UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS

Evaluación *in silico* y síntesis de α-aminofosfonatos cíclicos como potenciales inhibidores de las COXs

Tesis profesional para obtener el grado de: Doctora en Ciencias

PRESENTA

M. en C. Estefany Bello Vargas

Director

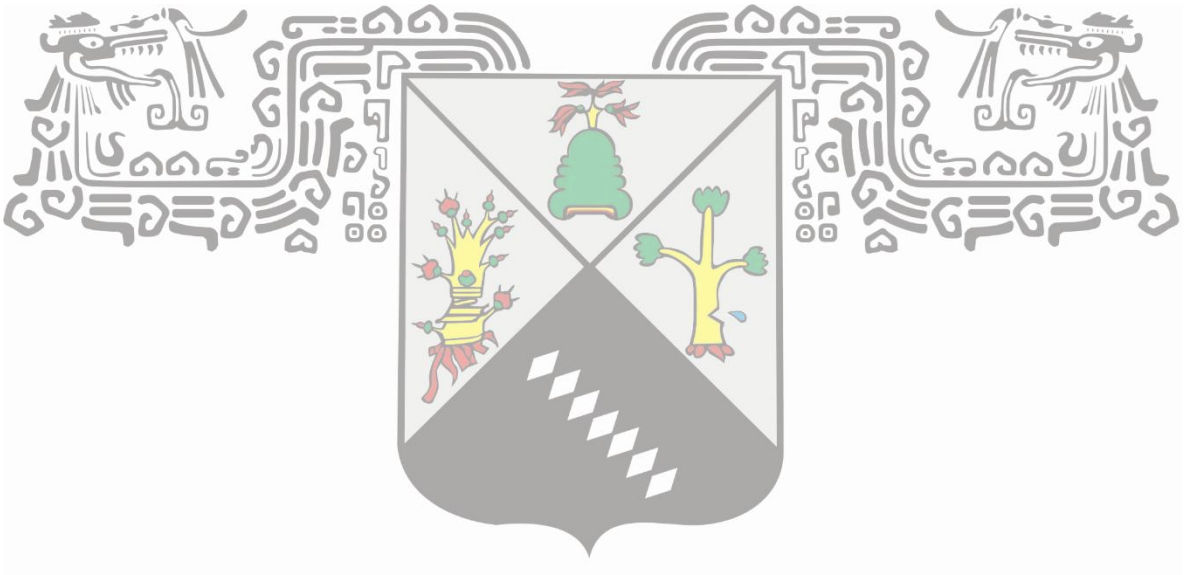
Dr. José Mario Ordóñez Palacios

Codirector

Dr. Rodrigo Said Razo Hernández

Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas

CUERNAVACA, MORELOS MAYO, 2025



La presente Tesis de Doctorado se realizó en el Laboratorio de Síntesis de Compuestos de Interés Farmacológico del Centro de Investigaciones Químicas (CIQ-UAEM) y el Laboratorio de Quimioinformática y Diseño de Fármacos del Centro de Investigación en Dinámica Celular de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (CIDC-UAEM) bajo la dirección del Dr. José Mario Ordoñez Palacios y Co-Dirección del Dr. Rodrigo Said Razo Hernández, con el apoyo de la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) a través de los proyectos de Ciencia Básica **320243**, **286614** y **140607**, de la beca de posgrado **780792**.

JURADO DE EXAMEN DE GRADO

Presidente:

Dra. Verónica Rodríguez López
Facultad de Farmacia-UAEM

Secretario:

Dra. Angélica Berenice Aguilar Guadarrama
CIQ-UAEM

Vocal:

Dr. José Luis Viveros Ceballos
CIQ-UAEM

Vocal:

Dr. Luis Chacón García
UMSNH

Vocal:

Dr. Ivan Omar Romero Estudillo
Investigador Cátedra-CONACYT-CIQ

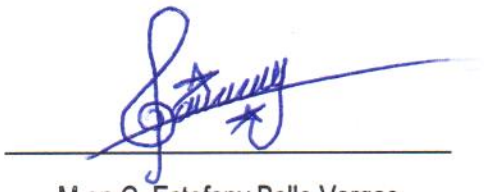
Suplente:

Dra. Cristal Columba Palomares
Facultad de Farmacia-UAEM

Suplente:

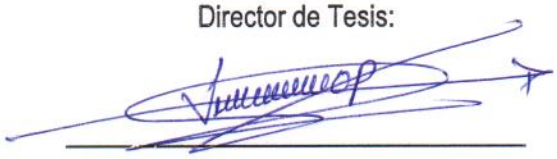
Dr. José Mario Ordoñez Palacios
CIQ-UAEM

Candidato al grado:



M en C. Estefany Bello Vargas

Director de Tesis:



Dr. José Mario Ordoñez Palacios

Codirector de Tesis:



Dr. Rodrigo Said Razo Hernández

“Cuando más te conoces a ti mismo
más paciencia tienes para lo que
ves en los demás”

-Erick Erikson-

Dedicatorias

A mi familia:
Ustedes han sido la guía y los pilares fundamentales para poder lograr todo lo que me propongo. Mi mamá, mi papá, mis hermanos y sobrinos, que aun en la distancia, un mensaje o una llamada era suficiente para hacerme sentir de nuevo en casa. Gracias por todas las muestras de cariño, apoyo y motivación que siempre han sabido trasmitirme cuando más las he necesitado, y sobre todo por siempre creer en mí. Por siempre ser mi lugar seguro cuando me siento vulnerable. Con cariño para todos ustedes.

A Nym, quien, desde 2023 has estado siempre a mi lado en los buenos y muchas veces en los peores momentos, has sido para mí una gran maestra, me enseñaste que no es necesario correr cuando puedes caminar sin tanta prisa y llegar al mismo lugar, mientras siempre tengas presente la meta en este camino llamado vida y mostrándome un amor tan más puro e incondicional que solo pocos tienen la fortuna de vivir. Siempre estaré agradecida por haberme elegido como compañera de vida y por ser mi dosis diaria de sol.

Al Dr. José Mario Ordóñez Palacios por brindarme la oportunidad de formar parte desde mi inicio en el mundo de la investigación al aceptarme como su alumna desde 2018 en el gran grupo de investigación que conforman en el Lab-205, por todos sus consejos que me han ayudado a mi formación profesional, por su empatía en momentos de vulnerabilidad, y así poder concluir mi etapa de estudiante. Con gran admiración hacia su trabajo y persona.

Al Dr. Razo por permitirme explorar el mundo de la química computacional, permitiéndome un espacio dentro de su grupo de investigación y reconocer el papel fundamental que realizó en mi formación académica.

Al Dr. Ivan Omar Romero Estudillo que siempre tuvo el tiempo y la paciencia para responder mis dudas en el ámbito académico y orientarme con mis decisiones personales, eres una persona admirable de manera profesional y personal.

Al Dr. Oscar García Barradas, por haber formado parte desde el inicio en este camino al ser mi profesor y transmitirme su amor y pasión por el mundo de la química, lo que me ha ayudado con mi decisión de seguir formando parte de esta maravillosa área. Por su gran apoyo y confianza que depositó en mí desde que era una universitaria.

A mis amigos de la universidad, Hugo y Eduardo, que, a pesar de la distancia física, siempre hemos sabido cultivar nuestra amistad, la cual sigue creciendo después de haber coincidido allá por el año 2014, apoyándonos, alentándonos y alegrándonos siempre de nuestras metas y logros cumplidos. Los quiero muchísimo chico.

A mis amigas: Diana, Ingrid y Lili que, aunque hemos tomado caminos distintos y estemos en diferentes áreas geográficas, no pareciera, cada vez que nos reunimos es como estar al día. Las considero unas grandes amigas. Lucila's desde 2012.

A mis compañeros de laboratorio: Erick, Piña, Alma, Sindy, Fer, Omar, Gus, Itzel, Gaspi, Vale, Norman, Alán, que día con día hacían la labor de que las horas de trabajo fueran más amenas y divertidas, así como apoyándome siempre en mis dudas. Gracias por la bella amistad que siempre me brindaron, los llevaré siempre en mis recuerdos.

A mi comité tutorial: Dr. Ivan, Dra. Gabriela, Dr. Razo y Dr. Mario, por guiarme en el desarrollo de este proyecto, permitiéndome aprender de todos sus comentarios y consejos.

A todo el personal administrativo, académico, técnico y de seguridad del Centro de Investigaciones Químicas-IICBA, que sin su apoyo este proyecto no estaría completo, ya que todos apoyaron de forma directa o indirectamente para desarrollarlo y finalizarlo. Gracias familia CIQ por todos estos años.

Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis de Doctorado se publicaron y presentaron en diferentes foros:

PUBLICACIONES:

Estefany Bello -Vargas, Mario Alberto Leyva-Peralta, Zeferino Gómez-Sandoval, Mario Ordóñez, Rodrigo Said Razo-Hernández. A computational method for the binding mode prediction of COX-1 and COX-2 inhibitors: analyzing the union of coxibs, oxicams, propionic and acetic acids. *Pharmaceuticals* **2023,** *16,* 1688. https://doi.org/10.3390/ph16121688

Estefany Bello-Vargas, Mario Ordoñez, Ivan Romero-Estudillo, Victoria Labastida-Galván Novel Synthesis of *rac*- and Enantiomerically Enriched Dimethyl α-Methylphosphoserinate *Synthesis* **2025,** *57*, 1346-1354. https://doi.org/10.1055/a-2506-0261

PRESENTACIÓN EN CONGRESOS INTERNACIONALES:

Estefany Bello-Vargas, Fernando Cuevas, Ivan Romero-Estudillo, Victoria Labastida-Galván, **Mario Ordóñez.** Participación en el Congreso Internacional 24th Tetrahedron Symposium en la modalidad poster con el trabajo "First synthesis of racemic and enantiomerically enriched dimethyl α-methylphosphoserinates". Montpellier, Francia 18-21 junio 2024.

Estefany Bello-Vargas, Ivan Omar Romero Estudillo, Rodrigo Said Razo Hernández, Mario Ordóñez. Participación en el Congreso Internacional Latin XChem en la modalidad poster con el trabajo "Desing and Synthesis of Compound as potential anti-inflammatory agents" galardonado con *mención honorifica*. 20 de septiembre del 2021.

PRESENTACION EN CONGRESOS NACIONALES:

Estefany Bello Vargas, Mario Alberto Leyva-Peralta, Zeferino Gómez-Sandoval, Mario Ordóñez, Rodrigo Said Razo-Hernández, Participación en el Congreso Nacional de la Reunión Mexicana de Fisicoquímica Teórica en modalidad poster con el trabajo "Método computacional para la predicción del modo de unión de los inhibidores de la COX-1 y COX-2: análisis de la unión de coxibs, Oxicams, Ácidos propiónico y acético". 10 de noviembre 2023.

Estefany Bello Vargas, Ivan Romero Estudillo, Mario Ordóñez. "Síntesis de 2-fenil-4-dimetilfosfinoil-2-oxazolinas como potenciales agentes anti-inflamatorios" Por su participación en el Concurso de Carteles Estudiantiles organizado en conmemoración del Día del Químico 2022. Centro de Investigaciones Químicas-UAEM Cuernavaca, Morelos 1 de diciembre 2022.

Estefany Bello Vargas, Ivan Romero Estudillo, Mario Ordóñez. "Síntesis de 2-fenil-4-dimetilfosfinoil-2-oxazolinas como potenciales agentes anti-inflamatorios" En la XVII Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica A. C. Puebla, Puebla 25 y 26 de agosto 2022.

ÍNDICE

INDICE DE COMPUESTOS ..... *I*

LISTA DE ABREVIATURAS ..... *II*

RESUMEN ..... *VI*

Capítulo I *1*

~Construcción de un modelo computacional para la predicción de la unión de inhibidores de las COXs ~..... 1

1. Introducción *2*

2. Antecedentes 4

3. Objetivo 10

3.1. General. 10

3.2.1 Objetivos específicos. 10

4. Resultados y discusión 11

4.1. Análisis de las cavidades de COXs 11

4.2. Búsqueda, análisis y selección de PDBs. 16

4.3. Recopilación de información para la base de datos. 18

4.3.1 Análisis exhaustivo de los cristales seleccionados para el modelo establecido. 19

4.3.1.1 Cristales de COX-1: 1EQG, 2OYU, 3KK6 y 4O1Z. 19

4.3.1.2. Cristales de COX-2: 4PH9, 4COX, 3LN1, 4M11. 21

4.4. Experimento de acoplamiento molecular para la validación del Modelo de Predicción Computacional. ... 22

4.4.1. Validación estructural y energética del Modelo de Predicción Computacional. 22

4.4.1.1. Validación estructural de modelo de Predicción Computacional. 22

4.4.1.2. Validación energética del modelo computacional. 28

4.4.2. Validación estructural y energética del modelo de predicción. 35

4.4.2.1. Caso ibuprofeno (1EQG y 4PH9) 35

4.4.2.2. Caso indometacina (2OYU y 4COX) 39

4.4.2.3. Caso celecoxib (3KK6 y 3LN1) 42

4.4.2.4. Caso meloxicam (4O1Z y 4M11). 46

4.4.3. Análisis estructural de inhibidores de COXs. 49

Capítulo II *53*

~Diseño racional estructural y evaluación in silico de α-aminofosfonatos heterocíclicos como potenciales inhibidores de las COXs~ *53*

1. Introducción 54

1.1. Diseño racional de fármacos: la inflamación crónica y su relevancia terapéutica. 54

1.2. Importancia de los ácidos α-aminofosfónicos. 55

1.3. Actividades biológicas de los ácidos α-aminofosfónicos. 56

2. Antecedentes 57

2.1. α-aminofosfonatos con actividad antiinflamatoria 57

2.2. Implementación de la restricción conformacional como estrategia en el diseño de nuevos α-aminofosfonatos heterocíclicos con potencial actividad antiinflamatoria. 59

3. Objetivo 62

3.1. Objetivos específicos 62

4. Resultados y discusión. 63

4.1. Evaluación *in silico* de α-aminofosfonatos heterocíclicos como compuestos de interés farmacológico: posibles inhibidores de las COXs. 63

4.1.1. Diseño de α-aminofosfonatos heterocíclicos conformacionalmente restringidos y la modificación del tamaño del heterociclo como técnicas de modificación estructural. 63

5. Conclusión 84

6. Material y Métodos utilizados en los experimentos de acoplamiento molecular de los α-aminofosfonatos heterocíclicos como potenciales inhibidores de las COXs. 85

6.1. Selección de PDBs. 85

6.2. Construcción y análisis estructural de los ligandos. 85

6.3. Metodología y cálculos utilizados en el acoplamiento molecular. 85

Capítulo III ..... *LXXXVI*

~Síntesis de α-aminofosfonatos heterocíclicos enantiomericamente enriquecidos~ ..... *LXXXVI*

1. Introducción 87

2. Antecedentes 89

2.1. Preparación diastereoselectiva de α-aminofosfonatos heterocíclicos. 89

3. Objetivos *94*

3.1. Objetivos específicos 94

4. Resultados y discusión *96*

4.1. Síntesis de α-aminofosfonatos heterocíclicos α-metilados enantiomericamente enriquecidos. 96

4.2. Asignación de la configuración absoluta a través del uso de técnicas de RMN bidimensionales (HSQC y NOESY) 99

4.2.1. Asignación absoluta del C_3 en el diastereoisómero mayoritario (3*R*,5*S*)-**25c**. 99

4.2.2. Asignación absoluta del C_3 en el diastereoisómero minoritario (3*S*,5*S*)-**25d** 101

4.2.3. Asignación absoluta del C3 en el diastereoisómero mayoritario (3S,5R)-**25a**. 107

4.2.4. Asignación absoluta del C_3 en el diastereoisómero minoritario (3*R*,5*R*)-**25b**. 109

5. Conclusiones 117

6. Parte experimental 119

6.1. Información general 119

7. Métodos sintéticos 120

*7.1. Síntesis de (S)-3-metil-5-fenil-5,6-dihidro-2H-1,4-oxazin-2-ona (S)-**50*** 120

7.2. Síntesis de (*R*)-3-metil-5-fenil-5,6-dihidro-2*H*-1,4-oxazin-2-ona (*R*)-**50**. 120

7.3. Síntesis de ((3*S*,5*S*)-3-metill-2-oxo-5-fenilmorfolin-3-il)fosfonato de dimetilo (3*S*,5*S*)-**25d** y ((3*R*,5*S*)-3-metil-2-oxo-5-fenilmorfolin-3-il)fosfonato de dimetilo (3*R*,5*S*)-**25c**. 120

7.4. Síntesis de (1-hidroxi-2-(((*R*)-2-hidroxi-1-feniletil)amino)propan-2-il) fosfosnato de dimetilo (5*S*,3*R*)-**53a**. 121

7.5. Síntesis de (*R*)-(2-amino-1-hidroxipropan-2-il)fosfonato de dimetilo (*R*)-**54a**. 122

7.6. Síntesis de ((3*S*,5*R*)-3-metil-2-oxo-5-fenilmorfolin-3-il)fosfonato de dimetilo (3*S*,5*R*)-25a y ((3*R*,5*R*)-3-metil-2-oxo-5-fenilmorfolin-3-il)fosfonato de dimetilo (3*R*,5*R*)-25b. 122

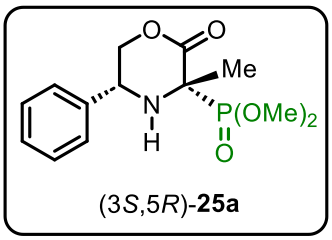
7.7. Síntesis de ((*R*)-1-hidroxi-2-(((*S*)-2-hidroxi-1-feniletil)amino)propan-2-il)fosfonato de dimetilo (3*S*,5*R*)-53b. 123

7.8. (*S*)-(2-Amino-1-hidroxipropan-2-il)fosfonato de dimetilo (*S*)-54b. 124

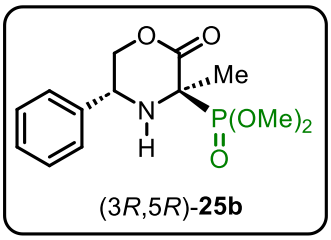
Apéndice teórico 125

Apéndice Experimental 134

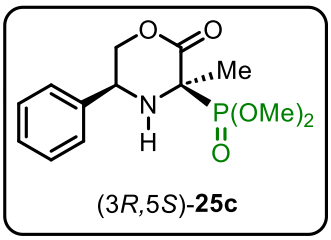
INDICE DE COMPUESTOS



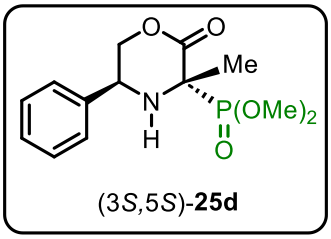
(3*S*,5*R*)-**25a**



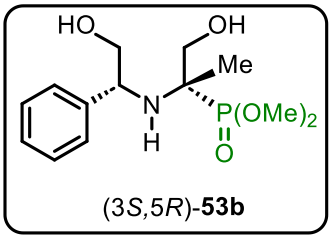
(3*R*,5*R*)-**25b**



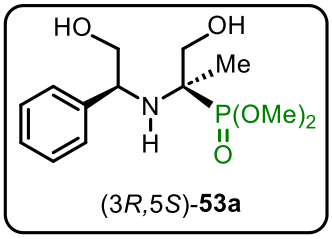
(3*R*,5*S*)-**25c**



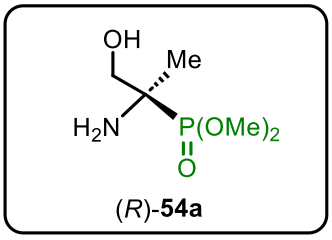
(3*S*,5*S*)-**25d**



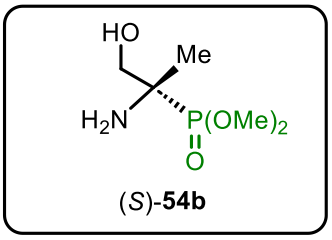
(3*S*,5*R*)-**53b**



(3*R*,5*S*)-**53a**



(*R*)-**54a**



(*S*)-**54b**

LISTA DE ABREVIATURAS

ÁA	Ácido araquidónico
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
°C	Grados centígrados
Bn	Bencilo
Bz	Benzoilo
BzSAD	Benzosulfonamida
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
Cat.	Catalizador
Cbz	Benciloxicarbonil
COXs	Ciclooxigenasas
d	Señal doble
dd	Señal doble de doble
DE_{50}	Dosis efectiva media
DIFAC	Diseño de fármacos asistido por computadora
DNBS*	Dinitrobenzene sulphonic acid
EDIA*	Electron density score for individual atoms
equiv.	Equivalentes
FAB*	Bombardeo rápido de átomos
g	Gramos
h	Horas

HBA*	Hydrogen-bridged donors
HBD*	Hydrogen-bridged acceptors
HEM	Hemoglobina
Hex	Hexano
HRMS*	High resolution mass spectrometry
HSQC*	Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hz	Hertz
IC_{50}*	Half maximal inhibitory concentration
J	Constante de acoplamiento
m	Señal múltiple
M	Molaridad
Me	Metilo
mg	Miligramos
MHz	Megahertz
mL	Mililitros
mmol	Milimoles
NOE*	Nuclear Overhauser Effect
NOESY*	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
Pa	Predicción actividad biológica
PASS*	Prediction of Activity Spectra for Substances
PDB	Protein Data Bank

PGs	Prostaglandinas
p.f.	Punto de fusión
PGG2	Prostaglandina G2
PGH2	Prostaglandina H2
p.f.	Punto de fusión
Ph	Fenilo
ppm	Partes por millón
QSAR*	Quantitative structure-activity relationship
r.d.	Relación diastereoisomérica
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN ^{1}H	Resonancia Magnética Nuclear de Protón
RMN ^{13}C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ^{31}P	Resonancia Magnética Nuclear de Fósforo 31
RMN 2D	Resonancia Magnética Nuclear Bidimensional
RMSD*	Root Mean Square Deviation
s	Señal simple
sa	Señal ancha
t	Señal triple
t.a.	Temperatura ambiente
TFA*	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
TPA*	Tetradecanoylphorbol acetate

TXA2	Tromboxano A2
VS*	Virtual Screening
δ	Desplazamiento químico
4-ABSA*	4-Amino-benzene sulfonamide
5-ASA	Ácido 5-aminosalicílico

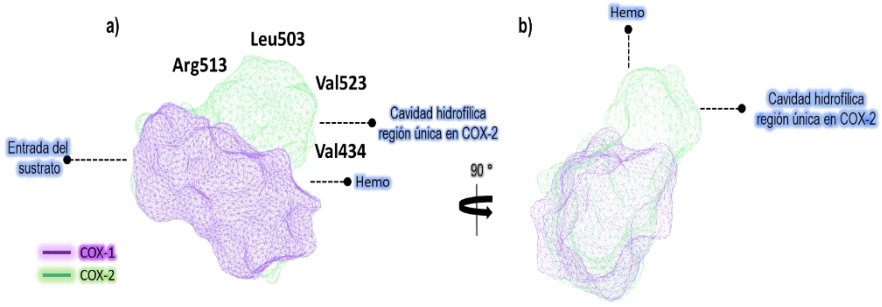
Por sus siglas en inglés

RESUMEN

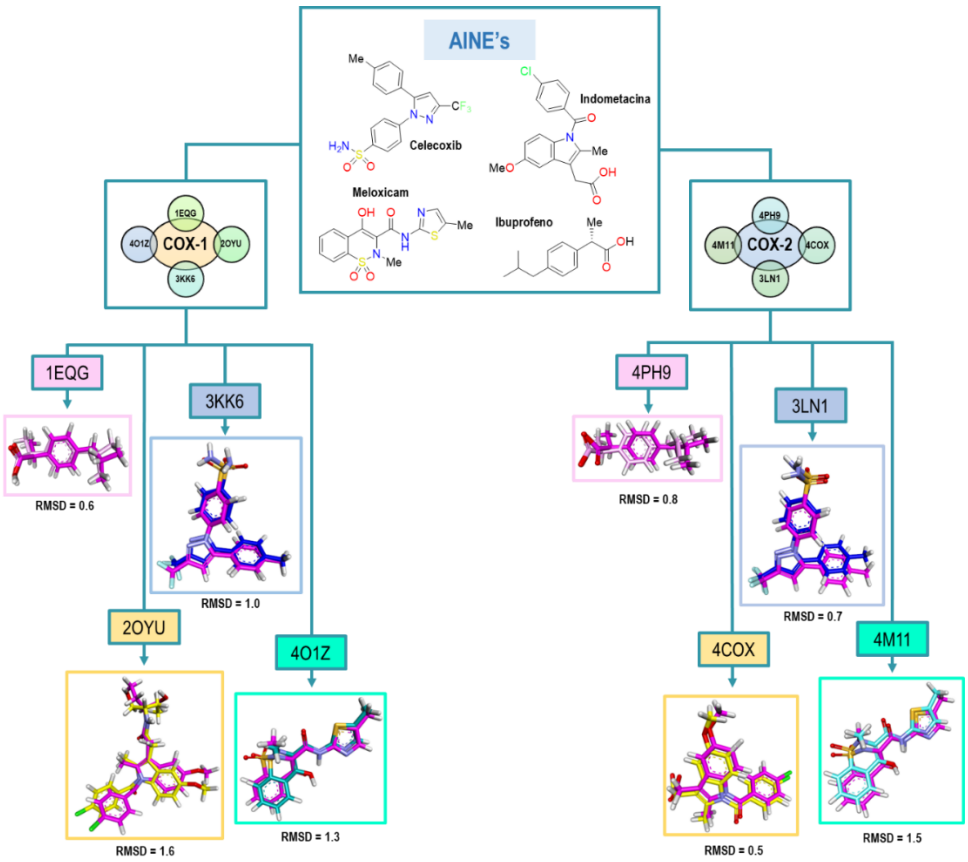
Capítulo I

El capítulo I presenta el desarrollo de un modelo computacional para la predicción del modo de interacción de inhibidores de las ciclooxigenasas COX-1 y COX-2, isoenzimas clave en la regulación de la inflamación y la síntesis de prostaglandinas. Se destaca la importancia de estas dianas terapéuticas en el diseño de agentes antiinflamatorios, con énfasis en la selectividad hacia COX-2 para minimizar efectos secundarios.

La metodología utilizada incluye un análisis exhaustivo de las estructuras cristalinas de las COXs disponibles en bases de datos públicas, evaluando su calidad mediante criterios de resolución y validación estructural con herramientas como DoGSiteScorer y EDIA. Se identificaron las diferencias clave en las cavidades activas de COX-1 y COX-2, incluyendo la presencia de residuos exclusivos y variaciones en volumen, superficie y profundidad, lo que respalda la necesidad de seleccionar adecuadamente los cristales para estudios de acoplamiento molecular.



El modelo se validó estructural y energéticamente utilizando un conjunto de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) de diferentes familias, como ibuprofeno, meloxicam, indometacina y celecoxib, así como mediante la comparación de los valores experimentales de IC_{50} y las energías de interacción obtenidas por docking. Esta validación permitió establecer correlaciones entre la afinidad predicha y los datos experimentales, lo que demuestra la fiabilidad del modelo para predecir la actividad antiinflamatoria de nuevos compuestos bioactivos.

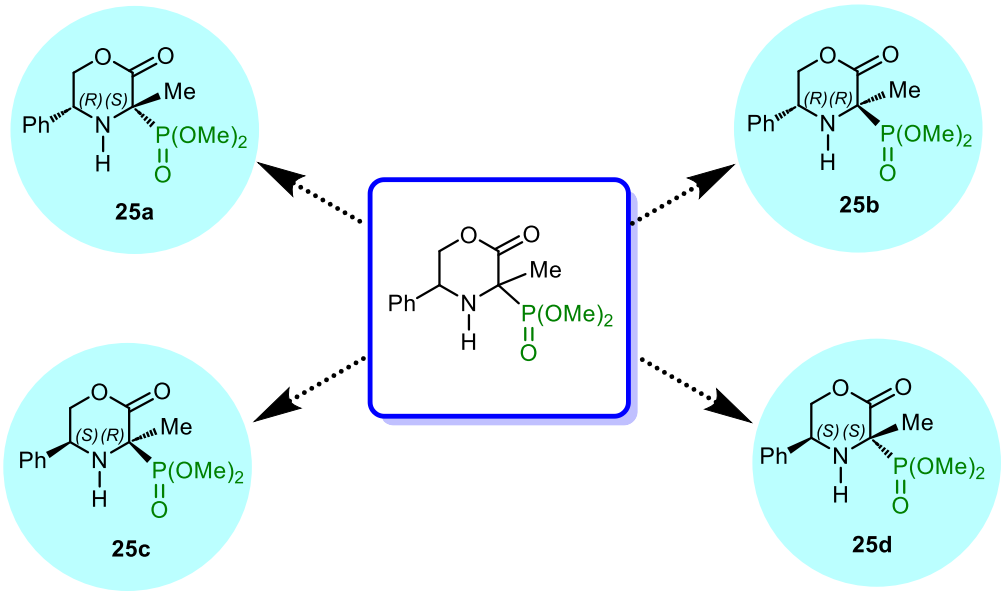


En conclusión, el modelo computacional desarrollado constituye una herramienta robusta y confiable para apoyar el diseño racional de inhibidores selectivos de COX-1 y COX-2, con aplicaciones relevantes en el descubrimiento de nuevos agentes terapéuticos antiinflamatorios.

Capítulo II

La inflamación crónica representa un eje patológico central en múltiples enfermedades degenerativas, lo cual ha incentivado la búsqueda de nuevas entidades moleculares con actividad antiinflamatoria selectiva y eficaz. En este contexto, los α-aminofosfonatos, análogos bioisostéricos de los α-aminoácidos, han emergido como una clase de compuestos bioactivos de interés terapéutico por su capacidad de modulares rutas inflamatorias. Esta investigación doctoral se enfocó en el diseño racional asistido por computadora (DIFAC) de nuevos α-aminofosfonatos heterocíclicos, integrando técnicas de optimización geométrica, acoplamiento molecular (docking) y predicción de actividad biológica contra las isoformas COX-1 y COX-2.

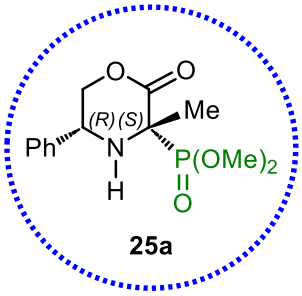
Se diseñaron compuestos cíclicos con restricción conformacional y modificaciones estructurales como la ampliación del anillo heterocíclico, introducción de grupos funcionales y evaluación de los isómeros. La predicción de la actividad antiinflamatoria mediante el servidor *PASS online* permitió identificar al compuesto prototipo **25** como el más prometedor, con una Pa del 85%. Posteriormente, se modelaron los posibles diasteroisómeros y conformeros derivados de **25**, seleccionando tres de los conformeros totales (menor, mediana y mayor energía) para realizar evaluaciones *in silico*.



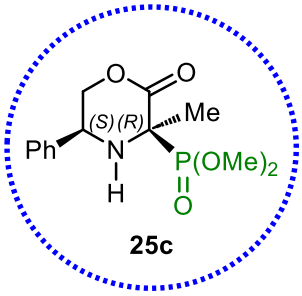
Los análisis de acoplamiento molecular frente a múltiples estructuras cristalográficas de COX-1 (PDB: 1EQG, 2OYU, 3KK6, 4O1Z) y COX-2 (PDB: 4PH9, 4COX, 3NL1, 4M11) mostraron que los compuestos **25a** y **25c** en determinadas conformaciones tienen energías de unión comparables o superiores a fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) como el ibuprofeno, meloxicam o indometacina. Además, se observó que los enantiómeros mostraron afinidades selectivas hacia diferentes isoformas, indicando una clara influencia de la estereoquímica sobre el reconocimiento molecular.

En particular, el estereoisómero **25c**_INTER (M0023) presentó la mejor afinidad con COX-1, mientras que **25a**_MENOR (M0008) mostró mayor selectividad hacia COX-2. Se analizaron detalladamente las interacciones intermoleculares, revelando contactos claves con residuos como Arg120, Tyr385, Ile523 y Ser530, característicos de los sitios activos de las COXs.

En conclusión, esta evaluación *in silico* validó el potencial de los α-aminofosfonatos cíclicos como inhibidores selectivos de las COXs, destacando a los compuestos **25a** y **25c** como candidatos líderes para futuras etapas de síntesis y validación experimental. Esta propuesta demuestra el impacto del diseño racional de fármacos enfocado en la estructura con la finalidad de generar nuevos compuestos con perfiles terapéuticos diferenciados.



25a

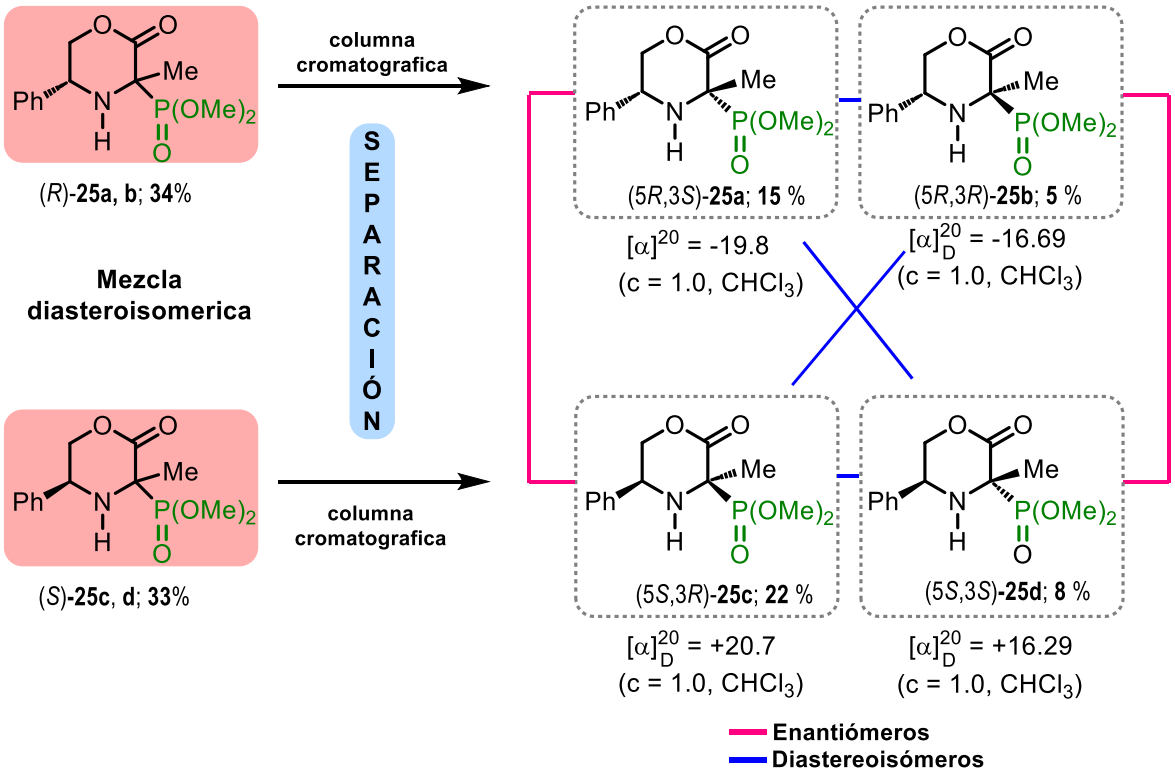


25c

Capítulo III

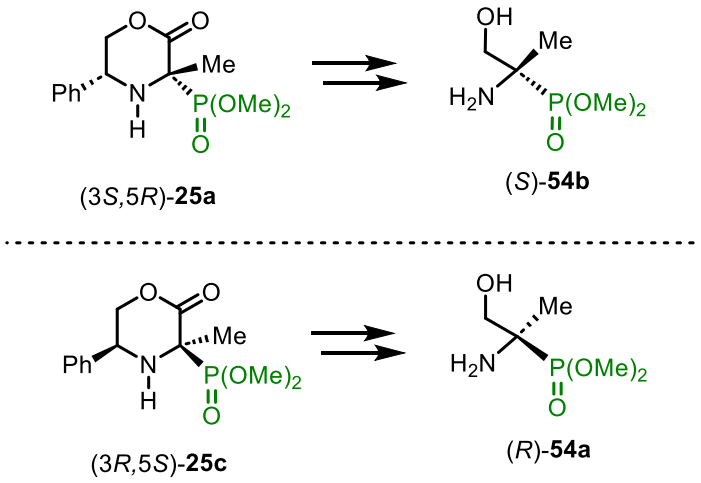
El capítulo III presenta la síntesis estereoselectiva y caracterización estructural de α-aminofosfonatos cíclicos derivados de morfolin-2-onas, compuestos de interés en química medicinal por su potencial actividad antiinflamatoria. El enfoque estratégico incluyó la obtención de iminas cíclicas quirales a partir de (*S*)- y (*R*)-fenilglicinol y piruvato de etilo, seguido de la fosfonilación diastereoselectiva utilizando fosfitos de diaqluilo o trialquilo en presencia o ausencia de catalizadores. Se evaluaron diferentes condiciones sintéticas que permitieron obtener los cuatro diasteroisómeros: (3*S*,5*R*)-**25a,** (3*R*,5*R*)-**25b**, (3*R*,5*S*)-**25c** y (3*S*,5*S*)-**25d** con rendimientos moderados y relaciones diastereoisoméricas variables.

La asignación de la configuración absoluta en los centros estereogénicos de los productos se realizó por RMN bidimensional (HSQC y NOESY), confirmando las disposiciones *cis* y *trans* entre los grupos metino y metilo.



Se propusieron mecanismos de reacción para explicar la selectividad observada, destacando la participación de especies activadas tipo *N*-aciliminio cuando se emplearon agentes activadores como cloroformiato de bencilo. Posteriormente, los compuestos **25a** y **25c** se transformaron exitosamente

en los correspondientes α-metilfosfoserinatos enantioméricamente enriquecidos (*R*)-**54a** y (*S*)-**54b** mediante reducción con $NaBH_4$ y posterior hidrogenólisis. Estos derivados representan un avance importante hacia la obtención de α-aminoácidos cuaternarios no proteicos con potencial farmacológico y como bloques de construcción para nuevos agentes terapéuticos.



(3*S*,5*R*)-**25a** (*S*)-**54b**

(3*R*,5*S*)-**25c** (*R*)-**54a**

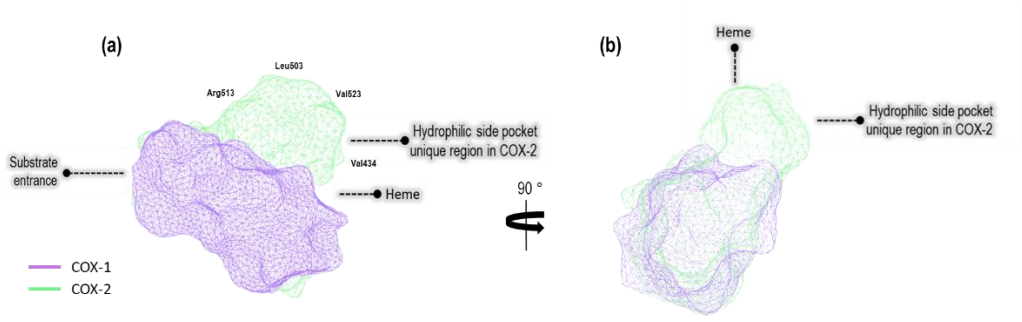
Este capítulo demuestra la viabilidad sintética, el control estereoquímico y el valor estratégico de los α-aminofosfonatos heterocíclicos como andamiajes quirales versátiles en el desarrollo de compuestos bioactivos de interés farmacéutico.

SUMMARY

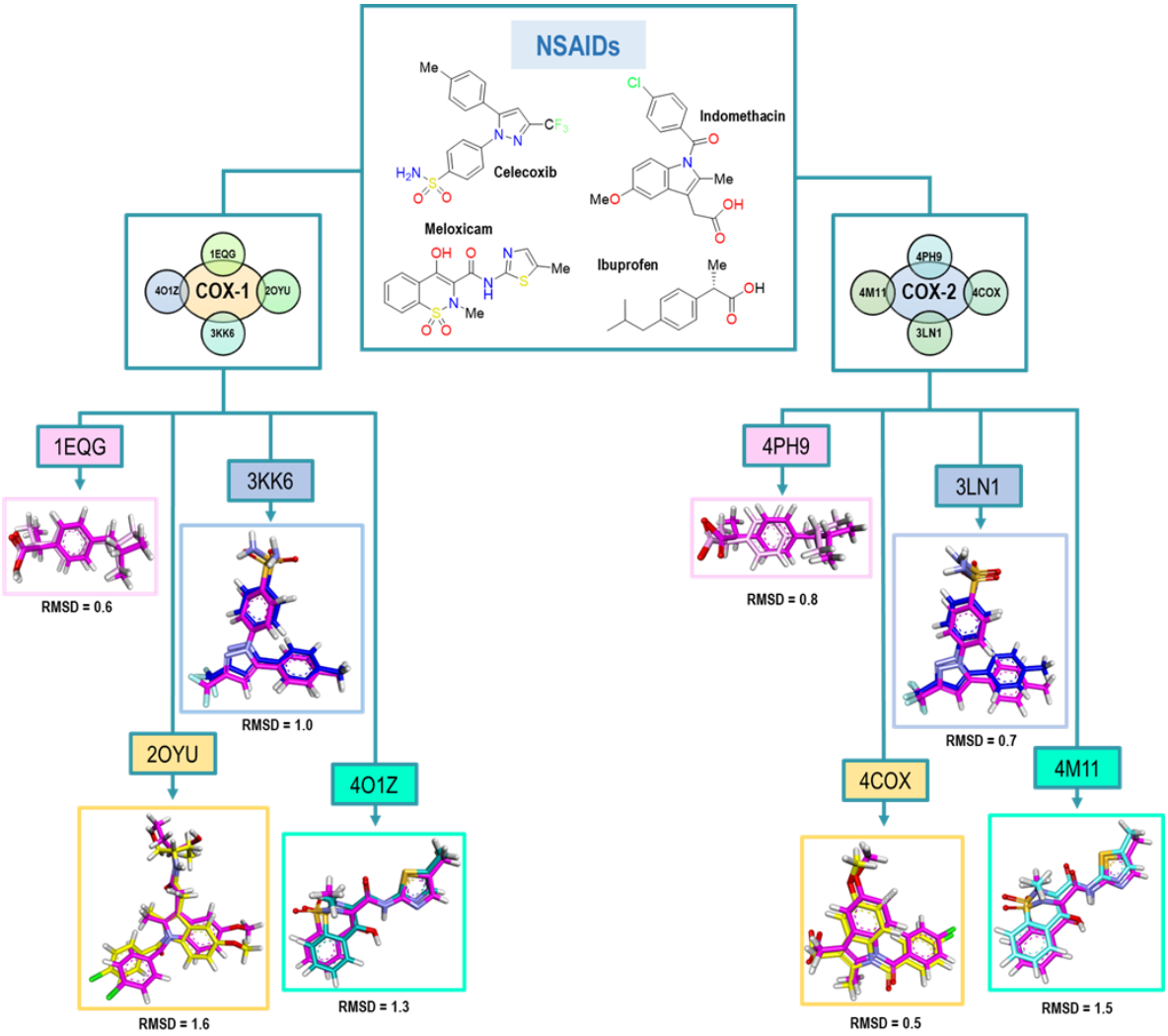
Chapter I

Chapter I presents the development of a computational model for the prediction of the binding mode of inhibitors of COX-1 and COX-2 cyclooxygenases, key isoenzymes in the regulation of inflammation and prostaglandin synthesis. The importance of these therapeutic targets in the design of anti-inflammatory agents is highlighted, with emphasis on selectivity towards COX-2 to minimize side effects.

The proposed methodology includes an exhaustive analysis of crystal structures of COXs available in public databases, evaluating their quality by resolution criteria and structural validation with tools such as DoGSiteScorer and EDIA. Key differences in COX-1 and COX-2 active cavities were identified, including the presence of unique residues and variations in volume, surface area and depth, supporting the need to properly select crystals for molecular docking studies.



The model was structurally and energetically validated using a set of non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) from different families, such as ibuprofen, meloxicam, indomethacin and celecoxib, as well as by comparing experimental values of IC_{50} and interaction energies obtained by docking. This validation allowed establishing correlations between the predicted affinity and the experimental data, demonstrating the reliability of the model to predict the antiinflammatory activity of new bioactive molecules.

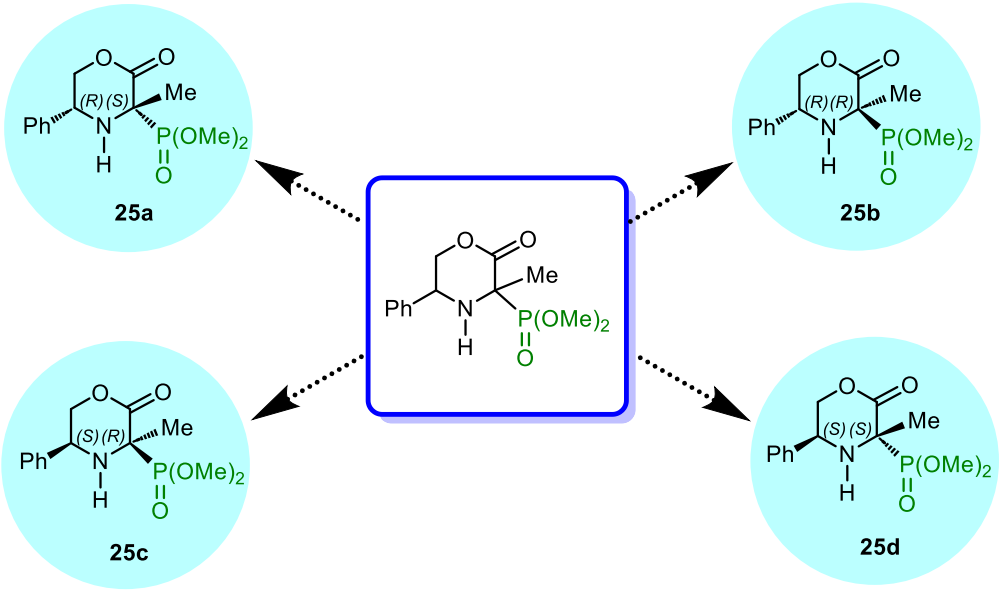


In conclusion, the computational model developed constitutes a robust and reliable tool to support the rational design of selective COX-1 and COX-2 inhibitors, with relevant applications in the discovery of new antiinflammatory therapeutic agents

Chapter II

Chronic inflammation represents a central pathological axis in multiple degenerative diseases, which has encouraged the search for new molecular entities with selective and effective antiinflammatory activity. In this context, α-aminophosphonates, bioisosteric analogues of α-amino acids, have emerged as a class of bioactive compounds of therapeutic interest for their ability to modulate inflammatory pathways. This doctoral research focused on the rational computer-aided design (DIFAC) of novel heterocyclic α-aminophosphonates, integrating geometric optimization, molecular docking and biological activity prediction techniques, against COX-1 and COX-2 isoforms.

Cyclic compounds were designed with conformational restrictions and structural modifications such as heterocyclic ring enlargement, introduction of functional groups and evaluation of isomers. Prediction of anti-inflammatory activity using the online *PASS* server identified the prototype compound **25** as the most promising compound, with a Pa of 85%. Subsequently, possible diastereoisomers and conformers derived from **25** were modeled, selecting three of the total conformers (lowest, medium and highest energy) for *in silico* evaluations.

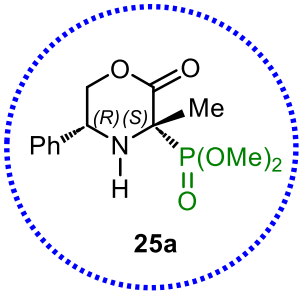


Molecular docking analyses against multiple crystallographic structures of COX-1 (PDB: 1EQG, 2OYU, 3KK6, 4O1Z) and COX-2 (PDB: 4PH9, 4COX, 3NL1, 4M11) showed that **25a** and **25c** compounds in certain conformations have comparable or higher binding energies to non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) such as ibuprofen, meloxicam or indomethacin. Furthermore, it was observed that the

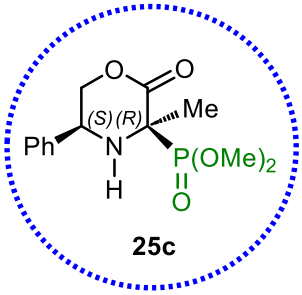
enantiomers showed selective affinities towards different isoforms, indicating a clear influence of stereochemistry on molecular recognition.

In particular, the stereoisomer **25c**_INTER (M0023) presented the best affinity for COX-1, while **25a**_MENOR (M0008) showed higher selectivity towards COX-2. Intermolecular interactions were analyzed in detail, revealing key contacts with residues such as Arg120, Tyr385, Ile523 and Ser530, characteristic of COXs active sites.

In conclusion, this *in silico* evaluation validated the potential of heterocyclic α-aminophosphonates as selective COX inhibitors, highlighting **25c** and **25a** as leading candidates for future stages of synthesis and experimental validation. This proposal demonstrates the impact of rational structure-focused drug design with the aim of generating new compounds with differentiated therapeutic profiles.



25a

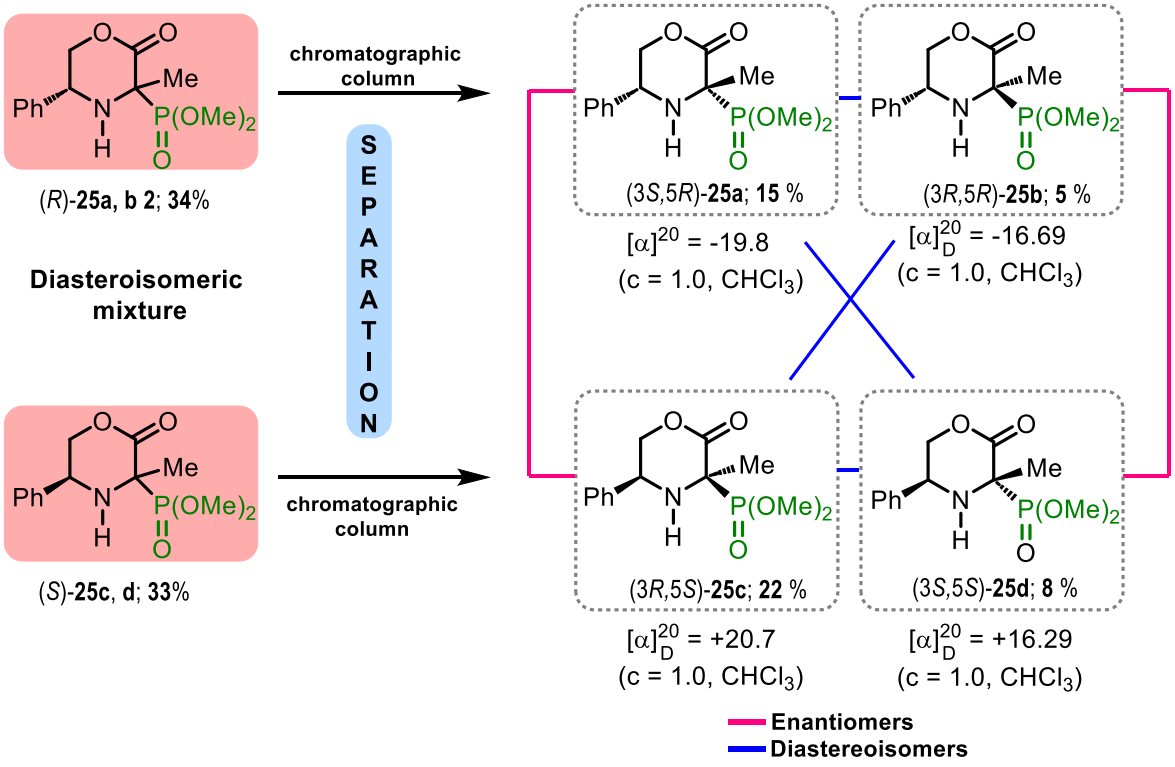


25c

Chapter III

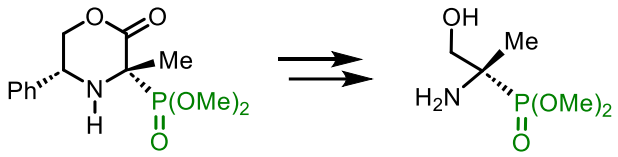
Chapter III presents the enantioselective synthesis and structural characterization of cyclic α-aminophosphonates derived from morpholin-2-ones, compounds of interest in medicinal chemistry for their potential anti-inflammatory activity. The strategic approach included obtaining chiral cyclic imines from (*S*)- and (*R*)-phenylglycinol and ethyl pyruvate, followed by diastereoselective phosphonylation employing dialkyl or trialkyl phosphites in the presence or absence of catalysts. Different synthetic conditions were evaluated to obtain the four diastereoisomers: (3*S*,5*R*)-**25a,** (3*R*,5*R*) **25b**, (3*R*,5*S*) **25c** and (3*S*,5*S*) **25d** with moderate yields and variable diastereoisomeric ration.

The assignment of the absolute configurations in the new stereogenic centers of the products was performed by two-dimensional NMR spectroscopy (HSQC and NOESY), confirming *cis* and *trans* arrangements between methine and methyl groups.

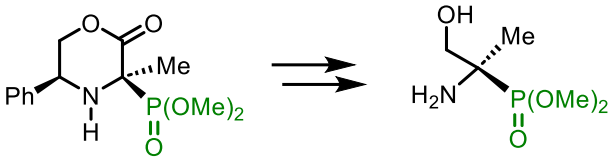


Reaction mechanisms were proposed to explain the observed selectivity, highlighting the participation of activated *N*-acyliminium-type species when activators agents such as benzyl chloroformylate were employed. Subsequently, compounds **25a** and **25c** were successfully transformed into the corresponding enantiomerically enriched α-methylphosphoserinates (*R*)-**54a** and (*S*)-**54b** by reduction with $NaBH_4$ and subsequent hydrogenolysis. These derivatives represent an important advance

towards obtaining non-protein quaternary amino acids with pharmacological potential as building blocks for new therapeutic agents.



(3*S*,5*R*)-**25a** (*S*)-**54b**

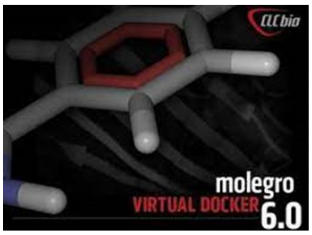


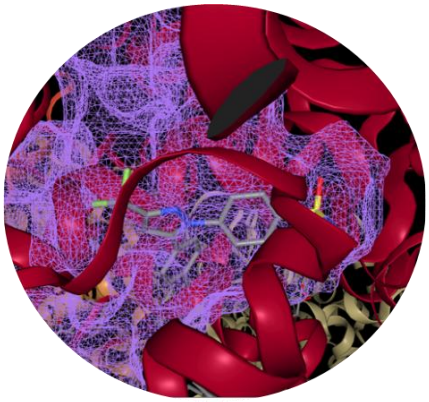
(3*R*,5*S*)-**25c** (*R*)-**54a**

This chapter demonstrates the synthetic feasibility, stereochemical control and strategic value of heterocyclic α-aminophosphonates as versatile chiral scaffolds in the development of pharmaceutically interesting bioactive compounds.

Capítulo I

~Construcción de un modelo computacional para la predicción de la unión de inhibidores de las COXs ~





RCSB PDB
PROTEIN DATA BANK

1. Introducción

La inflamación constituye una respuesta protectora natural en los tejidos afectados por traumatismos físicos, sustancias químicas nocivas o agentes microbianos. Representa la respuesta del organismo para inactivar o eliminar patógenos invasores, eliminar irritantes y sentar las bases para la reparación tisular.[1] En función de sus características fisiológicas, la inflamación puede clasificarse en aguda o crónica, siendo la inflamación crónica la más importante en el ámbito de la salud, ya que prevalece en las patologías crónicas.[2]

Al mismo tiempo, el papel de los grupos metilo (carbonos tetrasustituidos) en la modulación de la actividad biológica de compuestos pequeños está bien descrito en la literatura.[3] Numerosos grupos de investigación han llevado a cabo estudios sobre la sustitución de átomos de hidrógeno por el grupo metilo, demostrando sistemáticamente un impacto favorable en la relación estructura-actividad de estos compuestos.

Investigaciones recientes han revelado que en los estudios SAR se produce un aumento de 10 veces o más en la actividad biológica en aproximadamente el 8% de los casos, mientras que un 0,4% exhibe un aumento de 100 veces o más en el valor biológico. Esto está relacionado con la incorporación de un grupo metilo en un entorno hidrofóbico que puede ser adecuado; sin embargo, la ortometilación en sistemas biarílicos o por ramificación en un átomo unido a un anillo favorece un cambio conformacional en el sistema biológico. Por esta razón, la incorporación de grupos metilo ha surgido dentro del diseño de compuestos bioactivos dada la diversidad de ventajas que ofrece.[4]

En este contexto, en los últimos años nuestro grupo de investigación se ha centrado en la síntesis de pequeños compuestos con carbonos tetrasustituidos incorporando un grupo metilo en su estructura,

---

[1] (a) Clark, M. A.; Finkel, R.; Rey, J. A.; Whalen, K. Antiinflamatorios. In Farmacología, 5th ed.; Lippincott Williams & Wilkins:Philadelphia, PA, USA, **2012**, 525-548; (b) Serhan, C. N.; Petasis, N. A. Resolvins and Protectins in Inflammation Resolution. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 5922-5943; (c) Kumar, V.; Abbas, A. K.; Aster, J. C. Inflamación y reparación. In Patología Humana, 9th ed.; Klatt, E. C., Kummar, R., Mitchell, R. N., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, **2013,** 29-75; (d) Stevens, A.; Lowe, J.; Scott, I. Lesión celular y Muerte. Respuestas tisulares al daño. In Patología Clínica, 3rd ed.; El Manual Moderno: Ciudad de México, México, **2011**, 35-54.

[2] (a) Buch, M. H.; Eyre, S.; McGonagle, D. *Nat. Rev. Rheumatol*. **2021**, *17*, 17-33; (b) Moriya, J. *J. Cardiol.* **2019**, *73*, 22-27; (c) Ferrer, M. D.; Busquets-Cortés, C.; Capó, X.; Tejada, S.; Tur, J. A.; Pons, A.; Sureda, A. *Curr. Med. Chem.* **2019**, *26*, 3225-3241; (d) P¸eczek, P.; Gajda, M.; Rutkowski, K.; Fudalej, M.; Deptała, A.; Badowska-Kozakiewicz, A. M. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2023**, *149*, 2657-2672.

[3] Barreiro, E. J.; Kümmerle, A. E.; Fraga, C. A. M. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 5215-5246.

[4] Leung, C. S.; Leung, S. S. F.; Tirados-Rives, J.; Jorgensen,W. L. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 4489-4500.

las cuales han mostrado tener actividad antiinflamatoria, en modelos *in vivo*. Sin embargo, aún no se ha explorado el mecanismo farmacológico de este tipo de compuestos.[5]

Aunque existen diversos mecanismos farmacológicos implicados en los procesos inflamatorios,[6] el más conocido y estudiado es la inhibición de las enzimas ciclooxigenasas (COXs), isoenzimas claves en la regulación de la inflamación en procesos esenciales para la biosíntesis de prostaglandinas, a través de la oxidación del ácido araquidónico.[7] Por este motivo, la inhibición de estas isoenzimas es uno de los temas de estudio de diversos grupos de investigación con un interés específico en la isoforma COX-2; ya que se ha demostrado que ésta es la principal participante en los procesos inflamatorios. Además, existen diferencias estructurales como tamaño, hidrofobicidad y residuos dentro del sitio catalítico entre ambas isoenzimas.[8] En consecuencia, se busca el desarrollo de nuevos compuestos que presenten una mayor selectividad para la COX-2.

Dada la diversidad de cristales de COX disponibles en las bases de datos y las variaciones estructurales de sus compuestos co-cristalizadas, la elección de cristales adecuados para el análisis computacional descriptivo o predictivo se ha convertido en un reto cada vez mayor. Una selección incorrecta de cristales puede conducir a diseños moleculares erróneos o a una descripción inadecuada del modo de interacción de los inhibidores de la COX. Por lo tanto, este trabajo introduce un método destinado a racionalizar la selección adecuada de cristales de COX, reforzando en última instancia la fiabilidad de los resultados obtenidos a partir de cálculos de acoplamiento molecular. Este método explora el modo de interacción de cuatro AINEs diferentes: celecoxib, meloxicam, ibuprofeno e indometacina. Demostrando que, de este modo, es posible identificar el modo de interacción de los inhibidores de COXs. Además, este método permite correlacionar la energía de interacción (E_{int}) obtenida mediante cálculos de docking molecular, con los valores IC_{50} obtenidos a partir de experimentos de inhibición de COXs.

[5] Romero-Estudillo, I.; Viveros-Ceballos, J. L.; Cazares-Carreño, O.; González-Morales, A.; de Jesús, B. F.; López-Castillo, M.; Razo- Hernández, R. S.; Castañeda-Corral, G.; Ordóñez, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, *27*, 2376-2386.
[6] Wang, B.; Wu, L.; Chen, J.; Dong, L.; Chen, C.; Wen, Z.; Hu, J.; Fleming, I.; Wang, D. W. *Signal Transduct. Target Ther.* **2021**, *6*, 94.
[7] Ahmadi, M.; Bekeschus, S.;Weltmann, K. D.; vonWoedtke, T.;Wende, K. *RSC Med. Chem.* **2022**, 13, 471-496.
[8] Blobaum, A. L.; Marnett, L. J. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 1425-1441.

2. Antecedentes

La respuesta inflamatoria ha sido uno de los mecanismos más estudiados, dada la correlación que tiene con una gama de enfermedades.[29] Así mismo, esta respuesta puede ser abordada a través de diferentes mecanismos fisiológicos; sin embargo, una de las vías involucradas en esta respuesta inflamatoria y la cual ha sido por varios años de interés para la comunidad científica es la ruta metabólica del ácido araquidónico.

Esta vía metabólica comprende la biosíntesis de las prostaglandinas (PGs) y el tromboxano A2 (TXA2) a partir del ácido araquidónico y es gracias al papel clave que juegan las ciclooxigenasas (COXs). Teniendo que, estos metabolitos del Ácido araquidónico (ÁA) son biomoléculas claves en la modulación de la respuesta inflamatoria (Figura 1).[9]

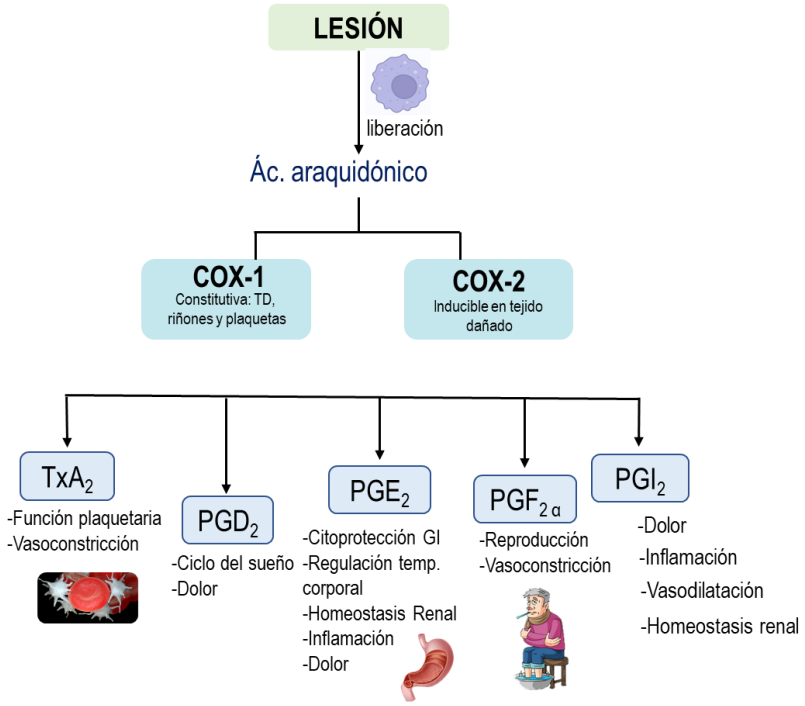


Figura 1. Vías de inflamación de las enzimas COX-2.

Las COXs forman parte de las enzimas de tipo oxidasas y están integradas por dos isoformas COX-1 y COX-2. La COX-1 se expresa principalmente en las plaquetas, en los riñones, la mucosa gástrica y los pulmones. La COX-2 muestra una expresión constitutiva baja en el cerebro, el riñón, el tracto gastrointestinal y el timo. Además, que esta isoforma es inducible por estímulos inflamatorios.[10] En

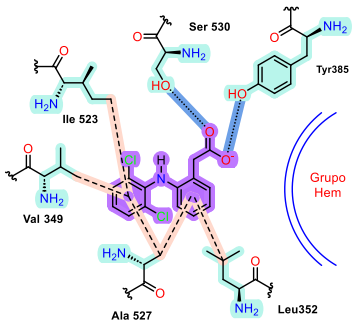
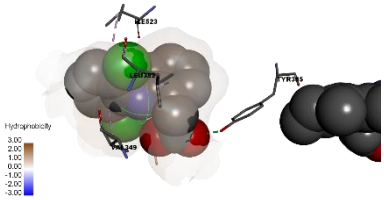
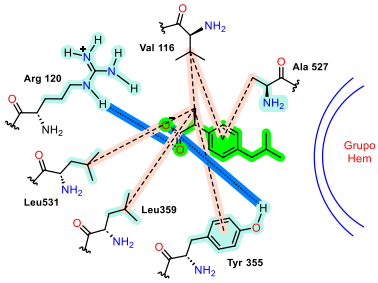
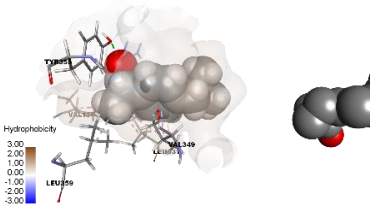
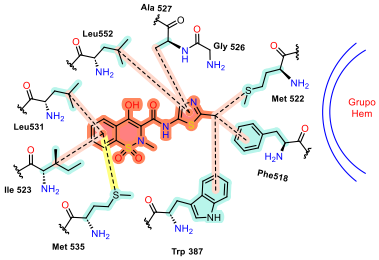
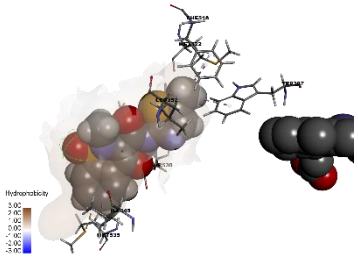
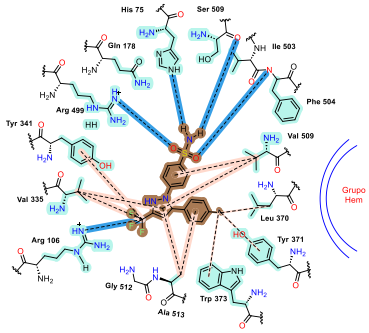
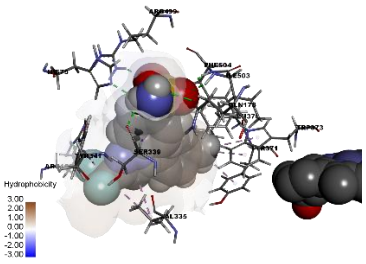
[9] Rouzer, C. A.; Marnett, L. *Chem. Rev.* **2020**, *120*, 7592-7641.
[10] Ricciotti E.; FitzGerald, G. A. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2011**, *31*, 986-1000.

conjunto integran una compleja vía regulatoria que controla la inflamación, en la que las dos isoformas desempeñan un papel modulador y, en parte, controvertido; sin embargo, se ha descrito los efectos que conllevan la reducción de los metabolitos PGG2 y PGH2 a través de la inhibición de la COX-1/COX-2 por los AINEs, reflejado en problemas a nivel de mucosa gástrica dando pauta a un daño del tracto gastrointestinal. Por otro lado, la COX-2 desempeña un papel esencial en la regulación de la función renal.[11]

Por lo mencionado anteriormente, se han estudiado los diversos mecanismos farmacológicos de diferentes fármacos del tipo AINEs, con la intención de conocer los efectos no deseados para cada uno de estos, y se han llevado pruebas *in vitro* de selectividad sobre ambas isoformas.[12] Esto ha llevado a clasificar el grupo de AINEs por familias, de las cuales, cuatro de estás son las más sobresalientes.

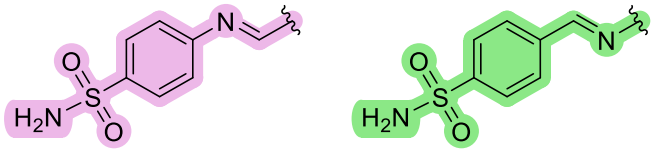
[11] Harris, R. C. Breyer, M. D. *Am. J. Physiol.* **2001**, *281,* F1-F11.
[12] (a) Brune, K.; Patrignani, P. *J. Pain Res,* **2015,** *8,* 105-118; (b) *RSC Med. Chem.* **2022**, *13*, 471-496.

Tabla 1. Modo de interacción de diferentes fármacos, representando a cada una de las familias más importantes de los AINEs.

Familias	Fármacos	Modo de Interacción (2D)	Modo de interacción (3D)
Derivados de ácido acético	- Diclofenaco - Indometacina	*Ejemplo: diclofenaco*  Interacciones 2D azul = enlaces de hidrógeno y rosado= Interacciones π-alquilo.	*Ejemplo: diclofenaco*  Acomodo y orientación estructural del diclofenaco sobre el sitio de unión en COX-1.
Derivado de ácido propiónico	- Ibuprofeno - Naproxeno - Flurbiprofeno	*Ejemplo: ibuprofeno*  Interacciones 2D azul = enlaces de hidrógeno y rosado= Interacciones π-alquilo.	*Ejemplo: ibuprofeno*  Acomodo y orientación estructural del ibuprofeno sobre el sitio de unión en COX-1.
Derivados de ácidos enólicos o fenólicos	- Meloxicam - Isoxicam	*Ejemplo: meloxicam*  Interacciones 2D amarillo = π- sulfuro, rosado= Interacciones π-alquilo	*Ejemplo: meloxicam*  Acomodo y orientación estructural del meloxicam sobre el sitio de unión en COX-1.
AINEs heterocíclicos diarilos (selectivos de COX-2)	- Celecoxib	*Ejemplo: celecoxib*  Interacciones 2D azul = enlaces de hidrógeno y rosado= Interacciones π-alquilo	*Ejemplo: celecoxib*  Acomodo y orientación estructural del celecoxib sobre el sitio de unión en COX-1.

Con todo este conocimiento en mente sobre el sistema COXs y su importancia dentro de los procesos inflamatorios, diversos grupos de investigación con interés en Diseño de Fármacos Asistido por Computadora (DIFAC), se han centrado en diseñar nuevos compuestos con potencial actividad antiinflamatoria, los cuales han sido probados en modelos computacionales y han mostrado resultados prometedores.

Un ejemplo de éxito es el trabajo realizado por Razo-Hernández y col.[13] donde ellos realizaron una modificación estructural del resveratrol; compuesto con actividad inhibitoria sobre COXs, en donde, decidieron sumar a la estructura el grupo benzosulfonamida (BzSAD) presentes en los AINEs del tipo COXIB, ya que estos han demostrado tener una mayor selectividad hacia COX-2. Por ende, diseñaron los siguientes andamios estructurales (Figura 2).



Andamio 1 **Andamio 2**

Figura 2. Propuesta de andamios estructurales a partir del resveratrol.

Después de haber realizado el estudio de una serie de más de 30 compuestos, llegaron a la conclusión que el andamio 1, donde el nitrógeno se encuentra unido al anillo de benceno, mostraron una mayor selectividad hacia COX-2 en comparación con el resveratrol.[14] No conformes, decidieron realizar una nueva serie de compuestos partiendo nuevamente del andamio 1, pero ahora incorporando un anillo de benceno sustituido con halógenos en la posición *meta* y *para.* En consecuencia, lograron diseñar el mejor candidato **1,** de acuerdo con los valores obtenidos del acoplamiento molecular, también analizaron y compararon el acomodo de esta estructura en ambas cavidades de COXs con celecoxib como referencia (Figura 3).

[13] Pérez, D. J.; Sarabia O.; Villanueva-García, Pineda-Urbina, K.; Ramos-Organillo, A.; Gonzalez-Gonzalez, J.; Gómez-Sandoval, Z.; Razo-Hernández, R. *C. R. Chim.* **2016**, *20*, 169-180.
[14] Lin, S. J.; Tsai, W. J.; Chiou, W. F.; Yang, T. H.; Yang, L. M. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 2697-2706.

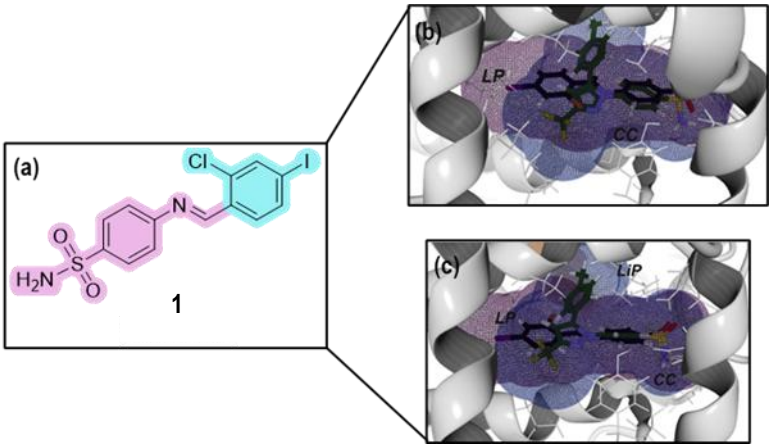


Figura 3. Diseño de un nuevo inhibidor selectivo para COX-2. (a) Estructura del compuesto **1**. (b) Modos de unión del compuesto **1** (negro) y celecoxib (verde) a la COX-1. La conformación del celecoxib corresponde a la unión experimental de su complejo con la COX-1. La conformación del compuesto **1** es la obtenida mediante cálculos de acoplamiento molecular; el yodo se representa en morado y el cloro en naranja. Las superficies de van der Waals expandidas se muestran en forma de cuadrícula: púrpura para **1** y azul para celecoxib.

En otro trabajo de Díaz-Reval y col. [15] publicaron el diseño de derivados de ibuprofeno que contienen silicio con actividad antiinflamatoria; estudio realizado *in silico* e *in vivo* (figura 4).

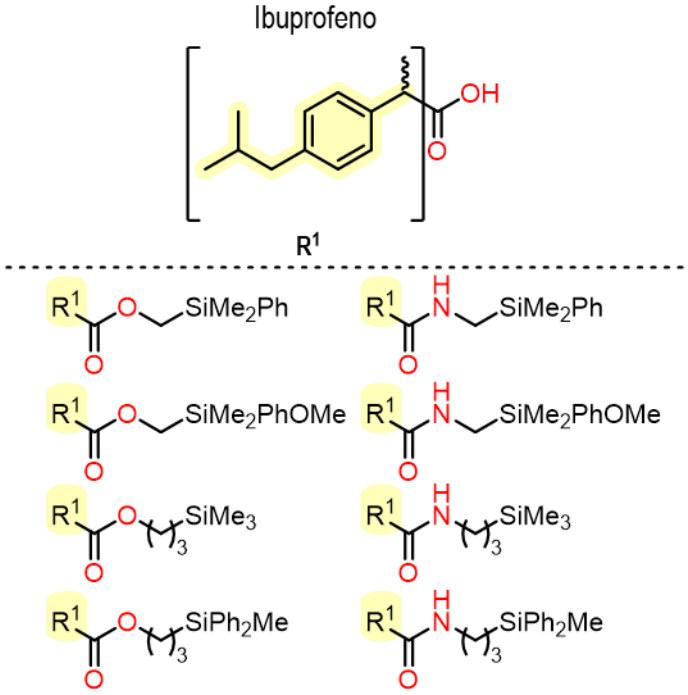


Figura 4. Diseño de nuevos compuestos derivados de ibuprofeno con actividad antiinflamatoria.

[15] Pérez, D. J.; Díaz-Reval, M. I.; Obledo-Benicio, F.; Zakai, U. I.; Gómez-Sandoval, Z.; Razo-Hernández, S. R.; West, R.; Sumaya-Martínez, M. T.; Pineda-Urbina, K.; Ramos-Organillo, A. *Eur. J. Pharmacol,* **2017**, *814*, 18-27.

En este estudio, se evaluaron las energías de interacción con los residuos: Ala527, Arg120, Arg513, Glu524, His90, Leu531, Ser530, Tyr 355, Val349 y Val523 para la isoforma de COX-2, los valores se compararon con los obtenidos para celecoxib e ibuprofeno como compuestos de referencia. De igual manera, se evaluaron hacia la isoforma de COX-1 con los mismos fármacos de referencia y sin los residuos His90 y Val523, pero solo integrando a Ile523. Los valores de energía obtenidos por el acoplamiento molecular mostraron tener una correlación con el porcentaje (%) de inhibición del edema.

Con estos ejemplos, podemos destacar la importancia de los modelos computacionales en la búsqueda de nuevos compuestos con posible actividad antiinflamatoria, proponer un mecanismo farmacológico enfocado a las COXs como dianas terapéuticas y finalmente, conocer el modo de interacción del ligando en el sitio de unión.

3. Objetivo

3.1. General.

Construir un modelo computacional robusto, que permita estudiar el modo de interacción de los inhibidores de las ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2) englobando diferentes familias de inhibidores.

3.2.1 Objetivos específicos.

3.2.1.1. Llevar a cabo la búsqueda, análisis y selección de los cristales óptimos de ambas isoformas de las enzimas ciclooxigenasas.

3.2.1.2. Construir una base de datos que incluyan: AINEs (selectivo y no selectivo) y compuestos que tengan reporte de actividad biológica inhibitoria sobre COXs (*in vitro*).

3.2.1.3. Diseñar y validar el modelo computacional a partir de los cristales seleccionados mediante la técnica de acoplamiento molecular.

3.2.1.4. Evaluar la respuesta predictiva y el modo de interacción del modelo computacional establecido con respecto a la actividad biológica en nuevos compuestos bioactivas pequeñas.

4. Resultados y discusión

4.1. Análisis de las cavidades de COXs

Los resultados obtenidos del análisis estructural realizado con el servidor Protein Plus sobre ambas cavidades de las isoformas de COXs, se observó claramente la existencia de diferencias estructurales englobando diferentes aspectos como se puede observar en la Figura 5.

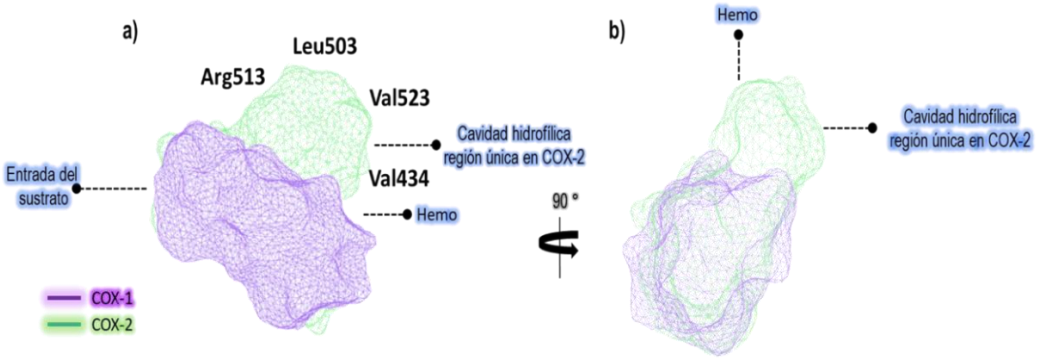


Figura 5. (a) Cavidad del sitio activo para COX-1 (1EQG) y COX-2 (3LN1); (b) giro a la derecha 90°.

Dentro de las primeras diferencias estructurales se pudo observar la existencia de un bolsillo hidrofílico único en la cavidad de COX-2 en comparación con COX-1, además de aspectos como la forma y el tamaño los cuales se calcularon con el método DoGSiteScorer que detecta cavidades[16] basándose únicamente en la estructura 3D de la enzima, y su división de esta en sub-cavidades. Además de realizar el cálculo de propiedades globales como: tamaño, forma y características químicas de los sub-cavidades.[17] Para el análisis, los aspectos evaluados fueron: volumen ($Å^3$), superficie ($Å^2$), profundidad (Å), radio hidrofóbico, residuos de aminoácidos en ambos y residuos de aminoácidos únicos como se muestra en la Tabla 2.

[16] Volkamer, A.; Griewel, A.; Grombacher, T.; Rarey, M. *J. Chem. Info. Model.* **2010**, *50*, 2041-2052.
[17] Volkamer, A.; Kuhn, D.; Grombacher, T.; Rippmann, F.; Rarey, M. *J. Chem. Inf. Model*. **2012**, *52*, 360-372.

Tabla 2. Diferencias de α-aminoácidos entre las cavidades COX-1 y COX-2.

PDB	Volumen (Å^3)	Superficie (Å^2)	Profundidad (Å)	Radio hidrofóbico	Residuos de α-aminoácidos en ambos	Residuos de α-aminoácidos únicos
1EQG (COX-1)	204.80	254.18	10.91	0.792	Tyr355, Arg120, Ser530, Tyr385	Ile523, Ile434, Phe503, His513
4PH9 (COX-2)	228.86	306.53	11.39	0.760	Tyr356, Arg121, Ser531, Tyr386	Leu504, Val435, Arg514, Val524
2OYU (COX-1)	288.76	335.33	12.82	0.745	Tyr355, Arg120, Ser530, Tyr385	Ile523, Ile434, Phe503, His513
4COX (COX-2)	260.09	343.12	12.34	0.780	Tyr355, Arg120, Ser530, Tyr385	Leu503, Val523, Val434, Arg513
3KK6 (COX-1)	198.14	309.36	10.91	0.763	Tyr341, Arg106, Ser516, Tyr371	Ile523, Ile434, Phe503, His513
3LN1 (COX-2)	269.31	306.59	12.28	0.760	Tyr355, Arg120, Ser530, Tyr385	Arg513, Leu503, Val523, Val434
4O1Z (COX-1)	272.89	335.02	12.67	0.815	Tyr355, Arg120, Ser530, Tyr385	Ile523, Ile434, Phe503, His513
4M11 (COX-2)	292.35	320.25	13.21	0.831	Tyr355, Arg120, Ser530, Tyr385	Leu503, Val384, Val523, Arg513

Las propiedades revelan que la cavidad de la COX-2 (4PH9, 3LN1 y 4M11) presenta un mayor volumen (Å^3) y una mayor superficie (Å^2) en comparación con la cavidad de la COX-1 (1EQG, 3LN1 y 4O1Z). Así mismo, el sitio catalítico de la COX-2 es más profundo, según la Tabla 2 (excepto en el cristal 2OYU, indometacina). Sin embargo, en el sistema de indometacina (2OYU y 4COX), la relación con respecto a los valores mencionados anteriormente es inversa, debido a la diferencia estructural en los ligandos cocristalizados. En el cristal 2OYU, el ligando es indometacina-(*S*)-α-etil-etanolamida (indometacina alfa) con un volumen más elevado que la indometacina presente en el cristal 4COX. En cuanto a los residuos de α-aminoácidos, en todos los sistemas se mantienen los siguientes: Tyr355, Arg120, Ser530 y Tyr385. Por otra parte, los residuos Ile523, Ile434, Phe503, e His513 están presentes únicamente en la cavidad COX-1, y Leu503, Val384, Val523, y Arg513 están presentes únicamente en la cavidad COX-2.

Adicionalmente, al llevar a cabo la selección de los cristales, se observó que las isoformas cristalizadas no pertenecían al mismo género, esto nos llevó a plantear si mantenían una similitud en la secuencia de α-aminoácidos y si estos se conservaban. Para ello, se realizó un análisis de la secuencia de α-aminoácidos donde también se incorporó la secuencia Humana para COX-1 teniendo los siguientes organismos: *Human*, *Mus musculus* y *Ovis aries.* La Figura 6, muestra el alineamiento de la secuencia correspondiente a la ciclooxigenasa 1; comparando los cuatro cristales seleccionados para el modelo computacional, las secuencias *Mus Musculus* y *Human*. Como resultado, sólo se encontró una

diferencia en la secuencia *Human* (His513 se sustituyó por Gln). Por otro lado, al analizar las secuencias de COX-2, se encontró una similitud completa. Debido a estos resultados se decidió continuar con la construcción de un modelo computacional al no encontrar ninguna diferencia significativa entre los cristales.

```
MOUSE_COX1------MSRRSLSLWFPLLLLLLLPPTPSVLLADPGVPSPVNPCCYYPCQNQGVCVRFGLDNYQCD 60
6Y3C_1----------------------------------ADPGAPTPVNPCCYYPCQHQGICVRFGLDRYQCD 34
1EQG_1----------------------------------PVFSADPGAPAPVNPCCYYPCQHQGICVRFGLDRYQCD 38
2OYU_1----------MSRQSISLRFPLLLLLLSP--SPVFSADPGAPAPVNPCCYYPCQHQGICVRFGLDRYQCD 58
3KK6_1------------------------------------------PVNPCCYYPCQHQGICVRFGLDRYQCD 27
4O1Z_1------------------------------------------PVNPCCYYPCQHQGICVRFGLDRYQCD 27
                                                  ***********:**:*******.****

MOUSE_COX1------CTRTGYSGPNCTIPEIWTWLRNSLRPSPSFTHFLLTHGYWLWEFVNATFIREVLMRLVLT 120
6Y3C_1----------CTRTGYSGPNCTIPGLWTWLRNSLRPSPSFTHFLLTHGRWFWEFVNATFIREMLMRLVLT 94
1EQG_1----------CTRTGYSGPNCTIPEIWTWLRTTLRPSPSFIHFLLTHGRWLWDFVNATFIRDTLMRLVLT 98
2OYU_1----------CTRTGYSGPNCTIPEIWTWLRTTLRPSPSFIHFLLTHGRWLWDFVNATFIRDTLMRLVLT 118
3KK6_1----------CTRTGYSGPNCTIPEIWTWLRTTLRPSPSFIHFLLTHGRWLWDFVNATFIRDTLMRLVLT 87
4O1Z_1----------CTRTGYSGPNCTIPEIWTWLRTTLRPSPSFIHFLLTHGRWLWDFVNATFIRDTLMRLVLT 87
                ************** :*****.:******* ******* *:*:********: *******

MOUSE_COX1------VRSNLIPSPPTYNSAHDYISWESFSNVSYYTRILPSVPKDCPTPMGTKGKKQLPDVQLLA 180
6Y3C_1----------VRSNLIPSPPTYNSAHDYISWESFSNVSYYTRILPSVPKDCPTPMGTKGKKQLPDAQLLA 154
1EQG_1----------VRSNLIPSPPTYNIAHDYISWESFSNVSYYTRILPSVPRDCPTPMGTKGKKQLPDAEFLS 158
2OYU_1----------VRSNLIPSPPTYNIAHDYISWESFSNVSYYTRILPSVPRDCPTPMGTKGKKQLPDAEFLS 178
3KK6_1----------VRSNLIPSPPTYNIAHDYISWESFSNVSYYTRILPSVPRDCPTPMGTKGKKQLPDAEFLS 147
4O1Z_1----------VRSNLIPSPPTYNIAHDYISWESFSNVSYYTRILPSVPRDCPTPMGTKGKKQLPDAEFLS 147
                ************* ************************:****************.:::*:

MOUSE_COX1------QQLLLRREFIPAPQGTNILFAFFAQHFTHQFFKTSGKMGPGFTKALGHGVDLGHIYGDNL 240
6Y3C_1----------RRFLLRRKFIPDPQGTNLMFAFFAQHFTHQFFKTSGKMGPGFTKALGHGVDLGHIYGDNL 214
1EQG_1----------RRFLLRRKFIPDPQGTNLMFAFFAQHFTHQFFKTSGKMGPGFTKALGHGVDLGHIYGDNL 218
2OYU_1----------RRFLLRRKFIPDPQGTNLMFAFFAQHFTHQFFKTSGKMGPGFTKALGHGVDLGHIYGDNL 238
3KK6_1----------RRFLLRRKFIPDPQGTNLMFAFFAQHFTHQFFKTSGKMGPGFTKALGHGVDLGHIYGDNL 207
4O1Z_1----------RRFLLRRKFIPDPQGTNLMFAFFAQHFTHQFFKTSGKMGPGFTKALGHGVDLGHIYGDNL 207
                :::*****:*** ******::****************************************

MOUSE_COX1------ERQYHLRLFKDGKLKYQVLDGEVYPPSVEQASVLMRYPPGVPPERQMAVGQEVFGLLPGL 300
6Y3C_1----------ERQYQLRLFKDGKLKYQVLDGEMYPPSVEEAPVLMHYPRGIPPQSQMAVGQEVFGLLPGL 274
1EQG_1----------ERQYQLRLFKDGKLKYQMLNGEVYPPSVEEAPVLMHYPRGIPPQSQMAVGQEVFGLLPGL 278
2OYU_1----------ERQYQLRLFKDGKLKYQMLNGEVYPPSVEEAPVLMHYPRGIPPQSQMAVGQEVFGLLPGL 298
3KK6_1----------ERQYQLRLFKDGKLKYQMLNGEVYPPSVEEAPVLMHYPRGIPPQSQMAVGQEVFGLLPGL 267
4O1Z_1----------ERQYQLRLFKDGKLKYQMLNGEVYPPSVEEAPVLMHYPRGIPPQSQMAVGQEVFGLLPGL 267
                ****:************:*:**:******:* ***:** *:**: ***************

MOUSE_COX1------MLFSTIWLREHNRVCDLLKEEHPTWDDEQLFQTTRLILIGETIKIVIEEYVQHLSGYFLQ 360
6Y3C_1----------MLYATLWLREHNRVCDLLKAEHPTWGDEQLFQTTRLILIGETIKIVIEEYVQQLSGYFLQ 334
1EQG_1----------MLYATIWLREHNRVCDLLKAEHPTWGDEQLFQTARLILIGETIKIVIEEYVQQLSGYFLQ 338
2OYU_1----------MLYATIWLREHNRVCDLLKAEHPTWGDEQLFQTARLILIGETIKIVIEEYVQQLSGYFLQ 358
3KK6_1----------MLYATIWLREHNRVCDLLKAEHPTWGDEQLFQTARLILIGETIKIVIEEYVQQLSGYFLQ 327
4O1Z_1----------MLYATIWLREHNRVCDLLKAEHPTWGDEQLFQTARLILIGETIKIVIEEYVQQLSGYFLQ 327
                **::*:************** *****.*******:******************:********

MOUSE_COX1------LKFDPELLFRAQFQYRNRIAMEFNHIYHWHPLMPNSFQVGSQEYSYEQFLFNTSMLVDYG 420
6Y3C_1----------LKFDPELLFGVQFQYRNRIAMEFNHIYHWHPLMPDSFKVGSQEYSYEQFLFNTSMLVDYG 394
1EQG_1----------LKFDPELLFGAQFQYRNRIAMEFNQIYHWHPLMPDSFRVGPQDYSYEQFLFNTSMLVDYG 398
2OYU_1----------LKFDPELLFGAQFQYRNRIAMEFNQIYHWHPLMPDSFRVGPQDYSYEQFLFNTSMLVDYG 418
3KK6_1----------LKFDPELLFGAQFQYRNRIAMEFNQIYHWHPLMPDSFRVGPQDYSYEQFLFNTSMLVDYG 387
4O1Z_1----------LKFDPELLFGAQFQYRNRIAMEFNQIYHWHPLMPDSFRVGPQDYSYEQFLFNTSMLVDYG 387
                ********* .*************:*********:**:** *:*****************
```

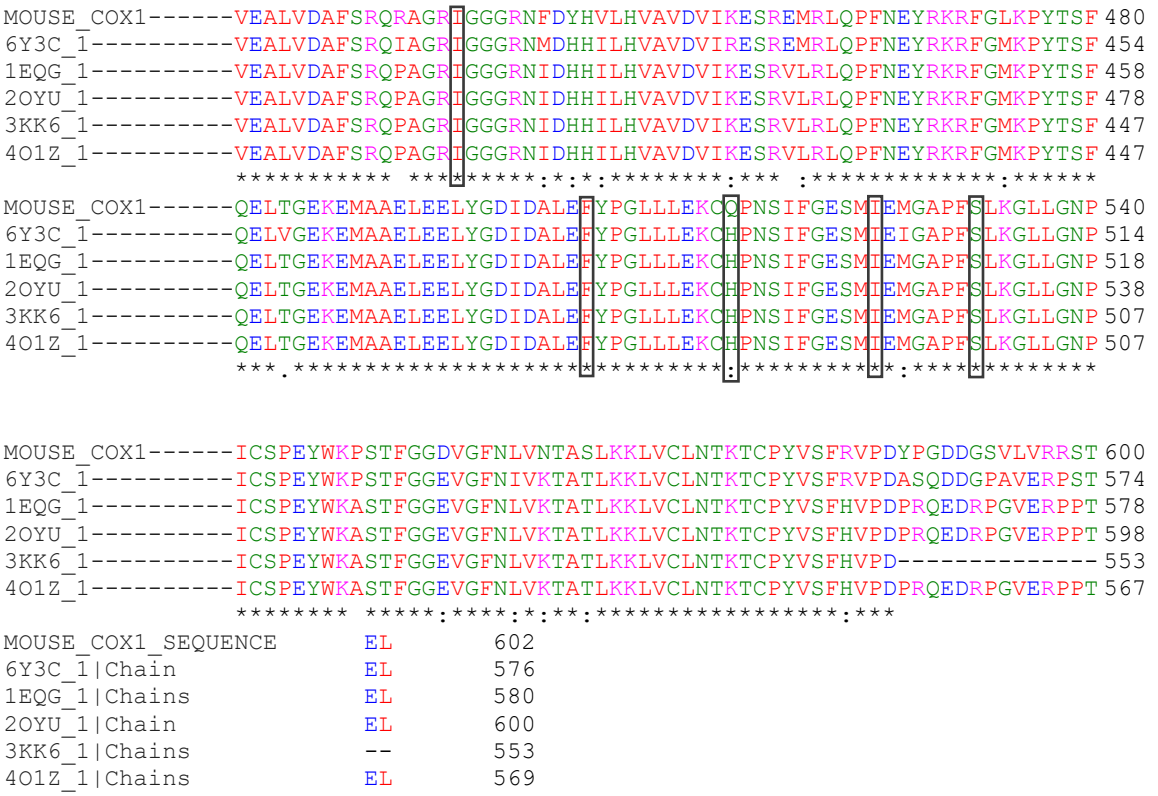


Figura 6. Análisis comparativo de la secuencia de la COX-1. Los residuos de α-aminoácidos dentro de la línea negra del recuadro corresponden a aminoácidos presentes en el sitio de unión de la enzima. Secuencia: *Mouse_COX1_SEQUENCE* (*Mus musculus*), *6Y3C*_COX1 (*Human*), 1EQG_1 (*Mus musculus*), 2OYU_1 (*Mus musculus*), 3KK6_1 (*Mus musculus*) y 4O1Z_1 (*Mus musculus*).



```
Human_cox2------QIIDGEMYPPTVKDTQAEMIYPPQVPEHLRFAVGQEVFGLVPGLMMYATIWLREHNRVCD 300
SHEEP_COX2------QMINGEMYPPTVKDTQVEMIYPPHIPEHLKFAVGQEVFGLVPGLMMYATIWLREHNRVCD 300
4PH9_1----------QVIGGEVYPPTVKDTQVEMIYPPHIPENLQFAVGQEVFGLVPGLMMYATIWLREHNRVCD 283
4COX_1----------QVIGGEVYPPTVKDTQVEMIYPPHIPENLQFAVGQEVFGLVPGLMMYATIWLREHQRVCD 283
3LN1_1----------QVIGGEVYPPTVKDTQVEMIYPPHIPENLQFAVGQEVFGLVPGLMMYATIWLREHNRVCD 283
4M11_1----------QVIGGEVYPPTVKDTQVEMIYPPHIPENLQFAVGQEVFGLVPGLMMYATIWLREHNRVCD 283
                *:*.**:*********.******::**:*:*************************:****
Human_cox2------VLKQEHPEWGDEQLFQTSRLILIGETIKIVIEDYVQHLSGYHFKLKFDPELLFNKQFQYQ 360
SHEEP_COX2------VLKQEHPEWGDEQLFQTSRLILIGETIKIVIEDYVQHLSGYHFKLKFDPELLFNQQFQYQ 360
4PH9_1----------ILKQEHPEWGDEQLFQTSRLILIGETIKIVIEDYVQHLSGYHFKLKFDPELLFNQQFQYQ 343
4COX_1----------ILKQEHPEWGDEQLFQTSKLILIGETIKIVIEDYVQHLSGYHFKLKFDPELLFNQQFQYQ 343
3LN1_1----------ILKQEHPEWGDEQLFQTSRLILIGETIKIVIEDYVQHLSGYHFKLKFDPELLFNQQFQYQ 343
4M11_1----------ILKQEHPEWGDEQLFQTSRLILIGETIKIVIEDYVQHLSGYHFKLKFDPELLFNQQFQYQ 343
                :******************:************************************:*****

Human_cox2------NRIAAEFNTLYHWHPLLPDTFQIHDQKYNYQQFIYNNSILLEHGITQFVESFTRQIAGRV 420
SHEEP_COX2------NRIAAEFNTLYHWHPLLPDVFQIDGQEYNYQQFIYNNSVLLEHGVTQFVESFTRQIAGRV 420
4PH9_1----------NRIASEFNTLYHWHPLLPDTFNIEDQEYSFKQFLYNNSILLEHGLTQFVESFTRQIAGRV 403
4COX_1----------NRIASEFNTLYHWHPLLPDTFNIEDQEYSFKQFLYNNSILLEHGLTQFVESFTRQIAGRV 403
3LN1_1----------NRIASEFNTLYHWHPLLPDTFNIEDQEYSFKQFLYNNSILLEHGLTQFVESFTRQIAGRV 403
4M11_1----------NRIASEFNTLYHWHPLLPDTFNIEDQEYSFKQFLYNNSILLEHGLTQFVESFTRQIAGRV 403
                ****:*************.*:*..*:*.::**:*****:*****:***************

Human_cox2------AGGRNVPPAVQKVSQASIDQSRQMKYQSFNEYRKRFMLKPYESFEELTGEKEMSAELEAL 480
SHEEP_COX2------AGGRNLPAAVEKVSKASLDQSREMKYQSFNEYRKRFLLKPYESFEELTGEKEMAAELEAL 480
4PH9_1----------AGGRNVPIAVQAVAKASIDQSREMKYQSLNEYRKRFSLKPYTSFEELTGEKEMAAELKAL 463
4COX_1----------AGGRNVPIAVQAVAKASIDQSREMKYQSLNEYRKRFSLKPYTSFEELTGEKEMAAELKAL 463
3LN1_1----------AGGRNVPIAVQAVAKASIDQSREMKYQSLNEYRKRFSLKPYTSFEELTGEKEMAAELKAL 463
4M11_1----------AGGRNVPIAVQAVAKASIDQSREMKYQSLNEYRKRFSLKPYTSFEELTGEKEMAAELKAL 463
                *****:* **: *::**:****:*****:******* **** ***********:***:**

Human_cox2------YGDIDAVELYPALLVEKPRPDAIFGETMVEVGAPFSLKGLMGNVICSPAYWKPSTFGGEV 540
SHEEP_COX2------YGDIDAMELYPALLVEKPRPDAIFGETMVEAGAPFSLKGLMGNPICSPEYWKPSTFGGEV 540
4PH9_1----------YSDIDVMELYPALLVEKPRPDAIFGETMVELGAPFSLKGLMGNPICSPQYWKPSTFGGEV 523
4COX_1----------YSDIDVMELYPALLVEKPRPDAIFGETMVELGAPFSLKGLMGNPICSPQYWKPSTFGGEV 523
3LN1_1----------YSDIDVMELYPALLVEKPRPDAIFGETMVELGAPFSLKGLMGNPICSPQYWKPSTFGGEV 523
4M11_1----------YSDIDVMELYPALLVEKPRPDAIFGETMVELGAPFSLKGLMGNPICSPQYWKPSTFGGEV 523
                *.***.:*********************** ***********  **** ***********

Human_cox2------GFQIINTASIQSLICNNVKGCPFTSFSVPDPELIKTVTINASSSRSGLDDINPTVLLKER 600
SHEEP_COX2------GFKIINTASIQSLICSNVKGCPFTSFSVQDAHLTKTVTINASSSHSGLDDINPTVLLKER 600
4PH9_1----------GFKIINTASIQSLICNNVKGCPFTSFNV-------------------------------- 551
4COX_1----------GFKIINTASIQSLICNNVKGCPFTSFNVQDPQPTKTATINASASHSRLDDINPTVLIKRR 583
3LN1_1----------GFKIINTASIQSLICNNVKGCPFTSFNVQDPQPTKTATINASASHSRLDDINPTVLIKRR 583
4M11_1----------GFKIINTASIQSLICNNVKGCPFTSFNVQ-------------------------------- 552
                **:************.**********.*

Human_cox2--------STEL    604
SHEEP_COX2--------STEL    604
4PH9_1-----------------    551
4COX_1------------STEL    587
3LN1_1------------STEL    587
4M11_1-----------------    552
```

Figura 7. Análisis comparativo de la secuencia de la COX-2. Los residuos de α-aminoácidos dentro de la línea negra del recuadro corresponden a aminoácidos presentes en el sitio de unión de la enzima. Secuencia: *Humano*_COX2 (*Human*), *Oveja*_COX2 (*Ovis aries*), 4PH9_1 (*Mus musculus*), 4COX_1 (*Mus musculus*), 3NL1_1 (*Mus musculus*) y 4M11_1 (*Mus musculus*).

4.2. Búsqueda, análisis y selección de PDBs.

Para llevar a cabo la construcción del modelo de predicción, el primer paso consistió en la búsqueda de cristales para las enzimas COXs 1 y 2 disponibles en la base de datos Protein Data Bank (PDB), logrando obtener un total de 49 cristales de los organismos *Ovis aries* (COX-1) y *Mus musculus* (COX-2) con diferentes ligandos cocristalizados (Figura 8).

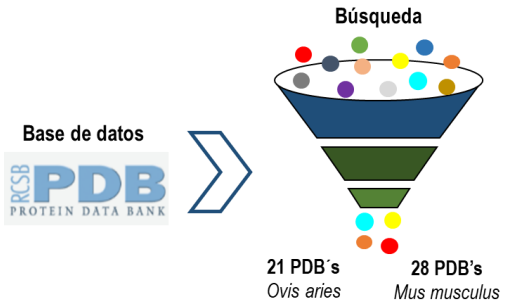


Figura 8. Búsqueda de cristales para COX-1 y COX-2.

Una vez encontrados estos cristales se prosiguió con el análisis de calidad en la técnica de cristalización por rayos-X, evaluándose respecto al valor de resolución descrito para cada cristal, teniendo como criterio de exclusión aquellos con valores mayores a 3Å. Posteriormente, aquellos que cumplieron con este criterio se clasificaron de acuerdo con las características del ligando cocristalizado como: estructura, tamaño, modo de interacción y selectividad (Figura 9).

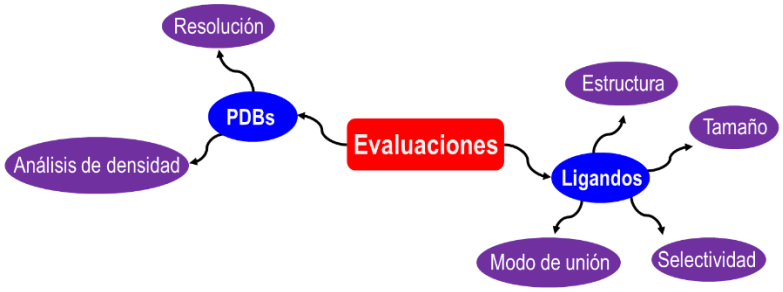


Figura 9. Búsqueda de cristales para COXs.

De acuerdo con la familia del ligando cocristalizado se obtuvieron cuatro grupos finales: Inhibidor endógeno, derivados de ácido propiónico, AINEs heterocíclicos diarílicos (COXIBs) y derivados de ácidos enólicos (oxicams); sin embargo, el número de cristales seguía siendo considerablemente alto.

Es por ello, que se realizó una evaluación detallada de la calidad en la técnica cristalográfica; se evaluó la calidad de estos a través de la elucidación de los cristales con respecto a su resolución con la herramienta EDIA[18] disponible en el servidor Protein Pluss. En la Figura 10, incisos (a) y (b) se muestra

[18] Meyder, A.; Nittinger, E.; Lange, G.; Klein, R. Rarey, M. *J. Chem. Inf. Model.* **2017,** *57,* 2437-2447.

el mapa en una escala de colores del análisis de densidad de los cristales 4PH9 y 3NZ8, ambos derivados del ácido propiónico.

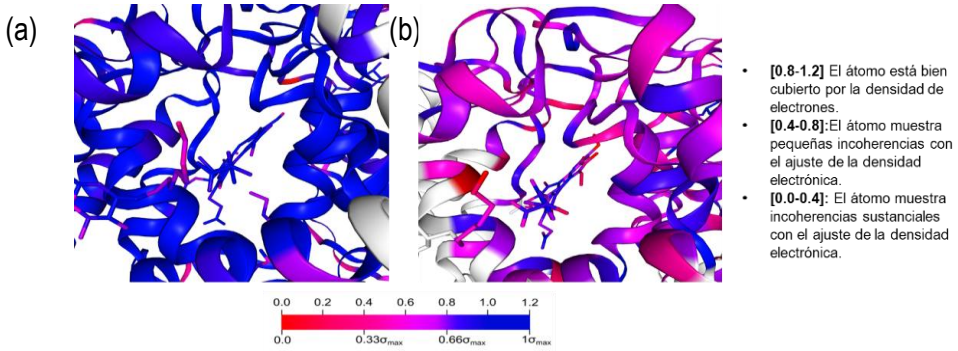


Figura 10. Ejemplos de análisis sobre el sitio activo en cristales de COX-1 con EDIA. (a) Ibuprofeno (4PH9) con resolución de 2.6 Å. (b) Flurbiprofeno (3N8Z) con resolución de 2.9 Å.

El análisis permitió comparar la calidad de resolución en ambos cristales con respecto a la densidad electrónica para cada uno de los átomos representado en color azul como se muestra en la escala, aquellos átomos con menores inconsistencias en cuanto a la distribución de densidad electrónica. Como se puede observar en la Figura 10 inciso (a) la variación en unas décimas en la resolución del cristal puede afectar de manera significativa la calidad de los cristales. Esta revisión visual se llevó a cabo con cada con cada uno de los cristales de los grupos mencionados anteriormente. Cabe mencionar que esta herramienta permitió tener una revisión visual en un tiempo menor. Así mismo, las puntuaciones de EDIA son utilizadas en química computacional y médica para la validación de modelos y el desarrollo de métodos en el diseño molecular asistido por computadora. Una vez obtenido los cristales de mayor calidad, se continuó con la selección con base en las características del ligando como: estructura, tamaño, modo de interacción y selectividad.

Encontrando que, para el modo de interacción, el ligando endógeno presenta un modo de interacción similar al de los oxicams; sin embargo, esta región fue diferente a los AINEs como: ibuprofeno y celecoxib. Por esta razón, se decidió eliminar este cristal del grupo de estudio e incorporar ambos cristales de COXs con el ligando indometacina a nuestra selección, por ser uno de los AINEs selectivos a COX-2 y así formar parte de los controles en nuestro modelo computacional.

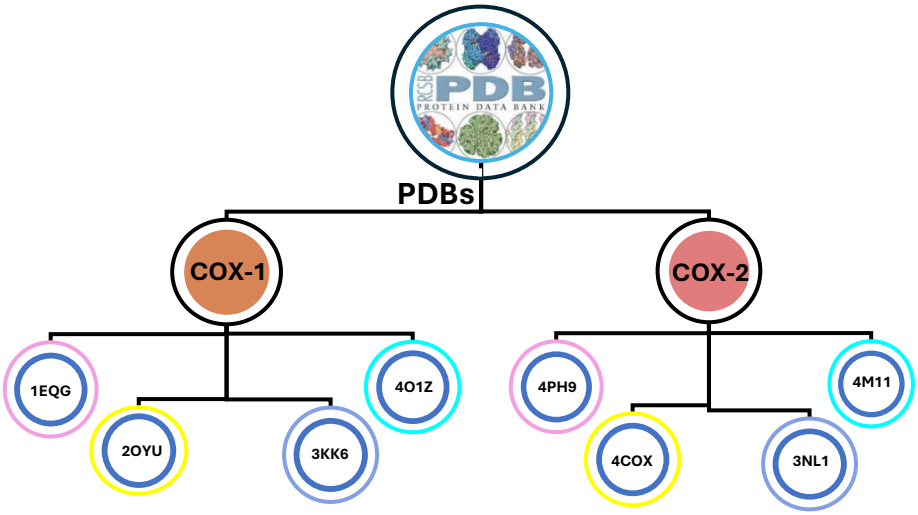


Figura 11. Selección final de cristales a partir del modelo computacional.

Por consiguiente, el modelo de estudio quedo integrado por ocho cristales finales como se muestra en la Figura 11. Donde, para cada una de las COXs fueron seleccionados cuatros cristales con los siguientes ligandos: ibuprofeno, indometacina, celecoxib y meloxicam.

4.3. Recopilación de información para la base de datos.

Como siguiente paso, se continuó con la búsqueda de los valores de IC_{50} descritos para los AINEs presentes en los cristales seleccionados en la base de datos ChEMBL[19] para ambas COXs; así mismo, se incorporaron los siguientes AINEs: flurbiprofeno,[20] diclofenaco,[21] rofecoxib,[22] nimesulida,[23] como compuestos participantes en la validación estructural y energética de nuestro modelo, dado el conocimiento de su modo de interacción y la selectividad que presentan sobre las COXs. Además, se encontraron en la literatura cincuenta compuestos con actividad biológica antiinflamatoria evaluados en modelos *in vitro*; sin embargo, de estos compuestos solo trece fueron seleccionados, dado que poseían ambos valores de IC_{50} sobre las COXs; compuestos que nos ayudarían a evaluar el poder predictivo de nuestro modelo (Figura 12).

---

[19] Mendez, D.; Gaulton, A.; Bento, A. P.; Chambers, J.; De Veij, M., Félix, E.; Magariños, M.; Mosquera, J. F.; Mutowo, P.; Gordillo-Marañón, M.; Hunter, F.; Junco, L.; Mugumbate, G.; Rodriguez-Lopez, M.; Atkinson, F.; Bosc, N.; Radoux, C. J.; Segura-Cabrera, A.; Hersey, A.; Leach, A. *Nucleic. Acids. Res.* **2019**, *47*, D930-D940.

[20] Ehrman, T. M.; Barlow, D. J.; Hylands, P. J. *Bioorg. Med. Chem.* **2010,** *18*, 2204-2218.

[21] Ju, Z.; Su, M.; Hong, J.; La Kim, E.; Moon, H. R.; Chung, H. Y.; Jung, J. H. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *180*, 86-98.

[22] Eren, G.; Ünlü, S.; Nuñez, M. T.; Labeaga, L.; Ledo, F.; Entrena, A.; Banoglu, E.; Constantino, G.; ¸Sahin, M. F. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**,*18*, 6367-6376.

[23] Yamamoto, Y.; Hisa, T.; Arai, J.; Saito, Y.; Yamamoto, F.; Mukai, T.; Ohshima, T.; Maeda, M.; Ohkubo, Y. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 6807-6814.

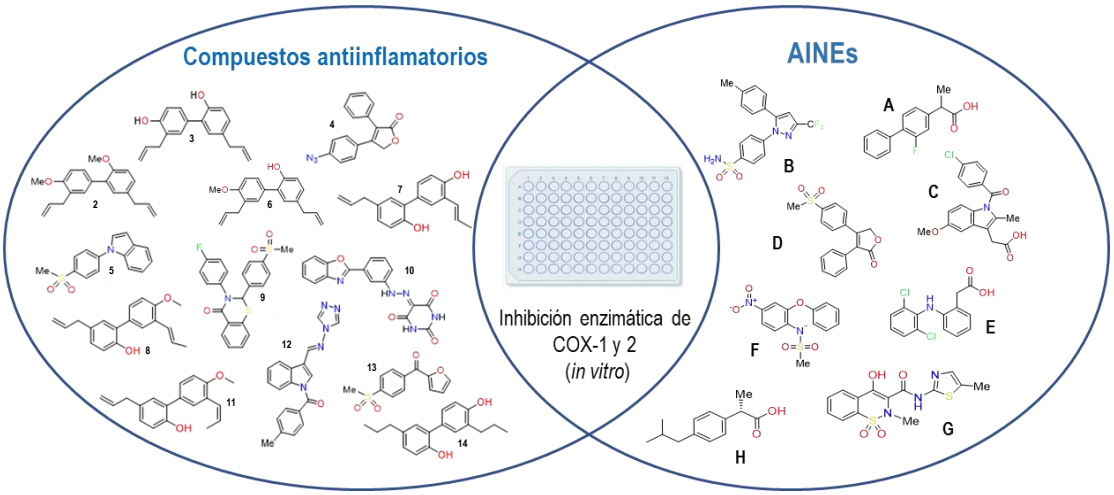


Figura 12. AINEs y compuestos antiinflamatorios utilizados en el modelo computacional. flurbiprofeno (A), celecoxib (B), indometacina (C), rofecoxib (D), diclofenaco (E), nimesulida (F), meloxicam (G) e ibuprofeno (H).

Dentro de los trece compuestos activos; se buscó tener una diversidad estructural que presentará un reto en nuestro modelo y así, evaluar sí aún con esta variable se podría establecer una correlación entre los datos establecidos por el modelo con los valores de actividad biológica descritos. Dentro de los criterios utilizados para la elección de estos compuestos se buscó que mantuvieran al menos dos anillos aromáticos dentro de la estructura y con un peso <500 KDa.

4.3.1 Análisis exhaustivo de los cristales seleccionados para el modelo establecido.

4.3.1.1 Cristales de COX-1: 1EQG, 2OYU, 3KK6 y 4O1Z.

Continuando con la elaboración del modelo, se tenían seleccionados los cristales y estructuras de los compuestos que formarían parte de la validación estructural y energética. Por ello, el siguiente paso consistió en la preparación y análisis de los cristales seleccionados para COX-1. En la Figura 13, se muestra el modo de interacción de los ligandos: ibuprofeno, indometacina, celecoxib y meloxicam en el sitio activo de la enzima, así como también se analizó el tamaño del ligando, la forma y características hidrofóbicas relacionadas a la cavidad donde se encontraban estos ligandos posicionados espacialmente.

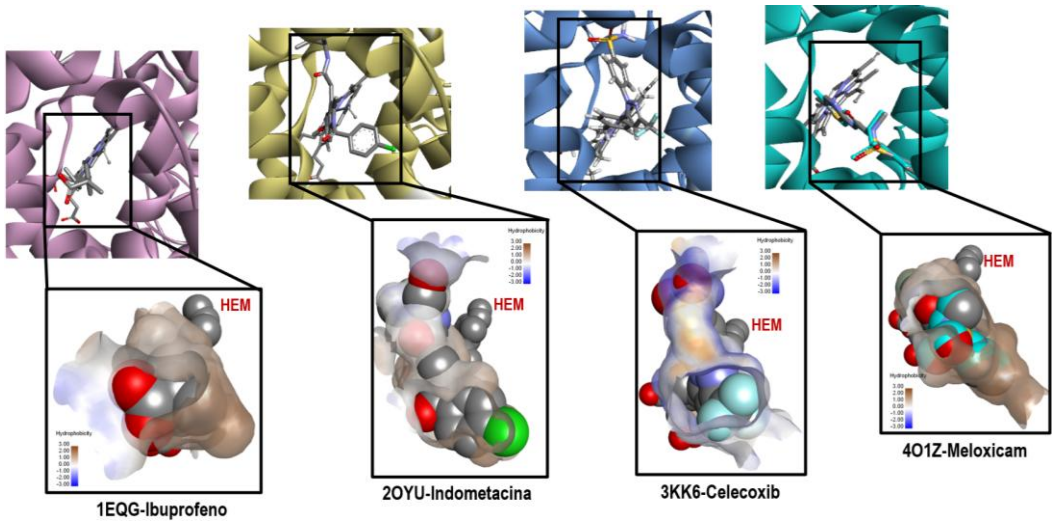


Figura 13. Comparación de las cavidades en los cuatro cristales de COX-1 con diferentes ligandos.

Al comparar los diferentes modos de unión de los AINEs, se encontraron diferencias importantes en cada sistema, dentro de las que se destacan: Ibuprofen (1EQG), se observó una distribución adecuada con respecto al tamaño sobre la cavidad de COX-1, donde el grupo hidrofílico (anillo aromático) se encuentra situado frente al grupo HEM y la parte hidrofóbica (ácido carboxílico) en la parte posterior en un ambiente más hidrofílico como es el caso para los AINEs derivados del ácido propiónico; mientras tanto, indometacina (2OYU) mostró un modo de interacción diferente al esperado para los derivados del ácido acético, esperando que el ácido carboxílico se posicionará en la sección más hidrofílica de la cavidad; sin embargo, la presencia de un sustituyente unido a este grupo llevó a la formación del grupo α-etill-etanolamida modificando la posición en el espacio del ligando; observando al grupo metoxilo unido al anillo de indol con orientación al grupo HEM, diferenciándose al modo de interacción conocido, ya que en esta posición se encontraría el anillo de *p*-clorobenceno. Mientras, que el celecoxib (3KK6) al ser un AINEs de tipo selectivo a COX-2, presenta un acomodo tipo C como los COXIBs sobre la cavidad, diferente al ibuprofeno, además de ocupar un mayor espacio y la aparición de un bolsillo hidrofílico debido a la presencia del grupo sulfonamida. Finalmente, el caso del meloxicam (4O1Z) nos muestra un modo de interacción diferente a los antes mencionados, siendo de gran importancia la aparición de un nuevo bolsillo de tipo hidrofóbico en el sitio de unión, donde se alberga el anillo de benzotiazina característico de los derivados de ácidos enólicos (Oxicams).

En resumen, de los diferentes modos de unión analizados para cada AINE, se destaca la importancia que representan las propiedades químicas del ligando al momento de interactuar con el sitio activo de COX, ya que, aunque el ambiente químico en el sitio de unión es el mismo dado los α-aminoácidos presentes; la diferencia de tamaño, estructura e hidrofobicidad en los compuestos son determinantes

al momento de la interacción. Reafirmando así, la importancia en la selección de los cuatro cristales con sus correspondientes ligandos para la construcción del modelo predictivo.

4.3.1.2. Cristales de COX-2: 4PH9, 4COX, 3LN1, 4M11.

Este mismo procedimiento de preparación y análisis se llevó a cabo con los cristales de COX-2, en la Figura 14 se muestra el modo de interacción de los ligandos: ibuprofeno (4PH9), indometacina (4COX), celecoxib (3LN1) y meloxicam (4M11) en el sitio activo de la enzima. Realizamos el análisis sobre el ligando: tamaño, la forma y características hidrofóbicas, así como los residuos presentes en la cavidad donde se encuentran los ligandos posicionados espacialmente.

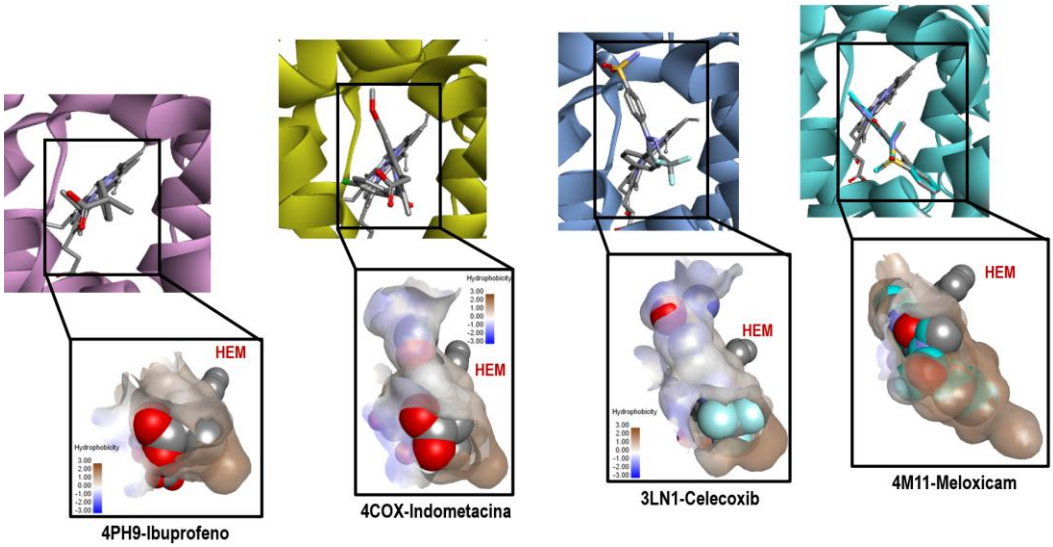


Figura 14. Comparación de las cavidades en los cuatro cristales de COX-2 con diferentes ligandos.

Como se puede observar en la Figura 14, los modos de unión de ibuprofeno, celecoxib y meloxicam mantienen gran similitud al compararse con COX-1; sin embargo, el caso de la indometacina es totalmente diferente, dado que para el cristal PDB: 4COX, solo es la estructura del AINE sin ningún fragmento que modifique la interacción con la enzima. Donde el grupo carboxílico se encuentra orientado al segmento con mayor hidrofilia posterior al grupo HEM, caso opuesto para el anillo de *p*-clorobenceno posicionándose frente al grupo HEM segmento de carácter hidrofóbico. Teniendo así, el análisis completo de los modos de interacción de estos AINEs se decidió continuar con el siguiente paso.

4.4. Experimento de acoplamiento molecular para la validación del Modelo de Predicción Computacional.

Se llevó a cabo la validación estructural para cada uno de los ligandos, los cuales fueron construidos de acuerdo con su estado de protonación predominante a pH fisiológico (neutra, anión o catión), se optimizo la geometría y finalmente se agregaron las cargas correspondientes. De igual manera, se realizó la limpieza de los cristales (remoción de moléculas de agua, ligados, moléculas co-cristalizadas). A continuación, se explican los resultados obtenidos de los experimentos, así como el análisis de la reproducibilidad de los complejos Ligando-Enzima, para cada uno de los cristales seleccionados.

4.4.1. Validación estructural y energética del Modelo de Predicción Computacional.

4.4.1.1. Validación estructural de modelo de Predicción Computacional.

Inicialmente, se analizaron las poses obtenidas a partir del experimento de acoplamiento molecular para los complejos ligando-enzima en los cristales de COX-1 (1EQG, 2OYU, 3KK6 y 4O1Z). En la siguiente imagen se muestra el modo de interacción obtenido del ibuprofeno dentro de la cavidad de COX-1 (Figura 15).

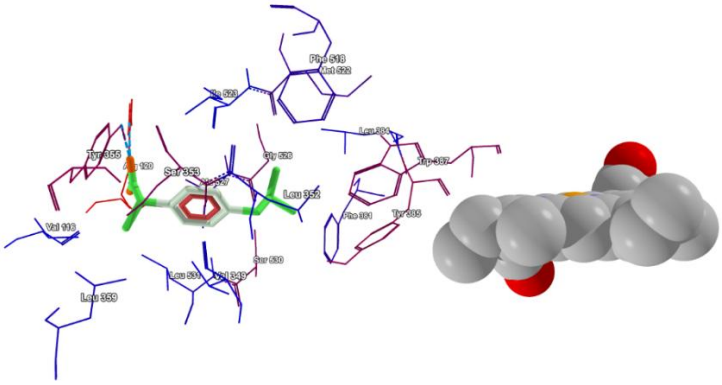


Figura 15. Modo de interacción del ibuprofeno en 1EQG (COX-1).

Dando pauta con la inspección visual del resultado sobre el cristal 1EQG, se observó una alta reproducibilidad de la posee obtenida, la orientación del grupo isopropilo en dirección al grupo HEM y el grupo carboxílico cercano al residuo de Tyr355. Además, la presencia de los residuos de α-aminoácidos característicos como: Arg120, Ser530, Tyr385 e Ile523; Finalmente, la orientación de manera horizontal en donde se encuentra el grupo polar de lado izquierdo y el grupo no polar de lado derecho fue lo esperado y tal cual se pudo corroborar con la pose del cristal 1EQG.

Por otra parte, en la siguiente imagen se muestra el modo de interacción obtenido de la indometacina dentro de la cavidad de COX-1 (Figura 16).

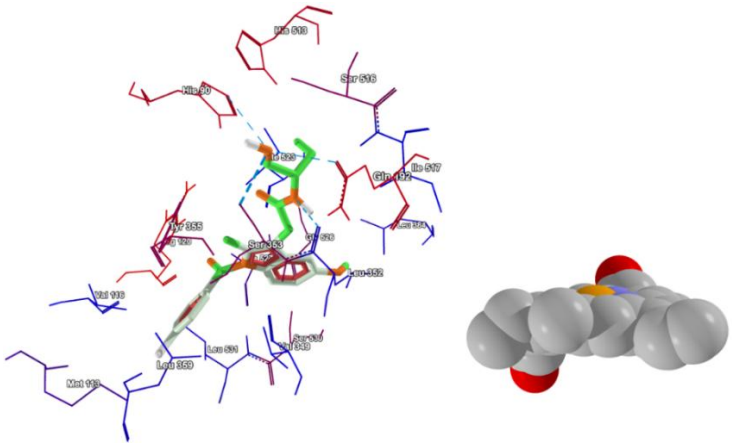


Figura 16. Modo de interacción de indometacina en 2OYU (COX-1).

En el caso de la indometacina, se encontró una orientación semidiagonal dentro de la cavidad en donde, el anillo de *p*-clorobencilo se posicionó en la sección inferior izquierda cerca a los residuos de Tyr355 y el fragmento del biciclo cerca de los residuos de Ser, Val y Leu correspondintes. El acomodo del fragmento superior en la cavidad no es parte fundamental del ligando, por lo cual se decidió no detallar esa sección.

Para el caso del inhibidor de tipo selectivo como celecoxib, mostró una forma estructural (pose) caracteristica en tipo C dentro de la cavidad; sin embargo, al tener diferentes residuos de α-aminoácidos, la COX-1 sobre la parte superior de la cavidad unicamente se obervó una interación de tipo enlace de hidrógeno entre el grupo sulfonamida y el residuo de Ser516 y la presencia de los residuos de His, Phe, Ile y Tyr presentan gran similitud con el ligando co-cristalizado al igual que la forma estrucutral dentro de la cavidad (Figura 17). Es por ello, que se decidió aceptar este resultado como reproducible con respecto a los datos experimentales del cristal.

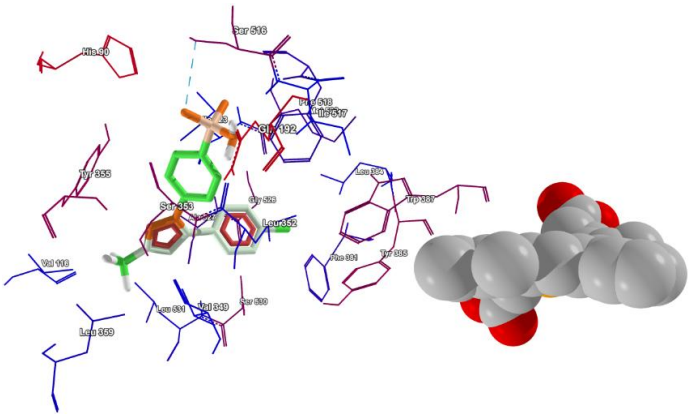


Figura 17. Modo de interacción del celecoxib en 3KK6 (COX-1).

Finalmente, para el bloque de las COX-1 el último ligando analizado fue el meloxicam, en donde este adoptó una forma (pose) estructural diagonal sobre la parte inferior de la cavidad con una orientación del fragmento no polar hacia los residuos de Leu359, Val114, Val 349 e Ile345; no obstante, el grupo sulfonamida dentro del anillo se orientó hacia la Arg120, En el caso del anillo de tiazol se observó una orientación frente al grupo HEM, Trp387; siendo este el grupo polar (Figura 18).

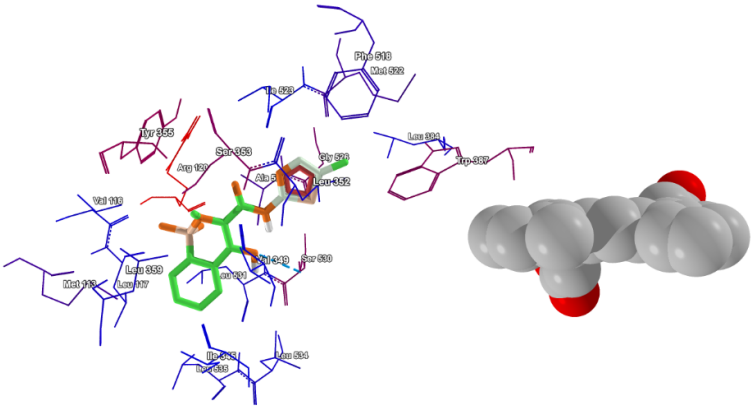


Figura 18. Modo de interacción del meloxicam en 4O1Z (COX-1).

La distribución estructural (pose) obtenida coincidió con el observado con el complejo ligando-enzima del cristal de referencia, avalando así la inspección visual.

Una vez finalizado el análisis de los resultados del acoplamiento en los diferentes cristales de COX-1, se continuó con los cuatro cristales de las COX-2. En la siguiente imagen (Figura 19), se muestra la representación de la distribución estructural (pose) de forma horizontal del ibuprofeno en la cavidad de COX-2, donde existe una clara orientación del grupo carboxílico hacia Arg121 como el fragmento polar y el grupo isopropilo frente al grupo HEM, siendo el fragmento no polar. Este resultado está de acuerdo con la forma estructural del ibuprofeno en el cristal 4PH9.

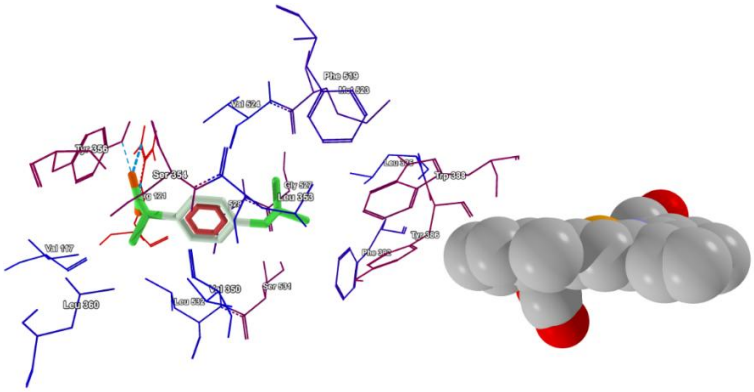


Figura 19. Modo de interacción del ibuprofeno en 4PH9 (COX-2).

Continuando con la en análisis estructural obtenida del ligando indometacina (pose), se observó la misma forma estructural presente en el cristal (4COX), con una orientación del anillo de *p*-clorobencilo de frente al grupo HEM, el grupo carboxílico orientado hacia los residuos de los α-aminoácidos Tyr355 y Arg120; observándose también la presencia de los residuos de Ser530, Tyr385 y Val523; siendo así la pose estructural similar a la del cristal de referencia (figura 20).

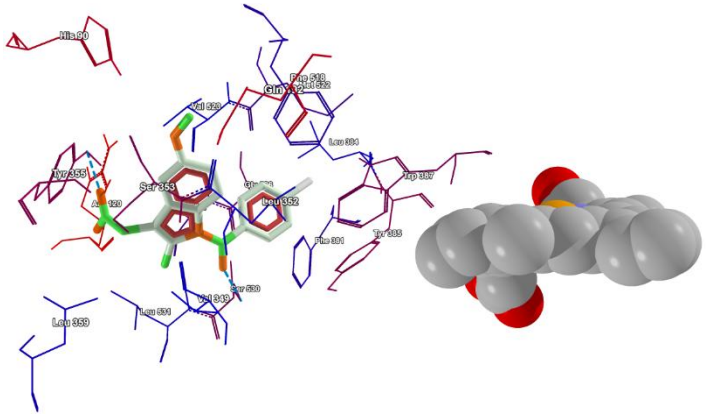


Figura 20. Modo de interacción de indometacina en 4COX (COX-2).

El caso de celecoxib, los resultados estructurales obtenidos fueron los esperados al ser un fármaco selectivo para COX-2; la distribución dentro de la cavidad del cristal 3LN1 (pose) fue más optima y se logró identificar más de una interacción del tipo enlace de hidrógeno entre la sulfonamida y los siguientes residuos: Arg499, Leu338, Gnl178 y Ser339 presentes en el sitio superior de la cavidad, además de observar la distribución estructural tipo C característicos de la familia de los COXIBs. Por otra parte, el anillo de *p*-metilbenceno se posicionó como un fragmento no polar en dirección al grupo HEM. Otro de los grupos importantes en la estructura de este ligando es el CF_3, el cual está cercano al α-aminoácido Arg106. La presencia de estas interacciones, además de la posición dentro de la

cavidad de este ligando como se muestra en estos resultados (Figura 21), proporcionó una alta reproducibilidad de lo observado en comparación con el cristal de referencia.

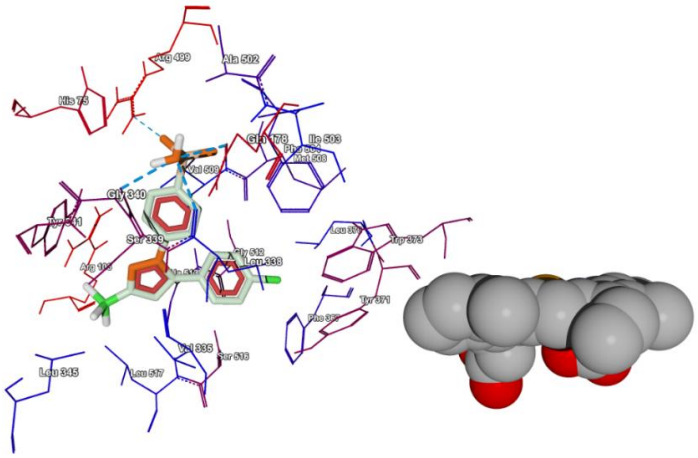


Figura 21. Modo de interacción del celecoxib en 3LN1 (COX-2).

A continuación, en la imagen (Figura 22) se muestra la pose experimental obtenida para el meloxicam, observando que, el anillo bicíclico se posicionó dentro de la cavidad sección izquierda (no polar) cerca de los siguientes α-aminoácidos: Met113, Leu359, Leu157, Val116, Ile345 y Leu534. El anillo de tiazol frente al grupo HEM y próximo de los residuos de Val523, Leu352, Ala527 y Ser353.

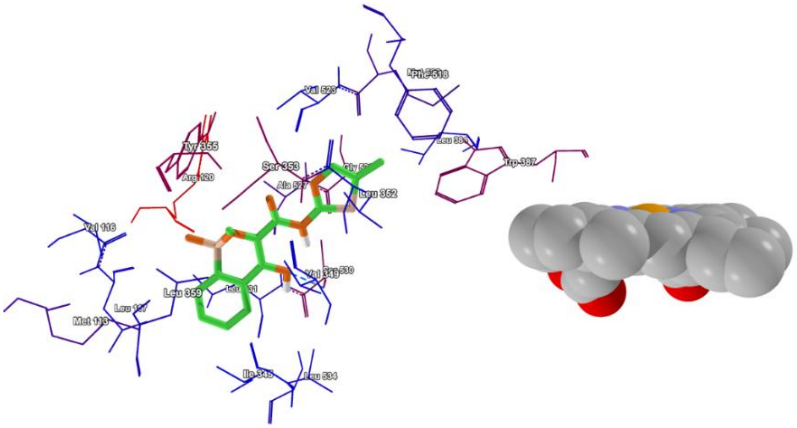


Figura 22. Modo de interacción del meloxicam en 4M11 (COX-2).

Finalmente, la validación del modelo fue evaluada con relación a la reproducibilidad de la pose original del ligando en comparación con la obtenida después del experimento de acoplamiento molecular, teniendo como criterio de similitud el valor de RMSD (Root Mean Square Deviation). Usualmente este valor se utiliza para las validaciones de experimentos de docking. Si el experimento logra reproducir una pose similar al ligando con respecto a la configuración biológicamente activa que se encuentra en el cristal del complejo, se puede confiar en la reproducibilidad de nuestro experimento de acoplamiento

molecular. En este caso un valor menor de RMSD con respecto a la pose de unión original (cristal de referencia), es bueno (valores ≤ 2 Å, son ideales, o incluso mejor cuando son ≤ 1.5 Å). Estos valores representan una buena reproducibilidad de la pose original. Trabajos que reportan valores de RMSD ≥ 3 Å son cuestionados dentro del área.

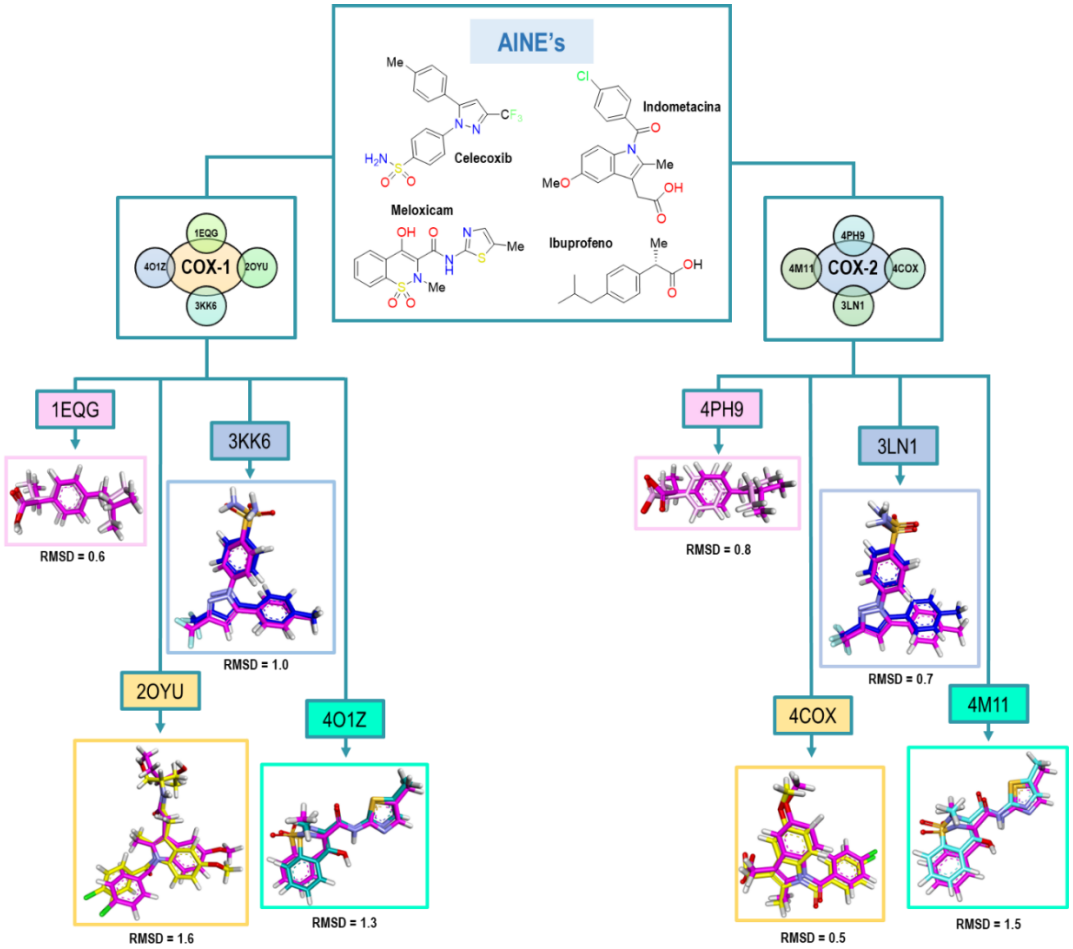


Figura 23. Los valores de RMSD obtenidos en la validación estructural del modelo computacional con AINEs donde la pose original del compuesto es color magenta en todos los casos. Colores de las poses obtenidas dentro de la validación de los ligandos después del experimento como se muestras: ibuprofeno (rosa), indometacina (amarillo), celecoxib (azul) y meloxicam (verde agua).

En este trabajo, se calcularon los valores de RMSD para cada uno de los complejos como se muestran en la Figura 23. El resultado obtenido para los ligandos ibuprofeno, indometacina, celecoxib y meloxicam, se encuentra en un rango <1.6 Å, siendo en el cristal de ibuprofeno donde la reproducibilidad obtenida se valora como excelente, al observar la comparación de la orientación del grupo carboxílico y el sustituyente propilo en el anillo aromático con respecto al compuesto original. Teniendo que el valor de RMSD más alto obtenido fue en el cristal 2OYU, el cual al no ser solamente

la estructura de la indometacina como ligando, si no que, posee un sustituyente en el grupo carboxílico, el ligando cocristalizado para esta enzima de COX-1 enlazaba una amida, comparando ambas estructuras se observó la posición del grupo hidroxilo en sitios espaciales diferentes, lo cual puede influenciar en la reproducibilidad de la pose original; a pesar de esta variable el valor de RMSD cumple con los criterios de aceptabilidad. Para el caso de la estructura del celecoxib se obtuvo un valor de 1.0 Å, ambas poses son bastante similares, aunque la pose obtenida en el experimento de acoplamiento molecular la sulfonamida se encuentra con un pequeño giro de 90° hacia la derecha al compararlo con la pose original. Finalmente, en el cristal (4O1Z) teniendo como ligando al meloxicam, se pudo observar que contemplaba dos diferentes poses para el ligando: la primera, presentaba una orientación paralela al átomo de azufre en el anillo de tiazol al carbonilo de la amida y la segunda el átomo de oxígeno ocupando esta posición. No obstante, se decidió tomar la primera pose como la activa biológicamente, esto de acuerdo con lo reportando por Meanweel y col.[24] que mediante varios analices concluyeron que la interacción del átomo de azufre del anillo de tiazol con el oxígeno de un grupo carbonilo mantienen una distancia más cercana entre sus esferas de Van der Waals indicativo de una interacción producida que conduce a una disposición coplanar de la amida y el anillo de tiazol en comparación con la segunda pose mencionada anteriormente.

Acerca de los cristales de las COX-2, se alcanzaron mejores valores para RMSD en el caso de la indometacina y celecoxib. Se propone que esto se debe a la mejora en el ligando cocristalizado de indometacina, dado que ahora la estructura no contenía ningún sustituyente adicional, proporcionando así la reproducibilidad de la pose original sobre la orientación de todos los grupos dentro del compuesto. Al mismo tiempo, la pose del ligando celecoxib obtenida después del experimento mantuvo la orientación exacta de los grupos con respecto a la pose original. En definitiva, la alta similitud de las poses obtenidas en el experimento en comparación con la pose original y los valores de RMSD que estas presentaron en los complejos de ambas COXs; por lo tanto, se puede reafirmar que el modelo de validación cumple con todos los criterios de aceptabilidad.

4.4.1.2. Validación energética del modelo computacional.

No obstante, la validación estructural no es suficiente para decir que el modelo presenta una alta confiabilidad y reproducibilidad. Por esta razón, se realizó la validación energética; mediante el acoplamiento molecular de cada uno de los AINEs sobre los cuatro cristales de COX-1 y COX-2, al

[24] Beno, B. R.; Yeung, K. S.; Bartberger, M. D.; Pennington, L. D.; Meanwell, N. A. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 4383-4438.

mismo tiempo se decidió sumar a esta validación energética otros cuatro AINEs: flurbiprofeno, nimesulida, diclofenaco y rofecoxib, al conocer los valores de IC_{50} permitió evaluar la predicción de la selectividad comparando el valor de energía obtenido en ambas isoformas. En la Figura 24, se muestra el análisis de dos AINEs (no selectivo y selectivo) sobre ambas isoformas de COX, además se muestran los valores energéticos obtenidos para cada uno de estos.

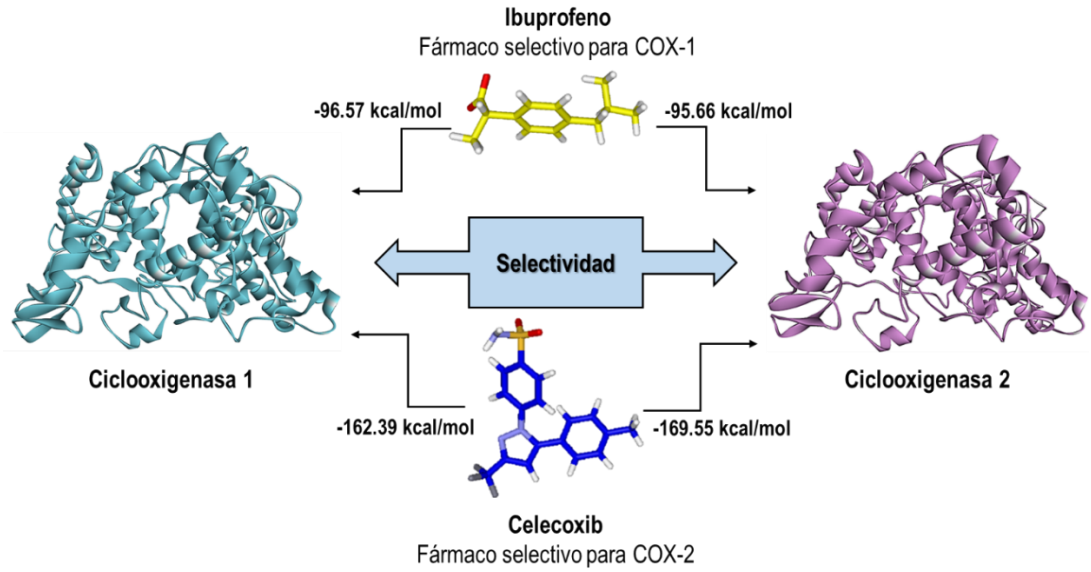


Figura 24. Ejemplos de validación energética del modelo computacional con ibuprofeno (AINE no selectivo) sobre los cristales 1EQG (COX-1) y 4PH9 (COX-2) al igual que celecoxib (AINE selectivo) sobre los cristales 3KK6 (COX-1) y 4PH9 (COX-2).

Los resultados energéticos obtenidos para el ligando ibuprofeno (AINE no selectivo) mostraron un valor de -96.57 Kcal/mol para el complejo ligando-enzima, así como el valor de -95.66 Kcal/mol para el caso del complejo con el cristal de COX-2 (4PH9); mostró valores energéticos similares para ambas isoformas, aunque más negativo hacia COX-1. Por lo consiguiente, una ligera selectividad hacia estos valores que correlacionan con la selectividad descrita en la literatura. Además, otro de los factores que se incluyeron como de vital importancia estaba relacionado al modo de interacción del complejo formado, el cual se abordará más adelante. También se muestra como dentro de aspecto de validación energética se incorporó al celecoxib como control positivo para selectividad hacia COX-2 (AINE selectivo), los valores energéticos mostraron un valor más negativo hacía COX-2 con -169.55 Kcal/mol y de -162.39 Kcal/mol frente a COX-1. Mostrando que, esta correlación no se obtuvo en los cuatros cristales de cada una de las COXs. Por lo cual, se decidió realizar una inspección visual más profunda en donde se compararon los valores energéticos con el modo de interacción.

En la Figura 25, se muestran los cuatro modos de unión del ibuprofeno en los diferentes cristales (ibuprofeno, indometacina, celecoxib y meloxicam), los valores energéticos obtenidos después de llevar a cabo el acoplamiento molecular de cada uno de estos y la forma de la cavidad adoptada después de este experimento, estos datos se muestran en una perspectiva de comparación, teniendo en la fila superior los resultados para los cristales en COX-1 y en la fila inferior los resultados para los cristales de COX-2.

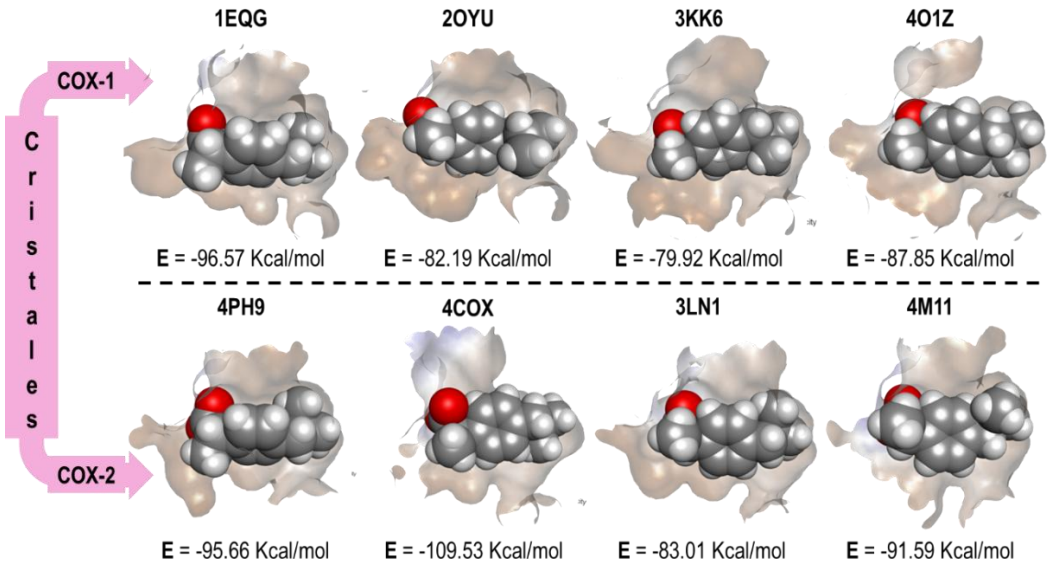


Figura 25. Diferentes modos de unión y valores energéticos de ibuprofeno (AINE no selectivo) en diferentes cristales de COX-1 y COX-2.

Como se muestra la figura 25, se encuentran diferencias en el modo de interacción a pesar de ser todos cristales de COXs; siendo los cristales 1EQG y 4PH9 nuestra referencia del modo de interacción de ibuprofeno en COX-1 y COX-2, así como la forma de la cavidad en ambos cristales, permitiendo la reproducibilidad de los modos de unión y respetando las orientaciones de los sustituyentes (grupos carboxílico y propilo) al tener la misma orientación espacial; no obstante, en los otros tres cristales (indometacina, celecoxib y meloxicam) se notó la influencia considerablemente: giro del fenilo desproporcional en la pose obtenida después de los experimentos del acoplamiento molecular al igual que la posición del grupo carboxílico en la estructura; afectando así, los valores energéticos (Kcal/mol) obtenidos en los modos de unión, donde solo en dos de ellos se identificó una correlación energética *vs* valor de selectividad encontrado para este AINE. En los cristales donde se llevó a cabo este suceso fueron en los de referencia 1EQG y 4PH9. En los otros tres casos, no se encontró esta correlación energía *vs* selectividad para la estructura del ibuprofeno.

Por otra parte, se llevó a cabo la omisión de la comparativa del ligando indometacina como la descrita anteriormente, ya que en este caso la estructura cocristalizada era diferente en COX-1 y COX-2, por lo que, no se podía hacer este mismo análisis ya que mantienen un modo de interacción diferente, así como la orientación espacial dentro de los cristales de referencia (2OYU y 4COX).

Para el caso de los cristales de referencia del celecoxib, en la Figura 26 se representan sus cuatro modos de unión en los cristales (ibuprofeno, indometacina, celecoxib y meloxicam), los valores energéticos obtenidos después de llevar a cabo el acoplamiento molecular de cada uno de estos y la forma de la cavidad adoptada después de este experimento desde una perspectiva comparativa, teniendo en la fila superior los resultados para los cristales en COX-1 y en la fila inferior los resultados para los cristales de COX-2.

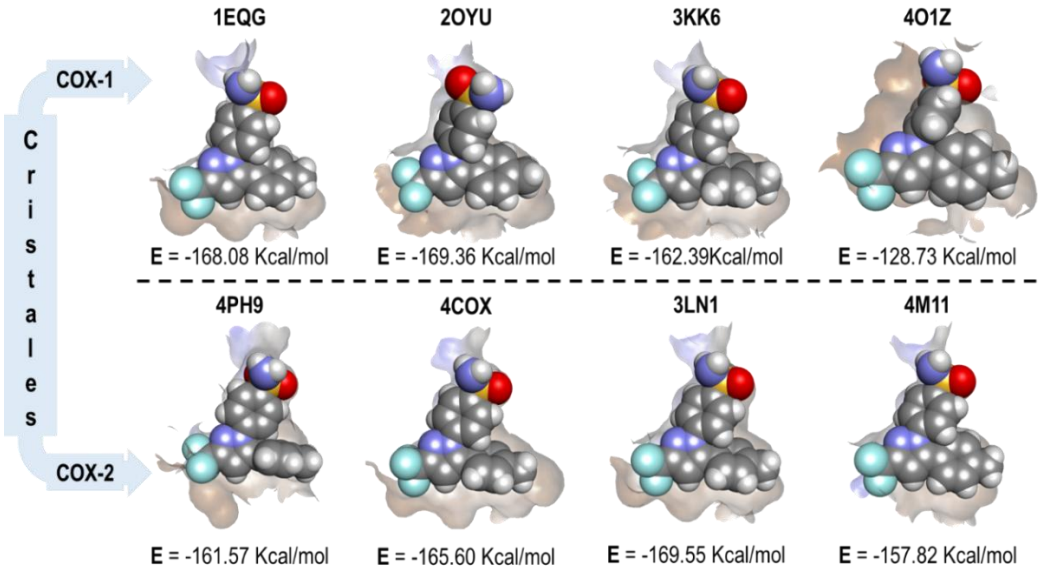


Figura 26. Diferentes modos de unión y valores energéticos de celecoxib (AINE selectivo) en diferentes cristales de COX-1 y COX-2

Como se muestra en la Figura 26, se puede observar a primera vista el tamaño en las cavidades de los cuatro cristales afectando así el modo de interacción del celecoxib en cada uno de estos a pesar de ser todos cristales de COXs; teniendo como referencia los cristales 3KK6 (COX-1) y 3LN1 (COX-2) con respecto al modo de interacción de celecoxib. En los cuatro cristales para COX-1 (fila superior) se encuentra una orientación espacial similar a excepción del cristal 2OYU (indometacina) donde el oxígeno de la sulfonamida está en posición opuesta con respecto al de referencia, además de los diferentes tamaños de las cavidades; siendo la del cristal de ibuprofeno de las más pequeñas tanto para COX-1 como COX-2. Una vez analizados los modos de unión y encontrando cierta analogía entre

estos con el de referencia, se evaluó la reproducibilidad de la energía respecto con la selectividad del celecoxib por COX-2, en donde únicamente en dos pares de cristales se llevó a cabo tanto la reproducibilidad estructural como energética, estos fueron: 3KK6 (COX-1) con 3LN1 (COX-2) cristales pertenecientes al ligando celecoxib (referencia) y el par de 4O1Z (COX-1) con 4M11 (COX-2) correspondientes al ligando cocristalizado meloxicam.

Finalmente, el análisis estructural y energético de meloxicam se basó en sus cristales de referencia 4O1Z (COX-1) y 4M11 (COX-2), en la Figura 27 se representan los cuatro modos de unión en los cristales (ibuprofeno, indometacina, celecoxib y meloxicam), los valores energéticos obtenidos después de llevar a cabo el acoplamiento molecular de cada uno de estos y la forma de la cavidad adoptada fueron abordados desde una perspectiva comparativa, teniendo en la fila superior los resultados para los cristales en COX-1 y en la fila inferior los resultados para los cristales de COX-2.

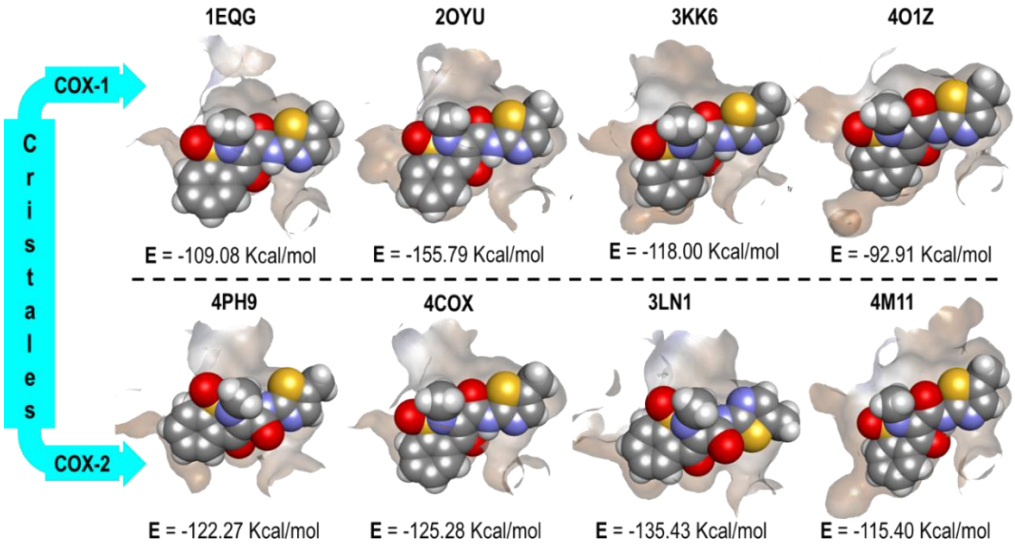


Figura 27. Diferentes modos de unión y valores energéticos de meloxicam (AINE no selectivo) en diferentes cristales de COX-1 y COX-2

Como se muestra en la Figura 27, la estructura del meloxicam es bastante grande dificultándose la forma de interactuar con las cavidades de los cristales 1EQG y 4PH9 ambos correspondientes al ligando ibuprofeno, donde el grupo carbonilo de la amida se encuentra en disposiciones diferentes en ambos cristales, además del anillo de benceno del biciclo se encuentra fuera de la cavidad en el cristal 1EQG y el grupo metilo unido al anillo de tiazol (sitio activo) en el cristal 4PH9, mostrando lo pequeña que es esta cavidad para albergar un ligando de esta magnitud, reflejando así un modo de interacción diferente al de referencia; sin embargo, los valores energéticos mantiene la reproducibilidad de acuerdo con la selectividad del Oxicam. Caso opuesto sucedió con los cristales 2OYU y 4COX

pertenecientes a la indometacina, donde cabe destacar que 2OYU fue cocristalizado con un ligando estructuralmente mayor a la indometacina denotando así una cavidad más grande, lo que permitió el acomodo del ligando en una pose similar al de referencia, para el caso de la pose obtenida en el cristal 4COX fue similar, aunque en la Figura 27 se muestra claramente que el anillo de benceno queda fuera del sitio de unión, estos factores se vieron reflejados al momento de comparar los valores energéticos y observar que estos no presentaban correlación alguna con la selectividad descrita para este ligando. Igualmente, se analizaron las poses obtenidas para los cristales 3KK6 y 3LN1 correspondientes al celecoxib, destacando que al ser un ligando de mayor tamaño, la cavidad que estos cristales contienen puede albergar casi de una manera perfecta al meloxicam, de no ser por aquel bolsillo hidrofóbico en la sección inferior izquierda que presentan los cristales de referencia que permite el acomodo perfecto del anillo de benceno unido al anillo de tiazina, se puede encontrar el giro de 180° de la amida unida al anillo de tiazol en la pose obtenida en el cristal 3LN1, en cuanto a los valores energético si hubo una reproducibilidad adecuada en relación a la selectividad. Finalmente, la correlación adecuada entre la pose y la energía obtenida se visualizó en los cristales 4O1Z y 4M11 (referencia).

El análisis junto con la inspección visual de estos experimentos permitió comprender que a pesar de utilizar un cristal de COX-1 al momento de realizar el acoplamiento molecular, se pueden obtener poses y valores energéticos poco creíbles, que van de la mano con la conformación adoptada por la enzima al momento de ser cocristalizada con diferentes ligandos, lo que implica tener una cavidad de un tamaño definido. Propiciando que nuestra enzima (PDB) presente una conformación y tamaño de cavidad ya adecuada a las necesidades estructurales del ligando con el cual se cristalizó, que no necesariamente son equivalentes a la de nuestras estructuras de interés para el experimento.

Una vez analizado los datos estructurales tanto como energéticos de los AINEs de referencia para cada ligando, se decidió llevar a cabo una doble validación que englobara ambos conceptos, así mismo se llevó a cabo la incorporación de cuatro AINEs más al estudio. En la Tabla 2 se presentan los valores energéticos obtenidos para las ocho estructuras, así como los valores del delta energético (ΔE), el cual representa la resta entre la sumatoria de energías para un ligando obtenidas en los cristales de COX-1 menos la sumatoria de energías para un ligando obtenidas en los cristales de COX-2, lo cual arrojó un valor numérico que correlaciona la preferencia o selectividad hacia una de las isoformas de COXs.

Tabla 2. Valores de energía de interacción (Kcal/mol) para AINEs en cada uno de los cristales de ambas isoformas y su delta energético (ΔE).

AINEs/COXs	COX-1				COX-2				$\Delta E = (\overline{X}E_{cox-1}) - (\overline{X}E_{cox-2})$
	1EQG	2OYU	3KK6	4O1Z	4PH9	4COX	3LN1	4M11	
Flurbiprofeno	-104.84	-105.12	-93.58	-110.92	-104.45	-123.05	-103.01	-105.91	-5.00
Indometacina	-155.27	-145.91	-135.67	-152.18	-151.98	-150.60	-146.31	-140.19	-3.29
Ibuprofeno	-96.57	-82.19	-79.92	-87.85	-95.66	-109.53	-83.01	-91.59	-0.91
Nimesulida	-122.59	-122.99	-119.00	-104.48	-114.84	-125.41	-117.58	-109.72	2.42
Celecoxib	-168.08	-169.36	-162.36	-128.73	-161.57	-165.60	-169.55	-157.82	7.15
Diclofenaco	-108.23	-118.20	-106.68	-108.64	-103.98	-110.47	-114.72	-116.44	7.79
Meloxicam	-109.08	-155.79	-118.00	-92.91	-122.27	-125.28	-135.43	-115.40	17.55
Rofecoxib	-139.99	-135.96	-123.10	-105.56	-140.86	-140.42	-144.84	-111.51	21.74

Los valores más negativos para ΔE de los AINEs denotan una correlacionan con la afinidad hacia una de las isoformas de las COXs en este caso, se refiere aquellos que después del experimento en los múltiples cristales al momento de promediarse los valores energéticos y llevar a cabo la diferencia entre los valores obtenidos para COX-1 y para COX-2; mostraron una mayor afinidad hacia COX-1. Por otra parte, los valores que presentan valores positivos se relacionan con una afinidad hacia COX-2.

Por último, con los valores de ΔE de la doble validación, se realizó una comparación utilizando una gráfica de barras (Figura 28), donde por medio de estas se representan de manera descendente los AINEs acorde a la selectividad mostrada para cada isoforma. Donde el eje de las equis representa el valor de ΔE.

Los valores más negativos para ΔE de los AINEs denotan una correlacionan con la afinidad hacia una de las isoformas de las COXs en este caso, se refiere aquellos que después del experimento en los múltiples cristales al momento de promediarse los valores energéticos y llevar a cabo la diferencia entre los valores obtenidos para COX-1 y para COX-2; mostraron una mayor afinidad hacia COX-1. Por otra parte, los valores que presentan valores positivos se relacionan con una afinidad hacia COX-2.

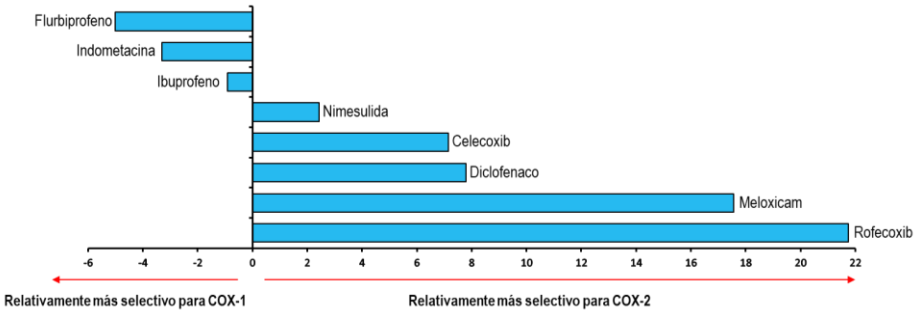


Figura 28. Obtención de la relación de selectividad sobre COX-1 y COX-2 de diferentes AINEs según el modelo computacional.

Los resultados se compararon con los datos descritos en la literatura. En la parte superior con un valor de ΔE de -5.00 Kcal/mol aparece el flurbiprofeno, como el AINE con mayor selectividad a la isoforma COX-1, superando a la indometacina e ibuprofeno que, aunque son selectivos para COX-1, la magnitud es menor. Continuando así con los valores de ΔE positivos, se pudo encontrar a la nimesulida con un valor de 2.42 Kcal/mol, denotando que, el grupo de AINEs es el de menor selectividad a la isoforma de COX-2 dentro del grupo de AINEs del tipo selectivos. Así mismo, los valores de celecoxib con 7.15 Kcal/mol y diclofenaco con 7.79 Kcal/mol muestran una gran similitud. Por último, meloxicam y rofecoxib fueron aquellos con valor más positivos, representando los dos AINEs con mayor selectividad hacia COX-2 de acuerdo con nuestro modelo.

4.4.2. Validación estructural y energética del modelo de predicción.

4.4.2.1. Caso ibuprofeno (1EQG y 4PH9)

Por otro lado, se continuo con los últimos pasos del modelo computacional, para lo cual se decidió evaluar el poder predictivo en diferentes sistemas de compuestos sin un modo de interacción conocido. Para ello, se añadieron nuevos compuestos con valores experimentales de IC_{50} descritos en la literatura (en ambas isoformas de la COX), y se utilizaron las mismas condiciones de los AINEs estudiados anteriormente. Esto fue necesario ya que, basándose en la correlación de la energía E_{int} y los valores IC_{50}, se propuso uno de los cuatro modos de unión ya estudiados. Por lo tanto, se utilizaron 21 compuestos para este tipo de sistema, realizando el experimento de acoplamiento molecular para cada compuesto con cada uno de los cristales (8 PDBs) del modelo. A continuación, se describirá este análisis en ambas isoformas de COXs correspondientes a los ligandos ibuprofeno, indometacina, celecoxib y meloxicam.

En la Figura 29 se muestran las gráficas con los valores de Log $IC_{50\ exp}$ (eje X) y Log $IC_{50\ exp}$ (eje Y), así como la $R^2 = 0.64$ y $R^2 = 0.82$ en ambas isoformas de los cristales para ibuprofeno. Los compuestos

mostrados en los gráficos son aquellos en las que fue posible correlacionar la E_{int} con su IC_{50} experimental obtenidos a partir del modelo matemático que correlacionaba con la E_{int} obtenida a partir del acoplamiento molecular en los cristales 1EQG y 4PH9.

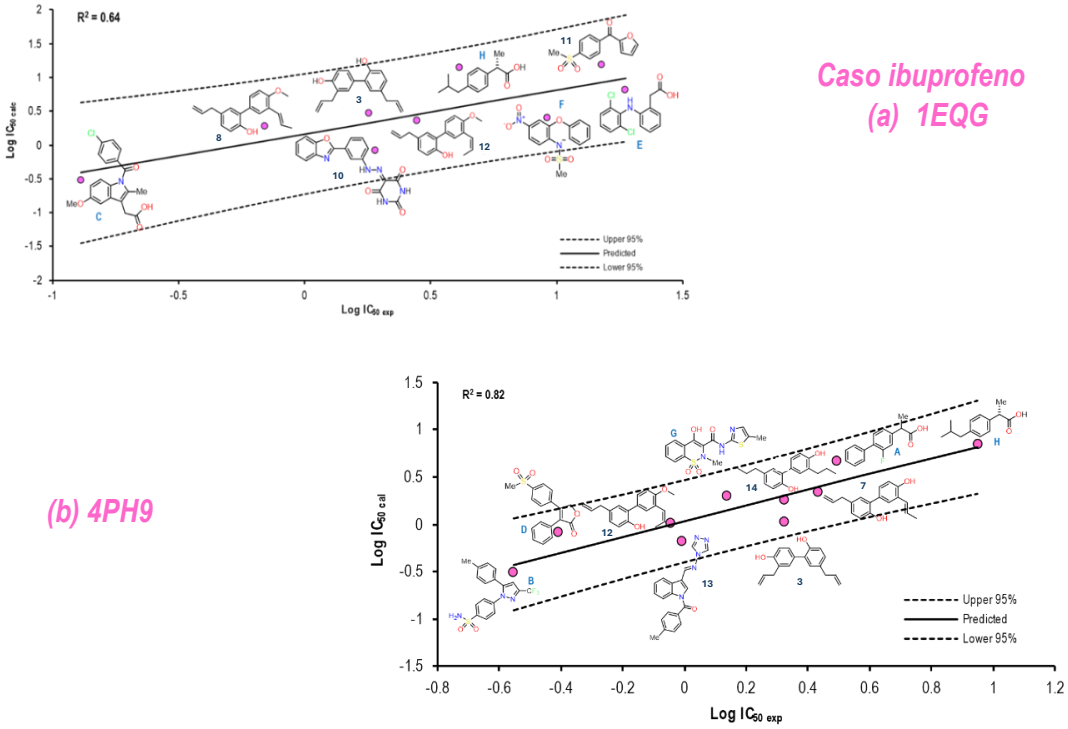


Figura 29. Representación gráfica de Log IC_{50} calc *vs* Log IC_{50} exp. Estructuras 2D de compuestos que encajan en el modelo de COX-1 (1EQG) y COX-2 (4PH9). Las líneas discontinuas muestran el intervalo de confianza basado en la desviación estándar.

Para el cristal 1EQG (Figura 29, (a)) se alcanzó una reproducibilidad de 9 compuestos de 21, observándose principalmente estructuras con dos anillos aromáticos y sólo dos con una diferencia de tamaño considerable, que fueron la indometacina y el compuesto **10.** Sin embargo, el compuesto **8** se observó con una posición más cercana a la línea de predicción en comparación con el ibuprofeno que presenta una mayor distancia respecto a ella. Con relación al análisis sobre el cristal 4PH9, se detectó una estrecha relación entre el tamaño y la forma de la cavidad con los ligandos que se acoplaban en ella. Está con un volumen de cavidad de 228.86 $Å^3$; sin embargo, incluso con el tamaño reducido del ibuprofeno, el volumen de la cavidad en este cristal es mayor dado que pertenece a COX-2, de igual forma se muestra la diferencia entre los α-aminoácidos que forman el sitio de unión. Por lo tanto, los compuestos de mayor volumen tenían mayor acceso sobre el sitio de unión, como el celecoxib y el rofecoxib, con similitud en el modo de interacción. Asimismo, el meloxicam, **13** y el flurbiprofeno se

ajustaron correctamente, y en el caso de los compuestos **3**, **14**, **12** y **7**, se observó un modo de interacción diferente en comparación con los AINEs.

Para analizar con más detalle la relación entre los valores obtenidos de la Figura 30, se decidió examinar el modo de interacción de los 9 ligandos en las cavidades del cristal 1EQG para la COX-1 y 4PH9 para COX-2 (Figura 30, (b)).

(a) *COX-1*

(b) *COX-2*

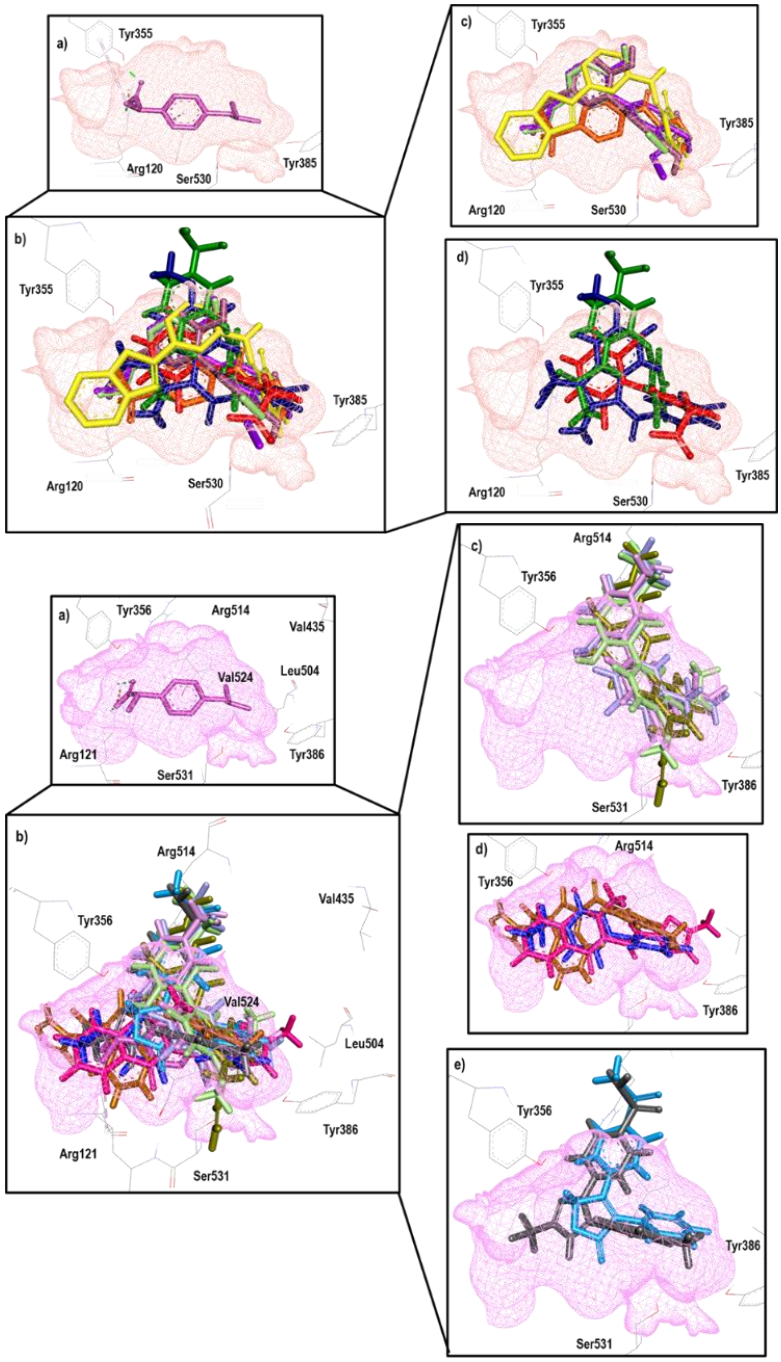


Figura 30. Poses obtenidas a partir del cálculo de acoplamiento molecular sobre los cristales (a) 1EQG y (b) 4PH9 (Ibuprofeno).

Se observo una relación entre el tamaño y la forma de la cavidad con los ligandos que se acoplaban en ella. Para COX-1 del cristal 1EQG tenía un volumen de cavidad de 204.80 $Å^3$, debido al pequeño tamaño del ibuprofeno. Por tanto, esto limitó el tamaño y la forma del sitio de unión influyendo directamente con el tipo de compuestos que se acoplaron sobre el sitio. Siendo rechazadas aquellas que, presentaban mayores diferencias estructurales con respecto al ibuprofeno, como los coxibs y los oxicams, incapaces de unirse en dicha cavidad. Para el caso de la indometacina y la nimesulida, los grupos nitro y *p*-MeO, respectivamente, se encuentran fuera de la cavidad. Por otra parte, incluso con el pequeño tamaño del ibuprofeno, el volumen de la cavidad de 228.86 $Å^3$ en este cristal perteneciente a COX-2 era mayor, además se destacaron los α-aminoácidos que formaban el sitio de unión existiendo diferencias de estos en ambas isoformas. Se observó que, debido al tamaño de la cavidad, está brindo un mayor acceso a los compuestos más grandes sobre el sitio de unión, como el celecoxib y el rofecoxib, ambos con similitud en el modo de interacción. Así mismo, el meloxicam, el **13** y el flurbiprofeno se ajustaron correctamente, y en el caso de los compuestos **3**, **14**, **12** y **7**, se observó un modo de interacción diferente en comparación con los AINEs.

Como último punto analizado en este sistema, se realizó una comparación de los valores enérgicos obtenidos en los modos de unión anteriormente descritos con respecto a los valores experimentales de IC_{50} y para los trece compuestos utilizados en la segunda validación del modelo (Figura 31).

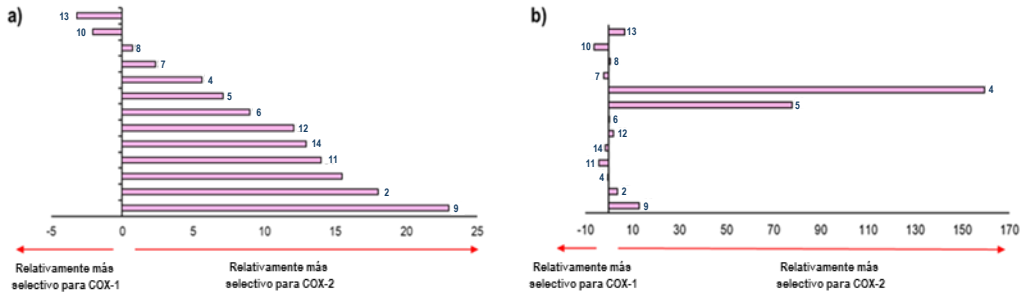


Figura 31. Representación de la selectividad hacia una isoforma COX. (a) Representación gráfica de la relación de selectividad en ambas isoformas con respecto a los valores calculados en cristales 1EQG y 4PH9. E_{COX-1} -E_{COX-2} (Kcal/mol) se representa en los ejes X (b) Representación gráfica de la relación de selectividad sobre ambas isoformas con respecto a los valores de actividad biológica (*in vitro*) en los 13 compuestos. Los valores $IC_{50\ COX-1}$ - $IC_{50\ COX-2}$ (μM) se representan en los ejes X**.**

Comparando el aspecto de selectividad predicho por el modelo con los valores experimentales ya conocidos de los trece compuestos, se encontró una correlación cualitativa en los ocho compuestos siguientes: **10**, **8**, **4**, **5**, **6**, **12**, **2** y **9**. Siete de ellos mostraron selectividad hacia la isoforma COX-2, mientras que sólo el compuesto **10** mantuvo la selectividad hacia COX-1.

4.4.2.2. Caso indometacina (2OYU y 4COX)

En una segunda etapa, se llevó a cabo el análisis de ambas isoformas para los cristales de indometacina. En la Figura 32, se observan las gráficas de los valores de Log $IC_{50\ exp}$ (eje X) y Log $IC_{50\ exp}$ (eje Y), así como la $R^2 = 0.73$ y $R^2 = 0.77$. Así mismo, se muestran los compuestos dentro de los gráficos que mostraron una posible correlación entre la E_{int} con su IC_{50} experimental mediante los valores de IC_{50} obtenidos a partir del modelo matemático que correlaciona con la E_{int} obtenida a partir del acoplamiento molecular en los cristales 2OYU y 4COX.

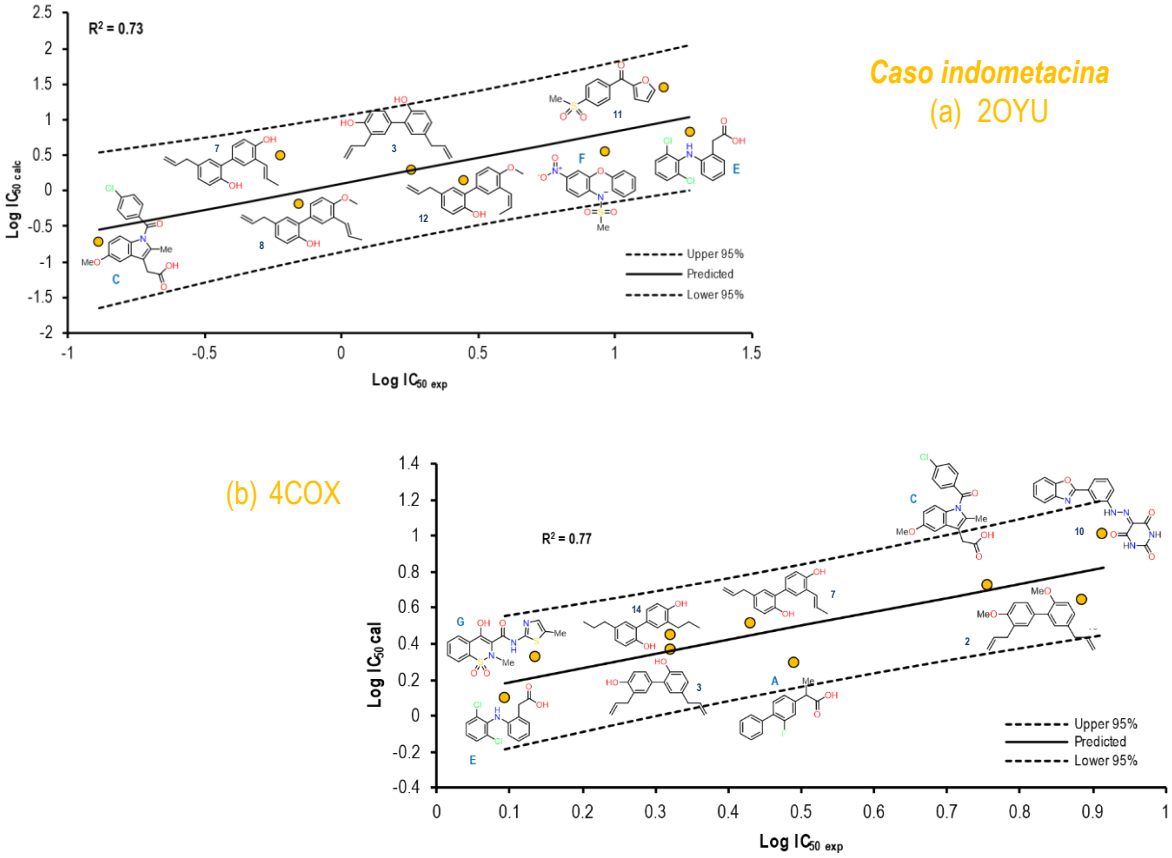


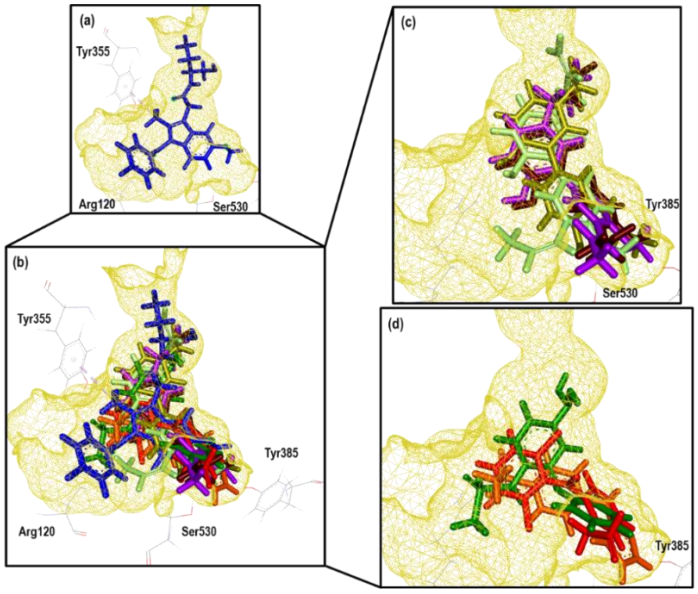
Figura 32. Representación gráfica de Log IC_{50} calc vs Log IC_{50} exp. Estructuras 2D de compuestos que encajan en el modelo cristalino de COX-1 (2OYU) y COX-2 (4COX). Las líneas discontinuas muestran el intervalo de confianza basado en la desviación estándar.

Para el análisis del cristal 2OYU (Figura 32), se alcanzó una reproducibilidad de 8 compuestos de 21, observándose que todas las estructuras presentan dos anillos aromáticos, HBD y HBA. En este caso, el compuesto **3** se observó con una posición más cercana a la línea de predicción en comparación con **7** y **11** que presentaba una mayor distancia respecto a ella. En el caso del cristal 4COX, se alcanzó una reproducibilidad de 9 compuestos de 21, observándose una mayor diversidad estructural en este cristal. Las estructuras presentan dos y tres anillos aromáticos, HBD y HBA. La indometacina y el

compuesto **3** mostraron una posición cercana a la línea de predicción en comparación con el flurbiprofeno y **10**. Por último, las estructuras con tamaños más pequeños mostraron una mayor precisión de la IC_{50} calc con respecto a la IC_{50} exp. Por lo, que se pudo corroborar que el tamaño es importante para la aceptación de los ligandos sobre la cavidad como el caso de la estructura **10** y **G**; sin importar el tamaño del ligando con el cual fueron co-cristalizadas las isoformas. Para analizar más a fondo la relación entre los valores obtenidos de la Figura 32 y la Tabla AT4 y AT5, se decidió examinar cada uno de los modos de unión de los ocho y nueve ligandos en las cavidades del cristal 2OYU para la COX-1 y 4COX para COX-2 (Figura 33).

En la Figura 33 (a) COX-1, (b) se muestran todos los ligandos sobre la cavidad de COX-1, (c) se muestran aquellos ligandos que tomaron una posición vertical dentro de la cavidad, (d) aquellos ligandos con una distribución tipo C dentro de la cavidad.

(a) COX-1



(b) COX-2

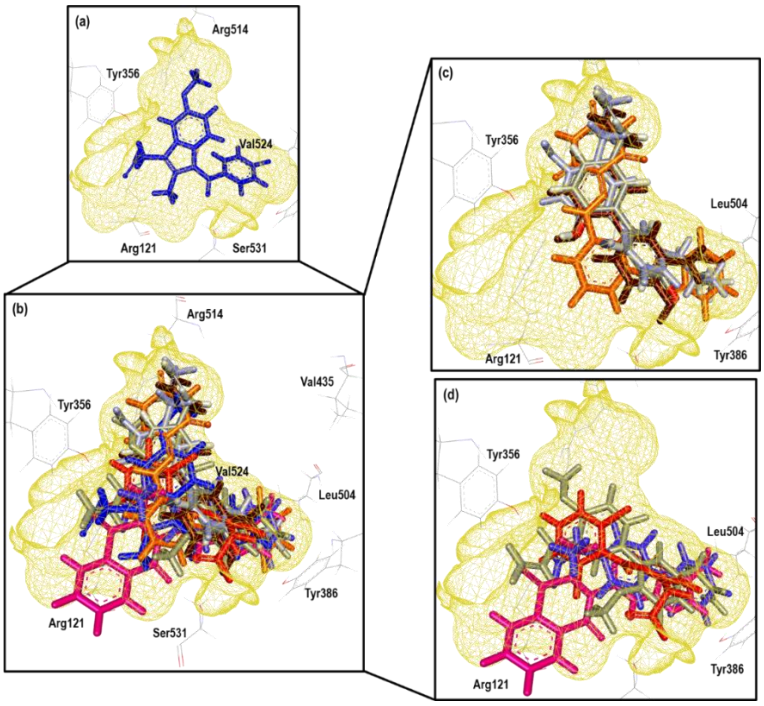


Figura 33. Poses obtenidas a partir del cálculo de acoplamiento molecular sobre los cristales 2OYU y 4COX (Indometacina).

En este estudio, se observaron dos formas de colocación dentro de la cavidad por parte de los ligandos, esto de acuerdo con su estructura. Para COX-1 del cristal 2OYU se tenía un volumen de cavidad de 288.76 $Å^3$, el cual no fue parte fundamental en la unión del tamaño de los ligandos, puesto que, aún con este tamaño, los ligandos acoplados fueron de tamaños inferiores, lo que mostró no tener una relación proporcional en la orientación de los compuestos.

Mientras que aquellas presentaban mayores diferencias estructurales con respecto al ibuprofeno, como los coxibs y los oxicams, e incapaces de unirse en dicha cavidad fueron rechazadas. Para el caso de indometacina y nimesulida, los grupos nitro y *p*-MeO, respectivamente, se encontraban fuera de la cavidad. Por otra parte, incluso con el pequeño tamaño del ibuprofeno, el volumen de la cavidad de 228.86 $Å^3$ en este cristal perteneciente a COX-2 era mayor, además se destacaron los α-aminoácidos que formaban el sitio de unión existiendo diferencias de estos en ambas isoformas. Se observó que el tamaño de la cavidad está brindo un mayor acceso a los compuestos más grandes sobre el sitio de unión, como el celecoxib y el rofecoxib, ambos con similitud en el modo de interacción. Así mismo, el meloxicam, **13** y flurbiprofeno se ajustaron correctamente, y en el caso de los compuestos **3**, **14**, **12** y **7**, se observó un modo de interacción diferente en comparación con los AINEs.

Como último punto analizado en este sistema, se realizó una comparación de los valores enérgicos obtenidos en los modos de unión anteriormente descritos con respecto a los valores experimentales de IC_{50} y para los 13 compuestos utilizados en la segunda validación del modelo (Figura 34).

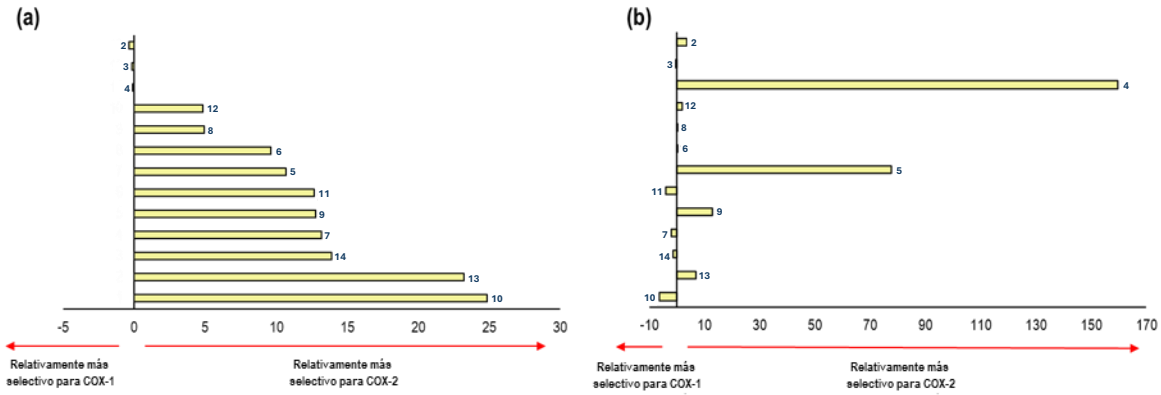
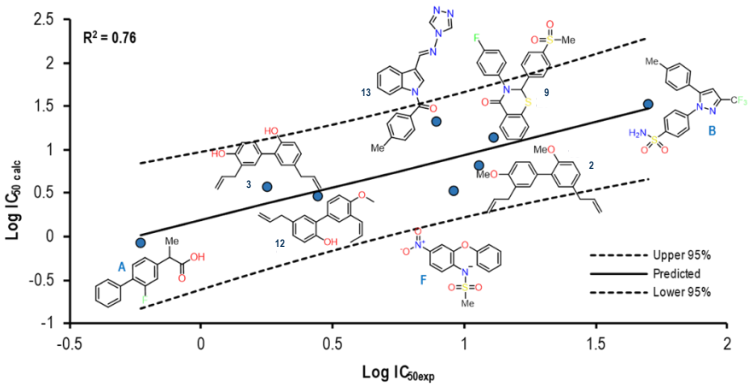


Figura 34. Representación de la selectividad hacia una isoforma COX. (a) Representación gráfica de la relación de selectividad en ambas isoformas con respecto a los valores calculados en cristales 2OYU y 4COX. E_{COX-1} -E_{COX-2} (Kcal/mol) se representa en los ejes X. (b) Representación gráfica de la relación de selectividad sobre ambas isoformas con respecto a los valores de actividad biológica (*in vitro*) en los 13 compuestos. Los valores $IC_{50\ COX-1}$ - $IC_{50\ COX-2}$ (µM) se representan en los ejes X.

4.4.2.3. Caso celecoxib (3KK6 y 3LN1)

En la Figura 35 se muestran las gráficas con los valores de Log IC_{50} exp (eje X) y Log IC_{50} calc (eje Y), así como la $R^2 = 0.76$ y $R^2 = 0.67$ en ambas isoformas de los cristales para celecoxib. Los compuestos mostrados en los gráficos son aquellos en las que fue posible correlacionar la E_{int} con su IC_{50} experimental mediante los valores de IC_{50} obtenidos a partir del modelo matemático que correlaciona E_{int} obtenida a partir del acoplamiento molecular en los cristales 3KK6 y 3LN1.



Caso celecoxib (a) 3KK6

(b) 3LN1

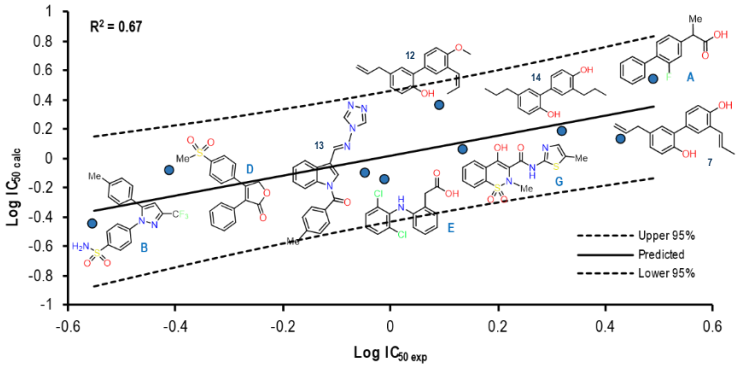
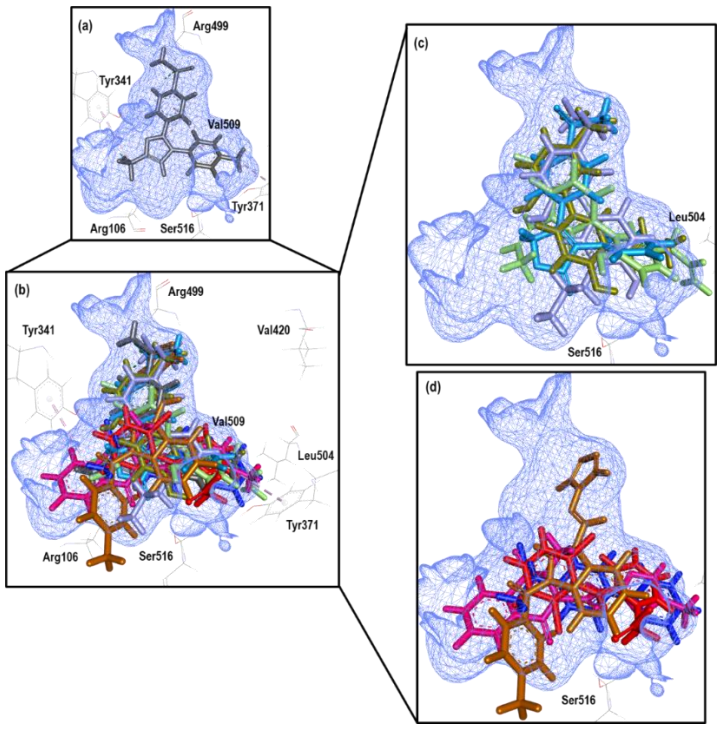


Figura 35. Representación gráfica de Log IC_{50} calc vs Log IC_{50} exp. Estructuras 2D de compuestos que encajan en el modelo cristalino de COX-1 (3KK6) y COX-2 (3LN1). Las líneas discontinuas muestran el intervalo de confianza basado en la desviación estándar.

Con un total de 8 compuestos en el experimento, donde los compuestos flurbiprofeno, **12**, **9** y el ligando correspondiente a este cristal (celecoxib), presentaron una cercanía a la línea (media), indicando una buena correlación entre estos dos valores, caso contrario se observó en nimesulida y el compuesto **13**. El resto de los compuestos de este experimento mostraron un comportamiento similar. Por último, al comparar las estructuras, se encontró que al menos el 50% presentaban un tamaño similar al celecoxib, lo cual fue un factor importante para delimitar el tamaño y la forma de la cavidad presente en este cristal, permitiendo que los compuestos de mayor tamaño pudieran llevar a cabo la interacción con el sitio de unión. Además, este grupo de estructuras presenta un menor valor de IC_{50} hacia la isoforma COX-2, lo que indica una mayor selectividad hacia la misma.

Para analizar más a fondo la relación entre los valores obtenidos de la Figura 36, se estudió el modo de interacción de los 8 ligandos en la cavidad del cristal 3KK6 de la COX-1 y 9 ligandos en la cavidad del cristal 3LN1 de la COX-2. A continuación se muestra el modo de interacción de los 8 ligandos en el sistema de celecoxib (3KK6) de la COX-1 (cavidad) y los residuos característicos de la COX-1. Al igual que los modos de unión de los 9 ligandos en el sistema de celecoxib (3LN1) de la COX-2 (cavidad) y sus residuos característicos de COX-2.

(a) COX-1



(b) COX-2

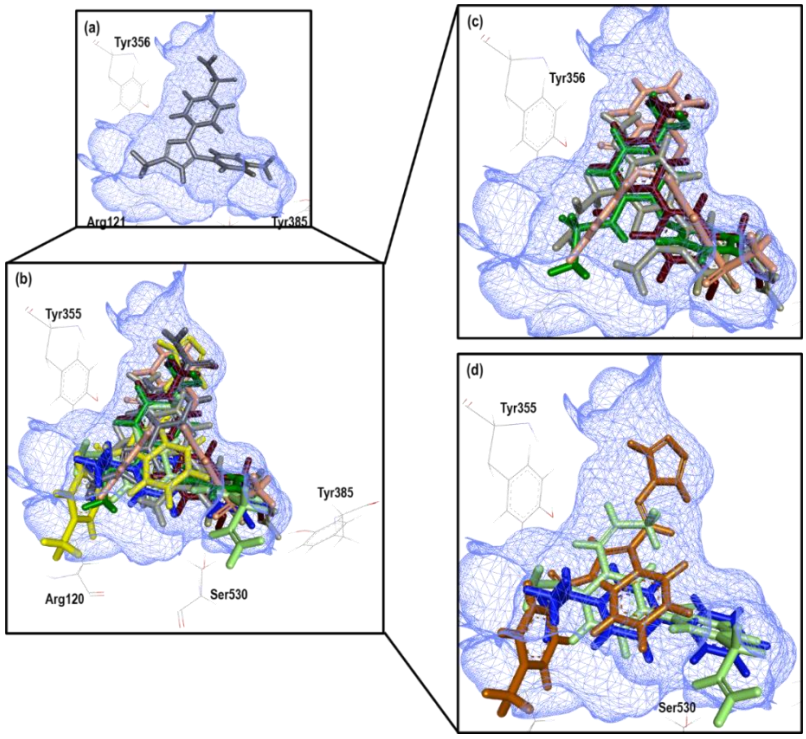


Figura 36. Poses obtenidas a partir del cálculo de acoplamiento molecular sobre los cristales 3KK6 y 3LN1 (Celecoxib).

Con respecto al modo de interacción en el sitio activo del cristal 3KK6 con la estructura del celecoxib como ligando de referencia, al menos 6 de los 8 compuestos, presentaron un modo de interacción bastante similar en cuanto a la disposición espacial; la cual mostro una tendencia hacia la cavidad superior del sitio de unión, donde se alojaba la sulfonamida de los AINEs en la familia COXIBs. La excepción fue el flurbiprofeno, que mantuvo su modo de interacción, orientándose con el grupo carboxílico en dirección a Arg120 y el anillo de benceno hacia Tyr385. Al realizar la comparación en los modos de unión en el cristal 3LN1, observamos cómo la estructura **13** presenta un modo de interacción como el observado en el cristal de COX-1. Por otra parte, las estructuras de AINEs conocidos presentan el modo de interacción de acuerdo con el ya conocido. Finalmente, dentro de las estructuras para las que no se ha establecido un modo de interacción, se observó una tendencia a la colocación en la dirección de Arg499.

Como parte final del análisis en el sistema de celecoxib, se compararon los valores de selectividad-energía obtenidos para cada uno de los ligandos en ambos cristales (3KK6 y 3NL1) según el modelo. Estos datos se compararon con los valores de selectividad experimentales, como se muestran en la Figura 37.

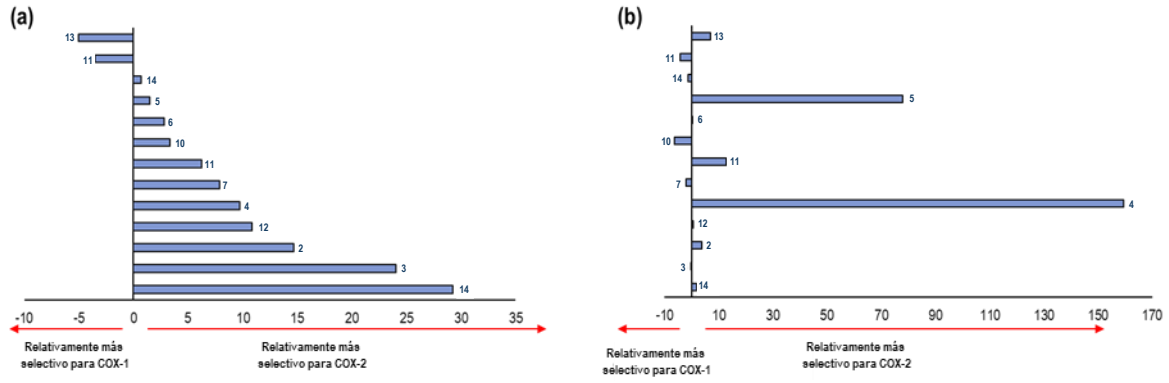


Figura 37. Representación de la selectividad hacia una isoforma COX. a) Representación gráfica de la relación de selectividad en ambas isoformas con respecto a los valores calculados en los cristales 3KK6 y 3LN1. $E_{COX\text{-}1}$-$E_{COX\text{-}2}$ (Kcal/mol) se representa en los ejes X. b) Representación gráfica de la relación de selectividad sobre ambas isoformas con respecto a los valores de actividad biológica (*in vitro*) en los 13 compuestos. Los valores $IC_{50COX\text{-}1}$ - $IC_{50\ COX\text{-}2}$ (μM) se representan en los ejes X**.**

En relación con los valores obtenidos en el modelo, se observó una tendencia a la selectividad hacia COX-2 en la mayoría de los compuestos; sin embargo, de los 13 compuestos, 8 fueron capaces de reproducir el aspecto de selectividad del sistema celecoxib (3KK6 y 3LN1) en comparación con los datos experimentales. Los compuestos que obtuvieron valores cualitativos de selectividad fueron **11**, **5**, **6**, **9**, **4**, **8**, **2** y **12**.

4.4.2.4. Caso meloxicam (4O1Z y 4M11).

La Figura 38 muestra el gráfico con los valores de Log IC_{50} exp (eje X) y Log IC_{50} calc (eje Y), así como el R^2 = 0.74. Los compuestos mostrados en el gráfico son aquellas en las que fue posible correlacionar la E_{int} con su IC_{50} exp, mediante la IC_{50} calc a partir del modelo matemático que correlaciona la E_{int} obtenida a partir del acoplamiento molecular en el cristal 4O1Z y para el cristal 4M11 con los valores de Log IC_{50} exp (eje X) y Log IC_{50} calc (eje Y), así como el R^2 = 0.80 (Figura 38).

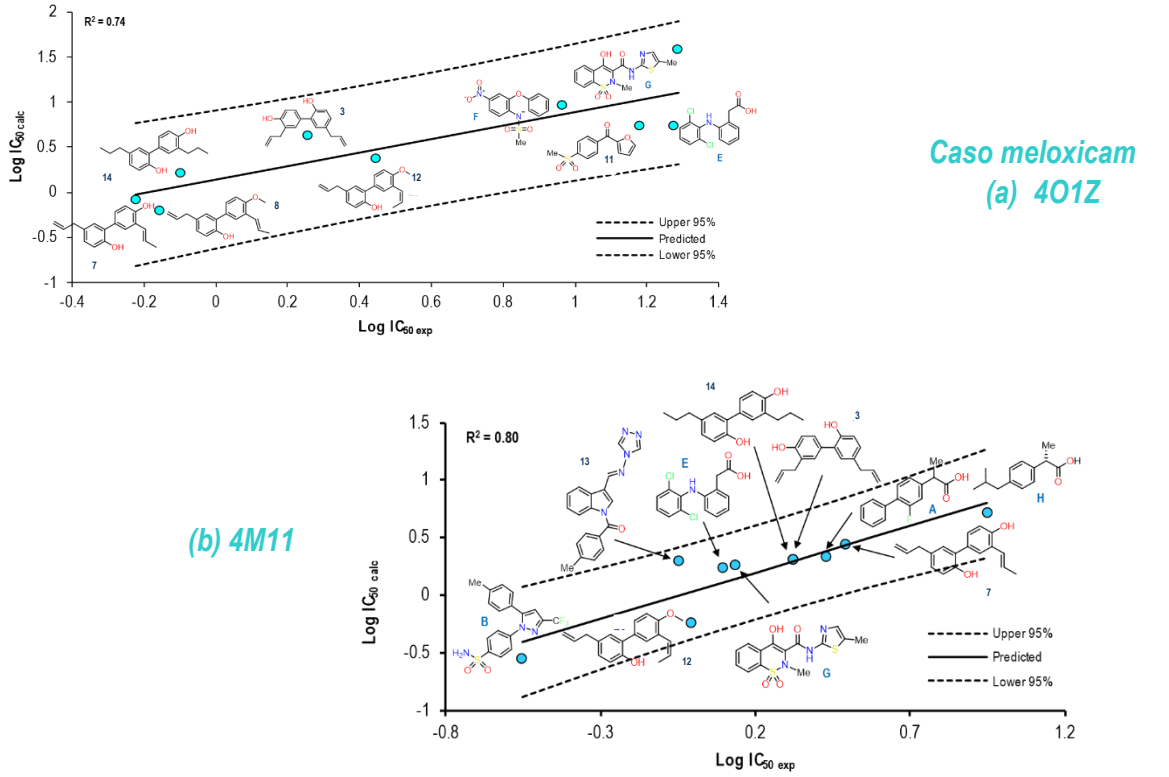


Figura 38. Representación gráfica de Log IC_{50} calc vs Log IC_{50} exp. Estructuras 2D de compuestos que encajan en el modelo cristalino de COX-1 (4O1Z) y COX-2 (4M11). Las líneas discontinuas muestran el intervalo de confianza basado en la desviación estándar.

La reproducibilidad se alcanzó para 9 compuestos en total para el cristal 4O1Z (COX-1), en donde el compuesto **3** y meloxicam son los más alejados de la línea (media) dentro del gráfico, el resto de ls compuestos tuvieron un comportamiento similar excepto el compuesto **7**, el cual muestra la mayor proximidad a la línea (media). Por otro lado, el cristal 4M11 en comparación con todos los cristales, fue uno de los que consiguió reproducir más compuestos, encontrándose estructuras no selectivas y selectivas. Sólo los compuestos **13** y **12** muestran una mayor distancia de la línea (media), los compuestos **14**, **3** y **7** mostraron mejores valores de correlación IC_{50}. Ninguna de las 10 estructuras se encuentra fuera de los intervalos de confianza estadística.

Para analizar con mayor detalle la relación entre los valores obtenidos de la Figura 39 y las Tablas AT8 y AT9, se examinó la unión de los 9 ligandos en la cavidad del cristal 4O1Z para la COX-1, mostrando los modos de unión de los 8 ligandos en el sistema de meloxicam (4O1Z) de la COX-1 (cavidad) y (4M11) de COX-2, así como los residuos característicos para cada una de las isoformas.

(a) *COX-1*

(b) *COX-2*

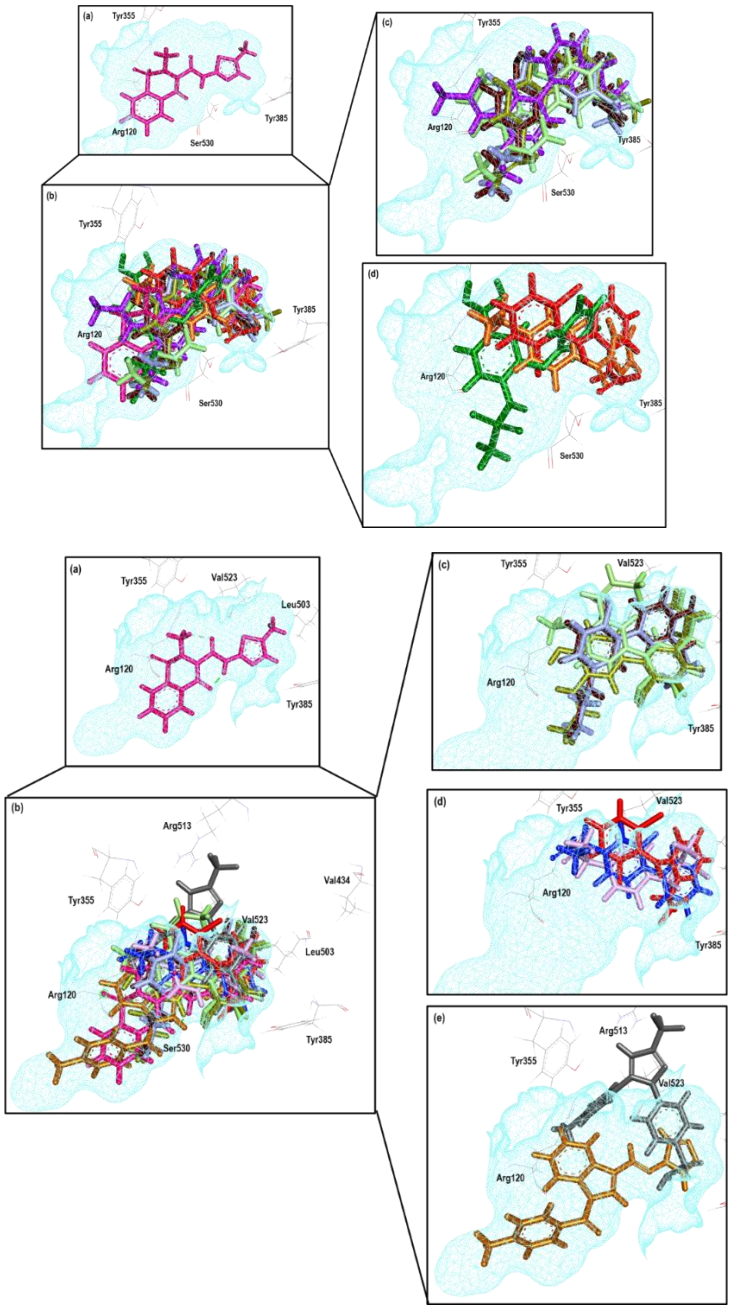


Figura 39. Poses obtenidas a partir del cálculo de acoplamiento molecular sobre los cristales 4O1Z y 4M11 (Meloxicam).

Se puede observar que compuestos como **3**, pueden cambiar el modo de interacción dependiendo del cristal en el que se realice el experimento 4O1Z (COX-1), incorporando los compuestos ahora en la cavidad específica de los AINEs tipo oxicams. Aunque el valor del error Δ calculado para meloxicam que presenta es uno de los valores más altos en este experimento, fue posible demostrar que el modo de interacción de esta estructura se lleva a cabo correctamente. Mientras que, el modo de interacción que presenta el celecoxib en el cristal 4M11 no es el correcto, a pesar de la predicción acertada del valor Log IC_{50} calc, este no concuerda con el modo de interacción. Sin embargo, para el caso de ibuprofeno y flurbiprofeno, si presentaron el modo de interacción correcto donde ambos dirigen el grupo carboxílico hacia el residuo Arg120 y la sección hidrofóbica con orientación hacia Leu503 en posición horizontal. En el caso de la estructura **13** el anillo *p*-MePn, se incorporó a la cavidad específica de los oxicams.

En este punto ya se habían obtenido los valores de IC_{50} previstos, así como los modos de unión de los compuestos del sistema meloxicam (4O1Z y 4M11). Sólo quedaba comparar la selectividad observada para estos compuestos en este sistema con respecto a los valores experimentales conocidos (Figura 40).

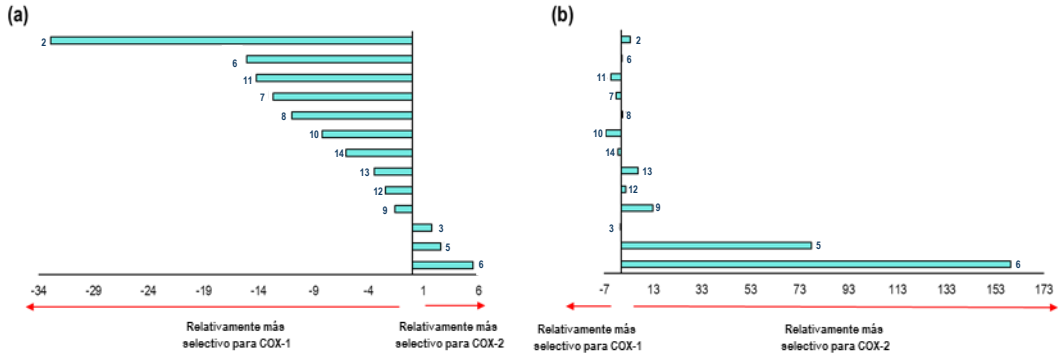


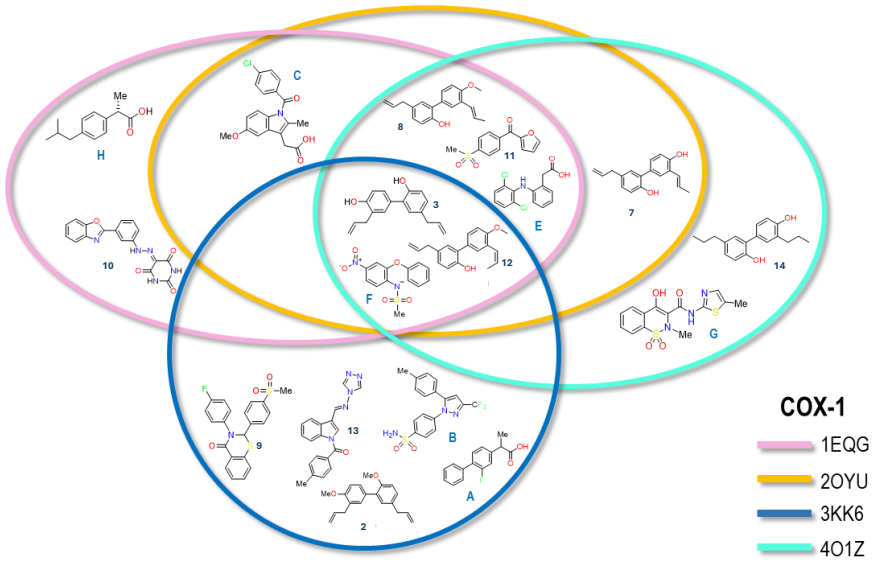
Figura 40. Representación de la selectividad hacia una isoforma COX. (a) Representación gráfica de la relación de selectividad en ambas isoformas con respecto a los valores calculados en los cristales 4O1Z y 4M11. E_{COX-1} -E_{COX-2} (Kcal/mol) se representa en los ejes X (b) Representación gráfica de la relación de selectividad sobre ambas isoformas con respecto a los valores de actividad biológica (*in vitro*) en los 13 compuestos. Los valores $IC_{50\ COX-1}$ - $IC_{50\ COX-2}$ (μM) se representan en los ejes X**.**

Observándose una tendencia en la selectividad para COX-1 en la mayoría de los compuestos; sin embargo, de los 4 compuestos 3 fueron capaces de reproducir el aspecto de selectividad para el sistema meloxicam (4O1Z y 4M11) en comparación con los datos experimentales. De los compuestos que obtuvieron valores cualitativos de selectividad fueron: **13**, **7, 10** y **14.**

4.4.3. Análisis estructural de inhibidores de COXs.

Se evaluó la reproducibilidad del Log IC_{50} exp en comparación con el Log IC_{50} calc para los compuestos de cada uno de los cristales de COXs. La Figura 41 muestra un diagrama de Venn en el que cada anillo representa uno de los cristales utilizados en el análisis de la COXs. La ubicación de las estructuras corresponde al cristal o cristales en los que se observó una mayor reproducibilidad, así como, en los que se llevó a cabo la reproducibilidad de los valores de IC_{50} calculados frente a los experimentales.

(a)



(b)

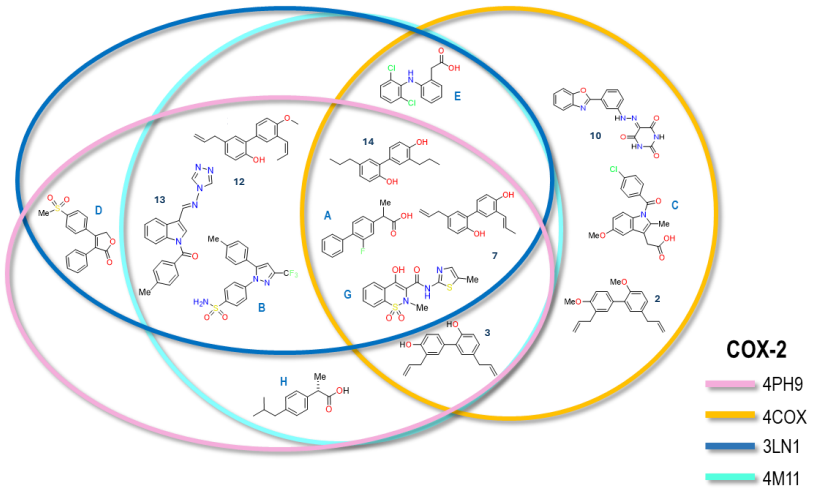


Figura 41. Diagrama de Venn ilustra la correlación entre los valores de IC_{50} exp e IC_{50} calc de los compuestos asociadas a los cristales de COX-1 y COX-2. Los cristales incluidos son: (a) 1EQG, (Ibuprofeno, rosa), 2OYU (Indometacina, amarillo), 3KK6 (Celecoxib, azul) y 4O1Z (Meloxicam, cian). (b) 4PH9 (Ibuprofeno, rosa), 4COX (Indometacina, amarillo), 3LN1 (Celecoxib, azul) y 4M11 (Meloxicam, cian).

Los datos extraídos del diagrama de Venn revelan que 3 compuestos (**3**, **12** y nimesulida) mostraron reproducibilidad en términos de energía en comparación con los valores experimentales de IC_{50} en los cuatro cristales. Estos compuestos compartían características estructurales, como dos anillos aromáticos, y poseían propiedades de aceptor de enlace de hidrógeno (HBA) y donante de enlace de hidrógeno (HBD). Del mismo modo, 3 compuestos (**8**, **11** y diclofenaco) mostraron reproducibilidad en los cristales 1EQG, 2OYU y 4O1Z. Al igual que el grupo anterior, estos compuestos también presentaban dos anillos aromáticos, incluyendo propiedades HBA y HBD. En particular, diclofenaco y **8** mostraron una ligera preferencia por la isoforma 2 en términos de selectividad. Sin embargo, no mostraron reproducibilidad en el cristal de celecoxib. En el caso de la indometacina, su reproducibilidad sólo se alcanzó en los cristales 1EQG y 2OYU, siendo este último la estructura con la que se cocristalizó el ligando; este cristal tiene una cavidad mayor causada por el incremento estructural en la indometacina. Por el contrario, el compuesto **7** compartió reproducibilidad en los cristales 2OYU y 4O1Z, que, a pesar de su similitud estructural con otros compuestos, no se observó su correlación en otros cristales. En el caso de la estructura de meloxicam, la reproducibilidad se produjo en el mismo cristal que en el caso de ibuprofeno y celecoxib. Un resultado inesperado fue la reproducibilidad de la estructura **10** en el cristal del ibuprofeno, ya que se trata de un compuesto de mayor tamaño y con grupos funcionales diferentes a los del ibuprofeno. Por último, entre los 5 compuestos que sólo se reprodujeron en el cristal 3KK6, 3 compartían un tamaño similar con el celecoxib. Esto sugiere que, en los cristales en los que el tamaño de la cavidad está predeterminado por el tamaño del ligando cocristalizado, la probabilidad de que se reproduzcan compuestos del mismo tamaño o mayores es mayor.

El mismo análisis se llevó a cabo para los cristales de COX-2. La Figura 41 muestra el diagrama de Venn en el que cada uno de los anillos representa uno de los cristales utilizados en el análisis de COX-2. Las estructuras se ubican en función del cristal o cristales en los que se comparó la reproducibilidad de los valores calculados y experimentales. En el caso de los cristales de COX-2, el diagrama muestra 4 compuestos (Meloxicam, Flurbiprofeno, **14** y **7**) que fueron reproducibles en términos de energía frente al IC_{50} experimental en los 4 cristales; así mismo, en el caso del diclofenaco, alcanzó la reproducibilidad en 3 de los 4 cristales (4COX, 3LN1 y 4M11). Por otra parte, para celecoxib, se observó una reproducibilidad en los cristales 4PH9, 3LN1 y 4M11, así como para los compuestos **13** y **12**; cabe señalar que el compuesto **13** es incluso mayor que el propio celecoxib. Para el caso del rofecoxib e ibuprofeno sólo se encontraron en 2 de los 4 cristales, incluyendo 4PH9 y 3LN1 (Rofecoxib)

y 4PH9 y 4M11 (Ibuprofeno). Por último, se observa en el diagrama que la indometacina sólo se encuentra en su mismo cristal con los compuestos **10** y **2** (4COX), lo que limita su reproducibilidad a un único cristal. Al igual que en COX-1, los compuestos del tipo COXIBs sólo pudieron experimentar la reproducibilidad en su propio cristal, 4M11 y 4PH9.

5. Conclusiones

5.1. Se logró diseñar un método computacional para predecir los valores, incluyendo la energía de interacción, modo de interacción y la selectividad y la interacción de pequeños compuestos con ambas isoformas de la COX.

5.2. Se logró un análisis exhaustivo que incluyó varias conformaciones de las enzimas basadas en sus estructuras cristalizadas.

5.3. Se logró establecer que, la calidad del análisis y la precisión de las predicciones depende significativamente de la selección de los cristales, ya que la conformación adoptada por la enzima depende del ligando co-cristalizado, del tamaño y la forma de la cavidad receptora.

5.4. Se encontró que, aunque algunos compuestos presentan valores de IC_{50} más bajos para la COX-2, no siempre es factible predecir con exactitud el modo de interacción en estos cristales.

5.5. Se demostró que, para el caso del flurbiprofeno, compuesto selectivo de COX-1, no se obtuvo una reproducibilidad energética en el cristal de ibuprofeno, a pesar de pertenecer ambos a la misma familia de AINEs.

5.6. Se obtuvo una correlación más consistente en el modo de interacción, los valores de energía y la selectividad en los cristales que incluyen al meloxicam como ligando de referencia (4O1Z y 4M11).

5.7. Se propone que, este método permite llevar a cabo un análisis más robusto sobre compuestos que carecen de similitud estructural ya que basarse únicamente en los valores de energía del acoplamiento molecular en un solo cristal es insuficiente.

5.8. Finalmente, se logró obtener un modelo de análisis que establece el estudio del modo de interacción en al menos 3 cristales (Ibuprofeno, Celecoxib y Meloxicam) con el objetivo de obtener valores de energía que presenten una correlación similar en los 6 cristales y un modo de interacción lo más parecido posible, siendo este último criterio de suma importancia.

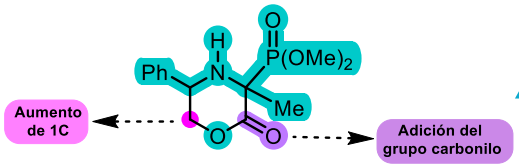
Capítulo II

~Diseño racional estructural y evaluación in silico de α-aminofosfonatos heterocíclicos como potenciales inhibidores de las COXs~

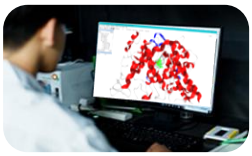
Problema de Salud: Inflamación crónica



Diseño de compuestos



Evaluación *in silico*



1. Introducción

1.1. Diseño racional de fármacos: la inflamación crónica y su relevancia terapéutica.

La inflamación es una de las respuestas biológicas diseñada para protegernos frente a agresiones externas o internas. No obstante, cuando esta respuesta se desregula y persiste en el tiempo, se convierte en un fenómeno insidioso y progresivo: dando lugar a la inflamación crónica**.** Un estado inflamatorio prolongado juega un papel de suma importancia en la progresión de múltiples enfermedades crónicas degenerativas, tales como la osteoartritis, la enfermedad de Alzheimer y diversos trastornos cardiovasculares.[25] Estos padecimientos no solo comprometen la funcionalidad del organismo, sino que deterioran de forma progresiva la calidad de vida del paciente, generando notables complicaciones en el área de salud pública. A pesar de los múltiples tratamientos farmacológicos que existen como lo son las familias de los AINEs (ibuprofeno, naproxeno, diclofenaco, celecoxib) y AIEs (Dexametasona, hidrocortisona) dentro de los más prescritos para el tratamiento de inflamación crónica; han mostrado diversos efectos secundarios: gastro intestinales, nefrotóxicos, cardiovasculares[26], además de que algunos son de elevados costos.

Como consecuencia, la búsqueda de nuevos agentes antiinflamatorios eficaces y seguros se ha vuelto un objetivo prioritario dentro del área de la química medicinal. En este contexto, el diseño racional de fármacos asistido por computadora (DIFAC) se ha convertido en una herramienta estratégica en el diseño de fármacos como una forma práctica en cuanto a costos y tiempo, cuyo objetivo es el desarrollo de nuevos candidatos a fármacos con enfoques computacionales en la fase preclínica.[27] Es así, que, a través del diseño racional de fármacos, la química se posiciona como una aliada primordial en el desarrollo de nuevos tratamientos que no solo se centren en combatir los síntomas, sino que aborden causas profundas de enfermedades complejas y persistentes.

---

[25] (a) Jalloh, A.; Walters, J.; Rönnbäck, A. K.; Rubinsztein, D. C. *Mol. Neurodegener.* **2023**, *18*, 43; (b) Zhao, X.; Huang, P.; Zhong, J.; Zuo, Z.; Li, Y.; Li, Q. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2020**, *2020*, 8293921.

[26] (a) Wongrakpanich, S.; Wongrakpanich, A.; Melhado, K.; Rangaswami, J. A. *Aging Dis*. **2018**, *9*, 143-150; (b) Blobaum A. L, Marnett, L. J.*J. Med. Chem*. **2007**, *50*, 1425-1441.

[27] (a) Ferreira, L. G.; Dos Santos, R. N.; Oliva, G.; Andricopulo, A. D. *Molecules* **2015**, *20*, 13384-13421; (b) Lyu, J.; Wang, S.; Balius, T. E.; Singh, I.; Levit, A.; Moroz, Y. S.; O´Meara, M. J.; Che, T.; Algaa, E.; Tolmachova, K.; Tolmachev, A. A.; Schoichet, B.; Roth, B. L.; Irwin, J. J. *Nature* **2019**, *566*, 224-229; (c) Waszkowyz, B. *Drug Discovery Today* **2008**, *13*, 219-226; (d) Saldicar-González, F.; Prieto-Martínez, F.; Medina-Franco J, L.Descubrimiento y desarrollo de fármacos: un enfoque computacional. Educación Química **(2016)**; (e) Sivakumar K. C.; Haixiao J.; Naman C. B.; Sajeevan T. P. *Drug Dev Res*. **2020**; *81*: 685-699.

Dentro de este campo (DIFAC), se encuentran diversas técnicas como lo son: el cribado virtual (VS), el modelado homológico, la relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR), el modelo de farmacofórico tridimensional (3D) y el acoplamiento molecular (docking).[28] En este sentido, el acoplamiento molecular es hoy en día una de las herramientas más utilizadas dentro de la búsqueda de nuevos compuestos con posible actividad biológica, ya que permite llevar a cabo modificaciones estructurales y posteriormente realizar una evaluación para conocer si los nuevos compuestos son mejores candidatos.

1.2. Importancia de los ácidos α-aminofosfónicos.

Por otra parte, en los últimos años los compuestos que contienen enlaces fósforo-carbono han despertado un notable interés en el campo de la química medicinal, debido a su versatilidad estructural y potencial terapéutico. En particular, los ácidos α-aminofosfónicos, análogos estructurales de mayor importancia de los α-aminoácidos, en donde el grupo fosfónico (PO_3H_2) sustituye al grupo carboxílico (CO_2H) (Figura 42), son considerados como una clase prominente de compuestos bioactivos. Su capacidad para imitar el comportamiento de los α-aminoácidos en sistemas biológicos les permite interactuar con enzimas, receptores y otras biomacromoléculas, desempeñando funciones de inhibición o modulación de procesos fisiológicos clave.[29]

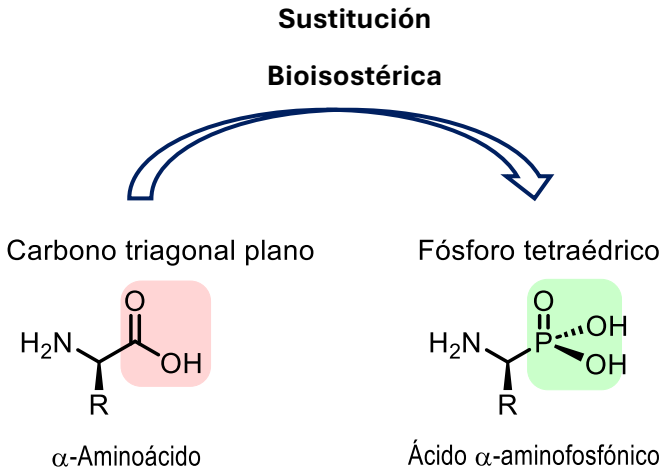


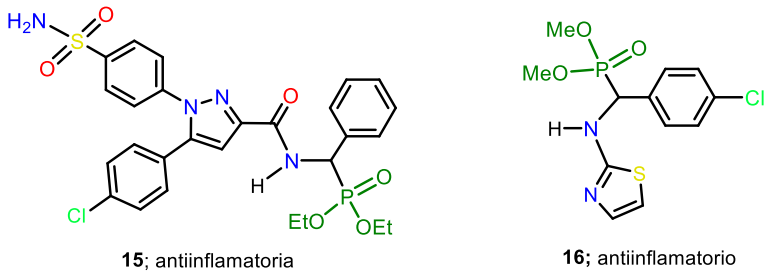
Figura 42. Reemplazo bioisotérico del grupo carboxílico por el fosfónico.

[28] Sabe, V. T.; Ntombela, T.; Jhamba, L. A.; Maguire, G. E. M.; Govender, T.; Naicker, T.; Kruger, H. *Eur. J. Med. Chem.* **2201,** *224,* 113705.

[29] (a) Gluza, K.; Kafarski, P. in *Drug Discovery* (Ed.: H. El-Shemy), InTech, Rijeka, Croatia, **2013**, pp. 325-372; (b) Mucha, A.; Kafarski, P.; Berlicki, L. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 5955-5980; (c) Orsini, F.; Sello, G.; Sisti, M. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 264-289; (d) Naydenova, E. D.; Todorov, P. T.; Troev, K. D. *Amino Acids* **2010**, *38*, 23-30; (e) Lejczak, B.; Kafarski, P. *Top. Heterocyclic Chem.* **2009**, *20*, 31-63.

1.3. Actividades biológicas de los ácidos α-aminofosfónicos.

En este sentido, se han descrito una gran variedad de actividades biológicas a este grupo de compuestos como: antioxidantes,[30] antibacteriales,[31] antifúngicos,[32] anticancerígenos,[33] trastornos neurodegenerativos,[34] y antiinflamatorios.[35]



15; antiinflamatoria **16;** antiinflamatorio

Figura 43. Ejemplos de α-aminofosfonatos con actividad antiinflamatoria.

En conjunto, estos estudios consolidan el valor de los α-aminofosfonatos como herramienta clave en el diseño de nuevos compuestos con potencial actividad antiinflamatoria, motivando la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos con mayor eficacia, selectividad y perfil de seguridad enfocados al tratamiento de la inflamación crónica.

[30](a) Damiche, R.; Chafaa, S. *J. Mol. Struct.* **2017**, *1130*, 1009-1017; (b) Elkaeed, E. B.; Abdel-Aziz, M.; Elkady, H.; Almehizia, A. A.; Eissa, I. H.; Kandeel, M. *Bioorg. Chem.* **2023**, *137*, 106566.
[31]Kandula, V. K.; Ramesh, B.; Ramu, R. *J. Mol. Struct.* **2024**, *1301*, 135035.
[32] González-Maldonado, M. B.; Quintana, M. J.; Martín-Souto, L.; Bouzón, C.; Rivas, L.; Torrado, J. J. *Microorganisms* **2022**, *10*, 1404.
[33] (a) Kumar, A.; Patel, M.; Li, H. *J. Mol. Struct.* **2021**, *1226*, 129238; (b) Singh, R. K.; Mehta, A.; Pandey, A. *J. Appl. Pharm. Sci.* **2022**, *12*, 45-52; (c) Ahmed, M. A.; Osman, H. Y.; Mohamed, A. M. *Chem. Select*. **2024**, *9*, e202401180.
[34] Liu, Y.; Zhou, T.; Wang, F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2022**, *54*, 128471.
[35] (a) Sudileti, M.; Chintha, V.; Nagaripati, S.; Gundluru, M.; Yasmin, S. H.; Wudayagiri, R.; Cirandur, S. R. *Med. Chem. Res.* **2019,** *28*,1740-1754; (b) Ramírez-Marroquín, O. A.; Jiménez-Arellanes, M. A.; Cortés-Pacheco, A.; Zambrano-Vásquez, O. R.; López-Torres, A. *Chemical Monthly* **2019,** *150*, 267-274; (c) Zhang, B.; Hu, X. T.; Gu, J.; Yang, Y. S.; Duan, Y. T.; Zhu, H. L. *Bioorg. Chem.* **2020,** *105*, 104390; (d) Rodriguez, J. B.; Gallo-Rodriguez, C.*Chem. Med. Chem.* **2019,** *14*, 190-216; (e) Romero-Estudillo, I.; Viveros-Ceballos, J. L.; Cazares-Carreño, O.; González-Morales, A.; De Jesús, B. F.; López-Castillo, M.; Razo-Hernández, R. S.; Castañeda-Corral, G.; Ordoñez, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2019,** *27*, 2376; (f) Abdou, W. M.; Ganoub, N. A.; Sabry, E. *Beilstein J. Org. Chem.* **2013**, *9*, 1730-1736.

2. Antecedentes

2.1. α-aminofosfonatos con actividad antiinflamatoria

Los α-aminofosfonatos se han posicionado como un grupo de compuestos particularmente versátil, capaces de combinar funcionalidad química con potencial biológico. Durante las últimas décadas, diversos grupos de científicos se han enfocado en la exploración del potencial antiinflamatorio de estos compuestos.

En este contexto, en el grupo de investigación del Dr. Ordóñez se ha descrito la síntesis de nuevos derivados de α-aminofosfonatos tetrasustituidos derivados de α-metilfosfoserinas **17a-c**., los cuales mostraron poseer actividad antiinflamatoria en el modelo de inflamación por edema de oído de ratón inducido por TPA.[36]

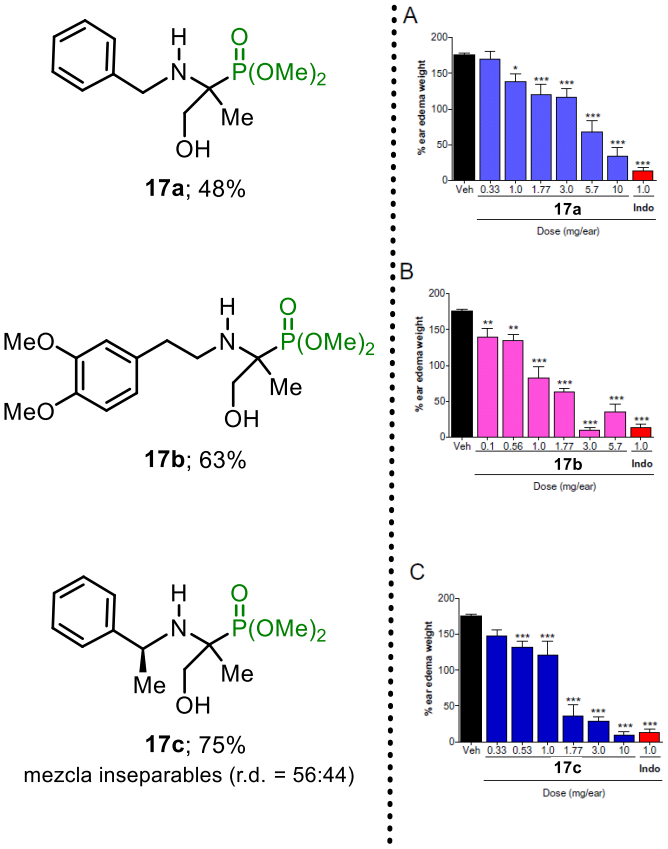


Figura 44. Ejemplos de nuevos α-aminofosfonatos acíclicos **17a-c** y su efecto antiinflamatorio. Cada barra representa la media ± SEM (n=8/dosis). *p < 0,05, **p < 0,01 *** p < 0,001 significativamente diferente del grupo vehículo (Veh).

[36] Romero-Estudillo, I. O.; Viveros-Ceballos, J. L.; Cazares-Carreño, O.; González-Morales, A.; Flores de Jesús, B.; López-Castillo, M.; Razo-Hernández, R. S.; Castañeda-Corral, G.; Ordóñez, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, *27*, 2376-2386.

No obstante, el grupo de investigación continúo explorando nuevas estrategias en el diseño de α-aminofosfonatos tetrasustituidos derivados de α-metilfosfoserinas. En su más reciente publicación, implementaron estrategias de modificación molecular, al realizar derivados mediante un proceso de conjunción conocido como "Hibridización molecular". En este proceso, decidieron asociar las estructuras ya conocidas de los α-aminofosfonatos tetrasustituidos derivados de α-metilfosfoserinas con el ácido propiónico **18** y (*S*)-naproxeno **19**, con el objetivo de evaluar un sinergismo de potenciación en la actividad antiinflamatoria (Figura 4).

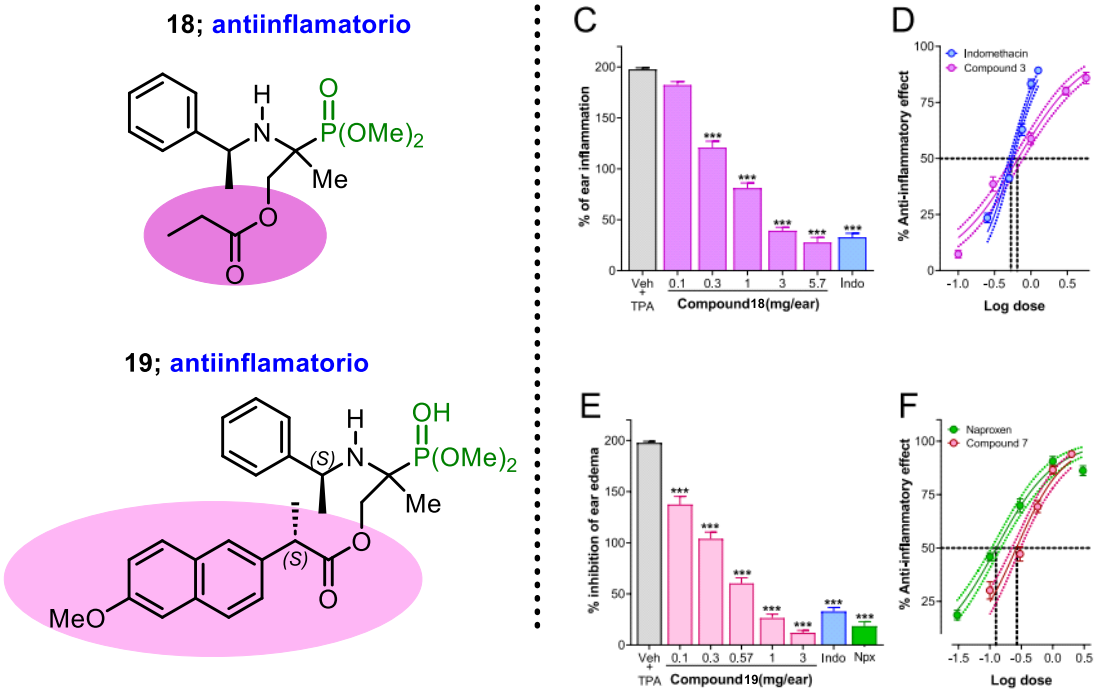


Figura 45. Diseño de nuevos α-aminofosfonatos tetrasustituidos derivados de α-metilfosfoserinas por "Hibridización molecular" y su evaluación como antiinflamatorios.

Los compuestos redujeron el edema de oído inducido por TPA de forma dependiente de la dosis. En esta prueba, los compuestos **18** y **19** mostraron la misma eficacia (≈ 90%) y mayor potencia que la indometacina y disminuyeron el marcador inflamatorio relación neutrófilos-linfocitos (NLR). Además, el pretratamiento y postratamiento oral con los compuestos **18** y **19** redujo el edema de la pata inducido por CFA, al igual que la indometacina o el (*S*)-naproxeno.[37]

[37] López-Castillo, M.; Ordoñez, M.; Bernal-Evangelista, I.; Vázquez-Arredondo, G. A.; Gutiérrez-Baños, M. V.; Romero-Estudillo, I.; Castañeda-Corral, G. *J. Med. Chem.* **2025**, *68*, 4498-4510.

Por otra parte, Cirandur y col.[38] sintetizaron una biblioteca de α-aminofosfonatos y llevaron a cabo la evaluación de actividad antiinflamatoria y estudios de acoplamiento molecular. Encontrando que los compuestos **20a**, **20b**, **20h**, **20i** y **20k** mostraron una fuerte actividad antiinflamatoria contra la muerte celular inducida por LPS en líneas celulares RAW 264.7. Además, se realizaron los estudios de acoplamiento molecular sobre COX-2 (diana terapéutica), los cuales mostraron altas energías de unión, confirmando así, su alta actividad antiinflamatoria. En consecuencia, el compuesto más bioactivo (**6k**), se perfila como un prometedor agente antioxidante y antiinflamatorio (Figura 46).

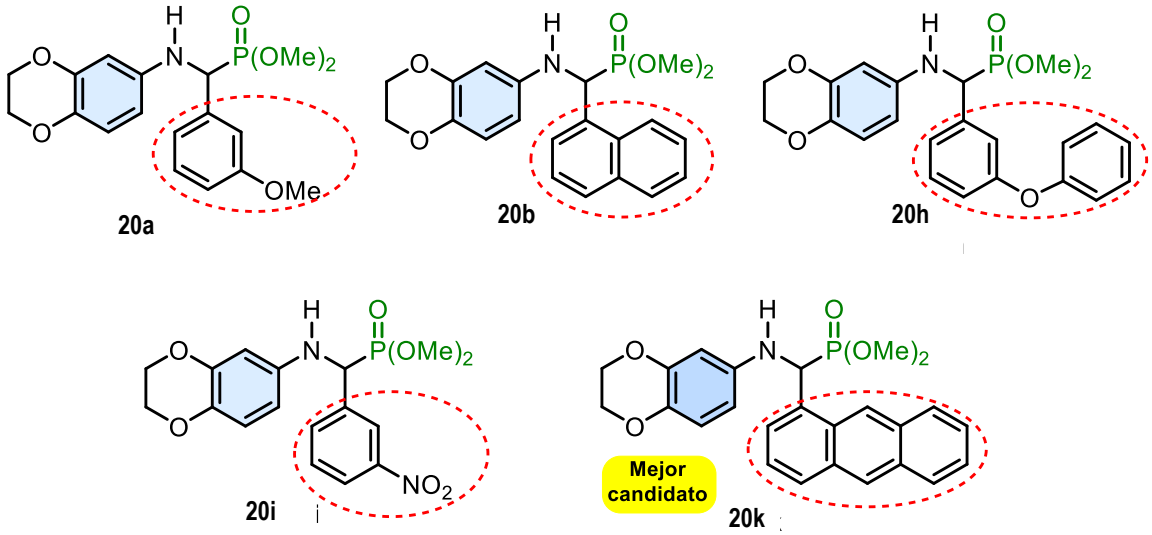


Figura 46. Biblioteca de α-aminofosfonatos con actividad antiinflamatoria y estudios de acoplamiento molecular.

2.2. Implementación de la restricción conformacional como estrategia en el diseño de nuevos α-aminofosfonatos heterocíclicos con potencial actividad antiinflamatoria.

Una de las estrategias más utilizada en el diseño de fármacos es la restricción conformacional, ya que esta puede minimizar la pérdida entrópica asociada con la adopción de una conformación preferida para la unión con el sitio receptor, lo que resulta en una mayor potencia, mayor selectividad, reducción de su metabolismo y menos efectos secundarios.[39] Con esto en mente, en el grupo de investigación del Dr. Ordoñez,[40] llevó a cabo la restricción conformacional de α-aminofosfonatos, como una estrategia en el diseño de nuevos compuestos con mayor potencia antiinflamatoria (Figura 47).

[38] Shaik, Y. H.; Chintha, V.; Gundluru, M.; Sarva, S.; Cirandur, S. R. *Synth. Commun.* **2021,** *52*, 129-144.

[39] (a) Fang, Z.; Song, Y.; Zhan, P.; Zhang, Q.; Liu, X. *Future. Med. Chem.* **2014**, *6*, 885-901; (b) Hanessian, S.; Auzzas, L. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1241-1251.

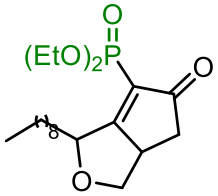
[40] Bello-Vargas, E. Tesis de Maestría "Alquilación de 2-fenil-4-dimetoxifosfinoil-2-oxazolinas y su potencial aplicación como agentes anti-inflamatorios" Maestría en ciencias, IICBA-UAEM, **2020**



Figura 47. Ejemplo de la restricción conformacional en el incremento de la potencia de la actividad antiinflamatoria de α-aminofosfonatos.

Es así como, la restricción conformacional mejoró los valores de DE_{50} del compuesto **21** en comparación con **17a** en el modelo de inflamación por edema de oído de ratón inducido por TPA. Demostrando así, que los α-aminofosfonatos conformacionalmente restringidos destacan como mejores candidatos farmacológicos.

Un último ejemplo adicional es el descrito por el grupo de investigación de Rubinstein,[41] ellos evaluaron la actividad antiinflamatoria del compuesto **22** de manera macroscópicamente en el colon de ratas inducidas con DNBS como se observa en la Tabla 3.



22

Tabla 3. Efecto de **22** y 5-ASA sobre la colitis inducida, evaluada mediante la medición del peso del colon y la puntuación de ulceración.

Grupo	Peso del colon (mg/kg de peso corporal)	Gravedad de la úlcera puntuación
Sanos	4.3 ± 0.6	0
DNBS-inducido, sin tratamiento	8.3 ± 1.9	1.9 ±0.7
P-5 (10mg/Kg)	5.6 ± 0.5	0.2 ±0.4
5-ASA (268 mg/Kg)	4.7 ± 0.7	0.3 ±0.4

Se muestran los valores medios ± D.S. de 5-10 ratas

[41] Moradov, D.; Shifrin, H.; Harel, E.; Nadler-Milbauer, M. *Gastroenterol. Res. Pract*. **2015,** *3*, 939483.

Se muestra que, tras la administración rectal de **22**, el peso del colon inflamado se redujo en un 33% y un 43% con ácido 5-aminosalicílico (5-ASA, control positivo). La puntuación de la ulceración reveló que tanto los tratamientos con **22** como con 5-ASA redujeron la gravedad de la ulceración.

Es de importancia destacar que, en la mayoría de los ejemplos descritos anteriormente los compuestos cuentan con un centro aquiral en la posición α al grupo fosfonato. Lo cual significa, que, los compuestos han sido obtenidos y evaluados biológicamente (antiinflamatorios) como mezclas racémicas. Sin embargo, la quiralidad juega un papel importante en el desarrollo de nuevos compuesto bioactivas dentro del área de la química farmacéutica.[42] Es por ello, que, en años recientes, una tendencia al incremento en la pureza enantiomérica es un requisito dentro de esta área, demostrando el mejoramiento significativo en la reducción de la toxicidad o efectos secundarios asociados con el enantiómero no activo.[43] Además, se ha demostrado que el uso de uno de los dos enantiómeros biológicamente activos da lugar a perfiles farmacológicos más sencillos y selectivos, índices terapéuticos mejorados, farmacocinética más simple y disminución de las interacciones farmacológicas.

Por lo tanto, en este capítulo se centrará en el diseño de nuevos α-aminofosfonatos heterocíclicos con estricto sentido de conciencia, en la importancia de la pureza enantiomérica de los candidatos a compuestos bioactivos, con la finalidad de ofrecer mejores soluciones farmacológicas en el tratamiento de la inflamación y las patologías que conlleva.

[42] Ceramella, J.; Iacopetta, D.; Franchini, A.; De Luca, M.; Saturnino, C.; Andreu, I.; Sinicropi, M. S.; Catalano, A. *Appl. Sci.* **2022**, *12,* 10909.

[43] (a) Coelho, M. M.; Fernandes, C.; Remião, F.; Tiritan, M. E. *Molecules* **2021**, *26*, 3113; (b) Davies, N. M.; Teng, X. W. *Adv. Pharm.* **2003**, *1*, 242-252.

3. Objetivo

Realizar el diseño racional de nuevos α-aminofosfonatos heterocíclicos y su evaluación *in silico* para determinar su potencial como inhibidores de las COXs.

3.1. Objetivos específicos

Diseñar una serie de α-aminofosfonatos heterocíclicos.

3.1.1. Llevar a cabo la predicción de la actividad biológica con la herramienta *PASS online*.

3.1.2. Realizar el análisis conformacional de los α-aminofosfonatos con mejores valores obtenidos de la predicción y seleccionarlos de acuerdo con su valor energético.

3.1.3. Evaluar el potencial de inhibición sobre las COXs de los confórmeros de los α-aminofosfonatos heterocíclicos con diferentes valores energéticos. Utilizando el modelo de predicción diseñado en el capítulo I de esta tesis.

4. Resultados y discusión.

4.1. Evaluación *in silico* de α-aminofosfonatos heterocíclicos como compuestos de interés farmacológico: posibles inhibidores de las COXs.

4.1.1. Diseño de α-aminofosfonatos heterocíclicos conformacionalmente restringidos y la modificación del tamaño del heterociclo como técnicas de modificación estructural.

Como parte inicial de este capítulo, se decidió retomar los compuestos ya sintetizados por nuestro grupo de investigación mencionados anteriormente, para la creación del nuevo diseño como estructuras base (Figura 48). En referencia con la actividad antiinflamatoria demostrada en modelos *in vivo*.

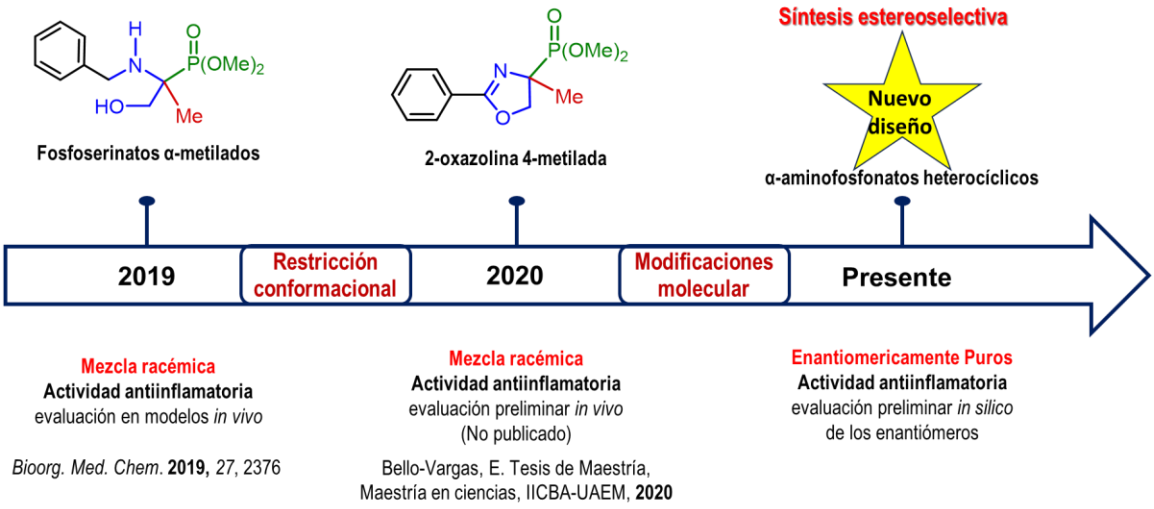


Figura 48. Etapas del desarrollo de nuevos α-aminofosfonatos con actividad antiinflamatoria.

Como se puede observar, el diseño ya mantiene una parte estructural fija, conservada desde las primeras series de compuestos, en una segunda etapa se decidió implementar la restricción conformacional como estrategia de diseño, la cual, resulto bastante favorable. Teniendo esto en mente, se decidió proponer las siguientes modificaciones moleculares (Figura 49).

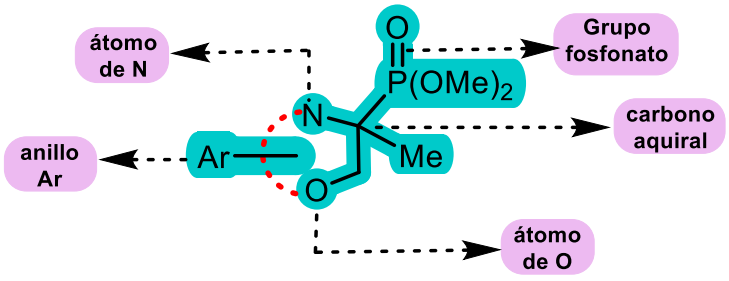


Figura 49. Componentes estructurales de importancia en los α-aminofosfonatos biológicamente activos.

En la siguiente etapa se decidió utilizar nuevas estrategias del diseño de fármacos específicamente en la modificación molecular con base en los procesos especiales como lo son:

- Alteraciones que aumenten o disminuyan las dimensiones y la flexibilidad de los compuestos.

Como primera modificación molecular, se decidió hacer una homologación del heterociclo pasando de un anillo de 5 a un anillo de 6 miembros, aumentando solo un átomo de carbono como se muestra en la Figura 50.

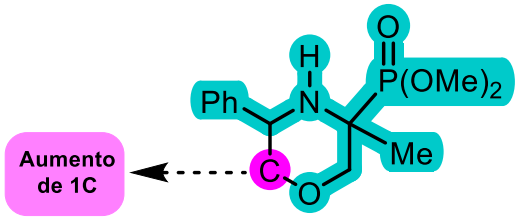


Figura 50. Nuevo diseño molecular con 1 átomo de carbono adicional (heterociclo de 6 miembros) **23**.

Se mantuvieron todos los grupos principales de la estructura inicial, los cuales se conoce que son importantes para la actividad biológica, modificando así, únicamente el tamaño del anillo, como consecuencia se observó un incremento en las dimensiones del compuesto y modificación de la flexibilidad. Posteriormente se realizó la predicción de la actividad biológica de esta estructura, obteniendo un valor de: Pa = 85% (antiinflamatoria), estos datos se calcularon por el servidor *PASS online*.[44]

A continuación, se llevó a cabo la modificando en la posición 5 del anillo heterocíclico con la intención de homologar la cadena aumentando un átomo más de carbono (Figura 51).

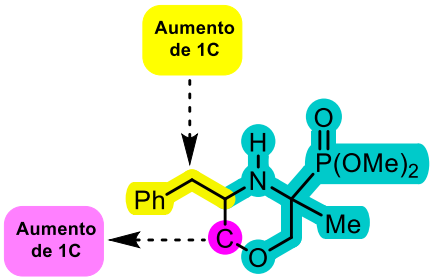


Figura 51. Nuevo diseño molecular: incorporación de 1 átomo de carbono adicional (heterociclo de 6 miembros) **24**.

Sin embargo, al realizar la predicción de la actividad biológica el valor obtenido fue menor (83%) en comparación con el prototipo **23**. Corroborando así, que al homologar la cadena en la posición 5, es una estrategia no favorable en cuanto a nuestro diseño. No obstante, aunque los resultados son alentadores, se decidió proponer

[44] Filimonov, D. A.; Lagunin, A. A.; Gloriozova, T. A.; Rudik, A. V.; Druzhilovskii, D. S.; Pogodin, P. V.; Poroikov, V. V. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2014**, *50*, 444-457.

una vez más, otro cambio molecular en **23**, en esta ocasión poniendo en práctica el siguiente fundamento (Figura 52).

- Alteraciones de las propiedades fisicoquímicas por introducción de nuevos grupos o sustitución de nuevas partes.

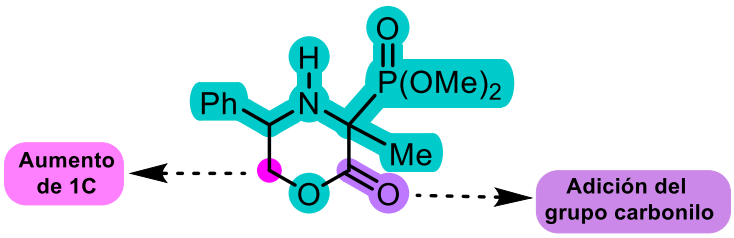
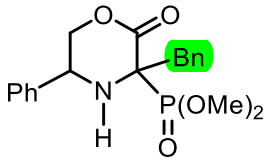
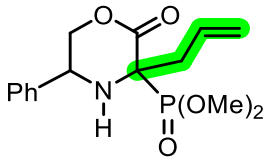
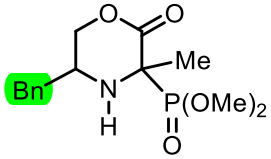
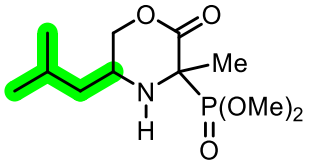
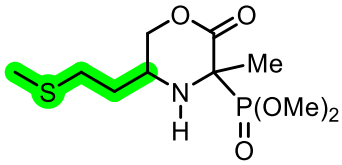


Figura 52. Nuevo diseño molecular: incorporación del grupo carbonilo en la posición 2 heterociclo de 6 miembros. prototipo **25**.

Se llevó a cabo la modificando en la posición 3 del anillo heterocíclico, colocando un grupo carbonilo. Posteriormente, se realizó la predicción de la actividad biológica de esta estructura, obteniendo un valor de: Pa = 85% (antiinflamatoria). Al observar que la predicción de la actividad antiinflamatoria no se veía modificada en comparación del prototipo **23**. Se decidió modificar los sustituyentes en la posición 5 y el metilo de la posición 3 del heterociclo. Construyendo así, una serie de posibles compuestos (Tabla 4).

Tabla 4. Propuesta de compuestos con posible actividad antiinflamatoria, basadas en el prototipo **25**.

Compuestos	Predicción actividad biológica (antiinflamatoria)
 **26a**	82%
 **26b**	82%
 **27a**	82%
 **27b**	85%
 **27c**	85%

Una vez analizados los resultados de todos los posibles candidatos con potencial actividad biológica y poniendo en práctica nuestros conocimientos sintéticos. Se optó por seleccionar el compuesto **25** como el mejor candidato. No obstante, se debe destacar que las predicciones realizadas en el servidor *PASS online* no contemplan los centros estereogénicos presentes en el compuesto, por lo que la predicción no contempla los diastereoisómeros posibles; puntualizando la importancia de esto, ya que si bien, en el mejor de los casos algunos de los diastereoisómeros sean activos y otros no, lo cual sería un criterio importante por evaluar este diseño. Teniendo así, que, el compuesto **25** contiene en su estructura 2 centros estereogénicos y si, aplicamos

la fórmula general para determinar el número total de diastereoisómeros **2^n**; siendo **n** = número de carbonos quirales presentes en el compuesto, se tiene 2^2 = 4, por lo tanto, las estructuras finales serían las siguientes:

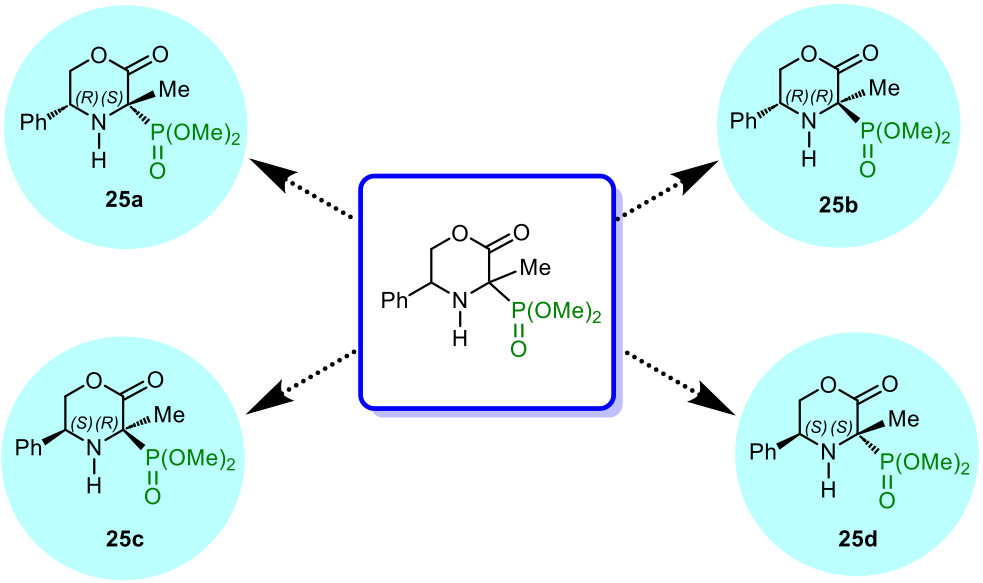


Figura 53. Diseño final: α-aminofosfonatos heterocíclicos como potenciales inhibidores de las COXs.

Ya con la propuesta del diseño final (Figura 53), se inició con la evaluación *in silico* de los compuestos antes mencionadas como posibles inhibidores de las COXs. Lo cual se detalla a continuación.

4.2. Análisis computacional del acoplamiento molecular de α-aminofosfonatos heterocíclicos sobre COXs.

4.2.1. Optimización de la geometría y análisis conformacional de los compuestos.

En primer lugar, se realizó el análisis del α-aminofosfonato heterocíclicos **25a**, obteniendo un total de 65 confórmeros posibles, de los cuales se seleccionaron los siguientes tres: el de menor (M0008, -245.06 Kcal/Mol), el intermedio (M0064, -235.94 kcal/Mol) y el mayor energéticamente (M0065, -229.46 kcal/Mol). Como se observa en la Figura 54, el sustituyente fenilo y los metilos del grupo fosfonato son aquellos que tiene un mayor movimiento rotacional al tener enlaces sencillos libres.

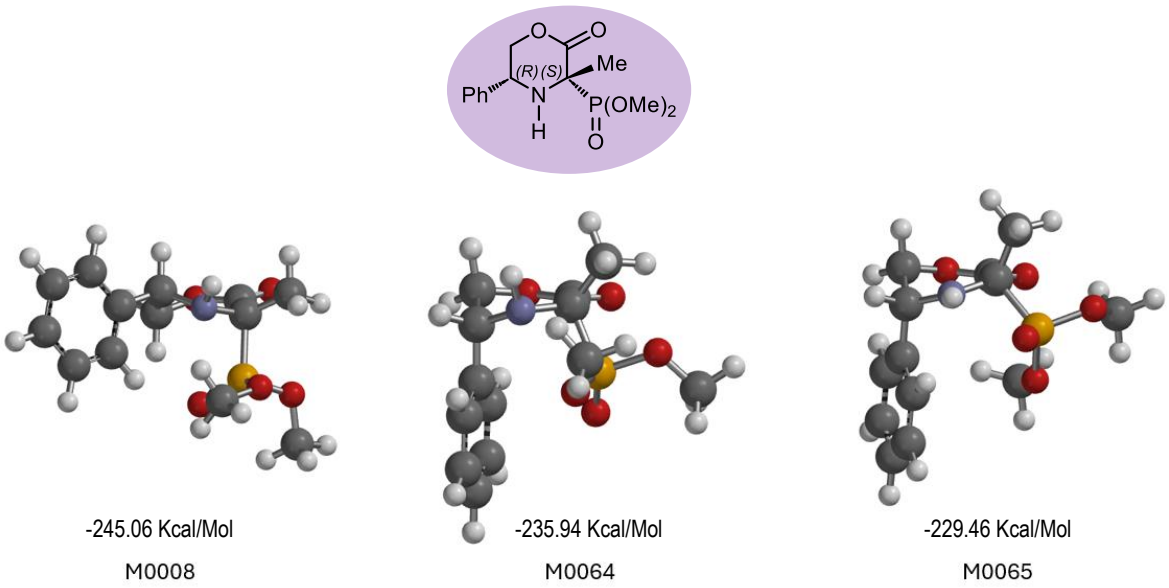
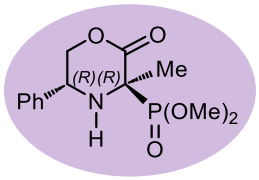


Figura 54. Análisis conformacional de **25a**.

Comparando los valores energéticos, es notable que la posición del grupo fenilo influye en el aspecto estérico, debido a esto, el confórmero más estable energéticamente es aquel donde el grupo fenilo está en posición ecuatorial, lejos del grupo fosfonato. Por el contrario, el confórmero menos estable es donde el grupo fenilo adopta una disposición axial, en consecuencia, el impedimento estérico genera un efecto de repulsión entre ambos sustituyentes.

Continuando con el análisis del diastereoisómero **25b**, se obtuvieron 33 confórmeros totales, seleccionando los siguientes tres: M0029 (-243.85 kcal/Mol), M0004 (-234.60 kcal/Mol) y M0033 (-229.84 kcal/Mol) como se muestra en la Figura 55.



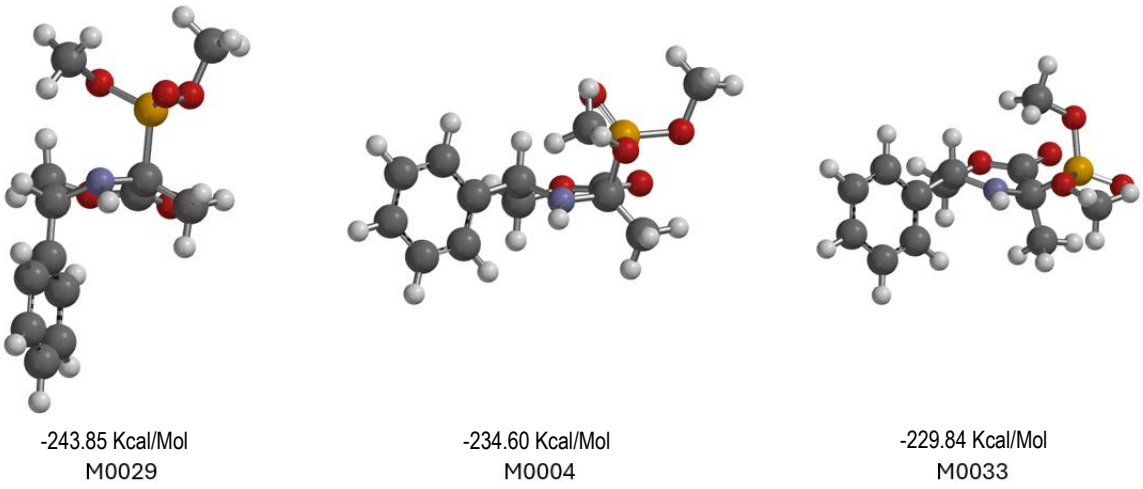


Figura 55. Análisis conformacional de **25b**.

Como se ve en la estructura 2D, el sustituyente fenilo y el grupo fosfonato se encuentran orientados de manera opuesta en el espacio. De manera que, el confórmero con mayor estabilidad energética dispone de ambos sustituyentes una orientación axial, mantenido los grupos lo más alejados entre sí, teniendo una diferencia de -14 kcal/Mol aproximadamente con el confórmero menos estable.

Mismo análisis se aplicó al siguiente par de diastereoisómeros, con el **25c**, de donde, se obtuvieron 36 confórmeros totales, de los cuales se seleccionaron los siguientes: M0006 (-245.06 kcal/Mol), M0023 (-234.85 kcal/Mol) y M0036 (-229.35 kcal/Mol) como se muestra en la Figura 15.

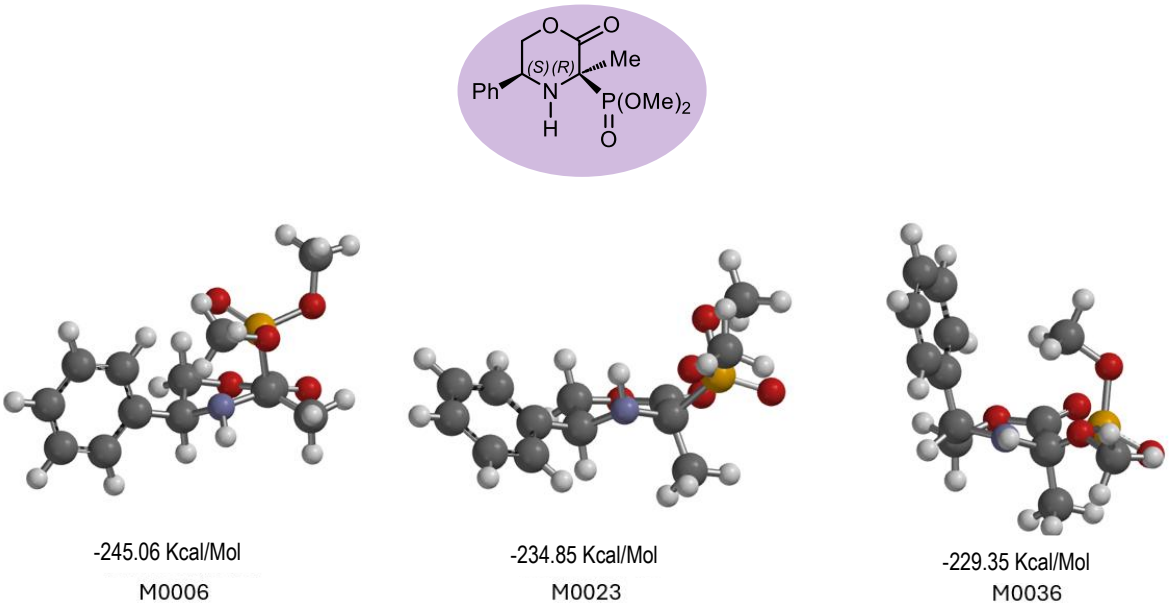


Figura 56. Análisis conformacional de **25c**.

Si bien, en la estructura 2D los sustituyentes fenilo y fosfonato se encuentran orientados hacia el mismo plano espacial, era de esperar que, el confórmero más inestable energéticamente presentara ambos grupos orientados en una orientación axial. Por otra parte, con una diferencia de -15.71 kcal/Mol aproximadamente, el confórmero con mayor estabilidad energética prefiere mantener el fenilo en una disposición ecuatorial y el fosfonato en axial. De modo que, el efecto estérico se ve disminuido por la mínima repulsión entre ambos grupos.

Finalmente, el último análisis conformacional realizado para el diasteroisómero **25d**, se obtuvieron 31 confórmeros totales y se seleccionaron los siguientes M0025 (-242.20 kcal/Mol), M0005 (-234.70 Kcal/mol) y M0031 (-230.37 kcal/Mol) como se muestra en la Figura 57.

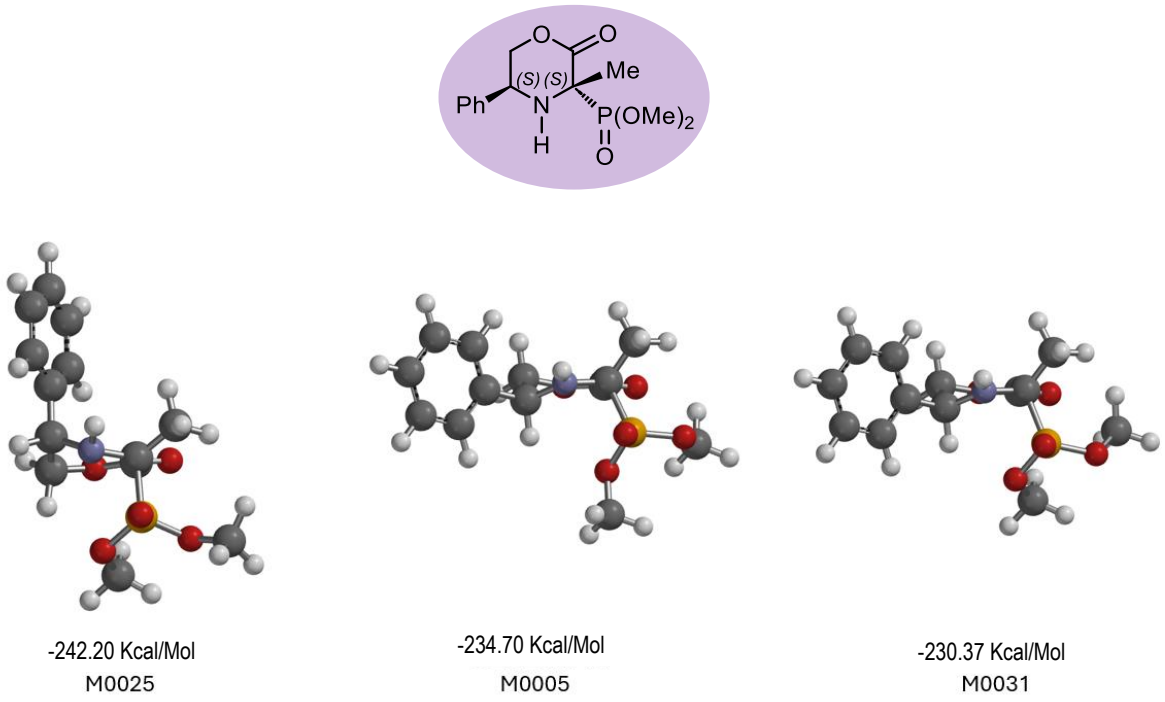


Figura 57. Análisis conformacional de **25d**.

En la estructura 2D los sustituyentes fenilo y fosfonato se encuentran orientados del lado contrario del plano espacial, por lo cual, el confórmero más estable energéticamente presentó ambos grupos orientados en disposición axial. Por otra parte, con una diferencia de -11.83 kcal/Mol aproximadamente, el confórmero con menor estabilidad energética prefiere mantener una orientación ecuatorial para el fenilo y axial para el fosfonato. Siendo el efecto estérico mayor por la repulsión entre los metoxilos cercanos al fenilo.

Con los resultados obtenidos de este análisis, se decidió evaluar el comportamiento de los tres confórmeros para la simulación de "acoplamiento molecular" en el sitio de unión de las COXs, ya que, si bien se sabe, no siempre el confórmero de menor energía es el que posee la actividad biológica deseada.

4.2.2. Cálculos del docking rígido y flexible.

Una vez realizado el análisis conformacional y seleccionados los confórmeros de interés, se continuo con el acoplamiento molecular (docking), el cual se realizó con el *software* Molegro Virtual Docker (MVD). Los cristales utilizados para este análisis fueron los mismos utilizados en el diseño del modelo predictivo descrito anteriormente. También, los parámetros utilizados para el docking rígido y flexible.

4.2.2.1. Docking rígido y flexible.

Una vez realizado los experimentos de acoplamiento molecular, se llevó a cabo el análisis de los resultados obtenidos, los cuales se discuten a continuación. El análisis se enfocó principalmente en tres aspectos: energía de unión ligando-receptor, comparación de la energía con la del AINE de referencia para cada uno de los cristales y posteriormente se analizaron las interacciones intermoleculares presentadas con los α-aminoácidos presentes en el sitio de unión.

En la siguiente tabla 5, se muestran las energías de interacción de uno de los tres confórmeros para cada uno de los compuestos de interés (PDBs), el cual fue seleccionado con respecto a su orientación dentro del sitio de unión y a su valor de energía de interacción.

Tabla 5. Resultados energéticos (kcal/mol) de los confórmeros seleccionados para cada uno de los sistemas de COX-1.

COX-1							
Compuestos/ PDB´s	1EQG (kcal/mol)	2OYU (kcal/mol)		3KK6 (kcal/mol)		4O1Z (kcal/mol)	
25d_MENOR	-92.331	25d_MENOR	-104.347	25d_MENOR	-88.855	25d_MENOR	-100.09
25c_MAYOR	-102.342	25c_INTER	-106.774	25c_MAYOR	-79.802	25c_INTER	-104.566
25a_MAYOR	-99.527	25a_MAYOR	-95.482	25a_INTER	-69.472	25a_MENOR	-94.345
25b_ _INTER	-109.296	25b_MENOR	-102.772	25b_INTER	-96.619	25b_MAYOR	-94.39

Para el caso del sistema 1EQG el confórmero 25d_MENOR se seleccionó en todos los sistemas. Sin embargo, en el caso del diastereoisómero **25c**, se conservó el confórmero de mayor energía en los sistemas 1EQG y 3KK6, así mismo, el confórmero de energía intermedia en 2OYU y 4O1Z, para el caso del confórmero **25a**, el predominante en dos de los sistemas (1EQG y 2OYU) fue el de mayor energía y finalmente, el confórmero **25b** predomino en dos de los sistemas el de energía intermedia (1EGQ y 3KK6) .Posteriormente, se realizó el cálculo de la diferencia de energía de cada uno de los compuestos con respecto al AINE del cristal de

referencia, evaluando así, el potencial y la selectividad de los compuestos de interés. En la Tabla 6 con las ΔE en los sistemas de COX-1.

Tabla 6. Resultado de la ΔE energética (kcal/mol) en los confórmeros seleccionados con respecto al sistema (AINE y COX-1) correspondiente.

COX -1							
1EQG (kcal/mol)		**2OYU** (kcal/mol)		**3KK6** (kcal/mol)		**4O1Z** (kcal/mol)	
Compuestos	$\Delta E=(E_{com})-(E_{ibu})$	**Compuestos**	$\Delta E=(E_{lig})-(E_{indo})$	**Compuestos**	$\Delta E=(E_{lig})-(E_{cele})$	**Compuestos**	$\Delta E=(E_{lig})-(E_{melo})$
25d_MENOR	4.239	25d_MENOR	41.563	25d_MENOR	73.505	25d_MENOR	-7.18
25c_MAYOR	-5.772	25c_INTER	39.136	25c_MAYOR	82.558	25c_INTER	-11.656
25a_MAYOR	-2.957	25a_MAYOR	50.428	25a_INTER	92.888	25a_MENOR	-1.435
25b _INTER	-12.726	25b_MENOR	43.138	25b_INTER	65.741	25b_MAYOR	-1.48

En el caso de los compuestos que mostraron una ΔE negativa, indican que el compuesto mostró una energía de unión más afín al sitio de unión que el AINE de referencia. Por otra parte, los valores de ΔE positivos muestran todo lo contrario, aquellos compuestos que obtuvieron una energía de unión con menor afinidad al sitio de unión en comparación con el AINE de referencia. En este contexto, se puede destacar que el confórmero con mayor selectividad con respecto al ibuprofeno (1EQG) es el 25b _INTER en comparación con su enantiómero 25d_MENOR, en el caso del sistema 2OYU ninguno de los confórmeros mostró mayor afinidad por el sitio de unión que la indometacina, siendo valores positivos ΔE en todos los casos, este mismo fenómeno se presentó en el sistema 3KK6, donde ninguno de los confórmeros mostró mayor energía de unión que el mismo fármaco de referencia (celecoxib). Por último, en el caso del sistema 4O1Z, todos los confórmeros mostraron una mayor afinidad de unión que el mismo AINE de referencia (meloxicam), en donde el confórmero 25c_INTER fue el que presentó mayor afinidad.

Esto nos lleva a realizar una primera selección de acuerdo con las ΔE obtenidas, el modo de interacción y la energía de interacción con residuos de α-aminoácidos principales en cada una de las isoformas, esto, en cada uno de los compuestos, mostrando así, que para el sistema donde se tiene al ibuprofeno como AINE de referencia (1EQG,COX-1), después de realizar una inspección cuidadosa, se llegó a la conclusión que el mejor candidato fue el confórmero 25a_MAYOR (M0065) con una valor de energía de -99.527 , valor de ΔE igual a -2.957 y las energías de interacción más fuertes con los α-aminoácidos Arg120, Ile23 y Ser530. En la siguiente Figura 58 se muestra: a) espacio ocupado por el ligando en la cavidad, b) las interacciones con los residuos de α-aminoácidos presentes en el sitio de unión, así como la disposición espacial de estos (3D) y, por último, c) un esquema en 2D del tipo de interacciones intermoleculares presentes ligando *vs* sitio de unión.

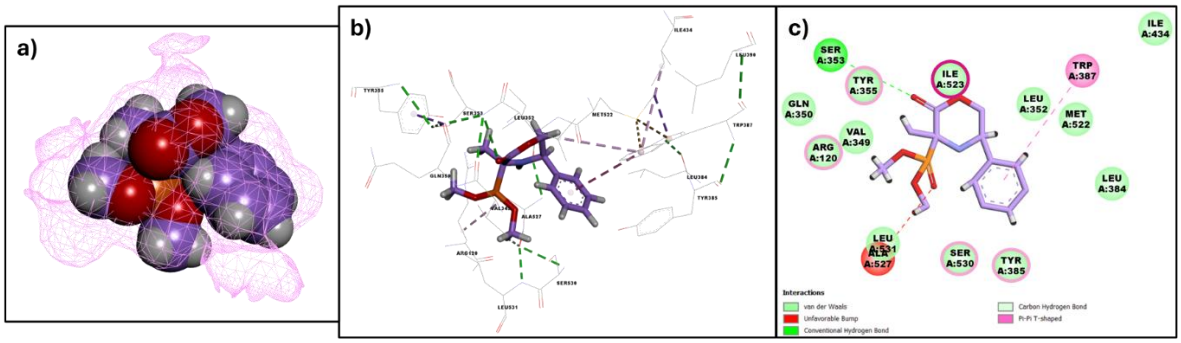


Figura 58. Modo de interacción del confórmero P3-1_MAYOR (M0065) sobre la isoforma COX-1(1EQG). a) En color morado ligando y color rosa (malla) la forma de la cavidad. b) En la representación 3D, los residuos de α-aminoácidos de interés en líneas con los colores por elemento, las líneas entrecortadas representan interacciones intermoleculares y, por último, el ligando en color morado (átomos de carbono) y de su elemento. c) Representación en 2D, α-aminoácidos en círculos de color rosa son los α-aminoácidos de importancia y presentes en ambas isoformas de COXs, en círculos de color magenta son para la isoforma de COX-1 y en la parte inferior la leyenda "interactions".

En primer lugar, en el inciso a) en la imagen se puede observar como el ligando ocupa gran área de la cavidad; sin embargo, no muestra un acomodo lineal, teniendo al fenilo en dirección a lo que es el grupo HEM o parte hidrofóbica, caso contrario, el grupo fosfonato orientado a la sección hidrofílica. A continuación, en el inciso b) se puede visualizar de una manera más certera la posición adoptada por el ligando, así como los residuos de α-aminoácidos que se encuentran cerca, manteniendo interacciones del tipo intermolecular. Finalmente, en el inciso c) se destaca el tipo de interacción entre el ligando y los residuos de α-aminoácidos, si bien, se observan interacciones de tipo Van der Waals, enlaces de hidrógeno, tipo π-π y enlaces carbono-hidrógeno, en particular aquellas con los residuos Tyr355, Arg120, Ser530, Tyr385, α-aminoácidos representativos en ambas isoformas de COXs y con Ile523, siendo este un α-aminoácido característico en la isoforma de COX-1.

Con respecto al sistema donde se tiene a la indometacina como el AINE de referencia (2OYU, COX-1), se llevó a cabo la inspección exhaustiva. De lo anterior resulta que, el mejor candidato fue el confórmero 25c_INTER_M0023 con un valor de energía de -106.774, valor de ΔE igual a 39.136 Kcal/mol y las energías de interacción más fuertes con los α-aminoácidos Tyr355, Tyr385. En la siguiente figura se muestra: a) espacio ocupado por el ligando en la cavidad, b) las interacciones con los residuos de aminoácidos presentes en el sitio de unión, así como la disposición espacial de estos (3D) y, por último, c) un esquema en 2D del tipo de interacciones intermoleculares presentes ligando *vs* sitio de unión.

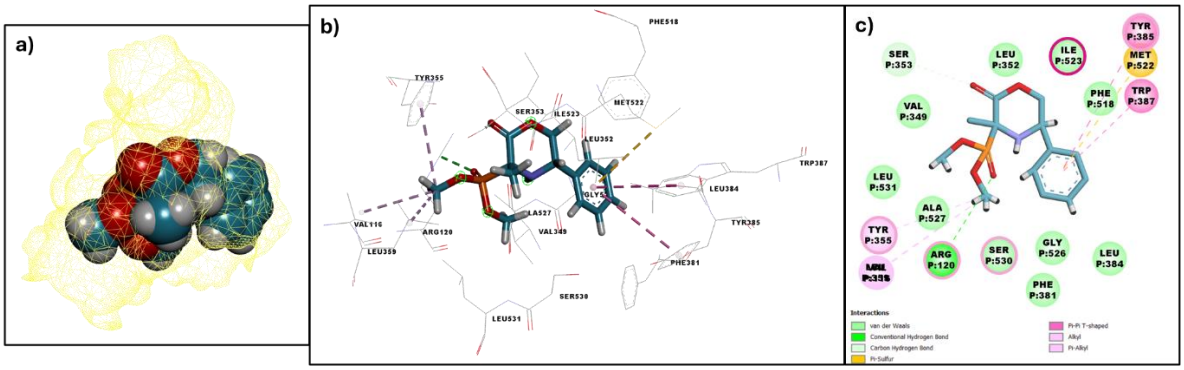


Figura 59. Modo de interacción del confórmero 25c_INTER (M0023) sobre la isoforma COX-1(2OYU). a) En color turquesa ligando y color amarillo (malla) la forma de la cavidad. b) En la representación 3D, los residuos de α-aminoácidos de interés en líneas con los colores por elemento, las líneas entrecortadas representan las interacciones intermoleculares y, por último, el ligando en color cian (átomos de carbono) y de su elemento. c) En la representación en 2D, los α-aminoácidos en círculos de color rosa son los α-aminoácidos de importancia y presentes en ambas isoformas de COXs, en círculos de color magenta son para la isoforma de COX-1 y en la parte inferior la leyenda "interactions".

En esta imagen, de lado izquierdo inciso a) se puede observar como el ligando ocupa gran proporción del espacio en la cavidad; sin embargo, se observa como un metilo se encuentra fuera de la red que representa la cavidad. Del mismo modo, el ligando toma una disposición espacial, donde el anillo aromático se encuentra próximo al grupo HEM, siendo esta la sección más hidrofóbica y el grupo fosfonato orientado hacia la sección más hidrofílica de acuerdo con los residuos de α-aminoácidos que se encuentran en esa sección. Posteriormente, en el inciso b) se visualiza la posición adoptada por el ligando dentro de la cavidad en una manera más espacial, al poder notar con cuales α-aminoácidos se está interactuando y que tipo de aminoácidos son. Por último, en el inciso c) se muestra una imagen en formato 2D, puntualizando los α-aminoácidos que interactúan con el ligando, así como el tipo de interacción intermolecular que llevan a cabo, cabe destacar la interacción de tipo enlace de hidrógeno que existe entre Arg120 y el átomo de oxígeno presente en el grupo fosfonato, interacción de tipo π-π entre el grupo fenilo y Tyr385, interacción del tipo π-alquilo presentes entre el metilo y Tyr355, cabe destacar que estos α-aminoácidos forman parte de ambas isoformas de COXs y, finalmente, la interacción tipo Van der Waals con Ile523, α-aminoácido único en la isoforma de COX-1. Aunque estas son las interacciones más destacadas debido a los α-aminoácidos presentes, se puede observar cómo se llevan a cabo otro tipo de interacciones como lo son: π-sulfuro, alquilo y enlaces de tipo carbono-hidrógeno.

Ahora bien, se describe el análisis para el caso del sistema donde se tiene al celecoxib como AINE de referencia (3KK6, COX-1), después del análisis exhaustivo de los resultados obtenidos, el mejor candidato para este sistema resulto ser el confórmero 25b_INTER_M0004 con un valor energético de -96.619 Kcal/mol, una ΔE igual a 65.74 Kcal/mol, al igual, que mostró energías de interacción mayores con los siguientes α-aminoácidos:

Ile523, Ser530, Tyr385. En la figura 60 se muestra: a) espacio ocupado por el ligando en la cavidad, b) las interacciones con los residuos de α-aminoácidos presentes en el sitio de unión, así como la disposición espacial de estos (3D) y, por último, c) un esquema en 2D del tipo de interacciones intermoleculares presentes ligando *vs* sitio de unión.

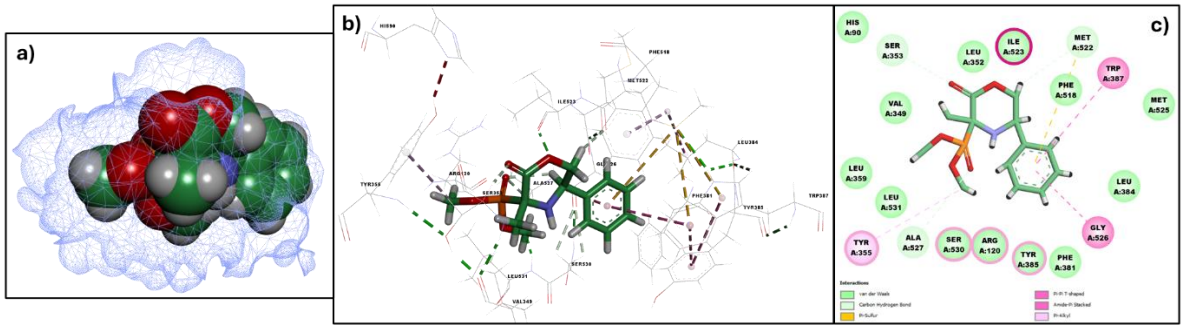


Figura 60. Modo de interacción del confórmero 25b_INTER (M0004) sobre la isoforma COX-1(3KK6). a) En color verde ligando y de color azul (malla) la forma de la cavidad. b) En la representación 3D, los residuos de α-aminoácidos de interés se simbolizan en líneas con los colores por elemento, las líneas entrecortadas representan las interacciones intermoleculares y, por último, el ligando en color verde (átomos de carbono) y de su elemento. c) En la representación en 2D, los α-aminoácidos en círculos de color rosa son los α-aminoácidos de importancia y presentes en ambas isoformas de COXs, en círculos de color magenta son para la isoforma de COX-1 y en la parte inferior la leyenda "interactions".

Como se observa en la figura, en el inciso a) de lado izquierdo con una representación de esferas de Van der Waals, la ocupación del ligando sobre la cavidad del sitio activo, en donde, la mayor parte del ligando se encuentra dentro de la cavidad; sin embargo, el grupo metilo sobresale de este espacio. Además, de una disposición espacial, donde el grupo polar como el fosfonato se encuentra en dirección a la zona hidrofílica y el fenilo próximo a la zona hidrofóbica. Continuando, en el inciso b) se representan las interacciones entre el ligando y los residuos de α-aminoácidos participantes, así como la posición que estos adoptan. Para terminar, en el inciso c) se puede observar en un formato 2D la representación de las interacciones más importantes para este complejo, como lo son: con Ile523 del tipo Van der Waals, cabe destacar que este residuo de α-aminoácido es específico para esta isoforma, una interacción de tipo π-alquilo con Tyr355 y finalmente, con Ser530, Arg120 y Tyr385 interacciones del tipo Van der Waals, estos últimos α-aminoácidos se encuentran presentes en ambas isoformas de COXs

Como último análisis para COX-1, se muestra a continuación el sistema de meloxicam como AINE de referencia (4O1Z), como en los sistemas anteriores, se realizó una inspección exhaustiva de los resultados obtenidos. Por consiguiente, el mejor candidato fue el confórmero 25c_INTER_M0023 con un valor de energía de unión igual a -104.566 Kcal/mol y un valor de ΔE igual a -11.656 Kcal/mol, aunado a esto, mostró energías de interacción

mayores con los siguientes α-aminoácidos Arg120 y Ser530. Ahora bien, en la Figura 61 se muestra: a) espacio ocupado por el ligando en la cavidad, b) las interacciones con los residuos de α-aminoácidos presentes en el sitio de unión, así como la disposición espacial de estos (3D) y, por último, c) un esquema en 2D del tipo de interacciones intermoleculares presentes ligando *vs* sitio de unión

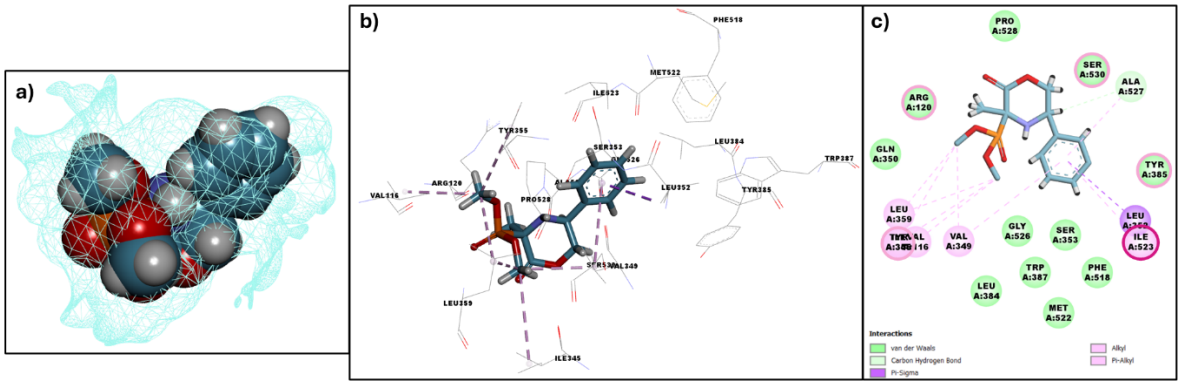


Figura 61. Modo de interacción del confórmero 25c_INTER (M0023) sobre la isoforma COX-1(4O1Z). a) En color turquesa ligando y de color cian (malla) la forma de la cavidad. b) En la representación 3D, los residuos de α-aminoácidos de interés se simbolizan en líneas con los colores por elemento, las líneas entrecortadas representan las interacciones intermoleculares y, por último, el ligando en color verde-agua (átomos de carbono) y de su elemento. c) En la representación en 2D, los α-aminoácidos en círculos de color rosa son los α-aminoácidos de importancia y presentes en ambas isoformas de COXs, en círculos de color magenta son para la isoforma de COX-1 y en la parte inferior la leyenda "interactions".

Un análisis más detallado de la pose adoptada e interacciones entre el sitio de unión y el ligando se muestra en la Figura 61. Donde, en el inciso a) se puede visualizar el espacio ocupado por el ligando sobre la cavidad, en donde uno de los grupos metoxilo se encuentra fuera de la red, por el contrario, el resto del compuesto se encuentra dentro de la cavidad. Continuando así, con el análisis de las interacciones presentes entre el ligando y los α-aminoácidos dentro de la cavidad representados en el inciso b), del mismo modo, se nota un posicionamiento del tipo "V" por parte del ligando, a su vez, conserva la misma orientación con respecto a las zonas hidrofóbicas e hidrofílicas que en los sistemas anteriores. Para culminar este análisis, en el inciso c), se muestra con más detalle las interacciones presentes en el complejo enzima-ligando, destacando la interacción de tipo π-alquilo con Ile523, α-aminoácido único en la isoforma COX-1; otras de las interacciones importantes son las de tipo: Van der Waals con ARG120, SER530 y TYR385, del tipo π-alquilo con Tyr355, estos últimos α-aminoácidos se encuentran en ambas isoformas de COXs.

Para concluir el análisis de los resultados para los sistemas de COX-1, se prosiguió, con los sistemas seleccionados para COX-2 de acuerdo con el modelo predictivo anteriormente elaborado. Del mismo modo que, en el caso de COX-1, se realizaron los experimentos de acoplamiento molecular sobre cada uno de los 3

confórmeros seleccionados para los compuestos de interés. El análisis se enfocó principalmente en tres aspectos: energía de interacción ligando-receptor, comparación de la energía con la del AINE de referencia para cada uno de los cristales y posteriormente se analizaron las interacciones intermoleculares presentadas con los α-aminoácidos presentes en el sitio de unión. En la Tabla 7, se muestran las energías de unión de uno de los 3 confórmeros (seleccionado con respecto a la pose adoptada y a la energía obtenida) para cada uno de los compuestos de interés.

Tabla 7. Resultados energéticos (kcal/mol) de los confórmeros seleccionados para cada uno de los sistemas de COX-2.

COX-2							
Compuestos /PDB´s	**4PH9** (kcal/mol)	**4COX** (kcal/mol)		**3NL1** (kcal/mol)		**4M11** (kcal/mol)	
25d_MAYOR	-90.831	25d_INTER	-110.892	25d_MENOR	-96.808	25d_MENOR	-90.684
25c_INTER	-104.273	25c_INTER	-112.666	25c_MENOR	-105.052	25c_MAYOR	-95.665
25a_MENOR	-94.731	25a_MENOR	-113.448	25a_MAYOR	-103.269	25a_MAYOR	-97.169
25b_MAYOR	-109.053	25b_MAYOR	-120.613	25b_MAYOR	-114.524	25b_MAYOR	-92.887

En la Tabla 8, las columnas muestran los resultados de la energía de unión de cada uno de los conformeros seleccionados para cada sistema en COX-2. Al igual que en los sistemas de COX-1, el confórmero seleccionado no fue el mismo en todos los sistemas a excepción del confórmero de mayor energía **25b**, caso opuesto al de su enantiómero **25d**, donde se observó un comportamiento diferente ya que los tres confórmeros estuvieron presentes en al menos en uno de los sistemas, a excepción del confórmero de menor energía, el cual estuvo presente en dos sistemas (3NL1 y 4M11). Por otra parte, el siguiente par enantiomérico **25c** y **25a**; donde, para el primer confórmero que prevaleció en dos de los sistemas fue el de energía intermedia (4PH9 y 4COX) y para el segundo confórmero se observó que el confórmero de menor energía estuvo presente en los sistemas (4PH9 y 4COX) y el confórmero de mayor energía en los sistemas (3NL1 y 4M11).

Tabla 8. Resultado de la ΔE energética en los confórmeros seleccionados con respecto al sistema (AINE y COX-2) correspondiente.

COX -2							
4PH9 (kcal/mol)		**4COX** (kcal/mol)		**3NL1** (kcal/mol)		**4M11** (kcal/mol)	
Compuestos	$\Delta E=(E_{com})-(E_{ibu})$	**Compuestos**	$\Delta E=(E_{lig})-(E_{indo})$	**Compuestos**	$\Delta E=(E_{lig})-(E_{cele})$	**Compuestos**	$\Delta E=(E_{lig})-(E_{melo})$
25d_MAYOR	4.829	25d_INTER	39.708	25d_MENOR	72.742	25d_MENOR	24.716
25c_INTER	-8.613	25c_INTER	37.934	25c_MENOR	64.498	25c_MAYOR	19.735
25a_MENOR	0.929	25a_MENOR	37.152	25a_MAYOR	66.281	25a_MAYOR	18.231
25b_MAYOR	13.393	25b_MAYOR	29.987	25b_MAYOR	55.026	25b_MAYOR	22.513

Los resultados se interpretan de la siguiente manera: los compuestos que mostraron una ΔE negativa, indican que el compuesto mostró una energía de unión más afín al sitio de unión que el AINE de referencia, y los valores

de ΔE positivos muestran todo lo contrario, aquellos compuestos que obtuvieron una energía de unión con menor afinidad al sitio de unión en comparación con el AINE de referencia.

A manera de resumen, se puede destacar que, el confórmero con mayor selectividad (afinidad por el sitio de unión) mostrada en el sistema ibuprofeno (4PH9,COX-2) es 25b_MAYOR con un valor de ΔE -13.393 Kcal/mol, caso contrario a su enantiómero 25d_MAYOR con un valor de ΔE 4.829 Kcal/mol, en el caso del sistema de indometacina (4COX, COX-2) ninguno de los 4 diastereoisómeros mostró mayor afinidad que el AINE de referencia, obteniendo valores positivos, aun así, el confórmero que obtuvo mayor energía de unión fue 25b_MAYOR con un ΔE igual a 29.987 Kcal/mol. Del mismo modo, en los siguientes sistemas: celecoxib (3KK6, COX-2) y meloxicam (4M11, COX-2), todos los confórmeros mostraron valores positivos para ΔE, dando a entender que ninguno de los compuestos mostro una mayor afinidad que los AINEs de referencia. No obstante, se presenta un análisis más robusto de cada uno de los confórmeros seleccionados para cada sistema. Este análisis se realizó mediante la selección de las ΔE obtenidas, el modo de interacción y la energía de interacción con residuos de α-aminoácidos principales en cada una de las isoformas.

En la Figura 62, se muestra el análisis que se llevó a cabo sobre el sistema donde se tiene el ibuprofeno como el AINE de referencia (4PH9, COX-2), siendo el mejor candidato el confórmero 25a_MENOR (M0008) con un valor de energía de -94.731 Kcal/mol, valor de ΔE igual a 0.929 Kcal/mol y las energías de interacción más fuertes con los α-aminoácidos Arg121, Tyr356 y Val524. A continuación, se muestra: a) espacio ocupado por el ligando en la cavidad, b) las interacciones con los residuos de α-aminoácidos presentes en el sitio de unión, así como la disposición espacial de estos (3D) y, por último, c) un esquema en 2D del tipo de interacciones intermoleculares presentes ligando *vs* sitio de unión.

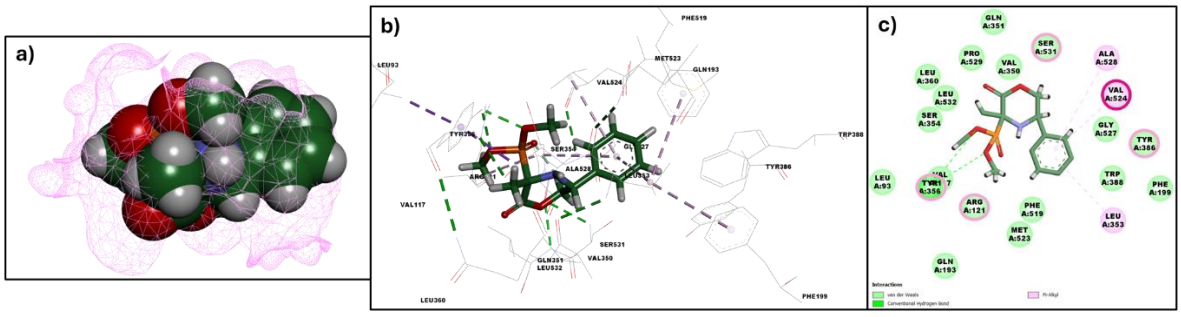


Figura 62. Modo de interacción del confórmero 25a_MENOR (M0008) sobre la isoforma COX-2 (4PH9). a) En color verde ligando y de color rosa (malla) la forma de la cavidad. b) En la representación 3D, los residuos de α-aminoácidos de interés se simbolizan en forma de líneas con los colores por elemento, las líneas entrecortadas representan las interacciones intermoleculares y, por último, el ligando en color verde (átomos de carbono) y de su elemento. c) En la representación en 2D, los α-aminoácidos encerrados en

círculos de color rosa son los α-aminoácidos de importancia y presentes en ambas isoformas de COXs, en círculos de color magenta son para la isoforma de COX-2 y en la parte inferior de la imagen se destaca la leyenda “interactions”.

Se puede observar que, en el inciso a) la visualización del espacio ocupado por el ligando sobre la cavidad, el grupo metilo y el fenilo se encuentra parcialmente fuera de la malla, la disposición está horizontalmente un poco desplazada a la derecha, como tal, no centrada en la cavidad. Para el análisis de las interacciones, entre el ligando y los α-aminoácidos dentro de la cavidad, se representan en el inciso b), se nota un posicionamiento no lineal sobre el eje de las equis por parte del ligando; sin embargo, conserva la misma orientación con respecto a las zonas hidrofóbicas e hidrofílicas como el AINE de referencia, además, se puede observar la presencia de α-aminoácidos del tipo aromáticos dentro de la cavidad. Finalmente, el inciso c) muestra con detalle todas las interacciones presentes en el complejo enzima-ligando, destacando a los residuos más representativos en las interacciones con los AINEs como lo son: de tipo π-alquilo con Val524 (α-aminoácido presente únicamente en la isoforma COX-2), interacciones de tipo enlace de hidrógeno con Tyr356 y finalmente, las interacciones de tipo Van der Waals con Ser531, Tyr386 y Arg121.

El segundo análisis, se enfocó en el sistema de indometacina (4COX, COX-2). En la Figura 63 se muestra la elección del mejor candidato 25a_MENOR (M0008) con un valor de energía de -113.448 Kcal/mol, valor de ΔE igual a 37.152 Kcal/mol. A continuación, se muestra: a) espacio ocupado por el ligando en la cavidad, b) las interacciones con los residuos de α-aminoácidos presentes en el sitio de unión, así como la disposición espacial de estos (3D) y, por último, c) un esquema en 2D del tipo de interacciones intermoleculares presentes ligando *vs* sitio de unión.

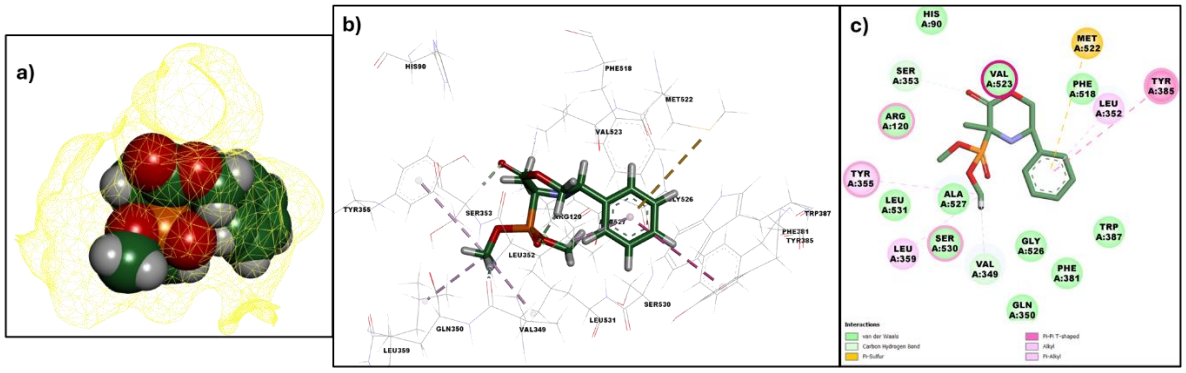


Figura 63. Modo de interacción del confórmero 25a_MENOR (M0008) sobre la isoforma COX-2 (4COX). a) En color verde ligando y de color amarillo (malla) la forma de la cavidad. b) En la representación 3D, los residuos de α-aminoácidos de interés se simbolizan en forma de líneas con los colores por elemento, las líneas entrecortadas representan las interacciones intermoleculares y, por último, el ligando en color magenta (átomos de carbono) y de su elemento. c) En la representación en 2D, los α-aminoácidos en círculos de color rosa son los α-aminoácidos de importancia y presentes en ambas isoformas de COXs, en círculos de color magenta son para la isoforma de COX-2 y en la parte inferior de la imagen se destaca la leyenda “interactions”.

En esta Figura se muestra en el inciso a) el espacio ocupado por el ligando sobre la cavidad; sin embargo, el sustituyente metilo del grupo fosfonato se encuentra fuera de la malla, el resto de la estructura se distribuye de manera uniforme. Además, la disposición del ligando es parcialmente lineal sobre el eje de las equis. Por otra parte, el análisis de las interacciones presentes entre el ligando y los α-aminoácidos dentro de la cavidad se representa en el inciso b) donde se observa que mantiene una orientación similar hacia las zonas hidrofóbicas e hidrofílicas como la indometacina (AINE de referencia). Adicionalmente, se observa la presencia de α-aminoácidos aromáticos y alifáticos no polares dentro de la cavidad. Por último, en el inciso c) se destacan las interacciones más significativas del tipo π-π (Tipo T) del fenilo con Tyr385, π-alquilo entre Tyr355 y el sustituyente metoxilo (-OCH_3) y, finalmente las interacciones de Van de Waals con Ser530, Arg120 y Val523, siendo este último α-aminoácido único de la isoforma COX-2.

Continuando con el análisis del confórmero seleccionado para el sistema de celecoxib (3LN1, COX-2). En la Figura 64 se muestra la elección del mejor candidato 25d_MENOR (M0025) con un valor de energía de -96.808 Kcal/mol, valor de ΔE igual a 72.742 Kcal/mol. Enseguida, se muestra: a) espacio ocupado por el ligando en la cavidad, b) las interacciones con los residuos de α-aminoácidos presentes en el sitio de unión, así como la disposición espacial de estos (3D) y, por último, en c) se muestra un esquema en 2D del tipo de interacciones intermoleculares presentes ligando *vs* sitio de unión.

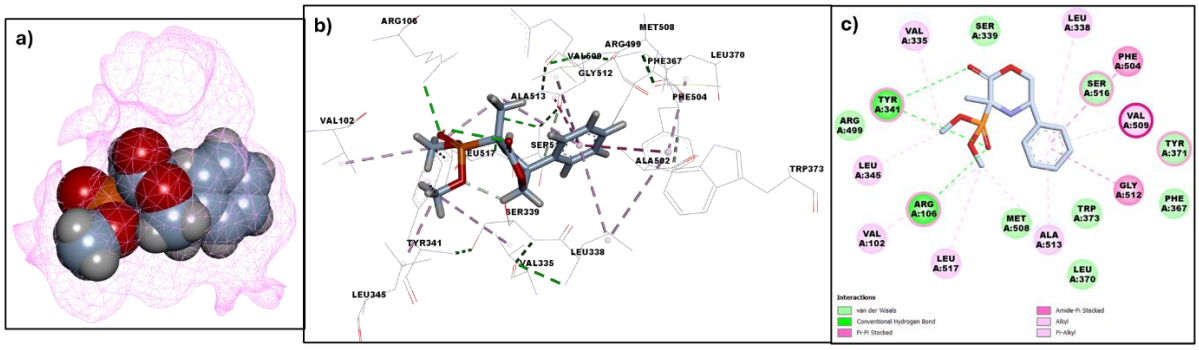


Figura 64. Modo de interacción del confórmero 25d_MENOR (M0025) sobre la isoforma COX-2(3LN1). a) En color azul-pastel el ligando y de color rosa (malla) la forma de la cavidad. b) En la representación 3D, los residuos de α-aminoácidos de interés se simbolizan en forma de líneas con los colores por elemento, las líneas entrecortadas representan las interacciones intermoleculares y, por último, el ligando se muestra en color verde (átomos de carbono) y de su elemento. c) En la representación en 2D, los α-aminoácidos en círculos de color rosa son α-aminoácidos de importancia y presentes en ambas isoformas de COXs, en círculos de color magenta son para la isoforma de COX-2 y en la parte inferior de la imagen se destaca la leyenda "interactions".

En el inciso a) mediante la representación de esferas de Van der Waals, se observa el espacio ocupado por el ligando en la cavidad, una orientación lineal sobre el eje de las equis y con un 96% aproximadamente de la estructura dentro de la cavidad. Continuando con el análisis de las interacciones entre ligando y los α-aminoácidos dentro de la cavidad, se representa en el inciso b), con una orientación respecto a las zonas hidrofóbicas e hidrofílicas de acuerdo con los sustituyentes del ligando, teniendo la presencia de α-aminoácidos: cargados positivamente como Arg, aromáticos no polares como Phe, Tyr y Trp y alifáticos no polares como Met, Ala, Val, Gly y Leu. Finalmente, en el inciso c) se detallan las interacciones presentes en el complejo enzima-ligando, destacando la interacción de Van der Waals con Ser516 y Tyr371, una interacción π-alquilo entre el α-aminoácido Val509 y el fenilo, enlaces de hidrógeno entre Tyr341 y el oxígeno del grupo carbonílico y fosfonato y, Arg106 con el oxígeno del grupo fosfonato.

El último análisis, se enfocó en el sistema de meloxicam (4M11, COX-2). En la Figura 24 se muestra la elección del mejor candidato 25d_MENOR (M0025) con un valor de energía de -90.684 Kcal/mol, valor de ΔE igual a 24.716 Kcal/mol. En principio, en el inciso: a) se muestra el espacio ocupado por el ligando en la cavidad, b) las interacciones con los residuos de α-aminoácidos presentes en el sitio de unión, así como la disposición espacial de estos (3D) y, por último, c) un esquema en 2D del tipo de interacciones intermoleculares presentes ligando *vs* sitio de unión.

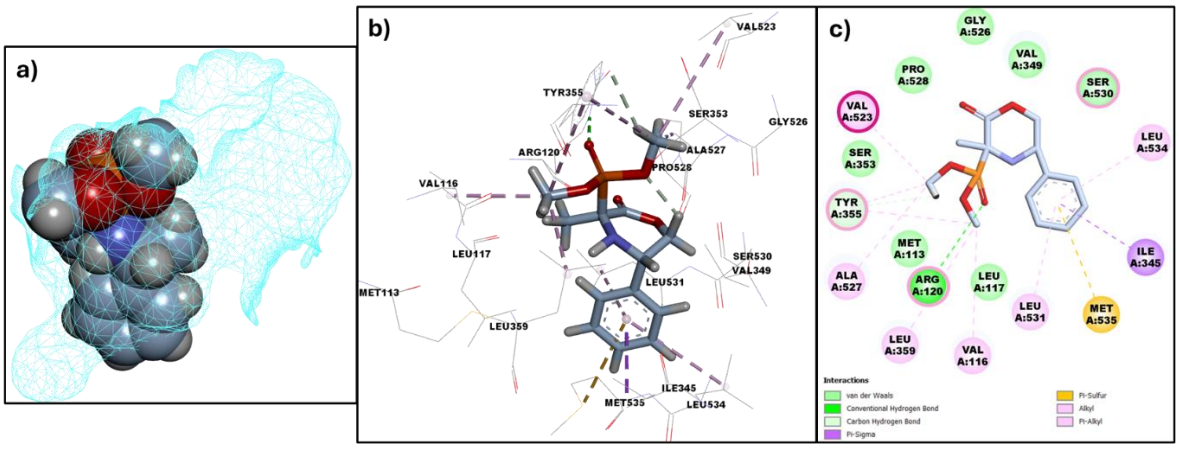


Figura 65. Modo de interacción del confórmero 25d_MENOR (M0025) sobre la isoforma COX-2(4M11). a) En color azul pastel el ligando y de color cian (malla) la forma de la cavidad. b) En la representación 3D, los residuos de α-aminoácidos de interés se simbolizan en forma de líneas con los colores por elemento, las líneas entrecortadas representan las interacciones intermoleculares y, por último, el ligando se muestra en color verde-agua (átomos de carbono) y de su elemento. c) En la representación en 2D, los α-aminoácidos en círculos de color rosa son α-aminoácidos de importancia y presentes en ambas isoformas de COXs, en círculos de color magenta son para la isoforma de COX-2 y en la parte inferior de la imagen se destaca la leyenda "interactions".

En este caso en específico, en el inciso a) la visualización del espacio ocupado por el ligando sobre la cavidad es bastante adecuada, ya que tiene un alto porcentaje de ocupación, con un acomodo vertical en dirección del lado izquierdo de la cavidad lo que asemeja un segmento de la estructura del meloxicam (AINE de referencia). Para el análisis de las interacciones presentes entre el ligando y los α-aminoácidos dentro de la cavidad, se ve representado en el inciso b) una orientación vertical en el eje de las "Y" y una orientación con respecto a las zonas hidrofóbicas e hidrofílicas como el AINE de referencia, además, se puede observar una disminución de α-aminoácidos aromáticos dentro de la cavidad y un aumento de alifáticos no polares, esto debido a la sub-cavidad característica de este sistema. Finalmente, el inciso c) muestra las interacciones presentes en el complejo enzima-ligando, destacando la interacción de tipo enlace de hidrógeno entre Arg120 y el oxígeno del grupo fosfonato, interacciones de Van der Waals con Ser530, interacciones tipo alquilo entre Val523 y el metoxilo (-OCH_3) y finalmente del tipo π-alquilo y enlace carbono-hidrógeno entre Tyr355 y ambos grupos metoxilo (-OCH_3) presentes en el grupo fosfonato.

En resumen, en la Tabla 9 se muestran los datos del confórmero (diseño) con mayor probabilidad de inhibición de las COXs. En consecuencia, con los resultados obtenidos del experimento de acoplamiento molecular para cada sistema seleccionado.

Tabla 8. Propuesta de los diseños con mayor probabilidad de inhibición de las COXs.

DATOS/SISTEMAS /DISEÑO	COX-1			
	1EQG	2OYU	3KK6	4O1Z
	25a_MAYOR (M0065)	25c_INTER (M0023)	25b_INTER (M0004)	25c_INTER (M0023)
Energía de interacción (kcal/mol)	-99.527	-106.774	-96.619	-104.566
$\Delta E=(E_{lig})-(E_{AINE})$ (kcal/mol)	-2.957	39.136	92.888	-11.656
α-aminoácidos importantes presentes (mayor energía de interacción)	Arg120, Ile523, Ser530,	Tyr385	Ile523, Ser530, Tyr385	Arg120, Ser530
DATOS/SISTEMAS /DISEÑO	COX-2			
	4PH9	4COX	3LN1	4M11
	25a_MENOR (M0008)	25a_MENOR (M0008)	25d_MENOR (M0025)	25d_MENOR (M0025)
Energía de Interacción (kcal/mol)	-94.731	-113.448	-96.808	-90.684
$\Delta E=(E_{lig})-(E_{AINE})$ (kcal/mol)	0.929	37.152	72.742	24.716
Aminoácidos de referencia presentes (mayor energía de interacción)	Arg121, Tyr356	Arg121, Tyr356, Val524	Arg106, Tyr341	Arg121, Tyr356

Las columnas de color verde corresponden a los compuestos con mayor probabilidad de éxito como inhibidores de las COXs.

De la Tabla 9, se puede deducir que los compuestos con mayor probabilidad para la inhibición de COXs son los siguientes: **25c** como inhibidor de la COX-1 en su conformación de energía M0023 debido a que la

reproducibilidad de este confórmero fue obtenida en dos de los cuatro sistemas totales. Finalmente, en el sistema de COX-2, **25a** obtuvo mejores predicciones como inhibidor de esta isoforma en su conformación de menor energía M0008 al ser reproducible en dos de los cuatro sistemas. No obstante, **25d** también fue reproducible en dos de los cuatro sistemas; sin embargo, promediando las energías de interacción, las ΔE, así como, la cantidad de α-aminoácidos presentes nos lleva a confirmar la selección de 25a_MENOR como el mejor candidato.

5. Conclusión

De este capítulo, se concluye que, la utilización del modelo propuesto en la predicción de la actividad inhibitoria de las COXs en compuestos de nuestro interés como lo son los α-aminofosfonatos heterocíclicos, permitió evaluar los tres principales confórmeros de energía para cada uno de los cuatro diastereoisómeros propuestos como compuestos con potencial actividad antiinflamatoria de forma rápida, eficaz y optima. Así mismo, se logró identificar como potenciales inhibidores de las COXs a los compuestos **25a** y **25c** (Figura 66).

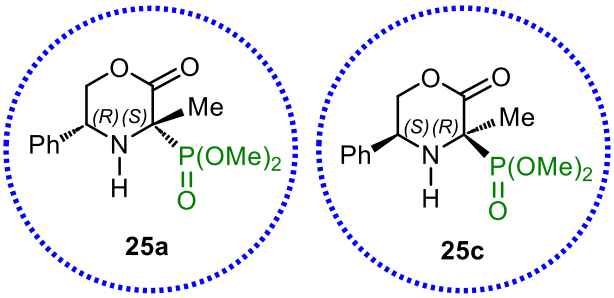


Figura 66. Propuesta de α-aminofosfonatos heterocíclicos con potencial actividad inhibitoria para COXs.

Como se puede observar en la Figura 66, ambas estructuras tienen una relación enantiomérica; sin embargo, los resultados muestran que a pesar de ser enantiómeros su selectividad hacia ambas isoformas es diferente. Es de importancia enfatizar esto, dado que con los experimentos de acoplamiento molecular y el análisis exhaustivo permitió obtener resultados de acuerdo con la estereoquímica de la estructura; parte fundamental dentro del diseño de fármacos. Por último, teniendo estos compuestos como posibles candidatos, será un reto poder llevar a cabo la síntesis enantiomericamente pura de cada uno de ellos.

6. Material y Métodos utilizados en los experimentos de acoplamiento molecular de los α-aminofosfonatos heterocíclicos como potenciales inhibidores de las COXs.

6.1. Selección de PDBs.

Los cristales de COXs utilizados para el experimento de acoplamiento molecular fueron los mismos que se utilizaron en el modelo de predicción (Capítulo I) obtenidos del servidor Protein Data Bank.[45] Los PDB´s elegidos incluyen 1EQG (2.6 Å), 2OYU (2.7 Å) 3KK6 (2.75 Å) y 4O1Z (2.4 Å) para la COX-1 y 4PH9 (1.81 Å), 4COX (2.9 Å), 3NL1 (2.15 Å) y 4M11 (2.45 Å) para la COX-2

6.2. Construcción y análisis estructural de los ligandos.

La construcción y el análisis consistió en llevar a cabo la optimización geométrica de los α-aminofosfonatos heterocíclicos; utilizando el software SPARTAN 20,[46]con un nivel de teoría semi-empírico con el método paramétrico 6 (PM6). Posteriormente, se llevó a cabo un análisis conformacional con un cálculo previo de mecánica molecular, utilizando el campo de fuerza MMFF (Merck Molecular Force Field), y analizando 10,000 confórmeros para determinar un rango de (mayor al de menor energía).

6.3. Metodología y cálculos utilizados en el acoplamiento molecular.

Los cálculos de acoplamiento molecular se llevaron a cabo en Molegro Virtual Docker 6.0,[47] empleando los cristales seleccionados de Protein Data Bank (mencionados en el Capítulo I). Para la COX-1 se utilizaron (PDB: 1EQG), (2OYU), (3KK6), (4O1Z), y para la COX-2 (PDB: 4PH9), (4COX), (3NL1), y (4M11). Los sitios de unión (definidos como cavidades) de la COX-1 y la COX-2 fueron las mismas que en el modelo predictivo. Se eliminaron todas las moléculas de agua del cristal. Se realizaron acoplamientos rígidos y flexibles, siguiendo la metodología descrita en el Capítulo I, para el modelo predictivo.

---

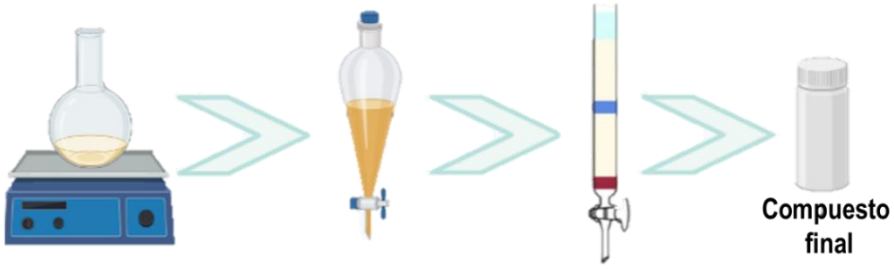
[45] Berman, H. M.; Westbrook, Z. F.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissing, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 235-242.

[46] Hehre, W. J. A Guide to Molecular Mechanics and Quantum Chemical Calculations; Wavefunction: Irvine, CA, USA, **2003**; Volume 2.

[47] Thomsen, R.; Christensen, M. H. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3315-3321.

Capítulo III

~Síntesis de α-aminofosfonatos heterocíclicos enantiomericamente enriquecidos~



1. Introducción

Durante las últimas décadas, la síntesis y la incorporación de α-aminofosfonatos heterocíclicos, caracterizados por la presencia de un grupo fosfonato unido a un carbono en posición alfa y adyacente a un grupo amino dentro de una estructura cíclica (Figura 67), han ganado atención como peptidomiméticos conformacionalmente restringidos y análogos de α-aminoácidos no proteicos, ya que, puede mejorar las propiedades farmacológicas al fijar conformaciones bioactivas.[48]

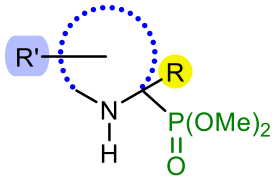


Figura 67. Estructura base del α-aminofosfonato heterocíclico.

Además, esta clase de compuestos han presentado una gama de actividades farmacológico como: inhibidores de enzimas (proteasas, aminopeptidasas, etc.) o moduladores de rutas biológicas,[49] antibacteriales,[50] neurológicas,[51] antifúngica,[52] antitumoral,[53] antiinflamatorias[54] (Figura 67).

[48] (a) Ordóñez, M.; Rojas-Cabrera, H.; Cativiela, C. *Tetrahedron*. **2009**, *65*, 17-49; (b) Tiwari, R. K.; Singh, D.; Singh, J.; Yadav, V.; Pathak, A. K.; Dabur, R.; Chhillar, A. K.; Singh, R.; Sharma, G. L.; Chandra, R.; Verma, A. K. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. **2006,** *16*, 413-416; (c) Belyaev, A.; Zhang, X.; Augustyns, K.; Lambeir, A. M.; De Meester, I.; Vedernikova, I.; Scharpé, S.; Haemers, A. *J. Med. Chem*. **1999**, *42*, 1041-1052; (d) Gibson, S. E.; Guillo, N.; Tozer, M. J. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 585-615; (e) Adams, D. R.; Perez, C.; Maillard, M.; Florent, J. C.; Evers, M.; Hénin, Y.; Simon, L.; Litvak, L.; Monneret, C.; Grierson, D. S. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 1550-1558; (f) Boduszek, B.; Oleksyszyn, J.; Kam, C. M.; Selzler, J.; Smith, R. E.;Powers, J. C. *J. Med. Chem*. **1994**, *37*, 3969-3976.

[49] (a) Boduszek, B.; Oleksyszyn, J.; Kam, C. M.; Selzler, J.; Smith, R. E.; Powers, J. C. *J. Med Chem.* **1994**, *37*, 3969-3976.

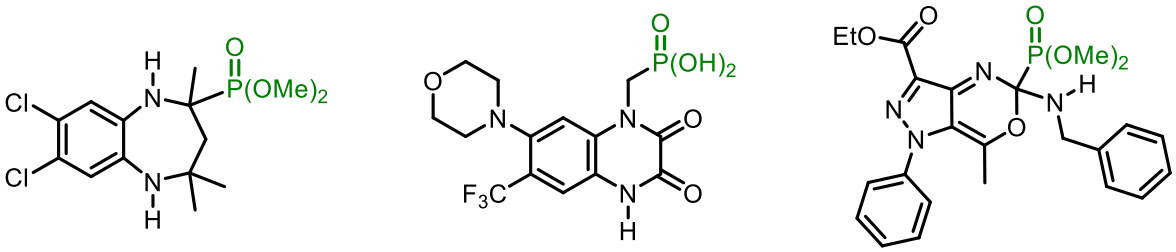
[50] Doğan, Ö.; Babiz, H.; Gözen, A. G.; Budak, S. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 2485-2489; (b) Bhattacharya, A. K.; Rana, K. C.; Raut, D. S.; Mhaindarkar, V. P.; Khan, M. I. *Org. Biomol. Chem*. **2011**, *9*, 5407-5413.

[51] (a) Eckhard, O.; Huth, A.; Kruger, M.; Schneider, H.; Neuhaus, R.; McDonald, F.; Lofberg, B.; Turski, L. *Biomed. Health Res*. **2001**, *45*, 329-344; (b) Turski, L.; Schoepp, D. D.; Cavalheiro, E. A.; Eds. *Excitatory Amino Acids: Ten Years Later.* IOS Press: Amsterdam, **2001**; (c) Turski, L.; Schneider, H. H.; Neu haus, R.; McDonald, F.; Jones, G. H.; Lofberg, B.; Schweinfurth, H.; Huth, A.; Kruger, M.; Ottow, E. *Restorative Neurol. Neurosci*. **2000**, *17*, 45-59.

[52] Mayorquín-Torres, M. C.; Simoens, A.; Bonneure, E.; Stevens, C. V. *Chem. Rev*. **2024**, *124*, 7907-7975.

[53] Ma, Y.; Wang, J. G.; Wang, B.; Li, Z. M. *J. Mol. Model.* **2011**, *17*, 1899-1909.

[54] (a) Abdou, W. M.; Barghash, R. F.; Bekheit, M. S. *RSC Adv.* **2013**, *3*, 1528-1540; (b) Abdou, W. M.; Barghash, R. F.; Bekheit, M. S. *Arch. Phar*. **2012**, *345*, 884-895.



28; antibacterial **29**; antagonista (AMPA) **30**; antiinflamatorio

Figura 68. α-Aminofosfonatos heterocíclicos con actividades biológicas relevantes.

Debido a la importancia de los α-aminofosfonatos, en las últimas décadas los grupos de investigación se han enfocado en la búsqueda de métodos para la preparación de α-aminofosfonatos acíclicos.[55,56] No obstante, la síntesis estereoselectiva de los sistemas heterocíclicos no ha sido explorada con gran detalle; uno de los factores principales, es el desafío que implica la formación simultánea de un centro quiral C-P, así como la generación de la estructura heterocíclica.[57] Por otra parte, la configuración absoluta del carbono α en estos compuestos es crítica, ya que determina en gran medida la actividad biológica.[58] En consecuencia, la preparación de α-aminofosfonatos enantiomericamente enriquecidos (ópticamente puros) se ha convertido en un objetivo importante de la química medicinal y la química orgánica asimétrica. Es así como, en este capítulo de tesis se propone un método para la síntesis estereoselectiva de los α-aminofosfonatos heterocíclicos **25a-d** a través de procesos diastereoselectivos. Los cuales han sido previamente diseñados en el Capítulo II.

[55] (a) Ordoñez, M.; Viveros-Ceballos, J. L.; Sayago, F. J.; Cativiela, C.*Synthesis* **2017**, *49*, 987; (b) Viveros-Ceballos, J. L.; Ordoñez, M.; Sayago, F. J.; Cativiela, C. *Molecules* **2016**, *21*, 1141; (c) Ordoñez, M.; Viveros-Ceballos, J. L.; Cativiela, C.; Sayago, F. J. *Tetrahedron* **2015**, *71*, 1745; (d) Ordoñez, M.; Viveros-Ceballos, J. L.; Cativiela, C.; Arizpe, *A. Curr. Org. Synth.* **2012**, *9*, 310.

[56] (a) Martínez-Toto, E. I.; Ordoñez, M.; Morales-Solís, J. C. Flores-Alamo, M. *Eur. J. Org. Chem*. *24***, 2022**, e20220046. (b) Amira, A.; Aouf, Z.; K'tir, H.; Chemam, Y.; Ghodbane, R.; Zerrouki, R.; Aouf, N. E. *Chemistry-Select* **2021**, *6*, 6137; (c) Varga, P. R.; Keglevich, G. *Molecules* **2021**, *26*, 2511; (d) Herrera, R. P. *Chem. Rec.* **2017**, *17*, 833; (e) Ali, T. E.; Abdel-Kariem, S. M. *ARKIVOC* **2015**, (*vi*), 246; (f) Kudzin, Z. H.; Kudzin, M. H.; Drabowicz, J.; Stevens, C. V. *Curr. Org. Chem.* **2011**, *15*, 2015; (g) Merino, P.; Marqués López, E.; Herrera, R. P. *Synth. Catal*. **2008**, *350*, 1195.

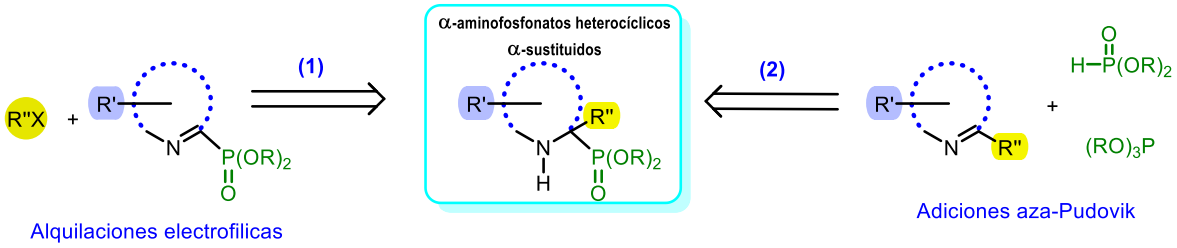
[57] (a) Hernández-Moreno, J. T.; Romero-Estudillo, I.; Cativiela, C.; Ordóñez, M. *Synthesis* **2020**, *52*, 769-774; (b) Ordóñez, M.; Torres-Hernández, F.; Viveros-Ceballos, J. L. *Eur. J. Org. Chem.* **2019**, 7378-7383; (c) Iwanejko, J.; Brol, A.; Szyja, B.; Daszkiewicz, M.; Wojaczyńska, E.; Olszewski, T. K. *Tetrahedron* **2019**, *75*, 1431-1439; (d) Ryzhakov, D.; Jarret, M.; Baltaze, J. P.; Guillot, R.; Kouklovsky, C.; Vincent, G. *Org. Lett*. **2019**, *21*, 4986-4990.

[58] Xu, W.; Zhang, S.; Yang, S.; Jin, L. H.; Bhadury, P. S.; Hu, D. Y.; Zhang, Y. *Molecules* **2010**, *15*, 5782-5796.

2. Antecedentes

2.1. Preparación diastereoselectiva de α-aminofosfonatos heterocíclicos.

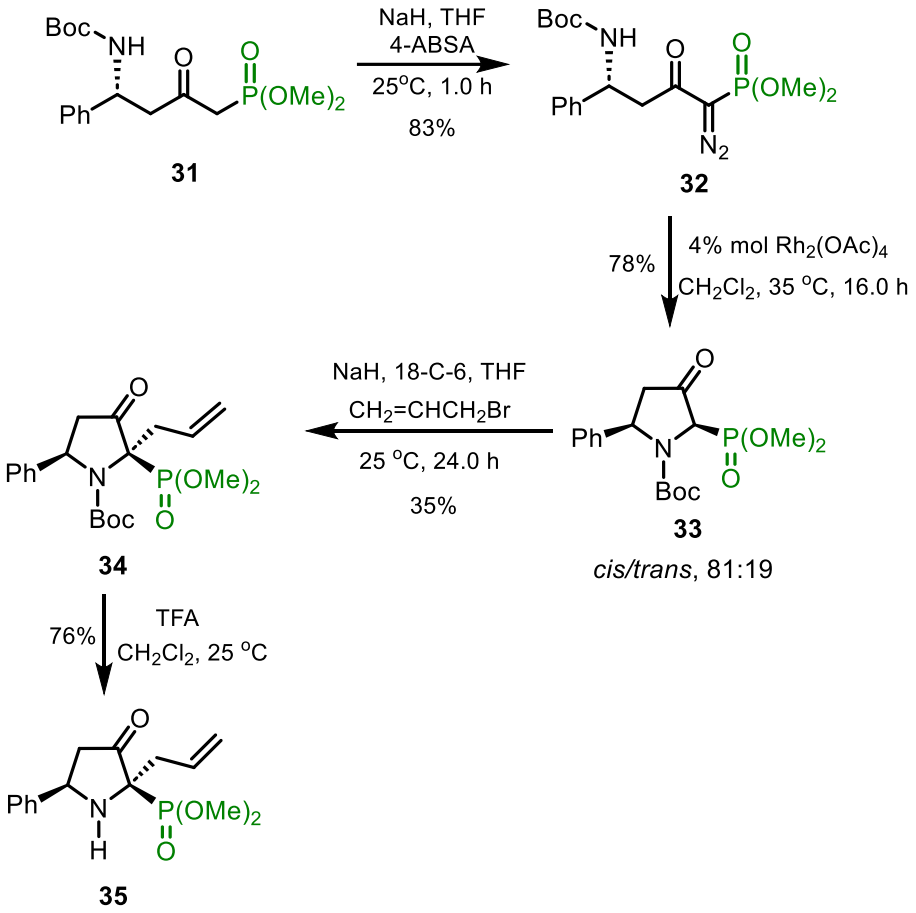
Durante los últimos años, se han logrado avances significativos desarrollando métodos para la síntesis estereoselectiva de α-aminofosfonatos heterocíclicos. A continuación, se presentan algunos ejemplos de los métodos sintéticos utilizados, dentro de los que pueden destacar: (1) adición de compuestos organometálicos a fosfoiminas quirales, y (2) fosfonilación enantio- o diastereoselectiva de iminas heterocíclicas o iones iminio heterocíclicos (Esquema 1).



Esquema 1. Métodos generales para la preparación de α-aminofosfonatos heterocíclicos

Un ejemplo para la preparación de un α-aminofosfonato heterocíclicos α-sustituidos a través de una α-alquilación es la descrita por Davis y col.[59] quienes hicieron reaccionar el β-cetofosfonato **31** con hidruro de sodio (NaH) seguido de la adición de la azida de 4-acetamido-bencenosulfonilo (4-ABSA) en THF a 25 °C, obteniendo el diazofosfonato **32** con un rendimiento del 83%, el cual al tratarse con 4% mol acetato de rodio (II) dimérico [Rh2(OAc)4] en CH_2Cl_2 a 35 °C, proporcionó una mezcla del *cis*- y *trans*-α-aminofosfonato heterocíclico **33** con un rendimiento del 78% y una relación diastereoisomérica de 81:19 en favor del diastereoisómero *cis*-**33**. Posteriormente, el α-aminofosfonato heterocíclico **33** diastereoisoméricamente puro se hizo reaccionar con NaH en presencia del éter corona 18-C-6 en THF a 25 °C seguido de la adición de bromuro de alilo, obteniendo el α-aminofosfonato cíclico α-sustituido **34** como único diastereoisómero y con un rendimiento del 35%. Finalmente, el tratamiento del compuesto **34** con ácido trifluoroacético (TFA) en CH_2Cl_2 a 25 °C, proporcionó el α-aminofosfonato heterocíclico **35** con un rendimiento del 76% (Esquema 2).

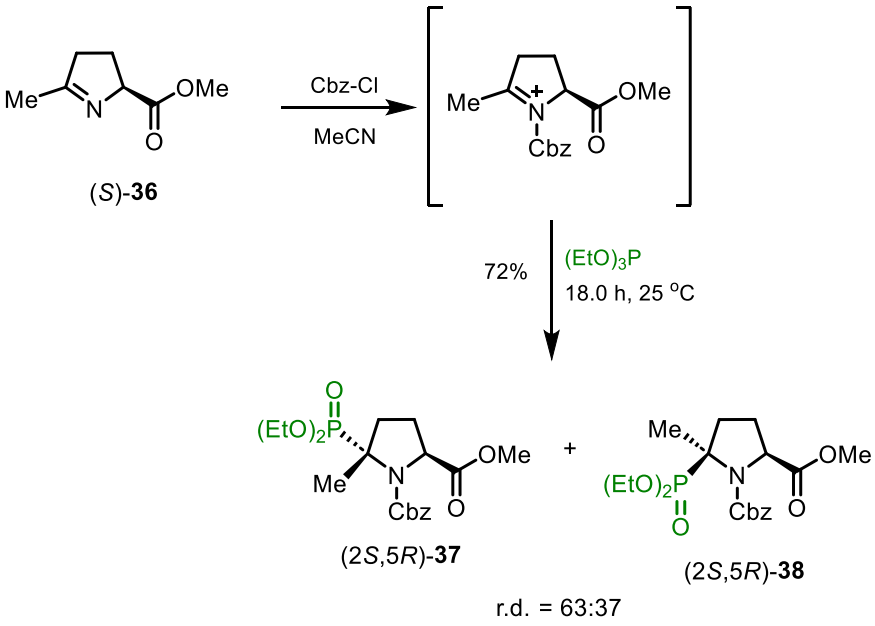
[59] Davis, F. A.; Xu, H.; Wu, Y; Zhang, J. *Org. Lett*. **2006**, *8*, 2273-2276; (b) Davis, F. A.; Wu, Y.; Xu, H.; Zhang, J. *Org. Lett*. **2004**, *6*, 4523-4525.



Esquema 2. Alquilación electrofílica para la preparación del α-aminofosfonato heterocíclico α-sustituido **35**.

Otro método para la preparación de α-aminofosfonato heterocíclico es través de adiciones aza-Pudovik a iminas cíclicas descrito por el grupo de investigación del Ordoñez y col.[9a,60] Donde, hicieron reaccionar la imina cíclica quiral (*S*)-**36** con cloroformiato de bencilo y fosfito de trietilo a 25 °C en acetonitrilo durante 18.0 h, obteniendo la mezcla diastereoisomérica de los α-aminofosfonatos (2*S*,5*R*)-**37** y (2*S*,5*S*)-**38** con un rendimiento del 72% y una relación diastereoisomérica de 63:37 (Esquema 3). Cabe destacar que, el paso clave de este método consiste en la adición del fosfito de trialquilo al ion *N*-aciliminio formado a través de la activación de la imina cíclica quiral con cloroformiato de bencilo.

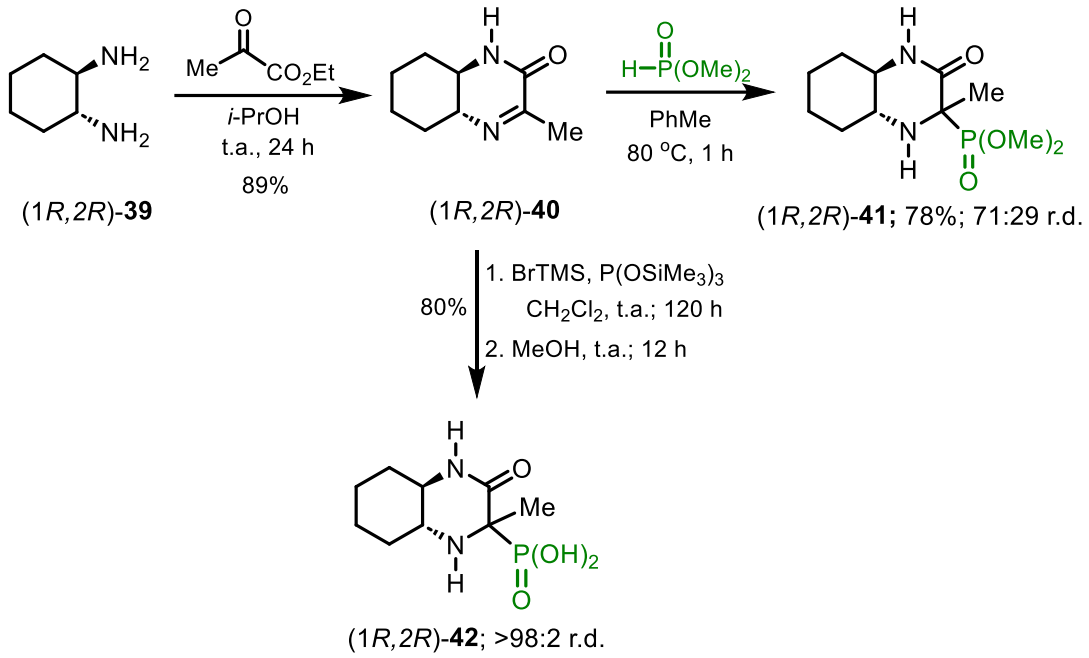
[60] Ordóñez, M.; Arizpe, A.; Sayago, F.; Jiménez, A.; Cativiela, C. *Molecules* **2016**, *21*, 1140.



Esquema 3. Fosfonilación de la imina cíclica quiral (*S*)-**36**.

Otro ejemplo, es el publicado por Olszewski y col.[61] Haciendo uso de sales de iminio bicíclicas para la preparación estereoselectiva de α-aminofosfonatos heterocíclicos (Esquema 4). La imina cíclica quiral (1*R*,2*R*)-**40** se obtiene por reacción de la diamina (1*R*,2*R*)-**39** y piruvato de etilo, la cual al hacerse reaccionar con fosfito de dimetilo proporcionó el correspondiente α-aminofosfonato heterocíclico tetrasustituido (1*R*,2*R*)-**41** con un rendimiento de 78% y una relación diastereoisomérica 71:29. Sin embargo, si la imina (1*R*,2*R*)-**40** se activa con bromotrimetilsilano, seguido de la adición de tris(trimetilsililil) fosfito, proporciona el ácido α-aminofosfónico heterocíclico (1*R*,2*R*)-**42** con un rendimiento del 80% y una relación diastereoisomérica 98:2 (Esquema 4).

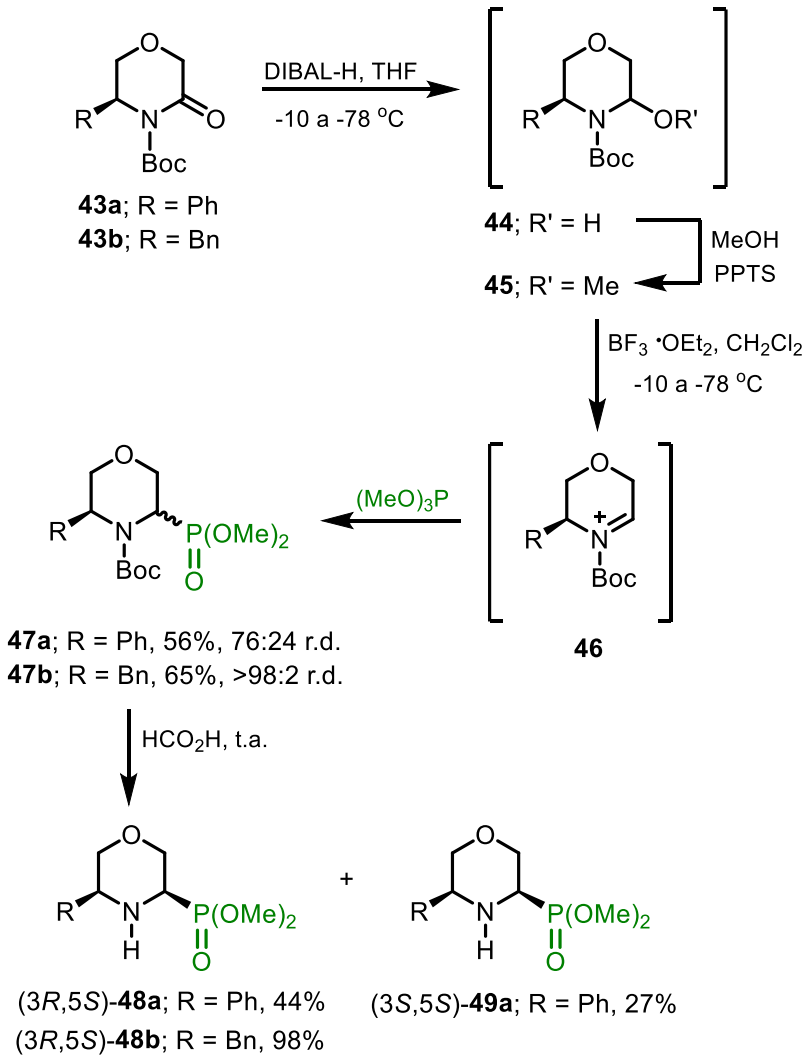
[61] Iwanejko, J.; Brol, A.; Szyja, B.M.; Daszkiewicz, M.; Wojaczyńska, E.; Olszewski, T.K. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 7352-7359



Esquema 4. Preparación de la imina (1*R*,2*R*)-**40** y su fosfonilación para la obtención de (1*R*,2*R*)-**41** y (1*R*,2*R*)-**42.**

Finalmente, un ejemplo de la activación de iminas a través de la formación de iones *N*-aciliminio es el descrito por Bonilla y col.[62] obtenidos a partir de derivados metoxilados del tipo **45** en la síntesis de α-aminofosfonatos heterocíclicos. Para lograr lo anterior, el *terc*-butilcarbamato **43a** se hizo reaccionar con hidruro de diisobutilaluminio (DIBAL-H) a 10 a 78 °C para obtener el correspondiente hemiaminal **44**, que no sin aislarse se trató inmediatamente con metanol y cantidades catalíticas de *p*-toluenosulfonato de piridinio (PPTS), para obtener el metoxiaminal **45**. El tratamiento posterior de **45** con fosfito de trimetilo y trifluoruro de boro-dietil éter (BF_3OEt_2) a 78 °C, proporcionó los (3*R*,5*S*)- y (3*S*,5*S*)-α-aminofosfonatos heterocíclicos **47a** con un rendimiento del 56% y una relación diastereoisomérica 76:24, a través del intermediario de ion *N*-aciliminio **46**. El rompimiento del enlace *N*-Boc en **47a** con ácido fórmico proporcionó los α-aminofosfonatos heterocíclicos (3*R*,5*S*)-**48a** (diastereoisómero más polar) y (3*S*,5*S*)-**49a** (diastereoisómero menos polar) en rendimientos del 44% y 27%, respectivamente. De forma similar, la reacción de **46** generó el α-aminofosfonato (3*R*,5*S*)-**47b** con un rendimiento 65% y una relación diastereoisomérica >98:2, que tras el tratamiento con ácido fórmico proporcionó el α-aminofosfonato heterocíclico(3*R*,5*S*)-**48b** con rendimiento cuantitativo (Esquema 5).

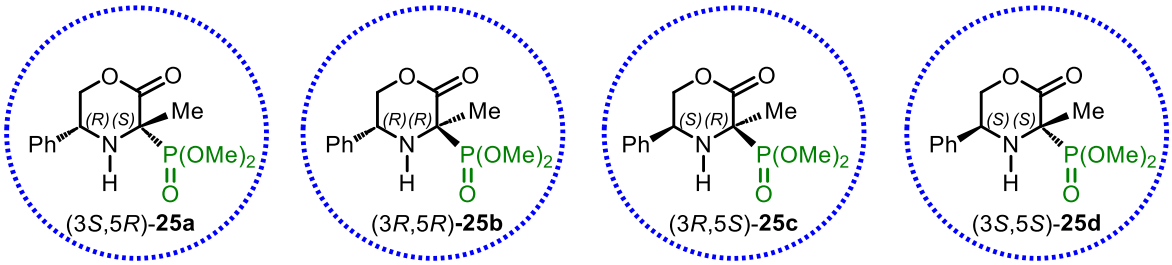
[62] Bonilla-Landa, I.; Viveros-Ceballos, J. L.; Ordóñez, M. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2014**, 25, 485-487.



Esquema 5. Fosfonilación al ión *N*-aciliminio **46** con fosfita de trimetilo.

3. Objetivos

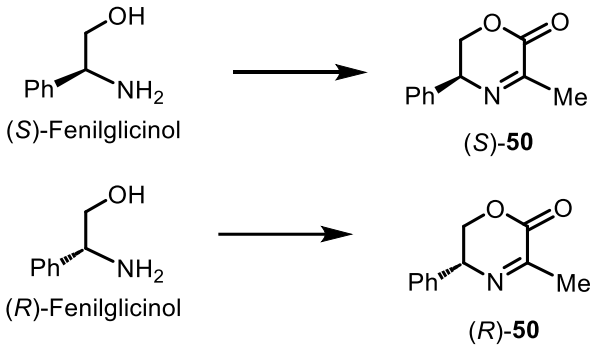
Desarrollar un método eficiente y práctico para la síntesis estereoselectiva de los α-aminofosfonatos heterocíclicos (3*S*,5*R*)-**25a**, (3*R*,5*R*)-**2b**, (3*R*,5*S*)-**25c** y (3*S*,5*S*)-**25d.**



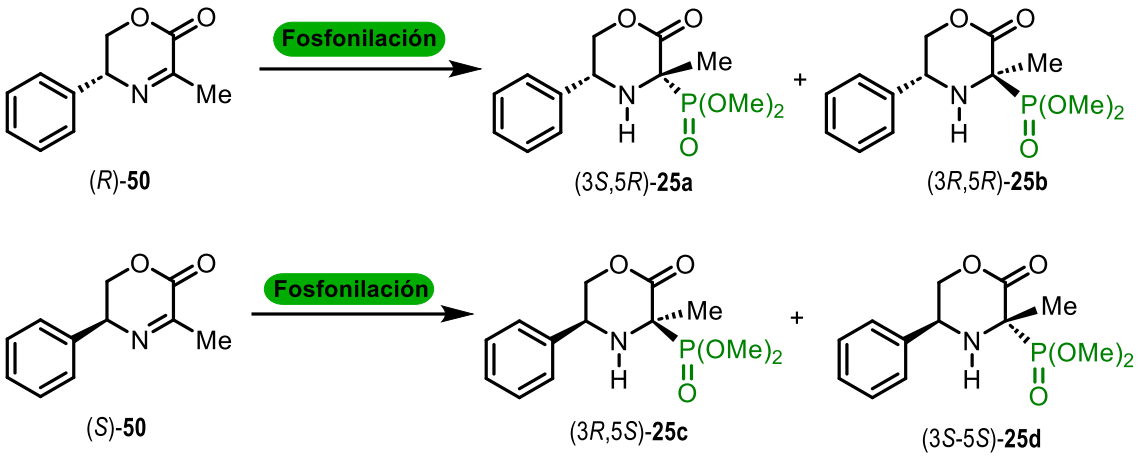
3.1. Objetivos específicos

Para el cumplimiento del objetivo general, se proponen los siguientes objetivos específicos.

3.1.1. Encontrar un método eficiente para la preparación de la 3-metill-5-fenil-5,6-dihidro-2*H*-1,4-oxazin-2-ona (*S*)-**50** y (*R*)-**50** partir de (*S*)- y (*R*)-fenilglicinol.



3.1.2. Evaluar la diastereoselectividad de la adición nucleofílica de fosfito de dimetilo y trimetilo a la 3-metill-5-fenil-5,6-dihidro-2*H*-1,4-oxazin-2-ona (*S*)-**50** y (*R*)-**50** en presencia y ausencia de catalizadores, para la obtención de los α-aminofosfonatos heterocíclicos (3*S*,5*R*)-**25a**, (3*R*,5*R*)-**25b**, (3*R*,5*S*)-**25c** y (3*S*,5*S*)-**25d.**

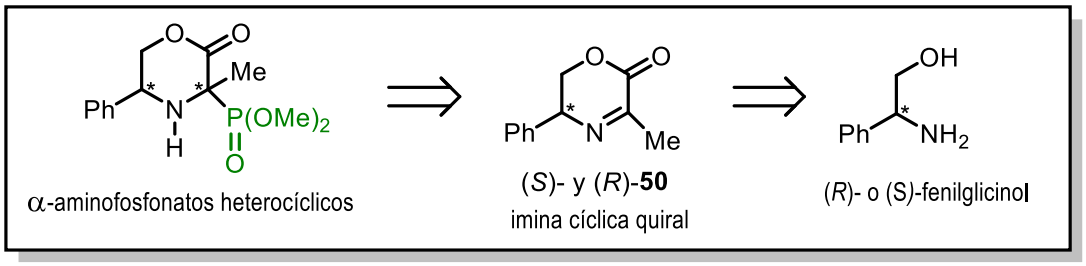


3.1.3. Realizar la separación y asignación de la configuración absoluta utilizando experimentos de RMN bidimensionales como NOESY y HSQC de los diasteroisómeros (3*S*,5*R*)-**25a**, (3*R*,5*R*)-**25b,** (3*R*,5*S*)-**25c** y (3*S*,5*S*)-**25d.**

4. Resultados y discusión

4.1. Síntesis de α-aminofosfonatos heterocíclicos α-metilados enantiomericamente enriquecidos.

Inicialmente, para la síntesis estereoselectiva de los α-aminofosfonatos heterocíclicos α-metilados, se propone que estos podrían obtenerse a través de la fosfonilación diastereoselectiva y con la subsecuente remoción del fragmento del (*S*)- o (*R*)-fenilglicinol de la imina cíclica quiral**.** Finalmente, las iminas cíclicas quirales (*S*)-**45** y (*R*)-**45** podrán obtenerse de la ciclo-condensación entre el (*S*)- o (*R*)-fenilglicinol y piruvato de etilo (Esquema 8).



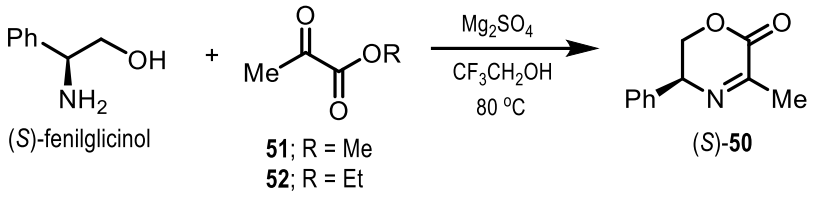
Esquema 8. Análisis retrosintético para la obtención de los -α-aminofosfonatos heterocíclicos.

Con base en el análisis retrosintético mostrado en el Esquema 8, la síntesis de los α-aminofosfonatos heterocíclicos enantiomericamente enriquecidos, inició con la reacción de ciclo-condensación del (*S*)-fenilglicinol con el piruvato de etilo o metilo **51** y **52.** Cabe destacar que esta opción resulta la más viable, ya que se obtiene la imina con el sustituyente metílico en la posición 3 de la morfolin-2-ona; al ser un carbono más sustituido la estabilidad de la imina aumenta.[63]

A continuación, se llevó a cabo el estudio de las condiciones óptimas de la ciclo-condensación (Tabla 1), observándose que en el ensayo 3 el uso de piruvato de etilo y Mg_2SO_4, en una relación peso/peso (1:3) en CF_3CH_2OH a 85 °C, se logró obtener la 3-metill-5-fenil-5,6-dihidro-2*H*-1,4-oxazin-2-ona (*S*)-**50** (para simplificación, de aquí en adelante solo se escribirá imina cíclica quiral) con un rendimiento del 27%, siendo el mejor resultado obtenido (Tabla 9, ensayo 3).

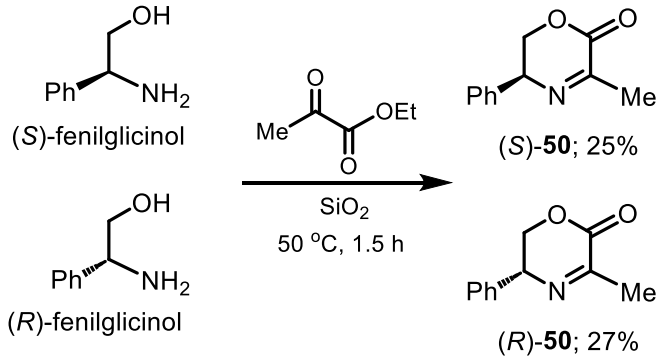
[63] Harwood, L. M.; Vines, K. J.; Drew. M. G. *Synlett.* **1996,** 1051-1053.

Tabla 9. Ciclo-condensación de (*S*)-fenilglicinol con piruvato de etilo o metilo para la obtención de la 3-metill-5-fenil-5,6-dihidro-2*H*-1,4-oxazin-2-ona (*S*)-**50**.



Ensayo	Sustituyente	Mg_2SO_4 (relación P/P)	t (h)	Rend. (%)
1	R = Me	1:1	16	5
2	R = Et	1:1	16	21
3	R = Et	1:3	20	27

Por otra parte, con la intención de mejorar los rendimientos químicos obtenidos, se decidió hacer reaccionar el piruvato de etilo con (*S*)- y (*R*)-fenilglicinol en presencia de SiO_2 en condiciones libres de disolvente,[64] obteniendo las correspondientes oxazin-2-onas (*S*)-**50** y (*R*)-**50** con rendimientos del 25 y 27%, respectivamente; sin embargo, aunque los rendimientos son similares a los obtenidos con el método arriba descrito, es importante destacar la disminución del tiempo de reacción bajo estas condiciones (Esquema 9).



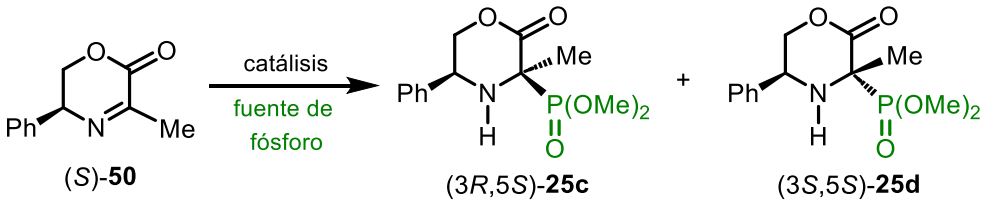
Esquema 9. Síntesis de oxazin-2-onas quirales (*S*)-**50** y (*R*)-**50**.

Una vez obtenidas las iminas cíclicas quirales (*S*)-**50** y (*R*)-**50** se decidió probar la preactivación de la imina. Para lograr lo anterior, en un primer ensayo se llevó a cabo la activación *in situ* del grupo carbonílico mediante la formación de éteres de silicio y así, el átomo de carbono en posición α presentaría una mayor electrofilia, favoreciendo la adición nucleofílica de la fuente de fósforo; sin embargo, esto no se reflejó en los resultados, ya que la reacción no se llevó a cabo (Tabla 10, ensayo

[64] Wua, M. S.; Zhang, X. Z. J. *Chem. Res.* **2008**, *2008*, 562-563.

1).Debido a este resultado y basándose en experiencia previa en la preparación de α-aminofosfonatos heterocíclicos mediante la metodología aza-Pudovik.[9a,] En un segundo ensayo, la imina cíclica quiral (*S*)-**50** se hizo reaccionar con fosfito de dimetilo 50°C durante 3.0 h, obteniéndose los α-aminofosfonatos heterocíclicos (3*R*,5*S*)-**25c** y (3*S*,5*S*)-**25d** con un rendimiento del 16% y una relación diastereoisomérica de 64:36 (Tabla 10, ensayo 2). Cuando se utilizaron ácido fenilborónico [$PhB(OH)_2$] y ácido fenilfosfónico [$PhP(O)(OH)_2$] 10 mol% como catalizadores, se obtuvieron los correspondientes α-aminofonofonatos heterocíclicos (3*S*,5*S*)-**25d** y (3*R*,5*S*)-**25c** con rendimientos del 17% y 32% con una relación diastereoisomérica de 62:38 y 66:34, respectivamente. (Tabla 10, ensayos 3 y 4). En el siguiente experimento, la imina cíclica quiral (*S*)-**50** se hizo reaccionar con fosfito de trimetilo y 10 y 20 mol% de cloroformiato de bencilo como agente activante en acetonitrilo a temperatura ambiente, obteniéndose los α-aminofosfonatos heterocíclicos (3*S*,5*S*)-**25d** y (3*R*,5*S*)-**25c** con rendimientos del 17 y 29% con una relación diastereoisomérica de 28:72 y 25:75, respectivamente (Tabla 10, ensayos 5 y 6). Por otra parte, cuando se utilizó Cbz-Cl en cantidades equimolares a 0 °C, se obtuvieron los α-aminofosfonatos heterocíclicos (3*S*,5*S*)- **25d** y (3*R*,5*S*)- **25c** con un rendimiento del 40% y una relación diastereoisomérica 30:70 (Tabla 10, ensayo 7). Sorprendentemente, cuando se utilizó Cbz-Cl en cantidades equimolares a 25 °C, se obtuvieron los α-aminofosfonatos heterocíclicos (3*S*,5*S*)-**25d** y (3*R*,5*S*)-**25c** con un rendimiento del 70% y una relación diastereoisomérica 25:75 (Tabla 10, ensayo 8). Además, cuando la mezcla de reacción se calentó a 80 °C, se obtuvieron los productos esperados con un rendimiento del 65% y una relación diastereoisomérica de 44:56 (Tabla 10, ensayo 9). Es importante señalar que los análisis de RMN ^1H y ^{13}C no mostraron la incorporación del grupo Cbz unido al átomo de nitrógeno en los productos (Tabla 10, ensayos 5-9).

Tabla 10. Fosfonilación de la imina cíclica quiral (*S*)-**50.**



(*S*)-**50** (3*R*,5*S*)-**25c** (3*S*,5*S*)-**25d**

Ensayo	Catalizador	Fuente de Fósforo	Rend. (%)	(**25d** : **25c**) r.d.[a]
1	BSA, TMSOTf[b]	$(MeO)_2P(O)H$[f]	---	---
2	----	$(MeO)_2P(O)H$[f]	16	64:36
3	$PhB(OH)_2$[c]	$(MeO)_2P(O)H$[f]	17	62:38
4	$PhP(O)(OH)_2$[c]	$(MeO)_2P(O)H$[f]	32	66:34
5	CbzCl[c]	$(MeO)_3P$[g]	17	28:72
6	CbzCl[d]	$(MeO)_3P$[g]	29	25:75
7	CbzCl[e]	$(MeO)_3P$[h]	40	30:70
8	CbzCl[e]	$(MeO)_3P$[g]	70	25:75
9	CbzCl[e]	$(MeO)_3P$[i]	65	44:56

[a] Determinado por RMN ^{31}P 202 MHz en la mezcla del crudo de reacción. [b] CH_2Cl_2, 0 °C.
[c] 10 mol%. [d] 20 mol%. [e] Cantidad equimolar. [f] 50 °C. [g] MeCN, 25 °C. [h] MeCN, 0 °C, [i] MeCN, 80 °C.

4.2. Asignación de la configuración absoluta a través del uso de técnicas de RMN bidimensionales (HSQC y NOESY).

Para la asignación de la configuración absoluta de los cuatro diasteroisómeros obtenidos, se llevó a cabo un análisis detallado en RMN HSQC y NOESY, logrando así asignar la configuración en el carbono en la posición 3 de los α-aminofosfonatos heterociclos.

4.2.1. Asignación absoluta del C_3 en el diastereoisómero mayoritario (3*R*,5*S*)-25c.

Para lograr lo anterior, inicialmente se realizó el análisis de Coherencia Heteronuclear Cuántica Simple (HSQC), con la finalidad de identificar la señal correspondiente al protón del grupo metino dentro del heterociclo, para ello, en la Figura 69 (ampliación) se muestra el espectro de HSQC, donde se observa una señal doble de doble (*dd*) con un desplazamiento químico de δ 4.3 ppm asignada a un átomo de hidrógeno H_1 (eje horizontal, espectro de RMN ^1H) con respecto a la señal singulete con un desplazamiento químico de δ 53.7 ppm (eje vertical, espectro de RMN ^{13}C) asignada al carbono del metino en la posición 5 del anillo de la fenilmorfolin-2-ona. Por consiguiente, la señal *dd* en δ 4.3 ppm muestra una correlación entre el protón marcado como H_1 unido y el C_5 en la estructura del diastereoisómero más polar (3*R*, 5*S*)-**25c**.

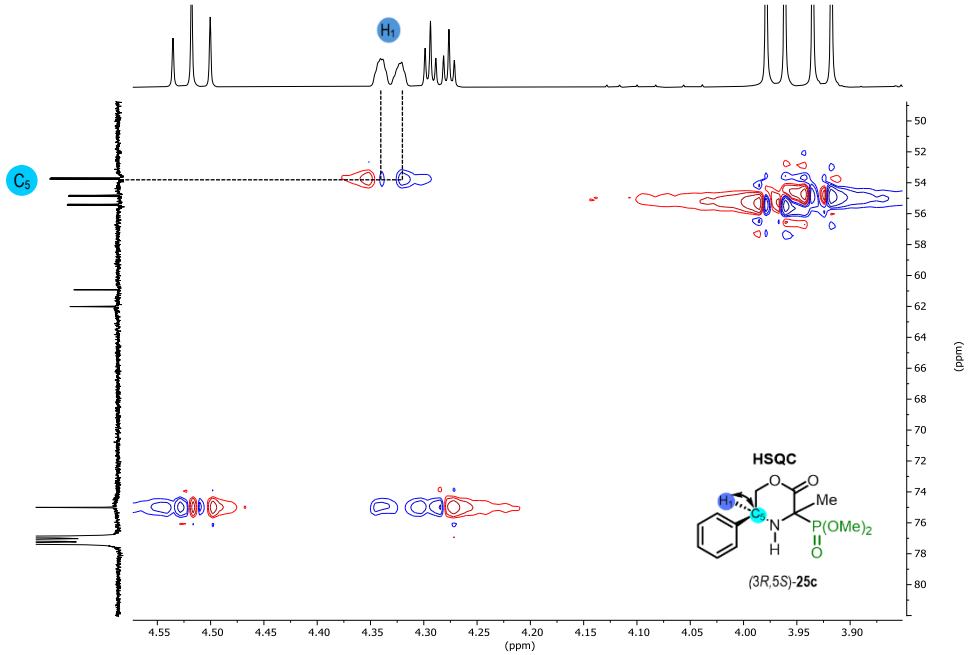


Figura 69. Experimento HSQC para el diastereoisómero más polar.

Con esta información en mano, el siguiente paso consistió en analizar la disposición dentro del espacio químico de los protones del grupo metino y el grupo metilo, esto se logró con la ayuda del experimento de Espectroscopía de Mejoramiento Nuclear de Overhauser (NOESY). En la Figura 70 (ampliación), se observa como la señal correspondiente al H_1 presenta un efecto NOE con la señal *dd* con δ1.7 ppm (eje vertical, espectro de RMN ^1H) asignada al grupo metilo; indicando que ambos grupos mantienen una interacción a través del espacio, permitiendo asignar una disposición de tipo *cis* para el metilo con respecto al H_1 del grupo metino.

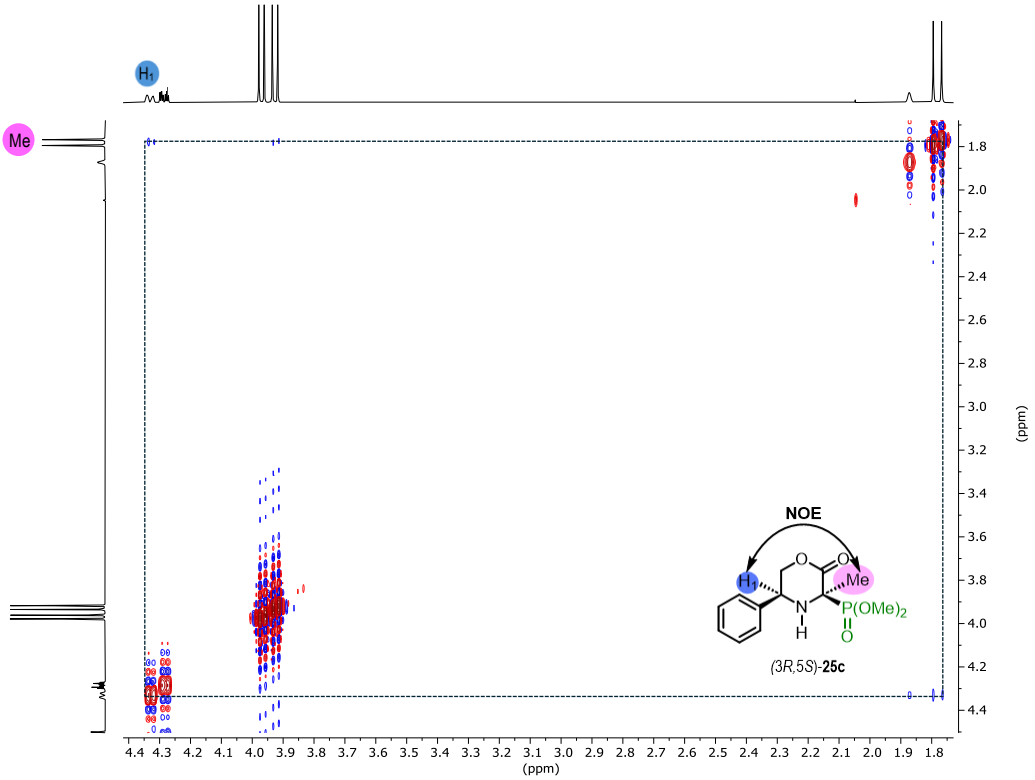


Figura 70. Experimento NOESY 2D para el diasteroisómero más polar.

4.2.2. Asignación absoluta del C_3 en el diastereoisómero minoritario (3*S*,5*S*)-25d.

Así mismo, se realizó el correspondiente análisis sobre el diastereisómero menos polar. Para ello, en la Figura 71 se muestra el experimento HSQC, donde el acoplamiento entre la señal doble de triples (*dt*) con un desplazamiento químico de δ 4.7 ppm asignada previamente por RMN ^{1}H para un átomo de hidrógeno H_1 (eje horizontal, espectro de RMN ^{1}H) con respecto a, la señal singulete a un desplazamiento químico δ 53.4 ppm (eje vertical, espectro de RMN ^{13}C) asignada previamente al carbono del metino en la posición 5 del anillo de fenilmorfolin-2-ona. Por consiguiente, la señal *dt* en δ 4.7 muestra una correlación entre el protón marcado como H_1 unido y el C_5 en la estructura del diastereoisómero minoritario (3*S*,5*S*)-**25d**.

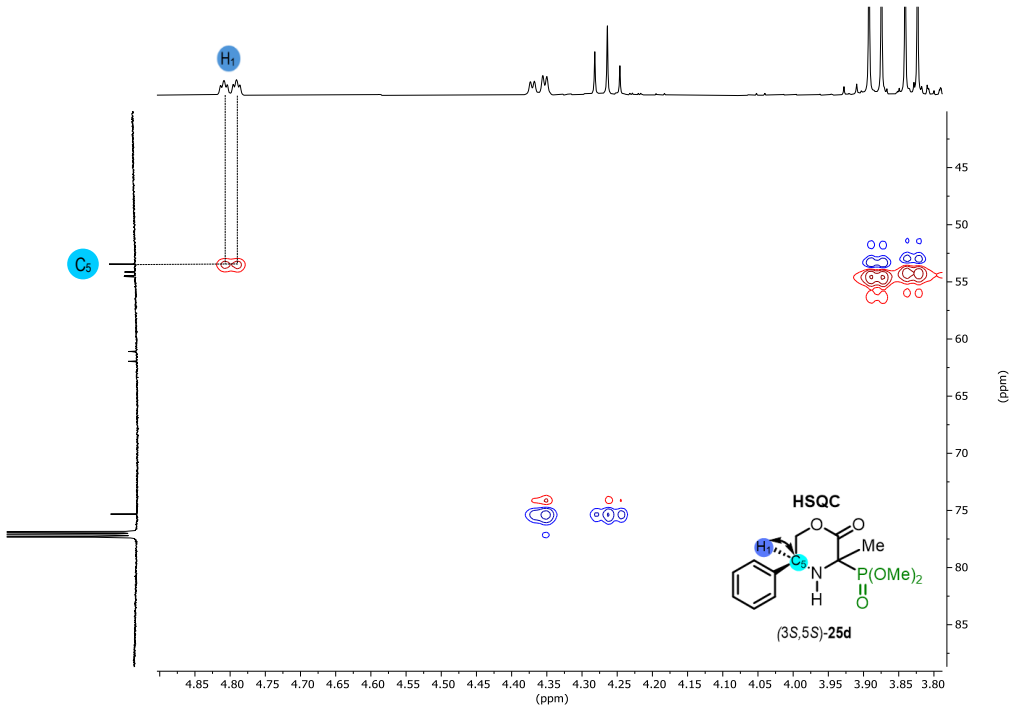


Figura 71. Experimento HSQC para el diastereoisómero menos polar.

Una vez identificada la señal correspondiente a H_1, el siguiente paso consistió en analizar la disposición dentro del espacio químico de los protones del grupo metino (H_1) y el grupo metilo (Me), realizando el experimento 2D (NOESY). En la figura 72 (ampliación), se observa que la señal correspondiente al H_1 no muestra un efecto NOE con la señal *dd* con δ1.7 ppm (eje vertical, espectro de RMN ^{1}H) asignada al grupo metilo; indicando que ambos grupos no presentan una interacción a través del espacio, permitiendo asignar una disposición de tipo *trans* para el metilo con respecto al H_1 del grupo metino.

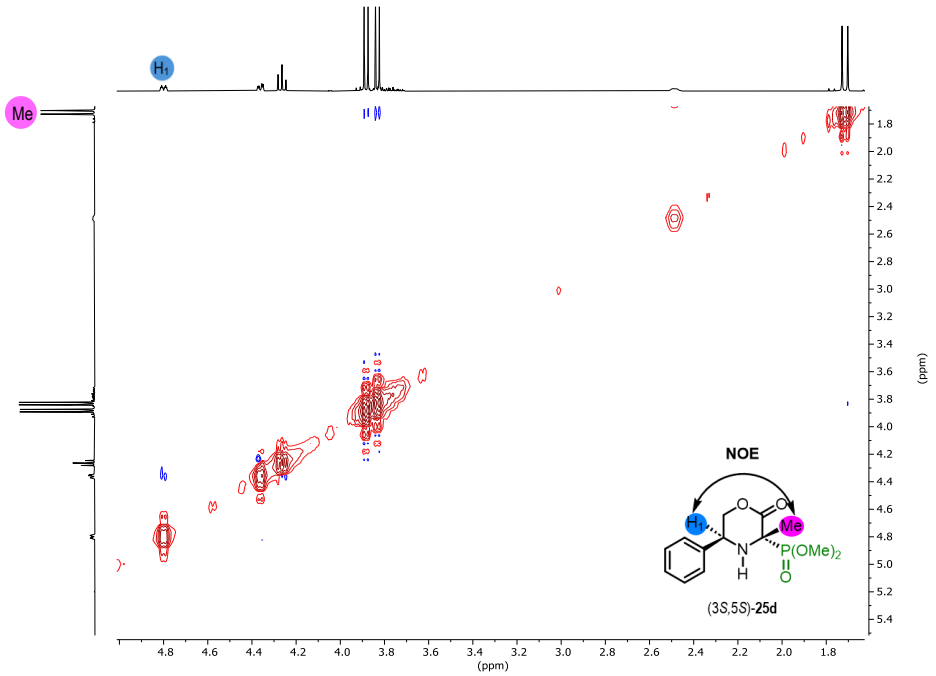


Figura 72. Experimento NOESY 2D para el diastereoisómero minoritario.

En resumen, la estereoquímica de los α-aminofosfonatos heterocíclicos (3*S*,5*S*)-**25d** y (3*R*,5*S*)-**25c**, se estableció por experimentos de RMN 2D NOESY. El α-aminofosfonato (3*R*,5*S*)-**25c** (producto más polar), muestra una correlación NOE entre CH_3-**3** y CH-**5**, lo que confirma una estereoquímica (3*R*,5*S*) para **25c**. Por el contrario, la ausencia de esta correlación en **25d** (producto menos polar), confirma la configuración (3*S*,5*S*) (Figura 73).

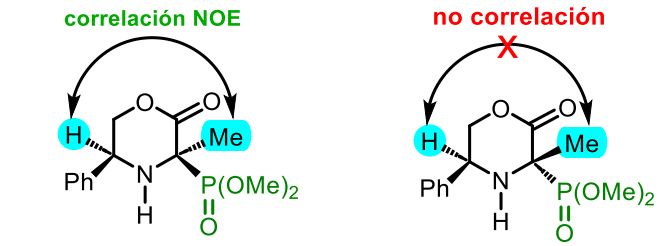
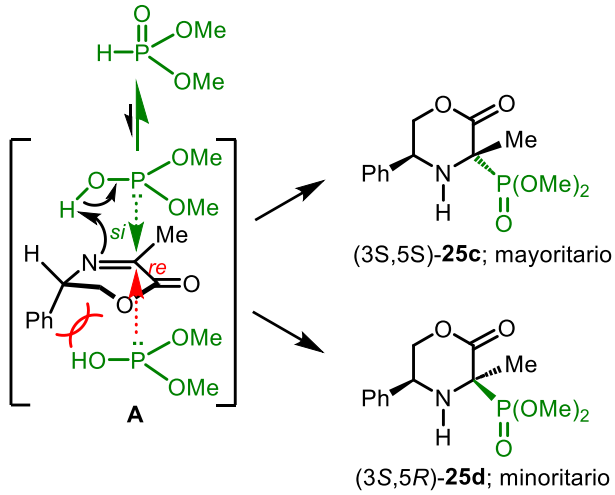


Figura 73. Asignación de la configuración absoluta para los diastereoisómeros (3*S*,5*S*)-**25c** y (3*R*,5*S*)-**25d.**

Con base en los resultados obtenidos, se propone un mecanismo en el que la (*S*)-imina quiral adopta una conformación en la que, el grupo fenilo en C-5 adopta una disposición pseudoecuatorial,[65] en donde el fosfito de dimetilo en su forma trivalente nucleofílica se acerca por la cara *si* (cara menos

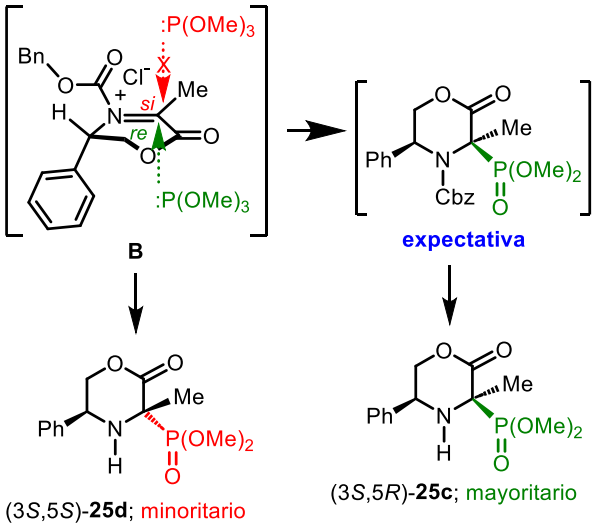
[65] (a) Pigza, J. A.; Molinski, T. F. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 1256-1259; (b) Cox, G. G.; Harwaod, L. M. *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, *5*, 16691672.

impedida estéricamente) y desde el lado opuesto al grupo fenilo a través de un estado de transición de cinco miembros, formándose el diastereoisómero (3*S*,5*S*)-**25c**. (Esquema 10)



Esquema 10. Posible estado de transición para la reacción de hidrofosfonilación de la imina cíclica (*S*)-**45** con fosfito de dimetilo.

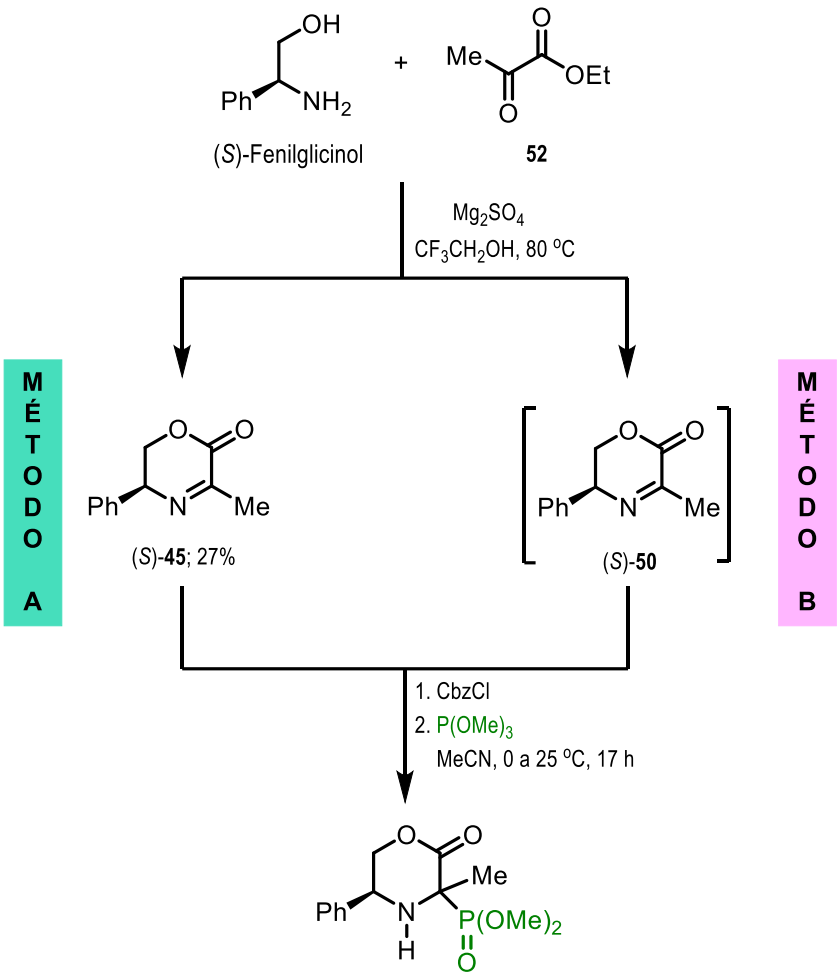
Por otra parte, la reacción de la imina cíclica quiral (S)-**45** con fosfito de trimetilo y cloroformiato de bencilo produjo el α-aminofosfonato heterocíclico (3*R*,5*S*)-**25c** como diastereoisómero mayoritario. Para explicar este resultado, se propone que la imina cíclica quiral (*S*)-**45** reacciona con cloroformiato de bencilo (1 eq) generando el correspondiente ion *N*-aciliminio **B**, donde el grupo formiato de bencilo bloquea la cara *si*,[24] favoreciendo el ataque nucleofílico del fosfito de trimetilo por la cara *re*, generando el esperado α-aminofosfonato heterocíclico *N*-Cbz protegido; Sin embargo, tras varios intentos, este compuesto no pudo observarse y el producto no protegido (3*R*,5*S*)-**25c** se obtuvo en todos los casos como diastereoisómero mayoritario (Esquema 11). Se obtuvieron resultados similares cuando se utilizó cloroformiato de isobutilo. La no incorporación de los grupos Cbz o *i*-BuOCO en el producto final, se propone que, el cloroformiato de bencilo no participaba en la reacción de fosfonilación, y para demostrar lo anterior, se llevó a cabo la reacción de la imina cíclica quiral (*S*)-**45** con fosfito de trimetilo en ausencia de CbzCl; sin embargo, bajo estas condiciones no se formó el α-aminofosfonato heterocíclico. Además, cuando se utilizó 10 y 20 mol% de CbzCl, la reacción no fue completa y se recuperó la imina cíclica quiral (*S*)-**45** sin reaccionar. Con estos resultados, queda claro que el cloroformiato de bencilo sí participa en la reacción, pero por alguna razón que no podemos explicar, se pierde (Esquema 11).



Esquema 11. Posible estado de transición para la reacción de hidrofosfonilación de la imina cíclica (*S*)-**45** con fosfito de trimetilo.

Con la intención de incrementar los rendimientos químicos, se decidió no aislar la imina (*S*)-**45**, por lo que una vez obtenida esta se hizo reaccionar de acuerdo con el (Método B).

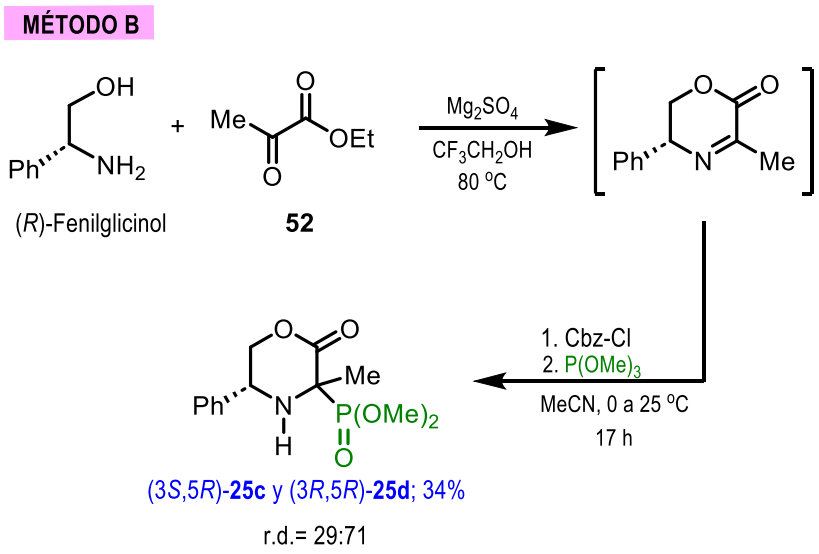
De esta manera, se realizó una comparación del rendimiento global en ambos métodos con y sin aislamiento de la imina quiral (*S*)-**45**, concluyendo que, al realizar la reacción de adición sobre el crudo de reacción, el rendimiento global se ve favorecido pasando de un 19% a 33%, sin la modificación en la relación diastereoisomérica (Esquema 12).



Método A: (3*S*,5*S*)-**25c** y (3*R*,5*S*)-**25d**; 19%
Método B: (3*S*,5*S*)-**25c** y (3*R*,5*S*)-**25d**; 33%

Esquema 12. Comparativa del rendimiento global método A y B.

Paso siguiente, era continuar con la obtención de la mezcla de los α-aminofosfonatos (3*S*,5*R*)-**25c** y (3*R*-5*R*)-**25d** partiendo ahora del (*R)*-fenilglicinol. Ya establecidas las mejores condiciones de reacción (Método B), estas fueron replicadas para la obtención de los fosfonatos α-aminofosfonatos, obteniéndose como una mezcla un rendimiento del 34% a partir del (*R*)-fenilglicinol y piruvato de etilo.



Esquema 13. Síntesis de los α-aminofosfonatos heterociclos (3*S*,5*R*)-**25c** y (3*R*-5*R*)-**25d** a partir de (*R*)-fenilglicinol.

De igual manera, la mezcla de los diastereoisómeros (3*S*,5*R*)-**25c** y (3*R*-5*R*)-**25d** se separó por columna cromatográfica, aislando ambos compuestos, los cuales se analizaron por RMN para asignar la configuración absoluta como se describe a continuación.

4.2.3. Asignación absoluta del C3 en el diastereoisómero mayoritario (3S,5R)-25a.

Inicialmente, se realizó el análisis HSQC, teniendo como propósito la identificación de la señal correspondiente al protón del grupo metino del heterociclo, para ello, en la Figura 74 (ampliación) podemos observar el espectro de HSQC, donde se muestra el acoplamiento entre la señal doble de doble (*d*) a un desplazamiento químico de δ 4.3 ppm asignada al átomo de hidrógeno H_1 (eje horizontal, espectro de RMN ^1H) con respecto al singulete con un desplazamiento químico de δ 53.9 ppm (eje vertical, espectro de RMN ^{13}C) asignada previamente al carbono del metino en la posición 5 del anillo de fenilmorfolin-2-ona. Por consiguiente, la señal *d* en δ 4.3 ppm muestra una perfecta correlación entre el protón marcado como H_1 unido al C_5 en la estructura del diastereoisómero menos polar (3*S*, 5*R*)-**25a**.

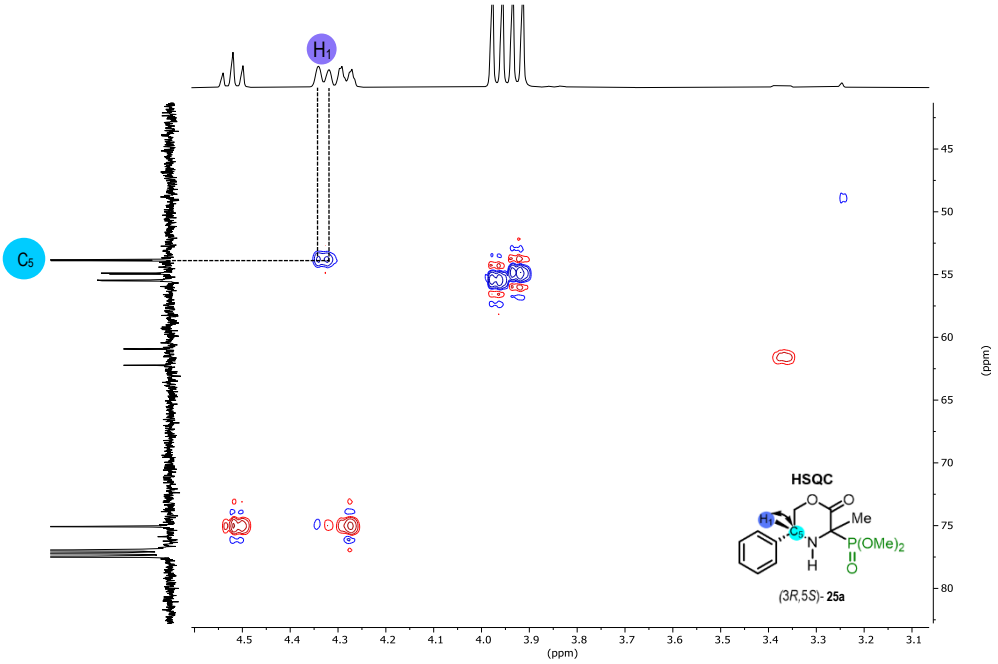


Figura 74. Experimento HSQC para el diastereoisómero menos polar.

Una vez identificada la señal perteneciente al protón H_1, el siguiente paso consistió en analizar la disposición de los protones del grupo metino y el grupo metilo, esto se logró con la ayuda del experimento NOESY. En la Figura 75 (ampliación), se observa como la señal correspondiente al protón H_1 presenta un efecto NOE con la señal *dd* con δ1.7 ppm (eje vertical, espectro de RMN ^{1}H) asignada al grupo metilo; indicando que ambos grupos mantienen una interacción a través del espacio, permitiendo asignar una disposición de tipo *cis* para el metilo con respecto al H_1 del grupo metino.

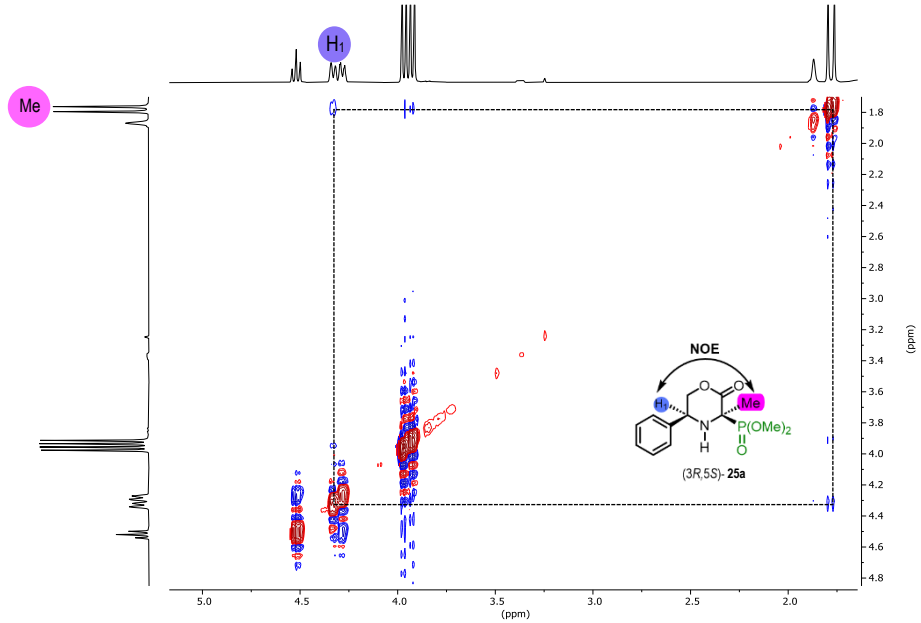


Figura 75. Experimento NOESY 2D para el diastereoisómero menos polar.

4.2.4. Asignación absoluta del C_3 en el diastereoisómero minoritario (3*R*,5*R*)-25b.

Finalmente, quedaba llevar a cabo la confirmación de la configuración para el diastereoisómero minoritario, la cual debería corresponder a una disposición *trans*. De igual manera, se llevó a cabo el experimento de HSQC para la identificación inequívoca del protón unido al C_5. En el espectro se puede observar el acoplamiento entre la señal doble de triple (*dt*) con un desplazamiento químico de δ 4.8 ppm asignada al átomo de hidrógeno H_1 (eje horizontal, espectro de RMN ^{1}H) con respecto al singulete con un desplazamiento químico de δ 53.4 ppm (eje vertical, espectro de RMN ^{13}C) asignada al carbono del metino en la posición 5 del anillo de fenilmorfolin-2-ona. De manera que, la señal *dt* muestra una perfecta correlación con el singulete lo que indica que pertenece al protón marcado como H_1, el cual se encuentra unido al C_5 en la estructura del diasteroisómero minoritario (3*R*,5*R*)-**25b** (Figura 76).

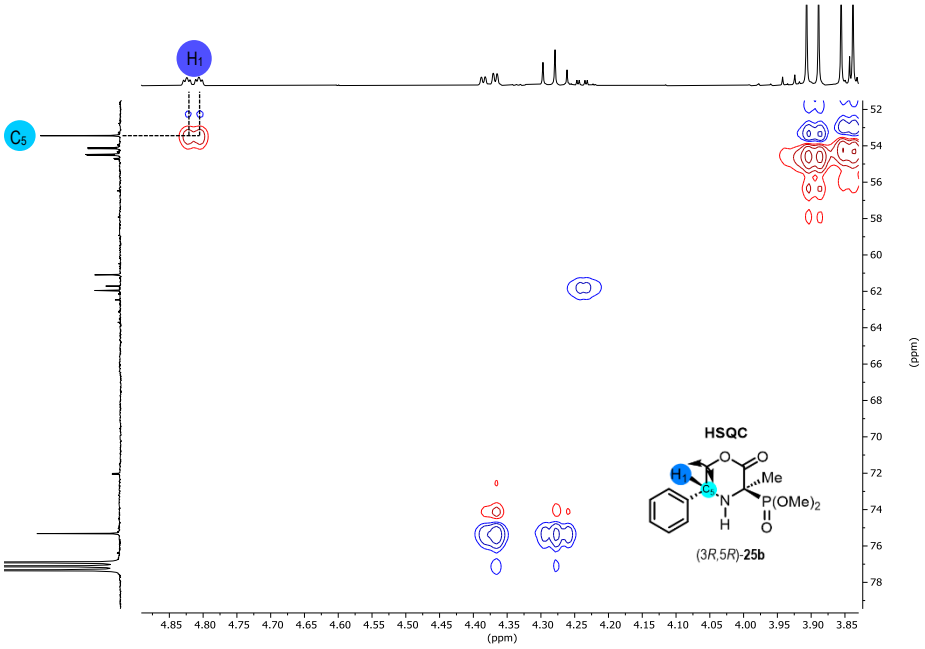


Figura 76. Experimento HSQC para el diastereoisómero menos polar.

El ultimo experimento fue un NOESY, esto nos confirmaría la disposición espacial de tipo *trans* entre el protón H_1 del metino y el grupo metilo. En la Figura 77 (ampliación), se observa la señal correspondiente al protón H_1 que no presenta un efecto NOE con la señal *dd* con δ1.7 ppm (eje vertical, espectro de RMN ^1H) asignada al grupo metilo; permitiendo asignar la configuración absoluta *R* para el centro estereogénico en posición 3.

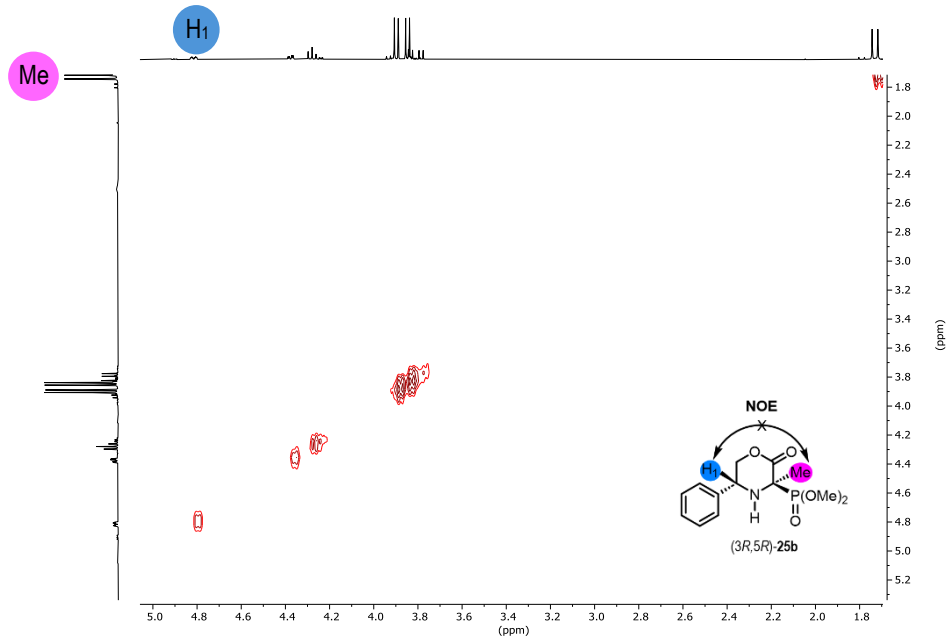


Figura 77. Experimento NOESY 2D para el diastereoisómero menos polar.

Resumiendo, la estereoquímica de los α-aminofosfonatos heterocíclicos (3*S*,5*R*)-**25a** y (3*R*,5*R*)-**25b**, se asignó por experimentos de RMN 2D NOESY. El α-aminofosfonato (3*S*,5*R*)-**25a** (producto más polar), muestra una correlación NOE entre CH_3-**3** y CH-**5**, lo que confirma la estereoquímica (3*S*,5*R*) para **25a**. Por el contrario, la ausencia de esta correlación en **25b** (producto menos polar), confirma la configuración (3*R*,5*R*) (Figura 77).

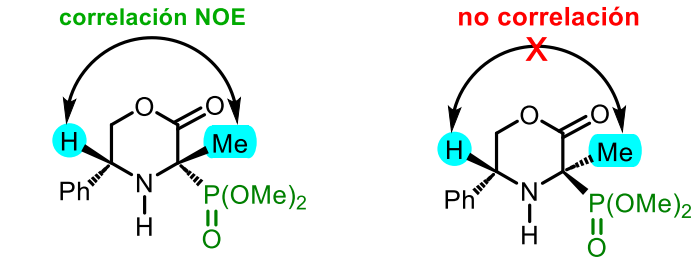


Figura 77. Asignación de la configuración absoluta para los diastereoisómeros (3*S*,5*R*)-**25a** y (3*R*,5*R*)-**25b.**

En la Figura 13 se muestran los cuatro diastereoisómeros aislados con sus respectivas configuraciones absolutas, rotaciones ópticas y rendimiento químico (Figura 78).

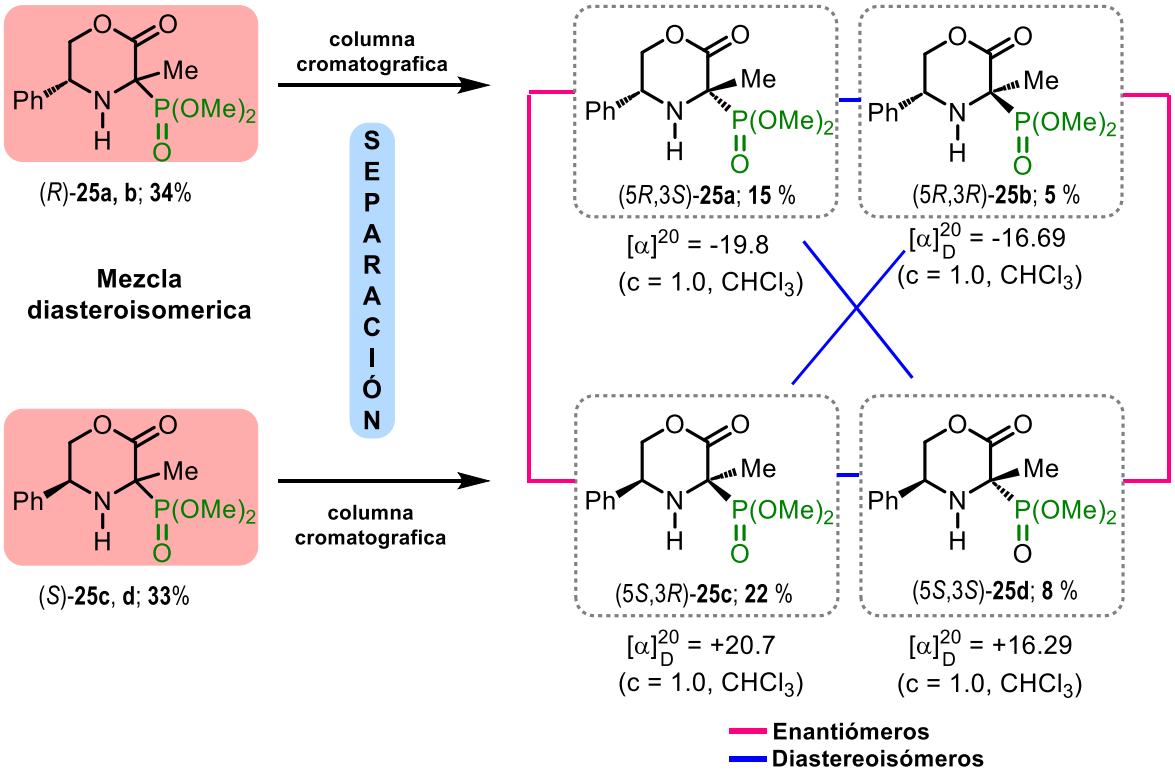


Figura 78. Separación de las mezclas de diasteroisómeros de los α-amino fosfonatos heterocíclicos (*R*)-**25a** y **25b** y (*S*)-**25c** y **25d** con sus correspondientes rendimientos aislados.

Finalmente, se logró la síntesis de los compuestos objetivo, así como el aislamiento de cada uno de los diastereoisómeros. Esto con el objetivo a futuro de realizar pruebas *in vitro*, que corroboren su actividad antiinflamatoria.

Por otra parte, los α-aminoácidos cuaternarios enriquecidos enantioméricamente, también llamados α,α-aminoácidos tetrasustituidos, son de gran importancia debido a su papel crucial en el desarrollo de nuevos agentes farmacéuticos.

Estos compuestos evitan eficazmente la racemización en el carbono estereogénico[66] y su introducción en péptidos es una herramienta útil para modificar diversas propiedades, como la restricción de la conformación, la mejora de la estabilidad química, el incremento de la lipofilia y la actividad biológica específica.[67] Adicionalmente, estos compuestos sirven como excelentes bloques de construcción para el desarrollo de agentes farmacológicos, agroquímicos y péptidos no naturales y proteínas.[68] Entre estos α-aminoácidos cuaternarios se encuentra la α-metilserina (Figura 79), que se ha estudiado ampliamente por ser un buen material de partida para la síntesis asimétrica de compuestos más complejos.

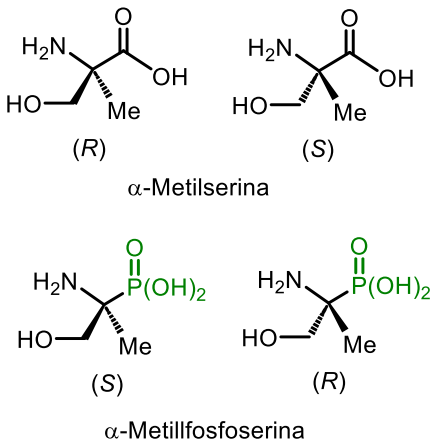


Figura 79. α-Metilserina y α-metilfosfoserina.

[66] (a) Zhang, Y.; Vanderghinste, J.; Wang, J.; Das, S. *Nat. Commun.* **2024**, *15*, 1474; (b) Cativiela, C.; Ordoñez, M.; Viveros-Ceballos, J. L. *Tetrahedron* **2020**, *76*, 130875; (c) Cativiela, C.; Ordoñez, M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 1-63; (d) Vogt, H; Bräse, S. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 406-430; (e) Cativiela, C.; Diaz-de-Villegas, M. D. *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 569-623.

[67] (a) Wang, X.; Li, J.; Hayashi, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144*, 10145; (b) Leonard, D. J.; Zieleniewski, F.; Wellhofer, I.; Baker, E. G.; Ward, J. W.; Woolfson, D. N.; Clayden, J. *Chem. Sci.* **2021**, *12*, 9386; (c) Tanaka, M. *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, *55*, 349; (d) Ohfune, Y.; Shinada, T. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, *2005*. 5127-5143; (e) Venkatraman, J.; Shankaramma, S. C.; Balaram, P. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3131-3152.

[68] (a) Passley, K. D.; Ruble, J. C.; Kerr, M. S.; Organ, M. G. *J. Org. Chem.* **2024**, *89*, 3211-3213; (b) Castro, T. G.; Melle-Franco, M.; Sousa, C. E. A.; Cavaco-Paulo, A.; Marcos, J. C. *Biomolecules* **2023**, *13*, 981; (c) Devillers, E.; Chelain, E.; Dalvit, C.; Brigaud, T.; Pytkowicz, J. *ChemBioChem* **2022**, *23*, e202100470; (d) Ding, Y.; Ting, J. P.; Liu, J.; Al-Azzam, S.; Pandya, P.; Afshar, S. *Amino Acids* **2020**, *52*, 1207-1226; (e) Walsh, C. T.; O'Brien, R. V.; Khosla, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 7098-7124.

Es común encontrar estos α,α-aminoácidos tetrasustituidos en productos naturales bioactivos, como la tambromicina,[69] que está formado por dos residuos de α-metilserina,[70] uno de ellos formando parte de una metiloxazolina, donde los estudios preliminares de este compuesto mostraron una actividad antiproliferativa selectiva contra cinco líneas diferentes de células B y T cancerosas. La α-metilserina también es componente de la (+)-conagenina,[71] piperazimicina A[72] y amicetin[73] (Figura 80). Debido a la importancia química y biológica de la α-metilserina, ha atraído una atención considerable y se han descrito muchos métodos sintéticos para su preparación eficiente de α-metilserina y derivados enantioméricamente enriquecidos.[74]

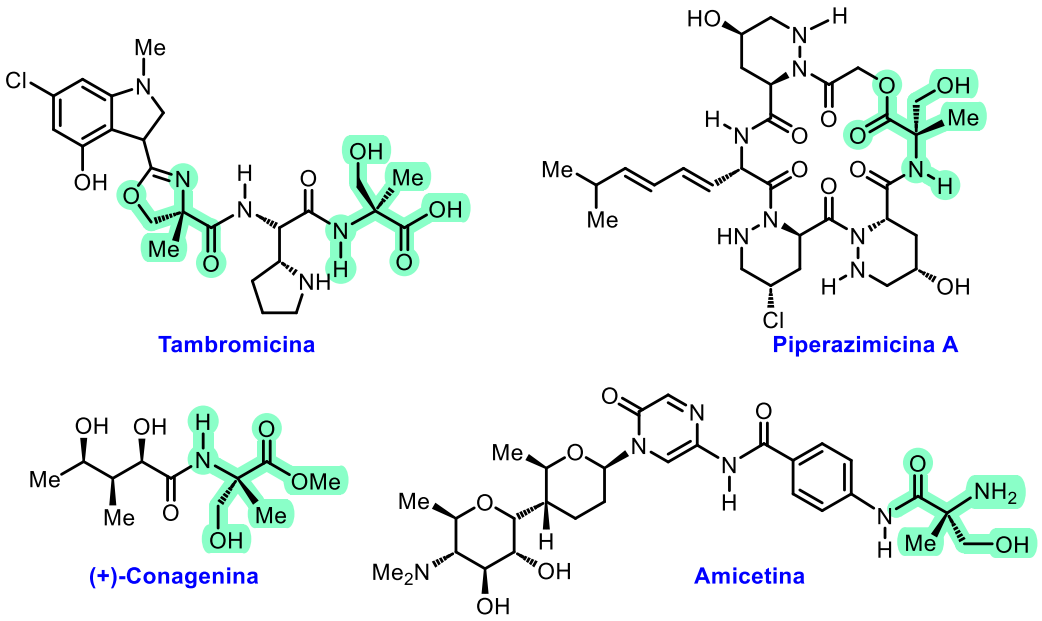


Figura 80. Compuestos farmacológicos que incorporan la α-metilserina.

[69] Goering, A. W.; McClure, R. A.; Doroghazi, J. R.; Albright, J. C.; Haverland, N. A.; Zhang, Y.; Ju, K.-S.; Thomson, R. J.; Metcalf, W. W.; Kelleher, N. L. *ACS Cent. Sci.* **2016**, *2*, 99-108.

[70] Zhang, X.; King-Smith, E.; Renata, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 5037-5041.

[71] (a) Wang, H.-F.; Ma, G.-H.; Yang, S.-B.; Han, R.-G.; Xu, P.-F. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 1630-1635; (b) Nakano, K.; Kotsuki, H.; Ichikawa, Y. *Org. Prep. Proced. Int.* **2008**, *40*, 67-91.

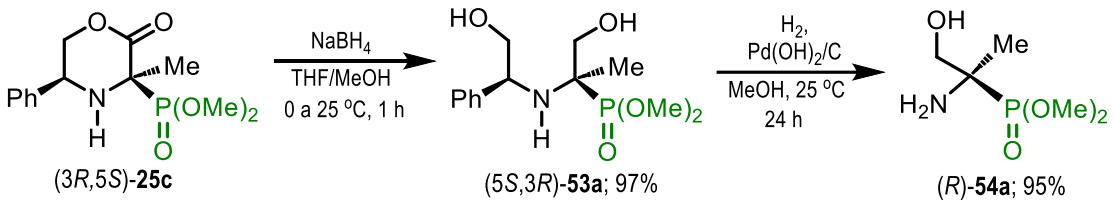
[72] Miller, E. D.; Kauffman, C. A.; Jenesen, P. R.; Fenical, W. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 323-330.

[73] (a) Fu, J.; Xu, P.; Yu, P. *Chin. J. Chem.* **2021**, *39*, 2679-2684; (b) Bloch, A.; Coutsogeorgopoulos, C. *Biochemistry* **1966**, *5*, 3345-3351.

[74] (a) Xiao, Q.; Tang, Y.-F.; Xie, P. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2020**, *22*, 61-68; (b) Wu, H.-M.; Zhang, Z.; Xiao, F.; Wei, L.; Dong, X.-Q.; Wang, C.-J. *Org. Lett.* **2020**, *22*, 4852-4857; (c) Yamamoto, K.; Ishimaru, S.; Oyama, T.; Tanigawa, S.; Kuriyama, M.; Onomura, O. *Org. Process Res. Dev.* **2019**, *23*, 660-666; (d) Anson, M. S.; Clark, H. F.; Evans, P.; Fox, M. E.; Graham, J. P.; Griffiths, N. N.; Meek, G.; Ramsden, J. A.; Roberts, A. J.; Simmonds, S.; Walker, M. D.; Willet, M. *Org. Process Res. Dev.* **2011**, *15*, 389-397; (e) Smith, N. D.; Wohlrab, A. M.; Goodman, M. Enantiocontrolled *Org. Lett.* **2005**, *7*, 255-258; (f) Nakayama, K.; Maruoka, K. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 5461-5463; (g) Avenoza, A.; Cativiela, C.; Corzana, F.; Peregrina, J. M.; Sucunza, D.; Zurbano, M. M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 949-957; (h) Alias, M.; Cativiela, C. Díaz-de-Villegas, M. D.; Gálvez, J. A.; Lapefia, Y. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 14963-14974.

En contraste con la gran cantidad de métodos para la síntesis y uso de la α-metilserina, la α-metilfosfoserina ha permanecido poco explorada, aunque se han publicado algunos estudios sobre la síntesis de la fosfoserina.[75] Sin embargo, hasta donde se tiene conocimiento, aún no se ha descrito la síntesis de la α-metilfosfoserina, a pesar de la gran importancia que tienen estos compuestos. Por lo consiguiente y considerando la relevancia de estos ácidos α-aminofosfónicos no-proteinogénicos como farmacóforo en la búsqueda de nuevos fármacos, lo que concuerda con nuestro actual interés en la síntesis de ácidos α-aminofosfónicos.[76]

Por lo mencionado anteriormente y con la intención de aprovechar el potencial sintético de los α-aminofosfonatos heterocíclicos (3*R*,5*S*)-**25c** y (3*R*,5*S*)-**25a** se propuso continuar con la ruta de síntesis para la obtención enantioselectiva de los α-metilfosfoserinatos de dimetilo. Bajo esta idea, el α-aminofosfonato heterocíclico (3*R*,5*S*)-**25c** se hizo reaccionar con $NaBH_4$ en una mezcla de MeOH/THF, obteniendo el diol (3*R*,5*S*)-**53a**, continuando con la desprotección del grupo amino de acuerdo con las condiciones reportadas por Jullian y col.[77] se obtuvo el α-metil fosfoserinato (*R*)-**54a** con un 94% de rendimiento (Esquema 14).



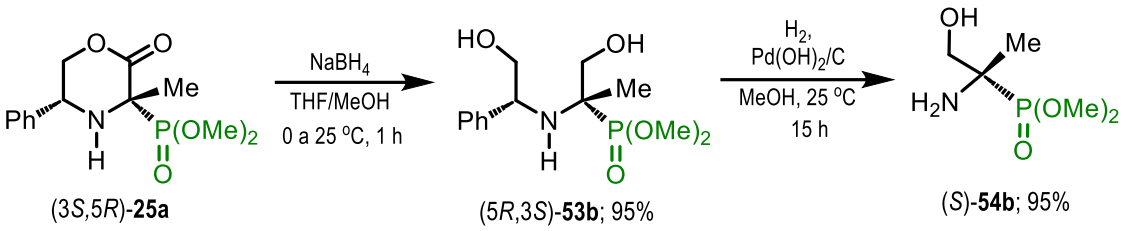
Esquema 14. Obtención del α-metilfosfoserinato de dimetilo (*R*)-**54a** a partir de (5*S*,3*R*)-**25c.**

De manera similar, se logró la obtención del α-metilfosfoserinato de dimetilo (*S*)-**54b** con un rendimiento del 95% a partir del α-aminofosfonato heterocíclico (3*S*,5*R*)-**25a** (Esquema 15).

[75] (a) Hammerschmidt, F.; Lindner, W.; Wuggenig, F.; Zarbl, E. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 2955; (b) Smith, III, A. B.; Yager, K. M.; Taylor, C. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10879; (c) Huber, R.; Knierzinger, A.; Obrecht, J.-P.; Vasella, A. *Helv. Chim. Acta* **1985**, *68*, 1730; (d) Lejczak, B.; Kafarski, P.; Soroka, M.; Mastalerz, P. *Synthesis* **1984**, *7*, 577.

[76] Morales-Solís, J. C.; Ordoñez, M.; Viveros-Ceballos, J. L. *Synthesis* **2024**, *56*, 2588; (b) Hernández-Benítez, R. I.; Viveros-Ceballos, J. L.; Labastida-Galván, V.; Ordoñez, M. *J. Org. Chem.* **2024**, *89*, 4916; (c) Morales-Solís, J. C.; Ordóñez, M.; Argüello-Velasco, R. O.; Viveros-Ceballos, J. L.; Labastida-Galván, V. *Synthesis* **2024**, *56*, 871; (d) Ordóñez, M.; Argüello-Velasco, R. O.; Miranda-Blancas, T.; Romero-Estudillo, I.; Labastida-Galván, V. *Synthesis* **2023**, *55*, 4181; (e) Argüello-Velasco, R. O.; Morales-Solís, J. C.; Muñoz-Vidales, M.; Viveros-Ceballos, J. L.; Romero-Estudillo, I.; Ordoñez. M. *Amino Acids* **2022**, *54*, 299; (f) Viveros-Ceballos, J. L.; Matías-Valdez, L. A.; Sayago, F. J.; Cativiela, C.; Ordoñez, M. *Amino Acids* **2021**, *53*, 451.

[77] Jullian, V.; Quirion, J. C.; Husson, H, P. *Synthesis* **1997**, 1091-1097.

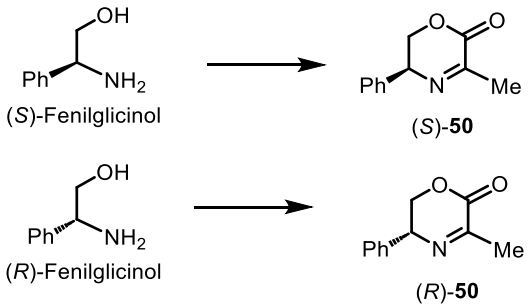


Esquema 15. Obtención del α-metilfosfoserinato de dimetilo (*S*)-**54b** a partir de (5*R*,3*S*)-**25a.**

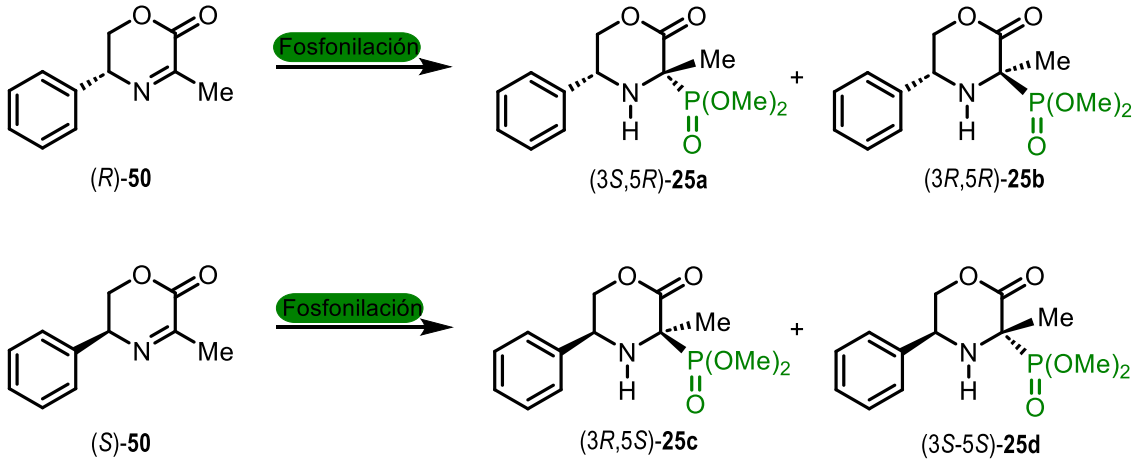
Finalmente, en este capítulo se logró la síntesis de los compuestos (Diseño, Capítulo II) de interés de los α-aminofosfonatos heterocíclicos (3*R*,5*S*)-**25c** y (3*R*,5*S*)-**25a**. Además, se desarrolló un método para su purificación y aislamiento. También, se logró desarrollar una nueva síntesis de (*S*)- y (*R*)-α-metilfosfoserinato de dimetilo enantioméricamente enriquecidos, obtenidos a partir de los α-aminofosfonatos heterocíclicos (3*R*,5*S*)-**25c**y (3*R*,5*S*)-**25a**. Donde, se redujo el grupo éster con $NaBH_4$ y bajo hidrogenólisis se eliminó el fragmento de fenilglicinol.

5. Conclusiones

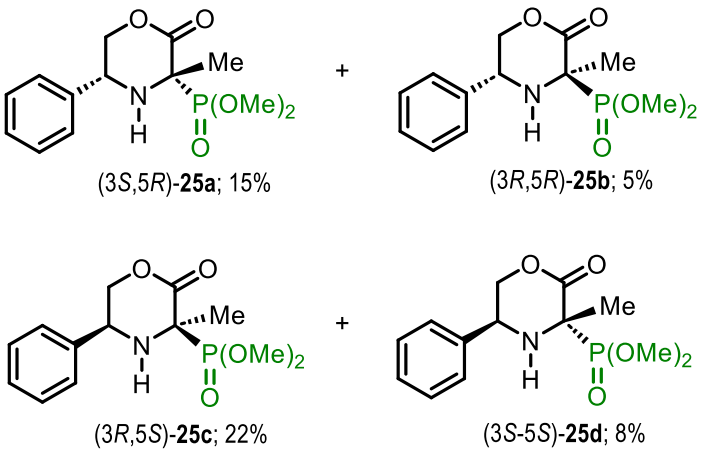
5.1 Se logró la preparación de la (*S*)- y (*R*)-3-metill-5-fenil-5,6-dihidro-2*H*-1,4-oxazin-2-ona (*S*)-**50** y (*R*)-**50** a partir del (*S*) y (*R*)-fenilglicinol.



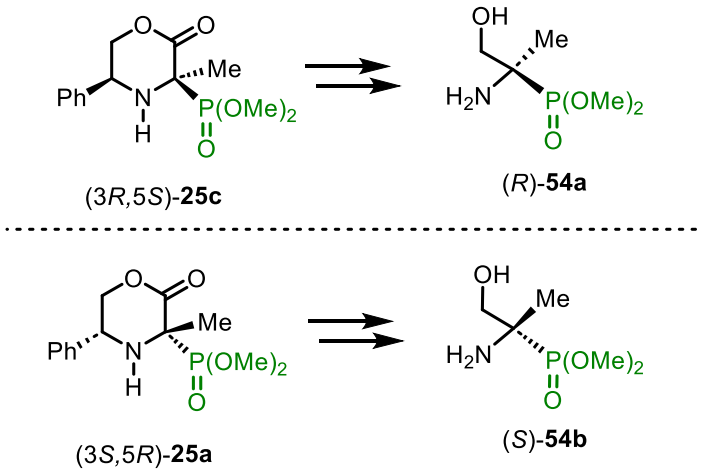
5.2. Se logró la fosfonilación de la (*S*)- y (*R*)-3-metill-5-fenil-5,6-dihidro-2*H*-1,4-oxazin-2-ona **50** en presencia y ausencia de catalizadores, obteniendo los α-aminofosfonatos heterocíclicos (3*S*,5*R*)-**25a,** (3*R*,5*R*)-**25b,** (3*R*,5*S*)-**25c**, y (3*S*,5*S*)-**25d** con moderada diastereoselectividad.



5.3. Se logró la asignación de configuración absoluta de los estereoisómeros (5*R*,3*R*)-**25a**, (3*S*,5*R*)-**25b,** (3*S*,5*S*)-**25d** y (3*R*,5*S*)-**25c** a través de RMN de 2D (HSQC y NOESY).



5.4. Se logró establecer las condiciones óptimas para la obtención de los α-metilfosfoserinatos de dimetilo (*R*)-**54a** y (*S*)-**54b** enantiomericamente enriquecidos a partir de los α-aminofosfonatos heterocíclicos (3*R*,5*S*)-**54a** y (3*S*,5*R*)-**54b.**



6. Parte experimental

6.1. Información general

Los reactivos utilizados se adquirieron de Sigma-Aldrich y no se manipularon de ninguna forma antes de su uso. El material para las reacciones en condiciones anhidras se secó con anticipación. Por otro lado, los disolventes usados en condiciones anhidras tuvieron un tratamiento; el disolvente THF se secó sobre sodio metálico y benzofenona como indicador, mientras que las reacciones que utilizaron CH_2Cl_2 se secó sobre CaH_2.

Las reacciones se monitorearon por cromatografía en capa fina usando cromatofolios 60 F_{254} de Merck y como reveladores se utilizaron radiación ultravioleta (254 nm), vapores de I_2, o disolución de ninhidrina y $KMnO_4$. La purificación de los productos obtenidos se llevó a cabo por cromatografía en columna CC, utilizando como fase estacionaria gel de sílice Merck 60® (malla 230-400).

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns utilizando cubreobjetos y no están corregidos. Los experimentos de resonancia magnética nuclear (RMN) se determinaron en los espectrofotómetros Brucker Avance III HD 500 MHz para ^{1}H, ^{13}C y ^{31}P y en un JOEL 600 MHz para ^{1}H, ^{13}C. Los desplazamientos químicos (δ) se reportaron en partes por millón (ppm) con respecto a la referencia interna tetrametilsilano (TMS) o las señales residuales del disolvente como metanol deuterado para ^{1}H. La multiplicidad de las señales se denotan con los siguientes símbolos: sa (señal ancha), s (señal simple), d (señal doble), t (señal triple), dd (doble de doble), m (señal multiple). Las constantes de acoplamiento (*J*) se reportan en Hertz (Hz). Los disolventes deuterados utilizados fueron cloroformo deuterado ($CDCl_3$) y metanol deuterado (CD_3OH).

Los análisis de masas de alta resolución se determinaron en un equipo JEOL HM-MStation MS-700. Las técnicas de ionización fueron por bombardeo de átomos rápidos (FAB^+). Las rotaciones ópticas α_D^{20} se determinaron en un polarímetro Perkin-Elmer 341 con lámpara de Na a 589 nm y 20 ^{o}C.

7. Métodos sintéticos

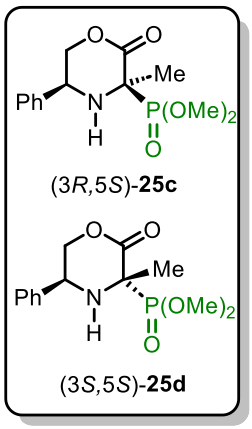
7.1. Síntesis de (*S*)-3-metil-5-fenil-5,6-dihidro-2*H*-1,4-oxazin-2-ona (*S*)-**50**.

En un matraz redondo de 25 mg se colocaron 110.0 mg, 0.1 mL (1.0 mmol, 1.0 equiv.) de piruvato de etilo, 200 mg (1.4 mmol) de (*S*)-(+)-2-fenilglicinol y 150 mg de silice. La mezcla de reacción se agitó en un baño de aceite a 50 °C durante 1.5 horas. El crudo de la reacción se filtró sobre algodón y se lavó con AcOEt (4 x 10 mL). La fase orgánica se evaporó a presión reducida y el residuo resultante se purificó por cromatografía en columna utilizando una mezcla de Hexano/AcOEt (70:30) como eluyente, obteniéndose el compuesto (*S*)-**50**[78] (49 mg, 25%) como un aceite amarillo pálido.

7.2. Síntesis de (*R*)-3-metil-5-fenil-5,6-dihidro-2*H*-1,4-oxazin-2-ona (*R*)-**50**.

En un matraz redondo de 25 mg se colocaron 110 mg, 0.1 mL (1.0 mmol, 1.0 equiv) de piruvato de etilo, 200 mg (1.4 mmol) de (*R*)-(-)-2-fenilglicinol y 150 mg de silice. La mezcla de reacción se agitó en un baño de aceite a 50 °C durante 1.5 horas. El crudo de la reacción se filtró sobre algodón y se lavó con AcOEt (4 x 10 mL). La fase orgánica se evaporó bajo presión reducida y el residuo resultante se purificó por cromatografía en columna utilizando una mezcla Hexano/AcOEt (70:30) como eluyente, obteniéndose el compuesto (*R*)-**50**[32] (52 mg, 27%) como un aceite amarillo pálido.

7.3. Síntesis de ((3*S*,5*S*)-3-metill-2-oxo-5-fenilmorfolin-3-il)fosfonato de dimetilo (3*S*,5*S*)-**25d** y ((3*R*,5*S*)-3-metil-2-oxo-5-fenilmorfolin-3-il)fosfonato de dimetilo (3*R*,5*S*)-**25c**.



A una disolución de 50 mg, (0.26 mmol) de la imina (*S*)-**50** en 2.0 mL de MeCN a 0 °C se adicionaron 50 mg (0.29 mmol) de Cbz-Cl. Terminada la adición, la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente por 30 minutos. Después de este tiempo, se adicionaron 0.03 mL de fosfito de trimetilo (0.29 mmol). Posteriormente la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente con agitación vigorosa durante 17 horas. El producto resultante se purificó por cromatográfica en columna utilizando AcOEt como eluyente. Posteriormente, el residuo se purificó por cromatografía en columna utilizando una mezcla de CH_2Cl_2/acetona (80:20) como eluyente, obteniéndose el compuesto mayoritario (3*R*,5*S*)-**25c** (38 mg, 48%) como un sólido cristalino blanco, el cual se cristalizó en una mezcla de CH_2Cl_2/Hexano. p. f. = 130-132 °C °C $[\alpha]_D^{20}$ = +16.3 (c 1.0, $CHCl_3$), el compuesto minoritario (3*S*, 5*S*)-**25d** 14 mg, 17%) como

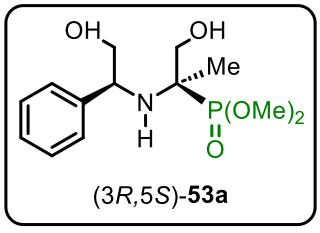
[78] Kidd, S. L.; Fowler, E.; Reinhardt, T.; Compton, T.; Mateu, N.; Newman, H.; Bellini, D.; Talon, R.; McLoughlin, J.; Krojer, T.; Aimon, A.; Bradley, A.; Fairhead, M.; Brear, P.; Díaz-Saez, L.; McAuley, K.; Sore, H. F.; Madin, A.; O'Donovan, D. H.; Huber, K. V. M.; Hyvonen, M.; von Delft, F.; Dowson, C. G.; Spring, D. R. *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 10792.

un aceite amarillo pálido $[\alpha]_D^{20}$ = +20.8 (c 1.0, $CHCl_3$) y una mezcla inseparable de (3*R*,5*S*)-**25c** y (3*S*,5*S*)-**25d** (5.6 mg, 7%).

Compuesto mayoritario (3*R*,5*S*)-25c: RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$): δ 1.78 (d, *J* = 16.2 Hz, 3H, CH_3), 3.92 (d, *J* = 10.5 Hz, 3H, $(CH_3O)_2P$), 3.97 (d, *J* = 10.5 Hz, 3H, $(CH_3O)_2P$), 4.28 (dd, *J* = 10.3, 3.0 Hz, 1H, CH_2O), 4.33 (ddd, *J* = 10.4, 3.1, 1.4 Hz, 1H, CH), 4.52 (dd, *J* = 10.4, 0.2 Hz, 1H, CH_2O), 7.33-7.48 (m, 5H, H_{arom}). RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) δ 23.9 (CH_3), 53.8 (d, *J* = 8.8 Hz, CH), 54.9 (d, *J* = 7.7 Hz, $(CH_3O)_2P$), 55.5 (d, *J* = 7.3, $(CH_3O)_2P$) 61.6 (d, *J* = 163.9 Hz, C-P), 75.0 (CH_2O), 127.6 (C), 129.0, 129.1, 137.2, 168.4 (C=O). ^{31}P RMN (202 MHz, $CDCl_3$) δ 21.2. HRMS. [FAB+]: Calculado para $C_{13}H_{19}NO_5P$ $[M+H]^+$ m/z 300.1001 encontrado 300.0997.

Compuesto minoritario (3*S*,5*S*)-25d: RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$): δ 1.73 (d, *J* = 15.6 Hz, 3H, CH_3), 3.85 (d, *J* = 10.5 Hz, 3H, $(CH_3O)_2P$), 3.90 (d, *J* = 10.7 Hz, 3H, $(CH_3O)_2P$), 4.28 (dd, *J* = 10.7 Hz, 1H, CH_2O), 4.38 (ddd, *J* = 10.6, 3.5, 0.8, 1H, CH_2O), 4.82 (dt, *J* = 10.7, 2.9 Hz, 1H, CH), 7.29-7.46 (m, 5H, H_{arom}). RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) δ 24.6 (CH_3), 53.6 (CH), 54.2 (d, *J* = 7.7 Hz, $(CH_3O)_2P$), 54.6 (d, *J* = 7.3 Hz, $(CH_3O)_2P$), 61.7 (d, *J* = 129.9 Hz, C-P), 75.4 (CH_2O), 127.5, 128.9, 129.0, 137.5, 168.0 (C=O). RMN ^{31}P (202 MHz, $CDCl_3$) δ 24.3. HMRS [FAB+]: Calculado para $C_{13}H_{19}NO_5P$ $[M+H]^+$ m/z 300.1001; encontrado 300.1006.

7.4. Síntesis de (1-hidroxi-2-(((*R*)-2-hidroxi-1-feniletil)amino)propan-2-il) fosfosnato de dimetilo (5*S*,3*R*)-**53a**.



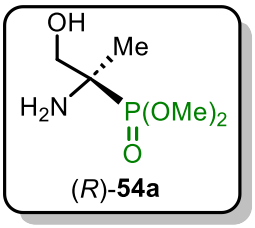
(3*R*,5*S*)-**53a**

En un matraz redondo de 50 mL provisto de una barra de agitación magnética, se colocaron 200 mg (0.67 mmol) del (3*R*,5*S*)-**25c** y 6.4 mL de THF. El matraz se sumergió en un baño a 0 °C, y a esta temperatura se adicionaron 102 mg (2.67 mmol) de borohidruro de sodio. Posteriormente se adicionaron gota a gota 3.2 mL de MeOH (cuidado la reacción es exotérmica). Terminada la adición, la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos, se neutralizó con 1 mL de una disolución de NH_4Cl, seguido de una extracción con AcOEt (3x10mL). El disolvente se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y evaporó a presión reducida. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna utilizando una mezcla de AcOEt:MeOH (80:20) como eluyente, obteniéndose 139.1 mg (97%) (3*R*,5*S*)-**53a** como un polvo blanco. p.f. = °C, α_D^{20} = +40.0 (c 1.0, $CHCl_3$).

RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$): δ 1.08 (d, *J* =16.5 Hz, 3H, CH_3), 3.46 (dd, *J* = 11.0, 9.6, 1H, CH_2OH), 3.59-3.73 (m, 3H, CH_2OH), 3.75 (d, *J* = 10.4 Hz, 3H, $(CH_3O)_2P$), 3.83 (d, *J* = 10.2 Hz, 3H, $(CH_3O)_2P$), 4.11

(dd, *J* = 9.5 Hz, 4.4 Hz, CH), 7.24 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H, H_{arom}), 7.32 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, H_{arom}), 7.37-7.40 (m, 2H, H_{arom}). RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) δ 18.0 (CH_3), 52.9 (d, *J* = 8.2 Hz, $(CH_3O)_2P$), 54.3 (d, *J* = 7.3 Hz, $(CH_3O)_2P$), 58.0 (d, *J* = 11.4 Hz, CH), 58.9 (d, *J* = 152.6 Hz, C-P), 64.0 (d, *J* = 4.5 Hz, CH_2OH), 68.0 (CH_2OH) 127.1, 127.4, 128.5, 143.0. RMN ^{31}P (202 MHz, $CDCl_3$) δ 31.0. HMRS [FAB+]: Calculado para $C_{13}H_{23}NO_5P$ $[M+H]^+$ m/z 304.1314; encontrado 304.1291.

7.5. Síntesis de (*R*)-(2-amino-1-hidroxipropan-2-il)fosfonato de dimetilo (*R*)-**54a**.

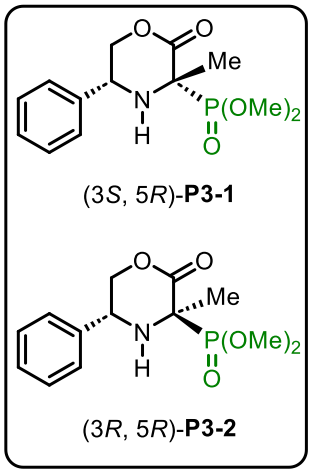


(*R*)-**54a**

En un matraz redondo de 25 mL provisto de una barra de agitación magnética, se colocaron 139 mg (0.46 mmol) del (3*R*,5*S*)-**53a**, 28 mg (20% mol) de $Pd(OH)_2/C$. El matraz se purgó con N_2 y se adicionaron 9 mL de MeOH. Posteriormente, el matraz se saturó de H_2 y se dejó en agitación a temperatura ambiente durante toda la noche. Transcurrido el tiempo de reacción, la mezcla de reacción se filtró sobre celita y se lavó con MeOH. El disolvente se evaporó a presión reducida y el residuo resultante se purificó por cromatografía en columna utilizando una mezcla de AcOEt:MeOH (80:20) como eluyente, obteniéndose 80 mg (95%) de (*R*)-**54a** como un aceite incoloro α_D^{20} = (c 1.0, CH_3OH).

RMN ^1H (500 MHz, $CDCl_3$): δ 1.35 (d, *J* = 16.3 Hz, 3H, CH_3), 3.64 (dd, *J* = 19.8, 11.7 Hz, 1H, CH_2OH), 3.80 (dd, *J* = 23.15, 7.7 Hz, 1H, CH_2OH), 3.91 (d, *J* = 10.4 Hz, 3H, $(CH_3O)_2P$), 3.93 (d, *J* = 10.6 Hz, 3H, $(CH_3O)_2P$). RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) δ 19.3 (CH_3), 53.7 (d, *J* = 149.1 Hz, C-P), 54.0 (d, *J* = 7.5 Hz, $(CH_3O)_2P$), 54.1 (d, *J* = 7.4 Hz, $(CH_3O)_2P$), 66.5 (d, *J* = 3.7 Hz, CH_2OH). RMN ^{31}P (202 MHz, $CDCl_3$) δ 33.7. HRMS [FAB+]: Calculado para $C_5H_{15}NO_4P$ $[M+H]^+$ m/z 184.0739; encontrado 184.0744

7.6. Síntesis de ((3*S*,5*R*)-3-metil-2-oxo-5-fenilmorfolin-3-il)fosfonato de dimetilo (3*S*,5*R*)-**25a** y ((3*R*,5*R*)-3-metil-2-oxo-5-fenilmorfolin-3-il)fosfonato de dimetilo (3*R*,5*R*)-**25b**.



(3*S*, 5*R*)-**P3-1**

(3*R*, 5*R*)-**P3-2**

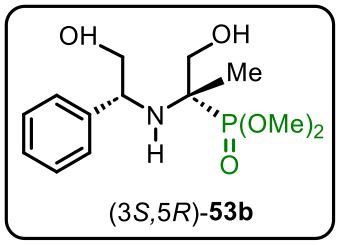
A una disolución de la imina (*S*)-**50** (50 mg, 0.26 mmol) en CH_3CN (2.5 mL) a 0 °C se le adicionó 49 mg, 0.04 mL (0.29 mmol) de CbzCl. Terminada la adición se agitó llevada agitación por 30 minutos. Después de este tiempo, se adicionó 36 mg, 0.03 mL (0.29 mmol) de fosfito de trimetilo. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 17 horas. El producto resultante se purificó por columna cromatográfica utilizando AcOEt como eluyente. Posteriormente, el residuo se purificó con una mezcla de CH_2Cl_2/acetona (80:20) como eluyente, obteniéndose el compuesto mayoritario (3*R*,5*S*)-**25a** (38 mg, 48%) como un sólido

cristalino blanco, el cual se cristalizó en una mezcla de CH_2Cl_2/Hexano. p. f. = 130-132 °C °C $[\alpha]_D^{20}$ = +16.3 (c 1.0, $CHCl_3$), el compuesto minoritario (3*S*,5*S*)-**25b** (13.5 mg, 17%) se obtuvo como un aceite amarillo pálido $[\alpha]_D^{20}$ = +20.8 (c 1.0, $CHCl_3$) y una mezcla inseparable de (3*S*,5*R*)-**25a** y (3*R*,5*R*)-**25b** (5.6 mg, 7%).

Compuesto mayoritario (3*S*,5*R*)-25a: RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$): δ 1.78 (d, *J* = 16.2 Hz, 3H, CH_3), 1.88 (bs, 1H, NH), 3.92 (d, *J* = 10.5 Hz, 3H, $(CH_3O)_2P$), 3.97 (d, *J* = 10.5 Hz, 3H, $(CH_3O)_2P$), 4.28 (dt, *J* = 10.4 Hz, 3.1 Hz, 1H, CH_2O), 4.33 (ddd, *J* = 10.5, 3.2, 1.4 Hz, 1H, CH), 4.52 (dd, *J* = 10.5, 0.2 Hz, CH_2O), 7.31-7.49 (m, 5H, H_{arom}). RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) δ 23.2 (CH_3), 53.9 (d, *J* = 8.6 Hz, CH), 54.9 (d, *J* = 7.7 Hz, $(CH_3O)_2P$), 55.4 (d, *J* = 7.3 Hz, $(CH_3O)_2P$), 61.5 (d, *J* = 163.5 Hz, C-P), 75.1 (CH_2O), 127.5, 129.0, 129.1, 137.1, 168.4 (C=O). RMN ^{31}P (202 MHz, $CDCl_3$) δ 21.2 HRMS [FAB+]: Calculado para $C_{13}H_{19}NO_5P$ $[M+H]^+$ m/z 300.1001; encontrado 300.1017.

Compuesto minoritario (3*R*,5*R*)-25b: RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$): δ 1.73 (d, *J* = 15.6 Hz, 3H, CH_3), 2.50 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H, NH), 3.85 (d, *J* = 10.5 Hz, 3H, $(CH_3O)_2P$), 3.90 (d, *J* = 10.6 Hz, 3H, $(CH_3O)_2P$), 4.28 (dd, *J* = 10.7, 0.05 Hz, 1H, CH_2O), 4.38 (ddd, *J* = 8.8, 2.8, 0.7 Hz, 1H, CH_2O), 4.82 (dt, *J* = 9.0, 2.4 Hz, 1H, CH), 7.32-7.46 (m, 5H, H_{arom}). RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) δ 24.6 (CH_3), 53.6 (CH), 54.2 (d, *J* = 7.6 Hz, $(CH_3O)_2P$), 54.6 (d, *J* = 7.2 Hz, $(CH_3O)_2P$), 61.6 (d, *J* = 130.0 Hz, C-P), 75.4 (CH_2O), 127.5, 128.9, 129.0, 137.5, 168.0 (C=O). RMN ^{31}P (202 MHz, $CDCl_3$) δ 24.2. HRMS [FAB+]: Calculado para $C_{13}H_{19}NO_5P$ $[M+H]^+$ m/z 300.1001; encontrado 300.0993.

7.7. Síntesis de ((*R*)-1-hidroxi-2-(((*S*)-2-hidroxi-1-feniletil)amino)propan-2-il)fosfonato de dimetilo (3*S*,5*R*)-**53b**.

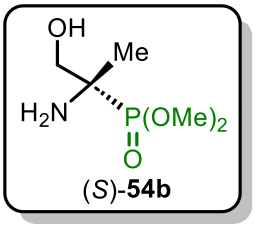


(3*S*,5*R*)-**53b**

En un matraz redondo de 50 mL provisto de una barra de agitación magnética, se colocaron 144 mg (0.48 mmol) del (3*S*,5*R*)-**25a** y 4.6 mL de THF. El matraz se sumergió en un baño a 0 °C, y a esta temperatura se adicionaron 73 mg (1.93 mmol) de borohidruro de sodio. Posteriormente se adicionaron gota a gota 2.3 mL de MeOH (cuidado la reacción es exotérmica). Terminada la adición, la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos, se neutralizó con 1 mL una disolución saturada de NH_4Cl, seguido de una extracción con AcOEt (3x10mL). El disolvente se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y evaporó a presión reducida. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna utilizando una mezcla de AcOEt:MeOH (80:20) como eluyente, obteniéndose 140 mg (96%) (3*S*,5*R*)-**53b** como un polvo blanco. p.f. = °C, α_D^{20} = -41.0 (c 1.0, $CHCl_3$).

RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$): δ 1.07 (d, *J* = 16.5 Hz, 3H, CH_3), 1.22-1.28 (m, 1H, NH), 3.42-3.49 (m, 1H, CH_2OH), 3.61-3.73 (m, 3H, CH_2OH), 3.75 (d, *J* = 10.4 Hz, 3H, $(CH_3O)_2P$), 3.83 (d, *J* = 10.2 Hz, 3H, $(CH_3O)_2P$), 4.11 (dd, *J* = 9.7 Hz, 4.0 Hz, CH), 7.24 (t, *J* = 7.3 Hz, H_{arom}), 7.32 (t, *J* = 7.6 Hz, H_{arom}), 7.36-7.42 (m, 2H, H_{arom}). RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) δ 18.22 (CH_3), 53.0 (d, *J* = 7.7 Hz $(CH_3O)_2P$), 54.3 (d, *J* = 7.3 Hz $(CH_3O)_2P$), 58.2 (d, *J* = 11.4 Hz CH), 59.0 (d, *J* = 152.6 Hz C-P), 64.2 (d, *J* = 4.5 Hz, CH_2OH), 68.1 (CH_2OH), 127.1, 127.4, 128.6, 143.3. RMN ^{31}P (202 MHz, $CDCl_3$) δ 31.0. HRMS [FAB+]: Calculado para $C_{13}H_{23}NO_5P$ $[M+H]^+$ m/z 304.1314; encontrado 304.1291.

7.8. (*S*)-(2-Amino-1-hidroxipropan-2-il)fosfonato de dimetilo (*S*)-**54b**.



(*S*)-**54b**

En un matraz redondo de 25 mL provisto de una barra de agitación magnética, se colocaron 130 mg (0.43 mmol) del (3*S*,5*R*)-**53b** y 26 mg (20% mol) de $Pd(OH)_2/C$. El matraz se purgó con N_2 y se adicionaron 8 mL de MeOH. Posteriormente, el matraz se saturó de H_2 y se dejó en agitación a temperatura ambiente durante toda la noche. Transcurrido el tiempo de reacción, la mezcla de reacción se filtró sobre celita y se lavó con MeOH. El disolvente se evaporó a presión reducida y el residuo resultante se purificó por cromatografía en columna utilizando una mezcla de AcOEt:MeOH (80:20) como eluyente, obteniéndose 74 mg (94%) de (*S*)**-54b** como aceite incoloro α_D^{20} = (c 1.0, CH_3OH).

RMN ^{1}H (500 MHz, CD_3OD): δ 1.17 (d, *J* = 16.5 Hz, 3H, CH_3), 3.46 (dd, *J* = 19.8 Hz, 11.7 Hz, 1H, CH_2OH), 3.55-3.65 (m, 1H, CH_2OH), 3.72 (d, *J* = 10.4 Hz, 3H, $(CH_3O)_2P$), 3.93 (d, *J* = 10.4 Hz, 3H, $(CH_3O)_2P$). RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD): δ 18.9 (CH_3), 53.7 (d, *J* = 148.5 Hz, C-P), 54.0 (d, *J* = 7.7 Hz, $(CH_3O)_2P$), 54.1 (d, *J* = 7.7 Hz, $CH_3O)_2P$), 66.5 (d, *J* = 3.2 Hz, CH_2OH). RMN ^{31}P (202 MHz, CD_3OD): δ 33.7. HMRS [FAB+]: Calculado para $C_5H_{15}NO_4P$ $[M+H]^+$ m/z 184.0739; encontrado 184.

Apéndice teórico

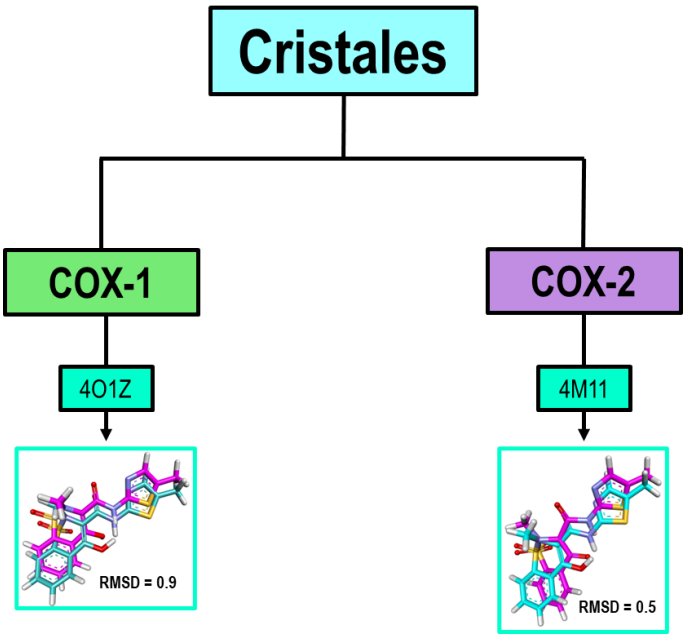
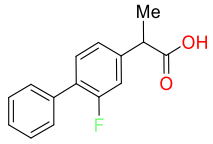
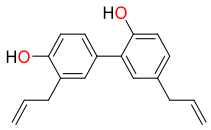
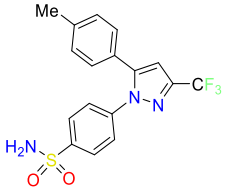
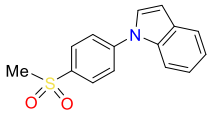
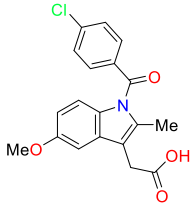
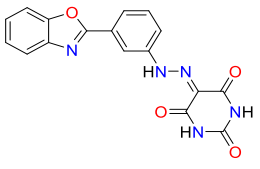
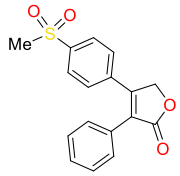
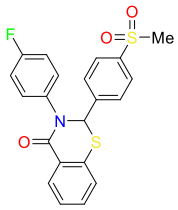
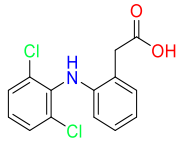
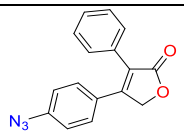
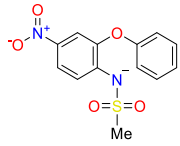
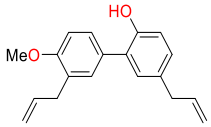
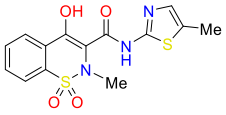
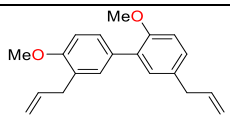
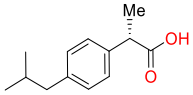
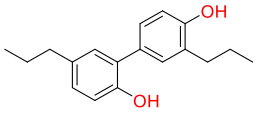
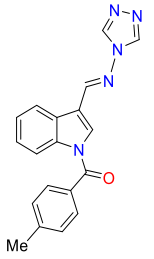
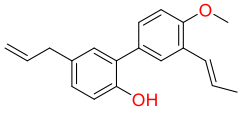
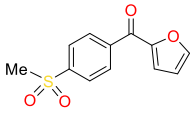
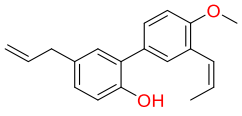
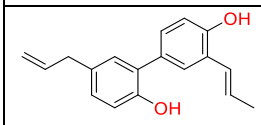


Figura A1. Los valores de RMSD obtenidos de la validación estructural del modelo computacional con meloxicam (magenta) presentaban una orientación paralela del átomo de nitrógeno del anillo de tiazol con el carbonilo de la amida pose original y pose obtenida en los compuestos tras el experimento como se muestra: meloxicam (cian).

Compuestos antiinflamatorios

Tabla A1. Valores IC_{50} de AINEs y compuestos antiinflamatorios.

Compuesto	Valores de IC_{50} (μM)		Compuesto	Valores de IC_{50} (μM)	
	COX-1	COX-2		COX-1	COX-2
 MW: 244.27	0.59	3.1	 MW: 263.13-	1.8	2.1
 MW: 381.08	50	0.28	 MW: 271.07	78.7 ± 3.60	0.3 ± 0.04
	0.13	5.7	 MW: 349.08	1.92 ± 0.9	8.21 ± 1.6

MW: 357.08					
 MW: 314.06	100	0.39	 MW: 413.06	12.95	0.05
 MW: 295.02	18.79	1.24	 MW: 277.09	159.72	0.196
 MW: 307.04	9.2	0.52	 MW: 280.15	0.1	0.06
 MW: 353.05	19.4	1.37	 MW: 294.16	11.4	7.7
 MW: 206.13	2.9	1.1	 MW: 270.16	0.8	2.1
 MW: 329.13 **30**	7.89	0.98	 MW: 280.15	0.7	0.2
 MW: 250.03	15.1 ± 0.94	19.2 ± 1.80	 MW: 280.15	2.8	0.9
 MW: 266.13	0.6	2.7			

Valores de energía de interacción (Kcal/mol) de los inhibidores de COXs

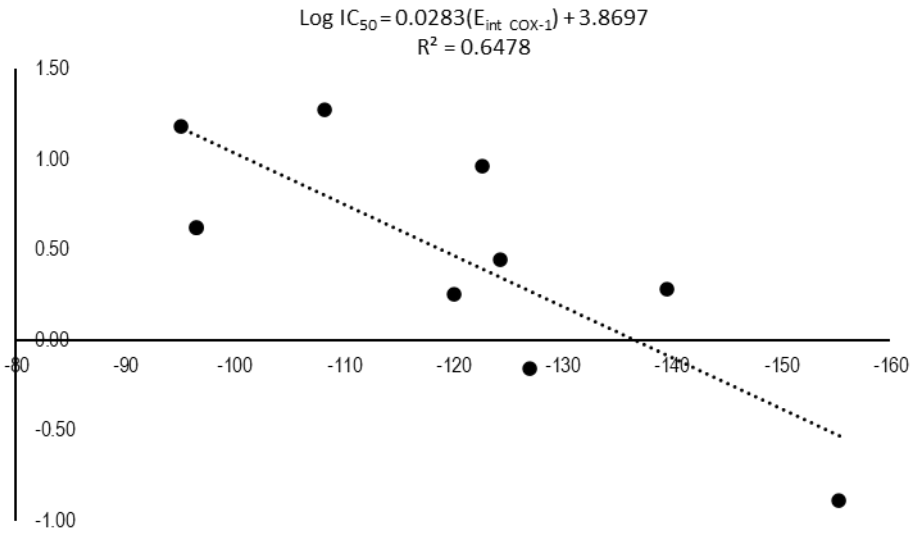


Figura A2. Valores de energía de interacción (Kcal/mol) de inhibidores de COX-1 que se acoplaron al cristal 1EQG. Los valores de Log $IC_{50\ exp}$, Log $IC_{50\ calc}$ y delta error (Δ error) son los que se muestran.

Tabla A2. Inhibidores de la COX-1 que se acoplaron al cristal 1EQG. Los valores de Log $IC_{50\ exp}$, Log $IC_{50\ calc}$ y delta error (Δ error) son los que se muestran.

Compuestos	Energía	Log $IC_{50\ exp}$	Log $IC_{50\ calc}$	Δ error
Ibuprofeno[1]	-96.57	0.61	1.14	0.53
3	-120.03	0.26	0.47	0.21
8	-127.04	-0.15	0.27	0.12
12	-124.25	0.45	0.35	-0.1
10	-139.49	0.28	-0.08	-0.36
11	-95.09	1.18	1.18	0
Diclofenaco	-108.23	1.27	0.81	-0.46
Indometacina	-155.27	-0.89	-0.52	-1.41
Nimesulida	-122.59	0.96	0.40	-0.56

[1] Ligando correspondiente al cristal.

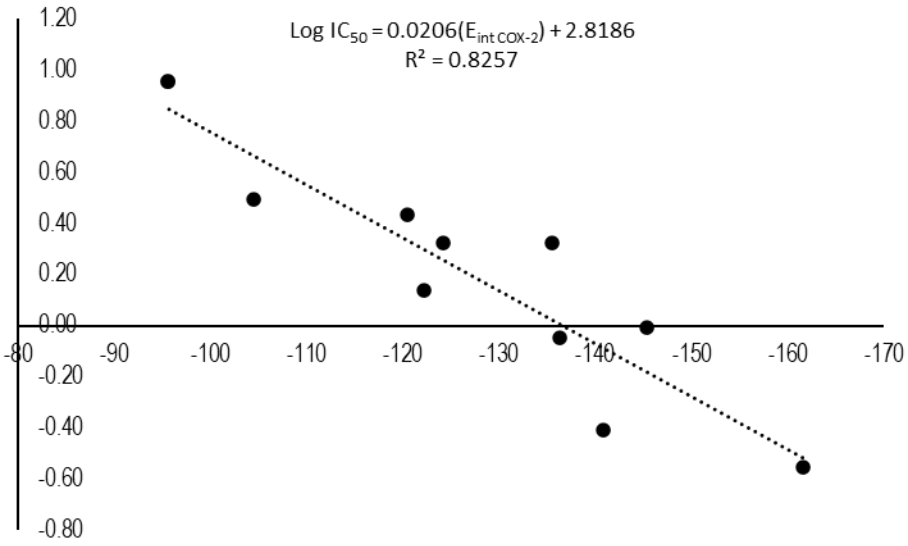


Figura A3. Valores de energía de interacción (Kcal/mol) de inhibidores de COX-2 que se acoplaron al cristal 4PH9. Los valores de Log $IC_{50\ exp}$, Log $IC_{50\ calc}$ y delta error (Δ error) son los que se muestran.

Tabla A3. Inhibidores de la COX-2 que se acoplaron al cristal 4PH9. Los valores de Log $IC_{50\ exp}$, Log $IC_{50\ calc}$ y delta error (Δ error) son los que se muestran.

Compuestos	Energía	Log $IC_{50\ exp}$	Log $IC_{50\ calc}$	Δ error
Ibuprofeno[1]	-95.66	0.95	0.85	-0.1
3	-135.53	0.32	0.03	-0.29
14	-124.25	0.32	0.26	-0.06
12	-136.32	-0.05	0.01	0.06
7	-120.5	0.43	0.34	-0.09
13	-145.4	-0.01	-0.18	-0.17
Celecoxib	-161.57	-0.55	-0.51	0.04
Flurbiprofeno	-104.45	0.49	0.67	0.18
Meloxicam	-122.27	0.14	0.30	0.16

[1] Ligando correspondiente al cristal.

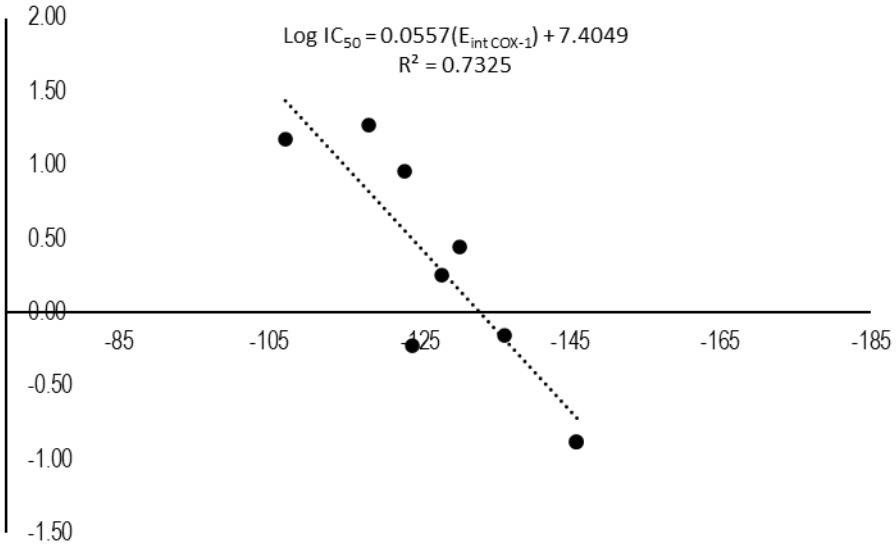


Figura A4. Valores de energía de interacción (Kcal/mol) de inhibidores de COX-1 que se acoplaron al cristal 2OYU. Los valores de Log $IC_{50\ exp}$, Log $IC_{50\ calc}$ y delta error (Δ error) son los que se muestran.

Tabla A4. Inhibidores de la COX-1 que se acoplaron al cristal 2OYU. Los valores de Log $IC_{50\ exp}$, Log $IC_{50\ calc}$ y delta error (Δ error) son los que se muestran.

Compuestos	Energía	Log $IC_{50\ exp}$	Log $IC_{50\ calc}$	Δ error
Indometacina[1]	-145.91	-0.89	-0.72	0.17
3	-127.84	0.26	0.28	0.02
8	-136.29	-0.15	-0.19	-0.04
12	-130.2	0.45	0.15	-0.3
7	-123.93	-0.22	0.50	0.72
12	-107.02	1.18	1.44	0.26
Diclofenaco	-118.2	1.27	0.82	-0.45
Nimesulida	-122.99	0.96	0.55	-0.41

[1] Ligando correspondiente al cristal.

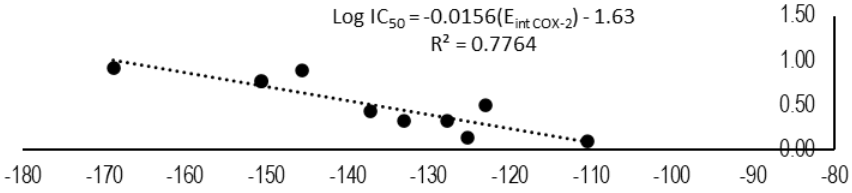


Figura A5. Valores de energía de interacción (Kcal/mol) de inhibidores de COX-2 que se acoplaron al cristal 4COX. Los valores de Log $IC_{50\ exp}$, Log $IC_{50\ calc}$ y delta error (Δ error) son los que se muestran.

Tabla A5. Inhibidores de la COX-2 que se acoplaron al cristal 4COX. Los valores de Log $IC_{50\ exp}$, Log $IC_{50\ calc}$ y delta error (Δ error) son los que se muestran.

Compuestos	Energía	Log $IC_{50\ exp}$	Log $IC_{50\ calc}$	Δ error
Indometacina[1]	-150.6	0.76	0.72	-0.04
3	-127.7	2.1	2.0	-0.1
2	-145.69	0.89	0.64	-0.25
14	-133.07	0.32	0.45	0.13
7	-137.15	0.43	0.51	0.08
10	-168.87	0.91	1.00	0.09
Diclofenaco	-110.47	0.09	0.09	0
Flurbiprofeno	-123.05	0.49	0.29	-0.2

[1] Ligando correspondiente al cristal.

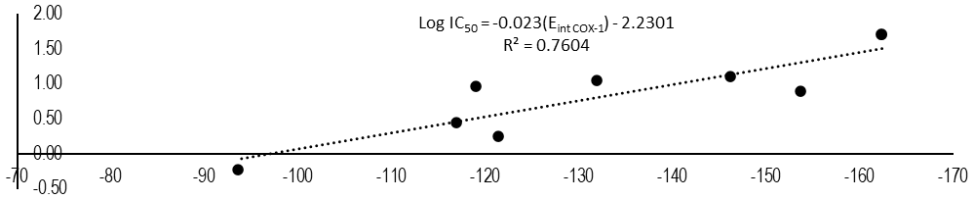


Figura A6. Valores de energía de interacción (Kcal/mol) de inhibidores de COX-1 que se acoplaron al cristal 3KK6. Los valores de Log $IC_{50\ exp}$, Log $IC_{50\ calc}$ y delta error (Δ error) son los que se muestran.

Tabla A6. Inhibidores de la COX-1 que se acoplaron al cristal 3KK6. Los valores de Log $IC_{50\ exp}$, Log $IC_{50\ calc}$ y delta error (Δ error) son los que se muestran.

Compuestos	Energía	Log $IC_{50\ exp}$	Log $IC_{50\ calc}$	Δ error
Celecoxib[1]	-162.39	1.70	1.51	-0.19
3	-121.38	0.26	0.56	0.3
2	-131.88	1.06	0.80	-0.26
12	-116.91	0.45	0.46	0.01
9	-146.17	1.11	1.13	0.02
13	-153.73	0.90	1.31	0.41
Flurbiprofeno	-93.58	-0.23	-0.08	0.15
Nimesulida	-119.00	0.96	0.51	-0.45

[1] Ligando correspondiente al cristal.

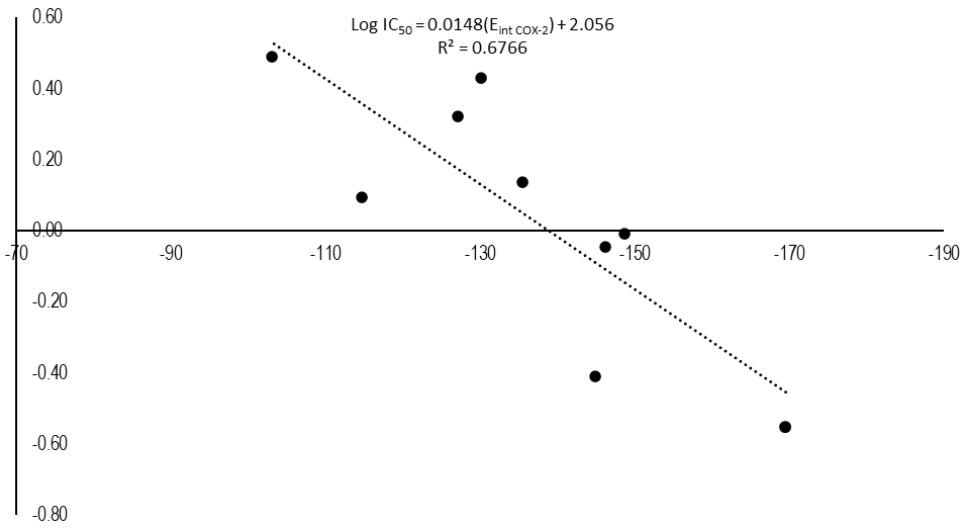


Figura A7. Valores de energía de interacción (Kcal/mol) de inhibidores de COX-2 que se acoplaron al cristal 3LN1. Los valores de Log $IC_{50\ exp}$, Log $IC_{50\ calc}$ y delta error (Δ error) son los que se muestran.

Tabla A7. Inhibidores de la COX-2 que se acoplaron al cristal 3LN1. Los valores de Log $IC_{50\ exp}$, Log $IC_{50\ calc}$ y delta error (Δ error) son los que se muestran.

Compuestos	Energía	Log $IC_{50\ exp}$	Log $IC_{50\ calc}$	Δ error
Celecoxib[1]	-169.55	-0.55	-0.45	0.1
14	-127.07	0.32	0.18	-0.14
12	-146.17	-0.05	-0.11	-0.06
7	-130.13	0.43	0.13	0.3
13	-148.72	-0.01	-0.15	-0.14
Diclofenaco	-114.72	0.09	0.36	0.27
Flurbiprofeno	-103.01	0.49	0.53	0.04
Meloxicam	-135.43	0.14	0.05	-0.09
Rofecoxib	-144.84	-0.41	-0.09	0.32

[1] Ligando correspondiente al cristal.

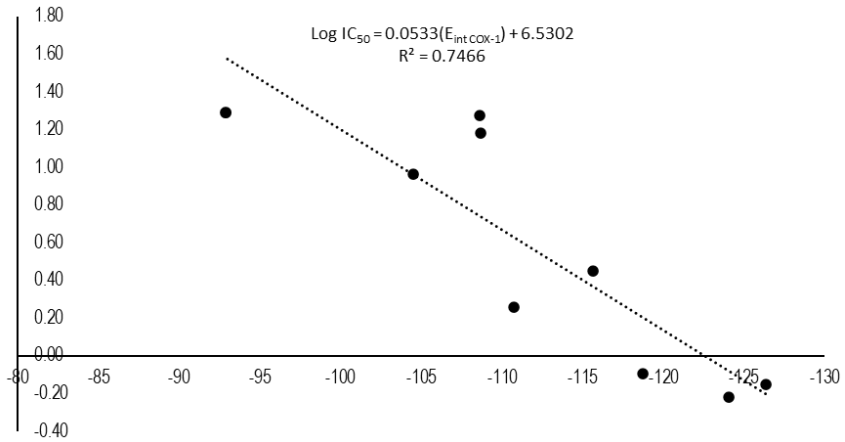


Figura A8. Valores de energía de interacción (Kcal/mol) de inhibidores de COX-1 que se acoplaron al cristal 4O1Z. Los valores de Log $IC_{50\ exp}$, Log $IC_{50\ calc}$ y delta error (Δ error) son los que se muestran.

Tabla A8. Inhibidores de la COX-1 que se acoplaron al cristal 4O1Z. Los valores de Log $IC_{50\ exp}$, Log $IC_{50\ calc}$ y delta error (Δ error) son los que se muestran.

Compuestos	Energía	Log $IC_{50\ exp}$	Log $IC_{50\ calc}$	Δ error
Meloxicam[1]	-92.91	0.96	1.58	0.62
3	-110.750	0.26	0.63	0.37
14	-118.69	-0.10	0.20	0.3
8	-126.32	-0.15	-0.20	-0.05
12	-115.64	0.45	0.37	-0.08
7	-124.05	-0.22	-0.08	0.14
11	-108.68	1.18	0.74	-0.44
Diclofenaco	-108.64	1.27	0.74	-0.53
Nimesulida	-104.48	0.96	0.96	0

[1] Ligando correspondiente al cristal.

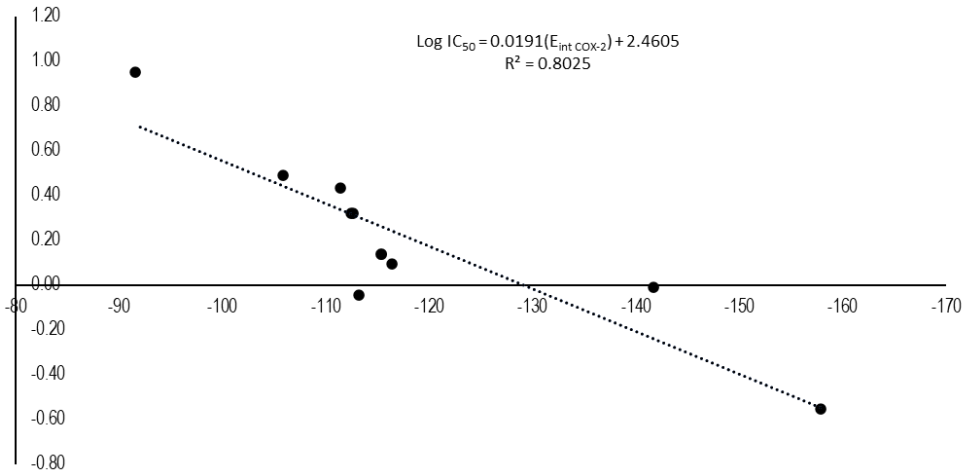


Figura A9. Valores de energía de interacción (Kcal/mol) de inhibidores de COX-2 que se acoplaron al cristal 4M11. Los valores de Log $IC_{50\ exp}$, Log $IC_{50\ calc}$ y delta error (Δ error) son los que se muestran.

Tabla A9. Inhibidores de la COX-2 que se acoplaron al cristal 4M11. Los valores de Log $IC_{50\ exp}$, Log $IC_{50\ calc}$ y delta error (Δ error) son los que se muestran.

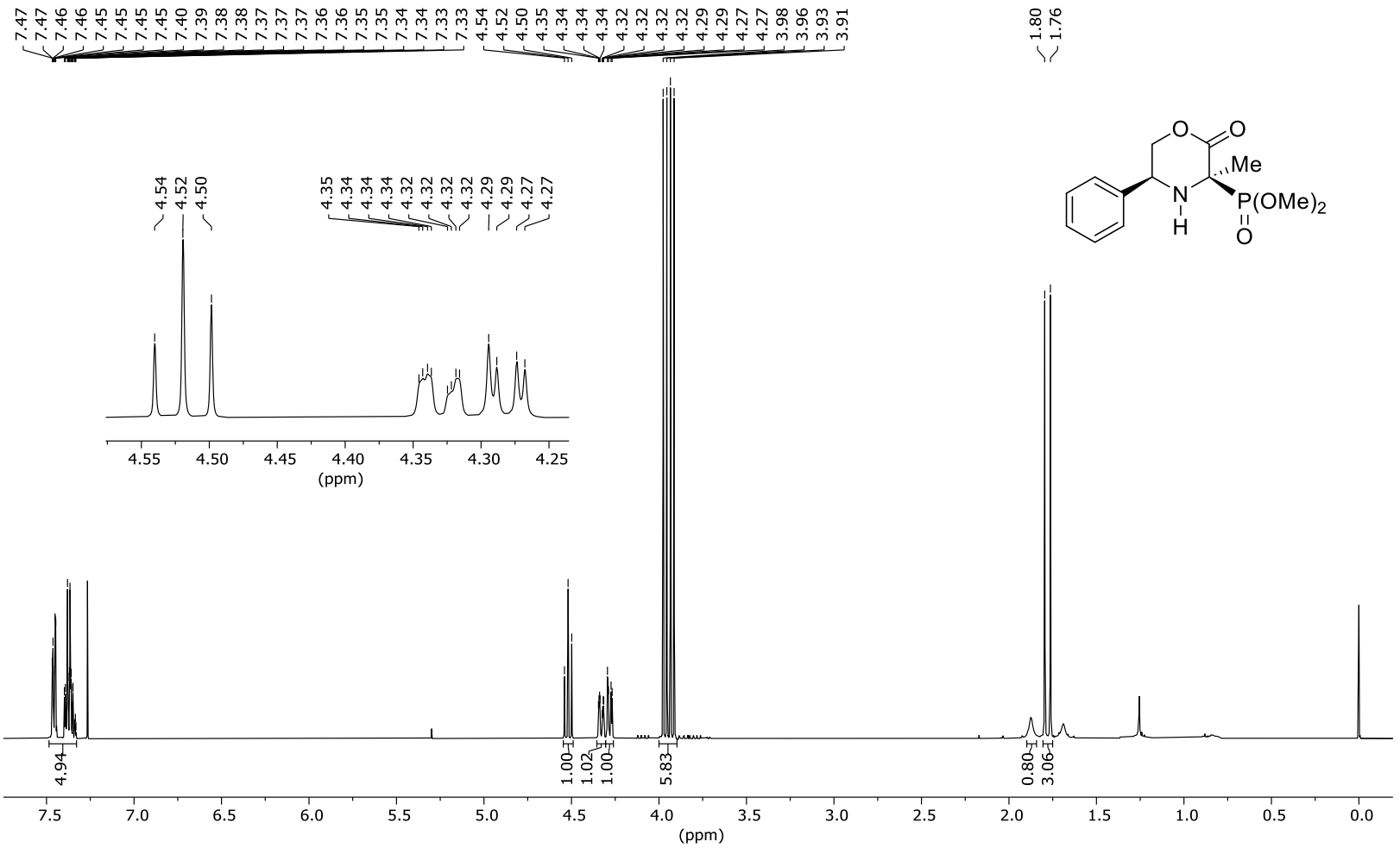
Compuestos	Energía	Log $IC_{50\ exp}$	Log $IC_{50\ calc}$	Δ error
Meloxicam[1]	-115.40	0.14	0.26	0.12
3	-112.49	0.32	0.31	-0.01
14	-112.64	0.32	0.31	-0.01
12	-113.17	-0.05	0.30	0.35
7	-111.41	0.43	0.33	-0.1
13	-141.68	-0.01	-0.25	-0.24
Celecoxib	-157.82	-0.55	-0.55	0
Diclofenaco	-116.44	0.09	0.24	0.15
Flurbiprofeno	-105.91	0.49	0.44	-0.05
Ibuprofeno	-91.59	0.95	0.71	-0.24

[1] Ligando correspondiente al cristal.

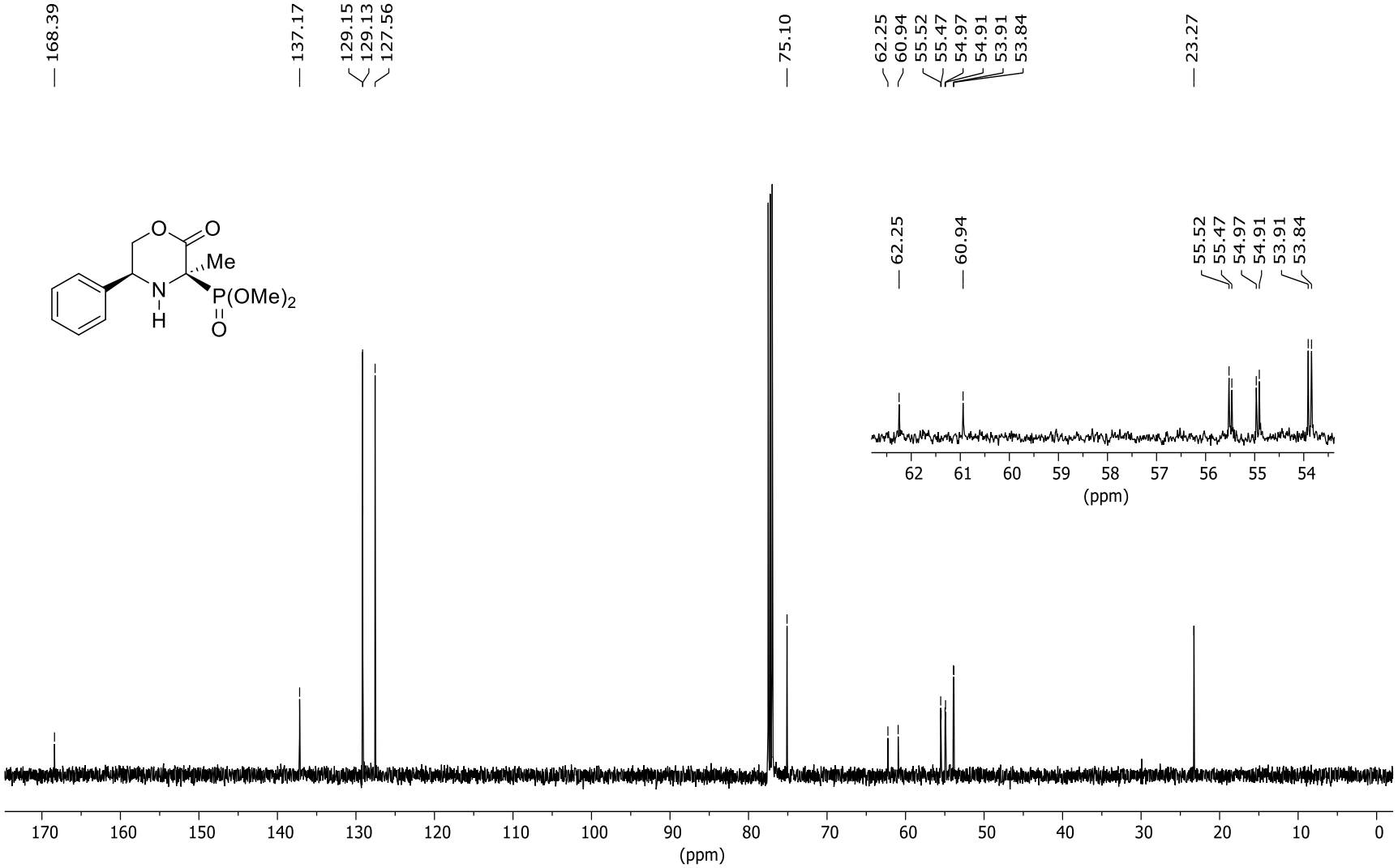
Tabla A10. Cristales y sus residuos flexibles mostrados en el acoplamiento molecular flexible.

PDBs	Residuos Flexibles
1EQG (COX-1)	Phe381, Phe518, Ser353, Ser530, Trp387, Tyr355, Val116, Val349, Arg120, Ile523, Leu 352 Leu359, Leu531, Met522.
4PH9 (COX-2)	Phe519, Ser354, Ser531, Trp388, Tyr356, Tyr386, Val117, Val350, Val524, Arg121, Leu353, Leu360, Leu532, Met523.
2OYU (COX-1)	Leu531, Leu359, Leu352, Ile523, Ile517, Arg120, Val349, Tyr355, Gln192, Ser530, Ser516, Ser353.
4COX (COX-2)	Phe381, Phe518, Ser353, Ser530, Trp387, Tyr355, Tyr385, Val349, Val523, Arg120, Leu352, Leu384, Leu531, Met522.
3KK6 (COX-1)	His90, Phe381, Phe518, Ser353, Ser516, Ser530, Trp387, Gln192, Tyr355, Val116, Val349, Ile517, Ile523, Leu352, Leu359, Leu531, Met522.
3LN1 (COX-2)	His75, Phe367, Phe504, Ser339, Ser516, Trp373, Gln178, Tyr341, Tyr371, Val335, Val509, Arg499, Leu338, Leu345, Leu370, Leu517.
4O1Z (COX-1)	Ser353, Ser530, Trp387, Tyr355, Val116, Val349, Arg120, Ile345, Ile523, Leu117, Leu352, Leu359, Leu384, Leu531, Leu534, Leu535, Met113, Met522.
4M11 (COX-2)	Phe518, Ser530, Trp387, Tyr355, Val349, Val523, Arg120, Ile345, Leu117, Leu352, Leu359, Leu531, Leu534, Met113, Met522.

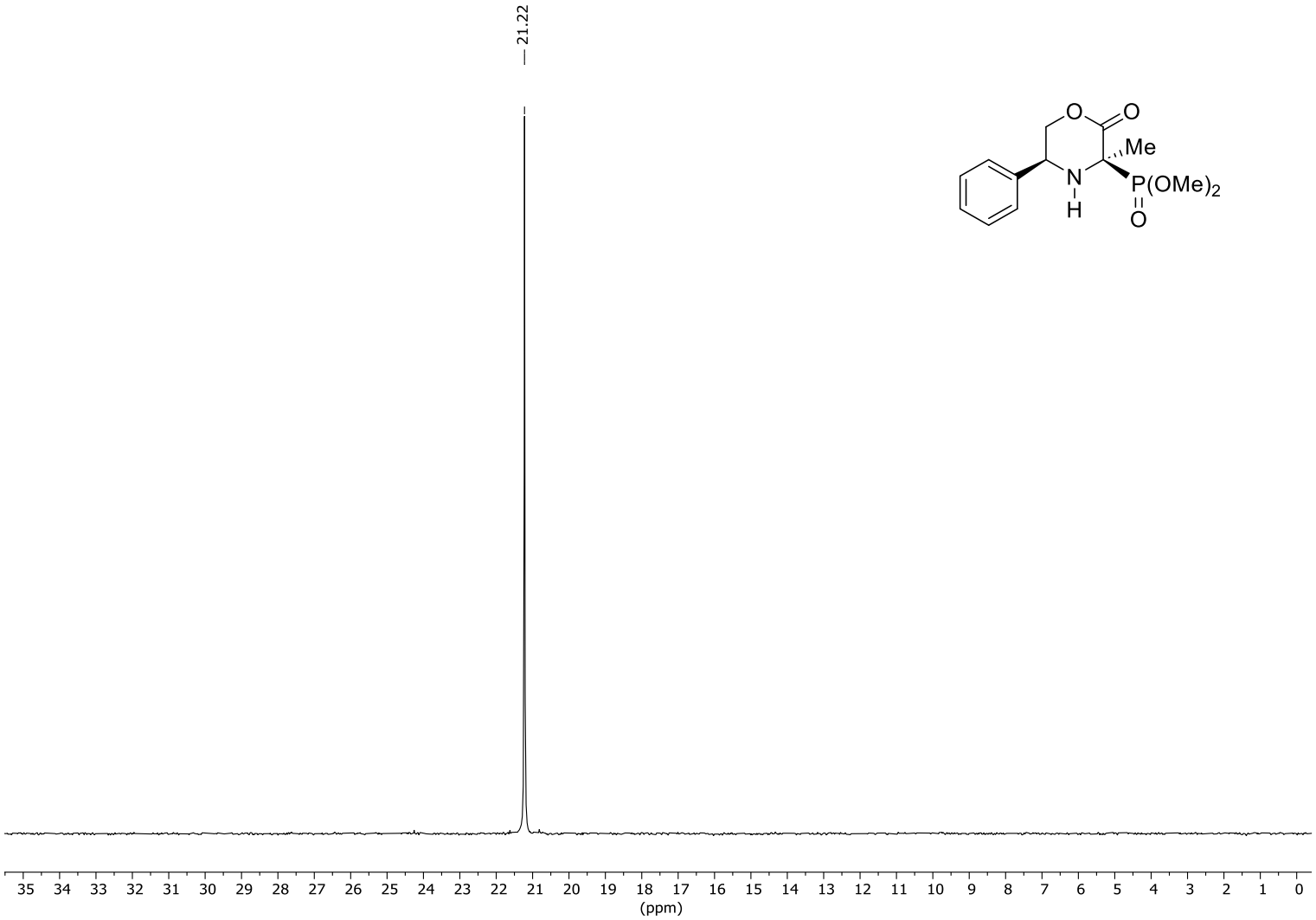
Apéndice Experimental



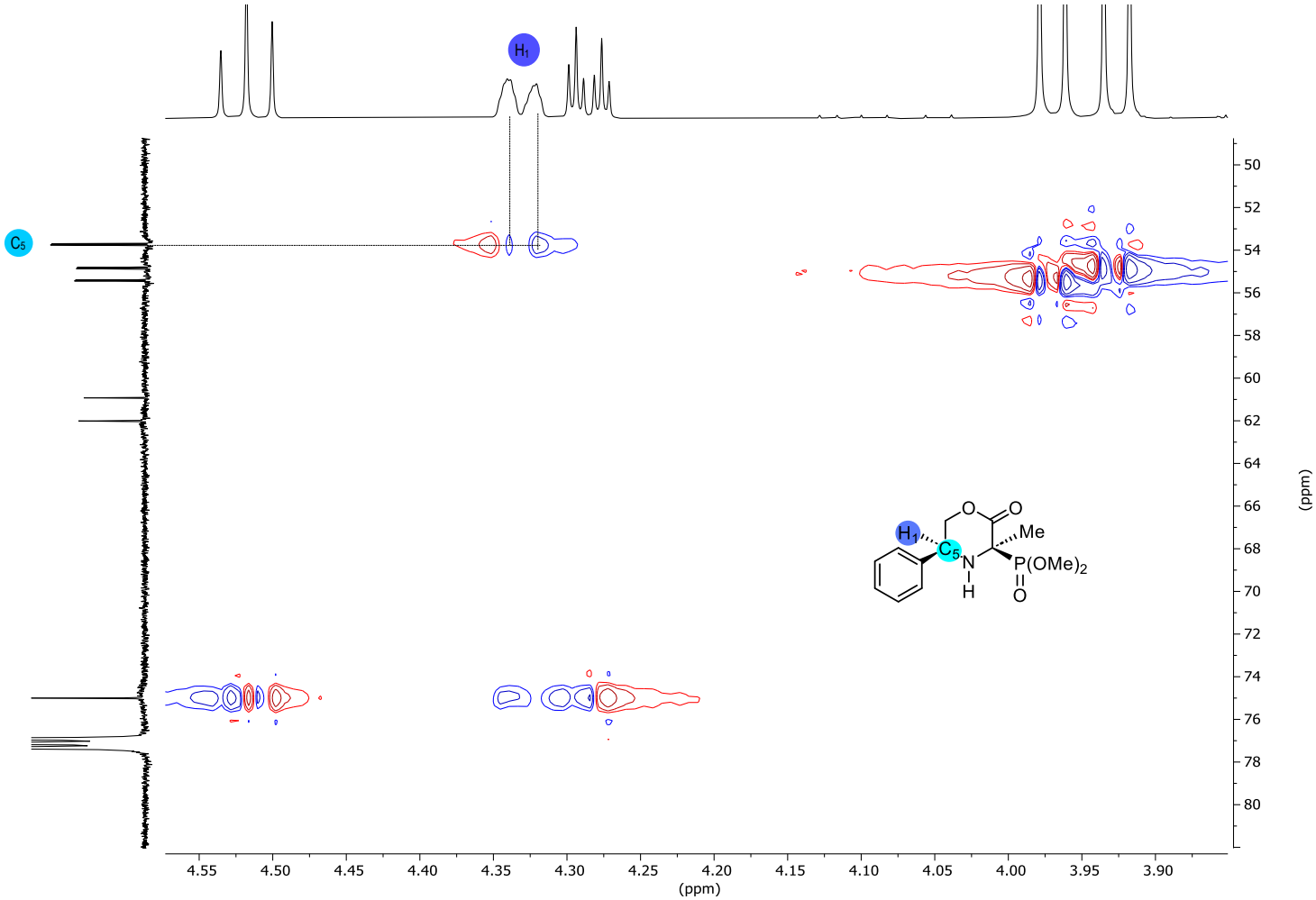
Espectro de RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) del compuesto (3*R*,5*S*)-**25c**.



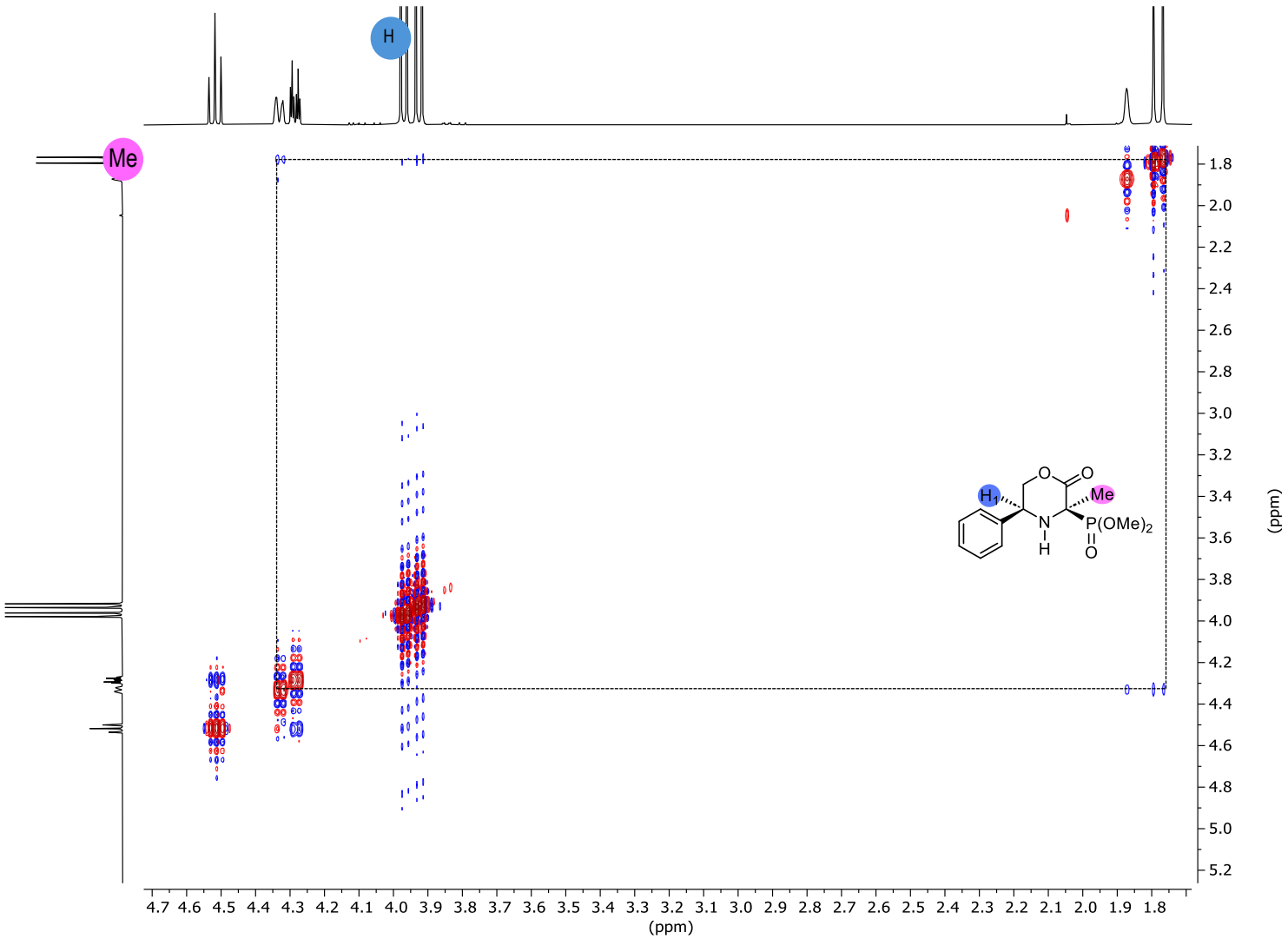
Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) del compuesto (3*R*,5*S*)-**25c**.



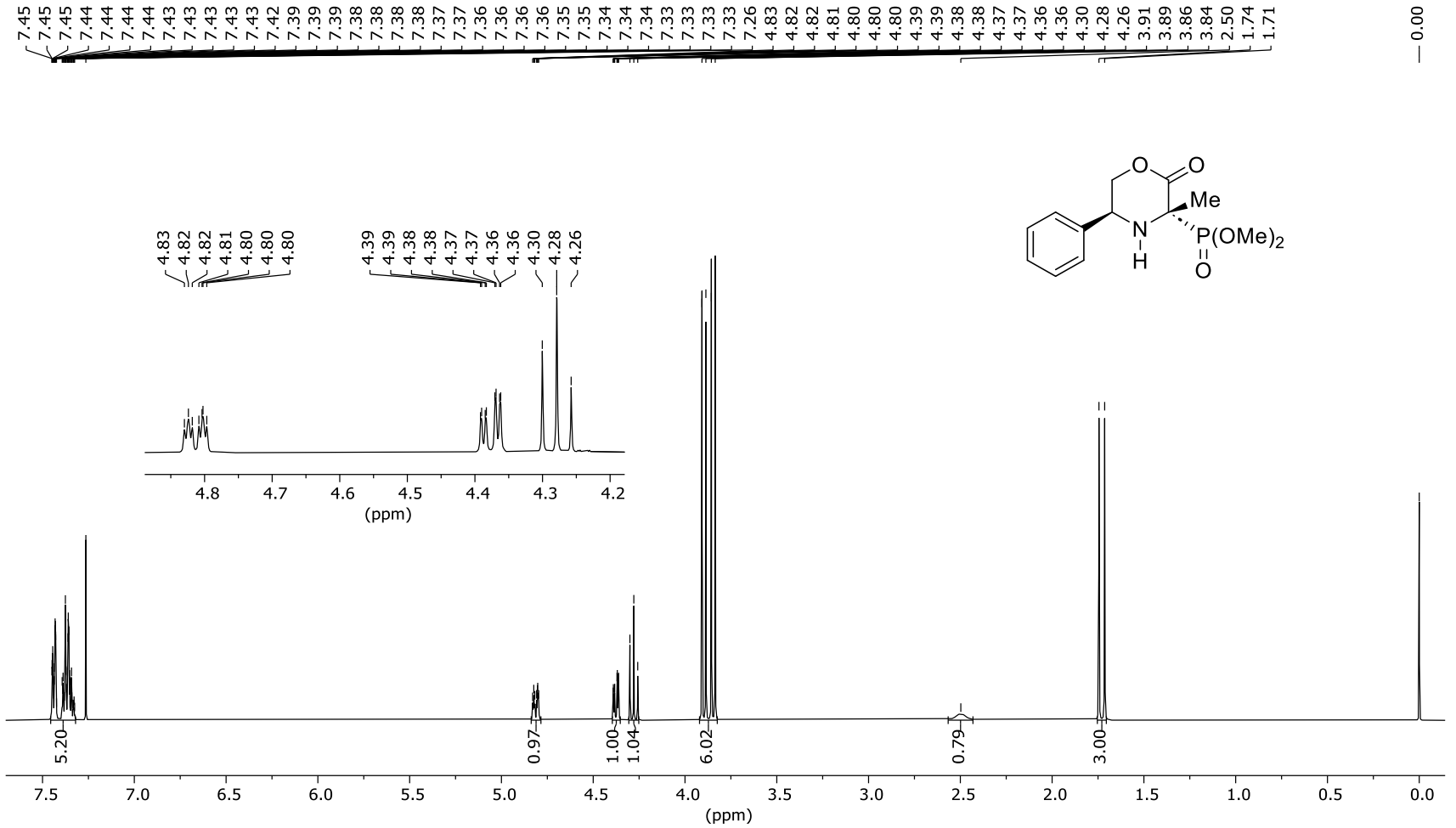
Espectro de RMN ^{31}P (202 MHz, $CDCl_3$) del compuesto (3*R*,5*S*)-**25c**.



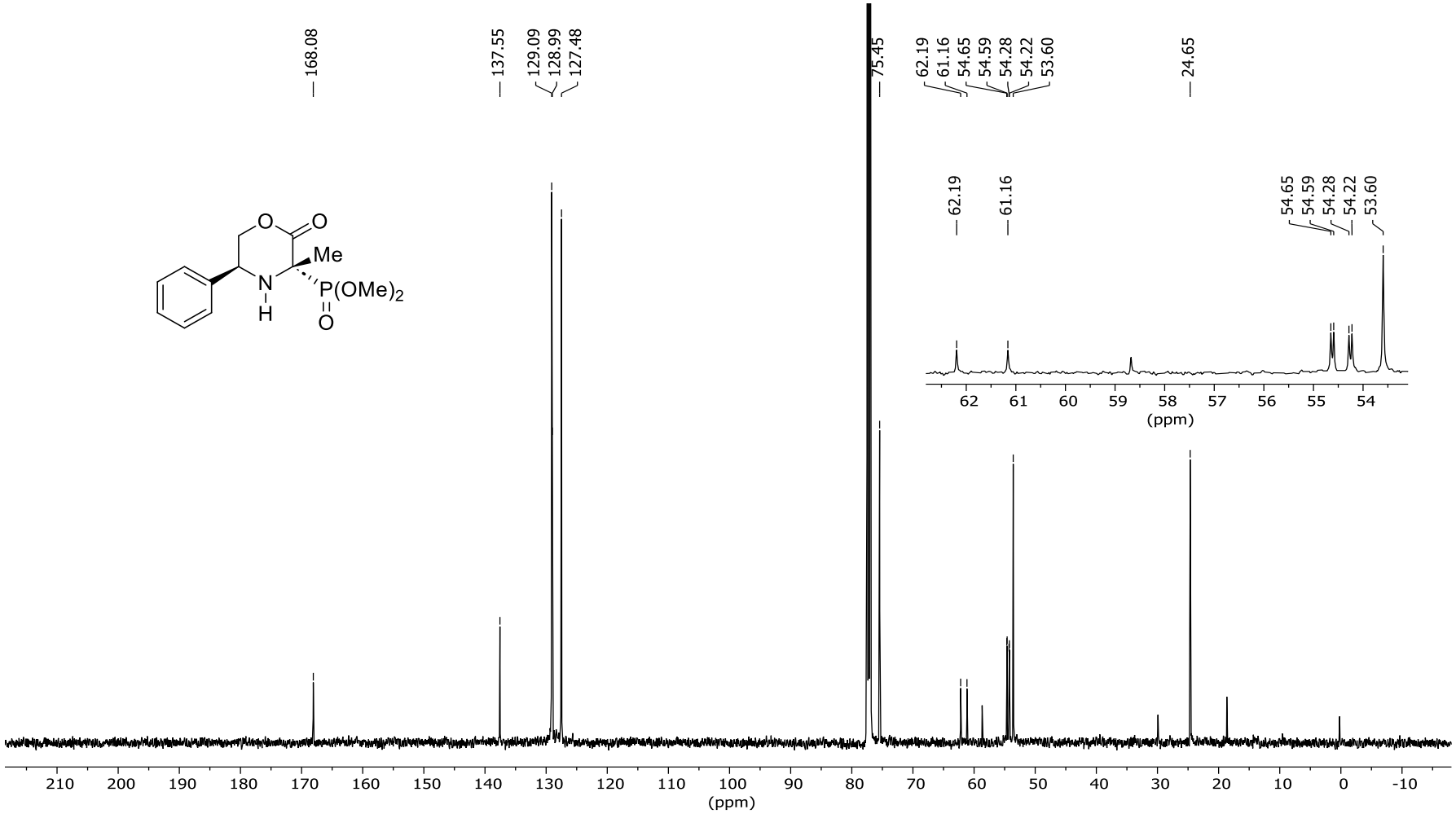
Espectro de RMN HSQC (ampliación, 500 MHz, $CDCl_3$) del compuesto (3*R*,5*S*)-**25c**.



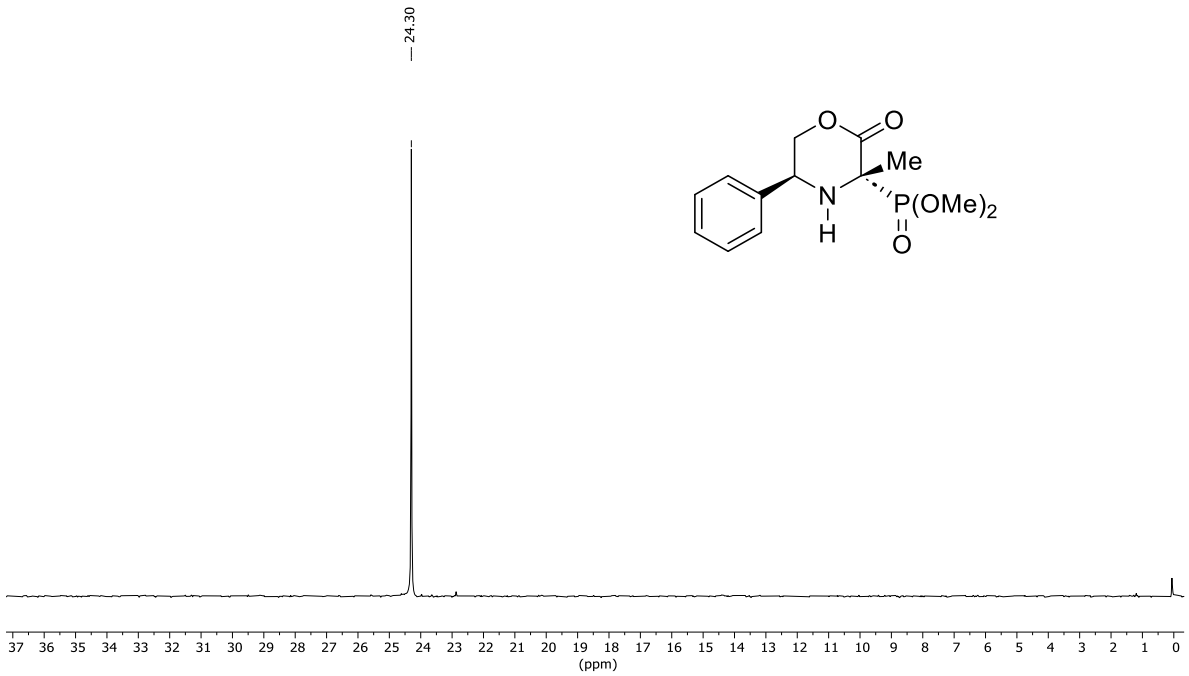
Espectro de RMN NOESY (ampliación, 500 MHz, $CDCl_3$) del compuesto (3*R*,5*S*)-**25c**.



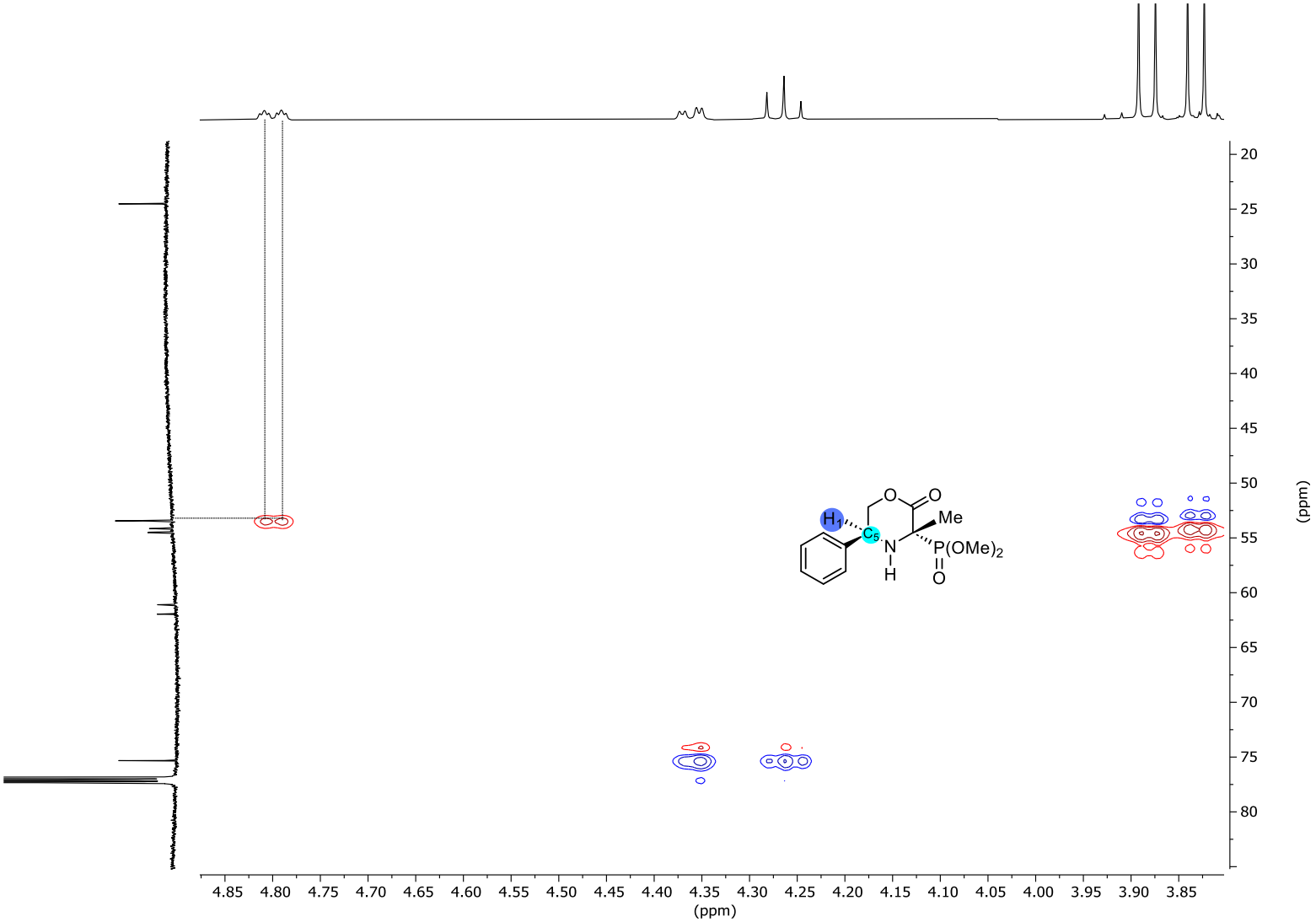
Espectro de RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) del compuesto (3*S*,5*S*)-**25d**.



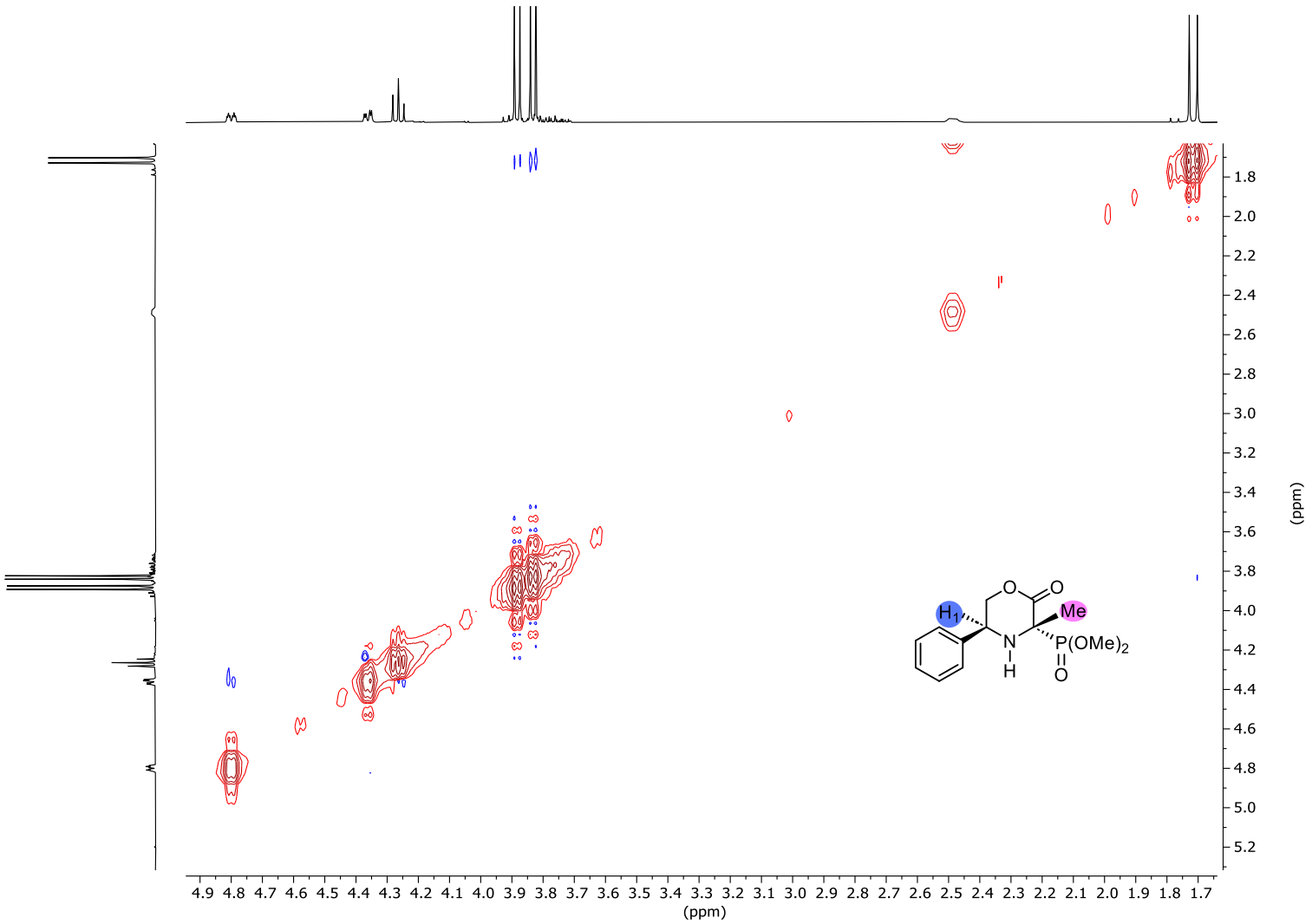
Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) del compuesto (3*S*,5*S*)-**25d**.



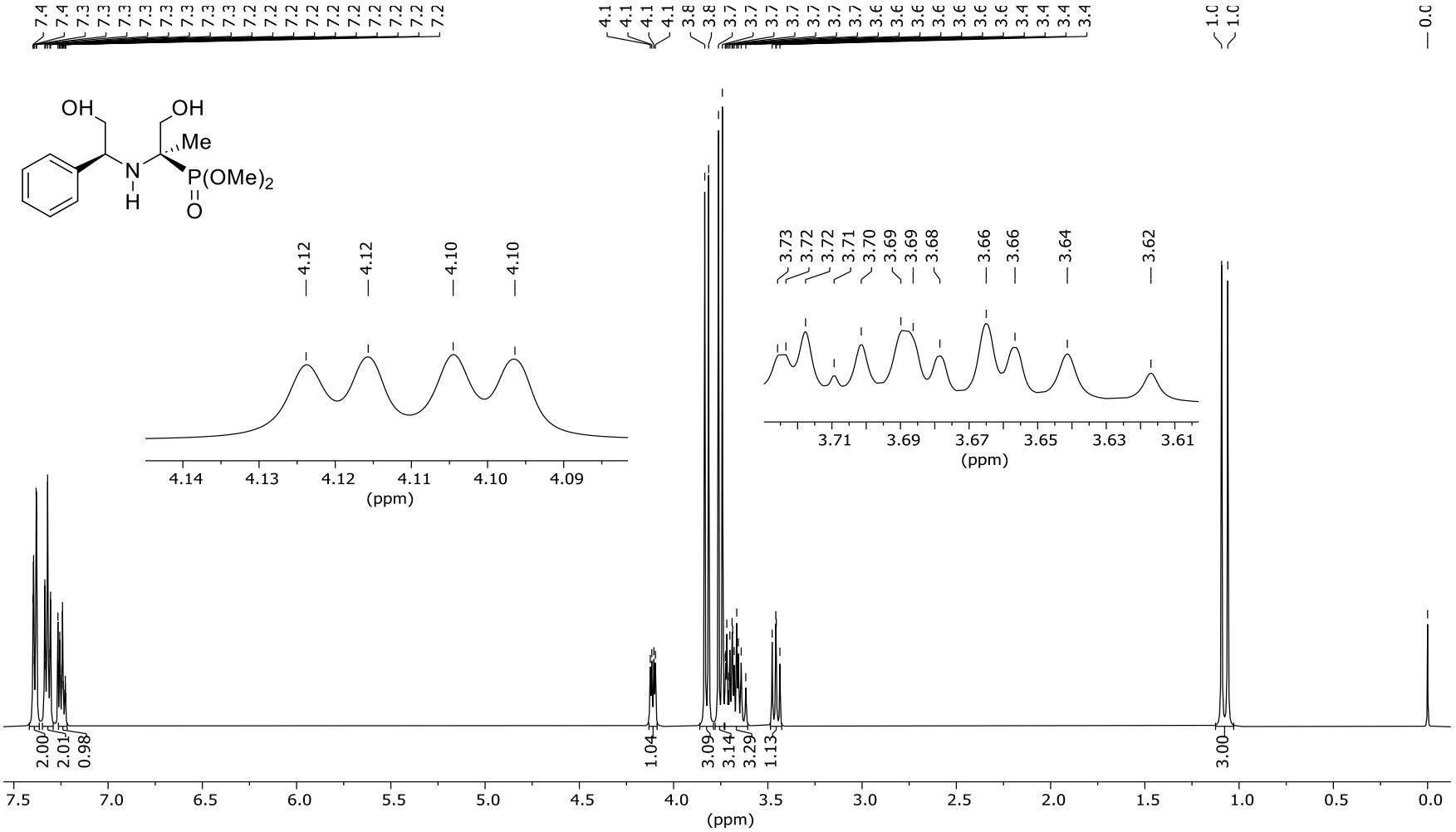
Espectro de RMN ^{31}P (202 MHz, $CDCl_3$) del compuesto (3*S*,5*S*)-**25d**.



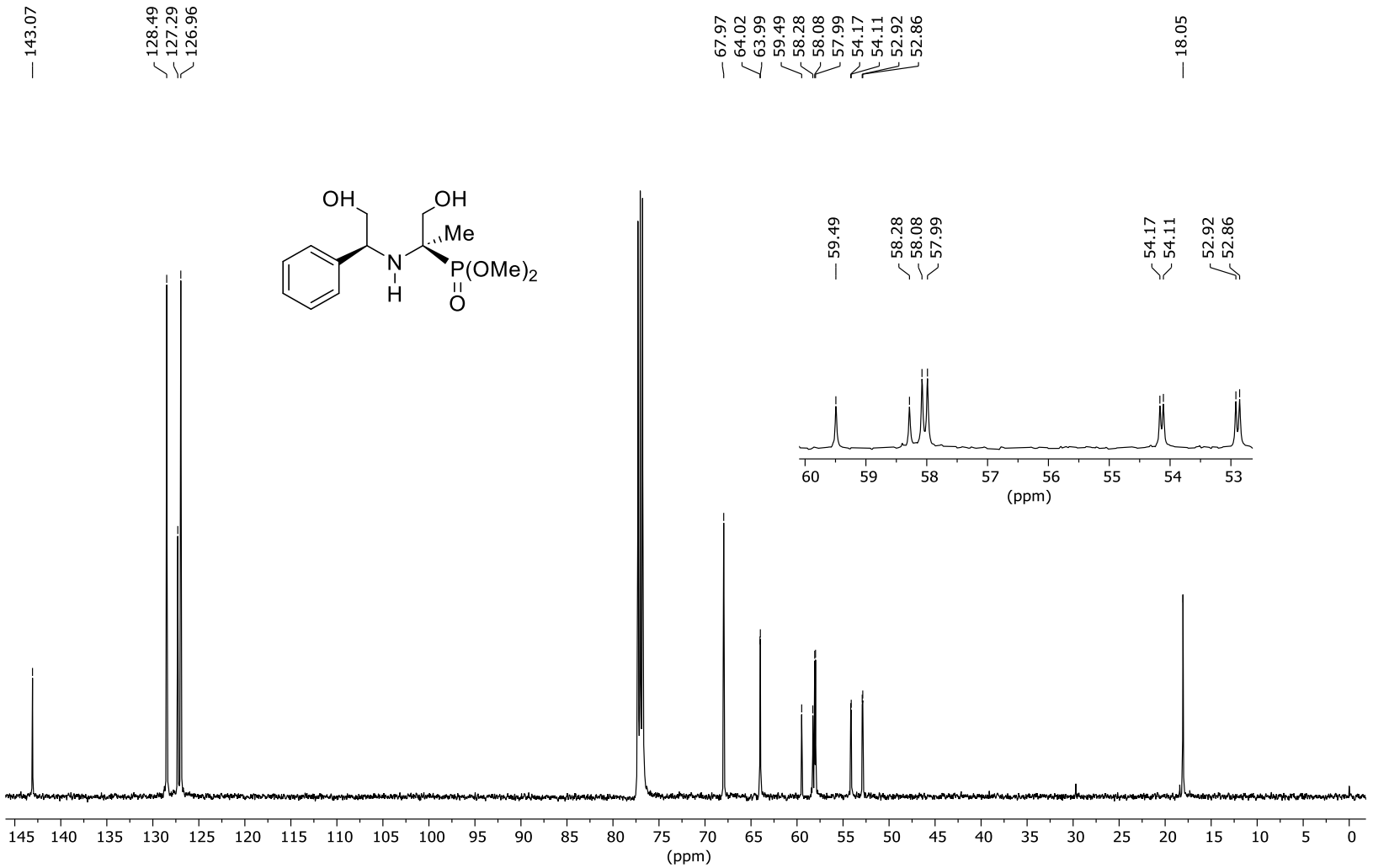
Espectro de RMN HSQC (ampliación, 500 MHz, $CDCl_3$) del compuesto (3*S*,5*S*)-**25d**.



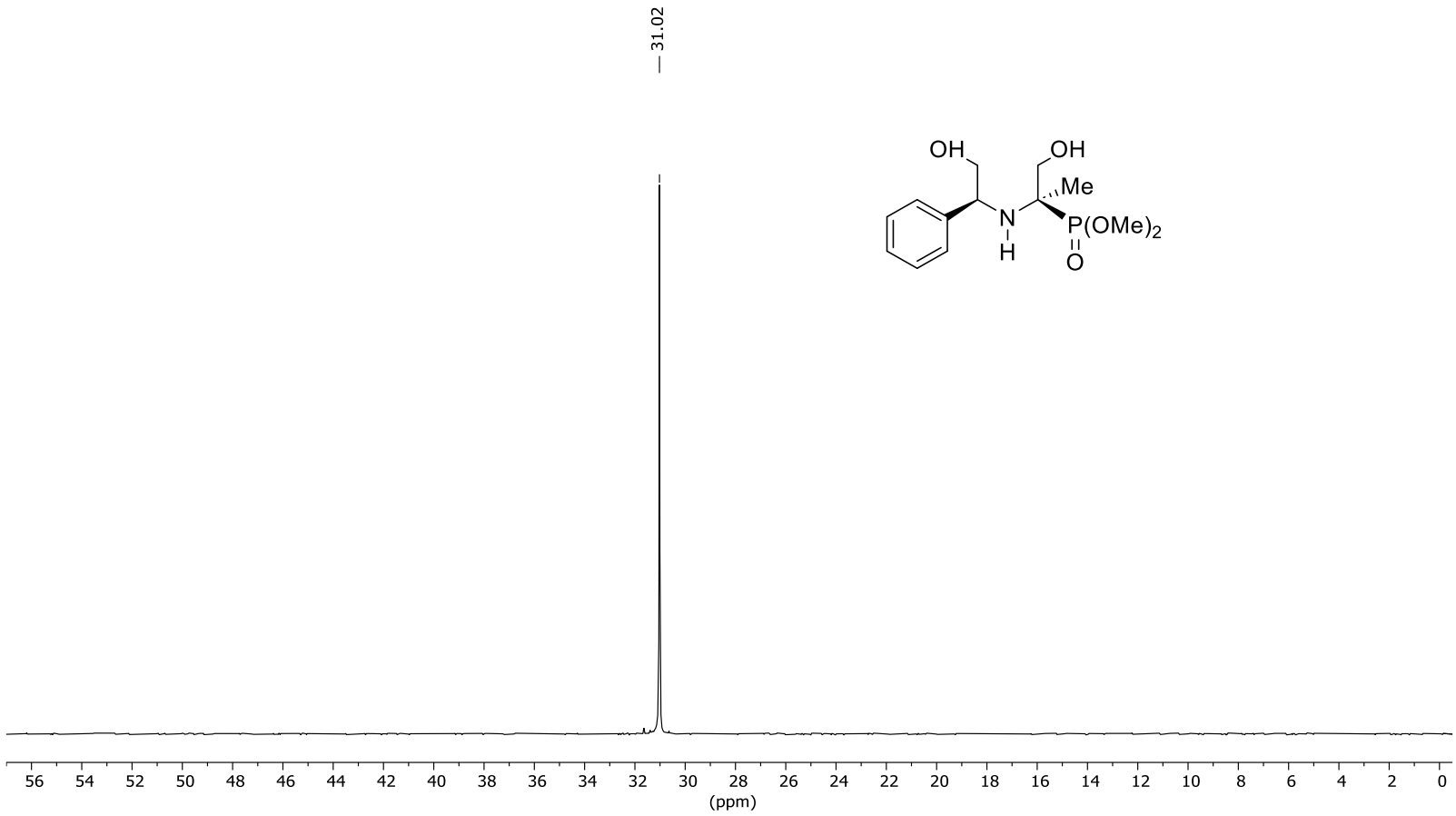
Espectro de RMN NOESY (ampliación, 500 MHz, $CDCl_3$) del compuesto (3*S*,5*S*)-**25d**.



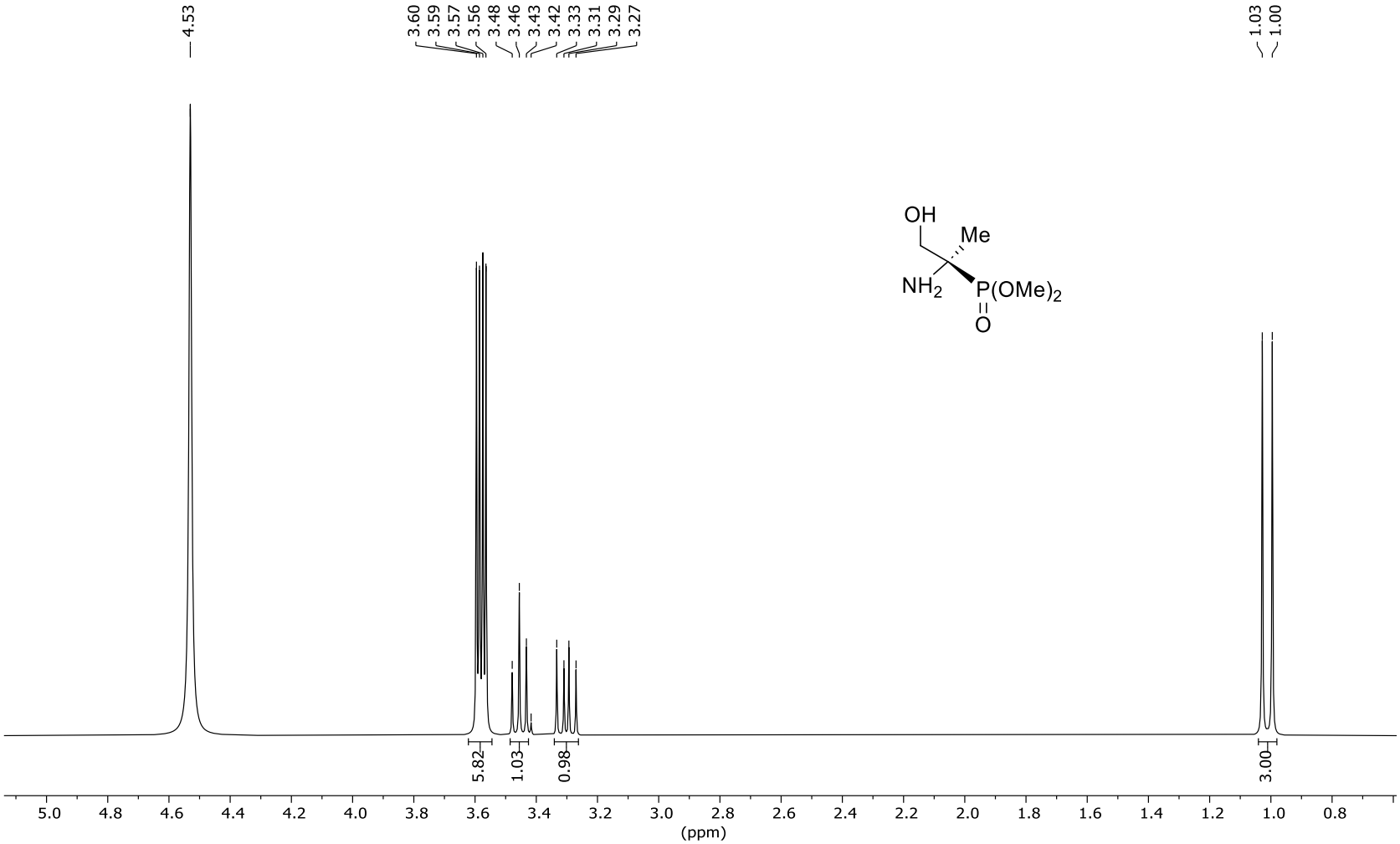
Espectro de RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) del compuesto (3*R*,5*S*)-**53a**.



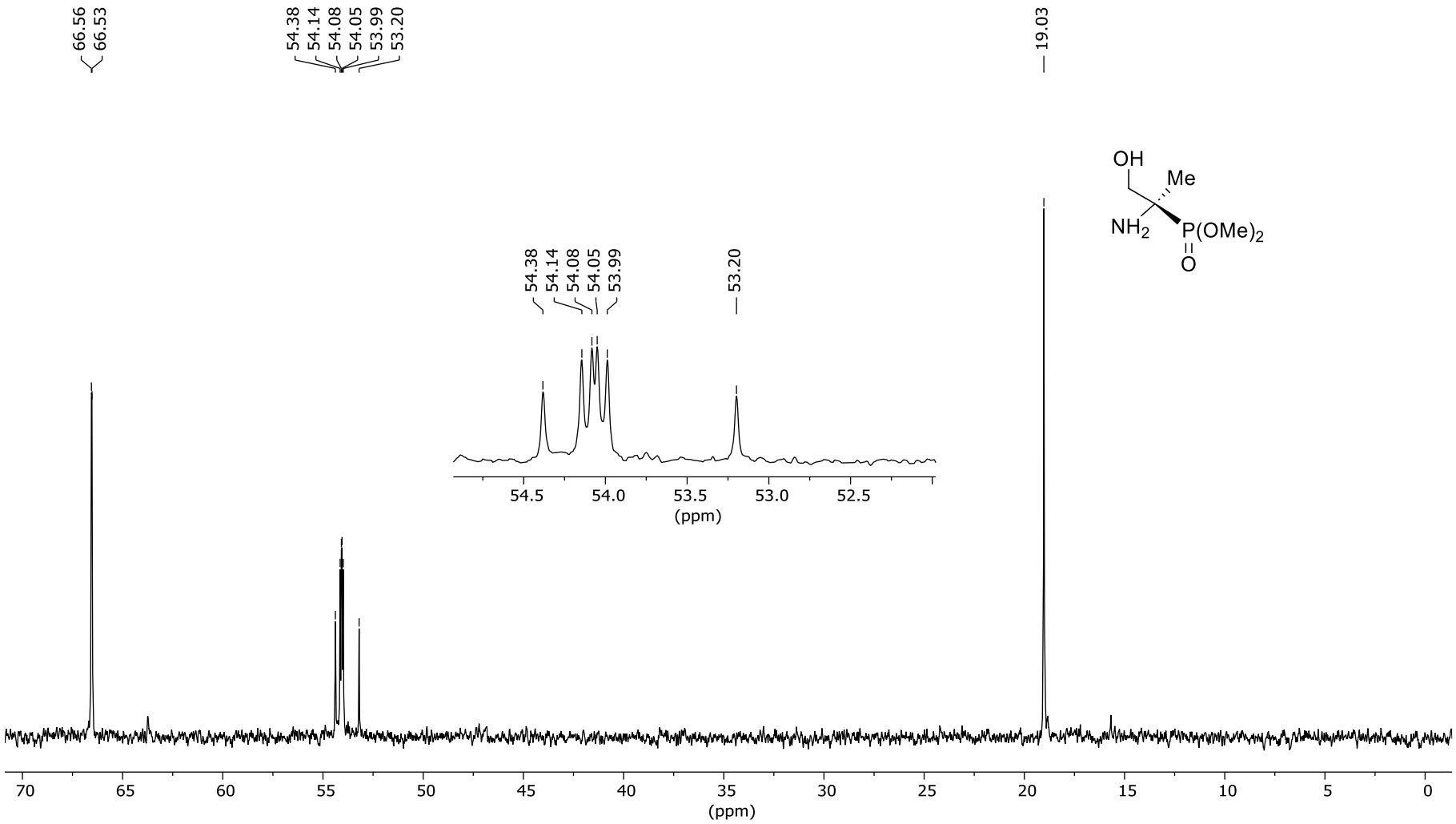
Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) del compuesto (3*R*,5*S*)-**53a**.



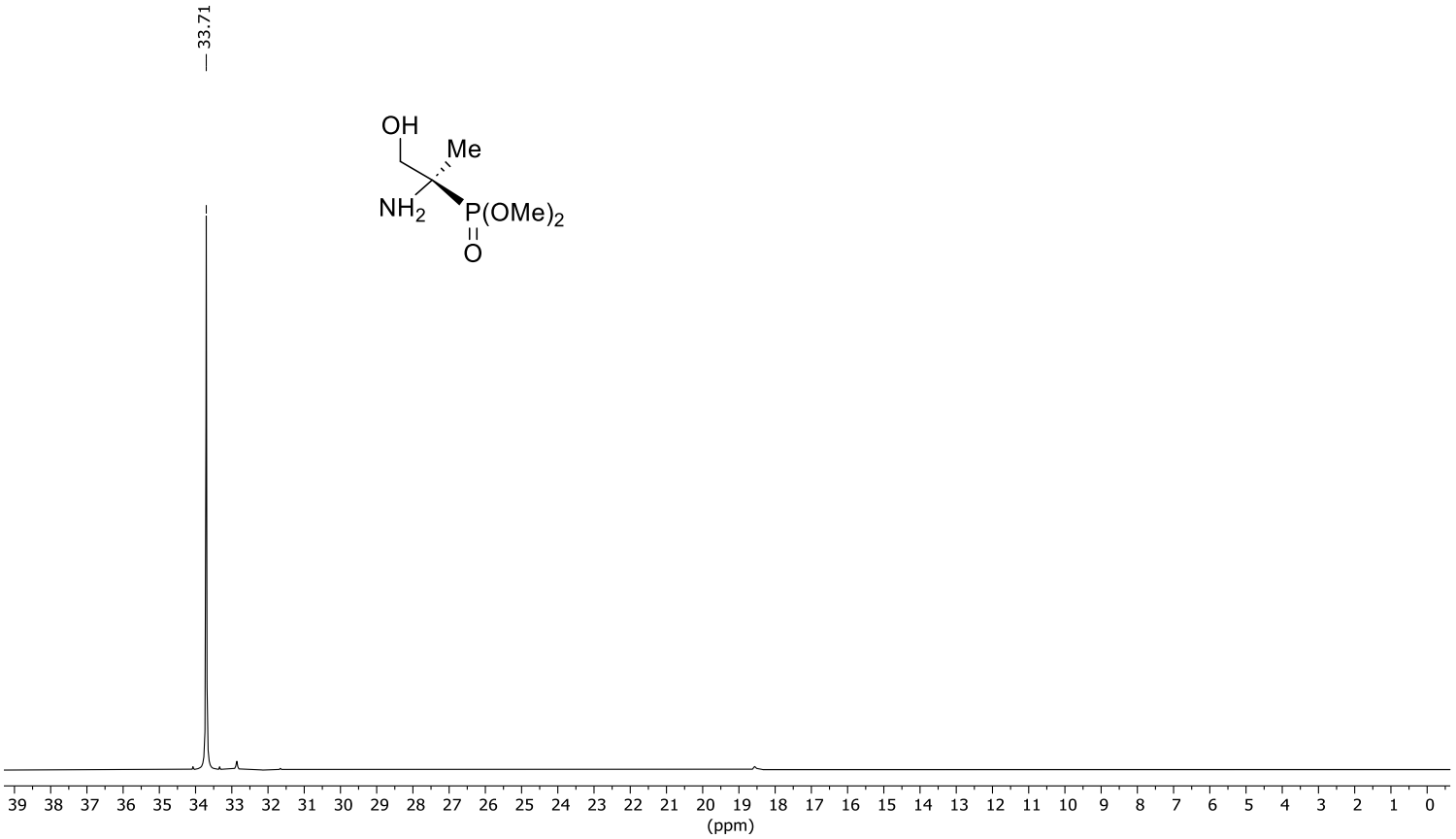
Espectro de RMN ^{31}P (202 MHz, $CDCl_3$) del compuesto (3*R*,5*S*)-**53a**.



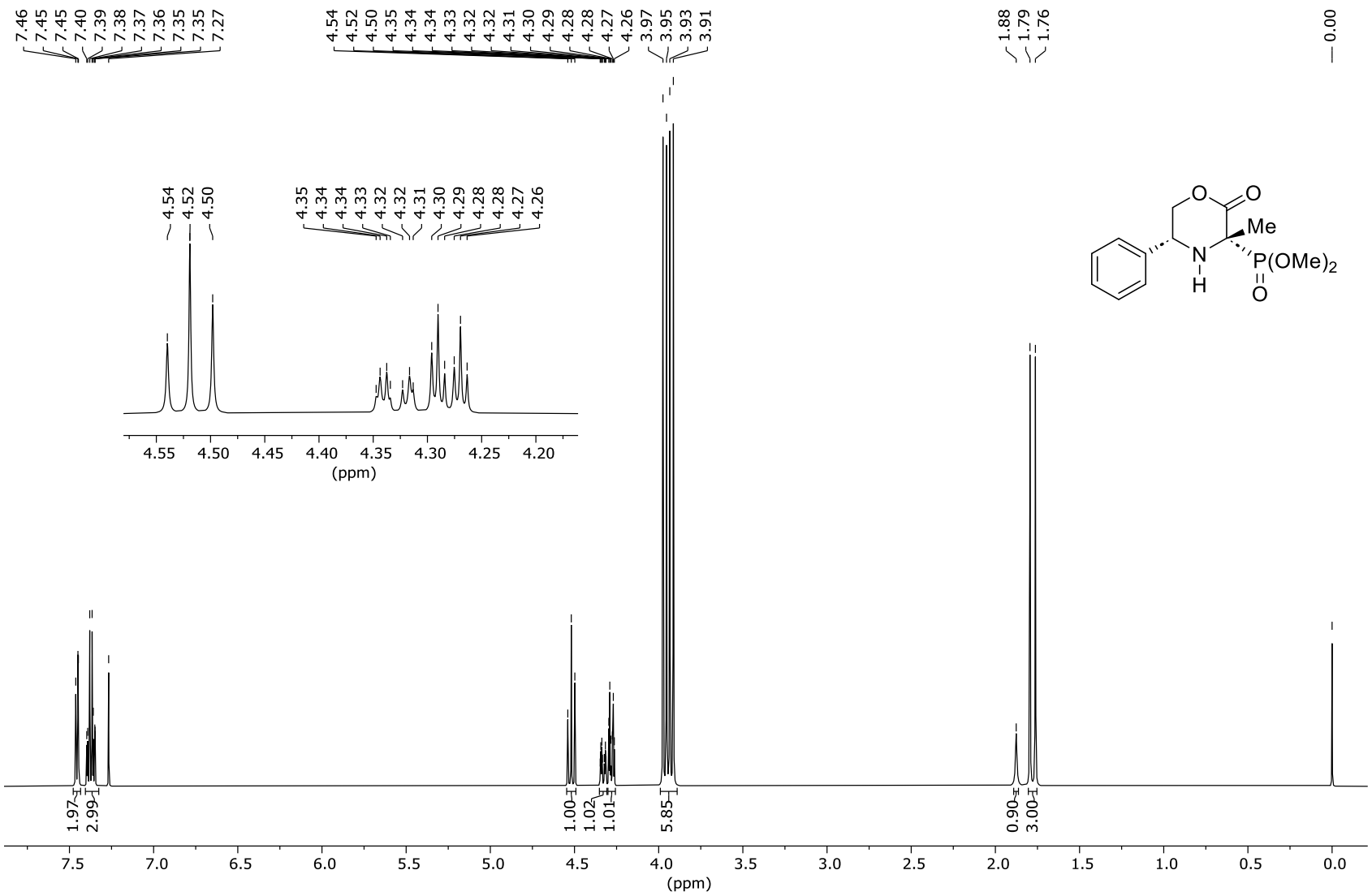
Espectro de RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) del compuesto (*R*)-**54a.**



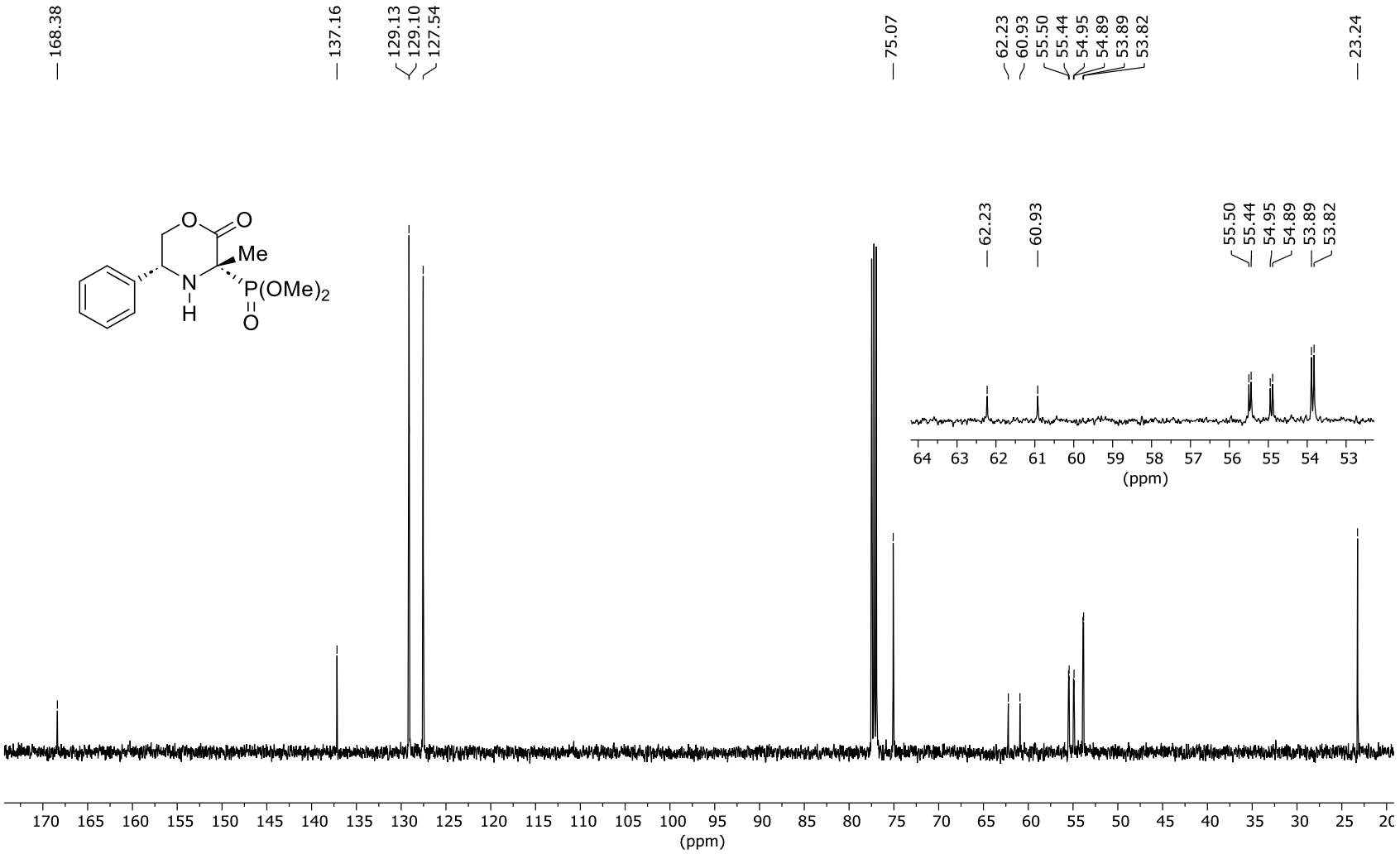
Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) del compuesto (*R*)-**54a.**



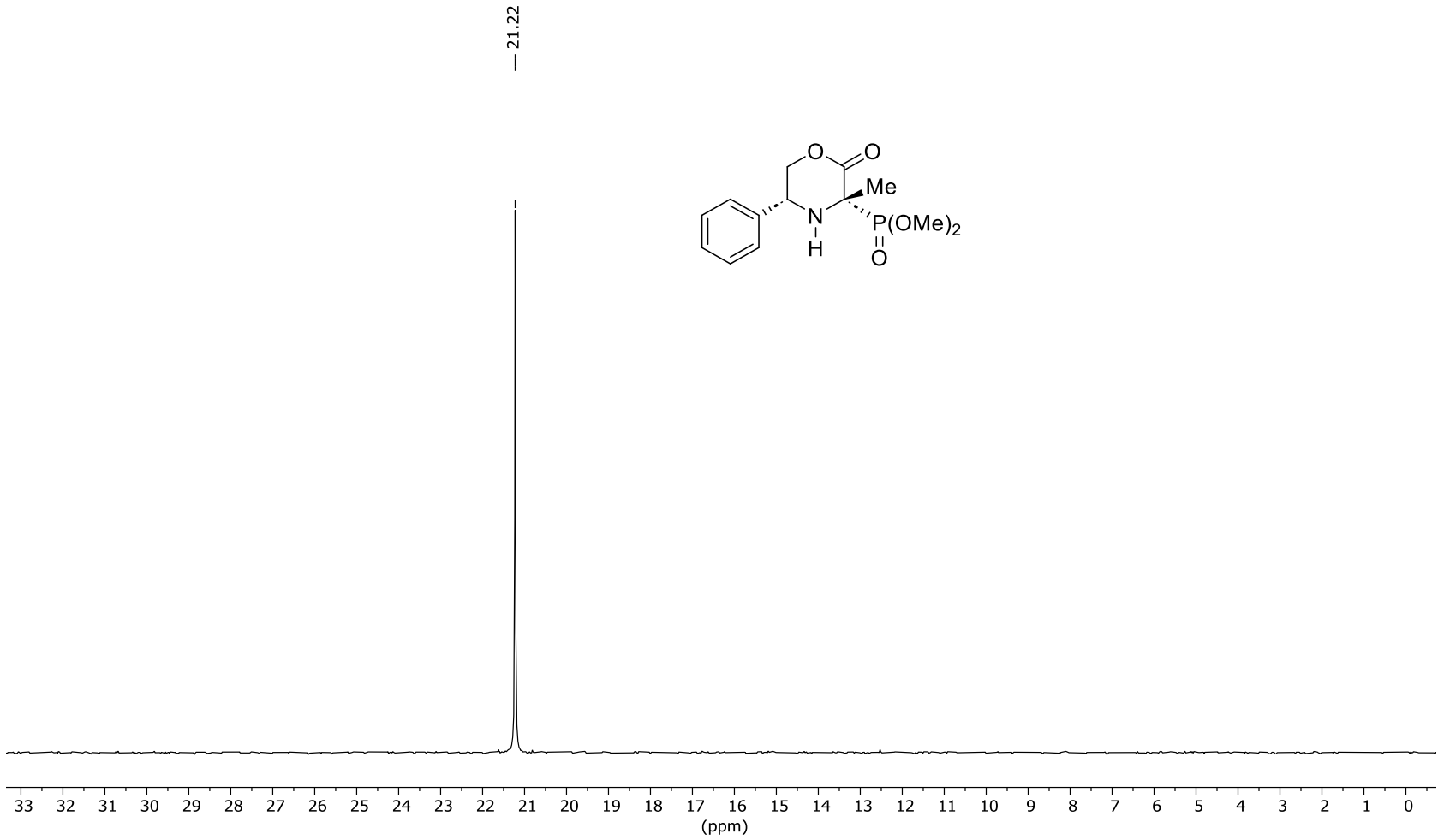
Espectro de RMN ^{31}P (202 MHz, $CDCl_3$) del compuesto (*R*)-**54a.**



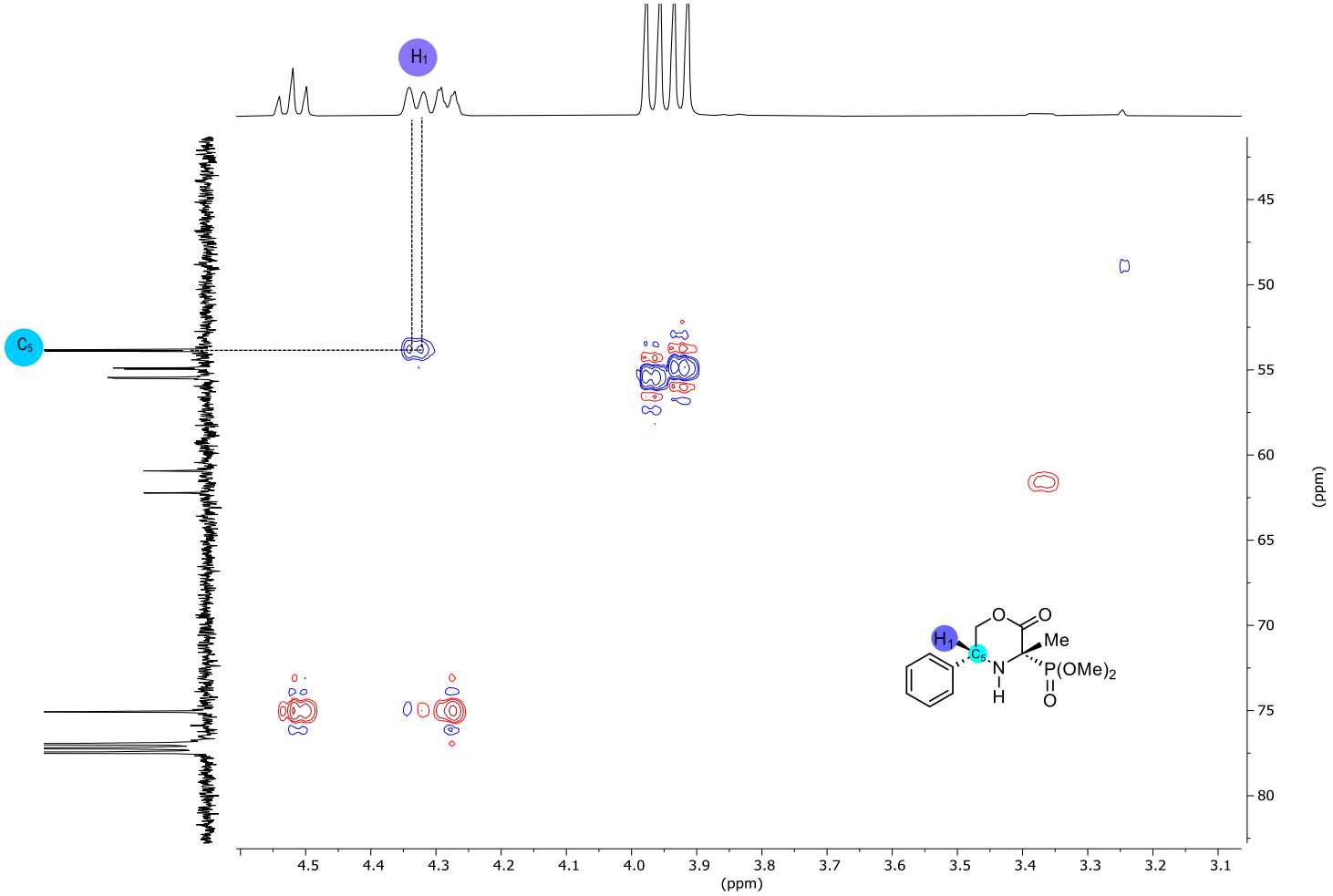
Espectro de RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) del compuesto (3*S*,5*R*)-**25a.**



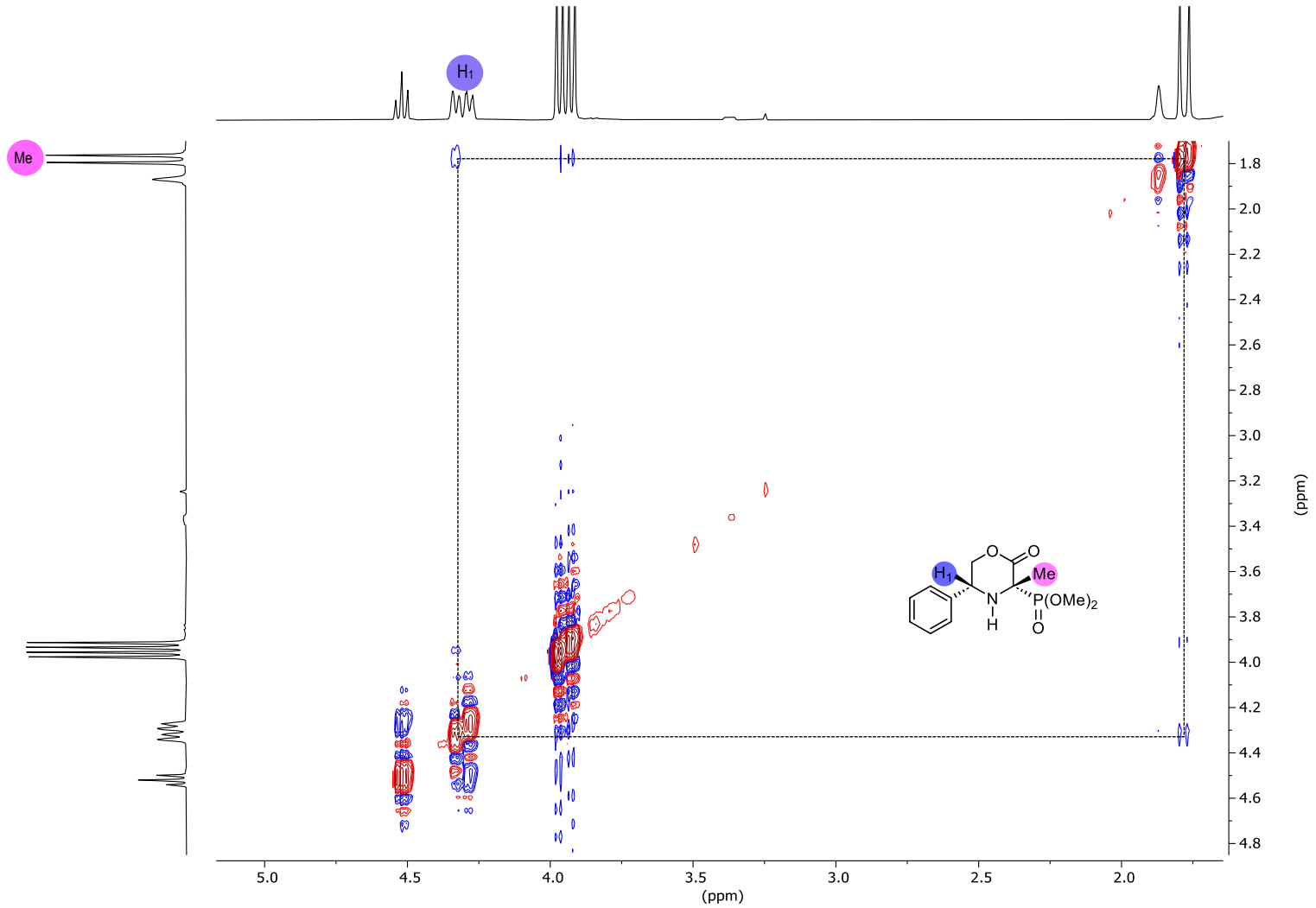
Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) del compuesto (3*S*,5*R*)-**25a.**



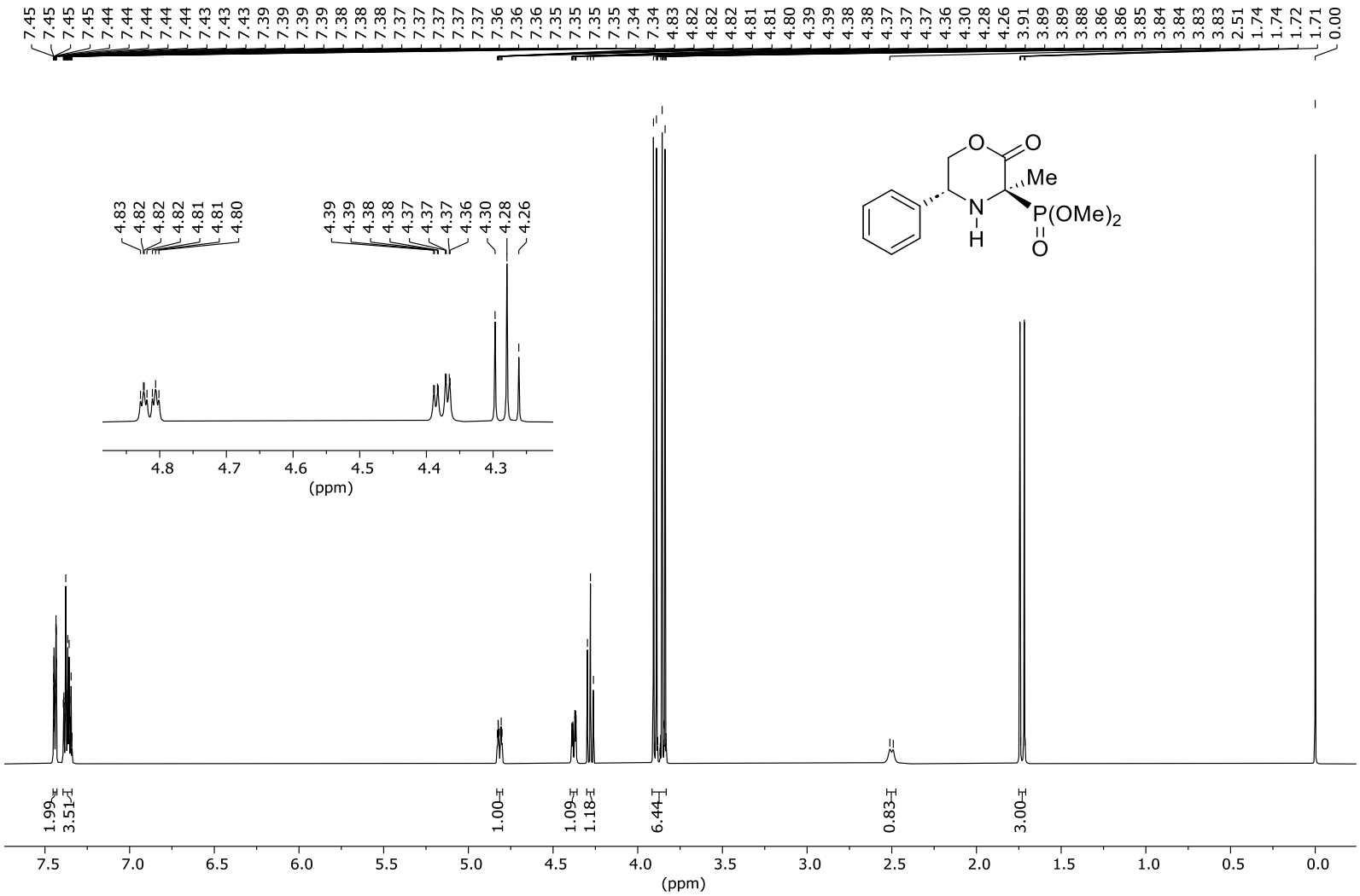
Espectro de RMN ^{31}P (202 MHz, $CDCl_3$) del compuesto (3*S*,5*R*)-**25a.**



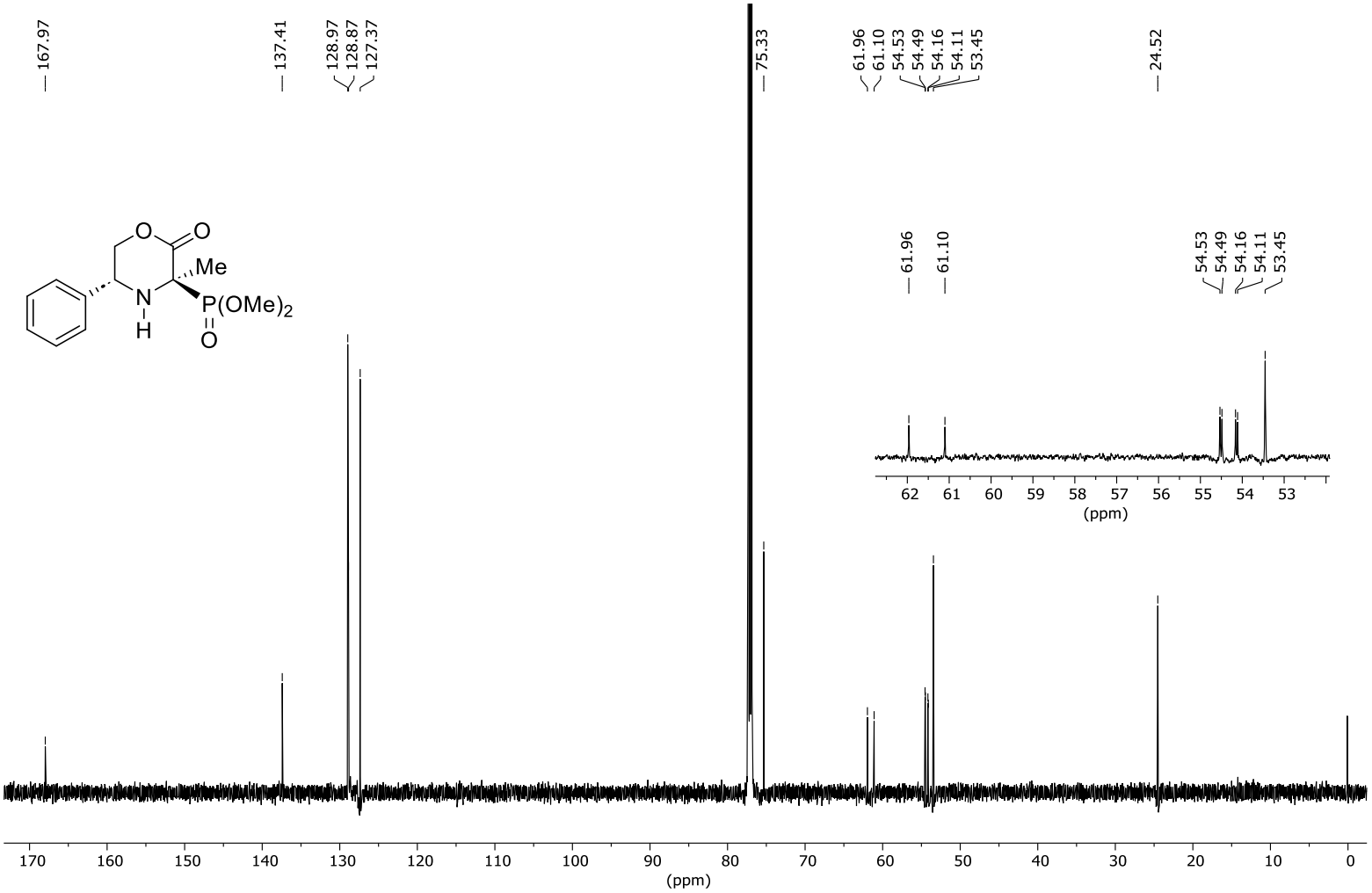
Espectro de RMN HSQC (ampliación, 500 MHz, $CDCl_3$) del compuesto (3*S*,5*R*)-**25a.**



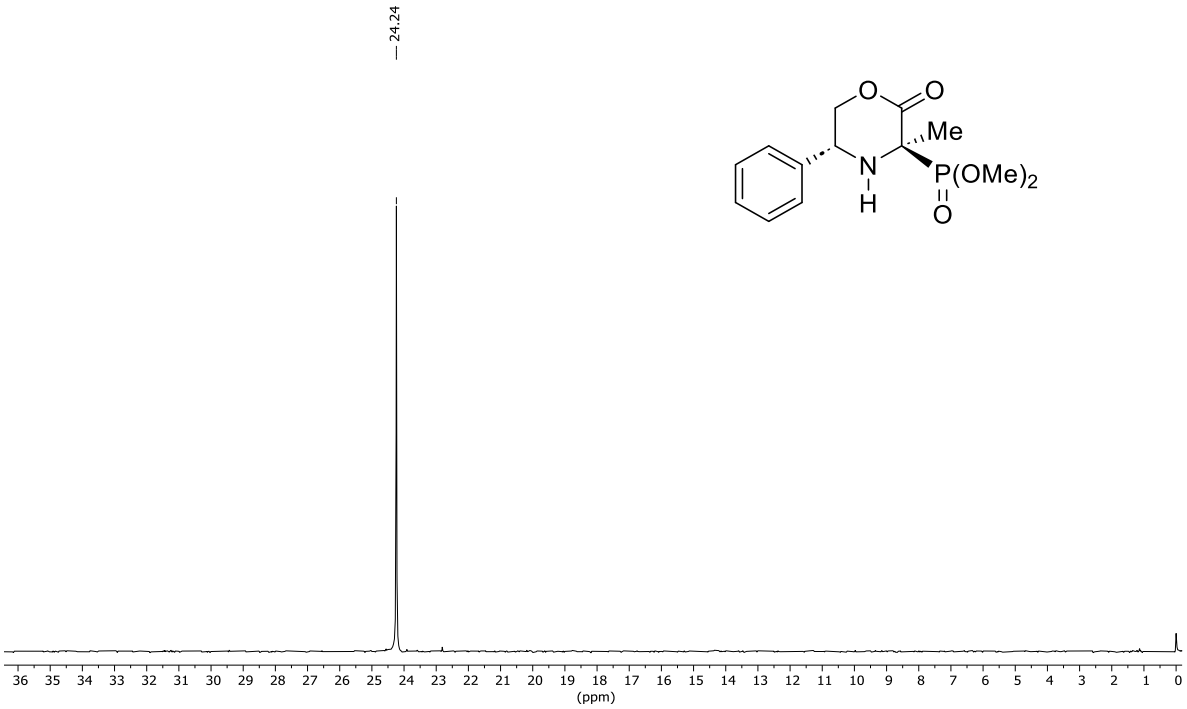
Espectro de RMN NOESY (ampliación, 500 MHz, $CDCl_3$) del compuesto (3*S*,5*R*)-**25a.**



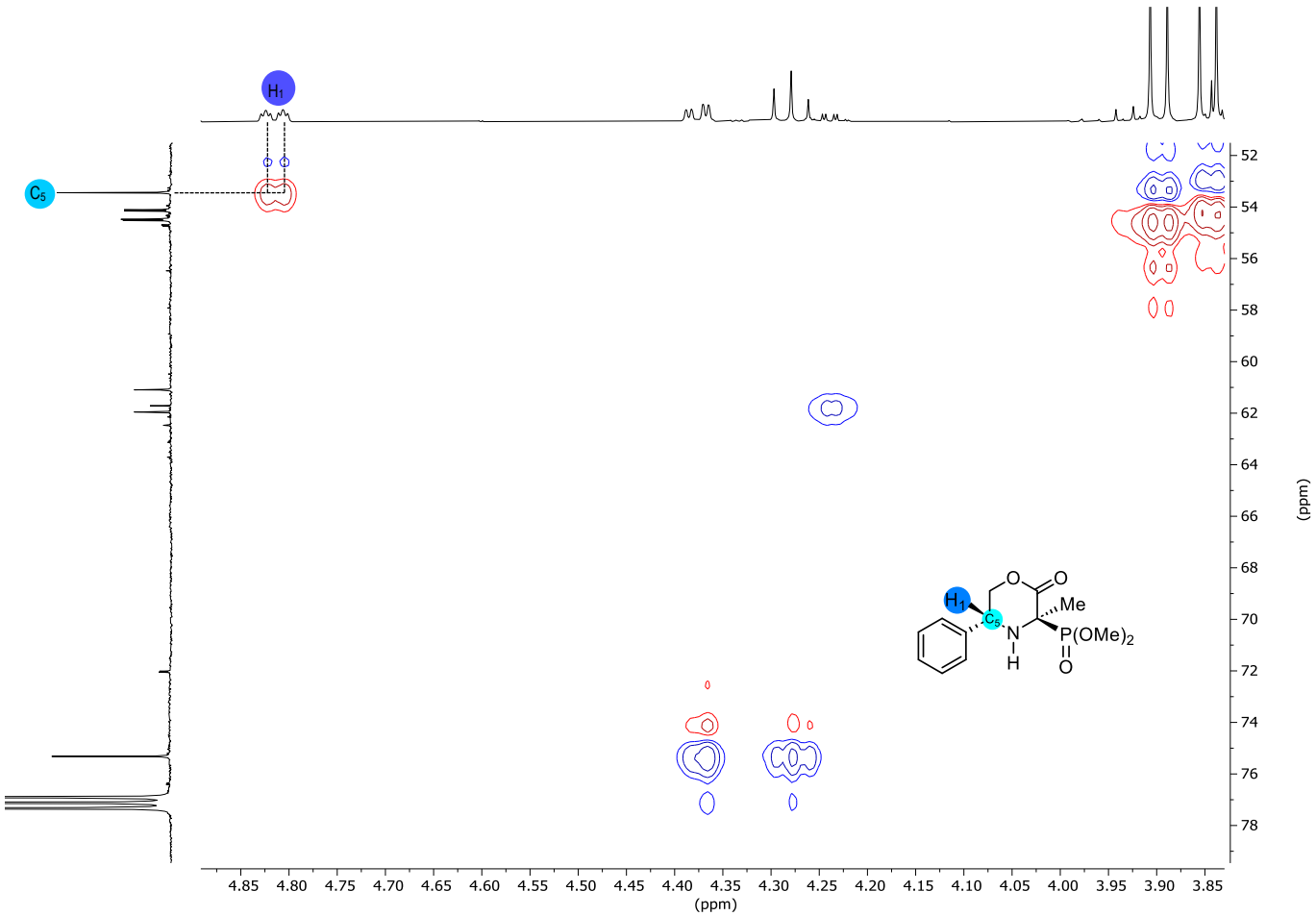
Espectro de RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) del compuesto (3*R*,5*R*)-**25b.**



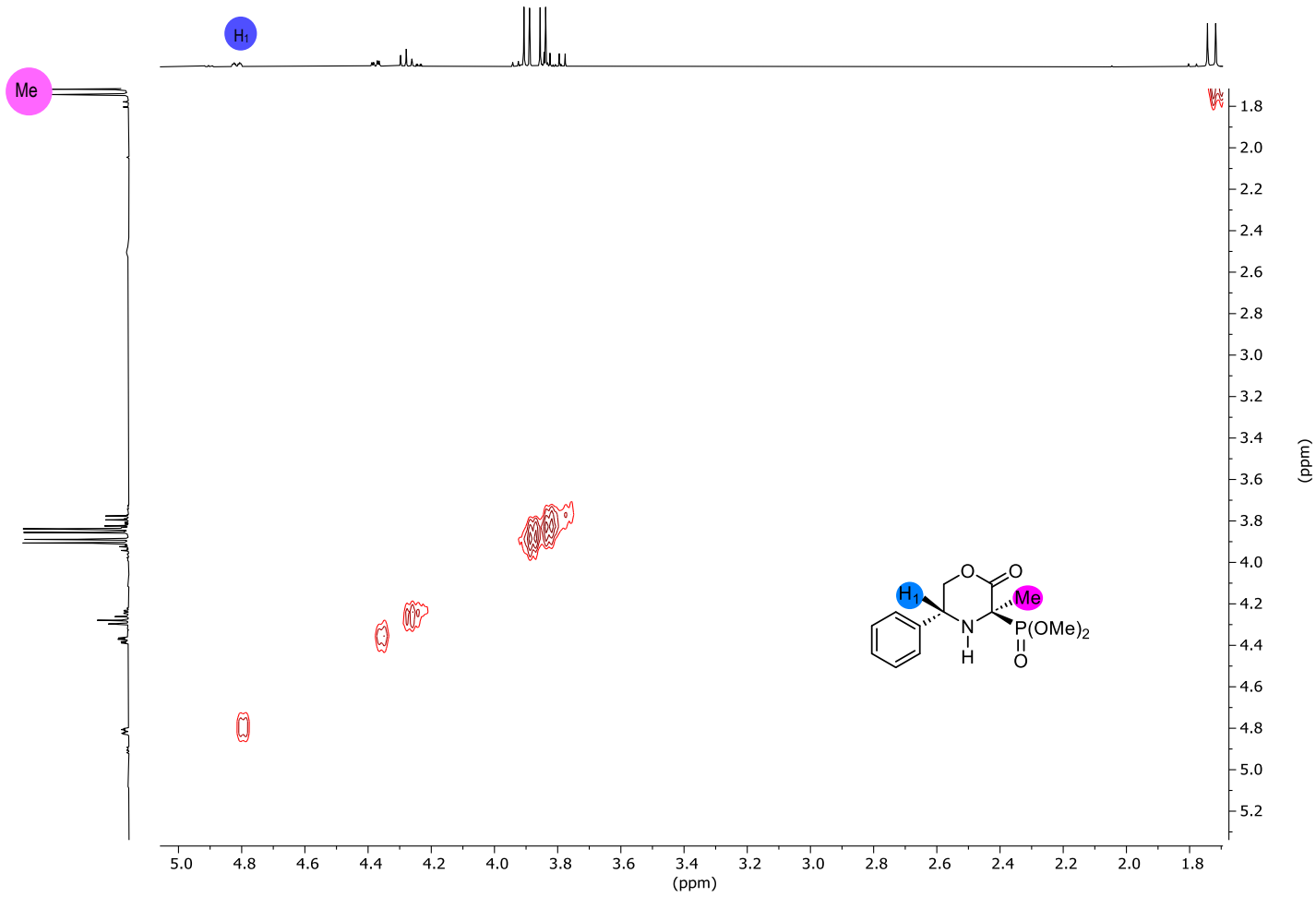
Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) del compuesto (3*R*,5*R*)-**25b.**



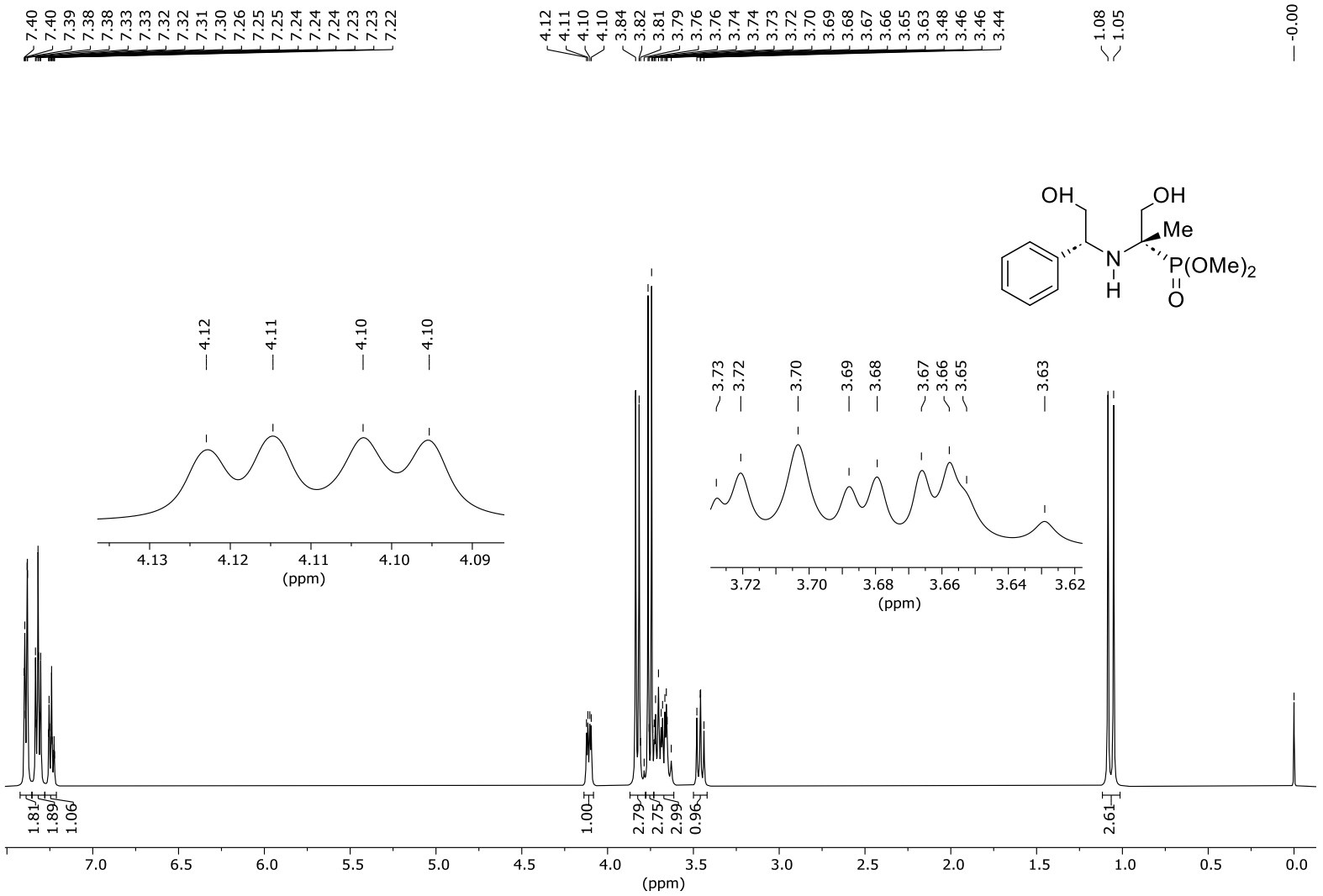
Espectro de RMN ^{31}P (202 MHz, $CDCl_3$) del compuesto (3*R*,5*R*)-**25b.**



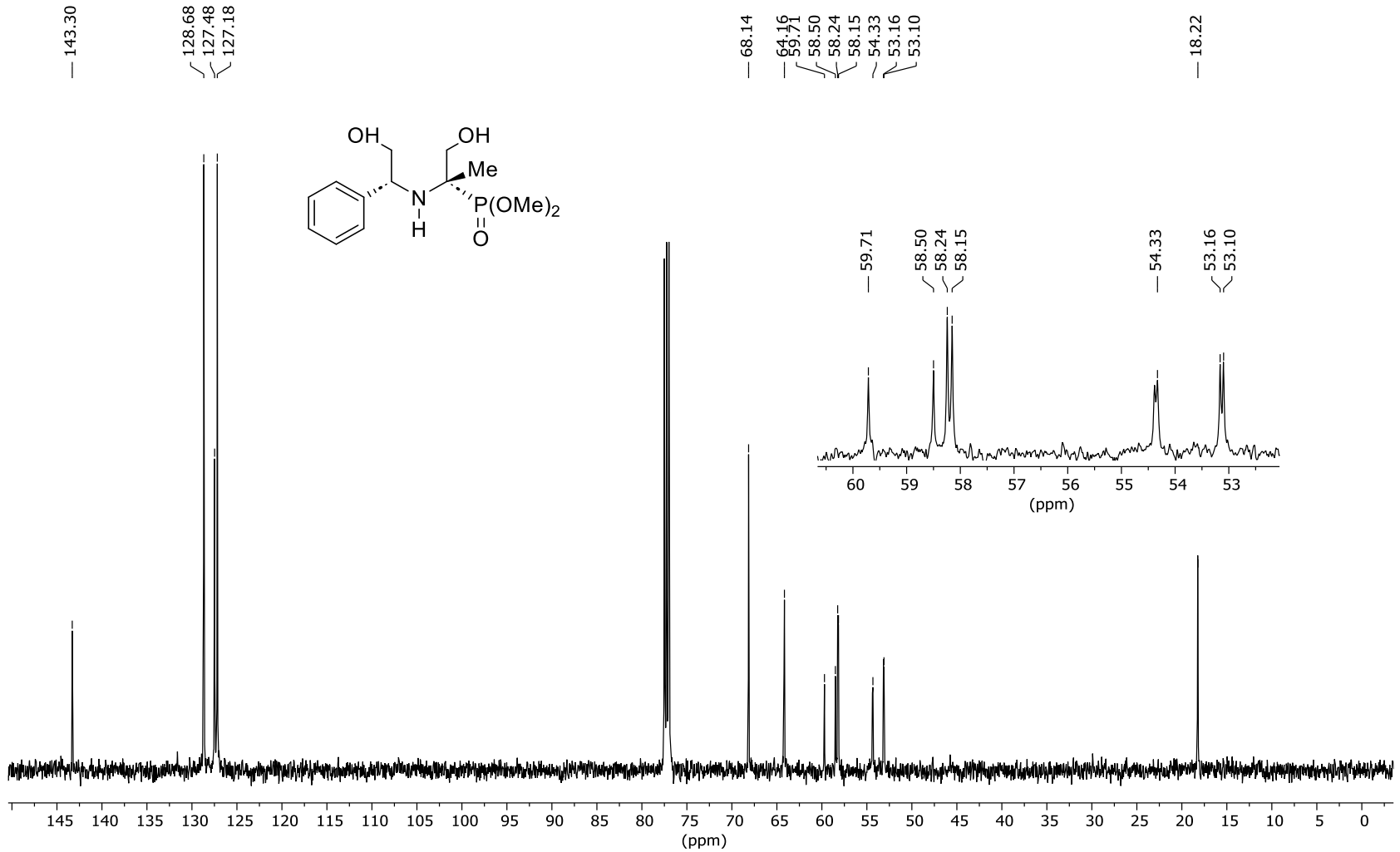
Espectro de RMN HSQC (ampliación, 500 MHz, $CDCl_3$) del compuesto (3*R*,5*R*)-**25b.**



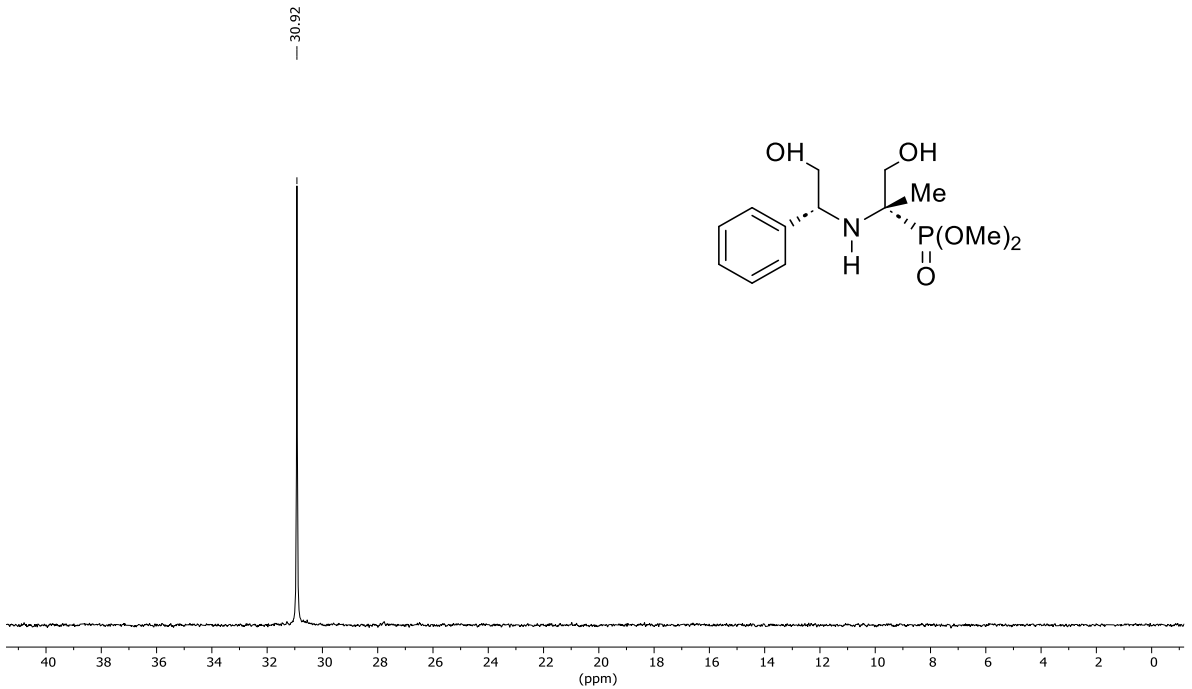
Espectro de RMN NOESY (ampliación, 500 MHz, $CDCl_3$) del compuesto (3*R*,5*R*)-**25b.**



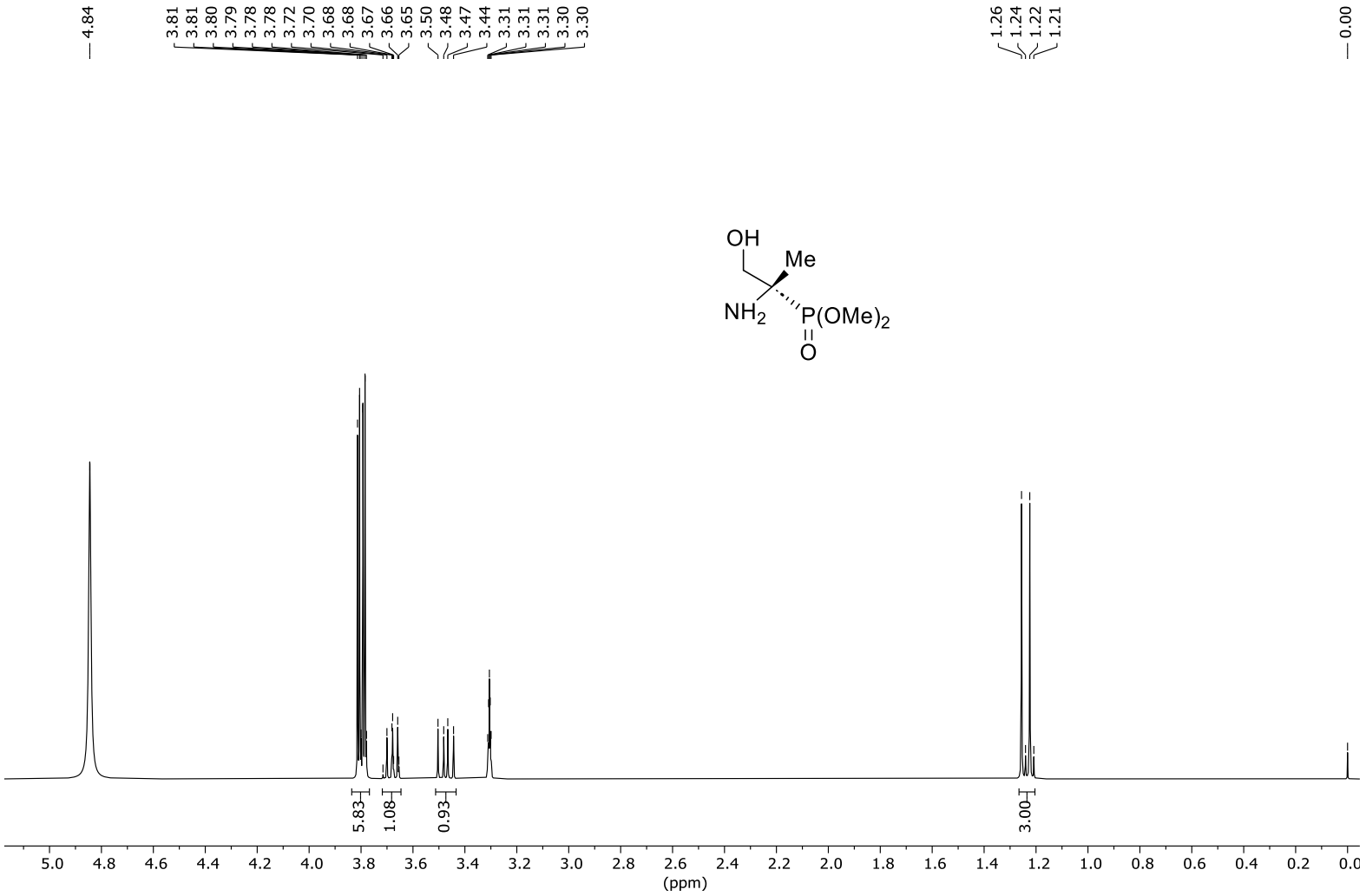
Espectro de RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) del compuesto (3*S*,5*R*)-**53b.**



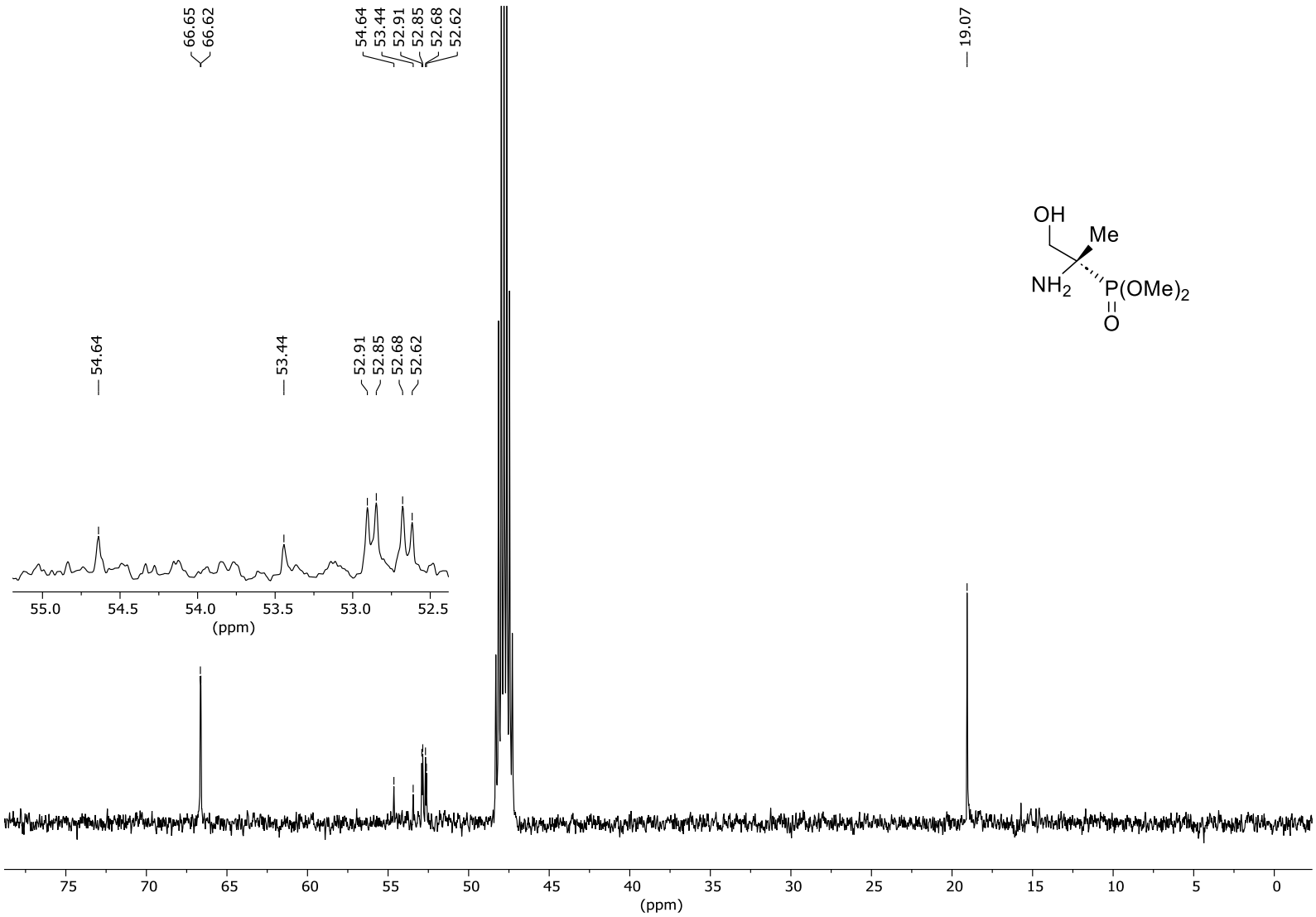
Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) del compuesto (3*S*,5*R*)-**53b.**



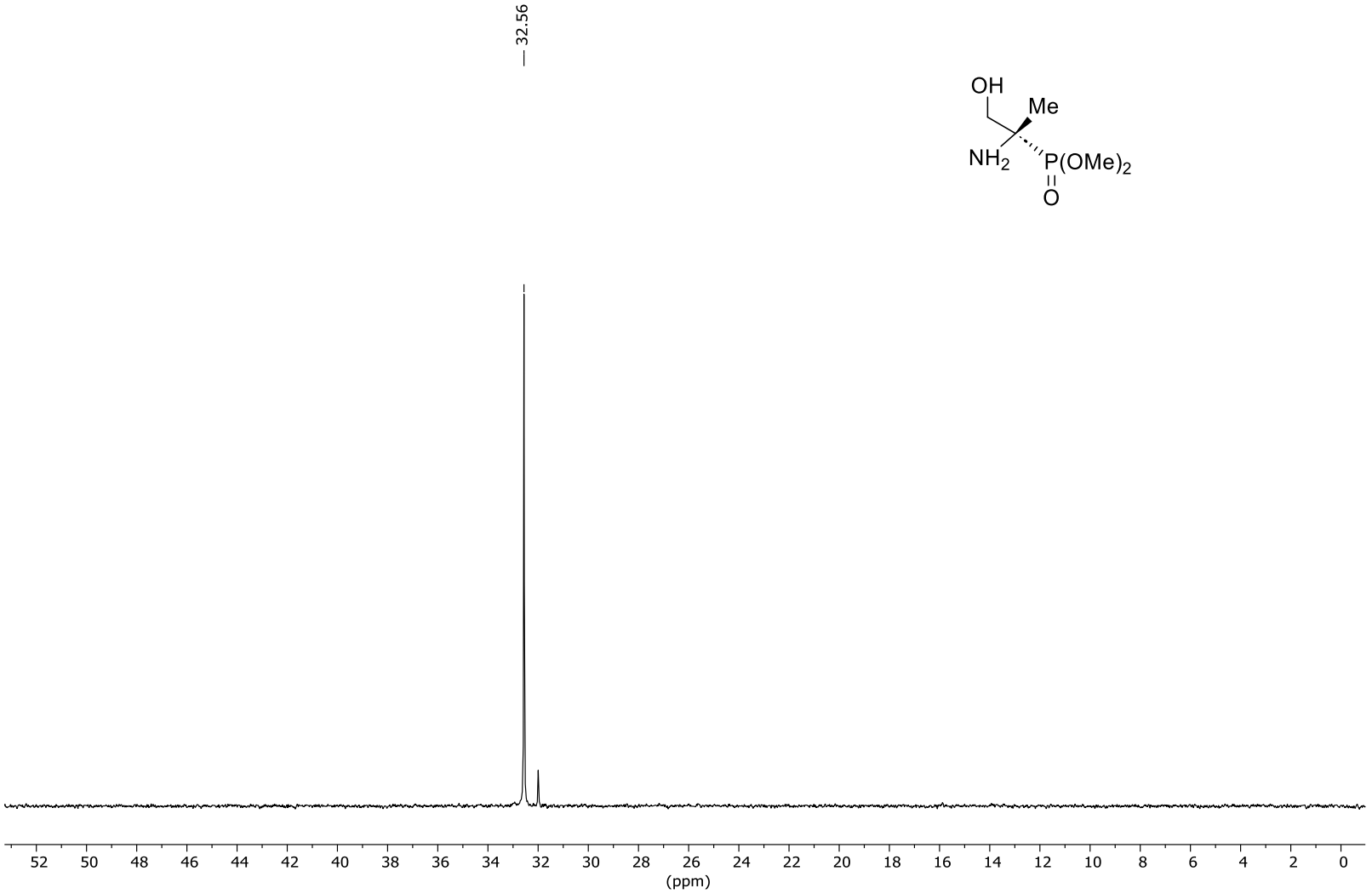
Espectro de RMN ^{31}P (202 MHz, $CDCl_3$) del compuesto (3*S*,5*R*)-**53b.**



Espectro de RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) del compuesto (*S*)-**54b.**



Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) del compuesto (*S*)-**54b.**



Espectro de RMN ^{31}P (202 MHz, $CDCl_3$) del compuesto (*S*)-**54b.**

pharmaceuticals

MDPI

Article

A Computational Method for the Binding Mode Prediction of COX-1 and COX-2 Inhibitors: Analyzing the Union of Coxibs, Oxicams, Propionic and Acetic Acids

Estefany Bello-Vargas [1], Mario Alberto Leyva-Peralta [2], Zeferino Gómez-Sandoval [3], Mario Ordóñez [1,*] and Rodrigo Said Razo-Hernández [4,*]

1 Centro de Investigaciones Químicas, Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca 62209, Mexico; estefany.bellovar@uaem.edu.mx
2 Departamento de Ciencias Químico Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Sonora, H. Caborca, Sonora 83621, Mexico; mario.leyva@unison.mx
3 Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Colima, km 9 Carretera Colima-Coquimatlán, Coquimatlán 28400, Mexico; zgomez@ucol.mx
4 Laboratorio de Quimioinformática y Diseño de Fármacos, Centro de Investigación en Dinámica Celular, Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca 62209, Mexico
* Correspondence: palacios@uaem.mx (M.O.); rodrigo.razo@uaem.mx (R.S.R.-H.)

Abstract: Among the biological targets extensively investigated to improve inflammation and chronic inflammatory conditions, cyclooxygenase enzymes (COXs) occupy a prominent position. The inhibition of these enzymes, essential for mitigating inflammatory processes, is chiefly achieved through Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs). In this work, we introduce a novel method—based on computational molecular docking—that could aid in the structure-based design of new compounds or the description of the anti-inflammatory activity of already-tested compounds. For this, we used eight crystal complexes (four COX-1 and COX-2 each), and each pair had a specific NSAID: Celecoxib, Meloxicam, Ibuprofen, and Indomethacin. This selection was based on the ligand selectivity towards COX-1 or COX-2 and their binding mode. An interaction profile of each NSAID was compiled to detect the residues that are key for their binding mode, highlighting the interaction made by the Me group. Furthermore, we rigorously validated our models based on structural accuracy (RMSD < 1) and (R^2 > 70) using eight NSAIDs and thirteen compounds with IC_{50} values for each enzyme. Therefore, this model can be used for the binding mode prediction of small and structurally rigid compounds that work as COX inhibitors or the prediction of new compounds that are designed by means of a structure-based approach.

Keywords: anti-inflammatory; cyclooxygenase (COXs); molecular docking; NSAIDs; Celecoxib; Meloxicam; Ibuprofen; Indomethacin

check for updates

Citation: Bello-Vargas, E.; Leyva-Peralta, M.A.; Gómez-Sandoval, Z.; Ordóñez, M.; Razo-Hernández, R.S. A Computational Method for the Binding Mode Prediction of COX-1 and COX-2 Inhibitors: Analyzing the Union of Coxibs, Oxicams, Propionic and Acetic Acids. *Pharmaceuticals* **2023**, *16*, 1688. https://doi.org/10.3390/ph16121688

Academic Editors: Anna Fantinati and Davide Illuminati

Received: 6 October 2023
Revised: 21 November 2023
Accepted: 29 November 2023
Published: 4 December 2023

Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Inflammation constitutes a natural protective response in tissues affected by physical trauma, noxious chemicals, or microbial agents. It represents the body's response to inactivate or eliminate invading pathogens, removing irritants, and laying the foundation for tissue repair [1–4]. Based on its physiological characteristics, inflammation can be classified as acute or chronic, with chronic inflammation of major significance in the health realm due to its prevalence in chronic pathologies [5–8].

Concurrently, the role of methyl groups in modulating the biological activity of small molecules is well described in the literature [9]. Numerous research groups have carried out studies on the replacement of hydrogen atoms with methyl groups, consistently demonstrating a favorable impact on the structure–activity relationship of these compounds.

Recent research has revealed how, in SAR studies, there is a 10-fold or greater increase in biological activity in 8% of cases, while a mere 0.4% exhibit a 100-fold or greater increase in biological value. This is related to the placement of a methyl group in a hydrophobic environment that may be suitable; however, orthomethylation in biaryl systems or via branching on an atom attached to a ring favors a conformational change in the biological system. For this reason, the implementation of methyl groups has emerged within the design of bioactive molecules, given the diverse range of advantages it offers [10].

In this context, in recent years, our investigation group has focused on the synthesis of small molecules that contain a methyl group within their structure, which have been shown to exhibit anti-inflammatory activity in vivo models. However, the pharmacological mechanism for this type of molecule has not yet been explored [11].

Although there are various pharmacological mechanisms involved in inflammatory processes [12], the best known and studied is the inhibition of cyclooxygenase enzymes (COXs)—key isoenzymes in the regulation of inflammatory processes—that are essential for the biosynthesis of prostaglandins through the oxidation of arachidonic acid [13]. For this reason, the inhibition of these isoenzymes is one of the topics of study in various research groups with a specific interest in the COX-2 isoform since it has been shown that this is the main participant in inflammatory processes. In addition, there are structural differences such as size, hydrophobicity, and residues within the catalytic site between both isoenzymes [14]. Consequently, the development of new molecules is sought, which present greater selectivity for COX-2.

Given the diversity of available COX crystals in databases and the structural variations in their co-crystallized molecules, choosing suitable crystals for descriptive or predictive computational analysis has become increasingly challenging. Incorrect crystal selection can lead to erroneous molecular designs or an inadequate description of the binding mode of COX inhibitors. Hence, this work introduces a method aimed at streamlining the adequate selection of COX crystals, ultimately bolstering the reliability of the results obtained from molecular docking calculations. This method explores the binding mode of four different NSAIDs: Celecoxib, Meloxicam, Ibuprofen, and Indomethacin. This study demonstrates that it is possible to identify the binding mode of COX inhibitors. Additionally, this method enables the correlation between the interaction energy (E_{int}) obtained via molecular docking calculations with the IC_{50} values obtained from COX inhibition experiments.

2. Results and Discussion

2.1. Cavities Analysis of COXs

By conducting a structural analysis using the Protein Pluss server on both COX isoform cavities, we obtained the results depicted in Figure 1.

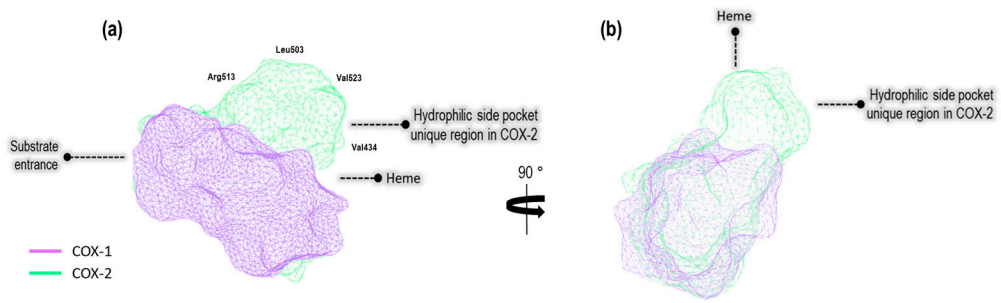


Figure 1. (**a**) The binding site cavity of COX-1 (1EQG) and COX-2 (3LN1), (**b**) turned to the right at 90°.

Based on differences in the structural attributes of these proteins, we identified a hydrophilic pocket unique to COX-2 when compared to COX-1. Additionally, we employed the DoGSiteScorer method, which is designed to detect pockets solely based on the 3D structure of the enzyme and further segment them into sub-pockets [15]. This analysis

encompassed the assessment of global properties, including the size, shape, and chemical characteristics of these sub-pockets [16]. The properties under evaluation included the volume (Å^3), surface area (Å^2), hydrophobicity depth ratio (Å), and amino acid residues in both, as well as exclusively amino acid residues specific to our model crystals, as illustrated in Table 1.

Table 1. Evaluation characteristics of the global properties of the crystals used in the computational model and importance of amino acid residues.

PDB	Ligand	Volume (Å^3)	Surface (Å^2)	Depth (Å)	Hydrophobicity Ratio	aa in Both Isoforms	aa in Only This Isoform
1EQG (COX-1)	Ibuprofen	204.80	254.18	10.91	0.792	Tyr355, Arg120, Ser530, Tyr385	Ile523, Ile434, Phe503, His513
4PH9 (COX-2)	Ibuprofen	228.86	306.53	11.39	0.760	Tyr356, Arg121, Ser531, Tyr386	Leu504, Val435, Arg514, Val524
2OYU (COX-1)	Indomethacin	288.76	335.33	12.82	0.745	Tyr355, Arg120, Ser530, Tyr385	Ile523, Ile434, Phe503, His513
4COX (COX-2)	Indomethacin	260.09	343.12	12.34	0.780	Tyr355, Arg120, Ser530, Tyr385	Leu503, Val523, Val434, Arg513
3KK6 (COX-1)	Celecoxib	198.14	309.36	10.91	0.763	Tyr341, Arg106, Ser516, Tyr371	Ile523, Ile434, Phe503, His513
3LN1 (COX-2)	Celecoxib	269.31	306.59	12.28	0.760	Tyr355, Arg120, Ser530, Tyr385	Arg513, Leu503, Val523, Val434
4O1Z (COX-1)	Meloxicam	272.89	335.02	12.67	0.815	Tyr355, Arg120, Ser530, Tyr385	Ile523, Ile434, Phe503, His513
4M11 (COX-2)	Meloxicam	292.35	320.25	13.21	0.831	Tyr355, Arg120, Ser530, Tyr385	Leu503, Val384, Val523, Arg513

The properties reveal that the COX-2 (4PH9, 3LN1, and 4M11) cavity exhibits a large volume (Å^3) and greater surface area (Å^2) compared to the COX-1 (1EQG, 3LN1, and 4O1Z) cavity. Also, the COX-2 catalytic site is deeper, according to Table 1 (except for the 2OYU crystal, Indomethacin). However, in the system of Indomethacin (2OYU and 4COX), the relationship with respect to the values mentioned above is inverse due to the structural difference in the co-crystalized ligands. In the crystal 2OYU, the ligand is Indomethacin-(*S*)-alpha-ethyl-ethanolamide (Indomethacin alpha) with a higher volume than Indomethacin, which is a ligand present in the crystal 4COX. With respect to the aminoacid residues, the following Tyr355, Arg120, Ser530, and Tyr385 are retained in all systems. On the other hand, the residues Ile523, Ile434, Phe503, and His513 are present only in the COX-1 cavity, and Leu503, Val384, Val523, and Arg513 are present only in the COX-2 cavity.

In addition, bioinformatic analysis was used to compare the sequences of all COX-1 and COX-2 crystals (see Figure S1, COX-1 and Figure S2, COX-2). For COX-1, three different organisms were analyzed: *Human*, *Mus musculus*, and *Ovis aries*. The focus of this analysis was to identify which aa is conserved in the COX-1 binding site (see Table 1, columns 6 and 7). As a result, only a difference in the *Human* sequence was found (His513 was replaced by Gln); see Figure S1. On the other hand, when analyzing COX2 sequences, we found a complete similarity. Furthermore, we continued with the construction of our computational model since there is no significant variation in the selected crystals.

2.2. Collection of Information for the Date (Active Compounds)

We proceeded with the search for IC_{50} values reported for NSAIDs present in our crystals in the ChEMBL database [17] for both COX isoforms. Additionally, we included the following NSAIDs: Flurbiprofen [18], Diclofenac [19], Rofecoxib [20], and Nimesulide [21]. These compounds served as participants in the structural and energetic validation of our model, leveraging our knowledge of their binding modes and their selectivity towards COX enzymes. Furthermore, we identified fifty compounds with documented anti-inflammatory activity, which were assessed using in vitro models from the literature. However, out of

these compounds, only thirteen were selected since they had both IC_{50} values on COXs, like the NSAIDs selected (Figure 2).

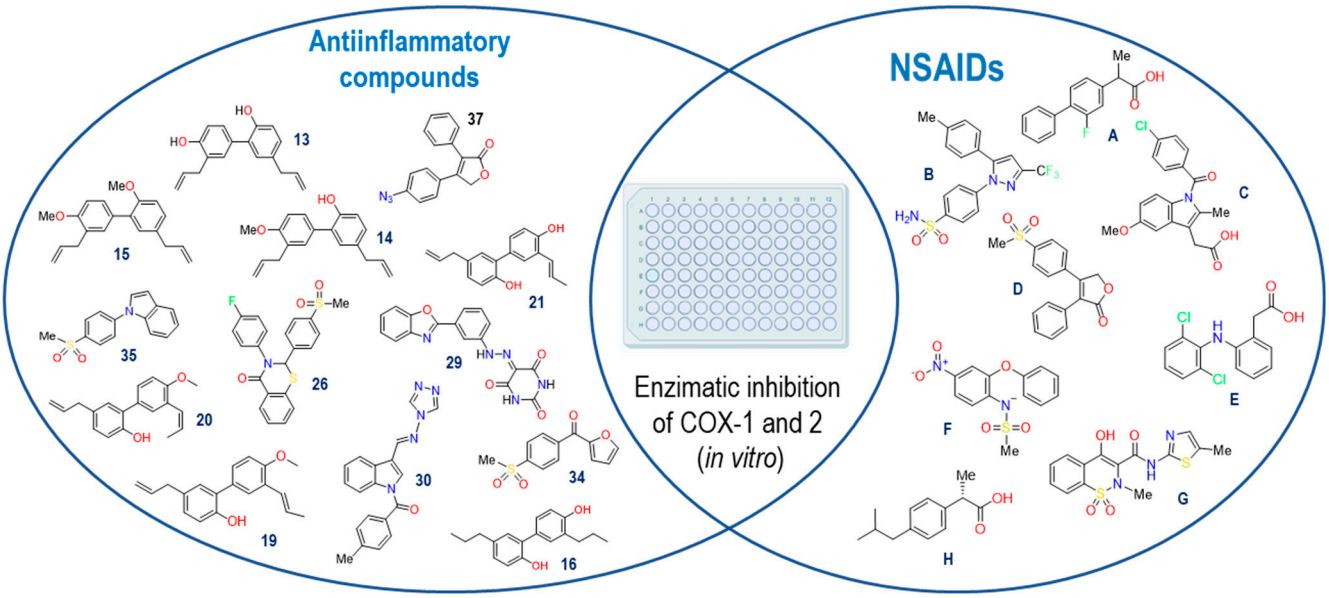


Figure 2. NSAIDs and anti-inflammatory compounds employed in the computational model. Flurbiprofen (**A**), Celecoxib (**B**), Indomethacin (**C**), Rofecoxib (**D**), Diclofenac (**E**), Nimesulide (**F**), Meloxicam (**G**) and Ibuprofen (**H**).

The thirteen active compounds we sought had a structural diversity that presented a challenge in our model, and thus, evaluating this variable, even if we could find a correlation between the data predicted by the model with the reported biological activity values, was unfeasible. The criteria used for the selection of these compounds were to maintain at least two aromatic rings within the structures and a molecular weight of fewer than 500 KDa.

2.3. Analysis of the Crystal Selected for the Predictive Model

Continuing with the elaboration of our model, we previously selected the crystals, and structures of the molecules that would form part of our structural and energetic validation. Therefore, the next step was the preparation and analysis of our selected crystals for COX-1. Figure 3 shows the binding mode of the ligands as follows: Ibuprofen, Indomethacin, Celecoxib, and Meloxicam in the enzyme binding site. We also analyzed the ligand size, shape and hydrophobic characteristics related to the cavity where these ligands were spatially positioned.

By analyzing these crystals (see Figure S3), we found important differences in each system, highlighting that they bound in a different way and at a location of the cavity where arachidonic acid (the endogenous ligand) also binds. For Ibuprofen (1EQG), we observed the proper accommodation of size over the COX-1 cavity, where the aromatic ring was in front of the HEM group and interacted with the following amino acid residues: Ile523, Val349, and Ala527 (Pi-alkyl and carboxylic acid on the back side in a more hydrophilic environment interacted with the following amino acid residues: Arg120 and Tyr355 (Conventional Hydrogen Bond). In the case of the methyl substituent in the alpha position to the carbonyl group, it interacted with the residues Val349, Val116, Leu531, and Leu359 (Alkyl). Finally, the heme-oriented isobutyl group showed interactions with the following amino acid residues: Leu352, Gly256, Phe518, Trp387, Met522, Tyr385, Ser530, and Phe381 (Van der Waals).

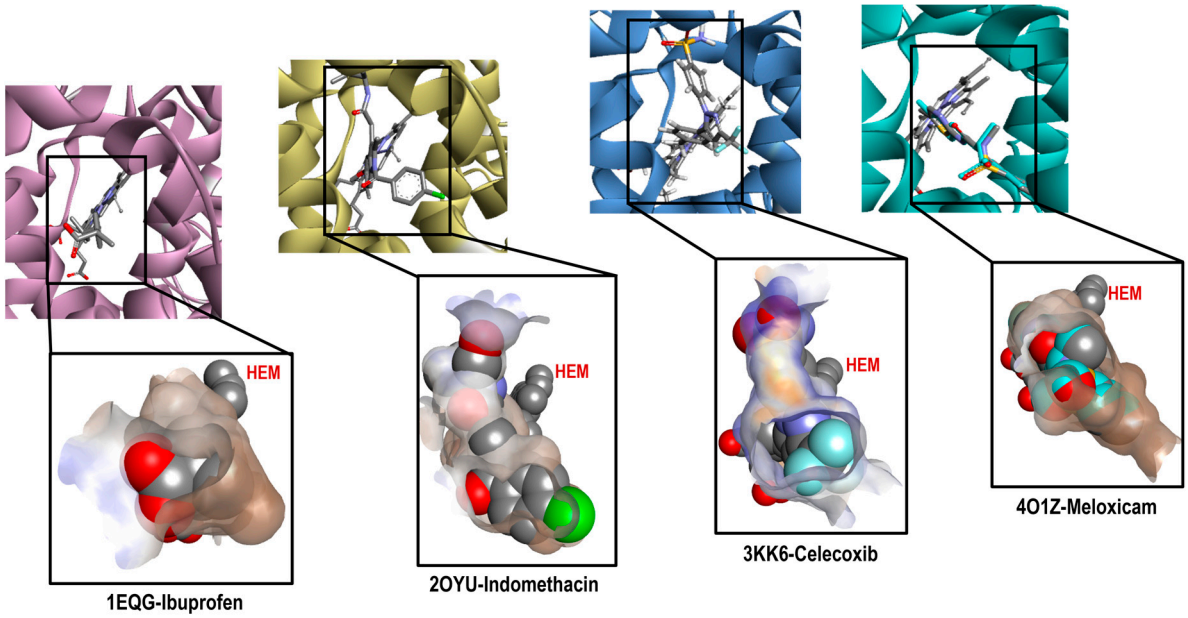


Figure 3. Comparative cavities in various COX-1 crystals with diverse ligands.

Indomethacin (2OYU) was bound in a different mode than the one expected for acetic acid derivatives due to the substituent attached to it (alpha-ethyl-ethanolamide group), modifying the orientation of the methoxy group attached to the indole ring to the HEM group, which is a position normally occupied by the ρ-chlorobenzene ring. The interactions observed for Indomethacin alfa were as follows: the ρ-chlorobenzene ring with residue amino acids Tyr355 (Pi-Pi Stacked), Met113 (Pi-Sulfur), Val116, Leu359, Val349 and Leu531 (Alkyl); the amide cyclic with Arg120 (Conventional Hydrogen Bond); the ring of indole with Val349 and Ala527 (Pi-Alkyl); and the MeO group with Trp387 (Pi-Alkyl) and Leu384 (Alkyl). Lastly, the ethyl-ethanolamide group interacted with Ile517 (Alkyl), His90 (Pi-Alkyl), and Phe518 (Pi-Alkyl) (see Figure S4).

For Celecoxib (3KK6), a C-type accommodation was displayed, occupying a larger space than Ibuprofen with the toluene fragment looking towards the HEM; this interacted with Trp387, Tyr385 and Ala527 (Pi-Alkyl), Leu352 (Pi-Sigma); for the pyrazole ring with Ala527 and Val349; the CF_3 group interacted with Val116, Leu359 and Val349 (Alkyl); and interactions with a hydrophilic pocket were shown for His90 (Pi-Sulfur and Carbon Hydrogen Bond), Ser516 (Carbon Hydrogen Bond), Leu352, and Gln192 (Conventional Hydrogen Bond) by its sulfonamide group (see Figure S5).

Finally, Meloxicam (4O1Z) displayed a different binding mode from those mentioned above, revealing a new hydrophobic pocket in the binding site where the benzothiazine ring—characteristic of the enolic acid derivatives (oxicams)—was harbored. This ring interacted with the following next residue amino acids: Leu531 (Pi-Sigma), Ile345 and Val349 (Pi-Alkyl), and Ser530 (Conventional Hydrogen Bond); the Thiazole ring interacted with Ile523, Ala527, Phe518, Leu384, Met522, and Trp (Pi-Alkyl), Gly526 (Amide-Pi Stacked), and Leu352 (Pi-Sigma) (see Figure S6). This finding is of great importance for the description of the binding mode of new inhibitors because, generally, this binding mode is not considered.

This analysis shows the importance of the structural and physicochemical properties of the ligand in its interaction with the enzyme. Although the chemical environment at the binding site was the same (Ibuprofen, Indomethacin, and Celecoxib), the differences in size, structure, and hydrophobicity between these molecules generated a different binding mode. In addition, in the case of Meloxicam, a greater difference was achieved, revealing a different pocket that needs to be considered for molecular docking prediction. Thus, this reaffirms the selection of the four crystals with their corresponding ligands for the construction of our predictive model.

The same analysis was performed with COX-2 crystals. Figure 4 shows the binding mode of the ligands as follows: Ibuprofen (4PH9), Indomethacin (4COX), Celecoxib (3LN1), and Meloxicam (4M11) on the COX-2 enzyme. The ligand analysis was performed based on their size, molecular shape, hydrophobic characteristics, and interaction residues.

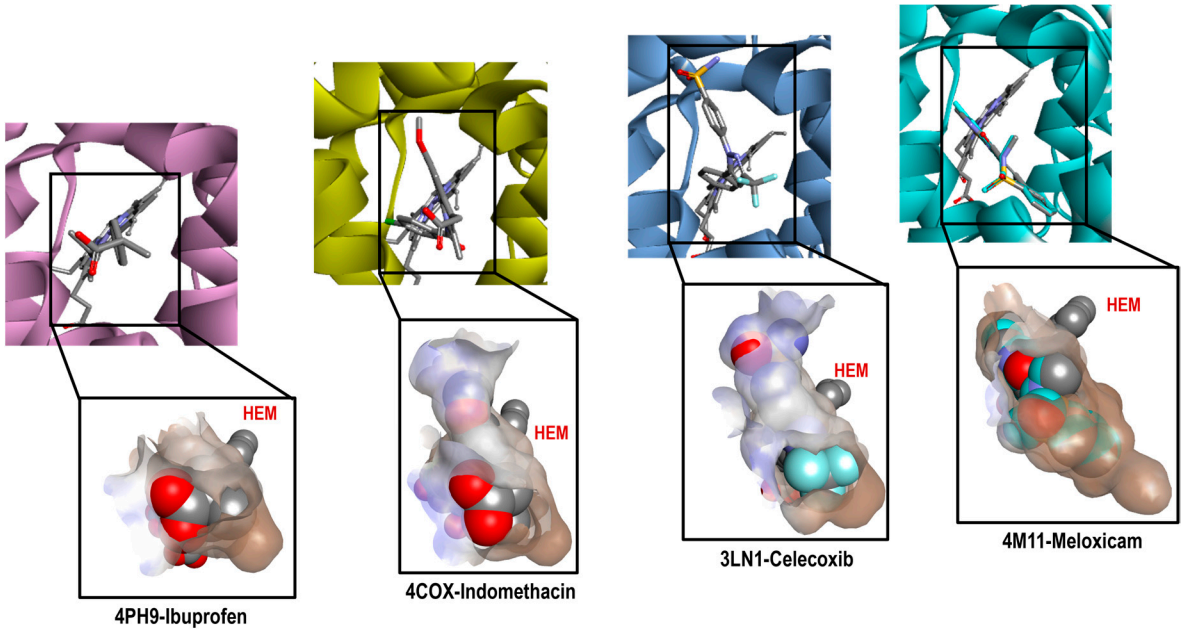


Figure 4. Comparative cavities in various COX-2 crystals with diverse ligands.

Figure 4 shows how the binding modes of Ibuprofen, Celecoxib, and Meloxicam maintain great similarity when compared to COX-1. The interactions with Ibuprofen in crystal 4PH9 are described next. Carboxylic acid interacted only with the following amino acid residues: Arg121 and Tyr356 (Conventional Hydrogen Bond) on the back side in an environment that was more hydrophilic, as well as COX-1. For the methyl substituent in the alpha position to the carbonyl group, it interacted with the residues Leu360, Leu532, Val117, Tyr356 and Val350 (Alkyl); the ρ- isobutylbenzene group showed interactions with Ala528 and Val350 (Pi-Sigma), Ser531, Tyr386 and Val524 (Van der Waals) (see Figure S7).

However, the case of the 4COX crystal is totally different since Indomethacin has no structural modification like the one in the 2OYU crystal. In 4COX, the carboxylic acid group of Indomethacin is oriented to the segment with higher hydrophilicity interacting with Arg120 (Attractive Charge) and Tyr355 (Conventional Hydrogen Bond); the ring of indole interacted with Val349, Val523, and Ala527 (Pi-Sigma), Leu531, Val349, Val523, Leu352, Ala527 (Pi-Alkyl), His90 (Pi-Alkyl), Leu352, Ser353 (Van der Waals). Meanwhile, the ρ-chlorobenzene ring interacted with Tyr385 (Pi-Pi-shaped), Ala527, Met522, Trp387, and Leu384 (Pi-alkyl and Alkyl) in front of the HEM group (see Figure S8).

In this analysis, the interactions obtained for celecoxib in crystal 3LN1 were as follows: toluene groups interacted with Tyr371, Trp373, Leu370 (Pi-Alkyl and Alkyl), Gly512 (Amide-Pi Stacked), and Ala513 (Pi-Sigma); the CF_3-Pyrazole group interacted with Ala513, Val335 (Pi-Sigma), Arg106 (Conventional Hydrogen Bond), Leu517, and Val335 (Alkyl). For the third aromatic ring in the structure (Benzenesuldidfonamide), the observed interactions were as follows: Val509, Ser339 (Pi-Sigma), Ser339, Gln178, Leu338, Arg499 (Conventional Hydrogen Bond) (see Figure S9).

Finally, the interactions for Meloxicam in 4M11 could be divided into two regions; in the first one, we found the thiazine ring, which interacted with Ser530 (Conventional Hydrogen Bond), Leu531, Ile345 (Pi-Alkyl), and Met535 (Pi-Sulfur). In the second, we found thiazole ring interactions with Val523, Met522, Ala527, Phe518 (Pi-Alkyl), Trp387 (Pi-Sulfur), Gly(526), and Leu (Pi-Sigma) (see Figure S10).

After obtaining the complete analysis of the binding modes of these NSAIDs, we decided to continue with the next step of our method: computational molecular docking.

2.4. Structural Validation of the Docking Model

The next step in our method consisted of the ability to predict the binding mode of new compounds, considering the four binding modes previously described. Therefore, the validation of computational molecular docking was fundamental to evaluate the predictive ability of our method. To accomplish this, for each system, the original conformation of the ligand in the crystal was compared to the one obtained from the molecular docking. For the evaluation of conformational reproducibility, we employed the root mean square deviation (RMSD) value, as shown in Figure 5.

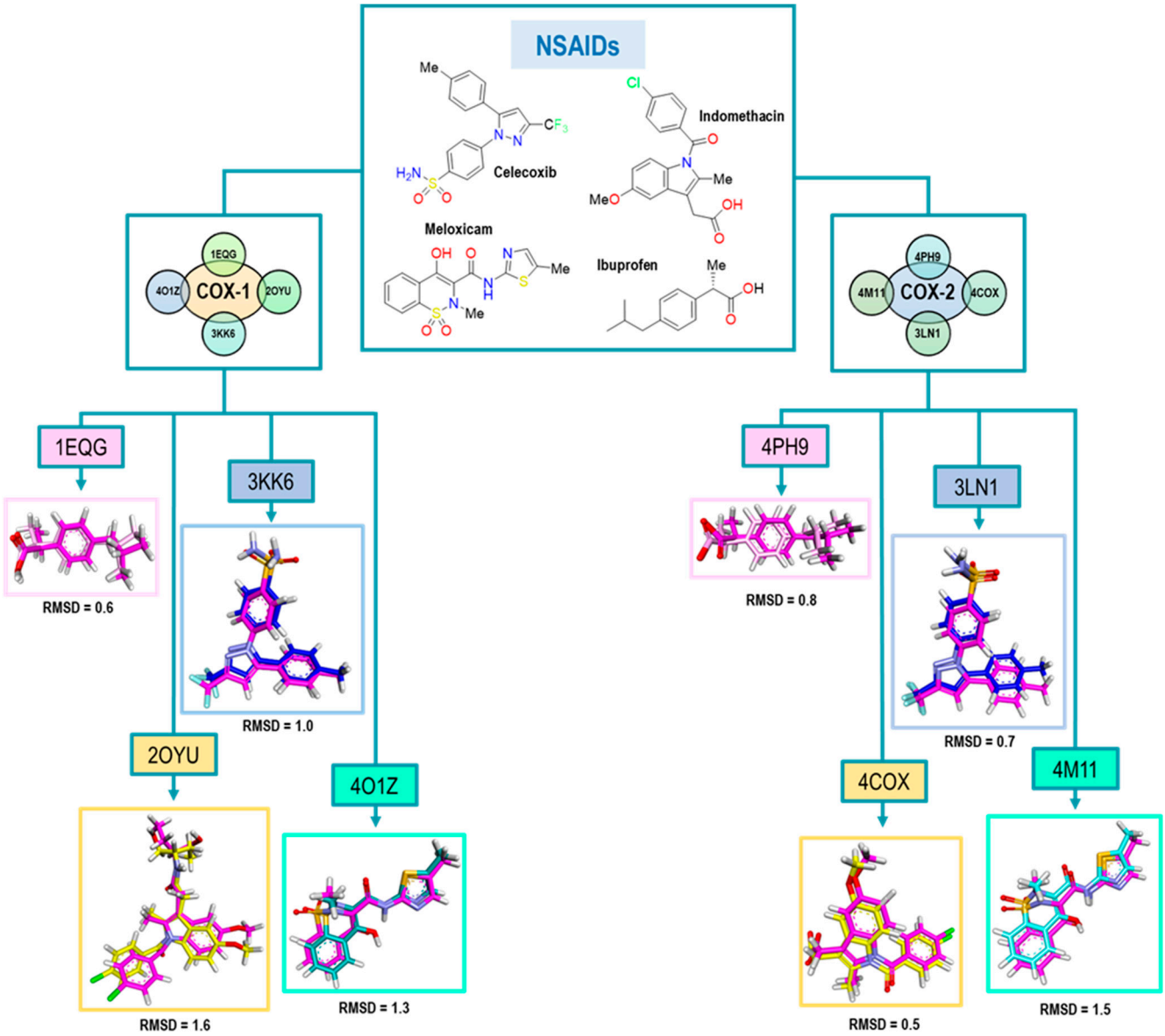


Figure 5. RMSD values obtained for the structural validation of the computational model with NSAIDs where the molecule is the original pose in all cases and is the color magenta. Colors for each pose represent those obtained in the molecules after the experiment as follows: Ibuprofen (pink), Indomethacin (yellow), Celecoxib (blue) and Meloxicam (cyan).

The results obtained for Ibuprofen, Indomethacin, Celecoxib, and Meloxicam are in a range of an RMSD lower than 1.6, where Ibuprofen exhibited the best value; see Figure 5.

The highest RMSD value was obtained for the 2OYU crystal because of its Indomethacin derivative co-crystallized. Nevertheless, its RMSD value met the acceptability criteria. For the case of Celecoxib, we obtained a value of 1.0; both conformations are quite similar, although, in the pose from the docking experiment, the sulfonamide group was found with a small 90° twist to the right.

Finally, in the 4O1Z crystal with Meloxicam as the ligand, we noticed that two different conformations for the ligand were displayed. The first one showed the parallel orientation of the sulfur atom of the thiazole ring with the carbonyl of the amide. For the second orientation, the oxygen atom of the thiazole ring was parallel (see Figure S11). However, we decided to take the first conformation as the biologically active one, according to Meanweel et al. [20].

For COX-2 crystals, we achieved better RMSD values, especially in the case of Indomethacin and Celecoxib. We associated this with the structure of Indomethacin, which has nonstructural modifications like 2OYU. Therefore, based on these RMSD values (see Figure 5), we concluded that our method had an adequate acceptability criterion for the structural results (conformations) obtained from the docking.

Validation of the E_{int} Values for Our Computational Model

Regardless of the structural validation, each docking result (pose) was accompanied by an energetic value related to its stability, which could be correlated to experimental inhibition values (IC_{50}). Therefore, a validation of our method related to the interaction energy values (E_{int}) obtained from the docking calculations was necessary. Therefore, we performed this validation for each of the co-crystallized NSAIDs and another four NSAIDs as follows: Flurbiprofen, Nimesulide, Diclofenac, and Rofecoxib. It is worth mentioning that for all these NSAIDs, an IC_{50} value for each COX isoform was obtained from the literature. This knowledge allowed us to evaluate the prediction of our method in relation to the selectivity of each NSAID for both isoforms. Figure 6 shows the analysis of two NSAIDs (non-selective and selective type) on both COX isoforms and the energy values obtained for each of them.

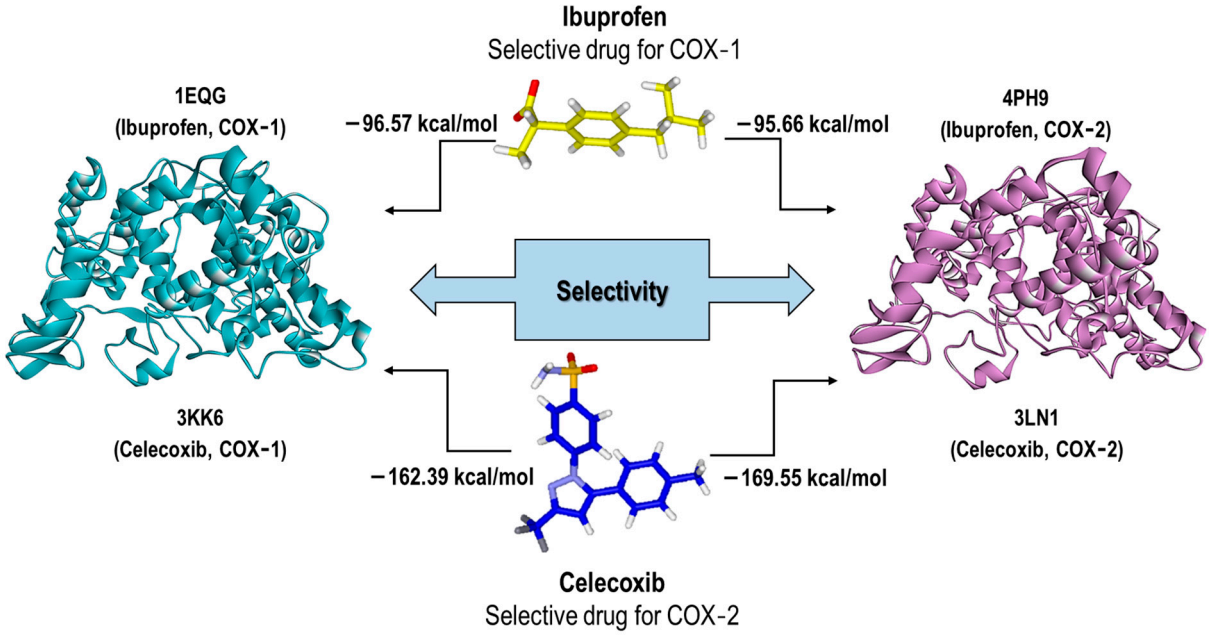


Figure 6. The scheme of our method validation in relation to the selectivity and E_{int}. As an example, the Ibuprofen and Celecoxib validation process is depicted.

The E_{int} values for Ibuprofen (non-selective NSAID) were −96.57 Kcal/mol and −95.66 Kcal/mol in COX-1 (1EQG) and COX-2 (4PH9), respectively, indicating a lower

selectivity towards COX-1. This value correlates with the selectivity reported in the literature. In addition, another factor that we included as critical was the binding mode, which is addressed later. In the case of Celecoxib, which is a selective NSAID towards COX-2, its energetic values were −169.55 Kcal/mol and −162.39 Kcal/mol for COX-2 and COX-1, respectively. This correlation was not obtained for the rest of the systems (COX crystals). Therefore, we undertook a more in-depth visual inspection considering the energy values with the binding mode.

In Figure 7, the four binding modes of Ibuprofen in the different crystals (four for COX-1 and four for COX-2) and the energy values obtained from the docking experiments are shown.

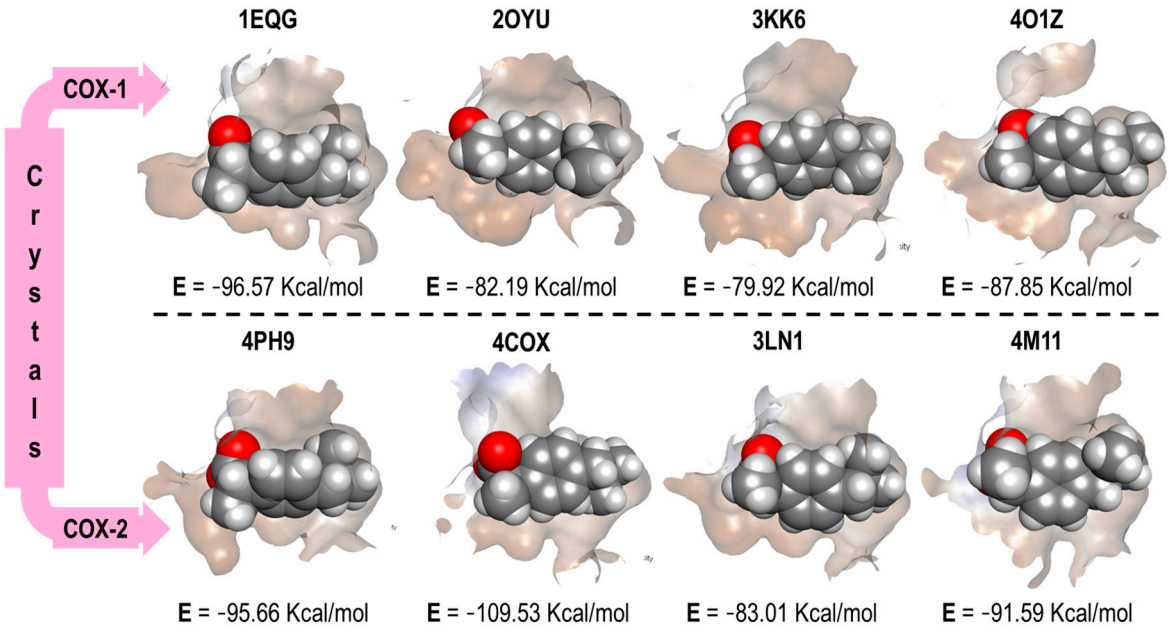


Figure 7. Ibuprofen binding mode and interaction energy values over all COX-1 and COX-2 crystals.

In Figure 7, fewer differences can be distinguished in the binding mode of Ibuprofen in 1EQG and 4PH9 crystals, which acted as our reference for the interaction of Ibuprofen in COX-1 and COX-2. The reproducibility of the binding mode, based on the orientations of its molecular fragments (carboxylic acid and propyl), was evaluated. However, in the other three crystal pairs (Indomethacin, Celecoxib, and Meloxicam), the obtained conformations were considerably different, especially with a disproportional benzene twist and a slight change in the position of the carboxylic acid in the structure, which affected the energy values (Kcal/mol). Therefore, for these three cases, we did not find an energy and selectivity correlation for the ibuprofen structure.

Since the co-crystallized structures differ for COX-1 and COX-2, we omitted the comparison described above for Indomethacin. Therefore, we could not perform the same analysis. Figure 8 displays the four binding modes of Celecoxib in all the crystals, along with their corresponding energy values.

From Figure 8, we can visualize the cavity size of the four crystals affected by Celecoxib binding. In the four crystals for COX-1 (top row), we found a similar spatial orientation, except for crystal 2OYU (Indomethacin), where the oxygen of the sulfonamide group was in the opposite position with respect to the reference. After analyzing the binding modes and finding some analogy between them, we evaluated the correlation of the energy with respect to the selectivity of Celecoxib for COX-2. This was achieved in only two pairs of crystals as follows: 3KK6(COX-1) with 3LN1 (COX-2) and 4O1Z (COX-1) with 4M11 (COX-2).

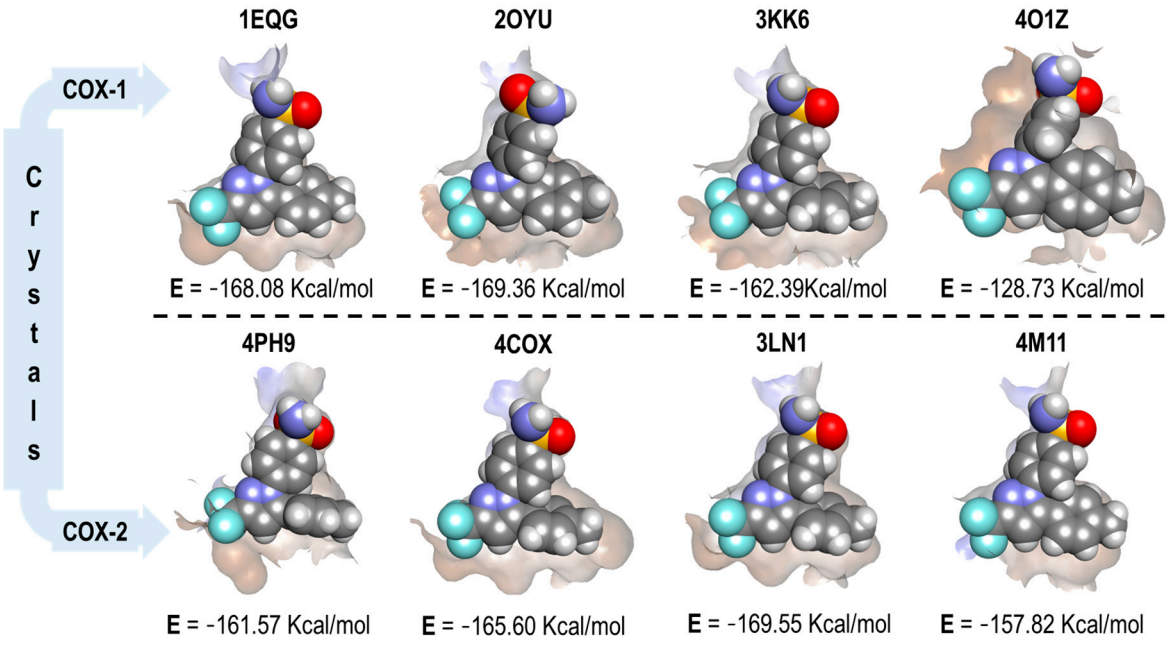


Figure 8. Celecoxib binding mode and interaction energy values over all COX-1 and COX-2 crystals.

Finally, the structural and energetic analysis of Meloxicam was based on its reference crystals 4O1Z (COX-1) and 4M11 (COX-2). In Figure 9, the four binding modes of Meloxicam in the COX crystals are displayed. Additionally, the energy values of each complex and its cavity shape are depicted.

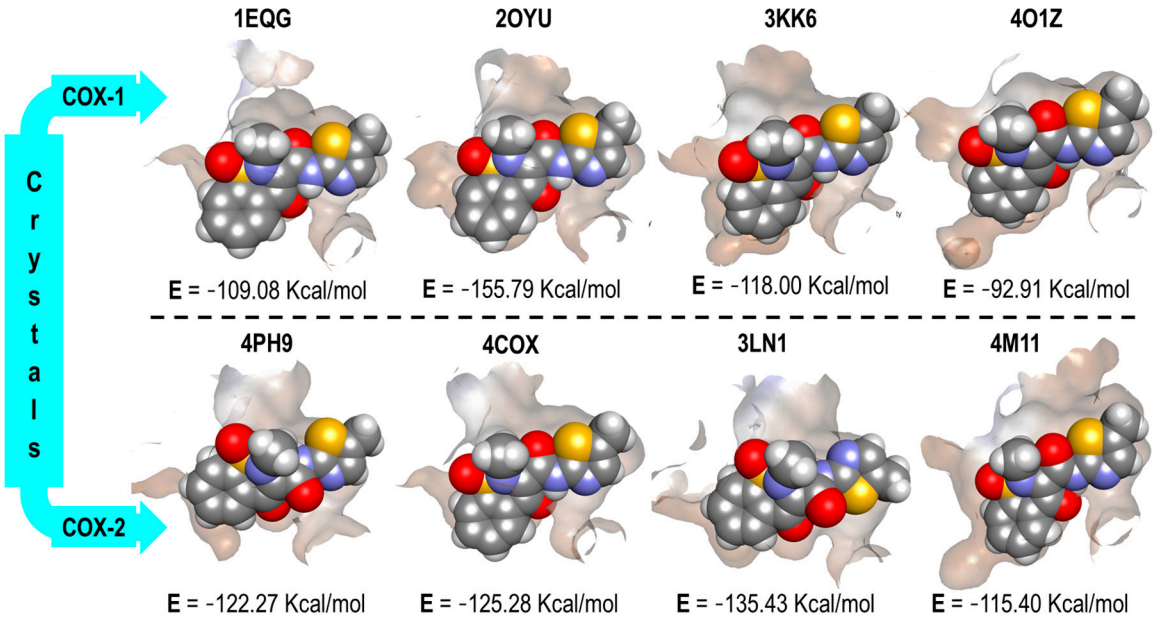


Figure 9. Meloxicam binding mode and interaction energy values over all COX-1 and COX-2 crystals.

In Figure 9, the different binding modes of Meloxicam over all the COX crystals are depicted. It can be shown that the adequate correlation between the pose and the energy values was obtained only in the 4O1Z and 4M11 crystals pair, which were co-crystalized with Meloxicam. In the other crystal pairs, features like size (1EQG and 4PH9) or the lack of a hydrophobic binding region that the oxicams opened (3KK6 and 3LN1) prevented the correct correlation between the docking results (pose and energy values).

This analysis, together with the visual inspection of these experiments, allowed us to confirm that our enzyme (COX-1 or COX-2) had a conformation and cavity size already adapted to the structural needs of the co-crystallized ligand, which is not necessarily equivalent to all the compounds.

Once the structural and energy data of the reference NSAIDs were analyzed, we decided to carry out this double validation incorporating four more NSAIDs in the study. Table 2 shows the energy values obtained for each NSAID in the eight COXs crystal structures and the energy difference values (ΔE), which represent the difference between the $\overline{E}_{COX-1}$ obtained in the COX-1 crystals minus the $\overline{E}_{COX-2}$, obtained in the COX-2 crystals ($\Delta E = \overline{E}_{COX-1} - \overline{E}_{COX-2}$), correlating with selectivity towards one of the COX isoforms. Here, $\overline{E}_{COX-1}$ stans for the average of all the E_{int} in COX-1 and $\overline{E}_{COX-2}$ stands for the average of all the E_{int} in COX-2.

Table 2. Energetic interaction values (Kcal/mol) for NSAIDs in each of the crystals of both isoforms and their delta Energetic (ΔE).

NSAIDs/COX	COX-1				COX-2				ΔE
	1EQG	2OYU	3KK6	4O1Z	4PH9	4COX	3LN1	4M11	
Flurbiprofen	−104.84	−105.12	−93.58	−110.92	−104.45	−123.05	−103.01	−105.91	−5.00
Indomethacin	−155.27	−145.91	−135.67	−152.18	−151.98	−150.60	−146.31	−140.19	−3.29
Ibuprofen	−96.57	−82.19	−79.92	−87.85	−95.66	−109.53	−83.01	−91.59	−0.91
Nimesulide	−122.59	−122.99	−119.00	−104.48	−114.84	−125.41	−117.58	−109.72	2.42
Celecoxib	−168.08	−169.36	−162.36	−128.73	−161.57	−165.60	−169.55	−157.82	7.15
Diclofenac	−108.23	−118.20	−106.68	−108.64	−103.98	−110.47	−114.72	−116.44	7.79
Meloxicam	−109.08	−155.79	−118.00	−92.91	−122.27	−125.28	−135.43	−115.40	17.55
Rofecoxib	−139.99	−135.96	−123.10	−105.56	−140.86	−140.42	−144.84	−111.51	21.74

Negative values of ΔE denote the affinity of the NSAID towards COX-1. On the other hand, positive values of ΔE are related to an affinity towards COX-2, see Figure 10.

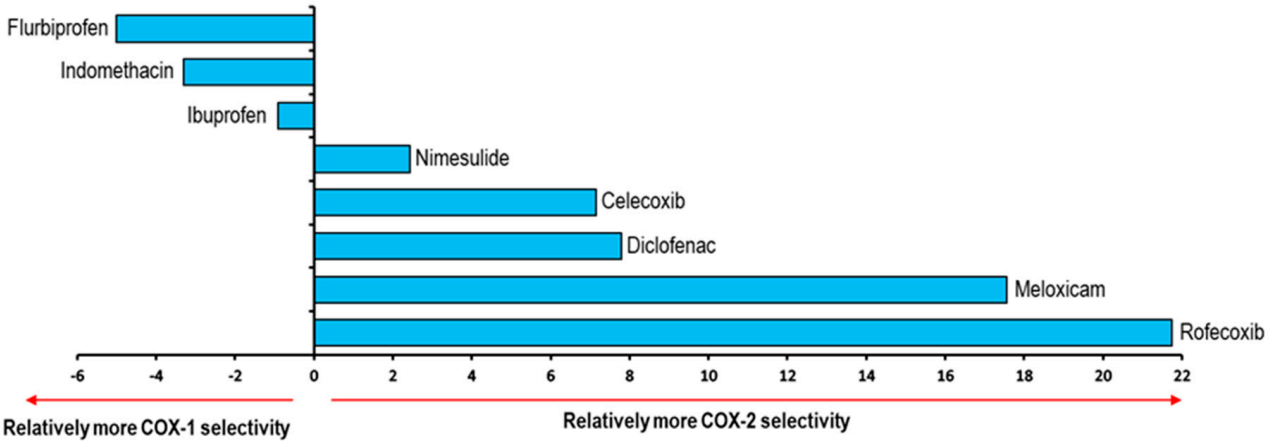


Figure 10. Graphical representation of ΔE values and their correlation to the relative COX-1 and COX-2 selectivity of NSAIDs. Positive values imply COX-2 selectivity and negative values imply COX-1 selectivity.

These results were compared with data reported in the literature for the selectivity of NSAIDs (Table S1). Flurbiprofen appears as the NSAID with the highest selectivity to the COX-1 isoform, surpassing Indomethacin and Ibuprofen. Moreover, Nimesulide has the lowest selectivity to COX-2. Likewise, Celecoxib with 7.15 and Diclofenac with 7.79 show

a great selectivity to this isoform. Finally, Meloxicam and Rofecoxib were those with the most positive values, representing the two NSAIDs with the highest selectivity towards COX-2 according to our model. 2.4.2. This formed the validation of the applicability of our computational method.

2.5. Validation of the Applicability Domain of Our Computational Method

- The Ibuprofen case (1EQG and 4PH9)

With the success obtained in the double validation of our model, we decided to evaluate its predictive power in a different system of molecules without a known binding mode. We performed this by adding new molecules with experimental IC_{50} values reported (on both COXs isoforms) in the literature, and we treated them as the NSAIDs previously studied. This was necessary since, based on the E_{int} energy correlation with IC_{50} values, we proposed one of the four binding modes already studied. Therefore, we used 21 molecules for this type of system, performing the molecular docking experiment for each molecule with each of the crystals (8 PDBs) of our model.

Figure 11 shows the graph with the values of Log $IC_{50\ exp}$ (X-axis) and Log $IC_{50\ calc}$ (Y-axis), as well as $R^2 = 0.64$. The molecules shown in the graph are those in which it was possible to correlate the E_{int} with their experimental IC_{50} by means of the IC_{50} obtained from the mathematical model that correlated with the E_{int} obtained from the docking in the 1EQG crystal (see Figure S12).

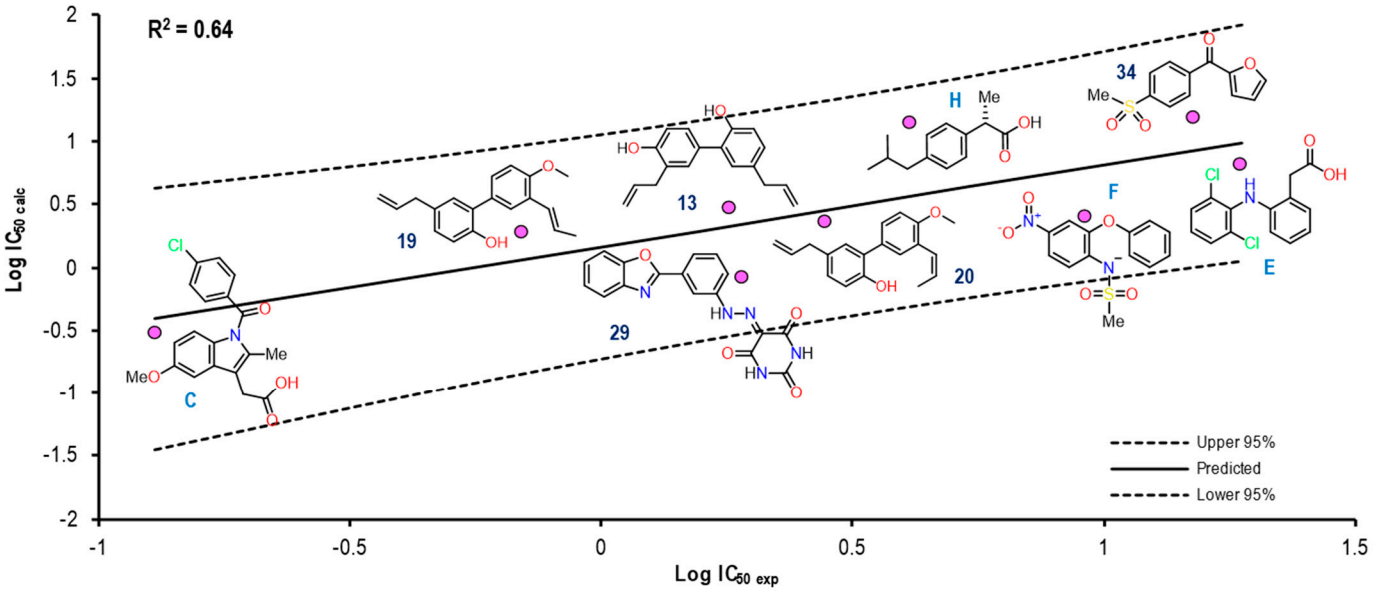


Figure 11. Graphical representation of Log $IC_{50\ calc}$ vs Log $IC_{50\ exp}$. The 2D structures of molecules that fit in the COX-1 crystal (1EQG) model. Dotted lines show the confidence interval based on the standard deviation.

For the 1EQG crystal, a reproducibility of nine molecules out of 21 was achieved, observing mostly structures with two aromatic rings and only two with a considerable difference in size, which were Indomethacin and compound **29**. However, compound **20** was observed with a position closer to the prediction line in comparison with Ibuprofen, which presented a greater distance from it.

The E_{int}, experimental and calculated Log IC_{50} and Δerror (Log $IC_{50\ calc}$–Log $IC_{50\ exp}$) values are shown in Table S2.

To further analyze the relationship between the values obtained from Figure 11 and Table S2, we examined the binding of the nine ligands in the cavity of the 1EQG crystal for COX-1. In Figure 12, all the ligands shown in Figure 11 are displayed in the cavity of COX-1.

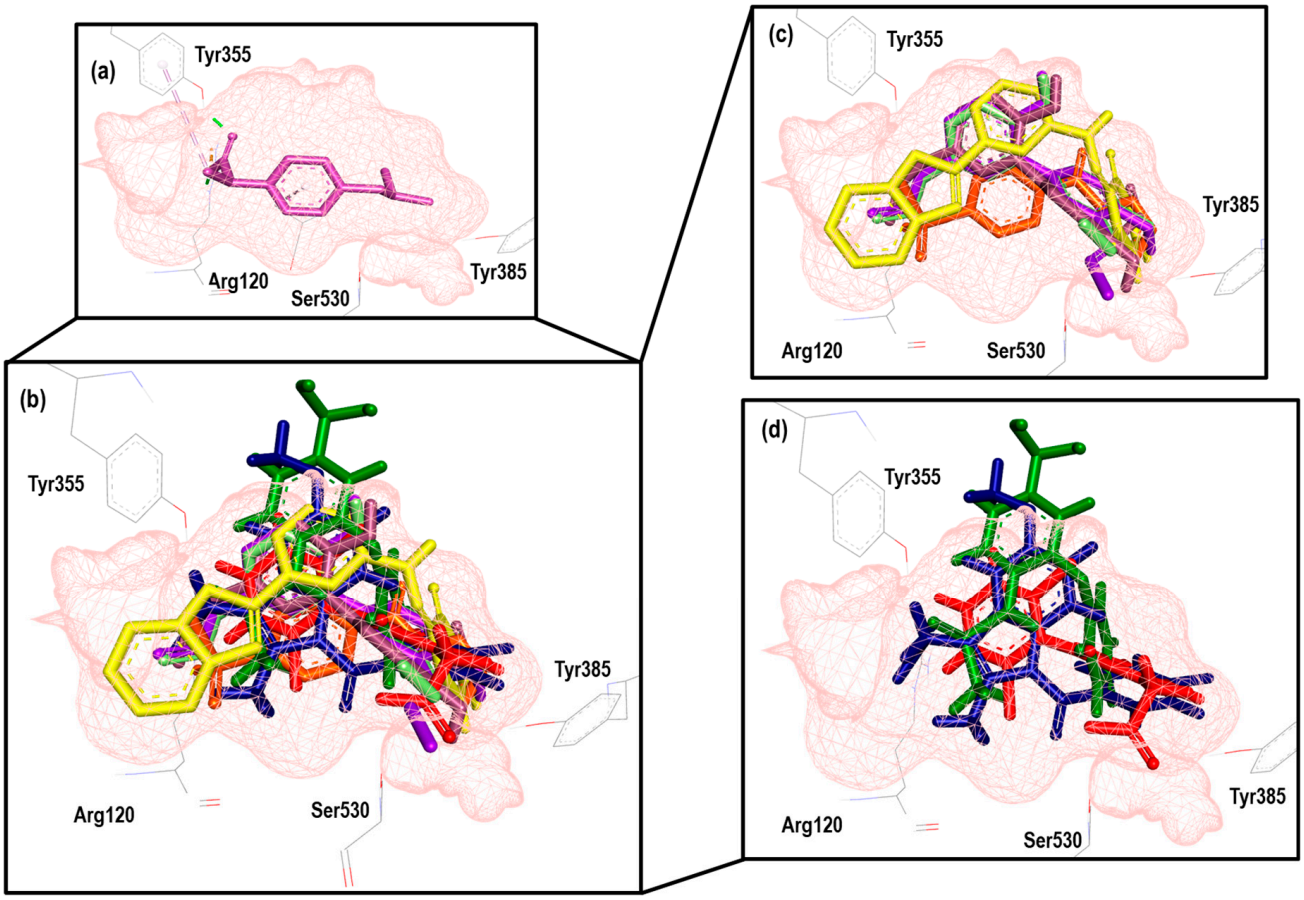


Figure 12. Poses obtained from the docking calculation over the 1EQG crystal. (**a**) Ibuprofen is colored pink. (**b**) The poses of all the ligands that fit the 1EQG model; ligands are colored in the following form: 19 (purple), 20 (aquamarine), 34 (orange), 13 (lilac), Indomethacin (dark blue), Nimesulide (green), 29 (yellow) and Diclofenac (red). (**c**) Ligands 13, 19, 20, 29 and 34 as binding modes. (**d**) The Indomethacin, Nimesulide and Diclofenac binding mode.

We detected a close relationship between the size and shape of the cavity with the ligands that were docked into it. COX-1 of the 1EQG crystal had a cavity volume of 204.80 $Å^3$ because of the small size of Ibuprofen. Thus, this limited the size and shape of the binding site and influenced the type of molecules that were docked. Therefore, those that presented greater structural differences in relation to Ibuprofen, such as coxibs or oxicams, were rejected and unable to bind in such a cavity. For the case of Indomethacin and Nimesulide, the nitro and the ρ-MeO groups, respectively, were outside of the cavity.

Figure 13 shows the graph with the values of Log $IC_{50\ exp}$ (X-axis) and Log $IC_{50\ calc}$ (Y-axis), as well as $R^2 = 0.82$. The molecules shown in the graph are those in which it was possible to correlate the E_{int} with their experimental IC_{50} by means of the IC_{50} obtained from the mathematical model correlating E_{int} obtained from the docking in the 4PH9 crystal (see Figure S13).

For the 4PH9 crystal, a reproducibility of ten molecules out of **21** was achieved, which was observed mostly on a structure greater than the reference ligand: Celecoxib, Rofecoxib, Meloxicam, as well as compound **30**. Compounds **16** and **20** showed a similitude to Ibuprofen itself for the predictive line. However, Flurbiprofen did not present the same tendency as Ibuprofen. For the rest of the molecules, we did not observe a considerable distance.

The E_{int}, experimental and calculated Log IC_{50} and Δerror (Log $IC_{50\ calc}$–Log $IC_{50\ exp}$) values are shown in Table S3.

To further analyze the relationship between the values obtained from Figure 13 and Table S3, we examined the binding of the nine ligands in the cavity of the 1EQG crystal for COX-1.

Figure 14 shows the binding mode of the 10 ligands in the system of the Ibuprofen crystal (4PH9) of COX-2 (cavity), as well as the characteristic residues for COX-2.

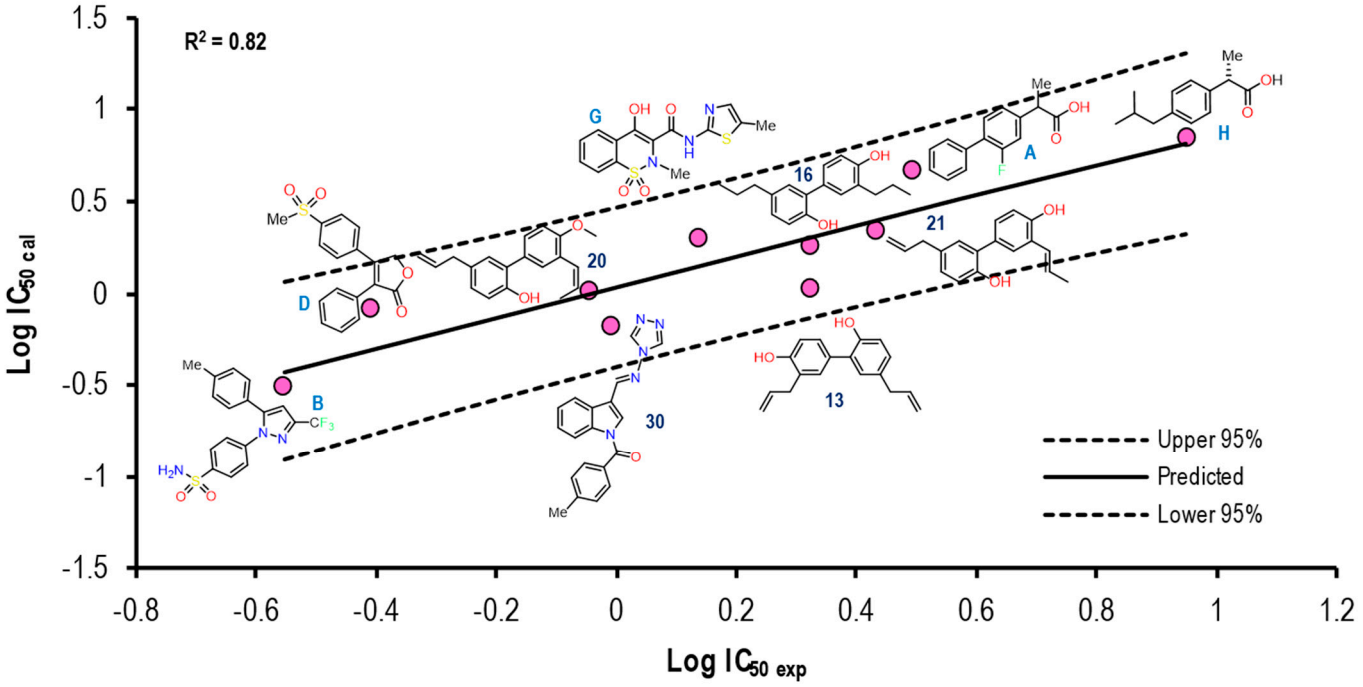


Figure 13. Graphical representation of Log $IC_{50\ calc}$ vs Log $IC_{50\ exp}$. The 2D structures of molecules that fit in the COX-2 crystal (4PH9) model. Dotted lines show the confidence interval based on the standard deviation.

We detected a close relationship between the size and shape of the cavity with the ligands that were docked into it. COX-1 of the 4PH9 crystal had a cavity volume of 228.86 $Å^3$. However, even with the small size of Ibuprofen, the volume of the cavity in this crystal was larger because it belonged to COX-2, and there was a difference between the amino acids that made up the binding site. Therefore, they had greater access to the larger molecules of the binding site, such as Celecoxib and Rofecoxib, with similarity in the binding mode. Also, Meloxicam, **30**, and Flurbiprofen were able to fit properly, and for compounds **13**, **16**, **20**, and **21**, we observed a binding mode that was different in comparison to NSAIDs.

As the last point analyzed in this system, we carried out a comparison of the energetic values obtained in the binding modes previously described with respect to the experimental IC_{50} values and for the thirteen compounds used in the second validation of our model (Figure 15).

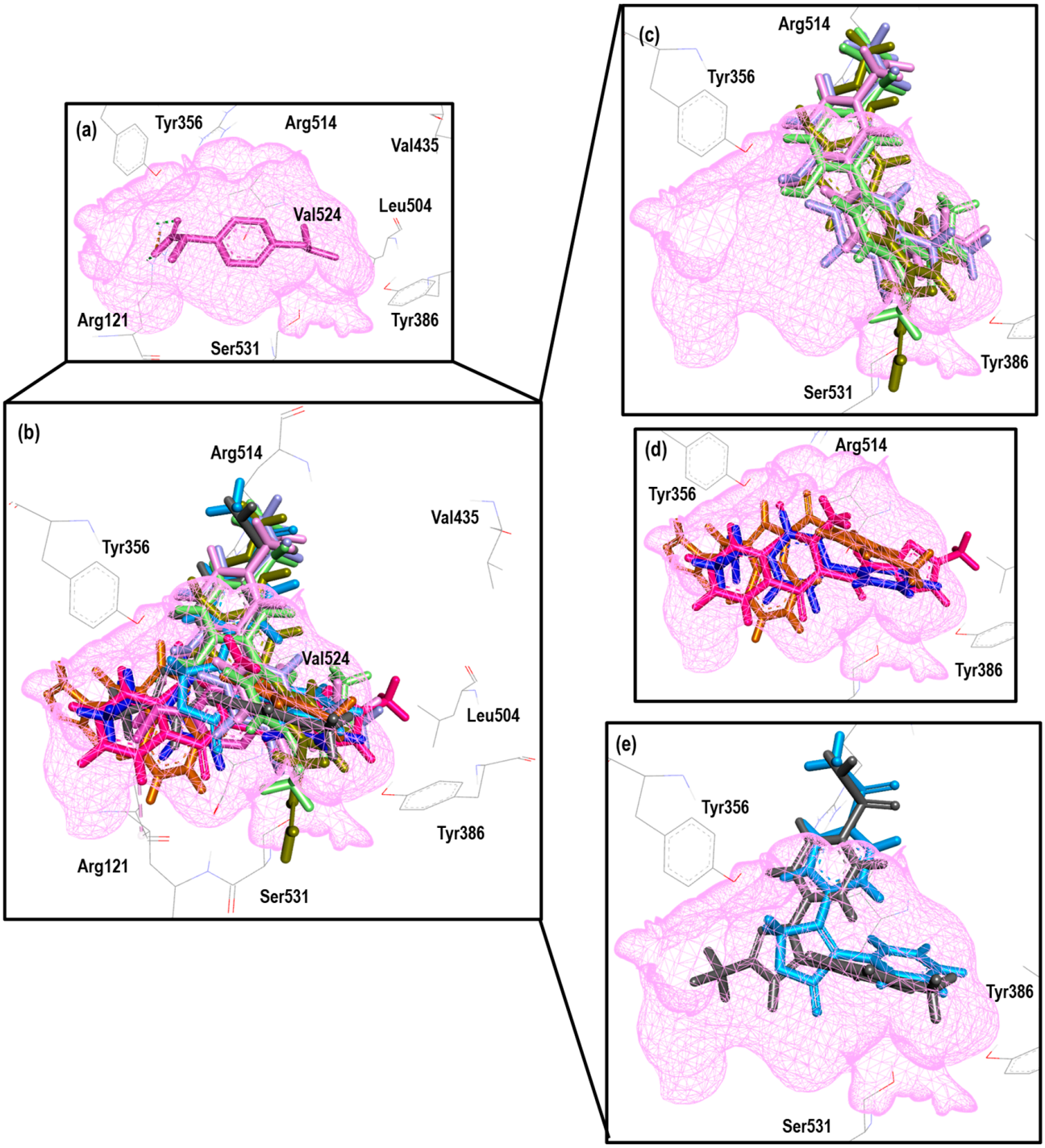


Figure 14. Poses obtained from the docking calculation over 4PH9 crystal (**a**) Ibuprofen is the color pink. (**b**) Poses of all ligands that fit the 4PH9 model; ligands are colored in the following form: 13 (lilac stick), 16 (blue gray), 20 (aquamarine), Flurbiprofen (blue dark), 21 (olive green), Rofecoxib (blue light), Celecoxib (grey), Meloxicam (magenta) and 30 (brown light). (**c**) Ligands 13, 16, 20 and 21 binding modes. (**d**) Meloxicam, Flurbiprofen and 30 binding modes. (**e**) Celecoxib and Rofecoxib binding modes.

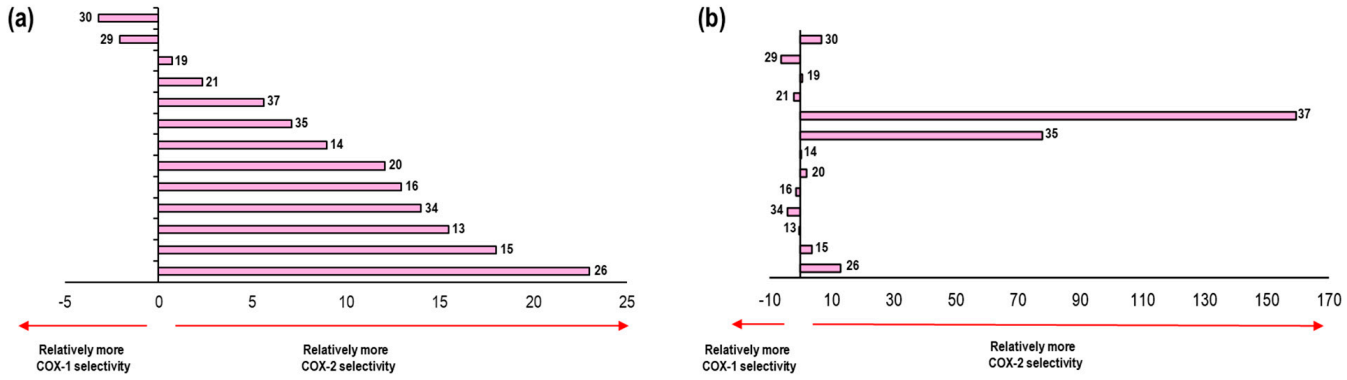


Figure 15. Representation of the selectivity towards one COX isoform. (**a**) Graph representation of selectivity ratio of both isoforms with respect to the calculated values obtained in 1EQG and 4PH9 crystals. $E_{COX\text{-}1}$–$E_{COX\text{-}2}$ (Kcal/mol) is represented in the X axes (**b**) Graph representation of selectivity ratio of both isoforms with respect to the biology activity values (in vitro) in the 13 compounds. $IC_{50\ COX\text{-}1}$–$IC_{50\ COX\text{-}2}$ values (μM) are represented in the X axes.

Comparing the selectivity aspect predicted by our model with the already known experimental values of the thirteen compounds, we found a qualitative correlation in the following eight compounds: **29**, **19**, **37**, **35**, **14**, **20**, **15**, and **26**. Seven of these showed selectivity towards the COX-2 isoform, while only compound **29** maintained selectivity towards COX-1.

- The Indomethacin (2OYU and 4COX)

Continuing with the second pair of crystals, Figure 16 shows the graph with the values of Log $IC_{50\ exp}$ (X-axis) and Log $IC_{50\ calc}$ (Y-axis), as well as the R^2 = 0.73. The molecules shown in the graph are those in which it was possible to correlate the E_{int} with their experimental IC_{50} by means of the IC_{50} obtained from the mathematical model that correlates E_{int} obtained from the docking in the 2OYU crystal (see Figure S14).

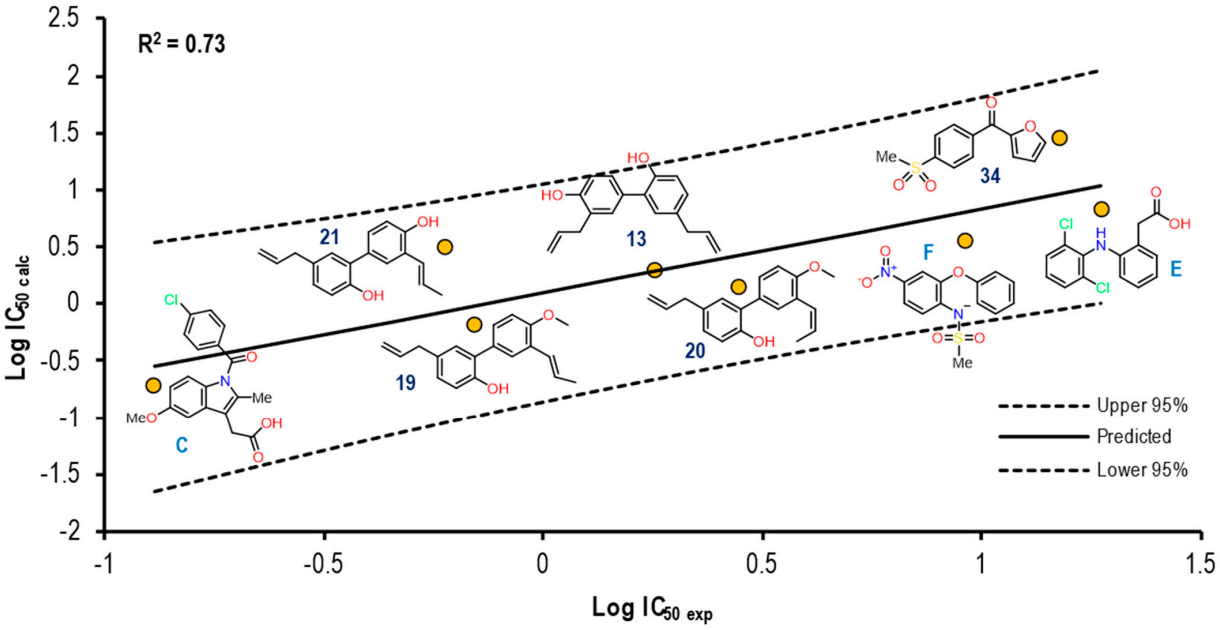


Figure 16. Graphical representation of Log $IC_{50\ calc}$ vs Log $IC_{50\ exp}$. The 2D structures of molecules that fit in the COX-1 crystal (2OYU) model. Dotted lines show the confidence interval based on the standard deviation.

For the 2OYU crystal, a reproducibility of eight molecules out of **21** was achieved, observing that all structures present two aromatic rings, HBD and HBA. The Indomethacin and **13** showed a position close to the prediction line in comparison with **21** and **34**. Although the co-crystallized Indomethacin alpha is a large structure, the binding mode was not favored for molecules of a similar size, such as the coxibs.

The E_{int}, experimental and calculated Log IC_{50} and Δerror (Log $IC_{50\ calc}$–Log $IC_{50\ exp}$) values are shown in Table S4.

To further analyze the relationship between the values obtained from Figure 13 and Table S4, we examined the binding of the eight ligands in the cavity of the 2OYU crystal for COX-1. In Figure 17, all the ligands shown in Figure 16 are displayed in the cavity of COX-1.

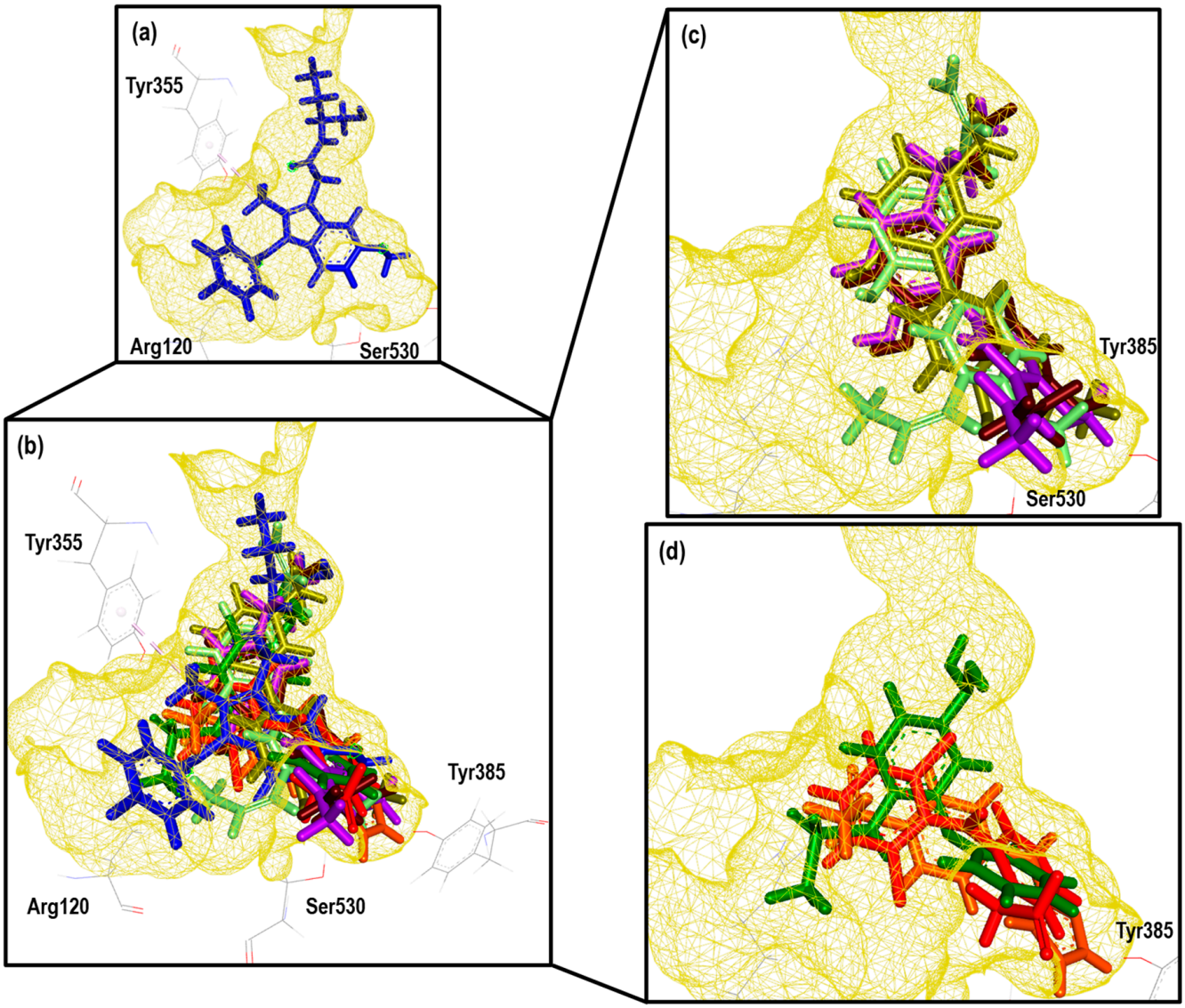


Figure 17. Poses obtained from the docking calculation of the 2OYU crystal. (**a**) Indomethacin is the color blue. (**b**) Posee of all the ligands that fit the 2OYU model; ligands are colored in the following form: 21 (olive green), 19 (purple), 13 (lilac stick), 20 (aquamarine), 34 (orange), Diclofenac (red), Nimesulide (green). (**c**) Ligands 13, 19, 20 and 21 binding modes (**d**) Ligands 34, Diclofenac and Nimesulide binding modes.

We did not detect a close relationship between the size and shape of the cavity with the ligands that were docked into it. Reflecting this, the size of the cavity was clearly affected

by the size of the ligand. COX-1 of the 2OYU crystal has a cavity volume of 288.76 Å^3. Most of the molecules are smaller than Indomethacin alfa. However, the size and shape of the binding site were not limited with respect to the type of molecule being docked. We did not find molecules belonging to the coxibs family or their derivatives.

Figure 18 shows the graph with the values of Log $IC_{50\ exp}$ (X axis) and Log $IC_{50\ calc}$ (Y axis), as well as $R^2 = 0.77$. The molecules shown in the graph are those in which it was possible to correlate the E_{int} with their experimental IC_{50} by means of the IC_{50} obtained from the mathematical model that correlates E_{int} obtained from the docking in the 4COX crystal (see Figure S15).

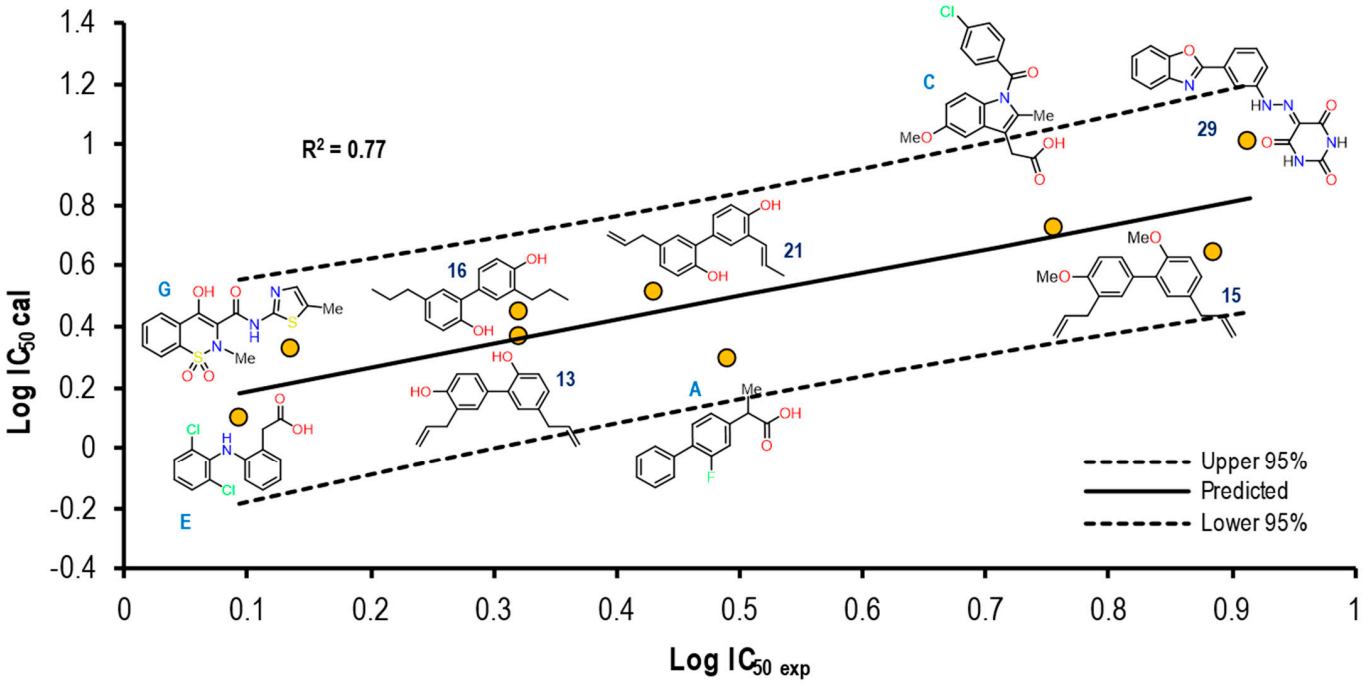


Figure 18. Graphical representation of Log $IC_{50\ calc}$ vs Log $IC_{50\ exp}$. The 2D structures of molecules that fit in the COX-2 crystal (4COX) model. Dotted lines show the confidence interval based on the standard deviation.

In the case of the 4COX crystal, a reproducibility of nine molecules out of 21 was achieved, observing greater structural diversity in this crystal. The structures present two and three aromatic rings, HBD and HBA. The Indomethacin and **13** showed a position close to the prediction line in comparison with Flurbiprofen and **29**. Finally, structures with smaller sizes showed a higher $IC_{50\ calc}$ accuracy with respect to the $IC_{50\ exp}$.

The E_{int}, experimental and calculated Log IC_{50} and Δerror (Log $IC_{50\ calc}$–Log $IC_{50\ exp}$) values are shown in Table S5.

To further analyze the relationship between the values obtained from Figure 18 and Table S5, we examined the binding of the eight ligands in the cavity of the 4COX crystal for COX-2. In Figure 19, all the ligands shown in Figure 18 are displayed in the cavity of COX-2.

Figure 19 shows the binding mode of the nine ligands in the system of the Indomethacin crystal (4COX) of COX-2 (cavity), as well as the characteristic residues for COX-2.

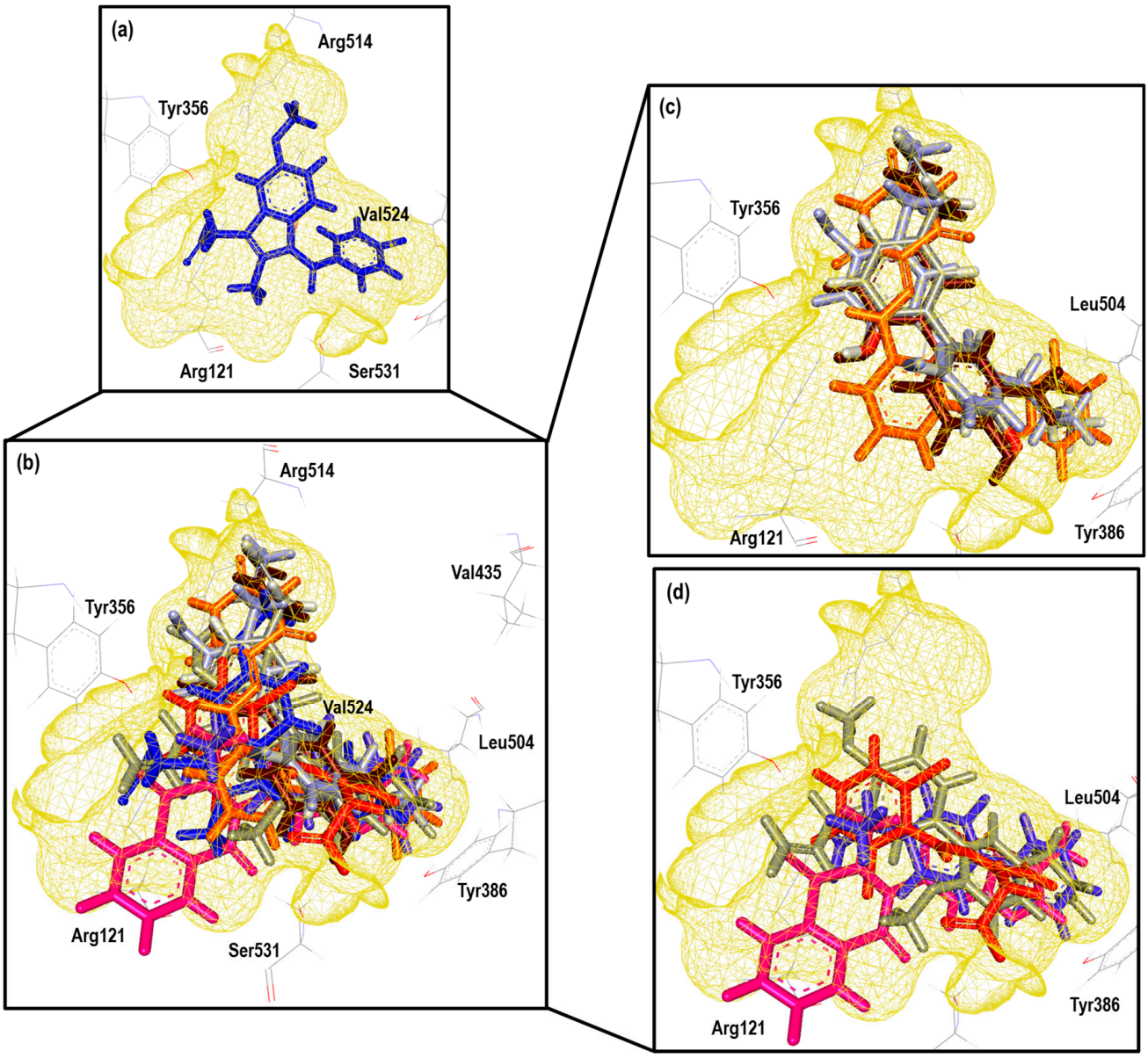


Figure 19. Poses obtained from the docking calculation over 4COX crystal. (**a**) Indomethacin is the color blue. (**b**) Poses of all the ligands that fit the 4COX model; ligands are colored in the following form: 16 (blue gray), 21 (olive green), 15 (stick), 13 (lilac), Flurbiprofen (blue dark), Diclofenac (red), Meloxicam (Magenta) and 29 (yellow). (**c**) Ligands 13, 16, 21, and 29 binding modes. (**d**) Ligands 15, Diclofenac, Flurbiprofen and Meloxicam binding modes.

We detected a close relationship between the size and shape of the cavity with the ligands that were docked into it. COX-2 of the 4COX crystal has a cavity volume of 260.09 $Å^3$. Observing the binding modes of **13**, **16**, **21**, and **29**, we noted an accommodation between the hydrophilic pockets BII and BIII. In the case of **15**, Diclofenac, Flurbiprofen, and Meloxicam maintained a horizontal position between pockets BI and BIII. In this crystal, we found that the size and shape of the binding site were not limited with respect to the type of molecule being docked. We find molecules belonging to the coxibs family and their derivatives, as well as other NSAIDs.

Figure 20 shows the comparison of the selectivity obtained by our model in 2OYU and 4COX crystals with the experimental data for the 21 compounds.

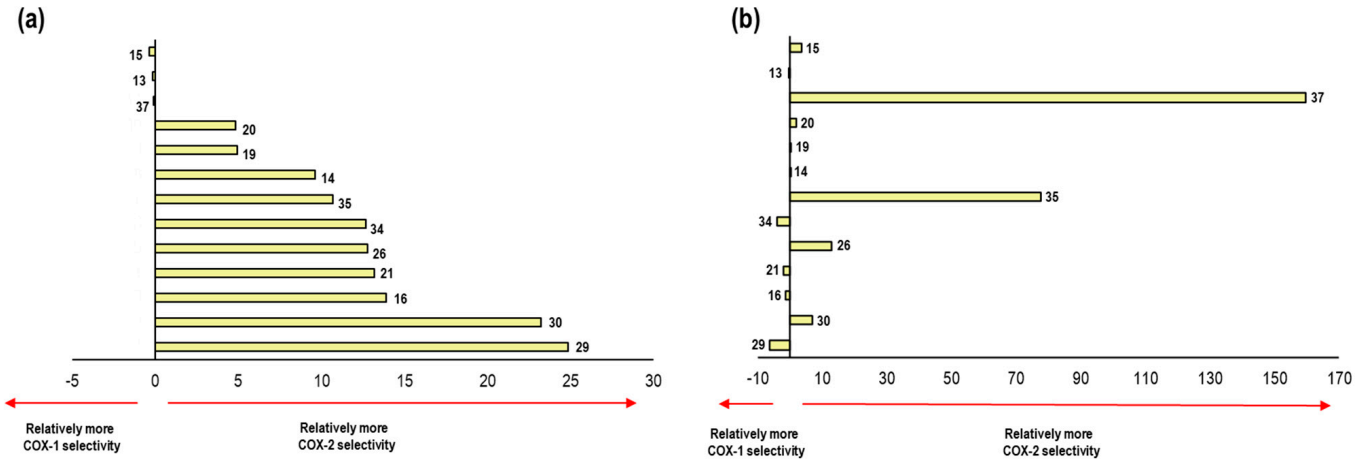


Figure 20. Representation of the selectivity towards one COX isoform. (**a**) Graph representation of selectivity ratio on both isoforms with respect to the calculated values obtained in 2OYU and 4COX crystals. $E_{COX\text{-}1}$–$E_{COX\text{-}2}$ (Kcal/mol) is represented by the X axes (**b**) Graph representation of selectivity ratio on both isoforms with respect to the biology activity values (in vitro) for the 13 compounds. $IC_{50\ COX\text{-}1}$–$IC_{50\ COX\text{-}2}$ values (μM) is represented in the X axes.

We compared the selectivity obtained by our model with experimental data for this system. For the ligands, **15**, **13**, **20**, **19**, **14**, **35**, **26**, and **30** showed a positive correlation in selectivity with a qualitative prediction of 8 molecules out of 13.

- The Celecoxib case (3KK6 and 3LN1)

Figure 21 shows the graph with the values of Log $IC_{50\ exp}$ (X axis) and Log $IC_{50\ calc}$ (Y axis) as well as R^2 = 0.76. The molecules shown in the graph are those in which it was possible to correlate E_{int} with their experimental IC_{50} by means of the IC_{50} obtained from the mathematical model that correlates E_{int} obtained from the docking in the 3KK6 crystal (see Figure S16).

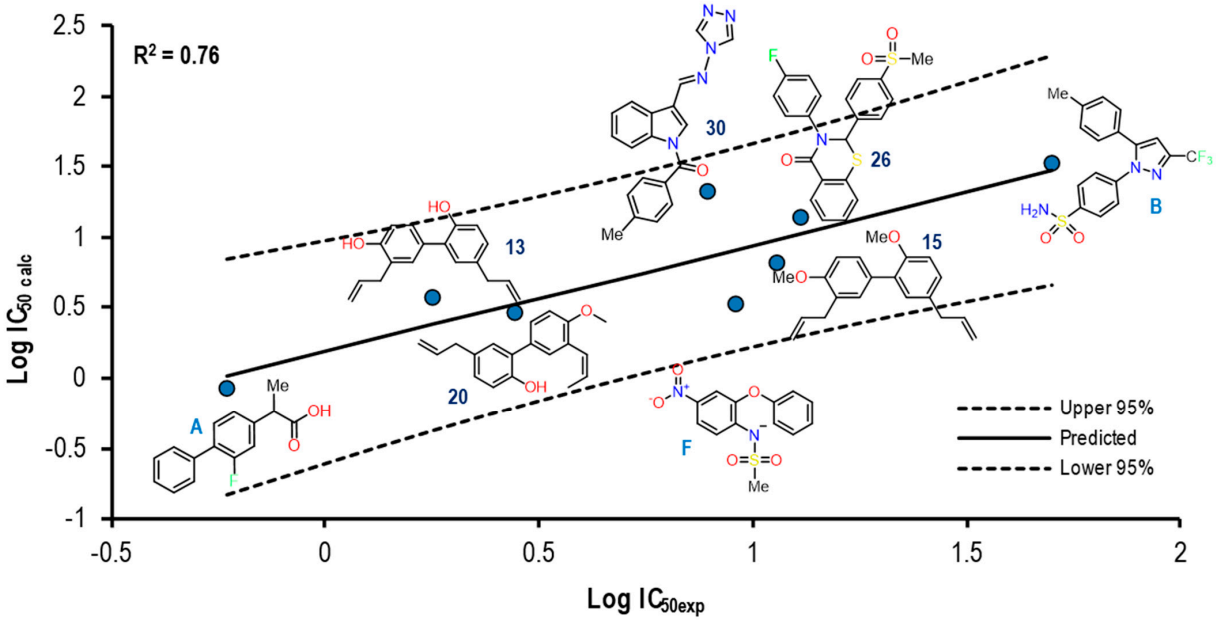


Figure 21. Graphical representation of Log $IC_{50\ calc}$ vs Log $IC_{50\ exp}$. The 2D structures of molecules that fit in the COX-1 crystal (3KK6) model. Dotted lines show the confidence interval based on the standard deviation.

With a total of eight molecules within the experiment, where the compounds Flurbiprofen, **20**, **26** and the ligand itself corresponding to this crystal (Celecoxib) present a closeness to the line (mean), indicating a good correlation between these two values, the opposite case was observed in Nimesulide and compound **30**, and the rest of the molecules of this experiment showed a similar behavior. Finally, when comparing the structures, we found that at least 50% presented a similar size to Celecoxib, which was an important factor in delimiting the size and shape of the cavity present in this crystal, allowing larger molecules to carry out the interaction with the binding site. In addition, this group of structures presents a lower IC_{50} value towards the COX-2 isoform, indicating a higher selectivity to it.

The E_{int}, experimental and calculated Log IC_{50} and Δerror (Log $IC_{50\ calc}$–Log $IC_{50\ exp}$) values are shown in Table S6.

To further analyze the relationship between the values obtained from Figure 21 and Table S6, we examined the binding of the nine ligands in the cavity of the 3KK6 crystal for COX-1.

Figure 22 shows the binding mode of the eight ligands in the system of Celecoxib (3KK6) of COX-1 (cavity), as well as the characteristic residues for COX-1.

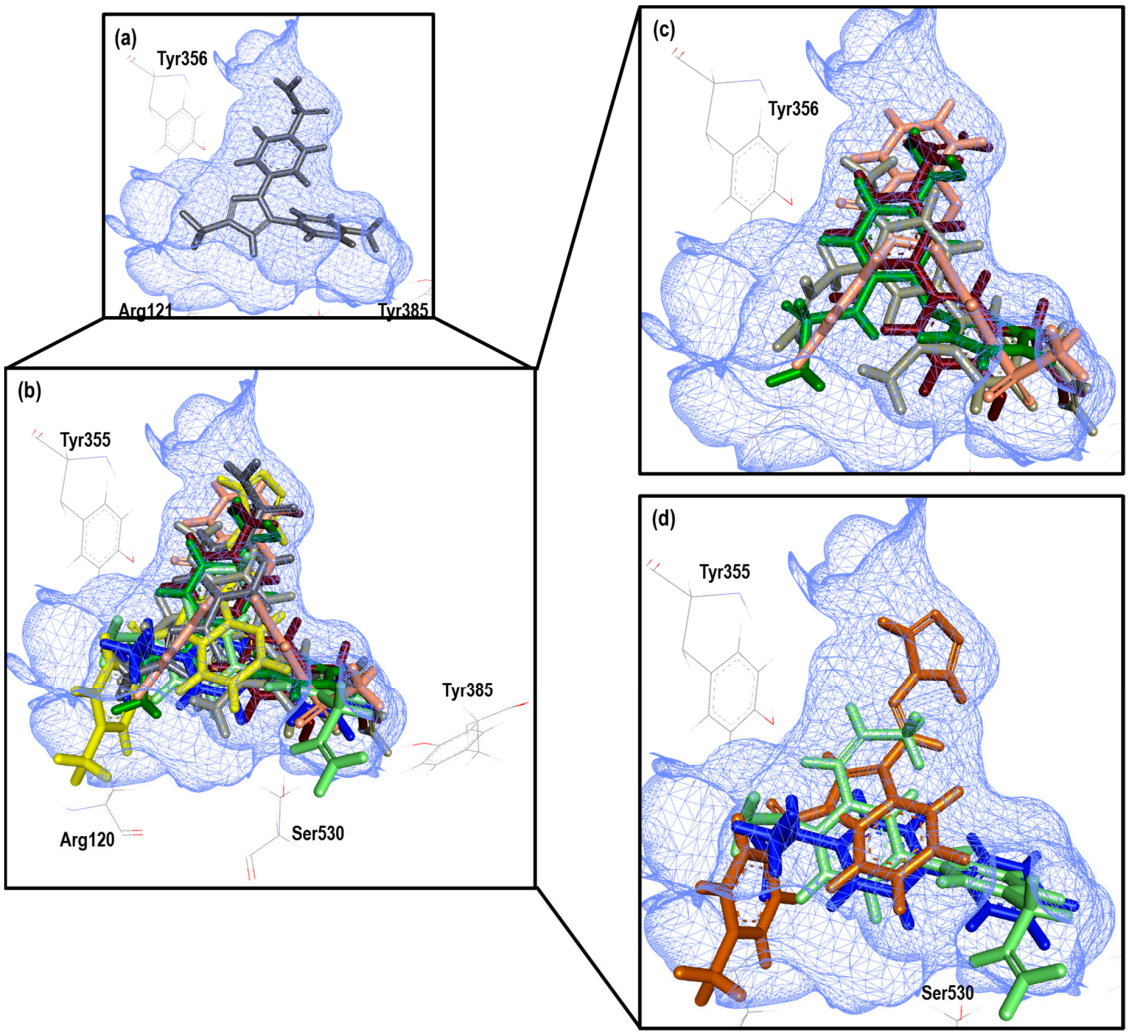


Figure 22. Poses obtained from the docking calculation over 3KK6 crystal. (**a**) Celecoxib is the color gray. (**b**) Poses of all the ligands that fit the 3KK6 model; ligands are colored in the following form: 13 (lilac), 20 (aquamarine), 15 (wine), Nimesulide (green), 26 (salmon pink), 30 (brown light), Flurbiprofen (blue dark). (**c**) Ligands 13, 15, 26 and Nimesulide binding modes. (**d**) Ligands 20, 30 and Flurbiprofen binding modes.

At least 6 of the 8 molecules, with the obviating structure of Celecoxib as our reference ligand, presented a binding mode that was quite similar with respect to the spatial arrangement; the arrangement had a tendency towards the upper cavity of the binding site, where the sulfonamide group of the NSAIDs of the COXIBs family was hosted. The exception was Flurbiprofen, which maintained its binding mode by orienting with the carboxylic acid group in the direction of Arg120 and the benzene ring towards Tyr385.

Figure 23 shows the graph with the values of Log $IC_{50\ exp}$ (X-axis) and Log $IC_{50\ calc}$ (Y-axis), as well as $R^2 = 0.67$. The molecules shown in the graph are those in which it was possible to correlate the E_{int} with their experimental IC_{50} by means of the IC_{50} obtained from the mathematical model that correlates E_{int} obtained from the docking in the 3LN1 crystal (see Figure S17).

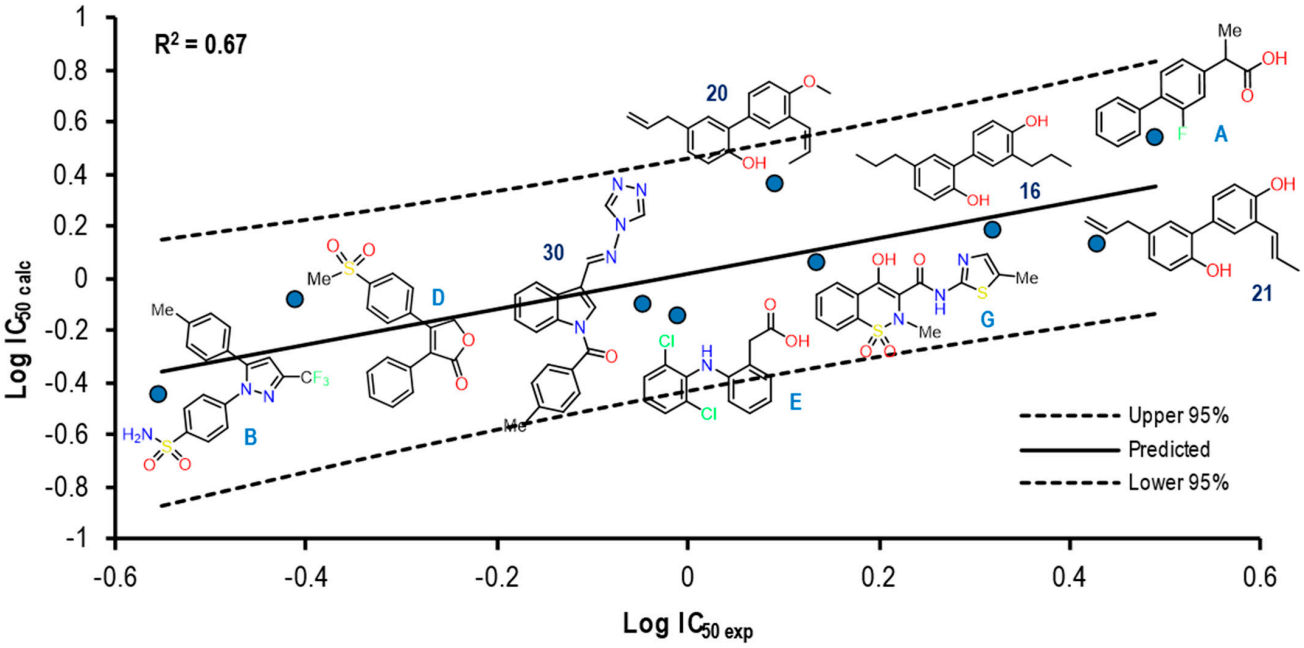


Figure 23. Graphical representation of Log $IC_{50\ calc}$ vs Log $IC_{50\ exp}$. The 2D structures of molecules that fit in the COX-2 crystal (3LN1) model. Dotted lines show the confidence interval based on the standard deviation.

This graph shows how five of the nine total molecules in the experiment present a proximity to the line (mean), indicating a good correlation between these two values and how the rest of the molecules (4) denote a greater distance; however, the nine molecules are within the statistical limits without presenting any outlier. In this group of molecules, we found NSAIDs with greater selectivity towards the COX-2 isoform, such as Rofecoxib (coxibs), Meloxicam (oxicams), and Diclofenac, as well as structures **30** and **20** with lower IC_{50} values for COX-2.

The E_{int}, experimental and calculated Log IC_{50} and Δerror (Log $IC_{50\ calc}$–Log $IC_{50\ exp}$) values are shown in Table S7.

To further analyze the relationship between the values obtained from Figure 23 and Table S7, we examined the binding of the nine ligands in the cavity of the 3LN1 crystal for COX-2.

Figure 24 shows the binding mode of the eight ligands in the system of Celecoxib (3LN1) of COX-2 (cavity), as well as the characteristic residues for COX-2.

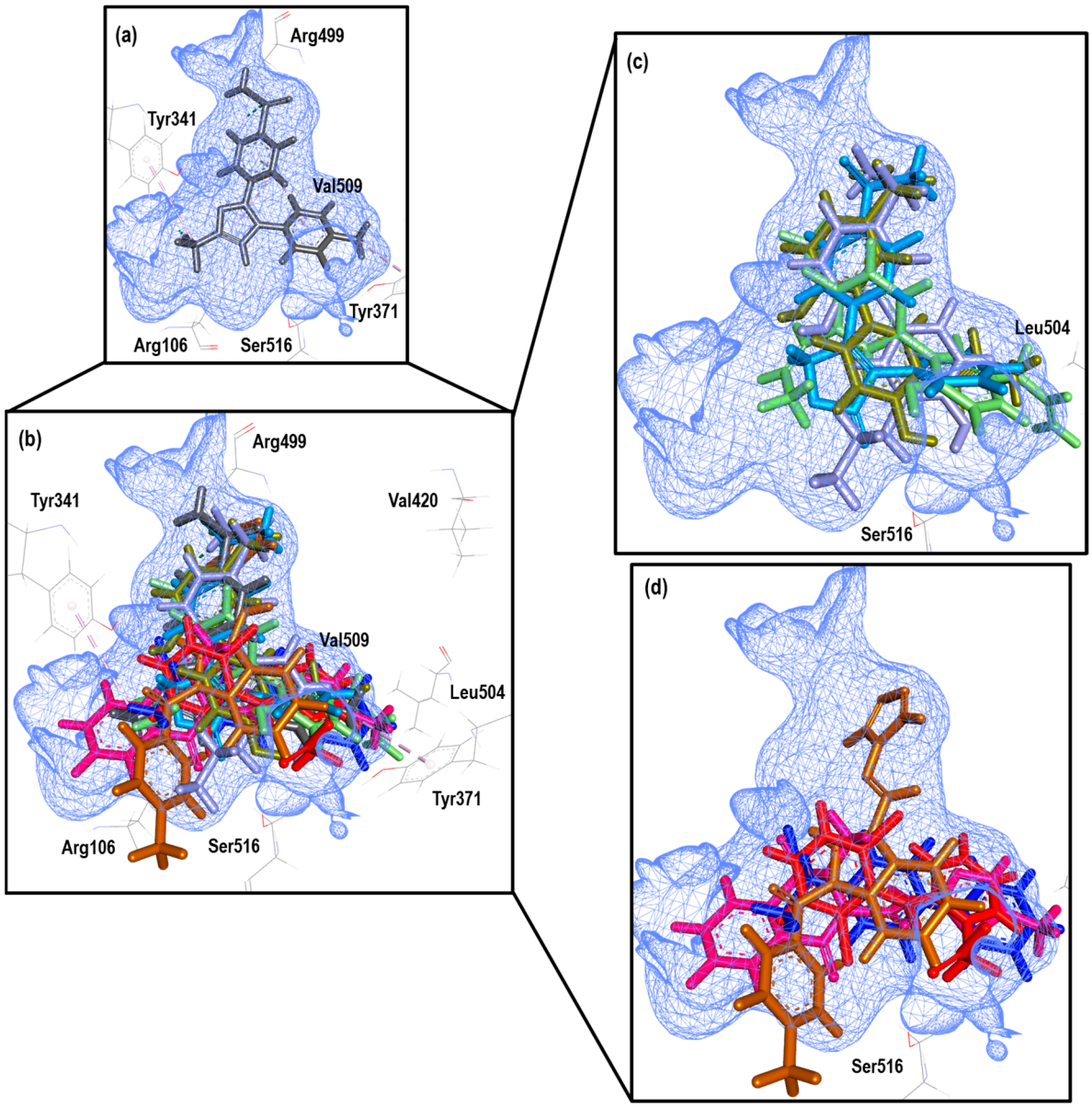


Figure 24. Poses obtained from the docking calculation over 3LN1 crystal. (**a**) Celecoxib is the color gray. (**b**) Poses of all the ligands that fit the 3LN1 model; ligands are colored in the following form: 21 (olive green), 16 (blue gray), 20 (aquamarine stick), Diclofenac (red), Rofecoxib (blue light), Flurbiprofen (blue dark), 30 (brown) and Meloxicam (Magenta). (**c**) Ligands 16, 20, 21 and Rofecoxib binding modes. (**d**) Ligands 30, Diclofenac, Flurbiprofen and Meloxicam binding modes.

In this experiment, we observed how structure **30** presents a mode like that observed in the COX-1 crystal, but which is different in the 4PH9 crystal despite belonging to the COX-2 isoform; however, the value of the Δ error is lower in this system. On the other hand, known NSAID structures present the binding mode according to the already known one. Finally, within the structures for which a binding mode has not been established, a tendency for accommodation in the direction of Arg499 was observed.

As a final part of the analysis in the Celecoxib system, we compared the selectivity-energy values obtained for each of the ligands in both crystals (3KK6 and 3NL1) according to our model. These data were compared with the experimental selectivity values, as shown in the following figure (Figure 25).

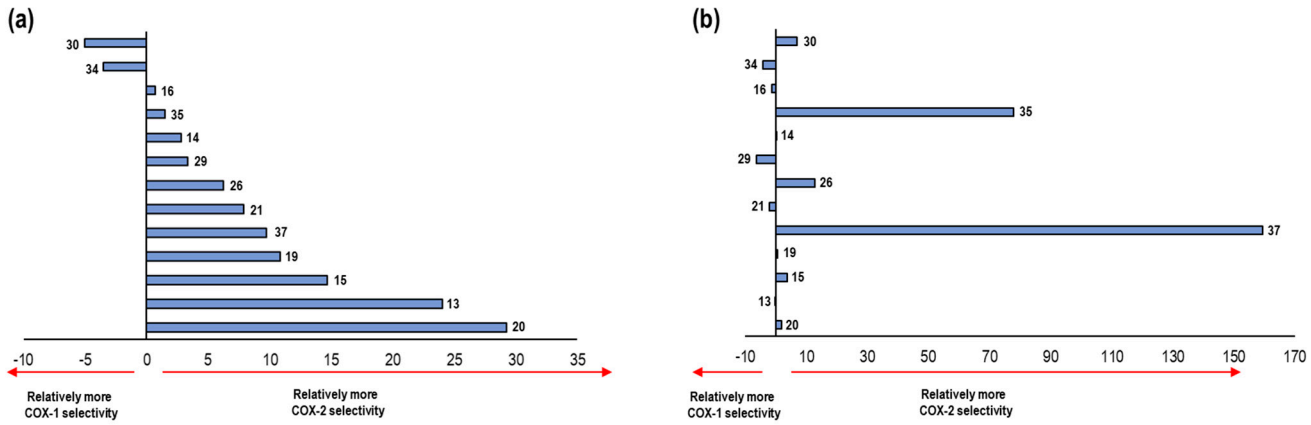


Figure 25. Representation of the selectivity towards one COX isoform. (**a**) Graph representation of the selectivity ratio on both isoforms with respect to the calculated values obtained in 3KK6 and 3LN1 crystals. $E_{COX\text{-}1} - E_{COX\text{-}2}$ (Kcal/mol) is represented by the X axes (**b**) Graph representation of the selectivity ratio on both isoforms with respect to the biology activity values (in vitro) in the 13 compounds. $IC_{50\ COX\text{-}1} - IC_{50\ COX\text{-}2}$ values (μM) are represented in the X axes.

In relation to the values obtained in our model. there was a tendency towards selectivity for COX-2 for most of the compounds; however, of the 13 compounds, 8 were able to reproduce the selectivity aspect of the Celecoxib system (3KK6 and 3LN1) in comparison with the experimental data. The compounds that obtained qualitative selectivity values were **34**, **35**, **14**, **26**, **37**, **19**, **15** and **20**.

- The Meloxicam case (4O1Z and 4M11)

Figure 26 shows the graph with the values of Log $IC_{50\ exp}$ (X axis) and Log $IC_{50\ calc}$ (Y axis), as well as $R^2 = 0.74$. The molecules shown in the graph are those in which it was possible to correlate the E_{int} with their experimental IC_{50} by means of the IC_{50} obtained from the mathematical model that correlates E_{int} obtained from the docking in the 4O1Z crystal (see Figure S18).

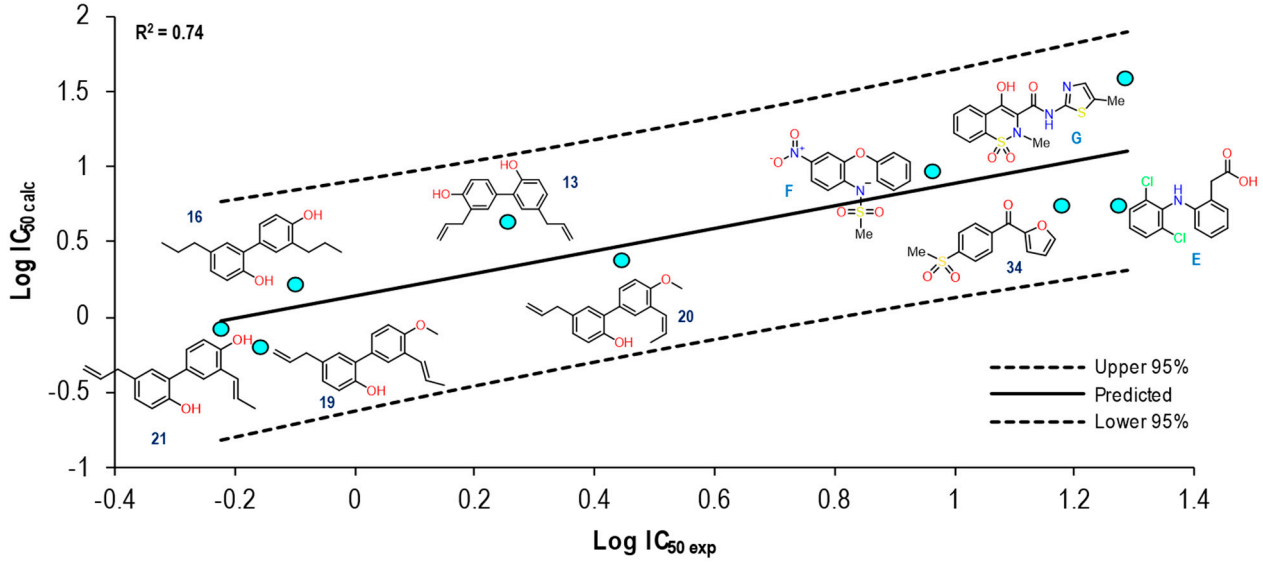


Figure 26. Graphical representation of Log $IC_{50\ calc}$ vs Log $IC_{50\ exp}$. The 2D structures of molecules that fit in the COX-1 crystal (4O1Z) model. Dotted lines show the confidence interval based on the standard deviation.

Reproducibility was achieved for nine total molecules, with compound **13** and Meloxicam being the farthest from the line (mean) within the graph; the rest of the molecules exhibited similar behavior except for compound 21, which showed the closest proximity to the line (mean). The E_{int}, experimental and calculated Log IC_{50} and Δerror (Log $IC_{50\ calc}$ − Log $IC_{50\ exp}$) values are shown in Table S8. To further analyze the relationship between the values obtained from Figure 26 and Table S8, we examined the binding of the nine ligands in the cavity of the 4O1Z crystal for COX-1. Figure 27 shows the binding mode of the eight ligands in the system of Meloxicam (4O1Z) of COX-1 (cavity), as well as the characteristic residues for COX-1.

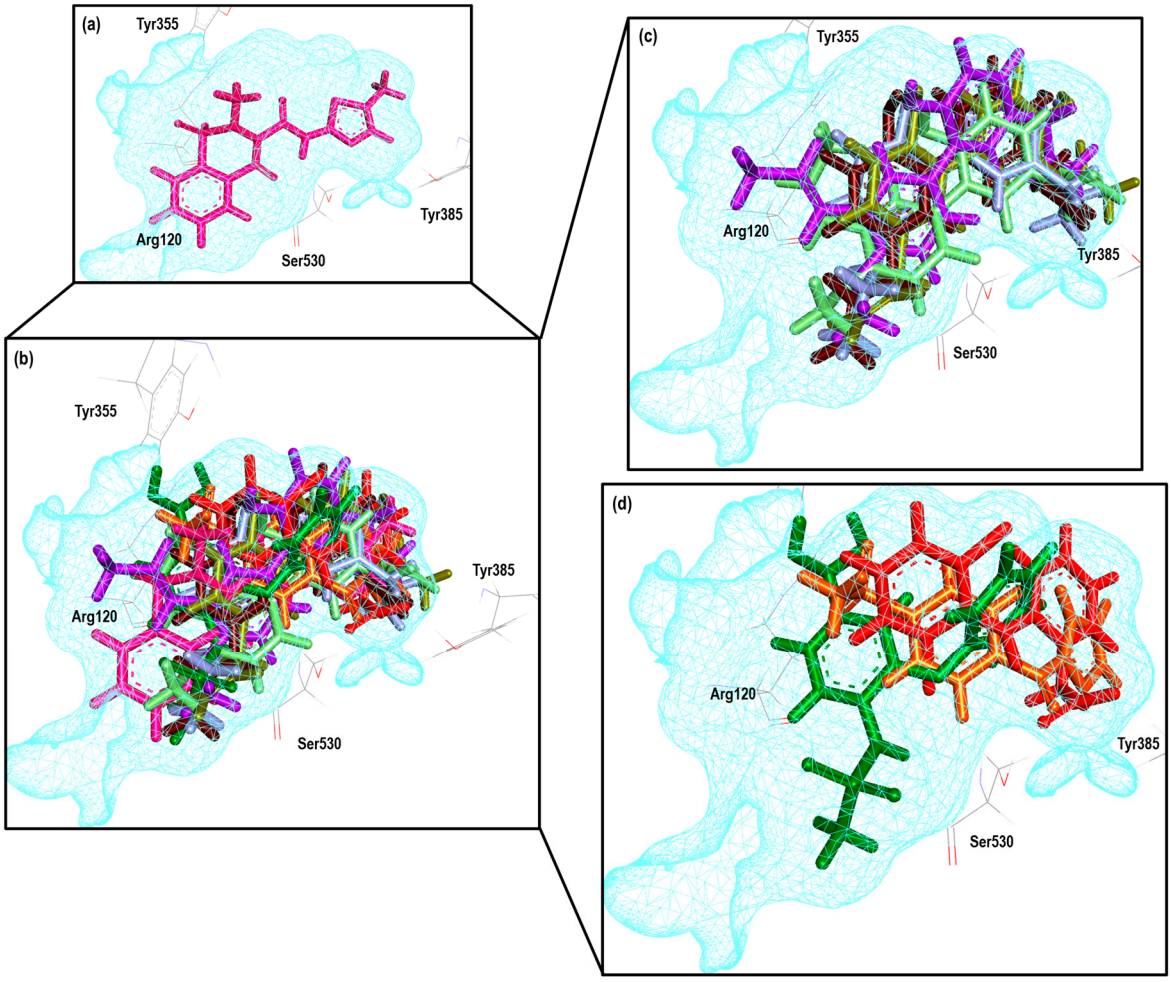


Figure 27. Poses obtained from the docking calculation over 4O1Z crystal. (**a**) Meloxicam is the color magenta. (**b**) Poses of all the ligands that fit the 4O1Z model; ligands are colored in the following form: 13 (lilac), 21 (olive green), 16 (blue gray), 19 (purple), 20 (aquamarine), Diclofenac (red), Nimesulide (green) and 34 (orange). (**c**) Ligands 13, 16, 19, 20 and 21 binding modes. (**d**) Ligands 34, Diclofenac and Nimesulide binding modes.

We can observe that compounds like 13 can change the binding mode depending on the crystal in which the experiment is carried out, incorporating the molecules in the molecules in the specific cavity of the NSAIDs of the oxicams type. Although the value of the Δ error calculated for Meloxicam is presented as one of the highest values in this experiment, we were able to demonstrate that the binding mode of this structure is being carried out properly.

Figure 28 shows the graph with the values of Log $IC_{50\ exp}$ (X axis) and Log $IC_{50\ calc}$ (Y axis), as well as R^2 = 0.80. The molecules shown in the graph are those in which it was possible to correlate the E_{int} with their experimental IC_{50} by means of the IC_{50} obtained

from the mathematical model that correlates with E_{int} obtained from the docking in the 4M11 crystal (see Figure S19).

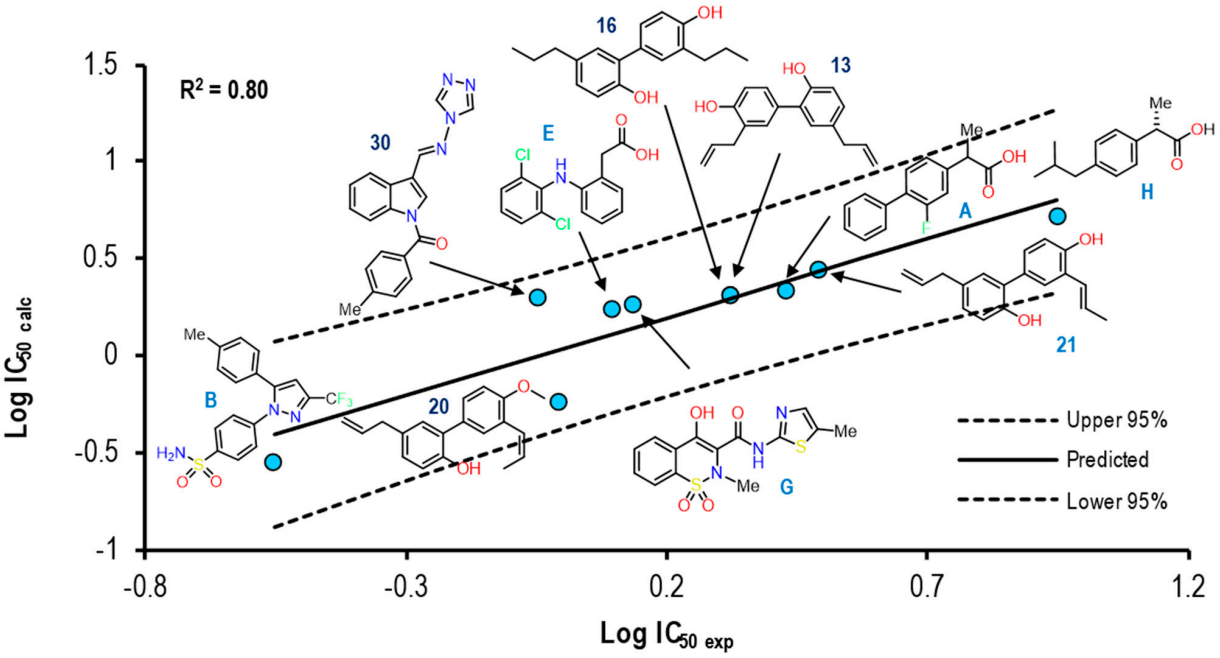


Figure 28. Graphical representation of Log $IC_{50\ calc}$ vs Log $IC_{50\ exp}$. The 2D structures of molecules that fit in the COX-2 crystal (4M11) model. Dotted lines show the confidence interval based on the standard deviation.

In comparison with all the crystals, this was one that managed to reproduce more molecules, finding structures of the non-selective type to be selective. Only compounds **30** and **20** showed a greater distance from the line (mean), while compounds **16**, **13**, and **21** obtained better IC_{50} correlation values. None of the ten structures were outside the statistical confidence intervals. The E_{int}, experimental and calculated Log IC_{50} and Δerror (Log $IC_{50\ calc}$ − Log $IC_{50\ exp}$) values are shown in Table S9. To further analyze the relationship between the values obtained from Figure 28 and Table S9, we examined the binding of the nine ligands in the cavity of the 4O1Z crystal for COX-1. Figure 29 shows the binding mode of the eight ligands in the system of Meloxicam (4M11) of COX-2 (cavity), as well as the characteristic residues for COX-2.

It should be noted that the binding mode presented by Celecoxib in this crystal is not the correct one; despite the accurate prediction of the Log $IC_{50\ calc}$ value, this does not agree with the binding mode. However, in the case of Ibuprofen and Flurbiprofen, they did present the proper binding mode where both directed the carboxylic acid group to the Arg120 residue and the hydrophobic section with an orientation towards Leu503 in a horizontal position. In the case of structure **30**, the ρ-MeBn ring was incorporated into the specific cavity of the oxicams.

At this point, we already obtained the predicted IC_{50} values as well as the binding modes for the compounds in the Meloxicam system (4O1Z and 4M11). We only needed to compare the selectivity for these compounds observed in this system with respect to the known experimental values (Figure 30).

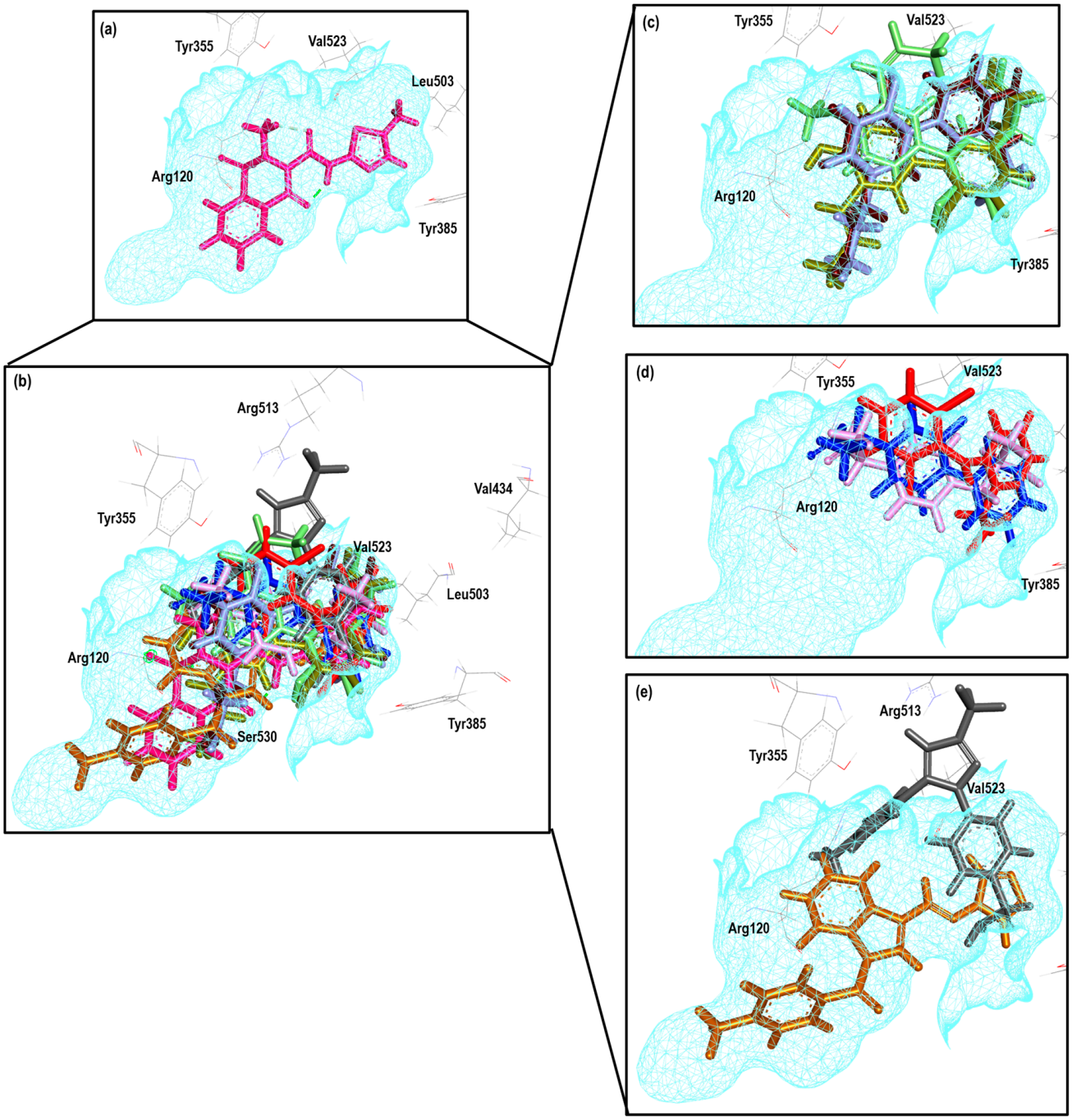


Figure 29. Poses obtained from the docking calculation over 4O1Z crystal. (**a**) Meloxicam is the color magenta. (**b**) Poses of all the ligands that fit the 4O1Z model; ligands are colored in the following form: 13 (lilac), 16 (blue gray), 21 (olive green), 20 (aquamarine), 30 (brown), Celecoxib (grey), Diclofenac (red), Flurbiprofen (blue dark), Ibuprofen (pink). (**c**) Ligands 13, 20, 21, 16 and binding modes. (**d**) Ligands Ibuprofen, Flurbiprofen and Diclofenac binding modes. (**e**) Ligands Celecoxib and 30 binding modes.

A tendency towards selectivity for COX-1 was observed for most of the compounds; however, of the three compounds, four were able to reproduce the selectivity aspect for the Meloxicam system (4O1Z and 4M11) in comparison with the experimental data. The compounds that obtained qualitative selectivity values were as follows: **34**, **21**, **29**, and **16**.

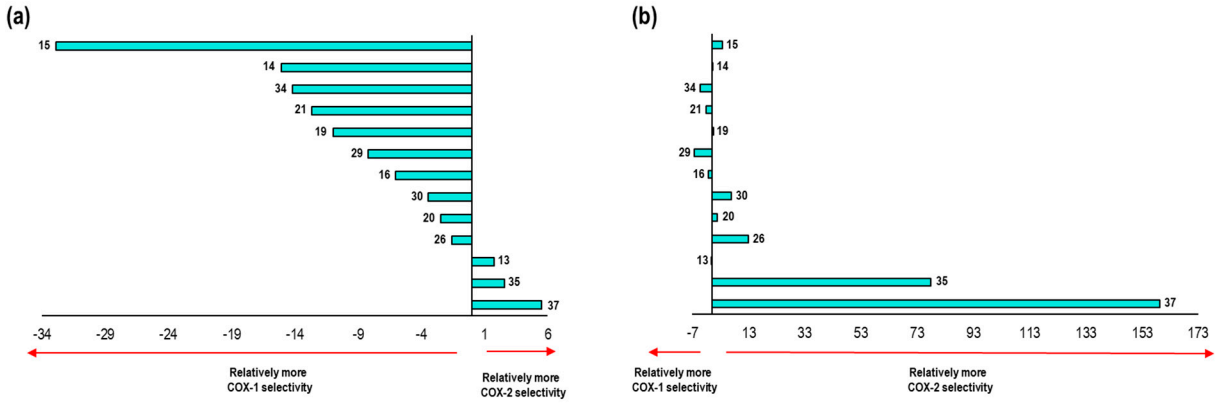


Figure 30. Representation of the selectivity towards one COX isoform. (**a**) Graph representation of the selectivity ratio of both isoforms with respect to the calculated values obtained in 4O1Z and 4M11 crystals. E_{COX-1}–E_{COX-2} (Kcal/mol) is represented in the X axes (**b**) Graph representation of the selectivity ratio of both isoforms with respect to the biology activity values (in vitro) in the 13 compounds. $IC_{50\ COX-1}$–$IC_{50\ COX-2}$ values (μM) is represented in the X axes.

2.6. Structural Analysis of Inhibitors from COX-1 and COX-2

The reproducibility of Log $IC_{50\ exp}$ compared to Log $IC_{50\ calc}$ for the molecules in each of the COX crystals was assessed. Figure 31 shows a Venn diagram with each ring representing one of the crystals used in the COX-1 analysis. The location of the structures corresponds to the crystal or crystals where the reproducibility of the calculated vs experimental IC_{50} values was carried out.

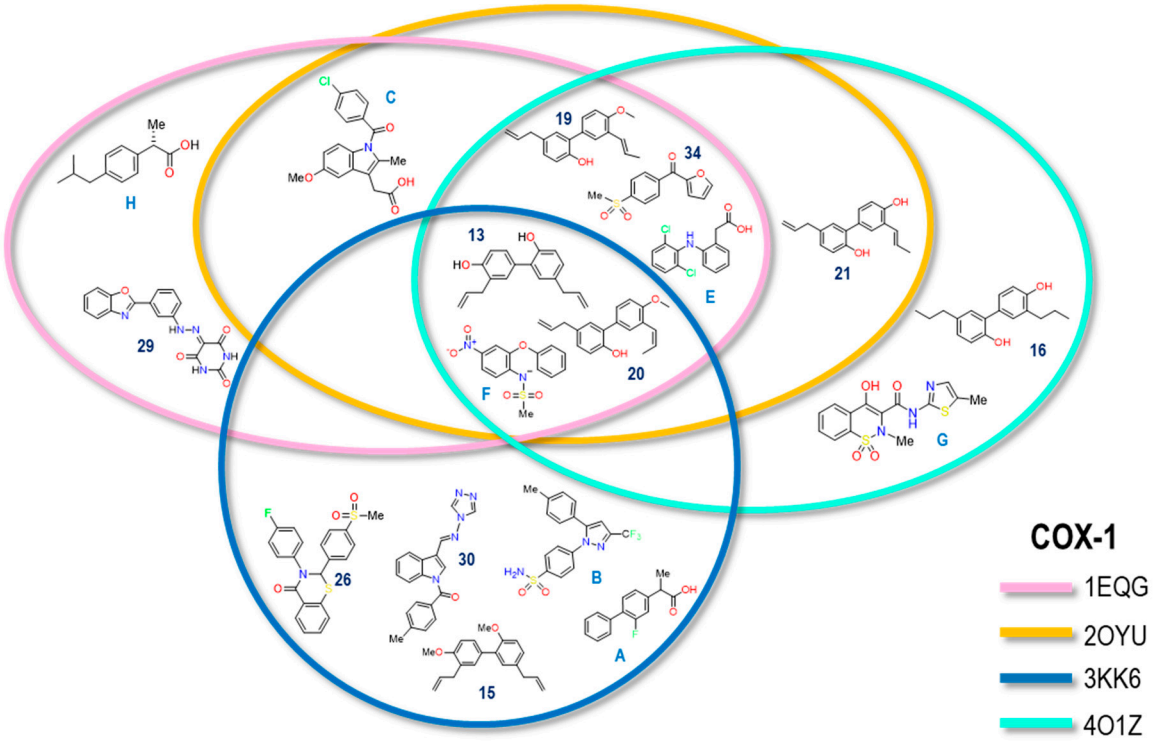


Figure 31. The Venn diagram illustrates the correlation between experimental and calculated IC_{50} values of molecules associated with the COX-1 crystal. The crystals included are as follows: 1EQG (Ibuprofen, pink), 2OYU (Indomethacin, yellow), 3KK6 (Celecoxib, blue), and 4O1Z (Meloxicam, cyan).

The data extracted from the Venn diagram reveal that three molecules (13, 20, and Nimesulide) exhibited reproducibility in terms of energy compared to the experimental IC_{50} values across all four crystals. These molecules shared structural features, such as two aromatic rings, and possessed hydrogen bond acceptor (HBA) and hydrogen bond donor (HBD) properties. Similarly, three molecules (19, 34, and Diclofenac) displayed reproducibility in the 1EQG, 2OYU, and 4O1Z crystals. Like the previous group, these molecules also featured two aromatic rings, including HBA and HBD properties. Notably, Diclofenac and **19** showed a slight preference for isoform 2 in terms of selectivity. However, they did not demonstrate reproducibility in the Celecoxib crystal. For the case of Indomethacin, its reproducibility was only achieved on 1EQG and 2OYU crystals, the latter being the structure with which the ligand was co-crystallized; this crystal has a bigger cavity caused by the structural increment in the Indomethacin alpha.

On the contrary, compound **21** shared reproducibility in the 2OYU and 4O1Z crystals. Despite its structural similarity to other compounds, we did not observe its correlation with other crystals. In the case of Meloxicam's structure, reproducibility occurred in the same crystal as in the case of Ibuprofen and Celecoxib. An unexpected outcome was the reproducibility of structure **29** on the ibuprofen crystal since this is a molecule with a larger size and functional groups different from those of ibuprofen. Finally, among the five molecules that only reproduced in the 3KK6 crystal, three shared a similar size with Celecoxib. This suggests that, in crystals where the cavity size is predetermined by the co-crystallized ligand's size, the likelihood of reproducing molecules of the same size or larger is higher.

The same analysis was carried out for the COX-2 crystals. Figure 32 shows the Venn diagram where each of the rings represents one of the crystals used in the COX-2 analysis. The structures are located based on the crystal or crystals where we compared the reproducibility of the calculated and experimental values.

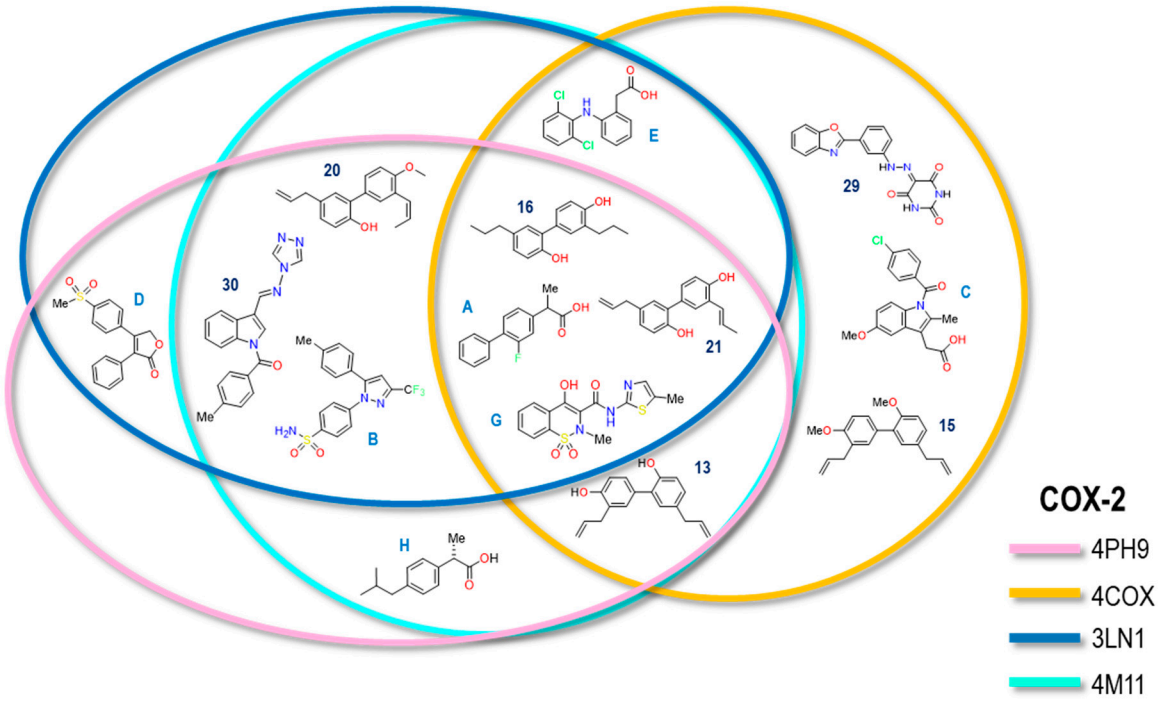


Figure 32. The Venn diagram illustrates the correlation between experimental and calculated IC_{50} values of molecules associated with the COX-2 crystal. The crystals included are as follows: 4PH9 (Ibuprofen, pink), 4COX (Indomethacin, yellow), 3NL1 (Celecoxib, blue), and 4M11 (Meloxicam, cyan).

In the case of COX-2 crystals, the diagram shows four molecules (Meloxicam, Flurbiprofen, 16 and 21) that were reproducible in terms of energy vs. experimental IC_{50} in the four crystals; likewise, in the case of diclofenac, it achieved reproducibility in three of the four crystals (4COX, 3LN1, and 4M11). In the case of Celecoxib, reproducibility was observed in crystals 4PH9, 3LN1, and 4M11, as well as for compounds **30** and **20**; it should be noted that molecule **30** is even larger than Celecoxib itself. On the other hand, Rofecoxib and Ibuprofen were only found in two of the four crystals, including 4PH9 and 3LN1 in the first case and 4PH9 and 4M11 in the second. Finally, Indomethacin can be observed in the diagram as it is only found within the same crystal with compounds **29** and **15**, which were only found in one (4COX), limiting the reproducibility to a single crystal. As in COX-1, compounds of the COXIBs type were only able to experience reproducibility in their own crystal, as in 4M11 and 4PH9.

3. Materials and Methods

3.1. Search and Selection of PDBs

COX crystals were obtained from the Protein Data Bank [21] and were selected based on optimal resolution levels. The chosen PDB entries include 1EQG (2.6 Å), 2OYU (2.7 Å), 3KK6 (2.75 Å), and 4O1Z (2.4 Å) for COX-1 from the Ovis aries organism, and 4PH9 (1.81 Å), 4COX (2.9 Å), 3NL1 (2.15 Å), and 4M11 (2.45 Å) for COX-2 from the Mus Musculus organism, employing the X-ray diffraction crystallization technique.

Additionally, we assessed structural quality elucidation (EDIA) by calculating the weighted sum over all relevant grid points in the sphere of interest surrounding the atom. The sphere's radius was twice the resolution-dependent electron density sphere radius [22]. This evaluation tool is accessible on the Protein Pluss server [23].

Sequence alignment was performed with the Clustal Omega server [24]. The sequences were obtained from the Fasta file of the corresponding PDBs, for the case of the Ovis aries sequence for COX-2 and Mus musculus for COX-1 [25].

To initiate the construction of the prediction model, the first step involved searching for crystals of COX 1 and 2 enzymes available in the Protein Data Bank database. A total of 49 crystals from the organisms Ovis aries (COX-1) and Mus Musculus (COX-2), each with distinct co-crystallized ligands, were obtained (Figure S20).

After locating these crystals, we analyzed their quality using X-ray crystallization techniques. The evaluation considered the reported resolution value for each crystal, excluding those with values greater than 3 Å. Subsequently, crystals meeting this criterion were categorized based on the characteristics of the co-crystallized ligand, including structure, size, binding mode, and selectivity (Figure S21).

Based on the cocrystallized ligand family, four distinct groups were derived as follows: endogenous inhibitors, propionic acid derivatives, heterocyclic biaryl NSAIDs (COXIBs), and enolic acid derivatives (oxicams); nevertheless, the number of crystals remained significantly high.

Therefore, we conducted a thorough assessment of the crystallographic technique's quality. The evaluation involved elucidating the crystals, and their resolution was analyzed using the EDIA tool accessible on the Protein Pluss server. This analysis enabled a comparison of the resolution quality in both crystals concerning the electron density for each atom, depicted by the blue color on the scale. Those atoms with minimal inconsistencies in electron density distribution are highlighted in Figure S22 [26]. Subsequently, having obtained the crystals of the highest quality, we proceeded with the selection based on ligand characteristics, including structure, size, binding mode, and selectivity.

We found that the endogenous ligand presented a similar binding mode to the oxicams. However, this region was different from NSAIDs such as Ibuprofen and Celecoxib. For this reason, we decided to exclude this crystal from our group and incorporate both COX crystals with the Indomethacin ligand into our selection since this NSAID was utilized previously in the in vivo assays of the molecules synthesized within our research group,

besides being one of the selective NSAIDs for COX-1, forming part of the controls for our computational model.

As a result, we integrated our model with a total of eight final crystals. For each one of the COXs, four crystals were selected with the following ligands: Ibuprofen, Indomethacin, Celecoxib, and Meloxicam, as shown in Figure S23.

3.2. Search for In Vitro Biological Activity Values on Previously Reported NSAIDs and New Compounds (IC_{50})

The search for biological in vitro activity on reported NSAIDs and new compounds was realized in the database ChEMBL, which is a manually curated database of bioactive molecules with drug-like properties. It brings together chemical, bioactivity, and genomic data to aid the translation of genomic information into effective new drugs [27].

The values of IC_{50} employed in this model were considered with the following criteria in the database: IC_{50} values with undefined concentration ranges were not taken into account for the model; the range of IC_{50} values had to be between 0.1 μM and 159.72 μM from COX-1 and 0.05 μM to 19.2 μM from COX-2 in vitro models, and the tests were performed on kits of the inhibition of ovine COX-1 and 2 via enzyme immunoassay [17,28–32].

3.3. Construction and Structural Analysis of Ligands

Therefore, we carried out the full geometric optimization without symmetric restriction and vibrational frequency calculations on the NSAIDs and anti-inflammatory compounds (neutral or anions) at a Semi-Empirical level using the Parametric Method 6 (PM6) approximation. From these calculations, the Mulliken partial charge were obtained; this type of partial charges was chosen based on previous works [33,34]. All the calculations were made in SPARTAN 20 [35].

3.4. Molecular Docking Calculations Docking Methodology

Molecular docking calculations were carried out in Molegro Virtual Docker 6.0 [36], employing the crystals retrieved from the Protein Data Bank (vide supra). For COX-1 (PDB: 1EQG) [37], [2OYU] [38], (3KK6) [39], (4O1Z) [40] and for COX-2 (PDB: 4PH9) [41], (4COX) [42], (3NL1) [43], and (4M11) were used [40]. Each crystal was complexed with an NSAID: Ibuprofen (1EQG and 4PH9), Indomethacin (2OYU and 4COX), Celecoxib (3KK6 and 3LN1) and Meloxicam (4O1Z and 4M11). The potential binding sites (defined as cavities) of both COX-1 and COX-2 were detected using the expanded Van der Waals spheres method. The cavities found for COX-1 PDB: 1EQG (23.04 $Å^3$), 2OYU (112.64 $Å^3$), 3KK6 (91.64 $Å^3$), 4O1Z (76.8 $Å^3$) and COX-2 PDB: 4PH9 (56.32 $Å^3$), 4COX (52.22 $Å^3$), 3NL1 (84.48 $Å^3$), 4M11 (111.61 $Å^3$), where all the binding calculations were performed, corresponded to the binding site of each ligand in both isoforms (henceforth known as the binding site). All water molecules were removed from the crystal.

Rigid and flexible docking was performed. For the flexible approach, the residues within 4 Å from the reference ligands (i.e., Ibuprofen, Indomethacin, Celecoxib, Meloxicam) were set as flexible; the type and number of residues are shown in Table S10 for COX-1 and COX-2. The docking calculation was performed for both types of compound, NSAID and biological compounds, with their corresponding active enantiomer. Partial charges were set according to Molegro Virtual Docker's internal partial charges scheme and the Mulliken partial charges scheme. All the residues bearing four free-rotating bonds were assigned with no strength factor value limiting their movement. For those residues with three rotational bonds, a value of 0.75 was assigned, and 0.5 for those with two free-rotating bonds. The search function MolDock Optimizer was employed for COX-1 and COX-2, and both functions used the genetic algorithm technique for the search for the best binding mode of the given compound. For calculating the binding energy, the scoring function Moldock Score [GRID] was used. For the scoring function, the search sphere was fixed with a 14 Å radius value, and a GRID partition of 0.2 Å was set. The other parameter was used as 2000 minimization steps for each flexible residue, and the ligand with 2000 steps

of global minimization per run. For the energetic analysis of the ligand, the electrostatic internal interactions, the internal H-bond and the sp^2-sp^2 torsions were considered. For the MolDock SE function of all the crystal, a total of 10 run with 1500 iterations, and a population of 50 individuals per run was used, with the exception of 4M11, where the MolDock SE algorithm -with a total of 10 runs, 3000 iterations, and a population of 50 individuals per run- was used. For the docking flex of COX-1, the Moldock optimizer algorithm—with a total of 10 runs, 2000 iterations, a population of 50 individuals per run—was used from 1EQG, 2OYU, and 3KK6. With respect to the selection of poses, the automorphism option handled by the program was considered. In the case of 4O1Z, a function total of 15 runs with 2000 iterations and a population of 50 individuals per run was used. All the residue rotating bonds were assigned a 1.0 strength factor for the selection of poses (vide supra).

For the docking flex of COX-2, the Moldock optimizer function with a total of 10 runs 3000 iterations and a population of 50 individuals per run, was considered from 4PH9. From 4COX, a function total of 10 runs with 2000 iterations and a population of 50 individuals per run was used. For 3NL1, a function total of 10 runs with 3000 iterations, and a population of 50 individuals per run was used, and finally, a function total of 15 runs with 2000 iterations and a population of 50 individuals per run was used in the case of 4M11 for the selection of poses (vide supra).

4. Conclusions

In this study, we introduced a computational method to improve the precision of predictive values, such as binding energy, the interaction mode, and selectivity, for the interaction of small molecules with both COX isoforms. This achievement resulted from an exhaustive analysis involving various conformations of these enzymes based on their crystallized structures.

The results underscore that the quality of an analysis and, consequently, the accuracy of predictions depend significantly on the selection of crystals because the conformation adopted by the enzyme, and influenced by the co-crystallized ligand, constrains the size and shape of the receptor cavity. For instance, in the case of COXIBs, we noted more challenges in the reproducibility of energy and binding modes when compared to their own crystals.

It suggests that even though some molecules exhibit lower IC_{50} values for COX-2, accurately predicting the binding mode in these crystals is not always feasible.

Regarding Flurbiprofen, a COX-1 selective compound, no energy reproducibility in the Ibuprofen crystal was found, despite both belonging to the same NSAID family. By contrast, in the Meloxicam crystal, we obtained a more consistent correlation in the binding mode, energy values, and selectivity.

Our proposed method implies that, for molecules lacking structural similarity, relying solely on energy values from molecular docking in a single crystal is insufficient. Preferably, an analysis of at least three of these crystals (such as Ibuprofen, Celecoxib, and Meloxicam) with the aim of obtaining energy values that exhibit a similar correlation across all six crystals and a binding mode, as closely resembling as possible, should be conducted. The latter criterion is of paramount importance.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: https://www.mdpi.com/article/10.3390/ph16121688/s1.

Author Contributions: Conceptualization, R.S.R.-H.; Formal analysis, E.B.-V. and R.S.R.-H.; Funding acquisition, M.O.; Investigation, M.O. and R.S.R.-H.; Methodology, E.B.-V. and R.S.R.-H.; Resources, M.O.; Software, M.A.L.-P. and Z.G.-S.; Supervision, R.S.R.-H.; Validation, E.B.-V. and R.S.R.-H.; Writing—original draft, E.B.-V.; Writing—review and editing, Mario Leyva-Peralta, Z.G.-S., M.O. and R.S.R.-H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by CONHCyT grant number 320243, 286614 and 140607.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data is contained within the article and Supplementary Materials.

Acknowledgments: E.B.-V. thanks CONAHCyT of Mexico for its Ph.D. scholarship (780792).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Clark, M.A.; Finkel, R.; Rey, J.A.; Whalen, K. Antiinflamatorios. In *Farmacología*, 5th ed.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA, 2012; pp. 525–548.
2. Serhan, C.N.; Petasis, N.A. Resolvins and Protectins in Inflammation Resolution. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 5922–5943. [CrossRef] [PubMed]
3. Kumar, V.; Abbas, A.K.; Aster, J.C. Inflamación y reparación. In *Patología Humana*, 9th ed.; Klatt, E.C., Kummar, R., Mitchell, R.N., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2013; pp. 29–75.
4. Stevens, A.; Lowe, J.; Scott, I. Lesión celular y Muerte. Respuestas tisulares al daño. In *Patología Clínica*, 3rd ed.; El Manual Moderno: Ciudad de México, México, 2011; pp. 35–54.
5. Buch, M.H.; Eyre, S.; McGonagle, D. Persistent inflammatory and non-inflammatory mechanisms in refractory rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2021**, *17*, 17–33. [CrossRef] [PubMed]
6. Moriya, J. Critical roles of inflammation in atherosclerosis. *J. Cardiol.* **2019**, *73*, 22–27. [CrossRef] [PubMed]
7. Ferrer, M.D.; Busquets-Cortés, C.; Capó, X.; Tejada, S.; Tur, J.A.; Pons, A.; Sureda, A. Cyclooxygenase-2 inhibitors as a therapeutic target in inflammatory diseases. *Curr. Med. Chem.* **2019**, *26*, 3225–3241. [CrossRef]
8. Pęczek, P.; Gajda, M.; Rutkowski, K.; Fudalej, M.; Deptała, A.; Badowska-Kozakiewicz, A.M. Cancer-associated inflammation: Pathophysiology and clinical significance. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2023**, *149*, 2657–2672. [CrossRef]
9. Barreiro, E.J.; Kümmerle, A.E.; Fraga, C.A.M. The methylation Effect in Medical Chemistry. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 5215–5246. [CrossRef]
10. Leung, C.S.; Leung, S.S.F.; Tirados-Rives, J.; Jorgensen, W.L. Methylation Effects on Protein-Ligand Binding. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 4489–4500. [CrossRef] [PubMed]
11. Romero-Estudillo, I.; Viveros-Ceballos, J.L.; Cazares-Carreño, O.; González-Morales, A.; de Jésus, B.F.; López-Castillo, M.; Razo-Hernández, R.S.; Castañeda-Corral, G.; Ordóñez, M. 000Synthesis of new α-aminophosphonates: Evaluation as anti-inflammatory agents and QSAR studies. *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, *27*, 2376–2386. [CrossRef]
12. Wang, B.; Wu, L.; Chen, J.; Dong, L.; Chen, C.; Wen, Z.; Hu, J.; Fleming, I.; Wang, D.W. Metabolism pathways of arachidonic acids: Mechanisms and potential therapeutic targets. *Signal Transduct. Target Ther.* **2021**, *6*, 94. [CrossRef]
13. Ahmadi, M.; Bekeschus, S.; Weltmann, K.D.; von Woedtke, T.; Wende, K. Non-steroidal anti-inflammatory drugs: Recent advances in the use of synthetic COX-2 inhibitors. *RSC Med. Chem.* **2022**, *13*, 471–496. [CrossRef]
14. Blobaum, A.L.; Marnett, L.J. Structural and functional basis of cyclooxygenase inhibition. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 1425–1441. [CrossRef]
15. Volkamer, A.; Griewel, A.; Grombacher, T.; Rarey, M. Analyzing the topology of active sites: On the prediction of pockets and subpockets. *J. Chem. Info. Model.* **2010**, *50*, 2041–2052. [CrossRef] [PubMed]
16. Volkamer, A.; Kuhn, D.; Grombacher, T.; Rippmann, F.; Rarey, M. Combining global and local measures for structure-based druggability predictions. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52*, 360–372. [CrossRef] [PubMed]
17. Mendez, D.; Gaulton, A.; Bento, A.P.; Chambers, J.; de Veij, M.; Félix, E.; Magariños, M.P.; Mosquera, J.F.; Mutowo, P.; Nowotka, M.; et al. ChEMBL: Towards direct deposition of bioassay data. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, D930–D940. [CrossRef] [PubMed]
18. Ehrman, T.M.; Barlow, D.J.; Hylands, P.J. In silico search for multi-target anti-inflammatories in Chinese herbs and formulas. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 2204–2218. [CrossRef]
19. Ju, Z.; Su, M.; Hong, J.; La Kim, E.; Moon, H.R.; Chung, H.Y.; Jung, J.H. Design of balanced COX inhibitors based on anti-inflammatory and/or COX-2 inhibitory ascidian metabolites. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *180*, 86–98. [CrossRef] [PubMed]
20. Eren, G.; Ünlü, S.; Nuñez, M.T.; Labeaga, L.; Ledo, F.; Entrena, A.; Banoglu, E.; Constantino, G.; Şahin, M.F. Synthesis, biological evaluation, and docking studies of novel heterocyclic diaryl compounds as selective COX-2 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 6367–6376. [CrossRef] [PubMed]
21. Yamamoto, Y.; Hisa, T.; Arai, J.; Saito, Y.; Yamamoto, F.; Mukai, T.; Ohshima, T.; Maeda, M.; Ohkubo, Y. Isomeric methoxy analogs of nimesulide for development of brain cyclooxygense-2 (COX-2)-targeted imaging agents: Synthesis, in vitro COX-2-inhibitory potency, and cellular transport properties. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 6807–6814. [CrossRef]
22. Beno, B.R.; Yeung, K.S.; Bartberger, M.D.; Pennington, L.D.; Meanwell, N.A. A survey of the role of noncovalent sulfur interactions in drug design. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 4383–4438. [CrossRef] [PubMed]
23. Berman, H.M.; Westbrook, Z.F.; Gilliland, G.; Bhat, T.N.; Weissing, H.; Shindyalov, I.N.; Bourne, P.E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 235–242. [CrossRef]
24. Goujon, M.; McWilliam, H.; Li, W.; Valentin, F.; Squizzato, S.; Paern, J.; Lopez, R. A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL–EBI. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, W695–W699. [CrossRef] [PubMed]

25. Martin, F.J.; Amode, M.R.; Aneja, A.; Austine-Orimoloye, O.; Azov, A.G.; Barnes, I.; Becker, A.; Bennett, R.; Berry, A.; Bhai, J.; et al. Ensembl 2023. *Nucleic Acids Res.* **2023**, *D1*, D933–D941. [CrossRef] [PubMed]
26. Meyder, A.; Nittinger, E.; Lange, G.; Klein, R.; Rarey, M. Estimating Electron Density Support for Individual Atoms and Molecular Fragments in X-ray Structure. *J. Chem. Inf. Model.* **2017**, *57*, 2437–2447. [CrossRef]
27. Schöning-Stierand, K.; Diedrich, K.; Ehrt, C.; Flachsenberg, F.; Graef, J.; Sieg, J.; Rarey, M. Proteins Plus: A comprehensive collection of web-based molecular modeling tools. *Nucleic Acids Res.* **2022**, *50*, W611–W615. [CrossRef]
28. Reddy, M.R.; Billa, V.K.; Pallela, V.R.; Mallireddigari, M.R.; Boominathan, R.; Gabriel, J.L.; Reddy, E.P. Design, synthesis, and biological evaluation of 1-(4-sulfamylphenyl)-3-trifluoromethyl-5-indolyl pyrazolines as cyclooxygenase-2 (COX-2) and lipoxygenase (LOX) inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 3907–3916. [CrossRef]
29. Zarghi, A.; Zebardast, T.; Daraie, B.; Hedayati, M. Design and synthesis of new 1, 3-benzthiazinan-4-one derivatives as selective cyclooxygenase (COX-2) inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 5369–5373. [CrossRef] [PubMed]
30. Shrivastava, S.K.; Srivastava, P.; Bandresh, R.; Tripathi, P.N.; Tripathi, A. Design, synthesis, and biological evaluation of some novel indolizine derivatives as dual cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitor for anti-inflammatory activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 4424–4432. [CrossRef]
31. Magda, A.A.; Abdel-Aziz, N.I.; Alaa, A.M.; El-Azab, A.S.; ElTahir, K.E. Synthesis, biological evaluation and molecular modeling study of pyrazole and pyrazoline derivatives as selective COX-2 inhibitors and anti-inflammatory agents. Part 2. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 3306–3316. [CrossRef]
32. Kaur, J.; Bhardwaj, A.; Huang, Z.; Knaus, E.E. N-1 and C-3 substituted indole Schiff bases as selective COX-2 inhibitors: Synthesis and biological evaluation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 2154–2159. [CrossRef]
33. Pérez, D.J.; Díaz-Reval, M.I.; Obledo-Benicio, F.; Zakai, U.I.; Gómez-Sandoval, Z.; Razo-Hernández, R.S.; West, R.; Sumaya-Martínez, M.T.; Pineda-Urbina, K.; Ramos-Organillo, Á. Silicon containing ibuprofen derivatives with antioxidant and anti-inflammatory activities: An in vivo and in silico study. *Eur. J. Pharmacol.* **2017**, *814*, 18–27. [CrossRef]
34. Rodríguez-Lozada, J.; Tovar-Gudiño, E.; Guevara-Salazar, J.A.; Razo-Hernández, R.S.; Santiago, Á.; Pastor, N.; Fernández-Zertuche, M. QSAR and molecular docking studies of the inhibitory activity of novel heterocyclic GABA analogues over GABA-AT. *Molecules* **2018**, *23*, 2984. [CrossRef] [PubMed]
35. Hehre, W.J. *A Guide to Molecular Mechanics and Quantum Chemical Calculations*; Wavefunction: Irvine, CA, USA, 2003; Volume 2.
36. Thomsen, R.; Christensen, M.H. MolDock: A new technique for high-accuracy molecular docking. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3315–3321. [CrossRef] [PubMed]
37. Selinsky, B.S.; Gupta, K.; Sharkey, C.T.; Loll, P.J. Structural analysis of NSAID binding by prostaglandin H2 synthase: Time-dependent and time-independent inhibitors elicit identical enzyme conformations. *Biochemistry* **2001**, *40*, 5172–5180. [CrossRef] [PubMed]
38. Harman, C.A.; Turman, M.V.; Kozak, K.R.; Marnett, L.J.; Smith, W.L.; Garavito, R.M. Structural basis of enantioselective inhibition of cyclooxygenase-1 by S-α-substituted Indomethacin ethanolamide. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 28096–28105. [CrossRef]
39. Rimon, G.; Sidhu, R.S.; Lauver, D.A.; Lee, J.Y.; Sharma, N.P.; Yuan, C.; Frieler, R.A.; Trievel, R.C.; Lucchesi, B.R.; Smith, W.L. Coxibs interfere with the action of aspirin by binding tightly to one monomer of cyclooxygenase-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 28–33. [CrossRef] [PubMed]
40. Xu, S.; Hermanson, D.J.; Banerjee, S.; Ghebreselasie, K.; Clayton, G.M.; Garavito, R.M.; Marnett, L.J. Oxicams bind in a novel mode to the cyclooxygenase active site via a two-water-mediated H-bonding network. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 6799–6808. [CrossRef] [PubMed]
41. Orlando, B.J.; Lucido, M.J.; Malkowski, M.G. The structure of ibuprofen bound to cyclooxygenase-2. *J. Struct. Biol.* **2015**, *189*, 62–66. [CrossRef]
42. Kurumbail, R.G.; Stevens, A.M.; Gierse, J.K.; McDonald, J.J.; Stegeman, R.A.; Pak, J.Y.; Gildehaus, D.; Iyashiro, J.M.; Penning, T.D.; Seibert, K.; et al. Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature* **1996**, *384*, 644–648. [CrossRef]
43. Ferraroni, M.; Matera, I.; Steimer, L.; Bürger, S.; Scozzafava, A.; Stolz, A.; Briganti, F. Crystal structures of salicylate 1, 2-dioxygenase-substrates adducts: A step towards the comprehension of the structural basis for substrate selection in class III ring cleaving dioxygenases. *J. Struct. Biol.* **2012**, *177*, 431–438. [CrossRef]

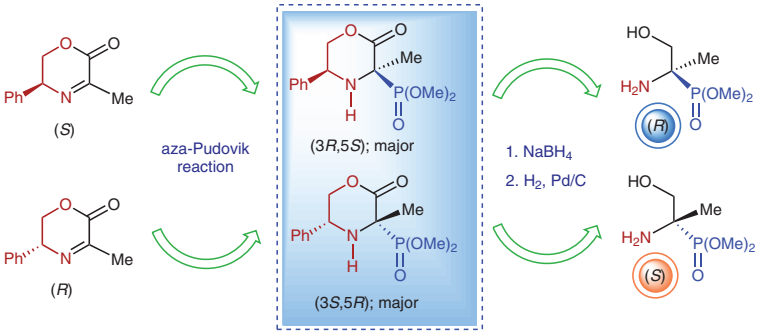
Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Synthesis E. Bello-Vargas et al. Paper

Novel Syntheses of *rac*- and Enantiomerically Enriched Dimethyl α-Methylphosphoserinate

Estefany Bello-Vargas[a]
Mario Ordoñez*[a]
Ivan Romero-Estudillo[a,b]
Victoria Labastida-Galván[a]

[a] Centro de Investigaciones Químicas-IICBA, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001, 62209 Cuernavaca, Morelos, México
palacios@uaem.mx
[b] CONAHCYT-Centro de Investigaciones Químicas-IICBA, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001, 62209 Cuernavaca, Morelos, México
ivan.romeroest@uaem.mx



Received: 04.12.2024
Accepted after revision: 18.12.2024
Published online: 18.12.2024 (Accepted Manuscript), 11.02.2025 (Version of Record)
DOI: 10.1055/a-2506-0261; Art ID: SS-2024-12-0475-OP

Abstract The novel synthesis of racemic and enantiomerically enriched dimethyl (*S*)- and (*R*)-α-methylphosphoserinate is described. The racemic synthesis involves a three-component reaction of hydroxyacetone, benzylamine, dimethyl phosphite and catalytic amounts of phenylphosphonic acid, or alternatively, the reaction of ethyl pyruvate with NH_4OAc and dimethyl phosphite in the presence of SiO_2 under solvent-free conditions, followed by reduction of the ethyl ester with $NaBH_4$ in THF/MeOH. On the other hand, the stereoselective synthesis includes the phosphonylation of chiral cyclic imines obtained by reaction of ethyl pyruvate with (*S*)- or (*R*)-phenylglycinol, followed by reduction of the cyclic ester with $NaBH_4$ and cleavage of the phenylglycinol fragment under hydrogenolysis. The absolute configuration is established by 2D NOESY experiments. All synthesized compounds are fully characterized.

Key words α-methylphosphoserinate, chiral cyclic imines, heterocyclic α-aminophosphonates, phosphonylation

Enantiomerically enriched quaternary α-amino acids, also known as α,α-disubstituted α-amino acids, are of great importance due to their roles in the development of new pharmaceutical agents. These compounds effectively avoid racemization at the stereogenic carbon[1] and their introduction into peptides is a useful tool for modifying various properties, including conformation restriction, enhanced chemical stability, increased lipophilicity and specific biological activity.[2] Additionally, these compounds serve as excellent building blocks for the development of pharmacological agents, agrochemicals and unnatural peptides and proteins.[3] An example of these quaternary α-amino acids is α-methylserine (**1**) (Figure 1), which has been extensively investigated because it is a good starting material for the asymmetric synthesis of more complex compounds. It is common to find these compounds in bioactive natural products such as tambromycin (Figure 2),[4] which is formed from two α-methylserine residues,[5] one of them being part of a methyloxazoline; preliminary studies on this compound revealed that it displayed selective antiproliferative activity against five different cancerous B and T cell lines.

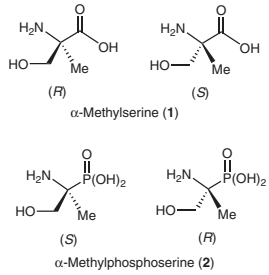


Figure 1 α-Methylserine (**1**) and α-methylphosphoserine (**2**)

α-Methylserine is also a component of (+)-conagenin,[6] piperazimycin A[7] and amicetin[8] (Figure 2). Due to the chemical and biological importance of α-methylserine, it has attracted considerable attention and many synthetic approaches have been described for the efficient preparation of enantiomerically enriched α-methylserine and its derivatives.[9]

On the other hand, the α-aminophosphonic and α-aminophosphonate analogues of the corresponding α-amino acids and α-amino esters, respectively, represent an important class of compounds with multiple applications in medicinal and organic chemistry. This is due to the ability of phosphonic groups to mimic the high-energy transition state of peptide bond hydrolysis, enabling them to act as enzyme inhibitors or receptor ligands in pathological conditions associated with amino acid metabolism.[10] Due to the importance of these compounds, several excellent methods for their preparation have been published over recent decades.[11,12]

© 2025. Thieme. All rights reserved.
Georg Thieme Verlag KG, Oswald-Hesse-Straße 50, 70469 Stuttgart, Germany

Downloaded by: Universidad National Autonoma de Mexico (UNAM). Copyrighted material.

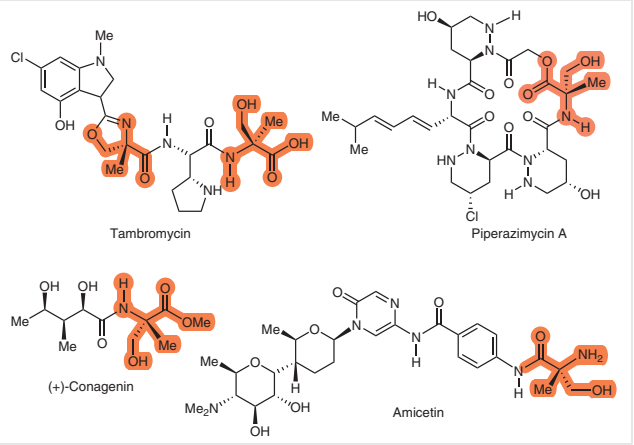
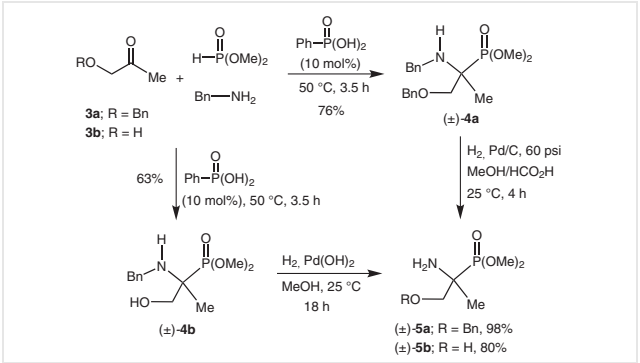


Figure 2 Pharmacological compounds incorporating α-methylserine

In contrast to the extensive reports on the synthesis and uses of α-methylserine, α-methylphosphoserine has remained under-explored, although some studies on the synthesis of phosphoserine have been published.[13] However, to the best of our knowledge, the synthesis of α-methylphosphoserine has not yet been described, despite the significant importance of these types of compounds. Considering the relevance of these non-proteinogenic α-aminophosphonic acids as pharmacophores in the discovery of new drugs, which is in line with our current research interest on the synthesis of α-aminophosphonic acids,[14] we herein report a novel synthesis of racemic and enantiomerically enriched dimethyl α-methylphosphoserinate (**5**).

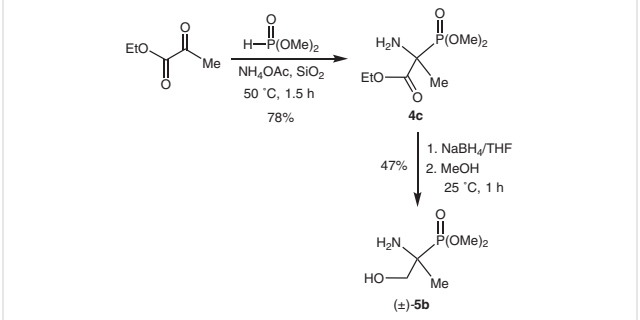
For the synthesis of our target compound, dimethyl α-methyphosphoserinate (±)-**5b**, we initially carried out the three-component reaction according to our previous reports.[15] Thus, the reaction of benzyloxyacetone (**3a**), benzylamine and dimethyl phosphite in the presence of a catalytic amount of phenylphosphonic acid at 50 °C under solvent-free conditions, produced the corresponding dibenzyl α-aminophosphonate (±)-**4a** in 76% yield, which on cleavage of the *N*-Bn and *O*-Bn bonds under hydrogenolysis would be expected to provide the target molecule; however, after several attempts, only cleavage of the *N*-Bn bond was observed, affording the α-aminophosphonate (±)-**5a** in 98% yield. On the other hand, the reaction of hydroxyacetone (**3b**), benzylamine and dimethyl phosphite in the presence of a catalytic amount of phenylphosphonic acid at 50 °C under solvent-free conditions afforded the *N*-benzyl α-aminophosphonate (±)-**4b** in 63% yield, which after cleavage of the *N*-Bn bond by hydrogenolysis gave dimethyl α-methylphosphoserinate (±)-**5b** in 80% yield (Scheme 1).

Additionally, the reaction of ethyl pyruvate, ammonium acetate and dimethyl phosphite in the presence of SiO_2 at 50 °C[16] gave the corresponding α-carboxyethyl α-aminophosphonate (±)-**4c** in 78% yield, which on reaction with



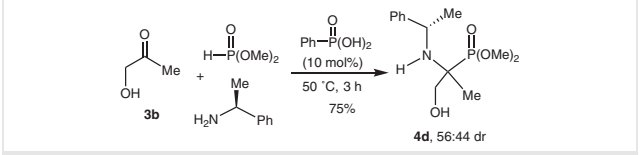
Scheme 1 Synthesis of dimethyl α-methylphosphoserinates (±)-**5a**,**b**

$NaBH_4$ in tetrahydrofuran and MeOH at room temperature afforded dimethyl α-methylphosphoserinate (±)-**5b** in 47% yield (Scheme 2).



Scheme 2 Synthesis of dimethyl α-methylphosphoserinate (±)-**5b**

On the other hand, approximately 90% of drugs currently in use are racemic mixtures. Despite having the same chemical structure, their pharmacokinetic and pharmacological profiles can differ significantly.[17] Hence, it is important to develop stereoselective methods to produce optically active compounds and accurately characterize their chemical and pharmacological properties. In this context, the stereoselective synthesis of dimethyl α-methylphosphoserinate was studied, and we recently reported a three-component reaction of hydroxyacetone (**3b**) with (*S*)-α-methylbenzylamine and dimethyl phosphite in the presence of a catalytic amount of phenylphosphonic acid at 50 °C under solvent-free conditions, obtaining the correspond-

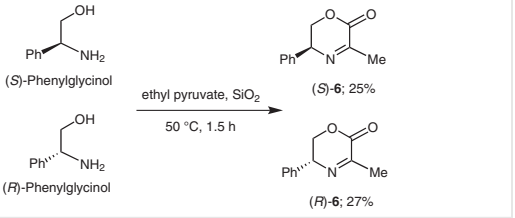


Scheme 3 Synthesis of dimethyl α-methylphosphoserinate **4d**

Downloaded by: Universidad National Autonoma de Mexico (UNAM). Copyrighted material.

ing α-aminophosphonate **4d** in 75% yield and a 56:44 diastereoisomeric ratio as an inseparable mixture (Scheme 3).[18]

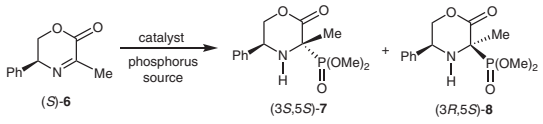
Additionally, to obtain enantiomerically enriched dimethyl α-methylphosphoserinate, the (*S*)-3-methyl-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-2-one **6**, a chiral cyclic imine, was proposed as a potential precursor based on our recent work demonstrating the application of chiral cyclic imines in the synthesis of heterocyclic α-aminophosphonates.[19] Thus, we carried out the reaction of ethyl pyruvate with (*S*)- and (*R*)-phenylglycinol in the presence of SiO_2 under solvent-free conditions, obtaining the corresponding oxazin-2-ones (*S*)-**6** and (*R*)-**6** in 25 and 27% yield, respectively. Similar results were obtained when ethyl pyruvate and (*S*)- and (*R*)-phenylglycinol were reacted in the presence of magnesium sulfate and 2,2,2-trifluoroethanol as the solvent (Scheme 4).



Scheme 4 Synthesis of chiral oxazin-2-ones (*S*)-**6** and (*R*)-**6**

Having obtained the chiral cyclic imines (*S*)- and (*R*)-**6**, we next studied the preparation of heterocyclic α-aminophosphonates through aza-Pudovik methodology based on our previous experience.[20] Initially, the chiral cyclic imine (*S*)-**6** was reacted with dimethyl phosphite at 50 °C for 3 hours to afford the heterocyclic α-aminophosphonates (3*S*,5*S*)-**7** and (3*R*,5*S*)-**8** in 16% yield and a 64:36 diastereoisomeric ratio (Table 1, entry 1). When phenylboronic acid [$PhB(OH)_2$] (10 mol%) or phenylphosphonic acid [$PhP(O)(OH)_2$] (10 mol%) was used as the catalyst, the corresponding heterocyclic α-aminophosphonates (3*S*,5*S*)-**7** and (3*R*,5*S*)-**8** were obtained in yields of 17 and 32% and diastereoisomeric ratios of 62:38 and 66:34, respectively (Table 1, entries 2 and 3). In the next experiment, the chiral cyclic imine (*S*)-**6** was reacted with trimethyl phosphite and 10 or 20 mol% of benzyl chloroformate as an activating agent in acetonitrile at room temperature, affording the heterocyclic α-aminophosphonates (3*S*,5*S*)-**7** and (3*R*,5*S*)-**8** in yields of 17 and 29% and diastereoisomeric ratios of 28:72 and 25:75, respectively (Table 1, entries 4 and 5). On the other hand, when CbzCl was used in an equimolar quantity at 0 °C, the heterocyclic α-aminophosphonates (3*S*,5*S*)-**7** and (3*R*,5*S*)-**8** were obtained in 40% yield and a 30:70 diastereoisomeric ratio (Table 1, entry 6). Surprisingly, when an equimolar amount of CbzCl was used at 25 °C, the heterocyclic α-aminophosphonates (3*S*,5*S*)-**7** and (3*R*,5*S*)-**8** were obtained in 70% yield and a 25:75 diastereoisomeric ratio (Table 1, entry 7). Additionally, when the reaction mixture was heated to 80 °C, the expected products were obtained in 65% yield and a 44:56 diastereoisomeric ratio (Table 1, entry 8). It is important to note that the ^1H and ^{13}C NMR analysis unexpectedly did not show the incorporation of the Cbz group attached to the nitrogen atom in the products (Table 1, entries 4–8).

Table 1 Phosphonylation of the Chiral Cyclic Imine (*S*)-**6**



Entry	Catalyst	Phosphorus source	Yield (%)	dr (**7**/**8**)[a]
1	none	$(MeO)_2P(O)H$[e]	16	64:36
2	$PhB(OH)_2$[b]	$(MeO)_2P(O)H$[e]	17	62:38
3	$PhP(O)(OH)_2$[b]	$(MeO)_2P(O)H$[e]	32	66:34
4	CbzCl[b]	$(MeO)_3P$[f]	17	28:72
5	CbzCl[c]	$(MeO)_3P$[f]	29	25:75
6	CbzCl[d]	$(MeO)_3P$[g]	40	30:70
7	CbzCl[d]	$(MeO)_3P$[f]	70	25:75
8	CbzCl[d]	$(MeO)_3P$[h]	65	44:56

[a] Determined by ^{31}P NMR (202 MHz, $CDCl_3$) of the crude reaction mixture.
[b] 10 mol%.
[c] 20 mol%.
[d] Equimolar quantity.
[e] 50 °C.
[f] MeCN, 25 °C.
[g] MeCN, 0 °C.
[h] MeCN, 80 °C.

To determine the stereochemistry of the heterocyclic α-aminophosphonates (3*S*,5*S*)-**7** and (3*R*,5*S*)-**8**, they were analyzed using 2D NOESY NMR experiments. The α-aminophosphonate **8** (the more polar product) showed a NOE correlation between Me-3 and CH-5, confirming the (3*R*,5*S*) stereochemistry for this product. Conversely, the absence of this correlation in **7** (the less polar product) confirms the (3*S*,5*S*) configuration (Figure 3). See also the spectra in the Supporting Information.

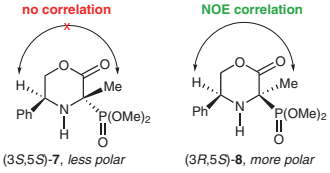


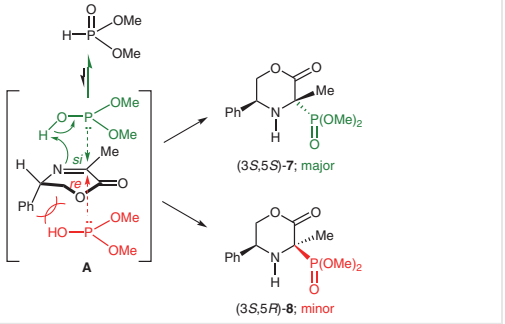
Figure 3 Determination of the configurations of (3*S*,5*S*)-**7** and (3*R*,5*S*)-**8** by NOESY analysis

As shown in the first three entries in Table 1, the *trans* heterocyclic α-aminophosphonate (3*S*,5*S*)-**7** was obtained as the major product. We explain these results as follows: the chiral cyclic imine (*S*)-**6** adopts a conformation, accord-

© 2025. Thieme. All rights reserved.

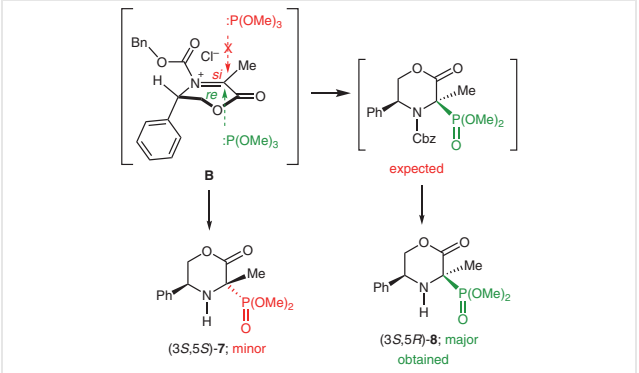
Downloaded by: Universidad National Autonoma de Mexico (UNAM). Copyrighted material.

ing to the literature, where the phenyl group at C-5 adopts a pseudo-equatorial arrangement.[21] Considering that dimethyl phosphite is the nucleophilic species rather than the unreactive phosphonate,[22] therefore the nucleophilic attack on the imine occurs at the *si* face (the less hindered face) from the side opposite to the phenyl group. This process takes place through a five-membered cyclic transition state **A**,[23] generating the heterocyclic α-aminophosphonate (3*S*,5*S*)-**7** as the major diastereoisomer (Scheme 5).



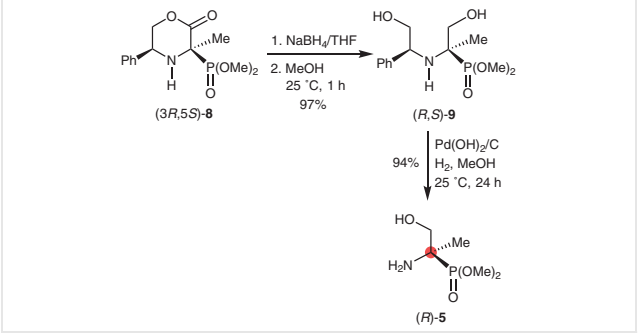
Scheme 5 Possible transition states for the hydrophosphonylation reaction of the chiral cyclic imine (*S*)-**6** with dimethyl phosphite

On the other hand, the reaction of chiral cyclic imine (*S*)-**6** with trimethyl phosphite and benzyl chloroformate afforded the heterocyclic α-aminophosphonate (3*R*,5*S*)-**8** as the major diastereoisomer. To explain this result, we propose that the chiral cyclic imine (*S*)-**6** reacts with benzyl chloroformate (1 equiv) to generate the corresponding *N*-acyliminium ion **B**, where the benzyl formate group blocks the *si* face,[24] thus favoring nucleophilic attack of trimethyl phosphite on the *re* face to generate the expected heterocyclic *N*-Cbz-protected α-aminophosphonate; however, after several attempts, this compound could not be observed and the unprotected product (3*R*,5*S*)-**8** was obtained in all cases as the major diastereoisomer (Scheme 6). Similar results were obtained when isobutyl chloroformate was used. For the non-incorporation of the Cbz or *i*-BuOCO groups in the final product, we also proposed that benzyl chloroformate did not participate in the phosphonylation reaction, and to demonstrate the above, we carried out the reaction of the chiral cyclic imine (*S*)-**6** with trimethyl phosphite in the absence of CbzCl; however, under these conditions the heterocyclic α-aminophosphonate was not formed. Additionally, when 10 and 20 mol% of CbzCl were used, the reaction was not complete, and unreacted chiral cyclic imine (*S*)-**6** was recovered. Based on these results, it is clear that benzyl chloroformate does participate in the reaction, but for some reason that we cannot explain, it is subsequently lost (Scheme 6).



Scheme 6 Possible transition states for the phosphonylation reaction of chiral cyclic imine (*S*)-**6** with trimethyl phosphite

Having assigned the absolute configuration, the major diastereoisomer (3*R*,5*S*)-**8** was reacted with $NaBH_4$ in THF followed by the addition of MeOH to afford the corresponding diol derivative (*R*,*S*)-**9** in 97% yield. Finally, cleavage of the phenylglycinol fragment in (*R*,*S*)-**9** was accomplished by hydrogenolysis in the presence of a catalytic amount of $Pd(OH)_2/C$ in MeOH, producing the enantiomerically enriched α-methylphosphoserinate (*R*)-**5** in 94% yield (Scheme 7).

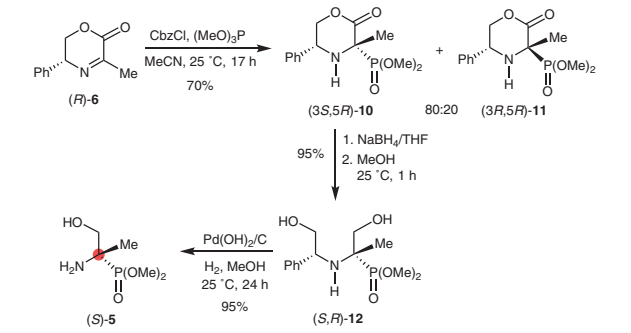


Scheme 7 Synthesis of dimethyl α-methylphosphoserinate (*R*)-**5**

Additionally, the chiral cyclic imine (*R*)-**6**, obtained via a 'one-pot' process from (*R*)-phenylglycinol and ethyl pyruvate, as described above, was reacted with equimolar quantities of CbzCl and $(MeO)_3P$ in MeCN at 25 °C, affording the heterocyclic α-aminophosphonates (3*S*,5*S*)-**10** and (3*R*,5*S*)-**11** in 70% yield and an 80:20 diastereoisomeric ratio. After separation by column chromatography, the major product (3*S*,5*S*)-**10** was reacted with $NaBH_4$ in THF at 25 °C followed by the addition of MeOH, producing the corresponding diol (*S*,*R*)-**12** in 95% yield, which under hydrogenolysis conditions using $Pd(OH)_2/C$ in MeOH at 25 °C afforded dimethyl α-methylphosphoserinate (*S*)-**5** in 95% yield (Scheme 8).

© 2025. Thieme. All rights reserved.

Downloaded by: Universidad National Autonoma de Mexico (UNAM). Copyrighted material.



Scheme 8 Synthesis of dimethyl α-methylphosphoserinate (*S*)-**5**

In conclusion, we have developed an efficient, facile and eco-friendly method for the synthesis of racemic dimethyl α-methylphosphoserinate in moderate yield. This was achieved through a 'one-pot' three-component reaction of hydroxyacetone, benzylamine and dimethyl phosphite, or by reaction of ethyl pyruvate with NH_4OAc and dimethyl phosphite under solvent-free conditions, followed by reaction with $NaBH_4$ in THF/MeOH. Additionally, we have described a novel synthesis of enantiomerically enriched dimethyl (*S*)- and (*R*)-α-methylphosphoserinate via the phosphonylation of chiral cyclic imines, which were obtained by the reaction of ethyl pyruvate with (*S*)- or (*R*)-phenylglycinol. This was followed by reduction of the ester group with $NaBH_4$ and hydrogenolysis of the phenylglycinol fragment. The absolute configurations were established by 2D NOESY experiments. After additional investigations, we anticipate that these compounds may have potential applications as chiral scaffolds in drug discovery.

All commercial materials were used as received unless otherwise noted. Flash chromatography was performed using Silica Flash 60® (230–400 mesh). Thin-layer chromatography was performed on TLC sheets precoated with silica gel (60 F_{254}, Merck), and the plates were visualized with UV light and ninhydrin. Melting points were determined with a Fisher–Johns apparatus and are uncorrected. ^{1}H, ^{13}C and ^{31}P NMR spectra were recorded in $CDCl_3$ or CD_3OD on a Bruker AVANCE III HD (500 MHz) spectrometer and HSQC and NOESY were obtained on a JEOL (600 MHz) spectrometer. TMS and $P(O)Ph_3$ (for ^{31}P NMR) were used as internal references. Chemical shifts (δ) are expressed in parts per million (ppm) and coupling constants (*J*) in hertz. Multiplicities are recorded as follows: s = singlet, d = doublet, t = triplet, dd = doublet of doublets, dt = doublet of triplets, m = multiplet and br = broad. High-resolution mass spectrometry (HMRS) (FAB^+) was performed using a JEOL MStation MS-700. ^{1}H and ^{13}C NMR data for the intermediary imines (*S*)-**6** and (*R*)-**6** were similar to those described in the literature.[25] Compounds **4b** and **4d** have been previously reported.[18]

Dimethyl (2-(Benzylamino)-1-benzyloxypropan-2-yl)phosphonate [(±)-4a]

A mixture of benzyloxyacetone (**3a**) (0.33 g, 0.3 mL, 2.0 mmol), benzylamine (0.22 g, 0.2 mL, 2.0 mmol) and phenylphosphonic acid (63 mg, 0.2 mmol) was stirred at room temperature for 20 min. The reaction mixture was then heated to 50 °C, dimethyl phosphite (0.24 g, 0.2 mL, 2.1 mmol) was added and the mixture stirred for 3.5 h. The resulting crude product was purified by flash chromatography using EtOAc as the eluent to afford compound **4a** (0.56 g, 76%) as a yellow oil.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.35 (d, *J* = 15.9 Hz, 3 H, CH_3), 3.53 (dd, *J* = 21.2, 9.2 Hz, 1 H, OCH_2C), 3.78 (d, *J* = 10.4 Hz, 3 H, $(CH_3O)_2P$), 3.77 (dd, *J* = 16.6, 9.2 Hz, 1 H, OCH_2C), 3.70 (d, *J* = 10.5 Hz, 3 H, $(CH_3O)_2P$), 3.83 (AB system, *J* = 12.5 Hz, 1 H, NCH_2Ph), 3.88 (AB system, *J* = 12.5 Hz, 1 H, NCH_2Ph), 4.54 (AB system, *J* = 12.0 Hz, 1 H, $PhCH_2O$), 4.59 (AB system, *J* = 12.0 Hz, 1 H, $PhCH_2O$), 7.23–7.35 (m, 10 H, H_{arom}).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 18.1 (CH_3), 47.5 (d, *J* = 4.4 Hz, NCH_2Ph), 52.9 (d, *J* = 7.3 Hz, $(CH_3O)_2P$), 53.3 (d, *J* = 5.9 Hz, $(CH_3O)_2P$), 58.5 (d, *J* = 145.0 Hz, C–P), 73.5 (OCH_2C), 73.6 (OCH_2Ph), 127.0, 127.8, 128.3, 128.4, 138.0, 141.0.

^{31}P NMR (162 MHz, $CDCl_3$): δ = 31.3.

HRMS (FAB^+): *m*/*z* [M + H]$^+$ calcd for $C_{19}H_{27}NO_4P$: 364.1678; found: 364.1688.

Dimethyl (2-(Amino)-1-benzyloxypropan-2-yl)phosphonate [(±)-5a]

A mixture of α-aminophosphonate **4a** (0.25 g, 0.68 mmol) and 20% Pd/C (w/w) (50 mg) in MeOH (3 mL) was treated with formic acid (0.06 mL), which was added dropwise over a period of 5 min. The reaction mixture was then stirred at 25 °C for 4 h. The crude product was filtered through Celite to yield product **5a** (0.18 g, 98%) as a colorless oil. Hydrogen (H_2) is generated from formic acid.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.31 (d, *J* = 15.6 Hz, 3 H, CH_3), 1.93 (br s, 2 H, NH_2), 3.40 (dd, *J* = 19.7, 9.1 Hz, 1 H, CH_2C), 3.69 (dd, *J* = 20.2, 8.7 Hz, 1 H, CH_2C), 3.74 (d, *J* = 10.3 Hz, 3 H, $(CH_3O)_2P$), 3.76 (d, *J* = 10.4 Hz, 3 H, $(CH_3O)_2P$), 4.55 (AB system, *J* = 11.9 Hz, 1 H, $BnCH_2O$), 4.59 (AB system, *J* = 11.9 Hz, 1 H, $BnCH_2O$), 7.23–7.35 (m, 5 H, H_{arom}).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 21.0 (CH_3), 53.0 (d, *J* = 7.0 Hz, $(CH_3O)_2P$), 53.4 (d, *J* = 7.0 Hz, $(CH_3O)_2P$), 53.6 (d, *J* = 149.0 Hz, C–P), 73.6 (CH_2P), 75.2 (OCH_2Ph), 127.6, 128.3, 137.8.

^{31}P NMR (81 MHz, $CDCl_3$): δ = 29.2.

HRMS (FAB^+): *m*/*z* [M + H]$^+$ calcd for $C_{12}H_{21}NO_4P$: 274.1208; found: 274.1211.

Dimethyl (2-(Amino)-1-hydroxypropan-2-yl)phosphonate [(±)-5b]

From 4b

A mixture of α-aminophosphonate **4b** (0.20 g, 0.73 mmol) and 30% $Pd(OH)_2$ (w/w) (60 mg) in MeOH (2 mL) and EtOAc (2 mL) was stirred under a hydrogen atmosphere at 25 °C for 18 h. The crude product was filtered through Celite and washed with MeOH. The resulting solution was evaporated under reduced pressure and the residue was purified by flash column chromatography using EtOAc/MeOH (80:20) as the eluent, yielding compound **5b** (0.11 g, 80%) as a colorless oil.

From 4c

A solution of **4c** (79 mg, 0.25 mmol) in THF (2 mL) at 0 °C was treated with $NaBH_4$ (38 mg, 1.0 mmol). MeOH (1 mL) was added dropwise and the reaction mixture was stirred at 25 °C for 1 h. After this time, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NH_4Cl and THF was removed under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash column chromatography using EtOAc/MeOH (80:20) as the eluent, yielding compound **5b** (30 mg, 47%) as a colorless oil.

^{1}H NMR (600 MHz, CD_3OD): δ = 1.23 (d, *J* = 15.8 Hz, 3 H, CH_3), 3.46 (dd, *J* = 19.1, 10.9 Hz, 1 H, CH_2OH), 3.66 (dd, *J* = 10.0, 5.0 Hz, 1 H, CH_2OH), 3.78 (d, *J* = 10.4 Hz, 3 H, $(CH_3O)_2P$), 3.80 (d, *J* = 10.4 Hz, 3 H, $(CH_3O)_2P$).

© 2025. Thieme. All rights reserved.

Downloaded by: Universidad National Autonoma de Mexico (UNAM). Copyrighted material.

^{13}C NMR (151 MHz, CD_3OD): δ = 20.4 (CH_3), 53.9 (d, *J* = 7.4 Hz, $(CH_3O)_2P$), 54.2 (d, *J* = 7.4 Hz, $(CH_3O)_2P$), 55.3 (d, *J* = 149.1 Hz, C–P), 68.0 (d, *J* = 3.7 Hz, CH_2OH).

^{31}P NMR (243 MHz, CD_3OD): δ = 32.81.

HRMS (FAB$^+$): *m*/*z* [M + H]$^+$ calcd for $C_5H_{15}NO_4P$: 184.0739; found: 184.0742.

Ethyl (2-(Amino)-2-dimethoxyphosphoryl)propanoate [(±)-4c]

A mixture of ethyl pyruvate (0.11 g, 0.1 mL, 1.0 mmol), ammonium acetate (0.13 g, 1.7 mmol), SiO_2 (0.15 g) and dimethyl phosphite (0.14 g, 0.1 mL, 1.3 mmol) was stirred at 50 °C for 1.5 h. The crude product was filtered through cotton wool and washed with CH_2Cl_2. The resulting mixture was evaporated under reduced pressure and the residue was purified by flash column chromatography using CH_2Cl_2/*i*-PrOH (98:02) as the eluent, yielding compound **4c** (0.17 g, 78%) as a yellow oil.

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.34 (t, *J* = 7.1 Hz, 3 H, C*H*$_3$CH$_2$O), 1.65 (d, *J* = 16.1 Hz, 3 H, CH_3), 1.88 (br s, 1 H, NH_2), 3.79 (br s, 1 H, NH_2), 3.85 (d, *J* = 10.6 Hz, 3 H, $(CH_3O)_2P$), 3.87 (d, *J* = 10.4 Hz, 3 H, $(CH_3O)_2P$), 4.34 (dq, *J* = 7.1, 7.1, 4.5 Hz, 2 H, CH_3CH_2O).

^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.2 (CH_3), 21.5 (CH_3), 54.4 (d, *J* = 7.7 Hz, $(CH_3O)_2P$), 54.8 (d, *J* = 6.8 Hz, $(CH_3O)_2P$), 63.4 (OCH_2), 74.8 (d, *J* = 161.2 Hz, C–P), 172.5 (C=O).

^{31}P NMR (202 MHz, $CDCl_3$): δ = 33.7.

HRMS (FAB$^+$): *m*/*z* [M + H]$^+$ calcd for $C_7H_{17}NO_5P$: 226.0844; found: 226.0848.

(*S*)-3-Methyl-5-phenyl-5,6-dihydro-2*H*-1,4-oxazin-2-one [(*S*)-6]

A mixture of ethyl pyruvate (0.11 g, 0.1 mL, 1.0 mmol), (*S*)-(+)-2-phenylglycinol (0.20 g, 1.4 mmol) and SiO_2 (150 mg) was stirred at 50 °C for 1.5 h. The crude product was filtered through cotton wool and washed with EtOAc. The resulting mixture was evaporated under reduced pressure and the residue was purified by flash column chromatography using hexane/EtOAc (70:30) as the eluent, affording product (*S*)-**6** (49 mg, 25%) as a pale yellow oil. The ^{1}H and ^{13}C NMR spectroscopic data are similar to those reported in the literature.[25]

(*R*)-3-Methyl-5-phenyl-5,6-dihydro-2*H*-1,4-oxazin-2-one [(*R*)-6]

A mixture of ethyl pyruvate (0.11 g, 0.1 mL, 1.0 mmol), (*R*)-(−)-2-phenylglycinol (0.20 g, 1.4 mmol) and SiO_2 (150 mg) was stirred at 50 °C for 1.5 h. The crude product was filtered through cotton wool and washed with EtOAc. The resulting mixture was evaporated under reduced pressure and the residue was purified by flash column chromatography using hexane/EtOAc (70:30) mixture as the eluent, affording product (*R*)-**6** (52 mg, 27%) as a pale yellow oil. The ^{1}H and ^{13}C NMR spectroscopic data are similar to those reported for (*S*)-**6**.

Dimethyl ((3*S*,5*S*)-3-Methyl-2-oxo-5-phenylmorpholin-3-yl)phosphonate [(3*S*,5*S*)-7] and Dimethyl ((3*R*,5*S*)-3-Methyl-2-oxo-5-phenylmorpholin-3-yl)phosphonate [(3*R*,5*S*)-8]

The imine (*S*)-**6** (50 mg, 0.26 mmol) in MeCN (2 mL) at 0 °C was treated with CbzCl (50 mg, 0.04 mL, 0.29 mmol) and stirred for 30 min. After this time, trimethyl phosphite (0.03 mL, 0.29 mmol) was added and the mixture stirred at room temperature for 17 h. The resulting crude product was initially purified by flash column chromatography using EtOAc (100%) as eluent. Subsequently, the residue was repurified with CH_2Cl_2/acetone (80:20) as the eluent, yielding the major product (3*R*,5*S*)-**8** (38 mg, 48%) as a crystalline white solid, which was recrystallized from CH_2Cl_2/hexanes. Mp 130–132 °C; $[\alpha]_D^{20}$ +16.3 (*c* 1.0, $CHCl_3$).

The minor compound (3*S*,5*S*)-**7** (13 mg, 17%) was obtained as a light yellow oil; $[\alpha]_D^{20}$ +20.8 (*c* 1.0, $CHCl_3$), and an inseparable mixture of (3*R*,5*S*)-**8** and (3*S*,5*S*)-**7** (4 mg, 5%).

Minor Compound (Less Polar) (3*S*,5*S*)-7

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.73 (d, *J* = 15.6 Hz, 3 H, CH_3), 3.85 (d, *J* = 10.5 Hz, 3 H, $(CH_3O)_2P$), 3.90 (d, *J* = 10.7 Hz, 3 H, $(CH_3O)_2P$), 4.28 (dd, *J* = 10.7 Hz, 1 H, CH_2O), 4.38 (ddd, *J* = 10.6, 3.5, 0.8 Hz, 1 H, CH_2O), 4.82 (dt, *J* = 10.7, 2.9 Hz, 1 H, CH), 7.29–7.46 (m, 5 H, H_{arom}).

^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ = 24.6 (CH_3), 53.6 (CH), 54.2 (d, *J* = 7.7 Hz, $(CH_3O)_2P$), 54.6 (d, *J* = 7.3 Hz, $(CH_3O)_2P$), 61.7 (d, *J* = 129.9 Hz, C–P), 75.4 (CH_2O), 127.5, 128.9, 129.0, 137.5, 168.0 (C=O).

^{31}P NMR (202 MHz, $CDCl_3$): δ = 24.3.

HMRS (FAB$^+$): *m*/*z* [M + H]$^+$ calcd for $C_{13}H_{19}NO_5P$: 300.1001; found: 300.1006.

Major Compound (More Polar) (3*R*,5*S*)-8

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.78 (d, *J* = 16.2 Hz, 3 H, CH_3), 3.92 (d, *J* = 10.5 Hz, 3 H, $(CH_3O)_2P$), 3.97 (d, *J* = 10.5 Hz, 3 H, $(CH_3O)_2P$), 4.28 (dd, *J* = 10.3, 3.0 Hz, 1 H, CH_2O), 4.33 (ddd, *J* = 10.4, 3.1, 1.4 Hz, 1 H, CH), 4.52 (dd, *J* = 10.4, 0.2 Hz, 1 H, CH_2O), 7.33–7.48 (m, 5 H, H_{arom}).

^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ = 23.9 (CH_3), 53.8 (d, *J* = 8.8 Hz, CH), 54.9 (d, *J* = 7.7 Hz, $(CH_3O)_2P$), 55.5 (d, *J* = 7.3 Hz, $(CH_3O)_2P$), 61.6 (d, *J* = 163.9 Hz, C–P), 75.0 (CH_2O), 127.6 (C), 129.0, 129.1, 137.2, 168.4 (C=O).

^{31}P NMR (202 MHz, $CDCl_3$): δ = 21.2.

HRMS (FAB$^+$): *m*/*z* [M + H]$^+$ calcd for $C_{13}H_{19}NO_5P$: 300.1001; found: 300.0997.

Dimethyl ((*R*)-1-Hydroxy-2-(((*S*)-2-hydroxy-1-phenylethyl)amino)propan-2-yl)phosphonate [(*R*,*S*)-9]

A solution of (3*R*,5*S*)-**8** (76 mg, 0.25 mmol) in THF (4 mL) at 0 °C was treated with $NaBH_4$ (38 mg, 1.00 mmol). MeOH (2 mL) was added dropwise and the reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. The solvents were evaporated under reduced pressure and the residue was dissolved in EtOAc (7 mL) and then washed with brine (3 × 7 mL). The organic layer was dried over Na_2SO_4, filtered and evaporated. The crude product was purified by flash chromatography using EtOAc/MeOH (90:10) as the eluent, yielding product (*R*,*S*)-**9** (73 mg, 97%) as a crystalline white solid.

Mp 75–77 °C; $[\alpha]_D^{20}$ +40.0 (*c* 1.0, $CHCl_3$).

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.07 (d, *J* = 16.5 Hz, 3 H, CH_3), 1.22–1.28 (m, 1 H, NH), 3.42–3.49 (m, 1 H, CH_2OH), 3.61–3.73 (m, 3 H, CH_2OH), 3.75 (d, *J* = 10.4 Hz, 3 H, $(CH_3O)_2P$), 3.83 (d, *J* = 10.2 Hz, 3 H, $(CH_3O)_2P$), 4.11 (dd, *J* = 9.7, 4.0 Hz, H, CH), 7.24 (t, *J* = 7.3 Hz, H, H_{arom}), 7.32 (t, *J* = 7.6 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.36–7.42 (m, 2 H, H, H_{arom}).

^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ = 18.22 (CH_3), 53.0 (d, *J* = 7.7 Hz, $(CH_3O)_2P$), 54.3 (d, *J* = 7.3 Hz, $(CH_3O)_2P$), 58.2 (d, *J* = 11.4 Hz, CH), 59.0 (d, *J* = 152.6 Hz, C–P), 64.2 (d, *J* = 4.5 Hz, CH_2OH), 68.1 (CH_2OH), 127.1, 127.4, 128.6, 143.3.

^{31}P NMR (202 MHz, $CDCl_3$): δ = 31.0.

HRMS (FAB$^+$): *m*/*z* [M + H]$^+$ calcd for $C_{13}H_{23}NO_5P$: 304.1314; found: 304.1291.

(*R*)-Dimethyl (2-(Amino)-1-hydroxypropan-2-yl)phosphonate [(*R*)-5]

A mixture of (*R*,*S*)-**9** (73 mg, 0.24 mmol) and 20% $Pd(OH)_2$/C (w/w) (15 mg) in MeOH (4 mL) was stirred under a H_2 atmosphere at room temperature for 24 h. The crude product was filtered through Celite and washed with MeOH. The resulting mixture was evaporated under

Downloaded by: Universidad National Autonoma de Mexico (UNAM). Copyrighted material.

© 2025. Thieme. All rights reserved.

reduced pressure and the residue was purified by flash column chromatography using EtOAc/MeOH (80:20) as the eluent, yielding product (*R*)-**5** (41 mg, 94%) as a colorless oil.

$[\alpha]_D^{20}$ –3.2 (*c* 1.0, MeOH).

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.35 (d, *J* = 16.3 Hz, 3 H, CH_3), 3.64 (dd, *J* = 19.8, 11.7 Hz, 1 H, CH_2OH), 3.80 (dd, *J* = 23.2, 7.7 Hz, 1 H, CH_2OH), 3.91 (d, *J* = 10.4 Hz, 3 H, $(CH_3O)_2P$), 3.93 (d, *J* = 10.6 Hz, 3 H, $(CH_3O)_2P$).

^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ = 19.3 (CH_3), 53.7 (d, *J* = 149.1 Hz, C–P), 54.0 (d, *J* = 7.5 Hz, $(CH_3O)_2P$), 54.1 (d, *J* = 7.4 Hz, $(CH_3O)_2P$), 66.5 (d, *J* = 3.7 Hz, CH_2OH).

^{31}P NMR (202 MHz, $CDCl_3$): δ = 33.7.

HRMS (FAB$^+$): *m*/*z* [M + H]$^+$ calcd for $C_5H_{15}NO_4P$: 184.0739; found: 184.0744.

Dimethyl ((3*S*,5*R*)-3-Methyl-2-oxo-5-phenylmorpholin-3-yl)phosphonate [(3*S*,5*R*)-10] and Dimethyl ((3*R*,5*R*)-3-Methyl-2-oxo-5-phenylmorpholin-3-yl)phosphonate [(3*R*,5*R*)-11]

The imine (*R*)-**6** (50 mg, 0.26 mmol) in MeCN (2 mL) at 0 °C was treated with CbzCl (50 mg, 0.04 mL, 0.29 mmol) and stirred for 30 min. After this time, trimethyl phosphite (0.03 mL, 0.29 mmol) was added and the mixture was stirred at room temperature for 17 h. The resulting crude product was initially purified by flash column chromatography using EtOAc (100%) as the eluent. Subsequently, the residue was repurified with CH_2Cl_2/acetone (80:20) as the eluent, yielding the major compound (3*S*,5*R*)-**10** (24 mg, 31%) as a crystalline white solid, which was recrystallized from a CH_2Cl_2/hexanes mixture. Mp 130–132 °C; $[\alpha]_D^{20}$ +16.7 (*c* 1.0, $CHCl_3$).

The minor compound (3*R*,5*R*)-**11** (8 mg, 10%) was obtained as a light yellow oil; $[\alpha]_D^{20}$ +19.8 (*c* 1.0, $CHCl_3$), and an inseparable mixture of (3*S*,5*R*)-**10** and (3*R*,5*R*)-**11** (23 mg, 29%).

Major Compound (3*S*,5*R*)-10

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.78 (d, *J* = 16.2 Hz, 3 H, CH_3), 1.88 (br s, 1 H, NH), 3.92 (d, *J* = 10.5 Hz, 3 H, $(CH_3O)_2P$), 3.97 (d, *J* = 10.5 Hz, 3 H, $(CH_3O)_2P$), 4.28 (dt, *J* = 10.4, 3.1 Hz, 1 H, CH_2O), 4.33 (ddd, *J* = 10.5, 3.2, 1.4 Hz, 1 H, CH), 4.52 (dd, *J* = 10.5, 0.2 Hz, H, CH_2O), 7.31–7.49 (m, 5 H, Ph).

^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ = 23.2 (CH_3), 53.9 (d, *J* = 8.6 Hz, CH), 54.9 (d, *J* = 7.7 Hz, $(CH_3O)_2P$), 55.4 (d, *J* = 7.3 Hz, $(CH_3O)_2P$), 61.5 (d, *J* = 163.5 Hz, C–P), 75.1 (CH_2O), 127.5, 129.0, 129.1, 137.1, 168.4 (C=O).

^{31}P NMR (202 MHz, $CDCl_3$): δ = 21.2.

HRMS (FAB$^+$): *m*/*z* [M + H]$^+$ calcd for $C_{13}H_{19}NO_5P$: 300.1001; found: 300.1017.

Minor Compound (3*R*,5*R*)-11

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.73 (d, *J* = 15.6 Hz, 3 H, CH_3), 2.50 (d, *J* = 12.0 Hz, 1 H, NH), 3.85 (d, *J* = 10.5 Hz, 3 H, $(CH_3O)_2P$), 3.90 (d, *J* = 10.6 Hz, 3 H, $(CH_3O)_2P$), 4.28 (dd, *J* = 10.7, 0.05 Hz, 1 H, CH_2O), 4.38 (ddd, *J* = 8.8, 2.8, 0.7 Hz, 1 H, CH_2O), 4.82 (dt, *J* = 9.0, 2.4 Hz, 1 H, CH), 7.32–7.46 (m, 5 H, Ph).

^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ = 24.6 (CH_3), 53.6 (CH), 54.2 (d, *J* = 7.6 Hz, $(CH_3O)_2P$), 54.6 (d, *J* = 7.2 Hz, $(CH_3O)_2P$), 61.6 (d, *J* = 130.0 Hz, C–P), 75.4 (CH_2O), 127.5, 128.9, 129.0, 137.5, 168.0 (C=O).

^{31}P NMR (202 MHz, $CDCl_3$): δ = 24.2.

HRMS (FAB$^+$): *m*/*z* [M + H]$^+$ calcd for $C_{13}H_{19}NO_5P$: 300.1001; found: 300.0993.

Dimethyl ((*S*)-1-Hydroxy-2-(((*R*)-2-hydroxy-1-phenylethyl)amino)propan-2-yl)phosphonate [(*S*,*R*)-12]

A solution of (3*S*,5*R*)-**10** (48 mg, 0.16 mmol) in THF (4 mL) at 0 °C was treated with $NaBH_4$ (24 mg, 0.64 mmol). MeOH (1 mL) was added dropwise and the reaction mixture was stirred at 25 °C for 1 h. The solvents were evaporated under reduced pressure and the residue was dissolved in EtOAc (7 mL) and then washed with brine (3 × 7 mL). The organic layer was dried over Na_2SO_4, filtered and evaporated. The crude product was purified by flash chromatography using EtOAc/MeOH (90:10) as the eluent, yielding product (*S*,*R*)-**12** (46 mg, 95%) as a white crystalline solid.

Mp 74–76 °C; $[\alpha]_D^{20}$ +41.0 (*c* 1.0, $CHCl_3$).

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.08 (d, *J* =16.5 Hz, 3 H, CH_3), 3.46 (dd, *J* = 11.0, 9.6, 1 H, CH_2OH), 3.59–3.73 (m, 3 H, CH_2OH), 3.75 (d, *J* = 10.4 Hz, 3 H, $(CH_3O)_2P$), 3.83 (d, *J* = 10.2 Hz, 3 H, $(CH_3O)_2P$), 4.11 (dd, *J* = 9.5, 4.4 Hz, 1 H, CH), 7.24 (t, *J* = 7.2 Hz, 1 H, H_{arom}), 7.32 (t, *J* = 7.6 Hz, 2 H, H_{arom}), 7.37–7.40 (m, 2 H, H_{arom}).

^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ = 18.0 (CH_3), 52.9 (d, *J* = 8.2 Hz, $(CH_3O)_2P$), 54.3 (d, *J* = 7.3 Hz, $(CH_3O)_2P$), 58.0 (d, *J* = 11.4 Hz, CH), 58.9 (d, *J* = 152.6 Hz, C–P), 64.0 (d, *J* = 4.5 Hz, CH_2OH), 68.0 (CH_2OH), 127.1, 127.4, 128.5, 143.0.

^{31}P NMR (202 MHz, $CDCl_3$): δ = 31.0.

HMRS (FAB$^+$): *m*/*z* [M + H]$^+$ calcd for $C_{13}H_{23}NO_5P$: 304.1314; found: 304.1291.

Dimethyl (*S*)-(2-Amino-1-hydroxypropan-2-yl)phosphonate [(*S*)-5]

A mixture of (*S*,*R*)-**12** (46 mg, 0.15 mmol) and 20% $Pd(OH)_2$/C (10 mg) in MeOH (5 mL) was stirred under a hydrogen atmosphere at 25 °C for 24 h. The crude product was filtered through Celite and washed with MeOH. The resulting mixture was evaporated under reduced pressure and the residue was purified by flash column chromatography using EtOAc/MeOH (80:20) as the eluent, yielding product (*S*)-**5** (26 mg, 95%) as a colorless oil.

$[\alpha]_D^{20}$ +2.8 (*c* 1.0, MeOH).

^{1}H NMR (500 MHz, CD_3OD): δ = 1.17 (d, *J* = 16.5 Hz, 3 H, CH_3), 3.46 (dd, *J* = 19.8, 11.7 Hz, 1 H, CH_2OH), 3.55–3.65 (m, 1 H, CH_2OH), 3.72 (d, *J* = 10.4 Hz, 3 H, $(CH_3O)_2P$), 3.93 (d, *J* = 10.4 Hz, 3 H, $(CH_3O)_2P$).

^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD): δ = 18.9 (CH_3), 53.7 (d, *J* = 148.5 Hz, C–P), 54.0 (d, *J* = 7.7 Hz, $(CH_3O)_2P$), 54.1 (d, *J* = 7.7 Hz, $CH_3O)_2P$), 66.5 (d, *J* = 3.2 Hz, CH_2OH).

^{31}P NMR (202 MHz, CD_3OD): δ = 33.7.

HMRS (FAB$^+$): *m*/*z* [M + H]$^+$ calcd for $C_5H_{15}NO_4P$: 184.0739; found: 184.0742.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Funding Information

The authors thank the Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) for financial support (Projects 286614, 140607). E. B.-V. would like to thank CONAHCYT for a graduate scholarship (884123).

Acknowledgment

The authors thank the Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas (LANEM) of CIQ-UAEM.

© 2025. Thieme. All rights reserved.

Downloaded by: Universidad National Autonoma de Mexico (UNAM). Copyrighted material.

Supporting Information

Supporting information for this article is available online at https://doi.org/10.1055/a-2506-0261.

References

(1) (a) Zhang, Y.; Vanderghinste, J.; Wang, J.; Das, S. *Nat. Commun.* **2024**, *15*, 1474. (b) Cativiela, C.; Ordoñez, M.; Viveros-Ceballos, J. L. *Tetrahedron* **2020**, *76*, 130875. (c) Cativiela, C.; Ordoñez, M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 1. (d) Vogt, H.; Bräse, S. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 406. (e) Cativiela, C.; Diaz-de-Villegas, M. D. *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 569.

(2) Representative references: (a) Wang, X.; Li, J.; Hayashi, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144*, 10145. (b) Leonard, D. J.; Zieleniewski, F.; Wellhofer, I.; Baker, E. G.; Ward, J. W.; Woolfson, D. N.; Clayden, J. *Chem. Sci.* **2021**, *12*, 9386. (c) Venkatraman, J.; Shankaramma, S. C.; Balaram, P. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3131. (d) Tanaka, M. *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, *55*, 349. (e) Ohfune, Y.; Shinada, T. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 5127.

(3) Representative references: (a) Passley, K. D.; Ruble, J. C.; Kerr, M. S.; Organ, M. G. *J. Org. Chem.* **2024**, *89*, 3211. (b) Castro, T. G.; Melle-Franco, M.; Sousa, C. E. A.; Cavaco-Paulo, A.; Marcos, J. C. *Biomolecules* **2023**, *13*, 981. (c) Devillers, E.; Chelain, E.; Dalvit, C.; Brigaud, T.; Pytkowicz, J. *ChemBioChem* **2022**, *23*, e202100470. (d) Ding, Y.; Ting, J. P.; Liu, J.; Al-Azzam, S.; Pandya, P.; Afshar, S. *Amino Acids* **2020**, *52*, 1207. (e) Walsh, C. T.; O'Brien, R. V.; Khosla, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 7098.

(4) Goering, A. W.; McClure, R. A.; Doroghazi, J. R.; Albright, J. C.; Haverland, N. A.; Zhang, Y.; Ju, K.-S.; Thomson, R. J.; Metcalf, W. W.; Kelleher, N. L. *ACS Cent. Sci.* **2016**, *2*, 99.

(5) Zhang, X.; King-Smith, E.; Renata, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 5037.

(6) (a) Wang, H.-F.; Ma, G.-H.; Yang, S.-B.; Han, R.-G.; Xu, P.-F. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 1630. (b) Nakano, K.; Kotsuki, H.; Ichikawa, Y. *Org. Prep. Proced. Int.* **2008**, *40*, 67.

(7) Miller, E. D.; Kauffman, C. A.; Jenesen, P. R.; Fenical, W. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 323.

(8) (a) Fu, J.; Xu, P.; Yu, P. *Chin. J. Chem.* **2021**, *39*, 2679. (b) Bloch, A.; Coutsogeorgopoulos, C. *Biochemistry* **1966**, *5*, 3345.

(9) Representative references: (a) Xiao, Q.; Tang, Y.-F.; Xie, P. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2020**, *22*, 61. (b) Wu, H.-M.; Zhang, Z.; Xiao, F.; Wei, L.; Dong, X.-Q.; Wang, C.-J. *Org. Lett.* **2020**, *22*, 4852. (c) Yamamoto, K.; Ishimaru, S.; Oyama, T.; Tanigawa, S.; Kuriyama, M.; Onomura, O. *Org. Process Res. Dev.* **2019**, *23*, 660. (d) Anson, M. S.; Clark, H. F.; Evans, P.; Fox, M. E.; Graham, J. P.; Griffiths, N. N.; Meek, G.; Ramsden, J. A.; Roberts, A. J.; Simmonds, S.; Walker, M. D.; Willet, M. *Org. Process Res. Dev.* **2011**, *15*, 389. (e) Smith, N. D.; Wohlrab, A. M.; Goodman, M. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 255. (f) Nakayama, K.; Maruoka, K. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 5461. (g) Avenoza, A.; Cativiela, C.; Corzana, F.; Peregrina, J. M.; Sucunza, D.; Zurbano, M. M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 949. (h) Alias, M.; Cativiela, C.; Díaz-de-Villegas, M. D.; Gálvez, J. A.; Lapefia, Y. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 14963.

(10) For excellent reviews, see: (a) Mucha, A.; Kafarski, P.; Berlicki, L. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 5955. (b) Orsini, F.; Sello, G.; Sisti, M. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 264. (c) Naydenova, E. D.; Todorov, P. T.; Troev, K. D. *Amino Acids* **2010**, *38*, 23. (d) Gluza, K.; Kafarski, P. *Transition State Analogues of Enzymatic Reaction as Potential Drugs*, In *Drug Discovery*; El-Shemy, H., Ed.; InTech: Rijeka, **2013**, 325–372. (e) Lejczak, B.; Kafarski, P. *Top. Heterocycl. Chem.* **2009**, *20*, 31.

(11) (a) Ordoñez, M.; Viveros-Ceballos, J. L.; Sayago, F. J.; Cativiela, C. *Synthesis* **2017**, *49*, 987. (b) Ordoñez, M.; Viveros-Ceballos, J. L.; Romero-Estudillo, I. *Stereoselective Synthesis of α-Aminophosphonic Acids through Pudovik and Kabachnik–Fields Reaction*, In *Amino Acid - New Insights and Roles in Plant and Animal*; Asao, T.; Asaduzzaman, Md., Ed.; InTech: Rijeka, **2017**, 127–151. (c) Viveros-Ceballos, J. L.; Ordoñez, M.; Sayago, F. J.; Cativiela, C. *Molecules* **2016**, *21*, 1141. (d) Ordoñez, M.; Viveros-Ceballos, J. L.; Cativiela, C.; Sayago, F. J. *Tetrahedron* **2015**, *71*, 1745. (e) Ordoñez, M.; Viveros-Ceballos, J. L.; Cativiela, C.; Arizpe, A. *Curr. Org. Synth.* **2012**, *9*, 310. (f) Ordoñez, M.; Rojas-Cabrera, A.; Cativiela, C. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 17.

(12) (a) Mayorquín-Torres, M. C.; Simoens, A.; Bonneure, E.; Stevens, C. V. *Chem. Rev.* **2024**, *124*, 7907. (b) Amira, A.; Aouf, Z.; K'tir, H.; Chemam, Y.; Ghodbane, R.; Zerrouki, R.; Aouf, N.-E. *ChemistrySelect* **2021**, *6*, 6137. (c) Varga, P. R.; Keglevich, G. *Molecules* **2021**, *26*, 2511. (d) Herrera, R. P. *Chem. Rec.* **2017**, *17*, 833. (e) Ali, T. E.; Abdel-Kariem, S. M. *ARKIVOC* **2015**, *(vi)*, 246. (f) Kudzin, Z. H.; Kudzin, M. H.; Drabowicz, J.; Stevens, C. V. *Curr. Org. Chem.* **2011**, *15*, 2015. (g) Merino, P.; Marqués López, E.; Herrera, R. P. *Synth. Catal.* **2008**, *350*, 1195.

(13) (a) Hammerschmidt, F.; Lindner, W.; Wuggenig, F.; Zarbl, E. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 2955. (b) Smith, A. B. III.; Yager, K. M.; Taylor, C. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10879. (c) Huber, R.; Knierzinger, A.; Obrecht, J.-P.; Vasella, A. *Helv. Chim. Acta* **1985**, *68*, 1730. (d) Lejczak, B.; Kafarski, P.; Soroka, M.; Mastalerz, P. *Synthesis* **1984**, 577.

(14) (a) Morales-Solís, J. C.; Ordoñez, M.; Viveros-Ceballos, J. L. *Synthesis* **2024**, *56*, 2588. (b) Hernández-Benítez, R. I.; Viveros-Ceballos, J. L.; Labastida-Galván, V.; Ordoñez, M. *J. Org. Chem.* **2024**, *89*, 4916. (c) Morales-Solís, J. C.; Ordóñez, M.; Argüello-Velasco, R. O.; Viveros-Ceballos, J. L.; Labastida-Galván, V. *Synthesis* **2024**, *56*, 871. (d) Ordóñez, M.; Argüello-Velasco, R. O.; Miranda-Blancas, T.; Romero-Estudillo, I.; Labastida-Galván, V. *Synthesis* **2023**, *55*, 4181. (e) Argüello-Velasco, R. O.; Morales-Solís, J. C.; Muñoz-Vidales, M.; Viveros-Ceballos, J. L.; Romero-Estudillo, I.; Ordoñez, M. *Amino Acids* **2022**, *54*, 299. (f) Viveros-Ceballos, J. L.; Matías-Valdez, L. A.; Sayago, F. J.; Cativiela, C.; Ordoñez, M. *Amino Acids* **2021**, *53*, 451.

(15) (a) Bedolla-Medrano, M.; Hernández-Fernández, E.; Ordoñez, M. *Synlett* **2014**, *25*, 1145. (b) Cervera-Villanueva, J. M. J.; Viveros-Ceballos, J. L.; Ordoñez, M. *Heteroat. Chem.* **2017**, *28*, 21398.

(16) Wu, M. S.; Zhang, X. Z. *J. Chem. Res.* **2008**, 562.

(17) (a) Hancu, G.; Modroiu, A. *Pharmaceuticals* **2022**, *15*, 240. (b) Nguyen, L. A.; He, H.; Pham-Huy, C. *Int. J. Biomed. Sci.* **2006**, *2*, 85.

(18) Romero-Estudillo, I.; Viveros-Ceballos, J. J.; Cazares-Carreño, O.; González-Morales, A.; Flores de Jesús, B.; López-Castillo, M.; Razo-Hernández, R. S.; Castañeda-Corral, G.; Ordoñez, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, *27*, 2376.

(19) Martínez-Toto, E. I.; Ordoñez, M.; Morales-Solís, J. C.; Flores-Alamo, M. *Eur. J. Org. Chem.* **2022**, e202200461.

(20) (a) Hernández-Moreno, J. T.; Romero-Estudillo, I.; Cativiela, C.; Ordoñez, M. *Synthesis* **2020**, *52*, 769. (b) Ordoñez, M.; Arizpe, A.; Sayago, F.; Jiménez, A.; Cativiela, C. *Molecules* **2016**, *21*, 1140.

(21) (a) Pigza, J. A.; Molinski, T. F. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 1256. (b) Cox, G. G.; Harwood, L. M. *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, *5*, 1669.

© 2025. Thieme. All rights reserved.

Downloaded by: Universidad National Autonoma de Mexico (UNAM). Copyrighted material.

(22) (a) Pietro, W. J.; Hehre, W. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 3594. (b) Vincze, D.; Ábrányi-Balogh, P.; Bagi, P.; Keglevich, G. *Molecules* **2019**, *24*, 3859.
(23) (a) Pudovik, A. N.; Konovalova, I. V. *Synthesis* **1979**, 81. (b) Pudovik, A. N. *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **1952**, *83*, 865.
(24) Onomura, O.; Kirira, P. G.; Tanaka, T.; Tsukada, S.; Matsumura, Y.; Demizu, Y. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 7498.
(25) Harwood, L. M.; Vines, K. J.; Drew, M. G. B. *Synlett* **1996**, 1051.

Downloaded by: Universidad National Autonoma de Mexico (UNAM). Copyrighted material.

© 2025. Thieme. All rights reserved.

Cuernavaca, Mor., a 28 de mayo de 2025

DRA. LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO
COORDINADORA DEL POSGRADO EN CIENCIAS

P R E S E N T E

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la tesis titulada: Evaluación *in silico* y síntesis de α-aminofosfonatos heterocíclicos como potenciales inhibidores de las COXs, que presenta la M. en C. Estefany Bello Vargas (10019222) para obtener el título de Doctorado en Ciencias.

Director de tesis: Dr. José Mario Ordoñez Palacios
Codirector de tesis: Dr. Rodrigo Said Razo Hernández
Unidad Académica: Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas (IICBA)

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dra. Verónica Rodríguez López Facultad de Farmacia-UAEM	APROBADO	
Dra. Angélica Berenice Aguilar Guadarrama CIQ-UAEM	APROBADO	
Dr. José Luis Viveros Ceballos CIQ-UAEM	APROBADO	
Dr. Luis Chacón García UMSNH	APROBADO	
Dr. Iván Omar Romero Estudillo Cátedra SECIHTI-CIQ-UAEM	APROBADO	
Dra. María Crystal Columba Palomares Facultad de Farmacia-UAEM	APROBADO	
Dr. José Mario Ordoñez Palacios CIQ-UAEM	APROBADO	

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANÓ INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

JOSE MARIO ORDOÑEZ PALACIOS | Fecha:2025-05-28 14:21:48 | FIRMANTE

2ZwN2fao1piGX+XBwG124LfZ81xYIeIiAzg1rD+VoX0F8PhaO2HBUhB3wVT5I45AHSC+TuwPwL4qcwftpVpXJNzvI6lY+4nIWaK843+VfSb+moIHasPo1YMMY5Oiur0CUJd3to7AiK0vjvcF3CPKYM6bvl140GamuL1cV2wNrqtnY19VHQsBqcH0deX++b/6kPge+28Z63311ThQudJ2KIQkdn7JygZ5ZQxVwFE/tjtGRnMMLQdTzu5L7HKa1VFfYlxu6dWVmZ9IlMuykyO/YlIUp/9yz3edKvnDscKUOf3TQrBd2qlLZH0EUSpxZnF5r34WRfjTwtQnrDDpBXg4WQ==

VERONICA RODRIGUEZ LOPEZ | Fecha:2025-05-28 14:27:44 | FIRMANTE

M07ObvMYR6AER+xrI7kHOoA5t/Pzrz4CzF3evb2NrUOPN9OY9Xw9d5iDaFgqCLWcnhkJ09V+4cpA6OkMlrCUm0udnps5A+umv+SwaeB9we24hkZjCsnOVYMzwk+b84VxqUluvJYbuz13Y0SDcYCIvGAtBxlSod9ZyaX5Hb95HhYFNjsIy3Nu9GJWmfG3gb8G79zmFF4rMxKIwPUskdA9NqZGXyHp3nxrsGEzJnqe/qL22Byv6nldSbFUhhNldpLepimFvmI1wJikhRtSkKrWgJ76vpuWCg3b3gII8Dzwc80GO5PcQFjTyCTvjPwSTp+PWLwICha2SIiApsPVUqeR8Q==

ANGELICA BERENICE AGUILAR GUADARRAMA | Fecha:2025-05-28 14:34:33 | FIRMANTE

QAw5ROsdyjDiLhr1ZJg7qxewDWyXm2UdMAOORh/2v3nh6fwd2Dpo6/PKS00q0aZGlk4XBYVQC9jQOGte1+fuRExbmJzdb3EQjF+dltff2BiAb3pSeCzQqR3/bxc9wChrs+TkIfsdDgnxkCS9PDyFvJPdoUOJK+mppAf+bKUUJk1LVnu5NTOuwgpWPtA31wZGyEc2shQ7Q/ImIRFWlG8fUbOKY4Rl+nNWWa0gCluTfMFk3i44+a3sYb8K6N9UcJlpE1crJjmImWmhgr63V6JsYsuLIZlgTG5H9meuiwjgYG+VoQQyMJG644dtB16Rm6qQJNcFsYkgvBoCU8yAzju1eQ==

JOSE LUIS VIVEROS CEBALLOS | Fecha:2025-05-28 14:39:06 | FIRMANTE

jw3YWLm1Jqt9B9EFeXWXLhdIb4WLRJp8W5GY13kz6/e9NS6NeNNC5WyYAlUfs7xZ8Tuyx7NA3pkUBD/SC0vv260xA8b2BpswCNlsc1ckN+VuF+thfMX2kAxQmJMGI9QTI4r8yRq9LHIzENZ100IIBCDPT1U76VIMH+Axg3ebidBcvjQAVJ5M7yDKUzISliRUJj8eSAuQhgrAkLu0f6Rmzc1BttVM4GmqtHydcF9iURwrBGkDsMh0V6+0YjnaJM/iliQdznku5mYwSKxQCUrxyhcJ6P1Lur1JQ7IJ95W/SLFohdaIQgNHVY7JfvojAfYklCX5rBJhlfqGcJNVu7w6+g==

IVAN OMAR ROMERO ESTUDILLO | Fecha:2025-05-28 14:58:59 | FIRMANTE

bpTPebuJKSI9QfOchqGXo98AGVpsN/U8P0x0iAllojDlXe7+Q64j844rjlrj9voVdYrmM5EG6bXVTZsHMxDt38cUzTnOll0dAngXTz43LbzIWem9oAGuES2UIx86vyIcwOIBohFoNYrqvo8e9Afop8Vzq69dewKKqsNxS5KsdjcEQWCvSbXe5aQt4o3htBGdy3xz4WA6gJRs89V4nqP3pqGDjqXcdqACS1/NOvAZHbOJCsMuizBde2VegQI136PWRh4FH9C1pZDekqhq8QXpcVS0W+Ye68YrIdRR6ZpI33/qJZOrUyTKgakXJ7iI4cI31FgqiehsLOfDq7MCY/H8wA==

MARIA CRYSTAL COLUMBA PALOMARES | Fecha:2025-05-28 15:12:54 | FIRMANTE

CDuJeSt/TamA9MJUN1qmD+k0qYoAPzLzW4ibD+4llHILZMUVgcsXQxYQreMEvUE+4gyUwrf0TOt4oldNCWixYbLMl7muWEWOiqf2v7xlL7SKN4aAqDE832fDGhb//FniXBxyc7A2M+p30a+WZDfTdgw2SHlasQWTxKy25fwoSzC0UoRA6PSE4EGuy06B9E9qtIAngripVDzxvMwv2bqZZrpi5IvJaOdxBXauxbKFSZBYKPO/fggmdTECivURrTDSiqF3KPNKKnudc4xi1XTtV3+0uJJ4mL+n0xy3hpdtj/5s8DLiOC6ZYhjWAmvrXWSYXsFmo1/ACQNCuvinDCPlLA==

LUIS CHACÓN GARCÍA | Fecha:2025-05-29 10:22:34 | FIRMANTE

j01sC7s7s+Ah3wksLZOeCr7NTJOv6IIGWX6QwquOCCwY2mGHo8dpQsQa9qpJN1lhT0+ppwQL1BeXGrjlop3KQd7UTJW5BuMtd+FP29aEhtTBXDGA/fSmQN9DBRN0MdQjMnHOxOefzd6U0bDLlPxFzT3WjCm+Q9E2HrT7GueV8P52JatlkE32J+FTOMli4oZLC0QwrsNNgkLvzDyQYPsYUla/RKkLEbM+e8dXfdVxP+vW0tQq3xOOG7SfOKRDYnXvGFN6xQAa3ZvyjzCFLhyuyGpt9EiFJjxwVQXQPcm8W72Eqa0ExPCs8MYjTN03lSYPT/+oIBfJgD++Gg40Aw1qhA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

qkbgjO2y3

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/MJrurQvGoX6tmm4mf9XfqAsSWqTKWugv