231–243.

¹²⁴ Gan, W.; Ren, J.; Li, T.; Lv, S.; Li, C.; Liu, Z.; Yang, M. The SGK1 Inhibitor EMD638683, Prevents Angiotensin II-Induced Cardiac Inflammation and Fibrosis by Blocking NLRP3 Inflammasome Activation. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Basis Dis.* **2018**, *1864* (1), 1–10.

¹²⁵ Talarico, C.; D'Antona, L.; Scumaci, D.; Barone, A.; Gigliotti, F.; Fiumara, C. V.; Dattilo, V.; Gallo, E.; Visca, P.; Ortuso, F.; Abbruzzese, C.; Botta, L.; Schenone, S.; Cuda, G.; Alcaro, S.; Bianco, C.; Lavia, P.; Paggi, M. G.; Perrotti, N.; Amato, R. Preclinical Model in HCC: The SGK1 Kinase Inhibitor SII13 Blocks Tumor Progression *In Vitro* and *In Vivo* and Synergizes with Radiotherapy. *Oncotarget* **2015**, *6* (35), 37511–37525.

¹²⁶ Greco, C.; Taresco, V.; Pearce, A. K.; Vasey, C. E.; Smith, S.; Rahman, R.; Alexander, C.; Cavanagh, R. J.; Musumeci, F.; Schenone, S. Development of Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidine Kinase Inhibitors as Potential Clinical Candidates for Glioblastoma Multiforme. *ACS Med. Chem. Lett.* **2020**, *11* (5), 657–663.

¹²⁷ Halland, N.; Schmidt, F.; Weiss, T.; Saas, J.; Li, Z.; Czech, J.; Dreyer, M.; Hofmeister, A.; Mertsch, K.; Dietz, U.; Strübing, C.; Nazare, M. Discovery of N-[4-(1H-Pyrazolo[3,4-b]Pyrazin-6-Yl)-Phenyl]-Sulfonamides as Highly Active and Selective SGK1 Inhibitors. *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, *6* (1), 73–78.

inhibidores potentes y selectivos ($CI_{50} < 1$ nM), los cuales han mostrado un prometedor potencial terapéutico frente a la osteoartritis en un modelo *ex vivo* de cabeza femoral de ratón.⁹³ En este caso, no se han aportado datos sobre su permeabilidad en el SNC.

Existen otros inhibidores publicados frente a SGK1. Algunos ejemplos son compuestos naturales como la herbacetina o el resveratrol,^{128,129} compuestos obtenidos a partir de cribados virtuales, o análogos de los inhibidores comentados (como es el caso de QGY-5-114-A a partir de GSK650394).¹³⁰ Sin embargo, ante la falta de evidencia preclínica de estos compuestos, no se han incluido en la comparativa. Pueden encontrarse varias revisiones exhaustivas al respecto en la literatura.^{123,131,132}

Como puede comprobarse, el diseño de inhibidores de SGK1 como herramientas frente a la neurodegeneración sigue siendo un tema pendiente. Únicamente el compuesto GSK650394 ha mostrado potencial terapéutico en este tipo de enfermedades, si bien su selectividad y sus propiedades farmacocinéticas están altamente comprometidas. Dado el interés de SGK1 como diana terapéutica en este tipo de patologías, urge la necesidad de descubrir nuevas moléculas capaces de ejercer su acción inhibitoria en el SNC.

¹²⁸ Catalogna, G.; Moraca, F.; D'Antona, L.; Dattilo, V.; Perrotti, G.; Lupia, A.; Costa, G.; Ortuso, F.; Iuliano, R.; Trapasso, F.; Amato, R.; Alcaro, S.; Perrotti, N. Review about the Multi-Target Profile of Resveratrol and Its Implication in the SGK1 Inhibition. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *183*, 111675.

¹²⁹ Zhang, S.; Wang, Y.; Yu, M.; Shang, Y.; Chang, Y.; Zhao, H.; Kang, Y.; Zhao, L.; Xu, L.; Zhao, X.; Difrancesco, D.; Baruscotti, M.; Wang, Y. Discovery of Herbacetin as a Novel SGK1 Inhibitor to Alleviate Myocardial Hypertrophy. *Adv. Sci.* **2022**, *9* (2), e2101485.

¹³⁰ Liang, X.; Lan, C.; Zhou, J.; Fu, W.; Long, X.; An, Y.; Jiao, G.; Wang, K.; Li, Y.; Xu, J.; Huang, Q.; Xu, B.; Xiao, J. Development of a New Analog of SGK1 Inhibitor and Its Evaluation as a Therapeutic Molecule of Colorectal Cancer. *J. Cancer* **2017**, *8* (12), 2256–2262.

¹³¹ Jang, H.; Park, Y.; Jang, J. Serum and Glucocorticoid-Regulated Kinase 1: Structure, Biological Functions, and Its Inhibitors. *Front. Pharmacol.* **2022**, *13*, 1036844.

¹³² Gulzar, M.; Noor, S.; Hasan, G. M.; Hassan, M. I. The Role of Serum and Glucocorticoid-Regulated Kinase 1 in Cellular Signaling: Implications for Drug Development. *Int. J. Biol. Macromol.* **2024**, *258* (P1), 128725.

OBJETIVOS

SGK1 es una quinasa involucrada en multitud de procesos patológicos relacionados con la neurodegeneración. Si bien la modulación farmacológica de la misma se ha mostrado beneficiosa en diversas patologías, su potencial frente a la neurodegeneración es un terreno aún por explorar. Además, los datos disponibles muestran cómo la gran mayoría de inhibidores actuales no han sido capaces de encontrar el equilibrio necesario entre potencia y farmacocinética para ser utilizados en contextos neuropatológicos. **Bajo esta premisa, el objetivo general de esta tesis se enmarca en el diseño, la síntesis y la evaluación biológica de nuevos inhibidores de SGK1 como potenciales fármacos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.**

En concreto, se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterización de SGK1 en modelos relacionados con diferentes enfermedades neurodegenerativas.
2. Descubrimiento de nuevos inhibidores de SGK1 capaces de ejercer su acción farmacológica en el SNC.
 - a. Diseño, síntesis y caracterización estructural de los compuestos inhibidores.
 - b. Elucidación del modo de unión de los compuestos inhibidores.
 - c. Determinación de las propiedades farmacocinéticas de los compuestos más prometedores.
3. Evaluación del potencial terapéutico de los inhibidores más prometedores frente a la neurodegeneración en diferentes modelos representativos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**CAPÍTULO 1. CARACTERIZACIÓN DE LOS
NIVELES DE SGK1 EN DIFERENTES
MODELOS REPRESENTATIVOS DE LA
NEURODEGENERACIÓN**

1. Introducción

Como se ha comentado a lo largo de la Introducción, existe poca información del papel de SGK1 en enfermedades neurodegenerativas. En consecuencia, los niveles de esta quinasa tanto en muestras humanas como en diferentes modelos neurodegenerativos es escasa. Con el objetivo de conocer el estado del arte de la caracterización de SGK1, se utilizó la base de datos Human Protein Atlas¹³³ para analizar tanto la transcripción como la expresión de esta diana de interés. Para la elección de los tejidos a estudiar, se consideraron todos aquellos que conforman el sistema nervioso. Por otro lado, dado el papel del músculo esquelético en enfermedades como la ELA, este tejido también fue incluido en la comparativa. Por último, el uso de muestras periféricas (ajenas al SNC) de pacientes como los linfocitos ha tomado relevancia en los últimos años.¹³⁴ Esto es debido a que este tipo de muestras, si bien no pertenecen al sistema nervioso, son capaces de recapitular las características moleculares de las enfermedades neurodegenerativas, lo que las posiciona como buenos modelos para estudiar estas patologías. Bajo esta premisa, se incorporó el tejido linfoide en este análisis (**Figura 18**).

La expresión de SGK1 se encontró notablemente elevada en la mayor parte del sistema nervioso, incluyendo corteza cerebral, hipocampo y cerebelo. La única excepción parece ser el núcleo caudado, donde se describe una expresión media. En el caso del músculo esquelético, se encuentra una expresión media. Por último, SGK1 se expresa con altos niveles en la mayor parte de los tejidos linfoides y en médula ósea, exceptuando las amígdalas y los ganglios linfáticos (expresión media y baja, respectivamente). Finalmente, la transcripción de esta quinasa ha sido detectada en todos los tejidos de interés. Sin embargo, merece la pena mencionar que los niveles de transcripción son relativamente bajos comparados con el conjunto de los genes caracterizados en la base de datos.

En lo relativo a diferentes contextos neuropatológicos, la caracterización de SGK1 se ha llevado a cabo en algunas muestras tanto de pacientes como de modelos animales. La transcripción de *SGK1* se ha cuantificado tanto en muestras de pacientes con EA como en modelos animales relacionados con esta enfermedad. En concreto, se ha descrito un claro

¹³³ Karlsson, M.; Zhang, C.; Méar, L.; Zhong, W.; Digre, A.; Katona, B.; Sjöstedt, E.; Butler, L.; Odeberg, J.; Dusart, P.; Edfors, F.; Oksvold, P.; von Feilitzen, K.; Zwahlen, M.; Arif, M.; Altay, O.; Li, X.; Ozcan, M.; Mardonoglu, A.; Fagerberg, L.; Mulder, J.; Luo, Y.; Ponten, F.; Uhlén, M.; Lindskog, C. A Single-Cell Type Transcriptomics Map of Human Tissues. *Sci. Adv.* **2021**, *7* (31), eabh2169.

¹³⁴ Dugger, B. N.; Harvey, D.; Beach, T. G.; Adler, C. H. Peripheral Tau as a Biomarker for Neurodegenerative Diseases: Is Life on Earth, Life on Mars? *Brain* **2022**, *145* (8), 2629–2631.

aumento en la corteza prefrontal de pacientes con EA y en los modelos de ratón Tg-Prp-TAU^{P301S} y Tg-5xFAD.¹¹⁹ Hasta donde sabemos, se desconoce el estado de los niveles de *SGK1* en el caso de pacientes con EP, si bien se ha mostrado un aumento en la transcripción en varios modelos animales.^{120,135,136} Por último, apenas existen datos hasta la fecha sobre el papel de *SGK1* en la ELA. Solo se ha descrito la transcripción de este gen en el modelo de ratón transgénico Tg-SOD1^{G93A}, donde aparece aumentada tanto en cerebro como en médula espinal.¹²⁰ En vistas a los resultados obtenidos tanto en la EA como en la EP, la caracterización de *SGK1* en esta enfermedad merece ser estudiada en detalle.

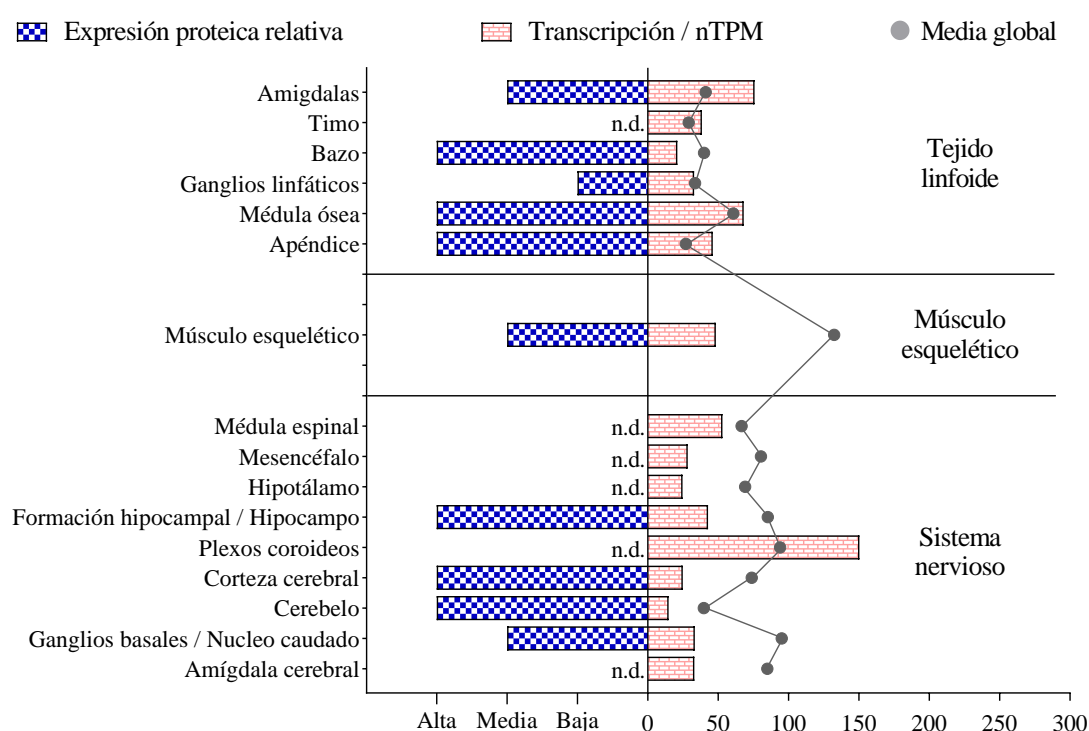


Figura 18. Expresión y transcripción de SGK1 en diferentes tejidos de interés. En azul, expresión proteica. En rojo, niveles de transcripción medidos en nTPM (número de transcripciones por millón).¹³³ En gris, la media para cada tejido del conjunto de proteínas recogidas en Human Protein Atlas. n.d., no determinado.

¹³⁵ Stichel, C. C.; Schoenebeck, B.; Foguet, M.; Siebertz, B.; Bader, V.; Zhu, X. R.; Lübbert, H. Sgk1, a Member of an RNA Cluster Associated with Cell Death in a Model of Parkinson's Disease. *Eur. J. Neurosci.* **2005**, *21* (2), 301–316.

¹³⁶ Iwata, S. I.; Nomoto, M.; Morioka, H.; Miyata, A. Gene Expression Profiling in the Midbrain of Striatal 6-Hydroxydopamine-Injected Mice. *Synapse* **2004**, *51* (4), 279–286.

Por todo lo expuesto anteriormente, este capítulo se centra en la caracterización de SGK1 en diferentes muestras representativas de enfermedades neurodegenerativas, tanto de pacientes como de animales, mediante la cuantificación de los niveles de ARNm por PCR cuantitativa (*quantitative polymerase chain reaction*, RT-qPCR). Los cDNA de las muestras de modelos animales y muestras *post mortem* de controles y pacientes fueron donados de otros proyectos de investigación. Para cada caso concreto, se indica la referencia del trabajo correspondiente. En el caso de las muestras *post mortem*, se obtuvieron del Banco de Tejidos de la Fundación CIEN. Por último, las muestras periféricas de pacientes como los linfocitos han resultado de gran utilidad en los últimos años como modelo de diferentes enfermedades. Dada su importancia, nuestro grupo de investigación ha dedicado parte de la última década a recopilar, caracterizar y estudiar una serie de linfocitos inmortalizados de diferentes donantes provenientes del Hospital Universitario 12 de Octubre, destacando pacientes diagnosticados con ELA, EA y EP.¹³⁷⁻¹³⁹ Para establecer líneas linfoblásticas inmortalizadas, los linfocitos fueron aislados a partir de muestras de sangre, tanto de pacientes como de controles, e inmortalizados mediante la infección del virus de Epstein-Barr.¹⁴⁰ Actualmente constituyen una colección privada de muestras que han servido como modelos representativos de enfermedades neurodegenerativas en este trabajo.

2. Caracterización de muestras relacionadas con TDP43-patías

La proteína TDP43 ocupa un papel central en diferentes enfermedades neurodegenerativas como la ELA o la DFT.³⁵ Por ello, resulta práctico englobar estas patologías bajo el término de TDP43-patías cuando el objetivo del trabajo recae en la elucidación del papel de esta proteína y su agregación en diferentes afecciones neurodegenerativas. En este apartado se incluyen también modelos relacionados con SOD1. Si bien no son necesariamente representativos de la patología de TDP43, pueden

¹³⁷ Posa, D.; Martínez-González, L.; Bartolomé, F.; Nagaraj, S.; Porras, G.; Martínez, A.; Martín-Requero, Á. Recapitulation of Pathological TDP-43 Features in Immortalized Lymphocytes from Sporadic ALS Patients. *Mol. Neurobiol.* **2019**, *56* (4), 2424–2432.

¹³⁸ Esteras, N.; Alquézar, C.; de la Encarnación, A.; Martín-Requero, Á. Lymphocytes in Alzheimer's Disease Pathology: Altered Signaling Pathways. *Curr. Alzheimer Res.* **2016**, *13* (4), 439–449.

¹³⁹ Esteras, N.; Alquézar, C.; Bartolomé, F.; de la Encarnación, A.; Bermejo-Pareja, F.; Molina, J. A.; Martín-Requero, Á. G1/S Cell Cycle Checkpoint Dysfunction in Lymphoblasts from Sporadic Parkinson's Disease Patients. *Mol. Neurobiol.* **2015**, *52* (1), 386–398.

¹⁴⁰ Hussain, T.; Mulherkar, R. Lymphoblastoid Cell Lines: A Continuous in Vitro Source of Cells to Study Carcinogen Sensitivity and DNA Repair. *Int. J. Mol. Cell. Med.* **2012**, *1* (2), 75–87.

encontrarse mutaciones de *SOD1* en un 20 % de los casos de ELAf, lo que los hace modelos de interés en el estudio de la ELA.²⁵

2.1. Muestras de modelos animales relacionados con TDP43-patías

Como modelos animales relacionados con la patología de TDP43, se utilizaron dos modelos de ratón transgénico: Tg-Prp-TDP43^{A315T} y Tg-CaMKII-TDP43.^{82,141} El primer modelo es capaz de sobreexpresar la proteína humana TDP43 con la mutación A315T en el sistema nervioso mediado por el promotor de la proteína priónica de ratón (Prp), tanto en cerebro como en médula espinal. Dicha mutación ha sido encontrada en algunos casos de ELAf, y el fenotipo patológico desarrollado por el ratón es principalmente motor. Por tanto, resulta un buen modelo animal para estudiar enfermedades como la ELA.¹⁴² El segundo modelo, Tg-CaMKII-TDP43, sobreexpresa de manera condicional la proteína humana TDP43 en el cerebro, concretamente en neuronas de la corteza prefrontal y el hipocampo. Este modelo es capaz de recapitular notablemente la patología de enfermedades como la DFT debido al alto deterioro cognitivo que presentan los ratones.¹⁴³ La cuantificación de los niveles de ARNm de *Sgk1* se llevó a cabo tanto en corteza cerebral como en médula espinal en ambos modelos (**Figura 19**).

En el caso del modelo Tg-Prp-TDP43^{A315T}, si bien no parece apreciarse ningún cambio significativo en la corteza motora, puede observarse una bajada de los niveles de *Sgk1* en médula espinal de los ratones transgénicos frente a los silvestres (1.004 vs. 0.7046, p-valor 0.0066). En el segundo modelo, dicha bajada solo se observa de manera significativa en la corteza prefrontal (1.130 vs. 0.8170, p-valor 0.0339).

Por otro lado, se utilizó el modelo de ratón transgénico Tg-SOD1^{G93A}.¹⁴⁴ Este animal sobreexpresa la proteína SOD1 con la mutación G93A de manera ubicua, aunque la patología se restringe principalmente a la médula espinal.¹⁴⁵ La cuantificación de la

¹⁴¹ Santos-García, I.; Rodríguez-Cueto, C.; Villegas, P.; Piscitelli, F.; Lauritano, A.; Shen, C.-K. J.; Di Marzo, V.; Fernández-Ruiz, J.; de Lago, E. Preclinical Investigation in FAAH Inhibition as a Neuroprotective Therapy for Frontotemporal Dementia Using TDP-43 Transgenic Male Mice. *J. Neuroinflammation* **2023**, *20* (1), 108.

¹⁴² Wegorzewska, I.; Bell, S.; Cairns, N. J.; Miller, T. M.; Baloh, R. H. TDP-43 Mutant Transgenic Mice Develop Features of ALS and Frontotemporal Lobar Degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106* (44), 18809–18814.

¹⁴³ Silva-Llanes, I.; Martín-Baquero, R.; Berrojo-Armisen, A.; Rodríguez-Cueto, C.; Fernández-Ruiz, J.; De Lago, E.; Lastres-Becker, I. Beneficial Effect of Dimethyl Fumarate Drug Repositioning in a Mouse Model of TDP-43-Dependent Frontotemporal Dementia. *Antioxidants* **2024**, *13* (9), 1072.

¹⁴⁴ Rodríguez-Cueto, C.; Santos-García, I.; García-Toscano, L.; Espejo-Porras, F.; Bellido, M.; Fernández-Ruiz, J.; Muñoz, E.; de Lago, E. Neuroprotective Effects of the Cannabigerol Quinone Derivative VCE-003.2 in SOD1(G93A) Transgenic Mice, an Experimental Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Biochem. Pharmacol.* **2018**, *157*, 217–226.

¹⁴⁵ Gurney, M. E.; Pu, H.; Chiu, A. Y.; Dal Canto, M. C.; Polchow, C. Y.; Alexander, D. D.; Caliendo, J.; Hentati, A.; Kwon, Y. W.; Deng, H. X. Motor Neuron Degeneration in Mice That Express a Human Cu,Zn Superoxide Dismutase Mutation. *Science* **1994**, *264* (5166), 1772–1775.

transcripción de *Sgk1* parece inalterada, al contrario que en el caso de los ratones transgénicos de TDP43 (**Figura 19**).

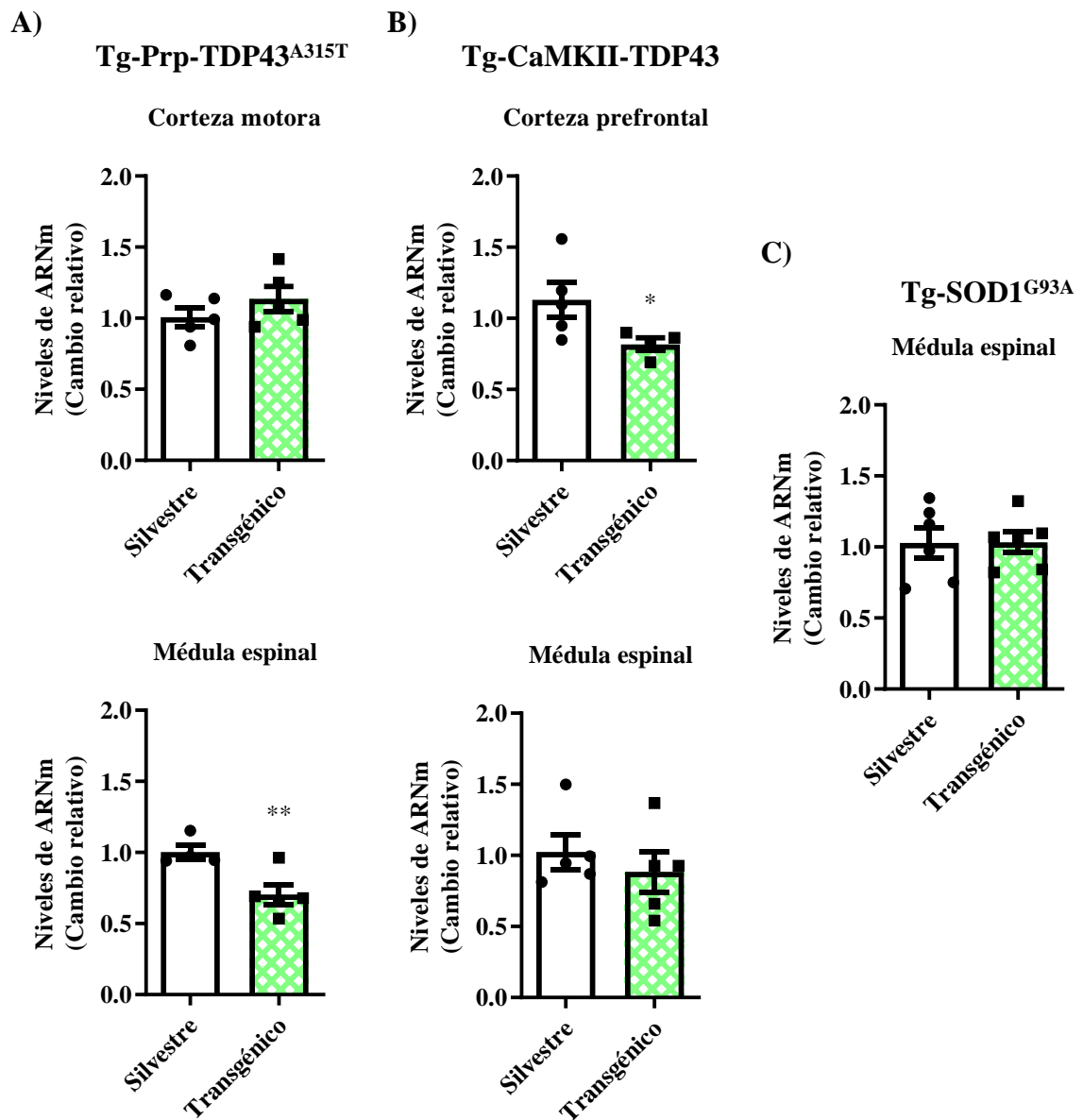


Figura 19. Niveles de *Sgk1* en las muestras de modelos animales de ELA. A) Ratón Tg-Prp-TDP43^{A315T}. Muestras de corteza motora (n = 5) y médula espinal (n = 4-5). Niveles de ARNm cuantificados por RT-qPCR y normalizados frente a *Tbp*. B) Ratón Tg-CaMKII-TDP43. Muestras de corteza prefrontal (n = 4-5) y médula espinal (n = 5). Niveles de ARNm cuantificados por RT-qPCR y normalizados frente a *Tbp*. C) Ratón Tg-SOD1^{G93A}. Muestras de médula espinal (n = 6). Niveles de ARNm cuantificados por RT-qPCR y normalizados frente a *Tbp*. Significancia estadística calculada mediante la prueba t de Student * p-valor < 0.05, ** p-valor < 0.01.

Los resultados obtenidos parecen indicar una correlación inversa entre la patología de TDP43 y la transcripción de *Sgk1*. Se aprecia una clara disminución de la quinasa solo en aquellas regiones donde la patología es predominante, esto es, la médula espinal en el

modelo Tg-Prp-TDP43^{A315T} y la corteza prefrontal en el modelo Tg-CaMKII-TDP43. Consecuentemente, los respectivos niveles de *Sgk1* en la corteza motora y la médula espinal de estos modelos permanece inalterada. Por otro lado, no se aprecian diferencias en el modelo Tg-SOD1^{G93A}. Esto contradice lo descrito en la literatura,¹²⁰ donde se afirma un aumento en la transcripción de *Sgk1* tanto en cerebro como en médula espinal (**Tabla 3**).

2.2. Muestras humanas relacionadas con TDP43-patías

Si bien los modelos animales son capaces de arrojar luz sobre las diferentes implicaciones moleculares de una diana de interés, las muestras provenientes de pacientes resultan de gran utilidad al aproximarse de manera mucho más realista a la patología de la enfermedad. En este contexto, se analizaron muestras de la corteza motora y de la médula espinal de pacientes fallecidos con ELA (**Figura 20**). Se encontró una bajada significativa en el caso de las muestras de corteza cerebral (1.025 vs. 0.7382, p-valor 0.0175). Sorprendentemente, se observa una drástica disminución de los niveles de *SGK1* en las muestras de médula espinal (1.072 vs. 0.2160, p-valor < 0.0001).

Para la caracterización de los linfoblastos, se establecieron dos categorías distintas: pacientes con mutaciones en el gen *SOD1* y pacientes categorizados como ELAe. Esta división obedece a la evidencia arrojada durante los últimos años sobre que, primero, los pacientes caracterizados con ELAf presentan alteraciones distintas a los pacientes con ELAe y, segundo, aquellos con mutaciones en el gen *SOD1* presentan vías moleculares alteradas distintas al resto de pacientes.¹⁴⁶ Prueba de ello es que el principal agregado encontrado de este tipo de pacientes es de SOD1 y no de TDP43. La cuantificación del ARNm en linfoblastos de pacientes con ELAf-SOD1 y ELAe mostró una tendencia a la disminución de los niveles de transcripción de *SGK1* en ambos casos, con una bajada especialmente llamativa en el caso de los ELAe (1.064 vs. 0.1287, p-valor 0.0144) (**Figura 20**).

De nuevo, estos resultados apuntan a que la patología de TDP43 tiende a disminuir los niveles de *SGK1*. Es bien sabido que los pacientes con ELA manifiestan una patología mucho más acusada en la médula espinal, allí donde la disminución de los niveles de *SGK1* es mayor. Además, se observa una bajada similar en los linfoblastos de pacientes con ELAe, donde la pérdida de la homeostasis de TDP43 ha sido ampliamente descrita.¹³⁷ Como en el

¹⁴⁶ Lastres-Becker, I.; Porras, G.; Arribas-Blázquez, M.; Maestro, I.; Borrego-Hernández, D.; Boya, P.; Cerdán, S.; García-Redondo, A.; Martínez, A.; Martín-Requero, Á. Molecular Alterations in Sporadic and SOD1-ALS Immortalized Lymphocytes: Towards a Personalized Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (6), 3007.

caso anterior, las muestras relacionadas con SOD1 difieren ligeramente de aquellas relacionadas con TDP43. Aunque se observa una tendencia a la disminución de los niveles de esta quinasa, este cambio no es tan drástico como en el caso de los pacientes con ELAe.

Dado que el 97 % de los pacientes con ELA y en torno al 50 % de los pacientes con DFT presentan agregados de TDP43,³⁵ estos resultados indicarían que la inhibición farmacológica de SGK1 podría no ser una estrategia adecuada para buscar nuevos tratamientos. En el caso de pacientes con ELA ligados a mutaciones en *SOD1*, si bien no se aprecia una disminución tan clara, en ningún caso se describe un aumento de esta quinasa, por lo que SGK1 tampoco sería una diana de interés desde el punto de vista farmacológico. No obstante, es de esperar que estos resultados sirvan como punto de apoyo para elucidar la relación entre SGK1 y las TDP43-patías, un ámbito que ha sido poco explorado y que podría desvelar nuevos mecanismos moleculares característicos de estas enfermedades.

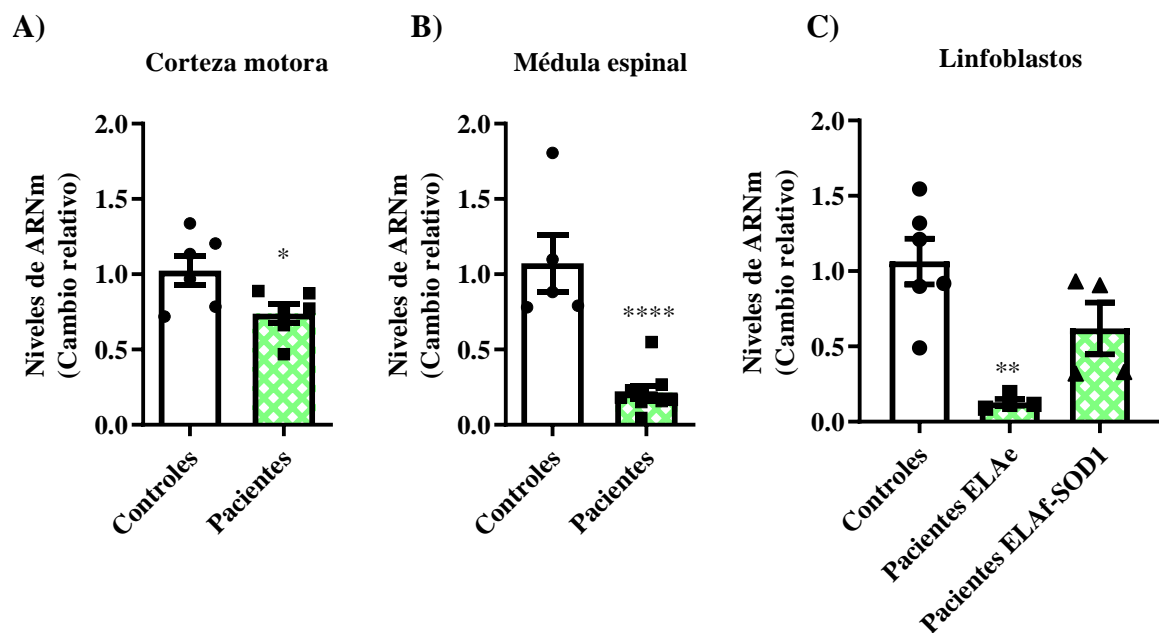


Figura 20. Niveles de SGK1 en muestras de pacientes con ELA. A) Muestras de corteza motora. Niveles de ARNm cuantificados por RT-qPCR con niveles y normalizados frente a *GAPDH*. n = 6. B) Muestras de médula espinal. Niveles de ARNm cuantificados por RT-qPCR y normalizados frente a *GAPDH*. n = 5-10. C) Linfoblastos de pacientes con ELAe y ELAf-SOD1. Niveles de ARNm cuantificados por RT-qPCR y normalizados frente a *GAPDH*. n = 4-6. Significancia estadística calculada mediante la prueba t de Student (A y B) o ANOVA con corrección *post-hoc* de Dunnett (C). * p-valor < 0.05, ** p-valor < 0.01, **** p-valor < 0.0001.

3. Caracterización de muestras relacionadas con tauopatías

De manera similar al caso anterior, el término tauopatías engloba un conjunto de enfermedades donde la función de la proteína tau se encuentra alterada y, en consecuencia, formando agregados patológicos. Como se comentó anteriormente, dentro de este término pueden encontrarse enfermedades como la EA o la PSP.

3.1. Muestras de modelos animales relacionados con tauopatías

En este contexto, se utilizaron dos modelos de ratón. El modelo AAV-TAU^{P301L} se caracteriza por la sobreexpresión de la proteína humana tau con la mutación P301L.¹⁴⁷ Dado que la administración del vector viral se realiza de manera estereotáxica en el hipocampo, únicamente un hemisferio hipocampal (ipsilateral) presenta la sobreexpresión de tau, mientras que el otro hemisferio (contralateral) permanece intacto.¹⁴⁷ A los 6 meses, el ratón desarrolla ovillos neurofibrilares, gliosis y alteraciones comportamentales sin presentar pérdida neuronal, por lo que puede considerarse un modelo de la enfermedad en estadio temprano. El segundo modelo, Tg-Prp-TAU^{P301S} o PS19, es un ratón transgénico que sobreexpresa la proteína humana tau con la mutación P301S mediada por el promotor de la Prp.¹⁴⁸ Los ratones presentan una pérdida neuronal severa tanto en hipocampo como en corteza a los 12 meses, siendo considerado un modelo de enfermedad en estadio avanzado.¹⁴⁹

La cuantificación de los niveles de transcripción de *Sgk1* se llevó a cabo en muestras de hipocampo de ambos modelos. Si bien se aprecia un aumento ligero en el caso del modelo de ratón AAV-TAU^{P301L} (1.00 vs. 1.25, p-valor 0.0094), no se aprecian diferencias en el modelo PS19 (**Figura 21**).

Al contrario que en el caso de TDP43, la relación entre la transcripción de *Sgk1* y tau no es tan evidente. Únicamente en el caso del modelo de ratón AAV-TAU^{P301L} se aprecia un incremento significativo, aunque leve, de los niveles de *Sgk1* en el hipocampo. No obstante, otros autores han cuantificado la transcripción de *Sgk1* en el modelo PS19,

¹⁴⁷ Castro-Sánchez, S.; Zaldivar-Diez, J.; Luengo, E.; López, M. G.; Gil, C.; Martínez, A.; Lastres-Becker, I. Cognitive Enhancement, TAU Phosphorylation Reduction, and Neuronal Protection by the Treatment of an LRRK2 Inhibitor in a Tauopathy Mouse Model. *Neurobiol. Aging* **2020**, *96*, 148–154.

¹⁴⁸ Galán-Ganga, M.; Rodríguez-Cueto, C.; Merchán-Rubira, J.; Hernández, F.; Ávila, J.; Posada-Ayala, M.; Lanciego, J. L.; Luengo, E.; Lopez, M. G.; Rábano, A.; Fernández-Ruiz, J.; Lastres-Becker, I. Cannabinoid Receptor CB2 Ablation Protects against TAU Induced Neurodegeneration. *Acta Neuropathol. Commun.* **2021**, *9* (1), 90.

¹⁴⁹ Yoshiyama, Y.; Higuchi, M.; Zhang, B.; Huang, S. M.; Iwata, N.; Saido, T. C. C.; Maeda, J.; Suhara, T.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M. Y. Synapse Loss and Microglial Activation Precede Tangles in a P301S Tauopathy Mouse Model. *Neuron* **2007**, *53* (3), 337–351.

demostrando un claro aumento en la corteza prefrontal.¹¹⁹ Paralelamente, este aumento también ha sido encontrado en la corteza prefrontal de ratones Tg-5xFAD.¹¹⁹ Si bien los resultados obtenidos en este trabajo no muestran grandes alteraciones en el hipocampo de estos modelos, esto podría indicar diferencias en el papel de SGK1 dependientes del contexto histológico (**Tabla 3**).

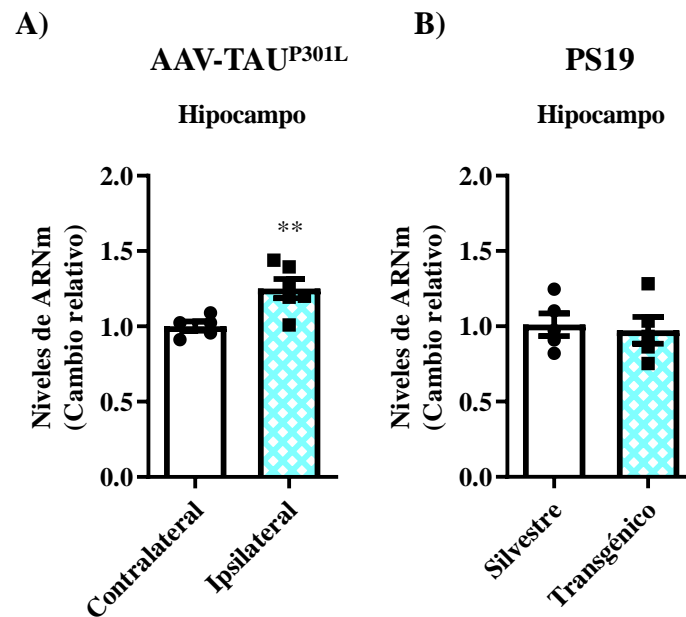


Figura 21. Niveles de *Sgk1* en muestras de modelos animales A) Hipocampo de ratones AAV-TAU^{P301L}. Niveles de ARNm cuantificados por RT-qPCR y normalizados frente a *Tbp*. n = 5-6. B) Hipocampo de ratones PS19. Niveles de ARNm cuantificados por RT-qPCR y normalizados frente a *Tbp*. n = 5. Significancia estadística calculada mediante la prueba t de Student. ** p-valor < 0.01.

3.2. Muestras humanas relacionadas con tauopatías

Continuando la caracterización de las muestras de hipocampo, se analizó los niveles de transcripción de *SGK1* en muestras de pacientes con EA y PSP. Si bien en ambos casos se observa una tendencia al alza en los pacientes, resulta complicado obtener una conclusión fiable debido a la alta variabilidad de los pacientes (**Figura 22**). De la misma manera, se utilizaron los linfoblastos de pacientes con EA, donde se encontró una tendencia al alza de dicha expresión, acompañada de nuevo por una alta variabilidad de los datos (**Figura 22**).

La alta variabilidad observada tanto en el hipocampo de pacientes como en linfoblastos puede deberse, en primer lugar, a la diversidad intrínseca que caracteriza a las muestras humanas. En segundo lugar, el bajo número de muestras hace que sea más

complicado obtener conclusiones estadísticamente significativas. No obstante, otros autores han descrito un aumento en cerebro de pacientes con EA,¹¹⁹ si bien son muestras de corteza prefrontal y no de hipocampo (**Tabla 3**).

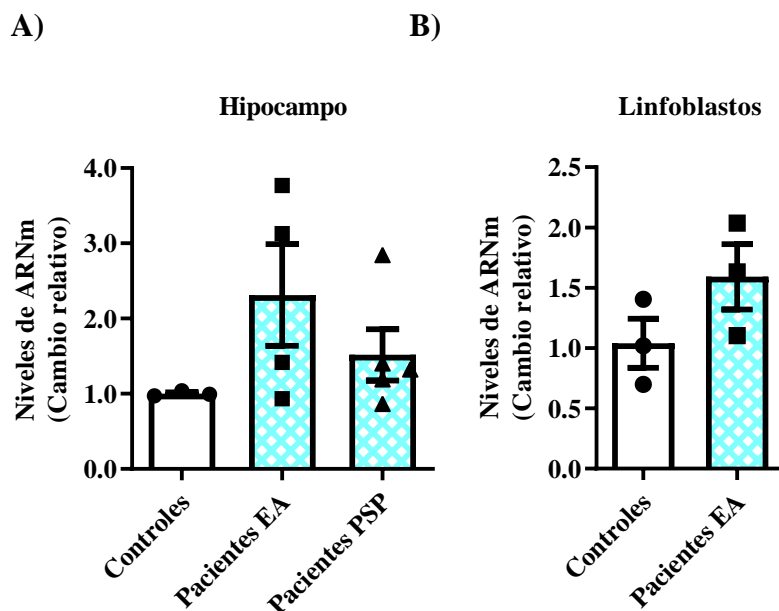


Figura 22. Niveles de *SGK1* en muestras humanas relacionadas con tauopatías. **A)** Hipocampo de pacientes con EA y PSP. Niveles de ARNm cuantificados por RT-qPCR y normalizados frente a *ACTB*. n = 3-5. **B)** Linfoblastos de pacientes con EA. Niveles de ARNm cuantificados por RT-qPCR con y normalizados frente a *RPS17*. n = 3.

4. Caracterización de muestras relacionadas con α -sinucleinopatías

Para terminar la tríada de proteinopatías comenzada con TDP43 y tau, finalmente se caracterizaron las muestras relacionadas con las patologías relacionadas con las α -sinucleinopatías. Este concepto engloba enfermedades donde se aprecia un acúmulo de agregados de α -sinucleína, como la EP.

En el momento de la realización de este trabajo, únicamente se disponía de los linfoblastos de pacientes con EP para la caracterización de esta quinasa de interés, donde se encontró un aumento significativo de los niveles de *SGK1*, acompañada de nuevo por una alta variabilidad (0.96 vs. 2.64, p-valor 0.0454) (**Figura 23**).

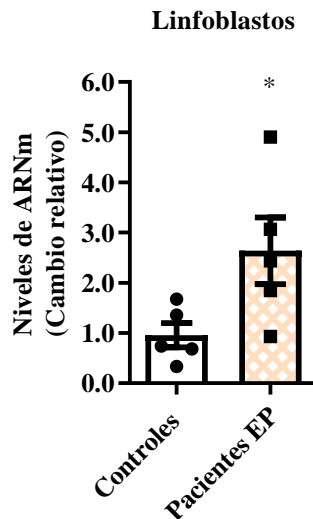


Figura 23. Niveles de SGK1 en linfoblastos de pacientes con EP. Niveles de ARNm cuantificados por RT-qPCR con niveles normalizados frente a *RPS17*. $n = 5$. Significancia estadística calculada mediante la prueba t de Student. * p-valor < 0.05.

5. Conclusiones

Durante este primer capítulo, se han caracterizado los niveles de ARNm de *SGK1* en varios modelos representativos de diferentes enfermedades neurodegenerativas. Las diferencias de cada tipo de enfermedad se reflejan en los niveles de transcripción de esta quinasa de interés: mientras que los niveles de ARNm se reducen de forma casi sistemática en todo el espectro de las TDP-43-patías, la transcripción de *SGK1* en otras patologías parece mantenerse en niveles similares a los controles o, en algunos casos, mostrar una tendencia a encontrarse elevada. Esto último está en sintonía con lo descrito por otros autores en diferentes modelos, tanto muestras humanas como modelos animales (**Tabla 3**). Merece la pena mencionar que estos datos han de interpretarse de manera cuidadosa. Aunque la caracterización de la transcripción de una quinasa es de vital importancia para comprender su función, la cuantificación de los niveles de proteína y sus modificaciones postraduccionales podría arrojar más luz sobre su papel en estas enfermedades neurodegenerativas. Por otro lado, un aumento de los niveles de una diana no implica necesariamente un papel patológico. La sobreexpresión de esta diana puede entenderse como un mecanismo de defensa del organismo, cuya inhibición podría resultar deletérea. En cualquier caso, ante estos resultados, y junto con lo descrito en la literatura, la búsqueda nuevos inhibidores de SGK1 podría resultar una estrategia de interés para enfermedades

Estos resultados están en sintonía con lo descrito en dos modelos animales: ratones tratados MPTP y ratones tratados con 6-hidroxiopamina (6-OHDA).^{135,136} En estos modelos, la transcripción de SGK1 se encontró notablemente elevada en todo el cerebro y en la sustancia negra, respectivamente (**Tabla 3**). No obstante, el uso de otro tipo de muestras y modelos animales sería necesario para establecer conclusiones más sólidas.

Capítulo 1. Caracterización de los niveles de SGK1

como la EA o la EP, mientras que no parece plausible que la inhibición de SGK1 resulte una estrategia adecuada en enfermedades como la ELA o la DFT.

Tabla 3. Resumen de la comparativa de los niveles de SGK1 en diferentes modelos representativos.

	Origen	Resultados	Literatura	Ref.	
TDP43	ELA	Humano	↓ en corteza cerebral y médula espinal de pacientes	n.d.	-
			↓ en linfoblastos de pacientes con ELAe		
	Animal	↓ en médula espinal de ratones Tg-Prp-TDP43 ^{A315T}	n.d.	-	
	DFT	Humano	n.d.	n.d.	-
		Animal	↓ en corteza prefrontal de ratones Tg-CAMKII-TDP43	n.d.	-
	ELAf-SOD1	Humano	↓ en linfoblastos de pacientes con ELAf-SOD1	n.d.	-
Animal		↓ en médula espinal de ratones Tg-SOD1 ^{G93A}	↑ en cerebro y médula espinal de ratones Tg-SOD1 ^{G93A}	120	
TAU	Humano	↑ en hipocampo de pacientes	↑ en corteza cerebral de pacientes	118	
		↑ en linfoblastos de pacientes		119	
	EA	Animal	↑ en hipocampo de ratones AAV-TAU ^{P301L}	↑ en corteza cerebral de ratones PS19	119
			Sin cambio en ratones PS19	↑ en corteza cerebral de ratones Tg-5xFAD	
	PSP	Humano	↑ en hipocampo de pacientes	n.d.	-
Animal		n.d.	n.d.		
α-sinucleína	Humano	n.d.	n.d.	-	
		↑ en linfoblastos de pacientes	n.d.	-	
	EP	Animal	n.d.	↑ en cerebro de ratones tratados con MPTP o 6-OHDA	135 136

n.d.: no determinado. Ref.: referencia.

CAPÍTULO 2. BÚSQUEDA DE NUEVOS INHIBIDORES DE SGK1

1. Antecedentes

Durante la Introducción de este trabajo (sección 5.6), se han descrito los inhibidores de SGK1 que han mostrado cierta eficacia preclínica. No obstante, la ausencia de datos sobre la farmacocinética de estos compuestos dificulta su uso como herramientas farmacológicas que alcancen el SNC. En este contexto, nuestro grupo de investigación llevó a cabo cálculos computacionales con el fin de predecir su permeabilidad cerebral mediante el programa informático SwissADME.^{114,150} Bajo este análisis, conocido como “huevo cocido”, aquellos compuestos localizados en la región amarilla del gráfico presentan propiedades aptas para atravesar la BHE. Todos los inhibidores descritos hasta la fecha del inicio de esta tesis doctoral mostraron propiedades fisicoquímicas inadecuadas para ser utilizados en contextos neurodegenerativos (**Figura 24**). En este sentido, se planteó la búsqueda de nuevos inhibidores de SGK1 que sean capaces de alcanzar el SNC.

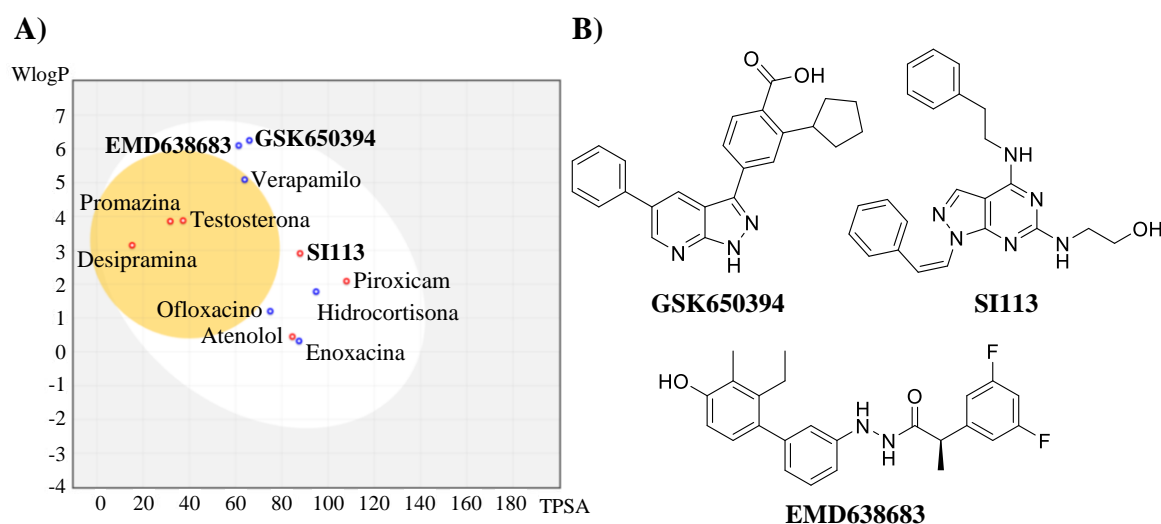


Figura 24. Análisis del huevo cocido de SwissADME. A) Inhibidores de SGK1 junto a controles positivos y negativos utilizados en la metodología PAMPA. WlogP: coeficiente de partición octanol/agua. TPSA: área de superficie polar topológica. **B)** Estructuras de los inhibidores de SGK1.

2. Las quimiotecas MBC y ECBL como fuente de moléculas tipo fármaco

En la búsqueda de moléculas bioactivas frente a una diana de interés, resulta de vital importancia el uso de quimiotecas adecuadas que maximicen las probabilidades de descubrir nuevos candidatos. En los últimos años hemos sido testigos del crecimiento

¹⁵⁰ Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V. SwissADME: A Free Web Tool to Evaluate Pharmacokinetics, Drug-Likeness and Medicinal Chemistry Friendliness of Small Molecules. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 42717.

exponencial tanto del número como del tamaño de las mismas. Si bien el espacio químico que engloba a las moléculas tipo fármaco se estima en 10^{60} entidades químicas distintas,¹⁵¹ algunas quimiotecas comerciales pueden alcanzar varios billones de compuestos, como respuesta a la necesidad de explorar este descomunal espacio. Como contraparte, la evaluación de este número de moléculas requiere el uso de herramientas computacionales que, aun reduciendo el tiempo y coste asociados, se encuentran lejos de poder utilizarse de una manera factible en términos de coste computacional. Otra alternativa, lejos de querer explorar la totalidad de este espacio químico, es el uso de quimiotecas de menor tamaño, pero compuestas por moléculas con propiedades fisicoquímicas óptimas. En este sentido, se propuso el uso de dos librerías químicas distintas para la realización de esta tesis doctoral: las quimiotecas MBC (*Medicinal and Biological Chemistry*) y ECBL (*European Chemical and Biological Library*).

La quimioteca MBC, propia del laboratorio donde se ha realizado esta tesis doctoral, recoge una colección de más de 2000 moléculas con propiedades tipo fármaco, sintetizadas durante los últimos 30 años. Es una fuente destacada de moléculas pequeñas en constante expansión, la cual ha servido como punto de partida de diferentes proyectos de química médica.¹⁵²⁻¹⁵⁴

Por otro lado, la quimioteca ECBL fue creada en 2014 (ECBL v.2014) gracias a la colaboración de cinco grupos de investigación europeos especializados en química médica, adscritos a la iniciativa EU-OPENSREEN.¹⁵⁵ Esta librería química contiene en torno a 200000 moléculas comercialmente disponibles, seleccionadas para garantizar propiedades fisicoquímicas óptimas y maximizar la exploración del espacio químico. Con el propósito

¹⁵¹ Kuan, J.; Radaeva, M.; Avenido, A.; Cherkasov, A.; Gentile, F. Keeping Pace with the Explosive Growth of Chemical Libraries with Structure-Based Virtual Screening. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* **2023**, *13*, e1678.

¹⁵² Salado, I. G.; Redondo, M.; Bello, M. L.; Perez, C.; Liachko, N. F.; Kraemer, B. C.; Miguel, L.; Lecourtois, M.; Gil, C.; Martinez, A.; Perez, D. I. Protein Kinase CK-1 Inhibitors as New Potential Drugs for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (6), 2755–2772.

¹⁵³ Rojas-Prats, E.; Martinez-Gonzalez, L.; Gonzalo-Consuegra, C.; Liachko, N. F.; Perez, C.; Ramírez, D.; Kraemer, B. C.; Martin-Requero, Á.; Perez, D. I.; Gil, C.; de Lago, E.; Martinez, A. Targeting Nuclear Protein TDP-43 by Cell Division Cycle Kinase 7 Inhibitors: A New Therapeutic Approach for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *210*, 112968.

¹⁵⁴ Garcia-Rubia, A.; Lasala, F.; Ginex, T.; Morales-Tenorio, M.; Olal, C.; Heung, M.; Oquist, P.; Galindo, I.; Cuesta-Geijo, M. Á.; Casasnovas, J. M.; Campillo, N. E.; Canales, Á.; Alonso, C.; Martínez, A.; Muñoz-Fontela, C.; Delgado, R.; Gil, C. N'-Phenylacetohydrazide Derivatives as Potent Ebola Virus Entry Inhibitors with an Improved Pharmacokinetic Profile. *J. Med. Chem.* **2023**, *66* (8), 5465–5483.

¹⁵⁵ Horvath, D.; Lisurek, M.; Rupp, B.; Kühne, R.; Specker, E.; von Kries, J.; Rognan, D.; Andersson, C. D.; Almqvist, F.; Elofsson, M.; Enqvist, P.-A.; Gustavsson, A.-L.; Remez, N.; Mestres, J.; Marcou, G.; Varnek, A.; Hibert, M.; Quintana, J.; Frank, R. Design of a General-Purpose European Compound Screening Library for EU-OPENSREEN. *ChemMedChem* **2014**, *9* (10), 2309–2326.

de crear una infraestructura de cribados de alto rendimiento para proyectos de química médica y biológica, se diseñó una nueva versión de esta colección en 2019 (ECBL v.2019), siendo el resultado de un proceso de refinamiento y optimización del conjunto inicial, terminando en una librería de más de 100000 compuestos.¹⁵⁶

Con el fin de cuantificar la idoneidad de estas quimiotecas como fuente de moléculas tipo fármaco, se realizó un análisis quimioinformático de sus propiedades fisicoquímicas y farmacéuticas para evaluar su potencial como fuentes de moléculas tipo fármaco.

2.1. Análisis de las propiedades fisicoquímicas y farmacéuticas de la MBC y ECBL

Existen diferentes metodologías para examinar las propiedades de un candidato a fármaco. Una aproximación clásica es la regla de 5 de Lipinski (R5L).¹⁵⁷ Esta regla empírica determina que, para que un compuesto pueda ser administrado vía oral, no debe incumplir más de 1 de las 5 métricas de dicha regla (Parte experimental, **Tabla S5**). Por otro lado, la regla de 3 de Jorgensen (R3J)¹⁵⁸ expone que aquellos compuestos que no incumplan ninguna de sus reglas resultan adecuados para ser considerados compuestos tipo *lead* (Parte experimental, **Tabla S5**). Estas métricas, junto con otros filtros como el de Veber (FV)¹⁵⁹ o Ghose (FG),¹⁶⁰ fueron utilizados en el análisis (Parte experimental, **Tabla S5**). Los parámetros necesarios para calcular estas propiedades, junto a otros como la permeabilidad al SNC ($P \log P_{C/S}$) o la predicción de la absorción oral (P AO), fueron calculados con el programa QikProp de Schrödinger (Parte experimental, **Tabla S6**).

El análisis de las propiedades mencionadas anteriormente se resume en la **Tabla 4**. Para la quimioteca MBC, el 97.3 % de los compuestos presentan una o ninguna violación

¹⁵⁶ Brennecke, P.; Rasina, D.; Aubi, O.; Herzog, K.; Landskron, J.; Cautain, B.; Vicente, F.; Quintana, J.; Mestres, J.; Stechmann, B.; Ellinger, B.; Brea, J.; Kolanowski, J. L.; Pilarski, R.; Orzaez, M.; Pineda-Lucena, A.; Laraia, L.; Nami, F.; Zielenkiewicz, P.; Paruch, K.; Hansen, E.; von Kries, J. P.; Neuenschwander, M.; Specker, E.; Bartunek, P.; Simova, S.; Leśnikowski, Z.; Krauss, S.; Lehtiö, L.; Bilitewski, U.; Brönstrup, M.; Taskén, K.; Jirgensons, A.; Lickert, H.; Clausen, M. H.; Andersen, J. H.; Vicent, M. J.; Genilloud, O.; Martinez, A.; Nazaré, M.; Fecke, W.; Gribbon, P. EU-OPENSREEN: A Novel Collaborative Approach to Facilitate Chemical Biology. *SLAS Discov.* **2019**, *24* (3), 398–413.

¹⁵⁷ Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, *46* (1–3), 3–26.

¹⁵⁸ Jorgensen, W. L. Efficient Drug Lead Discovery and Optimization. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42* (6), 724–733.

¹⁵⁹ Veber, D. F.; Johnson, S. R.; Cheng, H.-Y.; Smith, B. R.; Ward, K. W.; Kopple, K. D. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *J. Med. Chem.* **2002**, *45* (12), 2615–2623.

¹⁶⁰ Ghose, A. K.; Viswanadhan, V. N.; Wendoloski, J. J. A Knowledge-Based Approach in Designing Combinatorial or Medicinal Chemistry Libraries for Drug Discovery. 1. A Qualitative and Quantitative Characterization of Known Drug Databases. *J. Comb. Chem.* **1999**, *1* (1), 55–68.

Tabla 4. Propiedades calculadas para las diferentes quimiotecas.

	Intervalos	MBC v.2022	ECBL v.2014	ECBL v.2019
Nº de compuestos	-	2577	199341	101021
R5L	0 violaciones	85.3 %	98.8 %	98.7 %
	1 violación	12.0 %	1.0 %	1.0 %
	2 violaciones	2.3 %	0.2 %	0.2 %
	3 violaciones	0.4 %	< 0.1 %	0.1 %
	4 violaciones	0.0 %	< 0.1 %	< 0.1 %
R3J	0 violaciones	76.1 %	91.6 %	92.4 %
	1 violación	23.1 %	7.9 %	7.3 %
	2 violaciones	0.8 %	0.3 %	0.2 %
	3 violaciones	0.0 %	< 0.1 %	< 0.1 %
FG	Cumple el criterio	95.1 %	94.4 %	94.9 %
FV	Cumple el criterio	85.8 %	94.2 %	95.4 %
Peso molecular / Da	0-200	5.9 %	0.0 %	0.2 %
	201-300	34.4 %	22.2 %	21.0 %
	301-400	42.0 %	64.0 %	64.0 %
	401-500	14.4 %	13.2 %	14.1 %
	> 500	3.3 %	0.6 %	0.7 %
Enlaces rotables	0-5	79.5 %	71.8 %	66.9 %
	6-10	17.1 %	27.7 %	27.0 %
	>10	3.4 %	0.5 %	6.1 %
Nº de dadores de EH ^a	≤ 5	99.8 %	99.9 %	99.9 %
	> 5	0.2 %	0.1 %	0.1 %
Nº de aceptores de EH ^a	≤ 10	98.0 %	94.4 %	94.0 %
	> 10	2.0 %	5.6 %	6.0 %
P logP_{o/a} ^b	≤ 5	87.5 %	99.8 %	99.5 %
	> 5	12.5 %	0.2 %	0.5 %
P log(S / mol · dm⁻³) ^c	-12.0/-7.0	6.7 %	0.2 %	0.4 %
	-6.9/-3.0	82.9 %	69.6 %	67.0 %
	-2.9/2.0	10.4 %	30.2 %	32.6 %
P logP_{C/S} ^d	< -1.0	16.9 %	23.9 %	20.1 %
	-1.0/0.3	71.1 %	69.6 %	73.2 %
	> 0.3	12.0 %	6.5 %	6.7 %
P AO ^e	0-50 %	2.1 %	1.1 %	0.7 %
	51-75 %	8.5 %	15.0 %	12.5 %
	76-100 %	89.4 %	83.9 %	86.8 %

^a Enlace de hidrógeno. ^b Predicción del coeficiente de reparto octanol/agua. ^c Solubilidad acuosa. ^d Predicción del coeficiente de reparto cerebro/sangre. ^e Porcentaje de absorción oral.

de la R5L. De la misma manera, el 76.1 % de las moléculas cumplen con R3J, con porcentajes superiores en los FG (95.1 %) y FV (85.5 %). Por otra parte, el 96.7 % de las moléculas tienen un peso molecular inferior a 500 Da, una característica comúnmente aceptada como parte del espacio químico de los compuestos tipo fármaco. En cuanto a la capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica (BHE), el 71.1 % de las moléculas se

encuentran dentro del rango recomendado de $P \log P_{c/s}$ (-1.0/0.3).^{161,162} Esta propiedad resulta especialmente relevante en proyectos de química médica destinados al desarrollo de fármacos enfocados al SNC. Además, casi la totalidad de la colección (89.4 %) muestra una buena predicción de absorción oral.

En el caso de la quimioteca ECBL, los resultados fueron igualmente favorables para las dos versiones. Para la versión de 2014, el 98.8 % y el 91.6 % de los compuestos cumplen con las reglas R5L y R3J, respectivamente, mientras que solo el 0.3 % presentan dos o más violaciones a la R5L. Menos del 1 % de los compuestos tienen un peso molecular superior a 500 Da. Además, el 94.4 % y el 94.2 % de las moléculas cumplen con los filtros FG y FV. Al igual que en la quimioteca MBC, el 69.6 % de los compuestos presentan valores de $P \log P_{c/s}$ dentro del rango recomendado, y el 83.9 % muestra una buena predicción de absorción oral.

La segunda versión de la quimioteca ECBL (ECBL v.2019) mantiene en términos generales las mismas propiedades que su predecesora. La inmensa mayoría de la colección de compuestos cumplen con las cuatro reglas utilizadas en este trabajo. Igualmente, presenta valores de peso molecular óptimos. Si bien no es una diferencia excesivamente grande, esta versión presenta mejores porcentajes en términos de absorción oral (86.8 % vs. 83.9 %) y penetrancia de la BHE (73.2 % vs. 69.6 %).

En conclusión, este análisis confirma que ambas quimiotecas representan un espacio químico excelente de moléculas tipo fármaco, lo que las posiciona como fuentes de compuestos de interés en proyectos de química médica.¹⁶³ Por lo tanto, ambas quimiotecas fueron utilizadas en el cribado virtual frente a SGK1 para la identificación de nuevos inhibidores.

3. Estrategias de cribado virtual

Existen diferentes estrategias para descubrir nuevas moléculas bioactivas. Asumiendo una diana de interés, el descubrimiento de fármacos asistido por ordenadores utiliza diferentes herramientas computacionales destinadas no solo a acelerar la búsqueda

¹⁶¹ Huang, E. T. C.; Yang, J.-S.; Liao, K. Y. K.; Tseng, W. C. W.; Lee, C. K.; Gill, M.; Compas, C.; See, S.; Tsai, F.-J. Predicting Blood-Brain Barrier Permeability of Molecules with a Large Language Model and Machine Learning. *Sci. Rep.* **2024**, *14* (1), 15844.

¹⁶² Muehlbacher, M.; Spitzer, G. M.; Liedl, K. R.; Kornhuber, J. Qualitative Prediction of Blood-Brain Barrier Permeability on a Large and Refined Dataset. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2011**, *25* (12), 1095–1106.

¹⁶³ Ginex, T.; Madruga, E.; Martinez, A.; Gil, C. MBC and ECBL Libraries: Outstanding Tools for Drug Discovery. *Front. Pharmacol.* **2023**, *14*, 1244317.

de nuevos fármacos, sino también a reducir costes y recursos asociados. En términos generales, los cribados virtuales pueden categorizarse en aquellos basados en la estructura de la diana biológica o en la estructura del ligando.

3.1. Cribados virtuales basados en la estructura de la diana

Todas las metodologías computacionales basadas en la estructura de la diana se fundamentan en el uso de su información estructural, permitiendo el diseño racional de nuevas moléculas que puedan unirse por complementariedad tanto estérica como electrostática.¹⁶⁴ La metodología más utilizada dentro de esta disciplina es el *docking* o acoplamiento molecular, donde el objetivo principal es modelar el modo de unión más probable de las moléculas cribadas. En este proceso, el primer paso consiste en generar, para cada ligando, un conjunto de conformaciones que se acoplan a la diana de interés, generalmente considerada rígida. Los sistemas diana-ligando, también llamados poses, son puntuados en un segundo paso mediante un algoritmo de puntuación o *scoring* (Figura 25). Idealmente, esta función otorga mejores puntuaciones a los ligandos más prometedores, permitiendo diferenciar inactivos de potenciales activos.

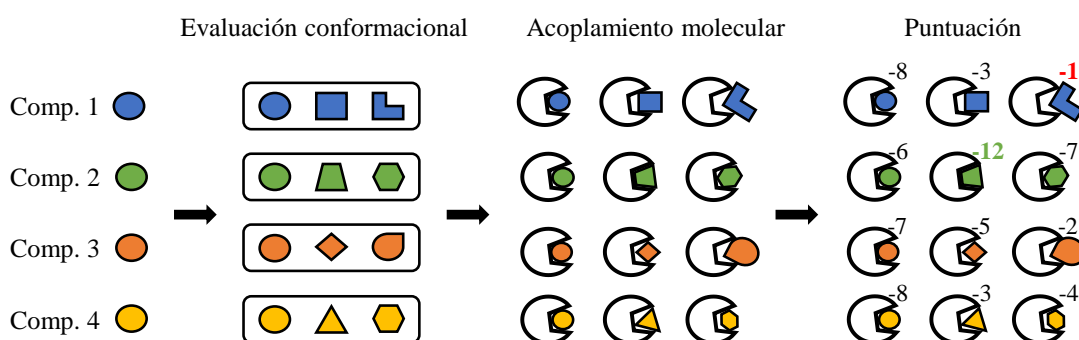


Figura 25. Representación esquemática de la metodología de *docking*. Los ligandos, considerados flexibles, se acoplan a la diana de interés, considerada rígida. Finalmente, las poses son puntuadas en función de la complementariedad diana-ligando.

Los cribados virtuales basados en el *docking* ofrecen la ventaja de no depender previamente de compuestos con actividad sobre la diana. Esto permite encontrar nuevas moléculas activas y estructuralmente novedosas. Sin embargo, es una metodología demandante en términos computacionales, sobre todo si el tamaño de la quimioteca es elevado. En línea con esto, la diana suele considerarse rígida para evitar el coste que

¹⁶⁴ Ballante, F.; Kooistra, A. J.; Kampen, S.; de Graaf, C.; Carlsson, J. Structure-Based Virtual Screening for Ligands of G Protein-Coupled Receptors: What Can Molecular Docking Do for You? *Pharmacol. Rev.* **2021**, 73 (4), 527–656.

supondría evaluar todo su espacio conformacional. Para solventar esto, se han utilizado metodologías como el acoplamiento molecular flexible (*induced-fit docking*) o la utilización de diferentes conformaciones de la diana, asumiendo implícitamente la flexibilidad de la misma.^{165,166}

3.2. Cribados virtuales basados en la estructura del ligando

Las metodologías computacionales basadas en ligando se basan en el principio de que moléculas estructuralmente parecidas tienden a mostrar propiedades también similares. Mediante el uso de la información estructural y las propiedades fisicoquímicas de compuestos activos, los compuestos más prometedores dentro de una quimioteca pueden seleccionarse en base a este principio de similitud.¹⁶⁷

Una de las metodologías más utilizadas es la codificación de las moléculas en *fingerprints* o huellas dactilares, donde cada *fingerprint* equivale a un fragmento molecular distinto. De esta manera, la molécula queda codificada en un vector de n dimensiones (siendo n el número de *fingerprints* utilizados) con valores binarios de 0 (ausencia) o 1 (presencia) del fragmento molecular (**Figura 26**).^{168,169} Posteriormente, puede calcularse la similitud de las dos moléculas en función de los valores binarios que coinciden, utilizando métricas como el coeficiente de Tanimoto o de Dire.¹⁶⁸

Otra metodología ampliamente utilizada es el uso de farmacóforos, esto es, el conjunto de características estéricas y electrónicas necesarias para asegurar la interacción óptima entre la diana y el compuesto activo.^{170,171} En este sentido, la extracción de características farmacofóricas a partir de la estructura de la molécula activa puede utilizarse como modelo sobre el cual comparar los compuestos que se desean cribar. Mediante una

¹⁶⁵ Xu, M.; Lill, M. A. Induced Fit Docking, and the Use of QM/MM Methods in Docking. *Drug Discov. Today Technol.* **2013**, *10* (3), e411–e418.

¹⁶⁶ Amaro, R. E.; Baudry, J.; Chodera, J.; Demir, Ö.; McCammon, J. A.; Miao, Y.; Smith, J. C. Ensemble Docking in Drug Discovery. *Biophys. J.* **2018**, *114* (10), 2271–2278.

¹⁶⁷ Pozzan, A. Molecular Descriptors and Methods for Ligand Based Virtual High Throughput Screening in Drug Discovery. *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12* (17), 2099–2110.

¹⁶⁸ Cereto-Massagué, A.; Ojeda, M. J.; Valls, C.; Mulero, M.; Garcia-Vallvé, S.; Pujadas, G. Molecular Fingerprint Similarity Search in Virtual Screening. *Methods* **2015**, *71*, 58–63.

¹⁶⁹ Capecchi, A.; Probst, D.; Reymond, J. L. One Molecular Fingerprint to Rule Them All: Drugs, Biomolecules, and the Metabolome. *J. Cheminform.* **2020**, *12* (1), 43.

¹⁷⁰ Giordano, D.; Biancaniello, C.; Argenio, M. A.; Facchiano, A. Drug Design by Pharmacophore and Virtual Screening Approach. *Pharmaceuticals* **2022**, *15* (5), 646.

¹⁷¹ Seidel, T.; Ibis, G.; Bendix, F.; Wolber, G. Strategies for 3D Pharmacophore-Based Virtual Screening. *Drug Discov. Today Technol.* **2010**, *7* (4), e203-70.

función de *scoring*, los compuestos que mejor encajen con este modelo obtienen un valor mayor, siendo considerados potenciales compuestos activos.

Generalmente, las estrategias basadas en ligando suelen suponer un coste computacional menor en comparación con las estrategias basadas en la estructura de la diana. Sin embargo, al contrario que en el caso anterior, requieren de compuestos con actividad biológica previamente descrita para poder construir modelos predictivos.

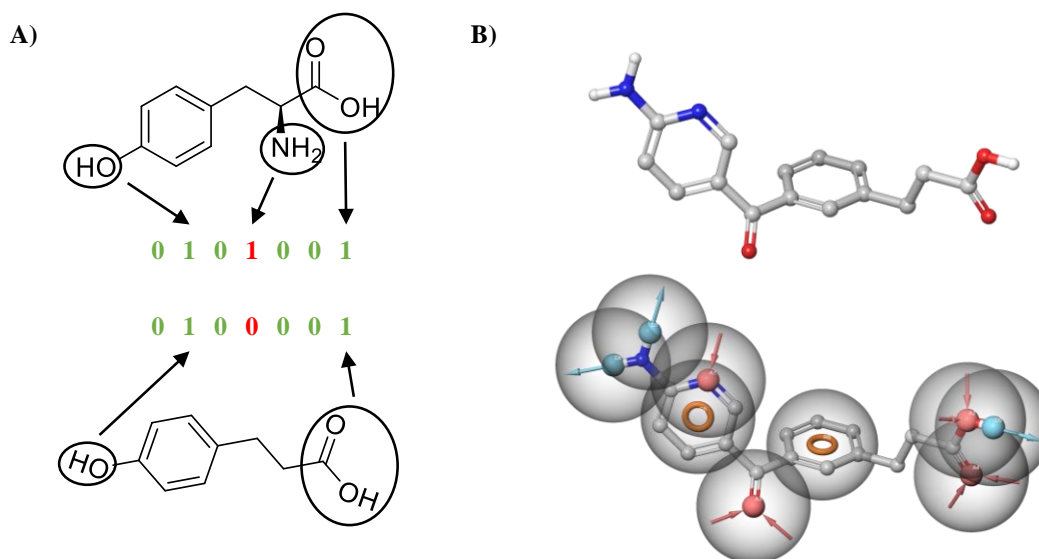


Figura 26. Estrategias de cribado virtual basado en la estructura del ligando. A) Codificación de dos moléculas en *fingerprints*. **B)** Ejemplo de extracción de características farmacofóricas de una molécula.

4. Cribado de la quimioteca MBC

Con el objetivo de buscar nuevos inhibidores de SGK1 capaces de ejercer su acción en el SNC, nuestro laboratorio realizó un cribado virtual basado en la estructura de SGK1 con la quimioteca MBC.¹¹⁴ Este cribado concluyó que los esqueletos de 7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-amina son un buen punto de partida en el diseño de nuevos inhibidores, obteniendo compuestos con una actividad en el rango micromolar frente a SGK1 y capaces de atravesar la BHE (**Figura 27**).

Con la intención de mejorar su potencia frente a SGK1 y su selectividad en relación con las dianas originales de estos compuestos, se planteó la síntesis de los derivados **a-f**, basados en la estructura 4-(feniltio)-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina. Para ello, se hizo reaccionar al 4-cloro-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina con los derivados de tiofenol vía sustitución nucleofílica aromática. Las reacciones se llevaron a cabo en presencia de

trietilamina (TEA) y bajo irradiación por microondas, obteniendo altos rendimientos en todos los casos (**Esquema 1**).

Sin embargo, la evaluación *in vitro* de esta pequeña colección de compuestos reveló que estas modificaciones estructurales desencadenaban la pérdida total de la actividad inhibitoria en SGK1 (**Esquema 1**), por lo que se abandonó esta familia de compuestos.

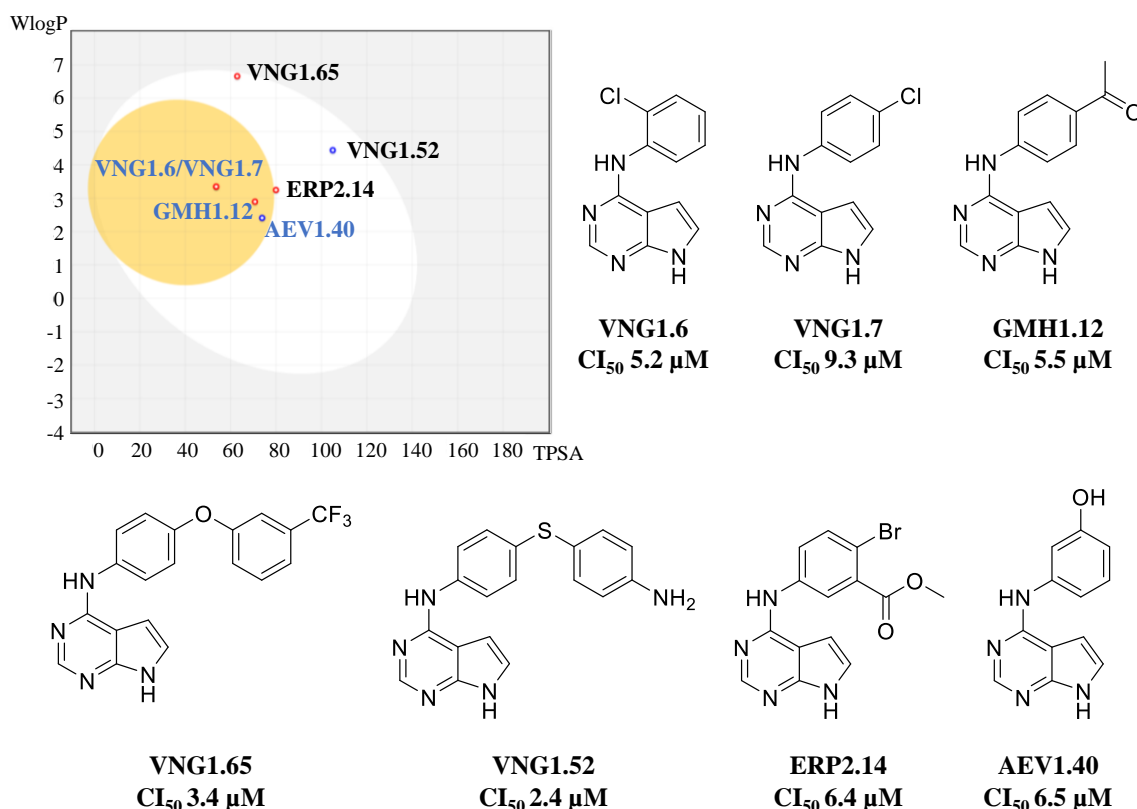
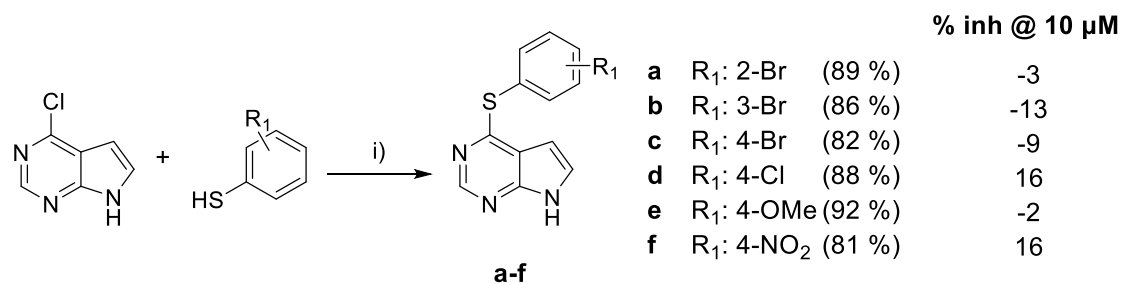


Figura 27. Análisis del huevo cocido de SwissADME de los inhibidores resultantes del cribado virtual de la quimioteca MBC. WlogP: coeficiente de partición octanol/agua. TPSA: área de superficie polar topológica. En azul, aquellas moléculas que atraviesan la BHE. Para cada estructura se indica su inhibición frente a SGK1.



Esquema 1. Síntesis de los derivados de 4-(feniltio)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (a-f). i) TEA, *i*-PrOH, 140 °C MW, 20 min. A la derecha, porcentaje de inhibición frente a SGK1 a 10 μM . Entre paréntesis se indican los rendimientos de reacción.

5. Cribado de la quimioteca ECBL

Dada la inactividad de las moléculas derivadas de pirrolopirimidina, se planteó la necesidad de explorar otro espacio químico. Para ello, se realizó un cribado virtual utilizando la quimioteca ECBL v.2014. En el momento de la realización de este trabajo, el repositorio Protein Data Bank alojaba 3 estructuras de SGK1 obtenidas por difracción de rayos X: 2R5T, 3HDM y 3HDN. Si bien todas ellas se encontraban cocrystalizadas con distintos ligandos, 2R5T aloja en su centro activo una molécula de adenilato de ácido fosfoaminofosfónico (ANP), mientras que 3HDM y 3HDN presentan inhibidores con un heterociclo central de 7-azaindol. (**Figura 28**).

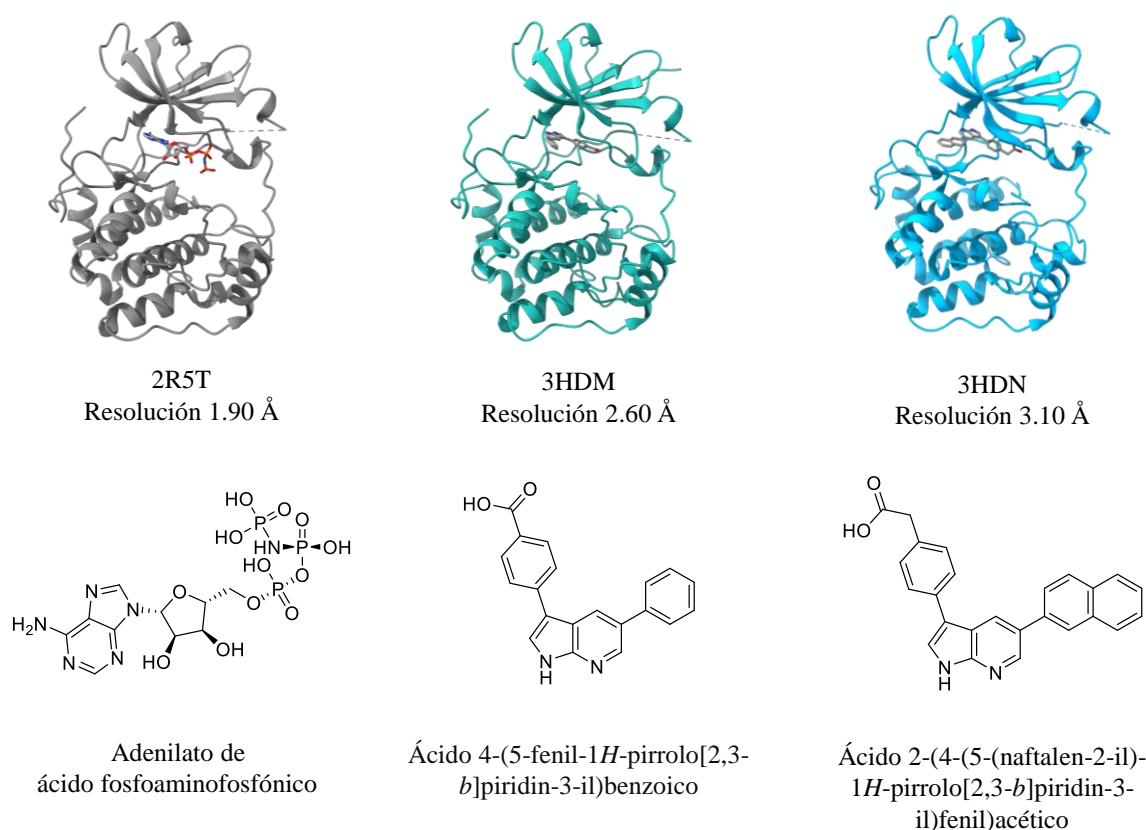


Figura 28. Estructuras cristalográficas de SGK1. Debajo de cada estructura, el ligando cocrystalizado.

Por otro lado, se recurrió a la base de datos de ZINC¹⁷² para comprobar el estado actual de los compuestos inhibidores de SGK1, encontrando un total de 99 compuestos activos frente a SGK1. Dado que se disponía de información estructural tanto de la diana

¹⁷² Irwin, J. J.; Tang, K. G.; Young, J.; Dandarchuluun, C.; Wong, B. R.; Khurelbaatar, M.; Moroz, Y. S.; Mayfield, J.; Sayle, R. A. ZINC20-A Free Ultralarge-Scale Chemical Database for Ligand Discovery. *J. Chem. Inf. Model.* **2020**, *60* (12), 6065–6073.

como de moléculas activas, se decidió aplicar una estrategia mixta que combinara toda esta información (**Figura 29**).¹⁷³

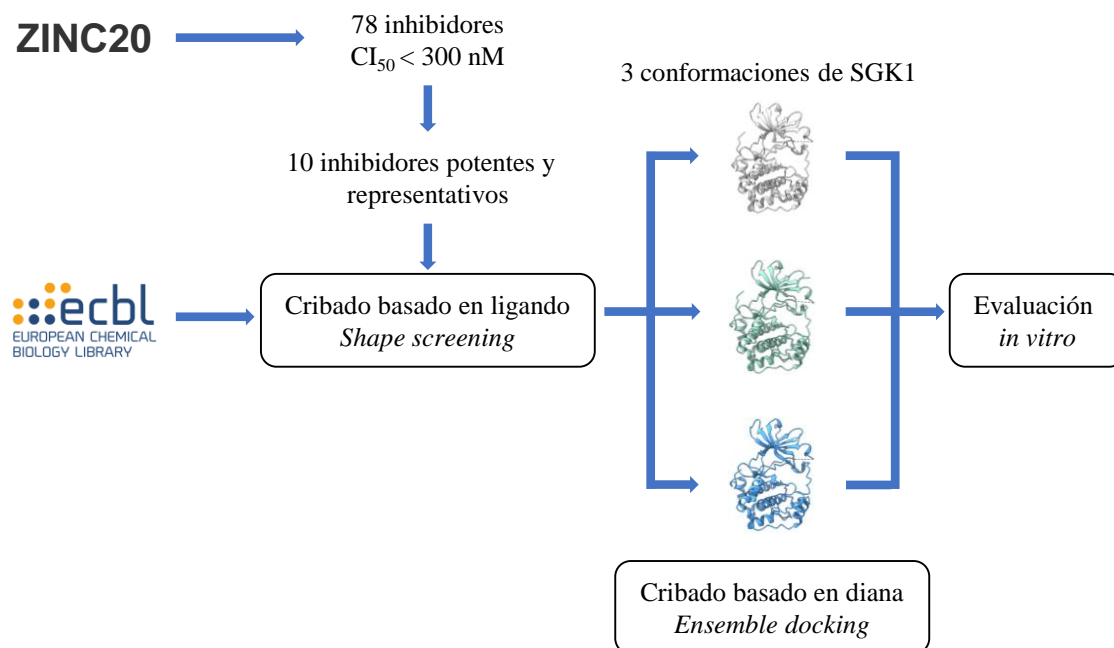


Figura 29. Cribado virtual frente a SGK1. Representación esquemática de la estrategia de cribado virtual frente a SGK1.

5.1. Cribado basado en la estructura del ligando: *shape screening*

La elección de los compuestos activos en los que diseñar el cribado basado en ligandos es un factor crítico. Los compuestos seleccionados deben ser lo más potentes posible sin, por otro lado, aportar redundancia estructural al cálculo. Por este motivo, únicamente los inhibidores con una CI₅₀ menor que 300 nM fueron considerados como compuestos de referencia, resultando en una colección de 78 compuestos. Posteriormente, se utilizó la herramienta Canvas de Schrödinger para codificar los compuestos mediante *fingerprints*.¹⁷⁴ Mediante el coeficiente de Tanimoto, los compuestos se agruparon en diez conjuntos en función de su similitud estructural, tomando el centroide de cada conjunto como la molécula más representativa. En función de su potencial modo de unión con la región bisagra, el análisis resultó en tres moléculas con el esqueleto de 1*H*-pirazolo[3,4-*b*]pirazin-3-amina, tres moléculas derivadas de 1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridina y cuatro

¹⁷³ Vázquez, J.; López, M.; Gibert, E.; Luque, F. J. Merging Ligand-Based and Structure-Based Methods in Drug Discovery: An Overview of Combined Virtual Screening Approaches. *Molecules* **2020**, 25 (20), 4723.

¹⁷⁴ Duan, J.; Dixon, S. L.; Lowrie, J. F.; Sherman, W. Analysis and Comparison of 2D Fingerprints: Insights into Database Screening Performance Using Eight Fingerprint Methods. *J. Mol. Graph. Model.* **2010**, 29 (2), 157–170.

Capítulo 2. Búsqueda de nuevos inhibidores

esqueletos diversos, entre ellos 1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidina, acetohidrazina, 2,4-diaminopiridina y 1*H*-pirazol-5-amina. (Figura 30).

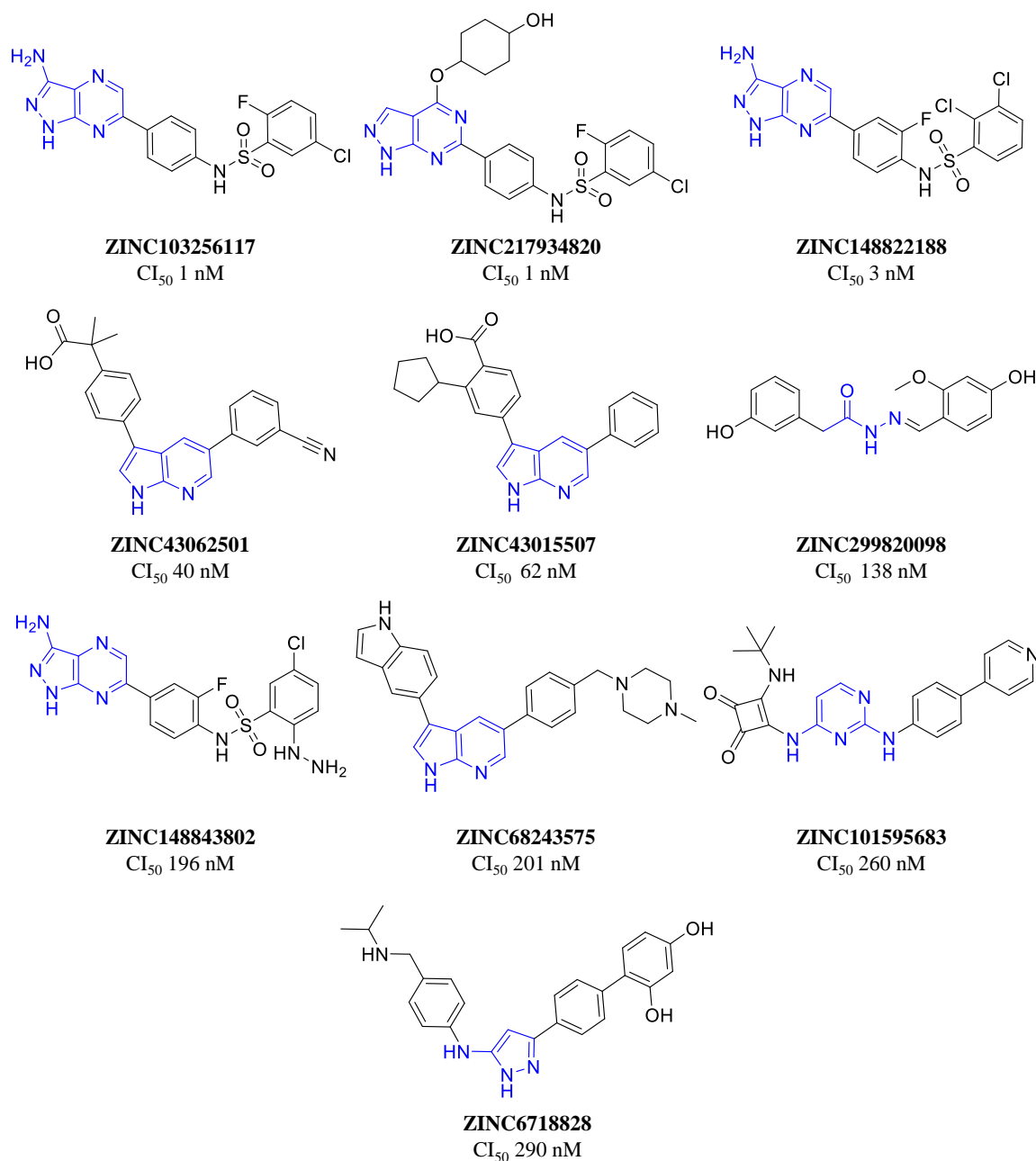


Figura 30. Centroides de los 10 conjuntos resultantes tras agrupar los inhibidores descritos de SGK1 con una CI₅₀ menor de 300 nM. En azul, esqueleto principal de la molécula.

Como estrategia de cribado, se utilizó la metodología *shape screening* del software Schrödinger.¹⁷⁵ Esta metodología de cribado superpone dos estructuras y calcula su similitud en base al volumen que ambas estructuras comparten. A mayor volumen

¹⁷⁵ Sastry, G. M.; Dixon, S. L.; Sherman, W. Rapid Shape-Based Ligand Alignment and Virtual Screening Method Based on Atom/Feature-Pair Similarities and Volume Overlap Scoring. *J. Chem. Inf. Model.* **2011**, 51 (10), 2455–2466.

compartido en la superposición, mayor se considera la similitud, obteniendo valores entre 0 (superposición nula) y 1 (superposición total). Las estructuras son representadas como esferas farmacofóricas,¹⁷⁶ concretamente como puntos de aceptor/dador de enlace de hidrógeno, regiones hidrofóbicas, anillos aromáticos y puntos de ionización positivos y negativos.¹⁷⁷ El algoritmo reconoce pares de tripletes de estas esferas con geometría similar entre las dos estructuras, utilizando aquellas superposiciones donde los tripletes coinciden mejor, utilizando el ajuste por mínimos cuadrados (**Figura 31**). Dado que se utilizaron los diez centroides como moléculas de referencia, cada molécula cribada generará diez comparaciones distintas, con sus correspondientes diez puntuaciones asociadas. Únicamente la comparación con mayor puntuación es considerada (similitud máxima) para cribar los compuestos, descartando el resto de las puntuaciones.

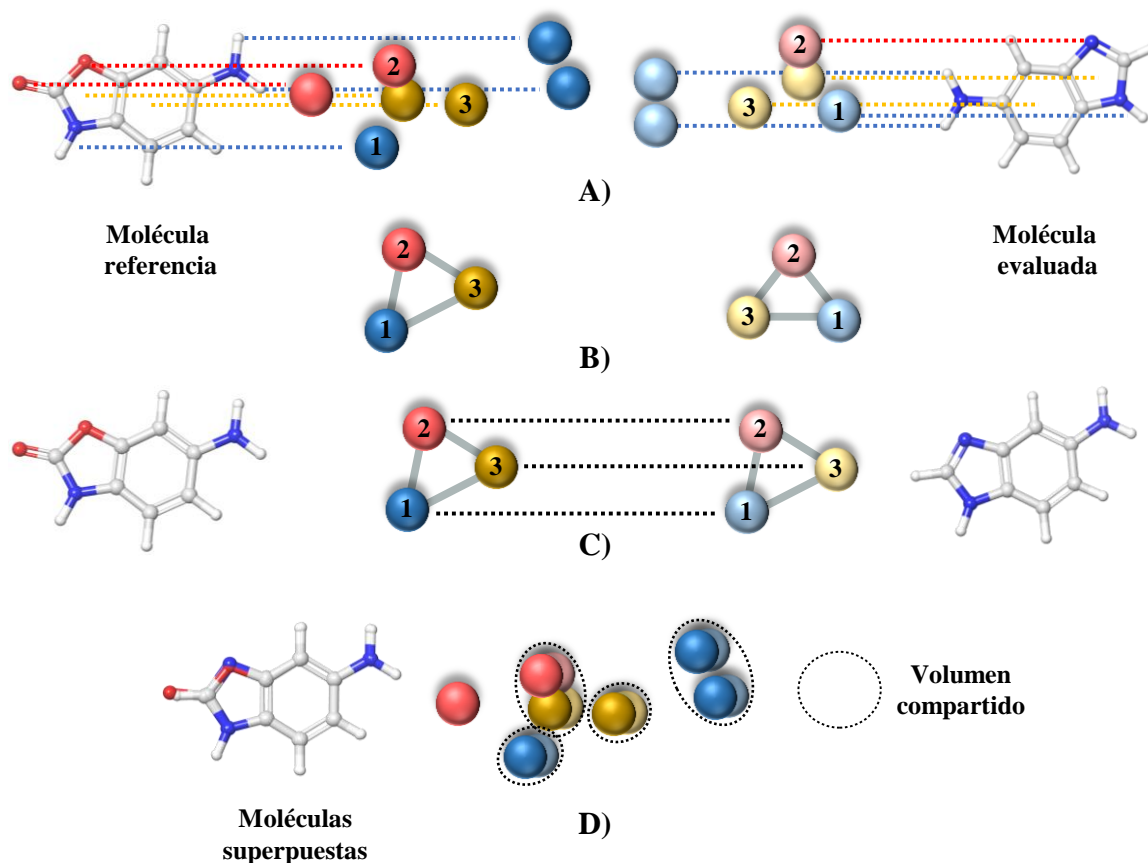


Figura 31. Metodología de *shape screening*. Dos moléculas son convertidas en esferas farmacofóricas (**A**) sobre las que se buscan tripletes farmacofóricos (**B**). Los modelos son alineados en función de estos tripletes (**C**), calculando el volumen que comparten el mismo tipo de esfera farmacofórica en ambas moléculas (**D**).

¹⁷⁶ Kirchmair, J.; Distinto, S.; Markt, P.; Schuster, D.; Spitzer, G. M.; Liedl, K. R.; Wolber, G. How to Optimize Shape-Based Virtual Screening: Choosing the Right Query and Including Chemical Information. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49* (3), 678–692.

¹⁷⁷ Dixon, S. L.; Smondyrev, A. M.; Knoll, E. H.; Rao, S. N.; Shaw, D. E.; Friesner, R. A. PHASE: A New Engine for Pharmacophore Perception, 3D QSAR Model Development, and 3D Database Screening: 1. Methodology and Preliminary Results. *J. Comput. -Aided. Mol. Des.* **2006**, *20* (10–11), 647–671.

Capítulo 2. Búsqueda de nuevos inhibidores

La quimioteca ECBL fue preparada con LigPrep,¹⁷⁸ generando para cada molécula los distintos estados de protonación y tautómeros posibles a un pH 7.4 ± 2.0 . Posteriormente, se calculó una batería de 10 conformeros para cada compuesto, los cuales fueron cribados frente a las 10 moléculas de referencia mediante *shape screening*. Se retuvieron únicamente los mejores 1500 candidatos (1325 compuestos únicos sin contar tautómeros y estados de protonación), así como sus 15000 puntuaciones asociadas (**Figura 32**).

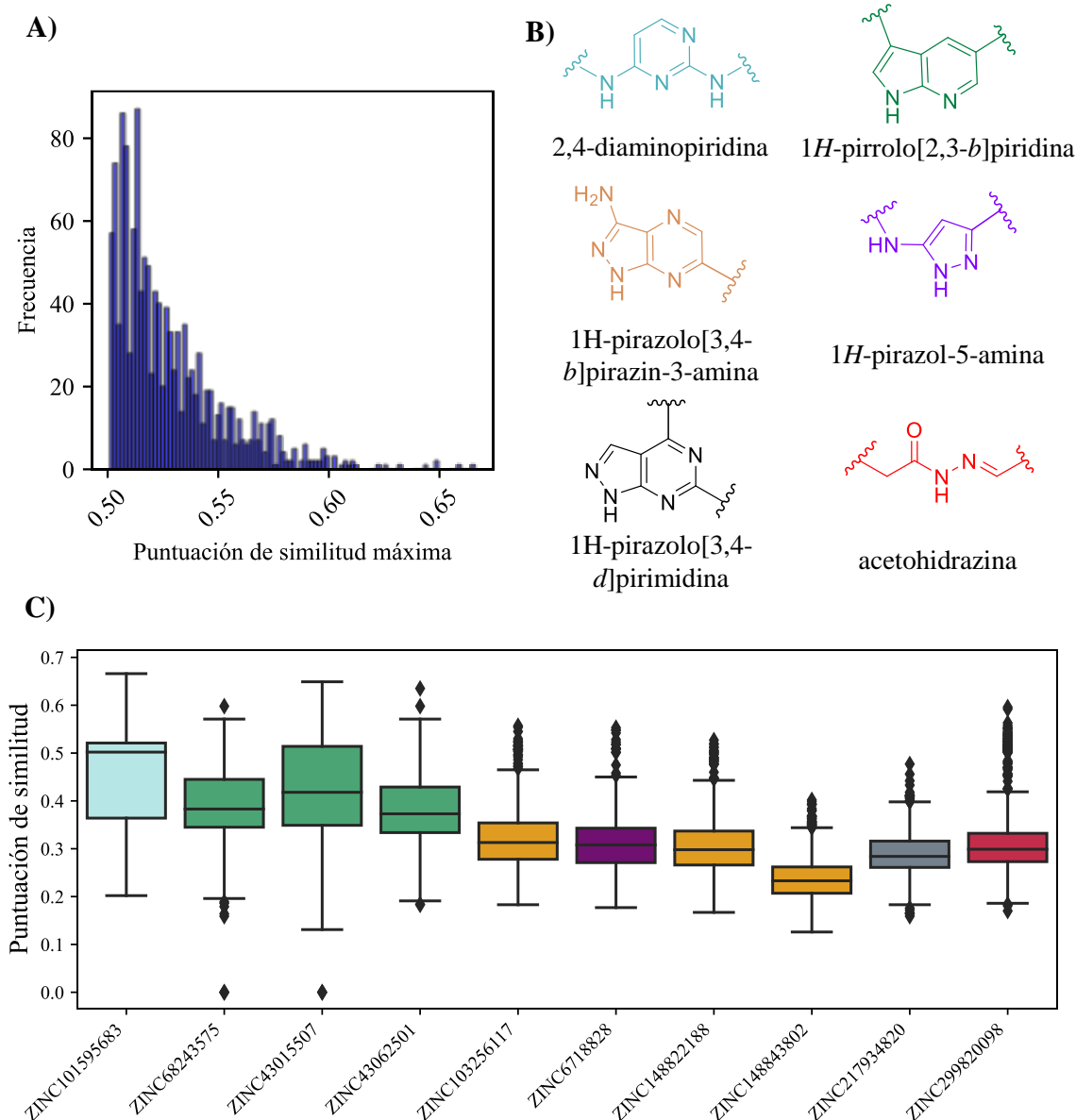


Figura 32. Resultados del cribado basado en estructura del ligando. **A)** Histograma de las puntuaciones de similitud máxima de los 1500 candidatos. **B)** Resumen de los esqueletos principales de las 10 moléculas de referencia. **C)** Diagrama de caja de la distribución de las puntuaciones de los 1500 candidatos frente a las 10 moléculas de referencia. ♦: valores atípicos.

¹⁷⁸ Schrödinger Release 2020-3: LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2020.

La similitud máxima de estos candidatos se encontró en un rango comprendido entre 0.501 y 0.666 (**Figura 32A**). Además, se analizó la distribución de las 15000 puntuaciones en función de cada molécula de referencia. Desde un punto de vista cualitativo, los candidatos seleccionados presentan una mayor semejanza con aquellas moléculas de referencia que poseen esqueletos de 2,4-diaminopiridina (ZINC101595683) y 1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridina (ZINC68243575, ZINC43015507 y ZINC43062501) (**Figura 32B, C**). Los 1500 candidatos fueron utilizados en el siguiente paso del cribado virtual.

5.2. Cribado basado en la estructura de la diana: *ensemble docking*

Como se ha comentado anteriormente, las metodologías clásicas de *docking* consideran fijas las coordenadas de la diana. Esto supone el riesgo de aumentar el número de falsos negativos debido a que la conformación escogida de la diana no es capaz de adaptarse adecuadamente a las moléculas evaluadas, situación que sí sucedería en condiciones reales. Una manera de solventar este problema es el uso de diferentes conformaciones de la diana, una técnica conocida como acoplamiento molecular múltiple o *ensemble docking*.^{166,179} En este caso, al disponer de 3 estructuras cristalográficas de SGK1, se optó por cribar los compuestos del paso anterior en todas ellas. Para ello, se cribaron con el módulo Glide de Schrödinger en precisión SP.^{180,181} El conjunto correspondiente al 50 % superior obtenido en este primer paso se volvió a cribar en cada una de las 3 estructuras cristalográficas en precisión XP, a modo de posprocesamiento.

Sin embargo, no existe una única manera de tratar los resultados provenientes del *docking* de diferentes conformaciones.^{179,182} Algunas posibilidades son calcular, para un mismo compuesto, la media aritmética o geométrica de la puntuación obtenida en todas las conformaciones, o utilizar únicamente el valor máximo de puntuación obtenido.¹⁸³ En nuestro caso, se optó por establecer como criterio que la misma molécula obtuviera una puntuación igual o superior a $-6.000 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ en los tres sistemas cribados, resultando en

¹⁷⁹ Chandak, T.; Mayginnnes, J. P.; Mayes, H.; Wong, C. F. Using Machine Learning to Improve Ensemble Docking for Drug Discovery. *Proteins* **2020**, *88* (10), 1263–1270.

¹⁸⁰ Friesner, R. A.; Banks, J. L.; Murphy, R. B.; Halgren, T. A.; Klicic, J. J.; Mainz, D. T.; Repasky, M. P.; Knoll, E. H.; Shelley, M.; Perry, J. K.; Shaw, D. E.; Francis, P.; Shenkin, P. S. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (7), 1739–1749.

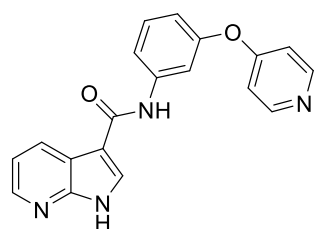
¹⁸¹ Friesner, R. A.; Murphy, R. B.; Repasky, M. P.; Frye, L. L.; Greenwood, J. R.; Halgren, T. A.; Sanschagrin, P. C.; Mainz, D. T. Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein-Ligand Complexes. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (21), 6177–6196.

¹⁸² Barril, X.; Morley, S. D. Unveiling the Full Potential of Flexible Receptor Docking Using Multiple Crystallographic Structures. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (13), 4432–4443.

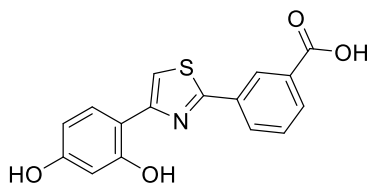
¹⁸³ Ricci-Lopez, J.; Aguila, S. A.; Gilson, M. K.; Brizuela, C. A. Improving Structure-Based Virtual Screening with Ensemble Docking and Machine Learning. *J. Chem. Inf. Model.* **2021**, *61* (11), 5362–5376.

Capítulo 2. Búsqueda de nuevos inhibidores

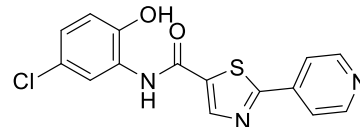
190 compuestos. Una vez superado este corte, para cada posible candidato, se consideró únicamente la pose con mejor puntuación de los tres cribados. Estos compuestos se inspeccionaron visualmente y se seleccionaron 11 candidatos para su evaluación *in vitro*. Los criterios seguidos fueron el tipo de pose, la puntuación obtenida, la formación de interacciones críticas como enlaces de hidrógeno con la región bisagra y la disponibilidad comercial de los mismos (**Figura 33**).



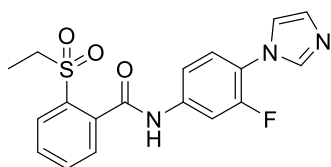
Z1183775917
-9.789 kcal/mol (3HDM)



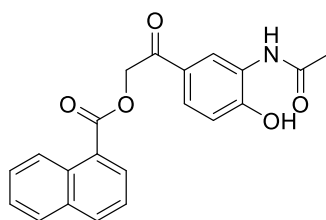
Z735542428
-8.166 kcal/mol (3HDM)



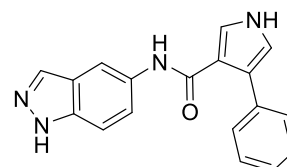
Z1280094148
-7.567 kcal/mol (2R5T)



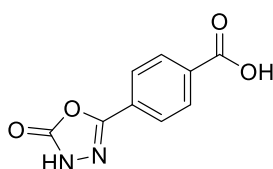
Z774949340
-7.984 kcal/mol (3HDM)



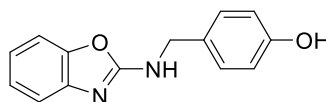
Z152570346
-8.870 kcal/mol (3HDM)



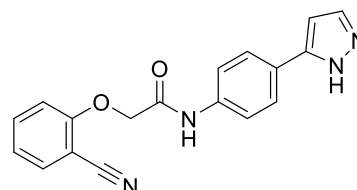
Z804448124
-10.082 kcal/mol (3HDM)



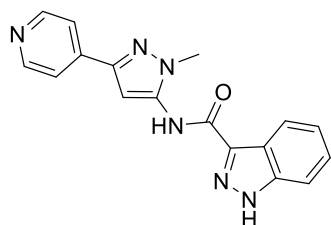
Z2732875439
-9.832 kcal/mol (3HDM)



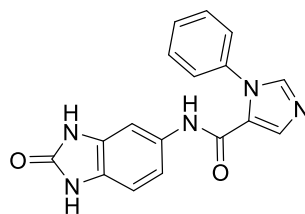
Z643744324
-8.127 kcal/mol (2R5T)



Z372120640
-9.817 kcal/mol (3HDM)



Z1274668325
-8.334 kcal/mol (3HDM)



Z64789520
-9.307 kcal/mol (3HDM)

Figura 33. Compuestos seleccionados tras el cribado virtual. Para cada compuesto, se indica la puntuación obtenida en el experimento de *docking* junto a la conformación de la proteína asociada.

5.3. Evaluación *in vitro* de los compuestos

Los compuestos más prometedores fueron evaluados *in vitro* para la caracterización de su potencial inhibición frente a SGK1 mediante la metodología Kinase-Glo. Este ensayo permite medir la actividad de la quinasa en estudio mediante la cuantificación del ATP restante en la disolución una vez se ha llevado a cabo la reacción de fosforilación. En presencia del compuesto, mayor es su actividad inhibitoria cuanto mayor sea la cantidad de ATP restante, que en presencia del sistema luciferina/luciferasa es capaz de producir luminiscencia. Dicha luminiscencia es cuantificada y traducida en actividad inhibitoria (**Figura 34**). Para optimizar y validar el ensayo, se utilizó el inhibidor comercial GSK650394, obteniendo una CI_{50} similar a la descrita en la literatura.¹²²

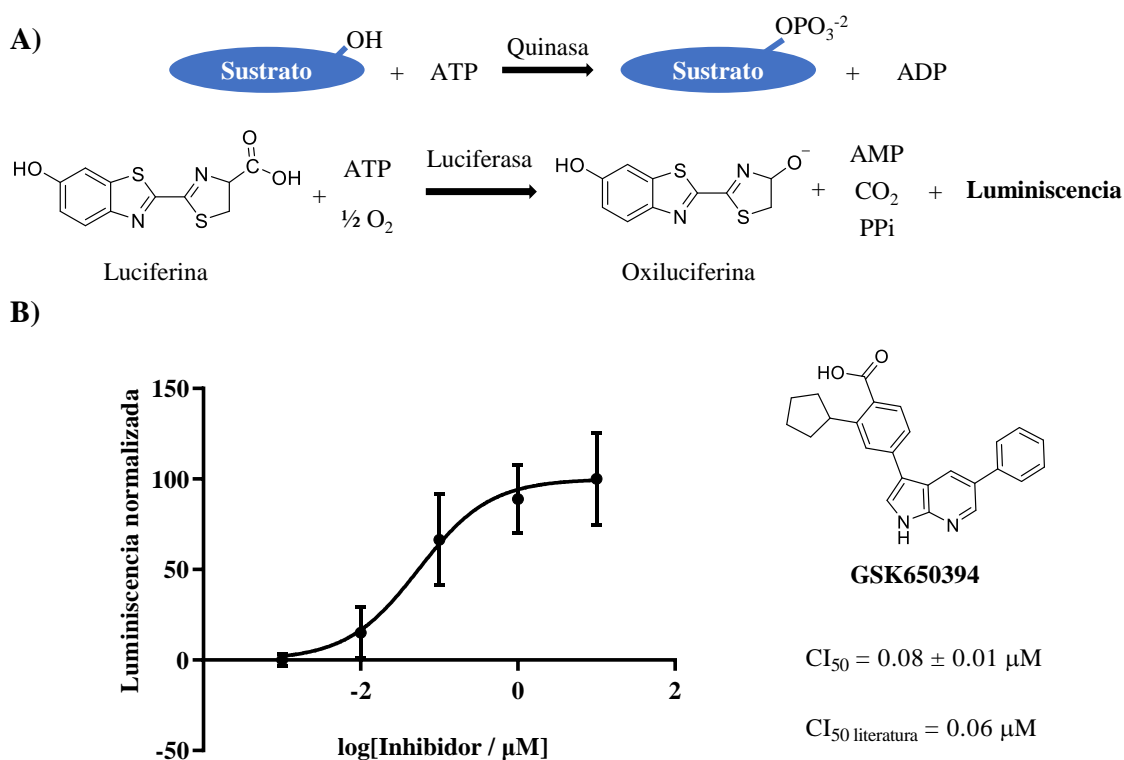


Figura 34. Metodología Kinase-Glo®. **A)** Reacción de luminiscencia generada durante el ensayo mediante el sistema luciferina/luciferasa junto al ATP restante. **B)** Curva de inhibición del inhibidor de SGK1 de referencia. CI_{50} obtenida en el experimento junto a la descrita en la literatura.¹²²

Los compuestos fueron evaluados a una concentración de $10 \mu\text{M}$, determinando su porcentaje de inhibición frente a SGK1. Aquellos compuestos con un porcentaje igual o superior al 50 % fueron seleccionados para calcular su CI_{50} . Los resultados de este experimento identificaron 3 nuevos inhibidores de SGK1 estructuralmente diversos en un rango de actividad desde el micromolar al submicromolar: Z804448124 (Hit 3, 0.63 ± 0.01

μM), Z1280094148 (Hit 1, $12.12 \pm 1.11 \mu\text{M}$) y Z152570346 (Hit 2, $7.08 \pm 3.28 \mu\text{M}$) (Tabla 5).

Tabla 5. Resultados de la evaluación *in vitro* frente a SGK1 de los compuestos más prometedores.

Compuesto	Hit	% inhibición @ 10 μM ^a	CI ₅₀ / μM ^b
Z1183775917	-	5.5	-
Z735542428	-	0.5	-
Z1280094148	1	57.7	12.12 ± 1.11
Z77494340	-	28.2	-
Z152570346	2	88.3	7.08 ± 3.28
Z804448124	3	100.0	0.63 ± 0.01
Z2732875439	-	49.1	-
Z643744324	-	37.7	-
Z372120640	-	10.9	-
Z1274668325	-	-0.6	-
Z64789520	-	38.4	-

^a Porcentaje de inhibición frente a SGK1 a 10 μM . ^b Concentración inhibitoria 50.

Por último, se calculó la permeabilidad al SNC de los *hits* encontrados mediante el diagrama de huevo cocido. Únicamente el Hit 3 mostró ser capaz de atravesar la BHE, por lo que los otros dos compuestos fueron descartados (Figura 35).

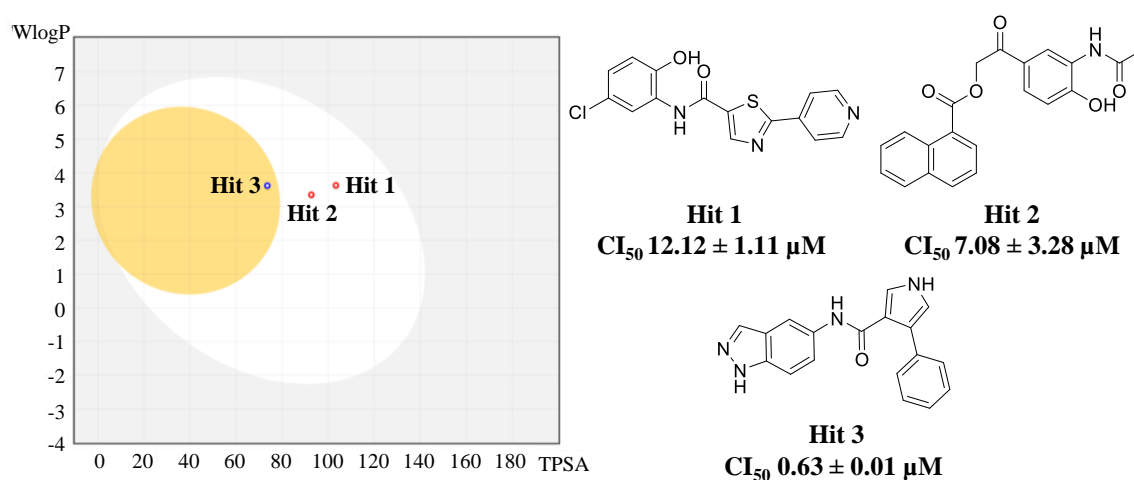


Figura 35. Análisis del huevo cocido de SwissADME de los inhibidores resultantes del cribado virtual de la quimioteca ECBL. WlogP: coeficiente de partición octanol/agua. TPSA: área de superficie polar topológica. Para cada estructura se indica su inhibición frente a SGK1.

6. Estudio del modo de unión del Hit 3

Dada la notable actividad del compuesto Hit 3 (de ahora en adelante **H3**) y su potencial interés como punto de partida de una nueva familia de inhibidores, se procedió al estudio de su modo de unión. Para ello, se realizaron simulaciones de dinámica molecular con el fin de estudiar el comportamiento del sistema a lo largo del tiempo. Las simulaciones se lanzaron por triplicado con una duración de 1 μ s por réplica (**Figura 36**). La estabilidad del compuesto, del centro activo y de la quinasa completa se evaluó mediante dos métricas: la raíz de la desviación cuadrática media (RMSD) y la raíz de la fluctuación cuadrática media (RMSF) (**Figura 36**).

El RMSD de los carbonos alfa ($C\alpha$) de la proteína se mantiene estable a lo largo de las tres réplicas, si bien pueden apreciarse inestabilidades puntuales en la primera réplica (Réplica 1: 2.95 ± 0.82 Å, Réplica 2: 2.50 ± 0.36 Å, Réplica 3: 2.68 ± 0.28 Å) (**Figura 36B**). Estas desviaciones suceden lejos del ligando, ya que el RMSD del centro activo permanece estable durante toda la simulación (Réplica 1: 2.39 ± 0.35 Å, Réplica 2: 2.23 ± 0.34 Å, Réplica 3: 2.58 ± 0.44 Å) (**Figura 36B**). Además, como puede comprobarse en el cálculo de RMSF para los $C\alpha$ de la proteína, las mayores fluctuaciones pueden asociarse a la movilidad intrínseca de dos estructuras secundarias de tipo bucle expuestas al solvente, incluyendo en este par al bucle de activación (aminoácidos 134-150, 248-264) (**Figura 36A, C**). En cuanto al compuesto **H3**, la conformación original se mantiene estable en las tres réplicas al comienzo de la simulación. Sin embargo, se adquiere una nueva conformación en las tres trayectorias en el rango de los 200-400 ns, la cual vuelve a presentar una estabilidad aceptable hasta el final de la simulación (**Figura 36B**).

El estudio de los valores de RMSF del ligando atribuye la mayor parte de la inestabilidad al anillo de fenilo, lo que podría indicar que esta nueva conformación podría estar dirigida por cambios en la disposición de este anillo (**Figura 36A, D**). Para comprobar esta hipótesis, se analizó el ángulo diedro definido por los átomos 12-14-18-19 (es decir, aquellos átomos que definen el ángulo formado entre el pirrol y el fenilo) a lo largo de las tres simulaciones (**Figura 36E**). El compuesto mantiene el ángulo de la conformación inicial durante un periodo de tiempo comprendido entre los 200 y los 400 ns. Dentro de este rango, la conformación nueva ocurre de manera simultánea con el cambio en el ángulo diedro. Bajo este análisis, se proponen dos modos de unión distintos: el primero, donde el

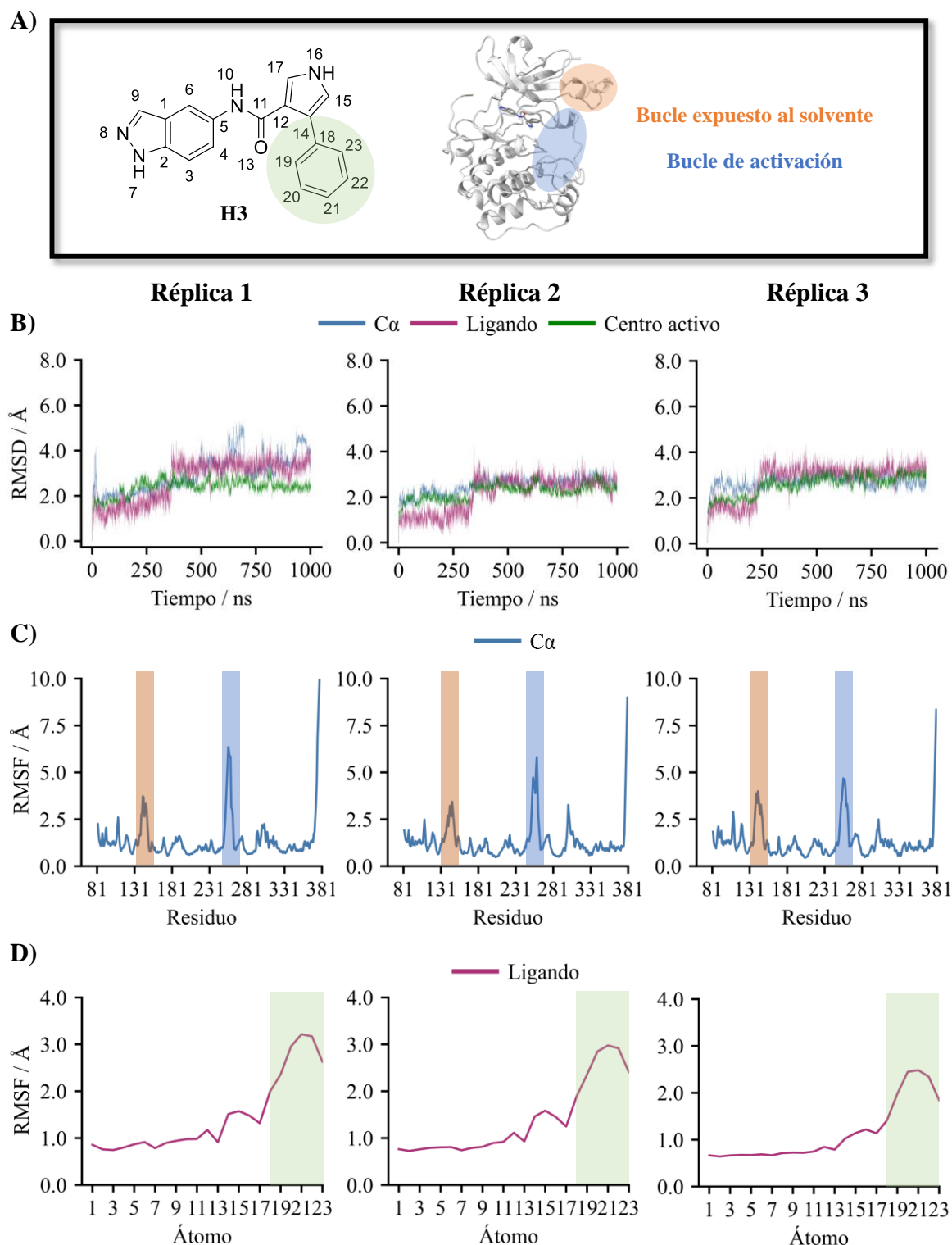


Figura 36. Estudio del modo de unión del compuesto H3. **A)** Estructura del compuesto H3 y SGK1. Resaltadas con colores las regiones más móviles durante las simulaciones. **B)** RMSD de los Ca de toda la proteína (azul), el centro activo (verde) y el ligando (rosa). **C)** RMSF de los Ca de toda la proteína. En azul y naranja sombreado, los aminoácidos correspondientes a un bucle expuesto al solvente y el bucle de activación, respectivamente. **D)** RMSF del ligando. En verde, la región correspondiente al anillo de fenilo.

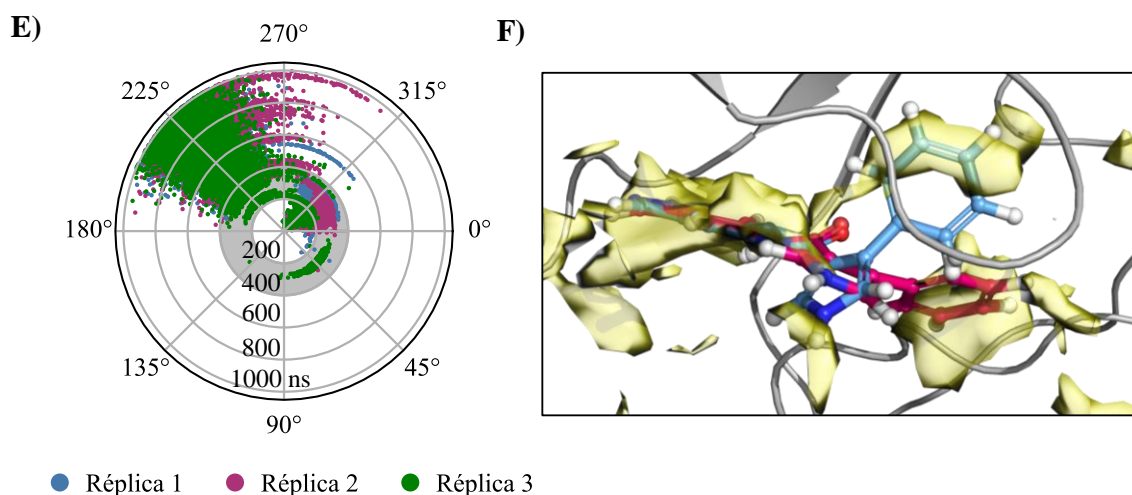


Figura 36 (continuación). Estudio del modo de unión del compuesto H3. D) Evolución del ángulo diedro de los átomos 12-14-18-19. En gris, el intervalo de tiempo en el que sucede el cambio conformacional del ligando. **F)** Disposición del ligando en las dos poses obtenidas en la simulación. Conformación Inicial (rosa) y Conformación Nueva (azul). En amarillo, zonas hidrofóbicas del centro activo.

ligando mantiene una conformación cercana a la coplanaridad, similar a los experimentos de *docking*, y el segundo, donde el anillo de fenilo rota y queda embebido en otro espacio hidrofóbico en el lóbulo N-terminal (**Figura 36F**). En vistas a elucidar qué modo de unión es el más representativo, cada trayectoria se separó en dos partes en función de la conformación del compuesto (Réplica 1: de 0 a 350 ns y de 400 a 1000 ns, Réplica 2: de 0 a 300 ns y de 400 a 1000 ns, Réplica 3: de 0 a 200 ns y de 300 a 1000 ns). Posteriormente, se concatenaron las partes correspondientes de cada réplica y se analizaron por separado (Conformación Inicial o CI y Conformación Nueva o CN).

En términos de interacciones, se cuantificó la frecuencia de las mismas mediante la herramienta *Simulation Interactions Diagram* de Schrödinger (**Figura 37**). Tanto la CI como la CN mantienen las interacciones con la región bisagra durante toda la simulación. En cuanto a las interacciones con la lisina catalítica (Lys127), la CN parece disponer del anillo de fenilo en una orientación más adecuada para formar la interacción π -catión (74 % vs. 94 %). Cabe destacar que la CI puede realizar un apilamiento de tipo T con el residuo Phe109 (41 %) que no se aprecia en la CN. La interacción de enlace de hidrógeno de este aminoácido con el carbonilo no muestra diferencias marcables (91 % vs. 91 %). En cuanto a la parte de la molécula que apunta hacia el solvente, sí pueden apreciarse algunas diferencias. En la CI, el NH del pirrol forma una interacción de enlace hidrógeno con el Glu226 (51 %), mientras que la CN muestra dos interacciones de enlace de hidrógeno con

el Glu226 (27 %) y la Asn227 (35 %). En cuanto al NH de la amida del compuesto, si bien no hay interacciones directas con la proteína, ambas conformaciones muestran puentes de hidrógeno mediados por moléculas de H₂O. Cabe destacar una mayor frecuencia de interacciones en la CN que en la CI (61 % vs. 70 %).

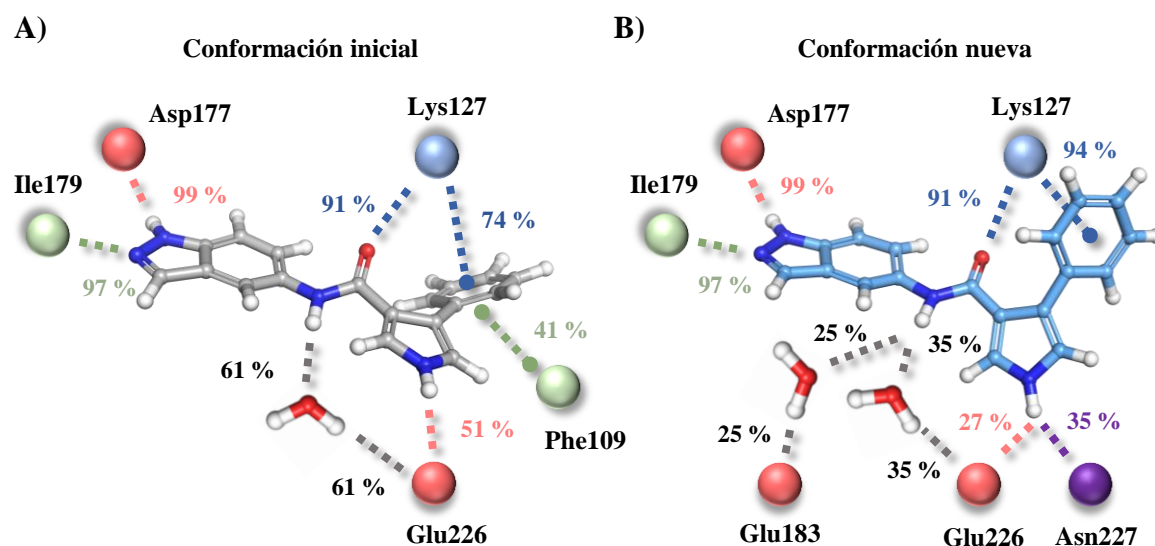


Figura 37. Modos de unión propuestos para el compuesto H3. A) Conformación inicial. B) Conformación nueva. Para cada interacción, se indica la frecuencia de aparición durante la simulación. Línea discontinua: enlace de hidrógeno, línea discontinua con punto: interacción π -catión.

Por último, se calculó la energía libre de unión (ΔG) de los dos tipos de pose. Para ello, se tomaron los fotogramas de cada una de las partes cada 10 ns y se calculó dicha energía mediante la técnica de Mecánica Molecular con el Modelo Generalizado de Born y Área de Superficie (MM-GBSA). Brevemente, esta técnica combina la mecánica molecular con un modelo de solvatación implícito para estimar la energía libre de unión entre un ligando y su diana. En el cálculo se evalúan las energías de interacción entre los átomos del ligando y del receptor, así como la energía de solvatación del sistema. La energía libre de unión se determina a partir de la diferencia entre la energía del complejo formado y las energías individuales del ligando y del receptor en su estado libre (**Tabla 6**). Bajo este análisis, la CN parece ser la más favorable desde un punto de vista energético (-47.78 vs. -53.82 kcal·mol⁻¹), donde la diferencia parece estar mediada principalmente por interacciones electrostáticas (-29.30 vs. -36.36 kcal·mol⁻¹). Destaca el hecho de que la disposición adoptada por el ligando en la CN resulta más favorable que en la CI (2.03 vs. 1.47 kcal·mol⁻¹).

Tabla 6. Cálculo de MM-GBSA de los modos de unión propuestos.

Energía / kcal·mol ⁻¹	Conformación inicial	Conformación nueva
ΔG	-47.78 ± 5.57	-53.82 ± 4.85
Coulomb	-29.30 ± 4.61	-36.36 ± 3.53
Van der Waals	-45.39 ± 3.19	-46.11 ± 3.27
Lipofílica	-13.74 ± 1.39	-11.54 ± 1.33
Enlace de hidrógeno[#]	-2.13 ± 0.31	-2.18 ± 0.29
Solv GB^a	43.86 ± 4.33	42.44 ± 2.67
Interacciones π-π[#]	-2.32 ± 1.00	-1.38 ± 0.61
Tensión conformacional del ligando	2.03 ± 0.86	1.47 ± 0.67

^a Energía de solvatación electrostática de Born generalizada. [#] Correcciones energéticas. Expresado como la media ± desviación estándar.

7. Conclusiones

En este capítulo se han caracterizado las quimiotecas MBC y ECBL como fuentes prometedoras de moléculas tipo fármaco. El uso de un cribado virtual mixto, el cual combina tanto la estructura del ligando como la de la diana farmacológica utilizando la quimioteca ECBL v.2014, ha permitido la caracterización de tres prototipos químicamente diversos, con un rango de actividad inhibitoria de SGK1 amplio, destacando el compuesto **H3** con una CI_{50} en el rango submicromolar. El estudio de su modo unión con SGK1 permitió continuar con las siguientes etapas de optimización.

CAPÍTULO 3. OPTIMIZACIÓN DEL COMPUESTO H3

1. Introducción

A raíz del cribado virtual realizado en el Capítulo 2 de este trabajo, se obtuvo el compuesto **H3** como el punto de partida en el desarrollo de una nueva familia de inhibidores de SGK1. Para ello, el estudio *in silico* del potencial modo de unión puede dirigir el diseño racional de nuevos compuestos hacia entidades química más potentes. Con los datos obtenidos en el anterior capítulo, se decidió dividir la molécula en tres partes (**Figura 38**):

1. El fragmento de indazol como estructura privilegiada de ciclos fusionados [6+5]. De manera similar a la adenina en el ATP, es capaz de realizar, por un lado, dos interacciones de enlace de hidrógeno con la región bisagra y, por otro lado, multitud de interacciones hidrofóbicas con los residuos del centro activo.
2. El fenilo, que queda embebido en una pequeña región hidrofóbica del centro activo.
3. El anillo de pirrol, que muestra interacciones de tipo enlace de hidrógeno con residuos expuestos al solvente.

Teniendo esto en cuenta, se propusieron diferentes modificaciones:

1. Diferentes ciclos fusionados [6+5] como alternativa al indazol, donde se explora la importancia de la doble interacción de enlace de hidrógeno y el NH de la amida.
2. Sustitución del anillo de fenilo por otros ciclos junto a la presencia de sustituyentes modificadores de la naturaleza del anillo.
3. Alternativas al anillo de pirrol y sustitución del NH por sustituyentes alquilo.

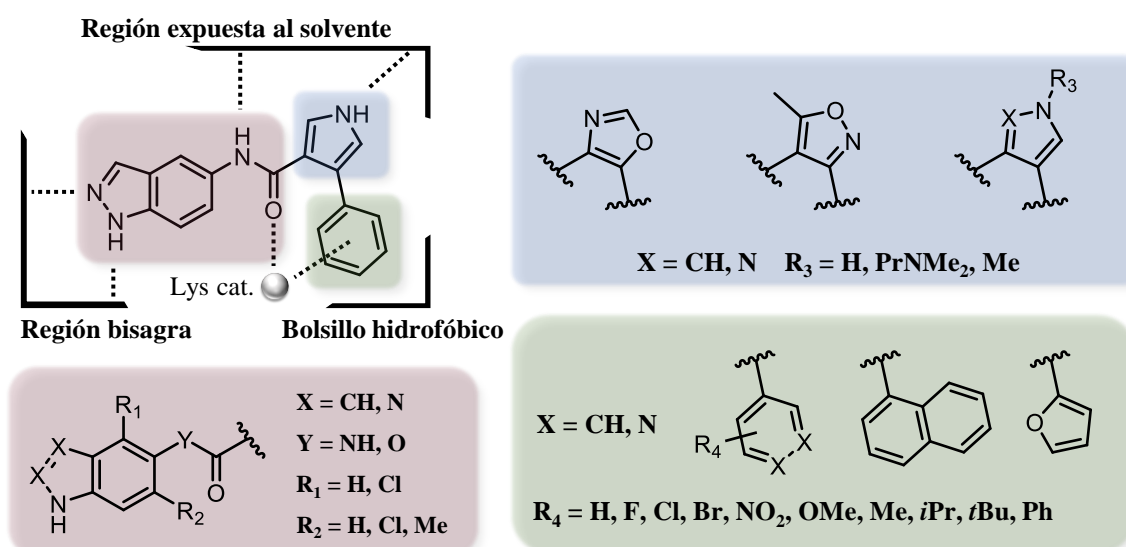
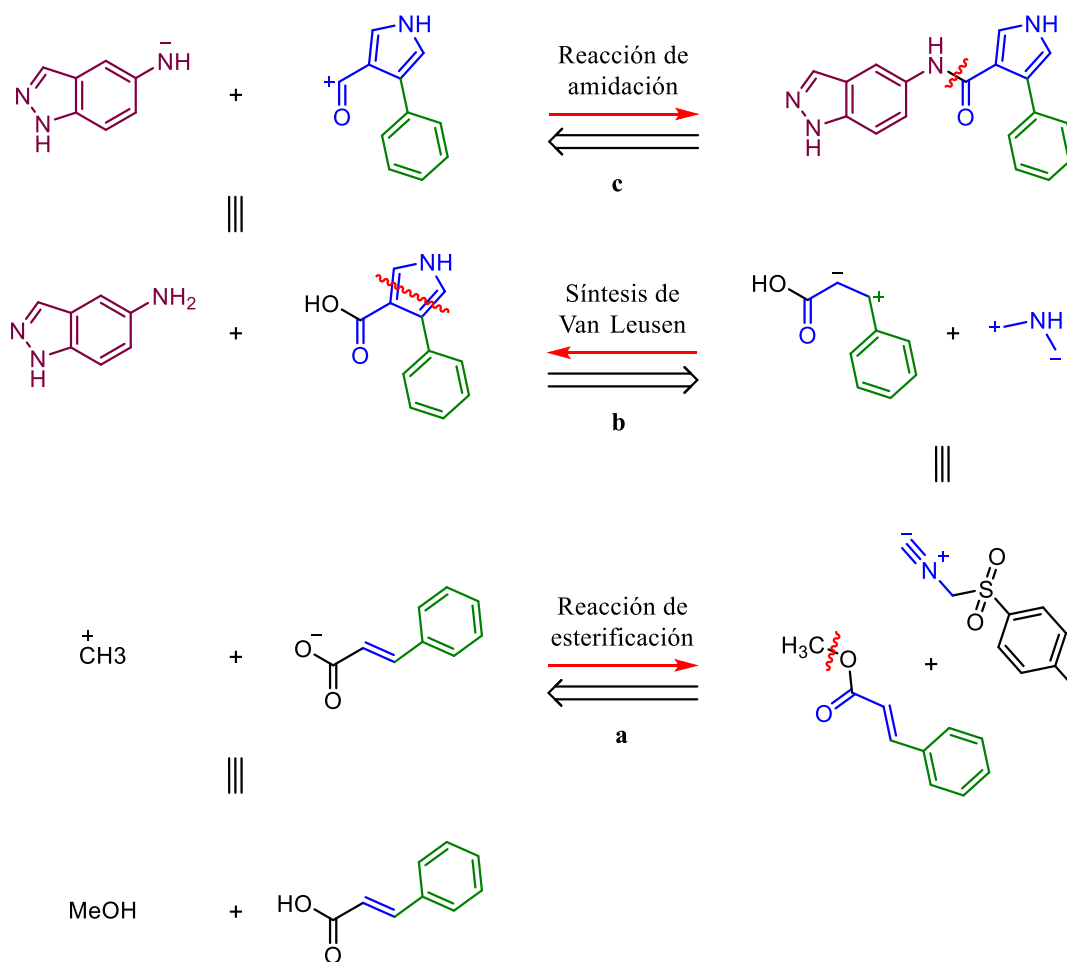


Figura 38. Resumen de las modificaciones propuestas de H3.

2. Análisis retrosintético del compuesto H3

Con el objetivo de realizar las modificaciones propuestas, se elaboró un análisis retrosintético del compuesto **H3** para identificar el proceso de síntesis más adecuado (**Esquema 2**).



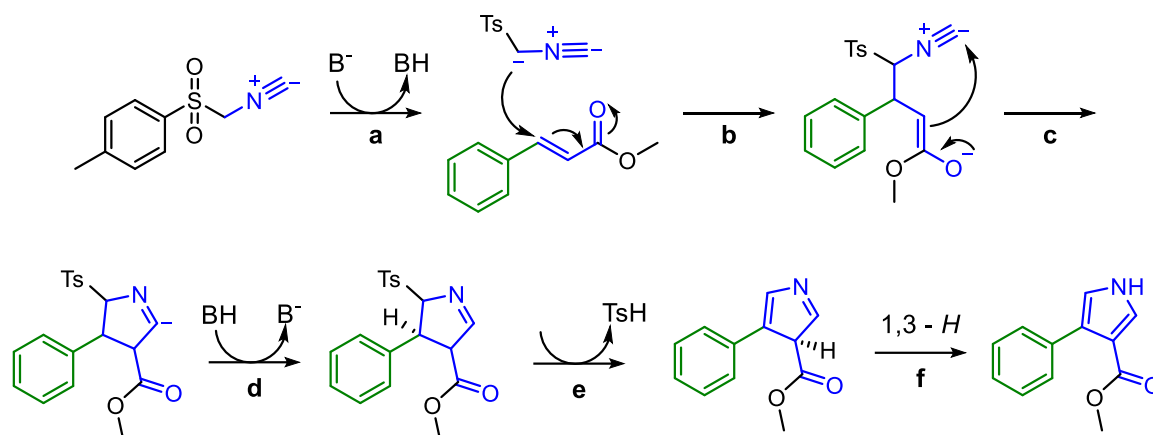
Esquema 2. Análisis retrosintético del compuesto H3.

La ruta comienza mediante la formación de ésteres derivados del ácido acrílico (**Esquema 2a**). Este paso obedece a la necesidad de proteger el grupo ácido, cuyo protón lábil impide la reacción de la olefina con el isocianuro de tosilmetil (TosMIC), también conocida como síntesis de Van Leusen (**Esquema 2b, Esquema 3**).^{184,185} El TosMIC es un equivalente sintético del sintón C-N-C capaz de reaccionar con dobles enlaces conjugados con grupos electroattractores, en presencia de una base fuerte. En las condiciones de

¹⁸⁴ Leusen, A. M. Van; Siderius, H.; Hoogenboom, B. E.; van Leusen, D. A New and Simple Synthesis of the Pyrrole Ring System from Michael Acceptors and Tosylmethylisocyanides. *Tetrahedron Lett.* **1972**, *13*, 5337–5340.

¹⁸⁵ Ma, Z.; Ma, Z.; Zhang, D. Synthesis of Multi-Substituted Pyrrole Derivatives Through [3+2] Cycloaddition with Tosylmethyl Isocyanides (TosMICs) and Electron-Deficient Compounds. *Molecules* **2018**, *23* (10), 2666.

reacción, el TosMIC se encuentra en forma de carbanión estabilizado gracias a la presencia tanto de la sulfona como del isocianuro (**Esquema 3a**). Este anión actúa como nucleófilo sobre el carbonilo α,β -insaturado, dando un intermedio tipo enolato que termina formando la ciclación del compuesto (**Esquema 3b-d**). La reacción evoluciona hacia la pérdida del grupo tosilo en forma de ácido, dando lugar al pirrol sustituido en las posiciones 3 y 4, previo reordenamiento sigmatrópico [1,3] de un hidrógeno (**Esquema 3e-f**).



Esquema 3. Síntesis de Van Leusen. Mecanismo aplicado a la síntesis del intermedio del compuesto **H3**. B: base, Ts: tosilo.

El diseño de esta síntesis permite generar una batería de ésteres pirrólicos comercialmente escasos y de elevado precio, los cuales pueden ser fácilmente derivatizados en ácidos tras una reacción de hidrólisis. Como último paso, se obtiene el producto final mediante una reacción de amidación (**Esquema 2c**). En base a este esquema general, se procedió a la síntesis de los compuestos diseñados junto con las modificaciones necesarias para cada caso particular.

3. Síntesis y evaluación de la actividad de los derivados de **H3**

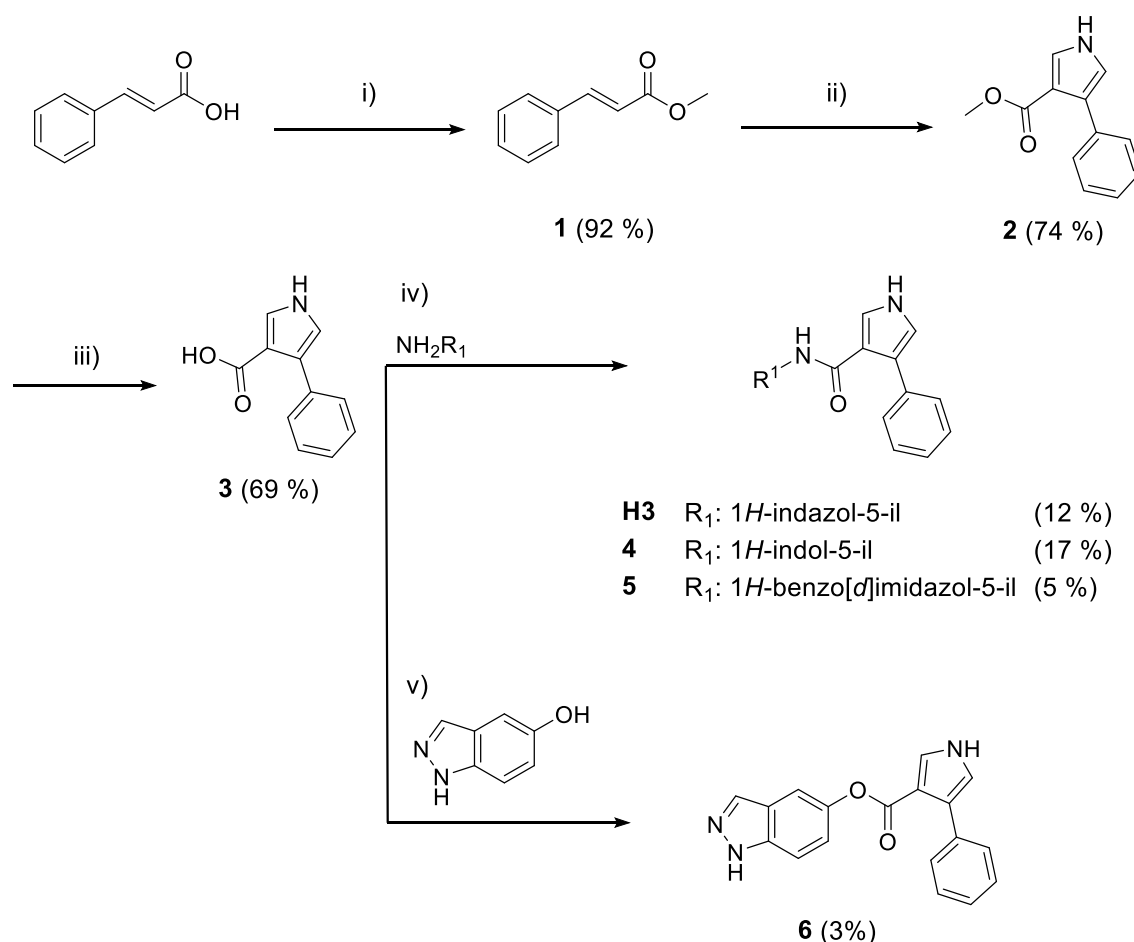
3.1. Evaluación del papel de los enlaces de hidrógeno del indazol y la amida

3.1.1. Síntesis de derivados tipo indol, benzimidazol y carboxilato

Considerando el anterior análisis, se sintetizó tanto el compuesto **H3** como derivados que presentasen heterociclos distintos al 1*H*-indazol-5-amina (**Esquema 4**). Para ello, el ácido cinámico se hizo reaccionar con cloruro de trimetilsililo (TMSCl), donde el grupo ácido es convertido en un intermedio de tipo éster de sililo que, en presencia de

Capítulo 3. Optimización del compuesto H3

MeOH, da lugar al éster metílico **1**.¹⁸⁶ Esta reacción permite la obtención de ésteres con altos rendimientos en escala multigramo. En ausencia de protones lábiles, el éster cinámico fue convertido en 4-fenil-1*H*-pirrol-3-carboxilato de metilo (**2**). Como base fuerte, se utilizó NaH desde 1 a 3 equivalentes. Se encontró que el uso de 3 equivalentes permite la conversión casi total del éster al anillo de pirrol, mejorando el rendimiento de la reacción y facilitando el aislamiento del producto. El 4-fenil-1*H*-pirrol-3-carboxilato de metilo (**2**) se sometió a condiciones básicas en una disolución a partes iguales de MeOH y H₂O, calentando a reflujo para obtener el intermedio **3** mediante precipitación en medio ácido. Dadas las altas temperaturas alcanzadas durante la reacción, parte del producto se degradó en forma de 3-fenilpirrol, lo que obligó a monitorizar la reacción cuidadosamente mediante cromatografía en capa fina (CCF).¹⁸⁵



Esquema 4. Síntesis de los derivados de indol, benzimidazol y carboxilato. i) TMSCl, MeOH, t.a., 24 h. ii) TosMIC, NaH, DMF, 0 °C a t.a., 1 h. iii) NaOH, MeOH, H₂O, reflujo, 2 h. iv) EDC, HOBT, DMAP, DIPEA, CH₃CN, t.a., 2 a 24 h. v) CDI, DMAP, CH₃CN, t.a., 48 h. Entre paréntesis se indican los rendimientos de reacción.

¹⁸⁶ Brook, M. A.; Chan, T.H. Simple Procedure for the Esterification of Carboxylic Acids. *Synthesis* **1983**, 1983 (03), 201–203.

Finalmente, el ácido **3** fue utilizado como reactivo para la formación de los productos finales. En el caso de los compuestos tipo carboxamida (**H3**, **4** y **5**), la reacción de amidación se llevó a cabo mediante el uso del hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) como activador del grupo ácido, el cual favorece el acoplamiento con la amina aromática. La reacción se llevó a cabo en condiciones básicas junto con el uso de 1-hidroxibenzotriazol (HOBT) como catalizador de la reacción, obteniendo bajos rendimientos.¹⁸⁷ En el caso del carboxilato **6**, se optó por el uso del 1,1-carbonildiimidazol (CDI) como agente de acoplamiento para la formación de ésteres.¹⁸⁸ De manera similar, el rendimiento de la reacción fue bajo.

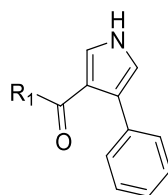
3.1.2. Evaluación de derivados tipo indol, benzimidazol y carboxilato

La evaluación de la actividad de los nuevos compuestos sintetizados (**4-6**) mostró que la sustitución del heterociclo de indazol por anillos tipo indol o benzimidazol resultan en la pérdida total de la actividad (**Tabla 7**). Bajo el modo de unión propuesto, estas sustituciones provocan la pérdida de las dos interacciones de enlace de hidrógeno con la región bisagra. Dado que estas interacciones son críticas en los inhibidores quinasa ATP-competitivos, estos datos están en consonancia con los resultados *in silico*. Por otro lado, la sustitución del grupo amida por un éster provoca una disminución de la actividad (**Tabla 7**). Si bien el NH de la amida podría estar involucrado en interacciones de tipo puente de hidrógeno, su importancia resulta menor comparada con las interacciones con la región bisagra.

¹⁸⁷ Ghosh, A. K.; Shahabi, D. Synthesis of Amide Derivatives for Electron Deficient Amines and Functionalized Carboxylic Acids Using EDC and DMAP and a Catalytic Amount of HOBT as the Coupling Reagents. *Tetrahedron Lett.* **2021**, *63*, 152719.

¹⁸⁸ Munawar, S.; Zahoor, A. F.; Hussain, S. M.; Ahmad, S.; Mansha, A.; Parveen, B.; Ali, K. G.; Irfan, A. Steglich Esterification: A Versatile Synthetic Approach toward the Synthesis of Natural Products, Their Analogues/Derivatives. *Heliyon* **2024**, *10* (1), e23416.

Tabla 7. Actividad inhibitoria frente a SGK1 de los derivados de indol, benzimidazol y carboxilato.



n°	R ₁	% inhibición @ 10 μM ^a	CI ₅₀ / μM ^b
H3		100.0	0.63 ± 0.01
4		13.7	-
5		11.7	-
6		68.4	5.25 ± 0.25

^a Porcentaje de inhibición frente a SGK1 a 10 μM. ^b Concentración inhibitoria 50.

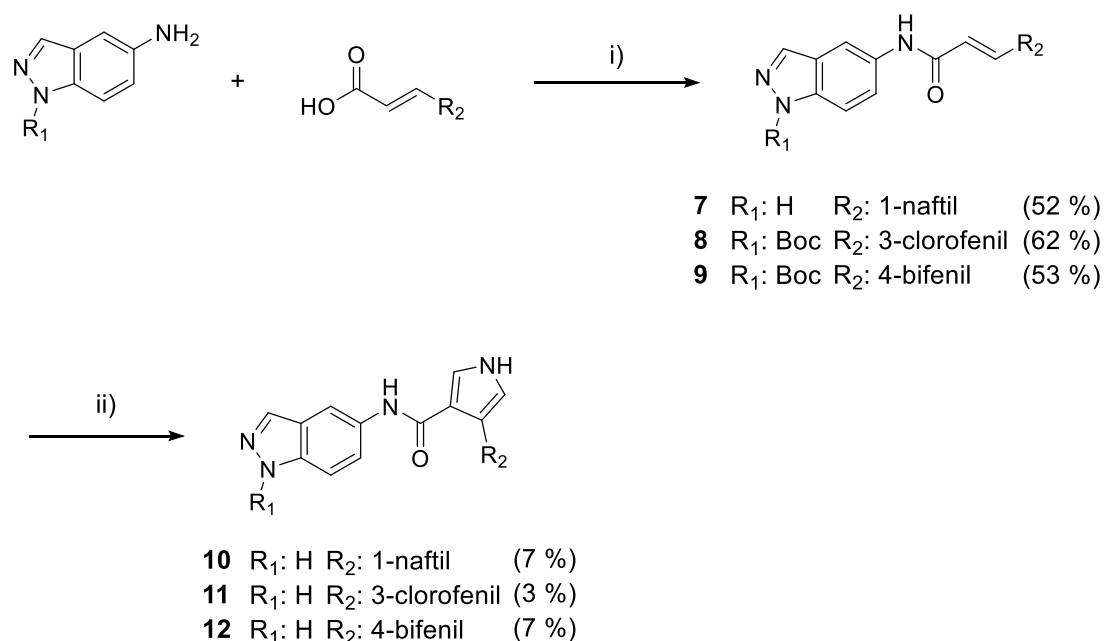
3.2. Modificaciones del anillo de fenilo

3.2.1. Síntesis alternativa de los derivados de H3

Una vez elucidada la importancia de los enlaces de hidrógeno del 1*H*-indazol-5-amina en la interacción proteína-ligando, se propuso una serie de modificaciones estructurales en el anillo de fenilo. Si bien la metodología propuesta en el apartado anterior permite la síntesis de los productos de interés, su rendimiento global es sustancialmente bajo. Esto es debido principalmente a la reacción de amidación que, en las condiciones de reacción propuestas, produce un gran número de impurezas que dificulta el aislamiento del producto. Una posible justificación es la presencia de los NH del indazol y el pirrol que, si bien son menos nucleófilos que el NH₂ tipo anilina, podrían estar interfiriendo en la reacción de amidación. En este contexto, se propuso una ruta sintética alternativa en dos pasos: un primer paso de reacción donde se produce la amidación a partir del ácido 3-arilacrílico correspondiente y, posteriormente, la formación del pirrol vía síntesis de Van Leusen (**Esquema 5**). Esta propuesta podría, primero, comprobar si la reacción de amidación evoluciona de manera más favorable en ausencia del pirrol. Segundo, aumentar

el rendimiento global de la reacción debido al menor número de reacciones. Y tercero, facilitar la síntesis de derivados de **H3** con sustituyentes de tipo naftilo o bifenilo en lugar del fenilo. Dado el carácter apolar de estos sustituyentes, los intermedios tipo 4-aryl-1*H*-pirrol-3-carboxilato de metilo resultan poco solubles en una mezcla de MeOH/H₂O, lo que dificultaría la posterior hidrólisis del éster.

Se utilizaron ácidos 3-arylacrílicos con tres sustituyentes distintos: 3-clorofenilo, 1-naftilo y 4-bifenilo. Para la reacción de amidación, se utilizó hexafluorofosfato de *O*-(1*H*-benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio (HBTU) como agente de acoplamiento, que dio lugar a los derivados de acrilamida **7-9**. Además, para comprobar si el NH del indazol podría interferir o no en la reacción, se utilizó el derivado protegido 5-amino-1*H*-indazol-1-carboxilato de *tert*-butilo en los dos últimos casos (**8, 9**). Independientemente de la presencia del grupo protector, se alcanzaron rendimientos superiores a la metodología anterior (**Esquema 4**). Esto podría indicar que el NH del indazol no interfiere en la reacción de amidación.



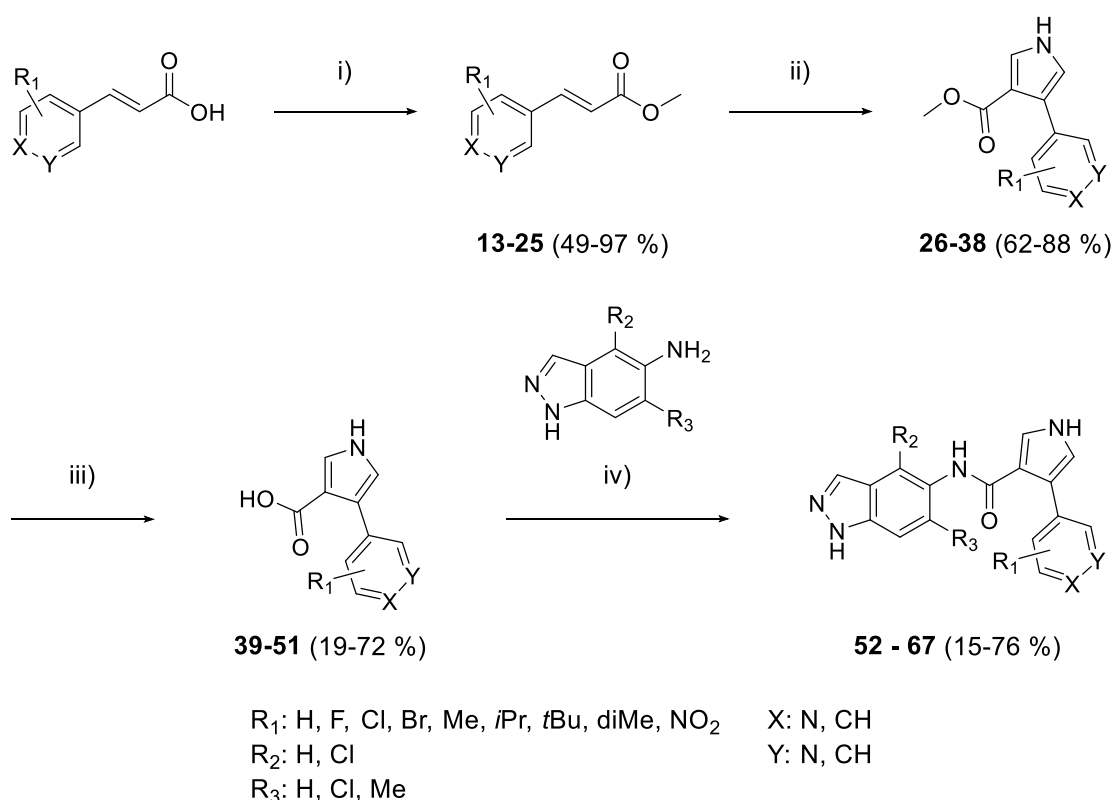
Esquema 5. Síntesis alternativa de los derivados de **H3**. i) HBTU, DIPEA, DMF, t.a., 2 h. ii) TosMIC, NaH, 0 °C a t.a., 2 h. Entre paréntesis se indican los rendimientos de reacción. Boc: *tert*-butiloxicarbonilo.

Los derivados de *N*-(1*H*-indazol-5-il)arylacrilamida fueron utilizados en el siguiente paso para formar el pirrol. Bajo estas condiciones de reacción (**Esquema 5**), el grupo protector resultó inestable para ambos casos (**11, 12**), obteniendo rendimientos similares al compuesto **10**, lo que disminuye drásticamente el rendimiento global de la ruta. Esto puede justificarse, primero, por la presencia de protones lábiles que pueden interactuar con el

NaH, y segundo, por un menor carácter electrófilo de las amida α,β -insaturadas **7-9** en comparación con el éster **1**.

3.2.2. Síntesis optimizada de los derivados de H3

El bajo rendimiento global obtenido en la anterior ruta sintética hizo que fuera descartada. Como alternativa, se propuso la utilización de la metodología original, pero modificando las condiciones de la reacción de amidación (**Esquema 6**).



Esquema 6. Síntesis optimizada de los derivados de H3. i) TMSCl, MeOH, t.a., 24 h. ii) TosMIC, NaH, DMF, 0 °C a t.a., 1 a 2 h. iii) NaOH, MeOH, H₂O, reflujo, 1 a 2 h. iv) BOP, DIPEA, THF, t.a., 2 a 24 h. Entre paréntesis se indican los rendimientos de reacción.

La formación de los ésteres derivados del ácido 3-arylacrílico **13-25** mantuvo los rendimientos esperados, a excepción del nitroderivado **23** con un rendimiento del 49 %. El resto de los ésteres se obtuvieron con rendimientos superiores al 75 %. La formación de los derivados de 4-aryl-1H-pirrol-3-carboxilato de metilo **26-38** también se obtuvieron con los rendimientos esperados. Se intentó la formación de pirroles con anillos π -excedentes en la posición 4. Sin embargo, tal y como está descrito, la formación del pirrol no tuvo lugar.¹⁸⁵ En cuanto a la hidrólisis de los ésteres para obtener los ácidos **39-51**, casi todos los intermedios fueron sintetizados con un rendimiento del 50 % o superior. Destaca el bajo

rendimiento del ácido 4-(piridin-4-il)-1*H*-pirrol-3-carboxílico (**51**, 19 %) y, en menor medida, del ácido 4-(piridin-3-il)-1*H*-pirrol-3-carboxílico (**50**, 49 %). Esto puede justificarse por el carácter anfótero de los compuestos, lo que aumenta su solubilidad en agua y dificulta su aislamiento por precipitación. Por último, se utilizó el hexafluorofosfato de 1*H*-benzotriazol-1-iloxitris(dimetilamino)fosfonio (BOP) como agente de acoplamiento para la formación de las amidas **52-67**.¹⁸⁹ En las condiciones de reacción descritas, se obtuvieron rendimientos superiores a la metodología expuesta en el **Esquema 4**.

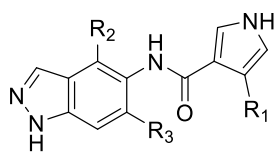
3.2.3. Evaluación de derivados con modificaciones en el anillo de fenilo

La evaluación de los derivados sintetizados permitió establecer relaciones entre la estructura química y actividad biológica de esta familia de compuestos (**Tabla 8**). En primer lugar, sustituyentes de tipo alquilo como metilo, isopropilo o *terc*-butilo en la posición 4 redujeron la actividad de los compuestos **58-61** en comparación con **H3**, con una clara correlación entre el tamaño del sustituyente y la reducción de la actividad. Esto podría apuntar a que, como se describe en el Capítulo 2 (sección 6), el grupo fenilo se encuentra localizado dentro de un bolsillo hidrofóbico, donde este impedimento estérico resultaría perjudicial para la interacción proteína-ligando. De manera similar, derivados con los sustituyentes tipo bifenilo (**10**) o naftilo (**12**) presentaron la misma disminución de la actividad, presumiblemente por el mismo motivo.

Por otro lado, el uso de sustituyentes tipo halógeno en el anillo de fenilo fueron bien tolerados (**11**, **52-57**), donde la CI_{50} siempre se mantuvo en el rango submicromolar. Es bien sabido que el uso de sustituyentes tipo halógeno es una estrategia común en química médica debido al aumento de lipofilia que estos generan en el ligando. Destacan los compuestos **52**, **54** y **62** con F, Cl y NO_2 en la posición 4 del anillo y una CI_{50} de 0.33, 0.11 y 0.22 μM , respectivamente. En el caso de las sustituciones tipo F y NO_2 , es posible que su carácter electroatractor favorezca la interacción con SGK1. En el segundo caso, es difícil adjudicar la mejora de la actividad del compuesto **54** solamente por la electronegatividad del Cl, claramente menos electronegativo que el F. Una potencial explicación en la diferencia de la actividad podría ser la presencia de un enlace de halógeno con la proteína, si bien harían falta cálculos computacionales para comprobar esta hipótesis.

¹⁸⁹ Agudo-Álvarez, S.; Díaz-Mínguez, S. S.; Benito-Arenas, R. The Amide Group and Its Preparation Methods by Acid-Amine Coupling Reactions: An Overview. *Pure Appl. Chem.* **2024**, *96* (5), 691–707.

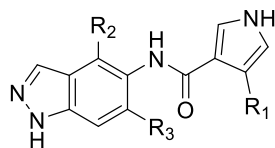
Tabla 8. Actividad inhibitoria frente a SGK1 de los derivados con modificaciones en el anillo de fenilo.



n°	R ₁	R ₂	R ₃	% inhibición @ 10 μM ^a	CI ₅₀ / μM ^b
10		H	H	77.9	2.21 ± 0.18
11		H	H	103.3	0.42 ± 0.01
12		H	H	29.2	16.42 ± 1.89
52		H	H	96.1	0.33 ± 0.07
53		H	H	89.6	0.89 ± 0.13
54		H	H	90.2	0.11 ± 0.02
55		H	H	93.1	0.45 ± 0.11
56		H	H	102.5	0.62 ± 0.04
57		H	H	104.6	0.57 ± 0.12
58		H	H	74.9	1.39 ± 0.34
59		H	H	72.7	2.99 ± 0.01
60		H	H	41.6	6.68 ± 1.30

^a Porcentaje de inhibición frente a SGK1 a 10 μM. ^b Concentración inhibitoria 50.

Tabla 8 (continuación). Actividad inhibitoria frente a SGK1 de los derivados con modificaciones en el anillo de fenilo.



n°	R ₁	R ₂	R ₃	% inhibición @ 10 μM ^a	CI ₅₀ / μM ^b
61		H	H	89.0	1.22 ± 0.45
62		H	H	107.3	0.22 ± 0.02
63		H	H	92.4	0.85 ± 0.05
64		H	H	77.0	5.87 ± 0.26
65		H	Me	48.9	8.98 ± 1.59
66		H	Cl	53.2	8.23 ± 0.42
67		Cl	H	68.3	1.67 ± 0.14

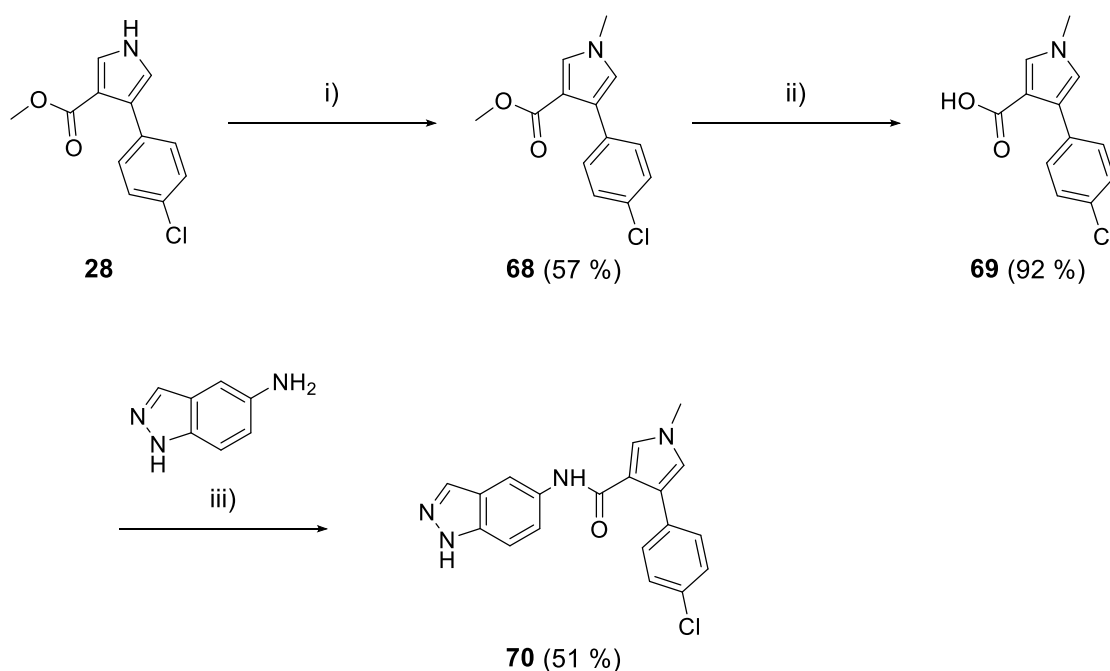
^a Porcentaje de inhibición frente a SGK1 a 10 μM. ^b Concentración inhibitoria 50.

En este sentido, resulta llamativa la actividad de los compuestos con sustituyentes tipo piridina (**63**, **64**). Mientras que el anillo π-deficiente piridin-3-ilo fue bien tolerado, el piridin-4-ilo produjo una caída notable de la actividad (CI₅₀ = 5.87 μM). Es posible que el par de electrones del nitrógeno se encuentre cerca de un aceptor de enlace de hidrógeno/halógeno. Esto podría ser lo que justifica las actividades de los compuestos **54** y **64**. Dada la actividad del compuesto **54**, se probaron ligeras modificaciones en las posiciones 4 y 6 del indazol (**65-67**), concretamente sustituciones con Cl y metilo. En todos los casos se observó una reducción de la actividad.

3.3. Modificaciones en el anillo de pirrol

3.3.1. Síntesis de los derivados alquilados en el NH pirrólico

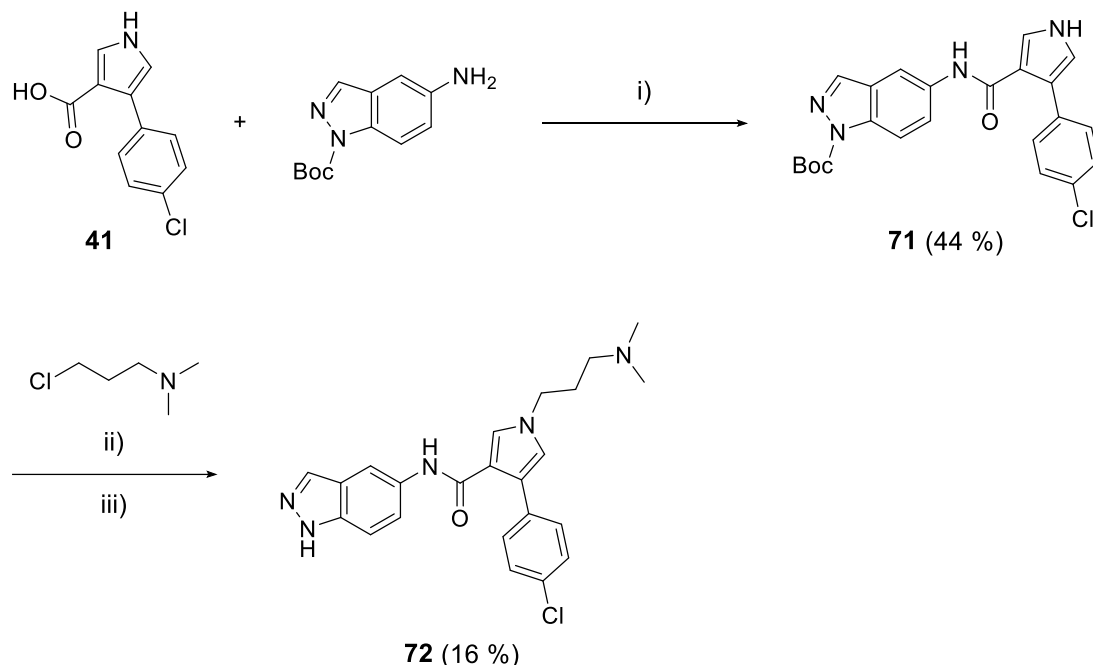
Como se explicó en el Capítulo 2 (sección 6), tanto el NH de la amida como del pirrol podrían realizar interacciones de tipo enlace/puente de hidrógeno con la proteína. De manera similar a cómo se comprobó el papel de la amida, se sintetizaron análogos del compuesto **H3** con cadenas de tipo alquilo en el NH del pirrol, concretamente metilo (**70**) y 3-(dimetilamino)propilo (**72**). En el primer caso (**Esquema 7**), se partió del intermedio **28**, que en presencia de NaH y CH₃I da lugar al derivado metilado **68**. Bajo las condiciones descritas anteriormente, se produce la hidrólisis del éster para obtener el ácido **69** que, tras la amidación correspondiente, da lugar al compuesto final **70**. Destaca el alto rendimiento en la síntesis del intermedio **69** (92 %). Curiosamente, no se observa la descarboxilación del intermedio en ausencia del NH pirrólico, al menos durante los tiempos de reacción.



Esquema 7. Síntesis del derivado 70. i) NaH, MeI, DMF, 0 °C a t.a., 2 h. ii) NaOH, MeOH, H₂O, reflujo, 2 h. iii) BOP, DIPEA, THF, t.a., 24 h. Entre paréntesis se indican los rendimientos de reacción.

Para la síntesis del compuesto **72**, se planteó un orden de reacciones distinto (**Esquema 8**), dado que el correspondiente ácido pirrólico con un sustituyente aminoalquilo tendría un carácter anfótero que dificultaría su aislamiento por precipitación en medio ácido. Por ello, se partió del intermedio **41** para formar la amida con el NH del indazol protegido (**71**). Posteriormente, el pirrol fue alquilado mediante el uso del 3-cloro-*N,N*-

dimetilpropan-1-amina en condiciones básicas y en presencia de KI como catalizador de la reacción. Tras la desprotección del indazol mediante ácido trifluoroacético (TFA), se obtiene el producto final **72**.



Esquema 8. Síntesis del derivado 72. i) BOP, DIPEA, THF, t.a., 2h. ii) Cs₂CO₃, KI, DMF, 80 °C, 18 h. iii) TFA, DCM, t.a., 6 h. Entre paréntesis se indican los rendimientos de reacción. Boc: *tert*-butiloxicarbonilo.

3.3.2. Síntesis de los derivados tipo pirazol

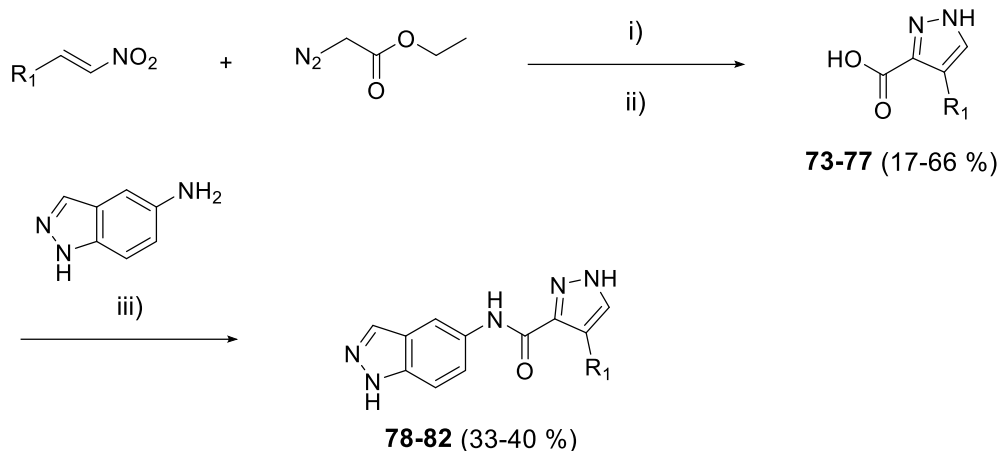
Como alternativa al anillo pirrólico, se propuso el anillo de pirazol como posible sustituto (**Esquema 9**). Para ello, se partió de los derivados de (*E*)-2-(nitrovinil)benceno que, en presencia de una base débil como TEA y diazoacetato de etilo, da lugar a la formación de derivados de 4-aryl-1*H*-pirazol-3-carboxilato de etilo, que tras la posterior hidrólisis da lugar a la formación de los ácidos **73-77**.^{190,191} Por último, se realizó la formación de la amida en las mismas condiciones que en el **Esquema 6**, dando lugar a los compuestos finales **78-82**. Los rendimientos de la reacción de amidación se mantuvieron en un intervalo similar (33-40 %). Como ventaja adicional, esta alternativa permite el uso

¹⁹⁰ Xie, J.-W.; Wang, Z.; Yang, W.-J.; Kong, L.-C.; Xu, D.-C. Efficient Method for the Synthesis of Functionalized Pyrazoles by Catalyst-Free One-Pot Tandem Reaction of Nitroalkenes with Ethyl Diazoacetate. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7* (21), 4352–4354.

¹⁹¹ Janin, Y. L. Preparations of 4-Substituted 3-Carboxypyrazoles. *J. Heterocycl. Chem.* **2013**, *50* (6), 1410–1414.

Capítulo 3. Optimización del compuesto H3

de anillos π -excedentes o ricos en electrones como los compuestos **81** y **82**, algo que la síntesis de Van Leusen no permite.¹⁸⁵

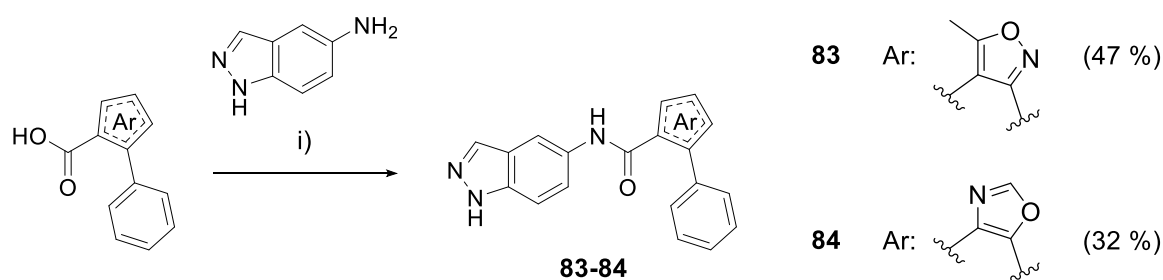


R₁: fenil, 4-fluorofenil, *p*-tolil, 4-metoxifenil, furan-2-il

Esquema 9. Síntesis de los derivados tipo pirazol. i) TEA, 24 h. ii) HCl 37%, reflujo, 4 h. iii) BOP, DIPEA, THF, t.a., 2 a 24 h. Entre paréntesis se indican los rendimientos de reacción.

3.3.3. Síntesis de los derivados de isoxazol/oxazol

Por último, se plantearon otros anillos de cinco miembros como alternativa del pirrol, concretamente anillos de isoxazol (**83**) y oxazol (**84**) (**Esquema 10**). La síntesis fue llevada a cabo con un único paso de reacción mediante la amidación con el agente de acoplamiento BOP, ya descrito anteriormente.



Esquema 10. Síntesis alternativa de los derivados de isoxazol/oxazol. i) BOP, DIPEA, THF, t.a., 2 a 24 h. Entre paréntesis se indican los rendimientos de reacción.

3.3.4. Evaluación de los derivados con modificaciones en el anillo de pirrol

Como en los casos anteriores, se procedió a la evaluación de los inhibidores sintetizados con alternativas al anillo de pirrol (**Tabla 9**). En primer lugar, la evaluación del compuesto **70** reveló que el NH del pirrol, al igual que la amida cuando se sustituye por un éster (**Tabla 7**, compuesto **6**), es responsable parcial de la interacción con la proteína, si bien la pérdida de esta interacción no es tan crítica como las del indazol (**Tabla 7**, compuestos **4**, **5**). Se obtuvo una actividad similar para el compuesto **72**, con una cadena alquílica de mayor tamaño y en forma de amonio cuaternario a pH fisiológico. Esto estaría en consonancia con el modelo de unión explicado en el Capítulo 2 (sección 6), donde el NH del pirrol se encuentra orientado a la zona expuesta al solvente. En caso contrario, sería esperable una mayor reducción en la actividad inhibitoria.

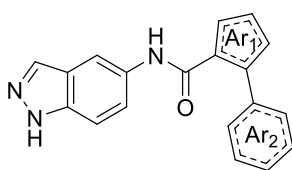
La sustitución del anillo de pirrol por pirazol resultó adecuada para la interacción con la proteína (**78-79**). Al igual que en el caso del pirrol, sustituyentes en la posición 4 del anillo de fenilo relativamente voluminosos desencadenaron la pérdida de actividad (**80**). De igual manera, anillos π -excedentes como el furano (**82**) o ricos en electrones (**81**) también redujeron la actividad los compuestos. Por último, anillos de cinco miembros que no son capaces de formar un enlace de hidrógeno (**83-84**) resultaron ser menos activos.

Tabla 9. Actividad inhibitoria frente a SGK1 de los derivados con alternativas al pirrol.

n°	Ar ₁	Ar ₂	% inhibición @ 10 μ M ^a	CI ₅₀ / μ M ^b
70			76.6	2.85 \pm 0.37
72			80.1	2.10 \pm 0.67
78			87.7	0.40 \pm 0.02

^a Porcentaje de inhibición frente a SGK1 a 10 μ M. ^b Concentración inhibitoria 50.

Tabla 9 (continuación). Actividad inhibitoria frente a SGK1 de los derivados con alternativas al pirrol.



n°	Ar ₁	Ar ₂	% inhibición @ 10 μ M ^a	CI ₅₀ / μ M ^b
79			82.3	0.35 \pm 0.04
80			71.8	3.85 \pm 0.12
81			52.6	6.64 \pm 0.07
82			60.5	2.76 \pm 0.29
83			62.5	4.87 \pm 0.01
84			52.1	6.51 \pm 0.54

^a Porcentaje de inhibición frente a SGK1 a 10 μ M. ^b Concentración inhibitoria 50.

3.4. Resumen de la relación estructura-actividad de los inhibidores sintetizados

Como ha sido comentado a lo largo del texto, la evaluación de los inhibidores reflejó la relación estructura-actividad de esta familia de compuestos (**Figura 39**). La doble interacción de enlace de hidrógeno del indazol resulta crítica, como es de esperar en inhibidores ATP-competitivos. Los enlaces/puentes de hidrógeno de los NH de la amida y el pirrol contribuyen a la actividad del compuesto, pero de una manera menos crítica que los anteriores. De los anillos de cinco miembros propuestos para sustituir al pirrol, únicamente el pirazol ha resultado adecuado para mantener o mejorar la actividad, puesto que el resto no son capaces de realizar un enlace de hidrógeno con la proteína. En cuanto al anillo de fenilo, sustituyentes electroattractores como el F, el Cl o el grupo NO₂ mejoran

la actividad del candidato. Sustituyentes como el Br son bien tolerados, aunque no se observa una mejora importante de la actividad. Si bien los compuestos con mayor actividad tienen sustituyentes en la posición 4, hay que destacar que las posiciones 2 y 3 fueron exploradas en menor medida. Cuando se utilizan sustituyentes de naturaleza alquílica, se observa una disminución de la actividad proporcional al componente estérico de los mismos. Por último, anillos π -deficientes parecen ser bien tolerados, mientras que anillos π -excedentes o ricos en electrones provocan una disminución notable de la actividad.

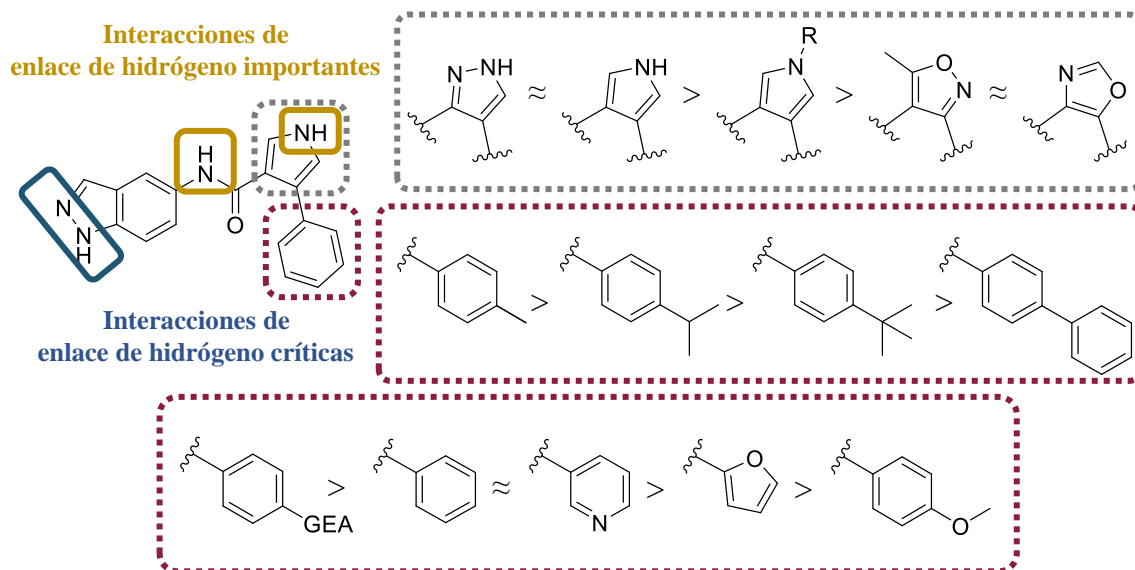


Figura 39. Resumen de las principales características de la relación estructura-actividad. R: alquilo. GEA: grupo electroattractor.

4. Caracterización de las propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas de los inhibidores sintetizados

4.1. Estudio del paso de la barrera hematoencefálica de los inhibidores de SGK1

Con el fin de continuar el desarrollo de los candidatos más potentes, resulta indispensable averiguar si son capaces de atravesar la BHE. Como se comentó a lo largo de la Introducción (sección 5.6), la falta de inhibidores de SGK1 que sean capaces de permear al cerebro es una de las principales dificultades a la hora de validar esta quinasa como diana de interés en contextos neurodegenerativos. Para ello, se utilizó la metodología PAMPA (del inglés, *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*).¹⁹² Este modelo se basa en el uso de dos placas (donadora y aceptora) separadas por una membrana artificial

¹⁹² Di, L.; Kerns, E. H.; Fan, K.; McConnell, O. J.; Carter, G. T. High Throughput Artificial Membrane Permeability Assay for Blood-Brain Barrier. *Eur. J. Med. Chem.* **2003**, *38* (3), 223–232.

compuesta por lípido de cerebro porcino. La cuantificación por espectroscopía UV del compuesto en estudio desde la placa donadora hacia la placa aceptora permite estimar su permeabilidad efectiva (P_e), siendo un buen indicador de la capacidad de atravesar la BHE por difusión pasiva.

Para obtener un modelo de regresión lineal que permita interpolar los valores de P_e de los compuestos evaluados, se cuantificó la permeabilidad de cuatro controles positivos (verapamilo, testosterona, promazina y desipramina) y seis controles negativos (atenolol, cafeína, enoxacina, hidrocortisona, ofloxacino y piroxicam) (**Figura 40A**, Parte experimental, **Figura S4**). Se encontró una buena correlación entre la permeabilidad obtenida en el experimento y la descrita en la literatura.

Posteriormente, se ensayó la permeabilidad de los compuestos más potentes ($CI_{50} < 3 \mu\text{M}$). Para discriminar aquellos compuestos que según su P_e pueden penetrar la BHE, se siguió el siguiente criterio:¹⁹²

- SNC+: $P_e > 4 \cdot 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$. Los compuestos presentan una alta permeabilidad.
- SNC+/SNC-: $2 \cdot 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1} < P_e < 4 \cdot 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$. Los compuestos presentan una permeabilidad incierta.
- SNC-: $P_e < 2 \cdot 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$. Los compuestos presentan una baja permeabilidad.

Estos valores se interpolaron en la recta de regresión lineal para poder ser aplicados a nuestro experimento, obteniendo los valores de P_e 1.93 y 4.11 como límites inferior y superior, respectivamente (**Figura 40B**). El 66.7 % de los compuestos evaluados presentaron valores de P_e adecuados para ser considerados como permeables. El 27.8 % restante, sin embargo, cayeron en la zona de incertidumbre. Únicamente el compuesto **63** fue considerado SNC-.

Como filtro adicional, se utilizó un algoritmo de optimización multiparámetro (MPO, del inglés *multiparameter optimization*) enfocado a la permeabilidad del SNC (SNC-MPO).¹⁹³⁻¹⁹⁵ Cada uno de los seis descriptores utilizados (logP, logD, peso molecular, TPSA, el número de dadores de enlaces de hidrógeno y pKa) es puntuado de

¹⁹³ Wager, T. T.; Hou, X.; Verhoest, P. R.; Villalobos, A. Moving beyond Rules: The Development of a Central Nervous System Multiparameter Optimization (CNS MPO) Approach To Enable Alignment of Druglike Properties. *ACS Chem. Neurosci.* **2010**, *1* (6), 435–449.

¹⁹⁴ Wager, T. T.; Hou, X.; Verhoest, P. R.; Villalobos, A. Central Nervous System Multiparameter Optimization Desirability: Application in Drug Discovery. *ACS Chem. Neurosci.* **2016**, *7* (6), 767–775.

¹⁹⁵ Pennington, L. D.; Hesse, M. J.; Koester, D. C.; McAtee, R. C.; Quinies, A. M.; Hu, D. X. Property-Based Drug Design Merits a Nobel Prize. *J. Med. Chem.* **2024**, *67* (14), 11452–11458.

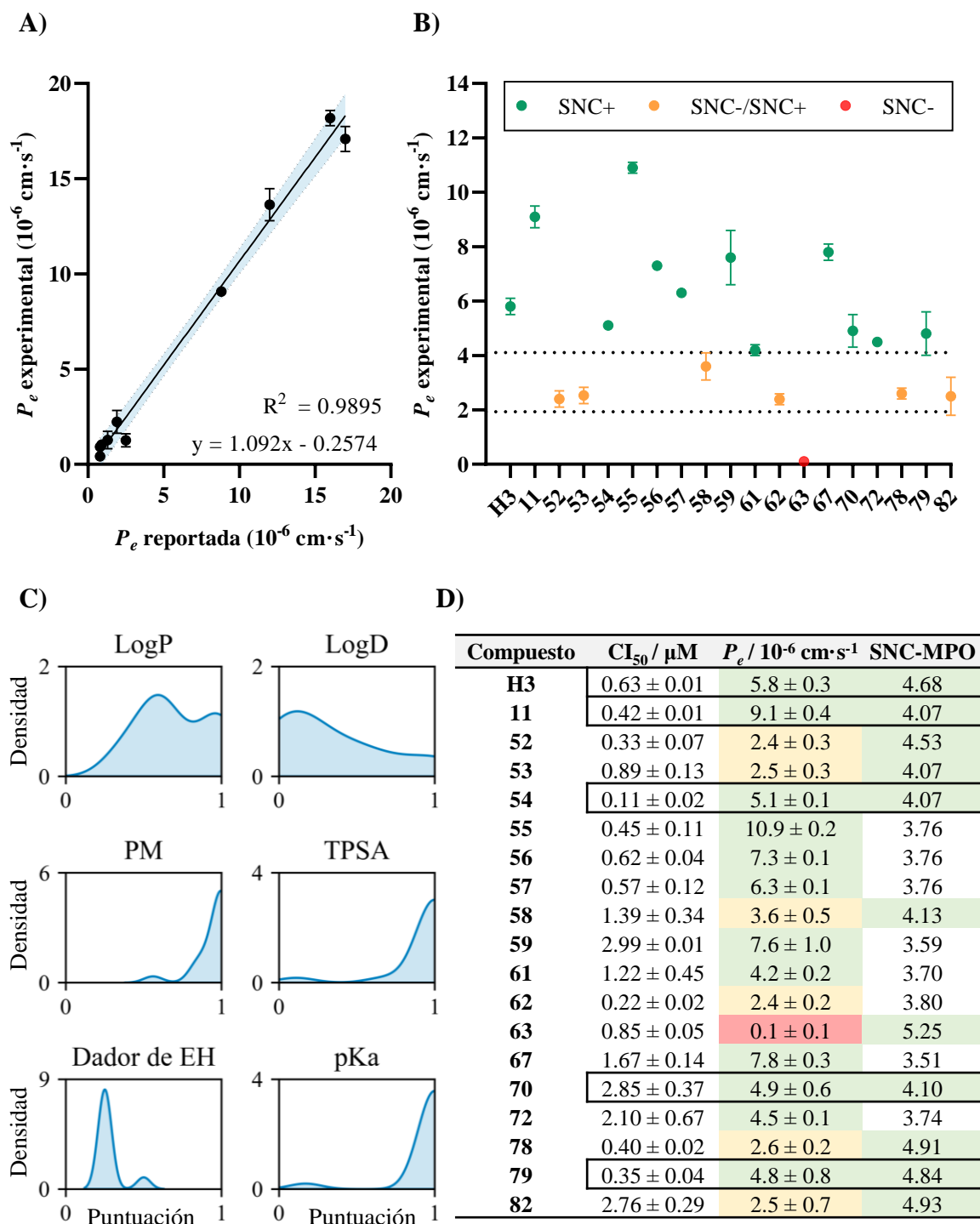


Figura 40. Predicción de la permeabilidad de la BHE. A) Regresión lineal de la P_e experimental y descrita de los controles utilizados. En azul, intervalo de confianza del 95 %. B) Predicción de la permeabilidad de la BHE de acuerdo al valor obtenido de P_e . Las líneas representan los límites inferior y superior obtenidos en la interpolación. C) Distribución de las puntuaciones obtenidas para cada descriptor representado como funciones de densidad de probabilidad. D) Resumen de los valores de P_e y puntuación del algoritmo SNC-MPO. Marcados con un cuadrado negro, los compuestos seleccionados tras aplicar ambos filtros. Datos expresados como la media \pm desviación estándar.

0 a 1 en base a una función lineal definida a trozos. La suma de estas seis puntuaciones da lugar a una puntuación global comprendida en un rango de 0 a 6, donde aquellos compuestos con una puntuación mayor o igual a 4 son considerados permeables al SNC.¹⁹³ Para ello, se utilizó el programa MarvinSketch (v.24.3.0) incluido en el paquete informático ChemAxon. En la **Figura 40C** puede comprobarse la distribución de las puntuaciones calculadas de los 19 compuestos para cada uno de los descriptores. En términos generales, se observó una baja puntuación para el descriptor del número de dadores de enlace de hidrógeno y el logD. De acuerdo a este cálculo, 11 compuestos obtuvieron una puntuación mayor o igual a 4, de los cuales 5 también fueron SNC+ de acuerdo a la metodología PAMPA: **H3, 11, 54, 70 y 79 (Figura 40D)**. Ante estos datos, se eligió el compuesto **54** como candidato para continuar con su evaluación debido a su menor CI₅₀.

4.2. Estudio de inhibición de citocromos, mutagenicidad, cardiotoxicidad y selectividad frente a otras quinasas

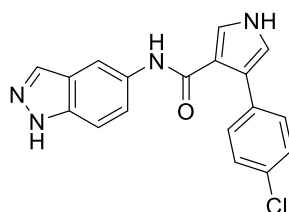
En etapas preclínicas tempranas, existen diferentes ensayos que permiten la caracterización de la actividad biológica de un candidato a fármaco, los cuales pueden incrementar el éxito traslacional del mismo. Dada la actividad del compuesto **54** y su capacidad de atravesar la BHE, se plantearon varios estudios: la inhibición de citocromos, la mutagenicidad, la inhibición de diferentes canales iónicos y su selectividad frente a un panel de quinasas.

La superfamilia de enzimas del citocromo P450 (CYP450) son un conjunto de proteínas encargadas del metabolismo de compuestos, tanto endógenos como exógenos. Si bien su expresión es ubicua, aquellas localizadas en el hígado son especialmente importantes en el contexto de la administración de un fármaco. Su inhibición puede resultar en la alteración del metabolismo del resto de sustratos, algo a tener en cuenta cuando se coadministra con otros fármacos.¹⁹⁶ Por ello, se procedió al estudio de la inhibición de estas enzimas, concretamente las isoformas CYP3A4, CYP2D6 y CYP2C9, provenientes de microsomas humanos (**Tabla 10**). El ensayo se llevó a cabo en colaboración con la Fundación Medina. Se encontró que el compuesto **54** inhibía de manera moderada las tres isoformas, con valores de CI₅₀ de 3.65, 8.19 y 1.27 μ M, respectivamente.

¹⁹⁶ Guengerich, F. P. Inhibition of Cytochrome P450 Enzymes by Drugs-Molecular Basis and Practical Applications. *Biomol. Ther.* **2022**, 30 (1), 1–18.

Para comprobar la potencial mutagenicidad del compuesto **54**, se procedió a realizar el test de Ames en la Fundación Medina.¹⁹⁷ Brevemente, se utilizó un cultivo de *Salmonella typhimurium* con mutaciones en genes relacionados con la biosíntesis de histidina, siendo por tanto incapaz de crecer en medios sin este aminoácido. Si el cultivo es capaz de crecer en presencia del compuesto, pero en ausencia de histidina, esto podría ser resultado de mutaciones en dichos genes, siendo un buen modelo para evaluar la potencial mutagenicidad del compuesto en estudio. No se encontró actividad mutagénica alguna en las cepas utilizadas (**Tabla 10**).

Tabla 10. Ensayos de seguridad realizados sobre el compuesto 54.



Inhibición de citocromos			Mutagénesis	Inhibición de canales iónicos		
CYP3A4	CYP2D6	CYP2C9	Test de Ames	hERG	Nav1.5	Cav1.2
3.65 μ M	8.19 μ M	1.27 μ M	Negativo	> 50 μ M	> 50 μ M	3.64 μ M

Por otro lado, la cardiotoxicidad es uno de los principales aspectos de seguridad de un candidato a fármaco que debe estudiarse en etapas tempranas. En concreto, los fármacos pueden ser capaces de, entre otras cosas, inhibir los canales iónicos dependientes de voltaje, los cuales regulan el ritmo cardiaco. Tal es la importancia de este efecto colateral que ha provocado la retirada de diferentes fármacos comercializados, así como la interrupción del desarrollo de otros prometedores.¹⁹⁸ En concreto, destacan el canal de K^+ hERG, el canal de Na^+ Nav1.5 y el canal de Ca^{2+} Cav1.2, siendo el primero de ellos el más crítico de los tres, cuya inhibición provoca arritmias ventriculares letales.¹⁹⁹ Se calculó la CI_{50} sobre estos tres canales en la Fundación Medina, resultando en la ausencia de actividad inhibitoria en los dos primeros casos ($CI_{50} > 50 \mu$ M) y una actividad moderada sobre el canal Cav1.2 ($CI_{50} = 3.64 \mu$ M).

¹⁹⁷ Vijay, U.; Gupta, S.; Mathur, P.; Suravajhala, P.; Bhatnagar, P. Microbial Mutagenicity Assay: Ames Test. *Bio-protocol* **2018**, 8 (6), e2763.

¹⁹⁸ Imbrici, P.; Nicolotti, O.; Leonetti, F.; Conte, D.; Liantonio, A. Ion Channels in Drug Discovery and Safety Pharmacology. *Methods Mol. Biol.* **2018**, 1800, 313–326.

¹⁹⁹ Garrido, A.; Lepailleur, A.; Mignani, S. M.; Dallemagne, P.; Rochais, C. HERG Toxicity Assessment: Useful Guidelines for Drug Design. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, 195, 112290.

Por último, resulta de vital importancia caracterizar la selectividad de un compuesto de interés frente a otras quinasas. Como se explica en la Introducción (sección 4.1), los inhibidores ATP-competitivos tienden a comportarse de manera promiscua frente a otras quinasas dada la alta conservación del centro activo. Si bien la inhibición colateral de otras quinasas puede resultar beneficiosa según el contexto patológico, también puede dar lugar a efectos tóxicos no deseados. Para ello, se evaluó el porcentaje de inhibición del compuesto **54** en una colección de 49 quinasas a una concentración de 10 μM (**Figura 41**) en la Universidad de Dundee (Unidad MRC-PPU). Se obtuvo un porcentaje de inhibición para SGK1 de 89 %, similar a lo obtenido en nuestro modelo de actividad enzimática. Si se calcula el índice S_{20} , esto es, la fracción de quinasas que muestra una actividad residual igual o menor al 20%, se obtiene un valor de 0.1. Si bien no puede considerarse el compuesto como promiscuo, destaca la inhibición sobre otras quinasas como MSK1, PRK2, PKA y ROCK2.

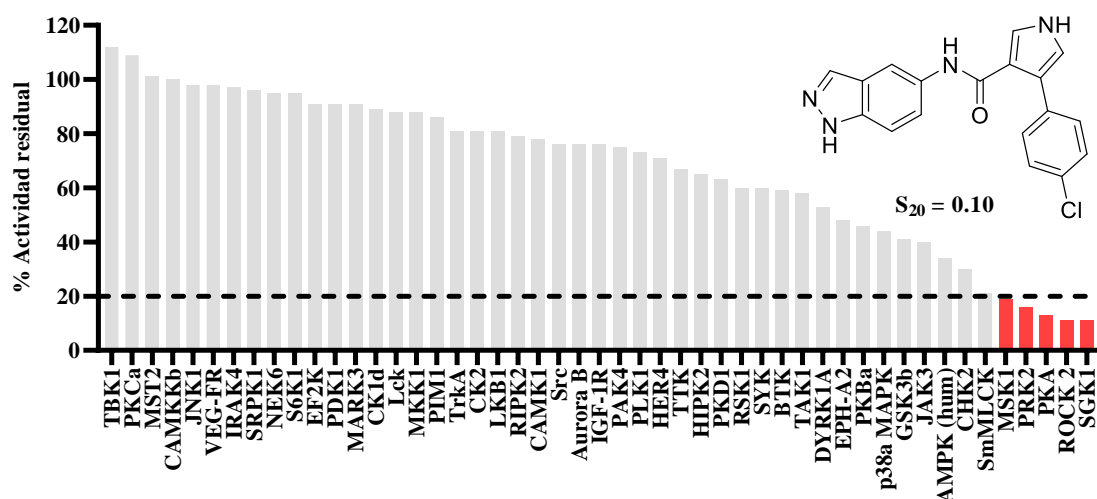
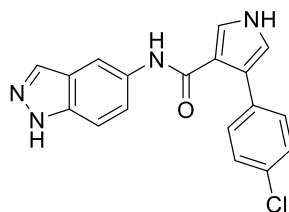


Figura 41. Panel de selectividad de quinasas del compuesto 54. En rojo, aquellas quinasas que mostraron una actividad residual igual o menor al 20%.

4.3. Estudio farmacocinético *in vivo* del compuesto 54

Dada la notable actividad, la capacidad de atravesar la BHE por difusión pasiva, su perfil de seguridad y su selectividad aceptable, se procedió al estudio del perfil farmacocinético del compuesto **54** *in vivo*. Se evaluaron los niveles de compuesto en plasma y cerebro tras la administración de una única dosis por vía oral (p.o, 10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) e intraperitoneal (i.p, 5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) en ratones macho (cepa BALB/c) en la empresa SAI Life Science. Los resultados pueden comprobarse en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Perfil farmacocinético del compuesto 54 en plasma y cerebro tras administración única.



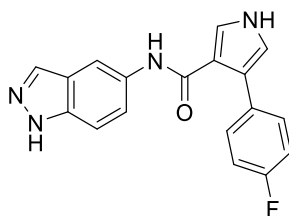
Vía	Dosis / mg·kg ⁻¹	Matriz	T _{max} / h	C _{max} ^a	AUC _{final} ^b	T _{1/2} / h	K _p cerebro (AUC _{final})
i.p	5	Plasma	0.25	568.84	591.58	0.55	-
		Cerebro	0.25	28.67	23.50	-	0.04
p.o	10	Plasma	0.25	777.40	599.08	0.33	-
		Cerebro	0.25	34.72	25.19	-	0.04

^a Expresada en ng·mL⁻¹ y ng·g⁻¹ para plasma y cerebro, respectivamente. ^b Expresada como h·ng·mL⁻¹ y h·ng·g⁻¹ para plasma y cerebro, respectivamente. AUC: área bajo la curva.

La concentración máxima en plasma se observa a las 0.25 h, lo que sugiere una rápida absorción del compuesto. Sin embargo, se encontraron niveles sorprendentemente bajos en cerebro, lo que sugiere una baja permeabilidad. Independientemente del tipo de administración, la constante del ratio cerebro/plasma (K_pcerebro) fue 0.04, lo que indica un mal paso de la barrera hematoencefálica. Esto entra en contradicción con los resultados obtenidos con la metodología PAMPA y los cálculos *in silico*, que predicen una buena disponibilidad en cerebro.

Para saber si es algo característico de este compuesto o si, por el contrario, es un comportamiento generalizado para esta familia de inhibidores, se realizó el mismo experimento con el compuesto 52 (Tabla 12). El análisis demostró el mismo tipo de comportamiento para este compuesto, con niveles en cerebro aún más bajos que en el caso anterior (K_pcerebro = 0.02). Esto podría indicar que las razones que están detrás de la baja

Tabla 12. Perfil farmacocinético del compuesto 52 en plasma y cerebro tras administración única.



Vía	Dosis / mg·kg ⁻¹	Matriz	T _{max} / h	C _{max} ^a	AUC _{final} ^b	T _{1/2} / h	K _p cerebro (AUC _{final})
i.p	5	Plasma	0.25	884.38	532.48	0.47	-
		Cerebro	0.25	25.74	9.75	-	0.02
p.o	10	Plasma	0.25	866.09	741.63	1.14	-
		Cerebro	0.25	26.49	15.53	-	0.02

^a Expresada en ng·mL⁻¹ y ng·g⁻¹ para plasma y cerebro, respectivamente. ^b Expresada como h·ng·mL⁻¹ y h·ng·g⁻¹ para plasma y cerebro, respectivamente. AUC: área bajo la curva.

disponibilidad cerebral podrían ser ajenas a las características fisicoquímicas involucradas en la difusión pasiva.

4.4. Análisis del transporte activo mediado por la glicoproteína-P

Ante el aumento de la concentración de un xenobiótico, las células disponen de transportadores que tienden a impedir la entrada del mismo, funcionando como una barrera que se suma a las membranas biológicas. En lo referido a la distribución de fármacos en un organismo, destaca el papel de la glicoproteína-P (gp-P) como una de las bombas de transporte activo más estudiadas. Codificada por el gen *ABCB1*, esta proteína se encuentra embebida en la membrana plasmática de diferentes tejidos, entre los que destacan el epitelio intestinal y las células endoteliales que componen la BHE.²⁰⁰ Cuando un fármaco es sustrato de este transportador, la gp-P previene la incorporación del mismo dentro de la célula, expulsándolo hacia aquellos compartimentos que favorecen la eliminación del compuesto (como, en los casos anteriores, al lumen intestinal o la sangre). Si bien se desconoce los detalles del proceso, la gp-P es capaz de reconocer al sustrato tanto en la membrana plasmática como en el citoplasma. Mediante el uso de ATP, el complejo gp-P-ligando sufre un cambio conformacional que orienta al sustrato hacia el compartimento de salida (**Figura 42**).²⁰¹

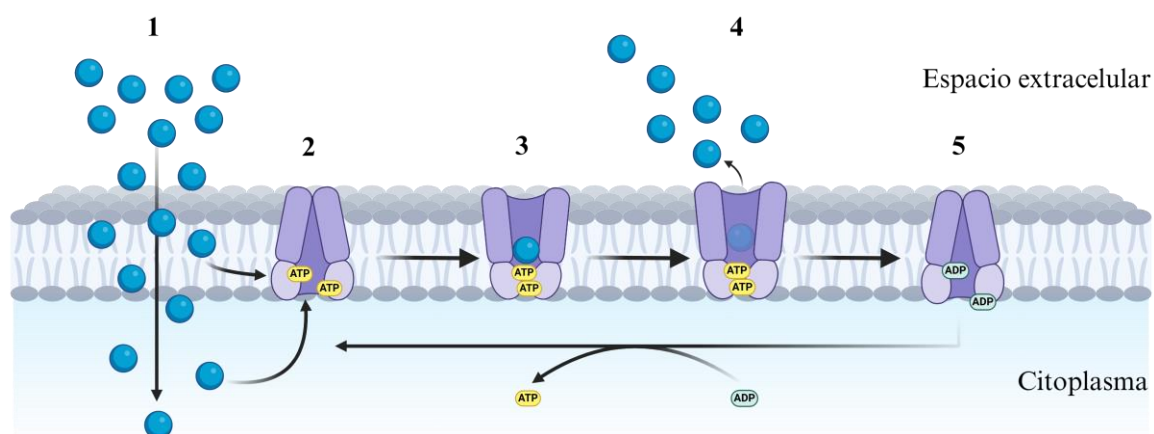


Figura 42. Mecanismo de transporte activo de la gp-P en la BHE. En azul, la molécula sustrato. En morado, la gp-P. El sustrato, el cual atraviesa la barrera plasmática por difusión pasiva (1), es reconocido por la gp-P, desde la membrana o desde el citoplasma (2). La glicoproteína sufre un cambio conformacional (3) que dispone al sustrato en dirección al espacio extracelular (4). Finalmente, la proteína vuelve a su conformación original para reconocer nuevos sustratos (5), todo esto gracias al consumo de ATP.

²⁰⁰ Seelig, A. P-Glycoprotein: One Mechanism, Many Tasks and the Consequences for Pharmacotherapy of Cancers. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 576559.

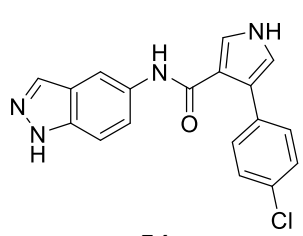
²⁰¹ Ambudkar, S. V.; Kimchi-Sarfaty, C.; Sauna, Z. E.; Gottesman, M. M. P-Glycoprotein: From Genomics to Mechanism. *Oncogene* **2003**, *22* (47), 7468–7485.

Este mecanismo condiciona la presencia de aquellos fármacos en el SNC pese a disponer de propiedades fisicoquímicas óptimas, incluidos varios inhibidores quinasas que han intentado ser utilizados en enfermedades neurológicas.²⁰² Por otro lado, modelos *knockout* de ratón muestran que, en ausencia de este transportador, estos sustratos pueden incrementar 4 veces su concentración en cerebro.²⁰² En este contexto, se planteó la posibilidad de que este mecanismo de transporte activo estuviera detrás de los bajos niveles cerebrales del compuesto **54**.

4.4.1. Predicción *in silico* de la relación gp-P y el compuesto 54

Para elucidar el potencial papel de la gp-P en la farmacocinética del compuesto **54**, se utilizó el programa PgpRules.²⁰³ Compuesto por un algoritmo de inteligencia artificial, se calcula una batería de descriptores para los compuestos en estudio, los cuales son utilizados como variables de entrada para la predicción. El programa calcula, primero, una predicción sobre si el compuesto es sustrato o no de la gp-P, y segundo, los descriptores que justifican el resultado (**Tabla 13**), lo cual puede orientar la síntesis de nuevos compuestos para evitar el mecanismo de transporte de activo. La predicción fue positiva para el compuesto **54**, caracterizándolo como potencial sustrato de la gp-P.

Tabla 13. Predicción de sustrato de la gp-P del compuesto 54.

	Descriptor	Res.
 <p>54 Sustrato</p>	≥ 16 C	V
	[#1]-N-C-[#1]	V
	≥ 1 anillos con 5 miembros de carbono, saturados o aromáticos	F
	≥ 32 H	F
	C(~C)(~Cl)(~H)	F
	Sc1ccc(N)cc1	F
	C-C-C-C-C-C-C	F
	≥ 2 anillos con 5 miembros	V

Res: resultado. V: verdadero. F: falso.

²⁰² Lin, J. H.; Yamazaki, M. Role of P-Glycoprotein in Pharmacokinetics. *Clin. Pharmacokinet.* **2003**, 42 (1), 59–98.

²⁰³ Wang, P.-H.; Tu, Y.-S.; Tseng, Y. J. PgpRules: A Decision Tree Based Prediction Server for P-Glycoprotein Substrates and Inhibitors. *Bioinformatics* **2019**, 35 (20), 4193–4195.

Para estudiar el potencial modo de unión del compuesto **54** con la gp-P, se procedió a calcular la pose mediante *induced-fit docking*, utilizando la proteína cristalizada (PDB 6QEX). El sitio de unión se definió mediante el sustrato cocrystalizado (taxol). El experimento dio lugar a un complejo gp-P-**54** mediado principalmente por interacciones de enlace de hidrógeno y acoplamiento π - π (**Figura 43**), similar a lo descrito en la literatura para otros sustratos.²⁰⁴

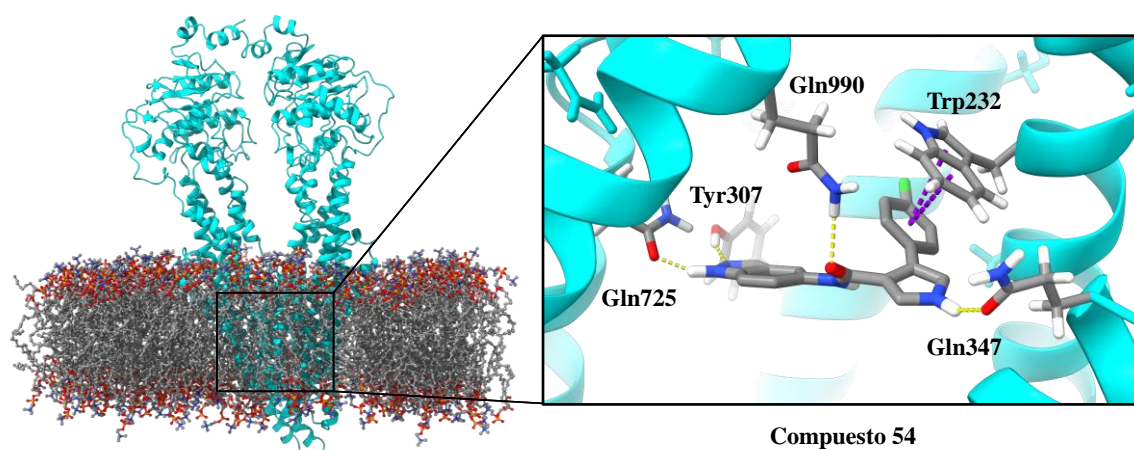


Figura 43. Modo de unión entre la gp-P y el compuesto 54. A la izquierda, la proteína embebida en la membrana plasmática. A la derecha, el compuesto **54** en el sitio de unión. En amarillo, interacciones de enlace de hidrógeno. En morado, interacciones tipo acoplamiento π - π .

4.4.2. Predicción *in silico* de la relación gp-P y el compuesto 70

Con toda la información expuesta en el apartado anterior, se planteó qué modificaciones estructurales son necesarias para evitar este transporte activo. Una posible alternativa podrían ser aquellos inhibidores con el NH pirrónico metilado, como es el caso del compuesto **70**. Esto se fundamenta por varios motivos:

- Analizando los descriptores usados en la predicción de PgpRules (**Tabla 13**), resulta llamativo el que ocupa el segundo lugar ([#1]-N-C-[#1], entendido como “H-N-C-H”). Según este modelo, el NH pirrónico sería responsable, al menos en parte, de este resultado.
- Según el modo de unión propuesto, el compuesto **54** realiza una interacción de enlace de hidrógeno mediante el NH pirrónico, algo que el compuesto **70** no podría hacer.

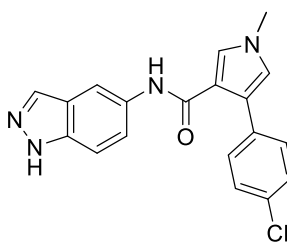
²⁰⁴ Vandevuer, S.; Van Bambeke, F.; Tulkens, P. M.; Prévost, M. Predicting the Three-Dimensional Structure of Human P-Glycoprotein in Absence of ATP by Computational Techniques Embodying Crosslinking Data: Insight into the Mechanism of Ligand Migration and Binding Sites. *Proteins* **2006**, *63* (3), 466–478.

- De acuerdo al análisis quimioinformático realizado por la farmacéutica Amgen, aquellos compuestos con menos de dos donadores de enlace de hidrógeno presentan una menor probabilidad de ser sustratos de la gp-P. En este sentido, el compuesto **70** presenta dos donadores de enlace de hidrógeno, uno menos que el compuesto **54**.²⁰⁵

Por todo esto, se realizó la predicción de la relación del compuesto **70** con la gp-P mediante PgpRules (**Tabla 14**). Consecuentemente, el compuesto **70** no resultó ser sustrato de la gp-P.

Tabla 14. Predicción de sustrato de la gp-P del compuesto 70.

	Descriptor	Res.
	≥ 16 C	V
	[#1]-N-C-[#1]	F
	O=C-C:C-O	F
	N#C-C=C	F
	≥ 5 anillos de 6 miembros de carbono, insaturados no aromáticos	F
	CC1CC(O)CCC1	F
	[#1]-C-O-[#1]	F
	Cc1ccc(N)cc1	F
	C(~C)(~C)(~C)(~O)	F
	C-N-C-[#1]	V
	O=C-C-C-N	V
	C(N)=N	F



70
No sustrato

Res: resultado. V: verdadero. F: falso.

4.4.3. Estudio de permeabilidad bidireccional de los compuestos 54 y 70

Para validar la hipótesis basada en los anteriores cálculos, se planeó un ensayo de permeabilidad bidireccional para los compuestos **54** y **70** en la compañía SAI Life Science. En este experimento, la línea celular MDCKII-MDR1, la cual sobreexpresa la gp-P humana, se siembra formando monocapas celulares. Tras la adición del compuesto en estudio, se calcula su permeabilidad aparente (P_a) a través de la monocapa en dos sentidos (**Figura 44A**):

- Desde el lado apical al basolateral, P_a -AB, o permeabilidad absorptiva

²⁰⁵ Hitchcock, S. A. Structural Modifications That Alter the P-Glycoprotein Efflux Properties of Compounds. *J. Med. Chem.* **2012**, 55 (11), 4877–4895

Capítulo 3. Optimización del compuesto H3

- Desde el lado basolateral al apical, P_a -BA, o permeabilidad secretoria

Esto permite, por un lado, cuantificar la permeabilidad del compuesto en otro modelo diferente a la metodología PAMPA en función de los valores de P_a :

- $P_a < 1.0 \cdot 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$: baja permeabilidad
- $1.0 \cdot 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1} < P_a < 10.0 \cdot 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$: permeabilidad media
- $P_a > 10.0 \cdot 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$: permeabilidad alta

Por otro lado, permite calcular el ratio de eflujo (R_E), definido como el cociente entre las dos permeabilidades (P_a -BA / P_a -AB). Dado que la actividad de la gp-P tiende a desplazar los compuestos hacia la zona apical, aquellos compuestos con un R_E mayor que 2.0 pueden ser considerados sustratos del transportador. Se utilizaron 3 controles: loperamida, como sustrato conocido de la gp-P, atenolol, como fármaco con baja permeabilidad, y propranolol, como fármaco con alta permeabilidad. Además, todos los compuestos fueron evaluados en presencia y ausencia de zosuquidar, inhibidor de la gp-P (**Figura 44B**).

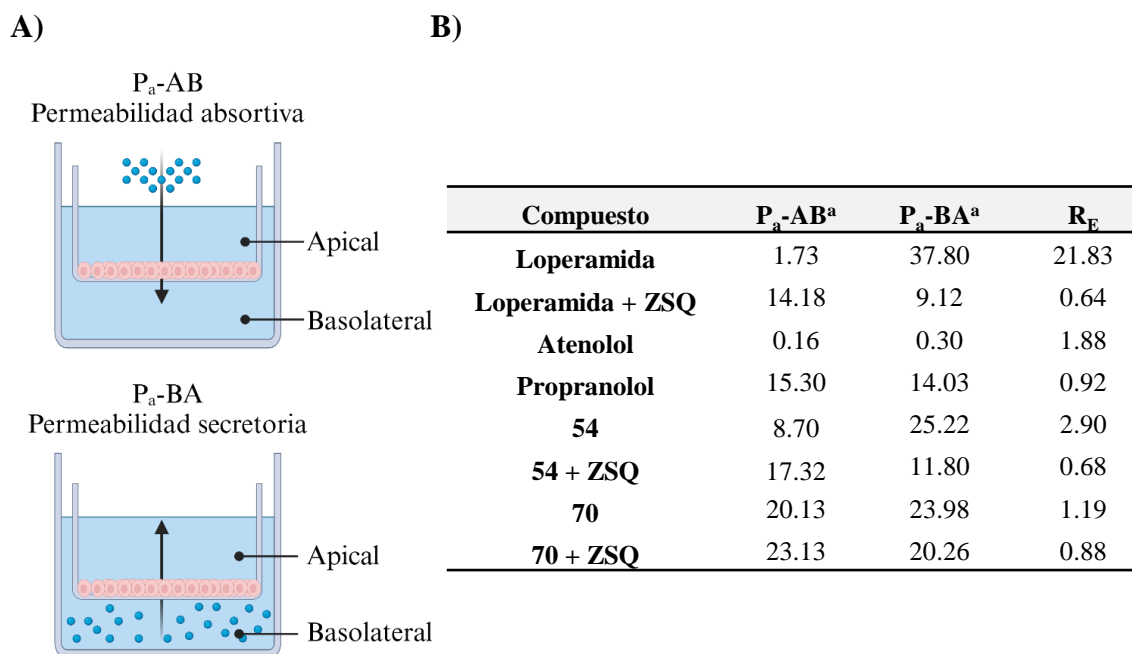


Figura 44. Ensayo de permeabilidad bidireccional. **A)** Representación esquemática del ensayo. En azul, el compuesto a evaluar. En naranja, monocapa de células MDCKII-MDR1. **B)** Resultado del ensayo para los compuesto **54** y **70**. ZSQ: zosuquidar. ^a Expresado en $10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$. R_E : ratio de eflujo.

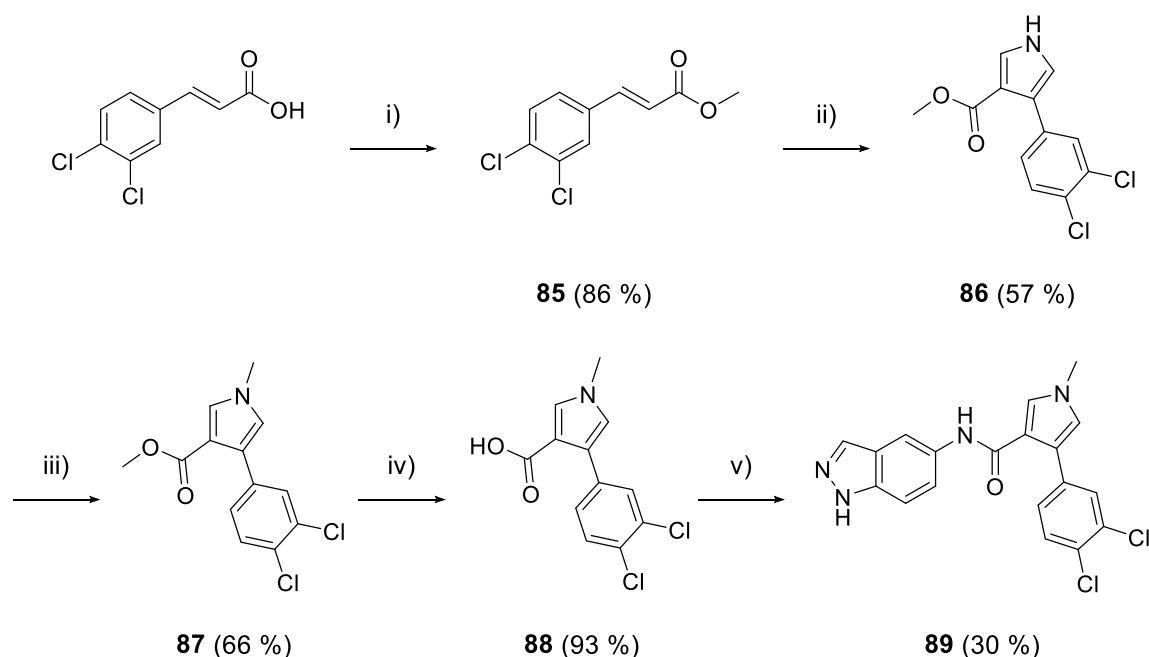
En este ensayo, la loperamida exhibió una permeabilidad absorbitiva media y una secretoria elevada, con un R_E de 21.83. En presencia del inhibidor de gp-P, ambas

permeabilidades se equilibran y el R_E disminuyó hasta 0.64. Por otro lado, el atenolol y el propranolol mostraron bajas y altas permeabilidades, respectivamente, validando el experimento. En cuanto al compuesto **54**, exhibió una permeabilidad absorptiva moderada, mientras que su permeabilidad secretoria fue elevada, obteniendo un R_E de 2.90. En presencia de zosuquidar, la gp-P deja de actuar, reduciendo la permeabilidad secretoria y obteniendo una permeabilidad absorptiva alta, lo que se reflejó en la disminución del R_E (0.68). Por último, en el caso del compuesto **70**, mostró permeabilidades altas (tanto absorptiva como secretoria) en ausencia y presencia del inhibidor de gp-P, lo que se reflejó en la estabilidad del valor de R_E (1.19 y 0.88).

En definitiva, esto confirma que, primero, el compuesto **54** es sustrato de la gp-p humana. En segundo lugar, se obtiene una permeabilidad elevada cuando esta bomba es inhibida. Y, por último, el compuesto **70** presenta una permeabilidad elevada y, además, no es sustrato de la gp-P, lo cual valida las predicciones explicadas anteriormente. La metilación del anillo pirrólico supone una buena estrategia para aumentar la permeabilidad cerebral de esta familia de compuestos. Sin embargo, esto conlleva una disminución notable de la actividad ($CI_{50} = 2.85 \pm 0.37 \mu\text{M}$, **Tabla 9**). Por tanto, se requiere de nuevas modificaciones estructurales que conserven tanto la actividad del compuesto como su permeabilidad.

4.5. Diseño de un nuevo inhibidor de SGK1 no sustrato de la gp-P

En la búsqueda de nuevos inhibidores de SGK1 activos y no sustratos de la gp-P, se plantearon modificaciones alternativas que aumentaran la potencia del compuesto **70**. Dado que, según el modo de unión propuesto, el anillo de fenilo se encuentra embebido en un bolsillo hidrofóbico, y que las sustituciones de tipo halógeno pueden mejorar la actividad del compuesto **H3**, se propuso la síntesis del derivado con dos sustituyentes tipo Cl en las posiciones 3 y 4 del anillo de fenilo, junto con el NH pirrólico metilado (**89**, **Esquema 11**). En teoría, esta nueva sustitución podría incrementar el carácter lipofílico del anillo y, por tanto, mejorar la actividad del compuesto.



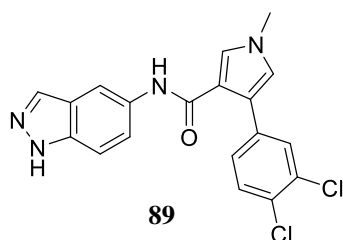
Esquema 11. Síntesis del compuesto 89. i) TMSCl, MeOH, t.a., 24 h. ii) TosMIC, NaH, DMF, 0 °C a t.a., 1 h. iii) NaH, MeI, DMF, 0 °C a t.a., 2 h. iv) NaOH, MeOH, H₂O, reflujo, 2 h. v) 1*H*-indazol-5-amina, BOP, DIPEA, THF, t.a., 24 h. Entre paréntesis se indican los rendimientos de reacción.

Para ello, se utilizó la síntesis general planteada en el **Esquema 6** con un paso adicional para metilar el pirrol, de manera similar a lo explicado en el **Esquema 7**. Se encontraron rendimientos de reacción similares al resto de inhibidores sintetizados. De nuevo, como en el caso del intermedio **69**, el rendimiento de la hidrólisis del éster es mayor en comparación con el resto debido a que la ausencia del NH pirrólico evita la descarboxilación del pirrol. La actividad inhibitoria del compuesto **89** fue evaluada, obteniendo una CI_{50} de $0.72 \pm 0.24 \mu\text{M}$, manteniéndose en el rango submicromolar (**Figura 45A**) y sirviendo como un buen punto de partida para el diseño de futuros inhibidores.

Para validar que el compuesto **89** presenta propiedades fisicoquímicas óptimas para alcanzar el SNC, se realizó el ensayo PAMPA y la predicción de sustrato de la gp-P (**Figura 45A**). Consecuentemente, se encontraron valores favorables de permeabilidad ($4.5 \pm 0.1 \cdot 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$) y resultó no ser sustrato de la gp-P. Paralelamente, como en el caso del compuesto **54**, se realizaron los ensayos de seguridad preclínicos de mutagénesis, inhibición de citocromos y cardiotoxicidad (**Figura 45A**). Si bien se obtuvieron resultados similares para este compuesto, destaca una fuerte inhibición de los citocromos CYP3A4 y CYP2C9, así como una inhibición moderada del CYP2D6. Esto podría desencadenar

interacciones farmacológicas con otros sustratos, lo que se deberá tener en cuenta en caso de continuar con el diseño de inhibidores de esta familia de compuestos.

A)



% inhibición @ 10 μM = 83.0 %

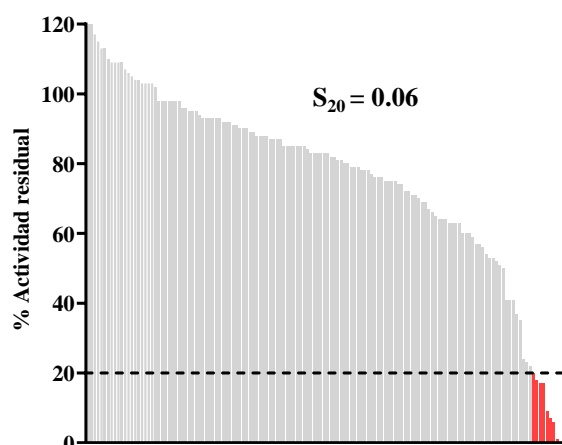
CI_{50} = $0.72 \pm 0.24 \mu\text{M}$

P_e = $4.5 \pm 0.1 \cdot 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$

No sustrato gp-P (PgpRules)

Inhibición de citocromos			Mutagénesis	Inhibición de canales iónicos		
CYP3A4	CYP2D6	CYP2C9	Test de Ames	hERG	Nav1.5	Cav1.2
0.68 μM	6.57 μM	0.86 μM	Negativo	> 50.0 μM	> 50.0 μM	12.1 μM

B)



C)

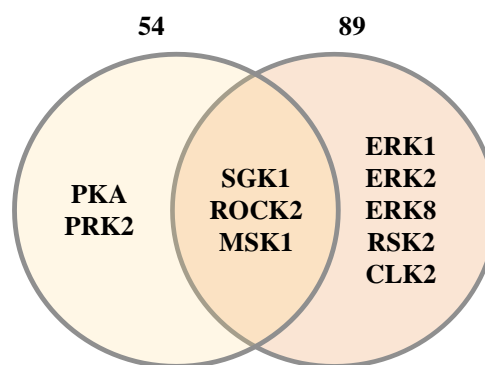


Figura 45. Caracterización biológica del compuesto 89. A) Actividad inhibitoria frente a SGK1 (porcentaje de inhibición a 10 μM y concentración inhibitoria 50), P_e del ensayo PAMPA, y predicción de sustrato de la gp-P. B) Selectividad frente a un panel de quinasas. En rojo, aquellas quinasas que mostraron una actividad residual igual o menor al 20%. El conjunto de actividades residuales que componen el gráfico puede consultarse en el repositorio de esta tesis (<https://doi.org/10.5281/zenodo.15112707>) C) Diagrama de Venn de la selectividad observada para los compuestos **54** y **89**.

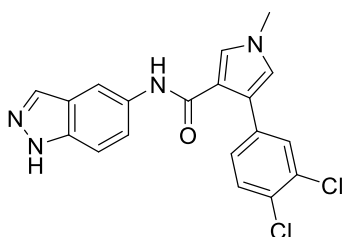
En vistas a elucidar cómo la modificación de este metilo puede alterar el perfil de selectividad de esta familia de compuestos, se evaluó su actividad en un panel de 150 quinasas a una concentración de 10 μM (**Figura 45B**) Como en el caso del compuesto **54**, se calculó el índice S_{20} para poder comparar el perfil de selectividad de ambas moléculas. En este sentido, se obtuvo un valor de 0.06, casi un 50 % menos comparado con el compuesto **54** (**Figura 41**), lo que podría indicar una mejora en términos de selectividad. Se observó la pérdida de actividad en las quinasas PRK2 y PKA, mientras que se mantuvo

Capítulo 3. Optimización del compuesto H3

la actividad frente a MSK1 y ROCK2. Además, el compuesto **89** inhibe las quinasas ERK1/2/8, RSK2 y CLK2.

Por último, como forma de validar los resultados de permeabilidad cerebral obtenidos *in vitro* e *in silico*, se procedió al estudio farmacocinético del compuesto. Los niveles en plasma y cerebro se analizaron tras la administración de una única dosis por vía oral (p.o, 10 mg·kg⁻¹), intraperitoneal (i.p, 5 mg·kg⁻¹) e intravenosa (i.v, 2.5 mg·kg⁻¹) en ratones macho (cepa BALB/c) (**Tabla 15**). Para este compuesto, se obtuvieron valores de K_p_{cerebro} de 0.25, 0.18, 0.49 para cada una de las vías de administración, respectivamente. Estos valores de permeabilidad cerebral fueron notablemente mayores que los del compuesto **54** (**Tabla 11**), lo que valida evitar el transporte activo de la gp-P como estrategia de química médica destinada a aumentar la presencia de este tipo de inhibidores en el SNC.

Tabla 15. Perfil farmacocinético del compuesto **89** en plasma y cerebro tras administración única.



Vía	Dosis / mg·kg ⁻¹	Matriz	T _{max} / h	C _{max} ^a	AUC _{final} ^b	T _{1/2} / h	K _p _{cerebro} (AUC _{final})	%F
i.v	2.5	Plasma	-	2138.85	954.87	0.93	-	-
		Cerebro	0.08	958.35	467.79	-	0.49	-
i.p	5	Plasma	0.25	902.54	793.15	1.24	-	-
		Cerebro	0.50	194.08	141.95	-	0.18	-
p.o	10	Plasma	0.50	360.06	806.97	1.83	-	21
		Cerebro	0.50	82.61	200.17	-	0.25	-

^a Expresada en ng·mL⁻¹ y ng·g⁻¹ para plasma y cerebro, respectivamente. En administración i.v., extrapolada a t = 0. ^b Expresada como h·ng·mL⁻¹ y h·ng·g⁻¹ para plasma y cerebro, respectivamente. AUC: área bajo la curva. F: biodisponibilidad.

5. Conclusiones

A partir del compuesto **H3** descubierto en el Capítulo 2, se ha sintetizado una familia congénica de compuestos, exhibiendo una relación estructura-actividad que coincide con el modo de unión propuesto. Tras la evaluación de la permeabilidad de los mejores candidatos en el modelo PAMPA, se seleccionó el compuesto **54** para continuar con los siguientes ensayos. A pesar de sus propiedades fisicoquímicas adecuadas, el estudio

farmacocinético *in vivo* del compuesto mostró niveles bajos en cerebro. Mediante aproximaciones *in silico* e *in vivo*, se descubrió que la gp-P podría explicar, al menos en parte, dicho comportamiento. Una vez identificado el NH pirrólico como el motivo estructural de esta interacción, se planteó la síntesis del compuesto **89** como un segundo candidato capaz de evitar este mecanismo de transporte activo, lo cual fue confirmado mediante su estudio farmacocinético *in vivo*. Por tanto, esto posiciona al compuesto **89** como un nuevo punto de partida en el diseño de inhibidores SGK1 que presenten tanto actividad inhibitoria como permeabilidad cerebral elevadas.

**CAPÍTULO 4. EVALUACIÓN DE LA
NEUROPROTECCIÓN DE LOS INHIBIDORES
DE SGK1**

1. Elección de modelos y compuestos

Durante el Capítulo 3, se ha sintetizado una colección de inhibidores de SGK1 en un rango de potencia suficiente para ser evaluados en modelos relacionados con la neurodegeneración. Mientras que los resultados en el Capítulo 1 descartaron el espectro de las TDP43-patías como patologías donde la inhibición de SGK1 podría ser beneficiosa, la EA o la EP surgieron como posibles escenarios terapéuticos. Por ello, se procedió a evaluar la actividad neuroprotectora de estos compuestos en modelos *in vitro* e *in vivo* asociados a estas dos últimas enfermedades. La selección de los compuestos a evaluar se basó en dos criterios: primero, que la CI_{50} fuera inferior a 1 μ M, y segundo, que los valores de Pe fueran lo suficientemente elevados para clasificarlos como SNC+ o SNC +/- (Capítulo 3, sección 4.1, **Figura 40**), lo que resultó en 11 candidatos en el momento de la realización de este trabajo.

2. Evaluación de la citotoxicidad de los inhibidores de SGK1

Como primer paso en la caracterización de la actividad biológica de estos inhibidores, se comprobó su potencial toxicidad. Dado que el objetivo último de estos inhibidores es actuar en el SNC, se utilizó la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y, siendo un modelo de gran relevancia en el contexto de las enfermedades neurodegenerativas.

Las células fueron tratadas con los compuestos durante 24 h a diferentes concentraciones. Posteriormente, se cuantificó la viabilidad celular mediante el uso de bromuro de 2,5-difenil-(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il))tetrazolio (MTT). Se estableció una reducción del 20 % en la viabilidad celular como el límite para considerar que un compuesto presentaba toxicidad (**Figura 46**). No se observó toxicidad para la mayoría de compuestos a las concentraciones evaluadas, a excepción del compuesto **54**, el cual mostró una ligera toxicidad a 5 μ M. Ante estos datos, se optó por utilizar una concentración de 5 μ M para todos los compuestos, a excepción del compuesto **54**, para el cual se seleccionó la concentración de 1 μ M.

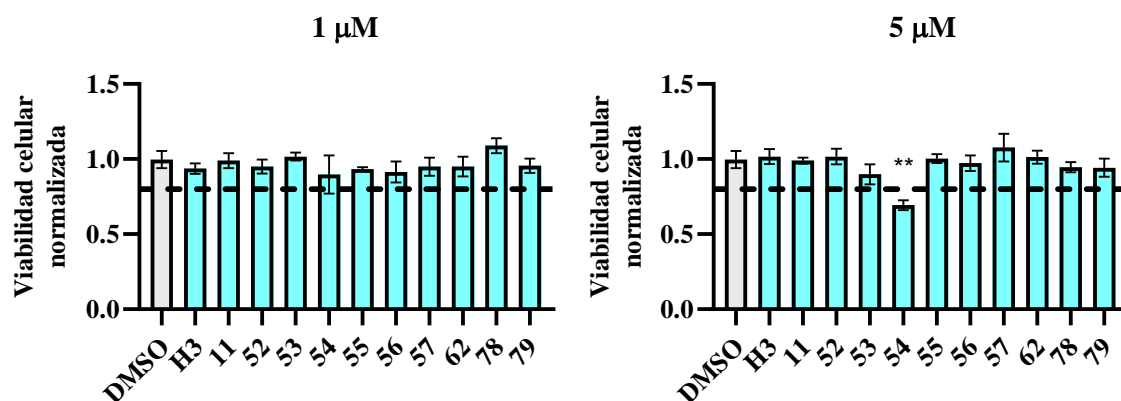


Figura 46. Viabilidad celular en presencia de los inhibidores de SGK1 a 1 y 5 μM en células SH-SY5Y. $n = 3$ réplicas biológicas. Significancia estadística calculada mediante ANOVA con corrección *post-hoc* de Dunnett. ** p-valor < 0.01.

3. Evaluación de la neuroprotección de los inhibidores de SGK1 en modelos de la enfermedad de Alzheimer

Una vez determinada la dosis de tratamiento de estos compuestos, se procedió a evaluar su neuroprotección en contextos relacionados con la EA. Como se expone en la Introducción de esta tesis (Capítulo 1, sección 5.4, **Figura 16**), SGK1 puede fosforilar a la proteína tau, concretamente en el epítipo Ser214.¹⁰⁹ Se ha documentado un aumento de esta fosforilación en diferentes modelos, como el Tg106 o el Tg-Prp-TAU^{P301S}.^{117,119} Además, se ha propuesto que SGK1 podría activar GSK3 β , lo que indicaría que su inhibición podría reducir la actividad de GSK3 β y, en consecuencia, disminuir la fosforilación de tau en la Ser396. Esta hipótesis ha sido comprobada tanto en modelos celulares como animales.¹¹⁷ Dado que la línea celular SH-SY5Y expresa la proteína tau, este modelo resulta adecuado para comprobar el papel de SGK1 en la homeostasis de esta proteína.

3.1. Neuroprotección de los inhibidores de SGK1 frente al ácido okadaico

La neuroprotección de los inhibidores de SGK1 fue evaluada mediante el uso de ácido okadaico (AO). Esta toxina es capaz de inhibir las fosfatasa 1 (PP1) y 2A (PP2A), alterando el balance de fosforilaciones y desfosforilaciones de muchos sustratos celulares.²⁰⁶ Como resultado, se produce la fosforilación activante de muchas quinasas, junto a la hiperfosforilación de la proteína tau, lo que provoca su agregación patológica y la muerte neuronal. En consecuencia, el uso de inhibidores quinasa es una estrategia

interesante para restaurar el balance de fosforilaciones, lo que se traduce en un aumento de la supervivencia celular.²⁰⁶ Esto hace que el modelo de AO pueda utilizarse para cribar inhibidores quinasa con potencial neuroprotector.^{207,208}

En lo que respecta a SGK1, algunos autores han descrito cómo el AO aumenta la actividad de esta quinasa, lo cual podría deberse a que la PP2A mantiene constitutivamente desfosforilada a SGK1, disminuyendo su actividad.^{209,210}

Por todo lo anteriormente expuesto, se comprobó si los inhibidores sintetizados en esta tesis doctoral eran capaces de proteger a las células SH-SY5Y del efecto tóxico del AO. Para ello, se incubaron con los compuestos a las concentraciones descritas y, 1 h después, se añadió el AO a una concentración final de 30 nM. 24 h después, se cuantificó la viabilidad celular mediante el uso de MTT (**Figura 47**). La presencia del AO provocó una reducción en la viabilidad celular del 54 % respecto al control, lo que está de acuerdo con lo descrito en la literatura.²¹¹ Este modelo mostró que la mayoría de compuestos evaluados eran capaces de recuperar parcialmente la viabilidad celular en presencia de AO, con diferencias estadísticamente significativas para los compuestos **H3, 52, 54, 55, 62, 78** y **79**, así como el control positivo GSK650394, un conocido inhibidor de SGK1 (Introducción, sección 5.6, **Figura 17**).^{122,114}

²⁰⁶ Kamat, P. K.; Rai, S.; Swarnkar, S.; Shukla, R.; Nath, C. Molecular and Cellular Mechanism of Okadaic Acid (OKA)-Induced Neurotoxicity: A Novel Tool for Alzheimer's Disease Therapeutic Application. *Mol. Neurobiol.* **2014**, *50* (3), 852–865.

²⁰⁷ Góral, I.; Wichur, T.; Sługocka, E.; Grygier, P.; Głuch-Lutwin, M.; Mordyl, B.; Honkisz-Orzechowska, E.; Szałaj, N.; Godyń, J.; Panek, D.; Zaręba, P.; Sarka, A.; Żmudzki, P.; Latacz, G.; Pustelny, K.; Bucki, A.; Czarna, A.; Menezes, F.; Więckowska, A. Exploring Novel GSK-3 β Inhibitors for Anti-Neuroinflammatory and Neuroprotective Effects: Synthesis, Crystallography, Computational Analysis, and Biological Evaluation. *ACS Chem. Neurosci.* **2024**, *15* (17), 3181–3201.

²⁰⁸ Yadikar, H.; Torres, I.; Aiello, G.; Kurup, M.; Yang, Z.; Lin, F.; Kobeissy, F.; Yost, R.; Wang, K. K. Screening of Tau Protein Kinase Inhibitors in a Tauopathy-Relevant Cell-Based Model of Tau Hyperphosphorylation and Oligomerization. *PLoS One* **2020**, *15* (7), e0224952.

²⁰⁹ Perrotti, N.; He, R. A.; Phillips, S. A.; Haft, C. R.; Taylor, S. I. Activation of Serum- and Glucocorticoid-Induced Protein Kinase (Sgk) by Cyclic AMP and Insulin. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (12), 9406–9412.

²¹⁰ Gu, W.; Zheng, H.; Canessa, C. M. Phosphatases Maintain Low Catalytic Activity of SGK1: DNA Damage Resets the Balance in Favor of Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **2023**, *299* (8), 104941.

²¹¹ Hayashi, A.; José Dorantes-Aranda, J.; Bowman, J. P.; Hallegraef, G. Combined Cytotoxicity of the Phycotoxin Okadaic Acid and Mycotoxins on Intestinal and Neuroblastoma Human Cell Models. *Toxins* **2018**, *10* (12), 526.

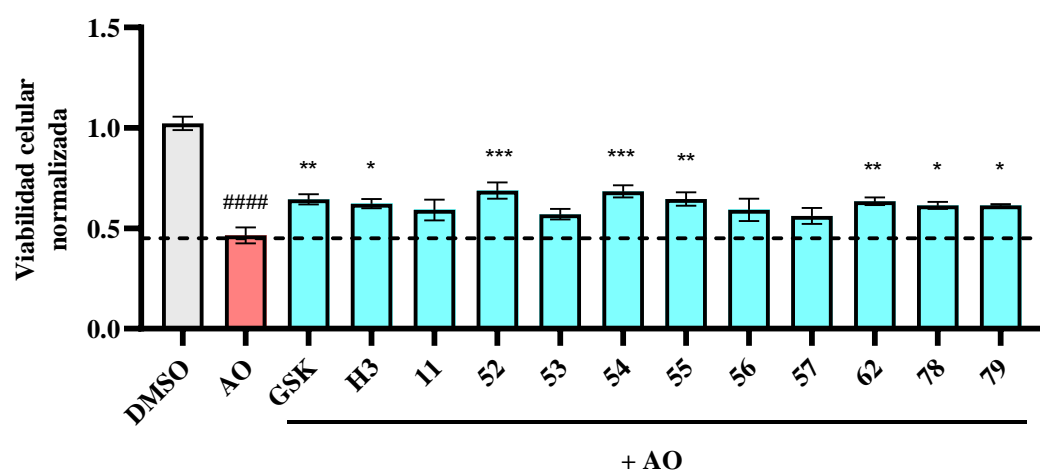


Figura 47. Neuroprotección de los inhibidores de SGK1 frente al AO. GSK: GSK650394 a 10 μ M como control positivo. Los inhibidores fueron evaluados a 5 μ M excepto el compuesto **54** (1 μ M). AO evaluado a 30 nM. $n \geq 3$ réplicas biológicas. Significancia estadística calculada mediante ANOVA con corrección *post-hoc* de Dunnett. # DMSO vs. AO. * A.O vs. compuesto. * p-valor < 0.05, ** p-valor < 0.01, *** p-valor < 0.001.

3.2. Caracterización de los niveles de tau en presencia de los inhibidores de SGK1

Dado que los inhibidores de SGK1 fueron capaces de neuroproteger en el modelo de AO, se procedió a comprobar si estos compuestos podían modificar los niveles de fosforilación de tau en la línea celular SH-SY5Y. De los siete compuestos que mostraron efecto neuroprotector, se utilizaron los compuestos **52**, **54**, **78** y **79**.

3.2.1. Cuantificación de los niveles de p-Ser396 tau

Se cuantificaron tanto los niveles de fosforilación de tau en el epítipo Ser396 (p-Ser396 tau) como los niveles totales de proteína. Para ello, las células fueron incubadas con los inhibidores durante 6 h. Posteriormente, se cuantificó la cantidad de p-Ser396 tau y tau total en los extractos proteicos para cada condición mediante un kit ELISA (**Figura 48**). Se utilizó tideglusib como control positivo, un conocido inhibidor de GSK3 β (Introducción, sección 4.1, **Figura 13**).⁸⁵

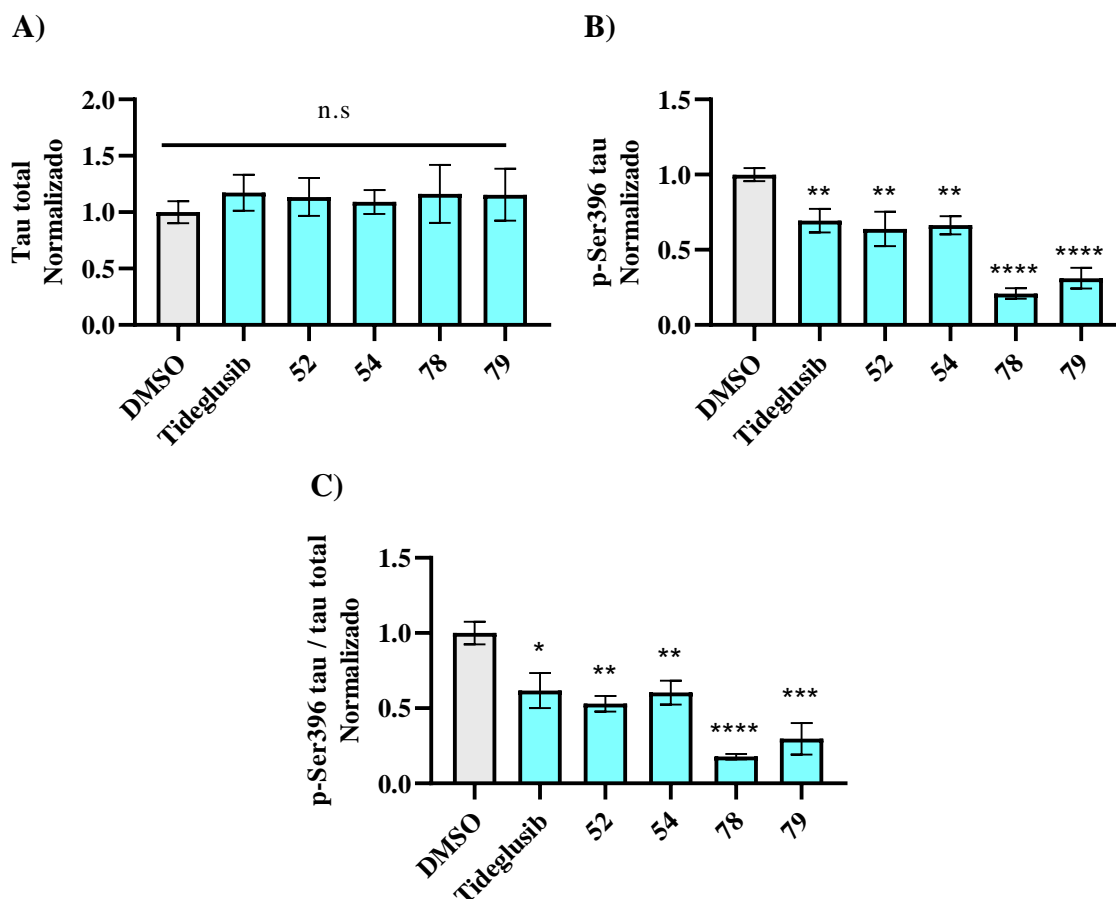
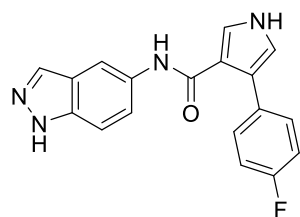


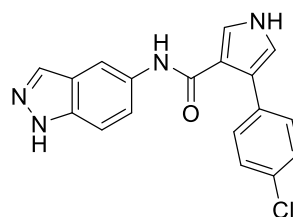
Figura 48. Niveles de p-Ser396 tau en la línea celular SH-SY5Y en presencia de los inhibidores de SGK1. A) Niveles de tau total. n.s: sin diferencias significativas. B) Niveles de p-Ser396 tau. C) Niveles de p-Ser396 tau normalizados frente a los niveles de tau total. Tideglusib a 10 μ M como control positivo. Los inhibidores fueron evaluados a 5 μ M excepto el compuesto **54** (1 μ M). $n \geq 3$ réplicas biológicas. Significancia estadística calculada mediante ANOVA con corrección *post-hoc* de Dunnett. * p-valor < 0.05, ** p-valor < 0.01, *** p-valor < 0.001, **** p-valor < 0.0001.

Los compuestos **52**, **54**, **78** y **79** mostraron una reducción significativa de los niveles de p-Ser396 tau sin alterar los niveles de tau total. Sorprendentemente, los inhibidores que disponen de un anillo de pirazol (**78** y **79**) mostraron una reducción mucho mayor que el tideglusib. Si bien es posible que la inhibición de SGK1 desencadene la inactivación de GSK3 β y, por ende, la reducción en los niveles de p-Ser396 tau, la actividad de estos dos compuestos es realmente llamativa. Una posible explicación es que los inhibidores con un anillo de pirazol sean capaces de inhibir dualmente SGK1 y GSK3 β , resultando en una reducción mayor de los niveles de fosfotau. Para comprobar esta hipótesis, se evaluó la actividad inhibitoria *in vitro* de los cuatro compuestos frente a GSK3 β mediante la metodología Kinase-Glo (**Figura 49**).



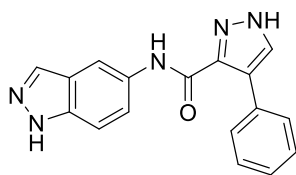
52

CI_{50} SGK1 = $0.33 \pm 0.23 \mu\text{M}$
 CI_{50} GSK3 β = $5.17 \pm 0.70 \mu\text{M}$



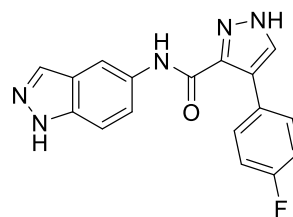
54

CI_{50} SGK1 = $0.11 \pm 0.02 \mu\text{M}$
 CI_{50} GSK3 β = $3.39 \pm 0.23 \mu\text{M}$



78

CI_{50} SGK1 = $0.40 \pm 0.02 \mu\text{M}$
 CI_{50} GSK3 β = $0.04 \pm 0.01 \mu\text{M}$



79

CI_{50} SGK1 = $0.35 \pm 0.04 \mu\text{M}$
 CI_{50} GSK3 β = $0.03 \pm 0.01 \mu\text{M}$

Figura 49. Evaluación de la actividad inhibitoria frente a SGK1 y GSK3 β de los inhibidores sintetizados. CI_{50} : concentración inhibitoria 50.

Los compuestos **52** y **54** mostraron valores de CI_{50} en el rango micromolar (5.17 ± 0.70 y $3.39 \pm 0.23 \mu\text{M}$, respectivamente), lo que hace improbable que el efecto en la reducción de los niveles de p-Ser396 tau se deba a una inhibición directa en GSK3 β . Sin embargo, los compuestos **78** y **79** resultaron ser inhibidores de esta quinasa en el rango nanomolar (0.04 ± 0.01 y $0.03 \pm 0.01 \mu\text{M}$, respectivamente). Por tanto, es posible que esta inhibición dual esté detrás de la notable reducción de los niveles en p-Ser396 tau.

3.2.2. Cuantificación de los niveles de p-Ser214 tau

Una vez comprobado que los inhibidores son capaces de reducir los niveles de p-Ser396 tau sin reducir los niveles totales de proteína, se procedió a cuantificar los niveles de fosforilación de tau en el epítipo Ser214 (p-Ser214 tau), el cual es fosforilado por SGK1, entre otras quinasas.

Para ello, los extractos proteicos obtenidos en las anteriores condiciones fueron analizados mediante *western blot* con un anticuerpo específico para p-Ser214 tau (**Figura 50**). Los experimentos mostraron una tendencia a la disminución en los niveles de p-Ser214

tau en los inhibidores utilizados, con diferencias estadísticamente significativas para los compuestos **52**, **54** y **79**.

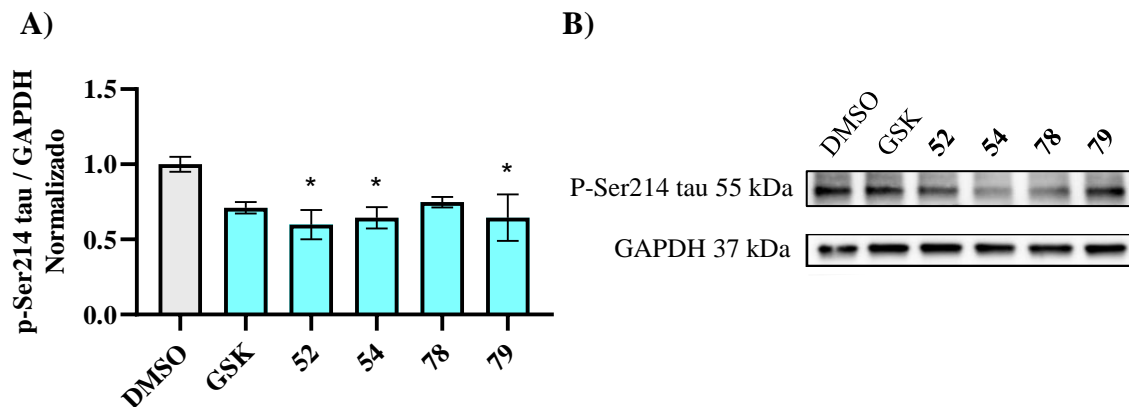


Figura 50. Cuantificación de los niveles de p-Ser214 tau en presencia de los inhibidores de SGK1. A) Niveles de p-Ser214 tau normalizados frente al control de carga. GSK: GSK650394 a 10 μ M como control positivo. Los inhibidores fueron evaluados a 5 μ M excepto el compuesto **54** (1 μ M). n = 3 réplicas biológicas. Significancia estadística calculada mediante ANOVA con corrección *post-hoc* de Dunnett. * p-valor < 0.05. **B)** *Inmunoblot* representativo de los experimentos de *western blot*.

En definitiva, estos resultados mostraron que los inhibidores de SGK1 sintetizados en este trabajo son capaces de, por un lado, neuroproteger en presencia del AO, y por otro lado, reducir la fosforilación de la proteína tau. Dado que la agregación proteica de tau es una de las principales características de patologías neurodegenerativas como la EA, estos inhibidores pueden posicionarse como herramientas eficaces para frenar este tipo de enfermedades.

3.3. Elucidación del papel de SGK1 en la enfermedad de Alzheimer mediante farmacología de sistemas

Aunque resulta de vital interés caracterizar la actividad biológica de los inhibidores de SGK1 sobre marcadores específicos, las patologías neurodegenerativas presentan un ecosistema de vías moleculares alteradas y altamente relacionadas entre sí. Las proteínas, como agentes clave que determinan la mayoría de procesos celulares, rara vez actúan de manera aislada. Por el contrario, la diversidad de procesos que tienen lugar en un contexto fisiológico surge de la interacción de múltiples proteínas y otras biomoléculas. Debido al exponencial crecimiento de las técnicas ómicas, nuestro conocimiento sobre este conjunto de interacciones (o interactoma) es cada vez más extenso. Las estimaciones más prudentes

recogen un total más de 250000 interacciones validadas para 16582 proteínas, si bien este número podría alcanzar los 6 millones si se rebaja el umbral de confianza.²¹²

Son estas interacciones las que determinan el fenotipo de un organismo, y de la misma manera, son las alteraciones dentro de esta red lo que provoca la aparición de una determinada patología. Entender este conjunto de interacciones aporta una visión mucho más realista de lo que subyace detrás de una enfermedad. Por tanto, el objetivo de comprender el potencial de una diana terapéutica no debería limitarse exclusivamente a su relación con marcadores específicos, sino también entender cómo se relaciona dentro de este complejo interactoma. No obstante, dado el volumen de información del que se dispone, se requiere de aproximaciones que permitan generar modelos aprehensibles. En este sentido, la farmacología de sistemas integra el conocimiento de diversas disciplinas para generar modelos matemáticos, los cuales permiten comprender el papel de los fármacos y sus respectivas dianas terapéuticas dentro de un sistema biológico.²¹³ Mediante esta aproximación, se procedió al estudio del potencial papel de SGK1 dentro de la EA durante una estancia realizada en la Universidad de Concepción en el Departamento de Farmacología bajo la supervisión del Dr. David Ramírez.

3.3.1. Red de interacciones proteína-proteína en la enfermedad de Alzheimer

En primer lugar, se procedió a elaborar una red de interacciones proteína-proteína (*protein-protein interaction network*, PPI_n) involucradas en la EA. Si bien existe un gran número de interacciones proteína-proteína en el interactoma, no todas son igual de relevantes en el estudio de una enfermedad. Para ello, se recurrió a las bases de datos Therapeutic Target Database (TTD) y ChEMBL.^{214,215} Ambas bases de datos recopilan, por un lado, la lista de dianas terapéuticas asociadas a enfermedades y, por otro lado, todas las entidades moleculares que han mostrado potencial terapéutico en contextos patológicos, desde fases preclínicas hasta su aprobación en el mercado. Tras la fusión de ambas bases de datos, se retuvieron solo aquellas dianas que han mostrado relevancia terapéutica en la EA (**Figura 51A**).

²¹² Ramos, R. H.; de Oliveira Lage Ferreira, C.; Simao, A. Human Protein-Protein Interaction Networks: A Topological Comparison Review. *Heliyon* **2024**, *10* (5), e27278.

²¹³ Azer, K.; Kaddi, C. D.; Barrett, J. S.; Bai, J. P. F.; McQuade, S. T.; Merrill, N. J.; Piccoli, B.; Neves-Zaph, S.; Marchetti, L.; Lombardo, R.; Parolo, S.; Immanuel, S. R. C.; Baliga, N. S. History and Future Perspectives on the Discipline of Quantitative Systems Pharmacology Modeling and Its Applications. *Front. Physiol.* **2021**, *12*, 637999.

²¹⁴ Zhou, Y.; Zhang, Y.; Zhao, D.; Yu, X.; Shen, X.; Zhou, Y.; Wang, S.; Qiu, Y.; Chen, Y.; Zhu, F. TTD: Therapeutic Target Database Describing Target Druggability Information. *Nucleic Acids Res.* **2024**, *52* (D1), D1465–D1477.

²¹⁵ Nowotka, M. M.; Gaulton, A.; Mendez, D.; Bento, A. P.; Hersey, A.; Leach, A. Using ChEMBL Web Services for Building Applications and Data Processing Workflows Relevant to Drug Discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **2017**, *12* (8), 757–767.

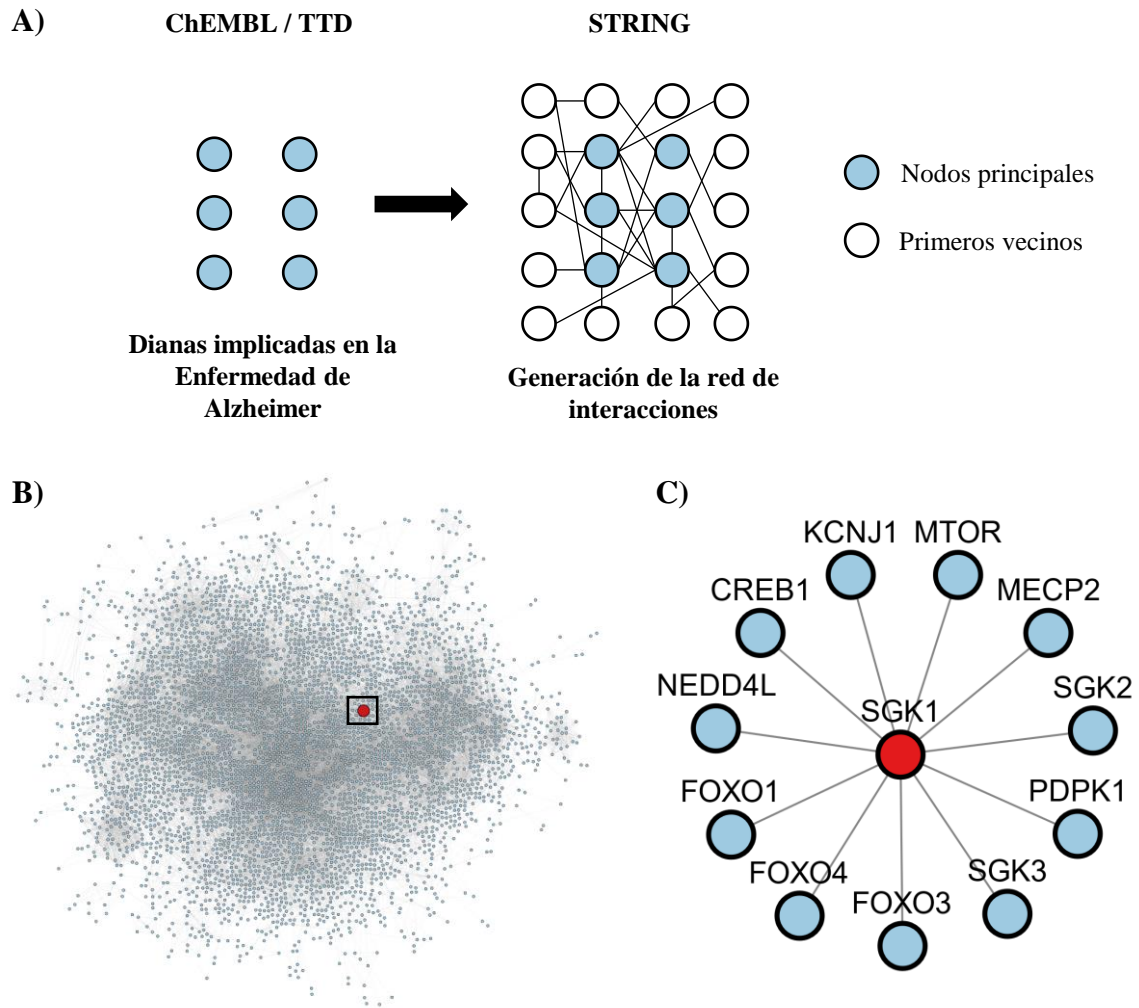


Figura 51. Red de interacciones proteína-proteína en la enfermedad de Alzheimer. **A)** Construcción de la red. Usando las bases de datos de ChEMBL y TTD, se seleccionan las dianas farmacológicas relevantes en la EA, sirviendo como nodos principales de la red. Estos nodos sirven como semilla para construir la red mediante la base de datos STRING, la cual anota las interacciones de los nodos principales y de los primeros vecinos descritos. **B)** Red de interacciones proteína-proteína resultante. En rojo, SGK1. **C)** Primeros vecinos de SGK1. Los nodos se indican con el nombre del gen.

Posteriormente, se recurrió a la base de datos de STRING para construir las interacciones de la PPI_n.²¹⁶ Como filtro, se requirió que las interacciones hayan sido o bien validadas experimentalmente ($e_{score} \geq 0.7$) o que se encuentren ampliamente descritas en diferentes bases de datos ($d_{score} \geq 0.7$), las cuales pueden ser físicas (formación de complejos proteína-proteína) o funcionales (influencia de una proteína sobre otra, sin necesidad de contacto físico descrito). Además de incluir las interacciones dentro de los nodos principales, se incorporaron aquellas proteínas que interactúan directamente con

²¹⁶ Szklarczyk, D.; Kirsch, R.; Koutrouli, M.; Nastou, K.; Mehryary, F.; Hachilif, R.; Gable, A. L.; Fang, T.; Doncheva, N. T.; Pyysalo, S.; Bork, P.; Jensen, L. J.; von Mering, C. The STRING Database in 2023: Protein-Protein Association Networks and Functional Enrichment Analyses for Any Sequenced Genome of Interest. *Nucleic Acids Res.* **2023**, *51* (D1), D638–D646.

ellos, también conocidos como primeros vecinos. Para delimitar el tamaño de la PPI_n, se determinó un máximo de 20 primeros vecinos por diana, obteniendo un total de 4586 nodos y 26297 interacciones (**Figura 51B**).

En cuanto a los primeros vecinos de SGK1, se encuentran nodos comentados en la Introducción de este trabajo (sección 5.2) como la familia de factores de transcripción FOXO, las quinasas activadoras de SGK1 mTOR y PDK1 (*PDPK1*) y la ubiquitina ligasa NEDD4, responsable de la regulación de canales de Na⁺. Adicionalmente, aparecen otros factores de transcripción como la proteína de unión a CpG metilado 2 (MECP2) y la proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP 1 (CREB1), el canal iónico KCa2.1 (*KCNJ1*) y el resto de isoformas de la familia SGK (SGK2/3) (**Figura 51C**).

3.3.2. Análisis del entorno de interacciones de SGK1

Los primeros vecinos de una diana de interés (en este caso, SGK1) dentro de una PPI_n son fácilmente identificables. Sin embargo, extender el análisis a los segundos vecinos (es decir, conectados a SGK1 mediante un nodo intermedio) entraña varias dificultades. Los nodos que conforman este tipo de PPI_n están altamente interconectados, lo que hace que el número de segundos vecinos crezca exponencialmente. No todos esos nodos son igual de importantes en un contexto patológico, por lo que se requiere del uso de algoritmos que permita discernir qué segundos vecinos deben ser investigados.

Para definir qué nodos deben ser estudiados en relación con SGK1, se utilizó la base de datos Open Targets.²¹⁷ Esta recopila el conjunto de dianas terapéuticas para múltiples enfermedades mediante un sistema de puntuación, el cual incluye datos de expresión génica, proteómica, distintas bases de datos y la información recopilada en la literatura. Dicha puntuación se encuentra en un rango de 0 a 1, siendo 1 la mayor puntuación que puede obtener una diana. Para este trabajo, se seleccionaron las dianas involucradas en la EA con una puntuación mayor o igual a 0.05 (1725 entradas o dianas de interés).

Como segundo paso, se calculó si alguna de estas 1725 entradas era un posible segundo vecino de SGK1. Para ello, se aplicó el algoritmo de los caminos cortos.²¹⁸ En

²¹⁷ Ochoa, D.; Hercules, A.; Carmona, M.; Suveges, D.; Gonzalez-Uriarte, A.; Malangone, C.; Miranda, A.; Fumis, L.; Carvalho-Silva, D.; Spitzer, M.; Baker, J.; Ferrer, J.; Raies, A.; Razuvayevskaya, O.; Faulconbridge, A.; Petsalaki, E.; Mutowo, P.; Machlitt-Northen, S.; Peat, G.; McAuley, E.; Ong, C. K.; Mountjoy, E.; Ghousaini, M.; Pierleoni, A.; Papa, E.; Pignatelli, M.; Koscielny, G.; Karim, M.; Schwartzenuber, J.; Hulcoop, D. G.; Dunham, I.; McDonagh, E. M. Open Targets Platform: Supporting Systematic Drug-Target Identification and Prioritisation. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49* (D1), D1302–D1310.

²¹⁸ Scalfani, V. F.; Patel, V. D.; Fernandez, A. M. Visualizing Chemical Space Networks with RDKit and NetworkX. *J. Cheminform.* **2022**, *14* (1), 87.

teoría de grafos, este algoritmo toma un nodo raíz (SGK1) y explora las vías con menos intermedios entre el nodo raíz y una lista de nodos de interés, en este caso las 1725 dianas. Estos caminos cortos son considerados única y exclusivamente si su longitud es menor o igual a 3, incluyendo así únicamente los segundos vecinos de SGK1 como longitud máxima. Si hay varios caminos cortos con la misma longitud, todos ellos son utilizados (Figura 52A).

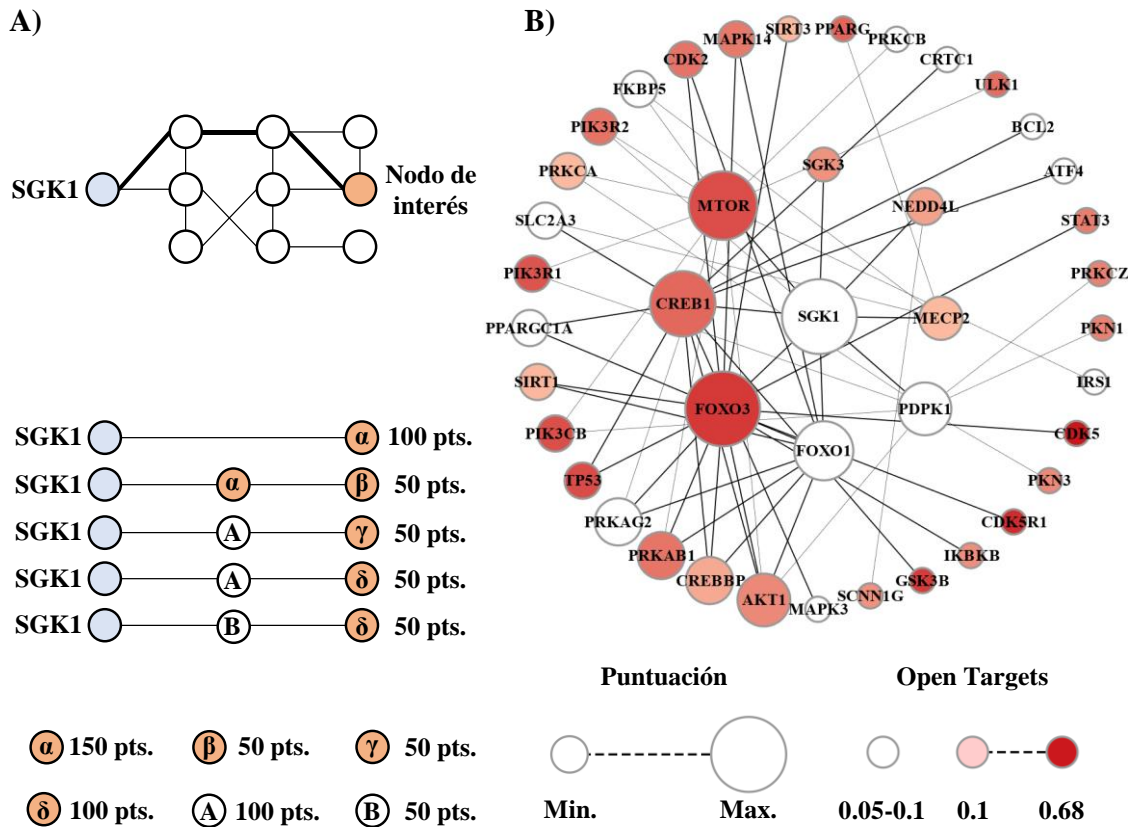


Figura 52. Análisis de las interacciones de dianas de interés con SGK1. A) Algoritmo de los caminos cortos y función de puntuación de los nodos. **B)** Primeros y segundos vecinos de SGK1 (primera y segunda esfera, respectivamente) con implicación en la enfermedad de Alzheimer. Las conexiones entre nodos resaltadas en negro corresponden a las interacciones de SGK1 con sus primeros vecinos y las interacciones de FOXO1/FOXO3/CREB1 con sus segundos vecinos.

Una vez encontrados estos caminos cortos, se asigna una puntuación a los nodos que componen estos caminos:

- Si se encuentran en un camino sin intermedios (primeros vecinos): 100 puntos.
- Si se encuentran en un camino con un intermedio (segundos vecinos): 50 puntos.

Si un nodo se encuentra en varios caminos distintos, las puntuaciones son aditivas. Con este sistema pueden identificarse, primero, aquellos primeros vecinos involucrados un

mayor número de veces en los caminos cortos hacia los segundos vecinos. Y segundo, qué segundos vecinos han sido encontrados mediante varios caminos cortos (**Figura 52A**). En teoría, si existen varios caminos cortos hacia el mismo segundo vecino, este se encuentra más relacionado con SGK1 desde un punto de vista topológico.

Este análisis mostró que, de los primeros vecinos iniciales de SGK1 (**Figura 51C**), KCJN1, FOXO4 y SGK2 ni tienen una puntuación superior a 0.05 en Open Targets ni fueron intermediarios para conectar con los 1725 nodos de interés. Segundo, FOXO3, CREB1 y mTOR obtuvieron las mayores puntuaciones (700, 650 y 600, respectivamente), además de estar incluidas dentro de las 1725 dianas farmacológicas (puntuaciones en Open Targets de 0.56, 0.49 y 0.40, respectivamente). Si bien FOXO1 tiene una puntuación más baja que las anteriores en la EA (0.08), se encontró altamente implicada como intermediaria entre SGK1 y sus segundos vecinos (500 puntos) (**Figura 52B**). En cuanto a los segundos vecinos, destacaron proteínas con una alta implicación en la EA como CDK5 (0.68) GSK3 β (0.55), o p53 (*TP53*, 0.49). Merece la pena destacar que AKT1, CREBBP, PRKAB1 y PRKAG2 aparecieron con puntuaciones superiores a 50, lo que implica que existen varios caminos cortos que llegan a estos nodos de interés (**Figura 52B**).

Por otro lado, resultó llamativo el hecho de que los factores de transcripción FOXO1/3 y CREB1 sirvieron de intermediarios para conectar SGK1 con 20 de los 33 nodos de interés. Es bien conocido cómo SGK1 es capaz de fosforilar a FOXO1/3, promoviendo su localización extranuclear e impidiendo la transcripción de diferentes genes.^{100,115,118} Algunos autores han descrito cómo la actividad de estos factores de transcripción es capaz de proteger de la muerte neuronal causada por el β A.²¹⁹ También se ha documentado una clara correlación entre los bajos niveles de actividad de la familia FOXO y un aumento del β A y la fosforilación de tau.²²⁰ Además, parece que un aumento en la actividad de FOXO3 en astrocitos promueve la eliminación de las placas de β A.²²¹ Por otro lado, SGK1 es capaz de fosforilar CREB1 en la Ser113, si bien se desconoce las implicaciones patológicas que esto pudiera tener.²²² No obstante, sí que se ha descrito una alteración en los niveles de

²¹⁹ Du, S.; Zheng, H. Role of FoxO Transcription Factors in Aging and Age-Related Metabolic and Neurodegenerative Diseases. *Cell Biosci.* **2021**, *11* (1), 188.

²²⁰ Sajan, M.; Hansen, B.; Ivey, R. 3rd; Sajan, J.; Ari, C.; Song, S.; Braun, U.; Leitges, M.; Farese-Higgs, M.; Farese, R. V. Brain Insulin Signaling Is Increased in Insulin-Resistant States and Decreases in FOXOs and PGC-1 α and Increases in A β 1-40/42 and Phospho-Tau May Abet Alzheimer Development. *Diabetes* **2016**, *65* (7), 1892–1903.

²²¹ Du, S.; Jin, F.; Maneix, L.; Gedam, M.; Xu, Y.; Catic, A.; Wang, M. C.; Zheng, H. FoxO3 Deficiency in Cortical Astrocytes Leads to Impaired Lipid Metabolism and Aggravated Amyloid Pathology. *Aging Cell* **2021**, *20* (8), e13432.

²²² Tyan, S.-W.; Tsai, M.-C.; Lin, C.-L.; Ma, Y.-L.; Lee, E. H. Y. Serum- and Glucocorticoid-Inducible Kinase 1 Enhances Zif268 Expression through the Mediation of SRF and CREB1 Associated with Spatial Memory Formation. *J. Neurochem.* **2008**, *105* (3), 820–832.

fosforilación y de actividad de este factor de transcripción en varias enfermedades neurodegenerativas.²²³ Todo esto abre una nueva vía de estudio enfocada a si los inhibidores de SGK1 son capaces de alterar estos nodos de interés a través de la modulación de estos factores de transcripción.

3.3.3. Análisis modular de la red de interacciones proteína-proteína

Las PPIs pueden analizarse en busca de redes más pequeñas dentro de la misma, también conocidos como módulos. En teoría de grafos, estos módulos pueden ser topológicos, es decir, un conjunto de nodos con muchas más conexiones entre sí que con el resto de nodos fuera del módulo, o funcionales, cuando las proteínas que conforman el módulo se encargan de procesos biológicos similares. Cuando ambas características coinciden en una PPI, estos módulos representan nodos altamente interconectados y encargados de vías moleculares concretas (**Figura 53**).^{224,225}

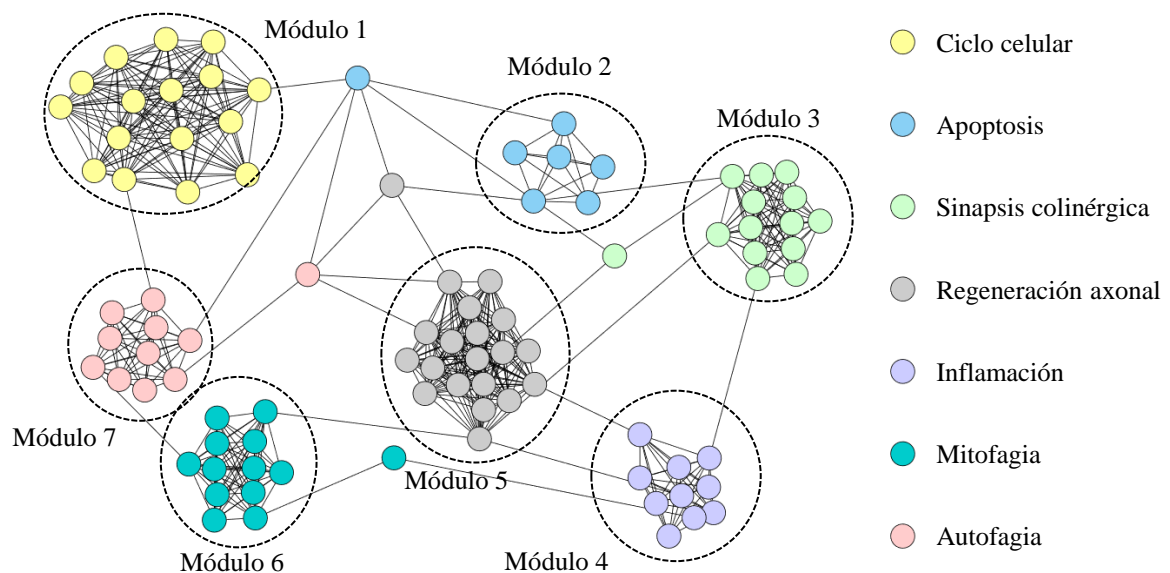


Figura 53. Ejemplo representativo de los módulos en una red de interacciones proteína-proteína. Los círculos indican los módulos detectados. En colores, diferentes vías moleculares arbitrarias.

Mientras que las propiedades topológicas pueden calcularse mediante métricas clásicas como el grado, la centralidad, o la modularidad de los nodos, las propiedades

²²³ Saura, C. A.; Valero, J. The Role of CREB Signaling in Alzheimer's Disease and Other Cognitive Disorders. *Rev. Neurosci. (Berlin, Ger.)* **2011**, *22* (2), 153–169.

²²⁴ Vella, D.; Marini, S.; Vitali, F.; Di Silvestre, D.; Mauri, G.; Bellazzi, R. MTGO: PPI Network Analysis Via Topological and Functional Module Identification. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 5499.

²²⁵ Vella, D.; Zoppis, I.; Mauri, G.; Mauri, P.; Di Silvestre, D. From Protein-Protein Interactions to Protein Co-Expression Networks: A New Perspective to Evaluate Large-Scale Proteomic Data. *EURASIP J. Bioinforma. Syst. Biol.* **2017**, *2017* (1), 6.

funcionales pueden asignarse mediante códigos de la base de datos KEGG.²²⁶ Cada término KEGG identifica un proceso molecular concreto, así como los genes y proteínas involucrados en este. Una vez identificadas tanto las características topológicas como funcionales que conforman los módulos, se puede interpretar la PPI en base a qué módulos han sido generados y como interaccionan estos entre sí.

En primer lugar, se procedió a la búsqueda de los términos KEGG más representativos de la PPI. Para ello, se realizó un análisis de enriquecimiento funcional de la misma mediante los programas ShinyGO y EnrichR.^{227,228} Este análisis permite identificar si, dentro de la PPI, existen ciertos conjuntos de proteínas sobrerrepresentados, comparándolos con lo que se esperaría por azar. Esto se realiza para todos los términos KEGG, resultando en un factor de enriquecimiento y un p-valor asociado para cada vía molecular. De esta manera, se obtiene una lista de términos KEGG ampliamente representados en la red, reteniendo únicamente aquellos que mostraron un p-valor < 0.05. Tras este filtro, se retuvieron 294 y 295 términos KEGG provenientes de EnrichR y ShinyGO, respectivamente (**Figura 54**). En cuanto a SGK1, esta quinasa fue identificada en 4 términos KEGG (**Tabla 16**).

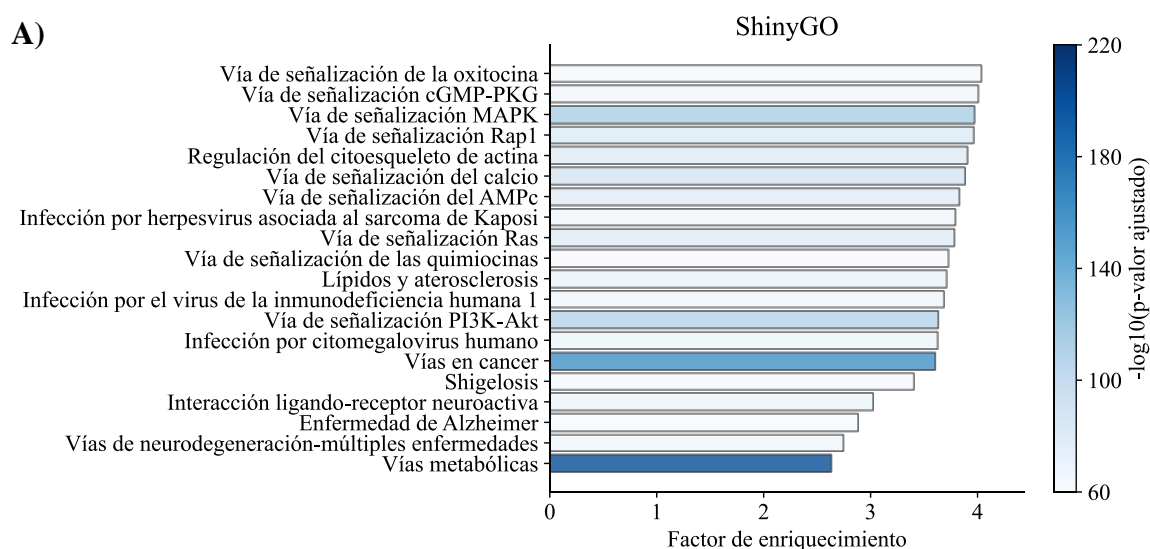


Figura 54. Los 20 términos KEGG mas significativos en la red de interacciones proteína-proteína. A) Términos KEGG obtenidos por ShinyGO.

²²⁶ Kanehisa, M.; Furumichi, M.; Sato, Y.; Kawashima, M.; Ishiguro-Watanabe, M. KEGG for Taxonomy-Based Analysis of Pathways and Genomes. *Nucleic Acids Res.* **2023**, *51* (D1), D587–D592.

²²⁷ Ge, S. X.; Jung, D.; Yao, R. ShinyGO: A Graphical Gene-Set Enrichment Tool for Animals and Plants. *Bioinformatics* **2020**, *36* (8), 2628–2629.

²²⁸ Kulshov, M. V.; Jones, M. R.; Rouillard, A. D.; Fernandez, N. F.; Duan, Q.; Wang, Z.; Koplev, S.; Jenkins, S. L.; Jagodnik, K. M.; Lachmann, A.; McDermott, M. G.; Monteiro, C. D.; Gundersen, G. W.; Ma'ayan, A. Enrichr: A Comprehensive Gene Set Enrichment Analysis Web Server 2016 Update. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44* (W1), W90–97.

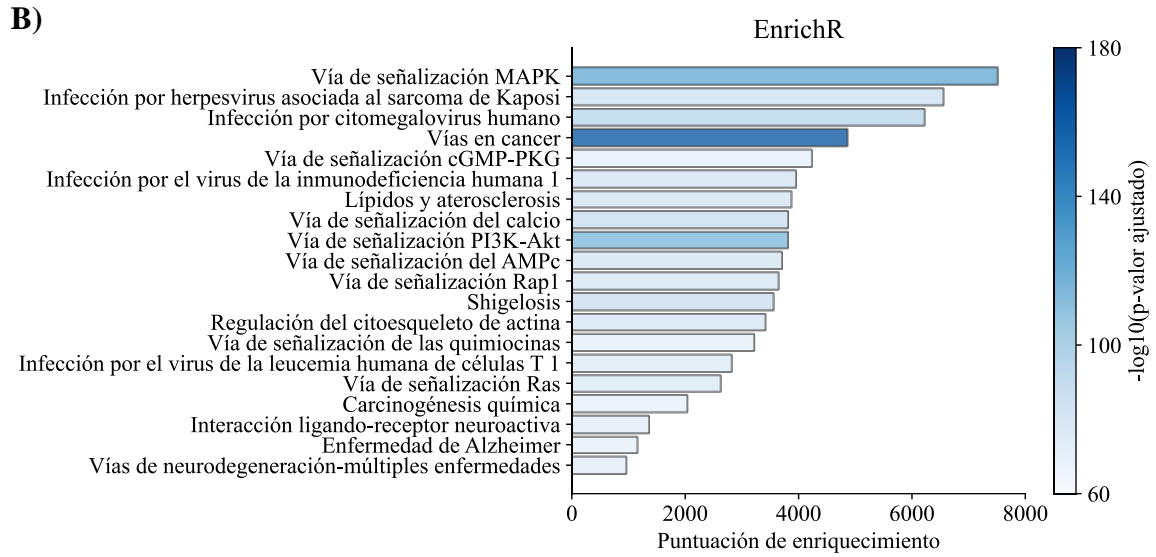


Figura 54 (continuación). B) Términos KEGG obtenidos por EnrichR.

Tabla 16. Términos KEGG donde SGK1 se encuentra involucrada.

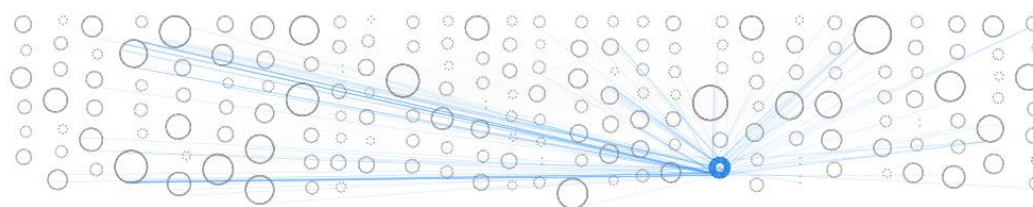
	Nº ^a	ShinyGO		EnrichR	
		p-valor _{ajustado}	E	p-valor _{ajustado}	E
Vía de señalización PI3K-AKT	269/354	$5.16 \cdot 10^{-115}$	3.86	$2.90 \cdot 10^{-113}$	3811.44
Vía de señalización mTOR	81/155	$1.35 \cdot 10^{-19}$	2.68	$9.79 \cdot 10^{-18}$	165.22
Vía de señalización FOXO	104/131	$1.11 \cdot 10^{-45}$	3.79	$2.41 \cdot 10^{-48}$	2063.44
Regulación de Na⁺ mediante aldosterona	33/37	$1.99 \cdot 10^{-18}$	4.26	$3.11 \cdot 10^{-19}$	2342.61

^a Número de entidades encontradas en la red en relación al total de entidades que componen el término KEGG. E = enriquecimiento.

Tras este cálculo, se asignaron los términos KEGG correspondientes para cada una de las proteínas de la PPI_n y se procedió al análisis modular de la misma mediante el programa MTGO (**Figura 55**).²²⁴ El algoritmo divide inicialmente la red en diferentes módulos basándose exclusivamente en las propiedades topológicas de la misma, obteniendo un índice de modularidad. Después, se analizan los términos KEGG para comprobar si los nodos de un mismo módulo comparten la misma vía molecular, comprobando así la coherencia biológica de los módulos. Tras esto, los módulos son fragmentados o fusionados para optimizar tanto la modularidad como la coherencia biológica. Este proceso se repite de manera iterativa hasta que se alcanza la convergencia en ambas métricas. Aunque inicialmente cada nodo puede tener asignados diferentes

términos KEGG, el análisis modular resultante devuelve un único término por módulo, aquel que proporciona los mejores valores de coherencia biológica.

A)



B)

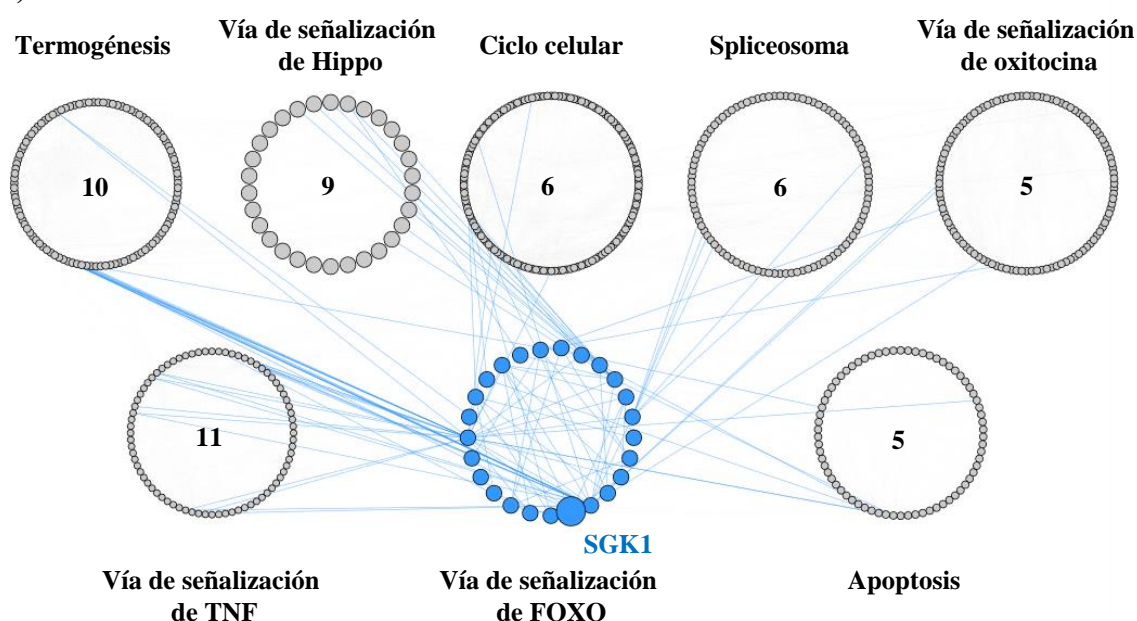


Figura 55. Análisis modular de la red de interacciones proteína-proteína. A) Módulos resultantes del análisis. En azul, vía de señalización de FOXO. B) Vía de señalización de FOXO y sus principales interacciones con el resto de módulos. Los números indican el número de contactos con el módulo de FOXO.

Este análisis mostró que SGK1 se encuentra dentro de la vía de señalización de FOXO. Dado que esta quinasa es capaz de regular a FOXO1/3 alterando su estado de fosforilación, resulta de vital interés comprobar cómo este módulo interacciona con el resto de la red. Para ello, se calculó qué módulos interaccionan con la vía de FOXO, reteniendo aquellos que realizaban 5 o más conexiones. En este sentido, destacan módulos como la apoptosis y el ciclo celular (5 y 6 contactos, respectivamente). Se ha descrito cómo SGK1 podría estar involucrada en la regulación del ciclo celular y la apoptosis neuronal a través de la fosforilación de FOXO3 y NDRG1, lo que podría estar detrás de esta relación entre módulos.¹¹⁸ Curiosamente, la vía de señalización de FOXO presenta un alto grado de interacción con los módulos de la vía de señalización Hippo, termogénesis y la vía de

señalización de TNF (9, 10 y 11 contactos, respectivamente) (**Figura 55B**). La vía de señalización Hippo ha sido recientemente estudiada como un agente involucrado en la patogénesis de varias enfermedades neurodegenerativas.²²⁹ En contextos relacionados con la EA, se ha relacionado un aumento en la activación de esta vía con un incremento en el estrés oxidativo, la hiperfosforilación de tau y la muerte neuronal.²³⁰ Se ha descrito que la vía de señalización Hippo podría regular los niveles de fosforilación de FOXO, lo que la haría parcialmente responsable de la patogénesis de la EA y otras enfermedades del SNC.²³¹ Por último, TNF- α es una conocida citoquina proinflamatoria en el SNC, concretamente en las células de la glía. Un aumento excesivo de esta citoquina provoca la proliferación de astrocitos y su conversión a poblaciones proinflamatorias, lo cual está mediado por la inactivación de FOXO3.²³² En este sentido, la activación de FOXO3 mediante la inhibición de SGK1 podría aliviar la neuroinflamación en contextos neurodegenerativos.

En definitiva, la aplicación de la farmacología de sistemas permitió un análisis exhaustivo del papel de SGK1 en el ecosistema de vías moleculares que subyace a la EA. Estos resultados abren la puerta a explorar otras dianas que se encuentran topológicamente cerca de SGK1 y, concretamente, el papel de la familia FOXO como regulador de distintas proteínas.

4. Evaluación de la neuroprotección de los inhibidores de SGK1 en modelos de la enfermedad de Parkinson

Como parte final de esta tesis doctoral, se procedió a evaluar el papel neuroprotector de la inhibición de SGK1 en la EP. En los últimos años, se ha incrementado la evidencia sobre la relación de SGK1 y esta patología, si bien existe controversia sobre si la actividad de esta quinasa es beneficiosa o, por el contrario, resulta deletérea. Mientras que algunos autores afirman que una disminución de SGK1 puede provocar un aumento de la

²²⁹ Sahu, M. R.; Mondal, A. C. The Emerging Role of Hippo Signaling in Neurodegeneration. *J. Neurosci. Res.* **2020**, *98* (5), 796–814.

²³⁰ Sahu, M. R.; Mondal, A. C. The Effect of Hippo Pathway Inhibitor Xmu-Mp-1 on Cognitive Impairment in a Rat Model of Alzheimer's Disease: Protection against Oxidative Stress, Tau Hyperphosphorylation, and Neurodegeneration. *Alzheimer's Dement.* **2023**, *19* (S13), e075237.

²³¹ Amanda, B.; Pragasta, R.; Cakrasana, H.; Mustika, A.; Faizah, Z.; Oceandy, D. The Hippo Signaling Pathway, Reactive Oxygen Species Production, and Oxidative Stress: A Two-Way Traffic Regulation. *Cells* **2024**, *13* (22).

²³² Cui, M.; Huang, Y.; Tian, C.; Zhao, Y.; Zheng, J. FOXO3a Inhibits TNF- α - and IL-1 β -Induced Astrocyte Proliferation: Implication for Reactive Astroglia. *Glia* **2011**, *59* (4), 641–654.

agregación de α -sinucleína,^{233,234} otros estudios apuntan a que la inhibición de SGK1 es capaz de resolver la neuroinflamación presente en ratones administrados con MPTP, así como de reducir los niveles de α -sinucleína, tanto *in vitro* como *in vivo*.¹²¹ Sin embargo, es cierto que la expresión de SGK1 se encuentra drásticamente elevada en el modelo de MPTP, mientras que se desconoce cómo se encuentra en otros modelos. Por tanto, cabe la posibilidad de que la inhibición de SGK1 resulte beneficiosa únicamente en ese contexto particular.²³⁵ Por tanto, evaluar la inhibición de esta quinasa en otros modelos ajenos a la toxina MPTP puede ayudar a resolver esta incógnita.

4.1. Evaluación de la neuroprotección de los inhibidores de SGK1 en el modelo AAV- α -SYN

Para evaluar esta hipótesis, se utilizó el compuesto **54** como candidato a ser evaluado en el modelo de ratón AAV- α -SYN, en colaboración con la Prof.^a Isabel Lastres Becker de la Universidad Autónoma de Madrid. Si bien este compuesto presenta niveles de permeabilidad cerebral bajos debido al transporte activo de la gp-P, esta elección se justifica fundamentalmente por dos motivos. Primero, se ha descrito cómo la gp-P puede ser saturada cuando la concentración del sustrato en sangre es elevada.^{236,237} Dado que la constante de afinidad de la mayoría de fármacos por la gp-P es relativamente baja, pueden conseguirse incrementos exponenciales de la concentración del compuesto en cerebro al aumentar la dosis en la administración.²⁰² Y segundo, la permeabilidad a través de la BHE se encuentra incrementada tanto en pacientes con diferentes enfermedades neurodegenerativas como en varios modelos animales.²³⁸ Esto puede deberse a la pérdida de la integridad de la BHE, la cual correlaciona con los niveles de neuroinflamación

²³³ Yeo, S.; Sung, B.; Hong, Y.-M.; van den Noort, M.; Bosch, P.; Lee, S.-H.; Song, J.; Park, S.-K.; Lim, S. Decreased Expression of Serum- and Glucocorticoid-Inducible Kinase 1 (SGK1) Promotes Alpha-Synuclein Increase Related with down-Regulation of Dopaminergic Cell in the Substantia Nigra of Chronic MPTP-Induced Parkinsonism Mice and in SH-SY5Y Cells. *Gene* **2018**, *661*, 189–195.

²³⁴ Heo, E.-J.; Lee, Y.; Hyung Seo, M.; Yeo, S. Association between SGK1 and α -Synuclein in Skeletal Muscle in an MPTP-Induced Parkinson's Disease Model. *Neurosci. Lett.* **2023**, *814*, 137464.

²³⁵ Chen, X.; Kang, H.; Xiao, Y. The Role of SGK1 in Neurologic Diseases: A Friend or Foe? *IBRO Neurosci. Reports* **2024**, *17*, 503–512.

²³⁶ Cisternino, S.; Bourasset, F.; Archimbaud, Y.; Sémioud, D.; Sanderink, G.; Scherrmann, J.-M. Nonlinear Accumulation in the Brain of the New Taxoid TXD258 Following Saturation of P-Glycoprotein at the Blood-Brain Barrier in Mice and Rats. *Br. J. Pharmacol.* **2003**, *138* (7), 1367–1375.

²³⁷ Cisternino, S.; Rousselle, C.; Debray, M.; Scherrmann, J.-M. In Vivo Saturation of the Transport of Vinblastine and Colchicine by P-Glycoprotein at the Rat Blood-Brain Barrier. *Pharm. Res.* **2003**, *20* (10), 1607–1611.

²³⁸ Knox, E. G.; Aburto, M. R.; Clarke, G.; Cryan, J. F.; O'Driscoll, C. M. The Blood-Brain Barrier in Aging and Neurodegeneration. *Mol. Psychiatry* **2022**, *27* (6), 2659–2673.

presentes,²³⁹ y a una reducción en los niveles o la actividad de la gp-P.^{240,241} Por todo esto, se decidió administrar el compuesto **54** vía i.p a una dosis de 15 mg·kg⁻¹, tres veces superior a lo evaluado en los experimentos de farmacocinética (Capítulo 3, sección 4.3, **Tabla 11**).

El modelo AAV- α -SYN se fundamenta en la inyección estereotáxica unilateral de un virus adenoasociado con el gen *SNCA* (el cual codifica para la α -sinucleína), cuya sobreexpresión está condicionada por el promotor de la sinapsina 1. Su administración provoca que solo las neuronas de un hemisferio de la sustancia negra desencadenen la patología de la enfermedad (ipsilateral), mientras que el otro permanece inalterado (contralateral).²⁴² Se administró el compuesto durante 14 días consecutivos tras la inyección del adenovirus (**Figura 56A**). Antes del sacrificio, se realizó un test de torsión para evaluar la afección motora que presentaban los ratones,²⁴³ lo que reveló que la administración del compuesto **54** fue capaz de revertir el fenotipo motor de los ratones tratados (**Figura 56B**). Tras el sacrificio de los mismos, se cuantificaron las neuronas TH positivas para comprobar si el inhibidor era capaz de revertir el daño neuronal causado por la α -sinucleína. Esta evaluación demostró que el compuesto **54** consiguió impedir la muerte de las neuronas dopaminérgicas en el hemisferio afectado (**Figura 56C, D**). Ante estos resultados, puede concluirse que los compuestos sintetizados en esta tesis doctoral presentan potencial neuroprotector en el modelo de AAV- α -SYN y, en consecuencia, posiciona a SGK1 como una prometedora diana terapéutica en la EP.

²³⁹ Preis, L.; Villringer, K.; Brosseron, F.; Düzel, E.; Jessen, F.; Petzold, G. C.; Ramirez, A.; Spottke, A.; Fiebach, J. B.; Peters, O. Assessing Blood-Brain Barrier Dysfunction and Its Association with Alzheimer's Pathology, Cognitive Impairment and Neuroinflammation. *Alzheimers. Res. Ther.* **2024**, *16* (1), 172.

²⁴⁰ Bartels, A. L.; Willemsen, A. T. M.; Kortekaas, R.; de Jong, B. M.; de Vries, R.; de Klerk, O.; van Oostrom, J. C. H.; Portman, A.; Leenders, K. L. Decreased Blood-Brain Barrier P-Glycoprotein Function in the Progression of Parkinson's Disease, PSP and MSA. *J. Neural Transm.* **2008**, *115* (7), 1001–1009.

²⁴¹ Lau, K.; Kotzur, R.; Richter, F. Blood-Brain Barrier Alterations and Their Impact on Parkinson's Disease Pathogenesis and Therapy. *Transl. Neurodegener.* **2024**, *13* (1), 37.

²⁴² Björklund, A.; Mattsson, B. The AAV- α -Synuclein Model of Parkinson's Disease: An Update. *J. Parkinsons. Dis.* **2024**, *14* (6), 1077–1094.

²⁴³ Borlongan, C. V.; Sanberg, P. R. Elevated Body Swing Test: A New Behavioral Parameter for Rats with 6-Hydroxydopamine-Induced Hemiparkinsonism. *J. Neurosci.* **1995**, *15* (7 Pt 2), 5372–5378.

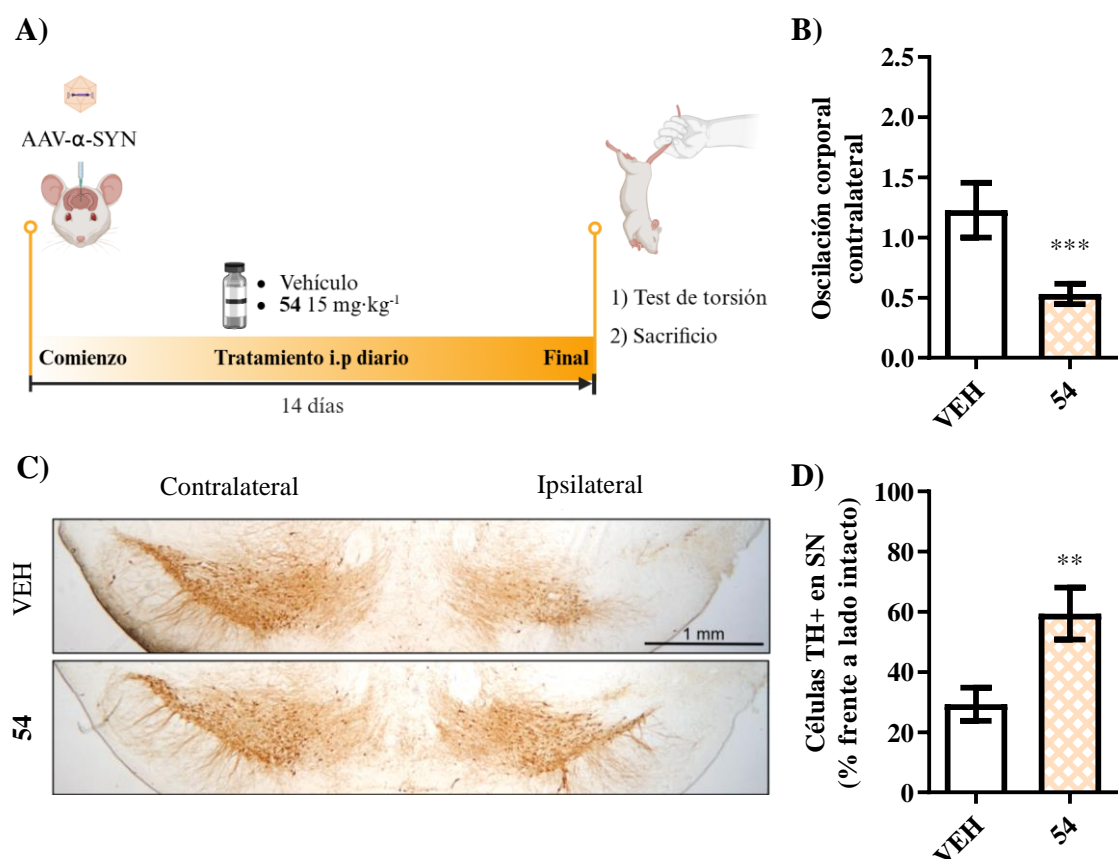


Figura 56. Evaluación del compuesto 54 en el modelo de ratón AAV- α -SYN. A) Esquema del ensayo. B) Prueba de oscilación del cuerpo elevado. Significancia estadística calculada mediante la prueba t de Student. *** p-valor < 0.001. C) Inmunohistoquímica de células positivas a TH de ratones administrados con el compuesto 54 y vehículo. D) Cuantificación de las células TH positivas de la región de la sustancia negra. Significancia estadística calculada mediante la prueba t de Student. ** p-valor < 0.01. VEH: vehículo. TH: tirosina hidroxilasa.

5. Conclusiones

Los compuestos sintetizados en esta tesis doctoral han sido evaluados en diferentes modelos relacionados con la neurodegeneración, previa caracterización de su toxicidad celular. En la línea celular SH-SY5Y, estos compuestos fueron capaces de neuroproteger en presencia del AO, así como de reducir los niveles de fosforilación de tau en los epítomos 214 y 396. El uso de la farmacología de sistemas permitió una comprensión global del papel de SGK1 en la EA, lo que planteó nuevas vías moleculares a estudiar en el contexto de su inhibición. Además, el compuesto 54 mostró su efecto terapéutico en el modelo AAV- α -SYN, consiguiendo tanto revertir el fenotipo patológico motor como impedir la muerte neuronal en la sustancia negra, algo de vital importancia en la EP. Por tanto, los inhibidores de SGK1 aquí sintetizados pueden considerarse como potenciales herramientas farmacológicas frente a diferentes contextos neurodegenerativos.

CONCLUSIONES

En esta tesis doctoral, se ha propuesto el uso de inhibidores de SGK1 como una aproximación terapéutica relevante para combatir diferentes enfermedades neurodegenerativas. Este proceso se ha enmarcado dentro de un proyecto de química médica que incluye: la cuantificación de esta quinasa en diferentes patologías, la caracterización y el cribado virtual de diferentes quimiotecas, la optimización química del compuesto inicial encontrado y, por último, la evaluación del potencial neuroprotector de estas moléculas. A continuación, se detallan las conclusiones más relevantes de este trabajo:

1. Los niveles de transcripción de *SGK1* se encuentran sistemáticamente disminuidos en todos los modelos relacionados con el espectro de las TDP43-patías. Ante la ausencia de más datos, se descartó la inhibición farmacológica de esta quinasa como estrategia terapéutica para la ELA y otras TDP43-patías.
2. Por el contrario, los niveles de *SGK1* en los modelos relacionados con tauopatías y α -sinucleinopatías muestran una tendencia a encontrarse elevados. Esto, junto a lo descrito en la literatura, planteó que patologías como la EA o la EP son escenarios en los que la inhibición de SGK1 podría ser beneficiosa.
3. Se han caracterizado las propiedades fisicoquímicas de las quimiotecas MBC y EBCL. Los resultados aquí mostrados posicionan ambas librerías como una fuente idónea de moléculas tipo fármaco.
4. El uso de la quimioteca ECBL en un cribado virtual basado tanto en la estructura del ligando como de la diana tuvo como resultado la obtención del compuesto **H3**, cuyo modo de unión fue elucidado mediante técnicas *in silico*.
5. Se diseñó y optimizó una ruta sintética que permitió la obtención de una familia de moléculas congenéricas al compuesto **H3**. La evaluación de su actividad inhibitoria frente a SGK1 dio lugar a una relación estructura-actividad consistente, obteniendo una colección de inhibidores en un rango de actividad diverso.
6. La evaluación de su permeabilidad cerebral mediante la metodología PAMPA reveló que la mayoría de compuestos disponían de propiedades fisicoquímicas óptimas para atravesar la BHE.
7. El estudio de las propiedades farmacocinéticas *in vivo* del compuesto **54**, cabeza de la serie, mostró niveles bajos del candidato en cerebro. Se propuso el transporte activo de la gp-P como responsable de este hecho, lo cual fue confirmado mediante diferentes técnicas *in silico* e *in vitro*. Además, la síntesis y evaluación del

compuesto **89** validó la estrategia de evitar el transporte activo de la gp-P para aumentar la permeabilidad cerebral de estos compuestos.

8. Los inhibidores de SGK1 fueron capaces de mostrar neuroprotección en un modelo *in vitro* de la EA, así como de reducir los niveles de fosforilación de tau. Además, el compuesto **54** demostró efectos terapéuticos prometedores en un modelo *in vivo* de la EP. En conjunto, estos compuestos se posicionan como herramientas farmacológicas prometedoras frente a estas dos patologías.

CONCLUSIONS

In this doctoral thesis, the use of SGK1 inhibitors has been proposed as a relevant therapeutic approach to combat various neurodegenerative diseases. This process was organized within a medicinal chemistry project that included: the quantification of this kinase in different pathologies, the characterization and virtual screening of different chemical libraries, the chemical optimization of the initial hit compound, and finally, the evaluation of the neuroprotective potential of these molecules. The most relevant conclusions of this work are detailed below:

1. SGK1 transcription levels were consistently decreased across all models related to the TDP-43 proteinopathy spectrum. Due to the lack of further data, pharmacological inhibition of this kinase was ruled out as a therapeutic strategy for ALS and other TDP-43-related diseases.
2. Conversely, SGK1 levels in models associated with tauopathies and α -synucleinopathies showed a tendency to be elevated. This observation, together with existing literature, suggested that diseases such as Alzheimer's disease and Parkinson's disease represent suitable scenarios where SGK1 inhibition might be beneficial.
3. The physicochemical properties of the MBC and ECBL libraries were characterized. The results presented here support both libraries as suitable sources of drug-like molecules.
4. A virtual screening of the ECBL library, based on both ligand- and structure-based approaches, led to the identification of compound **H3**, whose binding mode was elucidated using *in silico* techniques.
5. A synthetic route was designed and optimized to obtain a family of congeneric molecules based on compound **H3**. The evaluation of their inhibitory activity against SGK1 resulted in a consistent structure-activity relationship, yielding a collection of inhibitors with a broad range of activities.
6. Brain permeability evaluation using the PAMPA methodology revealed that most compounds exhibited optimal physicochemical properties for crossing the blood-brain barrier.
7. *In vivo* pharmacokinetic studies of compound **54**, the lead compound, showed low brain levels. Active efflux by P-glycoprotein was proposed as the cause, which was confirmed using both *in silico* and *in vitro* techniques. Moreover, the synthesis and

Conclusions

evaluation of compound 89 validated the strategy of avoiding P-gp-mediated efflux to enhance brain permeability.

8. SGK1 inhibitors showed neuroprotective effects in an *in vitro* model of AD, as well as reduced tau phosphorylation levels. Additionally, compound **54** demonstrated promising therapeutic effects in an *in vivo* model of PD. Altogether, these compounds emerge as promising pharmacological tools for tackling these two neurodegenerative diseases.

PARTE EXPERIMENTAL

1. Tratamiento de datos

Se han empleado diversas metodologías adaptadas a las necesidades de cada caso específico. Se utilizó Python v.3.9.15 en el entorno de desarrollo Jupyter Notebook v.6.5.2 como herramienta principal para el análisis y procesamiento de datos. Las librerías empleadas incluyen Numpy v.1.23.5, Pandas v.1.5.2, Matplotlib v.3.6.2 y scikit-learn v.1.2.0, entre otras, para realizar análisis numéricos, manipulación de datos, visualización y modelos estadísticos. Para el diseño de flujos de trabajo complejos, se utilizó el programa KNIME v.4.7.8. El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante el programa GraphPad Prism v.8.0.2. Salvo que se indique lo contrario, los datos se expresan como la media aritmética \pm el error estándar de la media (SEM). La significancia estadística se calculó mediante la prueba t de Student o el análisis de la varianza ANOVA, según se indique en cada caso. Para el límite de significancia estadística, se declaró un p-valor inferior a 0.05. Todos los flujos de trabajo y programas generados se pueden localizar en el siguiente repositorio: <https://doi.org/10.5281/zenodo.15112707>.

2. Procedimientos biológicos

2.1. Muestras sanguíneas de pacientes y controles

Todos los donantes a partir de los cuales se han originado las líneas linfoblásticas proceden del Hospital Universitario 12 de Octubre de la Comunidad de Madrid. Se han utilizado 4 muestras de pacientes con ELAe, 4 muestras de pacientes con ELAf-SOD1, 3 muestras de pacientes con EA y 4 muestras de pacientes con EP. En total, se usaron 6 muestras de controles. Las características de las muestras utilizadas pueden consultarse en la **Tabla S1**. Las muestras de los individuos en estudio se obtuvieron tras el consentimiento informado por parte de los donantes.

Tabla S1. Características de los individuos de estudio.

Caso	Edad	Sexo	Caso	Edad	Sexo	Caso	Edad	Sexo
ELAe			Enfermedad de Alzheimer			Controles		
ELA1	52	F	EA1	75	F	C1	73	M
ELA2	53	M	EA2	68	M	C2	57	F
ELA3	67	M	EA3	60	M	C3	75	M
ELA4	76	F	-	-	-	C4	67	F
ELAf-SOD1			Enfermedad de Parkinson			C5	71	F
ELA1-SOD1	64	F	EP1	62	M	C6	71	M
ELA2-SOD1	46	M	EP2	74	M	-	-	-
ELA3-SOD1	58	F	EP3	64	F	-	-	-
ELA4-SOD1	59	M	EP4	66	M	-	-	-

2.2. Cuantificación de los niveles de ARNm mediante RT-qPCR

La obtención del ADNc de las muestras de modelos murinos puede consultarse en las referencias correspondientes.^{82,141,144,147,148} En el caso de los linfocitos inmortalizados, las muestras fueron incubadas en suspensión con medio RPMI-1640 (Gibco, ThermoFisher Scientific) suplementado con 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de penicilina/estreptomicina y 10 % (v/v) de suero bovino fetal (FBS) y mantenidas en un incubador humidificado con un 5 % de CO_2 a 37 °C. Las células fueron sembradas a una concentración de $5\cdot 10^5$ células $\cdot\text{mL}^{-1}$ en placas de 6 pocillos. Al día siguiente, las células fueron centrifugadas y lavadas con tampón fosfato salino (PBS). Los pellets celulares fueron almacenados a -80 °C hasta su posterior utilización.

La extracción del ARN se llevó a cabo mediante el uso de TRIzol (Invitrogen), aislado con cloroformo, precipitado con isopropanol y lavado con etanol al 75 % de acuerdo a las instrucciones del proveedor. El ARN aislado y resuspendido en 50 μL de agua libre de nucleasas fue cuantificado por espectrofotometría (NanoDrop ND-1000). Su calidad fue comprobada mediante el ratio A260/A280 y, posteriormente, 1 μg de muestra fue tratado con DNasa I (Invitrogen) durante 15 min a temperatura ambiente. La reacción fue detenida mediante la adición de EDTA y la mezcla incubada 10 min a 65 °C. El ARN fue retrotranscrito utilizando el kit *Superscript III Reverse Transcriptase* (Invitrogen) en un termociclador (25 °C, 5 min; 50 °C, 60 min; 70 °C, 15 min). El ADNc resultante fue almacenado a -20 °C.

La posterior reacción de RT-qPCR tuvo lugar en triplicados con 20 ng de ADNc, los oligonucleótidos correspondientes y el reactivo *FastStart Essential DNA Green Master* (Roche), de acuerdo a las instrucciones del proveedor. La reacción se llevó a cabo mediante el termociclador LightCycler 96 (Roche) y el programa informático asociado (LightCycler 96 v.1.1.0). El análisis de datos se llevó a cabo mediante el método $\Delta\Delta\text{Ct}$. La normalización de los datos se realizó mediante el uso de los genes *housekeeping* que se indican en cada caso. Todos los oligonucleótidos utilizados para la replicación del ADNc pueden encontrarse en la **Tabla S2**.

Tabla S2. Oligonucleótidos utilizados durante los experimentos de qPCR, descritos en sentido 5' -3'.

Gen	Oligonucleótido directo	Oligonucleótido reverso
Murino		
<i>Tbp</i>	TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA	CACATCACAGCTCCCCACCA
<i>Sgk1</i>	TCCAACCTGGGTGTGAAGTG	GCATGCATAGGTGTTGCTGG
Humano		
<i>RPS17</i>	CCATTATCCCCAGCAAAAAG	GAGACCTCAGGAACATAATTG
<i>GAPDH</i>	CTCTCTGCTCCTCCTGTTCGAC	TGAGCGATGTGGCTCGGCT
<i>ACTB</i>	TCCTTCCTGGGCATGGAG	AGGAGGAGCAATGATCTTGATCTT
<i>SGK1</i>	GGGTGTGAAGTGAGAGAGCC	GTCGTTCAGACCCATCCTCC

2.3. Evaluación *in vitro* de la actividad inhibitoria de los compuestos

La inhibición de los compuestos fue evaluada mediante el ensayo de luminiscencia Kinase-Glo.²⁴⁴ El sistema luciferina-luciferasa necesario para el ensayo, así como las quinasas recombinantes humanas SGK1 (V2911) y GSK3 β (V1991) y los correspondientes sustratos fueron obtenidos a través de Promega (Promega Biotech Ibérica). El ATP se adquirió en ThermoFisher Scientific. La solución tampón utilizada contenía 40 mM de Tris (pH 7.5), 20 mM de MgCl₂, 0.1 mg·mL⁻¹ de BSA y 50 μ M de DTT. Los ensayos de inhibición fueron llevados a cabo en placas de 96 pocillos en un volumen total de 40 μ L. Para calcular la actividad de los compuestos, estos fueron evaluados a una concentración de 10 μ M partiendo de una disolución 10 mM del compuesto en DMSO. Se hicieron las diluciones necesarias para que el porcentaje de DMSO final no superara el 1 %. La cantidad de enzima utilizada por pocillo fue 50 ng y 25 ng para SGK1 y GSK3 β , respectivamente. El sustrato se utilizó a una concentración final de 25 μ M. La concentración de ATP utilizada fue 1 μ M. La reacción se incubó durante 1 h (SGK1) o 30 min (GSK3 β) a 30 °C, finalizando la reacción con la adición de 40 μ L del reactivo Kinase-Glo. Tras la incubación de esta reacción durante 10 minutos, la señal de luminiscencia generada fue medida mediante el lector GloMax® Discover Microplate Reader (Promega Biotech Ibérica).²⁴⁵

La actividad enzimática máxima (en ausencia del inhibidor) se calculó mediante la diferencia del ATP total y el consumido. La inhibición de los compuestos se calculó en base a esta actividad máxima. Para aquellos compuestos con una actividad superior al 50 % a 10 μ M, se diseñó una curva de inhibición para calcular el CI₅₀. El CI₅₀ fue definido como la concentración de cada compuesto que reduce un 50 % la actividad enzimática

²⁴⁴ Zegzouti, H.; Zdanovskaia, M.; Hsiao, K.; Goueli, S. A. ADP-Glo: A Bioluminescent and Homogeneous ADP Monitoring Assay for Kinases. *Assay Drug Dev. Technol.* **2009**, 7 (6), 560–572.

²⁴⁵ Baki, A.; Bielik, A.; Molnár, L.; Szendrei, G.; Keserü, G. M. A High Throughput Luminescent Assay for Glycogen Synthase Kinase-3beta Inhibitors. *Assay Drug Dev. Technol.* **2007**, 5 (1), 75–83.

respecto a la actividad máxima. Los valores de CI_{50} se expresan como la media de dos experimentos en duplicado \pm la desviación estándar de la media. Todos los compuestos sintetizados en esta tesis fueron evaluados según esta metodología. Los compuestos seleccionados a través del cribado virtual para su evaluación frente a SGK1 fueron adquiridos a través de Enamine Ltd.

2.4. Ensayo de neuroprotección en el modelo de AO

Las células SH-SY5Y fueron incubadas en DMEM (Gibco, ThermoFisher Scientific) suplementado con un 10 % de FBS y $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de penicilina/estreptomicina a 37°C y atmósfera con 5 % de CO_2 . Las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos a una concentración de $2\cdot 10^5$ células $\cdot\text{mL}^{-1}$. Al día siguiente, las células fueron incubadas con los compuestos a evaluar a la concentración indicada durante 1 h. Después, se añadió el AO a una concentración final de 30 nM y se incubaron durante 24 h. Posteriormente, se añadió el MTT a una concentración final de $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y se incubaron las células a 37°C y 5 % de CO_2 durante 3 h. Finalmente, el medio fue aspirado cuidadosamente y los cristales de formazán fueron disueltos en $150 \mu\text{L}$ de DMSO. La absorbancia UV fue cuantificada a 560 nM (GloMax® Discover Microplate Reader, Promega Biotech Ibérica).

2.5. Obtención de extractos proteicos

Las células SH-SY5Y se incubaron como se indica en la sección 2.4 y fueron sembradas a una concentración de $5\cdot 10^5$ células $\cdot\text{mL}^{-1}$ en placas de 6 pocillos. 24 h después, se añadieron los compuestos a evaluar a la concentración indicada y se incubaron las células durante 6 h. Después, se aspiró el medio, las células fueron lavadas con PBS y se levantaron con tripsina-EDTA (0.05 %) (Gibco, ThermoFisher Scientific). Inmediatamente después, la tripsina fue diluida en medio DMEM y se centrifugaron las muestras. Se aspiró el medio, se lavaron las células con PBS y se volvieron a centrifugar. Tras aspirar el PBS, los pellets celulares fueron almacenados a -80°C hasta su posterior utilización. Las células fueron lisadas mediante $70 \mu\text{L}$ de buffer de lisis (Tris-HCl (pH 7.4) 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, MgCl_2 15 mM, desoxicolato sódico 0.5 %, NP-40 0.5 % y SDS 0.1 %) con inhibidores de fosfatasa y proteasas (Roche) en hielo y agitación durante 15 min. Tras centrifugar, los extractos proteicos fueron obtenidos del sobrenadante y cuantificados mediante el método BCA (Pierce BCA Protein Assay, ThermoFisher Scientific).

2.6. Cuantificación de los niveles de tau mediante ELISA

Los niveles de p-Ser396 tau y tau total fueron cuantificados mediante dos ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) kit (TermoFisher Scientific, KHB7031, KHB0041) siguiendo las instrucciones del proveedor. Brevemente, 50 μL de muestra fueron diluidos en 50 μL del buffer de dilución y se añadió en una placa de 96 pocillos cubiertos con el anticuerpo específico. Tras la incubación y lavados correspondientes, se añadió el anticuerpo que reconoce el epítipo correspondiente y se incubó. Tras lavar, se añadió el anticuerpo conjugado con peroxidasa del rábano (HRP) que reconoce la región constante del anterior anticuerpo. Tras incubar y lavar, se añadió el cromógeno que, en presencia de la HRP, produce señal colorimétrica. Tras 30 min, se detuvo la reacción con la solución de parada y se cuantifica la absorbancia a 450 nM (GloMax Discover Microplate Reader, Promega Biotech Ibérica, SL). Los tiempos de incubación y lavados, así como las cantidades de los reactivos, pueden consultarse en los protocolos del proveedor.

Para obtener una función sobre la que interpolar las concentraciones de tau total y p-Ser396 tau en los extractos proteicos, se realizó previamente una curva de calibración para los dos casos a diferentes concentraciones (p-Ser396 tau: 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6 y 0 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$, tau total: 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2 y 0 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$) (**Figura S1**). Se utilizaron 5 y 15 μg de extracto proteico para cuantificar los niveles de tau total y p-Ser396 tau, respectivamente. Se normalizó la concentración obtenida en función de la cantidad de extracto utilizado.

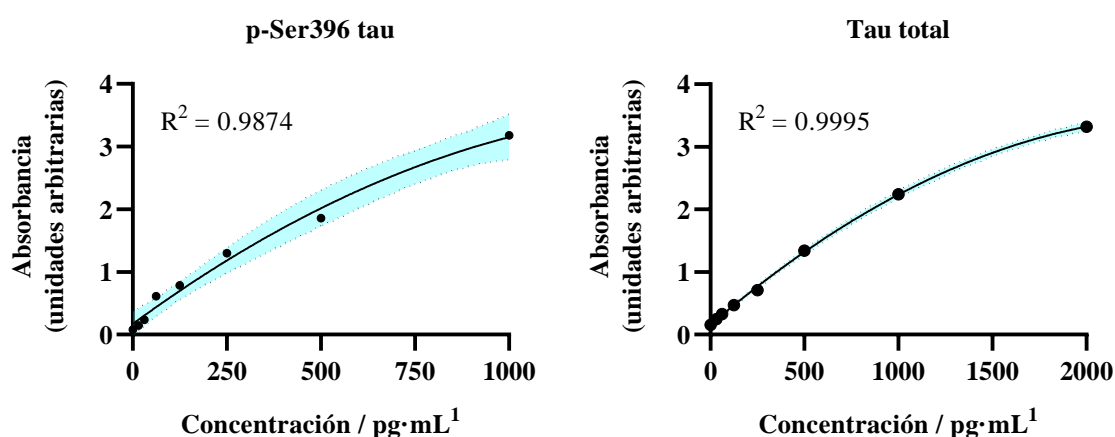


Figura S1. Curva patrón de p-Ser396 tau y tau total. En azul, intervalo de confianza del 95 %.

2.7. Cuantificación de los niveles de tau mediante *western blot*

La separación de las proteínas acorde al peso molecular se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en gradiente (4-15 %, Bio-Rad), cargando 30 µg por muestra. La transferencia se realizó sobre una membrana de PDVF (*Trans-Blot Turbo Transfer System*, Bio-Rad) y se bloqueó con BSA 5 % en TBS-T (Tris-HCl (pH 7.4) 50 mM, NaCl 150 mM y Tween-20 0.1 %) durante 1 h. Posteriormente, la membrana se incubó con el anticuerpo de p-Ser214 tau durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, se incubó la membrana con el anticuerpo secundario conjugado con HRP durante 1 h. En el caso del control de carga GAPDH, no se requirió de anticuerpo secundario al tener el primario ya conjugado la HRP. Finalmente, se revelaron las membranas mediante quimioluminiscencia (ECL, ThermoFisher Scientific) y se cuantificó la señal mediante un lector de luminiscencia (ChemiDoc, Bio-Rad). Los anticuerpos utilizados pueden encontrarse en la **Tabla S3**.

Tabla S3. Anticuerpos utilizados en los experimentos de *western blot*.

Anticuerpo primario	Referencia	Casa comercial	Dilución
p-Ser214 tau	ab170892	Abcam	1:1000
GAPDH	HRP-60004	Proteintech	1:5000
Anticuerpo secundario	Referencia	Casa comercial	Dilución
Anti-ratón	1706515	Bio-Rad	1:5000

2.8. Metodología PAMPA

Los controles y compuestos a evaluar (1-2 mg) se disolvieron en 5 mL de PBS (pH 7.4) y EtOH en proporción 7:3. Las muestras fueron filtradas (filtros PDVF 20 µm, Symta) y se cuantificó la emisión UV mediante barrido (220 – 400 nm) (Varioskan, TermoFisher), identificando las longitudes de onda a las que absorbe cada compuesto. Una vez determinada la concentración inicial de cada muestra (absorbancia inicial), se añadieron 180 µL a la placa donadora (Millipore), previamente cubierta con 5 µL de lípido de cerebro porcino (Avanti Polar Lipids) disuelto en dodecano (20 mg·mL⁻¹, Sigma-Aldrich). Posteriormente, se añadió 180 µL del tampón del ensayo en la placa aceptora. Se apiló la placa donadora sobre la placa aceptora durante 2,5 h a t.a. en atmósfera húmeda. Una vez pasado el tiempo de incubación, se retiró la placa donadora y se cuantificó la emisión UV en la placa aceptora a las longitudes de onda registradas para cada compuesto (absorbancia final), calculando así la concentración del compuesto capaz de atravesar la barrera lipídica. Mediante estos parámetros, se calcula la P_e (**Ecuación 1**).

Ecuación 1. Cálculo de la P_e en la metodología PAMPA.

$$P_e = \frac{V_d \cdot V_r}{(V_d + V_r) \cdot S \cdot t} \cdot \ln \frac{100 \cdot V_d}{100 \cdot V_d - T(V_d + V_r)}; T = \frac{V_r \cdot A_r}{V_d \cdot A_0}$$

P_e : permeabilidad efectiva ($\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$), V_d : volumen de la placa donadora (cm^3), V_r : volumen de la placa aceptora (cm^3), S : superficie del pocillo (0.266 cm^2), t : tiempo de incubación (s), A_0 : absorbancia inicial, A_r : absorbancia final.

Tabla S4. Valores de P_e obtenidos en el ensayo PAMPA junto a los descritos en la literatura.

Compuesto	P_e descrita ^{192, a}	P_e experimental ^{a, b}
Atenolol	0.8	0.4 ± 0.1
Cafeína	1.3	1.3 ± 0.5
Desipramina	12	13.6 ± 0.9
Enoxacina	0.9	1.0 ± 0.1
Hidrocortisona	1.9	2.2 ± 0.6
Ofloxacino	0.8	0.9 ± 0.1
Piroxicam	2.5	1.3 ± 0.4
Promazina	8.8	9.1 ± 0.1
Testosterona	17	17.1 ± 0.7
Verapamilo	16	18.2 ± 0.4

^a Expresada en $10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$. ^b Media \pm desviación estándar.

A continuación, se estableció una regresión lineal entre la P_e experimental y la descrita de los controles utilizados (**Tabla S4**) sobre la que interpolar la P_e de los compuestos evaluados. Cada muestra se ensayó por triplicado en dos experimentos independientes.

2.9. Ensayo de inhibición de citocromos

El ensayo se llevó a cabo en la Fundación Medina. Brevemente, los compuestos fueron disueltos en una mezcla de DMSO y acetonitrilo a 8.75 mM y diluidos de forma seriada en un rango de concentraciones desde 87.5 a 0.17 μM . 100 μL de una mezcla de microsomas humanos hepáticos ($0.25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) y los sustratos (testosterona, 50 μM , diclofenaco, 10 μM y dextrometorfano, 20 μM) fueron incubados con 2 μL del compuesto a evaluar y 98 μL de NADPH durante 15 min. La reacción fue terminada mediante la adición de 90 μL de acetonitrilo. La inhibición fue monitorizada por HPLC-MS utilizando cortisona, hidroxidiclofenaco y levalorfono como estándares internos.

2.10. Ensayo de mutagénesis

El ensayo fue realizado en la Fundación Medina. Los cultivos bacterianos (*S. typhimurium* TA100 y TA98) se expusieron a cuatro concentraciones del compuesto evaluado disuelto en DMSO (50, 25, 12.5 y 6.25 μM), diferentes controles positivos y

negativos, durante 90 minutos en un medio con histidina suficiente para aproximadamente dos divisiones celulares. Después, los cultivos se diluyeron en un medio sensible al pH sin histidina. Dos días después, se cuantificaron las colonias revertidas que, fruto de la división celular, acidifican y cambian el color del medio (amarillo o turbio: positivo, morado: negativo). Los compuestos fueron evaluados en ausencia y presencia de microsomas hepáticos.

2.11. Ensayos de inhibición de canales iónicos

Los ensayos fueron realizados en la Fundación Medina. Para todos los ensayos, se disolvió el compuesto a evaluar en DMSO y se testó a diez concentraciones seriadas (desde 50 a 0.05 μM). La inhibición de cada uno de los canales se llevó a cabo en células HEK293 que sobreexpresan el canal correspondiente. La inhibición del canal hERG se llevó a cabo mediante la metodología FluxOR (Invitrogen) según las instrucciones del proveedor, utilizando el astemizol como control positivo. La inhibición del canal Nav1.5 se llevó a cabo mediante la metodología *FLIPR Tetra High-Throughput Cellular Screening System* (Molecular Devices) según las instrucciones del proveedor, utilizando la tetrodotoxina como control positivo. La inhibición del canal Cav1.2 se llevó a cabo mediante la sonda intracelular Fluo-4 (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del proveedor, utilizando nicardipino como control positivo.

2.12. Ensayo de permeabilidad bidireccional en células MDCKII-MDR1

El ensayo fue realizado en SAI Life Science. Brevemente, las monocapas de la línea celular MDCKII-MDR1 fueron incubadas con los compuestos a evaluar (10 μM), los controles (10 μM) y el inhibidor zosuquidar (5 μM) disueltos en buffer HEPES 10 mM (DMSO 0.1%) en duplicado. El tiempo de incubación del ensayo fueron 120 min desde la adición del compuesto, ya sea desde el lado apical o basolateral. La integridad de la monocapa celular fue comprobada mediante *lucifer yellow*. Se cuantificó la concentración del compuesto mediante HPLC-MS, utilizando albendazol como estándar interno. La P_a y el R_E se calculó como se indica en la **Ecuación 2**.

Ecuación 2. Cálculo de la P_a y R_E en el ensayo de permeabilidad bidireccional.

$$P_a = \frac{dQ}{dt} \cdot \frac{1}{A \cdot C_0} ; R_E = \frac{P_a - AB}{P_a - BA}$$

P_a : permeabilidad aparente ($\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$), dQ/dt : pendiente lineal de la cantidad de compuesto en el lado aceptor (apical o basolateral) desde $t = 0$ hasta final del ensayo, A : superficie (0.7 cm^2), C_0 : concentración inicial del compuesto en el compartimento donador (apical o basolateral). R_E : ratio de eflujo, P_a -AB: permeabilidad absorbiva (desde apical a basolateral), P_a -BA: permeabilidad secretoria (desde basolateral a apical).

2.13. Selectividad en paneles de quinasas

La selectividad de los compuestos frente a diferentes quinasas se llevó a cabo en la Universidad de Dundee (unidad MRC-PPU) mediante detección de la incorporación de sustrato radioactivo.²⁴⁶ El sistema quinasa-sustrato correspondiente se diluye en el buffer apropiado con [^{33}P - γ -ATP]. La concentración del ATP varía en función de la constante de afinidad de la enzima. El ensayo se lleva a cabo en presencia del compuesto a $10 \mu\text{M}$ durante durante el tiempo correspondiente a t.a. Una descripción exhaustiva de las condiciones para cada quinasa puede encontrarse en el repositorio de la tesis doctoral (<https://doi.org/10.5281/zenodo.15112707>).

2.14. Evaluación de la farmacocinética *in vivo*

Los ensayos de farmacocinética se llevaron a cabo en SAI Life Science. Brevemente, para cada compuesto y administración, se utilizaron 24 ratones macho BALB/c (tres para cada toma de muestra: 0.083, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 y 24 h). La edad de los ratones fue de 8-12 semanas, con un peso de entre 19 y 23 g. Para las vías i.p e i.v, el vehículo fue 5 % DMSO, 5 % solutol HS-15 y 90 % de suero salino. Para la vía p.o, 0.5 % de Tween 80 y 99.5 % de carboximetilcelulosa sódica (0.5 % p/v en agua). Todas las formulaciones se encontraron dentro del rango de aceptabilidad analítico (± 20 % del valor nominal). Todos los animales fueron observados como normales, sin ningún signo clínico durante la duración del estudio. Para cada muestra, se cuantificó la presencia del compuesto en estudio mediante LC-MS (estándar interno: rosuvastatina).

²⁴⁶ Hastie, C. J.; McLauchlan, H. J.; Cohen, P. Assay of Protein Kinases Using Radiolabeled ATP: A Protocol. *Nat. Protoc.* **2006**, *1* (2), 968–971.

3. Procedimientos computacionales

3.1. Recursos computacionales

Los cálculos se llevaron a cabo en tres máquinas distintas en función del coste computacional: Intel® Core™ i7-10700 CPU @ 2.90GHz (16.0 GB RAM), AMD Ryzen Threadripper 3960X 24-Core (128.0 GB RAM) 4X NVIDIA GeForce RTX 3070 e Intel® Core™ i9-10940X CPU @ 3.30GHz (64.0 GB RAM) 2X NVIDIA GeForce RTX 2080.

3.2. Preparación de los ligandos

Los ligandos se prepararon mediante el módulo LigPrep¹⁷⁸ de Schrödinger. Brevemente, los hidrógenos fueron añadidos en caso de que fuera necesario, se eliminaron los contraiones, los estados de protonación posibles para un pH 7.4 ± 2.0 (Epik)²⁴⁷ junto con los correspondientes tautómeros fueron predichos y se mantuvo la estereoquímica de los compuestos. En el caso de que un centro quiral no estuviera definido, ambas posibilidades fueron generadas. El campo de fuerzas utilizado fue OPLS3e.²⁴⁸ Las quimiotecas MBC (2577 compuestos), ECBL v.2019 (101021 compuestos) y ECBL v.2014 (199341 compuestos) pueden encontrarse en el enlace del repositorio (<https://doi.org/10.5281/zenodo.15112707>). Para el análisis de las quimiotecas, se seleccionó únicamente un estado de todos los tautómeros, estereoisómeros y formas de protonación generadas.

3.3. Cálculo de las propiedades fisicoquímicas y farmacéuticas de las quimiotecas

Se calcularon los descriptores moleculares y las diferentes reglas de todos los compuestos utilizando QikProp (v.6.8)²⁴⁹ y RDKit (v.2022.9.3) (**Tablas S5, S6**). Dado que el programa no es capaz de calcular las propiedades para algunos compuestos (moléculas no neutralizables, átomos complejos o pesos moleculares elevados), algunas entradas fueron forzosamente excluidas del análisis (3.14 %, 0.59 % y 0.20 % para la MBC, ECBL v.2014 y ECBL v.2019, respectivamente).

²⁴⁷ Schrödinger Release 2020-3: Epik, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2020.

²⁴⁸ Harder, E.; Damm, W.; Maple, J.; Wu, C.; Reboul, M.; Xiang, J. Y.; Wang, L.; Lupyán, D.; Dahlgren, M. K.; Knight, J. L.; Kaus, J. W.; Cerutti, D. S.; Krilov, G.; Jorgensen, W. L.; Abel, R.; Friesner, R. A. OPLS3: A Force Field Providing Broad Coverage of Drug-like Small Molecules and Proteins. *J. Chem. Theory Comput.* **2016**, *12* (1), 281–296.

²⁴⁹ Schrödinger Release 2022-3: QikProp, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2022.

Tabla S5. Descriptores calculados mediante QikProp.

Descriptor	Descripción	Rango ^a
Nº de enlaces rotables	Número de enlaces rotables no obstaculizados (no CX ₃ , alquenos, amidas o anillos pequeños).	0-15
Peso molecular / Da	-	130.0-725.0
Nº de donadores de enlaces de hidrógeno	Número estimado de enlaces de hidrógeno que el ligando donaría a las moléculas de agua en una solución acuosa.	0.0-6.0
Nº de aceptores de enlace de hidrógeno	Número estimado de enlaces de hidrógeno que el ligando aceptaría de moléculas de agua en una solución acuosa.	2.0-20.0
P logP _{o/a}	Predicción del coeficiente de repartición octanol/agua.	-2.0-6.5
P logS	Predicción de la solubilidad acuosa, siendo S la concentración del soluto en una solución saturada, expresada en mol·dm ⁻³ .	-6.5-0.5
P logP _{C/S}	Predicción del coeficiente de reparto cerebro/sangre, aplicable solo para difusión pasiva.	-3.0-1.2
Nº de metabolitos	-	1-8
P PCaco	Permeabilidad aparente prevista de las células Caco-2 en nm·s ⁻¹ .	<25 baja >500 alta
P AO	Absorción oral humana prevista.	> 80 % alta
TPSA	Área de superficie de Van der Waals de los átomos polares de nitrógeno y oxígeno y de los grupos carbonilo.	7.0-200.0

^a Rango encontrado para el 97% de los fármacos de la base de datos interna de QikProp.

Tabla S6. Parámetros utilizados para calcular R5L, R3J, FG y FV.

	R5L	R3J	FG	FV
Peso molecular / Da	< 500	-	160-480	-
P logP _{o/a} ^a	< 5	-	-0.4-5.6	-
Dador de EH ^b	≤ 5	-	-	-
Aceptor de EH ^b	≤ 10	-	-	-
log(S / mol · dm ⁻³) ^c	-	> -5.7	-	-
P PCaco / nm · sec ⁻¹ ^d	-	> 22	-	-
Nº metabolitos	-	< 7	-	-
Nº átomos	-	-	20-70	-
Rm / cm ³ · mol ⁻¹ ^e	-	-	40-130	-
Nº de enlaces rotables	-	-	-	≤ 10
TPSA / Å ² ^f	-	-	-	≤ 140

^a Coeficiente de reparto octanol/agua. ^b Enlace de hidrógeno. ^c Solubilidad acuosa. ^d Permeabilidad aparente prevista en células Caco-2. ^e Refractividad molar. ^f Área de superficie polar.

3.4. *Shape screening*

Para la selección de las moléculas de referencia sobre las que realizar el cribado basado en ligando, se recurrió a la base de datos de ZINC (v.ZINC20)¹⁷² para obtener los inhibidores descritos de SGK1. Inicialmente, solamente aquellos compuestos con una CI_{50} inferior a 300 nM fueron considerados ($pKi > 6.54$ de acuerdo a la base de datos), resultando en 78 compuestos. Para evitar redundancia estructural, las moléculas fueron codificadas en forma de *fingerprints* con la herramienta Canvas^{250,251} de Schrödinger y agrupadas en 10 conjuntos en función de su similitud mediante el coeficiente de Tanimoto (**Ecuación 3**). El centroide de cada agrupación fue seleccionado como molécula de referencia (10 compuestos).

Ecuación 3. Índice de Tanimoto.

$$T_c = \frac{\sum_{j=1}^k a_j \times b_j}{(\sum_{j=1}^k a_j^2 + \sum_{j=1}^k b_j^2 - \sum_{j=1}^k a_j \times b_j)}$$

k, número de dimensiones o *fingerprints*; a, molécula 1; b, molécula 2.

La metodología *shape screening*¹⁷⁵ se realizó con el módulo Phase²⁵² de Schrödinger. La conformación de las moléculas de referencia se obtuvo mediante experimentos de *docking* (ver apartado 3.6). Para cada compuesto que fue cribado, se generó una colección de 10 conformeros. Todas las moléculas fueron representadas como esferas farmacofóricas de 2 Å de radio, correspondientes a características definidas por el programa (donadores y aceptores de enlaces de hidrógeno, grupos hidrofóbicos, anillos aromáticos y zonas de ionización positivas o negativas). El algoritmo identifica pares de tripletes farmacofóricos con geometrías y entornos similares entre la molécula de referencia y la molécula cribada, alineándolos mediante un ajuste por mínimos cuadrados. Posteriormente, la mejor superposición es calculada usando el volumen compartido por ambas moléculas en las esferas del mismo tipo. Se retuvieron las 15000 mejores soluciones.

3.5. Preparación de las estructuras cristalográficas de SGK1

Las estructuras cristalográficas fueron obtenidas a través de la base de datos Protein Data Bank (PDBs 2R5T, 3HDM, 3HDN). Las estructuras fueron preparadas con el módulo

²⁵⁰ Duan, J.; Dixon, S. L.; Lowrie, J. F.; Sherman, W. Analysis and Comparison of 2D Fingerprints: Insights into Database Screening Performance Using Eight Fingerprint Methods. *J. Mol. Graph. Model.* **2010**, *29* (2), 157–170.

²⁵¹ Schrödinger Release 2020-3: Canvas, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2020.

²⁵² Schrödinger Release 2020-3: Phase, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2020.

Protein Preparation Wizard²⁵³ de Schrödinger: se añadieron los hidrógenos correspondientes, se generaron los estados de ionización más probables para un pH de 7.4 ± 2.0 y se modelaron los bucles y cadenas laterales restantes con Prime. Los cosolventes e iones fueron eliminados. Se optimizó la red de enlaces de hidrógeno con PROPKA a un pH de 7.4 y se minimizó el sistema con el campo de fuerzas OPLS3e.²⁵⁴ Finalmente, se eliminaron las moléculas de H₂O.

3.6. Predicción del modo de unión mediante experimentos de *docking*

Para cada estructura cristalográfica, se generó una malla de puntos o *grid* sobre la que realizar los experimentos de *docking*. El centro de la *grid* se definió con el ligando cocrystalizado. Las dimensiones de la malla se establecieron por defecto. La quimioteca ECBL, una vez preparada, se cribó mediante el módulo Glide²⁵⁵ de Schrödinger. La precisión del cribado fue estándar (SP)¹⁸⁰ para cribar la totalidad de la quimioteca. El 50% de las mejores soluciones fueron cribadas en precisión extra (XP)¹⁸¹ a modo de posprocesamiento. Las penalizaciones de cada estado calculadas con Epik²⁴⁷ fueron añadidas a la función de puntuación (ver apartado 3.2). Se estableció como criterio de aprobación que únicamente aquellas moléculas que obtuvieran una puntuación mínima de -6.000 kcal·mol⁻¹ podrían ser seleccionadas. Para cada molécula, se tomó la pose con mejor puntuación como la potencial conformación bioactiva. No se establecieron restricciones en la búsqueda conformacional de ligando dentro del centro activo. El resto de variables fueron definidas por defecto.

3.7. Predicción del modo de unión del compuesto 54 con la gp-P mediante *induced-fit docking*

Los cálculos de *induced-fit docking* fueron realizados mediante los módulos Glide y Prime de Schrödinger.²⁵⁶ La estructura cristalográfica de la gp-P (6QEX, cadena A) y el compuesto 54 fueron preparados como se explica en las secciones 3.2 y 3.5. Se utilizó el ligando cocrystalizado como centro de la *grid* sobre la que realizar los cálculos. Se procedió

²⁵³ Madhavi Sastry, G.; Adzhigirey, M.; Day, T.; Annabhimoju, R.; Sherman, W. Protein and Ligand Preparation: Parameters, Protocols, and Influence on Virtual Screening Enrichments. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2013**, 27 (3), 221–234.

²⁵⁴ Roos, K.; Wu, C.; Damm, W.; Reboul, M.; Stevenson, J. M.; Lu, C.; Dahlgren, M. K.; Mondal, S.; Chen, W.; Wang, L.; Abel, R.; Friesner, R. A.; Harder, E. D. OPLS3e: Extending Force Field Coverage for Drug-Like Small Molecules. *J. Chem. Theory Comput.* **2019**, 15 (3), 1863–1874.

²⁵⁵ Schrödinger Release 2020-3: Glide, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2020.

²⁵⁶ Miller, E. B.; Murphy, R. B.; Sindhikara, D.; Borrelli, K. W.; Grisewood, M. J.; Ranalli, F.; Dixon, S. L.; Jerome, S.; Boyles, N. A.; Day, T.; Ghanakota, P.; Mondal, S.; Rafi, S. B.; Troast, D. M.; Abel, R.; Friesner, R. A. Reliable and Accurate Solution to the Induced Fit Docking Problem for Protein-Ligand Binding. *J. Chem. Theory Comput.* **2021**, 17 (4), 2630–2639.

a predecir un máximo de 20 poses del complejo proteína-ligando con un escalado del radio de van de Waals (0.70 y 0.50 para el receptor y el ligando, respectivamente). Posteriormente, se optimizaron las conformaciones de aminoácidos que se encontraban a menos de 5 Å del ligando. Tras optimizar la conformación de la proteína, se volvió a realizar el acoplamiento del ligando en precisión XP. La pose con mejor puntuación (*IFD score*) fue considerada como correcta.

3.8. Simulaciones de dinámica molecular

Con el objetivo de analizar la estabilidad del sistema proteína-ligando, se recurrió al programa Desmond Molecular Dynamics System como parte del paquete informático de Schrödinger.²⁵⁷ El campo de fuerzas seleccionado fue OPLS4.²⁵⁸ El complejo proteína ligando se obtuvo de acuerdo al protocolo general de *docking* (ver apartado 3.6). Inicialmente, se parametrizaron las cargas parciales del ligando (ESP, del inglés *electrostatic potential charges*) mediante el módulo Jaguar,^{259,260} previa optimización geométrica con las funciones de base B3LYP-D3/6-31G**. El sistema proteína-ligando fue solvatado en una caja ortorrómbica de moléculas de H₂O (modelo SPC), neutralizado con contraiones en caso de que fuera necesario y se añadió concentraciones fisiológicas de NaCl (0.15 M). El sistema fue relajado y equilibrado con el protocolo por defecto del programa. La aproximación NPT fue la utilizada durante la etapa de producción a 300 K y 1.01325 bar. El termostato y baróstato seleccionados fueron Nose-Hover chain y Martyna-Tobias-Klein, respectivamente. La integración de la ecuación de movimiento se llevó a cabo cada 2 fs. Los fotogramas de la trayectoria se almacenaron cada 100 ps. Las réplicas mostradas en el trabajo corresponden a los valores de semilla 2007, 2008 y 2009. Los datos del análisis de la simulación se obtuvieron con el módulo Simulation Interactions Diagram. Únicamente se tuvieron en consideración aquellas interacciones con una frecuencia mínima del 25%. En el caso de describir el comportamiento del centro activo, este se definió como aquellos átomos de la proteína que se encuentran a una distancia igual o inferior a 5 Å del ligando.

²⁵⁷ Schrödinger Release 2022-3: Desmond Molecular Dynamics System, D. E. Shaw Research, New York, NY, 2022. Maestro-Desmond Interoperability Tools, Schrödinger, New York, NY, 2022.

²⁵⁸ Lu, C.; Wu, C.; Ghoreishi, D.; Chen, W.; Wang, L.; Damm, W.; Ross, G. A.; Dahlgren, M. K.; Russell, E.; Von Bargen, C. D.; Abel, R.; Friesner, R. A.; Harder, E. D. OPLS4: Improving Force Field Accuracy on Challenging Regimes of Chemical Space. *J. Chem. Theory Comput.* **2021**, *17* (7), 4291–4300.

²⁵⁹ Bochevarov, A. D.; Harder, E.; Hughes, T. F.; Greenwood, J. R.; Braden, D. A.; Philipp, D. M.; Rinaldo, D.; Halls, M. D.; Zhang, J.; Friesner, R. A. Jaguar: A High-Performance Quantum Chemistry Software Program with Strengths in Life and Materials Sciences. *Int. J. Quantum Chem.* **2013**, *113* (18), 2110–2142.

²⁶⁰ Schrödinger Release 2022-3: Jaguar, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2022.

3.9. Cálculo de energía libre de unión

La energía libre de unión se calculó mediante la aproximación MM-GBSA. Para cada trayectoria, se extrajeron las coordenadas del sistema cada 10 ns y se analizaron mediante el *script* `thermal_mmgsa.py` incluido en el paquete informático de Schrödinger.

3.10. Construcción de la red de interacciones proteína-proteína y cálculos asociados

Los detalles de la construcción de la PPIn pueden encontrarse en el siguiente repositorio: <https://github.com/ramirezlab/WIKI/tree/master/NetworkPharmacology>. Brevemente, las bases de datos utilizadas en esta construcción fueron ChEMBL (v.31) y TTD (v.8.1.01). A partir de la base de datos de ChEMBL, se obtuvo el listado de indicaciones terapéuticas disponibles. Tras la selección de la patología de interés (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, EFO_ID: MONDO0004975), se identificaron las dianas presentes en ambas bases de datos, ChEMBL²¹⁵ y TTD,²¹⁴ que son moduladas por compuestos con indicación terapéutica para dicha enfermedad, desde etapas preclínicas hasta fármacos en el mercado. Para cada diana o nodo, se añadió un máximo de 20 primeros vecinos a la red mediante la base de datos STRING.²¹⁶ Como criterio de filtrado de las interacciones, se exigió que hubieran sido validadas experimentalmente por métodos directos (score ≥ 0.7) o que estuvieran ampliamente documentadas en múltiples bases de datos (dscore ≥ 0.7).²⁶¹

El cálculo de los segundos vecinos se realizó mediante la librería NetworkX (v.2.8.4).²¹⁸ La lista de nodos de interés se obtuvo a través de la plataforma Open Targets (v.25.03) mediante el término de búsqueda “Alzheimer’s Disease” y aplicando un filtro de puntuación de 0.05 (1725 entradas). Para la realización del análisis modular, los términos KEGG (v. 2021) enriquecidos fueron calculados mediante los programas ShinyGO (v. 0.82)²²⁷ y EnrichR (última versión, 8 de junio de 2023).²²⁸ Para ShinyGO, se determinó que el número mínimo y máximo de proteínas para un término fuera 2 y 5000, respectivamente. Únicamente se retuvieron aquellos términos con un p-valor ajustado menor a 0.05. La búsqueda de módulos se realizó mediante el programa MTGO.²²⁴ El número mínimo y máximo de entidades que componen un módulo se estableció en 15 y 300, respectivamente.

²⁶¹ Szklarczyk, D.; Nastou, K.; Koutrouli, M.; Kirsch, R.; Mehryary, F.; Hachilif, R.; Hu, D.; Peluso, M. E.; Huang, Q.; Fang, T.; Doncheva, N. T.; Pyysalo, S.; Bork, P.; Jensen, L. J.; von Mering, C. The STRING Database in 2025: Protein Networks with Directionality of Regulation. *Nucleic Acids Res.* **2025**, 53 (D1), D730–D737.

Las redes generadas fueron visualizadas mediante Cytoscape (v.3.10.0).²⁶² Todos los flujos de trabajo generados pueden localizarse en el repositorio de la tesis (<https://doi.org/10.5281/zenodo.15112707>).

4. Procedimientos químicos

4.1. Reactivos, instrumental y elucidación estructural

Los reactivos comerciales utilizados en la síntesis mostrada en este trabajo se obtuvieron de Sigma-Aldrich, Fluorochem, Activate Scientific y BLDPharm. La síntesis mediada por irradiación de microondas se llevó a cabo en un equipo initiator TM de Biotage. Las CCF fueron realizadas en placas cromatográficas de gel de sílice (Merck, 60 F254, 0.2 mm) y reveladas mediante luz ultravioleta ($\lambda = 254/365$ nm). El aislamiento de los productos mediante cromatografía en columna se realizó mediante el uso de gel de sílice (Merck, 60 (230-400 mesh ASTM)).

Los espectros de H^1 -RMN y C^{13} -RMN se adquirieron en un espectrómetro Bruker AVIII 300 MHz BACS-60 o Bruker AV 500 MHz provenientes del centro de apoyo a la investigación (CAI) de la Universidad Complutense de Madrid. El desplazamiento químico (δ), expresado en ppm, se determinó tomando como referencia la señal del disolvente utilizado. La multiplicidad de las señales (s: singlete, d: doblete, dt: doblete de tripletes, ddd: doblete de doblete de dobletes, dddd: doblete de doblete de doblete de dobletes, t:tripleto, td: tripleto de dobletes, tdd: tripleto de doblete de dobletes, q: cuadruplete, hept: heptuplete, m: multiplete), las constantes de acoplamiento (J , expresada en Hz) y la asignación estructural se encuentran indicadas en cada caso. Los espectros resultantes fueron analizados mediante el programa MestReNova (v.12.0.0).

Se utilizaron dos equipos de HPLC-MS: un equipo TermoFisher acoplado con FinniganTM LXQTM con ionización positiva con electrospray (ESI), y un equipo 1260 Infinity II de Agilent acoplado con MSD XT de cuadrupolo con ESI. La columna cromatográfica utilizada en ambos casos fue una ZOBRA[®]X SB-C18. El eluyente fue H₂O (0.1 % CH₂O₂)/CH₃CN (0.09 % CH₂O₂) con un flujo de 0.8 mL·min⁻¹ a 23 °C con un volumen de inyección de 5 μ L mediante el siguiente gradiente: concentración inicial de 5% de CH₃CN, aumento lineal hasta 100 % durante 3 min, 100 % durante 1.45 min y bajada

²⁶² Shannon, P.; Markiel, A.; Ozier, O.; Baliga, N. S.; Wang, J. T.; Ramage, D.; Amin, N.; Schwikowski, B.; Ideker, T. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Res.* **2003**, *13* (11), 2498–2504.

lineal hasta 5 % durante 0.55 min. El cálculo de la pureza de los compuestos se realizó mediante un detector PDA Surveyor plus UV-VIS.

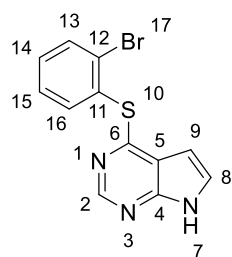
Los puntos de fusión se calcularon mediante un equipo Büchi Melting Point M-560. La masa molecular exacta obtenida por espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) se obtuvo mediante un cromatógrafo de líquidos Agilent 1200LC acoplado a un espectrómetro de masas Agilent 6500 con fuente de ionización ESI/APCI y analizador híbrido cuadrupolo/tiempo de vuelo (QTOF) proveniente del Servicio de Espectroscopía de Masas del Instituto de Química Orgánica General (IQOG-CSIC).

Todos los compuestos aquí descritos se han sintetizado durante el trabajo de esta tesis doctoral. En caso de que el compuesto se encuentre caracterizado en la literatura, se aporta la referencia correspondiente.

4.2. Síntesis de los derivados de 4-(feniltio)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina.

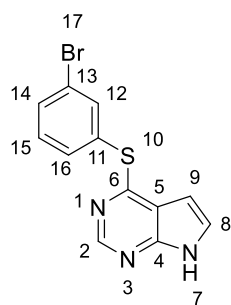
Procedimiento general A: se disolvió el reactivo 4-cloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (1.0 equivalentes) y el tiofenol correspondiente (1.0 equivalentes) en 1.5 mL·mmol⁻¹ de *i*-PrOH. Se adicionó gota a gota la cantidad correspondiente de TEA (2.0 equivalentes). El crudo de reacción se sometió a irradiación de microondas a 140 °C durante 20 min. Posteriormente, el disolvente fue evaporado, disuelto en AcOEt (10 mL·mmol⁻¹) y lavado con H₂O (3 x 10 mL·mmol⁻¹). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó a presión reducida. Finalmente, el producto deseado fue aislado mediante cromatografía en columna (DCM:MeOH, 40:1).

4-((2-Bromofenil)tio)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (a)



Procedimiento general A. Reactivos: 4-cloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (200 mg, 1.30 mmol), 2-bromotiofenol (246 mg, 1.30 mmol), TEA (360 µL, 2.60 mmol). Sólido blanco. Rendimiento: 354 mg, 40 %. P.f.: 178-180 °C. ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆): δ 12.24 (s, 1H, H-7), 8.46 (s, 1H, H-2), 7.88-7.77 (m, 2H, H-13, H-15), 7.54-7.39 (m, 3H, H-8, H-14, H-16), 6.08 (dd, *J* = 3.6, 1.8 Hz, 1H, H-9). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-d₆): δ 158.2 (C-6), 150.3 (C-2), 150.0 (C-4), 137.9 (C-15), 133.5 (C-13), 131.7 (C-14), 129.9 (C-11), 129.5 (C-12), 128.6 (C-16), 126.5 (C-8), 115.0 (C-5), 98.1 (C-9). HPLC-MS [M+H]⁺ = 306, T_R = 5.13 min (99 %). HRMS (ESI) calculado para C₁₂H₉BrN₃S [M + H]⁺ 305.9695, hallado 305.9698.

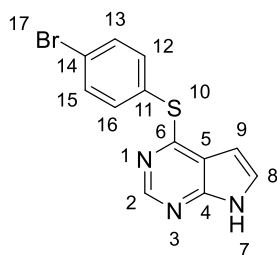
4-((3-Bromofenil)tio)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (b)



Procedimiento general A. Reactivos: 4-cloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (200 mg, 1.30 mmol), 3-bromotiofenol (246 mg, 1.30 mmol), TEA (360 μ L, 2.60 mmol). Sólido blanco. Rendimiento: 342 mg, 86 %. P.f.: 169-171 $^{\circ}$ C. 1 H-RMN (300 MHz, DMSO- d_6): δ 12.26 (s, 1H, H-7), 8.49 (s, 1H, H-2), 7.86 (t, J = 1.8 Hz, 1H, H-12), 7.71 (ddd, J = 8.0, 2.0, 1.0 Hz, 1H, H-16), 7.65 (dd, J = 7.8, 1.7 Hz, 1H, H-

14), 7.51 (dd, J = 3.6, 2.4 Hz, 1H, H-8), 7.45 (t, J = 7.9 Hz, 1H, H-15), 6.20 (dd, J = 3.6, 1.8 Hz, H-9). 13 C-RMN (75 MHz, DMSO- d_6): δ 158.6 (C-6), 150.6 (C-2), 150.2 (C-4), 137.3 (C-12), 134.3 (C-14), 132.6 (C-16), 131.5 (C-15), 130.8 (C-11), 126.9 (C-8), 122.2 (C-13), 115.2 (C-5), 98.5 (C-9). HPLC-MS $[M+H]^+$ = 306, T_R = 5.61 min (99 %). HRMS (ESI) calculado para $C_{12}H_9BrN_3S$ $[M + H]^+$ 305.9695, hallado 305.9699.

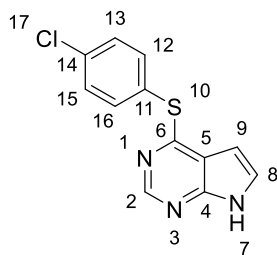
4-((4-Bromofenil)tio)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (c)



Procedimiento general A. Reactivos: 4-cloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (200 mg, 1.30 mmol), 4-bromotiofenol (246 mg, 1.30 mmol), TEA (360 μ L, 2.60 mmol). Sólido blanco. Rendimiento: 326 mg, 82 %. P.f.: 167-169 $^{\circ}$ C. 1 H-RMN (300 MHz, DMSO- d_6): δ 12.24 (s, 1H, H-9), 8.47 (s, 1H, H-2), 7.69 (d, J = 8.6 Hz, 2H, H-

13-15), 7.58 (d, J = 8.6 Hz, 2H, H-12, H-16), 7.50 (dd, J = 3.5, 2.5 Hz, 1H, H-8), 6.19 (dd, J = 3.5, 1.8 Hz, 1H, H-9). 13 C-RMN (75 MHz, DMSO- d_6): δ 159.0 (C-6), 150.8 (C-2), 150.3 (C-4), 137.6 (C-12, C-16), 132.8 (C-13, C-15), 128.1 (C-11), 127.0 (C-8), 123.6 (C-14), 115.4 (C-5), 98.7 (C-9). HPLC-MS $[M+H]^+$ = 306, T_R = 5.80 min (99 %). HRMS (ESI) calculado para $C_{12}H_9BrN_3S$ $[M + H]^+$ 305.9695, hallado 305.9699.

4-((4-Clorofenil)tio)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (d)

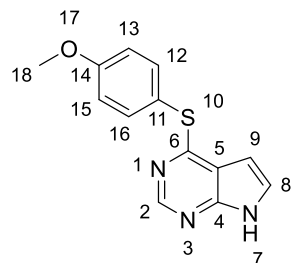


Procedimiento general A. Reactivos: 4-cloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (200 mg, 1.30 mmol), 4-clorotiofenol (188 mg, 1.30 mmol), TEA (360 μ L, 2.60 mmol). Sólido blanco. Rendimiento: 300 mg, 88 %. P.f.: 245-247 $^{\circ}$ C. 1 H-RMN (300 MHz, DMSO- d_6): δ 12.24 (s, 1H, H-7), 8.47 (s, 1H, H-2), 7.66 (d, J = 8.6 Hz, 2H, H-

13, H-15), 7.55 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H-12, H-16), 7.49 (dd, J = 3.5, 2.4 Hz, 1H, H-8), 6.18 (dd, J = 3.6, 1.8 Hz, 1H, H-7). 13 C-RMN (75 MHz, DMSO- d_6): δ 159.1 (C-6), 150.8 (C-2), 150.3 (C-4), 137.4 (C-13, C-15), 134.9 (C-11), 129.9 (C-12, C-16), 127.5 (C-14), 127.0 (C-

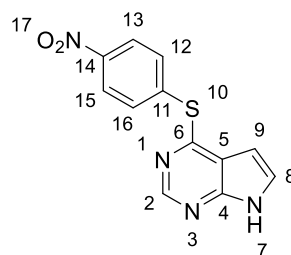
8), 115.4 (C-5), 98.7 (C-9). HPLC-MS $[M+H]^+ = 262$, $T_R = 5.70$ min (99 %). HRMS (ESI) calculado para $C_{12}H_9ClN_3S$ $[M+H]^+ 262.0200$, hallado 262.0205.

4-((4-Metoxifenil)tio)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (e)²⁶³



Procedimiento general A. Reactivos: 4-cloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (100 mg, 0.65 mmol), 4-metoxitiofenol (91 mg, 0.65 mmol), TEA (180 μ L, 1.30 mmol). Sólido blanco. Rendimiento: 154 mg, 92 %. P.f.: 194-196 $^{\circ}$ C (lit. 154-157 $^{\circ}$ C). 1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6): δ 12.14 (s, 1H, H-7), 8.43 (s, 1H, H-2), 7.57 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, H-12, H-16), 7.41 (dd, $J = 3.6, 2.2$ Hz, 1H, H-8), 7.06 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H-13, H-15), 5.92 (dd, $J = 3.6, 1.5$ Hz, 1H, H-9), 3.83 (s, 3H, H-18). ^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO- d_6): δ 160.7 (C-6), 160.6 (C-14), 150.2 (C-2), 149.9 (C-4), 137.4 (C-12, C-16), 126.0 (C-8), 118.2 (C-11), 115.0 (C-13, C-15), 114.5 (C-5), 98.3 (C-9), 55.4 (C-18). HPLC-MS $[M+H]^+ = 258$, $T_R = 4.83$ min (99 %). HRMS (ESI) calculado para $C_{13}H_{12}N_3OS$ $[M+H]^+ 258.0696$, hallado 258.0697.

4-((4-Nitrofenil)tio)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (f)



Procedimiento general A. Reactivos: 4-cloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (200 mg, 1.30 mmol), 4-nitrotiofenol (202 mg, 1.30 mmol), TEA (360 μ L, 2.60 mmol). Sólido amarillo. Rendimiento: 288 mg, 81 %. P.f.: 189-191 $^{\circ}$ C. 1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6): δ 12.36 (s, 1H, H-7), 8.55 (s, 1H, H-2), 8.27 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H-13, H-15), 7.88 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-12, H-16), 7.57 (t, $J = 3.0$ Hz, 1H, H-8), 6.37 (dd, $J = 3.6, 1.7$ Hz, 1H, H-9). ^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO- d_6): δ 156.4 (C-6), 150.4 (C-2), 150.1 (C-4), 147.3 (C-14), 138.0 (C-11), 134.3 (C-12, C-16), 127.2 (C-8), 124.0 (C-13, C-15), 115.8 (C-5), 98.4 (C-9). HPLC-MS $[M+H]^+ = 273$, $T_R = 5.08$ min (99 %). HRMS (ESI) calculado para $C_{12}H_9N_4O_2S$ $[M+H]^+ 273.0441$, hallado 273.0442.

²⁶³ Liu, W.; Jin, X.; Ma, D. Nucleophilic Aromatic Substitution of Heteroaryl Halides with Thiols. *J. Org. Chem.* **2024**, *89* (12), 8745–8758.

4.3. Síntesis de los derivados de *N*-(1*H*-indazol-5-il)-4-fenil-1*H*-pirrol-3-carboxamida (H3)

Procedimiento general B: se disolvió el ácido (*E*)-3-arilacrílico correspondiente (1.0 equivalentes) en MeOH (2 mL·mmol⁻¹). Inmediatamente después y a temperatura ambiente, se añadió gota a gota el TMSCl (2.2 equivalentes). La reacción se dejó en agitación durante 24 h a temperatura ambiente. El MeOH se evaporó a presión reducida y el crudo obtenido se disolvió en AcOEt (2 mL·mmol⁻¹). La solución se lavó con H₂O (3 x 2 mL·mmol⁻¹), la fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y finalmente se evaporó a presión reducida, obteniéndose el (*E*)-3-arilacrilato de metilo correspondiente.

Procedimiento general C: sobre una disolución del ácido (*E*)-3-arilacrílico correspondiente (1.0 equivalentes) en DMF anhidra (1 mL·mmol⁻¹) en atmósfera de argón, se añadió DIPEA (3.0 equivalentes) gota a gota y se dejó reaccionar en agitación durante 15 min. Después, se añadió gota a gota una mezcla de HBTU (1.5 equivalentes) y la amina correspondiente (1.1 equivalentes) en DMF anhidra (1 mL·mmol⁻¹). Se dejó reaccionar durante 2 h y se adicionó AcOEt (5 mL·mmol⁻¹). En caso de que el producto final no precipitara, la fase orgánica se lavó con H₂O (3 x 5 mL·mmol⁻¹), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó, purificando el compuesto por columna cromatográfica según se indique en cada caso.

Procedimiento general D: se disolvió una mezcla de TosMIC (1.1 equivalentes) y la olefina correspondiente (1.0 equivalentes) en DMF anhidra (0.5 mL·mmol⁻¹) y en atmósfera de argón. La disolución se añadió gota a gota sobre una mezcla de NaH (3.0 equivalentes, 60 % dispersión) en DMF anhidra (0.5 mL·mmol⁻¹), a 0 °C. Después de la adición, la reacción se dejó en agitación durante 1 o 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionaron 2 mL de H₂O, se diluyó en AcOEt (5 mL·mmol⁻¹) y se lavó vigorosamente con una mezcla de H₂O y H₂O saturada de NaCl (5 x 5 mL·mmol⁻¹, 1:1) para eliminar la DMF. Finalmente, la fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó a vacío, obteniéndose el producto deseado. En caso de que el compuesto necesitase ser purificado mediante cromatografía en columna, las condiciones pertinentes se indican en cada caso.

Procedimiento general E: se disolvió el correspondiente 4-aril-1*H*-pirrol-3-carboxilato de metilo (1.0 equivalente) en DMF anhidra (1.0 mL·mmol⁻¹) en atmósfera de argón. A 0 °C, se añadió el NaH (dispersión al 60 %, 1.3 equivalentes) disuelto en DMF

anhídrica (1.0 mL·mmol⁻¹) gota a gota. Después se añadió CH₃I (2.0 equivalentes) gota a gota y se dejó reaccionar durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 2 mL de H₂O, se diluyó en AcOEt (5 mL·mmol⁻¹) y se lavó vigorosamente con una mezcla de H₂O y H₂O saturada de NaCl (5 x 5 mL·mmol⁻¹, 1:1) para eliminar la DMF. Finalmente, la fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó a vacío. El compuesto se purificó mediante columna cromatográfica (Hex:AcOEt, 7:3) para obtener el correspondiente 4-aril-1-metil-1*H*-pirrol-3-carboxilato de metilo.

Procedimiento general F: se disolvió una mezcla del correspondiente 4-aril-1*H*-pirrol-3-carboxilato de metilo (1.0 equivalentes) e NaOH (10 equivalentes) en una solución 1:1 de MeOH/H₂O (1.0 mL·mmol⁻¹). La reacción se calentó a reflujo durante 1 o 2 h. Pasado este tiempo, la mezcla se diluyó en H₂O (5 mL·mmol⁻¹), se lavó con AcOEt (1 x 1 mL·mmol⁻¹) y la fase acuosa se acidificó con HCl al 37 % hasta alcanzar un pH de 2-3 o precipitar el compuesto, el cual se filtró, obteniendo el correspondiente ácido 4-aril-1*H*-pirrol-3-carboxílico.

Procedimiento general G: se disolvió una mezcla del correspondiente ácido 4-aril-1*H*-pirrol-3-carboxílico (1.0 equivalentes), la amina adecuada (1.2 equivalentes), EDC (1.0 equivalentes), DMAP (2.0 equivalentes), HOBT (0.1 equivalentes) y DIPEA (5 equivalentes) en CH₃CN anhidro (2 mL·mmol⁻¹), en atmósfera de argón. La reacción se dejó en agitación durante 2 h o hasta agotamiento del reactivo limitante mediante monitorización por CCF a temperatura ambiente. El disolvente se evaporó a vacío, el crudo se disolvió en AcOEt (5 mL·mmol⁻¹) y se lavó con H₂O (3 x 5 mL·mmol⁻¹). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y evaporó a presión reducida. El crudo obtenido se purificó mediante columna cromatográfica (DCM:MeOH, 30:1).

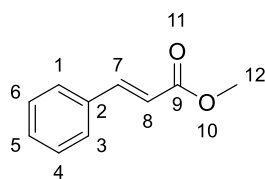
Procedimiento general H: se disolvió una mezcla del correspondiente ácido 4-aril-1*H*-pirrol-3-carboxílico (1.0 equivalentes), el fenol adecuado (1.1 equivalentes), CDI (1.1 equivalentes) y DMAP (1.1 equivalentes), en CH₃CN anhidro (3 mL·mmol⁻¹) en atmósfera de argón. La reacción se dejó en agitación durante 48 h. El disolvente se evaporó a vacío, el crudo se disolvió en AcOEt (5 mL·mmol⁻¹) y se lavó con H₂O (3 x 5 mL·mmol⁻¹). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y evaporó a presión reducida. El crudo obtenido se purificó mediante columna cromatográfica (DCM:MeOH, 30:1).

Procedimiento general I: se disolvió una mezcla del correspondiente ácido (1.0 equivalentes), la amina indicada en cada caso (1.1 equivalentes), y BOP (1.3 equivalentes)

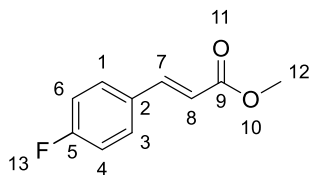
en THF anhidro ($5 \text{ mL} \cdot \text{mmol}^{-1}$) en atmosfera de argón. Tras la disolución completa, se añadió gota a gota DIPEA (1.5 equivalentes) y se dejó reaccionar en agitación a temperatura ambiente durante 2 h o hasta agotamiento del reactivo limitante, monitorizado por CCF. El THF se evaporó a presión reducida, el crudo se disolvió en AcOEt ($5 \text{ mL} \cdot \text{mmol}^{-1}$) y se lavó con H_2O ($3 \times 5 \text{ mL} \cdot \text{mmol}^{-1}$). Posteriormente, la fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se evaporó a presión reducida. El crudo obtenido se purificó mediante columna cromatográfica (DCM:MeOH, 30:1).

Procedimiento general J: se disolvió el pirrol correspondiente (1.0 equivalentes), Cs_2CO_3 (1.3 equivalentes), 3-cloro-*N,N*-dimetilpropan-1-amina (1.3 equivalentes) y KI (0.2 equivalentes) en DMF anhidra ($1 \text{ mL} \cdot \text{mmol}^{-1}$) y se mantuvo en agitación a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 18 h. Se añadió AcOEt ($5 \text{ mL} \cdot \text{mmol}^{-1}$) y lavó con una mezcla de H_2O y H_2O saturada de NaHCO_3 ($5 \times 5 \text{ mL} \cdot \text{mmol}^{-1}$, 1:1) para eliminar la DMF. La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se evaporó. El crudo se disolvió en una mezcla de DCM y TFA (4:1, $3 \text{ mL} \cdot \text{mmol}^{-1}$) y se dejó en agitación durante 6 h a temperatura ambiente. A continuación, se adicionó H_2O saturada de NaHCO_3 hasta alcanzar un pH básico. La fase acuosa se extrajo con AcOEt ($3 \times 5 \text{ mL} \cdot \text{mmol}^{-1}$), se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se evaporó. El crudo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna (DCM:MeOH, 9:1), obteniendo el compuesto deseado.

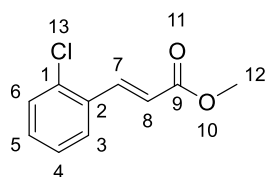
Procedimiento general K: sobre una mezcla del nitroderivado correspondiente (1.0 equivalentes) y el diazoacetato de etilo (4.0 equivalentes) a temperatura ambiente, se añadió TEA (0.2 equivalentes) y se dejó reaccionando en agitación durante 24 h. A continuación, se eliminó el disolvente y los compuestos volátiles a presión reducida. El sólido se lavó con una mezcla DCM/Hex 8:2, se disolvió en HCl 37 % ($3 \text{ mL} \cdot \text{mmol}^{-1}$) y se calentó a reflujo durante 4 h. A continuación, la mezcla se dejó enfriar y se concentró mediante la evaporación del disolvente. El sólido obtenido se filtró y se secó, obteniendo el ácido correspondiente.

4.3.1. Síntesis de los derivados de (*E*)-3-arilacrilato de metilo 1, 13-25, 85**(*E*)-3-Fenilacrilato de metilo (1)**²⁶⁴

Procedimiento general B. Reactivos: ácido (*E*)-3-fenilacrílico (1000 mg, 6.75 mmol) y TMSCl (1.9 mL, 14.85 mmol). Sólido blanco. Rendimiento: 1012 mg, 92 %. ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.77 – 7.61 (m, 3H, H-1, H-3, H-7), 7.48 – 7.37 (m, 3H, H-4, H-5, H-6), 6.65 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, H-8), 3.73 (s, 3H, H-12). HPLC-MS [M+H]⁺ = 181, T_R = 3.60 min (99 %). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.7 (C-9), 144.5 (C-7), 134.0 (C-2), 130.5 (C-5), 128.9 (C-4, C-6), 128.4 (C-1, C-3), 117.8 (C-8), 51.5 (C-12). HPLC-MS [M+H]⁺ = 163, T_R = 3.61 min (99 %).

(*E*)-3-(4-Fluorofenil)acrilato de metilo (13)²⁶⁴

Procedimiento general B. Reactivos: ácido (*E*)-3-(4-fluorofenil)acrílico (1520 mg, 9.15 mmol) y TMSCl (2.6 mL, 20.13 mmol). Sólido blanco. Rendimiento: 1450 mg, 88 %. ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.81 (dd, *J* = 8.5, 5.5 Hz, 2H, H-1, H-3), 7.67 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H, H-7), 7.26 (t, *J* = 8.8 Hz, 2H, H-4, H-6), 6.62 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H, H-8), 3.72 (s, 3H, H-12). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.6 (C-9), 163.3 (d, *J* = 250.3 Hz, C-5), 143.3 (C-7), 130.9 (C-2), 130.7 (d, *J* = 7.1 Hz, C-1, C-3), 117.7 (C-8), 115.9 (d, *J* = 21.6 Hz, C-4, C-6), 51.5 (C-12). HPLC-MS [M+H]⁺ = 181, T_R = 3.60 min (99 %).

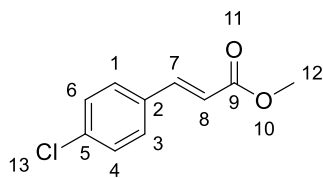
(*E*)-3-(2-Clorofenil)acrilato de metilo (14)²⁶⁴

Procedimiento general B. Reactivos: ácido (*E*)-3-(2-clorofenil)acrílico (3000 mg, 16.43 mmol) y TMSCl (4.6 mL, 36.15 mmol). Sólido blanco. Rendimiento: 3001 mg, 92 %. ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.95 (dd, *J* = 7.5, 1.9 Hz, 1H, H-3), 7.92 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, H-7), 7.55 (dd, *J* = 7.9, 1.5 Hz, 1H, H-6), 7.45 (td, *J* = 7.6, 2.0 Hz, 1H, H-5), 7.40 (td, *J* = 7.4, 1.4 Hz, 1H, H-4), 6.69 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, H-8), 3.75 (s, 3H, H-12). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.3 (C-9), 139.2 (C-7), 133.7 (C-1), 131.9 (C-5), 131.6 (C-

²⁶⁴ Tripathi, J.; Gupta, H.; Sharma, A. Photoacid-Catalyzed Esterification of Carboxylic Acids Using Eosin Y. *Org. Lett.* **2025**, 27 (4), 1018–1023.

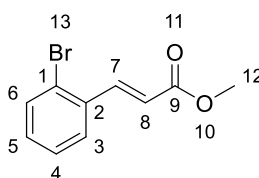
2), 130.0 (C-6), 128.3 (C-3), 127.8 (C-4), 120.9 (C-8), 51.7 (C-12). HPLC-MS $[M+H]^+ = 197$, $T_R = 3.84$ min (99 %).

(E)-3-(4-Clorofenil)acrilato de metilo (15)²⁶⁵



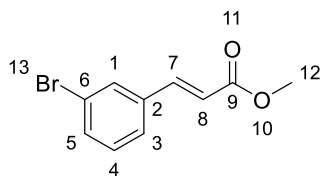
Procedimiento general B. Reactivos: ácido (E)-3-(4-clorofenil)acrílico (5000 mg, 27.38 mmol) y TMSCl (7.6 mL, 60.24 mmol). Sólido blanco. Rendimiento: 4600 mg, 85 %. ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7.76 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-1, H-3), 7.66 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, H-7), 7.48 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-4, H-6), 6.67 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, H-8), 3.73 (s, 3H, H-12). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-d₆) δ 166.5 (C-9), 143.1 (C-7), 135.0 (C-5), 133.0 (C-2), 130.1 (C-1, C-3), 128.9 (C-4, C-6), 118.7 (C-8), 51.5 (C-12). HPLC-MS $[M+H]^+ = 197$, $T_R = 3.90$ min (99 %).

(E)-3-(2-Bromofenil)acrilato de metilo (16)²⁶⁶



Procedimiento general B. Reactivos: ácido (E)-3-(2-bromofenil)acrílico (3000 mg, 13.21 mmol) y TMSCl (3.7 mL, 29.07 mmol). Aceite amarillo. Rendimiento: 2973 mg, 93 %. ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7.94 (dd, $J = 7.5, 1.8$ Hz, 1H, H-3), 7.89 (d, $J = 15.7$ Hz, 1H, H-7), 7.72 (dd, $J = 8.0, 1.3$ Hz, 1H, H-6), 7.44 (tdd, $J = 7.9, 1.4, 0.6$ Hz, 1H, H-4), 7.37 (td, $J = 7.7, 1.9$ Hz, 1H, H-5), 6.69 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H, H-8), 3.75 (s, 3H, H-12). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-d₆) δ 166.2 (C-9), 141.9 (C-7), 133.3 (C-2), 133.2 (C-6), 132.1 (C-5), 128.5 (C-3), 128.3 (C-4), 124.6 (C-1), 121.0 (C-8), 51.7 (C-12). HPLC-MS $[M+H]^+ = 241$, $T_R = 3.90$ min (95 %).

(E)-3-(3-Bromofenil)acrilato de metilo (17)²⁶⁴



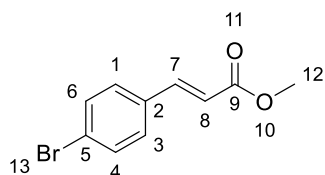
Procedimiento general B. Reactivos: ácido (E)-3-(3-bromofenil)acrílico (3000 mg, 13.21 mmol) y TMSCl (3.7 mL, 29.07 mmol). Sólido blanco. Rendimiento: 2611 mg, 82 %. ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7.98 (t, $J = 1.8$, 1H, H-1), 7.74 (dt, $J = 7.7, 1.1$ Hz, 1H, H-3), 7.64 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, H-7), 7.61 (ddd, $J = 8.0, 2.0, 1.0$ Hz, 1H, H-5), 7.38 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-4), 6.73 (d, $J = 16.1$ Hz, 1H, H-8), 3.73 (s, 3H, H-

²⁶⁵ Zhang, Z.; Wang, Z. Diatomite-Supported Pd Nanoparticles: An Efficient Catalyst for Heck and Suzuki Reactions. *J. Org. Chem.* **2006**, *71* (19), 7485–7487.

²⁶⁶ Oger, N.; Le Callonnec, F.; Jacquemin, D.; Fouquet, E.; Le Grogne, E.; Felpin, F.-X. Heck–Matsuda Arylation of Olefins Through a Bicataltic Approach: Improved Procedures and Rationalization. *Adv. Synth. Catal.* **2014**, *356* (5), 1065–1071.

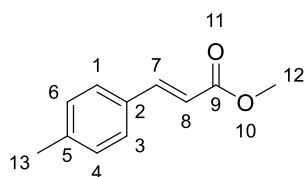
12). ^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 166.4 (C-9), 142.9 (C-7), 136.5 (C-2), 133.0 (C-5), 130.9 (C-1), 130.8 (C-4), 127.3 (C-3), 122.3 (C-6), 119.5 (C-8), 51.6 (C-12). HPLC-MS $[\text{M}+\text{H}]^+ = 241$, $T_{\text{R}} = 3.90$ min (99 %).

(E)-3-(4-Bromofenil)acrilato de metilo (18)²⁶⁴



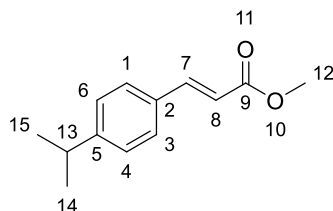
Procedimiento general B. Reactivos: ácido (*E*)-3-(4-bromofenil)acrílico (3000 mg, 13.21 mmol y, TMSCl (3.7 mL, 29.07 mmol). Sólido blanco. Rendimiento: 2456 mg, 77 %. ^1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 7.69 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H-1, H-3), 7.64 (d, $J = 16.4$ Hz, 1H, H-7), 7.62 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H-4, H-6), 6.69 (d, $J = 16.1$ Hz, 1H, H-8), 3.73 (s, 3H, 12). ^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 166.5 (C-9), 143.2 (C-7), 133.3 (C-2), 131.9 (C-4, C-6), 130.3 (C-1, C-3), 123.8 (C-5), 118.7 (C-8), 51.5 (C-12). HPLC-MS $[\text{M}+\text{H}]^+ = 241$, $T_{\text{R}} = 3.92$ min (99 %).

(E)-3-(*p*-Tolil)acrilato de metilo (19)²⁶⁴



Procedimiento general B. Reactivos: ácido (*E*)-3-(*p*-tolil)acrílico (2000 mg, 12.33 mmol) y TMSCl (3.4 mL, 27.13 mmol). Sólido blanco. Rendimiento: 2033 mg, 94 %. ^1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 7.63 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H, H-7), 7.60 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H-1, H-3), 7.23 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, H-4, H-6), 6.57 (d, $J = 16.1$ Hz, 1H, H-8), 3.71 (s, 3H, H-12), 2.33 (s, 3H, H-13). ^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 166.8 (C-9), 144.5 (C-7), 140.5 (C-5), 131.3 (C-2), 129.5 (C-4, C-6), 128.4 (C-1, C-3), 116.7 (C-8), 51.4 (C-12), 21.0 (C-13). HPLC-MS $[\text{M}+\text{H}]^+ = 177$, $T_{\text{R}} = 3.81$ min (99 %).

(E)-3-(4-Isopropilfenil)acrilato de metilo (20)²⁶⁷

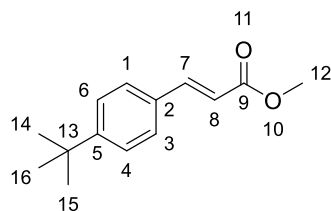


Procedimiento general B. Reactivos: ácido (*E*)-3-(4-isopropilfenil)acrílico (1000 mg, 5.26 mmol) y TMSCl (1.5 mL, 11.56 mmol). Sólido blanco. Rendimiento: 1040 mg, 97 %. ^1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 7.63 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, H-7), 7.63 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H-1, H-3), 7.29 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H-4, H-6), 6.58 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, H-8), 3.72 (s, 3H, H-12), 2.91 (hept, $J = 6.9$ Hz, 1H, H-13), 1.20 (d, $J = 6.9$ Hz, 6H, H-14, H-15). ^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 166.8 (C-9), 151.2 (C-5), 144.5

²⁶⁷ Mao, J.; Liu, D.; Li, Y.; Zhao, J.; Rong, G.; Yan, H.; Zhang, G. A Practical, Chemoselective Approach to O-Methylation of Carboxylic Acids with Dimethyl Malonate. *Tetrahedron* **2015**, *71* (48), 9067–9072.

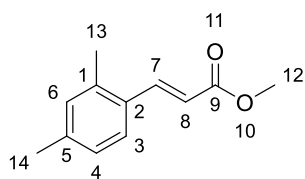
(C-7), 131.7 (C-2), 128.5 (C-1, C-3), 126.9 (C-4, C-6), 116.8 (C-8), 51.4 (C-12), 33.4 (C-13), 23.6 (C-14, C-15). HPLC-MS $[M+H]^+ = 205$, $T_R = 4.18$ min (99 %).

(E)-3-(4-(Terc-butil)fenil)acrilato de metilo (21)²⁶⁸



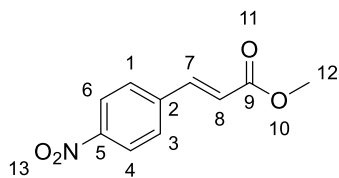
Procedimiento general B. Reactivos: ácido (E)-3-(4-*terc*-butil)fenil)acrílico (1000 mg, 4.90 mmol) y TMSCl (1.4 mL, 11.78 mmol). Sólido blanco. Rendimiento: 1029 mg, 96 %. ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.64 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-1, H-3), 7.64 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H, H-7), 7.44 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H-4, H-6), 6.59 (d, $J = 16.1$ Hz, 1H, H-8), 3.72 (s, 3H, 12), 1.28 (s, 9H, H-14, H-15, H-16). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.8 (C-9), 153.4 (C-5), 144.4 (C-7), 131.3 (C-2), 128.2 (C-1, C-3), 125.7 (C-4, C-6), 116.9 (C-8), 51.4 (C-12), 34.6 (C-13), 30.9 (C-14, C-15, C-16). HPLC-MS $[M+H]^+ = 219$, $T_R = 4.23$ min (96 %).

(E)-4-(2,4-Dimetilfenil)acrilato de metilo (22)²⁶⁹



Procedimiento general B. Reactivos: ácido (E)-3-(2,4-dimetilfenil)acrílico (1000 mg, 5.67 mmol) y TMSCl (1.6 mL, 12.47 mmol). Aceite amarillo. Rendimiento: 1014 mg, 94 %. ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.83 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, H-7), 7.62 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-3), 7.08 (s, 1H, H-6), 7.05 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-4), 6.47 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H, H-8), 3.72 (s, 3H, H-12), 2.35 (s, 3H, H-13), 2.28 (s, 3H, H-14). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167.2 (C-9), 142.1 (C-7), 140.6 (C-5), 137.8 (C-1), 131.9 (C-6), 130.3 (C-2), 127.6 (C-4), 127.0 (C-3), 118.1 (C-8), 51.9 (C-12), 21.3 (C-14), 19.7 (C-13). HPLC-MS $[M+H]^+ = 191$, $T_R = 4.00$ min (88 %).

(E)-3-(4-Nitrofenil)acrilato de metilo (23)²⁶⁵



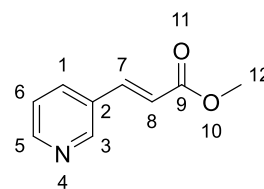
Procedimiento general B. Reactivos: ácido (E)-3-(4-nitrofenil)acrílico (1000 mg, 5.18 mmol) y TMSCl (1.4 mL, 11.38 mmol). Sólido amarillo. Rendimiento: 520 mg, 49 %. ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.24 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, H-4, H-6), 8.01 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-1, H-3), 7.78 (d, $J = 16.1$ Hz, 1H, H-7), 6.87 (d, $J = 16.1$

²⁶⁸ Imashiro, R.; Seki, M. A Catalytic Asymmetric Synthesis of Chiral Glycidic Acid Derivatives through Chiral Dioxirane-Mediated Catalytic Asymmetric Epoxidation of Cinnamic Acid Derivatives. *J. Org. Chem.* **2004**, *69* (12), 4216–4226.

²⁶⁹ Yang, L.; Zhang, X.; Mao, P.; Xiao, Y.; Bian, H.; Yuan, J.; Mai, W.; Qu, L. NCN Pincer Palladium Complexes Based on 1,3-Dipicolyl-3,4,5,6-Tetrahydropyrimidin-2-Ylidenes: Synthesis, Characterization and Catalytic Activities. *RSC Adv.* **2015**, *5* (33), 25723–25729.

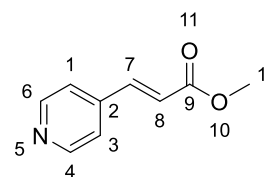
Hz, 1H, H-8), 3.76 (s, 3H, H-12). ^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 166.2 (C-9), 148.1 (C-5), 142.0 (C-7), 140.4 (C-2), 129.5 (C-1, C-3), 123.9 (C-4, C-6), 122.1 (C-8), 51.8 (C-12). HPLC-MS $[\text{M}+\text{H}]^+ = 208$, $T_{\text{R}} = 3.51$ min (97 %).

(E)-3-(Piridin-3-il)acrilato de metilo (24)²⁷⁰



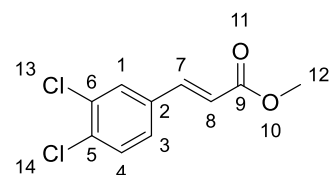
Procedimiento general B. Reactivos: ácido (E)-3-(piridin-3-il)acrilico (1000 mg, 6.70 mmol) y TMSCl (1.9 mL, 14.74 mmol). Sólido blanco. Rendimiento: 1005 mg, 92 %. ^1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8.88 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-3), 8.59 (dd, $J = 4.8, 1.6$ Hz, 1H, H-5), 8.18 (ddd, $J = 8.0, 2.2, 1.6$ Hz, 1H, H-1), 7.70 (dd, $J = 16.2, 0.6$ Hz, 1H, H-7), 7.45 (dddd, $J = 8.0, 4.8, 0.9, 0.4$ Hz, 1H, H-6), 6.80 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H, H-8), 3.74 (s, 3H, H-12). ^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 166.3 (C-9), 151.0 (C-5), 149.9 (C-3), 141.3 (C-7), 134.7 (C-1), 129.8 (C-2), 123.9 (C-6), 119.8 (C-8), 51.6 (C-12). HPLC-MS $[\text{M}+\text{H}]^+ = 164$, $T_{\text{R}} = 2.21$ min (99 %).

(E)-3-(Piridin-4-il)acrilato de metilo (25)²⁷¹



Procedimiento general B. Reactivos: ácido (E)-3-(piridin-4-il)acrilico (1000 mg, 6.70 mmol) y TMSCl (1.9 mL, 14.7 mmol). Sólido blanco. Rendimiento: 960 mg, 88 %. ^1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8.63 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H, H-4, H-6), 7.68 (d, $J = 6.3$ Hz, 2H, H-1, H-3), 7.64 (d, $J = 16.1$ Hz, 1H, H-7), 6.90 (d, $J = 16.1$ Hz, 1H, H-8), 3.75 (s, 3H, H-12). ^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 166.1 (C-9), 150.4 (C-4, C-6), 141.9 (C-7), 141.1 (C-2), 122.5 (C-8), 122.2 (C-1, C-3), 51.8 (C-12). HPLC-MS $[\text{M}+\text{H}]^+ = 164$, $T_{\text{R}} = 1.88$ min (99 %).

(E)-3-(3,4-Diclorofenil)acrilato de metilo (85)²⁷²



Procedimiento general B. Reactivos: ácido (E)-3-(3,4-diclorofenil)acrilico (2000 mg, 9.21 mmol) y TMSCl (2.57 mL, 20.26 mmol). Sólido blanco. Rendimiento: 1824 mg, 86 %. ^1H -

²⁷⁰ El-Batta, A.; Jiang, C.; Zhao, W.; Anness, R.; Cooksy, A. L.; Bergdahl, M. Wittig Reactions in Water Media Employing Stabilized Ylides with Aldehydes. Synthesis of α,β -Unsaturated Esters from Mixing Aldehydes, α -Bromoesters, and Ph_3P in Aqueous NaHCO_3 . *J. Org. Chem.* **2007**, 72 (14), 5244–5259.

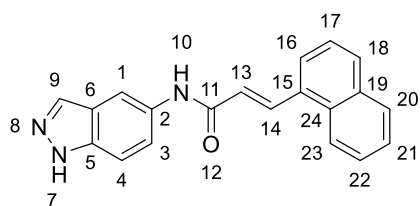
²⁷¹ Vassiliou, S.; Węglarz-Tomczak, E.; Berlicki, Ł.; Pawełczak, M.; Nocek, B.; Mulligan, R.; Joachimiak, A.; Mucha, A. Structure-Guided, Single-Point Modifications in the Phosphinic Dipeptide Structure Yield Highly Potent and Selective Inhibitors of Neutral Aminopeptidases. *J. Med. Chem.* **2014**, 57 (19), 8140–8151.

²⁷² Wang, C.-A.; Li, Y.-W.; Hou, X.-M.; Han, Y.-F.; Nie, K.; Zhang, J.-P. N-Heterocyclic Carbene-Based Microporous Organic Polymer Supported Palladium Catalyst for Carbon-Carbon Coupling Reaction. *ChemistrySelect* **2016**, 1 (7), 1371–1376.

RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8.07 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H-1), 7.74 (dd, $J = 8.5, 1.9$ Hz, 1H, H-3), 7.68 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-4), 7.64 (d, $J = 16.1$ Hz, 1H, H-7), 6.77 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H, H-8), 3.73 (s, 3H, H-12). ^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 166.3 (C-9), 141.9 (C-7), 134.9 (C-2), 132.7 (C-5), 131.8 (C-6), 131.0 (C-4), 130.1 (C-1), 128.3 (C-3), 120.1 (C-8), 51.6 (C-12). HPLC-MS $[\text{M}+\text{H}]^+ = 231$, $T_R = 4.08$ min (99 %).

4.3.2. Síntesis de los derivados de *N*-(1*H*-indazol-5-il)acrilamida 7-9

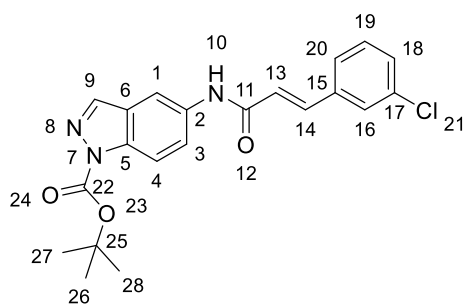
(*E*)-*N*-(1*H*-Indazol-5-il)-3-(naftalen-1-il)acrilamida (7)



Procedimiento general C. Reactivos: ácido (*E*)-3-(naft-1-il)acrílico (500 mg, 2.52 mmol), DIPEA (1.3 mL, 7.56 mmol), 1*H*-indazol-5-amina (369 mg, 2.77 mmol) y HBTU (1435 mg, 3.78 mmol). Sólido blanco. Aislado por precipitación. Rendimiento: 412 mg, 52 %.

^1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.02 (s, 1H, H-7), 10.32 (s, 1H, H-10), 8.37 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H, H-14), 8.33 (s, 1H, H-1), 8.26 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, H-23), 8.07 (s, 1H, H-9), 8.05 – 7.96 (m, 2H, H-18, H-20), 7.86 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, H-16), 7.69 – 7.51 (m, 5H, H-3, H-4, H-17, H-21, H-22), 6.95 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H, H-13). ^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 163.3 (C-11), 137.0 (C-5), 136.2 (C-14), 133.5 (C-2), 133.4 (C-9), 132.3 (C-15), 132.0 (C-24), 130.8 (C-19), 129.8 (C-18), 128.7 (C-20), 127.0 (C-17), 126.3 (C-22), 125.8 (C-21), 125.5 (C-13), 124.7 (C-16), 123.3 (C-23), 122.8 (C-6), 120.3 (C-3), 110.3 (C-4), 109.8 (C-1). HPLC-MS $[\text{M}+\text{H}]^+ = 314$, $T_R = 3.26$ min (98 %).

(*E*)-5-(3-(3-Clorofenil)acrilamido)-1*H*-indazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (8)

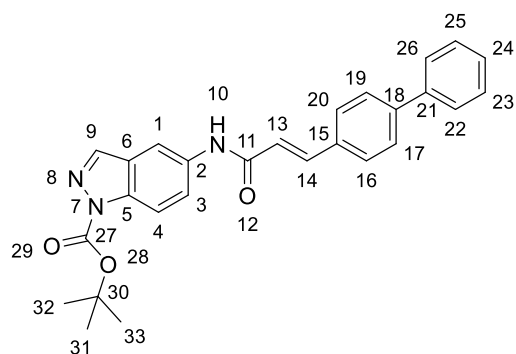


Procedimiento general C. Reactivos: ácido (*E*)-3-(3-clorofenil)acrílico (390 mg, 2.14 mmol), DIPEA (1.1 mL, 6.44 mmol), 5-amino-1*H*-indazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (549 mg, 2.35 mmol) y HBTU (1219 mg, 3.22 mmol). Sólido blanco. Aislado por cromatografía en columna DCM:MeOH

90:1. Rendimiento: 532 mg, 60 %. ^1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 10.45 (s, 1H, H-10), 8.43 (d, $J = 0.7$ Hz, 1H, H-9), 8.40 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, H-1), 8.04 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, H-4), 7.78 – 7.70 (m, 2H, H-3, H-16), 7.65 – 7.57 (m, 2H, H-14, H-20), 7.52 – 7.44 (m, 2H, H-18, H-19), 6.91 (d, $J = 15.8$ Hz, 1H, H-13), 1.65 (s, 9H, H-26, H-27, H-28). ^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 163.3 (C-11), 148.5 (C-22), 140.0 (C-9), 138.6 (C-14), 137.0 (C-15),

135.5 (C-5), 135.2 (C-2), 133.7 (C-17), 130.8 (C-18), 129.4 (C-19), 127.4 (C-16), 126.2 (C-20), 125.9 (C-6), 123.9 (C-13), 122.0 (C-3), 114.3 (C-4), 110.6 (C-1), 84.4 (C-25), 27.7 (C-26, C-27, C-28). HPLC-MS $[M + H - \text{terc}]^+ = 342$, $T_R = 3.05$ (90 %).

(E)-5-(3-([1,1'-Bifenil]-4-il)acrilamido)-1H-indazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (9)

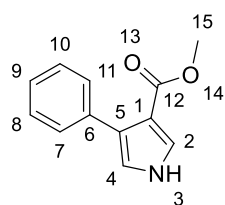


Procedimiento general C. Reactivos: ácido (E)-3-([1,1'-bifenil]-4-il)acrilico (224 mg, 1.07 mmol), DIPEA (559 μL , 3.21 mmol), 5-amino-1H-indazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (275 mg, 1.18 mmol) y HBTU (610 mg, 1.61 mmol). Sólido blanco. Aislado por precipitación. Rendimiento: 250 mg, 53 %. ^1H -RMN (300

MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 10.46 (s, 1H, H-10), 8.43 (s, 1H, H-1), 8.42 (s, 1H, H-9), 8.05 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, H-4), 7.82 – 7.62 (m, 8H, H-3, H-14, H-16, H-17, H-19, H-20, H-22, H-26), 7.49 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, H-23, H-25), 7.39 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H, H-24), 6.91 (d, $J = 15.7$ Hz, 1H, H-13), 1.65 (s, 9H, H-31, H-32, H-33). ^{13}C -RMN (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 163.7 (C-11), 148.5 (C-27), 141.3 (C-14), 140.0 (C-9), 139.8 (C-18), 139.3 (C-21), 135.5 (C-2), 135.4 (C-15), 133.8 (C-5), 129.0 (C-22, C-26), 128.4 (C-23, C-25), 127.9 (C-24), 127.2 (C-17, C-19), 126.6 (C-16, C-20), 126.0 (C-6), 122.1 (C-3), 122.0 (C-13), 114.3 (C-4), 110.5 (C-1), 84.4 (C-30), 27.7 (C-31, C-32, C-33). HPLC-MS $[M + H]^+ = 440$, $T_R = 4.02$ (99 %).

4.3.3. Síntesis de los derivados de 4-aryl-1H-pirrol-3-carboxilato de metilo 2, 26-38, 86

4-Fenil-1H-pirrol-3-carboxilato de metilo (2)²⁷³

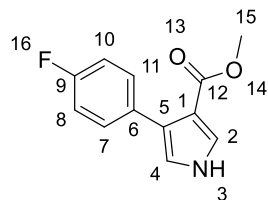


Procedimiento general D. Reactivos: (E)-3-fenilacrilato de metilo (1) (1500 mg, 9.25 mmol), TosMIC (1986 mg, 10.17 mmol) e NaH (1100 mg, 27.75 mmol). Sólido marrón. Rendimiento: 1369 mg, 74 %. ^1H -RMN (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11.55 (s, 1H, H-3), 7.49 (dd, $J = 3.1, 2.2$ Hz, 1H, H-2), 7.44 (m, 2H, H-7, H-11), 7.30 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, H-8, H-10), 7.24 – 7.18 (m, 1H, H-9), 6.94 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-4), 3.63 (s, 3H, H-15). ^{13}C -RMN (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 164.5 (C-12), 135.0 (C-6), 128.8 (C-7, C-11), 127.6 (C-8, C-10), 125.9 (C-2), 125.8

²⁷³ Pavri, N. P.; Trudell, M. L. An Efficient Method for the Synthesis of 3-Arylpyrroles. *J. Org. Chem.* **1997**, *62* (8), 2649–2651.

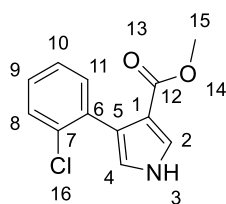
(C-5), 125.2 (C-9), 119.1 (C-4), 111.6 (C-1), 50.4 (C-15). HPLC-MS $[M + H]^+ = 202$, $T_R = 3.23$ (99 %).

4-(4-Fluorofenil)-1H-pirrol-3-carboxilato de metilo (26)



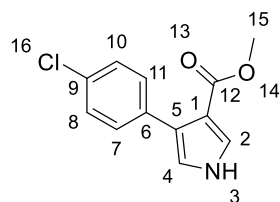
Procedimiento general D. Reactivos: (*E*)-3-(4-fluorofenil)acrilato de metilo (**13**) (1427 mg, 7.92 mmol), TosMIC (1700 mg, 8.71 mmol) e NaH (950 mg, 27.76 mmol). Sólido marrón. Rendimiento: 841 mg, 63 %. $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11.57 (s, 1H, H-3), 7.51 – 7.42 (m, 3H, H-2, H-7, H-11), 7.12 (t, $J = 9.0$ Hz, 2H, H-8, H-10), 6.94 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-4), 3.63 (s, 3H, H-15). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 164.5 (C-12), 160.9 (d, $J = 242.0$ Hz, C-9), 131.4 (d, $J = 3.1$ Hz, C-6), 130.6 (d, $J = 7.9$ Hz, C-7, C-11), 125.9 (C-2), 124.1 (C-5), 119.2 (C-4), 114.3 (d, $J = 21.1$ Hz, C-8, C-10), 111.5 (C-1), 50.4 (C-15). HPLC-MS $[M + H]^+ = 220$, $T_R = 3.27$ (95 %).

4-(2-Clorofenil)-1H-pirrol-3-carboxilato de metilo (27)



Procedimiento general D. Reactivos: (*E*)-3-(2-clorofenil)acrilato de metilo (**14**) (3000 mg, 15.25 mmol), TosMIC (3276 mg, 16.78 mmol) e NaH (1829 mg, 45.75 mmol). Sólido marrón. Rendimiento: 2500 mg, 70 %. $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11.57 (s, 1H, H-3), 7.47 (dd, $J = 3.1, 2.1$ Hz, 1H, H-2), 7.45 – 7.40 (m, 1H, H-11), 7.31 – 7.27 (m, 3H, H-8, H-9, H-10), 6.85 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-4), 3.55 (s, 3H, H-15). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 164.2 (C-12), 134.7 (C-7), 133.4 (C-6), 132.1 (C-9), 128.8 (C-11), 128.1 (C-10), 126.3 (C-8), 124.4 (C-2), 121.8 (C-5), 119.6 (C-4), 113.5 (C-1), 50.4 (C-15). HPLC-MS $[M + H]^+ = 236$, $T_R = 3.31$ (93 %).

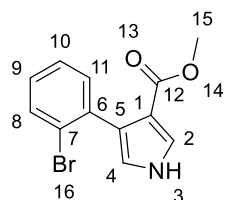
4-(4-Clorofenil)-1H-pirrol-3-carboxilato de metilo (28)²⁷³



Procedimiento general D. Reactivos: (*E*)-3-(4-clorofenil)acrilato de metilo (**15**) (2000 mg, 10.17 mmol), TosMIC (2184 mg, 11.19 mmol) e NaH (1220 mg, 30.51 mmol). Sólido amarillo pálido. Rendimiento: 1830 mg, 76 %. $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11.61 (s, 1H, H-3), 7.50 (dd, $J = 3.1, 2.2$ Hz, 1H, H-2), 7.46 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-7, H-11), 7.35 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H-8, H-10), 6.99 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-4), 3.64 (s, 3H, H-15). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 164.4 (C-12), 133.9 (C-6), 130.5 (C-9), 130.5 (C-7, C-11),

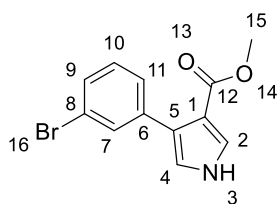
127.5 (C-8, C-10), 126.2 (C-2), 123.8 (C-5), 119.5 (C-4), 111.5 (C-1), 50.5 (C-15). HPLC-MS $[M + H]^+ = 236$, $T_R = 3.49$ (99 %).

4-(2-Bromofenil)-1H-pirrol-3-carboxilato de metilo (29)²⁷⁴



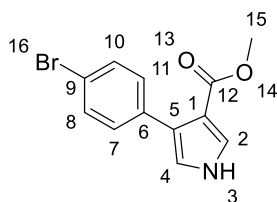
Procedimiento general D. Reactivos: (*E*)-3-(2-bromofenil)acrilato de metilo (**16**) (1000 mg, 4.15 mmol), TosMIC (891 mg, 4.56 mmol) e NaH (498 mg, 12.44 mmol). Sólido marrón. Rendimiento: 846 mg, 73 %. ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.55 (s, 1H, H-3), 7.61 (dd, $J = 7.9, 0.9$ Hz, 1H, H-11), 7.46 (dd, $J = 3.1, 2.2$ Hz, 1H, H-2), 7.36 – 7.25 (m, 2H, H-8, H-9), 7.20 (ddd, $J = 8.0, 7.0, 2.3$ Hz, 1H, H-10), 6.83 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-4), 3.54 (s, 3H, H-15). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.1 (C-12), 136.8 (C-6), 132.1 (C-11), 131.9 (C-9), 128.3 (C-10), 126.8 (C-8), 124.5 (C-7), 124.3 (C-2), 123.7 (C-5), 119.4 (C-4), 113.4 (C-1), 50.3 (C-15). HPLC-MS $[M + H]^+ = 280$, $T_R = 3.34$ (99 %).

4-(3-Bromofenil)-1H-pirrol-3-carboxilato de metilo (30)



Procedimiento general D. Reactivos: (*E*)-3-(3-bromofenil)acrilato de metilo (**17**) (1000 mg, 4.15 mmol), TosMIC (891 mg, 4.56 mmol) e NaH (498 mg, 12.44 mmol). Sólido marrón. Rendimiento: 836 mg, 72 %. ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.66 (s, 1H, H-3), 7.67 (t, $J = 1.8$ Hz, 1H, H-7), 7.51 (t, $J = 2.6$ Hz, 1H, H-2), 7.45 (dt, $J = 7.6, 1.3$ Hz, 1H, H-9), 7.41 (ddd, $J = 8.0, 2.0, 1.1$ Hz, 1H, H-11), 7.27 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-10), 7.05 (t, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-4), 3.65 (s, 3H, H-15). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.4 (C-12), 137.5 (C-6), 131.2 (C-7), 129.7 (C-10), 128.5 (C-11), 127.7 (C-9), 126.3 (C-2), 123.5 (C-5), 120.9 (C-8), 119.9 (C-4), 111.5 (C-1), 50.5 (C-15). HPLC-MS $[M + H]^+ = 280$, $T_R = 3.53$ (98 %).

4-(4-Bromofenil)-1H-pirrol-3-carboxilato de metilo (31)

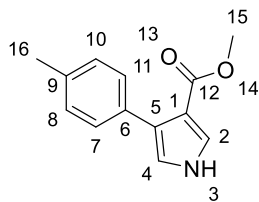


Procedimiento general D. Reactivos: (*E*)-3-(4-bromofenil)acrilato de metilo (**18**) (1000 mg, 4.15 mmol), TosMIC (891 mg, 4.56 mmol) e NaH (498 mg, 12.44 mmol). Sólido marrón. Rendimiento: 783 mg, 67 %. ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.64 (s, 1H, H-3), 7.52 – 7.46 (m, 3H, H-2, H-8, H-10), 7.40 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-7, H-11), 7.00 (t, $J = 2.0$ Hz, 1H, H-4), 3.64 (s, 3H, H-15). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.4 (C-12), 134.3

²⁷⁴ Liu, H.; El-Salfiti, M.; Lautens, M. Expeditious Synthesis of Tetrasubstituted Helical Alkenes by a Cascade of Palladium-Catalyzed C-H Activations. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2012**, *51* (39), 9846–9850.

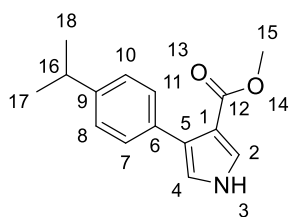
(C-6), 130.8 (C-8, C-10), 130.4 (C-7, C-11), 126.2 (C-2), 123.8 (C-5), 119.5 (C-4), 119.0 (C-9), 111.5 (C-1), 50.5 (C-15). HPLC-MS $[M + H]^+ = 280$, $T_R = 3.55$ (97 %).

4-(*p*-Tolil)-1*H*-pirrol-3-carboxilato de metilo (32)²⁷³



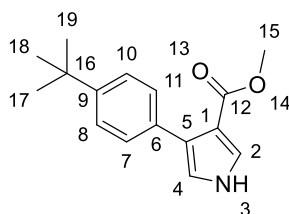
Procedimiento general D. Reactivos: (*E*)-3-(*p*-tolilfenil)acrilato de metilo (**19**) (2000 mg, 11.35 mmol), TosMIC (2437 mg, 12.48 mmol) e NaH (1361 mg, 34.05 mmol). Sólido marrón. Rendimiento: 2156 mg, 88 %. ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.50 (s, 1H, H-3), 7.46 (dd, $J = 3.1, 2.2$ Hz, 1H, H-2), 7.32 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, H-7, H-11), 7.10 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, H-8, H-10), 6.89 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-4), 3.62 (s, 3H, H-15), 2.30 (s, 3H, H-16). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.5 (C-12), 134.8 (C-9), 132.1 (C-6), 128.7 (C-7, C-11), 128.2 (C-8, C-10), 125.8 (C-2), 125.1 (C-5), 118.8 (C-4), 111.6 (C-1), 50.4 (C-15), 20.7 (C-16). HPLC-MS $[M + H]^+ = 216$, $T_R = 3.39$ (90 %).

4-(4-Isopropilfenil)-1*H*-pirrol-3-carboxilato (33)



Procedimiento general D. Reactivos: (*E*)-3-(4-isopropilfenil)acrilato de metilo (**20**) (1040 mg, 5.09 mmol), TosMIC (1093 mg, 5.60 mmol) e NaH (610 mg, 15.27 mmol). Sólido marrón. Rendimiento: 910 mg, 74 %. ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.51 (s, 1H, H-3), 7.46 (dd, $J = 3.1, 2.2$ Hz, 1H, H-2), 7.35 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H-7, H-11), 7.17 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H-8, H-10), 6.90 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-4), 3.63 (s, 3H, H-15), 2.88 (hept, $J = 6.9$ Hz, 1H, H-16), 1.22 (d, $J = 7.0$ Hz, 6H, H-17, H-18). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.5 (C-12), 145.9 (C-9), 132.5 (C-6), 128.7 (C-7, C-11), 125.7 (C-2), 125.5 (C-8, C-10), 125.2 (C-5), 118.9 (C-4), 111.5 (C-1), 50.4 (C-15), 33.1 (C-16), 24.0 (C-17, C-18). HPLC-MS $[M + H]^+ = 244$, $T_R = 3.74$ (99 %).

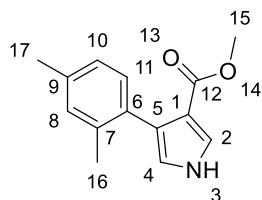
4-(4-(*Terc*-butil)fenil)-1*H*-pirrol-3-carboxilato de metilo (34)



Procedimiento general D. Reactivos: (*E*)-3-(4-(*terc*-butil)fenil)acrilato de metilo (**21**) (1000 mg, 4.58 mmol), TosMIC (984 mg, 5.03 mmol) e NaH (549 mg, 13.74 mmol). Sólido marrón. Rendimiento: 1040 mg, 80 %. ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.53 (s, 1H, H-3), 7.47 (dd, $J = 3.0, 2.2$ Hz, 1H, H-2), 7.37 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H-7, H-11), 7.31 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H-8, H-10), 6.90 (t, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-4), 3.64 (s, 3H, H-15), 1.30 (s, 9H, H-17, H-18, H-19). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.5 (C-

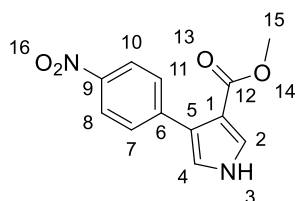
12), 148.1 (C-9), 132.1 (C-6), 128.5 (C-7, C-11), 125.8 (C-2), 125.1 (C-5), 124.3 (C-8, C-10), 118.9 (C-4), 111.5 (C-1), 50.4 (C-15), 34.1 (C-16), 31.2 (C-17, C-18, C-19). HPLC-MS $[M + H]^+ = 258$, $T_R = 3.85$ (98 %).

4-(2,4-Dimetilfenil)-1H-pirrol-3-carboxilato de metilo (35)



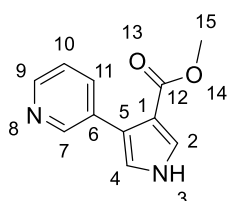
Procedimiento general D. Reactivos: (*E*)-3-(2,4-dimetilfenil)acrilato de metilo (**22**) (1000 mg, 5.26 mmol), TosMIC (1127 mg, 5.78 mmol) e NaH (630 mg, 15.78 mmol). Sólido marrón. Rendimiento: 810 mg, 67 %. $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11.50 (s, 1H, H-3), 7.47 (dd, $J = 3.1, 2.2$ Hz, 1H, H-2), 7.02 – 6.94 (m, 2H, H-8, H-11), 6.91 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, H-10), 6.69 (t, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-4), 3.55 (s, 3H, H-15), 2.27 (s, 3H, H-17), 2.07 (s, 3H, H-16). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 164.4 (C-12), 136.4 (C-9), 135.3 (C-7), 132.5 (C-6), 130.3 (C-11), 129.9 (C-8), 125.4 (C-10), 124.6 (C-2), 124.2 (C-5), 118.8 (C-4), 113.2 (C-1), 50.2 (C-15), 20.7 (C-17), 20.0 (C-16). HPLC-MS $[M + H]^+ = 230$, $T_R = 3.53$ (83 %).

4-(4-Nitrofenil)-1H-pirrol-3-carboxilato de metilo (36)



Procedimiento general D. Reactivos: (*E*)-3-(4-nitrofenil)acrilato de metilo (**23**) (520 mg, 2.51 mmol), TosMIC (539 mg, 2.76 mmol) e NaH (301 mg, 7.53 mmol). Sólido marrón. Rendimiento: 502 mg, 81 %. $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11.82 (s, 1H, H-3), 8.17 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H-8, H-10), 7.75 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H-7, H-11), 7.58 (dd, $J = 3.0, 2.2$ Hz, 1H, H-2), 7.22 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-4), 3.67 (s, 3H, H-15). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 164.4 (C-12), 145.3 (C-9), 142.3 (C-6), 129.4 (C-7, C-11), 127.0 (C-2), 123.0 (C-5), 122.9 (C-8, C-10), 121.1 (C-4), 111.8 (C-1), 50.7 (C-15). HPLC-MS $[M + H]^+ = 247$, $T_R = 3.26$ (94 %).

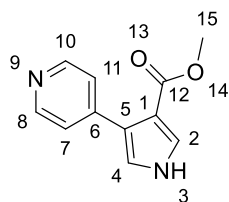
4-(Piridin-3-il)-1H-pirrol-3-carboxilato (37)²⁷³



Procedimiento general D. Reactivos: (*E*)-3-(piridin-3-il)acrilato de metilo (**24**) (500 mg, 3.06 mmol), TosMIC (658 mg, 3.37 mmol) e NaH (367 mg, 9.18 mmol). Sólido amarillo. Rendimiento: 440 mg, 71 %. $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11.70 (s, 1H, H-3), 8.63 (dd, $J = 2.3, 0.8$ Hz, 1H, H-7), 8.41 (dd, $J = 4.8, 1.7$ Hz, 1H, H-9), 7.84 (ddd, $J = 7.9, 2.2, 1.7$ Hz, 1H, H-11), 7.55 (dd, $J = 3.1, 2.2$ Hz, 1H, H-2), 7.33 (ddd, $J = 7.9, 4.8, 0.8$ Hz, 1H, H-10), 7.08 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-4), 3.65 (s, 3H, H-15). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 164.4 (C-

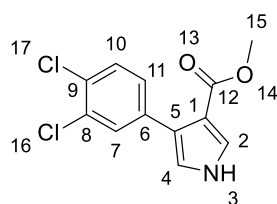
12), 149.2 (C-7), 146.9 (C-9), 136.1 (C-11), 130.8 (C-6), 126.3 (C-2), 122.7 (C-10), 121.5 (C-5), 119.8 (C-4), 111.7 (C-1), 50.5 (C-15). HPLC-MS $[M + H]^+ = 203$, $T_R = 1.86$ (95 %).

4-(Piridin-4-il)-1H-pirrol-3-carboxilato (38)



Procedimiento general D. Reactivos: (*E*)-3-(piridin-4-il)acrilato de metilo (**25**) (500 mg, 3.06 mmol), TosMIC (658 mg, 3.37 mmol) e NaH (367 mg, 9.18 mmol). Sólido marrón. Rendimiento: 367 mg, 62 %. ^1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11.78 (s, 1H, H-3), 8.47 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H, H-8, H-10), 7.56 (dd, $J = 3.1, 2.2$ Hz, 1H, H-2), 7.49 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H, H-7, H-11), 7.21 (dd, $J = 2.7, 2.2$ Hz, 1H, H-4), 3.67 (s, 3H, H-15). ^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 164.4 (C-12), 148.9 (C-8, C-10), 142.5 (C-6), 126.9 (C-2), 123.3 (C-7, C-11), 122.3 (C-5), 120.8 (C-4), 111.8 (C-1), 50.7 (C-15). HPLC-MS $[M + H]^+ = 203$, $T_R = 1.85$ (95 %).

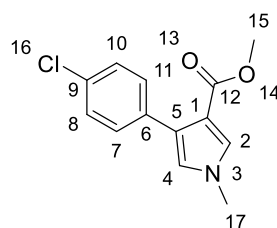
4-(3,4-Diclorofenil)-1H-pirrol-3-carboxilato de metilo (86)



Procedimiento general D. Reactivos: (*E*)-3-(3,4-diclorofenil)acrilato de metilo (**85**) (1500 mg, 6.49 mmol), TosMIC (1395 mg, 7.15 mmol) e NaH (778 mg, 19.47 mmol). Sólido marrón. Rendimiento: 994 mg, 57 %. ^1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11.73 (s, 1H, H-3), 7.74 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H-7), 7.55 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-10), 7.52 (dd, $J = 3.0, 2.3$ Hz, 1H, H-2), 7.45 (dd, $J = 8.4, 2.1$ Hz, 1H, H-11), 7.11 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-4), 3.66 (s, 3H, H-15). ^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 164.4 (C-12), 135.8 (C-6), 130.2 (C-7), 130.2 (C-8), 129.6 (C-10), 128.9 (C-11), 128.3 (C-9), 126.5 (C-2), 122.5 (C-5), 120.2 (C-4), 111.5 (C-1), 50.6 (C-15). HPLC-MS $[M + H]^+ = 270$, $T_R = 3.72$ (99 %).

4.3.4. Síntesis de los derivados de 4-aryl-1-metil-1H-pirrol-3-carboxilato de metilo 68, 87

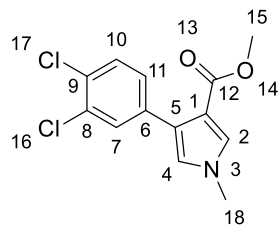
4-(4-Clorofenil)-1-metil-1H-pirrol-3-carboxilato de metilo (68)



Procedimiento general E. Reactivos: 4-(4-clorofenil)-1H-pirrol-3-carboxilato de metilo (**28**) (400 mg, 1.70 mmol), NaH (88 mg, 2.21 mmol) y CH_3I (212 μL , 3.40 mmol). Sólido blanco. Rendimiento: 242 mg, 57 %. ^1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 7.50 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-2), 7.44 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-7, H-11), 7.35 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-8, H-10), 6.97 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-4), 3.67 (s, 3H, H-17), 3.63 (s, 3H, H-15). ^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 164.0 (C-12), 133.5 (C-6), 130.6 (C-9), 130.3 (C-7, C-

11), 129.6 (C-2), 127.6 (C-8, C-10), 124.2 (C-5), 123.3 (C-4), 111.2 (C-1), 50.5 (C-15), 36.1 (C-17). HPLC-MS $[M + H]^+ = 250$, $T_R = 3.78$ (99 %).

4-(3,4-Diclorofenil)-1-metil-1H-pirrol-3-carboxilato de metilo (87)

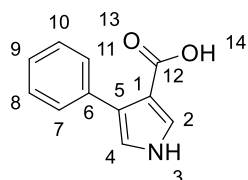


Procedimiento general E. Reactivos: 4-(3,4-diclorofenil)-1H-pirrol-3-carboxilato de metilo (**86**) (500 mg, 1.76 mmol), NaH (91 mg, 2.29 mmol) y CH_3I (219 μL , 3.52 mmol). Sólido blanco. Rendimiento: 332 mg, 66 %. 1H -RMN (300 MHz, $DMSO-d_6$) δ 7.71 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H-7), 7.56 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-10), 7.53

(d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-2), 7.42 (dd, $J = 8.4, 2.1$ Hz, 1H, H-11), 7.09 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-4), 3.67 (s, 3H, H-15), 3.65 (s, 3H, H-18). ^{13}C -RMN (75 MHz, $DMSO-d_6$) δ 164.0 (C-12), 135.4 (C-6), 130.2 (C-8), 130.2 (C-7), 129.9 (C-10), 129.7 (C-2), 128.8 (C-11), 128.4 (C-9), 123.9 (C-4), 122.8 (C-5), 111.2 (C-1), 50.6 (C-15), 36.2 (C-18). HPLC-MS $[M + H]^+ = 284$, $T_R = 4.01$ (95 %).

4.3.5. Síntesis de los derivados de ácido 4-aryl-1H-pirrol-3-carboxílico 3, 39-51, 69, 88

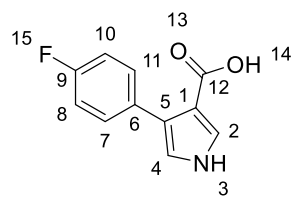
Ácido 4-fenil-1H-pirrol-3-carboxílico (3)²⁷⁵



Procedimiento general F. Reactivos: 4-fenil-1H-pirrol-3-carboxilato de metilo (**2**) (1000 mg, 4.97 mmol) e NaOH (1988 mg, 49.70 mmol). Sólido blanco. Rendimiento: 640 mg, 69 %. 1H -RMN (300 MHz, $DMSO-d_6$) δ 11.54 (s, 1H, H-14), 11.45 (s, 1H, H-3), 7.51 – 7.41 (m,

3H, H-2, H-7, H-11), 7.29 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, H-8, H-10), 7.23 – 7.16 (m, 1H, H-9), 6.91 (t, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-4). ^{13}C -RMN (75 MHz, $DMSO-d_6$) δ 165.7 (C-12), 135.3 (C-6), 128.8 (C-7, C-11), 127.5 (C-8, C-10), 126.0 (C-2), 125.7 (C-5), 125.2 (C-9), 119.0 (C-4), 112.6 (C-1). HPLC-MS $[M + H]^+ = 188$, $T_R = 2.74$ (99 %).

Ácido 4-(4-fluorofenil)-1H-pirrol-3-carboxílico (39)

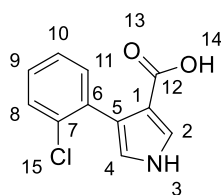


Procedimiento general F. Reactivos: 4-(4-fluorofenil)-1H-pirrol-3-carboxilato de metilo (**26**) (1413 mg, 6.45 mmol) e NaOH (2578 mg, 64.50 mmol). Sólido marrón. Rendimiento: 841 mg, 63 %. 1H -RMN (300 MHz, $DMSO-d_6$) δ 11.59 (s, 1H, H-14), 11.46 (s,

²⁷⁵ Syamaiah, K.; Mallikarjuna Reddy, G.; Padmavathi, V.; Padmaja, A. Synthesis and Antimicrobial Activity of Some New Amido/Sulfonamido-Linked 3,4-Disubstituted Pyrroles. *Med. Chem. Res.* **2014**, *23* (7), 3287–3297.

1H, H-3), 7.48 (dd, $J = 8.8, 5.7$ Hz, 2H, H-7, H-11), 7.43 (t, $J = 2.6$ Hz, 1H, H-2), 7.11 (t, $J = 9.0$ Hz, 2H, H-8, H-10), 6.91 (t, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-4). ^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 165.6 (C-12), 160.8 (d, $J = 241.8$ Hz, C-9), 131.7 (d, $J = 3.1$ Hz, C-6), 130.6 (d, $J = 7.9$ Hz, C-7, C-11), 126.0 (C-2), 124.1 (C-5), 119.0 (C-4), 114.2 (d, $J = 21.0$ Hz, C-8, C-10), 112.5 (C-1). HPLC-MS $[\text{M} + \text{H}]^+ = 206$, $T_R = 2.82$ (97 %).

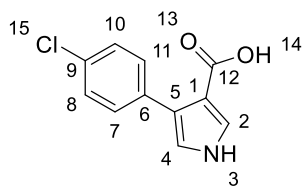
Ácido 4-(2-clorofenil)-1H-pirrol-3-carboxílico (40)



Procedimiento general F. Reactivos: 4-(2-clorofenil)-1H-pirrol-3-carboxilato de metilo (**27**) (2500 mg, 10.61 mmol) e NaOH (4243 mg, 106.10 mmol). Sólido amarillo pálido. Rendimiento: 1700 mg, 72 %.

^1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11.49 (s, 1H, H-3), 7.45 – 7.36 (m, 2H, H-2, H-11), 7.33 – 7.22 (m, 3H, H-8, H-9, H-10), 6.79 (t, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-4). ^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 165.5 (C-12), 135.2 (C-7), 133.5 (C-6), 132.2 (C-9), 128.7 (C-11), 127.8 (C-10), 126.2 (C-8), 124.3 (C-2), 121.8 (C-5), 119.3 (C-4), 115.0 (C-1). HPLC-MS $[\text{M} + \text{H}]^+ = 222$, $T_R = 2.84$ (97 %).

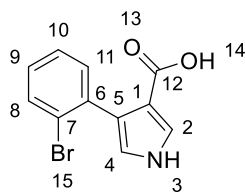
Ácido 4-(4-clorofenil)-1H-pirrol-3-carboxílico (41)



Procedimiento general F. Reactivos: 4-(4-clorofenil)-1H-pirrol-3-carboxilato de metilo (**28**) (1825 mg, 7.74 mmol) e NaOH (3098 mg, 77.40 mmol). Sólido blanco. Rendimiento: 840 mg, 49 %.

^1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11.64 (s, 1H, H-14), 11.54 (s, 1H, H-3), 7.49 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-7, H-11), 7.44 (dd, $J = 3.1, 2.2$ Hz, 1H, H-2), 7.34 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-8, H-10), 6.96 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-4). ^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 165.6 (C-12), 134.2 (C-6), 130.5 (C-7, C-11), 130.3 (C-9), 127.4 (C-8, C-10), 126.2 (C-2), 123.9 (C-5), 119.3 (C-4), 112.6 (C-1). HPLC-MS $[\text{M} + \text{H}]^+ = 222$, $T_R = 3.00$ (99 %).

Ácido 4-(2-bromofenil)-1H-pirrol-3-carboxílico (42)

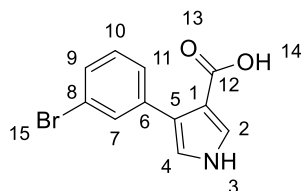


Procedimiento general F. Reactivos: 4-(2-bromofenil)-1H-pirrol-3-carboxilato de metilo (**29**) (500 mg, 1.79 mmol) e NaOH (713 mg, 17.90 mmol). Sólido blanco. Rendimiento: 269 mg, 57 %.

^1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11.43 (s, 2H, H-3, H-14), 7.59 (dd, $J = 7.9, 0.8$ Hz, 1H, H-11), 7.40 (dd, $J = 3.0, 2.2$ Hz, 1H, H-2), 7.34 – 7.25 (m, 2H, H-8, H-9), 7.18 (ddd, $J = 7.9, 6.6, 2.6$ Hz, 1H, H-10), 6.78 (t, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-4). ^{13}C -RMN (75 MHz,

DMSO- d_6) δ 165.2 (C-12), 137.2 (C-6), 132.1 (C-11), 131.8 (C-9), 128.1 (C-10), 126.7 (C-8), 124.6 (C-7), 124.3 (C-2), 123.8 (C-5), 119.2 (C-4), 114.5 (C-1). HPLC-MS $[M + H]^+ = 266$, $T_R = 2.89$ (99 %).

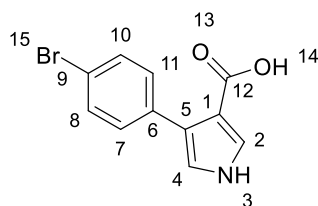
Ácido 4-(3-bromofenil)-1*H*-pirrol-3-carboxílico (43)



Procedimiento general F. Reactivos: 4-(3-bromofenil)-1*H*-pirrol-3-carboxilato de metilo (**30**) (500 mg, 1.79 mmol) e NaOH (713 mg, 17.90 mmol). Sólido amarillo pálido. Rendimiento: 302 mg, 64 %. $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11.67 (s, 1H, H-14),

11.55 (s, 1H, H-3), 7.68 (t, $J = 1.7$ Hz, 1H, H-7), 7.50 – 7.43 (m, 2H, H-2, H-9), 7.38 (ddd, $J = 8.0, 2.0, 1.1$ Hz, 1H, H-11), 7.25 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-10), 7.02 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-4). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, DMSO- d_6) δ 165.5 (C-12), 137.8 (C-6), 131.2 (C-7), 129.6 (C-10), 128.3 (C-11), 127.8 (C-9), 126.3 (C-2), 123.5 (C-5), 120.9 (C-8), 119.7 (C-4), 112.6 (C-1). HPLC-MS $[M + H]^+ = 266$, $T_R = 3.04$ (99 %).

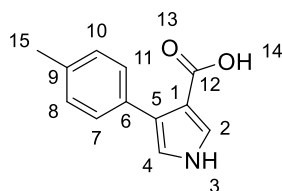
Ácido 4-(4-bromofenil)-1*H*-pirrol-3-carboxílico (44)



Procedimiento general F. Reactivos: 4-(4-bromofenil)-1*H*-pirrol-3-carboxilato de metilo (**31**) (500 mg, 1.79 mmol) e NaOH (713 mg, 17.90 mmol). Sólido amarillo pálido. Rendimiento: 343 mg, 72 %. $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ

11.65 (s, 1H, H-14), 11.51 (s, 1H, H-3), 7.51 – 7.37 (m, 5H, H-2, H-7, H-8, H-10, H-11), 6.96 (t, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-4). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, DMSO- d_6) δ 165.6 (C-12) 134.6 (C-6) 130.9 (C-8, C-10), 130.4 (C-7, C-11), 126.3 (C-2), 123.9 (C-5), 119.3 (C-4), 118.8 (C-9), 112.6 (C-1). HPLC-MS $[M + H]^+ = 266$, $T_R = 3.05$ (99 %).

Ácido 4-(*p*-tolil)-1*H*-pirrol-3-carboxílico (45)

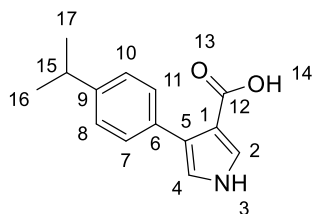


Procedimiento general F. Reactivos: 4-(*p*-tolil)-1*H*-pirrol-3-carboxilato de metilo (**32**) (2000 mg, 9.94 mmol) e NaOH (3976 mg, 99.40 mmol). Sólido amarillo pálido. Rendimiento: 1044 mg, 52 %. $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11.51 (s, 1H, H-14), 11.40

(s, 1H, H-3), 7.41 (dd, $J = 3.1, 2.2$ Hz, 1H, H-2), 7.34 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, H-7, H-11), 7.09 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, H-8, H-10), 6.85 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-4), 2.29 (s, 3H, H-15). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, DMSO- d_6) δ 165.7 (C-12), 134.6 (C-9), 132.4 (C-6), 128.7 (C-7, C-11), 128.1

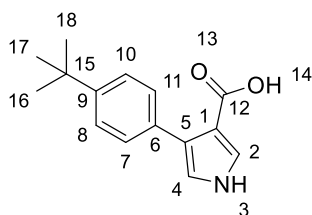
(C-8, C-10), 125.9 (C-2), 125.2 (C-5), 118.7 (C-4), 112.6 (C-1), 20.7 (C-15). HPLC-MS $[M + H]^+ = 202$, $T_R = 2.91$ (98 %).

Ácido 4-(4-isopropilfenil)-1H-pirrol-3-carboxílico (46)



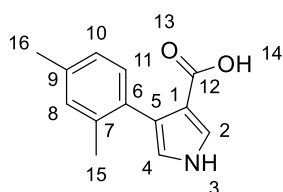
Procedimiento general F. Reactivos: 4-(4-isopropilfenil)-1H-pirrol-3-carboxilato de metilo (**33**) (910 mg, 3.74 mmol) e NaOH (1496 mg, 37.40 mmol). Sólido blanco. Rendimiento: 552 mg, 64 %. $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11.52 (s, 1H, H-14), 11.43 (s, 1H, H-3), 7.41 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-2), 7.37 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H-7, H-11), 7.15 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H-8, H-10), 6.86 (t, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-4), 2.87 (hept, $J = 6.9$ Hz, 1H, H-15), 1.21 (d, $J = 6.9$ Hz, 6H, H-16, H-17). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 165.7 (C-12), 145.7 (C-9), 132.8 (C-6), 128.8 (C-7, C-11), 125.9 (C-2), 125.4 (C-8, C-10), 125.2 (C-5), 118.8 (C-4), 112.5 (C-1), 33.1 (C-15), 24.0 (C-16, C-17). HPLC-MS $[M + H]^+ = 230$, $T_R = 3.25$ (98 %).

Ácido 4-(4-(terc-butil)fenil)-1H-pirrol-3-carboxílico (47)



Procedimiento general F. Reactivos: 4-(4-(terc-butil)fenil)-1H-pirrol-3-carboxilato de metilo (**34**) (1000 mg, 3.89 mmol) e NaOH (1554 mg, 38.90 mmol). Sólido blanco. Rendimiento: 550 mg, 58 %. $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11.52 (s, 1H, H-14), 11.41 (s, 1H, H-3), 7.42 (t, $J = 2.5$ Hz, 1H, H-2), 7.39 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H-7, H-11), 7.30 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H-8, H-10), 6.86 (t, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-4), 1.30 (s, 9H, H-16, H-17, H-18). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 165.7 (C-12), 147.9 (C-9), 132.4 (C-6), 128.5 (C-7, C-11), 125.9 (C-2), 125.1 (C-5), 124.2 (C-8, C-10), 118.8 (C-4), 112.6 (C-1), 34.1 (C-15), 31.2 (C-16, C-17, C-18). HPLC-MS $[M + H]^+ = 244$, $T_R = 3.37$ (99 %).

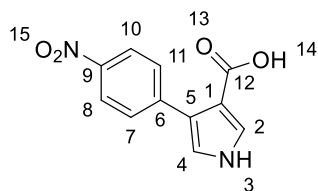
Ácido 4-(2,4-dimetilfenil)-1H-pirrol-3-carboxílico (48)



Procedimiento general F. Reactivos: 4-(2,4-dimetilfenil)-1H-pirrol-3-carboxilato de metilo (**35**) (790 mg, 3.45 mmol) e NaOH (1378 mg, 34.50 mmol). Sólido amarillo. Rendimiento: 452 mg, 61 %. $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11.35 (s, 1H, H-3), 7.40 (t, $J = 2.5$ Hz, 1H, H-2), 7.00 – 6.94 (m, 2H, H-8, H-11), 6.89 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-10), 6.64 (t, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-4), 2.27 (s, 3H, H-16), 2.08 (s, 3H, 15). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 165.5 (C-12), 136.5 (C-9), 135.1 (C-7), 132.9 (C-6), 130.3 (C-11), 129.8 (C-

8), 125.3 (C-10), 124.6 (C-2), 124.2 (C-5), 118.6 (C-4), 114.2 (C-1), 20.7 (C-16), 20.0 (C-15). HPLC-MS $[M + H]^+ = 216$, $T_R = 3.04$ (78 %).

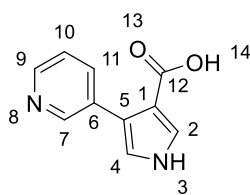
Ácido 4-(4-nitrofenil)-1*H*-pirrol-3-carboxílico (49)



Procedimiento general F. Reactivos: 4-(4-nitrofenil)-1*H*-pirrol-3-carboxilato de metilo (**36**) (500 mg, 2.03 mmol) e NaOH (812 mg, 20.30 mmol). Sólido amarillo. Rendimiento: 128 mg, 27 %.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11.84 (s, 1H, H-14), 11.71 (s, 1H, H-3), 8.16 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H, H-8, H-10), 7.77 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H, H-7, H-11), 7.52 (dd, $J = 3.0, 2.2$ Hz, 1H, H-2), 7.19 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-4). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, DMSO- d_6) δ 165.5 (C-12), 145.2 (C-9), 142.6 (C-6), 129.4 (C-7, C-11), 127.1 (C-2), 123.0 (C-5), 122.9 (C-8, C-10), 121.0 (C-4), 112.9 (C-1). HPLC-MS $[M + H]^+ = 233$, $T_R = 2.82$ (99 %).

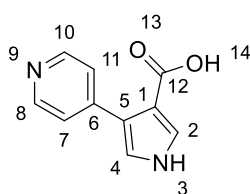
Ácido 4-(piridin-3-il)-1*H*-pirrol-3-carboxílico (50)



Procedimiento general F. Reactivos: 4-(piridin-3-il)-1*H*-pirrol-3-carboxilato de metilo (**37**) (260 mg, 1.29 mmol) e NaOH (516 mg, 12.90 mmol). Sólido marrón. Rendimiento: 113 mg, 47 %.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.17 (s, 1H, H-3), 9.06 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H-7), 8.76 – 8.64 (m, 2H, H-9, H-11), 7.99 (dd, $J = 8.1, 5.6$ Hz, 1H, H-10), 7.57 (dd, $J = 3.0, 2.2$ Hz, 1H, H-2), 7.38 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-4). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, DMSO- d_6) δ 165.5 (C-12), 144.5 (C-7), 140.4 (C-9), 138.3 (C-11), 134.5 (C-6), 127.3 (C-2), 126.2 (C-10), 121.8 (C-5), 118.1 (C-4), 112.7 (C-1). HPLC-MS $[M + H]^+ = 189$, $T_R = 1.04$ (96 %).

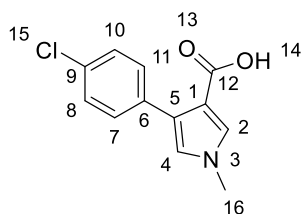
Ácido 4-(piridin-4-il)-1*H*-pirrol-3-carboxílico (51)



Procedimiento general F. Reactivos: 4-(piridin-4-il)-1*H*-pirrol-3-carboxilato de metilo (**38**) (635 mg, 3.14 mmol) e NaOH (1256 mg, 31.40 mmol). Sólido marrón. Rendimiento: 112 mg, 19 %.

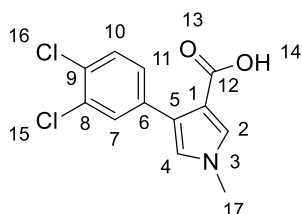
$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.44 (s, 1H, H-3), 8.74 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H, H-8, H-10), 8.29 (d, $J = 6.9$ Hz, 2H, H-7, H-11), 7.73 (dd, $J = 2.9, 2.2$ Hz, 1H, H-2), 7.63 (dd, $J = 2.9, 2.1$ Hz, 1H, H-4). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, DMSO- d_6) δ 165.4 (C-12), 152.0, (C-6), 140.2 (C-8, C-10), 129.0 (C-2), 125.2 (C-5), 124.5 (C-7, C-11), 119.6 (C-4), 113.6 (C-1). HPLC-MS $[M + H]^+ = 189$, $T_R = 1.09$ (97 %).

Ácido 4-(4-clorofenil)-1-metil-1H-pirrol-3-carboxílico (69)



Procedimiento general F. Reactivos: 4-(4-clorofenil)-1-metil-1H-pirrol-3-carboxilato de metilo (**68**) (200 mg, 0.80 mmol) e NaOH (320 mg, 8.00 mmol). Sólido blanco. Rendimiento: 170 mg, 92 %. $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11.65 (s, 1H, H-14), 7.46 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-7, H-11), 7.43 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, H-2), 7.34 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-8, H-10), 6.93 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-4), 3.66 (s, 3H, H-16). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 165.2 (C-12), 133.8 (C-6), 130.5 (C-9), 130.4 (C-7, C-11), 129.7 (C-2), 127.5 (C-8, C-10), 124.3 (C-5), 123.1 (C-4), 112.3 (C-1), 36.1 (C-16). HPLC-MS $[\text{M} + \text{H}]^+ = 236$, $T_R = 3.25$ (99 %).

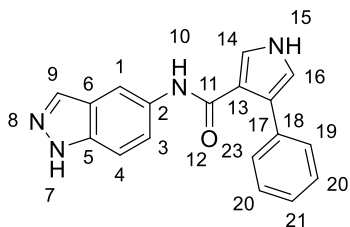
Ácido 4-(3,4-diclorofenil)-1-metil-1H-pirrol-3-carboxílico (88)



Procedimiento general F. Reactivos: 4-(3,4-diclorofenil)-1-metil-1H-pirrol-3-carboxilato de metilo (**87**) (300 mg, 1.06 mmol) e NaOH (422 mg, 10.60 mmol). Sólido blanco. Rendimiento: 266 mg, 93 %. $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11.76 (s, 1H, H-14), 7.72 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H-7), 7.54 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H-10), 7.48 – 7.42 (m, 2H, H-2, H-11), 7.05 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, H-4), 3.66 (s, 3H, H-17). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 165.1 (C-12), 135.7 (C-6), 130.2 (C-7), 130.1 (C-8), 130.0 (C-10), 129.7 (C-2), 128.8 (C-11), 128.2 (C-9), 123.8 (C-4), 122.8 (C-5), 112.3 (C-1), 36.1 (C-17). HPLC-MS $[\text{M} + \text{H}]^+ = 270$, $T_R = 3.46$ (95 %).

4.3.6. Síntesis de los derivados de N-aril-4-aril-1H-pirrol-3-carboxamida/carboxilato H3, 4-6, 10-12, 52-67, 70-72, 89

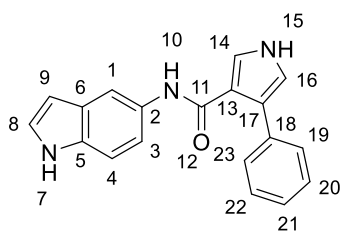
4-Fenil-N-(1H-indazol-5-il)-1H-pirrol-3-carboxamida (H3)



Procedimiento general G. Reactivos: ácido 1H-pirrol-3-carboxílico (**3**) (150 mg, 0.80 mmol), 1H-indazol-5-amina (117, 0.88 mmol), EDC (184 mg, 0.96 mmol), HOBT (10 mg, 0.08 mmol), DMAP (117 mg, 0.96 mmol) y DIPEA (698 μL , 4.00 mmol). Sólido marrón. Rendimiento: 30 mg, 12 %. P.f.: 229-231 $^{\circ}\text{C}$. $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, $\text{Acetona-}d_6$) δ 12.12 (s, 1H, H-7), 10.63 (s, 1H, H-15), 8.45 (s, 1H, H-10), 8.20 (s, 1H, H-1), 7.97 (s, 1H, H-9), 7.56 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H, H-19, H-23), 7.50 (t, $J = 2.6$ Hz, 1H, H-14), 7.46 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, H-4), 7.37 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H,

H-20, H-22), 7.33 (dd, $J = 8.9, 2.0$ Hz, 1H, H-3), 7.28 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-21), 6.98 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-16). ^{13}C -RMN (125 MHz, Acetona- d_6) δ 164.2 (C-11), 138.2 (C-5), 136.6 (C-18), 134.5 (C-9), 133.9 (C-2), 129.9 (C-19, C-23), 129.0 (C-20, C-22), 127.1 (C-21), 124.9 (C-17), 124.3 (C-6), 123.3 (C-14), 121.4 (C-3), 119.5 (C-13), 119.0 (C-16), 110.7 (C-4), 110.6 (C-1). HPLC-MS $[\text{M} + \text{H}]^+ = 303$, $T_R = 2.68$ (97 %). HRMS (ESI) calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{ONa}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+ 325.1060$, hallado 325.1055.

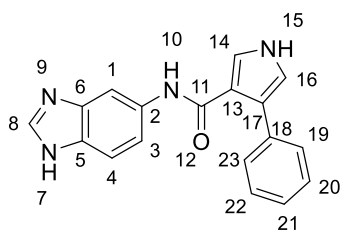
4-Fenil-*N*-(1*H*-indol-5-il)-1*H*-pirrol-3-carboxamida (4)



Procedimiento general G. Reactivos: ácido 1*H*-pirrol-3-carboxílico (3) (150 mg, 0.80 mmol), 1*H*-indol-5-amina (117 mg, 0.88 mmol), EDC (184 mg, 0.96 mmol), HOBT (10 mg, 0.08 mmol), DMAP (117 mg, 0.96 mmol) y DIPEA (698 μL , 4.00 mmol). Sólido blanco. Rendimiento: 42 mg, 17 %. P.f.:

225-227 °C. ^1H -RMN (300 MHz, Acetona- d_6) δ 10.61 (s, 1H, H-7), 10.15 (s, 1H, H-15), 8.21 (s, 1H, H-10), 7.93 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, H-1), 7.56 (dt, $J = 8.2, 1.7$ Hz, 2H, H-19, H-23), 7.48 (dd, $J = 3.0, 2.2$ Hz, 1H, H-14), 7.38 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, H-20, H-22), 7.33 – 7.24 (m, 3H, H-4, H-8, H-21), 7.12 (dd, $J = 8.7, 2.0$ Hz, 1H, H-3), 6.95 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-16), 6.39 (td, $J = 2.1, 1.0$ Hz, 1H, H-9). ^{13}C -RMN (75 MHz, Acetona- d_6) δ 163.9 (C-11), 136.7 (C-18), 134.0 (C-5), 132.8 (C-2), 129.9 (C-19, C-23), 129.1 (C-20, C-22), 129.0 (C-6), 127.1 (C-21), 126.2 (C-8), 124.7 (C-17), 123.2 (C-14), 119.8 (C-13), 118.9 (C-16), 116.0 (C-3), 111.8 (C-4), 111.7 (C-1), 102.3 (C-9). HPLC-MS $[\text{M} + \text{H}]^+ = 302$, $T_R = 2.96$ (97 %). HRMS (ESI) calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{ONa}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+ 324.1113$, hallado 324.1102.

N-(1*H*-Benzo[*d*]imidazol-5-il)-4-fenil-1*H*-pirrol-3-carboxamida (5)

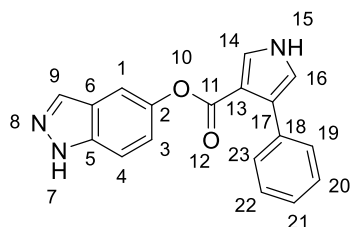


Procedimiento general G. Reactivos: ácido 1*H*-pirrol-3-carboxílico (3) (150 mg, 0.80 mmol), 1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-amina (117 mg, 0.88 mmol), EDC (184 mg, 0.96 mmol), HOBT (10 mg, 0.08 mmol), DMAP (117 mg, 0.96 mmol) y DIPEA (698 μL , 4.00 mmol). Sólido amarillo. Rendimiento:

11 mg, 5 %. P.f.: 132-134 °C. ^1H -RMN (500 MHz, Metanol- d_4) δ 7.98 (s, 1H, H-8), 7.52 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, H-1), 7.50 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H-14), 7.32 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-4), 7.26 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H, H-19, H-23), 7.17 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, H-20, H-22), 7.14 – 7.07 (m, 1H, H-21), 7.06 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H-16), 6.78 (dd, $J = 8.5, 2.2$ Hz, 1H, H-3). ^{13}C -RMN (125 MHz, Metanol- d_4) δ 165.7 (C-11), 147.7 (C-2), 143.0 (C-8), 136.9 (C-5), 135.7 (C-18),

134.4 (C-6), 129.5 (C-20, C-22), 128.9 (C-19, C-23), 127.4 (C-21), 127.4 (C-14), 127.2 (C-13), 120.4 (C-4), 119.9 (C-16), 116.1 (C-17), 115.3 (C-3), 101.6 (C-1). HPLC-MS $[M + H]^+ = 303$, $T_R = 2.35$ (97 %). HRMS (ESI) calculado para $C_{18}H_{14}N_4ONa$ $[M + Na]^+$ 325.1060, hallado 325.1054.

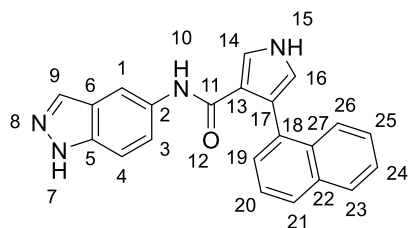
4-Fenil-1*H*-pirrol-3-carboxilato de 1*H*-indazol-5-ilo (6)



Procedimiento general H. Reactivos: ácido 1*H*-pirrol-3-carboxílico (**3**) (150 mg, 0.80 mmol), 1*H*-indazol-5-ol (117 mg, 0.88 mmol), CDI (143 mg, 0.88 mmol) y DMAP (108 mg, 0.88 mmol). Sólido blanco. Rendimiento: 6 mg, 3 %. P.f.:

221-223 °C. 1H -RMN (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ 11.75 (s, 1H, H-15), 8.05 (s, 1H, H-9), 7.77 (t, $J = 2.7$ Hz, 1H, H-14), 7.55 – 7.49 (m, 4H, H-1, H-4, H-19, H-23), 7.30 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, H-20, H-22), 7.20 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, H-21), 7.14 (dd, $J = 8.9, 2.2$ Hz, 1H, H-3), 7.04 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-16). ^{13}C -RMN (125 MHz, $DMSO-d_6$) δ 163.1 (C-11), 144.3 (C-2), 137.7 (C-5), 134.8 (C-18), 133.3 (C-9), 128.8 (C-19, C-23), 127.6 (C-20, C-22), 127.1 (C-14), 126.0 (C-21), 125.7 (C-17), 122.7 (C-6), 121.7 (C-3), 119.5 (C-16), 112.2 (C-4), 110.9 (C-13), 110.5 (C-1). HPLC-MS $[M + H]^+ = 304$, $T_R = 3.03$ (99 %). HRMS (ESI) calculado para $C_{18}H_{13}N_3O_2Na$ $[M + Na]^+$ 326.0900, hallado 326.0893.

N-(1*H*-Indazol-5-il)-4-(naftalen-1-il)-1*H*-pirrol-3-carboxamida (10)

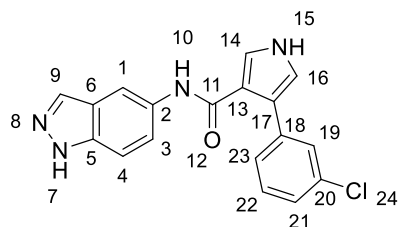


Procedimiento general D. Reactivos: (*E*)-*N*-(1*H*-indazol-5-il)-3-(naftalen-1-il)acrilamida (**7**) (400 mg, 1.28 mmol), TosMIC (275 mg, 1.41 mmol) e NaH (154 mg, 3.84 mmol). Sólido blanco. Aislado por cromatografía en columna Hex:AcOEt 8:2. Rendimiento: 30 mg, 7 %. P.f.:

197-199 °C. 1H -RMN (300 MHz, Acetona- d_6) δ 12.02 (s, 1H, H-7), 10.83 (s, 1H, H-15), 8.06 – 7.96 (m, 2H, H-10, H-20), 7.93 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H-26), 7.85 (s, 1H, H-9), 7.80 (d, $J = 1.3$ Hz, 1H, H-1), 7.71 (dd, $J = 3.2, 2.2$ Hz, 1H, H-14), 7.69 – 7.60 (m, 3H, H-19, H-21, H-23), 7.55 – 7.40 (m, 2H, H-24, H-25), 7.26 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, H-4), 6.99 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-16), 6.60 (dd, $J = 8.9, 2.0$ Hz, 1H, H-3). ^{13}C -RMN (75 MHz, Acetona- d_6) δ 163.2 (C-11), 138.0 (C-5), 134.8 (C-9), 134.3 (C-27), 134.3 (C-22), 134.2 (C-18), 133.3 (C-2), 129.4 (C-26), 129.1 (C-21), 128.8 (C-23), 127.1 (C-24), 127.1 (C-25), 126.9 (C-20), 126.4 (C-19), 124.1 (C-6), 123.9 (C-14), 121.5 (C-17), 120.8 (C-13), 120.8 (C-3), 120.3

(C-16), 110.6 (C-4), 110.2 (C-1). HPLC-MS $[M + H]^+ = 353$, $T_R = 3.02$ (99 %). HRMS (ESI) calculado para $C_{22}H_{16}N_4ONa$ $[M + Na]^+ 375.1216$, hallado 375.1218.

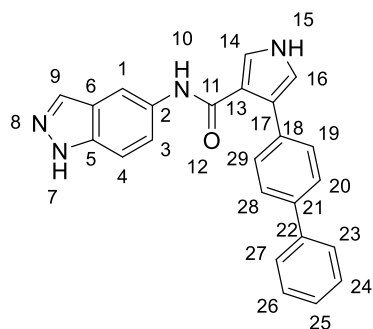
4-(3-Clorofenil)-N-(1H-indazol-5-il)-1H-pirrol-3-carboxamida (11)



Procedimiento general D. Reactivos: (*E*)-5-(3-(3-clorofenil)acrilamido)-1H-indazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (**8**) (310 mg, 0.78 mmol), TosMIC (169 mg, 0.86 mmol) e NaH (94 mg, 2.34 mmol). Sólido marrón.

Aislado por cromatografía en columna DCM:MeOH 30:1. Rendimiento: 7 mg, 3 %. P.f.: 196-198 °C. 1H -RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ 12.93 (s, 1H, H-7), 11.46 (s, 1H, H-15), 9.74 (s, 1H, H-10), 8.15 (s, 1H, H-1), 8.00 (s, 1H, H-9), 7.58 (t, $J = 1.8$ Hz, 1H, H-19), 7.52 (dd, $J = 8.9, 1.5$ Hz, 1H, H-3), 7.49 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-14), 7.48 – 7.43 (m, 2H, H-4, H-23), 7.31 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-22), 7.22 (ddd, $J = 8.0, 2.0, 1.0$ Hz, 1H, H-21), 7.13 (t, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-16). ^{13}C -RMN (125 MHz, DMSO- d_6) δ 163.7 (C-11), 137.8 (C-18), 136.8 (C-5), 133.3 (C-9), 132.7 (C-2), 132.4 (C-20), 129.5 (C-22), 127.6 (C-19), 126.6 (C-23), 125.1 (C-21), 122.7 (C-6), 122.4 (C-17), 122.2 (C-14), 121.1 (C-3), 118.9 (C-16), 117.5 (C-13), 110.1 (C-4), 109.8 (C-1). HPLC-MS $[M + H]^+ = 337$, $T_R = 2.86$ (98 %). HRMS (ESI) calculado para $C_{18}H_{13}ClN_4ONa$ $[M + Na]^+ 359.0670$, hallado 359.0666.

4-([1-1'-Bifenil]-4-il)-N-(1H-indazol-5-il)-1H-pirrol-3-carboxamida (12)

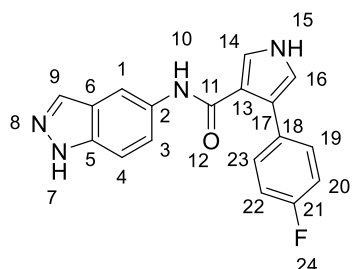


Procedimiento general D. Reactivos: (*E*)-5-(3-([1,1'-bifenil]-4-il)acrilamido)-1H-indazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (**9**) (440 mg, 1.00 mmol), TosMIC (215 mg, 1.10 mmol) e NaH (120 mg, 3.00 mmol). Sólido marrón. Aislado por cromatografía en columna DCM:MeOH 80:1. Rendimiento: 26 mg, 7 %. P.f.: 196-198 °C. 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.93 (s, 1H, H-7), 11.39 (s, 1H, H-15),

9.74 (s, 1H, H-10), 8.18 (s, 1H, H-1), 8.00 (s, 1H, H-9), 7.70 – 7.64 (m, 2H, H-19, H-23), 7.62 – 7.57 (m, 4H, H-20, H-22, H-25, H-29), 7.53 (dd, $J = 9.0, 1.9$ Hz, 1H, H-3), 7.49 – 7.42 (m, 4H, H-4, H-14, H-26, H-28), 7.37 – 7.30 (m, 1H, H-27), 7.09 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-16). ^{13}C -RMN (125 MHz, DMSO- d_6) δ 163.9 (C-11), 140.1 (C-21), 137.1 (C-24), 136.7 (C-5), 134.8 (C-2), 133.3 (C-9), 132.8 (C-18), 128.9 (C-25, C-29), 128.5 (C-26, C-28), 127.1 (C-27), 126.3 (C-20, C-22), 126.0 (C-19, C-23), 123.4 (C-17), 122.7 (C-6), 121.9 (C-

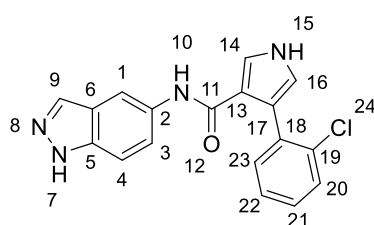
14), 121.0 (C-3), 118.3 (C-16), 117.7 (C-13), 109.9 (C-4), 109.8 (C-1). HPLC-MS $[M + H]^+ = 379$, $T_R = 3.12$ (97 %). HRMS (ESI) calculado para $C_{24}H_{18}ClN_4ONa$ $[M + Na]^+$ 401.1373, hallado 401.1369.

4-(4-Fluorofenil)-*N*-(1*H*-indazol-5-il)-1*H*-pirrol-3-carboxamida (52)

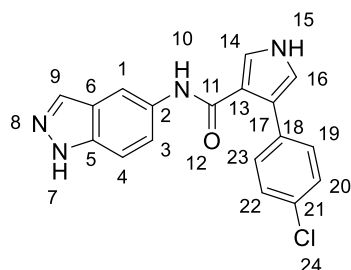


Procedimiento general I. Reactivos: 4-(4-fluorofenil)-1*H*-pirrol-3-carboxílico (**39**) (400 mg, 1.95 mmol), 1*H*-indazol-5-amina (286 mg, 2.15 mmol), BOP (1121 mg, 2.54 mmol) y DIPEA (510 μ L, 2.93 mmol). Sólido gris. Rendimiento: 475 mg, 76 %. P.f.: 221-223 °C. 1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.92 (s, 1H, H-7), 11.37 (s, 1H, H-15), 9.68 (s, 1H, H-10), 8.15 (s, 1H, H-1), 8.00 (s, 1H, H-9), 7.56 – 7.42 (m, 5H, H-3, H-4, H-14, H-19, H-23), 7.11 (t, $J = 9.0$ Hz, 2H, H-20, H-22), 7.01 (t, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-16). ^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 163.8 (C-11), 160.6 (d, $J = 241.6$ Hz, C-21), 136.7 (C-5), 133.3 (C-9), 132.8 (C-2), 132.0 (d, $J = 3.1$ Hz, C-18), 129.9 (d, $J = 7.8$ Hz, C-19, C-23), 123.0 (C-17), 122.7 (C-6), 121.9 (C-14), 121.0 (C-3), 118.2 (C-16), 117.4 (C-13), 114.4 (d, $J = 21.0$ Hz, C-20, C-22), 110.0 (C-4), 109.8 (C-1). HPLC-MS $[M + H]^+ = 321$, $T_R = 2.90$ (99 %). HRMS (ESI) calculado para $C_{18}H_{13}FN_4ONa$ $[M + Na]^+$ 343.0966, hallado 343.0961.

4-(2-Clorofenil)-*N*-(1*H*-indazol-5-il)-1*H*-pirrol-3-carboxamida (53)

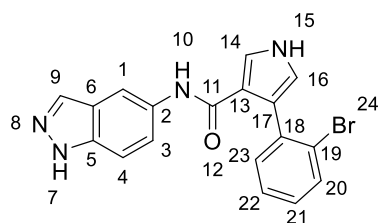


Procedimiento general I. Reactivos: ácido 4-(2-clorofenil)-1*H*-pirrol-3-carboxílico (**40**) (500 mg, 2.26 mmol), 1*H*-indazol-5-amina (331 mg, 2.49 mmol), BOP (1300 mg, 2.94 mmol) y DIPEA (609 μ L, 3.40 mmol). Sólido blanco. Rendimiento: 275 mg, 36 %. P.f.: 177-179 °C. 1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.90 (s, 1H, H-7), 11.39 (s, 1H, H-15), 9.50 (s, 1H, H-10), 8.08 (s, 1H, H-1), 7.96 (s, 1H, H-9), 7.55 (dd, $J = 2.9, 2.1$ Hz, 1H, H-14), 7.47 (dd, $J = 9.0, 1.7$ Hz, 1H, H-3), 7.43 – 7.39 (m, 2H, H-4, H-23), 7.38 – 7.33 (m, 1H, H-20), 7.32 – 7.22 (m, 2H, 21, 22), 6.88 (t, $J = 2.3$ Hz, 1H, 16). ^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 163.0 (C-11), 136.7 (C-5), 135.2 (C-18), 133.2 (C-19), 133.2 (C-9), 132.8 (C-2), 132.1 (C-21), 128.9 (C-23), 127.7 (C-22), 126.4 (C-20), 122.7 (C-17), 121.3 (C-6), 121.0 (C-3), 120.7 (C-14), 119.2 (C-16), 118.7 (C-13), 109.9 (C-4), 109.7 (C-1). HPLC-MS $[M + H]^+ = 337$, $T_R = 2.48$ (99 %). HRMS (ESI) calculado para $C_{18}H_{13}ClN_4ONa$ $[M + Na]^+$ 359.0670, hallado 359.0667.

4-(4-Clorofenil)-N-(1H-indazol-5-il)-1H-pirrol-3-carboxamida (54)

Procedimiento general I. Reactivos: ácido 4-(4-clorofenil)-1H-pirrol-3-carboxílico (**41**) (500 mg, 2.26 mmol), 1H-indazol-5-amina (331 mg, 2.49 mmol), BOP (1300 mg, 2.94 mmol) y DIPEA (609 μ L, 3.40 mmol). Sólido blanco. Rendimiento: 210 mg, 28 %. P.f.: 219-221 $^{\circ}$ C. 1 H-RMN (300

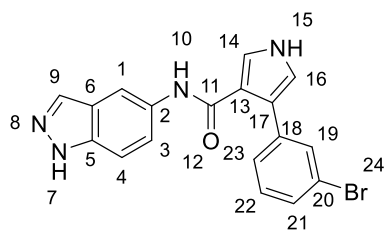
MHz, DMSO- d_6) δ 12.93 (s, 1H, H-7), 11.42 (s, 1H, H-15), 9.73 (s, 1H, H-10), 8.16 (s, 1H, H-1), 8.00 (s, 1H, H-9), 7.58 – 7.42 (m, 5H, H-3, H-4, H-14, H-19, H-23), 7.33 (d, J = 8.7 Hz, 2H, H-20, H-22), 7.07 (t, J = 2.3 Hz, 1H, H-16). 13 C-RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 163.7 (C-11), 136.8 (C-5), 134.5 (C-18), 133.3 (C-9), 132.7 (C-2), 130.0 (C-21), 129.7 (C-19, C-23), 127.7 (C-20, C-22), 122.7 (C-17), 122.7 (C-6), 122.1 (C-14), 121.0 (C-3), 118.5 (C-16), 117.5 (C-13), 110.0 (C-4), 109.8 (C-1). HPLC-MS $[M + H]^+$ = 337, T_R = 3.02 (99 %). HRMS (ESI) calculado para $C_{18}H_{13}ClN_4ONa$ $[M + Na]^+$ 359.0670, hallado 359.0664.

4-(2-Bromofenil)-N-(1H-indazol-5-il)-1H-pirrol-3-carboxamida (55)

Procedimiento general I. Reactivos: ácido 4-(2-bromofenil)-1H-pirrol-3-carboxílico (**42**) (200 mg, 0.75 mmol), 1H-indazol-5-amina (110 mg, 0.82 mmol), BOP (432 mg, 0.98 mmol) y DIPEA (197 μ L, 1.13 mmol). Sólido marrón. Rendimiento: 43 mg, 15 %. P.f.: 124-126

$^{\circ}$ C. 1 H-RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ 12.91 (s, 1H, H-7), 11.39 (s, 1H, H-15), 9.45 (s, 1H, H-10), 8.08 (s, 1H, H-1), 7.96 (s, 1H, H-9), 7.61 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H-23), 7.58 (t, J = 2.4 Hz, 1H, H-14), 7.47 (dd, J = 8.8, 1.5 Hz, 1H, H-3), 7.43 (d, J = 8.8 Hz, 1H, H-4), 7.37 – 7.32 (m, 2H, H-20, H-22), 7.20 (ddd, J = 8.9, 6.3, 2.8 Hz, 1H, H-21), 6.87 (t, J = 2.2 Hz, 1H, H-16). 13 C-RMN (125 MHz, DMSO- d_6) δ 162.8 (C-11), 137.2 (C-18), 136.6 (C-5), 133.2 (C-9), 132.7 (C-2), 132.2 (C-23), 132.0 (C-22), 127.9 (C-21), 126.8 (C-20), 124.3 (C-19), 123.2 (C-17), 122.7 (C-6), 121.0 (C-3), 120.6 (C-14), 119.0 (C-16), 118.4 (C-13), 109.9 (C-4), 109.7 (C-1). HPLC-MS $[M + H]^+$ = 381, T_R = 2.78 (96 %). HRMS (ESI) calculado para $C_{18}H_{13}BrN_4ONa$ $[M + Na]^+$ 403.0165, hallado 403.0153.

4-(3-Bromofenil)-N-(1H-indazol-5-il)-1H-pirrol-3-carboxamida (56)

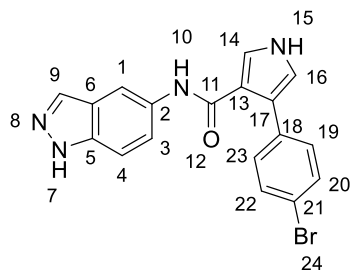


Procedimiento general I. Reactivos: ácido 4-(3-bromofenil)-1H-pirrol-3-carboxílico (**43**) (200 mg, 0.75 mmol), 1H-indazol-5-amina (110 mg, 0.82 mmol), BOP (432 mg, 0.98 mmol) y DIPEA (197 μ L, 1.13 mmol).

Sólido marrón. Rendimiento: 55 mg, 19 %. P.f.: 99-101

$^{\circ}$ C. $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, Acetona- d_6) δ 12.12 (s, 1H, H-7), 10.68 (s, 1H, H-15), 8.84 (s, 1H, H-10), 8.25 (s, 1H, H-1), 7.99 (d, $J = 0.7$ Hz, 1H, H-9), 7.79 (t, $J = 1.8$ Hz, 1H, H-19), 7.59 – 7.47 (m, 4H, H-3, H-4, H-14, H-23), 7.39 (ddd, $J = 8.0, 2.0, 1.1$ Hz, 1H, H-21), 7.27 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-22), 7.09 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-16). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, Acetona- d_6) δ 164.3 (C-11), 139.2 (C-18), 138.3 (C-5), 134.5 (C-9), 134.0 (C-2), 132.2 (C-19), 130.6 (C-23), 129.5 (C-22), 128.4 (C-21), 124.3 (C-17), 123.9 (C-6), 123.1 (C-14), 122.4 (C-20), 121.7 (C-3), 119.7 (C-16), 119.4 (C-13), 111.0 (C-4), 110.6 (C-1). HPLC-MS $[\text{M} + \text{H}]^+ = 381$, $T_R = 3.04$ (95 %). HRMS (ESI) calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{BrN}_4\text{ONa}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+ 403.0165$, hallado 403.0158.

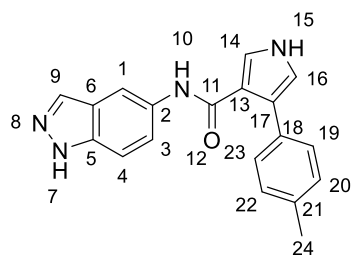
4-(4-Bromofenil)-N-(1H-indazol-5-il)-1H-pirrol-3-carboxamida (57)



Procedimiento general I. Reactivos: ácido 4-(4-bromofenil)-1H-pirrol-3-carboxílico (**44**) (200 mg, 0.75 mmol), 1H-indazol-5-amina (110 mg, 0.82 mmol), BOP (432 mg, 0.98 mmol) y DIPEA (197 μ L, 1.13 mmol). Sólido marrón.

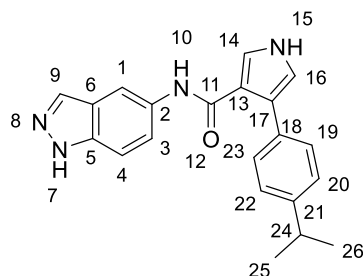
Rendimiento: 49 mg, 17 %. P.f.: 224-226 $^{\circ}$ C. $^1\text{H-RMN}$ (300

MHz, DMSO- d_6) δ 12.93 (s, 1H, H-7), 11.42 (s, 1H, H-15), 9.74 (s, 1H, H-10), 8.15 (s, 1H, H-1), 8.00 (s, 1H, H-9), 7.52 (dd, $J = 8.9, 1.8$ Hz, 1H, H-3), 7.49 – 7.41 (m, 6H, H-4, H-14, H-19, H-20, H-22, H-23), 7.07 (t, $J = 2.3$ Hz, 1H, 16). $^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ 163.7 (C-11), 136.7 (C-5), 134.8 (C-18), 133.3 (C-9), 132.7 (C-2), 130.6 (C-20, C-22), 130.1 (C-19, C-23), 122.7 (C-14), 122.1 (C-6), 122.1 (C-17), 121.0 (C-3), 118.5 (C-16), 118.4 (C-21), 117.5 (C-13), 110.0 (C-4), 109.8 (C-1). HPLC-MS $[\text{M} + \text{H}]^+ = 381$, $T_R = 3.05$ (95 %). HRMS (ESI) calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{BrN}_4\text{ONa}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+ 403.0165$, hallado 403.0156.

***N*-(1*H*-Indazol-5-il)-4-(*p*-tolil)-1*H*-pirrol-3-carboxamida (58)**

Procedimiento general I. Reactivos: ácido 4-(*p*-tolil)-1*H*-pirrol-3-carboxílico (**45**) (400 mg, 1.99 mmol), 1*H*-indazol-5-amina (291 mg, 2.18 mmol), BOP (1142 mg, 2.58 mmol) y DIPEA (520 μ L, 2.99 mmol). Sólido blanco. Rendimiento: 144 mg, 24 %. P.f.: 229-231 °C. $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, DMSO-

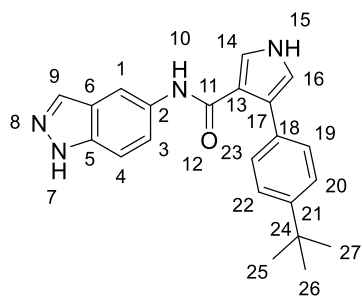
d_6) δ 12.92 (s, 1H, H-7), 11.31 (s, 1H, H-15), 9.61 (s, 1H, H-10), 8.15 (s, 1H, H-1), 7.99 (s, 1H, H-9), 7.49 (dd, $J = 9.0, 1.7$ Hz, 1H, H-3), 7.45 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H-4), 7.42 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-14), 7.37 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H-19, H-23), 7.09 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, H-20, H-22), 6.97 (t, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-16), 2.28 (s, 3H, H-24). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, DMSO- d_6) δ 163.9 (C-11), 136.7 (C-5), 134.4 (C-21), 133.3 (C-9), 132.8 (C-2), 132.6 (C-18), 128.4 (C-20, C-22), 128.0 (C-19, C-23), 123.8 (C-17), 122.7 (C-6), 121.7 (C-14), 121.0 (C-3), 117.8 (C-16), 117.6 (C-13), 109.8 (C-4), 109.8 (C-1), 20.7 (C-24). HPLC-MS $[\text{M} + \text{H}]^+ = 317$, $T_R = 2.99$ (99 %). HRMS (ESI) calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{ONa}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+ 339.1216$, hallado 339.1214.

***N*-(1*H*-Indazol-5-il)-4-(4-isopropilfenil)-1*H*-pirrol-3-carboxamida (59)**

Procedimiento general I. Reactivos: ácido 4-(4-isopropilfenil)-1*H*-pirrol-3-carboxílico (**46**) (400 mg, 1.74 mmol), 1*H*-indazol-5-amina (254 mg, 1.91 mmol), BOP (1000 mg, 2.26 mmol) y DIPEA (455 μ L, 2.61 mmol). Sólido rojo. Rendimiento: 177 mg, 30 %. P.f.: descompone a 174 °C. $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.93 (s, 1H, H-

7), 11.31 (s, 1H, H-15), 9.63 (s, 1H, H-10), 8.15 (s, 1H, H-1), 8.00 (s, 1H, H-9), 7.50 (dd, $J = 9.0, 1.7$ Hz, 1H, H-3), 7.45 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, H-4), 7.44 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-14), 7.39 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H-19, H-23), 7.16 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H-20, H-22), 6.96 (t, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-16), 2.86 (hept, $J = 6.7$ Hz, 1H, H-24), 1.21 (d, $J = 6.9$ Hz, 6H, H-25, H-26). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, DMSO- d_6) δ 163.9 (C-11), 145.5 (C-21), 136.7 (C-5), 133.3 (C-9), 133.0 (C-2), 132.8 (C-18), 128.1 (C-19, C-23), 125.7 (C-20, C-22), 123.9 (C-17), 122.7 (C-6), 121.7 (C-14), 121.0 (C-3), 117.9 (C-16), 117.6 (C-13), 109.9 (C-4), 109.8 (C-1), 33.1 (C-24), 24.0 (C-25, C-26). HPLC-MS $[\text{M} + \text{H}]^+ = 345$, $T_R = 3.30$ (95 %). HRMS (ESI) calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{ONa}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+ 367.1529$, hallado 367.1523.

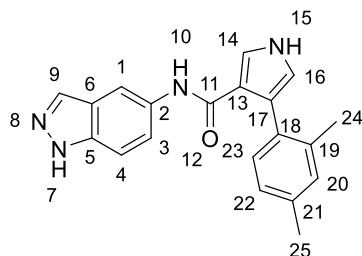
4-(4-(*tert*-butil)fenil)-*N*-(1*H*-indazol-5-il)-1*H*-pirrol-3-carboxamida (60)



Procedimiento general I. Reactivos: ácido 4-(4-(*tert*-butil)fenil)-1*H*-pirrol-3-carboxílico (**47**) (450 mg, 1.85 mmol), 1*H*-indazol-5-amina (271 mg, 2.03 mmol), BOP (1063 mg, 2.40 mmol) y DIPEA (482 μ L, 2.77 mmol). Sólido blanco. Rendimiento: 138 mg, 21 %. P.f.: 162-164 °C. $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 12.92 (s, 1H, H-7),

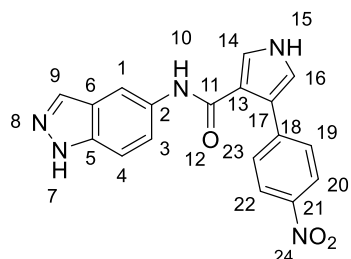
11.31 (s, 1H, H-15), 9.63 (s, 1H, H-10), 8.15 (s, 1H, H-1), 7.99 (s, 1H, H-9), 7.50 (dd, $J = 9.0, 1.8$ Hz, 1H, H-3), 7.47 – 7.42 (m, 2H, H-4, H-14), 7.40 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H-19, H-23), 7.30 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H-20, H-22), 6.96 (t, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-16), 1.29 (s, 9H, H-25, H-26, H-27). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 163.9 (C-11), 147.7 (C-21), 136.7 (C-5), 133.3 (C-9), 132.8 (C-2), 132.6 (C-18), 127.8 (C-19, C-23), 124.5 (C-20, C-22), 123.8 (C-17), 122.7 (C-6), 121.6 (C-14), 121.0 (C-3), 117.9 (C-16), 117.6 (C-13), 109.8 (C-4), 109.8 (C-1), 34.1 (C-24), 31.2 (C-25, C-26, C-27). HPLC-MS $[\text{M} + \text{H}]^+ = 359$, $T_R = 3.41$ (99 %). HRMS (ESI) calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{ONa}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+ 381.1686$, hallado 381.1677.

***N*-(1*H*-Indazol-5-il)-4-(2,4-dimetilfenil)-1*H*-pirrol-3-carboxamida (61)**



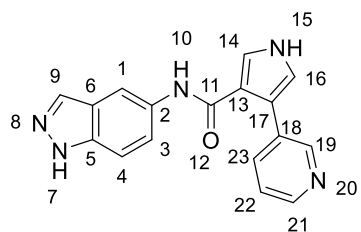
Procedimiento general I. Reactivos: ácido 4-(2,4-dimetilfenil)-1*H*-pirrol-3-carboxílico (**48**) (400 mg, 1.86 mmol), 1*H*-indazol-5-amina (272 mg, 2.05 mmol), BOP (1010 mg, 2.42 mmol) y DIPEA (486 μ L, 2.79 mmol). Sólido blanco. Rendimiento: 105 mg, 17 %. P.f.: 183-185

°C. $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 12.91 (s, 1H, H-7), 11.32 (s, 1H, H-15), 9.05 (s, 1H, H-10), 8.02 (s, 1H, H-1), 7.95 (s, 1H, H-9), 7.54 (t, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-14), 7.41 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, H-4), 7.29 (dd, $J = 8.9, 1.8$ Hz, 1H, H-3), 7.07 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-23), 7.02 (s, 1H, H-20), 6.96 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-22), 6.72 (t, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-16), 2.29 (s, 3H, H-25), 2.13 (s, 3H, H-24). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 163.1 (C-11), 136.7 (C-21), 136.5 (C-5), 135.4 (C-19), 133.2 (C-9), 132.7 (C-2), 132.6 (C-18), 130.4 (C-23), 130.1 (C-20), 125.7 (C-22), 123.0 (C-17), 122.7 (C-6), 121.2 (C-14), 120.7 (C-3), 118.3 (C-16), 118.2 (C-13), 109.8 (C-4), 109.6 (C-1), 20.7 (C-25), 20.1 (C-24). HPLC-MS $[\text{M} + \text{H}]^+ = 331$, $T_R = 3.15$ (99 %). HRMS (ESI) calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{ONa}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+ 353.1373$, hallado 353.1369.

***N*-(1*H*-Indazol-5-il)-4-(4-nitrofenil)-1*H*-pirrol-3-carboxamida (62)**

Procedimiento general I. Reactivos: ácido 4-(4-nitrofenil)-1*H*-pirrol-3-carboxílico (**49**) (128 mg, 0.55 mmol), 1*H*-indazol-5-amina (81 mg, 0.61 mmol), BOP (318 mg, 0.72 mmol) y DIPEA (145 μ L, 0.83 mmol). Sólido amarillo. Rendimiento: 52 mg, 27 %. P.f.: 158-160 °C. $^1\text{H-RMN}$ (300

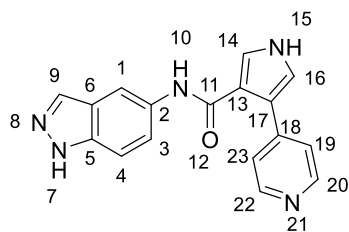
MHz, DMSO- d_6) δ 12.94 (s, 1H, H-7), 11.64 (s, 1H, H-15), 9.89 (s, 1H, H-10), 8.18 (s, 1H, H-1), 8.15 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H, H-20, H-22), 8.01 (s, 1H, H-9), 7.77 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H-19, H-23), 7.58 – 7.52 (m, 2H, H-3, H-14), 7.47 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, H-4), 7.31 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-16). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, DMSO- d_6) δ 163.5 (C-11), 144.9 (C-21), 143.0 (C-18), 136.8 (C-5), 133.3 (C-9), 132.6 (C-2), 128.4 (C-19, C-23), 123.1 (C-20, C-22), 123.0 (C-17), 122.7 (C-6), 121.9 (C-14), 121.1 (C-3), 120.4 (C-16), 117.9 (C-13), 110.2 (C-4), 109.8 (C-1). HPLC-MS $[\text{M} + \text{H}]^+ = 348$, $T_{\text{R}} = 2.87$ (99 %). HRMS (ESI) calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_3\text{Na}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+ 370.0911$, hallado 370.0909.

***N*-(1*H*-Indazol-5-il)-4-(piridin-3-il)-1*H*-pirrol-3-carboxamida (63)**

Procedimiento general I. Reactivos: ácido 4-(piridin-3-il)-1*H*-pirrol-3-carboxílico (**50**) (113 mg, 0.60 mmol), 1*H*-indazol-5-amina (88 mg, 0.66 mmol), BOP (345 mg, 0.78 mmol) y DIPEA (157 μ L, 0.90 mmol). Sólido marrón. Rendimiento: 71 mg, 39 %. P.f.: descompone a 170 °C. $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.94 (s, 1H, H-7), 11.52 (s, 1H, H-15), 9.76 (s, 1H, H-10), 8.68 (dd, $J = 2.3, 0.9$ Hz, 1H, H-19), 8.37 (dd, $J = 4.8, 1.7$ Hz, 1H, H-21), 8.15 (dd, $J = 1.9, 0.8$ Hz, 1H, H-1), 8.00 (d, $J = 1.0$ Hz, 1H, H-9), 7.88 (ddd, $J = 7.9, 2.3, 1.7$ Hz, 1H, H-23), 7.58 (dd, $J = 3.0, 2.1$ Hz, 1H, H-14), 7.53 (dd, $J = 9.0, 1.9$ Hz, 1H, H-3), 7.46 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, H-4), 7.31 (ddd, $J = 7.9, 4.8, 0.9$ Hz, 1H, H-22), 7.14 (t, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-16).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, DMSO- d_6) δ 163.5 (C-11), 148.7 (C-19), 146.3 (C-21), 136.8 (C-5), 135.5 (C-23), 133.3 (C-9), 132.7 (C-2), 131.4 (C-18), 122.8 (C-22), 122.7 (C-6), 122.3 (C-14), 121.1 (C-3), 120.6 (C-17), 118.9 (C-16), 117.4 (C-13), 110.2 (C-4), 109.8 (C-1). HPLC-MS $[\text{M} + \text{H}]^+ = 304$, $T_{\text{R}} = 1.91$ (95 %). HRMS (ESI) calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{ONa}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+ 326.1018$, hallado 326.1014.

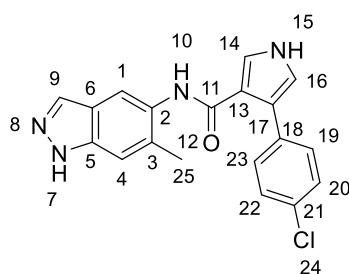
N-(1*H*-Indazol-5-il)-4-(piridin-4-il)-1*H*-pirrol-3-carboxamida (64)



Procedimiento general I. Reactivos: ácido 4-(piridin-4-il)-1*H*-pirrol-3-carboxílico (**51**) (113 mg, 0.60 mmol), 1*H*-indazol-5-amina (88 mg, 0.66 mmol), BOP (345 mg, 0.78 mmol) y DIPEA (157 μ L, 0.90 mmol). Sólido marrón. Rendimiento: 56 mg, 31 %. P.f.: descompone a 267 °C. ^1H -

RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.07 (s, 1H, H-7), 11.88 (s, 1H, H-15), 9.98 (s, 1H, H-10), 8.46 (d, $J = 6.3$ Hz, 2H, H-20, H-22), 8.20 (s, 1H, H-1), 8.00 (s, 1H, H-9), 7.65 – 7.56 (m, 4H, H-3, H-14, H-19, H-23), 7.47 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, H-4), 7.37 (s, 1H, H-16). ^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 163.6 (C-11), 147.7 (C-20, C-22), 144.4 (C-18), 136.9 (C-5), 133.3 (C-9), 132.7 (C-2), 123.3 (C-17), 122.7 (C-19, C-23), 122.7 (C-14), 121.2 (C-3), 120.7 (C-16), 120.7 (C-6), 117.8 (C-13), 110.2 (C-4), 109.9 (C-1). HPLC-MS $[\text{M} + \text{H}]^+ = 304$, $T_R = 1.87$ (96 %). HRMS (ESI) calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}$ $[\text{M} + \text{H}]^+ 304.1193$, hallado 304.1196.

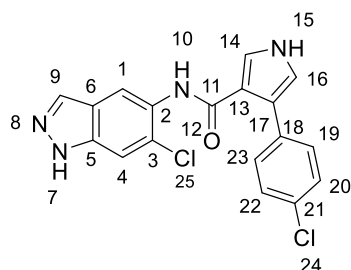
4-(4-Clorofenil)-*N*-(6-metil-1*H*-indazol-5-il)-1*H*-pirrol-3-carboxamida (65)



Procedimiento general I. Reactivos: ácido 4-(4-clorofenil)-1*H*-pirrol-3-carboxílico (**41**) (113 mg, 0.60 mmol), 6-metil-1*H*-indazol-5-amina (97 mg, 0.66 mmol), BOP (345 mg, 0.78 mmol) y DIPEA (157 μ L, 0.90 mmol). Sólido blanco. Rendimiento: 46 mg, 22 %. P.f.: descompone a 210 °C. ^1H -

RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.87 (s, 1H, H-7), 11.41 (s, 1H, H-15), 9.10 (s, 1H, H-10), 7.97 (s, 1H, H-9), 7.72 (s, 1H, H-1), 7.59 – 7.43 (m, 3H, H-14, H-19, H-23), 7.43 – 7.26 (m, 3H, H-4, H-20, H-22), 7.04 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-16), 2.28 (s, 3H, H-25). ^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 164.1 (C-11), 138.3 (C-5), 134.5 (C-18), 133.2 (C-9), 133.0 (C-2), 130.5 (C-3), 130.1 (C-21), 130.0 (C-19, C-23), 127.6 (C-20, C-22), 122.7 (C-17), 122.2 (C-14), 121.4 (C-6), 118.6 (C-16), 117.2 (C-13), 117.0 (C-1), 110.0 (C-4), 18.7 (C-25). HPLC-MS $[\text{M} + \text{H}]^+ = 351$, $T_R = 3.07$ (99 %). HRMS (ESI) calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{ClN}_4\text{O}$ $[\text{M} + \text{H}]^+ 351.1007$, hallado 351.1007.

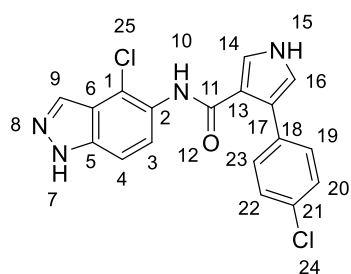
4-(4-Clorofenil)-N-(6-cloro-1H-indazol-5-il)-1H-pirrol-3-carboxamida (66)



Procedimiento general I. Reactivos: ácido 4-(4-clorofenil)-1H-pirrol-3-carboxílico (**41**) (113 mg, 0.60 mmol), 6-cloro-1H-indazol-5-amina (111 mg, 0.66 mmol), BOP (345 mg, 0.78 mmol) y DIPEA (157 μ L, 0.90 mmol). Sólido blanco. Rendimiento: 51 mg, 23 %. P.f.: descompone a 230 °C. ¹H-

RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.14 (s, 1H, H-7), 11.47 (s, 1H, H-15), 9.14 (s, 1H, H-10), 8.10 (s, 1H, H-9), 8.04 (s, 1H, H-1), 7.70 (s, 1H, H-4), 7.56 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H, H-14), 7.52 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H-19, H-23), 7.34 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H-20, H-22), 7.05 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-16). ¹³C-RMN (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163.8 (C-11), 137.7 (C-5), 134.2 (C-18), 133.8 (C-9), 130.3 (C-21), 130.2 (C-19, C-23), 128.4 (C-3), 128.0 (C-2), 127.7 (C-20, C-22), 122.8 (C-14), 122.7 (C-17), 121.8 (C-6), 118.9 (C-16), 118.3 (C-1), 116.6 (C-13), 110.2 (C-4). HPLC-MS [M + H]⁺ = 371, T_R = 3.27 (99 %). HRMS (ESI) calculado para C₁₈H₁₃Cl₂N₄O [M + H]⁺ 371.0461, hallado 371.0465.

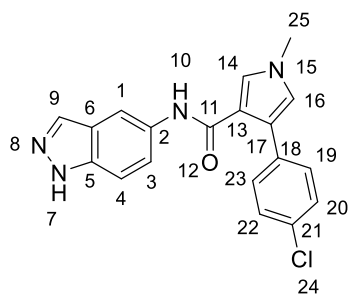
4-(4-Clorofenil)-N-(4-cloro-1H-indazol-5-il)-1H-pirrol-3-carboxamida (67)



Procedimiento general I. Reactivos: ácido 4-(4-clorofenil)-1H-pirrol-3-carboxílico (**41**) (133 mg, 0.60 mmol), 4-cloro-1H-indazol-5-amina (111 mg, 0.66 mmol), BOP (345 mg, 0.78 mmol) y DIPEA (157 μ L, 0.90 mmol). Sólido blanco. Rendimiento: 97 mg, 44 %. P.f.: descompone a 286 °C. ¹H-

RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.38 (s, 1H, H-7), 11.47 (s, 1H, H-15), 9.29 (s, 1H, H-10), 8.10 (s, 1H, H-9), 7.70 – 7.44 (m, 5H, H-3, H-4, H-14, H-19, H-23), 7.33 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-20, H-22), 7.05 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-16). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163.7 (C-11), 138.6 (C-5), 134.3 (C-18), 132.0 (C-9), 130.2 (C-21), 130.1 (C-19, C-23), 128.2 (C-2), 127.7 (C-20, C-22), 126.8 (C-3), 122.9 (C-14), 122.8 (C-17), 122.2 (C-1), 119.2 (C-6), 118.9 (C-16), 116.4 (C-13), 108.9 (C-4). HPLC-MS [M + H]⁺ = 371, T_R = 3.29 (95 %). HRMS (ESI) calculado para C₁₈H₁₂Cl₂N₄ONa [M + Na]⁺ 393.0286, hallado 393.0281.

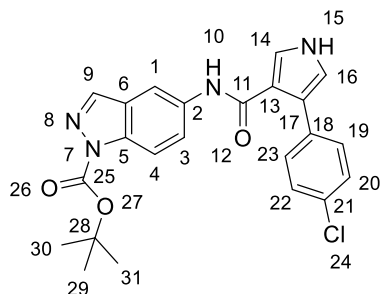
4-(4-Clorofenil)-N-(1H-indazol-5-il)-1-metil-1H-pirrol-3-carboxamida (70)



Procedimiento general I. Reactivos: ácido 4-(4-clorofenil)-1-metil-1H-pirrol-3-carboxílico (**69**) (141 mg, 0.60 mmol), 1H-indazol-5-amina (88 mg, 0.66 mmol), BOP (345 mg, 0.78 mmol) y DIPEA (157 μ L, 0.90 mmol). Sólido marrón. Rendimiento: 107 mg, 51 %. P.f.: 211-213 °C. $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 12.94 (s, 1H, H-7), 9.75 (s, 1H, H-10),

8.15 (s, 1H, H-1), 8.00 (s, 1H, H-9), 7.54 – 7.41 (m, 5H, H-3, H-4, H-14, H-19, H-23), 7.37 – 7.30 (m, 2H, H-20, H-22), 7.04 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-16), 3.70 (s, 3H, 25). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 163.3 (C-11), 136.8 (C-5), 134.1 (C-18), 133.3 (C-9), 132.7 (C-2), 130.1 (C-21), 129.6 (C-19, C-23), 127.7 (C-20, C-22), 125.6 (C-14), 122.9 (C-17), 122.7 (C-6), 122.3 (C-16), 120.9 (C-3), 117.5 (C-13), 109.9 (C-4), 109.8 (C-1), 36.1 (C-25). HPLC-MS $[\text{M} + \text{H}]^+ = 351$, $T_R = 3.26$ (95 %). HRMS (ESI) calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{ClN}_4\text{O}_2\text{Na}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+ 373.0832$ hallado, 373.0832.

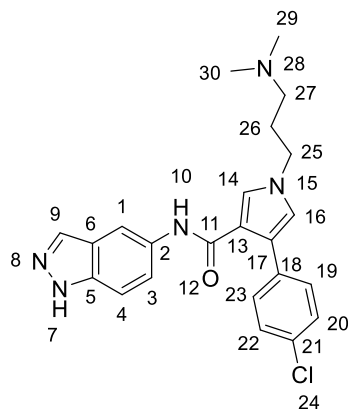
5-(4-(4-Clorofenil)-1H-pirrol-3-carboxamido)-1H-indazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (71)



Procedimiento general I. Reactivos: ácido 4-(4-clorofenil)-1H-pirrol-3-carboxílico (**41**) (173 mg, 0.78 mmol), 5-amino-1H-indazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (200 mg, 0.86 mmol), BOP (448 mg, 1.01 mmol) y DIPEA (204 μ L, 1.17 mmol). Sólido blanco. Rendimiento: 151 mg, 44 %. $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11.48 (s, 1H, H-15),

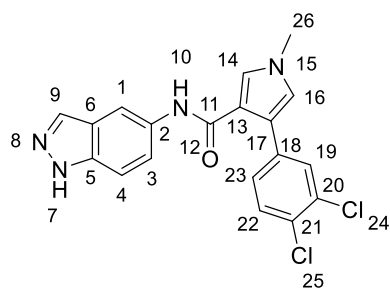
9.96 (s, 1H, H-10), 8.38 (d, $J = 0.8$ Hz, 1H, H-9), 8.32 (d, $J = 1.3$ Hz, 1H, H-1), 7.99 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, H-4), 7.76 (dd, $J = 9.1, 2.0$ Hz, 1H, H-3), 7.53 (dd, $J = 3.0, 2.1$ Hz, 1H, H-14), 7.50 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H-19, H-23), 7.33 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H-20, H-22), 7.08 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-16), 1.65 (s, 9H, H-29, H-30, H-31). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 163.9 (C-11), 148.5 (C-25), 139.9 (C-9), 135.9 (C-2), 135.2 (C-5), 134.4 (C-18), 130.1 (C-21), 129.8 (C-19, C-23), 127.7 (C-20, C-22), 125.9 (C-6), 122.9 (C-3), 122.6 (C-17), 122.5 (C-14), 118.7 (C-16), 117.1 (C-13), 113.9 (C-4), 110.7 (C-1), 84.3 (C-28), 27.7 (C-29, C-30, C-31). HPLC-MS $[\text{M} + \text{H}]^+ = 473$, $T_R = 3.76$ (99 %).

4-(4-Clorofenil)-*N*-(1*H*-indazol-5-il)-1-(3-(dimetilamino)propil)-1*H*-pirrol-3-carboxamida (72)



Procedimiento general J. Reactivos: 5-(4-(4-clorofenil)-1*H*-pirrol-3-carboxamido)-1*H*-indazol-1-carboxilato de *tert*-butilo (**71**) (140 mg, 0.32 mmol), Cs₂CO₃ (135 mg, 0.42 mmol), KI (10 mg, 0.06 mmol), 3-cloro-*N,N*-dimetilpropan-1-amina (55 μ L, 0.42 mmol) y TFA:DCM 4:1 (5mL). Sólido blanco. Rendimiento: 21 mg, 16 %. P.f.: 224-226 °C. ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.94 (s, 1H, H-7), 9.72 (s, 1H, H-10), 8.14 (s, 1H, H-1), 8.00 (s, 1H, H-9), 7.55 – 7.41 (m, 5H, H-3, H-4, H-14, H-19, H-23), 7.33 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H-20, H-22), 7.10 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H-16), 3.97 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, H-25), 2.33 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, H-27), 2.23 (s, 6H, H-29, H-30), 2.04 – 1.89 (m, 2H, H-26). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163.3 (C-11), 136.8 (C-5), 134.1 (C-18), 133.3 (C-9), 132.7 (C-2), 130.1 (C-21), 129.6 (C-19, C-23), 127.7 (C-20, C-22), 124.7 (C-14), 122.8 (C-17), 122.7 (C-6), 121.4 (C-16), 121.0 (C-3), 117.3 (C-13), 110.0 (C-4), 109.8 (C-1), 55.6 (C-27), 47.1 (C-25), 44.8 (C-29, C-30), 28.2 (C-26). HPLC-MS [M + H]⁺ = 422, T_R = 2.45 (95 %). HRMS (ESI) calculado para C₂₃H₂₄ClN₅O [M + H]⁺ 422.1742, hallado 422.1735.

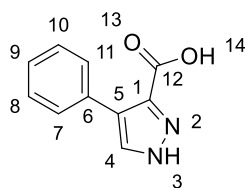
4-(3,4-Diclorofenil)-*N*-(1*H*-indazol-5-il)-1-metil-1*H*-pirrol-3-carboxamida (89)



Procedimiento general I. Reactivos: ácido 4-(3,4-diclorofenil)-1-metil-1*H*-pirrol-3-carboxílico (**88**) (200 mg, 0.74 mmol), 1*H*-indazol-5-amina (108 mg, 0.81 mmol), BOP (425 mg, 0.96 mmol) y DIPEA (193 μ L, 1.11 mmol). Sólido blanco. Rendimiento: 84 mg, 30 %. P.f.: 249-251 °C. ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.94 (s, 1H, H-7), 9.80 (s, 1H, H-10), 8.14 (s, 1H, H-1), 8.01 (s, 1H, H-9), 7.75 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H-19), 7.57 – 7.42 (m, 5H, H-3, H-4, H-14, H-22, H-23), 7.16 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H-16), 3.70 (s, 3H, H-26). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163.2 (C-11), 136.8 (C-5), 136.0 (C-18), 133.3 (C-9), 132.6 (C-2), 130.3 (C-20), 129.9 (C-22), 129.4 (C-19), 128.1 (C-23), 127.8 (C-21), 125.9 (C-14), 123.0 (C-16), 122.7 (C-6), 121.6 (C-17), 121.0 (C-3), 117.4 (C-13), 110.1 (C-4), 109.9 (C-1), 36.1 (C-26). HPLC-MS [M + H]⁺ = 385, T_R = 3.43 (95 %). HRMS (ESI) calculado para C₁₉H₁₄Cl₂N₄ONa [M + Na]⁺ 407.0437, hallado 407.0432.

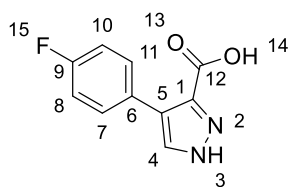
4.3.7. Síntesis de los derivados de ácido 4-*aril*-1*H*-pirazol-3-carboxílico 73-77

Ácido 4-fenil-1*H*-pirazol-3-carboxílico (73)²⁷⁶



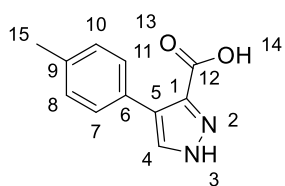
Procedimiento general K. Reactivos: (*E*)-2-(nitrovinil)benceno (150 mg, 1.00 mmol), diazoacetato de etilo (0.5 mL, 4.0 mmol) y TEA (28 μ L, 0.20 mmol). Sólido marrón. Rendimiento: 124 mg, 66 %. ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.87 (s, 1H, H-4), 7.56 – 7.50 (m, 2H, H-7, H-11), 7.36 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, H-8, H-10), 7.28 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H, H-9). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162.3 (C-12), 132.1 (C-6), 129.0 (C-7, C-11), 127.9 (C-8, C-10), 126.8 (C-9), 124.2 (C-5). HPLC-MS [M + H]⁺ = 189, T_R = 2.59 (98 %).

Ácido 4-(4-fluorofenil)-1*H*-pirazol-3-carboxílico (74)



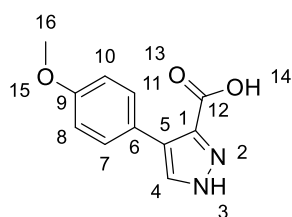
Procedimiento general K. Reactivos: (*E*)-1-fluoro-4-(2-nitrovinil)benceno (1.00 g, 6.00 mmol), diazoacetato de etilo (19.2 mL, 24.00 mmol) y TEA (167 μ L, 1.20 mmol). Sólido marrón. Rendimiento: 817 mg, 65 %. ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.22 (s, 2H, H-3, H-14), 7.87 (s, 1H, H-4), 7.57 (dd, *J* = 8.9, 5.6 Hz, 2H, H-7, H-11), 7.19 (t, *J* = 9.0 Hz, 2H, H-8, H-10). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162.2 (C-12), 161.3 (d, *J* = 243.5 Hz, C-9), 130.9 (d, *J* = 8.1 Hz, C-7, C-11), 128.5 (d, *J* = 3.1 Hz, C-6), 123.2 (C-5), 114.7 (d, *J* = 21.3 Hz, C-8, C-10). HPLC-MS [M + H]⁺ = 207, T_R = 2.66 (95 %).

Ácido 4-(*p*-tolil)-1*H*-pirazol-3-carboxílico (75)

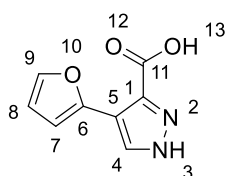


Procedimiento general K. Reactivos: (*E*)-1-metil-4-(2-nitrovinil)benceno (979 mg, 6.00 mmol), diazoacetato de etilo (19.2 mL, 24.00 mmol) y TEA (167 μ L, 1.20 mmol). Sólido marrón. Rendimiento: 594 mg, 49 %. ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.25 (s, 2H, H-3, H-14), 7.82 (s, 1H, H-4), 7.42 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H-7, H-11), 7.16 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H-8, H-10), 2.31 (s, 3H, H-15). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162.3 (C-12), 136.0 (C-9), 129.2 (C-6), 128.8 (C-7, C-11), 128.5 (C-8, C-10), 124.2 (C-5), 20.8 (C-15). HPLC-MS [M + H]⁺ = 203, T_R = 2.77 (99 %).

²⁷⁶ Ermolenko, M. S.; Guillou, S.; Janin, Y. L. Pyrazole-3/5-Carboxylic Acids from 3/5-Trifluoromethyl NH-Pyrazoles. *Tetrahedron* **2013**, *69* (1), 257–263.

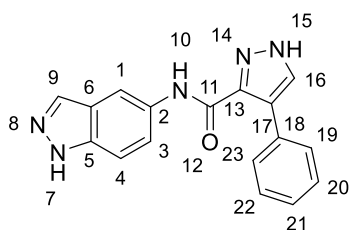
Ácido 4-(4-metoxifenil)-1H-pirazol-3-carboxílico (76)²⁷⁶

Procedimiento general K. Reactivos: (*E*)-1-metoxi-4-(2-nitrovinil)benceno (1.08 g, 6.00 mmol), diazoacetato de etilo (19.2 mL, 24.00 mmol) y TEA (167 μ L, 1.20 mmol). Sólido marrón. Rendimiento: 720 mg, 55 %. ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.80 (s, 1H, H-4), 7.48 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H-7, H-11), 6.93 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, H-8, H-10), 3.77 (s, 3H, H-16). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162.3 (C-12), 158.3 (C-9), 130.1 (C-7, C-11), 124.4 (C-6), 124.1 (C-5), 113.4 (C-8, C-10), 55.1 (C-16). HPLC-MS [M + H]⁺ = 219, T_R = 2.60 (90 %).

Ácido 4-furan-2-il-1H-pirazol-3-carboxílico (77)²⁷⁷

Procedimiento general K. Reactivos: (*E*)-2-(2-nitrovinil)furano (835 mg, 6.00 mmol), diazoacetato de etilo (19.2 mL, 24.00 mmol) y TEA (167 μ L, 1.20 mmol). Sólido marrón. Rendimiento: 178 mg, 17 %. ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.47 (s, 2H, H-3, H-13), 8.01 (s, 1H, H-4), 7.66 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, H-9), 7.06 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H, H-7), 6.53 (dd, *J* = 3.3, 1.8 Hz, 1H, H-8). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161.9 (C-11), 146.4 (C-6), 141.8 (C-9), 115.0 (C-5), 111.6 (C-8), 108.8 (C-7). HPLC-MS [M + H]⁺ = 179, T_R = 2.45 (98 %).

4.3.8. Síntesis de los derivados de 4-aryl-*N*-(1H-indazol-5-il)-1H-pirazol-3-carboxamida 78-82

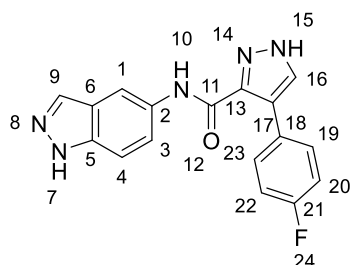
4-Fenil-*N*-(1H-indazol-5-il)-1H-pirazol-3-carboxamida (78)

Procedimiento general I. Reactivos: ácido 4-fenil-1H-pirazol-3-carboxílico (**73**) (113 mg, 0.60 mmol), 1H-indazol-5-amina (88 mg, 0.66 mmol), BOP (345 mg, 0.78 mmol) y DIPEA (157 μ L, 0.90 mmol). Sólido blanco. Rendimiento: 69 mg, 38 %. P.f.: 262-264 °C. ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.45 (s, 1H, H-15), 12.98 (s, 1H, H-7), 10.20 (s, 1H, H-10), 8.27 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H-1), 8.15 (s, 1H, H-16), 8.03 (s, 1H, H-9), 7.76 – 7.54 (m, 3H, H-3, H-19, H-23), 7.49 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H-4), 7.35 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, H-20, H-22), 7.30 – 7.16 (m, 1H, H-21). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161.6 (C-11), 143.1 (C-13), 137.0 (C-5), 133.4 (C-9), 132.3 (C-18), 132.0 (C-2), 129.4 (C-16), 128.4 (C-19, C-23), 128.0 (C-20, C-22), 126.4 (C-21), 122.7 (C-

²⁷⁷ Cativiela, C.; De Villegas, M. D. D.; Mayoral, J. A.; Avenoza, A.; Roy, M. A. On the Synthesis of 3(5)-Carbomethoxy-4-Hetarylpzrazoles. *J. Heterocycl. Chem.* **1988**, 25 (3), 851–855.

6), 121.8 (C-17), 121.1 (C-3), 110.5 (C-4), 109.9 (C-1). HPLC-MS $[M + H]^+ = 304$, $T_R = 2.83$ (95 %). HRMS (ESI) calculado para $C_{17}H_{13}N_5ONa$ $[M + Na]^+ 326.1018$, hallado 326.1011.

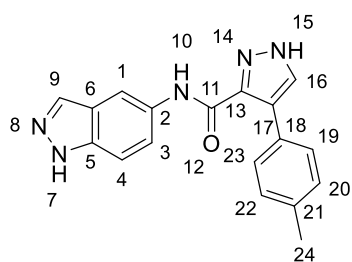
4-(4-Fluorofenil)-*N*-(1*H*-indazol-5-il)-1*H*-pirazol-3-carboxamida (79)



Procedimiento general I. Reactivos: ácido 4-(4-fluorofenil)-1*H*-pirazol-3-carboxílico (74) (124 mg, 0.60 mmol), 1*H*-indazol-5-amina (88 mg, 0.66 mmol), BOP (345 mg, 0.78 mmol) y DIPEA (157 μ L, 0.90 mmol). Sólido blanco. Rendimiento: 77 mg, 40 %. P.f.: 288-290 °C. 1H -RMN (300

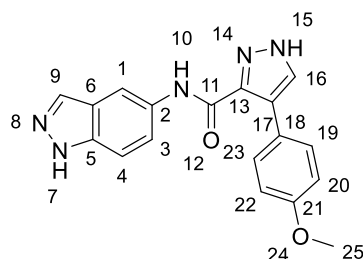
MHz, DMSO- d_6) δ 13.48 (s, 1H, H-15), 12.98 (s, 1H, H-7), 10.19 (s, 1H, H-10), 8.27 (s, 1H, H-1), 8.15 (s, 1H, H-16), 8.03 (s, 1H, H-9), 7.75 – 7.58 (m, 3H, H-3, H-19, H-23), 7.49 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, H-4), 7.19 (t, $J = 8.9$ Hz, 2H, H-20, H-22). ^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 161.5 (C-11), 161.1 (d, $J = 243.1$ Hz, C-21), 142.8 (C-13), 137.0 (C-5), 133.4 (C-9), 131.9 (C-2), 130.4 (d, $J = 8.0$ Hz, C-19, C-23), 129.6 (C-16), 128.8 (d, $J = 2.3$ Hz, C-18), 122.7 (C-6), 121.1 (C-3), 120.9 (C-17), 114.7 (d, $J = 21.2$ Hz, C-20, C-22), 110.6 (C-4), 109.9 (C-1). HPLC-MS $[M + H]^+ = 322$, $T_R = 2.91$ (95 %). HRMS (ESI) calculado para $C_{17}H_{12}FN_5ONa$ $[M + Na]^+ 344.0924$, hallado 344.0921.

N-(1*H*-Indazol-5-il)-4-(*p*-tolil)-1*H*-pirazol-3-carboxamida (80)

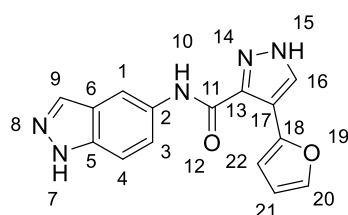


Procedimiento general I. Reactivos: ácido 4-(*p*-tolil)-1*H*-pirazol-3-carboxílico (75) (121 mg, 0.60 mmol), 1*H*-indazol-5-amina (88 mg, 0.66 mmol), BOP (345 mg, 0.78 mmol) y DIPEA (157 μ L, 0.90 mmol). Sólido blanco. Rendimiento: 70 mg, 37 %. P.f.: 276-278 °C. 1H -RMN (300 MHz, DMSO-

d_6) δ 13.40 (s, 1H, H-15), 12.98 (s, 1H, H-7), 10.17 (s, 1H, H-10), 8.26 (s, 1H, H-1), 8.10 (s, 1H, H-16), 8.03 (s, 1H, H-9), 7.64 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H, H-3), 7.55 – 7.46 (m, 3H, H-4, H-19, H-23), 7.15 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, H-20, H-22), 2.30 (s, 3H, H-24). ^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 161.7 (C-11), 143.1 (C-13), 137.0 (C-5), 135.5 (C-21), 133.4 (C-9), 132.0 (C-2), 129.4 (C-18), 129.1 (C-16), 128.6 (C-20, C-22), 128.3 (C-19, C-23), 122.7 (C-6), 121.7 (C-17), 121.1 (C-3), 110.4 (C-4), 109.9 (C-1), 20.7 (C-24). HPLC-MS $[M + H]^+ = 319$, $T_R = 3.00$ (99 %). HRMS (ESI) calculado para $C_{18}H_{16}N_5O$ $[M + H]^+ 318.1349$, hallado 318.1353.

***N*-(1*H*-Indazol-5-il)-4-(4-metoxifenil)-1*H*-pirazol-3-carboxamida (81)**

Procedimiento general I. Reactivos: ácido 4-(4-metoxifenil)-1*H*-pirazol-3-carboxílico (**76**) (131 mg, 0.60 mmol), 1*H*-indazol-5-amina (88 mg, 0.66 mmol), BOP (345 mg, 0.78 mmol) y DIPEA (157 μ L, 0.90 mmol). Sólido blanco. Rendimiento: 70 mg, 35 %. P.f.: 275-277 $^{\circ}$ C. 1 H-RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.38 (s, 1H, H-15), 12.97 (s, 1H, H-7), 10.15 (s, 1H, H-10), 8.27 (s, 1H, H-1), 8.07 (s, 1H, H-16), 8.03 (s, 1H, H-9), 7.65 (dd, J = 9.0, 1.9 Hz, 1H, H-3), 7.56 (d, J = 8.7 Hz, 2H, H-19, H-23), 7.48 (d, J = 8.8 Hz, 1H, H-4), 6.92 (d, J = 8.8 Hz, 2H, H-20, H-22), 3.76 (s, 3H, H-25). 13 C-RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 161.7 (C-11), 158.0 (C-21), 142.8 (C-13), 136.9 (C-5), 133.4 (C-9), 132.0 (C-2), 129.6 (C-19, C-23), 128.9 (C-16), 124.7 (C-18), 122.7 (C-6), 121.6 (C-17), 121.1 (C-3), 113.4 (C-20, C-22), 110.4 (C-4), 109.9 (C-1), 55.1 (C-25). HPLC-MS $[M + H]^+ = 334$, $T_R = 2.84$ (99 %). HRMS (ESI) calculado para $C_{18}H_{15}N_5O_2Na$ $[M + Na]^+ 356.1118$, hallado 356.1117.

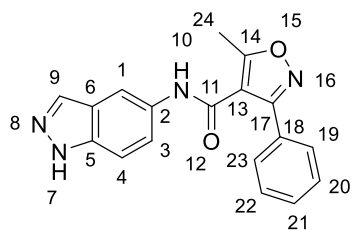
***N*-(1*H*-Indazol-5-il)-4-(4-metoxifenil)-1*H*-pirazol-3-carboxamida (82)**

Procedimiento general I. Reactivos: 4-furan-2-il-1*H*-pirazol-3-carboxílico (**77**) (107 mg, 0.60 mmol), 1*H*-indazol-5-amina (88 mg, 0.66 mmol), BOP (345 mg, 0.78 mmol) y DIPEA (157 μ L, 0.90 mmol). Sólido blanco. Rendimiento: 58 mg, 33 %.

P.f.: 264-266 $^{\circ}$ C. 1 H-RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.61 (s, 1H, H-15), 12.99 (s, 1H, H-7), 10.16 (s, 1H, H-10), 8.29 (d, J = 1.8 Hz, 1H, H-1), 8.22 (s, 1H, H-16), 8.06 (s, 1H, H-9), 7.74 – 7.60 (m, 2H, H-3, H-20), 7.50 (d, J = 8.9 Hz, 1H, H-4), 7.12 (d, J = 3.3 Hz, 1H, H-22), 6.51 (dd, J = 3.3, 1.9 Hz, 1H, H-21). 13 C-RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 160.8 (C-11), 146.8 (C-18), 141.5 (C-20), 141.4 (C-13), 137.0 (C-5), 133.5 (C-9), 131.8 (C-2), 128.2 (C-16), 122.7 (C-6), 121.3 (C-3), 113.2 (C-17), 111.4 (C-21), 110.8 (C-1), 109.9 (C-4), 108.3 (C-22). HPLC-MS $[M + H]^+ = 294$, $T_R = 2.79$ (95 %). HRMS (ESI) calculado para $C_{15}H_{11}N_5O_2Na$ $[M + Na]^+ 316.0805$, hallado 316.0803.

4.3.9. Síntesis de los derivados de oxazol/isoxazol-carboxamida 83, 84

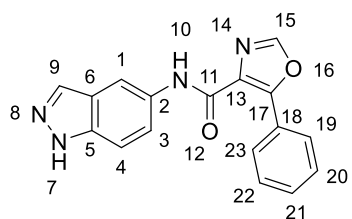
3-Fenil-N-(1*H*-indazol-5-il)-5-metil-isoxazol-4-carboxamida (83)



Procedimiento general I. Reactivos: ácido 3-fenil-5-metil-isoxazol-4-carboxílico (300 mg, 1.48 mmol), 1*H*-indazol-5-amina (216 mg, 1.62 mmol), BOP (849 mg, 1.92 mmol) y DIPEA (387 μ L, 2.22 mmol). Sólido blanco. Rendimiento: 222 mg, 47 %. P.f.: 220-222 °C. ^1H -RMN (300 MHz, DMSO-

d_6) δ 13.03 (s, 1H, H-7), 10.44 (s, 1H, H-10), 8.18 (s, 1H, H-1), 8.06 (s, 1H, H-9), 7.76 – 7.69 (m, 2H, H-19, H-23), 7.54 – 7.41 (m, 5H, H-3, H-4, H-20, H-21, H-22), 2.60 (s, 3H, H-24). ^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 169.7 (C-11), 160.2 (C-14), 159.8 (C-17), 137.2 (C-5), 133.5 (C-9), 131.5 (C-2), 130.1 (C-21), 128.9 (C-20, C-22), 128.1 (C-18), 127.7 (C-19, C-23), 122.6 (C-6), 120.6 (C-3), 113.5 (C-13), 110.6 (C-4), 110.3 (C-1), 11.9 (C-24). HPLC-MS $[\text{M} + \text{H}]^+ = 319$, $T_R = 3.05$ (99 %). HRMS (ESI) calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+ 319.1190$, hallado 319.1178.

5-Fenil-N-(1*H*-indazol-5-il)oxazol-4-carboxamida (84)



Procedimiento general I. Reactivos: ácido 5-feniloxazol-4-carboxílico (300 mg, 1.59 mmol), 1*H*-indazol-5-amina (232 mg, 1.74 mmol), BOP (912 mg, 2.06 mmol) y DIPEA (413 μ L, 2.37 mmol). Sólido blanco. Rendimiento: 154 mg, 32 %.

P.f.: 228-230 °C. ^1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13.02 (s, 1H, H-7), 10.25 (s, 1H, H-10), 8.70 (s, 1H, H-15), 8.30 (d, $J = 1.3$ Hz, 1H, H-1), 8.20 (dd, $J = 8.1, 1.6$ Hz, 2H, H-19, H-23), 8.06 (s, 1H, H-9), 7.69 (dd, $J = 9.0, 1.9$ Hz, 1H, H-3), 7.57 – 7.46 (m, 4H, H-4, H-20, H-21, H-22). ^{13}C -RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 159.4 (C-11), 151.6 (C-17), 150.3 (C-15), 137.2 (C-5), 133.6 (C-9), 131.3 (C-2), 130.0 (C-21), 129.2 (C-13), 128.5 (C-20, C-22), 127.8 (C-19, C-23), 126.9 (C-18), 122.7 (C-6), 121.5 (C-3), 111.4 (C-1), 110.0 (C-4). HPLC-MS $[\text{M} + \text{H}]^+ = 305$, $T_R = 3.27$ (99 %). HRMS (ESI) calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_2\text{Na}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+ 327.0852$, hallado 327.0848.

DIFUSIÓN DE RESULTADOS

El trabajo realizado durante esta tesis doctoral ha dado lugar a los siguientes resultados:

❖ Publicaciones derivadas de la tesis doctoral:

Ginex, T.; **Madruga, E.**; Martínez, A.; Gil, C. MBC and ECBL Libraries: Outstanding Tools for Drug Discovery. *Front. Pharmacol.* **2023**, *14*, 1244317.

Maestro, I.; **Madruga, E.**; Boya, P.; Martínez, A. Identification of a New Structural Family of SGK1 Inhibitors as Potential Neuroprotective Agents. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2023**, *38* (1), 2153841.

Madruga, E.; Maestro, I.; Martínez, A. Mitophagy Modulation, a New Player in the Race against ALS. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (2), 740.

❖ Patentes:

Martínez, A.; Gil, C.; **Madruga, E.**; García-Rubia, A.; Lastres-Becker, I. Compuestos inhibidores de SGK1 y su uso para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y/o cardiovasculares. Nº de solicitud P202430463, **2024**. Fecha de prioridad: 7 de junio de 2024.

❖ Otras publicaciones:

Cuevas, E. P.[#]; **Madruga, E.**[#]; Valenzuela-Martínez, I.; Ramírez, D.; Gil, C.; Nagaraj, S.; Martín-Requero, A.; Martínez, A. MicroRNA Signature of Lymphoblasts from Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients as Potential Clinical Biomarkers. *Neurobiol. Dis.* **2025**, *208*, 106871.

Silva-Llanes, I.; **Madruga, E.**; Martínez, A.; Lastres-Becker, I. RIPK1 Expression and Inhibition in Tauopathies: Implications for Neuroinflammation and Neuroprotection. *Front. Neurosci.* **2024**, *18*, 1530809.

Méndez-Líter, J. A.; Pozo-Rodríguez, A.; **Madruga, E.**; Rubert, M.; Santana, A. G.; de Eugenio, L. I.; Sánchez, C.; Martínez, A.; Prieto, A.; Martínez, M. J. Glycosylation of Epigallocatechin Gallate by Engineered Glycoside Hydrolases from *Talaromyces Amestolkiae*: Potential Antiproliferative and Neuroprotective Effect of These Molecules. *Antioxidants* **2022**, *11* (7), 1325.

Ambos autores contribuyen igual al trabajo.

❖ Comunicaciones orales:

Madruga, E.; García-Rubia, A.; Lastres-Becker, I.; Martínez, A. Potential of SGK1 inhibition in Parkinson's disease treatment. X Young Researchers Symposium of the Spanish Society of Medicinal Chemistry. Sociedad Española de Química Terapéutica. Madrid, España. **2024**.

Madruga, E.; García-Rubia, A.; Lastres-Becker, I.; Martínez, A. From computational design to *in vivo* efficacy: SGK1 inhibition as a therapeutic strategy against Parkinson's disease. 43rd Advanced Course of Medicinal Chemistry and Seminar for PhD students. ESMEC. Urbino, Italia. **2024**.

Madruga, E.; Martínez, A. Machine learning-enhanced virtual screening to find new GSK-3 β inhibitors. VII SEQT Summer School. Sociedad Española de Química Terapéutica. Santiago de Compostela, España. **2023**.

Madruga, E.; Ginex, T.; Lastres-Becker, I.; Martínez, A. Discovery of new SGK1 inhibitors using a ligand and target mixed virtual screening methodology. XII SDDN Meeting. Spanish Drug Discovery Network. Madrid, España. **2021**.

❖ Presentaciones de póster en congresos:

Madruga, E.; García-Rubia, A.; Lastres-Becker, I.; Martínez, A. SGK1 as a promising target for neurodegeneration: sample characterization, virtual screening, molecular dynamics simulations, chemical expansion and *in vitro* evaluation of new inhibitors. XLIV Congreso Anual SOFARCHI. Sociedad de Farmacología de Chile. Antofagasta, Chile. **2023**.

Madruga, E.; Ginex, T.; Lastres-Becker, I.; Martínez, A. Ligand and structure-based virtual screening toward identifying new potent inhibitors against SGK1. 20th National Meeting of the Spanish Society of Medicinal Chemistry. Sociedad Española de Química Terapéutica. Santiago de Compostela. España. **2022**.

Madruga, E.; Ginex, T.; Lastres-Becker, I.; Martínez, A. Ligand and structure-based virtual screening toward identifying new potent inhibitors against SGK1. VII Young Researchers Symposium of the Spanish Society of Medicinal Chemistry. Sociedad Española de Química Terapéutica. Online. **2021**.