



FACULTAD DE FARMACIA

**“DISEÑO, SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN
POLIFARMACOLÓGICA DE AZAHETEROCICLOS
Y CARBOCICLOS HÍBRIDOS DE TIROSINA CON
ACCIÓN ANTIDIABÉTICA”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN FARMACIA

PRESENTA:

M. F. MIGUEL ANGEL HERRERA RUEDA

Co-Directores de tesis:

Dr. Gabriel Navarrete Vázquez

Dr. Hugo Tlahuext Romero



ÍNDICE

ÍNDICE	I
ABREVIATURAS.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE TABLAS.....	VIII
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	IX
RESUMEN	X
ABSTRACT.....	XI
1.- INTRODUCCIÓN	1
2.- ANTECEDENTES.....	2
2.1.- Diabetes y la disfunción de diferentes órganos.....	2
2.2.- Mortalidad producida por la diabetes	2
2.3.- Patología de diabetes.....	3
2.4.- Diabetes y complicaciones cardiovasculares.....	4
2.5.- Patrón farmacofórico de los Glitazares: Agonistas duales PPAR α/γ basados en armazones del aminoácido tirosina.....	6
2.7.- Farmacocinética y farmacodinamia de los glitazares.....	7
2.8.- Toxicidad de los glitazares.....	7
2.6.- Derivados de tirosina como agonistas PPAR γ	7
2.7.- Agonistas PPAR γ e inhibidores de la enzima PTP1-B diseñados y sintetizados en nuestro grupo de investigación.....	8
2.7.- Azaheterociclos y carbociclos como estructuras privilegiadas	17
2.8.- Blancos terapéuticos actuales para el tratamiento de la DM2	17
2.8.1.-PPAR γ	17
2.8.2.- PPAR α	18
2.8.3.- Mecanismo de señalización de PPARs.....	19
2.8.4.- Mecanismo de señalización de la enzima PTP-1B.....	21
2.9.- Reglas de Lipinski y Veber	22
2.9.1.- Reglas de Lipinski.....	22
2.9.2.- Reglas de Veber.....	22
3.0.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	23
4.0.- HIPÓTESIS	24
5.0.- OBJETIVO	24
5.1.- Objetivo general.....	24

5.2.- Objetivos Específicos.....	24
6.- CONSIDERACIONES PARA EL DISEÑO MOLECULAR DE LOS COMPUESTOS.....	25
7.- METODOLOGÍA.....	27
7.1 Metodología parte química.....	28
7.1.1.- Retrosíntesis.....	28
7.1.2.- Síntesis del 2-Clorometilbencimidazol (6).....	29
7.1.3.- Síntesis de terbutilcarbamato de tirosina (11).....	29
7.1.4.- Síntesis de los compuestos finales M1 - M5 análogos de chigitazar, muraglitazar y farglitazar.....	30
7.2 Metodología parte biológica.....	31
7.2.1 Actividad <i>in vitro</i>	31
7.2.1.1 Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad inhibitoria sobre la enzima PTP-1B.....	31
7.2.1.2 Evaluación <i>in vitro</i> del efecto sobre receptores PPAR α , PPAR γ , transportador de glucosa tipo 4 (GLUT-4) y proteína transportadora de ácidos grasos (FATP-1)....	31
7.2.2.- Actividad <i>in vivo</i>	33
7.2.2.1 Inducción de la diabetes (Modelo murino de diabetes mellitus no insulino dependiente).....	33
7.2.2.2.- Evaluación de compuestos sobre modelo murino de diabetes.....	34
7.2.2.3.- Prueba de tolerancia oral a la glucosa (OGTT).....	34
7.3 Parte computacional.....	35
7.3.1 ADMETSar y ACD/Tox Suite.....	35
7.3.2.- Acoplamiento molecular sobre PTP1B, PPAR α y PPAR γ	36
8. RESULTADOS.....	38
8.1 Resultados parte química.....	38
8.1.2.- Caracterización del precursor bencimidazol mediante ^1H RMN.....	38
8.1.3.- Caracterización del precursor bencimidazol mediante espectrometría de masas modalidad FAB $^+$	39
8.1.3.- Caracterización del precursor Boc-tirosina mediante ^1H RMN.....	40
8.1.4.- Caracterización del compuesto final M2 mediante ^1H RMN.....	41
8.1.4.- Caracterización del compuesto final M2 mediante espectrometría de masas modalidad FAB $^+$	42
8.1.5.- Propiedades fisicoquímicas y rendimientos de los compuestos.....	43
8.1.6.- Caracterización ^1H y ^{13}C RMN del compuesto M1	43
8.1.7.- Tabla de caracterización ^1H y ^{13}C RMN del compuesto M2	45
8.1.8.- Tabla de caracterización ^1H y ^{13}C RMN del compuesto M3	46

8.1.9.- Tabla de caracterización ¹ H y ¹³ C RMN del compuesto M4	48
8.1.10.- Tabla de caracterización ¹ H y ¹³ C RMN del compuesto M5	49
8.2 Resultados <i>in silico</i> (a priori).....	50
8.2.1.- Resultados <i>in silico</i> obtenidos del programa computacional admetSAR de los compuestos M1-M5 versus chigitazar, muraglitazar y farglitazar.....	50
8.2.2.- Resultados <i>in silico</i> obtenidos del programa computacional ACD/ToxSuite de los compuestos M1-M5 versus chigitazar, muraglitazar y farglitazar.....	52
8.3 Resultados parte farmacológica.....	54
8.3.1 Resultados de la evaluación <i>in vitro</i> de la actividad inhibitoria sobre la enzima PTP-1B.....	54
8.3.2.- Cálculo de la concentración inhibitoria media sobre la enzima PTP1B.	55
8.3.3.- Expresión relativa de PPAR α , PPAR γ y FATP/ GLUT4.....	56
8.3.4.- Resultados de los compuestos M1 y M3 sobre un modelo murino de diabetes no insulino dependiente.....	59
8.3.5.- Ensayo oral de tolerancia a la glucosa (OGTT)	62
8.4 Resultados parte <i>in silico</i> (a posteriori).....	63
8.4.1.- Resultados del acoplamiento molecular de los compuestos M1 y M3 con PPAR α	63
8.4.2.- Resultados del acoplamiento molecular de los compuestos M1 y M3 con PPAR γ	64
8.4.3.- Resultados del acoplamiento molecular de los compuestos M1 y M3 con la enzima PTP1-B.....	64
9. CONCLUSIONES	66
11.- PARTE EXPERIMENTAL	69
11.1.- Metodología para la síntesis del Ácido-(S)-3-(4-((1H-benzo[d]imidazol-2-il)metoxi)fenil)-2-((tertbutoxicarbonil)amino)propanoico (M1).	70
11.2.- Metodología para la síntesis del Ácido-(S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-(4-(quinolin-2-ilmetoxi)fenil)propanoico (M2).	71
11.3.- Metodología para la síntesis del Ácido-(S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-(4-((2'-ciano-[1,1'bifenil]-4-il)metoxi)fenil) propanoico (M3).	72
11.4.- Metodología para la síntesis del Ácido-(S)3(4-([1,1'-bifenil]-3-ilmetoxi)fenil)-2-(terbutoxicarbonil)amino)propanoico (M4).	73
11.5.- Metodología para la síntesis del Ácido-(S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-(4-(naftalen-1-ilmetoxy)fenil)propanoico (M5).....	74
12. BIBLIOGRAFIA	76
13. ESPECTTROS	87

ABREVIATURAS.

°A - Amstrong.

ADN - Acido Desoxiribonucleico.

CC50 - Concentración citotóxica media.

CDCl₃- Cloroformo deuterado

CE50 - Concentración efectiva media

CI50 - Concentración inhibitoria media

CYP450 Citocromo P450.

DM2 Diabetes Mellitus tipo 2

DL50 Dosis letal media.

DMSO Dimetil sulfoxido.

EAB Espectro de actividad biológica.

EM Espectrometría de masas.

FAB+ Bombardeo de átomos rápido.

FATP-1 – Proteína Transportadora de Ácidos Grasos

GLUT4 – Trasportador de Glucosa tipo 4

IM - Intramuscular

IV - Intravenosa

K₂CO₃ - Carbonato de potasio

Log P Coeficiente de partición.

[M+H] Ion cuasimolecular μ M – Micromolar

nM - Nanomolar

OGTT - Prueba de tolerancia oral a la glucosa

OMS Organización mundial de la salud.

Pf Punto de fusión.

PTP-1B – Proteína Fosfatasa de Tirosina-1B

PCR - Reacción en cadena de la polimerasa

PM Peso molecular.

RMN Resonancia magnética nuclear

Ro5 - Regla de Lipinski

SAR - Relación Estructura-Actividad

SN₂ Sustitución nucleofílica bimolecular.

PPAR α - Receptor Activado por el Proliferador de Peroxisomas alfa

PPAR γ - Receptor Activado por el Proliferador de Peroxisomas gamma

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. COMPLICACIONES DE LA DIABETES MELLITUS. ³	2
FIGURA 2. MAPA MUNDIAL DE MORTALIDAD POR DIABETES MELLITUS EN EL AÑO 2017 Y LA ESTIMACIÓN PARA EL AÑO 2045. ^{4,5}	3
FIGURA 3. SIGNOS Y SÍNTOMAS PRODUCIDOS POR DIABETES MELLITUS. ⁵⁻⁸	4
FIGURA 4. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS AGONISTAS DUALES PPAR α/γ . ¹⁶⁻¹⁸	5
FIGURA 5. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS GLITAZARES; CHIGLITAZAR, MURAGLITAZAR Y FARGLITAZAR.	6
FIGURA 6. PATRÓN FARMACOFÓRICO DE LOS GLITAZARES: AGONISTAS DUALES PPAR α/γ BASADOS EN ARMAZONES DEL AMINOÁCIDO DE TIROSINA	7
FIGURA 7. AGONISTAS PPAR γ BASADOS EN ARMAZONES DE TIROSINA. ^{30,31}	8
FIGURA 8. ESTRUCTURAS QUÍMICAS DE ALGUNOS AZAHETEROCICLOS Y CARBOCICLOS RECONOCIDAS COMO ESTRUCTURAS PRIVILEGIADAS. ²⁷⁻²⁹	17
FIGURA 9. LIGANDOS NATURALES DE PPAR γ	18
FIGURA 10. LIGANDOS SINTÉTICOS DE PPAR γ	18
FIGURA 11. LIGANDOS NATURALES DE PPAR α	19
FIGURA 12. LIGANDOS SINTÉTICOS DE PPAR α	19
FIGURA 13. MECANISMO DE SEÑALIZACIÓN DE PPARS. ^{36,38,39}	20
FIGURA 14. MECANISMO DE SEÑALIZACIÓN DE LA ENZIMA PTP-1B ⁶⁸⁻⁷⁰	21
FIGURA 15. PROGRAMA COMPUTACIONAL PARA CALCULAR PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS.....	22
FIGURA 16. CONSIDERACIONES PARA EL DISEÑO DE COMPUESTOS BASADO EN EL PATRÓN FARMACOFÓRICO DE LOS AGONISTAS DUALES PPAR α/γ CHIGLITAZAR, MURAGLITAZAR Y FARGLITAZAR.	25
FIGURA 17. RETROSÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS DISEÑADOS M1 - M5 , PARA LA OBTENCIÓN DE MATERIAS PRIMAS UTILIZADAS Y LA RUTA DE SÍNTESIS.....	28
FIGURA 18. SÍNTESIS DE 2-CLOROMETILBENCIMIDAZOL A TRAVÉS DE LA REACCIÓN DE PHILLIPS.....	29
FIGURA 19. SÍNTESIS DEL PRECURSOR TERBUTILCARBAMATO DE TIROSINA.	29
FIGURA 20. SÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS FINALES M1 - M5 ANÁLOGOS DE CHIGLITAZAR Y MURAGLITAZAR.	30
FIGURA 21. ESPECTRO DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PROTÓN PARA EL PRECURSOR BENCIMIDAZOL.	38
FIGURA 22. AMPLIACIÓN DEL ESPECTRO DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PROTÓN PARA EL PRECURSOR BENCIMIDAZOL.	38
FIGURA 23. ESPECTRO DE MASAS EN MODALIDAD FAB+ CORRESPONDIENTE AL BENCIMIDAZOL.	39
FIGURA 24. ESPECTRO DE RMN DE PROTÓN DE LA MATERIA PRIMA BOC-TIROSINA.	40
FIGURA 25. ESPECTRO DE RMN DE PROTÓN DEL COMPUESTO FINAL 2 CON QUINOLINA.	41
FIGURA 26. ESPECTRO DE MASAS EN MODALIDAD FAB+ CORRESPONDIENTE AL COMPUESTO FINAL 2-QUINOLINA.	42
FIGURA 27. ACTIVIDAD RESIDUAL DE LA ENZIMA PTP1B.	54
FIGURA 28. PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE PTP-1B OBTENIDA INCUBANDO LA ENZIMA EN PRESENCIA DE LOS COMPUESTOS M1 - M5 A 50 mM. DMSO SE USÓ COMO CONTROL. CADA DATO REPRESENTA LA MEDIA \pm S.E.M. (N = 4).....	55
FIGURA 29. EL VALOR DE CI_{50} PARA LOS COMPUESTOS M1 SE CALCULÓ REPRESENTANDO LOS DATOS RELATIVOS A LA ACTIVIDAD RESIDUAL DE LA PTP-1B FRENTE A LA CONCENTRACIÓN DE LOS COMPUESTOS M1. SE EMPLEARON QUINCE CONCENTRACIONES DE INHIBIDOR. TODOS LOS ENSAYOS SE REALIZARON POR CUADRUPPLICADO. LOS DATOS REPRESENTAN LA MEDIA \pm S.E.M.....	55
FIGURA 30. EL VALOR DE CI_{50} PARA LOS COMPUESTOS M3 SE CALCULÓ REPRESENTANDO LOS DATOS RELATIVOS A LA ACTIVIDAD RESIDUAL DE LA PTP-1B FRENTE A LA CONCENTRACIÓN DE LOS	

COMPUESTOS M3. SE EMPLEARON QUINCE CONCENTRACIONES DE INHIBIDOR. TODOS LOS ENSAYOS SE REALIZARON POR CUADRUPPLICADO. LOS DATOS REPRESENTAN LA MEDIA \pm S.E.M.....	56
FIGURA 31. INFLUENCIA DE LOS COMPUESTOS M1 , M3 Y FENOFIBRATO SOBRE LOS CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN RELATIVA DE ARNm DE PPARA. LOS RESULTADOS SON LA MEDIA \pm S.E.M. (N = 5). * P <0.001 EN COMPARACIÓN CON EL GRUPO DE CONTROL.....	57
FIGURA 32. INFLUENCIA DE LOS COMPUESTOS M1 , M3 Y FENOFIBRATO EN LA EXPRESIÓN RELATIVA DE ARNm DE FATP-1. LOS RESULTADOS SON LA MEDIA \pm S.E.M. (N = 5). * P <0.001 EN COMPARACIÓN CON EL GRUPO DE CONTROL.....	57
FIGURA 33. INFLUENCIA DE LOS COMPUESTOS M1 , M3 Y PIOGLITAZONA SOBRE LOS CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN RELATIVA DE ARNm DE PPAR γ . LOS RESULTADOS SON LA MEDIA \pm S.E.M. (N = 5). * P <0.001 EN COMPARACIÓN CON EL GRUPO DE CONTROL.....	58
FIGURA 34. INFLUENCIA DE LOS COMPUESTOS M1 , M3 Y PIOGLITAZONA EN LA EXPRESIÓN RELATIVA DE ARNm DE GLUT4. LOS RESULTADOS SON LA MEDIA \pm S.E.M. (N = 5). * P <0.001 EN COMPARACIÓN CON EL GRUPO DE CONTROL.....	58
FIGURA 35. INFLUENCIA DE UNA DOSIS INTRAGÁSTRICA DE 100 MG / KG DEL COMPUESTO M1 Y 5 MG/KG DE GLIBENCLAMIDA EN EL MODELO DE RATONES HIPERGLUCÉMICOS STZ / NA (N = 6). *** P <0,05 FRENTE AL GRUPO DEL VEHÍCULO (TWEEN 80, 10% V / V).....	60
FIGURA 36. CARACTERÍSTICAS FISCOQUÍMICAS DE LAS REGLAS DE LIPINSKI Y VEBER	60
FIGURA 37. INFLUENCIA DE UNA DOSIS INTRAGÁSTRICA DE 100 MG / KG DEL COMPUESTO M3 Y 5 MG/KG DE GLIBENCLAMIDA EN EL MODELO DE RATONES HIPERGLUCÉMICOS STZ / NA (N = 6). *** P <0,05 FRENTE AL GRUPO DEL VEHÍCULO (TWEEN 80, 10% V / V).....	61
FIGURA 38. CARACTERÍSTICAS FISCOQUÍMICAS DE LAS REGLAS DE LIPINSKI Y VEBER	61
FIGURA 39. OGTT, Y AUC DE LOS COMPUESTOS M1 Y M3 . * DIFERENCIA ESTÁTICA COMPARADA FRENTE AL GRUPO DE VEHÍCULOS. PRUEBA DE DUNNETT ANOVA POST HOC DE UNA VIA Y DOS VÍAS (N = 6, MEDIA \pm SEM, P <0,05).....	62
FIGURA 40. AUC DE LOS COMPUESTOS M1 Y M3 . * DIFERENCIA ESTÁTICA COMPARADA FRENTE AL GRUPO DE VEHÍCULOS. PRUEBA DE DUNNETT ANOVA POST HOC DE UNA VIA Y DOS VÍAS (N = 6, MEDIA \pm SEM, P <0,05).....	62
FIGURA 41. (A) DIAGRAMA DE UNIÓN TRES DIMENSIONES (3-D) DE LOS COMPUESTOS M1 Y M3 EN EL SITIO DE UNIÓN DE LIGANDOS DE PPARA. LOS MODELOS DE BARRAS REPRESENTAN: COMPUESTO M1 (AZUL), M3 (BLANCO) Y AMINOÁCIDOS COMO LÍNEAS NARANJAS. LA LÍNEAS AMARILLAS SUGIEREN CONTACTOS POLARES. (B) MAPA DE INTERACCIÓN EN DOS DIMENSIONES (2-D) PARA EL COMPUESTO M1 UNIDO A PPARA.....	63
FIGURA 42. (A) DIAGRAMA DE UNIÓN TRES DIMENSIONES (3-D) DE LOS COMPUESTOS M1 Y M3 EN EL SITIO DE UNIÓN DE LIGANDOS DE PPAR γ . LOS MODELOS DE BARRAS REPRESENTAN: COMPUESTO M1 (VERDE), M3 (BLANCO) Y AMINOÁCIDOS COMO LÍNEAS MORADAS. LAS LÍNEAS AMARILLAS SUGIEREN CONTACTOS POLARES. (B) MAPA DE INTERACCIÓN DOS DIMENSIONES (2-D) PARA LOS COMPUESTOS M1 Y M3 EN PPAR γ	64
FIGURA 43. (A) DIAGRAMA DE UNIÓN DE M1 Y M3 EN EL SITIO ACTIVO DE PTP-1B. LOS MODELOS DE BARRAS REPRESENTAN: M1 (VERDE), M3 (BLANCO) Y AMINOÁCIDOS COMO LÍNEAS MAGENTA. LAS LÍNEAS AMARILLAS SUGIEREN CONTACTOS POLARES. (B) MAPA DE INTERACCIÓN 2-D PARA M1 SOBRE PTP.	65

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. TIAZOLIDINDIONAS AGONISTAS PPAR γ E INHIBIDORES DE LA ENZIMA PTP1-B. ³²⁻⁵¹	9
TABLA 2. REGIOISÓMEROS DE TIAZOLIDINDIONAS AGONISTAS PPAR γ E INHIBIDORES DE LA ENZIMA PTP1-B. ³²⁻⁵¹	10
TABLA 3. BARBITÚRICOS AGONISTAS PPAR γ E INHIBIDORES DE LA ENZIMA PTP1-B. ³²⁻⁵¹	11
TABLA 4. ÁCIDO FENILPROPANÓICO AGONISTAS PPAR γ E INHIBIDORES DE LA ENZIMA PTP1-B ³²⁻⁵¹	13
TABLA 5. ÁCIDO 2- FENOXIPROPANÓICO AGONISTAS PPAR γ E INHIBIDORES DE LA ENZIMA PTP1-B. ³²⁻⁵¹	14
TABLA 6. ÁCIDO (4-HIDROXIFENIL)ACÉTICO AGONISTAS PPAR γ E INHIBIDORES DE LA ENZIMA PTP1-B. ³²⁻⁵¹	15
TABLA 7. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS (REGLAS DE LIPINSKI Y VEBER) DE CHIGLITAZAR MURAGLITAZTAR, FARGLITAZAR Y DE LOS COMPUESTOS (M1- M5).	26
TABLA 8. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y RENDIMIENTOS DE LOS COMPUESTOS SINTETIZADOS.	43
TABLA 9. DESPLAZAMIENTOS, INTEGRALES, MULTIPLICIDAD Y LAS CONSTANTES DE ACOPLAMIENTO DE LOS ESPECTROS DE RMN ¹ H Y ¹³ C PARA EL COMPUESTO M1	44
A 10. DESPLAZAMIENTOS, INTEGRALES, MULTIPLICIDAD Y LAS CONSTANTES DE ACOPLAMIENTO DE LOS ESPECTROS DE RMN ¹ H Y ¹³ C PARA EL COMPUESTO M2	45
TABLA 11. DESPLAZAMIENTOS, INTEGRALES, MULTIPLICIDAD Y LAS CONSTANTES DE ACOPLAMIENTO DE LOS ESPECTROS DE RMN 1H Y 13C PARA EL COMPUESTO M3	46
TABLA 12. DESPLAZAMIENTOS, INTEGRALES, MULTIPLICIDAD Y LAS CONSTANTES DE ACOPLAMIENTO DE LOS ESPECTROS DE RMN 1H Y 13C PARA EL COMPUESTO M4	48
TABLA 13. DESPLAZAMIENTOS, INTEGRALES, MULTIPLICIDAD Y LAS CONSTANTES DE ACOPLAMIENTO DE LOS ESPECTROS DE RMN 1H Y 13C PARA EL COMPUESTO M5	49
TABLA 14. RESULTADOS IN SILICO DEL PROGRAMA COMPUTACIONAL ADMETSAR DE LOS COMPUESTOS M1- M5 VERSUS CHIGLITAZAR, MURAGLITAZARY FARGLITAZAR.	51
TABLA 15. RESULTADOS IN SILICO DEL PROGRAMA COMPUTACIONAL ACD/TOXSUITE DE LOS COMPUESTOS M1-M5 VERSUS CHIGLITAZAR, MURAGLITAZARY FARGLITAZAR.	53
TABLA 16. SISTEMAS DE ELUCIDACIÓN UTILIZADOS PARA EL MONITOREO DE LOS PRECURSORES Y PRODUCTOS FINALES (M1 – M5).	69

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

ILUSTRACIÓN 1. RESULTADOS DE ANÁLISIS ELEMENTAL DEL COMPUESTO M1	87
ILUSTRACIÓN 2. ESPECTRO DE RMN ¹ H 400 MHZ DEL COMPUESTO M1	87
ILUSTRACIÓN 3. ESPECTRO DE RMN ¹ H 400 MHZ DEL COMPUESTO M1	88
ILUSTRACIÓN 4. ESPECTRO DE RMN ¹³ C 100 MHZ DEL COMPUESTO M1	88
ILUSTRACIÓN 5. RESULTADOS DE ANÁLISIS ELEMENTAL DEL COMPUESTO M2	89
ILUSTRACIÓN 6. ESPECTRO DE RMN ¹ H 400 MHZ DEL COMPUESTO M2	89
ILUSTRACIÓN 7. ESPECTRO DE RMN ¹ H 400 MHZ DEL COMPUESTO M2	90
ILUSTRACIÓN 8. ESPECTRO DE RMN ¹³ C 100 MHZ DEL COMPUESTO M2	90
ILUSTRACIÓN 9. ESPECTRO DE EM-FAB+ DEL COMPUESTO M3	90
ILUSTRACIÓN 10. ESPECTRO DE RMN ¹ H 400 MHZ DEL COMPUESTO M3	90
ILUSTRACIÓN 11. ESPECTRO DE RMN ¹ H 400 MHZ DEL COMPUESTO M3	90
ILUSTRACIÓN 12. ESPECTRO DE RMN ¹³ C 100 MHZ DEL COMPUESTO M3	90
ILUSTRACIÓN 13. RESULTADOS DE ANÁLISIS ELEMENTAL DEL COMPUESTO M4	90
ILUSTRACIÓN 14. ESPECTRO DE RMN ¹ H 400 MHZ DEL COMPUESTO M4	90
ILUSTRACIÓN 15. ESPECTRO DE RMN ¹ H 400 MHZ DEL COMPUESTO M4	90
ILUSTRACIÓN 16. ESPECTRO DE RMN ¹ H 400 MHZ DEL COMPUESTO M4	90
ILUSTRACIÓN 17. ESPECTRO DE RMN ¹³ C 100 MHZ DEL COMPUESTO M4	90
ILUSTRACIÓN 18. RESULTADOS DE ANÁLISIS ELEMENTAL DEL COMPUESTO M5	90
ILUSTRACIÓN 19. ESPECTRO DE RMN ¹ H 400 MHZ DEL COMPUESTO M5	90
ILUSTRACIÓN 20. ESPECTRO DE RMN ¹ H 400 MHZ DEL COMPUESTO M5	90
ILUSTRACIÓN 21. ESPECTRO DE RMN ¹ H 400 MHZ DEL COMPUESTO M5	90
ILUSTRACIÓN 22. ESPECTRO DE RMN ¹³ C 100 MHZ DEL COMPUESTO M5	90

RESUMEN

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es una enfermedad metabólica caracterizada por hiperglucemia crónica y transcurre con enfermedades concomitantes tales como las cardiovasculares, ceguera, nefrotoxicidad, entre otras. En este proyecto se abordaron dianas farmacológicas que convergen tanto en la diabetes como en enfermedades ateroscleróticas y retinopatía. El receptor PPAR γ y la enzima PTP-1B participan mejorando la sensibilidad a la insulina disminuyendo los niveles de glucosa en sangre, mientras que el receptor PPAR α favorece la reducción de los niveles de triglicéridos en plasma y el metabolismo de ácidos grasos, disminuyendo las complicaciones cardiovasculares. Se ha descrito una amplia variedad de compuestos de tipo ácido carboxílico como ligandos de estas dianas. Con base en lo anterior, se diseñaron 5 moléculas (**M1 – M5**) basadas en el armazón de tirosina e hibridadas con diferentes azaheterociclos y carbociclos consideradas como estructuras privilegiadas, que puedan actuar sobre PTP-1B, PPAR α y PPAR γ de manera simultánea, a lo cual se le conoce como polifarmacología. La actividad inhibitoria de los 5 compuestos sobre la enzima PTP-1B fue realizada en ensayos *in vitro*. Los compuestos **M1** y **M3** mostraron una concentración inhibitoria media (CI50) de 44 \pm 3.0 μ M respectivamente. De estos dos candidatos, solo el compuesto **M1** mostró actividad dual al aumentar alrededor de 8 y 10 veces los niveles de expresión de RNAm de PPAR α y su proteína de expresión FATP1 más que el adipocito sin tratamiento (línea celular 3T3-L1) respectivamente y alrededor de 8 y 2.5 veces los niveles de expresión de RNAm de PPAR γ y su proteína de expresión GLUT4 más que el adipocito sin tratamiento (línea celular 3T3-L1) respectivamente, mostrando una mejor activación que los fármacos de referencia (pioglitazona y fenofibrato) respectivamente. Así mismo, el compuesto **M1** administrado por vía oral (100mg/kg), en un modelo murino de diabetes no insulino dependiente logró disminuir hasta un 50% los niveles de glucosa en plasma a partir de la primera hora manteniendo este efecto sostenido durante las 7 horas que duró el experimento, presentando un efecto antihiperglucémico más que un efecto hipoglucémico en un ensayo oral de tolerancia a la glucosa. Se realizaron estudios *in silico* de acoplamiento molecular (Docking) de los compuestos más activos (**M1** y **M3**) con estructuras cristalizadas de humano de las diferentes dianas terapéuticas (enzima PTP1-B y los receptores PPAR α y PPAR γ) obtenidas de Protein Data Bank (PDB) (PDB code: 4Y14, 1K74 y 1K7L, respectivamente) presentando ambos compuestos (**M1** y **M3**) buenas interacciones de tipo puente de hidrógeno con los mismo aminoácidos que presentan los ligandos cocrystalizados.

ABSTRACT

Diabetes mellitus type 2 (DM2) is a metabolic disease characterized by chronic hyperglycemia and occurs with concomitant diseases such as cardiovascular, blindness, nephrotoxicity, among others. This project addressed pharmacological targets that converge in both diabetes and atherosclerotic diseases and retinopathy. The PPAR γ receptor and the PTP-1B enzyme participate in improving insulin sensitivity by decreasing blood glucose levels, while the PPAR α receptor improvement the reduction of plasma triglyceride levels and fatty acid metabolism, decreasing complications cardiovascular. A wide variety of carboxylic acid type compounds have been described as ligands for these targets. Based on the above, 5 molecules (**M1** - **M5**) based on the tyrosine framework and hybridized with different azaheterocycles and carbocycles considered as privileged structures were designed, which can act on PTP-1B, PPAR α and PPAR γ simultaneously, which is known as polypharmacology. The inhibitory activity of the 5 compounds on the PTP-1B enzyme was carried out in *in vitro* tests. Compounds **M1** and **M3** showed an average inhibitory concentration (IC₅₀) of 44 +/- 3.0 μ M respectively. Of these two candidates, only the compound M1 showed dual activity by increasing (about 8 and 10 times) the levels of mRNA expression of PPAR α and its expression protein FATP1 more than the adipocyte without treatment (cell line 3T3-L1) respectively and (about 8 and 2.5 times) the expression levels of PPAR γ mRNA and its GLUT4 expression protein more than the untreated adipocyte (cell line 3T3-L1) respectively. Showing a better activation than the reference drugs (pioglitazone and fenofibrate) respectively. Also, compound M1 administered orally (100 mg / kg), in a non-insulin dependent diabetes mellitus murine model, decreased plasma glucose levels by 50% from the first hour, maintaining this effect sustained during the 7 hours of the experiment, presenting an antihyperglycemic effect more than a hypoglycemic effect in an oral glucose tolerance test (OGTT). Docking assays were performed in order to gain insight the possible binding mode of the most active compounds (**M1** and **M3**) with the enzyme PTP1-B and the receptors PPAR α and PPAR γ , these compounds were docked with a crystallographic structure of human (PDB code: 4Y14, 1K74 and 1K7L, respectively) obtained from the Protein Data Bank (PDB), presenting both compounds (**M1** and **M3**) hydrogen bridge-type interactions with the same amino acids as the co-crystallized ligands.

1.- INTRODUCCIÓN

La *Diabetes mellitus* es una enfermedad crónico degenerativa que se caracteriza por una elevación de los niveles de glucosa en sangre (**hiperglucemia**) y se asocia a largo plazo con el daño, disfunción e insuficiencia de diferentes órganos especialmente los ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos, y posteriormente pueden desarrollar enfermedades cardiovasculares, ceguera, falla renal y amputaciones de los miembros inferiores. Según reportes de la Federación Internacional de la Diabetes, en el año 2017, 415 millones de personas padecían de diabetes mellitus a nivel mundial (México ocupaba el sexto lugar con 11.5 millones de personas con diabetes) y se estima que para el año 2045, 642 millones de personas padecerán de esta enfermedad. Además, las personas que padecen de diabetes, con frecuencia presentan concentraciones elevadas de triglicéridos en plasma, conduciendo al desarrollo de enfermedad aterosclerótica vascular, por lo que dichas personas, tienen la necesidad de administrarse diferentes medicamentos (polifarmacia) de manera crónica para tratar cada una de estas patologías provocando toxicidad por interacciones medicamentosas. En la actualidad existen fármacos multitarget que modulan distintas funciones fisiológicas al actuar sobre diferentes blancos terapéuticos de manera simultánea; un ejemplo de estos son los glitazares, que son agonistas duales de los Receptores activados por el proliferador de peroxisomas alfa y gamma (**PPAR α / γ**), los cuales, al ser activados aumentando los niveles de sus proteínas de expresión FATP1 y GLUT4, aumentando de manera simultánea la sensibilidad a la insulina y previniendo complicaciones cardiovasculares (disminuyendo los niveles de glucosa y triglicéridos en plasma) respectivamente. Así mismo, se ha reportado la actividad dual de compuestos que activan a los PPAR γ y al mismo tiempo inhiben de la actividad enzimática la proteína fosfatasa de tirosina (PTP-1B) mejorando la sensibilidad del receptor a la insulina y disminuyendo los niveles de glucosa en plasma. Con base en lo anterior, en este proyecto se plantea una serie de compuestos tomando como armazón estructural el núcleo de tirosina e hibridizándolo con diferentes azaheterociclos y carbociclos con la finalidad de generar agentes multitarget que actúen sobre distintos blancos terapéuticos: PTP-1B, PPAR α y PPAR γ .

2.- ANTECEDENTES

2.1.- Diabetes y la disfunción de diferentes órganos.

La *Diabetes mellitus* es una enfermedad crónico degenerativa que se caracteriza por una elevación de los niveles de glucosa en sangre (**hiperglucemia**)¹ y se asocia a largo plazo con el daño, disfunción e insuficiencia de diferentes órganos especialmente los ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos.² y posteriormente pueden desarrollar enfermedades cardiovasculares, ceguera, falla renal y amputaciones de los miembros inferiores. **(Figura 1)**³

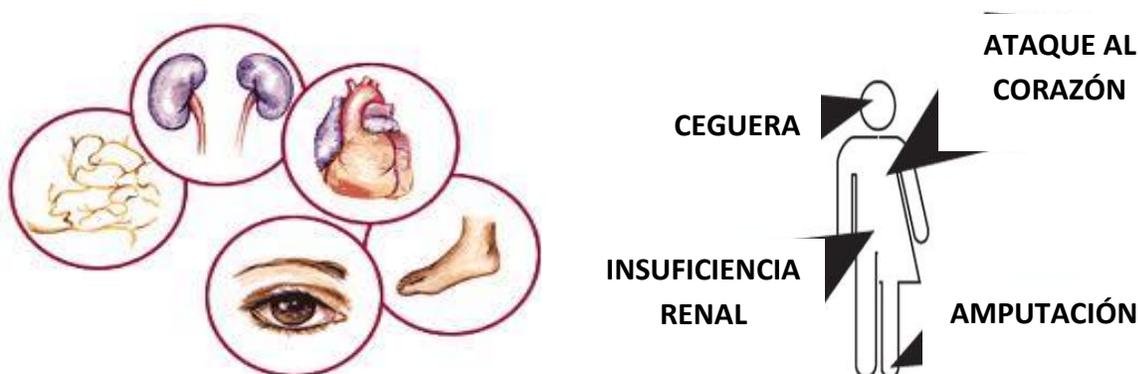


Figura 1. Complicaciones de la diabetes mellitus.³

2.2.- Mortalidad producida por la diabetes

Según reportes de la Federación Internacional de la Diabetes, en el año 2017, 415 millones de personas padecían de diabetes mellitus a nivel mundial y se estima que para el año 2045, 642 millones de personas padecerán de esta enfermedad **(Figura 2)**. Además, en el año 2017 México se encontraba dentro de los 10 países con más personas diabéticas, ocupando el quinto lugar con 11.5 millones de personas con esta enfermedad y se estima que México ocupe el cuarto lugar con 20.6 millones de personas con diabetes en el año 2045.^{4,5}

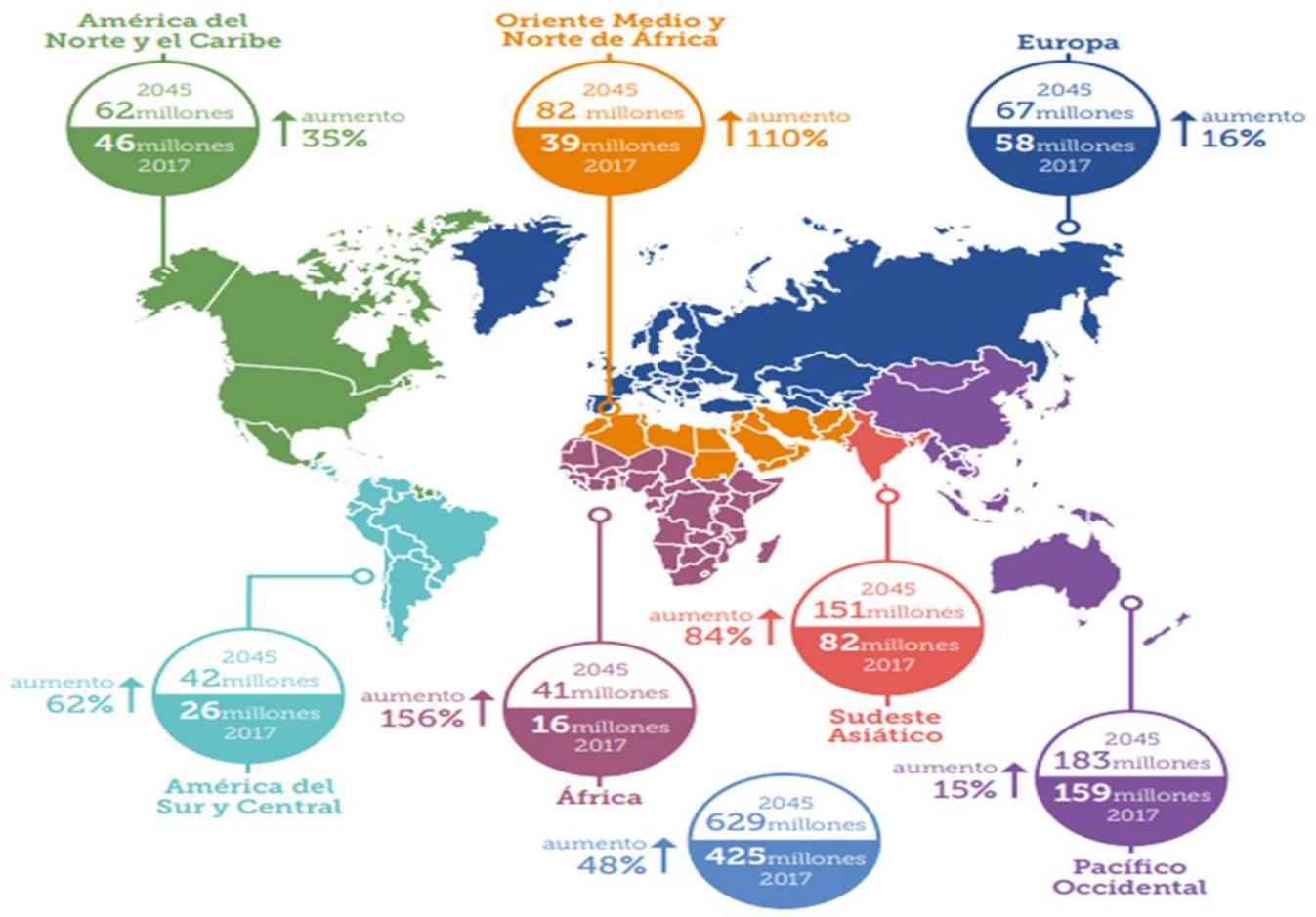


Figura 2. Mapa mundial de mortalidad por diabetes mellitus en el año 2017 y la estimación para el año 2045.^{4,5}

2.3.- Patología de diabetes.

En personas diabéticas la hiperglucemia puede ser producida por dos diferentes mecanismos: 1) por la deficiencia de las células- β pancreáticas para producir y secretar la hormona insulina, esta patología es conocida como **diabetes tipo 1**,⁶ o 2) por la deficiencia de la activación de alguna de las enzimas involucradas en la cascada de activación cuando la insulina se une a su receptor, lo que se conoce como **diabetes tipo 2**⁷ (Enfermedad a tratar en este proyecto). Tanto en la diabetes tipo 1 como en la diabetes tipo 2 se impide la entrada de glucosa hacia el interior de la célula, así como su posterior metabolismo y por ende la producción de energía, lo que genera en la persona diabética **síntomas (Figura 3)** de falta de energía y un aumento del hambre (Polifagia),⁸ además esta inhibición de la producción de energía proveniente de la glucosa externa, conlleva a la obtención de energía a partir de otras vías alternas como la *glucogenólisis* o

gluconeogénesis,⁹ lo que genera en la persona diabética pérdida de peso corporal. Por otra parte, esta inhibición de la entrada de glucosa hacia el interior de la célula aumenta la osmolaridad de líquido extracelular lo que genera una sed excesiva (polidipsia) en la persona diabética y su concomitante necesidad de orinar con frecuencia (poliuria).⁸



Figura 3. Signos y síntomas producidos por diabetes mellitus.⁵⁻⁸

2.4.- Diabetes y complicaciones cardiovasculares.

Se sabe que las personas que padecen de diabetes, con frecuencia presentan concentraciones elevadas de triglicéridos en plasma,^{10,11} los cuales, conducen al desarrollo de enfermedad aterosclerótica vascular, aumentando la mortalidad a nivel mundial.¹²⁻¹⁴ por lo que las personas que padecen de esta enfermedad tienen la necesidad de administrarse diferentes medicamentos de manera crónica para tratar cada una de estas patologías lo que se conoce como polifarmacia¹⁵ y que posteriormente producen toxicidad por interacciones medicamentosas.^{16,17} La tendencia actual en el desarrollo de nuevos fármacos es la actividad polifarmacológica (*multitarget*) es decir; fármacos que son reconocidos por diferentes dianas terapéuticas para modular distintas funciones fisiológicas presentes en una sola molécula.¹⁸ Existen compuestos agonistas duales **PPAR α / γ** basados en armazones del aminoácido tirosina llamados glitazares, los cuales al

interaccionar los receptores activados por el proliferador de peroxisomas gama (**PPAR γ**) en musculo y tejido adiposo producen insulinosensibilización al incrementar la activación del transportador de glucosa tipo 4 (**GLUT4**),^{19–22} favoreciendo la captación y utilización de glucosa teniendo mejores efectos en la homeostasis de ésta en personas diabéticas.²⁰ y al mismo tiempo previenen complicaciones cardiovasculares al unirse con los receptores activados por el proliferador de peroxisomas alfa (**PPAR α**) reduciendo los niveles de triglicéridos en plasma al incrementar la activación de la proteína transportadora de ácidos grasos tipo 1 (**FATP-1**)^{23,21} (**Figura 4**). Por otra parte, se ha reportado la actividad dual de compuestos que son agonistas de los PPAR γ y al mismo tiempo inhibidores de la actividad catalítica de la proteína fosfatasa de tirosina (PTP-1B)²² La PTP-1B ha mostrado una importante influencia en la señalización de la insulina,²⁴ varios estudios han revelado que la inhibición de los aminoácidos (Asp181, Arg221 and Cys215) presentes en el sitio catalítico de dicha enzima están relacionados con la desfosforilación de los residuos de tirosina presentes en el receptor de insulina^{25–27} mejorando la sensibilidad a la insulina y estimulando la captación de glucosa.²⁸

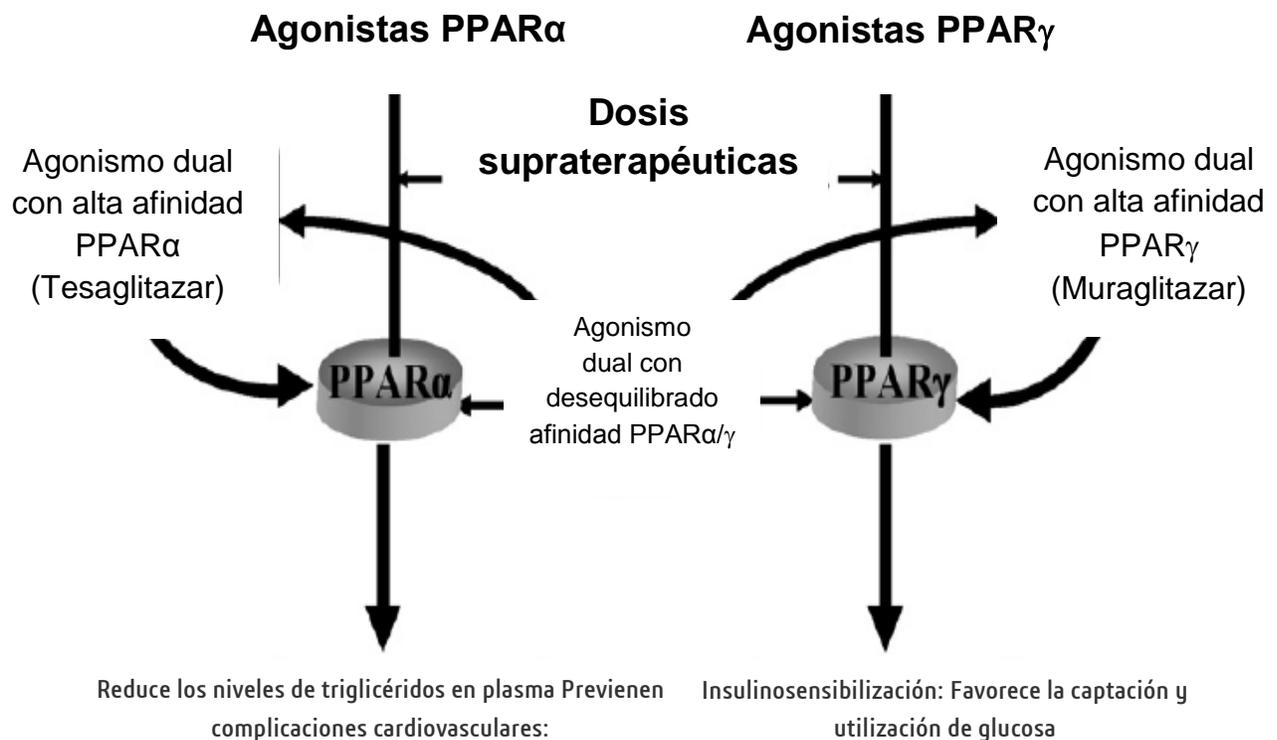


Figura 4. Mecanismo de acción de los agonistas duales PPAR α/γ .¹⁶⁻¹⁸

2.5.- Patrón farmacofórico de los Glitazares: Agonistas duales PPAR α/γ basados en armazones del aminoácido tirosina.

Los **Glitazares** como chiglitazar, muraglitazar y farglitazar (**Figura 5**) son agonistas duales de los receptores PPAR α/γ ^{21,29} basados en armazones del aminoácido tirosina y podrían ser inhibidores de la proteína fosfatasa de tirosina (PTP-1B) por presentar dicho aminoácido como estructura base, los cuales cuentan con un patrón farmacofórico conformado por una región acida (A) unida a un anillo aromático (B), un fragmento hidrofóbico de tipo **azaheterociclo** o **carbociclo** (D) unido mediante un espaciador flexible (C) y una amina voluminosa (E) ²² (**Figura 6**).

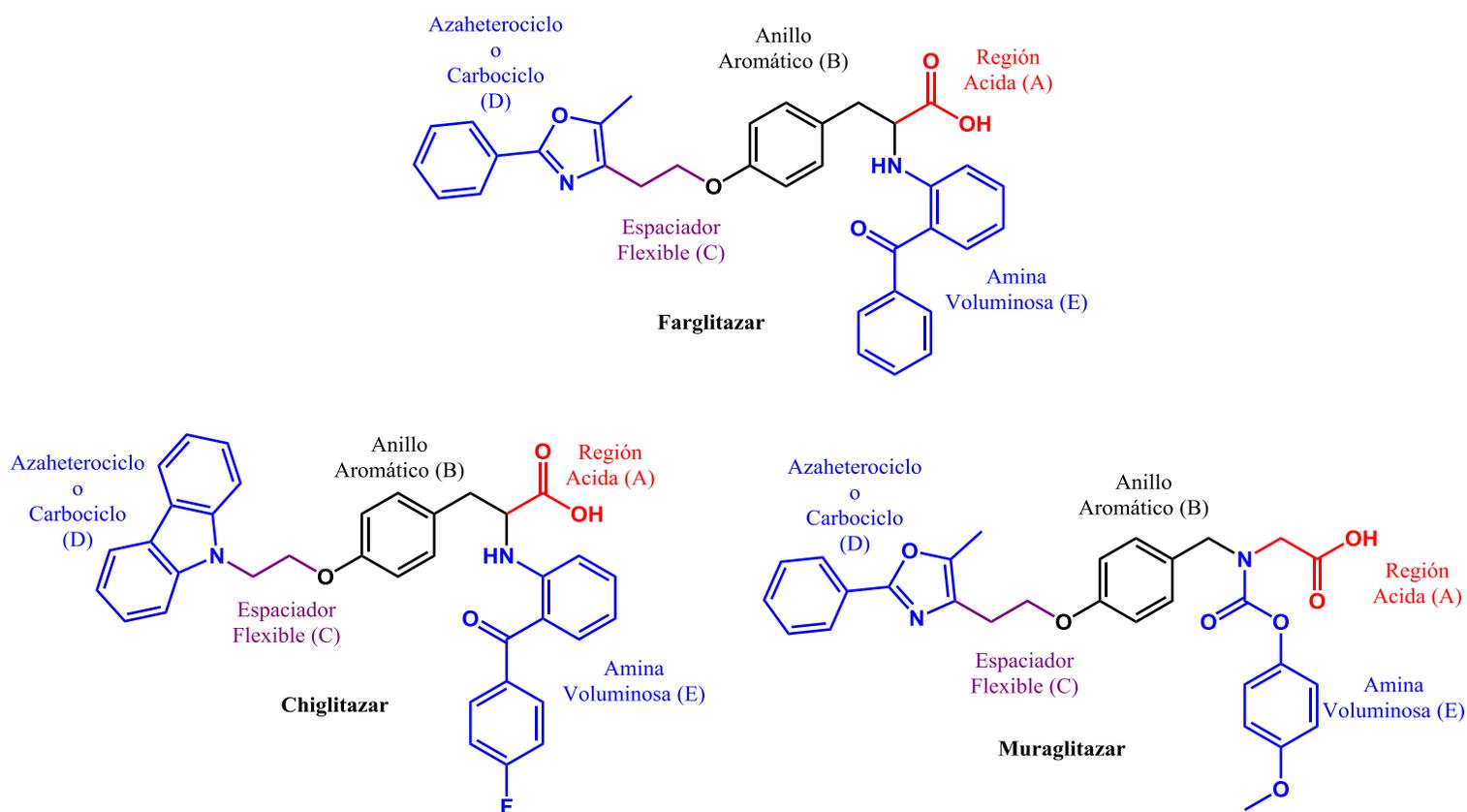


Figura 5. Estructura química de los glitazares; chiglitazar, muraglitazar y farglitazar.



Figura 6. Patrón farmacofórico de los Glitazares: Agonistas duales PPAR α/γ basados en armazones del aminoácido de tirosina

2.7.- Farmacocinética y farmacodinamia de los glitazares.

Los glitazares tales como chiglitazar, muraglitazar y farglitazar incrementan la sensibilidad a la insulina y simultáneamente previenen complicaciones cardiovasculares^{21,30,31} Además inhiben la gluconeogénesis, disminuyen los niveles de triglicéridos (TG) ácidos grasos no esterificados (AGNe), lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) y colesterol total (TCHO) en plasma, promueven la diferenciación de adipocitos y disminuyen su diámetro mejorando la sensibilidad a la insulina. Además; aumenta los niveles de Carnitina palmitoil transferasa 1 (CPT1) mostrando tener mejores efectos sobre la homeostasis de lípidos en pacientes diabéticos.^{23,32} Por otra parte, tienen una biodisponibilidad por vía oral de 79% y un tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de 12 a 16 horas lo que nos indica que puede ser administrado una sola vez al día.²⁴

2.8.- Toxicidad de los glitazares.

En la actualidad solamente saroglitazar es el único de los glitazares que se encuentra comercializado exclusivamente en la India por la empresa farmacéutica *Zydus cadila* bajo el nombre de "*Lipaglyn*" recibiendo su aprobación en Junio del 2013; Mientras los demás tipos de glitazares fueron descontinuados en ensayos clínicos debido a la toxicidad que presentaron.³³

2.6.- Derivados de tirosina como agonistas PPAR γ

En la **figura 7** se muestran solo algunos de los compuestos sintetizados por diversos grupos de investigación que utilizan un armazón del aminoácido tirosina

como estructura base de los cuales, se ha reportado su actividad como agonistas PPAR γ realizada en estudios *in vitro*.^{34,35}

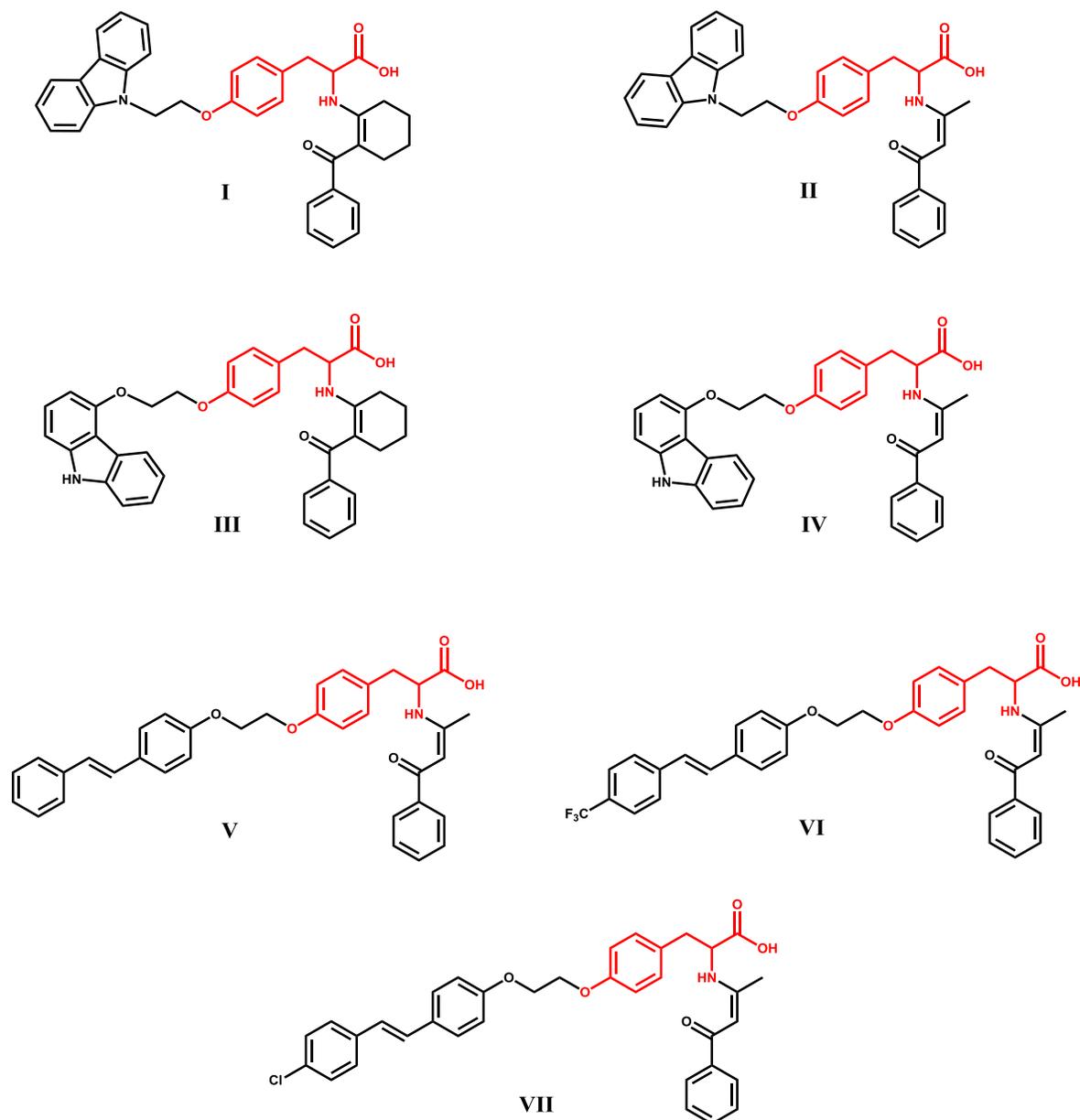


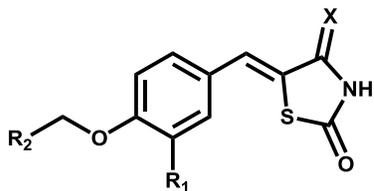
Figura 7. Agonistas PPAR γ basados en armazones de tirosina.^{30,31}

2.7.- Agonistas PPAR γ e inhibidores de la enzima PTP1-B diseñados y sintetizados en nuestro grupo de investigación.

En la **tablas 1 - 6** se muestran algunos de los compuestos que se han diseñado y sintetizado en nuestro grupo de investigación, los cuales han presentado actividad como agonistas PPAR γ e inhibidores de la enzima PTP1-B respectivamente. De la misma manera se muestran algunas de las estructuras

privilegiadas que hemos venido estudiando para la realización de un análisis estructura-química actividad-antidiabética.³⁶⁻⁵⁵

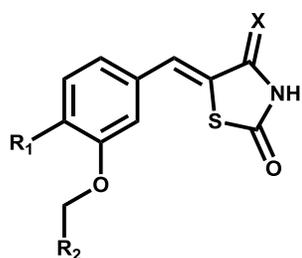
Tabla 1. Tiazolidindionas agonistas PPAR γ e inhibidores de la enzima PTP1-B.³²⁻⁵¹



Compuesto	R1	R2	X	Compuesto	R1	R2	X
1	H		O	14	OMe		S
2	H		O	15	OMe		S
3	H		O	16	OMe		S
4	H		O	17	OMe		S
5	H		O	18	OMe		S
6	H		O	19	OMe		S
7	H		O	20	OMe		S
8	H		O	21	OMe		S
9	H		O	22	OMe		

10	H		O	23	OMe		S
11	H		O	24	OMe		S
12	H		O	25	OMe		S
13	H		O	26	OMe		S

Tabla 2. Regioisómeros de tiazolidindionas agonistas PPAR γ e inhibidores de la enzima PTP1-B.
32-51



Compuesto	R1	R2	X	Compuesto	R1	R2	X
1	H		O	14	OMe		S
2	H		O	15	OMe		S
3	H		O	16	OMe		S
4	H		O	17	OMe		S

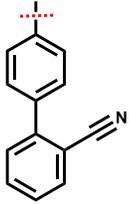
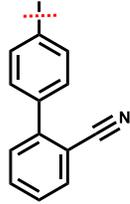
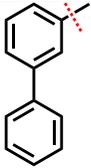
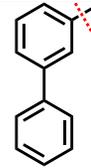
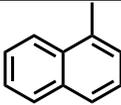
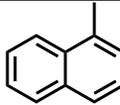
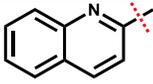
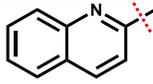
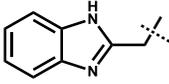
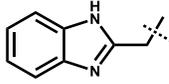
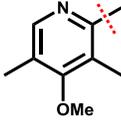
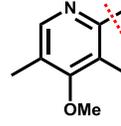
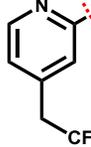
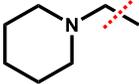
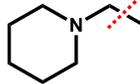
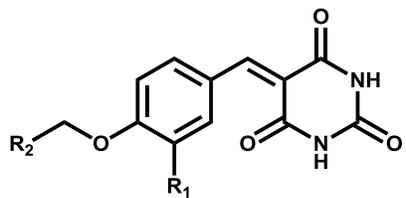
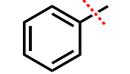
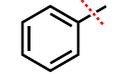
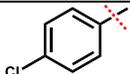
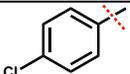
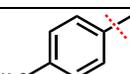
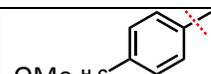
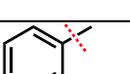
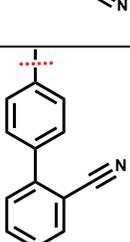
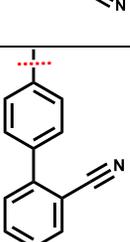
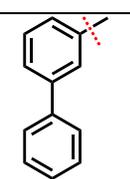
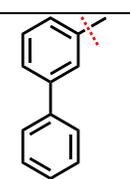
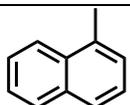
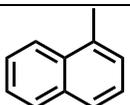
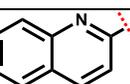
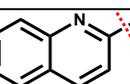
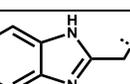
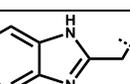
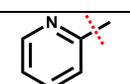
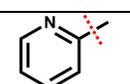
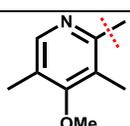
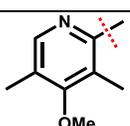
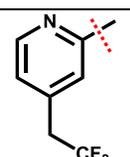
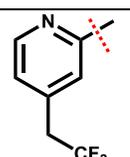
5	H		O	18	OMe		S
6	H		O	19	OMe		S
7	H		O	20	OMe		S
8	H		O	21	OMe		S
9	H		O	22	OMe		
10	H		O	23	OMe		S
11	H		O	24	OMe		S
12	H		O	25	OMe		S
13	H		O	26	OMe		S

Tabla 3. Barbitúricos agonistas PPAR γ e inhibidores de la enzima PTP1-B. ³²⁻⁵¹

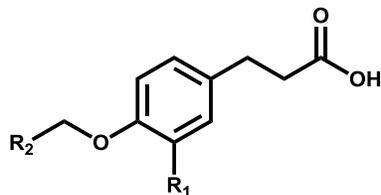


Compuesto	R1	R2	Compuesto	R1	R2

1	H		14	OMe	
2	H		15	OMe	
3	H		16	OMe	
4	H		17	OMe	
5	H		18	OMe	
6	H		29	OMe	
7	H		20	OMe	
8	H		21	OMe	
9	H		22	OMe	
10	H		23	OMe	
11	H		24	OMe	
12	H		25	OMe	

13	H		26	OMe	
----	---	--	----	-----	--

Tabla 4. Ácido fenilpropanoico agonistas PPAR γ e inhibidores de la enzima PTP1-B³²⁻⁵¹



Compuesto	R1	R2	Compuesto	R1	R2
1	H		14	OMe	
2	H		15	OMe	
3	H		16	OMe	
4	H		17	OMe	
5	H		18	OMe	
6	H		29	OMe	
7	H		20	OMe	
8	H		21	OMe	

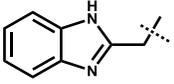
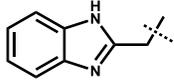
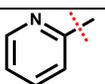
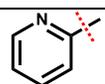
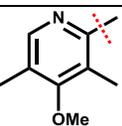
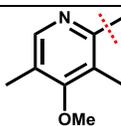
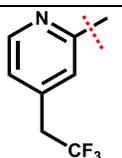
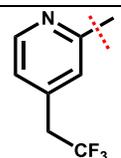
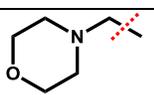
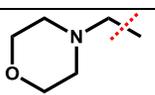
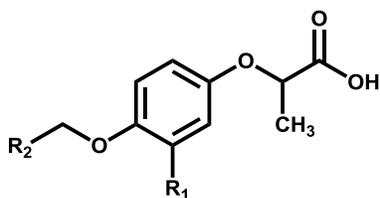
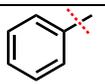
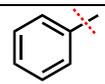
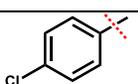
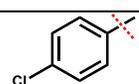
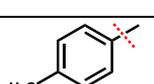
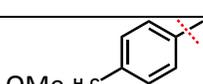
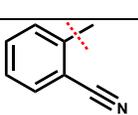
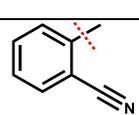
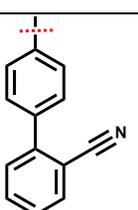
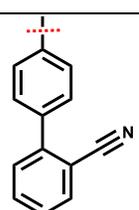
9	H		22	OMe	
10	H		23	OMe	
11	H		24	OMe	
12	H		25	OMe	
13	H		26	OMe	

Tabla 5. Ácido 2- fenoxipropanóico agonistas PPAR γ e inhibidores de la enzima PTP1-B.³²⁻⁵¹



Compuesto	R1	R2	Compuesto	R1	R2
1	H		14	OMe	
2	H		15	OMe	
3	H		16	OMe	
4	H		17	OMe	
5	H		18	OMe	

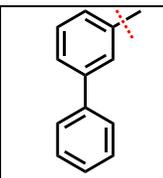
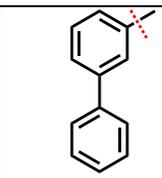
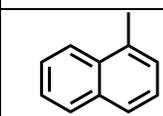
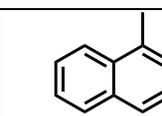
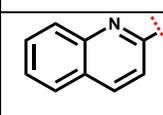
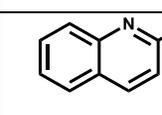
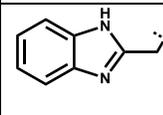
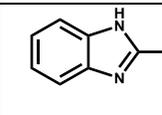
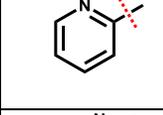
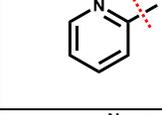
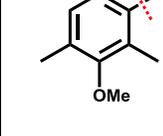
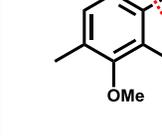
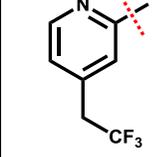
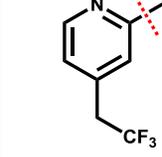
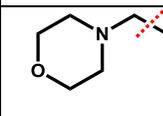
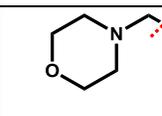
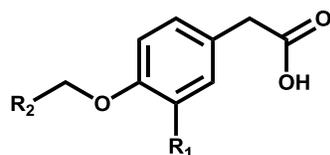
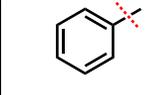
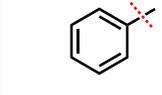
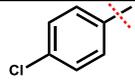
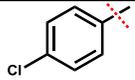
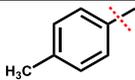
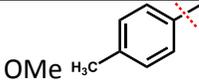
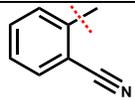
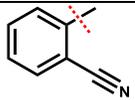
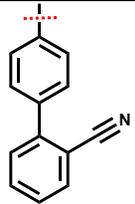
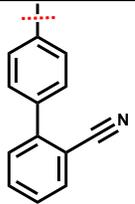
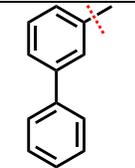
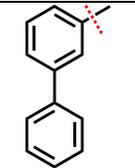
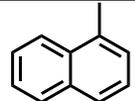
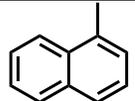
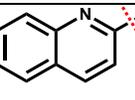
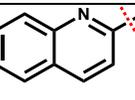
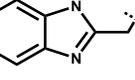
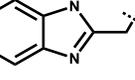
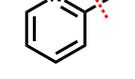
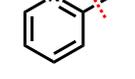
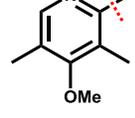
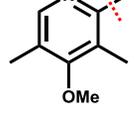
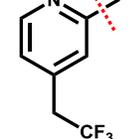
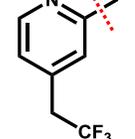
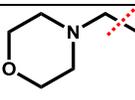
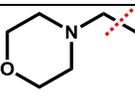
6	H		29	OMe	
7	H		20	OMe	
8	H		21	OMe	
9	H		22	OMe	
10	H		23	OMe	
11	H		24	OMe	
12	H		25	OMe	
13	H		26	OMe	

Tabla 6. Ácido (4-Hidroxifenil)acético agonistas PPAR γ e inhibidores de la enzima PTP1-B. ³²⁻⁵¹



Compuesto	R1	R2	Compuesto	R1	R2
1	H		14	OMe	

2	H		15	OMe	
3	H		16	OMe	
4	H		17	OMe	
5	H		18	OMe	
6	H		29	OMe	
7	H		20	OMe	
8	H		21	OMe	
9	H		22	OMe	
10	H		23	OMe	
11	H		24	OMe	
12	H		25	OMe	
13	H		26	OMe	

En todos los casos se observa la presencia de carbociclos y azaheterociclos dentro de los cuales destacan: bifenilcarbonitrilo, bifenilo, naftilo, quinolina y bencimidazol como los compuestos más activos de cada serie.

2.7.- Azaheterociclos y carbociclos como estructuras privilegiadas.

Las estructuras privilegiadas (**Figura 8**) son típicas estructuras químicas constituidas principalmente por **azaheterociclos** (compuestos con uno o más átomos de nitrógeno que conforman una estructura cíclica) o **carbociclos** (compuestos de carbono cíclicos) que forman parte del fármaco y que han sido reconocidas por su capacidad de generar ligandos de alta afinidad para diferentes dianas terapéuticas y optimizar propiedades farmacológicas.⁵⁶⁻⁵⁸

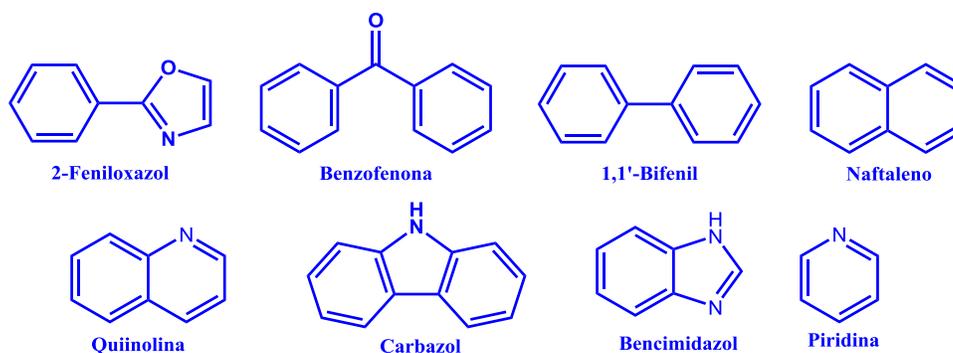


Figura 8. Estructuras químicas de algunos azaheterociclos y carbociclos reconocidas como estructuras privilegiadas.²⁷⁻²⁹

2.8.- Blancos terapéuticos actuales para el tratamiento de la DM2

2.8.1.-PPAR γ

Los receptores activados por el proliferador de peroxisomas gamma (PPAR γ) se encuentran presentes principalmente en tejido adiposo, músculo esquelético, músculo cardíaco, riñón, células β pancreáticas, músculo liso vascular y macrófagos.⁵⁹ Su activación mediante ligandos naturales como ácido linolénico, ácido eicosapentaenoico y prostaglandina J_2 ⁶⁰ (**Figura 9**) o sintéticos como pioglitazona, rosiglitazona, troglitazona, etc. (**Figura 10**)⁶¹ promueven principalmente la activación de GLUT4 e incrementan la sensibilidad a la insulina mejorando la homeostasis de glucosa en pacientes diabéticos.

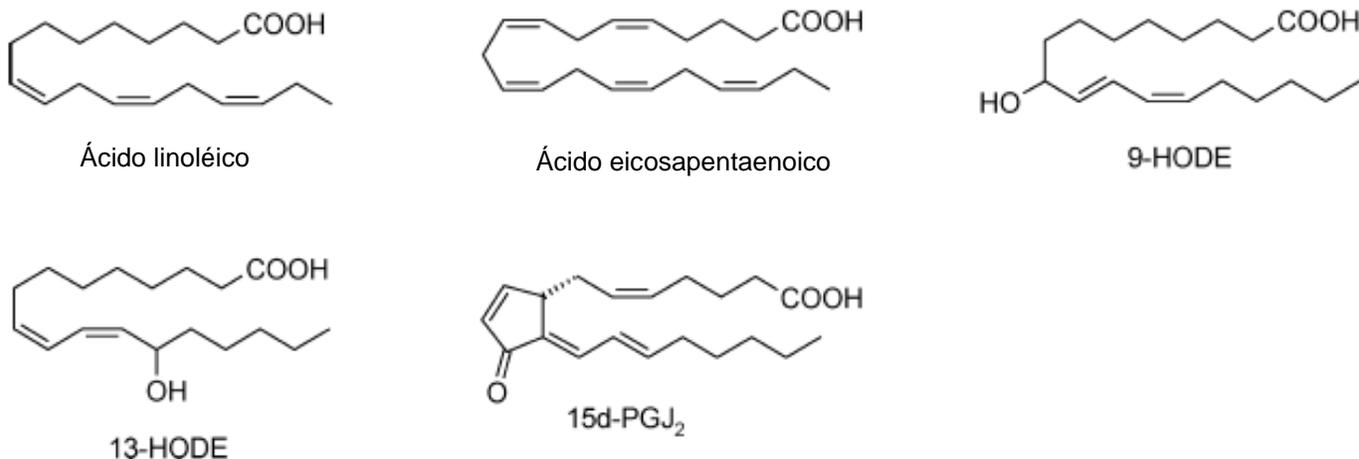


Figura 9. Ligandos naturales de PPAR γ

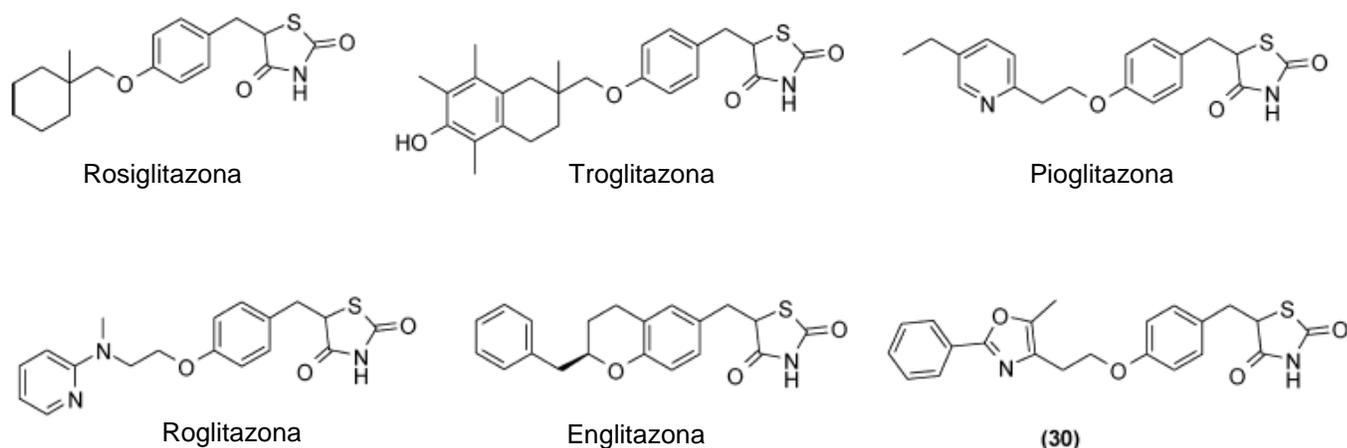


Figura 10. Ligandos sintéticos de PPAR γ .

2.8.2.- PPAR α .

Los receptores activados por el proliferador de peroxisomas alfa (PPAR α) se expresan de forma predominante en hígado, músculo esquelético, endotelio liso, corazón, riñón y tejido adiposo.⁶² La activación de este receptor mediante ligandos naturales como ácido palmítico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido araquidónico⁶⁰ (Figura 11) o sintéticos (Figura 12),⁶³ reducen los niveles de triglicéridos en plasma promoviendo la activación de ciertas proteínas involucradas en la captación y utilización de ácidos grasos como acetil-CoA sintetasa, carnitina palmitoil transferasa (CTP) I y II y FATP-1 previendo complicaciones cardiovasculares.^{62,64}

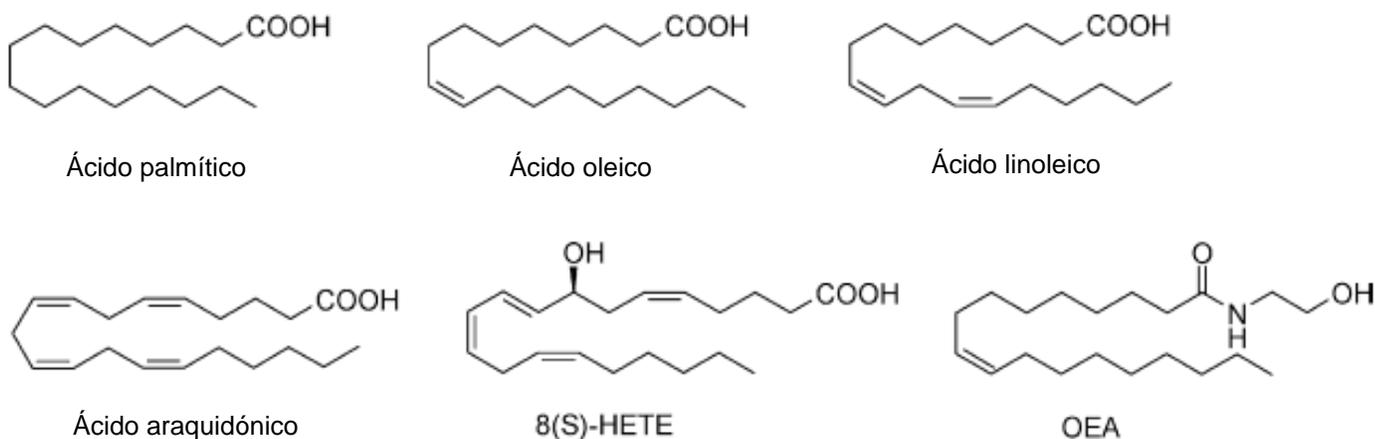


Figura 11. Ligandos naturales de PPAR α

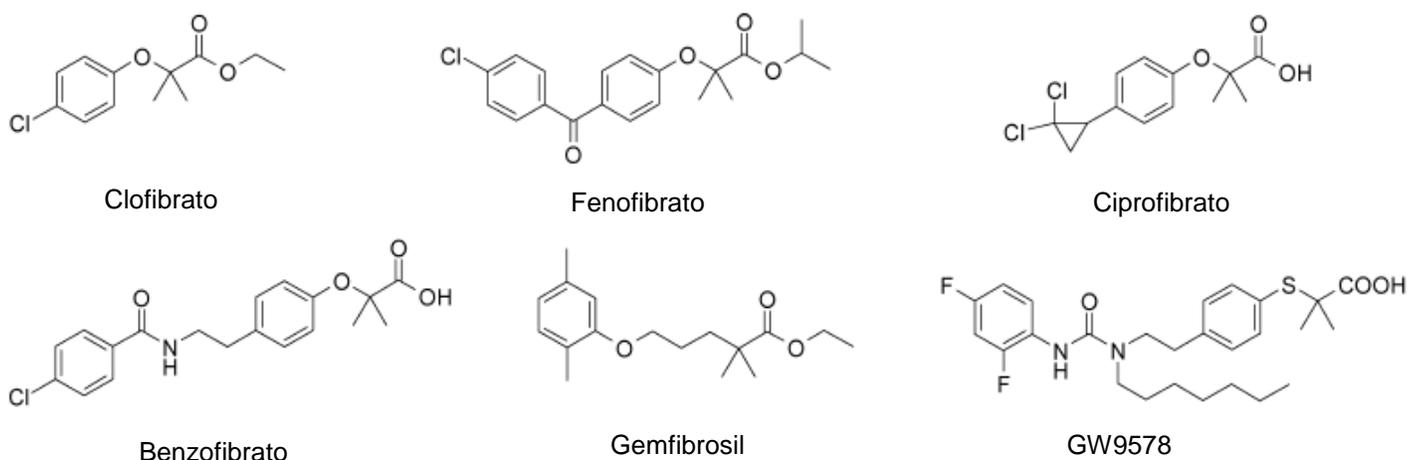


Figura 12. Ligandos sintéticos de PPAR α .

2.8.3.- Mecanismo de señalización de PPARs.

La señalización de los PPARs comienza cuando el ligando (natural o sintético) atraviesa la membrana celular y se une a los PPARs posteriormente, ambos (ligando-PPARs) atraviesan la membrana nuclear uniéndose al **Receptor de Retinoide X (RXR)** en una región específica del ADN (elemento de respuesta a PPAR), lo que conlleva a una transcripción y posteriormente a una traducción de varias proteínas involucradas en la homeostasis de lípidos y carbohidratos, como GLUT4 y FATP-1 (principalmente), favoreciendo la captación y utilización de glucosa y ácidos grasos (respectivamente) disminuyendo los niveles en plasma de

cada uno de estos mejorando de esta manera uno de los defectos involucrados en la diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares (**Figura 13**)^{62,65,66}

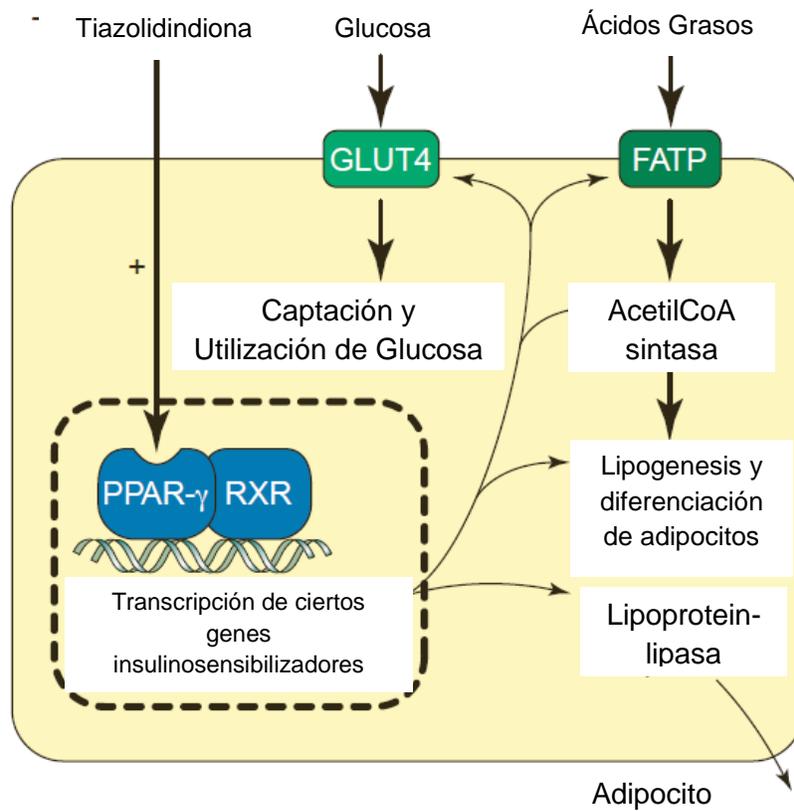


Figura 13. Mecanismo de señalización de PPARs.^{36,38,39}

2.8.4.- Mecanismo de señalización de la enzima PTP-1B

La enzima proteína fosfatasa de tirosina 1B (PTP-1B) juega un papel muy importante tanto en la resistencia como en la sensibilidad de la insulina en el hígado.⁶⁷ Una vez que la insulina se une a su receptor, éste se fosforila en residuos de tirosina y posteriormente fosforila a otras enzimas hasta llegar a la activación y translocación de la proteína transportadora de glucosa (**GLUT4**), favoreciendo su entrada y utilización en la célula.²⁰ La PTP-1B actúa como un regulador negativo, desfosforilando los residuos de tirosina y atenuando o disminuyendo la actividad de la insulina. Por lo que la inhibición de ésta enzima prolonga el tiempo de fosforilación de los residuos de tirosina presentes en los receptores de insulina mejorando la sensibilidad de dicha hormona y mejorando la homeostasis de glucosa en personas diabéticas (**Figura 14**).⁶⁸⁻⁷⁰

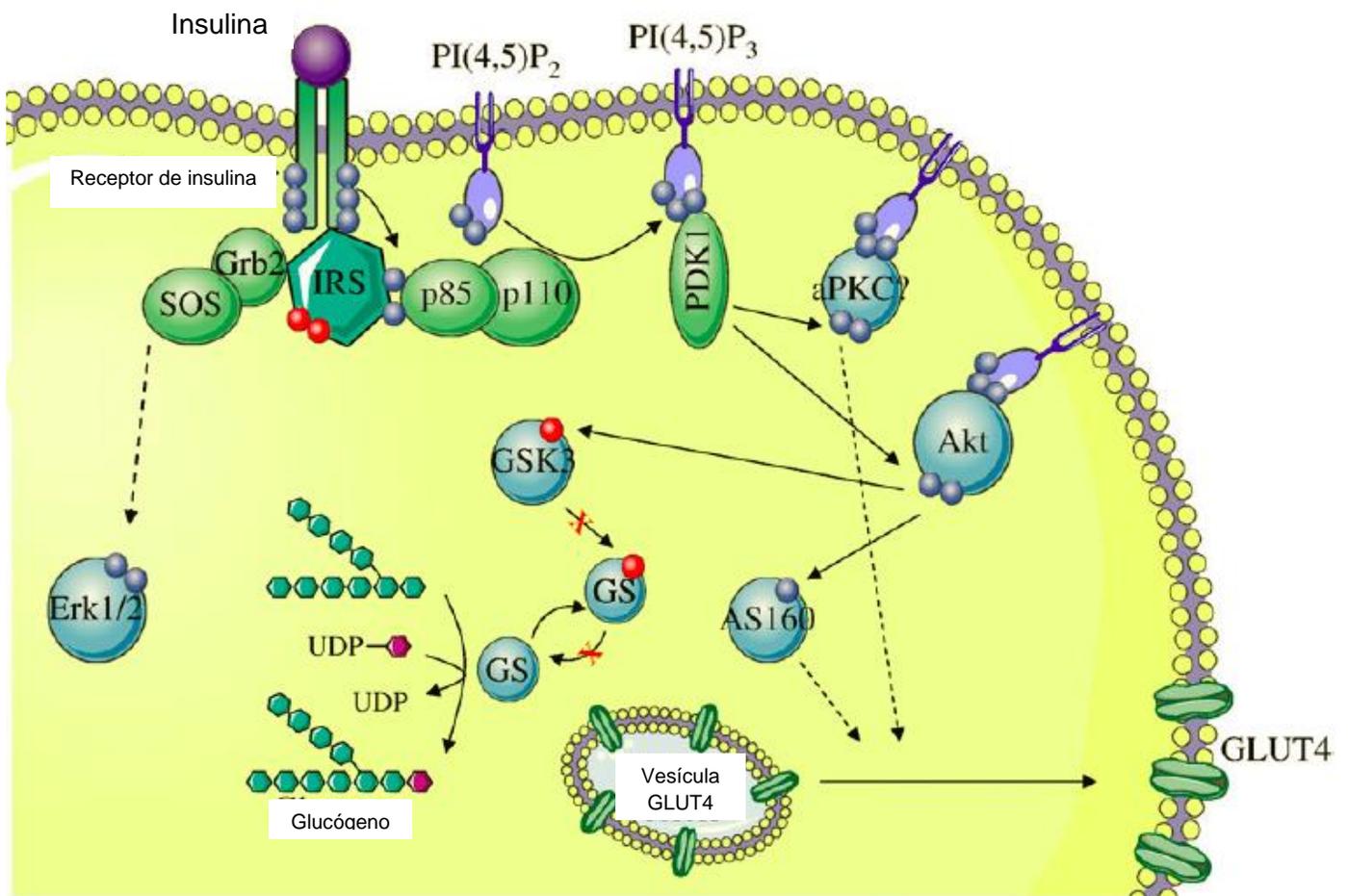


Figura 14. Mecanismo de señalización de la enzima PTP-1B.⁶⁸⁻⁷⁰

2.9.- Reglas de Lipinski y Veber

Existen ciertos programas computacionales como molinspiration (**Figura 15**) que realizan cálculos *in silico* que nos ayudan a predecir ciertas propiedades fisicoquímicas (llamadas Reglas de Lipinski y Reglas de Veber) y que impactan en la farmacocinética de las moléculas. Dentro de estas propiedades se encuentran:

26

2.9.1.- Reglas de Lipinski

- **Coefficiente de partición (logP)**; debe ser menor a 5
- **Número Total de Átomos**; menor a 48
- **Peso Molecular (PM)**; menor a 500 g/Mol
- **Número de aceptores de puentes de hidrógeno (nON)**; menor a 10
- **Número de donadores de puentes de hidrógeno (nOH,NH)**; menor a 5
- El programa computacional molinspiration también nos indica el **número de violaciones (nDviol)** hacia estos postulados que debe ser menor a 2

2.9.2.- Reglas de Veber

- **Área Polar Superficial (PSA)**; menor a 150 Å²
- Otro valor muy importante que impacta en la farmacocinética de las moléculas son el **número de enlaces rotables (nEnlsRtbls)** que tiene que ser menor a 8 para evitar que la molécula tenga muchos grados de libertad y de esta manera se pueda unir a diferentes receptores o enzimas y provocar múltiples efectos que podrían ser tóxicos.²⁶

Estas propiedades serán tomadas en cuenta en las consideraciones para el diseño de nuestras moléculas.

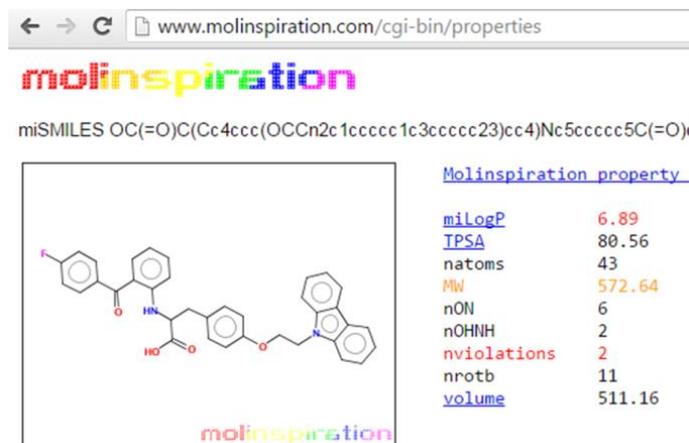


Figura 15. Programa computacional para calcular propiedades fisicoquímicas.

3.0.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.

Debido a que en nuestro país y a nivel mundial la DM2 al igual que la enfermedad aterosclerótica vascular derivada de la misma, poseen una alta tasa de morbilidad y mortalidad, así como la toxicidad por interacciones medicamentosas provocadas por la administración crónica para tratar cada una de estas patologías (polifarmacia), existe una necesidad médica urgente para el desarrollo de nuevos fármacos duales con actividad antidiabética y anti-hipertrigliceridémica (para la prevención de complicaciones cardiovasculares) presentes en una sola molécula.

En este proyecto químico-farmacéutico se pretende desarrollar una serie de compuestos con actividad antidiabética y posible efecto antidislipidémico que actúen sobre diferentes blancos terapéuticos lo cual reduciría el uso simultaneo de diversos fármacos.

4.0.- HIPÓTESIS

- Los compuestos azaheterociclos y carbociclos hibridizados con el núcleo de tirosina diseñados y sintetizados, poseerán actividad antidiabética y anti-hipertrigliceridémica al ser agonistas de los receptores PPAR α , PPAR γ , e inhibidores de la enzima PTP-1B en modelos *in vitro*, *in silico* e *in vivo*.

5.0.- OBJETIVO

5.1.- Objetivo general

Diseñar y sintetizar compuestos azaheterociclos y carbociclicos y evaluar la actividad antidiabética *in vitro* sobre la enzima PTP1B y los receptores PPAR α , PPAR γ , GLUT4 y FATP-1 así como, determinar su efecto *in vivo* sobre modelos murinos.

5.2.- Objetivos Específicos

- Diseñar, sintetizar y caracterizar 5 compuestos basados en el aminoácido tirosina, azaheterociclos y carbociclos.
- Evaluar *in vitro* los compuestos sintetizados sobre la enzima PTP1B y los receptores PPAR α , PPAR γ y sus proteínas de expresión GLUT4 y FATP-1, así como analizar la relación estructura química-actividad antidiabética.
- Evaluar en un modelo murino el efecto hipoglucemiante/antihiperoglucemiante de los análogos que resulten más activos en los modelos *in vitro*.
- Realizar un acoplamiento molecular refinado sobre PPAR α , PPAR γ y PTP-1B de los compuestos que resulten más activos.

6.- CONSIDERACIONES PARA EL DISEÑO MOLECULAR DE LOS COMPUESTOS

Las consideraciones que se tomaron en cuenta para el diseño de compuestos con actividad antidiabética fueron basados en el patrón farmacofórico de los agonistas duales PPAR α/γ chiglitazar, muraglitazar y farglitazar (**figura 16**), el cual cuenta con una región ácida proporcionada por un ácido carboxílico (A) unida a un anillo aromático (B), características que se mantuvieron, utilizando como estructura base el aminoácido de tirosina, un fragmento hidrofóbico de tipo azaheterociclo o carbociclo (D) remplazado con algunas estructuras privilegiadas (estudiadas en nuestro grupo de trabajo: Bencimidazol, quinolina, bifenilcarbonitrilo, bifenilo, naftilo) que impactarán en la farmacodinamia (interacción ligando-receptor), unido mediante un espaciador flexible (C) y una amina voluminosa (E), a la que se le realizó una disgregación molecular para obtener un ahorro de átomos, esperando mejorar de esta manera algunas de las características fisicoquímicas (reglas de Lipinski y Veber) que impactan directamente en las propiedades farmacocinéticas de las moléculas diseñadas **M1- M5**.

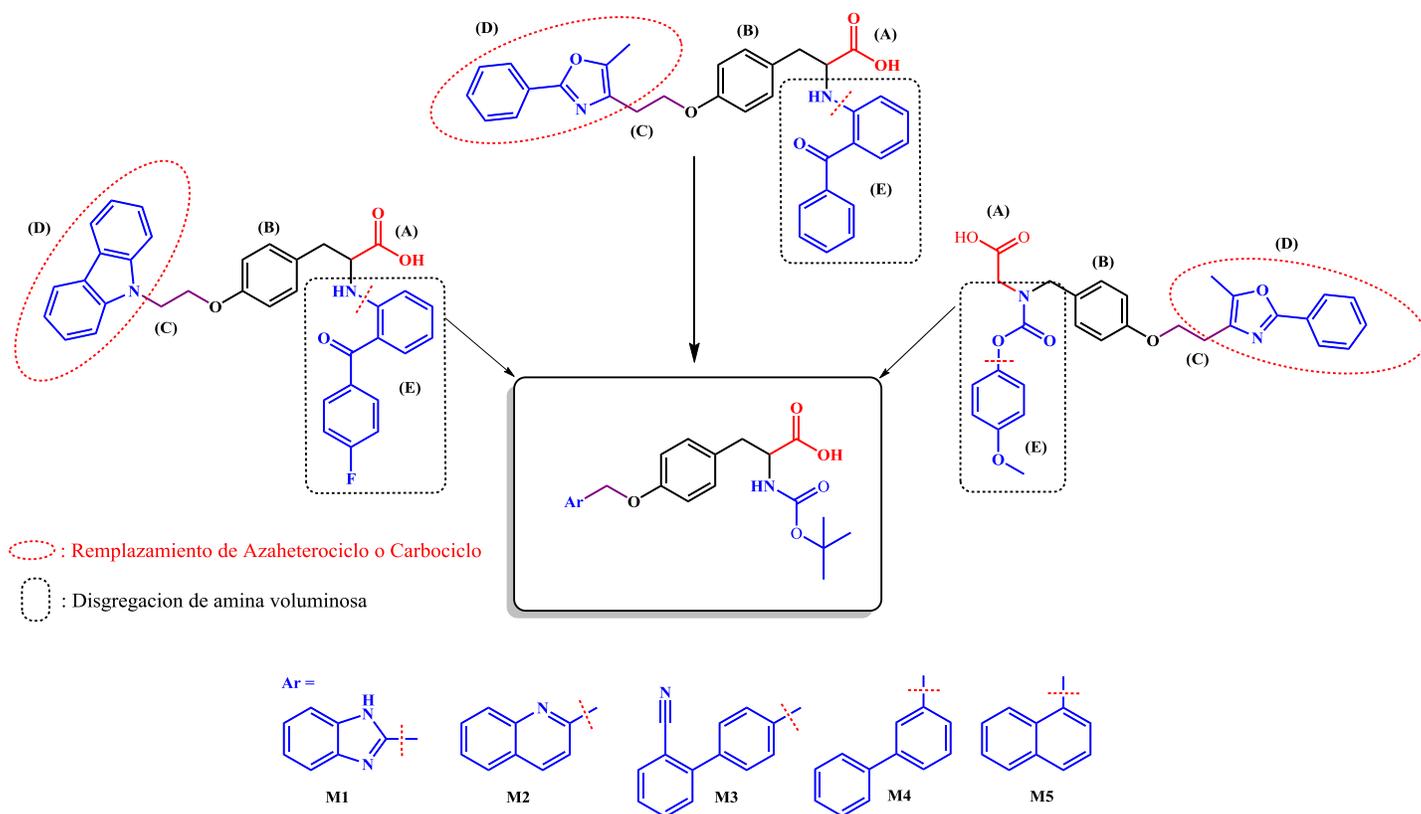


Figura 16. Consideraciones para el diseño de compuestos basado en el patrón farmacofórico de los agonistas duales PPAR α/γ chiglitazar, muraglitazar y farglitazar.

En la **tabla 7** se muestran las diferentes propiedades fisicoquímicas (reglas de Lipinski y Veber) de chigitazar muraglitaztar, farglitazar y de las moléculas diseñadas (**M1- M5**) obtenidas a partir del programa computacional molinspiration, las cuales impactan de manera directa la solubilidad y absorción de estas. Los compuestos **M1** y **M2** no violan los postulados a las reglas mencionadas anteriormente por lo que tienen mayor probabilidad de presentar una buena farmacocinética en comparación con los demás compuestos (**M3 – M5**, chigitazar, muraglitazar y farglitazar) que violan uno o dos postulados (peso molecular y el coeficiente de partición), a la regla de Lipinski y Veber lo cual, nos indica tienen una mayor probabilidad de presentar una farmacocinética errática.

Tabla 7. Propiedades fisicoquímicas (reglas de Lipinski y Veber) de chigitazar muraglitaztar, farglitazar y de los compuestos (M1- M5).

Compuestos	LogP	TPSA	nAtoms	PM	nOH	nOHNH	nViol
M1	3.76	113.55	30	411	8	3	0
M2	4.24	97.76	31	422	7	2	0
M3	5.67	108.66	35	472	7	2	1
M4	5.35	84.86	31	421	6	2	1
M5	5.93	84.86	33	447	6	2	1
Chig.	6.89	80.56	43	572	6	2	2
Mur.	3.88	111.34	38	516	9	1	1
Farg.	6.00	101.66	41	546	7	2	2

Chig.= Chigitazar, **Mur.**= Muraglutazar, **Farg.**= Farglitazar.

7.- METODOLOGÍA

Parte química

La síntesis de los compuestos, se está realizó en el Laboratorio 209 del Centro de Investigaciones Químicas UAEM así como, en el Laboratorio 5 de la Facultad de Farmacia bajo la tutoría del Dr. Hugo Tlahuext Romero y el Dr. J. Gabriel Navarrete Vázquez.

Parte farmacológica

La evaluación *in vitro* del efecto de inhibición sobre la enzima PTP1B se realizó en colaboración con el Dr. Paolo Paoli del Departamento de Ciencias Bioquímicas de la Universidad de Florencia, Italia.

La evaluación *in vitro* sobre la expresión de receptores PPAR α , PPAR γ , GLUT4 y FATP1 se realizó con la colaboración del Dr. Julio C. Almanza Pérez y el M. en C. Abraham Giacomán-Martínez Laboratorio de Farmacología, Depto. Ciencias de la Salud, UAM Iztapalapa.

La determinación del efecto antidiabético en un modelo murino fue realizada con la colaboración del Dr. Samuel E. Estrada Soto y el M.F Fabiola Chávez Silva del Laboratorio 12 de la Facultad de Farmacia UAEM.

El experimento de OGTT se realizó en colaboración con el Dr. Elix Alberto Dominguez-Mendoza del Laboratorio 5 de la Facultad de Farmacia UAEM.

Parte computacional

Los estudios de acoplamiento molecular, se realizaron en el Laboratorio 5 de la Facultad de Farmacia, UAEM, con la colaboración del M.F Abraham Gutiérrez Hernández.

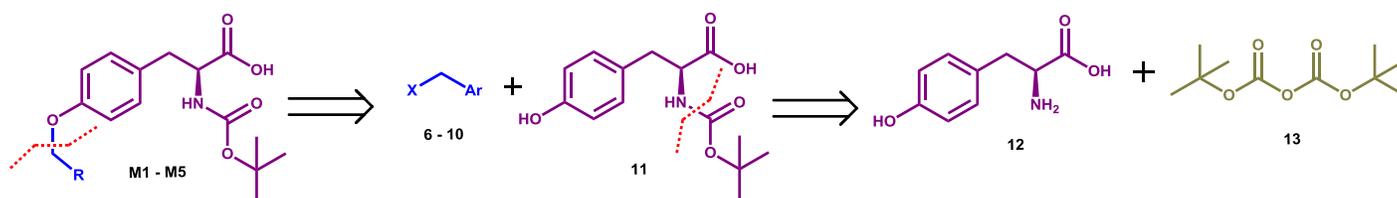
+

7.1 Metodología parte química

Una vez diseñados los compuestos se procedió a la parte de retrosíntesis para saber cuáles serán las posibles materias primas utilizadas así como la ruta de síntesis.

7.1.1.- Retrosíntesis

La retrosíntesis para los compuestos **M1 – M5** análogos de glitazares comenzó con una desconexión entre el átomo de oxígeno del anillo central y carbono bencílico de la parte alifática para la obtención de los diferentes halogenuros de metilarilo y el terbutilcarbamato de tirosina (Boc-Tirosina), a la cual se le realizó una desconexión entre el grupo amino y el carbonilo del carbamato para obtener el dicarbonato de diterbutilo y la L-Tirosina (**Figura 17**).



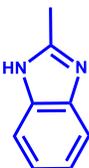
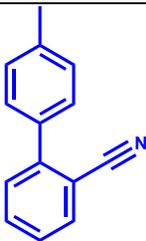
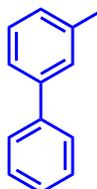
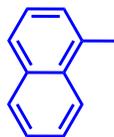
M1	M2	M3	M4	M5
6	7	8	9	10
Bencimidazol	Quinolina	Bifenilcarbonitrilo	Bifenilo	Naftilo
				

Figura 17. Retrosíntesis de los compuestos diseñados **M1 – M5**, para la obtención de materias primas utilizadas y la ruta de síntesis.

Cabe mencionar que los compuestos de partida anteriormente mencionados como la L-Tirosina, dicarbonato de diterbutilo y los halogenuros de metilarilo (**MP1 – MP5**) son materias primas comercialmente disponibles a excepción del 2- cloro metilbencimidazol el cual fue sintetizado a partir de la *o*-fenilendiamina y el ácido 2-Cloroacetico, mediante la reacción de Phillips.

7.1.2.-Síntesis del 2-Clorometilbencimidazol (6)

Mediante la reacción de Phillips, se hizo reaccionar la *o*-fenilendiamina (14) con ácido 2-cloroacético (15) en ácido clorhídrico (HCl) al 70% volumen/volumen calentando a reflujo, obteniendo el 2-clorometilbencimidazol (figura 18)

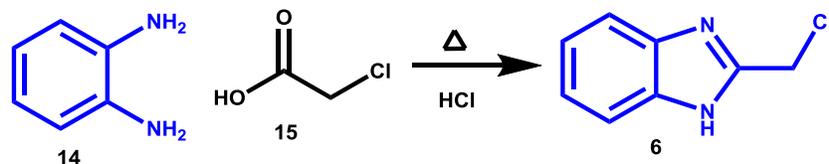


Figura 18. Síntesis de 2-clorometilbencimidazol a través de la reacción de Phillips.

7.1.3.- Síntesis de terbutilcarbamato de tirosina (11)

La síntesis de terbutilcarbamato de tirosina, se comenzó haciendo reaccionar el clorhidrato de L-tirosina con 2.1 equivalente de trietilamina (TEA) y 1 equivalente de bicarbonato de diter-butilo en cloroformo como disolvente (figura 19)

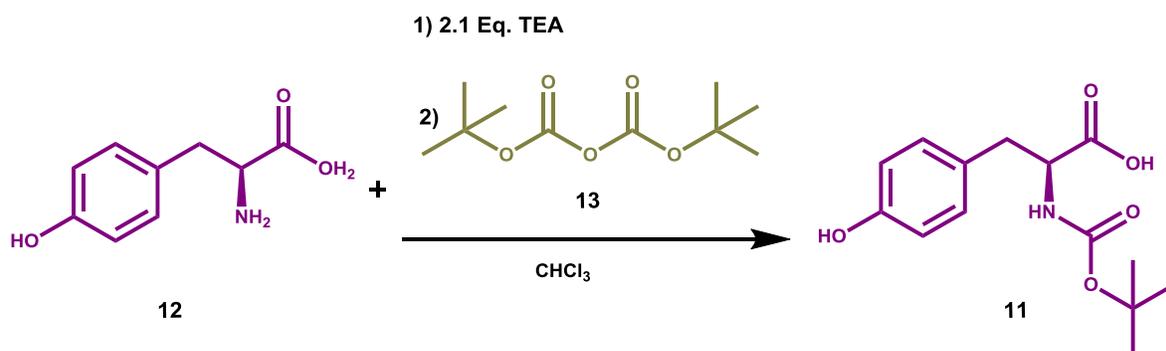
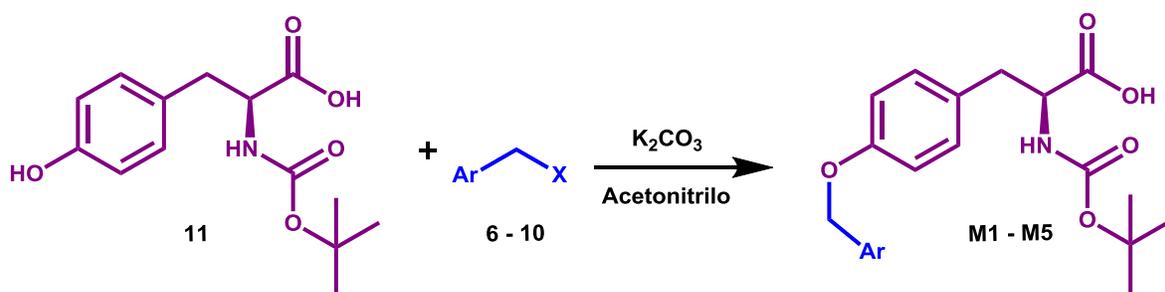


Figura 19. Síntesis del precursor ter-butilcarbamato de tirosina.

7.1.4.- Síntesis de los compuestos finales M1 - M5 análogos de chiglitazar, muraglitazar y farglitazar.

Una vez obtenidos los precursores (2-Clorometilbencimidazol y Boc-Tirosina) se procedió a la síntesis de los compuestos finales análogos de chiglitazar, muraglitazar y farglitazar, como se muestra en la **figura 20**, mediante la reacción de Williamson se hizo reaccionar la Boc-tirosina con 3.5 equivalentes de carbonato de potasio (K_2CO_3) como base y 1 equivalente de los correspondientes halogenuros de metilarilo (**6 – 10**) para así obtener compuestos finales **M1 - M5**.



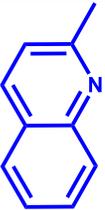
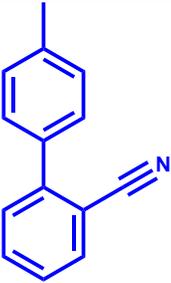
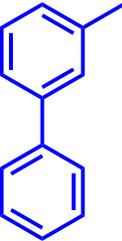
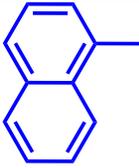
M1	M2	M3	M4	M5
6	7	8	9	10
Bencimidazol	Quinolina	Bifenilcarbonitrilo	Bifenilo	Naftilo
				

Figura 20. Síntesis de los compuestos finales **M1 - M5** análogos de chiglitazar y muraglitazar.

7.2 Metodología parte biológica

7.2.1 Actividad *in vitro*

7.2.1.1 Evaluación *in vitro* de la actividad inhibitoria sobre la enzima PTP-1B

Para probar la capacidad inhibitoria de los compuestos **M1 –M5** se utilizó la enzima PTP-1B recombinante humana purificada. Los compuestos **M1 –M5** se disolvieron en DMSO preparando una solución inicial de 20 mM, por otra parte el sustrato (fosfato de *p*-nitrofenilo) se disolvió en 0.075M de buffer β,β -dimetilglutarato a pH 7.0, 1mM de EDTA y 1mM de ditioneitol. Posteriormente alícuotas de cada solución inicial de los compuestos **M1 –M5** fueron diluidos en una solución de 40 μ M de buffer que contenía 2mM de fosfato de *p*-nitrofenilo hasta obtener un volumen final fue de 1mL. La reacción enzimática se inició al agregar alícuotas de la proteína PTP1-B (0.16 μ g por cada ensayo) al buffer que contenía los compuestos (**M1 –M5**) y fosfato de *p*-nitrofenilo, y se detuvo a tiempos determinados utilizando 4 mL de KOH 1M. La formación de *p*-nitrofenol es inversamente proporcional a la capacidad inhibitoria de los compuestos la cual, se determinó midiendo la absorbancia a 400 nm. La cinética enzimática se determinó midiendo las velocidades iniciales usando ocho diferentes concentraciones del sustrato (0.5-40 mM).^{68,70–72}

7.2.1.2 Evaluación *in vitro* del efecto sobre receptores PPAR α , PPAR γ , transportador de glucosa tipo 4 (GLUT-4) y proteína transportadora de ácidos grasos (FATP-1)

Fibroblastos 3T3-L1 (9×10^5 células por pozo) fueron sembradas en placa de 6 pozos (Corning Incorporated, NY, USA) en medio DMEM adicionado con 25 mM de glucosa, 10% de suero fetal bovino (v/v), 1 mM de piruvato sódico, 2 mM de glutamina, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales, y gentamicina, bajo una atmósfera humidificada al 5% de CO₂, a 37 °C. Después de dos a tres días de confluencia, las células se diferenciaron fenotípicamente a adipocitos con 0.5 mM de 3-isobutil-1-metilxantina, 0.25 μ M de acetato de dexametasona, y 0.8 μ M de insulina por 48 h, seguido por insulina sola por 48 h más. El medio de cultivo sin insulina fue reemplazado cada dos días durante 8 días de diferenciación (García-Macedo et al., 2008). Para determinar el efecto de los compuestos sobre la

expresión relativa de los PPARs, GLUT-4 y FATP1, las células fueron tratadas con los compuestos **M1 – M5** por 24 h.

El ARN fue aislado de las células de cultivo usando el reactivo de aislamiento TriPure (Invitrogen). La absorbancia se midió a 260 y 280 nm para cada muestra de ARN. Para confirmar la integridad del ARN, 1 µg fue corrido en gel de agarosa al 1% y revelado con bromuro de etidio, visualizado utilizando el Image Gel-Logic 212 Pro (Kodak/Caarestream). Dos microgramos del ARN total fue transcrito inversamente usando el ImProm II reverse transcription system (Promega, Madison, WI, USA), la reacción (20 µL) e incubado en un termociclador (BioProducts, West Palm Beach, FL, USA), bajo el siguiente programa de ciclos: incubación a 25 °C por 5 min, hasta 42 °C por 55 min. La enzima se inactivó a 70°C, por 15 min, y finalmente las muestras fueron enfriadas a 4 °C, por 5 min. Un volumen 1/10 aproximadamente de cada reacción fue amplificado usando SYBR Green master mix (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) conteniendo 0.5 mM de cebadores personalizados de **PPAR γ** -(F-CCAGAGTCTGCTGATCTGCG ; R-GCCACCTCTTTGCTCTGCTC; Gene Bank NM_011146.1), **PPAR α** (F-ATGCCAGTACTGCCGTTTTTC; RGGCCTTGACCTTGTTTCATGT; Gene Bank NM_011144), **GLUT-4** (FGATTCTGCTGCCCTTCTGTC; R-ATTGGACGCTCTCTCTCCAA; Gene Bank NM_009204.2), así como la enzima de iniciación rápida, buffer para PCR y 3.5 mM MgCl₂, en un volumen final de 10 µL. Las reacciones fueron medidas en un Rotor-Gene de tiempo-real (Corbett Life Science, Concorde NSW, Australia). Los PCR se llevaron a cabo usando las siguientes condiciones de ciclos: pre-incubación y desnaturalización a 95 °C durante 10 min. El umbral de ciclos (Ct) fue medido usando tubos separados y por duplicado. La identidad y pureza de los productos de ampliación fueron monitoreadas por electroforesis en gel de agarosa al 2 %. La curva de fusión se analizó al inicio de la amplificación siguiendo las condiciones del kit SYBER Green, tal cual lo indica la compañía (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). Para asegurar la calidad de las mediciones, cada ensayo incluirá un control negativo para cada gen. La cantidad de ARNm de cada adipocito fue normalizado de acuerdo a la cantidad de ARNm ribosomal que

codifica para la proteína 36B4 F-AAGCGCGTCCTGGCATTGTCT; RCCGCAGGGGCAGCAGTGGT; Gene Bank NM_007475.2). Los valores de ΔCt fueron calculados en cada muestra de cada gen de interés como se menciona a continuación: Ct gen de interés – Ct gen de referencia (β - actina como el gen de referencia. Los cambios relativos en los niveles de expresión de un gen en específico ($\Delta\Delta Ct$) serán calculados como ΔCt del grupo prueba menos ΔCt del grupo control y entonces presentado $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los cebadores que se emplearon se muestran a continuación⁷³⁻⁷⁶:

36B4 (*Mus musculus*)
Gene Bank NM_007475.2
F AAGCGCGTCCTGGCATTGTCT
R CCGCAGGGGCAGCAGTGGT
Producto 135pb

PPAR- γ (*Mus musculus*)
Gene Bank NM_011146.1
FCCAGAGTCTGCTGATCTGCG
R GCCACCTCTTTGCTCTGCTC
Producto 217pb

PPAR- α (*Mus musculus*)
Gene Bank NM_011144
F ATGCCAGTACTGCCGTTTTTC
R GGCCTTGACCTTGTTTCATGT
Producto 220pb

GLUT-4 (*Mus musculus*)
Gene Bank NM_009204.2
F GATTCTGCTGCCCTTCTGTC
R ATGGACGCTCTCTCTCCAA
Producto 168pb

FATP-1 (*Mus musculus*)
Gene Bank NM_011977.3
F ACCAGTGTCCAGGGGTACAG
R TGTCTCCAGCTGACATGAG
Producto 174pb

7.2.2.- Actividad *in vivo*

7.2.2.1 Inducción de la diabetes (Modelo murino de diabetes mellitus no insulino-dependiente)

El modelo murino de diabetes no insulino-dependiente fue inducido en ratones CD1 con ayuno de 14h a través de una sola inyección intraperitoneal de 120 mg/kg de estreptozotocina previamente diluida en un buffer de citratos (pH 4.5). La hiperglucemia fue confirmada por la elevación de la concentración de glucosa en plasma, determinada a las 72 h con un glucómetro. Los animales con

concentraciones de glucosa sanguínea mayores de 150 mg/dL fueron empleados para la búsqueda de compuestos antidiabéticos.

7.2.2.2.- Evaluación de compuestos sobre modelo murino de diabetes

Los ratones con valores de glucosa mayor a 150 mg/dL fueron divididos en grupos de cinco animales cada uno (n=5). Los ratones del grupo experimental les fue administrado una suspensión de los compuestos **M1** y **M3** respectivamente (disueltos en 10% de Tween 80) vía intragástrica (100 mg/kg peso de ratón). Los animales del grupo control fueron también administrados con una solución de Tween 80 al 10%, glibenclamida (5 mg/kg) fue empleado como fármaco hipoglucemiante de referencia. Las muestras sanguíneas fueron recolectadas de la vena caudal a las 0, 1, 3, 5, y 7 h después de la administración. La concentración de glucosa sanguínea fue estimada por un método enzimático de glucosa oxidasa usando un glucómetro comercial (Accu-Chek, Performa, Roche®). El porcentaje de variación de la glucemia de cada grupo fue calculado con relación al nivel inicial (0 h), de acuerdo a: %Variación de glucemia = $[(G_x - G_0)/G_0] \times 100$, donde G₀ fueron los valores iniciales de glucemia y G_x fueron los valores de glucemia a la +1, +3, +5 y +7 h, respectivamente. Todos los valores fueron expresados como promedio ± E.E. La significancia estadística fue estimada por análisis de varianza (ANOVA de dos vías), p < 0.05 y p < 0.01 implica significancia.⁷⁷⁻⁸⁰

7.2.2.3.- Prueba de tolerancia oral a la glucosa (OGTT)

La prueba de tolerancia oral a la glucosa se realizó en ratones normales en ayunas durante la noche. Se dividieron en tres grupos de seis cada uno. El grupo de control solo se trató con 1% de Tween 80, el compuesto **M1** (100 mg / kg de peso corporal) y glibenclamida (5 mg / kg) se suspendieron en 10% de Tween 80 en solución salina y se administraron en sus respectivos grupos (grupo experimental y grupo de referencia) con una sola dosis por vía oral por vía intragástrica (ig) utilizando un ig tubo, 60 minutos antes de la administración de glucosa (2 g / kg, i.g). Las muestras de sangre se recogieron de la vena caudal justo antes de la carga de glucosa (0 min) y a los 30, 60 y 120 minutos después de

la administración de glucosa. Los niveles de glucosa sérica se determinaron con un método de oxidasa usando un glucómetro comercial (Accu-Chek, Performa, Roche). Los valores se expresaron como media SEM. La significación estadística se estimó mediante análisis de varianza de una manera y bidireccional. La prueba de Dunnett post hoc ($n = 6$, media \pm SEM, $p < 0,05$) y el área bajo la curva (glucosa AUC).^{81,82}

7.3 Parte computacional

7.3.1 ADMETSar y ACD/Tox Suite.

Se utilizaron los programas computacionales **ADMETSar** y **ACD/Tox Suite** para predecir ciertas características toxicológicas y farmacocinéticas que presentan algunos de los fármacos disponibles en el mercado o en desarrollo con el fin de conocer la seguridad y absorción *in silico* que presentaran los compuestos diseñados **(M1-M5)**.

ACD/Tox Suite

.- **El bloqueo de canales hERG** está asociado al síndrome de la onda larga “QT”, es decir; arritmias cardiacas.

Terfenadina; es el fármaco que se toma como referencia por bloquear un 99% los canales hERG.

La Inhibición de las isoformas del citocromo P450 (CYP3A4, CYP2D6 y CYP2C9) encargadas del metabolismo de fármacos la cual está asociada a interacciones medicamentosas y toxicidad

ketoconazol es el fármaco que se toma como referencia por inhibir un 99% la isoforma CYP3A4.

La dosis letal media (DL₅₀) por vía oral (P.O) en rata y ratón nos indica que tan toxica es una molécula de acuerdo al daño que esta genera a determinada dosis.

Absorción intestinal nos indica la probabilidad que una molécula sea absorbida por esta vía, la cual, está ampliamente relacionada con las características fisicoquímicas (reglas de Lipinski y Veber).

La probabilidad de ser sustratos de glicoproteína-P nos indica la si los fármacos serán expulsadas de las células por esta proteína antes de llegar a la diana terapéutica y por ende presentar resistencia farmacológica, lo que conlleva a inactividad terapéutica.

La probabilidad de ser inhibidor de la glicoproteína-P está asociada a toxicidad por acumulación ya que evita el eflujo de otros compuestos a través de esta proteína.

La prueba de AMES está relacionada con la genotoxicidad, nos indica si un fármaco tiene la capacidad de causar daño al material genético generando carcinogénesis o mutagénesis.

7.3.2.- Acoplamiento molecular sobre PTP1B, PPAR α y PPAR γ .

Los compuestos más activos en los ensayos *in vitro* e *in vivo* (**M1** y **M3**) se les realizó un acoplamiento molecular (Docking) con las estructuras cristalizadas de PTP1B y PPAR α/γ obtenidas de la base de datos Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>), con el código de identificación (PDB código 4Y14, 1K74 and 1K7L respectivamente). Los cálculos de acoplamiento fueron realizados con AutoDock, versión 4.2. AutoDock realiza un acoplamiento automatizado del ligando semiflexible con el sitio de unión rígido de la proteína. El programa conlleva varias corridas del experimento. Cada corrida proporciona una predicción de modo de unión. Todas las moléculas de agua y también el ligando cristalográfico (COA) fueron removidas de la estructura cristalográfica y todos los átomos de hidrógeno fueron añadidos. Para los dos ligandos **M1** y **M3**, así como para cada una de las proteínas fueron asignadas las cargas de Gasteiger y fueron escondidos los átomos no polares.

Todas las torsiones fueron consideradas para moverse durante el acoplamiento. El programa auxiliar AutoGrid generó los mapas electrostáticos del grid. Cada grid fue centrado sobre las coordenadas cristalográficas de cada ligando cristalográfico (3-bromo-4-[difluoro(fosfono)metil]-N-metil-N-alfa-(metilsulfonil)-L-fenilalaninamida

para la enzima PTP-1B y Ácido 2-(1-metil-3-oxo-3-fenyl-propilamino)-3-{4-[2-(5-metil-2-fenil-oxazol-4-il)-etoxi]-fenil}-propionico para PPAR α y PPAR γ). Las dimensiones del grid fueron 60 x 60 x 60 puntos con un espacio de grid de 0.375 Å. El algoritmo Genético Lamarckiano fue aplicado para la búsqueda usando parámetros ya establecidos. MOE 2018.01, y Pymol 1.2 fueron utilizados para la visualización.⁸³⁻⁸⁷

8. RESULTADOS

8.1 Resultados parte química

8.1.2.- Caracterización del precursor bencimidazol mediante ^1H RMN.

En la **figura 21** se muestra un espectro de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de protón (^1H) para el precursor sintetizado 2-clorometilbencimidazol en el cual se puede observar a radiofrecuencias bajas las señales aromáticas y en 4.88 partes por millón (ppm) una señal que integra para dos protones correspondiente al metileno unido al átomo de cloro.

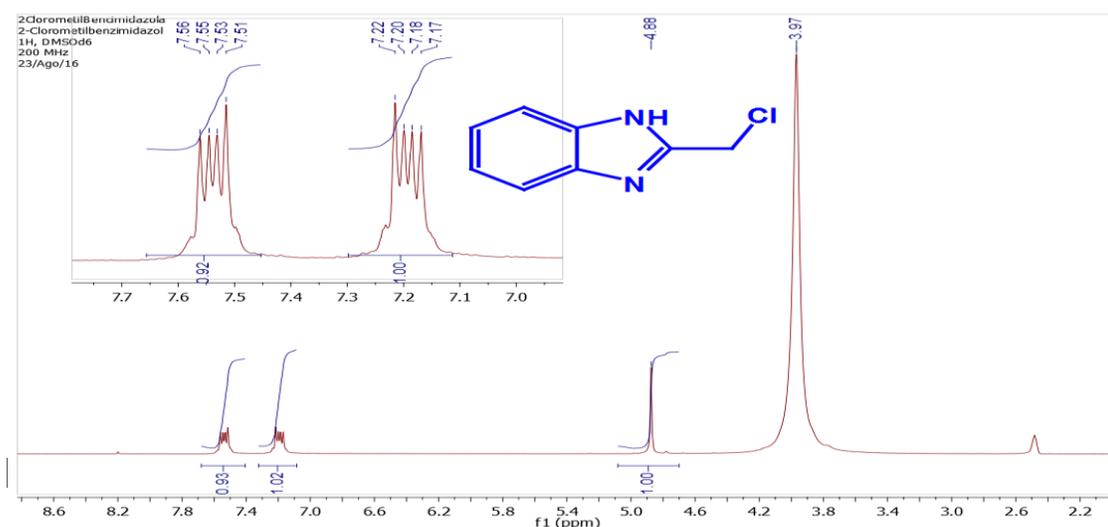


Figura 21. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de protón para el precursor bencimidazol.

En la **figura 22** se muestra una ampliación de las señales aromáticas que integran para cuatro protones correspondientes al anillo aromático las cuales se muestran como un cuadruplete debido a la tautomería del bencimidazol per se.

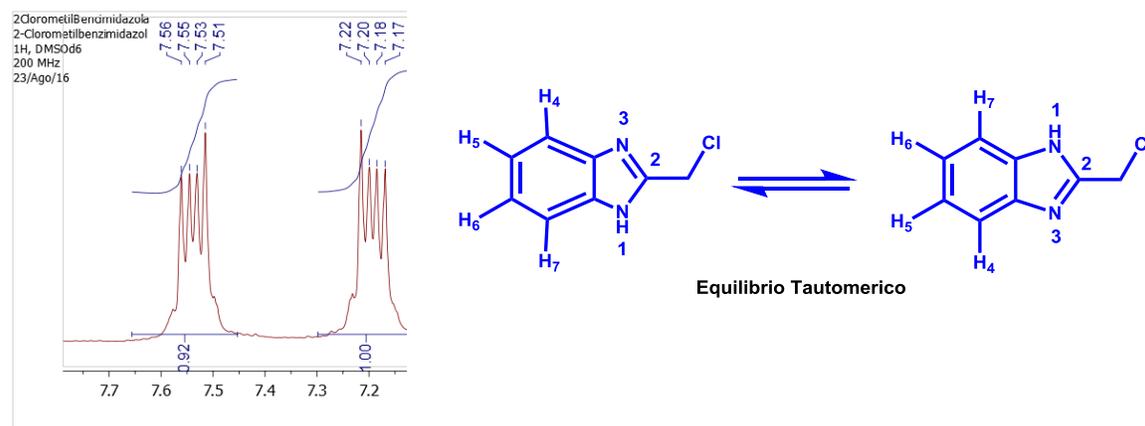


Figura 22. Ampliación del Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de protón para el precursor bencimidazol.

8.1.3.- Caracterización del precursor bencimidazol mediante espectrometría de masas modalidad FAB⁺.

En la **figura 23** se muestra un espectro de masas en modalidad FAB⁺ correspondiente al mismo compuesto (2-Clorometilbencimidazol) en donde se observa un pico de 166 m/z que corresponde al peso molecular (PM) de este precursor y por otra parte una contribución isotópica del átomo de cloro 37 (³⁷Cl). El pico base de este espectro representa la pérdida del átomo de cloro y probablemente la expansión del anillo de 6 miembros.

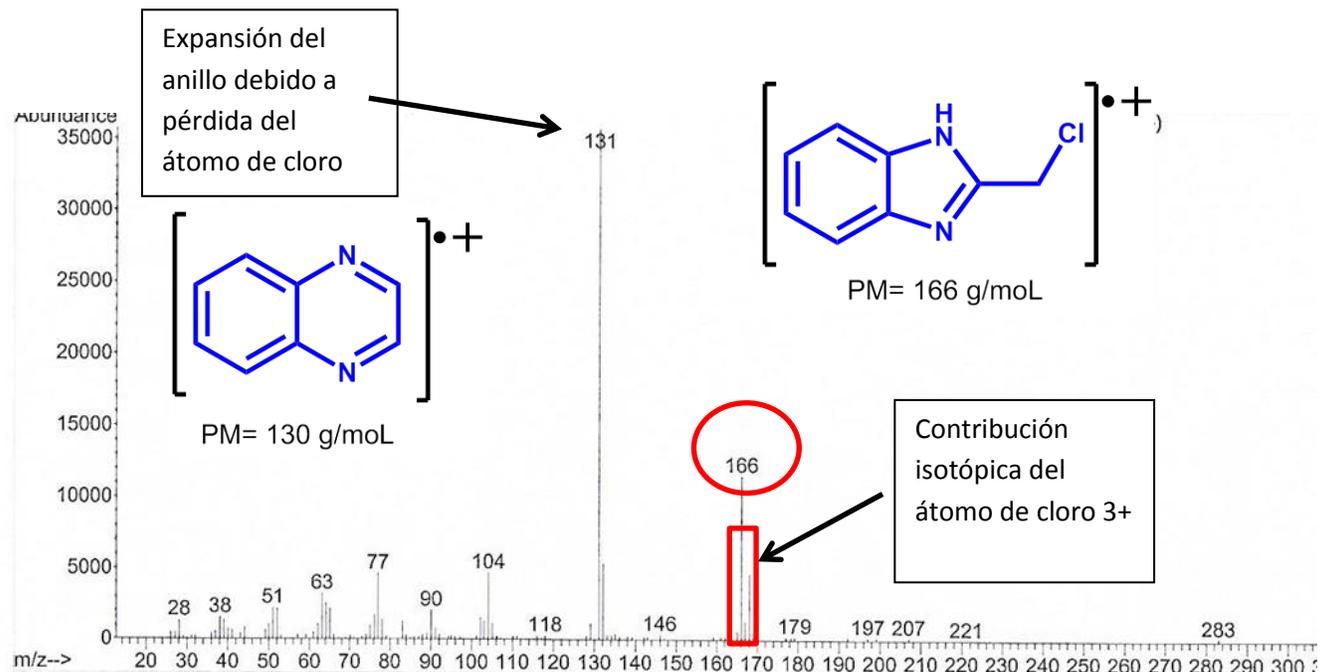


Figura 23. Espectro de masas en modalidad FAB⁺ correspondiente al bencimidazol.

8.1.3.- Caracterización del precursor Boc-tirosina mediante ^1H RMN.

En la **figura 24** se observa el espectro de ^1H de RMN del precursor terbutilcarbamato de tirosina (Boc-tirosina) en donde puede observar a radiofrecuencias bajas un sistema "AÁ,BB'" que corresponde a los protones del anillo aromático asignadas como H_2 , H_3 , H_5 y H_6 , una señal simple en 3.63 ppm que integra para 9 protones correspondiente a los 3 metilos del terbutilo, en 4.1 ppm se observa un triplete que integra para uno protón correspondiente a la señal asignada como α al carbonilo y en 3.01 ppm una señal múltiple que integra para dos protones correspondiente a los protones asignadas como β con respecto al carbonilo.

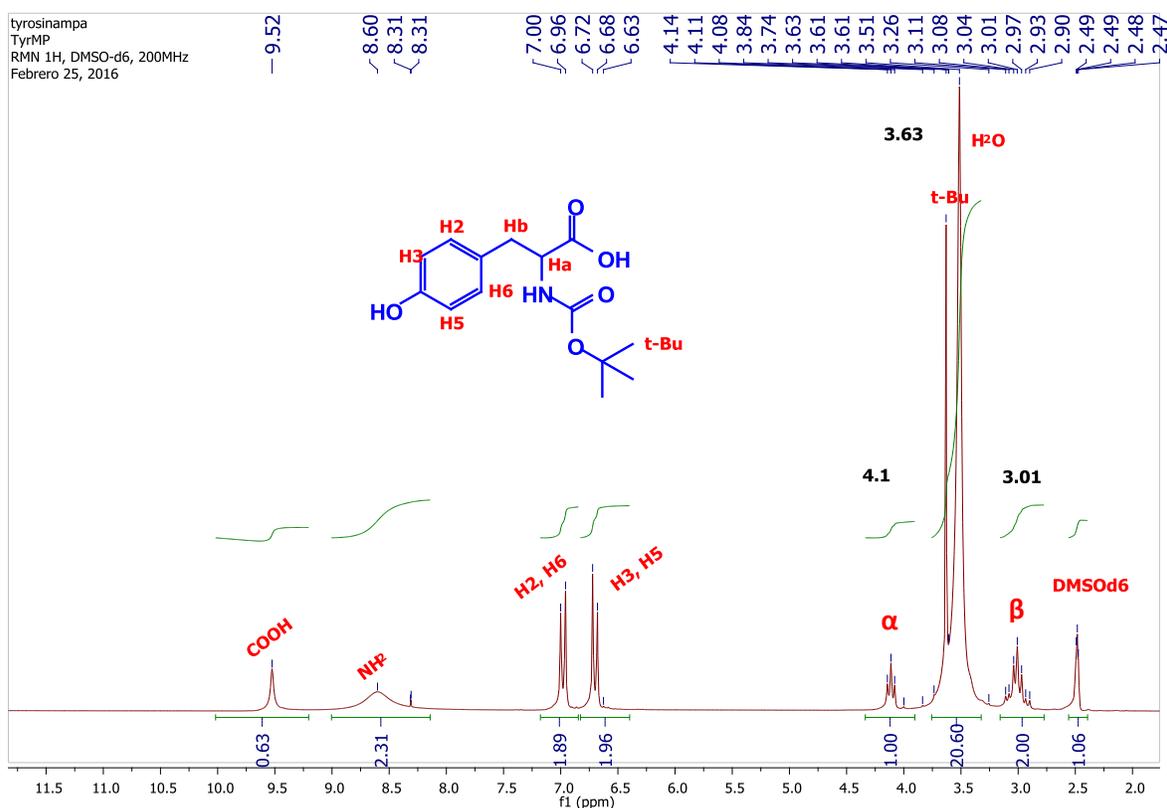


Figura 24. Espectro de RMN de protón de la materia prima Boc-tirosina.

8.1.4.- Caracterización del compuesto final M2 mediante ^1H RMN.

En la **figura 25** se muestra el espectro de ^1H de RMN del compuesto final **M2**, en el cual se puede observar en 1.44 ppm una señal simple que integra para 9 protones correspondiente a los metilos del terbutilo, en 3.15 y 4.62 ppm las señales asignadas como α y β al carbonilo y entre 7.16 y 6.89 ppm un sistema "AA,BB" que corresponde a los protones del anillo aromático de la Boc-Tyr asignadas anteriormente; así como la señal correspondiente al metileno unido al oxígeno de la tyr (**OCH₂**). En 7.52 ppm se muestra una señal triple debido al acoplamiento con el metileno unido al oxígeno, que integra para un protón con una constante de acoplamiento de 7.2 Hz asignada a 3'', en 8.20 ppm se muestra una señal doble con una constante de acoplamiento de 8.12 Hz, que integra para un protón correspondiente a la señal asignada como 4''. Para 5'' la cual integra para un protón se muestra una señal doble en 7.79 ppm con una constante de acoplamiento de 7.76 Hz. En 7.70 ppm con una constante de acoplamiento de 8.4 Hz, se muestra una señal triple que integra para los protones 6'' y 7'' y por último para la señal 8'' se muestra una señal doble, la cual integra para un protón en 8.12 ppm con una constante de acoplamiento de 8.8 Hz correspondientes a la quinolina.

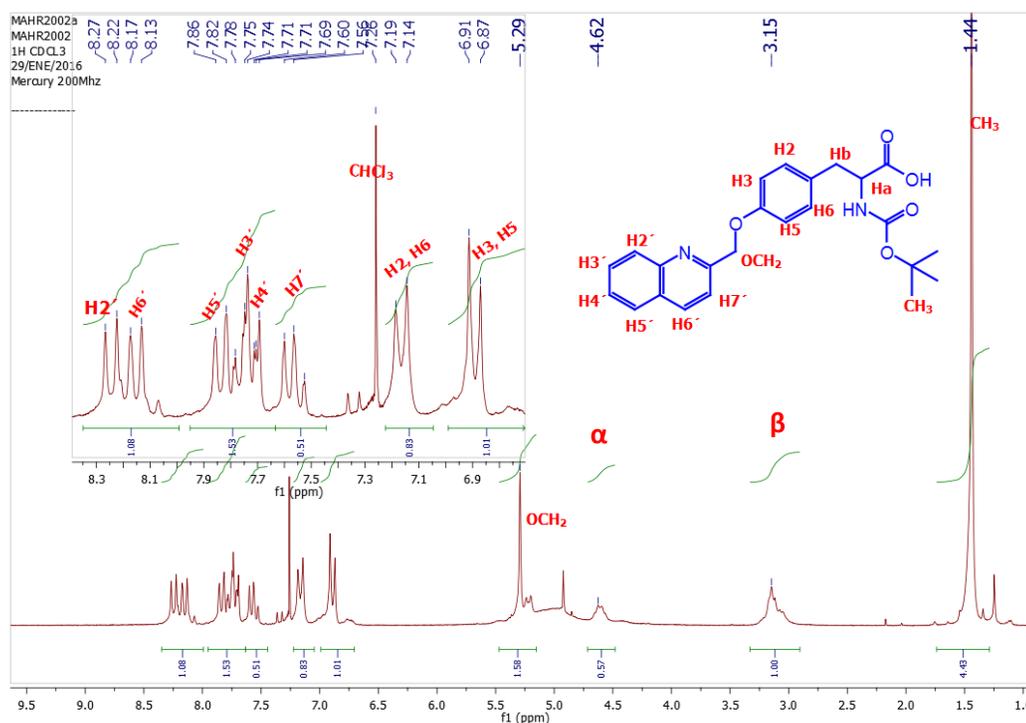


Figura 25. Espectro de RMN de protón del compuesto final M2 con quinolina.

8.1.4.- Caracterización del compuesto final M2 mediante espectrometría de masas modalidad FAB+.

En la **figura 26** se muestra el espectro de masas en modalidad FAB+ correspondiente al compuesto final **M2** en donde se muestra un pico del ion cuasimolecular de 423 m/z que corresponde al peso molecular (PM) de este compuesto así como las principales fragmentaciones de 365 m/z correspondiente a la pérdida del terbutilo.

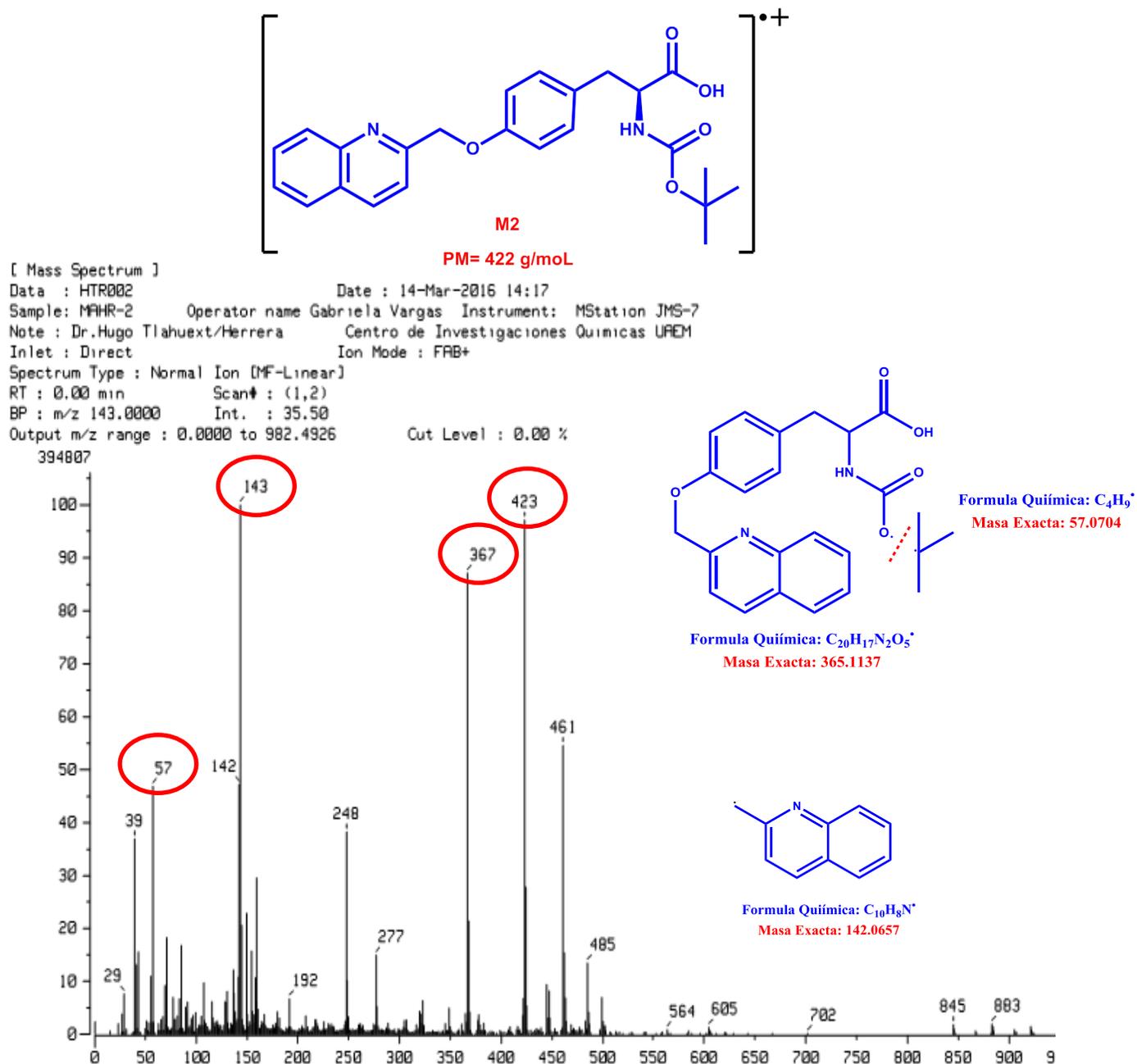


Figura 26. Espectro de masas en modalidad FAB+ correspondiente al compuesto final 2-quinolina.

8.1.5.- Propiedades fisicoquímicas y rendimientos de los compuestos.

En la **tabla 8** se muestran algunas propiedades fisicoquímicas y los rendimientos de reacción obtenidos de los compuestos sintetizados, con tiempos de reacción que van de 7 a 9 horas, rendimientos de 80 a 90% aproximadamente, puntos de fusión característicos de compuestos puros y en forma de sólidos blancos para los compuestos **M1 - M3** y en forma de resinas para los compuestos **M4** y **M5**.

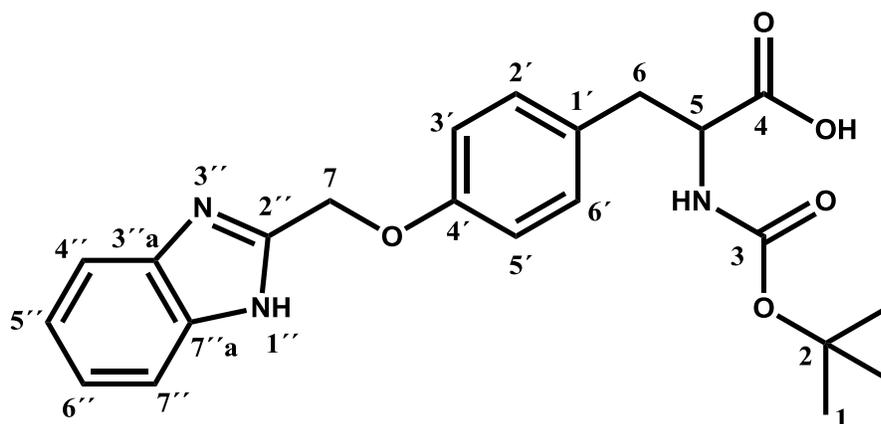
Tabla 8. Propiedades fisicoquímicas y rendimientos de los compuestos sintetizados.

Comp.	PM (g/Mol)	Tiempo de Reacción (Hrs.)	Rendimiento %	P.F (°C)	Apariencia Física
M1	411	8	89	113.7-114.2	Sólido amarillo
M2	422	8	87	139.8-140.0	Sólido blanco
M3	447	8	92	133.5-135.3	Sólido blanco
M4	472	7	85	119.6-120.8	Sólido blanco
M5	421	9	92	172.2-173.3	Sólido blanco
Bencimidazol	166	8	95	146.1-148.2	Sólido amarillo
Boc-Tyr	281	9	80	132.3–134.5	Sólido blanco

8.1.6.- Caracterización ^1H y ^{13}C RMN del compuesto M1.

Para apreciar y realizar de manera adecuada una comparación los resultados obtenidos mediante resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C para los compuestos **M1 – M5**, se realizaron las **tablas 9 – 13** donde se puede observar que los desplazamientos, las integrales, la multiplicidad y las constantes de acoplamiento correspondientes a la Boc-tirosina guardan relación entre todas las estructuras.

Tabla 9. Desplazamientos, integrales, multiplicidad y las constantes de acoplamiento de los espectros de RMN ^1H y ^{13}C para el compuesto **M1**.

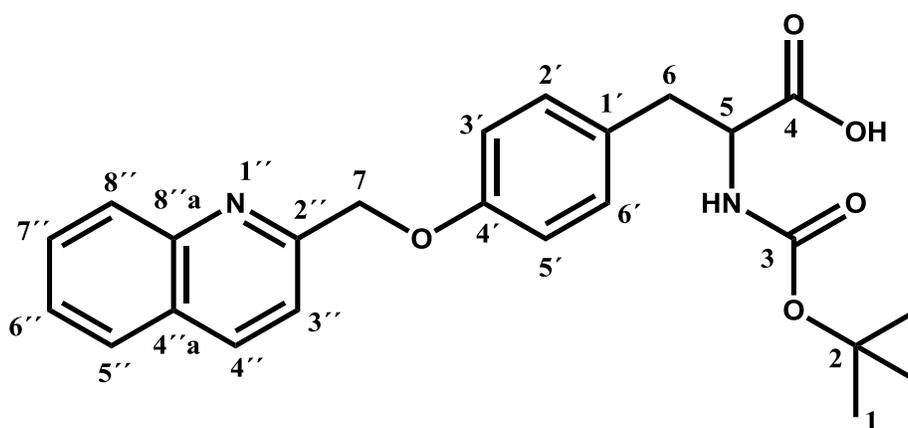


Posición	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
1	1.26 (s, 9H)	28.6
2	---	78.1
3	---	155.9
4	---	175.4
5	3.8 (b, 1H)	57.1
6	2.85 (m, 2H)	37.2
7	4.67 (s, 2H)	57.8
1'	---	129.3
2', 6'	6.89 (d, $J_o= 8.2$ Hz, 2H)	130.7
3', 5'	6.56 (d, $J_o= 8.2$ Hz, 2H)	115.1
4'	---	155.9
2''	---	155.3
3'' a	---	138.7
4''	7.48 (dd, $J_o= 9.0, 3.0$ Hz, 2H)	115.3
5''	7.12 (dd, $J_o= 9.2, 3.4$ Hz, 2H)	122.0

6''	7.12 (dd, $J_o = 9.2, 3.4$ Hz, 2H)	122.0
7''	7.48 (dd, $J_o = 9.0, 3.0$ Hz, 2H)	115.3
7''a	---	138.7

8.1.7.- Tabla de caracterización ^1H y ^{13}C RMN del compuesto M2

10. Desplazamientos, integrales, multiplicidad y las constantes de acoplamiento de los espectros de RMN ^1H y ^{13}C para el compuesto M2.

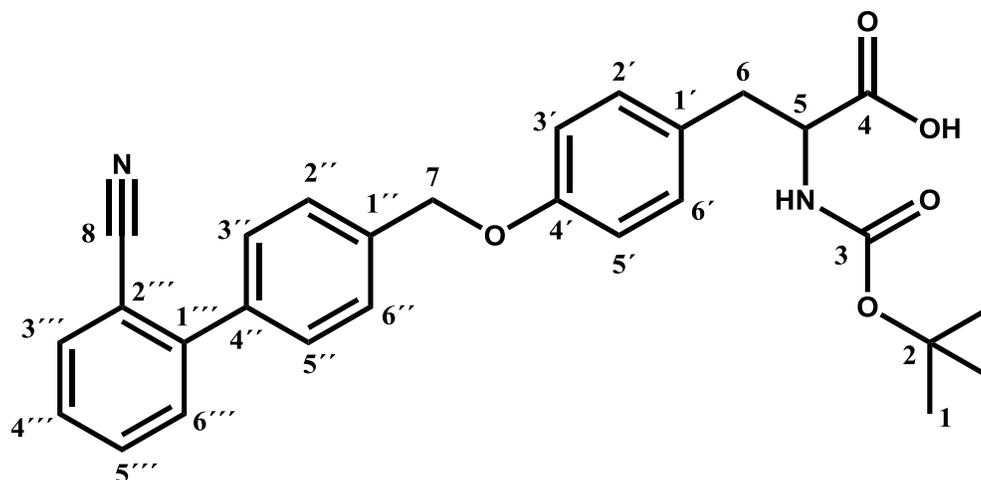


Posición	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
1	1.41 (s, 9H)	28.5
2	---	80.0
3	---	158.1
4	---	174.5
5	4.60 (b, 1H)	54.8
6	3.12 (m, 2H)	37.4
7	5.23 (s, 2H)	69.8
1'	---	127.9
2', 6'	7.14 (d, $J_o = 7.6$ Hz, 2H)	130.9

3', 5'	6.86 (d, $J_o=7.6$ Hz, 2H)	114.9
4'	---	155.5
2''	---	157.3
3''	7.52 (t, $J_o= 7.2$ Hz, 1H)	119.3
4''	8.20 (d, $J_o= 8.12$ Hz, 1H)	138.5
4''a	---	127.9
5''	7.79 (d, $J_o= 7.76$ Hz, 1H)	127.5
6''	7.70 (t, $J_o= 8.4$ Hz, 2H)	127.1
7''	7.70 (t, $J_o= 7.2$ Hz, 2H)	129.5
8''	8.12 (d, $J_o= 8.8$ Hz, 1H)	130.7
8''a	---	146.2

8.1.8.- Tabla de caracterización ^1H y ^{13}C RMN del compuesto M3

Tabla 11. Desplazamientos, integrales, multiplicidad y las constantes de acoplamiento de los espectros de RMN ^1H y ^{13}C para el compuesto M3.

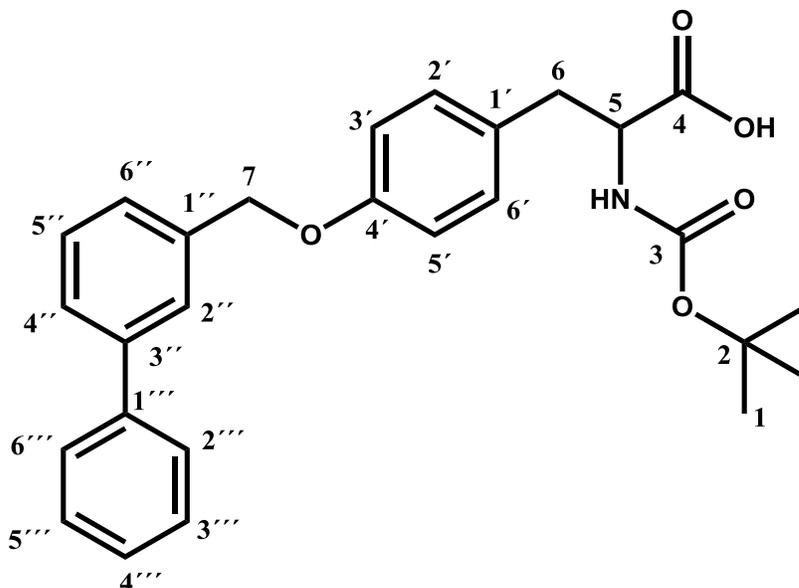


Posición	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
1	1.33 (s, 9H)	28.1

2	---	78.4
3	---	157.1
4	---	172.2
5	4.23 (d, 1H)	55.8
6	2.93 (m, 2H)	35.6
7	5.16 (s, 2H)	68.7
8	---	118.6
1'	---	129.7
2', 6'	7.19 (d, $J_o=7.2$ Hz, 2H)	130.2
3', 5'	6.96 (d, $J_o=6.8$ Hz, 2H)	114.5
4'	---	155.5
1''	---	137.8
2'', 6''	7.57 (m, 5H)	128.8
3'', 5''	7.57 (m, 5H)	128.2
4''	---	137.3
1'''	---	144.2
2'''	---	110.2
3'''	7.93 (d, $J_o=6.0$ Hz, 1H)	136.5
4'''	7.43 (d, $J_o=7.2$ Hz, 1H)	127.9
5'''	7.76 (d, $J_o=5.2$ Hz, 1H)	133.9
6'''	7.57 (m, 5H)	133.6

8.1.9.- Tabla de caracterización ^1H y ^{13}C RMN del compuesto M4

Tabla 12. Desplazamientos, integrales, multiplicidad y las constantes de acoplamiento de los espectros de RMN ^1H y ^{13}C para el compuesto **M4**.

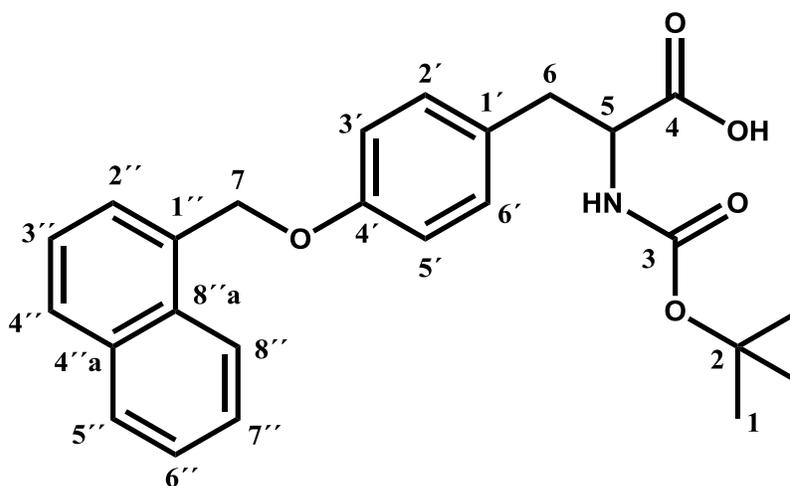


Posición	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
1	1.46 (s, 9H)	28.4
2	---	80.3
3	---	157.9
4	---	175.9
5	4.62 (m, 1H)	54.6
6	3.15 (m, 2H)	37.1
7	5.09 (s, 2H)	70.0
1'	---	129.0
2', 6'	7.17 (d, $J_o= 8.2$ Hz, 2H)	130.6
3', 5'	6.97 (d, $J_o= 8.6$ Hz, 2H)	115.0
4'	---	155.6
1''	---	137.6

2''	7.56 (s, 9H)	126.5
3''	---	141.6
4''	7.56 (s, 9H)	126.8
5''		126.3
6''	7.41 (d, $J_o= 8.6$ Hz, 1H)	129.1
1'''	---	140.9
2''', 6'''	7.77 (d, $J_o= 7.4$ Hz, 2H)	127.2
3''', 5'''	7.46 (dd, $J_o= 8.6$ Hz, 2H)	128.8
4'''	7.56 (s, 9H)	127.5

8.1.10.- Tabla de caracterización ^1H y ^{13}C RMN del compuesto M5

Tabla 13. Desplazamientos, integrales, multiplicidad y las constantes de acoplamiento de los espectros de RMN ^1H y ^{13}C para el compuesto M5.



Posición	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
1	1.42 (s, 9H)	28.3
2	---	80.3
3	---	157.9

4	---	176.5
5	4.60 (d, 1H)	54.4
6	3.12 (dd, 2H)	37.0
7	5.46 (s, 2H)	68.6
1'	---	128.3
2', 6'	7.17 (d, $J_o= 8.6$ Hz, 2H)	130.5
3', 5'	6.97 (d, $J_o= 8.2$ Hz, 2H)	115.0
4'	---	155.5
1''	---	133.8
2''	7.45 (m, $J_o= 7.8$ Hz, 4H)	125.3
3''	7.42 (m, $J_o= 7.0$ Hz, 4H)	126.6
4''	7.84 (m, $J_o= 7.8$ Hz, 1H)	129.0
4''a	---	132.2
5''	7.88 (m, $J_o= 9.2$ Hz, 1H)	128.7
6''	7.50 (m, $J_o= 7.2$ Hz, 4H)	125.9
7''	7.55 (m, $J_o= 7.8$ Hz, 4H)	126.4
8''	8.02 (m, $J_o= 9.0, 8.0$ Hz, 4H)	123.7
8''a	---	131.5

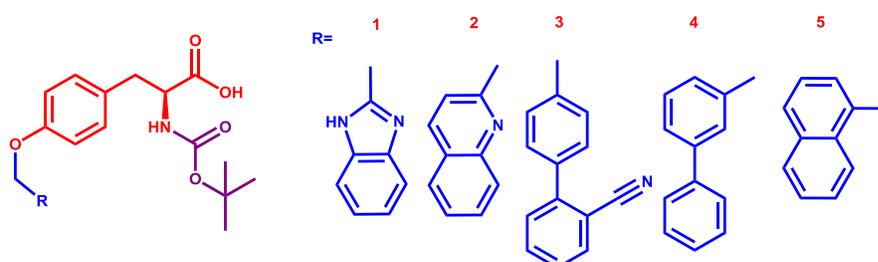
8.2 Resultados *in silico* (a priori).

8.2.1.- Resultados *in silico* obtenidos del programa computacional admetSAR de los compuestos M1-M5 versus chigitazar, muraglitazar y farglitazar.

En la **tabla 14** se muestran los resultados obtenidos por el programa computacional admetSAR para los compuestos **M1-M5** en comparación con chigitazar, muraglitazar y farglitazar. Todos los compuestos diseñados (**M1-M5**) presentan una buena probabilidad de absorberse de manera intestinal en comparación con chigitazar y farglitazar que muestra mediana probabilidad, esto

podría atribuirse a los resultados obtenidos en las reglas de Lipinski y Veber las cuales impactan de manera directa en la solubilidad y absorción de las moléculas. Por otra parte, todos los compuestos tienen una mediana probabilidad de ser sustratos, pero no inhibidores de la glicoproteína-P la cual nos indica que podría presentar resistencia a fármacos pero no toxicidad por acumulación. En la prueba de AMES la cual está relacionada con la genotoxicidad, todos los compuestos muestran valores negativos al igual que en la prueba de carcinogénesis.

Tabla 14. Resultados *in silico* del programa computacional admetSAR de los compuestos **M1-M5** versus chigitazar, muraglitazary farglitazar.



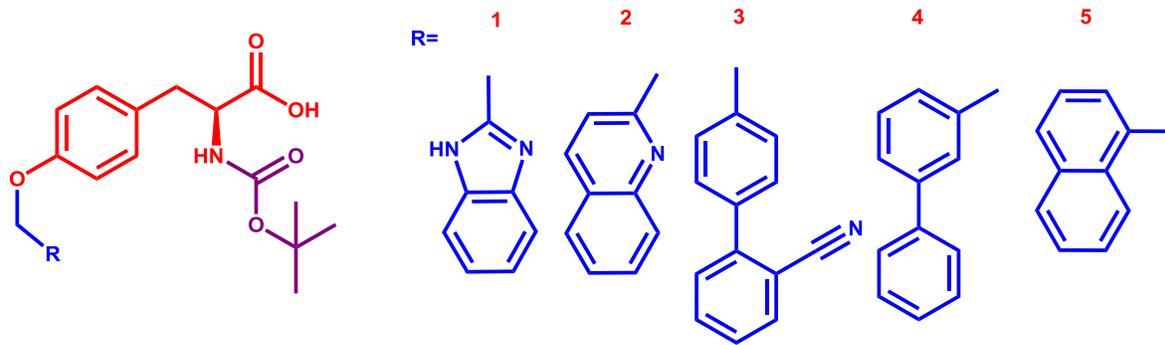
Comp.	Absorción intestinal	Sustrato de glicoproteína-P	Inhibidor de glicoproteína-P	Prueba de AMES	Carcinogénico
M1	97%	58%	No inhibidor	Negativo	Negativo
M2	93%	73%	No inhibidor	Negativo	Negativo
M3	98%	58%	No inhibidor	Negativo	Negativo
M4	98%	65%	No inhibidor	Negativo	Negativo
M5	98%	77%	No inhibidor	Negativo	Negativo
Chig.	64%	64%	No inhibidor	Negativo	Negativo
Mur.	92%	59%	No inhibidor	Negativo	Negativo
Farg.	70%	69%	No inhibidor	Negativo	Negativo

Chig.= Chigitazar, **Mur.**= Muraglitazar, **Farg.**= Farglitazar

8.2.2.- Resultados *in silico* obtenidos del programa computacional ACD/ToxSuite de los compuestos M1-M5 versus chiglitazar, muraglitazar y farglitazar.

En la **tabla 15** se muestran los resultados obtenidos por el programa computacional ACD/ToxSuite, para los compuestos diseñados (**M1-M5**) en comparación con chiglitazar, muraglitazar, farglitazar y algunos fármacos que sirven de referencia para cada una estas pruebas. La prueba de bloqueo de canales hERG que está asociado a arritmias cardiacas, los compuestos **M1-M5** muestran baja probabilidad de bloquear dichos canales en comparación con chiglitazar y farglitazar que tienen una probabilidad del 90%, valor similar a *Terfenadina* (fármaco que se toma como referencia por bloquear un 99% los canales hERG y será altamente cardiotoxico). Por otra parte en la Inhibición de las isoformas del citocromo P450 (CYP3A4, CYP2D6 y CYP2C9) encargadas del metabolismo de fármacos, está asociada a interacciones medicamentosas y toxicidad. Los compuestos **M1-M5** muestran una mediana a baja probabilidad de inhibir estas isoformas, en comparación con chiglitazar y farglitazar que presentan una probabilidad de mediana a alta, con valores similar a ketoconazol (fármaco que se toma como referencia por inhibir un 99% la isoforma CYP3A4). Por último, la dosis letal media (DL₅₀) por vía oral (P.O) en rata y ratón de los compuestos **M1-M5** entran en categoría 3 (prácticamente no toxico) en comparación con muraglitazar (ligeramente toxico).

Tabla 15. Resultados *in silico* del programa computacional ACD/ToxSuite de los compuestos **M1-M5** versus chigitazar, muraglitazary farglitazar.



Comp.	Probabilidad de bloquear los canales hERG	Probabilidad de $Cl_{50} < \mu M$ isoformas de citocromo P450			Especie y vía de administración DL_{50} (mg/kg)	
		CYP3A4	CYP2D6	CYP2C9	Ratón/Oral	Rata/Oral
M1	11%	43%	3%	17%	2400	2700
M2	10%	46%	6%	12%	4400	5600
M3	7%	34%	8%	13%	5600	6000
M4	3%	40%	7%	22%	4800	4900
M5	10%	35%	7%	20%	4700	3200
Chig.	90%	87%	41%	90%	5000	5100
Mur.	13%	69%	10%	34%	1200	200
Farg.	90%	86%	43%	90%	4900	4300
Terf.	98%	29%	39%	7%	1200	2000
Ket.	96%	93%	2%	13%	1300	320

Chig.= Chigitazar, **Mur.**= Muraglitazar, **Farg.**= Farglitazar, **Terf.**= Terfenadina, **Ket.**= Ketokonazol.

Estos resultados *in silico* nos indican que los compuestos diseñados y sintetizados (**M1-M5**) son menos tóxicos que chigitazar, muraglitazar y farglitazar, lo que nos lleva a corroborar posteriormente con ensayos *in vivo*

8.3 Resultados parte farmacológica

8.3.1 Resultados de la evaluación *in vitro* de la actividad inhibitoria sobre la enzima PTP-1B

En la **figura 27** se muestra la actividad residual de la enzima PTP1B en presencia de los compuestos **M1 – M5**, en comparación con la actividad enzimática al 100% en presencia del control positivo (fosfato de *p*-nitrofenilo y ausencia de inhibidores) que se muestra en la primera barra

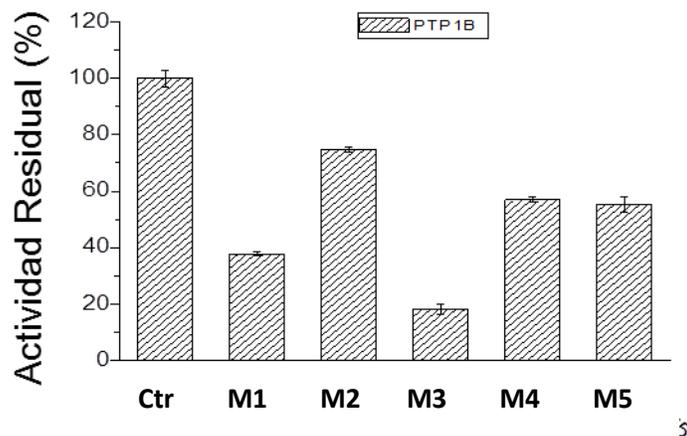


Figura 27. Actividad residual de la enzima PTP1B.

Para apreciar de una manera más clara estos resultados se hizo la conversión de los datos de la actividad residual sobre la enzima PTP-1B a porcentaje (%) de inhibición. En la **figura 28** se muestra el porcentaje de inhibición enzimática (PTP1B) a 50 μ M, en donde se puede observar que los compuestos **M1** (bencimidazol como sustituyente) y **M3** (bifenilcarbonitrilo como sustituyente) inhiben un 60% y 80% la actividad enzimática respectivamente. En contraste con los compuestos **M2** (quinolina), **M4** (naftaleno) y **M5** (bifenilo) los cuales mostraron ser inhibidores débiles con un 40 % de inhibición. El compuesto **M3** fue 20% más eficaz que el compuesto **M1**.

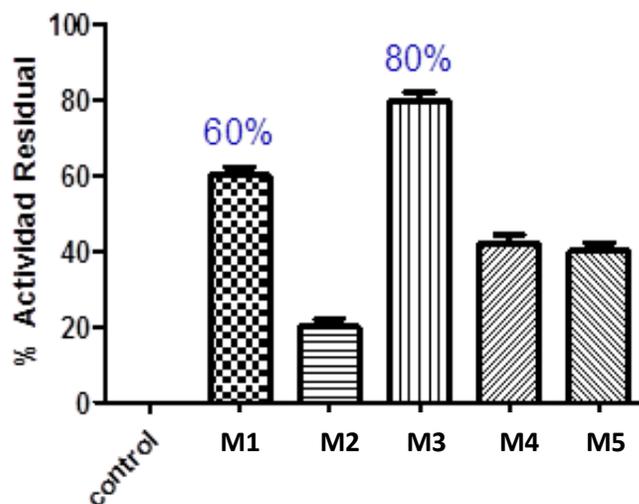


Figura 28. Porcentaje de inhibición de la actividad de PTP-1B obtenida incubando la enzima en presencia de los compuestos **M1 - M5** a 50 μM . DMSO se usó como control. Cada dato representa la media \pm S.E.M. (n = 4).

Tomando en cuenta los resultados anteriores, se realizó una prueba adicional para determinar la CI_{50} de los compuestos más activos (**M1** y **M3**).

8.3.2.- Cálculo de la concentración inhibitoria media sobre la enzima PTP1B.

En las **figura 29** se muestran que los compuestos **M1** posee una concentración inhibitoria media (CI_{50}) de $43.6 \pm 0.7 \mu\text{M}$ y **M3** son equipotentes ya que ambos poseen una concentración inhibitoria media (CI_{50}) de 44 ± 3.0 respectivamente.

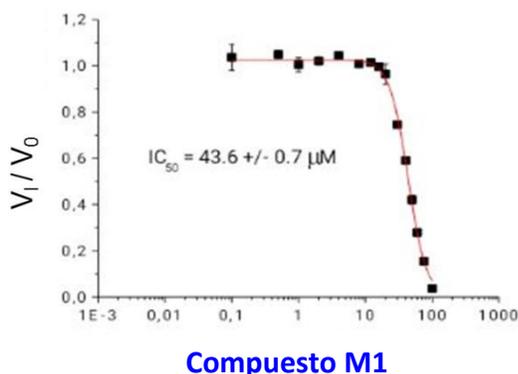


Figura 29. El valor de CI_{50} para los compuestos **M1** se calculó representando los datos relativos a la actividad residual de la PTP-1B frente a la concentración de los compuestos M1. Se emplearon quince concentraciones de inhibidor. Todos los ensayos se realizaron por cuadruplicado. Los datos representan la media \pm S.E.M.

En la **figura 30** se muestran que los compuestos **M3** posee una concentración inhibitoria media (CI_{50}) de $44 \pm 3.0 \mu\text{M}$

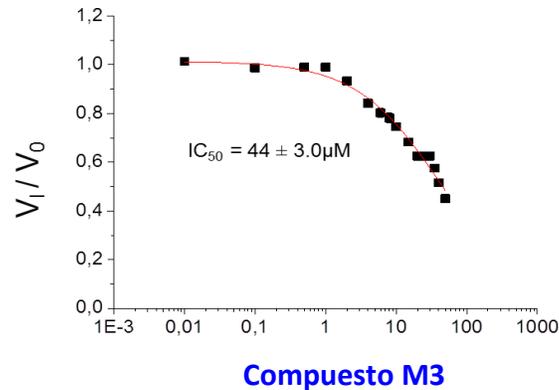


Figura 30. El valor de CI_{50} para los compuestos **M3** se calculó representando los datos relativos a la actividad residual de la PTP-1B frente a la concentración de los compuestos **M3**. Se emplearon quince concentraciones de inhibidor. Todos los ensayos se realizaron por cuadruplicado. Los datos representan la media \pm S.E.M.

Como se puede observar en ambas figuras (**29 y 30**), los compuestos son equipotentes ya que poseen una concentración inhibitoria media (CI_{50}) de 44 ± 3.0 respectivamente.

8.3.3.- Expresión relativa de $PPAR\alpha$, $PPAR\gamma$ y FATP/ GLUT4

En las **Figuras 31 - 34** se puede observar que los compuestos **M1** y **M3** aumentaron de manera significativa los niveles de expresión de los RNAs de $PPAR\alpha$, $PPAR\gamma$ y FATP y GLUT4, siendo mejores que los fármacos de referencia fenofibrato y pioglitazona.

Como se puede observar en la **figura 31** el compuesto **M1** aumentó significativamente (alrededor de 8) los niveles de expresión de RNAm de $PPAR\alpha$ más que el adipocito sin tratamiento (línea celular 3T3-L1). Mientras, que el compuesto **M3** aumentó alrededor de 3 veces los niveles de expresión de RNAm de $PPAR\alpha$.

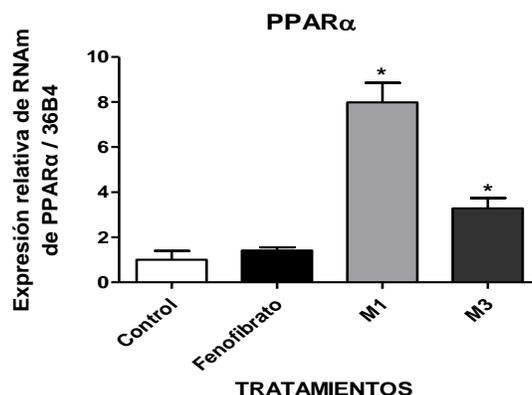


Figura 31. Influencia de los compuestos **M1**, **M3** y fenofibrato sobre los cambios en la expresión relativa de ARNm de PPAR α . Los resultados son la media \pm S.E.M. (n = 5). * p <0.001 en comparación con el grupo de control.

En la **figura 32** el compuesto **M1** y el compuesto **M3** aumentaron significativamente (alrededor de 10 y 15 veces respectivamente) los niveles de expresión de RNAm de FATP1 más que el adipocito sin tratamiento (línea celular 3T3-L1).

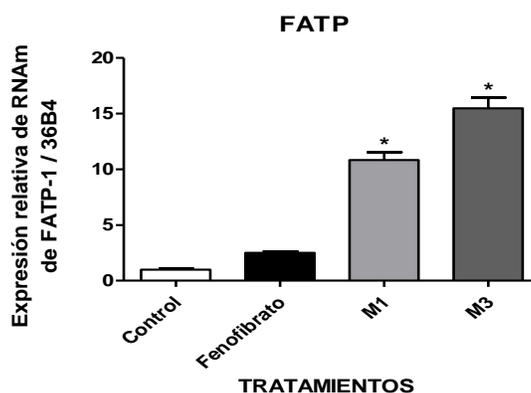


Figura 32. Influencia de los compuestos M1, M3 y fenofibrato en la expresión relativa de ARNm de FATP-1. Los resultados son la media \pm S.E.M. (n = 5). * p <0.001 en comparación con el grupo de control.

Estas activaciones podrían mejorar la captación celular de ácidos grasos, reducir los niveles de triglicéridos en plasma mejor que fenofibrato y mostrar efectos benéficos al prevenir riesgos cardiovasculares.

En la **figura 33** podemos observar que el compuesto **M1** aumentó (alrededor de 8 veces) los niveles de expresión de RNAm de PPAR γ . Mientras que el compuesto **M3** solamente aumentó alrededor de 2.5 veces.

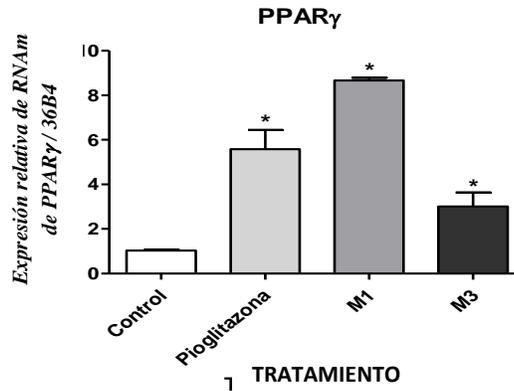


Figura 33. Influencia de los compuestos **M1**, **M3** y pioglitazona sobre los cambios en la expresión relativa de ARNm de PPAR γ . Los resultados son la media \pm S.E.M. (n = 5). * p < 0.001 en comparación con el grupo de control.

En la **figura 34** podemos observar que el compuesto **M1** aumentó alrededor de 2.5 veces los niveles de expresión de GLUT4 con respecto al adipocito sin tratamiento. Por otra parte, el compuesto **M3** no mostró un aumento significativo.

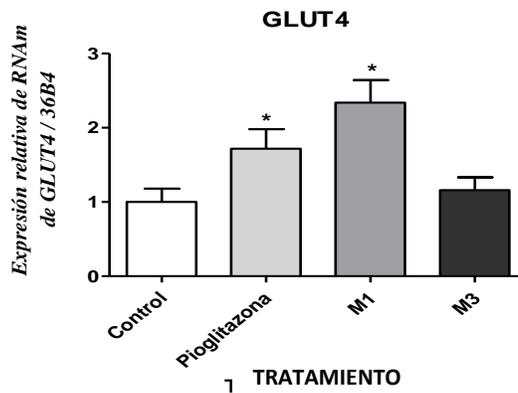


Figura 34. Influencia de los compuestos **M1**, **M3** y pioglitazona en la expresión relativa de ARNm de GLUT4. Los resultados son la media \pm S.E.M. (n = 5). * p < 0.001 en comparación con el grupo de control.

Estos resultados nos indican que la activación de PPAR γ y GLUT4 que presenta el compuesto **M1** podría reducir la glucemia en personas diabéticas mejor que pioglitazona. Por otra parte, con estos resultados podemos inferir que el aumento de los niveles de expresión de las proteínas FATP y GLUT4 no siempre son dependientes del aumento de expresión de RNAs de PPAR α y PPAR γ .

Finalmente, la tendencia actual en el desarrollo de nuevos fármacos es la actividad polifarmacológica (multitarget) es decir; moléculas que son reconocidas por diferentes dianas terapéuticas para modular distintas funciones fisiológicas y alcanzar la terapéutica deseada.¹⁸ Como se puede observar que el compuesto **M1** podría poseer una actividad polifarmacológica (multitarget) al aumentar la expresión de RNAm de PPAR α , PPAR γ y sus proteínas de expresión FATP1 y GLUT4, el cual podría disminuir los niveles de glucosa y triglicéridos en plasma, aumentando la sensibilidad a la insulina y previniendo complicaciones cardiovasculares simultáneamente.

8.3.4.- Resultados de los compuestos M1 y M3 sobre un modelo murino de diabetes no insulino dependiente.

Se seleccionaron los compuestos más activos en el ensayo *in vitro* para la evaluación *in vivo* en un modelo murino de diabetes mellitus no insulino dependiente.

Se seleccionaron los compuestos más activos del ensayo *in vitro* para la realización de la evaluación *in vivo* en un modelo murino de diabetes mellitus no insulino dependiente. En la **Figura 35** se muestran que los resultados de la administración intragástrica del compuesto **M1** (100mg/kg) comenzó a disminuir de manera significativa los niveles de glucosa en plasma en un modelo murino de diabetes no insulino dependiente a partir de la primer hora, logrando disminuir hasta un 50 % los niveles de glucosa en plasma durante el transcurso del ensayo con respecto al grupo control (vehículo). Las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas que presenta el compuesto **M1** en este ensayo podrían ser atribuidas a la estructura privilegiada de tipo bencimidazol en la región hidrofóbica, la cual favorece las interacciones con diferentes dianas terapéuticas (PPARs, FATP1/GLUT4 y PTP1B) y al mismo tiempo le brinda ciertas características fisicoquímicas (explicadas anteriormente en las reglas de Lipinski y Veber) (**figura**

36) que impactan de manera directa en la solubilidad y absorción de dicha molécula.

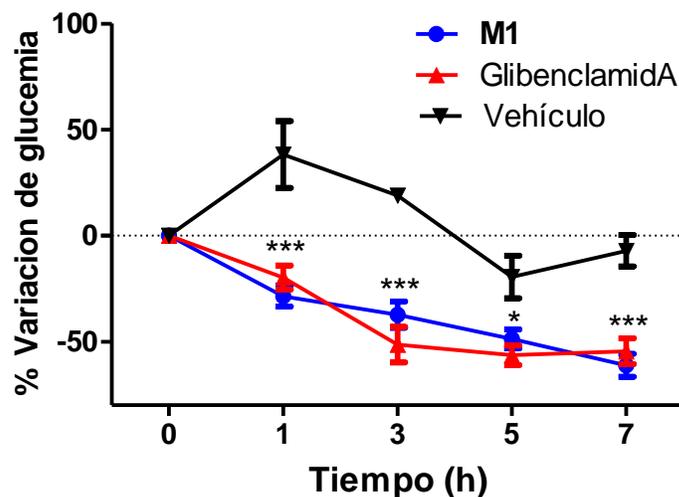


Figura 35. Influencia de una dosis intragástrica de 100 mg / kg del compuesto **M1** y 5 mg/kg de glibenclamida en el modelo de ratones hiperglucémicos STZ / NA (n = 6). *** p <0,05 frente al grupo del vehículo (Tween 80, 10% v / v).

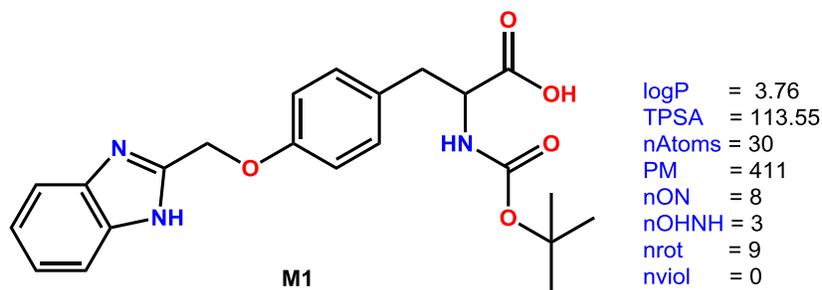


Figura 36. Características fisicoquímicas de las reglas de Lipinski y Veber

*Coeficiente de Partición (logP), Area Polar Superficial (TPSA), número de átomos (nÁtomos), Peso Molecular (PM), número de Aceptores de Puentes de Hidrógeno (nON), número de Donadores de Puentes de Hidrógeno (nOHNH), número de enlaces rotables (nrot), nviol (número de violaciones a estas reglas).

En la **Figura 37** los resultados de la administración intragástrica del compuesto **M3** (100 mg/kg) en un modelo murino de diabetes no insulino dependiente. El compuesto **M3** comenzó a disminuir los niveles de glucosa a partir de la tercer

hora, logrando disminuir hasta un 50% durante el transcurso del ensayo. Las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas que presenta el compuesto **M3** son atribuidas a que dicho compuesto solamente muestra interacción con una de las dianas terapéuticas (enzima PTP-1B). Además, viola uno de los postulados (coeficiente de partición) de la regla de Lipinski y Veber (**figura 38**) generando una farmacocinética errática, retardando de esta manera la absorción intestinal y por ende la acción de este compuesto.

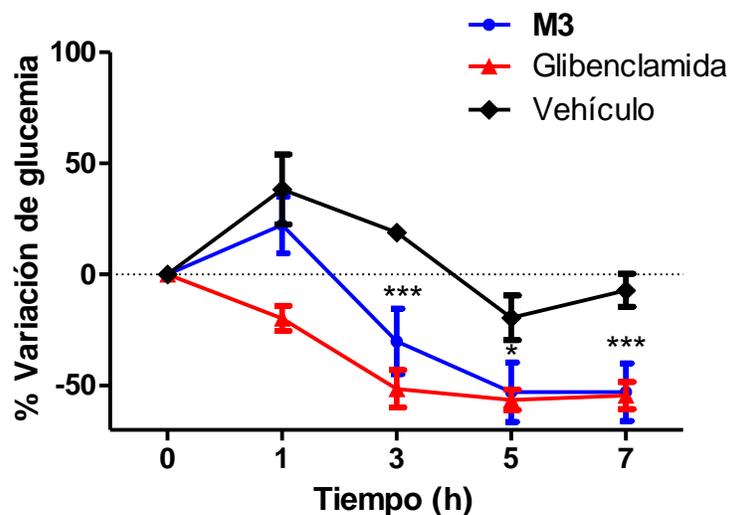


Figura 37. Influencia de una dosis intragástrica de 100 mg / kg del compuesto **M3** y 5 mg/kg de glibenclamida en el modelo de ratones hiperglucémicos STZ / NA (n = 6). *** p <0,05 frente al grupo del vehículo (Tween 80, 10% v / v).

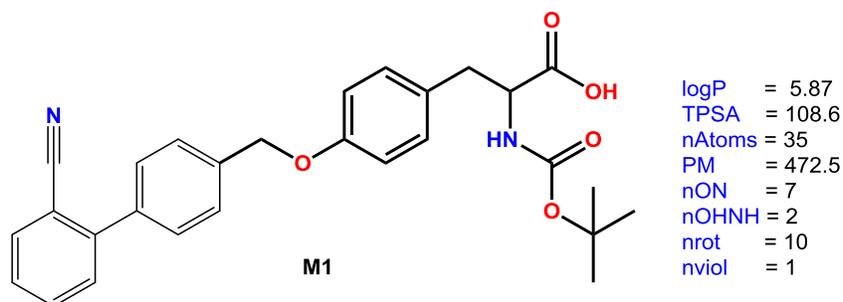


Figura 38. Características fisicoquímicas de las reglas de Lipinski y Veber

8.3.5.- Ensayo oral de tolerancia a la glucosa (OGTT)

Con el fin de verificar el posible efecto antihiper glucémico o hipoglucémico de los compuestos, se llevó a cabo un ensayo oral de tolerancia a la glucosa en ratones normoglucémicos. El compuesto **M1** fue elegido de acuerdo a los resultados obtenidos en el ensayo antidiabético agudo. En la **figura 39** se puede observar como el compuesto **M1** (100 mg/kg) disminuye los niveles de glucosa en plasma de manera significativa con respecto al grupo control (vehículo) 60 minutos después de una carga de glucosa (2 g/kg), el cual presenta el valor máximo de glucosa en sangre en el mismo tiempo.

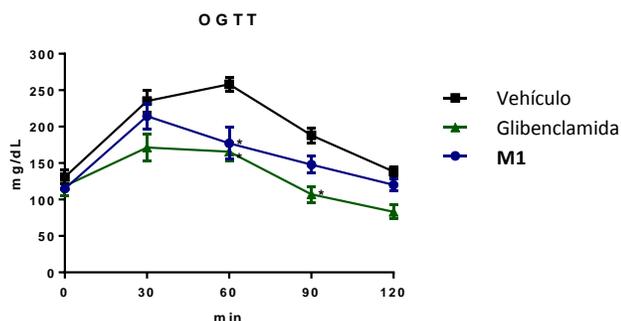


Figura 39. OGTT, y AUC de los compuestos **M1** y **M3**. * Diferencia estática comparada frente al grupo de vehículos. Prueba de Dunnett anova post hoc de una vía y dos vías (n = 6, media ± SEM, p <0,05).

El **figura 40** se confirma la eficacia del compuesto **M1**, disminuyendo el valor de AUC alrededor del 25% de manera significativa (p = 0,05).

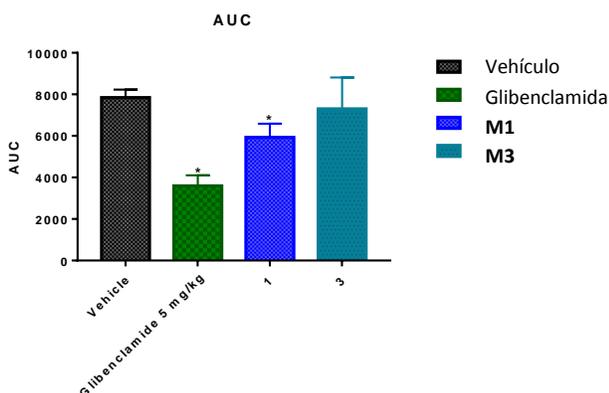


Figura 40. AUC de los compuestos **M1** y **M3**. * Diferencia estática comparada frente al grupo de vehículos. Prueba de Dunnett anova post hoc de una vía y dos vías (n = 6, media ± SEM, p <0,05).

Los niveles de glucosa no disminuyeron más allá del valor inicial, lo que indica que la acción antidiabética del compuesto **M1** se debe a un efecto antihiper glucémico más que a un efecto hipoglucémico, de acuerdo con la inhibición de PTP1B y la activación de PPAR γ relacionada con una sensibilización a insulina. El compuesto **M3** no mostró actividad significativa en OGTT.

8.4 Resultados parte *in silico* (a posteriori).

8.4.1.- Resultados del acoplamiento molecular de los compuestos **M1** y **M3** con PPAR α .

Para darnos una idea de cómo es que interactúan los compuestos **M1** y **M3** con los PPARs y la enzima PTP1B se realizó un acoplamiento molecular con cada una de las proteínas cristalizadas (códigos PDB: 1K7L, 1K74 y 4Y14 respectivamente). Los compuestos **M1** y **M3** mostraron buenas energías libres de unión de -8.2 Kcal/mol y -9.9 Kcal/mol acoplados con PPAR α y -10.7 Kcal/mol, -9.6 Kcal/mol acoplados con PPAR γ respectivamente. En la **figura 41 A-B** se muestran el modo de unión de los compuestos **M1** y **M3** con PPAR α mostrando interacciones de puente de hidrógeno con los aminoácidos His 440, Tyr 464, Tyr 314, Ser 280, los cuales son esenciales para la activación de estos receptores nucleares.

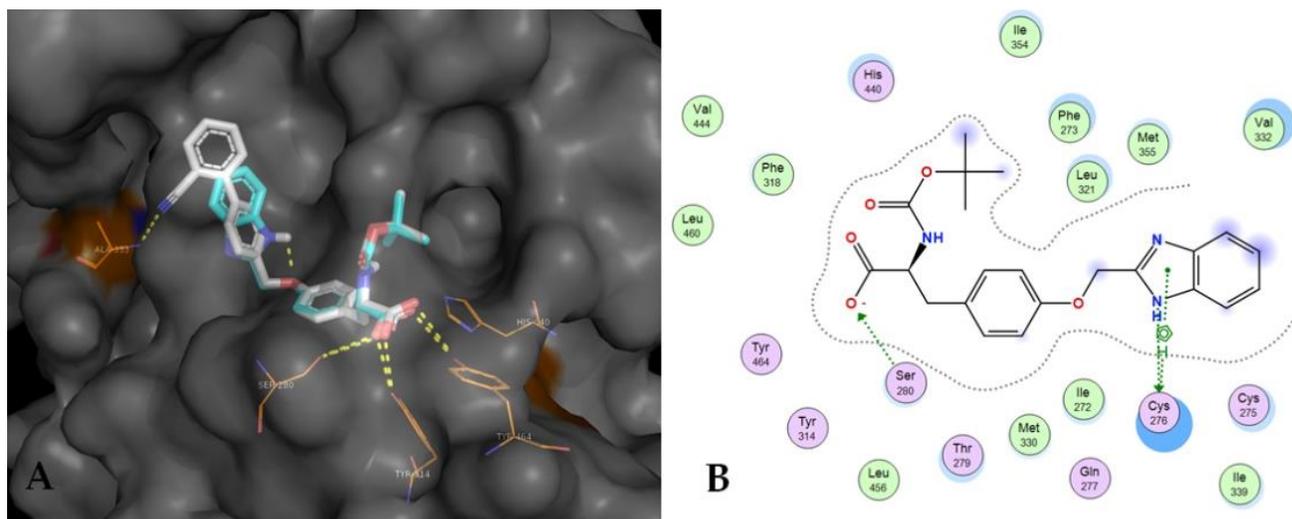


Figura 41. (A) Diagrama de unión tres dimensiones (3-D) de los compuestos **M1** y **M3** en el sitio de unión de ligandos de PPAR α . Los modelos de barras representan: compuesto M1 (azul), M3 (blanco) y aminoácidos como líneas naranjas. Las líneas amarillas sugieren contactos polares. (B) mapa de interacción en dos dimensiones (2-D) para el compuesto **M1** unido a PPAR α .

8.4.2.- Resultados del acoplamiento molecular de los compuestos M1 y M3 con PPAR γ .

En la **figura 42 A-B** se muestran el modo de unión de los compuestos **M1** y **M3** con el sitio de unión a ligandos con **PPAR γ** , mostrando interacciones de puente de hidrógeno con los aminoácidos (His 449, Tyr 473, His 323, Ser 289 y Cys 285) que juegan un papel importante en la activación de este receptor nuclear.

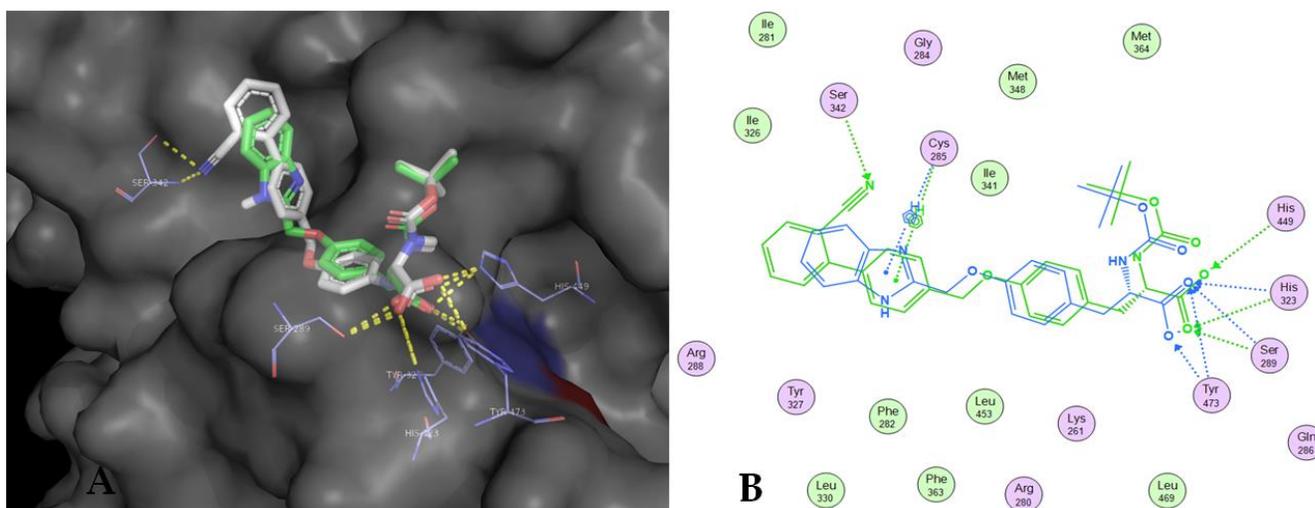


Figura 42. (A) Diagrama de unión tres dimensiones (3-D) de los compuestos **M1** y **M3** en el sitio de unión de ligandos de PPAR γ . Los modelos de barras representan: compuesto **M1** (verde), **M3** (blanco) y aminoácidos como líneas moradas. Las líneas amarillas sugieren contactos polares. (B) mapa de interacción dos dimensiones (2-D) para los compuestos **M1** y **M3** en PPAR γ .

8.4.3.- Resultados del acoplamiento molecular de los compuestos M1 y M3 con la enzima PTP1-B.

Por último, el modo de unión de los compuestos **M1** y **M3** con el sitio de unión a ligandos de la enzima PTP1B se muestra en la **figura 43**, sugiere que ambos compuestos no se internalizan en el sitio catalítico de la PTP-1B pero muestran una interacción iónica con el aminoácido Lys 120 en el sitio extendido de unión. Por otra parte el compuesto **M1** muestra una interacción adicional con el aminoácido Asp 48 razón por la cual se le atribuye una CI_{50} de 44 μ M contra la enzima PTP-1B siendo inhibidores moderados.

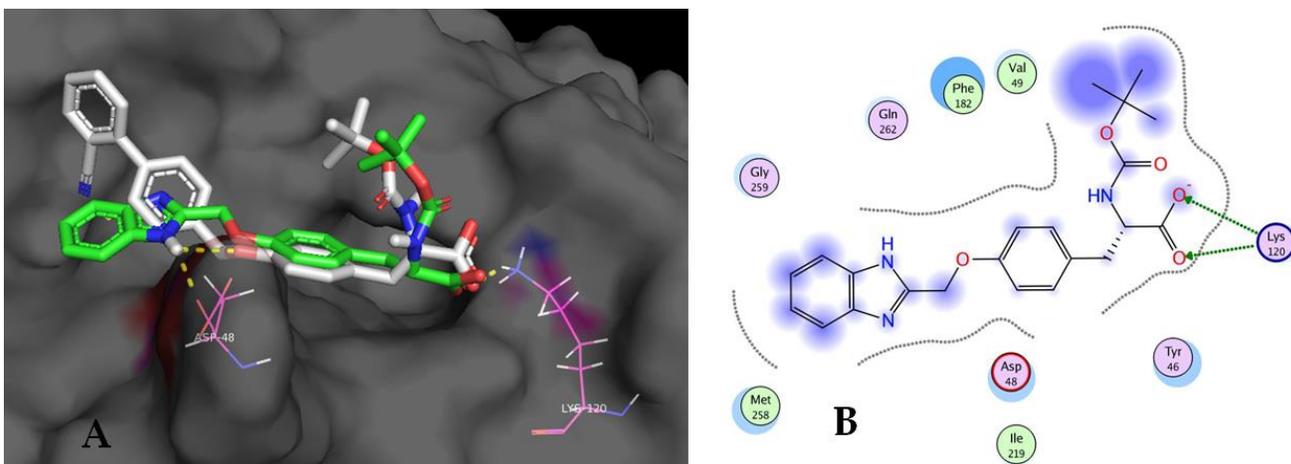


Figura 43. (A) Diagrama de unión de **M1** y **M3** en el sitio activo de PTP-1B. Los modelos de barras representan: **M1** (verde), **M3** (blanco) y aminoácidos como líneas magenta. Las líneas amarillas sugieren contactos polares. (B) mapa de interacción 2-D para **M1** sobre PTP.

9. CONCLUSIONES

- Se sintetizaron y caracterizaron los compuestos **M1 – M5**.
- Para los compuestos **M1 – M5** se realizaron ensayos de inhibición *in vitro* sobre la enzima PTP1B, mostrando que los compuestos **M1** y **M3** inhiben de manera significativa la actividad enzimática de la PTP-1B, siendo equipotentes con una CI_{50} 43 y 44 μ M respectivamente.
- Los compuestos **M1** y **M3** aumentaron significativamente (alrededor de 8 y 4 veces) los niveles de expresión de RNAm de PPAR α y (10 y 15 veces respectivamente) su proteína de expresión FATP1 mejor que el fármaco disponible en el mercado fenofibrato.
- El compuesto **M1** mostró un aumento significativo de 8 veces los niveles de expresión de RNA de PPAR γ y (2.5 veces) de su proteína de expresión GLUT4 mayor que el fármaco disponible en el mercado pioglitazona, sin embargo el compuesto **M3** no mostró activación sobre dicha diana terapéutica.
- Se realizaron los ensayos *in vivo* en un modelo murino de diabetes no insulino dependiente de los compuestos **M1** y **M3**, mostrando disminuir los niveles de glucosa hasta un 50% en el transcurso del ensayo.
- Para el compuesto **M1** se realizó el ensayo oral de tolerancia a la glucosa mostrando un efecto antihiper glucémico más que a un efecto hipoglucémico.
- En los estudios *in silico* de acoplamiento molecular, ambos compuestos (**M1** y **M3**) presentaron buenas interacciones de tipo puente de hidrógeno con los mismo aminoácidos que presentan los ligandos cocrystalizados.
- El compuesto **M1** es el más atractivo para continuar con la investigación ya que presentó un efecto polifarmacológico, siendo un ligando multiblancos terapéutico (LMBT) de tipo tritarget (tripartita), ya que presentó una buena CI_{50} sobre la enzima PTP-1B, aumentó de manera significativa los niveles

de expresión de RNA de PPAR α/γ y de sus proteínas de expresión FATP-1 y GLUT4 respectivamente. Además, en los ensayos *in vivo* mostró un efecto antihiper glucémico, así como, buen perfil farmacocinético debido a que no violó ninguno de los postulados a la regla de Lipinski y Veber.

10.- PERSPECTIVAS

- Determinar la Dosis Efectiva media (DE_{50}) en ensayos antidiabéticos de los compuestos **M1** y **M3** que manifestaron efecto polifarmacológico.
- Realizar las pruebas de toxicidad y ADMET de los compuestos **M1** y **M3**.
- Diseñar y sintetizar una nueva serie de compuestos bencimidazólicos, benzotiazólicos y benzoxazólicos análogos del compuesto **M1**, sustituidos en posición 5 o 6 con diferentes grupos electrodonadores y electroattractores y determinar su efecto polifarmacológico antidiabético.

11.- PARTE EXPERIMENTAL.

11.1 Instrumentación

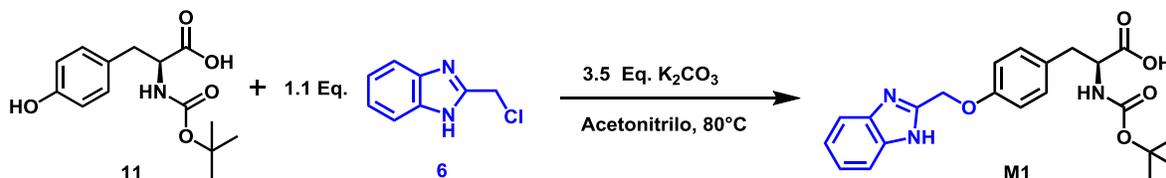
Las reacciones se hicieron por calentamiento convencional, para ello se usó una parrilla con agitador de la marca IKA Works, modelo Ceramag Midi, USA. Para el monitoreo de las reacciones y determinación de la pureza de los productos obtenidos se utilizaron placas de cromatografía de capa fina (ccf) en placas de aluminio de 2.5 x 4 cm recubiertas con gel de sílice Alugam SILG/UV254 (Macherey-Nagel). Y la visualización de estos compuestos orgánicos se realizó con una lámpara de luz ultravioleta marca ENTELA modelo UVGL-25 a una longitud de onda UV-254/366 nm. En la **tabla 16** se muestran los sistemas de elución que se emplearon para el monitoreo de las reacciones en este proyecto.

Tabla 16. Sistemas de elucidación utilizados para el monitoreo de los precursores y productos finales (**M1 – M5**).

Sistemas	Composición	Proporción
I	Hex-AcOEt	90:10
II	Hex-AcOEt	70:30
III	CH ₂ Cl ₂ -MeOH	98:02
IV	CH ₂ Cl ₂ -MeOH	95:05
V	CH ₂ Cl ₂ -MeOH	90:10

La evaporación de los disolventes se realizó a presión reducida empleando un rotaevaporador marca Buchi R-200, con vacío generado por una bomba marca FELISA modelo FE-1500L. Los puntos de fusión (Pf) se determinaron en un aparato marca SRS modelo EZ-MELTMPA120. Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN ¹H) y de carbono (RMN ¹³C), se determinaron en los espectrofotómetros de marca Varían modelo MERCURY-200 MHz y modelo INOVA-400 MHz, utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna y DMSO-*d*₆ como disolvente. Los espectros de masas en modalidad FAB+ se determinaron en un espectrómetro de masas de alta resolución marca JEOL modelo MStation 700 con un intervalo espectral de 1 a 5000 m/z.

11.1.- Metodología para la síntesis del Ácido-(S)-3-(4-((1H-benzo[d]imidazol-2-il)metoxi)fenil)-2-((tertbutoxicarbonil)amino)propanoico (M1).

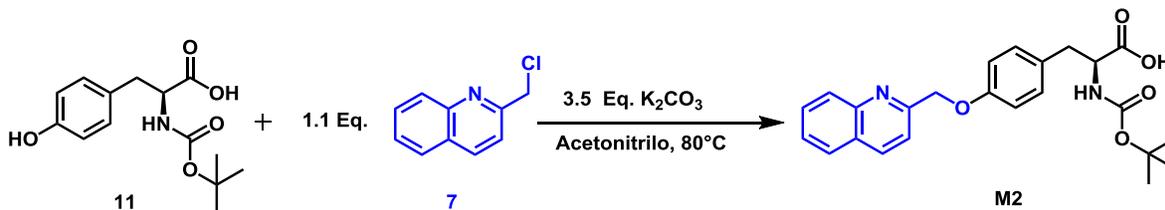


En un matraz bola de 50 mL acondicionado con agitación magnética, mantilla de calentamiento y refrigerante en posición de reflujo se disolvió 1 equivalente (0.5 g, 0.0017 mol) del precursor Boc-tirosina (**11**) en 5 mL de acetonitrilo y se hizo reaccionar con 2.5 equivalentes (0.859 g, 0.006 mol) de carbonato de potasio (K₂CO₃) durante 15 minutos, posteriormente se agregó 1.1 equivalentes (0.324 g, 0.0019 mol) de 2-clorometilbencimidazol (**6**) y se elevó la temperatura a 80°C. La reacción se monitoreó por cromatografía en capa fina (ccf) observando a las 12 horas de reacción el consumo total de las materias primas. La reacción se llevó a un pH de 6 agregando HCl al 10% y se evaporó la mayor cantidad de disolvente a alto vacío, posteriormente se agregaron 5 mL de agua helada obteniendo un precipitado el cual fue filtrado al vacío. El producto final fue purificado por placa preparativa obteniendo cristales amarillos con 89 % de rendimiento.

P.f 113.7-114.2 °C. $[\alpha]_D^{20} + 2$ (c, 0.1, CHCl₃). IR (cm⁻¹): 1018 (**C-O-C**), 1244 (**C(CH₃)₃**), 1510 (**N=C**), 1612 (**NCOO**), 1685 (**COO**). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 1.26 (s, 9H, **CH₃**), 2.85 (m, 2H, **Hβ**), 3.8 (b, 1H, **Hα**), 4.67 (s, 2H, **OCH₂**), 6.56 (d, *J*_o= 8.2 Hz, 2H, **H3, H5**), 6.89 (d, *J*_o= 8.2 Hz, 2H, **H2, H6**), 7.12 (dd, *J*_o= 9.2, 3.4 Hz, 2H, **H5', H6'**) 7.48 (dd, *J*_o= 9.0, 3.0 Hz, 2H, **H4', H7'**), ppm. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ: 28.59 (**CH₃**), 37.17 (**Cβ**), 57.12 (**Cα**), 57.82 (**OCH₂**), 78.08 (**C-tert**), 115.14 (**C3, C5**), 115.27 (**C4', C7'**), 122.04 (**C5', C6'**), 129.33 (**C1**), 130.69 (**C2, C6**), 138.72 (**C3'a, C7'a**), 155.29 (**C2'**), 155.86 (**NCOO**), 155.96 (**C4**),

175.39 (COOH) ppm; H.R.M.S.(FAB +): m/z 412.1899 [M + H]⁺ (Calculado para C₂₂H₂₅N₃O₅H⁺ 412.1794)

11.2.- Metodología para la síntesis del Ácido-(S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-(4-(quinolin-2-ilmetoxi)fenil)propanoico (M2).

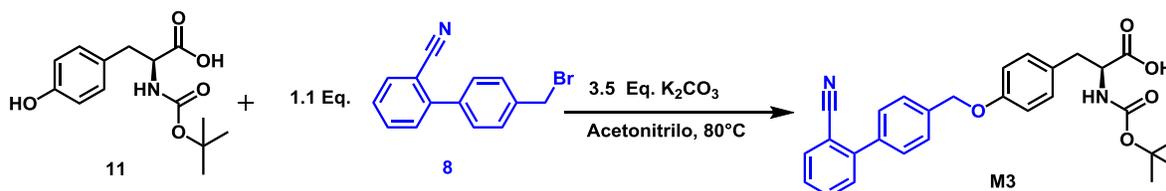


En un matraz bola de 50 mL acondicionado con agitación magnética, mantilla de calentamiento y refrigerante en posición de reflujo se puso a reaccionar 1 equivalente (0.5g, 0.0017 mol) del precursor Boc-tirosina (**11**) con 2.5 equivalentes (0.859 g, 0.006 mol) de carbonato de potasio (K₂CO₃) durante 15 minutos en 5 mL de acetonitrilo, posteriormente se agregó 1.1 equivalentes (0.404 g, 0.0019) de 2-clorometilquinolina (**7**) y se elevó la temperatura a 80°C. La reacción fue monitoreada cada hora por cromatografía en capa fina (ccf), el consumo total de las materias primas se observó a las 9 horas de reacción, posteriormente la reacción se dejó enfriar y se agregó HCl al 10% hasta llegar a un pH de 6, la mayor cantidad de disolvente se evaporó al vacío, se adicionaron 5 mL de agua fría obteniendo un precipitado el cual fue filtrado a alto vacío. El producto final fue purificado por placa preparativa obteniendo cristales blancos con 87 % de rendimiento.

P.f: 139.8-140.0°C. $[\alpha]_D^{20} + 14$ (c, 0.1, CHCl₃). IR (cm⁻¹): 1020-1161 (**C-O-C**), 1243 (**C(CH₃)₃**), 1508 (**N=C**), 1611 (**NCOO**), 1705 (**COO**). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.41 (s, 9H, **CH₃**), 3.12 (m, 2H, **Hβ**), 4.60 (b, 1H, **Hα**), 5.23 (s, 2H, **OCH₂**) 6.86 (d, *J*_o=7.6 Hz, 2H, **H3, H5**), 7.14 (d, *J*_o=7.6 Hz, 2H, **H2, H6**), 7.52 (t, *J*_o= 7.2 Hz, 1H, **H3'**), 7.70 (t, *J*_o= 8.4 Hz, 2H, **H6'**), 7.70 (t, *J*_o= 7.2 Hz, 2H, **H7'**), 7.79 (d, *J*_o= 7.76 Hz, 1H, **H5'**), 7.79 (d, *J*_o= 7.76 Hz, 1H, **H5'**), 8.12 (d, *J*_o= 8.8 Hz, 1H, **H8'**) 8.20 (d, *J*_o= 8.12 Hz, 1H, **H4'**) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, DMSOd₆) δ: 28.55 (**CH₃**),

37.45 (**C β**), 54.74 (**C α**), 69.74 (**OCH₂**), 80.02 (**C tert**), 114.89 (**C3, C5**), 119.34 (**C3''**), 127.12 (**C6''**), 127.51 (**C5''**), 127.85 (**C4''a**), 127.97 (**C1**), 129.49 (**C7''**), 130.69 (**C8''**), 130.94 (**C2, C6**), 138.51 (**C4''**), 146.28 (**C8''a**), 155.53 (**C4**), 157.32 (**C2''**), 158.11 (**NCOO**), 174.51 (**COO**) ppm; H.R.M.S.(FAB +): m/z 423.1911 (M+H)⁺ (Calculado para C₂₄H₂₆N₂O₅H⁺ 423.1842).

11.3.- Metodología para la síntesis del Ácido-(S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-(4-((2'-ciano-[1,1'bifenil]-4-il)metoxi)fenil)propanoico (**M3**).

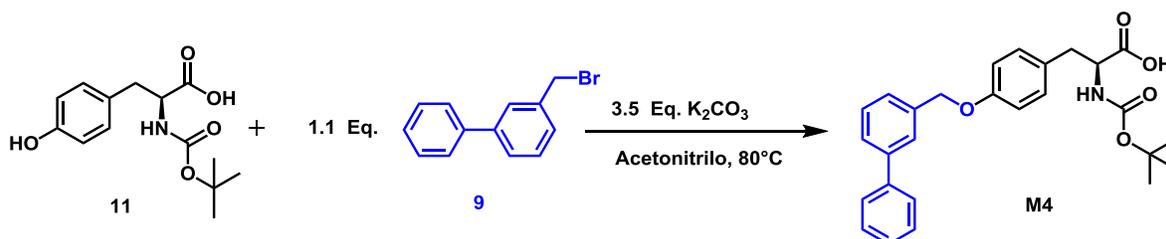


En un matraz bola de 50 mL acondicionado con agitación magnética, mantilla de calentamiento y refrigerante en posición de reflujo se disolvió 1 equivalente (0.5 g, 0.0017 mol) del precursor Boc-tirosina (**11**) y 2.5 equivalentes (0.859 g, 0.006 mol) de carbonato de potasio (K₂CO₃) en 5 mL de acetonitrilo, después de 15 minutos se agregaron 1.1 equivalentes (0.514 g, 0.0019 mol) de 4-bromometil-2-bifenilcarbonitrilo (**8**), la reacción se elevó a 80°C y se monitoreó por cromatografía en capa fina (ccf) observando el consumo total de las materias primas a las 10 horas de reacción, por último la reacción se dejó enfriar y se acidificó con HCl al 10% hasta llegar a un pH de 6, el disolvente se evaporó a alto vacío y 5 mL de agua fría fueron adicionados obteniendo un precipitado el cual fue filtrado a alto vacío. El producto final fue purificado por placa preparativa obteniendo cristales blancos con 92 % de rendimiento.

P.f. 133.5-135.3°C. [α]₂₀^D + 9 (c, 0.1, CHCl₃). IR (cm⁻¹): 1005-1210 (**C-O-C**), 1243 (**C(CH₃)₃**), 1510-1533 (**C=C**), 1594 (**NCOO**), 1666 (**COO**), 2222 (**Ar-CN**). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 1.33 (s, 9H, **CH₃**), 2.93 (m, 2H, **H β**), 4.23 (d, 1H, **H α**), 5.16 (s, 2H, **OCH₂**), 6.96 (d, *J*_o = 6.8 Hz, 2H, **H3, H5**), 7.19 (d, *J*_o = 7.2 Hz, 2H, **H2, H6**), 7.43 (d, *J*_o = 7.2 Hz, 1H, **H4''**), 7.57 (m, 5H, **H2', H3', H5', H6', H6''**), 7.76 (d, *J*_o = 5.2 Hz, 1H, **H5''**) 7.93 (d, *J*_o = 6.0 Hz, 1H, **H3''**), ppm. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-

d6) δ : 28.14 (**CH₃**), 35.65 (**C β**), 55.79 (**C α**), 68.73 (**OCH₂**), 78.39 (**C-tert**), 110.17 (**C $2''$**) 114.54 (**C 3 , C 5**), 118.60 (**CN**), 127.93 (**C $4''$**), 128.16 (**C $3'$, C $5'$**), 128.76 (**C $2'$, C $6'$**), 129.67 (**C 1**), 130.20 (**C 2 , C 6**), 133.56 (**C $6''$**), 133.89 (**C $5''$**), 136.52 (**C $3''$**), 137.27 (**C $4'$**), 137.83 (**C $1'$**), 144.20 (**C $1''$**), 157.10 (**NCOO**), 155.52 (**C 4**), 172.19 (**COO**) ppm; MS (FAB+) m/z 43, 57, 136, 192, 299, 373, 417(M+H)+.

11.4.- Metodología para la síntesis del Ácido-(S)3(4-([1,1'-bifenil]-3-ilmetoxi)fenil)-2-(terbutoxicarbonil)amino)propanoico (M4).

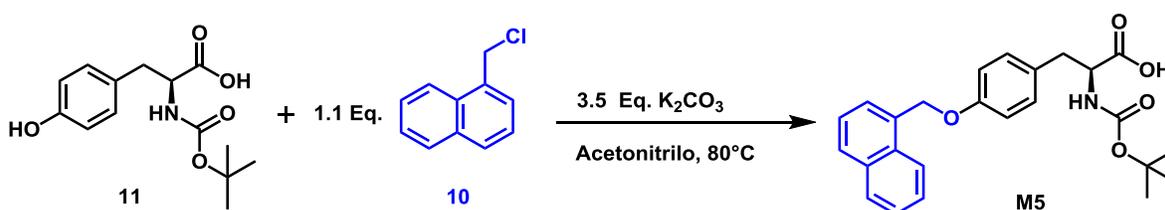


En un matraz bola de 50 mL acondicionado con agitación magnética, mantilla de calentamiento y refrigerante en posición de reflujo se disolvió 1 equivalente (0.5 g, 0.0017 mol) del precursor Boc-tirosina (**11**) y 2.5 equivalentes (0.859 g, 0.006 mol) de carbonato de potasio (K_2CO_3) en 5 mL de acetonitrilo y se dejó reaccionar durante 15 minutos, posteriormente se adicionaron 1.1 equivalentes (0.467 g, 0.0019 mol) de bromuro de 3-bifenilbencilo (**9**), la temperatura de la reacción a 80°C, utilizando cromatografía en capa fina (ccf) se monitoreó hasta el consumo total de las materias primas (9 horas de reacción), una vez terminada la reacción, se dejó enfriar y se acidificó con HCl al 10% hasta llegar a un pH de 6, el disolvente se evaporó a alto vacío, 5 mL de agua fría fueron adicionados obteniendo un precipitado el cual fue filtrado a alto vacío. El producto final fue purificado por placa preparativa obteniendo cristales blancos con 85 % de rendimiento.

P.f. 119.6-120.8 °C. $[\alpha]_D^{20} + 25$ (c, 0.1, $CHCl_3$). IR (cm⁻¹): 1011-1160 (**C-O-C**), 1234 (**C(CH₃)₃**), 1509-1584 (**C=C**), 1610 (**NCOO**), 1705 (**COO**). ¹H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 1.42 (s, 9H, **CH₃**), 3.12 (dd, 2H, **H β**), 4.60 (d, 1H, **H α**), 5.46 (s, 2H, **OCH₂**), 6.97 (d, $J_o = 8.2$ Hz, 2H, **H 3 , H 5**), 7.17 (d, $J_o = 8.6$ Hz, 2H, **H 2 , H 6**), 7.42 (m, $J_o = 7.0$ Hz, 4H, **H $3'$**), 7.45 (m, $J_o = 7.8$ Hz, 4H, **H $2'$**), 7.50 (m, $J_o = 7.2$ Hz, 4H,

H6'), 7.55 (m, $J_o=7.8$ Hz, 4H, **H7'**), 7.84 (m, $J_o=7.8$ Hz, 1H, **H4'**), 7.88 (m, $J_o=9.2$ Hz, 1H, **H-5'**), 8.02 (m, $J_o=9.0, 8.0$ Hz, 4H, **H8'**) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 28.30 (**CH**₃), 37.01 (**C β**), 54.44 (**C α**), 68.64 (**OCH**₂), 80.29 (**C-tert**), 115.00 (**C3, C5**), 123.72 (**C8'**), 125.30 (**C2'**), 125.90 (**C6'**), 126.45 (**C7'**), 126.64 (**C3'**), 128.28, (**C1**), 128.67 (**C5'**), 129.02 (**C4'**), 130.52 (**C2, C6**), 131.53 (**C8'a**), 132.24 (**C4'a**), 133.77 (**C1'**), 155.50 (**C4**), 157.99 (**NCOO**), 176.46 (**COO**) ppm; H.R.M.S.(FAB +): m/z 421.1862 [M+H]⁺ (Calculado para $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_5$ 421.1889).

11.5.- Metodología para la síntesis del Ácido-(S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-(4-(naftalen-1-ilmetoxy)fenil)propanoico (M5).



En un matraz bola de 50 mL acondicionado con mantilla de calentamiento, agitación magnética y refrigerante en posición de reflujo se hizo reaccionar 1 equivalente (0.5 g, 0.0017 mol) del precursor Boc-tirosina (**11**) con 2.5 equivalentes (0.859 g, 0.006 mol) de carbonato de potasio (K_2CO_3) en 5 mL de acetonitrilo durante 15 minutos, seguida de la adición de 1.1 equivalentes (0.334 g, 0.0019 mol) de 1-Clorometilnaftaleno (**10**), la temperatura de la reacción se elevó a 80°C y se monitoreó mediante cromatografía en capa fina (ccf), el consumo total de las materias primas se llevó a cabo a las 8 horas de reacción, la cual, se acidificó con HCl al 10% hasta llegar a un pH de 6, la mayor cantidad de disolvente se evaporó a alto vacío, 5 mL de agua fría fueron adicionados obteniendo un precipitado el cual fue filtrado a alto vacío. El producto final fue purificado por placa preparativa obteniendo cristales blancos con 92 % de rendimiento.

P.f. $172.2\text{-}173.3$ $^\circ\text{C}$. $[\alpha]_D^{20} + 38$ (c, 0.1, CHCl_3). IR (cm^{-1}): 1023-1160 (**C-O-C**), 1238 (**C(CH**₃)₃), 1509-1584 (**C=C**), 1610 (**NCOO**), 1708 (**C=O**). ^1H NMR (400 MHz,

CDCl₃) δ : 1.46 (s, 9H, **CH₃**), 3.15 (m, 2H, **H β**), 4.62 (m, 1H, **H α**), 5.09 (s, 2H, **OCH₂**), 6.97 (d, $J_o= 8.6$ Hz, 2H, **H₃**, **H₅**), 7.17 (d, $J_o= 8.2$ Hz, 2H, **H₂**, **H₆**), 7.41 (d, $J_o= 8.6$ Hz, 1H, **H_{6'}**), 7.46 (dd, $J_o= 8.6$ Hz, 2H, **H_{3''}**, **H_{5''}**), 7.56 (s, 9H, **H_{2'}**, **H_{4'}**, **H_{5'}**, **H_{4''}**), 7.77 (d, $J_o= 7.4$ Hz, 2H, **H_{2''}**, **H_{6''}**) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ : 28.36 (**CH₃**), 37.06 (**C β**), 54.58 (**C α**), 70.04 (**OCH₂**), 80.28 (**C-tert**), 115.00 (**C₃**, **C₅**), 126.33 (**C_{5'}**), 126.46 (**C_{2'}**), 126.83 (**C_{4'}**), 127.24 (**C_{2''}**, **C_{6''}**), 127.47 (**C_{4''}**), 128.85 (**C_{3''}**, **C_{5''}**), 129.08 (**C₁**), 129.08 (**C_{6'}**), 130.56 (**C₂**, **C₆**), 137.59 (**C_{1'}**), 140.91 (**C_{1''}**), 141.59 (**C_{3'}**), 155.63 (**C₄**), 157.93 (**NCOO**), 175.91 (**COO**) ppm; H.R.M.S.(FAB +): m/z 447.1930 [M + H] + (Calculado para C₂₇H₂₉NO₅ 447.2046).

12. BIBLIOGRAFIA

- (1) Li, N.; Wang, L.; Jiang, B.; Li, X.; Guo, C. European Journal of Medicinal Chemistry Recent Progress of the Development of Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitors for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *151*, 145–157.
- (2) [http://Programa de Acción específico 2007-2010. Diabetes mellitus, S. de S. Programa de Acción Específico 2007-2010. Diabetes Mellitus, Secretaria de Salud. *http://Programa Acción Especif. 2007-2010. Diabetes mellitus, Secr. Salud.*](http://Programa de Acción específico 2007-2010. Diabetes mellitus, S. de S. Programa de Acción Específico 2007-2010. Diabetes Mellitus, Secretaria de Salud. http://Programa Acción Especif. 2007-2010. Diabetes mellitus, Secr. Salud.)
- (3) <http://www.idf.org/complications-diabetes?language=es>.
- (4) World Health Organization <http://www.who.int/diabetes/en/> (accessed Sep 19, 2017).
- (5) Atlas. <http://www.diabetesatlas.org/resources/2015-atlas.html>.
- (6) American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2014, *37* (1), S-S. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2014, *37* (1), S81-S89. *Am. Diabetes Assoc. Diagnosis Classif. Diabetes Mellitus. Diabetes Care. 2014, 37 (1), S81-S89.*
- (7) Fröjdö, S.; Vidal, H.; Pirola, L. Alterations of Insulin Signaling in Type 2 Diabetes: A Review of the Current Evidence from Humans. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **2009**, *1792* (2), 83–92.
- (8) <Http://Www.Idf.Org/Signs-and-Symptoms-Diabetes>.
- (9) Guyton and Hall., Tratado de fisiología médica., Ed. Decimosegunda., 2011., 78.
- (10) Mooradian, A. Dyslipidemia in Type 2 Diabetes Mellitus. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* **2009**, *5* (3), 150–159.
- (11) de Souza Bastos, A.; Graves, D. T.; de Melo Loureiro, A. P.; Júnior, C. R.;

- Corbi, S. C. T.; Frizzera, F.; Scarel-Caminaga, R. M.; Câmara, N. O.; Andriankaja, O. M.; Hiyane, M. I.; Orrico, S. R. P. Diabetes and Increased Lipid Peroxidation Are Associated with Systemic Inflammation Even in Well-Controlled Patients. *J. Diabetes Complications* **2016**, *30* (8), 1593–1599.
- (12) Sarbijani, H. M.; Khoshnia, M.; Marjani, A. The Association between Metabolic Syndrome and Serum Levels of Lipid Peroxidation and Interleukin-6 in Gorgan. *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.* **2015**, *10* (1), S86–S89.
- (13) Ceriello, A.; Quatraro, A.; Giugliano, D. Diabetes Mellitus and Hypertension: The Possible Role of Hyperglycaemia through Oxidative Stress. *Diabetologia* **1993**, *36*, 265–266.
- (14) Chen, Q.; Zhang, Y.; Ding, D.; Li, D.; Xia, M.; Li, X.; Yang, Y.; Li, Q.; Hu, G.; Ling, W. Metabolic Syndrome and Its Individual Components with Mortality among Patients with Coronary Heart Disease. *Int. J. Cardiol.* **2016**, *224*, 8–14.
- (15) Masnoon, N.; Shakib, S.; Kalisch-ellet, L.; Caughey, G. E. What Is Polypharmacy? A Systematic Review of Definitions. **2017**, 1–10.
- (16) Li, W.; Zeng, S.; Yu, L.-S.; Zhou, Q. Pharmacokinetic Drug Interaction Profile of Omeprazole with Adverse Consequences and Clinical Risk Management. *Ther. Clin. Risk Manag.* **2013**, *9*, 259–271.
- (17) Zhou, Y. T.; Yu, L. S.; Zeng, S.; Huang, Y. W.; Xu, H. M.; Zhou, Q. Pharmacokinetic Drug-Drug Interactions between 1,4-Dihydropyridine Calcium Channel Blockers and Statins: Factors Determining Interaction Strength and Relevant Clinical Risk Management. *Ther. Clin. Risk Manag.* **2014**, *10* (1), 17–26.
- (18) Colín-Lozano, B.; Estrada-Soto, S.; Chávez-Silva, F.; Gutiérrez-Hernández, A.; Cerón-Romero, L.; Giacomani-Martínez, A.; Almanza-Pérez, J. C.; Hernández-Núñez, E.; Wang, Z.; Xie, X.; Cappiello, M.; Balestri, F.; Mura, U.; Navarrete-Vazquez, G. Design, Synthesis and in Combo Antidiabetic Bioevaluation of Multitarget Phenylpropanoic Acids. *Molecules* **2018**, *23* (2),

1–16.

- (19) Fujiwara, Y.; Tsukahara, C.; Ikeda, N.; Sone, Y.; Ishikawa, T.; Ichi, I.; Koike, T.; Aoki, Y. Oleuropein Improves Insulin Resistance in Skeletal Muscle by Promoting the Translocation of GLUT4. **2017**, No. October, 2–8.
- (20) Gandhi, G. R.; Stalin, A.; Balakrishna, K.; Ignacimuthu, S.; Paulraj, M. G.; Vishal, R. Insulin Sensitization via Partial Agonism of PPAR α/γ And Glucose Uptake through Translocation and Activation of GLUT4 in PI3K/p-Akt Signaling Pathway by Embelin in Type 2 Diabetic Rats. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2013**, 1830 (1), 2243–2255.
- (21) Balakumar, P.; Rose, M.; Ganti, S. S.; Krishan, P.; Singh, M. PPAR Dual Agonists : Are They Opening Pandora ' s Box ? **2007**, 56, 91–98.
- (22) Bhattarai, B. R.; Kafle, B.; Hwang, J. S.; Ham, S. W.; Lee, K. H.; Park, H.; Han, I. O.; Cho, H. Novel Thiazolidinedione Derivatives with Anti-Obesity Effects: Dual Action as PTP1B Inhibitors and PPAR-?? Activators. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2010**, 20 (22), 6758–6763.
- (23) Wu, Q.; Ortegon, A. M.; Tsang, B.; Doege, H.; Feingold, K. R.; Stahl, A.; Iol, M. O. L. C. E. L. L. B. FATP1 Is an Insulin-Sensitive Fatty Acid Transporter Involved in Diet-Induced Obesity. **2006**, 26 (9), 3455–3467.
- (24) Johnson, T. O.; Ermolieff, J.; Jirousek, M. R. Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitors for Diabetes. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, 1 (9), 696–709.
- (25) Romsicki, Y.; Reece, M.; Gauthier, J. Y.; Asante-Appiah, E.; Kennedy, B. P. Protein Tyrosine Phosphatase-1B Dephosphorylation of the Insulin Receptor Occurs in a Perinuclear Endosome Compartment in Human Embryonic Kidney 293 Cells. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279 (13), 12868–12875.
- (26) Pedersen, A. K.; Guo, X.-L.; Møller, K. B.; Peters, G. H.; Andersen, H. S.; Kastrup, J. S.; Mortensen, S. B.; Iversen, L. F.; Zhang, Z.-Y.; Møller, N. P. H. Residue 182 Influences the Second Step of Protein-Tyrosine Phosphatase-Mediated Catalysis. *Biochem. J.* **2004**, 378 (Pt 2), 421–433.

- (27) Zhang, Z. Y. Protein-Tyrosine Phosphatases: Biological Function, Structural Characteristics, and Mechanism of Catalysis. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1998**, 33 (1), 1–52.
- (28) Elchebly, M. Increased Insulin Sensitivity and Obesity Resistance in Mice Lacking the Protein Tyrosine Phosphatase-1B Gene. *Science (80-)*. **1999**, 283 (5407), 1544–1548.
- (29) He, B. K.; Ning, Z. Q.; Li, Z. B.; Shan, S.; Pan, D. S.; Ko, B. C. B.; Li, P. P.; Shen, Z. F.; Dou, G. F.; Zhang, B. L.; Lu, X. P.; Gao, Y. *In vitro* and *In Vivo* Characterizations of Chiglitazar , a Newly Identified PPAR Pan-Agonist. **2012**, 2012.
- (30) Shearer, B. G.; Billin, A. N. The next Generation of PPAR Drugs: Do We Have the Tools to Find Them? *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **2007**, 1771 (8), 1082–1093.
- (31) Henke, B. R. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha/Gamma Dual Agonists for the Treatment of Type 2 Diabetes. *J. Med. Chem.* **2004**, 47 (17), 4118–4127.
- (32) Rubenstrunk, A.; Hanf, R.; Hum, D. W.; Fruchart, J. C.; Staels, B. Safety Issues and Prospects for Future Generations of PPAR Modulators. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **2007**, 1771 (8), 1065–1081.
- (33) <https://www.drugdevelopment-technology.com/?s=saroglitazar>. No Title.
- (34) Kumar, R.; Ramachandran, U.; Khanna, S.; Bharatam, P. V.; Raichur, S.; Chakrabarti, R. Synthesis, *in vitro* and *in Silico* Evaluation of I-Tyrosine Containing PPAR α/γ Dual Agonists. *Bioorganic Med. Chem.* **2007**, 15 (3), 1547–1555.
- (35) De Filippis, B.; Linciano, P.; Ammazalorso, A.; Di Giovanni, C.; Fantacuzzi, M.; Giampietro, L.; Laghezza, A.; Maccallini, C.; Tortorella, P.; Lavecchia, A.; Liodice, F.; Amoroso, R. Structural Development Studies of PPARs Ligands Based on Tyrosine Scaffold. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, 89, 817–825.

- (36) Hidalgo Figueroa S. “diseño, síntesis, bioevaluación y estudios de acoplamiento molecular de aza y tiazaheterociclos para el tratamiento experimental de la diabetes e hipertensión. Tesis de Doctorado en Farmacia UAEM. 2013.
- (37) Kuyoc Carrillo F. “Diseño y síntesis tiazaheterociclos duales para el tratamiento experimental la diabetes y obesidad”. Tesis de Maestria en Farmacia. UAEM. 2013.
- (38) Menez Guerrero J. “síntesis de benciliden-1, 3-tiazolidin-2, 4-dionas y caracterización farmacológica in silico” Tesis de Licenciado en Farmacia UAEM. 2014.
- (39) Gutiérrez Hernández A. Diseño síntesis y evaluación *in vitro* e in silico de análogos de Rivoglitazona como agonistas duales PPAR α / γ . Tesis de Licenciado en Farmacia. UAEM. 2015.
- (40) Claverie García C. Preparación de azahomologos de Ciglitazona y predicción in silico de su interacción con 4 dianas terapéuticas implicadas en la diabetes mellitus tipo 2. Tesis de Licenciado en Farmacia. UAEM. 2016.
- (41) Miranda Gonzales C. Síntesis de derivados del ácido (4-hidroxifenilacetico como inhibidores virtuales de la P.-1B y aldosa reductasa para el tratamiento experimental de la D.M. tipo 2). Tesis de Licenciado en Farmacia UAEM. 2018.
- (42) Galván Ciprés Yelzyn. “Síntesis y evaluación in vivo de tiazolidindionas obtenidas de isovainillina como ligandos virtuales de PTP-1B y PPAR γ . Tesis de Licenciado en Farmacia UAEM. 2017.
- (43) Martínez Miranda J. Síntesis de derivados del ácido ferúlico afines *in silico* a multiples dianas terapeuticas relacionadas en el abordaje experimental de la DM2. Tesis de Licenciado en Farmacia. UAEM. 2018.
- (44) Rosales Ortega E. Síntesis, simulación computacional farmacodinámica y farmacocinética de bencilidentiazolidindionas derivadas de vainillina. Tesis Licenc en Farmacia. UAEM. 2018.

- (45) Delgado Aguilar T. "síntesis y evaluación virtual e *in vitro* de la afinidad barbituratos y tiazolidindionas sobre GPR40". Tesis Licenciado en Farmacia UAEM. 2016.
- (46) Martínez Conde C. "síntesis y evaluación *in silico* de benciloxilidenbarbituratos con afinidad a múltiples blancos (multitarget) para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo II". Tesis de Licenciado en Farmacia UAEM. 2015.
- (47) Colín Lozano B. "diseño síntesis y bioevaluación antidiabética in combo de benciliden-1, 3-tiazolidin-2, 4-dionas y derivados del ácido fenilpropiónico". Tesis de Doctorado en Farmacia. UAEM. 2018.
- (48) Madrigal Angulo J. "Diseño, síntesis y evaluación del efecto antidiabético análogos tiazolidin-2,4-dionas como posibles agonistas duales PPAR α / γ ". Tesis de Maestro en Farmacia. UAEM. 2015.
- (49) Ramírez Martínez M. "Diseño, síntesis y evaluación farmacológica *in vitro silico e vivo* (in combo) de benzotiazoles oxamato de etilo, Inhibidores de la enzima PTP-1 β , para el tratamiento experimental de la Diabetes Mellitus tipo 2". Tesis Maestría en Farmacia. UAEM. 2014
- (50) Morales Vilchis G. "Diseño y síntesis 2-{2-[(α / β -naftilsulfonil)amino]-1,3-tiazol-4-il}acetamidas como inhibidores de la enzima 11 β -HSD1 estudio *in vitro, in silico e in vivo* en un modelo experimental de diabetes mellitus tipo 2". Tesis de Maestro en Farmacia. UAEM. 2014
- (51) Torres Gómez H. "Diseño y síntesis de híbridos de tiazolidin-2, 4-dionas y fibratos, como potenciales agentes para el tratamiento del síndrome Metabólico. Tesis de Maestro en Farmacia. UAEM. 2009.
- (52) González Acevedo C. "síntesis de amidas híbridas del ácido clofíbrico y tiazaheterociclos para el tratamiento experimental de la diabetes". Tesis de Maestro en Farmacia, UAEM. 2013.

- (53) Gutiérrez Jaimes M. diseño y síntesis de derivados de l ácido 2-(4-hidroxifenoxi) propiónico como agentes para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. Tesis de Maestro en Farmacia, UAEM. 2016.
- (54) Gutiérrez Hernández A. “síntesis y evaluación antidiabética de derivados de los ácidos 3-fenilpropanóico y 2-fenoxipropanóico como potenciales ligandos multitarget”. Tesis de Maestro en Farmacia, UAEM. 2017.
- (55) Mosso Gonzáles M. D. Diseño y síntesis de híbrido basados en ácido fenipropiónico como agonistas duales PPAR α / γ . Tesis de Maestro en Farmacia, UAEM. 2018.
- (56) DeSimone, R. W.; Currie, K. S.; Mitchell, S. A.; Darrow, J. W.; Pippin, D. A. Privileged Structures: Applications in Drug Discovery. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **2004**, 7 (5), 473–494.
- (57) Mason, J. S.; Morize, I.; Menard, P. R.; Cheney, D. L.; Hulme, C.; Labaudiniere, R. F. New 4-Point Pharmacophore Method for Molecular Similarity and Diversity Applications: Overview of the Method and Applications, Including a Novel Approach to the Design of Combinatorial Libraries Containing Privileged Substructures. *J. Med. Chem.* **1999**, 42 (17), 3251–3264.
- (58) Zdrazil, B.; Guha, R. The Rise and Fall of a Scaffold: A Trend Analysis of Scaffolds in the Medicinal Chemistry Literature. *J. Med. Chem.* **2018**, 61 (11), 4688–4703.
- (59) Reddy, J. K.; Hashimoto, T. peroxisomal β -oxidation and peroxisome proliferator – activated receptor α : An Adaptive Metabolic System. *Perspective* **2001**, 21, 193–230.
- (60) Pirat, C.; Farce, A.; Lebègue, N.; Renault, N.; Furman, C.; Millet, R.; Yous, S.; Speca, S.; Berthelot, P.; Desreumaux, P.; Chavatte, P. Targeting Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs): Development of Modulators. *J. Med. Chem.* **2012**, 55 (9), 4027–4061.
- (61) Sahebkar, A.; Chew, G. T.; Watts, G. F. New Peroxisome Proliferator-

- Activated Receptor Agonists: Potential Treatments for Atherogenic Dyslipidemia and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Expert Opin. Pharmacother.* **2014**, *15* (4), 493–503.
- (62) Gervois, P.; Fruchart, J. C.; Staels, B. Inflammation, Dyslipidaemia, Diabetes and PPARs: Pharmacological Interest of Dual PPARalpha and PPARgamma Agonists. *Int. J. Clin. Pract. Suppl.* **2004**, *58* (October), 22–29.
- (63) Fazio, S.; Linton, M. F. The Role of Fibrates in Managing Hyperlipidemia: Mechanisms of Action and Clinical Efficacy. *Curr. Atheroscler. Rep.* **2004**, *6* (2), 148–157.
- (64) Thangavel, N.; Al Bratty, M.; Akhtar Javed, S.; Ahsan, W.; Alhazmi, H. A. Targeting Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Using Thiazolidinediones: Strategy for Design of Novel Antidiabetic Drugs. *Int. J. Med. Chem.* **2017**, *2017*, 1–20.
- (65) Bailey, C. J. Potential New Treatments for Type 2 Diabetes. *Trends Pharmacol. Sci.* **2000**, *21* (7), 259–265.
- (66) Tyagi, S.; Sharma, S.; Gupta, P.; Saini, A.; Kaushal, C. The Peroxisome Proliferator-Activated Receptor: A Family of Nuclear Receptors Role in Various Diseases. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* **2011**, *2* (4), 236.
- (67) Navarrete-Vazquez, G.; Paoli, P.; León-Rivera, I.; Villalobos-Molina, R.; Medina-Franco, J. L.; Ortiz-Andrade, R.; Estrada-Soto, S.; Camici, G.; Diaz-Coutiño, D.; Gallardo-Ortiz, I.; Martinez-Mayorga, K.; Moreno-Díaz, H. Synthesis, *in vitro* and Computational Studies of Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibition of a Small Library of 2-Arylsulfonylaminobenzothiazoles with Antihyperglycemic Activity. *Bioorganic Med. Chem.* **2009**, *17* (9), 3332–3341.
- (68) Navarrete-Vazquez, G.; Ramírez-Martínez, M.; Estrada-Soto, S.; Nava-Zuazo, C.; Paoli, P.; Camici, G.; Escalante-García, J.; Medina-Franco, J. L.; López-Vallejo, F.; Ortiz-Andrade, R. Synthesis, *in vitro* and *in Silico* Screening of Ethyl 2-(6-Substituted Benzo[d]Thiazol-2-Ylamino)-2-

Oxoacetates as Protein-Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *53*, 346–355.

- (69) Ramírez-Espinosa, J. J.; Rios, M. Y.; Paoli, P.; Flores-Morales, V.; Camici, G.; Rosa-Lugo, V. D. La; Hidalgo-Figueroa, S.; Navarrete-Vázquez, G.; Estrada-Soto, S. Synthesis of Oleanolic Acid Derivatives: *In vitro*, *In Vivo* and *In Silico* Studies for PTP-1B Inhibition. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *87*, 316–327.
- (70) Navarrete-Vázquez, G.; Morales-Vilchis, M. G.; Estrada-Soto, S.; Ramírez-Espinosa, J. J.; Hidalgo-Figueroa, S.; Nava-Zuazo, C.; Tlahuext, H.; Leon-Rivera, I.; Medina-Franco, J. L.; López-Vallejo, F.; Webster, S. P.; Binnie, M.; Ortiz-Andrade, R.; Moreno-Diaz, H. Synthesis of 2-{2-[(α/β -Naphthalen-1-Ylsulfonyl)Amino]-1,3- Thiazol-4-Yl} Acetamides with 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Inhibition and *In Vivo* Antidiabetic Activities. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *74*, 179–186.
- (71) Cerón-Romero, L.; Paoli, P.; Camici, G.; Flores-Morales, V.; Rios, M. Y.; Ramírez-Espinosa, J. J.; Hidalgo-Figueroa, S.; Navarrete-Vázquez, G.; Estrada-Soto, S. *In vitro* and *In Silico* PTP-1B Inhibition and *In Vivo* Antidiabetic Activity of Semisynthetic Moronic Acid Derivatives. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2016**, *26* (8), 2018–2022.
- (72) Paoli, P.; Modesti, A.; Magherini, F.; Gamberi, T.; Caselli, A.; Manao, G.; Raugei, G.; Camici, G.; Ramponi, G. Site-Directed Mutagenesis of Two Aromatic Residues Lining the Active Site Pocket of the Yeast Ltp1. **2007**, *1770*, 753–762.
- (73) Hidalgo-Figueroa, S.; Ramírez-Espinosa, J. J.; Estrada-Soto, S.; Almanza-Pérez, J. C.; Román-Ramos, R.; Alarcón-Aguilar, F. J.; Hernández-Rosado, J. V.; Moreno-Díaz, H.; Díaz-Coutiño, D.; Navarrete-Vázquez, G. Discovery of Thiazolidine-2,4-Dione/Biphenylcarbonitrile Hybrid as Dual PPAR α/γ Modulator with Antidiabetic Effect: *In vitro*, *In Silico* and *In Vivo* Approaches. *Chem. Biol. Drug Des.* **2013**, *81* (4), 474–483.
- (74) Garcia-Macedo, R.; Sanchez-Muñoz, F.; Almanza-Perez, J. C.; Duran-

- Reyes, G.; Alarcon-Aguilar, F.; Cruz, M. Glycine Increases mRNA Adiponectin and Diminishes Pro-Inflammatory Adipokines Expression in 3T3-L1 Cells. *Eur. J. Pharmacol.* **2008**, *587* (1–3), 317–321.
- (75) Alarcon-Aguilar, F. J.; Almanza-Perez, J.; Blancas, G.; Angeles, S.; Garcia-Macedo, R.; Roman, R.; Cruz, M. Glycine Regulates the Production of Pro-Inflammatory Cytokines in Lean and Monosodium Glutamate-Obese Mice. *Eur. J. Pharmacol.* **2008**, *599* (1–3), 152–158.
- (76) Hidalgo-Figueroa, S.; Navarrete-Vázquez, G.; Estrada-Soto, S.; Giles-Rivas, D.; Alarcón-Aguilar, F. J.; León-Rivera, I.; Giacomán-Martínez, A.; Miranda Pérez, E.; Almanza-Pérez, J. C. Discovery of New Dual PPAR γ -GPR40 Agonists with Robust Antidiabetic Activity: Design, Synthesis and in Combo Drug Evaluation. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *90*, 53–61.
- (77) Szkudelski, T. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. Department of Animal Physiology and Biochemistry, University of Agriculture, Poznan, Poland. **2001**.
- (78) Masiello, P. Animal Models of Type 2 Diabetes with Reduced Pancreatic-Cell Mass. *Nutr Hosp.* **2007**; *22* (2):160-68.
- (79) Press, D. Streptozotocin-Induced Type 1 Diabetes in Rodents as a Model for Studying Mitochondrial Mechanisms of Diabetic β Cell Glucotoxicity. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targ. and Therapy.* **2015**, 181–188.
- (80) Balibrea, J. A. J. Modelos Animales de Intolerancia a La Glucosa y Diabetes Tipo 2. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **38**, **2006**, 873–893
- (81) Gutierrez-lara, E.; Martínez-conde, C.; Rosales-ortega, E.; Ramírez-espinosa, J. J.; Rivera-leyva, J. C.; Centurión, D.; Carvajal, K.; Ortega-cuellar, D.; Estrada-soto, S.; Navarrete-vázquez, G. Synthesis and *In vitro* AMPK Activation of Cycloalkyl / Alkarylbiguanides with Robust In Vivo Antihyperglycemic Action. **2017**.

- (82) Stephen Irudayaraj, S.; Sunil, C.; Duraipandiyan, V.; Ignacimuthu, S. Antidiabetic and Antioxidant Activities of *Toddalia Asiatica* (L.) Lam. Leaves in Streptozotocin Induced Diabetic Rats. *J. Ethnopharmacol.* **2012**, *143* (2), 515–523.
- (83) Capelli, D.; Cerchia, C.; Montanari, R.; Loiodice, F.; Tortorella, P.; Laghezza, A.; Cervoni, L.; Pochetti, G.; Lavecchia, A. Structural Basis for PPAR Partial or Full Activation Revealed by a Novel Ligand Binding Mode. *Nat. Publ. Gr.* **2016**, No. October, 1–12.
- (84) Molecular Operating Environment (MOE), 2013.08; Chemical Computing Group ULC, 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, **2017**.
- (85) O. Méndez-Lucio, J. Naveja, H. Vite-Caritino, F. Prieto-Martínez, J. Medina-Franco, *Polypharmacology Drug Discov. N. Handl. Drug Sel. An Evol. Concept Med. Chem. Wiley.* **2017**, pp. 1-29.
- (86) [Http://bio-hpc.ucam.edu/dia-db/](http://bio-hpc.ucam.edu/dia-db/).
- (87) A. Sánchez-Pérez, A. Muñoz, J. Peña-García, H. den-Haan, N. Bek. A. Katsikoudi, A.G. Tzakos, H. Pérez-Sánchez, *DIA-DB A Web-Accessible Database Predict. Diabetes Drugs, Bioinforma. Biomed. Eng.* 9044 655-663.

13. ESPECTTROS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Servicio de Espectrometría de Masas
MStation JMS-700 JEOL Alta Resolución
Centro de Investigaciones Químicas UAEM
Tel. 329-79-97 ext.6013



[Elemental Composition]

Data : HTR010

Date : 17-Jan-2018 14:00

Sample: BnzTyr

Operator name Ing.Victoria Labastida G. Ins

Note : Dr.Hugo Tlahuext/Miguel Centro de Investigaciones Químicas UAEM

Inlet : Direct

Ion Mode : FAB+

RT : 0.85 min

Scan#: (5,34)

Elements : C 40/0, H 49/0, O 5/0, N 3/0

Mass Tolerance : 1000ppm, 3mmu if m/z < 3, 5mmu if m/z > 5

Unsaturation (U.S.) : -0.5 - 15.0

Observed m/z	Int%	Err[ppm / mmu]	U.S.	Composition
412.1899	100.0	+6.5 / +2.7	11.5	C 22 H 26 O 5 N 3

Ilustración 1. Resultados de análisis elemental del compuesto M1.

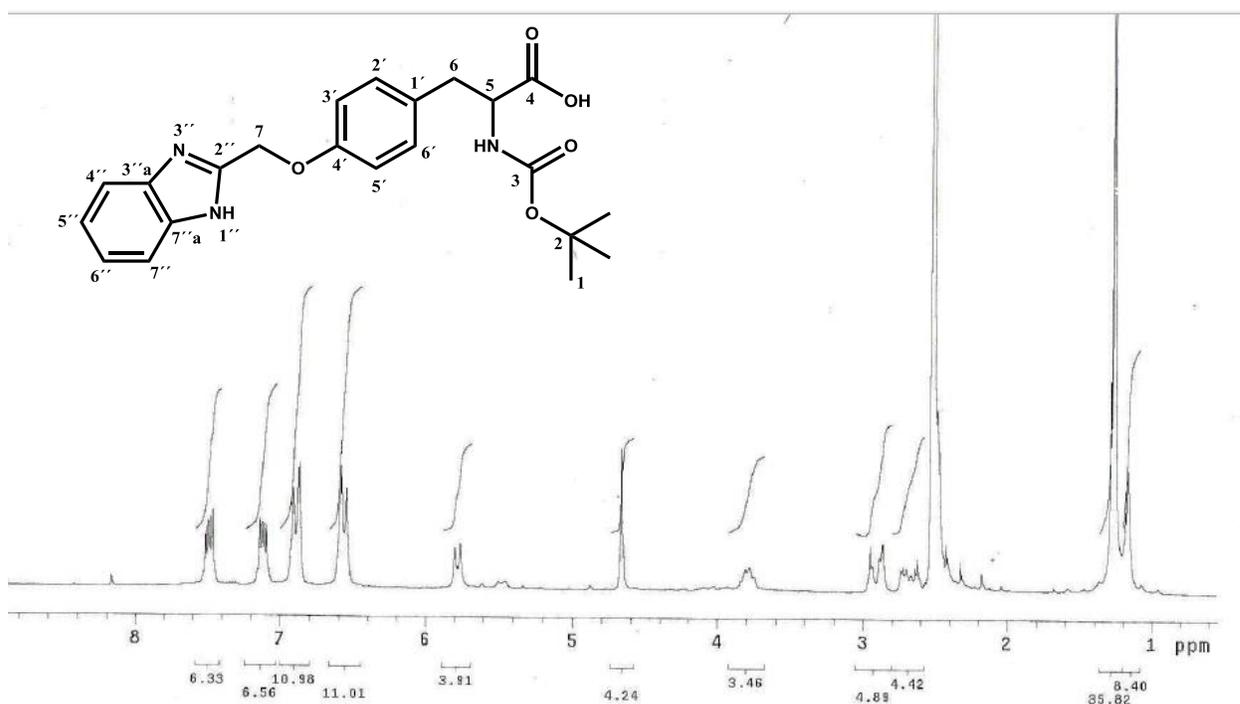


Ilustración 2. Espectro de RMN ¹H 400 MHz del compuesto M1.

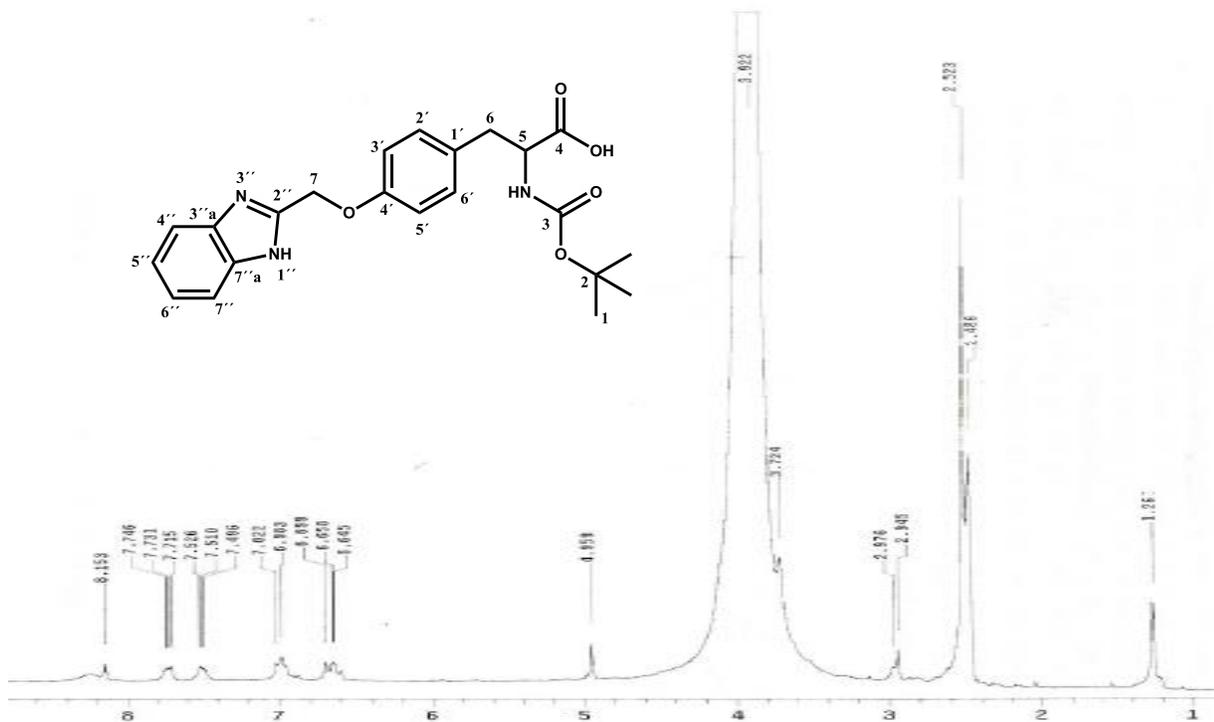


Ilustración 3. Espectro de RMN ^1H 400 MHz del compuesto M1.

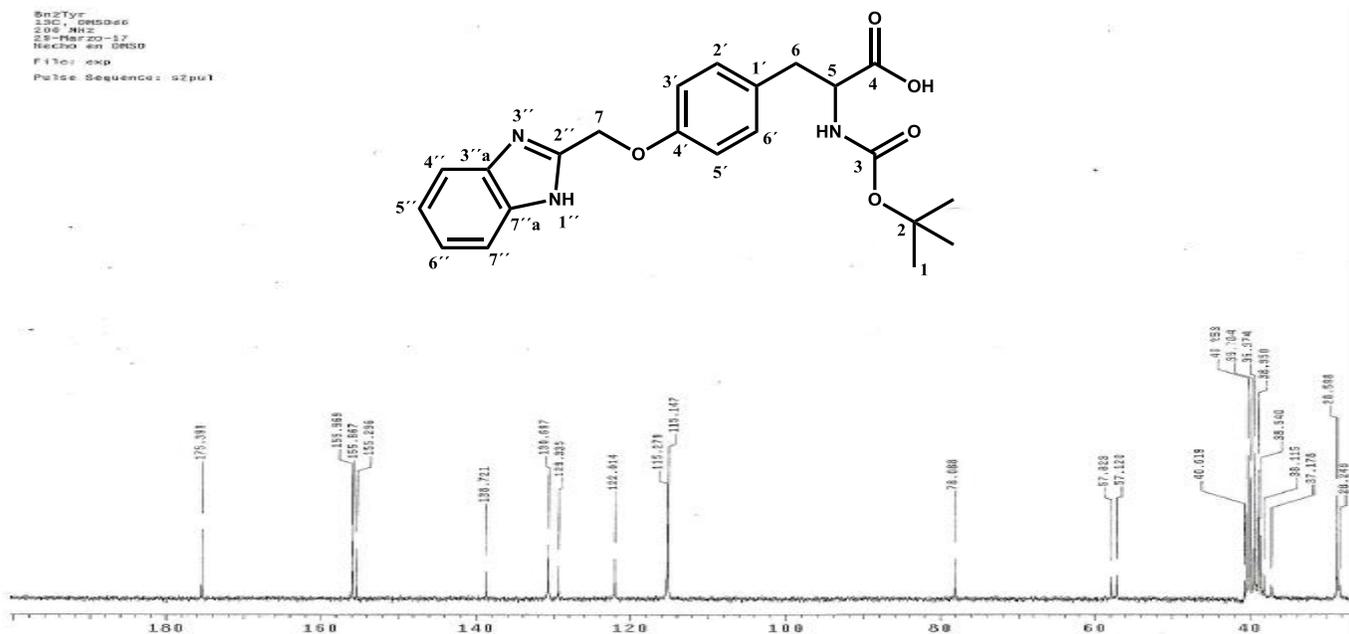


Ilustración 4. Espectro de RMN ^{13}C 100 MHz del compuesto M1.

[Elemental Composition]

Data : HTR006 Date : 17-Jan-2018 13:21
 Sample: QuinolinTyr Operator name Ing.Victoria Labastida G.
 Note : Dr.Hugo Tlahuext/Miguel Centro de Investigaciones Químicas UAEM
 Inlet : Direct Ion Mode : FAB+
 RT : 0.25 min Scan#: 7+41
 Elements : C 40/0, H 49/0, O 5/0, N 2/0
 Mass Tolerance : 1000ppm, 3mmu if m/z < 3, 5mmu if m/z > 5
 Unsaturation (U.S.) : -0.5 - 15.0

Observed m/z	Int%	Err[ppm / mmu]	U.S.	Composition
423.1911	100.0	-2.2 / -0.9	12.5	C 24 H 27 O 5 N 2

Ilustración 5. Resultados de análisis elemental del compuesto **M2**.

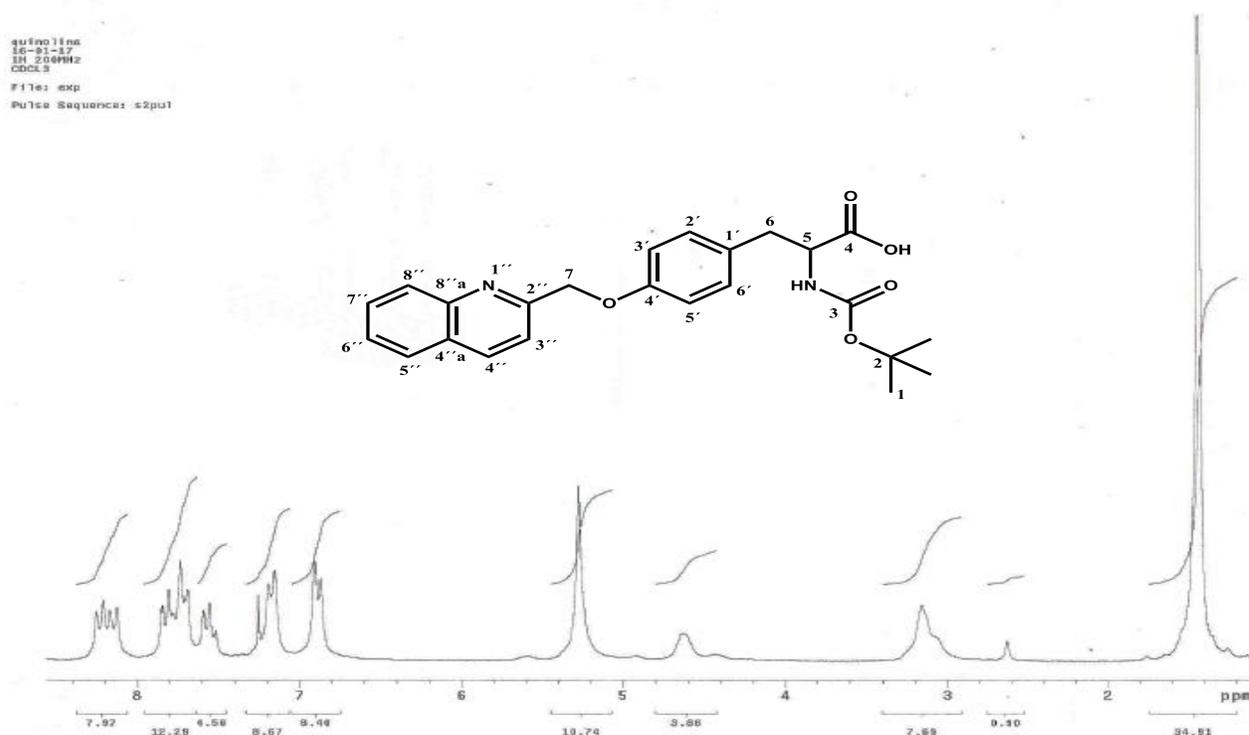


Ilustración 6. Espectro de RMN ¹H 400 MHz del compuesto **M2**.

su1mol1pe
 16-81-17
 1H 200MHz
 CDCl3
 F13a: exp
 Pulse Sequence: s2ps1

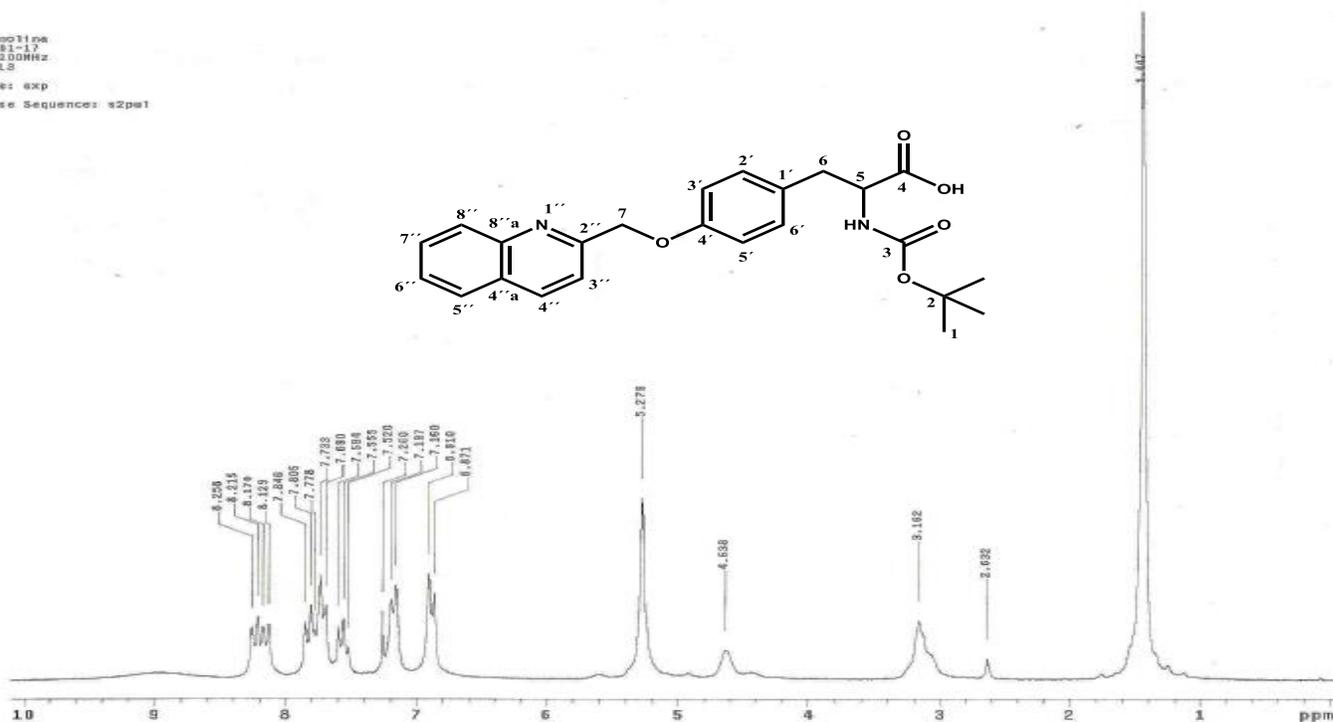


Ilustración 7. Espectro de RMN ^1H 400 MHz del compuesto **M2**.

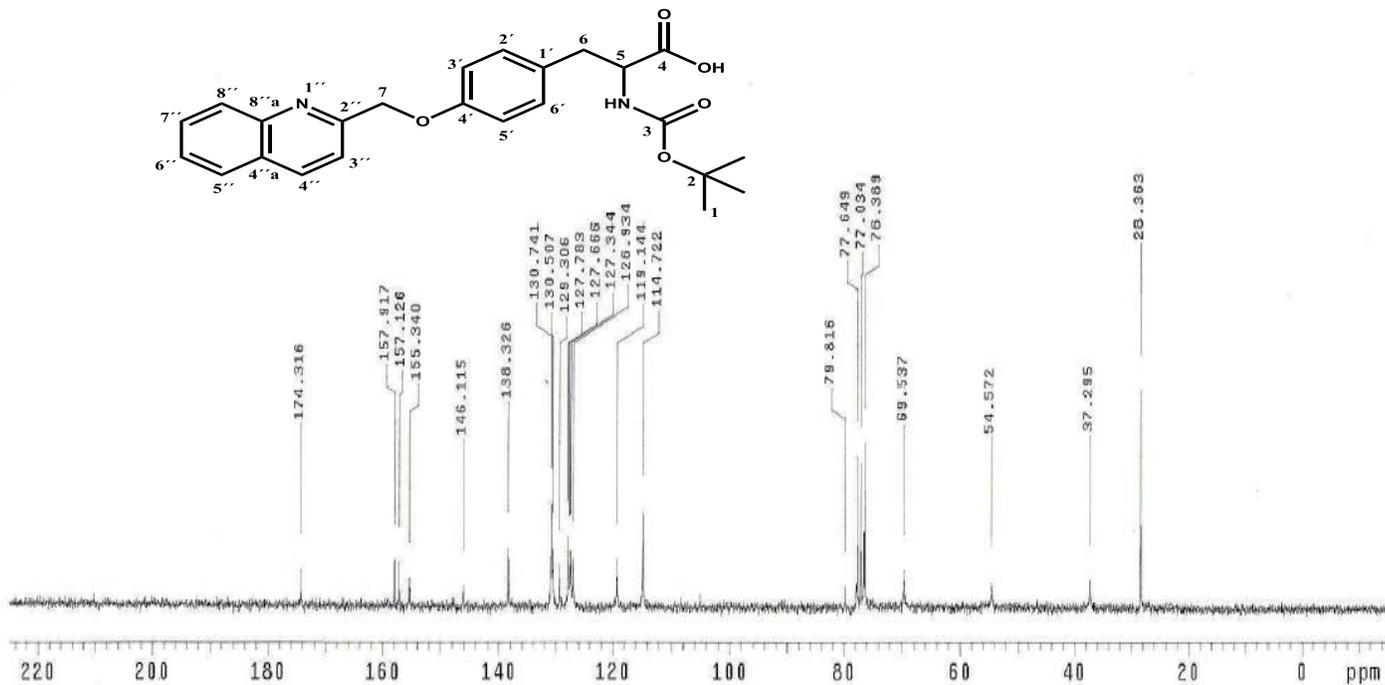


Ilustración 8. Espectro de RMN ^{13}C 100 MHz del compuesto **M2**.

Data : HTR011 Date : 10-Apr-2018 07:59
 Sample: orto BC Operator name Ing.Victoria Labastida G. In
 Note : Dr.Hugo Tlahuext/Miguel Centro de Investigaciones Quimicas UREM
 Inlet : Direct Ion Mode : FAB+
 Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]
 RT : 0.26 min Scan# : 3
 BP : m/z 248.0000 Int. : 6.86
 Output m/z range : 40.0000 to 800.0000

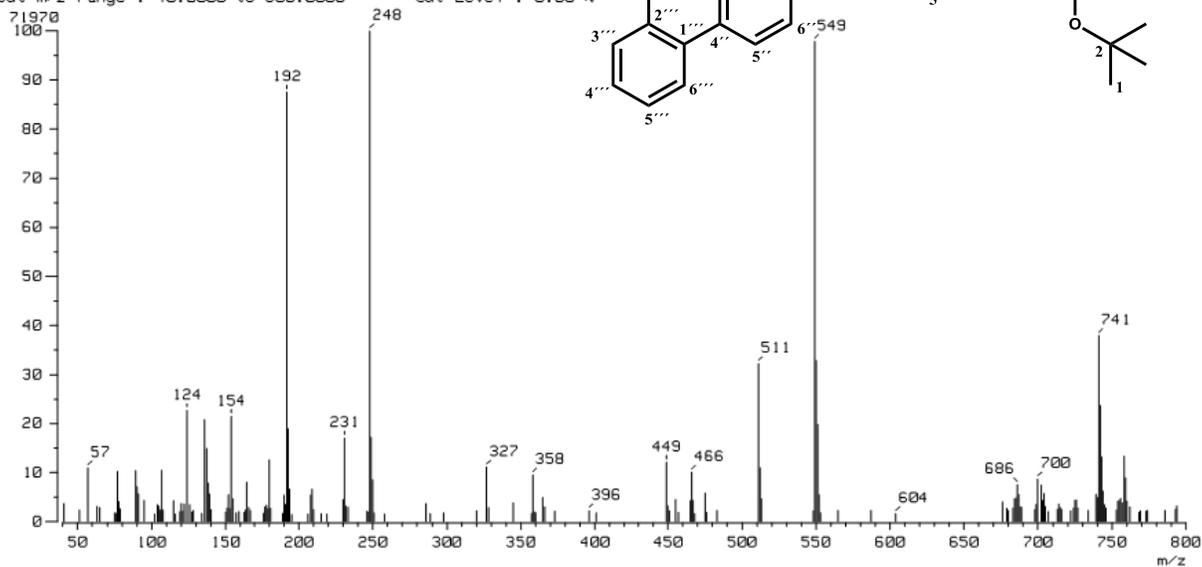


Ilustración 9. Espectro de EM-FAB+ del compuesto M3.

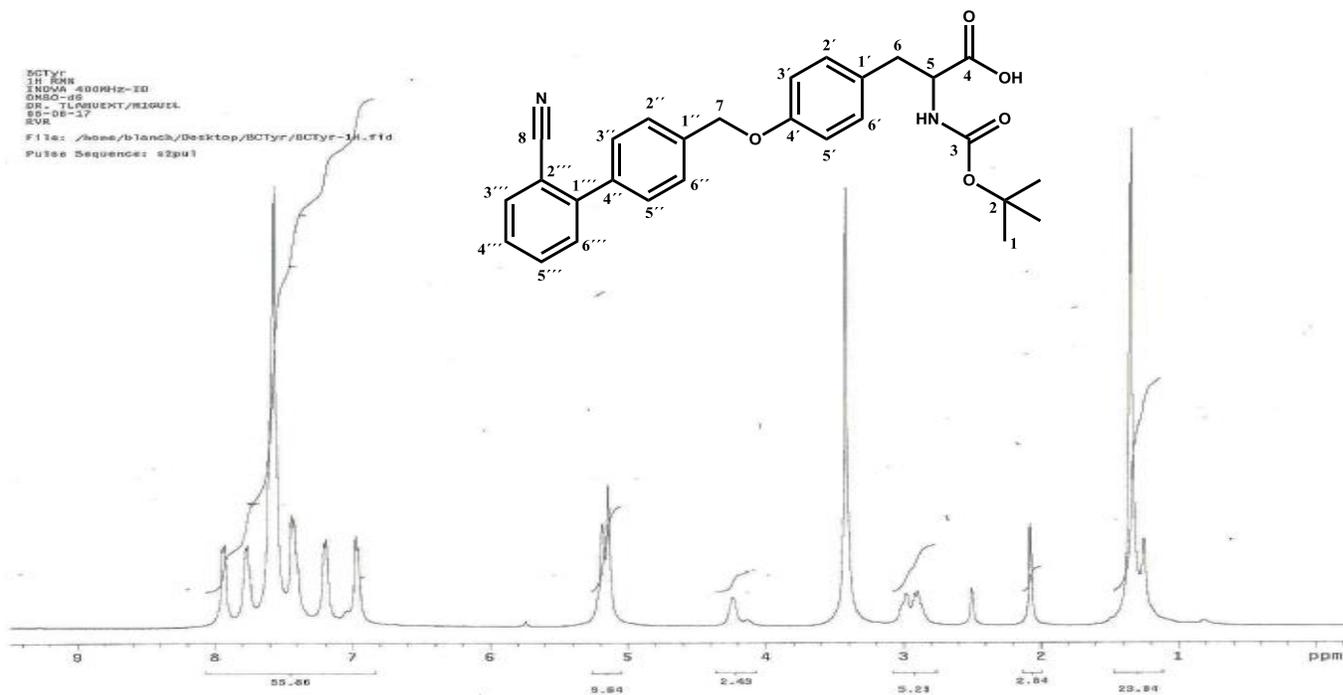


Ilustración 10. Espectro de RMN¹H 400 MHz del compuesto M3.

B1fTyr
CDCL3
230MHz
File: exp
Pulse Sequence: s2pu1

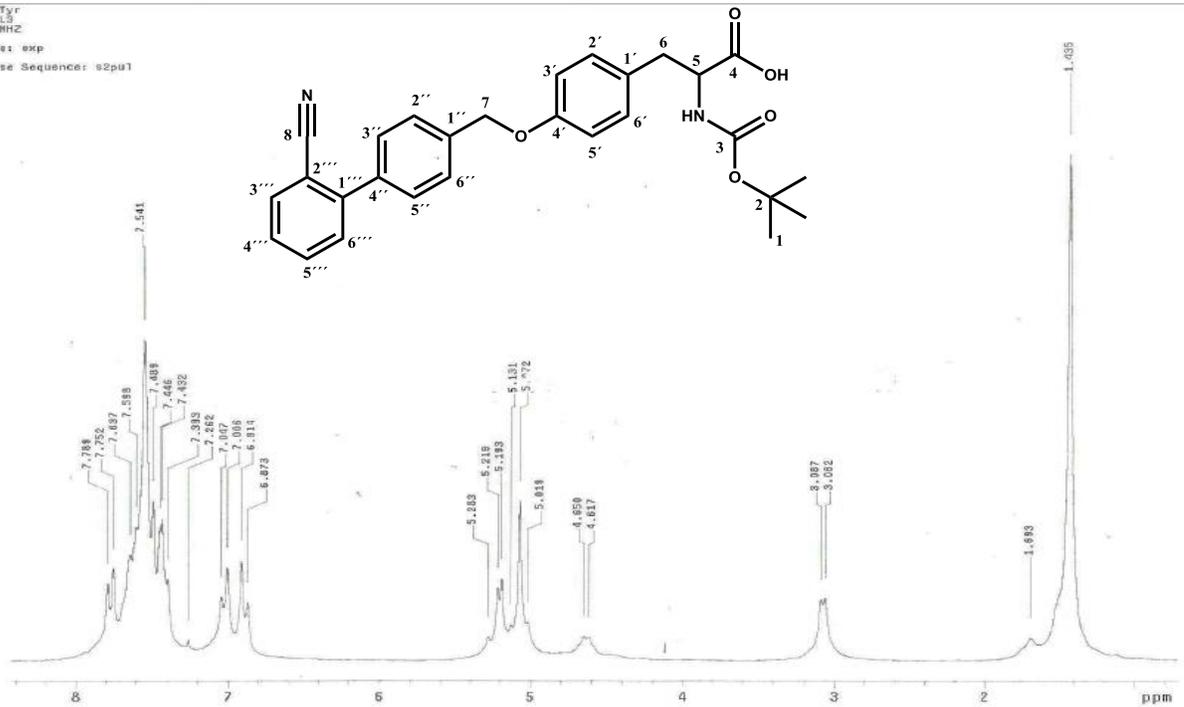


Ilustración 11. Espectro de RMN¹H 400 MHz del compuesto M3.

BCTyr
13C RMN
TRGM 800MHz-ID
DMSO-d6
DR - TLAUENT/MIGUEL
DG - 06-17
RVR
File: /home/blanch/Desktop/BCTyr/BCTyr-13C.f1d
Pulse Sequence: s2pu1

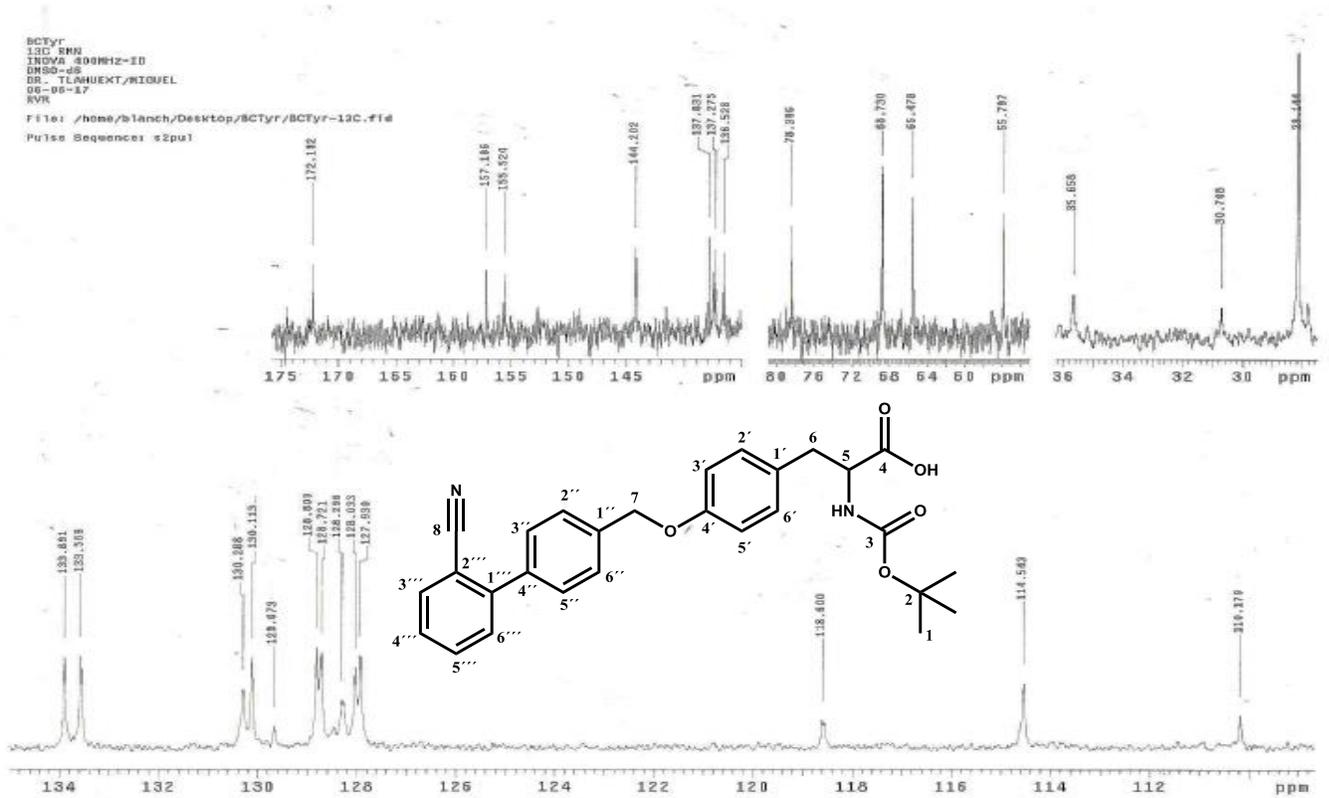


Ilustración 12. Espectro de RMN¹³C 100 MHz del compuesto M3.

[Elemental Composition]

Data : HTR008 Date : 17-Jan-2018 13:37
 Sample: BifTyr Operator name Ing.Victoria Labastida G. Ins
 Note : Dr.Hugo Tlahuext/Miguel Centro de Investigaciones Químicas UAEM
 Inlet : Direct Ion Mode : FAB+
 RT : 1.46 min Scan#: 36+(3,7)
 Elements : C 40/0, H 49/0, O 5/0, N 2/0
 Mass Tolerance : 1000ppm, 3mmu if m/z < 3, 15mmu if m/z > 15
 Unsaturation (U.S.) : -0.5 - 14.0

Observed m/z	Int%	Err [ppm / mmu]	U.S.	Composition
447.1930	45.2	-26.0 / -11.6	14.0	C 27 H 29 O 5 N

Ilustración 13. Resultados de análisis elemental del compuesto **M4**.

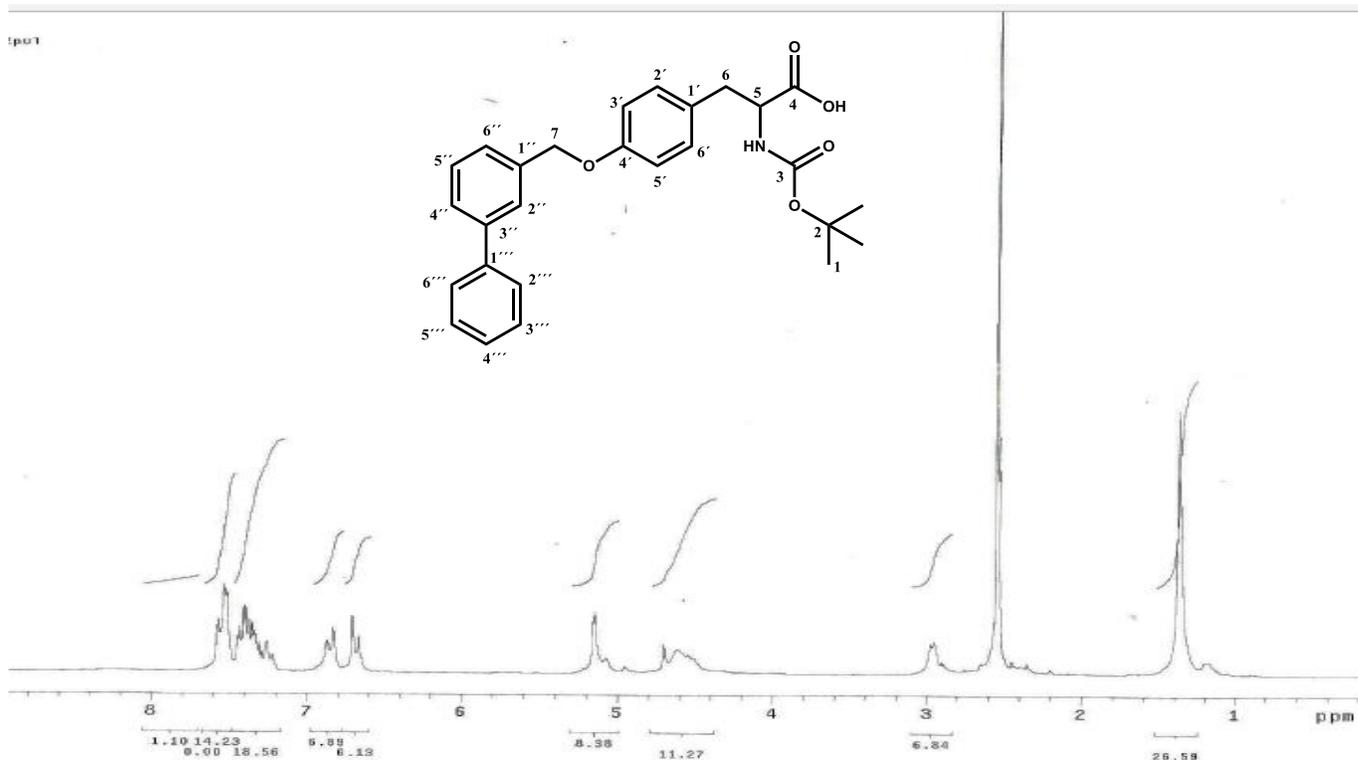


Ilustración 14. Espectro de RMN¹H 400 MHz del compuesto **M4**.

BifeniltoSecTyr
en Acetona
CDCl3, 40, 200 MHz
310517
File: 6kp
Pulse Sequence: s2pu1

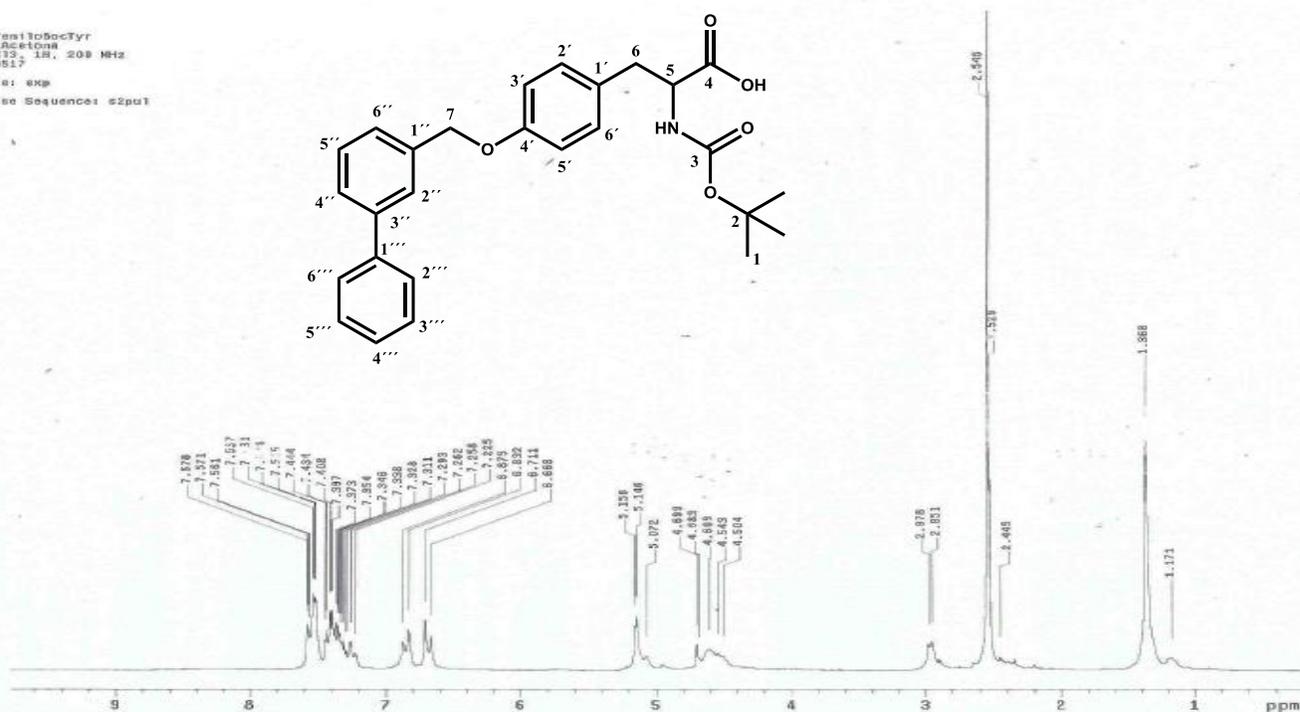
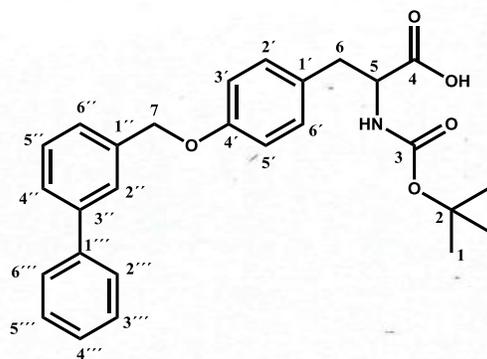


Ilustración 15. Espectro de RMN¹H 400 MHz del compuesto M4.

BifeniltoSecTyr
en Acetona
CDCl3, 40, 200 MHz
310517
File: 6kp
Pulse Sequence: s2pu1

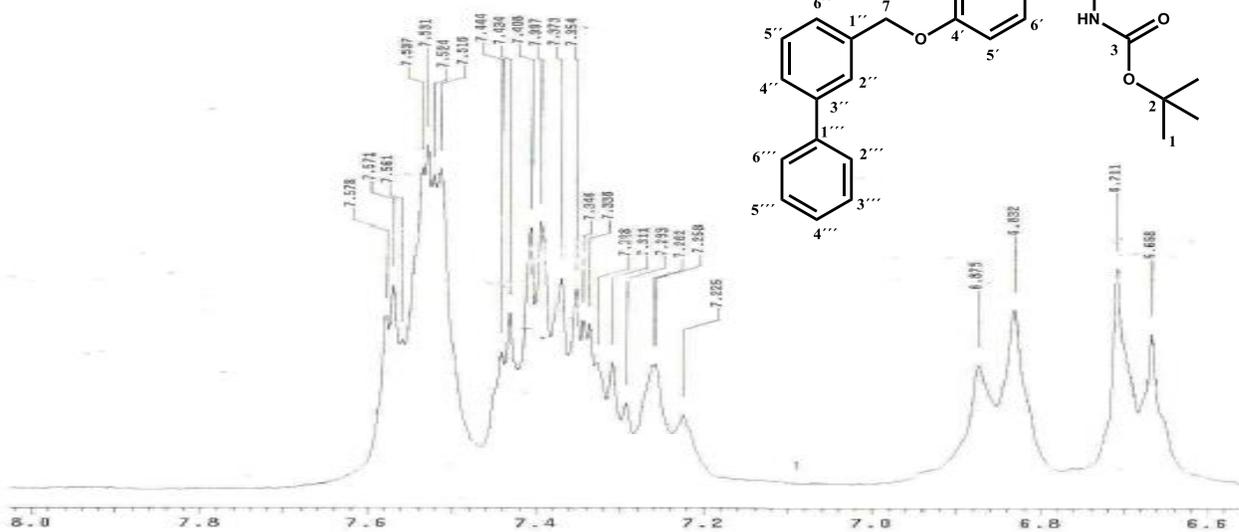
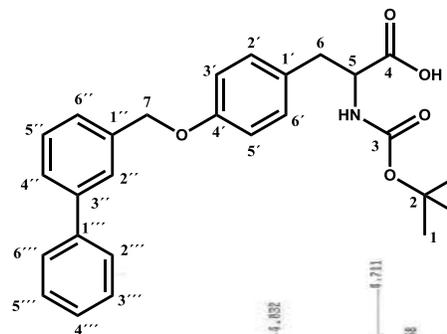
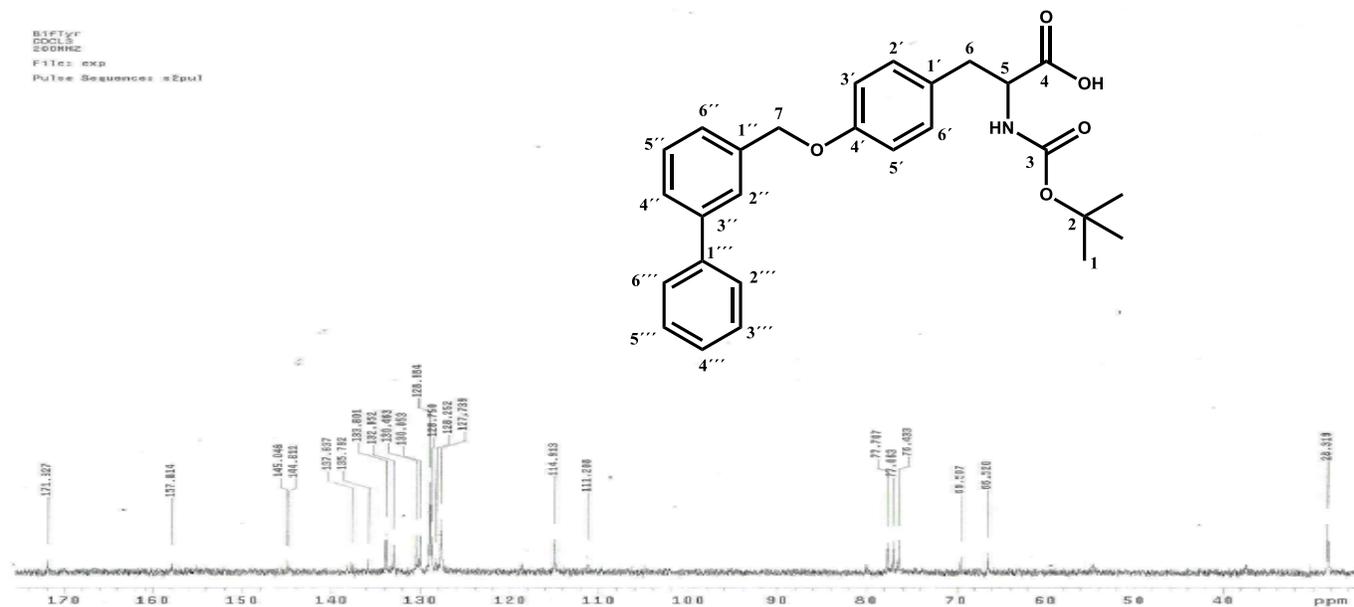


Ilustración 16. Espectro de RMN¹H 400 MHz del compuesto M4.



Servicio de Espectrometría de Masas
MStation JMS-700 JEOL Alta Resolución
Centro de Investigaciones Químicas UAEM
Tel. 329-79-97 ext.6013



[Elemental Composition]

Data : HTR003

Date : 17-Jan-2018 12:48

Sample: NafTyr

Operator name Ing.Victoria Labastida G.

Note : Dr.Hugo Tlahuext/Miguel Centro de Investigaciones Químicas UAEM

Inlet : Direct

Ion Mode : FAB+

RT : 1.21 min

Scan#: (7,53)

Elements : C 40/0, H 49/0, O 5/0, N 1/0

Mass Tolerance : 1000ppm, 3mmu if m/z < 3, 5mmu if m/z > 5

Unsaturation (U.S.) : -0.5 - 20.0

Observed m/z	Int%	Err[ppm / mmu]	U.S. Composition
421.1862	32.5	-6.6 / -2.8	13.0 C 25 H 27 O 5 N

Ilustración 18. Resultados de análisis elemental del compuesto M5.

CDCL3
101.250MHz
22-03-17
NafalenoMethylEsterTyr
File: exp
Pulse Sequences: s2pu1

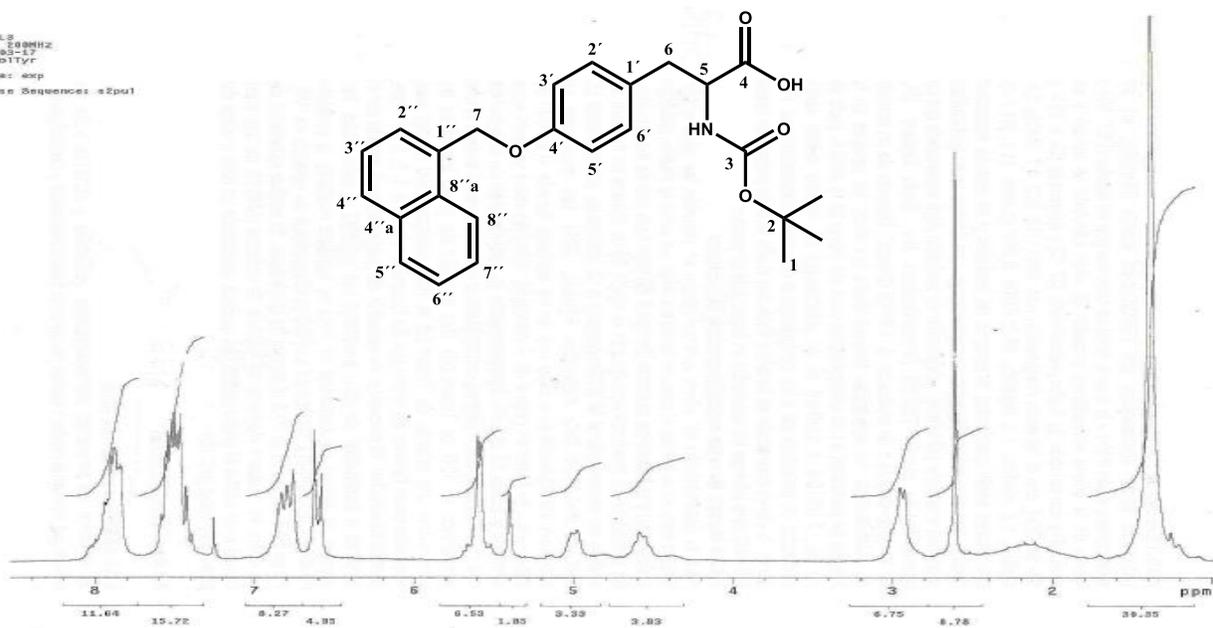


Ilustración 19. Espectro de RMN¹H 400 MHz del compuesto M5.

NafalenoMethylEsterTyr
1H CDCl3
298 MHz
11Sep17
File: exp
Pulse Sequences: s2pu1

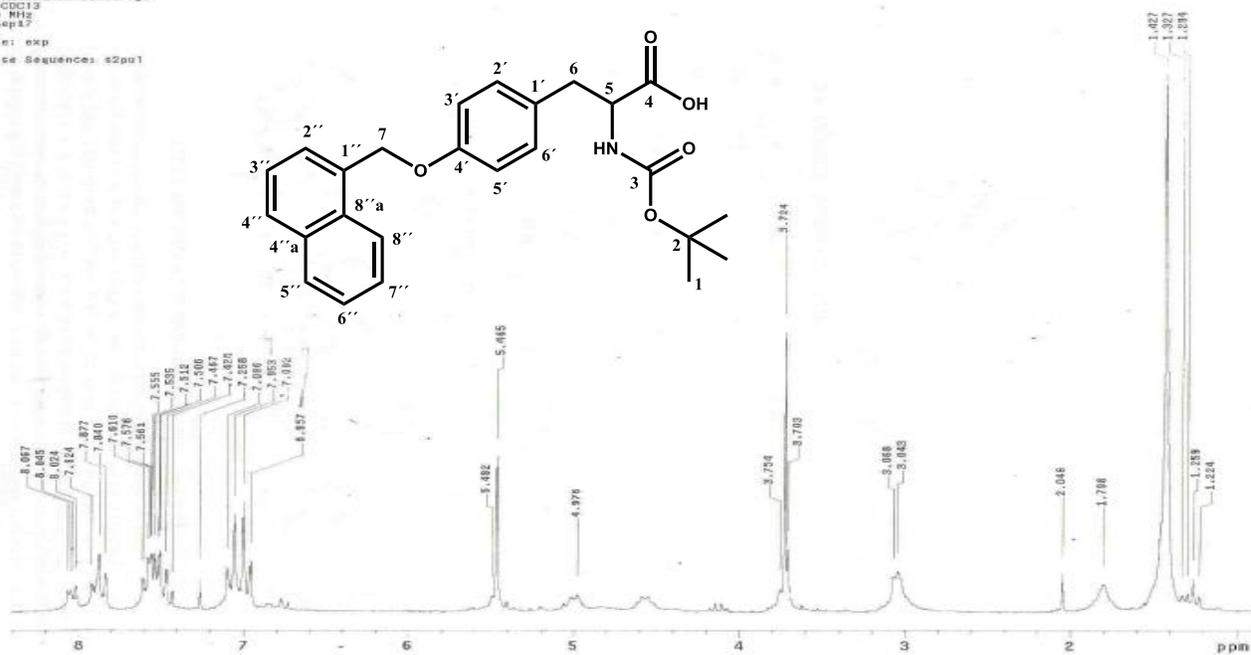


Ilustración 20. Espectro de RMN¹H 400 MHz del compuesto M5.

CDCL3
31, 200MHz
22-03-17
NakotTYT
File: exp
Pulse Sequence: s2pu1

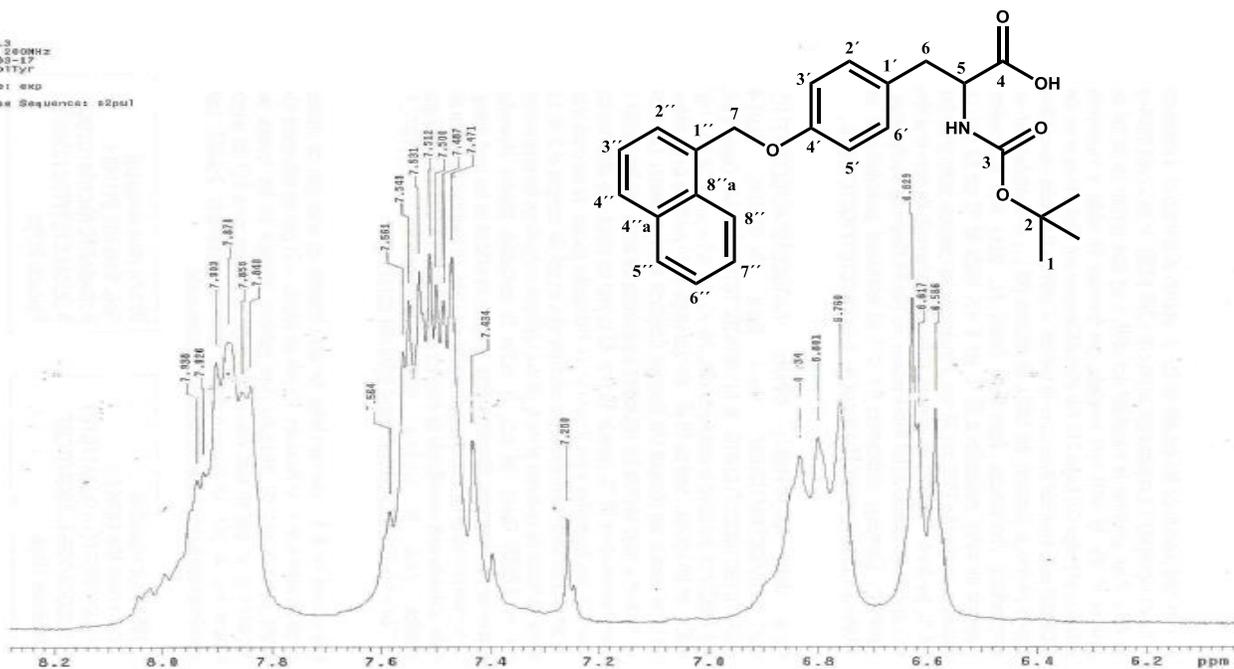


Ilustración 21. Espectro de RMN¹H 400 MHz del compuesto M5.

Nettyr
31, 200 MHz,
CDCL3
33-08p-17
File: exp
Pulse Sequence: s2pu1

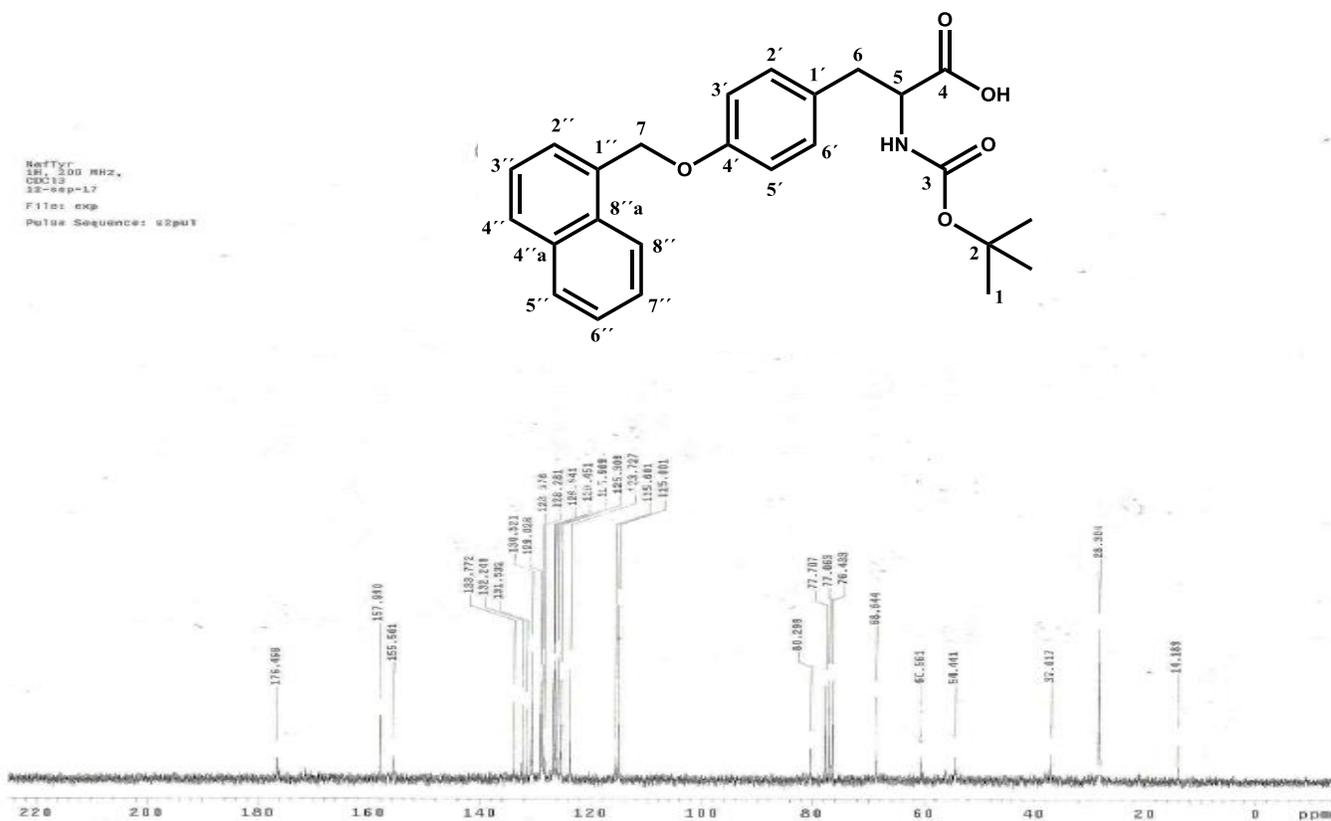


Ilustración 22. Espectro de RMN¹³C 100 MHz del compuesto M5.



Design, synthesis, *in vitro*, *in vivo* and *in silico* pharmacological characterization of antidiabetic *N*-Boc-L-tyrosine-based compounds[☆]

Miguel Ángel Herrera-Rueda^a, Hugo Tlahuext^b, Paolo Paoli^c, Abraham Giacomani-Martínez^d, Julio César Almanza-Pérez^d, Horacio Pérez-Sánchez^e, Abraham Gutiérrez-Hernández^a, Fabiola Chávez-Silva^a, Elix Alberto Dominguez-Mendoza^a, Samuel Estrada-Soto^a, Gabriel Navarrete-Vazquez^{a,*}

^a Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos 62209, Mexico

^b Centro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, 62209, Mexico

^c Dipartimento di Scienze Biomediche Sperimentali e Cliniche, Sezione di Scienze Biochimiche, Università degli Studi di Firenze, Viale Morgagni 50, 50134, Firenze, Italy

^d Laboratorio de Farmacología, Depto. Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México, D.F. 09340, Mexico

^e Bioinformatics and High Performance Computing Research Group (BIO-HPC), Computer Engineering Department, Universidad Católica de Murcia (UCAM), E30107, Murcia, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Diabetes
PTP-1B
PPAR
GLUT-4
Polypharmacology
Drug design

ABSTRACT

In this study, we synthesized five *N*-Boc-L-tyrosine-based analogues to glitazars. The *in vitro* effects of compounds 1–5 on protein tyrosine phosphatase 1B (PTP-1B), peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma (PPAR α/γ), glucose transporter type-4 (GLUT-4) and fatty acid transport protein-1 (FATP-1) activation are reported in this paper. Compounds 1 and 3 were the most active in the *in vitro* PTP-1B inhibition assay, showing IC₅₀s of approximately 44 μ M. Treatment of adipocytes with compound 1 increased the mRNA expression of PPAR γ and GLUT-4 by 8- and 3-fold, respectively. Moreover, both compounds (1 and 3) also increased the relative mRNA expression of PPAR α (by 8-fold) and FATP-1 (by 15-fold). Molecular docking studies were performed in order to elucidate the polypharmacological binding mode of the most active compounds on these targets. Finally, a murine model of hyperglycemia was used to evaluate the *in vivo* effectiveness of compounds 1 and 3. We found that both compounds are orally active using an exploratory dose of 100 mg/kg, decreasing the blood glucose concentration in an oral glucose tolerance test and a non-insulin-dependent diabetes mellitus murine model. In conclusion, we demonstrated that both molecules showed strong *in vitro* and *in vivo* effects and can be considered polypharmacological antidiabetic candidates.

1. Introduction

Type 2 diabetes mellitus (T2DM), a chronic metabolic disease, affects the quality of life of individuals worldwide and is characterized by increased blood glucose concentrations (> 120 mg/dL or > 7 mM) caused by a deficiency in insulin production by the pancreas or by the inactivation of some proteins involved in the insulin signaling pathway (insulin resistance) [1,2]. In addition, it is well known that diabetic patients often show high plasma triglyceride concentrations [3,4] which leads to the development atherosclerotic vascular disease, increasing worldwide mortality [5,6]. Currently, experimental T2DM drug discovery is focused on compounds with insulin-sensitizing activity that acts *via* several mechanisms. Some of them are mediated by

peroxisome-proliferator activated receptors, which include 3 different subtypes of nuclear receptors: PPAR α , PPAR γ , and PPAR δ [7]. Every isoform controls tissue-specific target proteins that act as lipid sensors. The activation of PPAR α reduces triglycerides by increasing fatty acid transport protein-1 (FATP-1) which is expressed in some insulin-sensitive tissues and increases the cellular uptake of long chain fatty acids [8], showing beneficial, preventative effects on cardiovascular risks [9]. Furthermore, PPAR γ activation in muscle and adipose tissue causes insulin sensitization by increasing glucose transporter type 4 (GLUT4) expression, which is one of the proteins involved in the insulin signaling pathway [10,11]. Indeed, it has been widely demonstrated that increased translocation and activation of GLUT-4 is essential for increased glucose uptake and improved glucose homeostasis in murine models

[☆] Taken in part from the Ph D. thesis of M. A. Herrera-Rueda.

* Corresponding author.

E-mail address: gabriel_navarrete@uaem.mx (G. Navarrete-Vazquez).

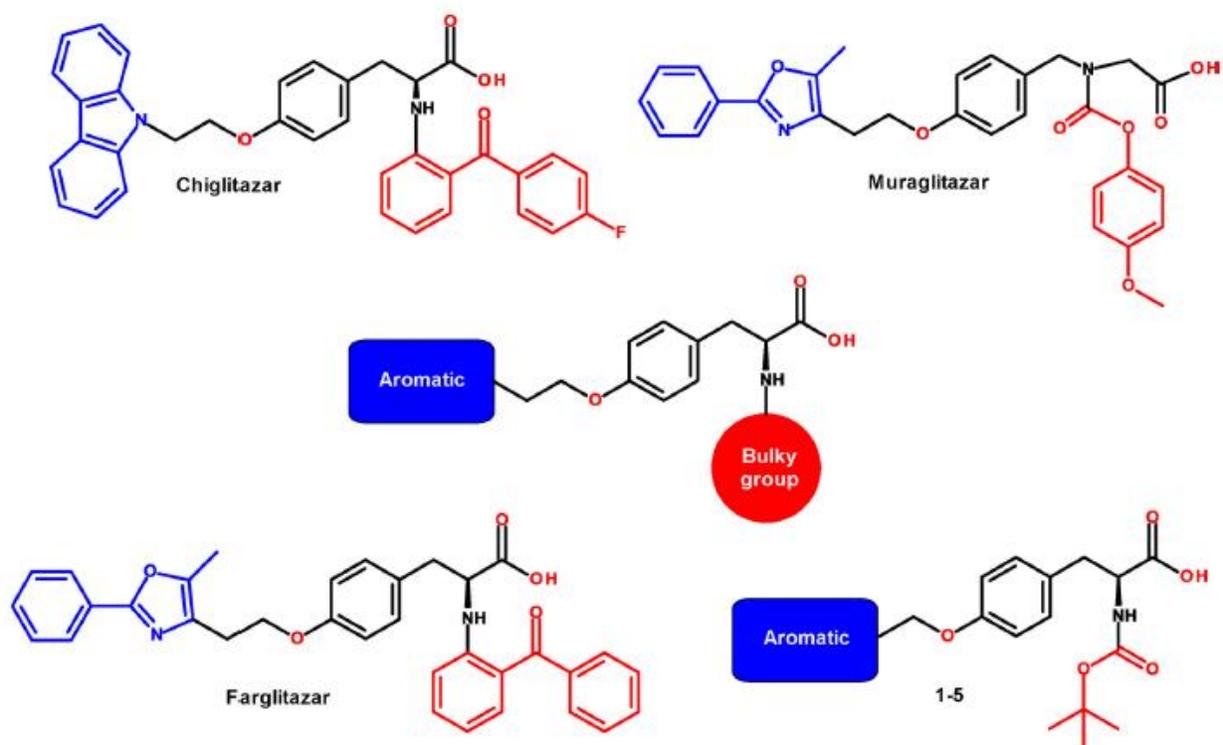


Fig. 1. Unified pharmacophore (center) for glitazars: Chiglitazar, muraglitazar, farglitazar and *N*-Boc-L-tyrosine derivatives 1–5.

[12]. PPAR α and γ are dual agonists based on a tyrosine scaffold belonging to the glitazar family (chiglitazar, farglitazar and muraglitazar; Fig. 1), which was developed to increase insulin sensitivity and simultaneously prevent diabetic cardiovascular complications [9,13–15]. Glitazars have been evaluated in large scale phase III clinical trials in T2DM patients in the last 20 years. Unfortunately, despite being effective at reducing triglycerides, raising HDL levels and improving insulin sensitivity, they also induced severe side effects, forcing researchers to interrupt the development of that kind of molecule [16]. Another promising molecular target for the treatment of diabetes via insulin sensitization is protein tyrosine phosphatase 1B (PTP-1B). This intracellular enzyme is involved in down-regulation of receptor tyrosine kinase activity following stimulation of the insulin or leptin receptors [17]. The PTP-1B inhibition causes the insulin receptor to remain in an activated state and hence extends the signaling pathway, thereby improving glucose uptake [18–20]. In addition to known drugs (farglitazar and chiglitazar), other compounds are based on a tyrosine scaffold and have been reported as PPAR α/γ dual agonists [21]. These compounds, which could be beneficial in diabetic cardiomyopathy, possess a unified pharmacophore made up of an acid moiety, a central phenyl ring, linked to an aromatic tail through an aliphatic linker and a bulky group tail connected to the amino group of tyrosine (Fig. 1) [22]. Compounds with dual action as PPAR γ activators and PTP-1B inhibitors have been reported elsewhere [23].

From our ongoing research on PPAR α and PPAR γ dual activators with cardiometabolic activities, we report the design and synthesis of five compounds based on the *N*-Boc-L-tyrosine scaffold (1–5) containing the unified glitazar pharmacophore (with the *N*-Boc as the bulky group) along with the *in vitro* relative mRNA expression of PPAR α , PPAR γ , FATP-1 and GLUT-4. We also describe the inhibition of PTP-1B by these compounds and the molecular docking of the most active compound in the ligand binding site of both PPARs and PTP-1B and its *in vivo* anti-diabetic effect using a murine model of hyperglycemia.

2. Materials and methods

2.1. Chemistry

The reagents were purchased from Merck/Sigma-Aldrich (Mexico). The melting point (m.p.) was calculated on an MPA120 EZ-Melt automated apparatus, and the values were not corrected. Thin layer chromatography visualized with UV light and iodine vapors were employed to monitor reactions. Based on respective spectral data, the chemical structures of the prepared molecules were confirmed. ^1H and ^{13}C NMR studies were conducted on Varian Oxford (400 MHz) and (100 MHz) instruments, respectively. Chemical shifts and coupling constants are given in ppm and Hz. Infrared (IR) spectra were obtained from a Bruker Vector 22 FT spectrophotometer. High Resolution Mass Spectrometry (HRMS) was performed with JEOL JMS-700 equipment. Optical rotations were measured by Perkin Elmer model 241 polarimeter at room temperature (20 °C) and 589 nm (concentration in 0.01 g/1 mL CHCl_3).

2.1.1. General preparation of 1–5

A solution of *N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-L-tyrosine (13) (0.2 g, 0.6 mmol) in CH_3CN (4 mL) was reacted with potassium carbonate (0.327 g, 2.3 mmol, 3.5 eq.). After the reaction mixture was stirred at room temperature for 30 min, adequately substituted methylarylhalides (6–10) were added (0.6 mmol, 1 eq.). The reaction was stirred at 70 °C for 9 h. The reaction was monitored by thin layer chromatography. After complete conversion, solvent was extracted in vacuum and 2 mL of cold water was added to the residue, and an acidic pH was reached with dilute HCl solution (10%). The aqueous layer was extracted, and the organic solvent was evaporated in vacuum. All compounds were purified by Preparative Layer Plates (PLC), and silica was extracted with CH_2Cl_2 ; the solvent was filtered and evaporated in vacuum obtaining a pure solid.

2.1.1.1. (*R*)-3-(4-((1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)methoxy)phenyl)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino) propanoic acid (1). Yellow crystals were obtained with 89% yield. M.p. 113.7–114.2 °C. $[\alpha]_{20}^D + 2$ (c, 0.1,

CHCl₃). IR (cm⁻¹): 1018 (C–O–C), 1244 (C(CH₃)₃), 1510 (N=C), 1612 (NCOO), 1685 (COO). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 1.26 (s, 9H, CH₃), 2.85 (m, 2H, Hβ), 3.8 (b, 1H, Hα), 4.67 (s, 2H, OCH₂), 6.56 (d, J_o = 8.2 Hz, 2H, H₃, H₅), 6.89 (d, J_o = 8.2 Hz, 2H, H₂, H₆), 7.12 (dd, J_o = 9.2, 3.4 Hz, 2H, H_{5'}, H_{6'}), 7.48 (dd, J_o = 9.0, 3.0 Hz, 2H, H_{4'}, H_{7'}), ppm. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ: 28.59 (CH₃), 37.17 (Cβ), 57.12 (Cα), 57.82 (OCH₂), 78.08 (C-tert), 115.14 (C₃, C₅), 115.27 (C_{4'}, C_{7'}), 122.04 (C_{5'}, C_{6'}), 129.33 (C₁), 130.69 (C₂, C₆), 138.72 (C_{3'}a, C_{7'}a), 155.29 (C_{2'}), 155.86 (NCOO), 155.96 (C₄), 175.39 (COOH) ppm; H.R.M.S.(FAB⁺): m/z 412.1899 [M+H]⁺ (calculated for C₂₂H₂₅N₃O₅H⁺ 412.1794).

2.1.1.2. (R)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-(4-(quinolin-2-ylmethoxy)phenyl)propanoic acid (2). White crystals were obtained with 87% yield. M.p. 139.8–140.0 °C. [α]₂₀^D + 14 (c, 0.1, CHCl₃). IR (cm⁻¹): 1020–1161 (C–O–C), 1243 (C(CH₃)₃), 1508 (N=C), 1611 (NCOO), 1705 (COO). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 1.41 (s, 9H, CH₃), 3.12 (m, 2H, Hβ), 4.60 (b, 1H, Hα), 5.23 (s, 2H, OCH₂), 6.86 (d, J_o = 7.6 Hz, 2H, H₃, H₅), 7.14 (d, J_o = 7.6 Hz, 2H, H₂, H₆), 7.52 (t, J_o = 7.2 Hz, 1H, H_{3'}), 7.70 (t, J_o = 8.4 Hz, 2H, H_{6'}), 7.70 (t, J_o = 7.2 Hz, 2H, H_{7'}), 7.79 (d, J_o = 7.76 Hz, 1H, H_{5'}), 7.79 (d, J_o = 7.76 Hz, 1H, H_{5'}), 8.12 (d, J_o = 8.8 Hz, 1H, H_{8'}), 8.20 (d, J_o = 8.12 Hz, 1H, H_{4'}) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ: 28.55 (CH₃), 37.45 (Cβ), 54.74 (Cα), 69.74 (OCH₂), 80.02 (C-tert), 114.89 (C₃, C₅), 119.34 (C_{3'}), 127.12 (C_{6'}), 127.51 (C_{5'}), 127.85 (C_{4'a}), 127.97 (C₁), 129.49 (C_{7'}), 130.69 (C_{8'}), 130.94 (C₂, C₆), 138.51 (C_{4'}), 146.28 (C_{8'a}), 155.53 (C₄), 157.32 (C_{2'}), 158.11 (NCOO), 174.51 (COO) ppm; H.R.M.S.(FAB⁺): m/z 423.1911 (M+H)⁺ (Calculated for C₂₄H₂₆N₂O₅H⁺ 423.1842).

2.1.1.3. (R)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-(4-((2'-cyano-[1,1'-biphenyl]-4-yl)methoxy)phenyl)propanoic acid (3). White crystals obtained with 92% yield. M.p. 133.5–135.3 °C. [α]₂₀^D + 9 (c, 0.1, CHCl₃). IR (cm⁻¹): 1005–1210 (C–O–C), 1243 (C(CH₃)₃), 1510–1533 (C=C), 1594 (NCOO), 1666 (COO), 2222 (Ar-CN). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.33 (s, 9H, CH₃), 2.93 (m, 2H, Hβ), 4.23 (d, 1H, Hα), 5.16 (s, 2H, OCH₂), 6.96 (d, J_o = 6.8 Hz, 2H, H₃, H₅), 7.19 (d, J_o = 7.2 Hz, 2H, H₂, H₆), 7.43 (d, J_o = 7.2 Hz, 1H, H_{4'}), 7.57 (m, 5H, H_{2'}, H_{3'}, H_{5'}, H_{6'}), 7.76 (d, J_o = 5.2 Hz, 1H, H_{5'}), 7.93 (d, J_o = 6.0 Hz, 1H, H_{3'}), ppm. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ: 28.14 (CH₃), 35.65 (Cβ), 55.79 (Cα), 68.73 (OCH₂), 78.39 (C-tert), 110.17 (C_{2'}), 114.54 (C₃, C₅), 118.60 (CN), 127.93 (C_{4'}), 128.16 (C_{3'}, C_{5'}), 128.76 (C_{2'}, C_{6'}), 129.67 (C₁), 130.20 (C₂, C₆), 133.56 (C_{6'}), 133.89 (C_{5'}), 136.52 (C_{3'}), 137.27 (C_{4'}), 137.83 (C_{1'}), 144.20 (C_{1'}), 157.10 (NCOO), 155.52 (C₄), 172.19 (COO) ppm; MS (FAB⁺) m/z 43, 57, 136, 192, 299, 373, 417 (M+H)⁺.

2.1.1.4. (R)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-(4-(naphthalen-1-ylmethoxy)phenyl)propanoic acid (4). White crystals were obtained with 85% yield. M.p. 119.6–120.8 °C. [α]₂₀^D + 25 (c, 0.1, CHCl₃). IR (cm⁻¹): 1011–1160 (C–O–C), 1234 (C(CH₃)₃), 1509–1584 (C=C), 1610 (NCOO), 1705 (COO). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.42 (s, 9H, CH₃), 3.12 (dd, 2H, Hβ), 4.60 (d, 1H, Hα), 5.46 (s, 2H, OCH₂), 6.97 (d, J_o = 8.2 Hz, 2H, H₃, H₅), 7.17 (d, J_o = 8.6 Hz, 2H, H₂, H₆), 7.42 (m, J_o = 7.0 Hz, 4H, H_{3'}), 7.45 (m, J_o = 7.8 Hz, 4H, H_{2'}), 7.50 (m, J_o = 7.2 Hz, 4H, H_{6'}), 7.55 (m, J_o = 7.8 Hz, 4H, H_{7'}), 7.84 (m, J_o = 7.8 Hz, 1H, H_{4'}), 7.88 (m, J_o = 9.2 Hz, 1H, H_{5'}), 8.02 (m, J_o = 9.0, 8.0 Hz, 4H, H_{8'}) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 28.30 (CH₃), 37.01 (Cβ), 54.44 (Cα), 68.64 (OCH₂), 80.29 (C-tert), 115.00 (C₃, C₅), 123.72 (C_{8'}), 125.30 (C_{2'}), 125.90 (C_{6'}), 126.45 (C_{7'}), 126.64 (C_{3'}), 128.28 (C₁), 128.67 (C_{5'}), 129.02 (C_{4'}), 130.52 (C₂, C₆), 131.53 (C_{8'a}), 132.24 (C_{4'a}), 133.77 (C_{1'}), 155.50 (C₄), 157.99 (NCOO), 176.46 (COO) ppm; H.R.M.S.(FAB⁺): m/z 421.1862 [M+H]⁺ (Calculated for C₂₄H₂₆N₂O₅ 421.1889).

2.1.1.5. (R)-3-(4-([1,1'-biphenyl]-3-ylmethoxy)phenyl)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)propanoic acid (5). White crystals were obtained

with 92% yield. M.p. 172.2–173.3 °C. [α]₂₀^D + 38 (c, 0.1, CHCl₃). IR (cm⁻¹): 1023–1160 (C–O–C), 1238 (C(CH₃)₃), 1509–1584 (C=C), 1610 (NCOO), 1708 (C=O). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.46 (s, 9H, CH₃), 3.15 (m, 2H, Hβ), 4.62 (m, 1H, Hα), 5.09 (s, 2H, OCH₂), 6.97 (d, J_o = 8.6 Hz, 2H, H₃, H₅), 7.17 (d, J_o = 8.2 Hz, 2H, H₂, H₆), 7.41 (d, J_o = 8.6 Hz, 1H, H_{6'}), 7.46 (dd, J_o = 8.6 Hz, 2H, H_{3'}, H_{5'}), 7.56 (s, 9H, H_{2'}, H_{4'}, H_{5'}, H_{4'}), 7.77 (d, J_o = 7.4 Hz, 2H, H_{2'}, H_{6'}) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ: 28.36 (CH₃), 37.06 (Cβ), 54.58 (Cα), 70.04 (OCH₂), 80.28 (C-tert), 115.00 (C₃, C₅), 126.33 (C_{5'}), 126.46 (C_{2'}), 126.83 (C_{4'}), 127.24 (C_{2'}, C_{6'}), 127.47 (C_{4'}), 128.85 (C_{3'}, C_{5'}), 129.08 (C₁), 129.08 (C_{6'}), 130.56 (C₂, C₆), 137.59 (C_{1'}), 140.91 (C_{1'}), 141.59 (C_{3'}), 155.63 (C₄), 157.93 (NCOO), 175.91 (COO) ppm; H.R.M.S.(FAB⁺): m/z 447.1930 [M+H]⁺ (Calculated for C₂₇H₂₉NO₅ 447.2046).

2.1.2. Preparation of N-(tert-butoxycarbonyl)-L-tyrosine (N-Boc-L-tyrosine, 13)

A suspension of L-tyrosine hydrochloride (12) (5 g, 22.9 mmol), Boc₂O (15 g, 68.7 mmol, 3 eq) and Et₃N (4.63 g, 45.8 mmol, 2 eq) in CH₂Cl₂ (50 mL) was heated at reflux for 2–3 h. After cooling the mixture to room temperature, a 10% aqueous solution of HCl (10 mL) was added. The layers were separated and the aqueous layer was extracted with CHCl₃ (20 mL). The combined organic layers were dried with sodium sulfate and filtered and the solvent evaporated under reduced pressure. The residue was recrystallized from ethanol, yielding 89%. [α]₂₀^D + 3.0 (c, 0.1, CHCl₃), M.p. 133–135 °C.

2.2. Pharmacological evaluation

2.2.1. In vitro PTP-1B studies

PTP-1B complete coding sequence was cloned with the sequence of the glutathione S-transferase (GST) in the pGEX-2T bacterial expression vector. The *E. coli* TB1 strain was employed for enzyme expression and purification. The recombinant fusion proteins were purified by affinity chromatography on glutathione-Sepharose, treated with thrombin and purified by gel filtration.

2.2.1.1. Phosphatase assay inhibition. The phosphatase assay was carried out at 37 °C using 4-nitrophenylphosphate as substrate. The assay buffer (pH 7.0) contained β,β-dimethylglutarate, EDTA and dithiothreitol. Furthermore, the reactions were started by adding aliquots of the PTP-1B preparation and stopped at proper times by addition of KOH. The amount of 4-nitrophenolate ion released was detected by reading the absorbance of samples at 400 nm (ε = 18,000 M⁻¹ cm⁻¹). For each inhibitor, the IC₅₀ was calculated by determining the initial hydrolysis rate under a fixed 4-nitrophenylphosphate concentration, equal to the Km value, in the presence of increasing inhibitor concentrations. Data obtained were fitted to the following equation using the Fig-Sys software:

$$y = \frac{\text{Max} - \text{Min}}{1 + \left(\frac{x}{\text{IC}_{50}}\right)^{\text{slope}}} + \text{Min}$$

where y = V_i / V₀ represents the ratio between the activity measured in the presence of the inhibitor and the activity of enzyme in the absence of inhibitor. The concentration of the inhibitor is represented by the “x” parameter [24]. Ki values were determined using suitable equations depending on the inhibition mechanisms of the compounds. All initial rates were measured in triplicate [18–20].

2.2.2. In vitro PPAR α/γ, FATP-1 and GLUT-4 assays

Assays were performed as described previously [2,7,25–28]. 3T3-L1 cells (9 × 10⁵ murine fibroblast/well) were cultured using Dulbecco's modified Eagle's medium. Cell viability, following treatment with compounds 1 and 3, was measured using the 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay at different

concentrations ranging from 1 μ M to 100 μ M. Confluent cultures of 3T3-L1 cells were induced to differentiate to the adipocyte phenotype using 3-isobutyl-1-methylxanthine (0.5 mM), dexamethasone acetate (0.25 μ M), and murine insulin (0.8 μ M) for 48 h, followed by another insulin pulse. The differentiated cells were treated for 24 h to determine the effects of compounds **1** and **3** at 10 μ M on PPARs, FATP1 and GLUT-4 mRNA expression. RNA was isolated from the differentiated cells, and 2 μ g of total RNA was reverse-transcribed. Transcriptase was inactivated, and the samples were cooled. For the amplification of every reverse-transcribed reaction, SYBR-Green master mix containing 0.5 mM of customized primers for PPAR α , PPAR γ , GLUT-4, and FATP-1 was used. Polymerase chain reaction (PCR) was employed for each sample measuring the threshold cycles (Ct) and the Δ Ct values. Changes in the relative expression levels of each specific gene ($\Delta\Delta$ Ct) were calculated [2].

2.2.3. In vivo antidiabetic assay

The experiment was carried out in accordance with the Mexican Federal Regulations for Animal Experimentation and Care (NOM-062-ZOO-1999, SAGARPA), founded on U.S. NIH Publication No. 85-23. CD1 mice weighing 25–30 g were maintained in groups of 6 under laboratory environments with water *ad libitum* and fasted for 16 h. The experimental diabetes model was induced in these mice using a single administration of streptozotocin (STZ, 100 mg/kg, i.p.) 15 min before the injection of nicotinamide (NA, 40 mg/kg, i.p.). The hyperglycemic effect was established as higher glycemic levels (> 180 mg/dL), and animals were designated for the assay. The hyperglycemic mice were divided into 3 groups of 6 animals each (n = 6). Individuals of experimental groups were orally administered a suspension of 100 mg/kg of **1** and **3** in 10% tween 80 (vehicle). The control group was treated only with vehicle. A dose of 5 mg/kg of sulfonylurea (glibenclamide) was employed as a hypoglycemic reference. Samples of mice blood were collected from the caudal veins at 0, 1, 3, 5 and 7 h after oral gavage of compounds **1** and **3**. Blood glucose concentrations were calculated using the Accu-Chek commercial glucometer from Roche. The percent variation of glycemia was calculated using the following formula: %Variation of glycemia = $[(G_x - G_0)/G_0] \times 100$, where G_0 is initial glycemia level and G_x is the glycemia level at each time point [2,19,20].

2.2.4. Oral glucose tolerance test

Normal glycemic mice were separated into 3 groups of six mice. 30 min after administration of compounds **1** and **3**, a single gavage of glucose solution (2 g/kg) was given to each mouse. Blood samples were obtained as described above at 0, 0.5, 1, 1.5, 2 and 3 h after the oral gavage of vehicle, glibenclamide or a test compound. Plasmatic glucose levels and the percent variation of glycemia for each group were established as mentioned above [29].

2.2.5. Statistical analysis

For *in vivo* experiments (6 mice/group), all values are expressed as the mean \pm S.E.M. To analyze the changes in the percent variation of glycemia, ANOVA was used, followed by a Bonferroni test. The *in vitro* studies were carried out in quadruplicate or sextuplicate in Adipocytes or PTP-1B. The statistical analysis for these experiments was an ANOVA complemented with a Dunnett's multiple comparison test. $p < 0.05$ was considered statistically significant. GraphPad Prism 5.0 was employed for data analysis.

2.3. Molecular docking calculation

Crystal structure information of PPAR α , PPAR γ and PTP-1B was obtained from the Protein Data Bank (PDB) searching the respective PDB codes: 1K7L (resolution: 2.5 Å), 1K74 (2.3 Å) and 4Y14 (1.898 Å). The docking experiments were performed using AutoDock (version 4.2.6.) to execute several runs in each calculation and provide putative

binding modes. All molecules of water and the cocrystal ligands were extracted from the crystallographic coordinates. After the docking calculation was finished, the complete solutions were clustered into groups with RMSD < 2.0 Å. MOE 2018.01 [30] and Pymol 1.7.4. were employed for adequate visualization.

2.3.1. Validation of docking experiments

All protocols were validated *via* redocking of cocrystal molecules into the ligand site of each receptor or enzyme target: PPAR α (GW409544), PPAR γ (GW409544) and PTP-1B (CPT157633). The RMSD between the cocrystal molecule and the performed experiment must be < 2.0 Å in all cases (0.37, 1.23 and 1.87 Å, respectively). These values indicate that the parameters used for calculations agree by replicating the conformation and orientation in the X-ray coordinates of the receptors and enzyme.

3. Results and discussion

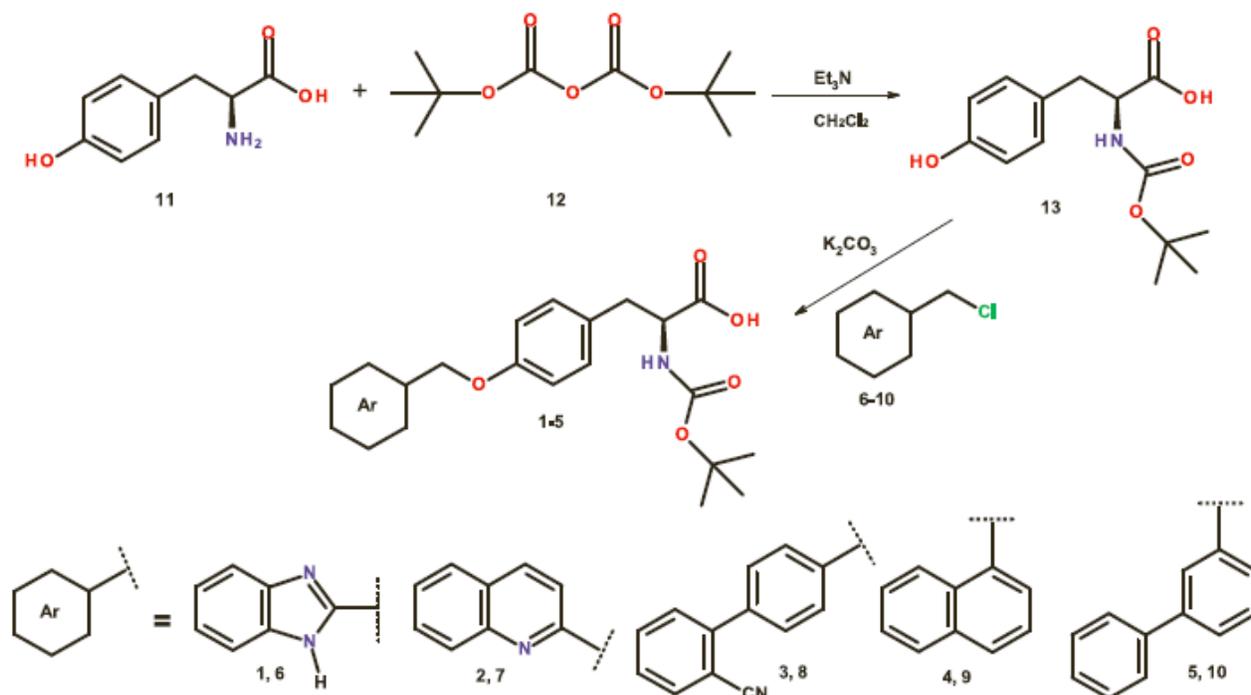
3.1. Chemistry

L-tyrosine (**11**) was treated with di-*tert*-butyl dicarbonate (Boc₂O, **12**) to give *N*-Boc-L-tyrosine (**13**). Compounds **1**–**5** were obtained *via* Williamson synthesis from the reaction of **13** and the appropriately substituted methylarylhalides **6**–**10** using nonprotic polar solvents and K₂CO₃ as a nonnucleophilic base (Scheme 1). The compounds were recuperated with 85–92% yield, and the purification was done using Preparative Layer Plates (PLC). The chemical structures of the synthesized molecules were confirmed based on their spectral data (NMR and Mass spectra). In the nuclear magnetic resonance experiments (¹H NMR; δ ppm), the signals of each proton of the compounds were confirmed based on their chemical shifts, multiplicities, and coupling constants. The five compounds showed a single signal integrated for the 9 hydrogens, ranging from δ_H 1.26 to 1.46 ppm, of the (CH₃)₃ of the *N*-Boc group. In all compounds, the aliphatic signals were found at upfield shifts in 3.79 to 4.62 ppm accredited to H α , and signals ranging from δ 2.85 to 3.15 ppm were assigned to H β . The displacements for the methyleneoxy group were found in δ_H 4.67–5.46 ppm (singlet). The aromatic part of the ¹H NMR spectra of all compounds possessed an A₂B₂ spin system signals oscillating from δ_H 6.89 to 7.19 ppm (d, J_{ortho} = 6.8–8.6 Hz) and 6.56–6.97 ppm (d, J_{ortho} = 7.2–8.6 Hz) accredited to the equivalent hydrogens (H-2', H-6' and H-3', H-5', respectively) of the phenyl-*p*-substituted tyrosine scaffold. In the ¹³C NMR spectra, persistent signals were found for the *N*-Boc-L-tyrosine scaffold: One signal fluctuated from δ_C 28.1 to 28.6 ppm, attributed to the (CH₃)₃ of the *N*-Boc group; two signals oscillated from δ_C 54.4 to 57.1 and 35.6 to 37.4 ppm, attributed to α and β aliphatic carbons, respectively.

An additional recurrent signal associated with the CH₂O group was located in upfield shifts fluctuating from δ_C 57.8 to 70.0 ppm. A constant signal appeared in δ_C 78.1 to 80.3 ppm, attributed to *C*-*tert* of *N*-Boc group. In the aromatic region, four persistent signals were found: 127.9 to 129.7 (C-1), 130.1 to 130.7 (C-2 and C-6), 114.5 to 115.1 (C-3 and C-5) and 155.5 to 155.9 (C-4) ppm, corresponding to the benzene nucleus of tyrosine. Another two frequent signals were located in downfield shifts from δ_C 155.9 to 157.9 ppm given to C=O group belonging to *N*-Boc as well as the COOH signal found in δ_C 172.2–176.5 ppm.

3.2. The in vitro PTP-1B assay

The results of preliminary enzymatic assays carried out by using a fixed inhibitor concentration (final concentration was 50 μ M) are reported in Fig. 2. We observed that compound **1** (with benzimidazole substituent) and compound **3** (with biphenylcarbonitrile substituent) inhibit the activity of PTP-1B by 60% and 80%, respectively, compared with the control test (0% of inhibition). In contrast, compounds **2** (quinolinyl), **4** (naphthyl) and **5** (*m*-biphenyl) behave as weaker



Scheme 1. Synthetic scheme of compounds 1–5.

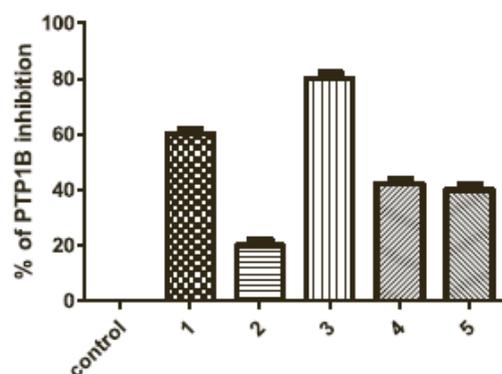


Fig. 2. Percentage of inhibition of PTP-1B activity obtained by incubating the enzyme in the presence of compounds 1–5 at 50 μ M. DMSO was used as the control. Each bar represents the mean \pm S.E.M. ($n = 4$).

inhibitors.

Taking these results into account, an additional test was performed to calculate the IC_{50} for the most active inhibitors, namely, compounds 1 and 3. For this purpose, we studied the PTP-1B catalyzed hydrolysis of 4-nitrophenyl phosphate by using different concentrations of compounds 1 and 3 calculating the time-course of 4-nitrophenol releasing (measured at 400 nm). The initial rates decreased with cumulative inhibitor concentrations; thereby, the IC_{50} s were determined (Fig. 3). We found that the two compounds are equipotent because they showed IC_{50} s of 43.6 ± 0.7 and 44 ± 3.0 μ M, respectively.

To obtain compounds with polypharmacological activities and to continue with the *in vitro* tests on PPAR α/γ , an initial screening was carried out selecting only compounds 1 and 3 as the best candidates since they were the most potent and selective as PTP-1B inhibitors.

3.3. Relative expression of PPARs, FATP-1 and GLUT-4

Fibroblasts were differentiated to the adipocytes to determine the influence of testing molecules on PPAR α , PPAR γ , GLUT-4 and FATP-1 expression. Differentiated cells were treated for 24 h with 10 μ M of molecules 1, 3, fenofibrate (FEN) and pioglitazone (PIO), both used as

reference drugs. Then, changes in the mRNA expression levels were calculated. Figs. 4 and 5 show that these compounds significantly increased the levels of PPARs, FATP-1 and GLUT-4 mRNA expression to a greater extent than fenofibrate and pioglitazone.

Compound 1 significantly increased the relative mRNA expression levels of PPAR α (approximately 8-fold) and its downstream gene FATP-1 (10-fold). This activation of PPAR α by compound 1 could reduce triglycerides by increasing FATP-1 which could enhance the cellular uptake of fatty acids and lead to beneficial preventative effects on cardiovascular risks. FATP-1 also plays an important role in the incorporation of postprandial fatty acids into adipose tissue and muscle as well as in the etiology of diet-induced insulin resistance and metabolic disease [8]. Compound 3 also increased the levels of mRNA expression of PPAR α (approximately 3-fold) and FATP-1 (15-fold).

On the other hand, compound 1 significantly increased the mRNA levels of PPAR γ (approximately 8-fold) and its downstream gene GLUT-4 (2.5-fold). Activation of PPAR γ may reduce glycemia in diabetic people *via* insulin sensitization. Multiple line of evidence specify that increased GLUT-4 in skeletal muscle is essential for glucose control [2], and these results suggest that compound 1 induces GLUT-4 mRNA expression to a greater extent than pioglitazone.

Moreover, compound 3 did not induce a meaningful increase in the mRNA expression levels of PPAR γ or GLUT-4. These results indicate that an increase in the expression of the downstream genes FATP-1/GLUT4 is not always dependent upon high mRNA expression of PPAR α/γ . Finally, it was clearly observed that compound 1 possesses polypharmacological activities by increasing the mRNA expression of PPAR α , PPAR γ and their downstream genes (FATP-1 and GLUT-4, respectively). Therefore, it could decrease plasma glucose and triglycerides levels, increase insulin sensitivity and simultaneously prevent cardiovascular complications. Polypharmacological (multitarget) activity is the modulation of different molecular targets to reach a desired therapeutic effect [2]. It refers to molecules that are recognized by different drug targets [31]. A polypharmacological treatment that regulates glucose levels and diminished several complications related to hyperglycemia and insulin resistance would be an attractive choice for T2DM therapy.

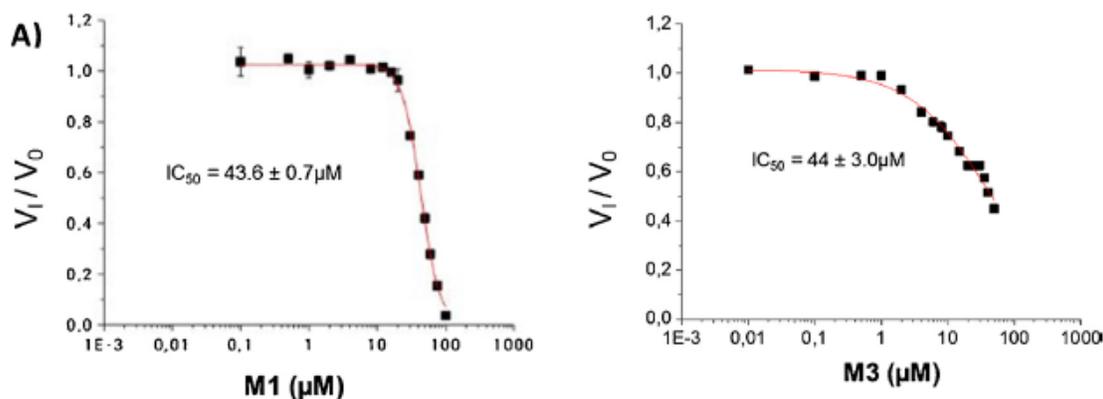


Fig. 3. The IC_{50} for compounds **1** (A) and **3** (B) was calculated by plotting the data for the residual activity of PTP-1B against the concentration of compounds **1** and **3**. Fifteen inhibitor concentrations were employed. All assays were conducted in quadruplicate. Data represent the mean \pm S.E.M.

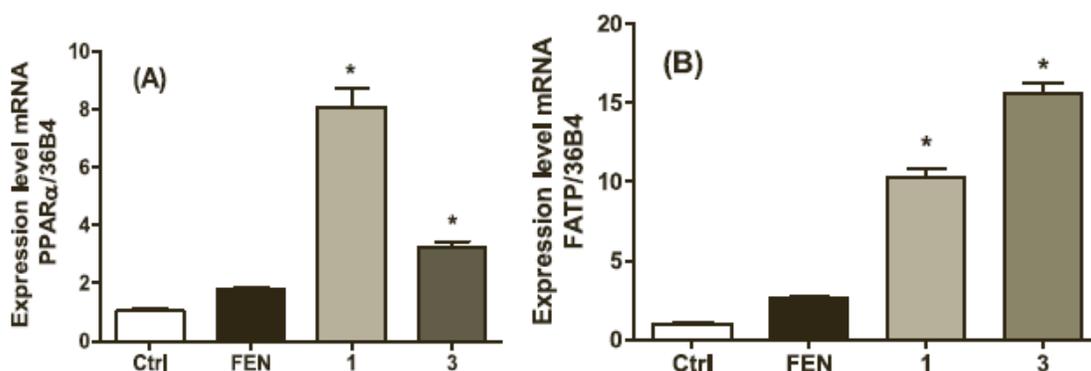


Fig. 4. (A) Influence of **1**, **3** and fenofibrate on changes in the relative mRNA expression of PPAR α . (B) Influence of **1**, **3** and fenofibrate on the relative mRNA expression of FATP-1. Results are means \pm S.E.M. (n = 5). *p < 0.001 compared with the control group.

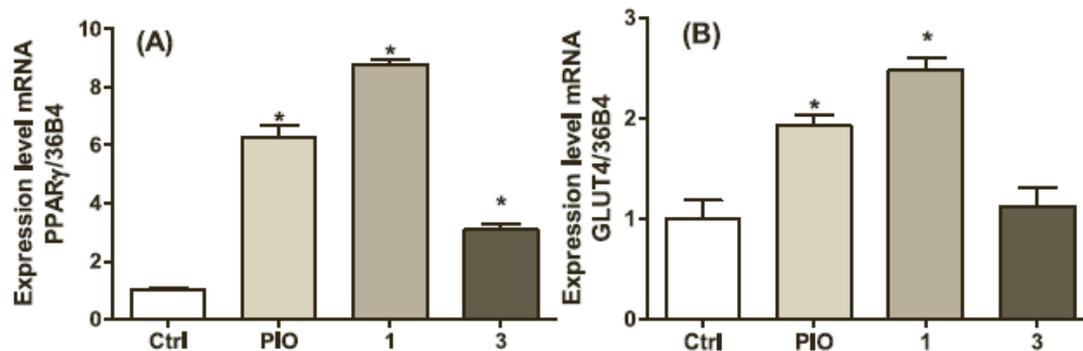


Fig. 5. (A) Influence of **1**, **3** and pioglitazone on the relative mRNA expression of PPAR γ . (B) Influence of **1**, **3** and pioglitazone on the relative mRNA expression of GLUT-4. Results are means \pm S.E.M. (n = 5). p < 0.001 compared with the control group.

3.4. In vivo assays

3.4.1. Antidiabetic activity of compounds **1** and **3**

Compounds **1** and **3** were the most potent for the three T2DM protein targets selected, and both were chosen to evaluate their *in vivo* effects on STZ/NA diabetic mice, an experimental non-insulin-dependent diabetes murine model [2,7,25]. As a hypoglycemic control, glibenclamide was employed to confirm that the pancreas damage induced in this model was limited and that the pancreatic β -cells still generated insulin responding to the secretagogue signal. Compounds **1** and **3** were administered *via* intragastric gavage using an experimental dose of 50 mg/kg. Administration of compounds **1** and **3** significantly decreased plasma glucose concentration (p < 0.05) during acute time periods (7 h) compared with the vehicle group (Fig. 6). Compound **1** showed the best activity, decreasing blood glucose levels after the first

hour, compared with compound **3** which started decreasing glucose levels after three hours. The pharmacodynamic and pharmacokinetic behavior of compound **1** could be attributed to the benzimidazole-privileged structure in the hydrophobic region of the *N*-Boc-L-tyrosine derivatives generating a continued decrease in glycemia, by nearly 50% at 7 h after compound oral administration. Compound **3** reduced glycemia three hours after intragastric gavage (–20% at 3 h and –45% at 5 h). Moreover, a statistically significant difference was observed between **3** and the vehicle group at the end of the experiment, when the maximum influence of the compound was obtained (Fig. 6).

3.4.2. Oral glucose tolerance test (OGTT) in normoglycemic mice

To verify the plausible antihyperglycemic or hypoglycemic effect of compounds, we carried out an oral glucose tolerance test in normoglycemic mice. Compounds **1** and **3** were chosen according to the

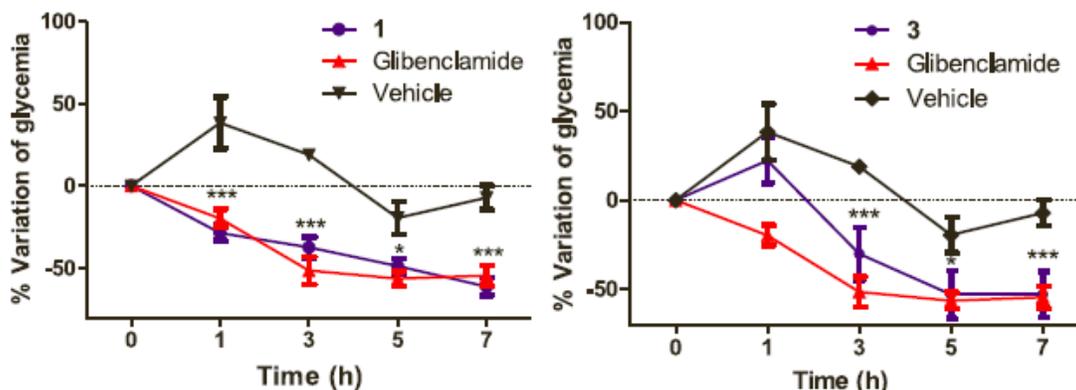


Fig. 6. Influence of an intragastric 100 mg/kg dose of compound 1 or 3 or 5 mg/kg glibenclamide in the STZ/NA hyperglycemic mouse model (n = 6). ***p < 0.05 versus the vehicle group (Tween 80, 10% v/v).

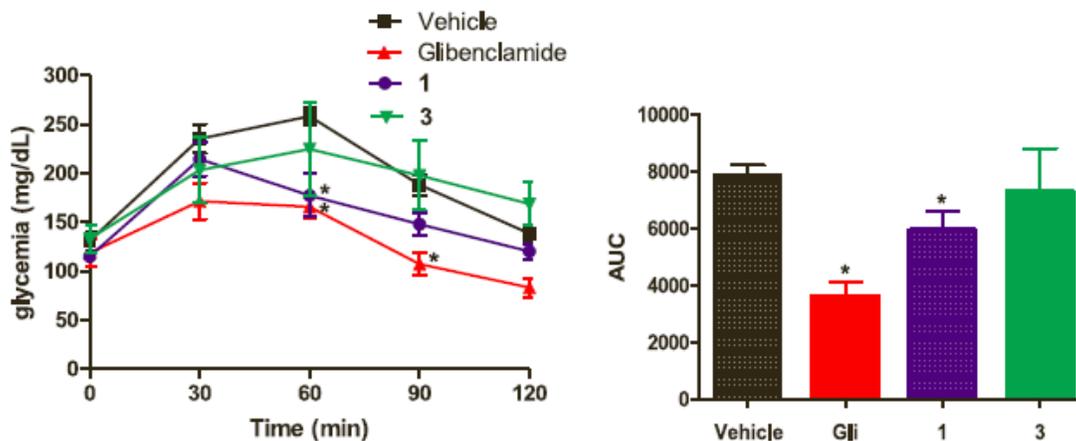


Fig. 7. (A) OGTT and (B) AUC of compounds 1 and 3. *Significantly different from the vehicle group. One-way and two-way ANOVA with post hoc Dunnett's test (n = 6, mean ± SEM, p < 0.05).

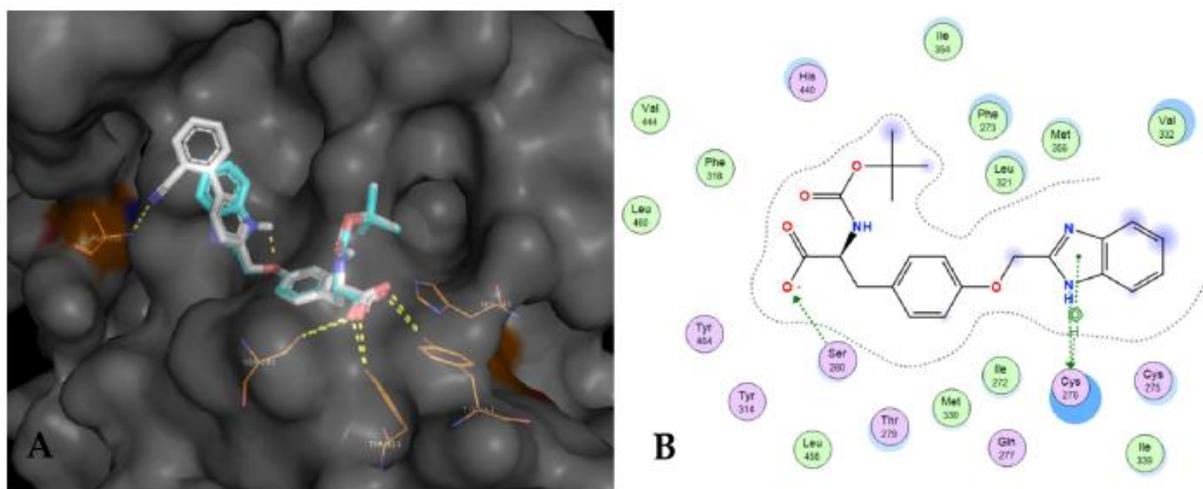


Fig. 8. (A) 3-D binding diagram of compounds 1 and 3 in the PPAR α ligand binding pocket. The stick models represent: 1 (cyan), 3 (white), and amino acids as orange lines. Yellow lines suggest polar contacts. (B) 2-D interaction map for compound 1 on PPAR α .

results obtained in the antidiabetic assay. Fig. 7 shows the results of these assessments; compound 1 (100 mg/kg) significantly reduced blood glucose 60 min after glucose load (2 g/kg) compared with the vehicle group, which presented the maximum blood glucose level at this time. An area under the curve (AUC) graph confirmed the efficacy of 1, which significantly decreased the AUC by approximately 25% (p = 0.05). During the experiment, glucose levels did not decrease

beyond baseline, indicating that the antidiabetic action of compound 1 is due to an antihyperglycemic effect rather than a hypoglycemic effect in agreement with PTP-1B inhibition and PPAR activation related to insulin sensitization. Compound 3 showed lack of activity in OGTT.

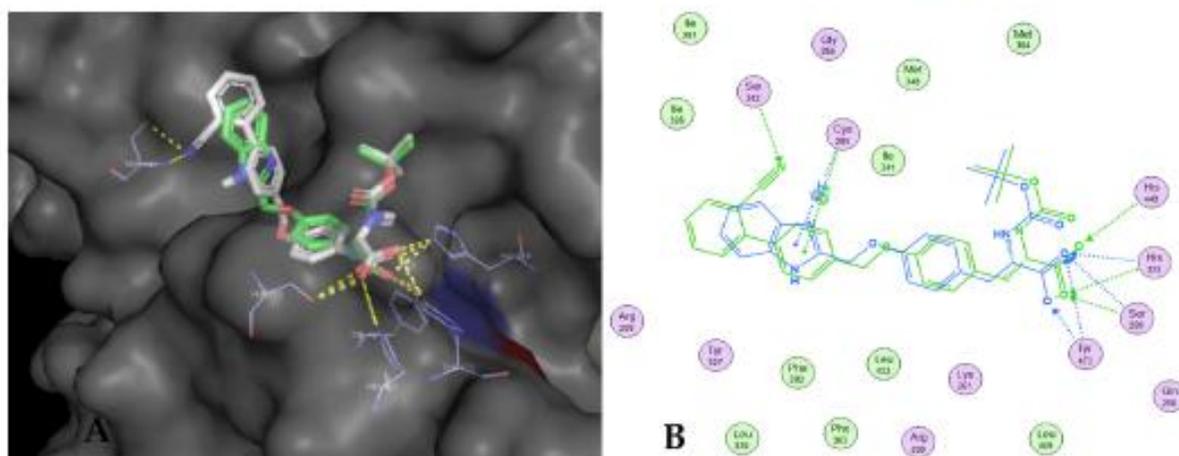


Fig. 9. (A) 3-D binding diagram of 1 and 3 into the into the PPAR γ ligand binding pocket. The stick models represent: 1 (green), 3 (white), and amino acids as cyan lines. Yellow lines suggest polar contacts. (B) 2-D overlay map for 1 and 3 on PPAR γ .

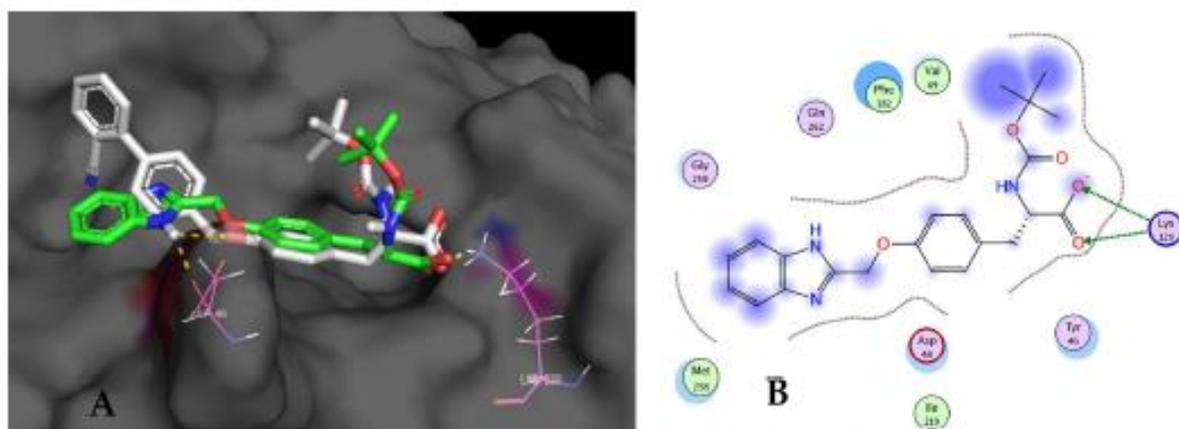


Fig. 10. (A) Binding diagram of 1 and 3 into the active site of PTP-1B. The stick models represent: 1 (green), 3 (white), and amino acids as magenta lines. Yellow lines suggest polar contacts. (B) 2-D interaction map for 1 on PTP-1B.

Table 1
Molecular docking binding energies for compounds 1 and 3 and their multi-targets.

Compound	PPAR- α AG (Kcal/mol)	PPAR- γ AG (Kcal/mol)	PTP-1B AG (Kcal/mol)
1	-8.2	-9.6	-7.1
3	-9.9	-10.7	-6.5

3.5. Molecular docking calculation

Based on the *in vitro* and *in vivo* biological results, the most potent compounds, 1 and 3, were designated to elucidate the experimental effects on relevant T2DM protein targets. A pilot molecular docking calculation was performed employing DIA-DB [2,32], a European web server, for the prediction of antidiabetic compounds using inverse virtual screening of the molecules 1–5 versus a set of eighteen different targets recognized as crucial proteins in T2DM, including PPAR α , PPAR γ and PTP-1B, *inter alia* [33]. Afterward, a more precise and refined study was conducted for the most attractive compounds (1 and 3). Refined docking calculation revealed that molecules 1 and 3 go into the ligand binding pocket of PPAR α and generate a network of ionic and hydrogen bonds with Ser-280, Tyr-314, Tyr-464 and His-440, critical amino acids for the activation of this nuclear receptor. Compound 1, which was the most potent in the *in vitro* assay, showed two extra interactions with Cys-276; one of them was a type π -H interaction, and

the other one was a polar interaction. Compound 3 also showed an extra interaction with Ala-333 (Fig. 8).

Compounds 1 and 3 adopt a conformation inside the PPAR γ ligand binding pocket and connect by means of ionic and hydrogen bonds with His-449, His-323, Tyr-473 and Ser-289, critical amino acids for the activation of PPAR γ (Fig. 9).

The most active compound (3) *in vitro* displayed an extra interaction with Ser-342 (Fig. 9), distinguishing of PPAR γ partial agonists. Glitazones, which are full PPAR γ agonists, shows side effects such as weight gain and congestive heart failure, among other undesired effects. However, partial agonists are not related to these adverse effects [34].

In the case of PTP-1B, binding postures represented in Fig. 10 suggest that 1 and 3 do not internalize in the catalytic pocket of PTP-1B; both interact *via* ionic bonds with the residue Lys-120 in the surface of this pocket [35]. Compound 1 showed an additional interaction with Asp-48. This could be the reason why both compounds showed IC₅₀s of approximately 44 μ M against PTP-1B.

Molecular docking scores (binding energies) are reported in Table 1 for compounds 1 and 3, and their polypharmacological targets.

Both binding energies and ligand-induced interactions correlate with the behavior of compounds 1 and 3 in the *in vitro* assays, suggesting that computational tools are useful in drug discovery.

4. Conclusion

In summary, five *N*-Boc-L-tyrosine derivatives have been developed

as new chemical entities for the treatment of type 2 diabetes mellitus. Compounds **1** and **3** (a) significantly increased the mRNA expression of PPAR α , PPAR γ , FATP-1 and GLUT-4 to a greater extent than fenofibrate and pioglitazone, (b) inhibited PTP-1B activity, (c) showed poly-pharmacological (multitargeting) profiles based on the *in vitro* and *in silico* experiments, and (d) decreased glucose levels *in vivo* with anti-hyperglycemic effects related to insulin sensitization mechanisms.

Conflict of interests

The authors declared that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgements

This work has been supported by CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología from Mexico) under Grant # 253814 (Ciencia Básica, 2015) given to G. Navarrete-Vázquez. M. A. Herrera-Rueda received a CONACyT support (483277) in order to reach Doctoral studies. The authors thank CIQ-LANEM Laboratory for structural analysis. We also thank the Facultad de Farmacia and Centro de Investigaciones Químicas, UAEM for providing some research supplies for this study.

References

- N. Li, L.J. Wang, B. Jiang, X.Q. Li, C.L. Guo, S.J. Guo, D.Y. Shi, Recent progress of development of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes mellitus, *Eur. J. Med. Chem.* 151 (2018) 145–157.
- B. Collín-Lozano, S. Estrada-Soto, F. Chávez-Silva, A. Gutiérrez-Hernández, L. Cerón-Romero, A. Giacoman-Martínez, J.C. Almanza-Pérez, E. Hernández-Núñez, Z. Wang, X. Xie, M. Cappiello, F. Balestri, U. Mura, G. Navarrete-Vázquez, Design, synthesis and *in vivo* antidiabetic bioevaluation of multitarget phenylpropanoic acids, *Molecules* 23 (2018) 340.
- A. de Souza Bastos, D.T. Graves, A.P. de Melo Loureiro, C.R. Júnior, S.C.T. Corbi, F. Frizzera, R.M. Scarel-Caminaga, N.O. Câmara, O.M. Andriankaja, M.I. Hiyane, S.R.P. Orrico, Diabetes and increased lipid peroxidation are associated with systemic inflammation even in well-controlled patients, *J. Diab. Complications* 30 (2016) 1593–1599.
- A. Ceriello, A. Quattraro, D. Giugliano, Diabetes mellitus and hypertension: the possible role of hyperglycemia through oxidative stress, *Diabetologia* 36 (1993) 265–266.
- Q. Chen, Y. Zhang, D. Ding, D. Li, M. Xia, X. Li, Y. Yang, Q. Li, G. Hu, W. Ling, Metabolic syndrome and its individual components with mortality among patients with coronary heart disease, *Int. J. Cardiol.* 224 (2016) 8–14.
- G. Navarrete-Vázquez, H. Torres-Gómez, S. Hidalgo-Figueroa, J.J. Ramírez-Espinosa, S. Estrada-Soto, J.L. Medina-Franco, I. León-Rivera, F.J. Alarcón-Aguilar, J.C. Almanza-Pérez, Synthesis, *in vitro* and *in silico* studies of a PPAR γ and GLUT-4 modulator with hypoglycemic effect, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24 (2014) 4575–4579.
- Q. Wu, A.M. Ortegón, B. Tsang, H. Doegé, K.R. Feingold, A. Stahl, FATP1 is an insulin-sensitive fatty acid transporter involved in diet-induced obesity, *Mol. Cell. Biol.* 26 (2006) 3455–3467.
- P. Balakumar, M. Rose, S.S. Ganti, P. Krishan, M. Singh, PPAR dual agonists: are they opening Pandora's box? *Pharmacol. Res.* 56 (2007) 91–98.
- Y. Wang, J. Liu, P.J. Dransfield, L. Zhu, Z. Wang, X. Du, X. Jiao, Y. Su, A.R. Li, S.P. Brown, A. Kasparian, M. Vimolmatana, M. Yu, V. Pattaropong, J.B. Houze, G. Swaminath, T. Tran, K. Nguyen, Q. Guo, J. Zhang, F. Li, L. Zhuang, M.D. Miao, T.L. Bartberger, D. Correll, S. Chow, J. Wong, Luo, D.C.H. Lin, J.C. Medina, Discovery and optimization of potent GPR40 full agonists containing tricyclic spirocycles, *ACS Med. Chem. Lett.* 4 (2013) 551–555.
- M. Parimala, M. Debjani, H.R. Vasanthi, F.G. Shoba, F. Nymphaea Burm, Hydroalcoholic seed extract increases glucose consumption in 3T3-L1 adipocytes through activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and insulin sensitization, *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* 6 (2015) 183.
- Y. Fujiwara, C. Tsukahara, N. Ikeda, Y. Sone, T. Ishikawa, I. Ichi, T. Koike, Y. Aoki, Oleuropein improves insulin resistance in skeletal muscle by promoting the translocation of GLUT4, *J. Clin. Biochem. Nutr.* 61 (2017) 196–202.
- B.G. Shearer, A.N. Billin, The next generation of PPAR drugs: do we have the tools to find them? *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1771 (2007) 1082–1093.
- B.R. Henke, Peroxisome proliferator-activated receptor Alpha/gamma dual agonists for the treatment of type 2 diabetes, *J. Med. Chem.* 47 (2004) 4118–4127.
- B.K. He, Z.Q. Ning, Z.B. Li, S. Shan, D.S. Pan, B.C. Ko, P.P. Li, Z.F. Shen, G.F. Dou, B.L. Zhang, X.P. Lu, Y. Gao, *in vitro* and *in vivo* characterizations of chiglitazar, a newly identified PPAR pan-agonist, *PPAR Res.* 2012 (2012) 5465–48.
- A. Rubenstunck, R. Hanf, D.W. Hum, J.C. Fruchart, B. Staels, Safety issues and prospects for future generations of PPAR modulators, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1771 (2007) 1065–1081.
- G. Navarrete-Vázquez, P. Paoli, I. León-Rivera, R. Villalobos-Molina, J.L. Medina-Franco, R. Ortiz-Andrade, S. Estrada-Soto, G. Camici, D. Diaz-Coutiño, I. Gallardo-Ortiz, K. Martínez-Mayorga, H. Moreno-Díaz, Synthesis, *in vitro* and computational studies of protein tyrosine phosphatase 1B inhibition of a small library of 2-arylsulfonfylamino-benzothiazoles with antihyperglycemic activity, *Bioorg. Med. Chem.* 17 (2009) 3332–3341.
- G. Navarrete-Vázquez, M. Ramírez-Martínez, S. Estrada-Soto, C. Nava-Zuazo, P. Paoli, G. Camici, J. Escalante-García, J.L. Medina-Franco, F. López-Vallejo, R. Ortiz-Andrade, Synthesis, *in vitro* and *in silico* screening of ethyl 2-(6-substituted benzo[d]thiazol-2-ylamino)-2-oxoacetates as protein-tyrosine phosphatase 1B inhibitors, *Eur. J. Med. Chem.* 53 (2012) 346–355.
- L. Cerón-Romero, P. Paoli, G. Camici, V. Flores-Morales, M.Y. Ríos, J.J. Ramírez-Espinosa, S. Hidalgo-Figueroa, G. Navarrete-Vázquez, S. Estrada-Soto, *In vitro* and *in silico* PTP-1B inhibition and *in vivo* antidiabetic activity of semisynthetic moronic acid derivatives, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 26 (2016) 2018–2022.
- G. Navarrete-Vázquez, M.G. Morales-Vilchis, S. Estrada-Soto, J.J. Ramírez-Espinosa, S. Hidalgo-Figueroa, C. Nava-Zuazo, H. Tlahuext, I. León-Rivera, J.L. Medina-Franco, F. López-Vallejo, S.P. Webster, M. Binnie, R. Ortiz-Andrade, H. Moreno-Díaz, Synthesis of 2-[(α/β -naphthalen-1-ylsulfonyl)amino]-1,3-thiazol-4-yl]acetamides with 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase inhibition and *in vivo* antidiabetic activities, *Eur. J. Med. Chem.* 74 (2014) 179–186.
- F. Filippis, P. Linciano, A. Ammazalorso, C. Giovanni, M. Fantacuzzi, L. Giampietro, A. Laghezza, C. Maccallini, P. Tortorella, A. Lavecchia, F. Loiodice, R. Amoroso, Structural development studies of PPARs ligands based on tyrosine scaffold, *Eur. J. Med. Chem.* 89 (2015) 817–825.
- N. Thangavel, M. Al Bratty, S. Akhtar Javed, W. Ahsan, H.A. Alhazmi, Targeting peroxisome proliferator-activated receptors using thiazolidinediones: strategy for design of novel antidiabetic drugs, *Int. J. Med. Chem.* 2017 (2017) 1–20.
- B.R. Bhattami, B. Kafle, J.S. Hwang, S.W. Ham, K.H. Lee, H. Park, I.O. Han, H. Cho, Novel thiazolidinedione derivatives with anti-obesity effects: dual action as PTP-1B inhibitors and PPAR γ activators, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20 (2010) 6758–6763.
- P. Paoli, A. Modesti, F. Magherini, T. Gamberi, A. Caselli, G. Manao, G. Raugeri, G. Camici, G. Ramponi, Site-directed mutagenesis of two aromatic residues lining the active site pocket of the yeast Ltp1, *Biochim. Biophys. Acta* 1770 (2007) 753–762.
- S. Hidalgo-Figueroa, J.J. Ramírez-Espinosa, S. Estrada-Soto, J.C. Almanza-Pérez, phenylcarbonitrile hybrid as dual PPAR α/γ modulator with antidiabetic effect: *in vitro*, *in silico* and *in vivo* approaches, *Chem. Biol. Drug Des.* 81 (2013) 474–483.
- R. García-Macedo, F. Sánchez-Muñoz, J.C. Almanza-Pérez, G. Duran-Reyes, F. Alarcón-Aguilar, M. Cruz, Glycine increases mRNA adiponectin and diminishes pro-inflammatory adipokines expression in 3T3-L1 cells, *Eur. J. Pharmacol.* 587 (2008) 317–321.
- J.C. Almanza-Pérez, F.J. Alarcón-Aguilar, G. Blancas-Flores, A.E. Campos-Sepúlveda, R. Román-Ramos, R. García-Macedo, M. Cruz, Glycine regulates inflammatory markers modifying the energetic balance through PPAR and UCP-2, *Biomed. Pharmacother.* 64 (2010) 534–540.
- S. Hidalgo-Figueroa, G. Navarrete-Vázquez, S. Estrada-Soto, D. Giles-Rivas, F.J. Alarcón-Aguilar, I. León-Rivera, A. Giacoman-Martínez, E. Miranda Pérez, J.C. Almanza-Pérez, Discovery of new dual PPAR γ -GPR40 agonists with robust antidiabetic activity: design, synthesis and *in vivo* evaluation, *Biomed. Pharmacother.* 90 (2017) 53–61.
- E. Gutierrez-Lara, C. Martínez-Conde, E. Rosales-Ortega, J.J. Ramírez-Espinosa, J.C. Rivera-Leyva, D. Centurión, K. Carvajal, D. Ortega-Cuellar, S. Estrada-Soto, G. Navarrete-Vázquez, Synthesis and *in vitro* AMPK activation of cycloalkyl/alkarylbiguanides with robust *in vivo* antihyperglycemic action, *J. Chem.* 1212609 (2017) 1–8.
- Molecular Operating Environment (MOE), 2018.01, Chemical Computing Group ULC, 1010 Sherbooke St. West, Site #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2018 <http://www.chemcomp.com>.
- O. Méndez-Lucio, J. Naveja, H. Vite-Caritano, F. Prieto-Martínez, J. Medina-Franco, Polypharmacology in drug Discovery, in: N. Handler (Ed.), *Drug Selectivity. An Evolving Concept in Medicinal Chemistry*, Wiley, 2017, pp. 1–29.
- <http://bio-hpc.ucam.edu/dia-db/>.
- A. Sánchez-Pérez, A. Muñoz, J. Peña-García, H. den-Haan, N. Bekas, A. Katsikoudi, A.G. Tzakos, H. Pérez-Sánchez, DIA-DB: a web-accessible database for the prediction of diabetes drugs, *Bioinform. Biomed. Eng.* 9044 (2015) 655–663.
- D. Capelli, C. Cerchia, R. Montanari, F. Loiodice, P. Tortorella, A. Laghezza, L. Cervoni, G. Pochetti, A. Lavecchia, Structural basis for PPAR partial or full activation revealed by a novel ligand binding mode, *Sci. Rep.* 6 (2016) 34792.
- S. Hidalgo-Figueroa, S. Estrada-Soto, J.J. Ramírez-Espinosa, P. Paoli, G. Lori, I. León-Rivera, G. Navarrete-Vázquez, Synthesis and evaluation of thiazolidine-2,4-dione/benzazole derivatives as inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B (PTP-1B): antihyperglycemic activity with molecular docking study, *Biomed. Pharmacother.* 107 (2018) 1302–1310.

**VOTO APROBATORIO PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: MIGUEL ANGEL HERRERA RUEDA

Título de la tesis: "DISEÑO, SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN
POLIFARMACOLÓGICA DE AZAHETEROCICLOS Y CARBOCICLOS HÍBRIDOS
DE TIROSINA CON ACCIÓN ANTIDIABÉTICA"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Samuel E. Estrada Soto

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que
mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____



Firma del miembro del jurado

22/11/2018

Fecha

**VOTO APROBATORIO PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: MIGUEL ANGEL HERRERA RUEDA

Título de la tesis: "DISEÑO, SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN
POLIFARMACOLÓGICA DE AZAHETEROCICLOS Y CARBOCICLOS HÍBRIDOS
DE TIROSINA CON ACCIÓN ANTIDIABÉTICA"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia

Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Sergio Nemorio Hidalgo Figueroa

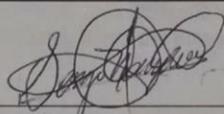
La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que
mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta

Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____



Firma del miembro del jurado

20/NOVIEMBRE/2018

Fecha