

Departamento de Química Orgánica



**DISEÑO, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA
DE COMPUESTOS CON POTENCIAL ACTIVIDAD
ANTIMALÁRICA Y ANTITUMORAL**

Programa de doctorado en Química

Directores: Ana C. Cuñat Romero, Juan F. Sanz Cervera,
Juan Alberto Marco Ventura

Tesis Doctoral

Víctor Blasco Cabañas

Burjassot (Valencia), Mayo 2017

Dra. Dña. Ana Carmen Cuñat Romero, Profesora titular de Química Orgánica del departamento de Química Orgánica de la Universidad de Valencia,

Dr. D. Juan Francisco Sanz Cervera, Catedrático de Química Orgánica del departamento de Química Orgánica de la Universidad de Valencia, y

Dr. D. Juan Alberto Marco Ventura, Catedrático de Química Orgánica del departamento de Química Orgánica de la Universidad de Valencia.

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral, titulada **“Diseño, síntesis y evaluación biológica de compuestos con potencial actividad antimalárica y antitumoral”** ha sido realizada bajo su dirección en el departamento de Química Orgánica de la Universidad de Valencia, por el licenciado en Química **D. Víctor Blasco Cabañas** y autorizan su defensa para que sea calificada como Tesis Doctoral.

Burjassot (Valencia), 2017

Fdo. Ana C. Cuñat Romero

Fdo. Juan F. Sanz Cerverza

Fdo. Juan A. Marco Ventura

El tiempo es el mejor autor, siempre encuentra un final perfecto

Charles Chaplin

AGRADECIMIENTOS

Echando la vista atrás, parece que fue ayer cuando se inició esta carrera de fondo cuya meta no hubiera podido alcanzar, sin el apoyo de tanta gente que ha aportado su granito de arena y ha estado presente durante esta etapa de mi vida.

En primer lugar he de comenzar dando las gracias a los directores de esta Tesis, al Dr. J. Alberto Marco, por su inestimable ayuda y entera dedicación, a la Dra. Ana Cuñat, por su gran apoyo y por estar siempre dispuesta a enseñarme y al Dr. Juan Fco. Sanz, por su confianza y buenos consejos.

A la Generalitat Valenciana y al Ministerio de Educación, por la concesión de la beca predoctoral Vali+d (2013-2014) y FPU (2014-2017).

A la empresa multinacional GlaxoSmithKline (GSK) por brindarnos la oportunidad de colaborar en el desarrollo de un proyecto de tal envergadura, llevando a cabo los ensayos biológicos de los compuestos sintetizados. En especial agradecer a Maria Luisa León su ayuda, disponibilidad y buenos consejos.

A la empresa Fibrostatin S.L. por la colaboración establecida y por la realización del análisis biológico de los derivados preparados. En especial agradecer al Dr. Juan Saus el ofrecernos la oportunidad de incorporarnos al desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Miguel Carda, a la Dra. Eva Falomir y al Dr. Juan Murga de la universidad Jaume I de Castellón, por su gran ayuda y disponibilidad. Especialmente agradecer a la Dra. Eva Falomir la realización del análisis biológico de los derivados preparados.

Me gustaría agradecer la confianza, amistad y buenos momentos a mis compañeros de la "5º planta". A Javi, Ruth, Dani, Hyden, Eric, Guillermo, Amparo, Marc, Lode, Andrea, Miguel, Alicia, Meli y especialmente a Carlos, por toda su ayuda e ideas brillantes, "ha sigut un plaer amic."

Dedicar este párrafo a mis compañeros de vitrina y de laboratorio Judith, Salva, Adrian y especialmente a Ana y Nuria. Siempre me he sentido como en casa, apoyado, valorado y pese a todos los momentos de estrés, nunca me he sentido sólo. Gracias por escucharme y por todos esos ratos irrepetibles intentando cambiar el mundo. Al Dr. Raúl Blasco, por su gran interés y buenos consejos.

A mis queridos amigos, a la familia que yo he elegido, que han sabido comprenderme, apoyarme y entender la importancia que tenía para mí llevar este barco a buen puerto. Estoy enormemente orgulloso de todos y no puedo expresar con palabras la suerte que tengo de contar con vosotros. Siempre habéis estado presentes desde que tengo memoria y estoy convencido de que amistades tan grandes duran para toda la vida. Gracias chavales.

Me gustaría agradecer de forma más personal a ti, Miguel, siempre has sido un referente para mí, era imposible borrarte la sonrisa, un estupendo compañero y mucho más que un gran amigo. Nunca te olvidaré.

A Nuria, mi cómplice, mi confidente, mi alma gemela. Gracias por subirte a mi montaña rusa, agarrarme fuerte y acompañarme en todo momento sin dejarme caer. Sé que no ha sido fácil y que hemos tenido momentos complicados, pero igualmente preciosos, intensos y cargados de recuerdos inolvidables. Nos queda toda la vida por delante para seguir alcanzando sueños. Gracias corazón.

Por último, debo reportar el mayor agradecimiento a mi familia, a mis padres y a mi hermano, por su apoyo incondicional, por su completa dedicación, por un gran interés y su enorme confianza. Siempre me han aportado la fuerza necesaria para lograr mis objetivos, para no rendirme y ver siempre al parte positiva en los momentos de flaqueza. Sois mi pilar fundamental.

A todos vosotros, gracias de corazón.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	- 5 -
INTRODUCCIÓN GENERAL: QUÍMICA MÉDICA.....	7
1.- QUÍMICA MÉDICA	- 9 -
1.1.- CONCEPTO Y DEFINICIÓN	- 9 -
1.2.- RESEÑA HISTÓRICA	- 9 -
1.3.- DIANAS FARMACOLÓGICAS	- 12 -
1.4.- FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINÁMIA	- 13 -
1.5.- PROCESO DE OBTENCIÓN DE UN FÁRMACO	- 14 -
CAPÍTULO I: DISEÑO, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE COMPUESTOS CON POTENCIAL ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA	17
1.- INTRODUCCIÓN	- 21 -
1.1.- ORIGEN Y DEFINICIÓN	- 21 -
1.2.- VECTOR DE TRANSMISION.....	- 22 -
1.3.- MODO DE ACCIÓN Y CICLO DE VIDA DEL PARÁSITO	- 23 -
1.4.- ALCANCE Y EXTENSIÓN DE LA MALARIA.....	- 24 -
1.5.- ESTRATEGIAS EN DESARROLLO ACTUAL.....	- 27 -
1.5.1.- COMPUESTOS ANTIMALÁRICOS	- 27 -
1.5.2.- VACUNAS	- 30 -
1.5.3.- MEDIDAS PREVENTIVAS Y DE CONTROL.....	- 31 -
1.5.4.- NUEVAS TERAPIAS EN DESARROLLO	- 32 -
1.6.- RESISTENCIA A LOS AGENTES ANTIMALÁRICOS: NECESIDAD DE NUEVOS FÁRMACOS	- 33 -
2.- OBJETIVOS GENERALES	- 39 -
3.- TRABAJO PREVIO: ELECCIÓN DEL <i>HIT</i>.....	- 43 -
3.1.- FAMILIA DE DERIVADOS DE INDOL.....	- 44 -
3.2.- FAMILIA DE DERIVADOS DE TIAZOL	- 45 -
4.- DISEÑO Y SÍNTESIS DE DERIVADOS CON ESQUELETO DE TIPO INDOL	- 49 -
4.1. INTRODUCCIÓN.....	- 49 -
4.1.1.- SÍNTESIS DESCRITAS PARA LA FORMACIÓN DEL SISTEMA DE INDOL.....	- 50 -
4.1.1.1.- Síntesis de indoles de Fischer.....	- 51 -
4.1.1.2.- Síntesis de Leimgruber-Batcho	- 51 -
4.1.2.- REACTIVIDAD DEL INDOL.....	- 52 -
4.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	- 53 -
4.3.- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	- 54 -
5.- DISEÑO Y SÍNTESIS DE DERIVADOS CON ESQUELETO DE TIPO TIAZOL ..	- 59 -
5.1.- INTRODUCCIÓN	- 59 -
5.1.1.- SINTESIS DESCRITAS PARA LA FORMACIÓN DEL NÚCLEO DE TIAZOL.....	- 61 -
5.1.1.1.- Síntesis de Cook-Heilbron.....	- 62 -
5.1.1.2.- Síntesis de Robinson-Gabriel.....	- 62 -
5.1.2.- REACTIVIDAD DEL ANILLO DE TIAZOL.....	- 63 -
5.1.2.1.- Reacción con electrófilos.....	- 63 -
5.1.2.2.- Reacción con nucleófilos.....	- 63 -

5.1.2.3.- Reacción con bases	- 63 -
5.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	- 64 -
5.2.1.- 1ª ALTERNATIVA PROPUESTA (I)	- 64 -
5.2.2.- 2ª ALTERNATIVA PROPUESTA (II)	- 65 -
5.3.- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	- 66 -
5.3.1.- PREPARACIÓN DE DERIVADOS DEL <i>HIT</i> EMPLEANDO LA PRIMERA METODOLOGÍA SINTÉTICA DESCRITA.....	- 71 -
5.3.2.- PREPARACIÓN DE DERIVADOS DEL <i>HIT</i> EMPLEANDO LA SEGUNDA METODOLOGÍA SINTÉTICA DESCRITA.....	- 76 -
6.-PARTE EXPERIMENTAL	- 87 -
6.1.-TÉCNICAS GENERALES	- 87 -
6.2.- PARTE EXPERIMENTAL DE LA FAMILIA DE LOS INDOLES	- 89 -
6.2.1.- PROCEDIMIENTOS GENERALES	- 89 -
6.2.2.- PROCEDIMIENTOS DE SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN	- 90 -
6.3 PARTE EXPERIMENTAL DE LA FAMILIA DE LOS TIAZOLES	- 95 -
6.3.1 PROCEDIMIENTOS GENERALES	- 95 -
6.3.2.- PROCEDIMIENTOS DE SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN	- 98 -
7.- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA	- 121 -
7.1.- ASPECTOS GENERALES	- 121 -
7.1.1.- HIGH THROUGHPUT SCREENING (HTS).....	- 121 -
7.1.2.- ENSAYOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA.....	- 121 -
7.1.3.- METODOLOGÍA GENERAL EMPLEADA	- 122 -
7.2.- RESULTADOS BIOLÓGICOS PARA LA FAMILIA DE LOS INDOLES	- 124 -
7.3.- RESULTADOS BIOLÓGICOS PARA LA FAMILIA DE LOS TIAZOLES.....	- 127 -
7.3.1.- ESTUDIO DE TOXICIDAD DE LOS DERIVADOS OBTENIDOS	- 131 -
7.3.1.1.- Metodología general empleada	- 131 -
7.3.1.2.- Resultados obtenidos.....	- 132 -
8.- CONCLUSIONES	- 135 -
CAPÍTULO II: DISEÑO, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE ANÁLOGOS DE PRODUCTOS NATURALES CON POTENCIAL ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA. 137	
1.- INTRODUCCIÓN	- 141 -
1.1.- CANCER: ORIGEN Y DEFINICIÓN	- 141 -
1.2.- TRATAMIENTOS CONTRA EL CANCER	- 142 -
1.2.1.- INHIBICIÓN DE LA MITOSIS CELULAR.....	- 143 -
1.2.2.- INHIBICIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS	- 145 -
1.2.3.- INHIBICIÓN DE LA ENZIMA TELOMERASA	- 146 -
1.3.- ANTECEDENTES	- 148 -
1.3.1.- COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIMITÓTICA	- 148 -
1.3.2.- COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIANGIOGÉNICA.....	- 149 -
1.3.3 COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTITELOMERASA.....	- 150 -
2.- OBJETIVOS GENERALES.....	- 155 -
3.- TRABAJO PREVIO: ELECCIÓN DEL <i>HIT</i>	- 159 -
3.1.- FAMILIA DE DERIVADOS DE COLQUICINA	- 159 -
3.2.- FAMILIA DE DERIVADOS DE COMBRETASTATINA A-4.....	- 161 -

4.- DISEÑO Y SÍNTESIS DE DERIVADOS DE COLQUICINA	- 167 -
4.1.- INTRODUCCIÓN	- 167 -
4.1.1.- COLQUICINA COMO AGENTE ANTICANCERÍGENO	- 168 -
4.1.2.- ANTECEDENTES Y ESTUDIOS DE ESTRUCTURA-ACTIVIDAD	- 170 -
4.1.3.- PERSPECTIVAS DE FUTURO	- 171 -
4.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	- 172 -
4.3.- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	- 173 -
4.3.1.- FAMILIA DE UREAS DERIVADAS DE COLQUICINA.....	- 173 -
4.3.2.- FAMILIA DE CARBAMATOS DERIVADOS DE COLQUICINA.....	- 185 -
5.-DISEÑO Y SÍNTESIS DE DERIVADOS DE COMBRETASTATINA	- 193 -
5.1.- INTRODUCCIÓN	- 193 -
5.1.1.- COMBRETASTATINA A-4 COMO ANTITUMORAL	- 194 -
5.1.2.- ANTECEDENTES Y ESTUDIOS DE ESTRUCTURA-ACTIVIDAD	- 195 -
5.1.3.- PERSPECTIVAS DE FUTURO	- 196 -
5.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	- 196 -
5.3.- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	- 198 -
6.-PARTE EXPERIMENTAL	- 217 -
6.1.-TÉCNICAS GENERALES	- 217 -
6.2.- PARTE EXPERIMENTAL DE DERIVADOS DE COLQUICINA.....	- 217 -
6.2.1.- PROCEDIMIENTOS GENERALES	- 217 -
6.2.2. PROCEDIMIENTOS DE SÍNTESIS Y CARACTERIZACION.....	- 220 -
6.3.- PARTE EXPERIMENTAL DE DERIVADOS DE COMBRETASTATINA A4	- 248 -
6.3.1.- PROCEDIMIENTOS GENERALES	- 248 -
6.3.2 PROCEDIMIENTOS DE SÍNTESIS Y CARACTERIZACION.....	- 249 -
7.- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA	- 267 -
7.1.- ASPECTOS GENERALES	- 267 -
7.1.1.- METODOLOGÍA, MATERIALES Y EQUIPOS EMPLEADOS.....	- 267 -
7.1.2.- CULTIVOS CELULARES.....	- 267 -
7.1.3.- ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD	- 269 -
7.1.3.1.- Metodología experimental empleada.....	- 270 -
7.1.4.-DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR CONVENCIONAL	- 271 -
7.1.4.1.- Metodología experimental empleada.....	- 271 -
7.1.5.- DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE SECRECIÓN DE VEGF A-165 MEDIANTE ENSAYOS ELISA	- 272 -
7.1.5.1.- Metodología experimental empleada.....	- 273 -
7.1.6.- ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ANTIMITÓTICA	- 274 -
7.1.6.1.- Metodología experimental empleada.....	- 275 -
7.1.7.- ESTUDIO DEL EFECTO SOBRE LAS PROTEÍNAS VEGFR2 y c-Myc.....	- 275 -
7.1.7.1.- Metodología experimental empleada.....	- 276 -
7.2.- RESULTADOS BIOLÓGICOS OBTENIDOS PARA LA FAMILIA DE COLCHICINA....	- 277 -
7.2.1 FAMILIA DE UREAS DERIVADAS DE COLCHICINA	- 277 -
7.2.1.1.- Ensayos de citotoxicidad	- 277 -
7.2.1.2.- Estudio del efecto de los compuestos sobre la expresión génica y la secreción de la proteína VEGF A-165	- 284 -
7.2.1.3.- Estudio del efecto sobre las proteínas VEGFR2 y c-Myc	- 287 -
7.2.1.4.- Ensayos de capacidad antimitótica	- 290 -
7.2.2 FAMILIA DE CARBAMATOS DERIVADOS DE COLCHICINA	- 291 -
7.2.2.1.- Ensayos de citotoxicidad	- 291 -
7.2.2.2.- Estudio del efecto sobre las proteínas VEGFR2 y c-Myc	- 294 -

7.3.- RESULTADOS BIOLÓGICOS OBTENIDOS PARA LA FAMILIA DE LA COMBRETASTATINA A-4.....	- 297 -
7.3.1.- ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD	- 297 -
7.3.2.- ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ANTIMITÓTICA	- 301 -
8.- CONCLUSIONES	- 305 -
CAPÍTULO III: DISEÑO, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE NUEVOS PEPTIDOMIMÉTICOS ACTIVOS.....	307
1.- INTRODUCCIÓN	- 311 -
1.1.-AMINOÁCIDOS, PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS.....	- 311 -
1.2.- PEPTIDOMIMÉTICOS	- 312 -
1.2.1.- ESTRATEGIAS PARA EL DISEÑO DE NUEVOS PEPTIDOMIMÉTICOS.....	- 312 -
1.3.- EL SÍNDROME DE GOODPASTURE	- 314 -
1.3.1.- PROTEÍNA DE UNIÓN AL ANTÍGENO DE GOODPASTURE (GPBP).....	- 315 -
1.4.- AMILOIDOSIS Y SU RELACIÓN CON GPBP	- 315 -
1.5.- OTRAS ENFERMEDADES EN LAS QUE INTERVIENE GPBP: CANCER.....	- 316 -
1.6.- INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD QUINASA DE GPBP	- 317 -
2.- OBJETIVOS GENERALES.....	- 321 -
3.- TRABAJO PREVIO: ELECCIÓN DEL <i>HIT</i>	- 325 -
4.- DISEÑO Y SÍNTESIS DE PEPTIDOMIMÉTICOS CON ESQUELETO DE BENZOILUREA.	- 331 -
4.1.- INTRODUCCIÓN.....	- 331 -
4.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	- 333 -
4.3.- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	- 334 -
5.-PARTE EXPERIMENTAL	- 353 -
5.1.-TÉCNICAS GENERALES	- 353 -
5.2.- PARTE EXPERIMENTAL DE DERIVADOS DE BENZOILUREA.....	- 353 -
5.2.1.- PROCEDIMIENTOS GENERALES	- 353 -
5.2.2 PROCEDIMIENTOS DE SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN	- 357 -
6.- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA	- 377 -
6.1.- ASPECTOS GENERALES	- 377 -
6.1.1.- ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD	- 377 -
6.1.2.- ENSAYOS DE SINERGIA CON DOXORRUBICINA	- 378 -
6.2.- METODOLOGÍA GENERAL EMPLEADA	- 379 -
6.2.1.- PREPARACIÓN DE LAS CÉLULAS PARA LLEVAR A CABO LOS ENSAYOS	- 379 -
6.2.2.- ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD	- 379 -
6.2.3.- ENSAYOS DE SINERGIA CON DOXORRUBICINA.	- 379 -
6.3.- RESULTADOS BIOLÓGICOS OBTENIDOS	- 380 -
6.3.1.- ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD	- 380 -
6.3.2.- ENSAYOS DE SINERGIA CON DOXORRUBICINA	- 383 -
7.- CONCLUSIONES	- 389 -
RESUMEN	- 391 -

ABREVIATURAS

Å	angstrom/10 ⁻¹⁰ m
Ac	acetilo
AcOEt	acetato/etanoato de etilo
AcOH	ácido acético
Ac ₂ O	anhídrido acético
Ar	arilo
Bn	bencilo
Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonilo
Boc ₂ O	dicarbonato de di- <i>tert</i> -butilo
<i>t</i> -Bu	<i>tert</i> -butilo
CA-4	combretastatina A-4
d	días
DCE	1,2-dicloroetano
DIPEA	etil <i>N,N</i> -diisopropilamina
DMAP	4-(dimetilamino)piridina
DME	1,2-dimetoxietano
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
EDCI	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
eq.	equivalentes
Et	etilo
g	gramo
mg	miligramo
GP	grupo protector
GSK	GlaxoSmithKline
h	hora
HPLC	cromatografía líquida de alta eficacia
IsoPr	isopropilo
LADME	(acrónimo): liberación, absorción, distribución, metabolismo y excreción.
LDH	lactato deshidrogenasa
μM	micromolar
nM	nanomolar
M	molar
Me	metilo
μL	microlitros
mL	mililitros
mmol	milimol
MVI	Malaria Vaccine Initiative.
OMS	Organización Mundial de la Salud

p.ej.	por ejemplo
Ph	fenilo
ppm	partes por millón
RMN	resonancia magnética nuclear
Rto	rendimiento
SOCl ₂	cloruro de tionilo
t.a.	temperatura ambiente
t	tiempo de reacción
T	temperatura
TBME	<i>tert</i> -butilmetiléter
TCA	terapia combinada con artemisinina
TFA	ácido trifluoroacético
THF	tetrahidrofurano
TM	tamiz molecular
USFDA	United States Food and Drug Administration

INTRODUCCIÓN GENERAL: QUÍMICA MÉDICA

1.- QUÍMICA MÉDICA

La presente Tesis Doctoral se encuentra inmersa en el marco de la química médica y en ella se discutirán conceptos relacionados con esta disciplina, haciendo especial hincapié en el proceso sintético y en la evaluación biológica de compuestos de diversa naturaleza, que presentan potencial actividad frente a importantes patologías que afectan al organismo humano.

1.1.- CONCEPTO Y DEFINICIÓN

La química médica se refiere al descubrimiento, desarrollo, identificación e interpretación del modo de acción de compuestos biológicamente activos a nivel molecular. Adicionalmente, también estudia la identificación y síntesis de los productos derivados del metabolismo de los fármacos y compuestos relacionados con estos.¹ En otras palabras, se trata de la ciencia que se encarga del diseño y del descubrimiento de nuevos productos químicos biológicamente activos y de su desarrollo en medicamentos útiles, para que su uso posterior sea seguro y eficaz.

La química médica es una ciencia altamente interdisciplinar que combina a la perfección diferentes áreas científicas como la química orgánica, la bioquímica, la química computacional, la farmacología, la biología molecular, la estadística y la química física entre otras. Más concretamente, facilita el estudio y la aplicabilidad de la química orgánica para el desarrollo de diversas sustancias que puedan presentar efectos biológicos sobre el organismo humano.²

Presenta inicialmente los siguientes objetivos:³

- Aislamiento, obtención y caracterización de sustratos con actividad biológica.
- Estudio de las relaciones entre la estructura química de los compuestos y su actividad biológica (SAR).
- Determinación del grado de absorción y distribución del fármaco en el interior del organismo, así como de sus transformaciones metabólicas y excreción (LADME).
- Estudio de sus interacciones sobre receptores, enzimas, u otras dianas farmacológicas. (Farmacodinámica).

1.2.- RESEÑA HISTÓRICA

Desde hace miles de años se conocen gran cantidad de productos naturales que presentan propiedades medicinales para la salud humana, tanto de origen vegetal, animal, como mineral.

¹ IUPAC; *Information Bulletin, Tech. Rep.* **1974**, 13.

² Timmerman, H. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. Elsevier. **2013**, 1-5.

³ Wess, G.; Urmann, M.; Sickenberger, B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 3341-3350.

Las diferentes civilizaciones poseían conocimientos poco contrastados, basados principalmente en su experiencia previa sobre diferentes remedios naturales, pero desconocían el principio activo que ejercía la acción farmacológica. Algunos ejemplos de estos remedios pueden ser el opio (*opium poppy*), empleado con fines analgésicos; la corteza del árbol de la quinina (*Cinchona spp.*) utilizada para el tratamiento de casos febriles graves o la planta *Digitalis purpurea*, empleada para el tratamiento de enfermedades cardíacas.⁴

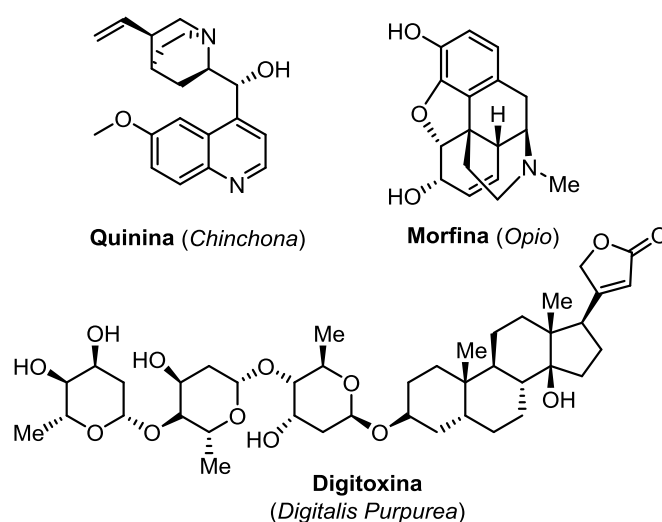


Figura 1.- Estructura del principio activo que se encuentra en estas especies vegetales.

Generalmente fueron utilizados como tratamientos simples hasta que posteriormente, con el impulso de la medicina árabe, se comenzaron a emplear medicamentos compuestos mediante la asociación de diferentes plantas, animales o minerales, para obtener un efecto sinérgico. Desafortunadamente, la mayor parte de la información relativa a estos remedios antiguos no estuvo disponible hasta entrado el siglo XV, con el nacimiento de la imprenta, cuando se crearon las primeras farmacopeas. Aun así, existen diversos textos antiguos que se remontan miles de años atrás donde se recogen algunos de estos principios medicinales, como es el caso del papiro Ebers, que data del año 1500 a.C en el antiguo Egipto.

Desde ese momento, se produjo un rápido incremento en el uso de estos remedios tradicionales y en el estudio exhaustivo de los mismos, sobre todo durante el siglo VII, cuando la maquinaria empleada para su difusión comenzaba a ser considerablemente potente. Durante los siglos posteriores (siglo XVIII, XIX), se realizó una investigación más profunda de este tipo de aplicaciones, eliminando de las farmacopeas gran parte de estos remedios por considerarlos ineficaces o potencialmente tóxicos, lo que contribuyó significativamente a un desarrollo más racional de posteriores fármacos.⁵

⁴ Graham, L. P. *An Introduction to Medicinal Chemistry*, 4^o Ed. Oxford University Press, **2009**.

⁵ a) Wermuth, C. G. *The Practice of Medicinal Chemistry*. 2^o Ed, Academic Press, **2003**. b) Drews, J. *Drug Discovery: A Historical perspective*. *Science* **2000**, 287, 1960-1964.

Durante la última parte del siglo XIX, la necesidad de encontrar compuestos o remedios menos tóxicos a los ya conocidos, desembocó en la aparición de nuevas moléculas sintéticas potencialmente activas, y en su posterior desarrollo durante todo el siglo XX. Estas nuevas moléculas estaban basadas principalmente en estructuras conocidas de compuestos naturales farmacológicamente activos, actualmente denominados compuestos líder o *hits*, cuya estructura servía de modelo para la preparación de una serie de análogos sintéticos con el objetivo de modular su actividad biológica.

El primer desarrollo racional de una droga sintética fue realizado por Paul Ehrlich y Sahachiro Hata en 1910,⁶ combinando procedimientos de síntesis orgánica con ensayos biológicos fiables y metodologías de evaluación del fármaco. Para poder comparar la efectividad de diferentes compuestos, establecieron un nuevo parámetro denominado índice quimioterapéutico (IQ):

$$IQ = \frac{\text{Dosis Mínima Curativa}}{\text{Dosis Máxima Tolerada}}$$

Figura 2.- Ecuación del índice quimioterapéutico.

Ehrlich buscaba un agente antimicrobiano seguro para tratar la sífilis,⁷ combatida hasta la época con Atoxyl, extremadamente tóxico.⁸ Juntamente con Hata testearon y evaluaron más de 600 productos arsenicales estructuralmente relacionados y así descubrieron finalmente la Arsfenamina (Salvarsan) (Figura 3), efectiva en humanos para tratar la enfermedad pero todavía excesivamente tóxica. Pese a su elevada toxicidad, fue utilizada hasta mediados de los años 40 cuando fue sustituida por la penicilina.

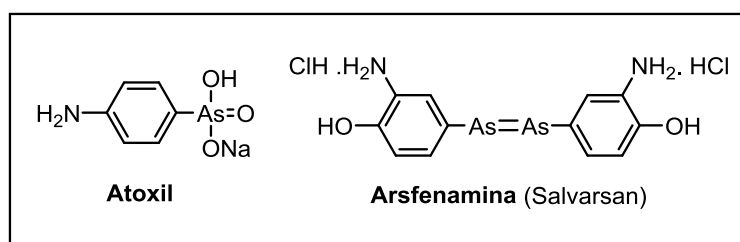


Figura 3.- Estructura del Atoxyl y del Salvarsan.

Esta aproximación es aún una de las técnicas usadas como base para el descubrimiento de nuevos fármacos. Sin embargo, el índice quimioterapéutico ha sido modificado para tener en cuenta la variabilidad de los individuos, y ahora se denomina índice terapéutico (IT):

$$IT = \frac{LD50}{ED50}$$

Figura 4.- Ecuación del índice terapéutico.

⁶ Ehrlich, P.; Hata, S. *Die Experimentelle Chemotherapie der Spirilosens*, Julius Springer, Berlin, 1910.

⁷ Ehrlich, P. *Berl. Klin. Wochenschr.* 1910, 51, 2346-2347.

⁸ Burke, E. T. *Br. J. Vener. Dis.* 1925, 1, 321-338.

En la ecuación anterior, LD50 es la dosis letal requerida para matar el 50% de los sujetos testeados, y ED50 es la dosis que produce un efecto terapéutico efectivo en el 50% de los casos ensayados. De tal manera, un índice terapéutico alto significa que hay un gran margen de seguridad o una ventana terapéutica amplia, entre las dosis beneficiosas y las tóxicas.⁹

Ya entrados en la segunda mitad del siglo XX, desde la década de los sesenta, comenzaron a aparecer regulaciones mucho más estrictas que obligaban a las entidades farmacéuticas a comprobar que los compuestos comercializados fueran a la vez eficaces y completamente seguros para la salud humana. Sin embargo, estas nuevas restricciones no impidieron que el número de fármacos en el mercado aumentase de manera exponencial, traduciéndose en la aparición de numerosas alternativas terapéuticas con eficacia no siempre bien contrastada.

A pesar de que en los últimos cincuenta años el avance en esta disciplina ha sido inmenso y se han descubierto un gran número de sustancias nuevas biológicamente activas, aun existen innumerables afecciones que no poseen un tratamiento satisfactorio, tales como el cáncer, problemas circulatorios, la malaria o el SIDA. Esto unido a los problemas derivados del uso continuado de fármacos, como la aparición de cepas resistentes o los efectos secundarios derivados del uso de éstos, hacen que la química médica sea actualmente una disciplina aún inexplorada, con gran capacidad de evolución y de gran relevancia para la comunidad científica.

1.3.- DIANAS FARMACOLÓGICAS

En el interior de nuestro cuerpo ocurren a nivel molecular una gran cantidad de reacciones químicas que permiten la regulación y el correcto funcionamiento del organismo. Además, se producen una serie de procesos en los que sustancias de diversa naturaleza y estructura, interaccionan muy estrechamente con entidades biológicas más complejas.

En relación a esto, no es de extrañar que los fármacos como entidades químicas, puedan ejercer un efecto sobre dichas reacciones y procesos internos, produciendo efectos específicos en función del lugar en el que se ejerce la acción, es decir, en función de las dianas biológicas susceptibles de reaccionar con los fármacos correspondientes.¹⁰ Las principales dianas biológicas son proteínas (enzimas, receptores, proteínas estructurales y de transporte), ácidos nucleicos (ADN y ARN), lípidos (membrana celular) y ciertos carbohidratos (antígenos y moléculas de reconocimiento celular), que se encuentran en su mayoría en el interior celular. Se trata de macromoléculas de elevado peso molecular y de mayor tamaño que los fármacos en cuestión, por lo que la interacción entre ambos se producirá en un lugar concreto y

⁹ a) Trevor, A. J.; Katzung, B. G.; Masters, S. B. *Farmacología básica y clínica*, 9º Ed. McGraw Hill, **2010**. b) Muller, P. Y.; Milton, N. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2012**, *11*, 751-761.

¹⁰ Hansch, C. et al. *Comprehensive Medicinal Chemistry*. Pergamon Press, **1990**.

específico de éstas, denominado sitio de unión. Ambas entidades presentan grupos funcionales y un esqueleto carbonado concreto que facilita dicha interacción.

Algunos fármacos interaccionan irreversiblemente con el sitio de unión y quedan anclados en su interior de forma permanente mediante enlaces covalentes fuertes (200-400 kJ/mol). No obstante, la mayoría de éstos interaccionan mediante fuerzas intermoleculares débiles y reversibles como puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, interacciones electrostáticas o hidrofóbicas entre otras.¹¹ Dichas interacciones ejercen un efecto cooperativo y pueden formarse y romperse con relativa facilidad. De esta manera se establece un equilibrio dinámico entre ambos, que permite mantener al fármaco unido a su diana biológica el tiempo suficiente para que tenga lugar el efecto deseado y a su vez, permite la expulsión del mismo una vez haya cumplido su función.

1.4.- FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINÁMIA

Existen dos factores que deben de ser considerados a la hora de diseñar un nuevo fármaco. Por un lado es necesario determinar los procesos a los que una sustancia es sometida a través de su paso por el organismo (**farmacocinética**) y por otro, es preciso conocer los mecanismos de acción de los fármacos y los efectos bioquímicos y farmacológicos que éstos pueden producir (**farmacodinamia**).

La farmacocinética es la rama de la farmacología que estudia el movimiento de los fármacos en el interior del organismo y permite conocer su concentración, en función de la dosis y del tiempo transcurrido desde su administración.¹²

Para estudiar este concepto se han desarrollado diferentes modelos que simplifican los numerosos procesos que tienen lugar en el interior organismo. Actualmente se agrupan todos bajo el acrónimo LADME,¹³ que está definido por los siguientes parámetros: liberación del producto activo, absorción en el organismo, distribución, metabolismo de la sustancia y excreción. En ciertas ocasiones también se estudia la toxicidad real de un compuesto dentro de estos parámetros, apareciendo una fase adicional (LADMET), o bien se engloba la fase de liberación dentro de la de absorción ya que se administra el fármaco en forma de principio activo, con lo que ésta primera fase no existe (ADME)¹⁴ (Figura 5).

¹¹ a) Moy, V. T.; Florin, E. L.; Gaub, H. E. *Science* **1996**, 266, 257–259. b) Singh, J.; Peter, R. C.; Baillie, T. A.; Whitty, A. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2011**, 10, 307-317.

¹² Aleixandre, A.; Puerro, M. *Absorción y distribución de los fármacos*, Farmacología básica. Parte I, **2008**, 13-35.

¹³ Jimenez Altayo, F. et al. *Farmacología Básica Avanzada*, Universitat Autònoma de Barcelona. Facultad de Medicina, **2014**.

¹⁴ Flórez, J.; Armijo, J. A.; Mediavilla, A. *Farmacocinética: Absorción, Distribución y Eliminación de los Fármacos. Farmacología Humana*. 4.^a Ed. Masson. Barcelona, **2003**, 51-79.

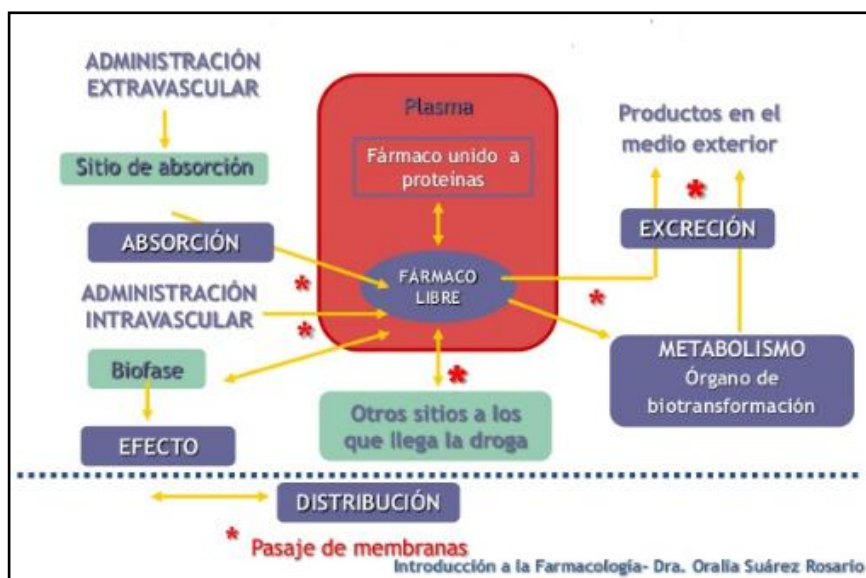


Figura 5.- Tránsito de los fármacos en el interior del organismo

Cada una de las fases está sujeta a interacciones físico-químicas entre el fármaco y el organismo, que se pueden expresar de forma matemática. Por tanto, la farmacocinética se apoya en ecuaciones matemáticas para predecir el comportamiento del fármaco y que dan cuenta de la relación que existe entre sus concentraciones plasmáticas y el tiempo transcurrido desde su administración.

Por otro lado, **la farmacodinamia** comprende el estudio de los mecanismos de acción de los fármacos y de los efectos que éstos producen en el organismo.¹⁵ En otras palabras, es el estudio de lo que le sucede al organismo por la acción de un fármaco.

Inicialmente se observó que la eficiencia farmacológica aumentaba de forma proporcional a la dosis administrada, hasta llegar a un máximo, a partir del cual no mejoraba aunque se incrementase la cantidad de fármaco. Este hecho puso de manifiesto que dichas sustancias actuaban sobre un número limitado de "sitios" específicos en el organismo, denominados receptores. Estos receptores son estructuras celulares generalmente proteicas, con una finalidad concreta y son activados por distintas sustancias, tanto naturales como externas al organismo (fármacos). El conocimiento de estos efectos y de los receptores responsables de los mismos, ha sido el eje central de la investigación farmacodinámica, desde que John Newport Langley propuso su existencia en Cambridge, en 1905.¹⁶

1.5.- PROCESO DE OBTENCIÓN DE UN FÁRMACO

Como se ha comentado en el apartado anterior, desde la segunda mitad del siglo XIX, se comenzaron a aislar y purificar los principios activos derivados de los productos naturales conocidos hasta el momento.

¹⁵ Ratain, M. J.; Plunkett, W. K. Jr. *Principles of Pharmacodynamics, Holland-Frei Cancer Medicine*. 6º Ed. BC Decker, 2003.

¹⁶ Langley, J. N. *J. Physiol.* 1905, 33, 374-413.

Desde entonces y hasta la actualidad, se han descubierto una gran cantidad de compuestos naturales y no naturales con buenas propiedades farmacológicas y se ha determinado rigurosamente su estructura. Esto ha supuesto un punto de partida importante para la preparación de análogos sintéticos de los mismos, en un intento de mejorar y potenciar sus propiedades farmacológicas.

Gran parte de la síntesis de estos derivados se llevó a cabo inicialmente siguiendo el método de ensayo-error, pero rápidamente los resultados obtenidos pusieron de manifiesto una serie de principios racionales para el impulso de una metodología general, aplicable en el diseño y desarrollo de nuevos fármacos. El proceso de optimización de un compuesto patrón mediante la preparación de análogos está basado en una serie de parámetros estructurales que se pueden englobar dentro de la “regla del cinco” de Lipinsky.¹⁷ Esta regla descrita en 1997 trata de predecir la biodisponibilidad de un candidato a fármaco basándose en los siguientes criterios:

- El compuesto debe poseer un peso molecular menor de 500.
- El coeficiente de reparto log P (logaritmo del coeficiente de partición entre el agua y el 1-octanol) debe ser menor de 5.
- El número de grupos donadores de enlaces de hidrógeno en el compuesto no puede ser mayor de 5.
- El compuesto no puede poseer más de 10 grupos aceptores de enlaces de hidrógeno.

En la actualidad, para la optimización farmacológica de un compuesto se emplean nuevas técnicas como la Química Computacional, relaciones cuantitativas de estructura-actividad (QSAR) o escaneado de alto rendimiento (HTS, *High Throughput Screening*), que permiten mejorar la capacidad de predicción y suponen un ahorro económico considerable.

El proceso de obtención de un nuevo fármaco es muy complejo e involucra diferentes etapas que requieren de un gran aporte económico y científico. A continuación se muestra un modelo de las diferentes fases planteadas en el descubrimiento de nuevos fármacos.



Figura 6.-Etapas del proceso de descubrimiento de nuevos fármacos

¹⁷ Lipinsky, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1997**, 23, 3-25.

El primer paso tras seleccionar la diana terapéutica sobre la que se pretende actuar, es encontrar un compuesto líder o *hit*, cuya estructura sea conocida y que presente la actividad farmacológica deseada. A continuación se optimizarán sus propiedades a través de la preparación de una serie de análogos del mismo con diferente funcionalización. Estos candidatos se someterán a un proceso de evaluación biológica antes de que puedan ser comercializados y producidos a gran escala. En esta fase es necesario contrastar su fiabilidad y efectividad, evaluando su toxicidad, metabolismo, estabilidad y su formulación, en lo que se conoce como ensayos preclínicos y ensayos clínicos.

Por un lado, los **ensayos preclínicos** incluyen ensayos de toxicidad, estudios del metabolismo del fármaco, formulación y pruebas de estabilidad del formulado. Se realizan tanto *in vitro* como *in vivo* y pueden llegar a durar hasta varios años. Por otro lado, los **ensayos clínicos** se realizan a posteriori, cuando el fármaco ya ha demostrado poseer el efecto deseado y una baja toxicidad. Suelen durar de entre 5 a 7 años, son extremadamente caros y requieren de una ética muy estricta. Los ensayos clínicos se dividen en 4 fases:

Fase I: Se lleva a cabo en voluntarios sanos y suele tener una duración media de 1 año. Trata de obtener una evaluación preliminar de la seguridad, la farmacocinética y la dosis máxima administrada del fármaco.

Fase II: Se lleva a cabo en pacientes para determinar si el fármaco presenta la actividad biológica esperada y establecer su seguridad a corto plazo. Suelen durar varios años.

Fase III: Se llevan a cabo estudios similares a los de fase II, pero en poblaciones numerosas. Suelen durar 3 años.

Fase IV: El fármaco ya se encuentra en el mercado y puede ser prescrito para su administración. Sin embargo, continua controlándose su efectividad y los posibles efectos secundarios que pueden surgir de su uso a largo plazo.

La etapa de ensayos clínicos es la más cara en lo que a tiempo y dinero se refiere, por lo que de cada 10.000 estructuras sintetizadas durante el diseño del fármaco, sólo 500 llegan a ensayos *in vivo*, 10 llegan a la fase clínica I y sólo 1 llega al mercado, estimándose un coste global para esta fase de unos 800 millones de dólares.

La presente Tesis Doctoral está centrada principalmente en el diseño, la síntesis y la caracterización de sustratos farmacológicamente activos. Además, se profundizará en el estudio de las relaciones entre la estructura química de los compuestos y su actividad biológica, analizando no sólo su citotoxicidad, sino también su grado de seguridad y los efectos que éstos pueden producir sobre la acción de las dianas biológicas implicadas.

CAPÍTULO I

**CAPÍTULO I: DISEÑO, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN
BIOLÓGICA DE COMPUESTOS CON POTENCIAL
ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA**

1.- INTRODUCCIÓN

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- ORIGEN Y DEFINICIÓN

El paludismo o malaria es una enfermedad potencialmente mortal causada por parásitos del género *Plasmodium*, que se transmiten al ser humano a través de la picadura de la hembra de mosquitos del género *Anopheles*.¹⁸

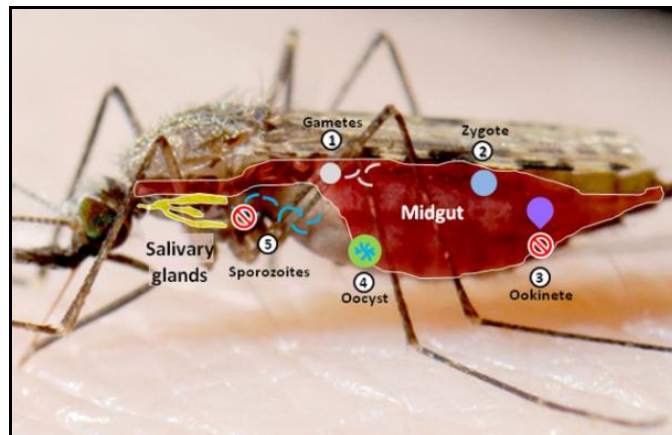


Figura 1.1.- Hembra del mosquito del género *Anopheles*.¹⁹

La malaria es una de las enfermedades parasitarias más antiguas y asentadas que existen, pues ha estado presente en la historia de la humanidad durante más de 50.000 años.²⁰

Según recientes investigaciones científicas, se ha demostrado que el parásito fue transferido inicialmente a la especie humana a través de los simios, principalmente a través de chimpancés y gorilas, ya que se ha encontrado material genético del *Plasmodium* en más de tres mil muestras fecales de estos animales.²¹

Las muestras analizadas revelaron la presencia de un amplio espectro de especies de *Plasmodium* que se agrupan dentro de uno de los seis linajes específicos de este parásito, dentro del subgénero *Laverania*.²² Más concretamente, *P. falciparum*, la cepa parasitaria más peligrosa y mortal, procede en una primera instancia de los gorilas y fue transmitida a los seres humanos a través de la picadura de la hembra de dicho mosquito, que se situaba sobre los restos fecales de estos primates donde incorporaba el parásito.

¹⁸ Sow, F.; Nyonda, M.; Bienvenu, A. L.; Picot, S. *Microbial. Cell* **2015**, 2, 219-224.

¹⁹ Isaacs, A. T. et al. *PNAS*. **2012**, 109, 11070-11071.

²⁰ Carter, R.; Mendis, K. N. *Clin. Microbiol. Rev.* **2002**, 15, 564-594.

²¹ Liu, W.; Li, Y.; Learn, G. H.; Rudicell, R. S.; Robertson, J. D.; Keele, B. F.; Ndjango, J. B. N.; Sanz, C. M.; Morgan, D. B.; Locatelli, S.; Gonder, M. K.; Kranzusch, P. J.; Walsh, P. D.; Delaporte, E.; Mpoudi-Ngole, E.; Georgiev, A. V.; Muller, M. N.; Shaw, G. M.; Peeters, M.; Sharp, P. M.; Rayner, J. C.; Hahn, B. H. *Nature* **2010**, 467, 420-427.

²² Rayner, J. C.; Liu, W.; Peeters, M.; Sharp, P. M.; Hahn, B. H. *Trends Parasitol.* **2011**, 27, 222-229.

1.2.- VECTOR DE TRANSMISION

Como ya se ha indicado previamente, la malaria es una enfermedad causada por parásitos protozoarios del género *Plasmodium*, cinco especies de las cuales se sabe que infectan a los seres humanos:²³ *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* y la más recientemente descubierta *P. knowlesi*.

De estas cinco especies, *P. vivax* y *P. falciparum* son las más importantes en número e incidencia de la enfermedad. En concreto se estima que *P. falciparum* causa anualmente más de medio millón de muertes en todo el mundo (aproximadamente el 90% del total), con una morbilidad de aproximadamente 250 millones. Por su parte, *P. vivax* es el responsable de la mayoría de infecciones, aunque en este caso se suelen considerar benignas, ya que sus consecuencias para la salud humana no son tan devastadoras en comparación con el primero.²⁴ Sin embargo, esta cepa causa el mayor índice de morbilidad, representando una reserva de infección latente que dificulta los esfuerzos de control y erradicación de esta enfermedad.²⁵

Por otra parte, los mosquitos del género *Anopheles* portadores del parásito, habitan prácticamente en todo el mundo, con especial intensidad en las zonas templadas, tropicales y subtropicales. Sólo las hembras de este mosquito se alimentan de sangre y pueden transmitir enfermedades, mientras que los machos no pican y se alimentan únicamente de néctares y jugos vegetales. Existen aproximadamente unas 400 especies diferentes de mosquitos del género *Anopheles*, de las cuales únicamente 30 o 40 son capaces de transmitir las cepas de *Plasmodium* causantes de la malaria en los seres humanos.²⁶

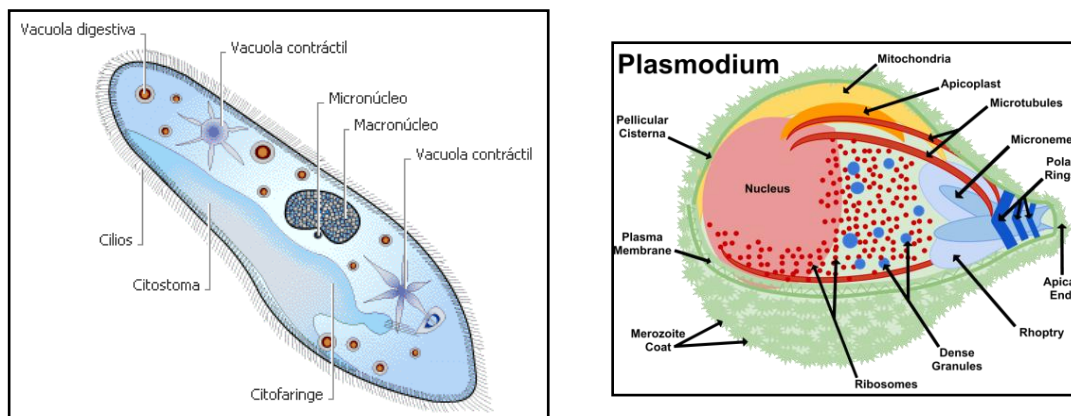


Figura 1.2.- Imagen de un protozoo del genero *Plasmodium*.

²³ a) Greenwood, B. M.; Bojang, K.; Whitty, C. J.; Targett, G. A. *Lancet*. **2005**, 365, 1487-1498. b) Snow, R. W.; Guerra, C. A.; Noor, A. M.; Myint, H. Y.; Hay, S. I. *Nature* **2005**, 434, 214-217.

²⁴ Anstley, N. A.; Rusell, B.; Yeo, T. W.; Price, R. N. *Trends in Parasitol.* **2009**, 25, 220-227.

²⁵ Gamo, F. J.; Sanz, L. M.; Vidal, J.; Cozar, C.; Alvarez, E.; Lavandera, J. L.; Vanderwall, D. E.; Green, D. V. S.; Kumar, V.; Hasan, S.; Brown, J. R.; Peishoff, C. E.; Cardon, L. R.; Garcia-Bustos, J. F. *Nature* **2010**, 465, 305-310.

²⁶ Sinka, M. E. et al. *Parasites & Vectors* **2012**, 5, 1-11.

1.3.- MODO DE ACCIÓN Y CICLO DE VIDA DEL PARÁSITO

De las cinco especies de *Plasmodium* que infectan a seres humanos, *P. falciparum* es la que presenta una mayor virulencia, siendo capaz de evolucionar rápidamente hacia enfermedad grave o muerte en escasamente uno o dos días.²⁷ De las demás especies, *P. vivax* es la más común y causa el mayor número de casos de infección a escala mundial.

El ciclo vital de *Plasmodium* se representa en la Figura 1.3. Las etapas asexuales en la sangre (anillos, trofocitos y esquizontes) son las responsables de causar los síntomas de esta enfermedad y por ello son el objetivo principal de la quimioterapia, ya que las etapas sexuales (gametocitos) no causan patologías conocidas.

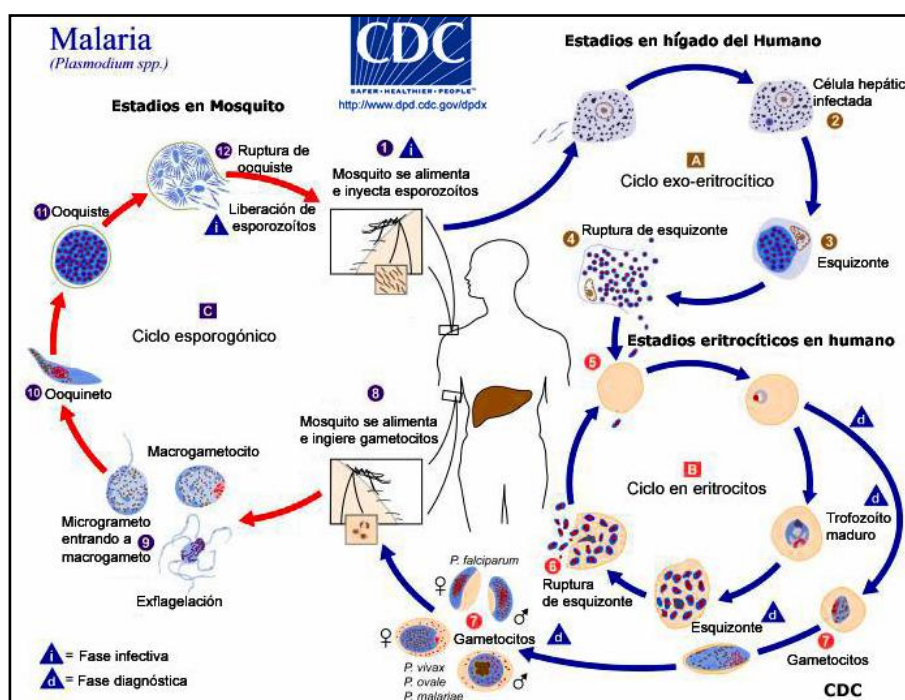


Figura 1.3.- Ciclo de vida del *Plasmodium*.²⁸

En el ciclo del *Plasmodium* existe un agente vector (la hembra del mosquito *Anopheles*), en la cual el parásito se reproduce sexualmente, y un huésped intermediario, el ser humano. El ciclo se inicia con la picadura del mosquito, que inculca al parásito en el interior del organismo huésped, pasando a la sangre en forma de esporozoitos hasta alcanzar los hepatocitos del hígado, donde comienza la fase exo-eritrocítica o hepática. Allí se multiplican por esquizogénesis formando el correspondiente esquizonte hepático, el cual se fragmenta dando lugar a un nuevo estadio, el merozoito. En este momento hay un primer ciclo asexual, en el que los merozoitos pueden infectar de nuevo a los hepatocitos o bien pasar al torrente sanguíneo, donde penetran en los eritrocitos, iniciado así la segunda etapa del ciclo.

²⁷ Griffith, K. S.; Lewis, L. S.; Mali, S.; Parise, M. E. *JAMA*. **2007**, 297, 2264-2277.

²⁸ <http://www.cdc.gov/malaria> (Centers for Disease Control and Prevention) (consultada Octubre, 2016).

La transición desde la etapa hepática a la eritrocítica ha sido confusa hasta hace poco tiempo. En el año 2006,²⁹ se demostró que el parásito sale de los hepatocitos en merozomas que contienen cientos o miles de merozoitos. Estos merozomas se dirigen a los capilares pulmonares, donde se desintegran lentamente en unas 48-72 horas, liberando los merozoitos que pasan al torrente sanguíneo.³⁰

Tras alimentarse de la parte proteica de la hemoglobina y convertirse en trofozoitos, se produce una nueva división por esquizogénesis, formándose el correspondiente esquizonte hemático. Al igual que en la etapa anterior, se fragmenta el esquizonte formado liberando nuevos merozoitos, que pueden continuar con el ciclo replicativo infectando nuevos eritrocitos, o bien convertirse en gametocitos, tanto masculinos como femeninos.

Si el individuo infectado es nuevamente picado por un mosquito, dichos gametocitos se introducen entonces en el interior de éste, donde se diferencian en gametos que al fusionarse, generan los correspondientes cigotos. Los cigotos a su vez, se convierten en oocinetos, que invaden la pared intestinal del mosquito donde se desarrollan en ooquistes. Éstos crecen, se rompen y liberan una nueva generación de esporozoitos que pasan de nuevo a las glándulas salivares del mosquito, donde el *Plasmodium* puede volver a ser inoculado en un nuevo huésped.³¹ Con esta reproducción alternante, asexual en el hombre y sexual en el mosquito, se cierra el ciclo evolutivo del parásito.³²

En algunas especies de *Plasmodium* (*P. vivax* y *P. ovale*), el esquizonte hepático puede permanecer en estado latente en forma de hipnozoito. La reactivación de los hipnozoitos puede ocurrir hasta un máximo de 30 años después de la infección inicial en el ser humano. Por otra parte, *P. falciparum* es capaz de invadir los eritrocitos de todas las edades, de ahí su elevada peligrosidad. En cambio, *P. vivax* tiene preferencia por eritrocitos jóvenes, de manera que se limita su capacidad reproductiva y no suelen ser causa de enfermedad grave.²⁴

1.4.- ALCANCE Y EXTENSIÓN DE LA MALARIA

Durante el siglo XX la población mundial creció de manera exponencial desde aproximadamente 1000 millones hasta casi 7000 millones de personas (Tabla 1.1). Estos datos demográficos son importantes en lo que se refiere a la proporción de la población humana expuesta a esta enfermedad a lo largo del tiempo.

²⁹ Sturm, A.; Amino, R.; Van de Sand, C.; Regen, T.; Retzlaff, S.; Rennenberg, A.; Krueger, A.; Pollok, J. M.; Menard, R.; Heussler, V. T. *Science* **2006**, 313, 1287-1290.

³⁰ Baer, K.; Klotz, C.; Kappe, S. H.; Schnieder, T.; Frevort, U. *PLoS Pathog.* **2007**, 3, 1651-1668.

³¹ Su, X.; Hayton, K.; Wellems, T. E. *Nat. Rev. Genet.* **2007**, 8, 497-506.

³² Pasvol G. *Nat. Genet.* **2010**, 42, 284-285.

Tabla 1.1.- Riesgo global de malaria desde 1900 hasta 2010.

Año	Población global	Área terrestre con malaria		Países en riesgo	Población expuesta	
		Km ²	%		N	%
1900	1.158.400.472	77.594.460	53,16	140	892.373.056	77,03
1946	2.391.400.960	58.565.752	40,12	130	1.653.815.808	68,40
1965	3.363.417.344	53.492.988	36,65	103	1.925.360.320	57,21
1975	4.065.759.488	48.075.780	32,93	91	2.121.086.592	51,91
1992	5.419.255.808	43.650.812	29,90	88	2.565.602.144	47,34
1994	5.582.432.256	39.537.020	27,08	87	2.570.555.136	46,05
2002	6.204.095.488	39.758.172	27,24	88	2.996.419.584	48,30
2010	6.807.085.056	39.758.172	27,24	88	3.410.862.060	50,11

A la vista de los datos anteriores, el porcentaje de población en riesgo ha disminuido desde un 77% al principio del siglo XX hasta un mínimo del 46% en 1994. Esta proporción aumentó hasta el 48% en 2002 a causa del crecimiento de población en una distribución geográfica que no ha variado sustancialmente.

En términos absolutos, la población en riesgo ha aumentado desde 900 millones hasta casi 3500 millones de habitantes en el período comprendido entre 1900 y 2010, por lo que, se estima que la población que sigue expuesta a la malaria a principios del siglo XXI, es del 48%.³³ En la actualidad, según datos proporcionados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) durante el año 2016,³⁴ aproximadamente unos 3.300 millones de personas en 91 países están en riesgo de contraer malaria y desarrollar la enfermedad, y aproximadamente 1.200 millones están en situación de alto riesgo (una probabilidad > 1 de cada 1.000 personas de contraer malaria en un año).

Los territorios más afectados a nivel mundial son la región del África subsahariana donde predomina principalmente *P. falciparum* y el sudeste asiático, zonas de Sudamérica y América central, donde predomina *P. vivax*. Por otra parte, *P. ovale* aparece fundamentalmente en zonas del África occidental y en Papúa Nueva Guinea y *P. malariae* y *P. knowlesi* aparecen con escasa frecuencia en zonas dispersas del mundo.

³³ Hay, I. S.; Guerra, C. A.; Tatem, A. J.; Noor, A. M.; Snow, R. W. *Lancet. Infect. Dis.* **2004**, 4, 327-336.

³⁴ WHO. *World Malaria Report 2016*, 1-186.

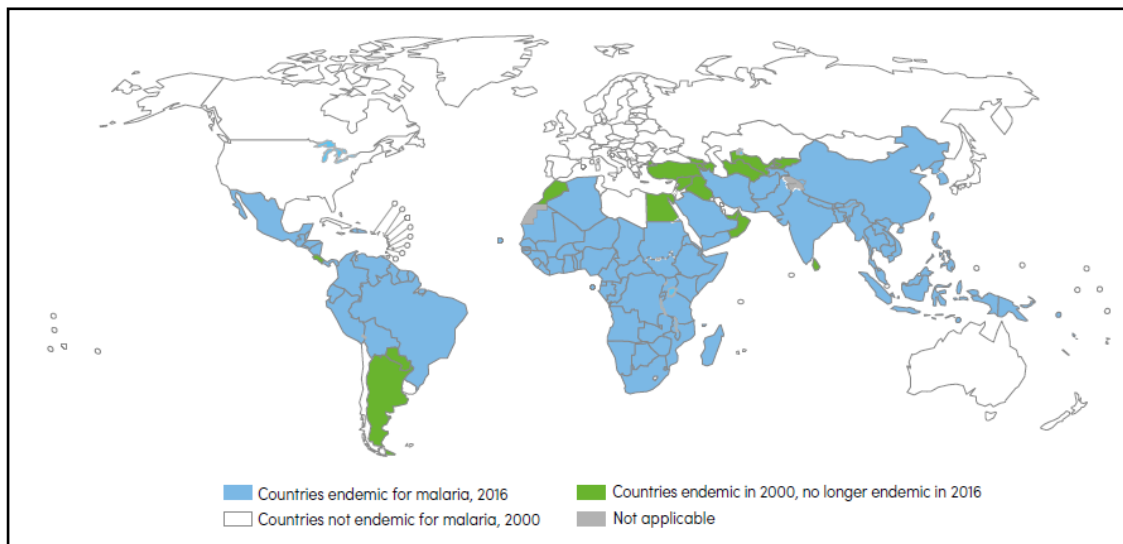


Figura 1.4.- Países en riesgo de contagio por malaria en 2016.³⁴

Especialmente en el continente africano se estima que se producen alrededor del 92% de todas las muertes anuales causadas por malaria. Se ven principalmente afectados los niños menores de 5 años (70% de muertes), pues en ellos los niveles de inmunidad adquiridos son a menudo insuficientes para hacer frente a esta enfermedad.

De acuerdo con las últimas estimaciones se detectó en 2015 un número de casos de malaria que oscila entre 148 y 304 millones, que dieron lugar a entre 235.000 y 639.000 muertes. Esto se traduce en una disminución de un 22% en la incidencia de casos de malaria y una reducción de 50% en la tasa de mortalidad, desde el año 2000. No se dispone de estadísticas más precisas con menor margen de error porque muchos casos ocurren en áreas rurales, donde las personas no tienen acceso a hospitales o a recursos para garantizar cuidados de salud. Como consecuencia de ello, la mayoría de los casos no está bien documentada.

En concreto en el continente africano se estima que el número de infecciones concurrentes se redujo de 173 millones en el año 2000 a 114 millones en el 2015, es decir una reducción del 35% en el número de personas infectadas. En cuanto a la tasa de mortalidad se ha reducido un 54% desde el año 2000 y concretamente un 60% en niños menores de 5 años.

Estos enormes avances son el resultado de nuevos logros científicos, un mayor compromiso político, el surgimiento de iniciativas regionales y un aumento considerable en la financiación para la lucha contra la malaria. Pese al gran esfuerzo realizado, alrededor de 195 millones de personas en África todavía viven en hogares sin mosquiteras tratadas con insecticida y alrededor de 12 millones de mujeres embarazadas permanecen sin acceso al tratamiento preventivo para esta enfermedad. La cura y prevención de dicha infección depende principalmente de la administración de un pequeño número de fármacos, cuya eficacia se ve continuamente amenazada debido

a la creciente resistencia que desarrollan los parásitos a dichos compuestos,^{35,36,37} fenómeno que se ha atribuido a la aparición de polimorfismos genéticos en el parásito.^{38,39}

Además, existen otros factores que complican la situación y favorecen la aparición de dichas resistencias, tales como el uso incorrecto de los medicamentos, la no observación de las especificaciones de uso de los mismos, el rápido deterioro del estado de salud y nutrición de los afectados, etc. Por esta razón, surge la necesidad y el compromiso de la comunidad científica de desarrollar nuevos, efectivos y asequibles compuestos capaces de combatir esta patología.

1.5.- ESTRATEGIAS EN DESARROLLO ACTUAL

Entre las alternativas que se están llevando a cabo para erradicar la enfermedad, cabe destacar entre otras, la producción de vacunas que aumenten el nivel de protección inmunitaria frente al *Plasmodium*, tratamientos basados en la quimioprolifaxis y la quimioterapia, la distribución de mosquiteras impregnadas de insecticida y la administración de fármacos antimaláricos de origen diverso.

1.5.1.- COMPUESTOS ANTIMALÁRICOS

En una primera aproximación los alcaloides del género *Cinchona* y sus derivados han constituido una parte integral y esencial en el control de la enfermedad. La quinina, que se extrae de la corteza del árbol *Cinchona officinalis*, ha sido el fármaco de elección para el tratamiento de casos graves de malaria durante casi 400 años, aunque sus propiedades curativas ya eran conocidas por los nativos americanos que empleaban dicha corteza para tratar casos febriles graves. Sin embargo, no fue hasta 1820 cuando los químicos franceses Pierre Joseph Pelletier y Jean Bienaimé Caventou extrajeron por primera vez el principio activo,⁴⁰ la quinina (Figura 1.5), cuyo uso a gran escala como profiláctico se estableció en el año 1850.

³⁵ Muller, I. B.; Hyde, J. *Future Microbiol.* **2010**, *5*, 1875-1873.

³⁶ Tun, K. M.; Imwong, M.; Lwin, K. M.; Win, A. A.; Hlaing, T. M.; Hlaing, T.; Lin, K.; Kyaw, M. P.; Plewes, K.; Faiz, M. A. *Lancet Infect. Dis.* **2015**, *15*, 415-421.

³⁷ WHO. Report on antimalarial drug efficacy and drug resistance, **2000-2010**, 1-121.

³⁸ a) Kerb, R.; Fux, R.; Mörike, K.; Kremsner, P. G.; Gil, J.P.; Gleiter, C.H.; Schwab, M. *Lancet Infect. Dis.* **2009**, *9*, 760-774. b) Koenderink, J. B.; Kavishe, R. A.; Rijpma, S. R.; Russel, F. G. M. *Trends Parasitol.* **2010**, *26*, 440-446. c) López, C.; Saravia, C.; Gómez, A.; Hoebeke, J.; Patarroyo, M. A. *Gene* **2010**, *467*, 1-12.

³⁹ a) Miotto, O.; Amato, R.; Ashley, E.; MacInnis, B.; Almagro-Garcia, J.; Amaratunga, C.; Lim, P.; Mead, D.; Oyola, S.; Dhorda, M. et al. *Nat. Genet.* **2015**, *47*, 226-234. b) Murai, K.; Culleton, R.; Hisaoka, T.; Endo, H.; Mita, T. *Parasitol. Int.* **2015**, *64*, 267-273.

⁴⁰ a) Pelletier, P. S.; Caventou, J. B.; *Ann. Chim. Phys.* **1820**, *15*, 337-365. b) Achan, J. et al. *Malar. J.* **2011**, *10*, 1-12.

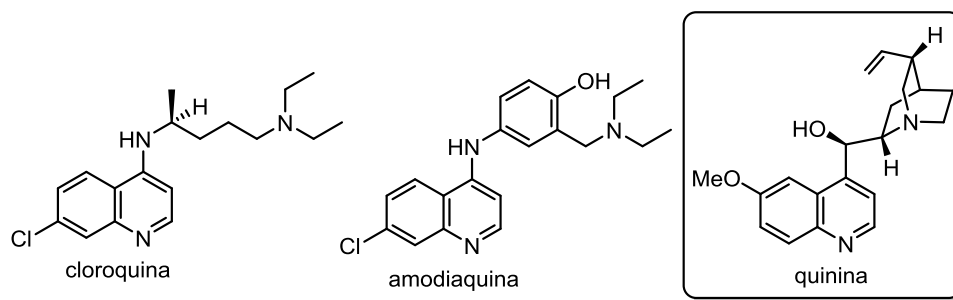


Figura 1.5.- Estructura de la quinina y de sus principales análogos.

Su estructura incluye un anillo de quinolina, al igual que sus análogos sintéticos más importantes: cloroquina (CQ), amodiaquina (ADQ), primaquina, (PIP) y mefloquina.

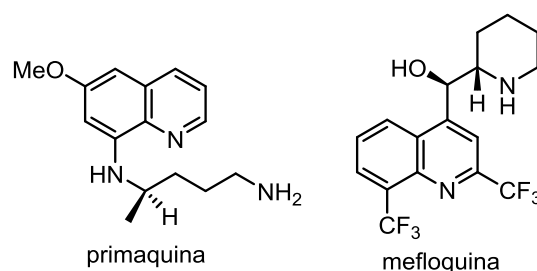


Figura 1.6.- Estructura de dos derivados importantes de la quinina.

A pesar de su largo historial de eficacia, la quinina tiene serias limitaciones. La quinidina (Figura 1.7), un estereoisómero de la quinina, es el único fármaco aprobado por la *United States Food and Drug Administration* (USFDA) para el tratamiento de casos graves de malaria. Aunque se trata de un compuesto disponible y efectivo frente a esta enfermedad, dista mucho de ser un fármaco ideal, debido a su elevado carácter cardiotoxico. Los efectos cardiovasculares de este compuesto son potencialmente graves y pueden aparecer más frecuentemente cuando se administra el tratamiento de forma rápida.⁴¹

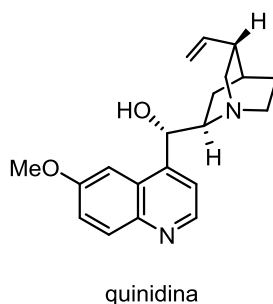


Figura 1.7.- Estructura de la quinidina.

Además de éste, la cloroquina (Figura 1.5), uno de los antimaláricos sintéticos más efectivos que se han producido hasta la fecha, sigue siendo actualmente el tratamiento de elección para todas las infecciones con *P. malariae*, *P. ovale* y algunas con *P. vivax*. A pesar de su eficacia inicial, la emergencia de parásitos de *Plasmodium*

⁴¹ Qigui, L.; Weina, P. *Pharmaceuticals* **2010**, 3, 2322-2332.

con resistencia a dicho medicamento, ha provocado un resurgimiento de la incidencia de malaria en el mundo.⁴²

Otros dos antimaláricos importantes menos relacionados estructuralmente con la quinina, son la halofantrina y la lumefantrina, que se basan en sistemas de fenantreno y fluoreno, respectivamente.

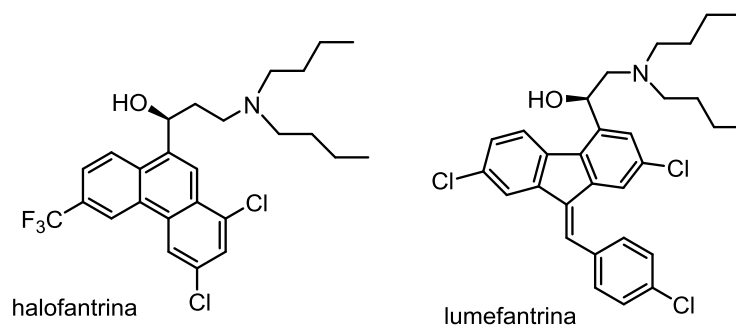


Figura 1.8.- Estructura de halofantrina y lumefantrina.

Además de la ya mencionada resistencia del *Plasmodium* a determinados fármacos, aparece un nuevo tipo de resistencia cruzada que puede ocurrir entre antimaláricos que pertenezcan a la misma familia o que tengan semejantes modos de acción. Esto provoca continuos cambios en la epidemiología global y condiciona el control y prevención de la enfermedad.

A continuación se muestra una tabla que refleja los principales antimaláricos disponibles, así como la familia química a la que pertenecen.

Tabla 1.2.- Principales antimaláricos disponibles.³¹

Familia química	Fármacos
4-Aminoquinolinas	Cloroquina, amodiaquina, piperaquina
Aminoalcoholes	Quinina, quinidina, mefloquina, alofantrina, lumefantrina
Sulfonamidas y sulfonas	Sulfadoxina, sulfaleno, dapsona
Biguanidas	Proguanil, clorproguanil
Diaminopirimidina	Pirimetamina
8-Aminoquinolina	Primaquina
Lactonas sesquiterpénicas	Artemisinina, arteeter, artemeter, artesunato, dihidroartemisina
Naftoquinona	Atovacuona
Antibióticos	Acitromicina, clindamicina, aoxiciclina, tetraciclina

⁴² a) Krogstad, D. J. et al. *Science* **1987**, 238, 1283–1285. b) Foley, M.; Tilley, L. *Int. J. Parasitol.* **1997**, 27, 231-240.

En la actualidad, los compuestos relacionados con la quinina están siendo sustituidos por la artemisinina, un sesquiterpeno natural aislado de la planta *Artemisia annua*,⁴³ para el tratamiento de casos graves de malaria. La artemisinina y sus derivados eliminan los parásitos de forma muy rápida y han demostrado una reducción de la mortalidad en comparación con el tratamiento parenteral con quinina.

Es tal la importancia de este compuesto, que le fue otorgado el premio Nobel de medicina en el año 2015 a su descubridora, la Dra. Youyou Tu, por sus investigaciones en el desarrollo de esta nueva terapia, que ha revolucionado el tratamiento administrado en la lucha contra la malaria.⁴⁴

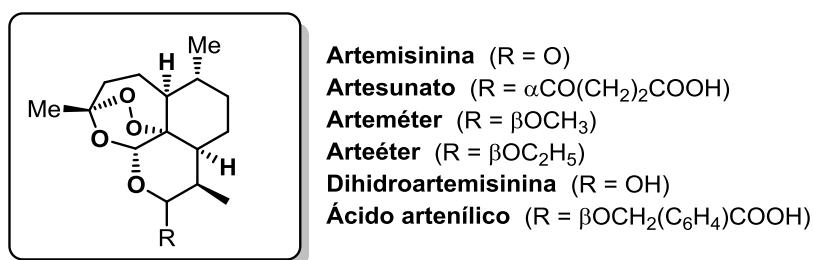


Figura 1.9.- Estructura de la artemisinina y sus derivados.

La artemisinina, a pesar de ser muy efectiva, presenta algunos inconvenientes derivados de su elevado coste y su baja solubilidad en agua. Con el objetivo de mejorar sus propiedades LADME, se han formulado diversos derivados semisintéticos de artemisinina entre los que se encuentran la dihidroartemisinina (DHA), artesunato (AS), arteméter (AM), y arteéter (Figura 1.9). Estos derivados actúan como profármacos y se metabolizan en el interior del organismo para dar lugar a la dihidroartemisinina, que es el metabolito con mayor actividad esquizotónica conocida.

De entre los derivados mencionados, el artesunato (AS) presenta varias ventajas frente a la artemisinina pues a diferencia de ésta, permite la preparación de soluciones orales, rectales, intramusculares e intravenosas dada su mayor solubilidad. Este hecho proporciona una mayor biodisponibilidad de dicho compuesto en el interior del organismo. Además, es muy efectivo frente a la malaria multirresistente a otros fármacos y se utiliza con frecuencia en el tratamiento de casos graves de la enfermedad en Vietnam, Tailandia, China y África.

1.5.2.- VACUNAS

Actualmente no hay disponible una vacuna contra la malaria que pueda administrarse de forma habitual en los programas de vacunación de los países endémicos. Esto se debe a que los parásitos son organismos multicelulares y por tanto mucho más complejos que las bacterias y los virus.

⁴³ Mueller, M. S.; Karhagomba, I. B.; Hirt, H. M.; Wemakor, E. *J. Ethnopharmacol.* **2000**, *73*, 487-493.

⁴⁴ a) [www.nobelprize.org / nobel_prize / medicine / laureates / 2015](http://www.nobelprize.org/nobel_prize/medicine/laureates/2015) (consultada Septiembre, **2016**) b) Callaway, E.; Cyranoski, D. *Nature* **2015**, *526*, 174-175.

En el caso concreto del *Plasmodium*, en cada estadio de su ciclo biológico (esporozoito, trofozoito, esquizonte, merozoito) su envoltura antigénica se modifica, confundiendo con ello al sistema inmune y dificultando el establecimiento de los antígenos fundamentales que desencadenan una respuesta inmune eficaz.

Otro aspecto que hace difícil la producción y distribución de vacunas es que la malaria afecta especialmente a países subdesarrollados, que no son capaces de destinar suficientes recursos económicos a la investigación y desarrollo de vacunas contra esta enfermedad. A ello se suma el hecho de que las empresas farmacéuticas consideran poco rentable investigar vías terapéuticas contra esta patología. No obstante, se han realizado importantes avances científicos en el desarrollo de vacunas eficaces durante las últimas dos décadas, existiendo en la actualidad alrededor de 100 vacunas candidatas en diferentes fases de investigación.^{45,46,47}

De entre todas las candidatas, la vacuna que se encuentra en un estado de desarrollo más avanzado es la llamada RTS,S/AS02A, desarrollada y financiada conjuntamente por GlaxoSmithKline (GSK) y la Malaria Vaccine Initiative (MVI). Se trata de una vacuna recombinante basada en la fusión del antígeno de superficie del circunsporozoito con el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), formulada con un potente adyuvante, el AS02A.⁴⁸ Esta vacuna fue aprobada durante el año anterior por la Agencia Europea del Medicamento (EMA) y espera comercializarse durante el presente año 2017, puesto que los resultados obtenidos hasta el momento en fase clínica han sido realmente esperanzadores.⁴⁹

1.5.3.- MEDIDAS PREVENTIVAS Y DE CONTROL

Además de la quimioprofilaxis y de la quimioterapia, que juegan un papel fundamental en la lucha contra la malaria,⁵⁰ se están llevando a cabo una serie de medidas económicamente más asequibles que permiten controlar el avance y proliferación de esta infección. Entre estas medidas es posible destacar:

- La distribución de mosquiteras impregnadas de insecticida, que ha resultado ser la herramienta más útil y efectiva en todo el ámbito de salud pública.⁵¹

- El empleo de diferentes insecticidas en zonas poblacionales y en el ámbito doméstico, tales como piretrinas o el DDT.⁵²

⁴⁵ Graves, P.; Gelband, H. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2003**, 1, CD000129.

⁴⁶ Okie, N. *Engl. J. Med.* **2005**, 353, 1877-1881.

⁴⁷ Alonso, P. L.; Brown, G.; Arevalo-Herrera, M. *PLoS Med.* **2011**, 8, 1-8.

⁴⁸ Alonso, P. et al. *Lancet.* **2005**, 366, 2012-2018.

⁴⁹ Agnandji, S. T.; Lell, B.; Fernandes, J. F.; Abossolo, B. P.; Methogo, B.; Gaelle, N. O.; Adegnik, A.; Issifou, S.; Kremsner, P. G.; Alonso P. *N. Engl. J. Med.* **2012**, 367, 2284-2295.

⁵⁰ a) Chatterjee, A.; Yeung, B. K. S. *Curr. Top. Med. Chem.* **2012**, 12, 473-483. b) Dechy-Cabaret, O.; Benoit-Vical, F. *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 10328-10344. c) Gravitz, L. *Nature* **2012**, 484, S26-S27. d) Biamonte, M. A.; Wanner, J.; Le Roch, K. G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, 23, 2829-2843.

⁵¹ Enayati, A.; Hemingway, J. *Annu. Rev. Entomol.* **2010**, 55, 569-591.

⁵² Nájera, J. A.; Gonzalez-Silva, M.; Alonso, P. L. *PLoS Med.* **2011**, 8, 1-7.

El uso de insecticidas conllevó la erradicación de la malaria en Europa y el descenso considerable en casos de infección grave en Taiwán, Sri Lanka, India, el Caribe, los Balcanes y en áreas del Pacífico Sur. En 1964 la malaria fue oficialmente erradicada en España.⁵³ Sin embargo, no se consiguieron grandes resultados en la región del África subsahariana debido a la resistencia mostrada por ciertas especies de mosquito *Anopheles* a estos insecticidas.⁵⁴ A finales de la década de los 70, la OMS decidió dejar de utilizar el DDT contra la malaria, habiéndose prohibido ya su uso agrícola desde 1972, a causa de los posibles riesgos a largo plazo sobre el medio ambiente y la salud humana.

Actualmente y debido al aumento masivo de casos de paludismo a finales del siglo XX, el DDT ha vuelto a emplearse bajo condiciones muy controladas en la lucha contra esta enfermedad.

1.5.4.- NUEVAS TERAPIAS EN DESARROLLO

Se están llevando a cabo actualmente grandes avances científicos con el fin de lograr un mayor control vectorial de los mosquitos que causan la enfermedad. En este sentido, se incluyen los siguientes estudios:

- Científicos del grupo de Salud Tropical de la universidad de Navarra, diseñan actualmente un implante de silicona que libera un insecticida (Ivermectina)⁵⁵ que afecta a los mosquitos que pican a su portador. El estudio se encuentra actualmente en fase preclínica y si todo sigue según lo esperado, este tratamiento podría ser empleado en unos pocos años para niños mayores de 5 años.

- Otra aproximación consiste en la manipulación genética de los machos del mosquito *Anopheles gambiae*, con el fin de obtener como descendencia únicamente mosquitos macho.⁵⁶ Este método, sin embargo, se encuentra aún en fase de investigación, habiéndose logrado erradicar la descendencia de hasta seis generaciones.

- Un novedoso descubrimiento que podría suponer otra alternativa para el control de la enfermedad, es el hallazgo de una cepa de la bacteria *Wolbachia* que puede infectar a los mosquitos y hacerlos resistentes a los parásitos de malaria. El estudio publicado en la revista *Science*, demuestra que al parásito le cuesta sobrevivir en los insectos infectados con esta bacteria.⁵⁷ De demostrarse la utilidad de esta herramienta, que todavía se encuentra en fase de investigación, podría servir de complemento a las medidas actuales tales como las mosquiteras y la quimioprofilaxis.

⁵³ Bueno Marí, R.; Jiménez Pedro, R. *Rev. Esp. Salud Pública* **2008**, *82*, 467-479.

⁵⁴ Ranson, H.; N'Guessan, R.; Lines, J.; Moiroux, N.; Nkuni, Z.; Corbel, V. *Trends Parasitol.* **2011**, *27*, 91-98.

⁵⁵ Chaccour, C. J.; Kobylinski, K. C.; Bassat, Q.; Bousema, T.; Drakeley, C.; Alonso, P.; Foy, B. D. *Malar. J.* **2013**, *12*, 1-8.

⁵⁶ Galizi, R.; Doyle, L. A.; Menichelli, M.; Bernardini, F.; Deredec, A.; Burt, A.; Stoddard, B. L.; Windbichler, N.; Crisanti, A. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 1-8.

⁵⁷ Bian, G.; Joshi, D.; Dong, Y.; Lu, P.; Zhou, G.; Pan, X.; Xu, Y.; Dimopoulos, G.; Xi, Z. *Science* **2013**, *340*, 748-751.

1.6.- RESISTENCIA A LOS AGENTES ANTIMALÁRICOS: NECESIDAD DE NUEVOS FÁRMACOS

La resistencia de *Plasmodium* frente a los antimaláricos comerciales constituye uno de los mayores obstáculos en la lucha frente a malaria.³⁷ Los tratamientos antimaláricos disponibles de buena calidad son escasos y los que a priori son más efectivos se vuelven rápidamente ineficaces debido a la emergencia y extensión de la resistencia de *Plasmodium* a dichos fármacos.⁵⁸

Hoy por hoy, la artemisinina, de excelente eficiencia pero también elevado precio, es el fármaco de elección cuando fallan las alternativas. Este fármaco y sus derivados (Figura 1.9) son activos frente a parásitos multiresistentes a otros medicamentos y tienen una muy baja toxicidad en humanos. Se les considera fármacos útiles en casos de malaria grave, ya que debido a su amplio modo de acción, una única dosis del fármaco es capaz de matar a un gran número de parásitos en todas las etapas del ciclo vital de *Plasmodium*, incluyendo los gametocitos.

Sin embargo, las perspectivas de futuro no son nada alentadoras, ya que se empiezan a observar resistencias de *Plasmodium* a la artemisinina y a sus derivados semisintéticos. Por desgracia no existe por ahora ningún otro compuesto antimalárico que pudiera constituir una alternativa fiable. Debido a ello,⁵⁹ estos compuestos se emplean actualmente en terapias combinadas con otros fármacos antimaláricos (TCA). Estos tratamientos están recomendados por la OMS para combatir la enfermedad en la gran mayoría de zonas endémicas.

Tabla 1.3.- Principales combinaciones de fármacos antimaláricos.

Combinaciones antimaláricas	Restricciones
Artemeter con lumefantrina	–
Artesunato con amodiaquina	En áreas donde la velocidad de cura con la monoterapia de amodiaquina es mayor del 80%
Artesunato con mefloquina	Datos de seguridad insuficientes para recomendar su uso en África
Artesunato con sulfadoxina-pirimetamina	En áreas donde la velocidad de cura con sulfadoxina/pirimetamina es mayor del 80%

Como ya se ha mencionado anteriormente, se ha empezado a observar resistencia a la artemisinina en cinco países de la subregión del Gran Mekong, entre los que se encuentran Camboya, Myanmar, República Democrática Popular de Laos, Tailandia y Vietnam.^{60,61}

⁵⁸ Porter-Kelly, J. M.; Cofie, J.; Jean, S.; Brooks, M. E.; Lassiter, M.; Mayer, D. C. G. *Infec. Drug Resist.* **2010**, 3, 87-94.

⁵⁹ WHO. *Status report on artemisinin resistance*: September, **2014**, 1-8.

⁶⁰ Noedl, H.; Se, Y.; Schaecher, K.; Smith, B. L.; Socheat, D.; Fukuda, M. M. *N. Engl. J. Med.* **2008**, 359, 2619-2620.

⁶¹ Dondorp, A. M.; Nosten, F.; Yi, P. et al. *N. Engl. J. Med.* **2009**, 361, 455-467.

Si la resistencia se expande de Asia a África, podría verse inutilizado gran parte del progreso realizado en la reducción de la mortalidad por malaria.

Por lo tanto, la aparición de resistencia a la artemisinina constituye una preocupación prioritaria en materia de salud pública, dado que pone en peligro la sostenibilidad del esfuerzo que se está realizando a escala mundial para tratar de paliar el avance y proliferación de esta infección. A causa de todo lo anterior, surge la necesidad de encontrar nuevos fármacos,⁶² que además de poseer las propiedades farmacológicas estándar, presenten buenas características de fiabilidad (seguridad en niños), eficacia y economía (costar menos de 1\$ al día el tratamiento), factores imprescindibles para su administración.

El desarrollo de nuevos antimaláricos se ha basado inicialmente en tres aproximaciones: un fármaco se descubre como el componente de un producto medicinal o de una planta (artemisinina y/o quinina), como una molécula sintética que podría ser completamente nueva o una modificación funcional de una molécula ya existente (la mayoría), o bien se manifiestan nuevos usos en fármacos ya conocidos (metotrexato). En todas las aproximaciones el compuesto obtenido debería ser eficaz y presentar propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas aceptables, para poder convertirse en un futuro fármaco en un corto periodo de tiempo.

La cuestión que ahora se plantea la comunidad científico-médica es cuál será el mejor modo de asegurar un continuo desarrollo de nuevos compuestos, capaces de convertirse en fármacos antimaláricos de manera constante. Un estudio de la literatura revela casi 60 dianas biológicas en *P. falciparum* para las cuales se describen inhibidores. Sin embargo, un análisis más detallado de estos inhibidores revela que esta vía, basada en nuevas dianas identificadas mediante el estudio del genoma, todavía no ha proporcionado ni un solo candidato a fármaco, bien sea porque dichos compuestos no poseen actividad en la célula, o bien por falta de propiedades farmacológicas imprescindibles.

Otra alternativa posible consiste en el estudio de actividad de una extensa librería de compuestos sobre parásitos de malaria cultivados. En recientes publicaciones se muestra un cribado de la empresa farmacéutica multinacional GSK,²⁵ que comprende unos dos millones de compuestos, de los que se identificaron 13.553 como inhibidores del crecimiento de *P. falciparum* (cepa 3D7 sensible a la cloroquina) en más del 80% a una concentración de 2 μ M. Otros 8.000 compuestos aproximadamente, muestran también actividad frente a la cepa Dd2 (resistente a múltiples fármacos) y de ellos, menos de 2.000 muestran una toxicidad apreciable cuando se ensayan a 10 μ M frente a células humanas (HepG2). En el cribado se han identificado como positivos todos los fármacos antimaláricos representativos conocidos hasta el momento, lo cual da una idea de la fiabilidad y validez de este estudio.

⁶² Nzila, A.; Chilengi, R. *Trends Pharmacol. Sci.* **2010**, *31*, 277-283.

En un segundo artículo se describen los resultados de la colaboración de GSK con varias instituciones académicas.⁶³ En este caso, una quimioteca de 309.474 compuestos de gran diversidad estructural, se ensayaron frente a la cepa 3D7 de *P. falciparum* a una concentración fija de 7 μM , resultando aproximadamente 1300 compuestos como inhibidores del crecimiento del parásito en más de un 80%. A continuación, estos 1300 compuestos se volvieron a ensayar frente a la cepa multiresistente K1, dando lugar a 1134 *hits* validados. Un análisis de la estructura química para la validación de estos *hits* por topología y clustering, mostró prometedoras relaciones estructura-actividad. Dentro de estos 1134 *hits* había estructuras previamente relacionadas con compuestos antimaláricos conocidos, pero la mayoría eran nuevas. Un total de 561 *hits* dieron valores de $\text{EC}_{50} \leq 2 \mu\text{M}$ para 3D7 y K1 y tras una serie de tests adicionales, se obtuvieron 172 compuestos finales para investigaciones subsiguientes. La principal ventaja de todos estos *hits* estriba en su probada actividad contra parásitos de cultivo y en sus buenas propiedades “*druglike*”, adecuadas para ejercer su acción farmacológica.

Obviamente, la obtención de un *hit* es únicamente el comienzo de un largo y complicado camino hacia un fármaco comercial. GSK ha publicado todos los resultados de los *screenings* realizados en formato de base de datos de acceso público,⁶⁴ incluyendo una amplia información suplementaria. Los compuestos identificados en estos cribados como *hits* (que muestran la actividad deseada por debajo de una concentración predeterminada en un ensayo) han conseguido salvar el mayor obstáculo en el que han fallado la inmensa mayoría de compuestos que se han preparado con el diseño basado en la estructura de la diana: ser activos en ensayos con células completas.

Si todo se desarrolla de forma ideal, se podría obtener un número considerable de candidatos para la fase clínica en unos pocos años. Pero es imprescindible que la industria farmacéutica se comprometa a reincorporarse al desarrollo del nuevo fármaco, desde el momento posterior a los ensayos preclínicos, ya que estas etapas sólo pueden financiarse y llevarse a cabo adecuadamente con la colaboración de la industria farmacéutica.

Para el desarrollo de este trabajo, nuestro grupo de investigación ha establecido una colaboración con la empresa farmacéutica GSK, líder en el sector del descubrimiento, desarrollo y comercialización de fármacos, que ha demostrado desde hace años su compromiso con la investigación de enfermedades como la malaria, que asolan países subdesarrollados. La evaluación biológica de los productos sintetizados se llevará a cabo en el departamento *Fighting diseases in the developing world* perteneciente a la compañía farmacéutica GSK, en Tres Cantos (Madrid).

⁶³ Guiguemde, W. A.; Shelat, A. A.; Bouck, D.; Duffy, S.; Crowther, G. J.; Davies, P. H.; Smithson, D. C.; Connelly, M.; Clark, J.; Zhu, F.; Jiménez-Díaz, M. B.; Martínez, M. S.; Wilson, E. B.; Tripathi, A. K.; Gut, J.; Sharlow, E. R.; Bathurst, I.; Mazouni, F.; Fowble, J. W.; Rorquer, I. *Nature* **2010**, *465*, 311-315.

⁶⁴ <http://www.ebi.ac.uk/chemblntd>. (consultada Junio, **2012**)

2.- OBJETIVOS GENERALES

2.- OBJETIVOS GENERALES

1.- Elección de *hits* adecuados y con buenas propiedades farmacológicas para llevar a cabo el desarrollo del proyecto.

2.- Diseño de la estrategia sintética y preparación del *hit* correspondiente junto con una quimioteca de análogos del mismo. Estudio de su actividad antimalárica y de su capacidad farmacológica.

3.- Reevaluación y rediseño de las estructuras objetivo en función de los resultados de las evaluaciones biológicas y de los estudios estructurales realizados.

3.- ELECCIÓN DEL HIT

3.- TRABAJO PREVIO: ELECCIÓN DEL HIT

Como se ha comentado anteriormente, la empresa farmacéutica GSK ha publicado los resultados obtenidos de los *screenings* realizados (HTS) en una base de datos de acceso público.⁶⁴ En base a ésta, nuestro grupo de investigación ha realizado un segundo cribado mucho más exhaustivo, seleccionando una serie de compuestos de diversa naturaleza en función de los valores observados para los siguientes parámetros farmacológicos:

- **XC₅₀ sobre la cepa 3D7 (µM)**: Este ensayo determina los niveles de lactato deshidrogenasa de *P. falciparum* como indicador del crecimiento del parásito. Sirve para estimar la potencia de los compuestos ensayados como inhibidores del crecimiento del mismo. Cuanto mayor es la inhibición de crecimiento, menor es la concentración de lactato deshidrogenasa, por lo que el valor debe ser lo más bajo posible. Se toman como referencia valores menores de 0.3 µM.

- **Citotoxicidad sobre células humanas HepG2**: El valor debe ser lo más bajo posible para que la ventana terapéutica sea amplia. Se selecciona como referencia una inhibición menor del 10% a la concentración ensayada (10 µM).

- **Porcentaje de inhibición de la cepa 3D7 (sensible a cloroquina) (2 µM)**. Este ensayo determina los niveles de lactato deshidrogenasa de *P. falciparum* como indicador de la inhibición del crecimiento del parásito. El valor debe ser elevado y se toma como referencia un mínimo del 90%.

- **Porcentaje de inhibición de la cepa Dd2 (resistente a cloroquina) (2 µM)**. Este ensayo determina los niveles de lactato deshidrogenasa de *P.falciparum* como indicador de la inhibición del crecimiento del parásito, en cepas multiresistentes. El valor debe ser elevado y parecido al obtenido en el ensayo anterior. Se toma también como referencia un mínimo del 90%.

-**Índice de frecuencia de inhibición (IFI)**: este parámetro da una idea de las veces que una molécula ha resultado ser un *hit* en distintos ensayos de actividad llevados a cabo por GSK. Este valor debe ser bajo, ya que un compuesto con un valor elevado es muy probable que sea poco específico en su modo de acción. Se admite un valor máximo del 10% como referencia.

Una vez llevada a cabo la búsqueda, el número de compuestos continuaba siendo considerablemente elevado, con lo que se seleccionaron únicamente ciertas estructuras teniendo en cuenta criterios sintéticos y farmacológicos adicionales:

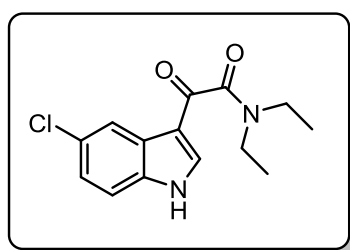
- Los sustratos seleccionados deben poder obtenerse de manera sencilla e introducir diversidad funcional fácilmente en sus estructuras. La OMS impone que el fármaco debe ser barato, costar menos de 1\$ por tratamiento.

- Deben poseer buenas propiedades “*druglike*” y cumplir las reglas de Lipinski.¹⁷ Este se considera un buen punto de partida para el diseño de nuevos fármacos y para afrontar con éxito las etapas de desarrollo posteriores.

- Su estructura debe mantener cierta estabilidad metabólica, ya que los compuestos con una vida media muy baja tienen pocas posibilidades de resultar adecuados en tratamientos antimaláricos monodosis.

Así pues, una combinación de los valores para todos estos parámetros permitió a nuestro grupo de investigación seleccionar varios sustratos, dos de los cuales constituyen la base del presente trabajo.

3.1.- FAMILIA DE DERIVADOS DE INDOL



MW 278.73
ALogP 2.79
PSA 53.17
HBA 2
HBD 1
#Ro5 Vio. 0

%Inhibition 3D7 (2uM) 96
%Inhibition Dd2 (2uM) 96
%Inhibition 3D7 PFLDH (2uM) 0
pXC₅₀ 3D7 7.09 (81.07nM)
%Inhibition HEPG2 (10uM) 1
Inhibition Frequency Index 0
Chemical Cluster NR 882
Graph Frame Cluster 367

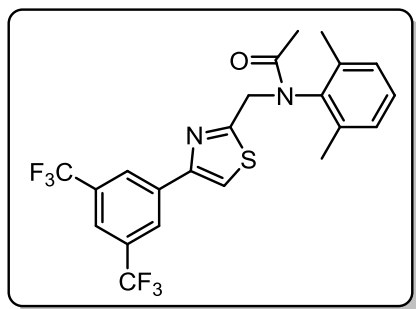
2-(5-cloro-1H-indol-3-il)-N,N-dietil-2-oxoacetamida

Figura 1.10.- Estructura del *hit* y valores obtenidos para los parámetros correspondientes.

La elección inicial de este compuesto reside en su atractivo farmacológico. Es ampliamente conocida la presencia del esqueleto de tipo indol en numerosos fármacos y moléculas orgánicas de origen natural, que poseen un extenso rango de aplicaciones biológicas. Además, se trata de un compuesto “*druglike*” que cumple las reglas de Lipinsky¹⁷ y presenta unos valores adecuados para los parámetros descritos anteriormente. Es posible obtenerlo de manera sencilla mediante síntesis orgánica y permite la introducción y modificación de sustituyentes en la molécula fácilmente.

El único inconveniente de este tipo de estructura es su posible inestabilidad metabólica debido a la presencia de un grupo α -cetoamida, que puede ser susceptible de metabolizarse en el interior del organismo humano. Si así fuera, se trataría de modificar dicha agrupación mediante síntesis orgánica.

3.2.- FAMILIA DE DERIVADOS DE TIAZOL



MW	472.45	%Inhibition 3D7 (2uM)	100
ALogP	6.19	%Inhibition Dd2 (2uM)	99
PSA	61.44	%Inhibition 3D7 PFLDH (2uM)	1
HBA	2	pXC₅₀ 3D7	6.97 (406.64nM)
HBD	0	%Inhibition HEPG2 (10uM)	0
#Ro5 Vio.	1	Inhibition Frequency Index	0.69
		Chemical Cluster NR	1465
		Graph Frame Cluster	241

N-[(4-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)thiazol-2-il)metil]-*N*-(2,6-dimetilfenil)acetamida

Figura 1.11.- Estructura del *hit* y valores obtenidos para los parámetros correspondientes.

La elección de este tipo de estructura radica en la relevancia del núcleo heterocíclico de tiazol, presente en numerosos metabolitos importantes (p.ej. en vitaminas como la tiamina y en antibióticos como las penicilinas). Además, presenta unos valores muy interesantes para los parámetros anteriores desde el punto de vista de actividad y permite una síntesis no muy compleja y asequible, facilitando la introducción de diversidad funcional en la molécula.

Si bien es cierto que cumple en su mayoría las reglas de Lipinsky,¹⁷ presenta una lipofilia quizá demasiado elevada (LogP=6.19) como para ser fácilmente soluble en medio acuoso. No obstante, se tratará de modificar este hecho mediante síntesis orgánica para adecuar sus propiedades fisicoquímicas a las de un futuro fármaco.

Una vez seleccionados los *hits* objetivo, se procederá a la preparación de éstos y de una quimioteca de compuestos derivados de los mismos, realizando posteriormente su análisis biológico para determinar si presentan actividad frente a esta patología.

4.- DISEÑO Y SÍNTESIS DE DERIVADOS CON ESQUELETO TIPO INDOL

4.- DISEÑO Y SÍNTESIS DE DERIVADOS CON ESQUELETO DE TIPO INDOL

4.1. INTRODUCCIÓN

El indol es un compuesto heterobíclico que consiste en un anillo aromático de seis miembros (benceno) condensado con otro de cinco miembros (pirrol). La disposición del par de electrones del nitrógeno, totalmente deslocalizado sobre el anillo de pirrol, explica que el indol sea una base extraordinariamente débil y no presente propiedades análogas a las de una amina simple. Se trata de un sólido cristalino a temperatura ambiente con un p.f de 52 °C, que puede ser producido por bacterias como un producto de degradación del aminoácido triptófano, o bien de forma natural en las heces humanas, presentando un intenso olor fecal. No obstante, a concentraciones muy bajas tiene un olor floral, siendo el componente de muchos aromas de flores y perfumes.

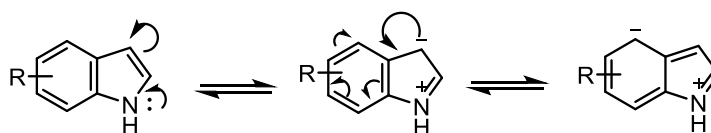


Figura 1.12.- Deslocalización electrónica en el anillo de indol.

Los indoles son compuestos de presencia muy difundida en la naturaleza y han sido citados en numerosas ocasiones como estructuras base privilegiadas para el descubrimiento de fármacos. Ello se debe a su gran capacidad para unirse con elevada afinidad a muchos tipos de receptores biológicos específicos.⁶⁵ Entre los ejemplos de moléculas naturales que presentan el núcleo de indol, cabe destacar el triptófano, un aminoácido esencial componente de la mayoría de proteínas, la serotonina, un neurotransmisor muy importante del sistema nervioso central, y la hormona melatonina, que regula el ritmo diurno de las funciones fisiológicas.⁶⁶

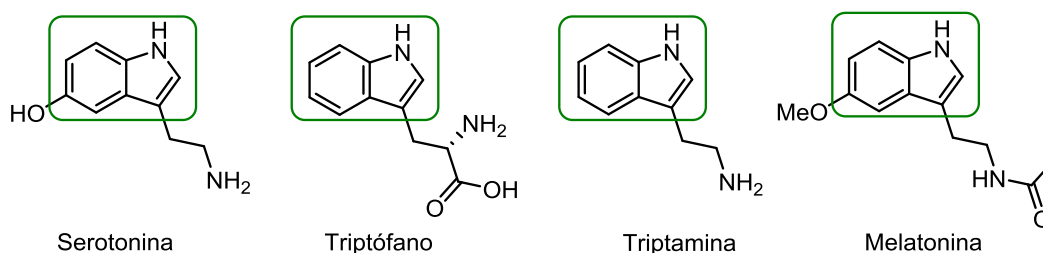


Figura 1.13.- Moléculas orgánicas de origen natural que contienen el núcleo de indol.

⁶⁵ Horton, D. A.; Bourne, G. T.; Smythe, M. L. *Chem. Rev.* **2003**, 103, 893–930.

⁶⁶ Chan, G.; Salazar M. J. et al. *Importancia biomédica de los indoles*. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, **2006**.

En lo que se refiere a su acción farmacológica, se utilizan comúnmente como agentes neuroprotectores que afectan al estrés oxidativo,⁶⁷ a modo de potentes agonistas de receptores de opioides,⁶⁸ como farmacóforos altamente funcionalizados y para el tratamiento de la osteoporosis, enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares entre otras.⁶⁹

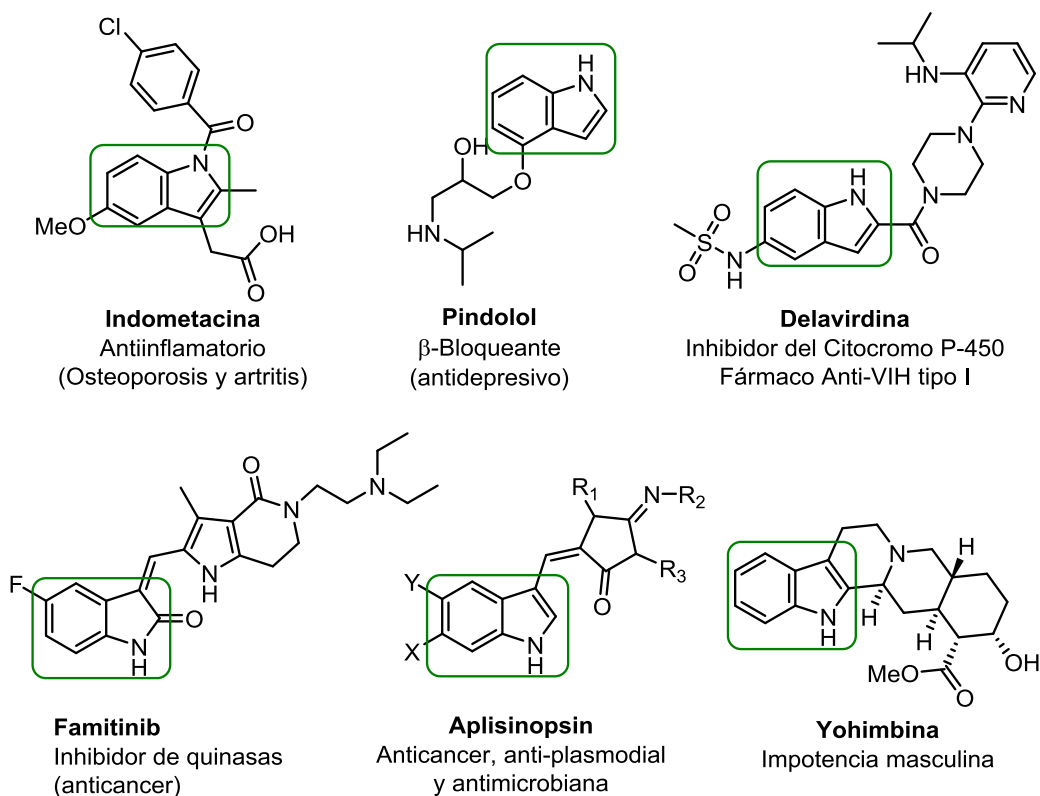


Figura 1.14.- Fármacos comerciales con estructura de tipo indol.

4.1.1.- SÍNTESIS DESCRITAS PARA LA FORMACIÓN DEL SISTEMA DE INDOL

El indol fue preparado por primera vez en 1869 por Adolf von Baeyer, por tratamiento de oxindol con polvo de zinc.⁷⁰ El oxindol deriva de la isatina, que a su vez puede obtenerse fácilmente del colorante índigo. Ya en 1869, Baeyer propuso la primera estrategia sintética para la preparación de este compuesto (Figura 1.15).

⁶⁷ Stolc, S.; Snirc, V.; Majekova, M.; Gasparova, Z.; Gajdosikova, A.; Stvrtina, S. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2006**, 26, 1493–1502.

⁶⁸ Takayama, H.; Misawa, K.; Okada, N.; Ishikawa, H.; Kitajima, M.; Hatori, Y.; Murayama, T.; Wongseripipatana, S.; Tashima, K.; Matsumoto, K.; Horie, S. *Org. Lett.* **2006**, 8, 5705–5708.

⁶⁹ a) Hopkins, C. R.; O’Neil, S. V.; Laufersweiler, M. C.; Wang, Y.; Pokross, M.; Mekel, M.; Evdokimov, A.; Walter, R.; Kontoyianni, M.; Petrey, M. E.; Sabatakos, G.; Roesgen, J. T.; Richardson, E.; Demuth, T. P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 5659–5663. b) Pruss, R.; Jamot, L.; Drouot, C. *Chem. Abstr.* **2007**, 146, 27812. c) Bischoff, H.; Dittrich-Wengenroth, E.; Wuttke, M.; Heckroth, H.; Thielemann, W.; Woltering, M.; Otteneder, M. (Bayer Healthcare A.-G., Germany). *PCT Int. WO 2004005253*, **2004**.

⁷⁰ Baeyer, A.; Emmerling, A. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1869**, 2, 679-682.

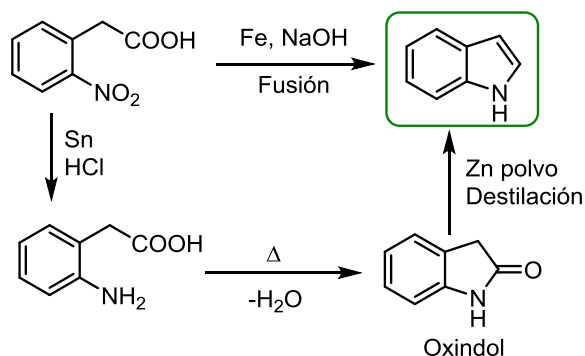


Figura 1.15.- Primera estrategia sintética descrita para la preparación del indol.

El interés del indol y sus derivados se intensificó considerablemente a partir de entonces y son innumerables los métodos desarrollados para la obtención de dichos compuestos. Entre otros muchos, cabe destacar como métodos clásicos la síntesis de Fischer,⁷¹ la síntesis de Leimgruber-Batcho,⁷² la de Bischler-Möhlau⁷³ o la de Bartoli,⁷³ además de otros métodos más recientes.⁷⁴

4.1.1.1.- Síntesis de indoles de Fischer

Se trata de uno de los métodos más antiguos y fiables de síntesis de indoles sustituidos que existen y fue desarrollado por Hermann Emil Fischer en 1883. Consiste en hacer reaccionar una fenilhidrazina sustituida con un aldehído o una cetona, empleando catálisis ácida, bien sea con ácidos de Bronsted (HCl, H₂SO₄) o con ácidos de Lewis (BF₃, ZnCl₂, FeCl₂, AlCl₃).

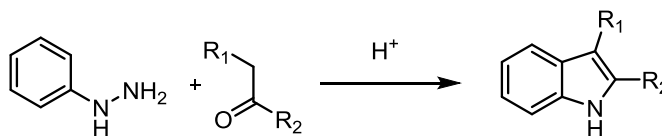


Figura 1.16.- Estrategia de síntesis de indoles de Fischer.

4.1.1.2.- Síntesis de Leimgruber-Batcho

Se trata de una secuencia sintética que permite obtener indoles a partir de derivados de o-nitrotolueno. La primera etapa involucra la formación de una enamina empleando pirrolidina y un acetal de N,N-dimetilformamida. El producto obtenido sufre a continuación un proceso de ciclación reductora que da el correspondiente indol (Figura 1.17).

⁷¹ a) Fischer, E.; Jourdan, F. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1883**, 16, 2241-2245. b) Fischer, E.; Hess, O. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1884**, 17, 559-568.

⁷² Batcho, A. D.; Leimgruber, W. *Org. Synth.* **1985**, 63, 214-225.

⁷³ a) Möhlau, R. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1881**, 14, 171-175. b) Bischler, A. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1892** 25, 2860-2879. c) Bartoli, G.; Palmieri, G.; Bosco, M.; Dalpozzo, R. *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 2129-2132.

⁷⁴ a) Bratulescu, G. *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49, 984-986. b) Vicente, R. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, 9, 6469-6480.

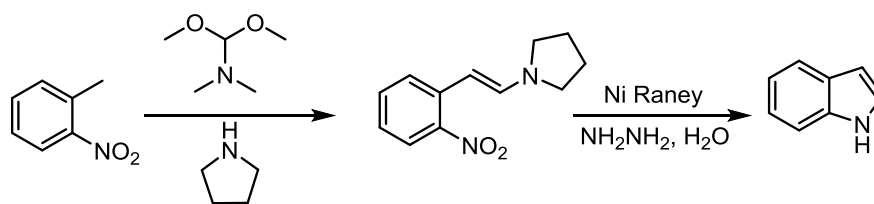


Figura 1.17.- Estrategia de síntesis de indoles de Leimgruber-Batcho.

Además de éstos, existen como ya se ha mencionado, una gran cantidad de métodos alternativos para obtener el esqueleto de indol, pero al no ser este tema el objeto de nuestro estudio, no se seguirá desarrollando este aspecto.

4.1.2.- REACTIVIDAD DEL INDOL

Como cabe esperar de un sistema aromático, el indol sufre reacciones de sustitución electrofílica (S_{EAr}) que tienen lugar principalmente en la posición 3.

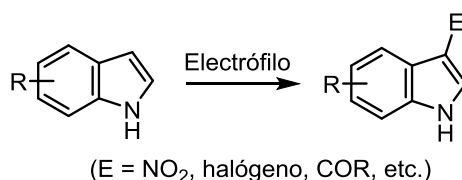


Figura 1.18.- Sustituciones electrofílicas en el anillo de indol.

A semejanza con el pirrol, el sistema de indol exhibe una notable sensibilidad a las especies ácidas, por lo que las sustituciones aromáticas han de llevarse a cabo en condiciones más suaves que las usadas con el benceno. Véase, por ejemplo, el caso de la nitración.⁷⁵

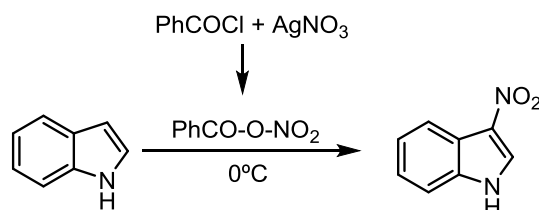


Figura 1.19.- Reacción de nitración del indol.

La acilación de Friedel-Crafts y la sulfonación se producen también exclusivamente sobre la posición C3 del anillo heterocíclico.⁷⁵ Por último, el indol no reacciona con haluros de alquilo a temperatura ambiente. Para ello es necesario aumentar considerablemente la temperatura, teniendo en cuenta que puede provocar reacciones secundarias de polialquilación.

⁷⁵ a) Sainsbury, M. *Heterocyclic Chemistry*, The Royal Society of Chemistry (Tutorial Chemistry texts) Cambridge, **2001**, 97-110. b) Joule, J. A.; Mills, K. *Heterocyclic Chemistry*, 5^o Ed. Wiley & Sons, Hoboken, N.J. USA. **2010**, 373-421.

4.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

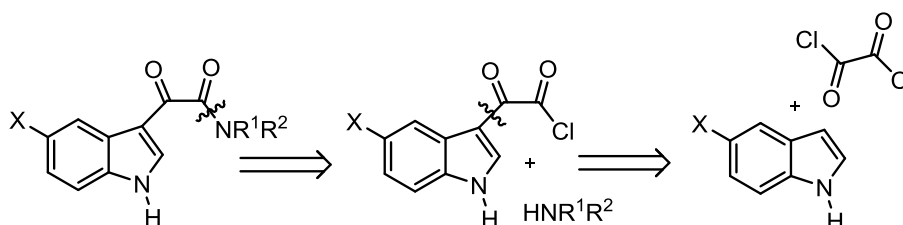
Los objetivos planteados para el desarrollo de esta familia de compuestos, una vez seleccionado el *hit* que se estimó oportuno, fueron los siguientes:

1.- Síntesis del *hit* que presenta actividad antimalárica y evaluación de su capacidad farmacológica.

2.- Síntesis de una librería de compuestos análogos al *hit*, con el fin de evaluar su actividad biológica.

3.- Reevaluación y rediseño de las estructuras objetivo en función de los resultados de las evaluaciones biológicas y de los estudios estructurales realizados.

A continuación se muestra el esquema retrosintético diseñado para la preparación de esta quimioteca de compuestos.



Esquema 1.1.- Análisis retrosintético diseñado para la preparación de esta familia de compuestos.

A la vista del esquema anterior, el compuesto *hit* podría prepararse fácilmente a partir de otro indol más sencillo mediante una reacción de acilación del tipo Friedel-Crafts empleando cloruro de oxalilo y catálisis adecuada.⁷⁶ Una vez obtenido el compuesto intermedio, la estrategia sintética consistiría en llevar a cabo una reacción de amidación entre dicho compuesto y diferentes aminas alifáticas comerciales de las que se dispone en el laboratorio.⁷⁷

Este tipo de molécula presenta varias ventajas a nivel estructural: Permite introducir diversidad funcional tanto en el anillo de indol como en la función α -cetoamida de manera sencilla, cumple con las reglas de Lipinski y presenta un peso molecular adecuado, que admitiría la introducción de una mayor complejidad estructural.

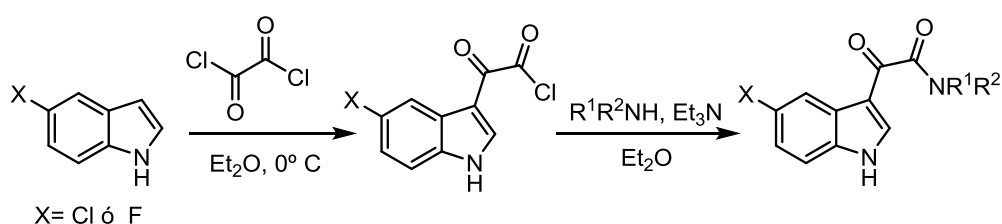
De esta manera se tratará de obtener una pequeña quimioteca de compuestos derivados del *hit* propuesto que se evaluarán posteriormente para determinar su actividad antimalárica.

⁷⁶ a) Aubry, C.; Wilson, A. J.; Emmerson, D.; Murphy, E.; Chan, Y. Y.; Dickens, M. P.; Garcia, M. D.; Jenkins, P. R.; Mahale, S.; Chaudhuri, B. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 6073–6084. b) Gilbert, E. J.; Ziller, J. W.; Vranken, D. L. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 16553–6564. c) Settimo, A. D.; Primofiore, G.; Marini, A. M.; Mori, C.; Franzone, J. S. et al. *Farmaco Ed. Sci.* **1987**, *42*, 17–26.

⁷⁷ a) Victor, W. P.; Sabrina, T.; Talakad, G. L.; David, R. J. O.; Isabella, P.; Da Pozzo, E.; Jinsoo, H.; Sami, S. Z.; Roger, N. G.; Parker, C. A.; Rabiner, E. A.; Fujita, M.; Innis, R. B.; Martini, C.; Da Settimo, J. F. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 366–373. b) Thompson, M. J.; Borsenberger, V.; Jennifer, C.; Louth, J. C.; Judd, E. K.; Chen, B. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 7503–7511.

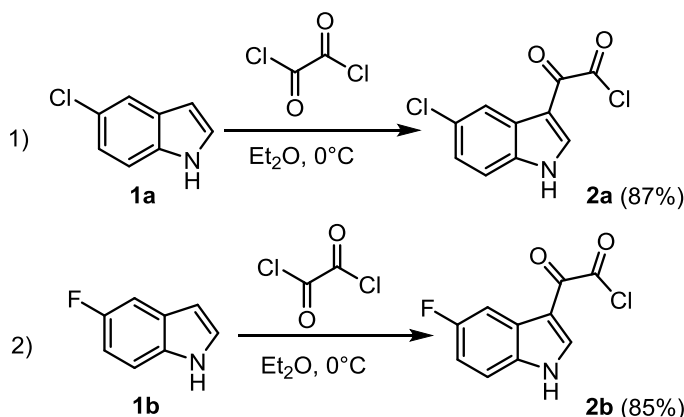
4.3.- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

En conexión con lo mostrado se planteó inicialmente la siguiente estrategia sintética (Esquema 1.2), cuya primera etapa consistió en hacer reaccionar el correspondiente indol comercial con cloruro de oxalilo a 0 °C.⁷⁶ En esta etapa se produce el ataque nucleofílico de la posición 3 del indol sobre uno de los carbonilos del reactivo, actuando el átomo de Cl como buen grupo saliente. Una vez obtenidos los cloruros de oxoacilo correspondientes se tratarán con diferentes aminas alifáticas empleando Et₃N como base para neutralizar el HCl generado en el transcurso de la reacción.⁷⁷



Esquema 1.2.- Ruta sintética propuesta para la preparación del *hit* y de sus derivados.

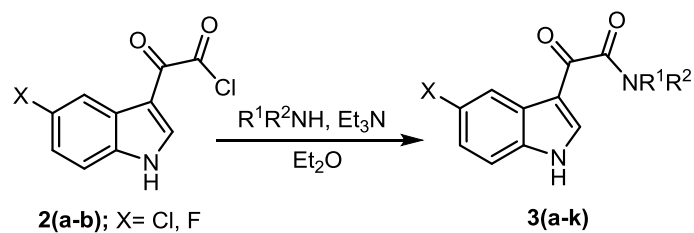
Siguiendo estas premisas fue posible preparar inicialmente dos compuestos intermedios que sólo difieren en el átomo de halógeno que se encuentra unido en la posición 5 del anillo de indol, siendo en uno de los casos un átomo de Cl y en otro un átomo de F.



Esquema 1.3.- Reacción de formación del cloruro de oxoacilo correspondiente.

Una vez preparados los correspondientes cloruros de oxoacilo intermedios **2(a-b)** se hicieron reaccionar mediante un mecanismo de adición-eliminación con diferentes aminas (Tabla 1.4). Para ello se adicionó una disolución de la correspondiente amina sobre una suspensión que contenía el cloruro de α -oxoacilo (**2a-b**) en Et₂O anhidro a 0 °C. Se lograron aislar los sustratos esperados mediante técnicas de cristalización en Et₂O con buenos rendimientos.

Tabla 1.4.- Reacción de amidación para la formación de los análogos esperados 3(a-k).



Compuesto	X	-NR ¹ R ²	Rendimiento (%)
3a (<i>hit</i>)	-Cl		83%
3b	-Cl		78%
3c	-Cl		65%
3d	-Cl		85%
3e	-Cl		87%
3f	-Cl		72%
3g	-F		80%
3h	-F		64%
3i	-F		75%
3j	-F		75%
3k	-F		65%

Los compuestos finales obtenidos (**3a-k**) serán sometidos posteriormente a evaluación biológica con el fin de estimar su actividad antimalárica. En vista de los resultados se procederá a determinar la relación de estructura-actividad existente mediante estudios SAR de los sustratos anteriores.

5.- DISEÑO Y SINTESIS DE DERIVADOS CON ESQUELETO DE TIPO TIAZOL

5.- DISEÑO Y SÍNTESIS DE DERIVADOS CON ESQUELETO DE TIPO TIAZOL

5.1.- INTRODUCCIÓN

El tiazol o 1,3-tiazol es un compuesto heterocíclico, aromático y plano, formado por un anillo de 5 miembros que contiene un átomo de azufre y otro de nitrógeno. Forman parte de la familia de los 1,3-azoles entre los que también se incluyen los imidazoles y oxazoles, en los que el átomo de S ha sido sustituido por un átomo de N o por un átomo de O respectivamente.

Fue descrito por primera vez por A. Hantzsch y J. Weber en 1887 como “la piridina de la serie de los tiofenos”. Sin embargo, su descubrimiento tuvo cierta controversia y no fue hasta la tercera década del siglo XX, cuando Hantzsch pudo finalmente establecer rigurosa y definitivamente el término tiazol para esta familia de compuestos con la estructura abajo indicada.⁷⁸

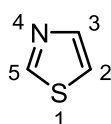


Figura 1.20.- Numeración del núcleo de tiazol.

El tiazol es un líquido de color amarillo pálido con un punto de ebullición de 117 °C y con un olor fuerte que recuerda a la piridina, presentando además propiedades muy parecidas a esta.⁷⁹

En lo que respecta a su interés farmacológico cabe resaltar que este sistema aromático forma parte de moléculas de relevancia biológica tales como la vitamina B1 (tiamina), las penicilinas (antibióticos betalactámicos de amplio espectro, en este caso en la forma reducida de tetrahidrotiazol) o las luciferinas, empleadas para la generación de luz por insectos bioluminiscentes como las luciérnagas.⁸⁰

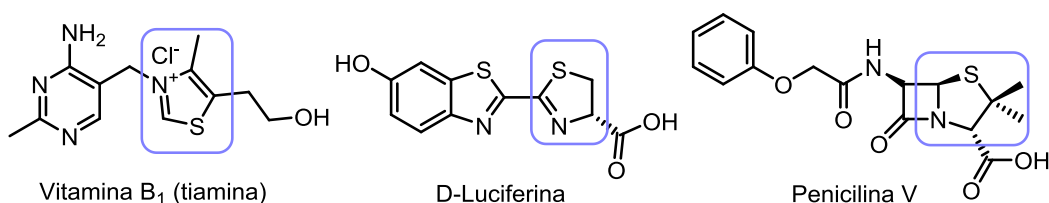


Figura 1.21.- Estructura de la tiamina, penicilina V y luciferina.

⁷⁸ Metzger, J. V. *The Chemistry of Heterocyclic Compounds. Thiazole and its Derivatives*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, N. J. USA **1979**, 34, Parte I.

⁷⁹ Barluenga, J. *Manual de Química Orgánica*, Reverté S.A, Barcelona, España, **1987**.

⁸⁰ Barthelemy, C.; Cornago, M. P.; Esteban, S. *Química Heterocíclica*, UNED, Madrid, España, **2015**.

La vitamina B₁ consta de dos estructuras orgánicas interconectadas; un anillo de pirimidina con un grupo amino y un anillo de tiazol (como catión tiazolio) unido a la pirimidina por un grupo metileno. Está implicada en la liberación de energía a través del metabolismo de carbohidratos, así como en el correcto funcionamiento del sistema nervioso central mediante la síntesis de neurotransmisores como la acetilcolina.⁸¹

Por otra parte, existen estudios recientes sobre compuestos orgánicos que exhiben un sistema de tiazol y que pueden actuar como potenciales agentes antitumorales,⁸² debido entre otras a su capacidad de inhibición de quinasas.⁸³ Además es posible hacer extensivo el uso de este tipo de compuestos para el tratamiento de otras enfermedades de diferente índole como la esquizofrenia,⁸⁴ hipertensión,⁸⁵ procesos inflamatorios,⁸⁶ alergias,⁸⁷ o también como compuestos retrovirales.⁸⁸

Adicionalmente, los anillos de tiazol reducidos forman parte de ciertos antibióticos como la bacitracina A o la tiostreptona. Los derivados de 2-aminotiazol se usan como fungicidas, pesticidas y bactericidas^{89,90} y ciertas bases de Schiff derivadas de 2-amino-5-feniltiazoles presentan propiedades diuréticas.⁹¹ En la industria, muchos mercaptotiazoles se emplean en procesos de vulcanización del caucho y ciertos derivados se emplean como agentes aromatizantes.⁹²

Existen otras muchas moléculas de interés farmacológico que presentan en su estructura un fragmento de tiazol y entre ellas cabe destacar algunas que se muestran en la figura siguiente (Figura 1.22).

⁸¹ Kashyap, S. J.; Garg, V. K.; Sharma, P. K.; Kumar, N.; Dudhe, R.; Gupta, J. K. *Med. Chem. Res.* **2012**, *21*, 2123–2132.

⁸² a) Taori, K.; Paul, V. J.; Luesch, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 1806–1807. b) Sasse, F.; Steinmetz, H.; Hofle, G.; Reichenbach, H. *J. Antibiot.* **2003**, *56*, 520–525.

⁸³ a) Reichelt, A. et al. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *80*, 364–382. b) Jänne, P. A.; Gray, N.; Settleman, J. *Nature Rev.* **2009**, *8*, 709–723.

⁸⁴ Jaen, J. C.; Wise, L. D.; Caprathe, B. W.; Tecele, H.; Bergmeier, S.; Humblet, C. C.; Heffner, T. G.; Meltzner, L. T.; Pugsley, T. A. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 311–317.

⁸⁵ Patt et al. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 2562–2572.

⁸⁶ Sharma et al. *J. Med. Chem.* **2009**, *24*, 890–897.

⁸⁷ Hargrave et al. *J. Med. Chem.* **1983**, *26*, 1158–1163.

⁸⁸ Bell, F. W.; Cantrell, A. S.; Hoberg, M.; Jaskunas, D. R.; Johansson, N. G.; Jordon, C. L.; Kinnick, M. D.; Lind, P.; Morin Jr., J. M.; Noreen, R.; Oberg, B.; Palkowitz, J. A.; Parrish, C. A.; Pranc, J.; Zhang, H.; Zhou, X. X. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 4929–4936.

⁸⁹ a) Hans, N. *Swiss Patent 592103*, **1977** b) Wilson, K. J.; Utig, C. R.; Subhasinghe, N.; Hoffman, J. B.; Rudolph, N. J.; Soll, R.; Molloy, C. J.; Bone, R.; Green, D.; Randall, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 915–918.

⁹⁰ Tsuji, K.; Ishikawa, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 1601–1606.

⁹¹ Andreani, A.; Rambaldi, M.; Mascellani, G.; Rugarli, P. *Eur. J. Med. Chem.* **1987**, *22*, 19–22.

⁹² Pittet, A. O.; Hruza, D. E. *J. Agric. Food Chem.* **1974**, *22*, 264–269.

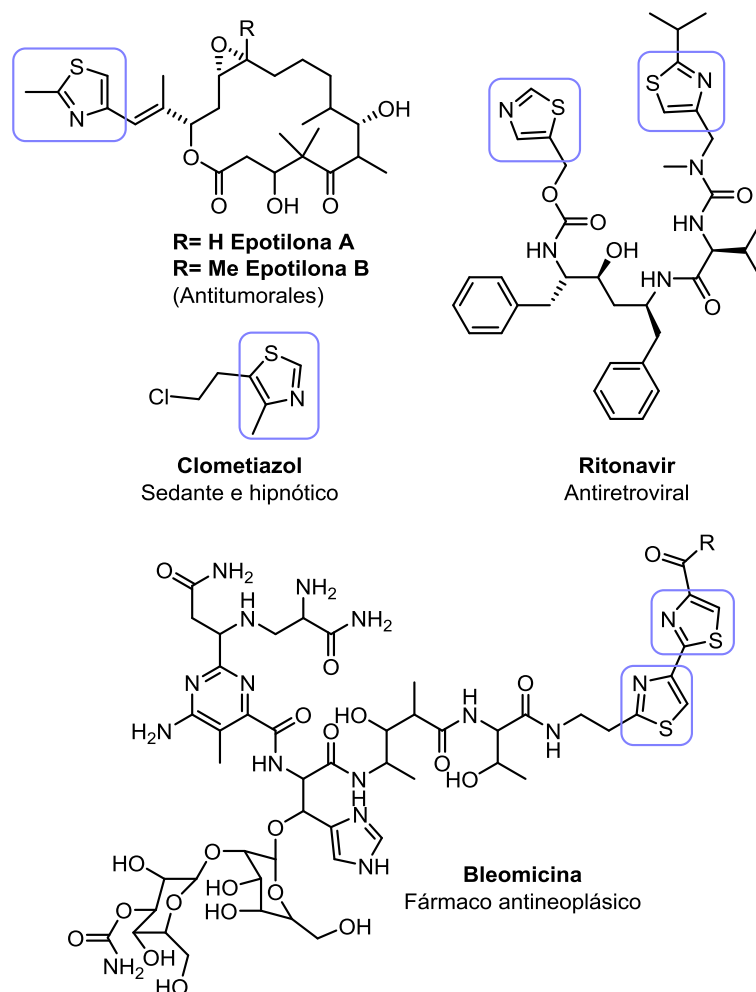


Figura 1.22.- Fármacos que contienen el esqueleto de tiazol.

5.1.1.- SINTESIS DESCRITAS PARA LA FORMACIÓN DEL NÚCLEO DE TIAZOL

El primero en describir sintéticamente la preparación de derivados de tiazol fue **Hantzsch** en 1887, quien los obtuvo mediante condensación de tioamidas⁹³ con α -halocetonas.

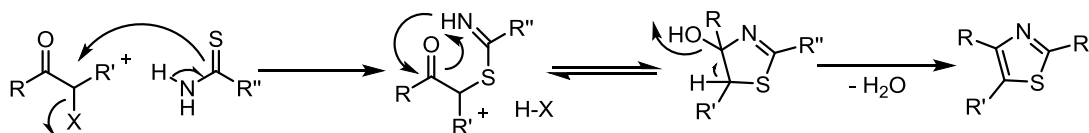


Figura 1.23.- Mecanismo de la reacción de Hantzsch para la preparación de derivados de tiazol.

La reacción transcurre a través del ataque nucleofílico del átomo de azufre de la tioamida sobre el carbono que contiene el átomo de halógeno, produciéndose la sustitución del mismo. A continuación se completa la formación del ciclo mediante el ataque del nitrógeno de la tioamida sobre el carbonilo correspondiente en la α -halocetona, con pérdida de una molécula de H_2O y recuperación de la aromaticidad.

⁹³ a) Hantzsch, A.; Weber, J. H. *Ber Dtsch. Chem. Ges.* **1887**, 20, 3118-3112. b) Hantzsch, A. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1888**, 21, 942-946.

Esta metodología permite la preparación de tiazoles simples con relativa facilidad y con buenos rendimientos, pero en el caso de tiazoles más complejos, los rendimientos disminuyen considerablemente debido a reacciones de deshalogenación que sufre el sustrato durante la transformación.⁹⁴ Con el fin de optimizar la reacción de Hantzsch surgieron posteriormente varias modificaciones de la misma que la convirtieron en una reacción más versátil.⁹⁵ Ejemplos de éstas son las establecidas por Kelly (1986), Holzapfel (1990) o la modificación de Meyers (1994) entre otras.⁹⁶

Además del método de Hantzsch, es posible destacar otros métodos de síntesis más recientes que permiten la obtención directa del núcleo de tiazol a través de otros mecanismos de reacción. Véase las que se muestran a continuación:

5.1.1.1.- Síntesis de Cook-Heilbron⁹⁷

Permite la obtención de 5-aminotiazoles con diferentes patrones de sustitución. Para ello emplea α -aminonitrilos con disulfuro de carbono o diferentes isotiocianatos comerciales. Se forma según el caso 5-amino-2-mercaptotiazoles o 2,5-diaminotiazoles.

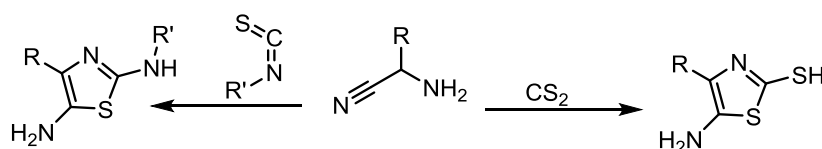


Figura 1.24.- Síntesis de Cook-Heilbron de tiazoles.

5.1.1.2.- Síntesis de Robinson-Gabriel⁹⁸

Se trata de una adaptación de la síntesis de Robinson-Gabriel de oxazoles descrita por dichos científicos entre 1909-1910. En lugar de emplear 2-acilaminocetonas como reactivos de partida, emplea la tioamida correspondiente que se preparó usando P_2S_5 . Esta transformación se lleva a cabo a través de una reacción de condensación intramolecular seguida de deshidratación (Figura 1.25).

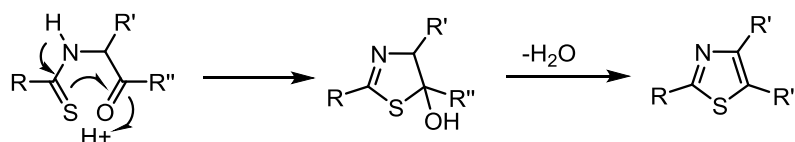


Figura 1.25.- Síntesis de Robinson-Gabriel de tiazoles.

⁹⁴ a) Bach, T.; Heuser, S. *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 1707-1710. b) Carter, J. S.; Rogier, D. J.; Graneto, M. J.; Seibert, K.; Koboldt, C. M.; Zhang, Y.; Talley, J. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, 9, 1167-1170.

⁹⁵ Aguilar, E.; Meyers, A. I. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 2473-2476.

⁹⁶ Majumdar, K. C.; Chattopadhyay, S. K. *Heterocycles in Natural Product Synthesis*, John Wiley & Sons, **2011**, 100-105.

⁹⁷ Cook, A. H.; Heilbron, I.; MacDonald, S. F.; Mahadevan, A. P. *J. Chem. Soc.* **1949**, 1064-1068.

⁹⁸ Robinson, R. *J. Chem. Soc.* **1909**, 95, 2167-2174.

Además de estos, también es posible destacar en ciertos casos la reacción de Herz⁹⁹ y si se requiere mayor diversidad estructural, será preciso recurrir a métodos de síntesis más recientes basados en la química combinatoria.¹⁰⁰

5.1.2.- REACTIVIDAD DEL ANILLO DE TIAZOL¹⁰¹

El anillo de tiazol exhibe carácter básico debido a la protonación del átomo de nitrógeno. Presenta un $pK_a = 2.5$, por lo que dentro de la familia de los 1,3-azoles se encuentra en un nivel intermedio de basicidad entre el oxazol ($pK_a = 0.8$) y el imidazol ($pK_a = 7.1$).

5.1.2.1.- Reacción con electrófilos

Este tipo de reacción requiere la presencia de grupos activantes sobre el anillo de tiazol y se produce principalmente sobre el carbono 5. Las acilaciones de Friedel-Crafts no tienen lugar en tiazoles debido a la interacción del nitrógeno básico con el catalizador ácido de Lewis.



Figura 1.26.- Sustitución electrofílica sobre el anillo de tiazol.

5.1.2.2.- Reacción con nucleófilos

El anillo de tiazol no muestra una reactividad muy acusada frente a nucleófilos. Sin embargo, si tiene lugar la reacción predomina la apertura del ciclo y si hay un átomo de halógeno en la posición C2, se observa la sustitución nucleofílica del mismo.

5.1.2.3.- Reacción con bases

Las interacciones con bases fuertes para llevar a cabo reacciones de metalación tienen lugar preferentemente en el carbono 2 y si esta posición está bloqueada, en el carbono 5.

⁹⁹ Warburton, W. K. *Chem. Rev.* **1957**, 57, 1011–1020.

¹⁰⁰ Heck, S.; Dömling, A. *Synlett.* **2000**, 3, 424-426.

¹⁰¹ Metzger, J. V. *The Chemistry of Heterocyclic Compounds. Thiazole and its Derivatives*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, N. J. USA. **1979**, 34, Parte II.

5.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

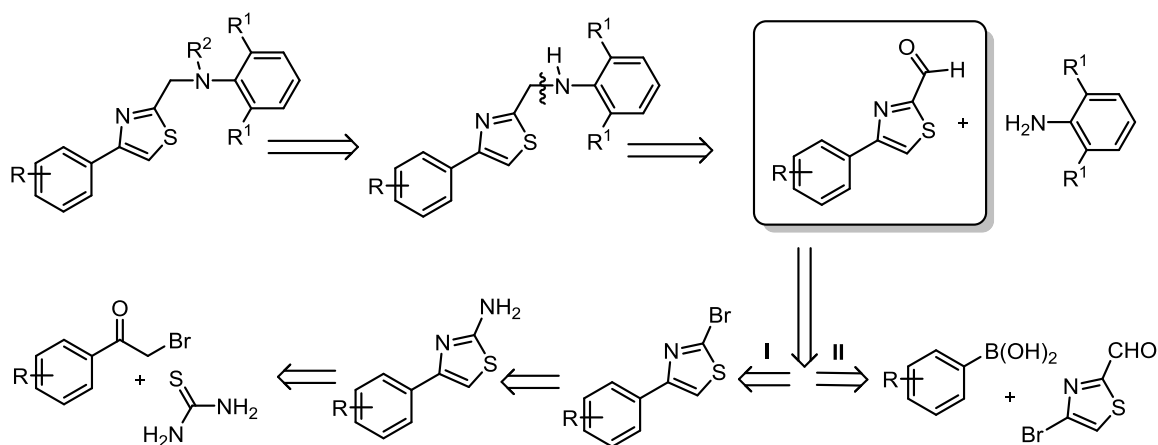
Los objetivos planteados para el desarrollo de esta familia de compuestos, una vez seleccionado el *hit* apropiado, fueron los siguientes:

1.- Síntesis del compuesto *hit* que presenta actividad antimalárica y evaluación de su capacidad farmacológica.

2.- Síntesis de una quimioteca de compuestos análogos al *hit* incluyendo elementos de diversidad estructural, lo que permitirá deducir relaciones preliminares de estructura-actividad.

3.- En el caso de que los compuestos presenten actividad frente a *P. falciparum*, se procederá a la reevaluación y rediseño de las estructuras objetivo en función de los resultados de las evaluaciones biológicas y de los estudios estructurales realizados.

La síntesis de esta familia de compuestos con esqueleto tipo tiazol es posible abordarla a través de varias alternativas que se muestran en el siguiente esquema:



Esquema 1.4.- Esquema retrosintético propuesto para la preparación del compuesto *hit*.

5.2.1.- 1ª ALTERNATIVA PROPUESTA (I)

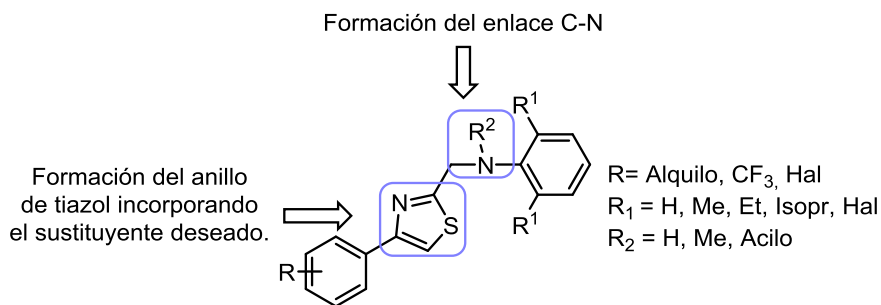


Figura 1.27.- Primera estrategia sintética para la preparación del *hit*.

Esta posibilidad incluye como etapas clave la formación del núcleo de tiazol que ya lleve incorporado un sustituyente aromático y la posterior formación de un enlace C-N, que a su vez podría llevarse a cabo mediante dos aproximaciones:

-Reacción de aminación reductora entre el correspondiente aldehído y la anilina primaria adecuada.¹⁰²

-Reacción de sustitución nucleofílica a partir del derivado halogenado bencílico y la anilina primaria correspondiente.¹⁰³

El esqueleto de tiazol se podría preparar a su vez a partir de la correspondiente α -bromocetona adecuadamente sustituida por reacción con tiourea.^{104,105,106} Finalmente sería posible modificar el grupo amino secundario mediante reacciones de acetilación o metilación, con el objetivo de modular la actividad de los compuestos obtenidos.^{107,108}

5.2.2.- 2ª ALTERNATIVA PROPUESTA (II)

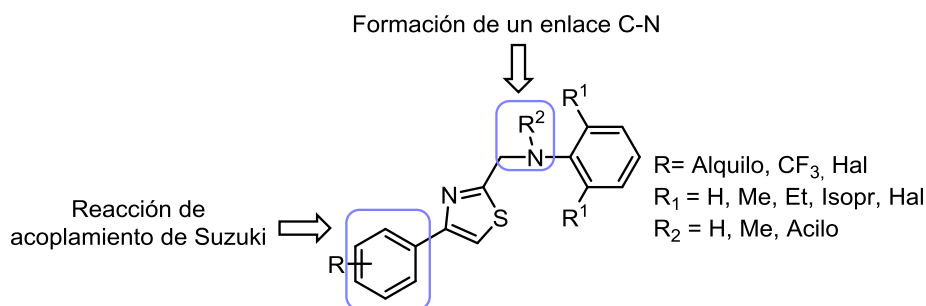


Figura 1.28.- Segunda estrategia sintética para la preparación del *hit*.

En esta segunda alternativa se contempla la preparación del compuesto *hit* empleando como etapas clave una reacción de acoplamiento biarílico de Suzuki¹⁰⁹ y una posterior reacción de formación de un enlace C-N, que al igual que en el caso anterior podría abordarse a través de varias alternativas.^{102,103}

Existen derivados funcionalizados de tiazol, comercialmente accesibles, sobre los cuales se pueden llevar a cabo posteriormente las transformaciones propuestas.

¹⁰² Dangerfield, E. M.; Plunkett, C. H.; Win-Mason, A. L.; Stocker, B. L.; Timmer, M. S. M. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 5470-5477.

¹⁰³ Chabrier De Lassauniere, P. E.; Harnett, J.; Bigg, D.; Liberatore, A. M.; Pommier, J.; Lannoy, J.; Thurieau, C.; Dong, Z. X. *U. S. Pat. Publ.* 20050038087, **2005**.

¹⁰⁴ Chiacchio, U.; Rescifina, A.; Saita, M. G.; Iannazzo, D.; Romeo, G.; Mates, J. A.; Tejero, T.; Merino, P. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 8991-9001.

¹⁰⁵ Chen, H. J.; Wang, W. L.; Wang, G. F.; Shi, L. P.; Gu, M.; Ren, Y. D.; Hou, L. F.; He, P. L.; Zhu, F. H.; Zhong, X. G.; Tang, W.; Zuo, J. P.; Nan, F. J. *Chem. Med. Chem.* **2008**, *3*, 1316-1321.

¹⁰⁶ Karuvalam, R. P.; Haridas, K. R.; Natak, S. K.; Guru Row, T. N.; Rajeesh, P.; Kumari, N. S. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *49*, 172-182.

¹⁰⁷ Shaffer, C. L.; Harriman, S.; Koen, Y. M.; Hanzlik, R. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8268-8274.

¹⁰⁸ Mohri, K.; Suzuki, K.; Usui, M.; Isobe, K.; Tsuda, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **1995**, *43*, 159-161.

¹⁰⁹ Tao, T.; Ma, B.; Peng, Y. X.; Wang, X.; Huang, W.; You, X. Z. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 8669-8679.

En los casos en los que fuera necesaria una mayor variabilidad estructural sería también posible la preparación de otros núcleos de tiazol funcionalizados siguiendo las pautas descritas en la bibliografía para tiazoles¹¹⁰ o bien tiazolidinas,¹¹¹ convertibles por oxidación¹¹² en los primeros.

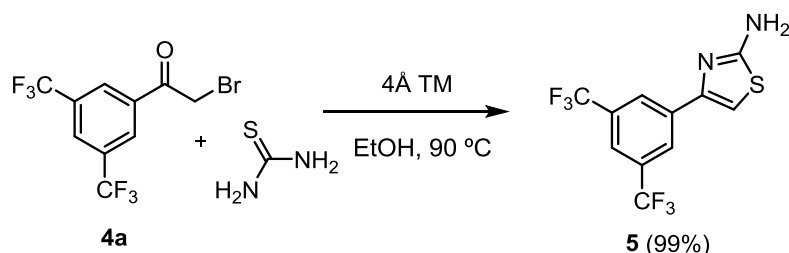
Finalmente, al igual que en el caso anterior, el grupo amino secundario sería susceptible de modificarse mediante reacciones de acetilación¹⁰⁷ o de metilación.¹⁰⁸

Ambas aproximaciones presentan ventajas e inconvenientes desde el punto de vista experimental y económico. Por un lado, la primera aproximación presenta el inconveniente de ser una ruta más larga y con mayor número de pasos intermedios. Por otro, la segunda ruta planteada, al trabajar ya con el núcleo de tiazol debidamente funcionalizado y dada la fiabilidad que presenta la reacción de Suzuki podría ser una buena alternativa sintética, siempre que se disponga de los ácidos borónicos necesarios. En cualquier caso, ambas rutas permitirían obtener una extensa quimioteca de moléculas basadas en la estructura del *hit* seleccionado.

5.3.- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

El *hit* seleccionado presenta sustitución principalmente en los carbonos 2 y 4 del anillo heteroaromático, siendo posible incluir diferentes modificaciones funcionales en el carbono 5, en el caso de que fuese necesario.¹¹³ Inicialmente se planteó una estrategia sintética consistente con la primera aproximación descrita (Figura 1.27), dada la disponibilidad de reactivos en nuestro grupo de investigación y la relativa sencillez experimental.

En relación a esto, el núcleo de tiazol se preparó haciendo reaccionar una α -bromo cetona convenientemente funcionalizada, en este caso 3,5-bis(trifluorometil fenil)-2-bromoetanonona (**4a**), con tiourea comercial a reflujo de etanol, a través de una reacción de tipo Hantzsch (Esquema 1.5). Se obtuvo el producto de acoplamiento esperado (**5**) sin necesidad de purificación y con un excelente rendimiento.^{105,106}



Esquema 1.5.- Preparación del anillo de tiazol funcionalizado.

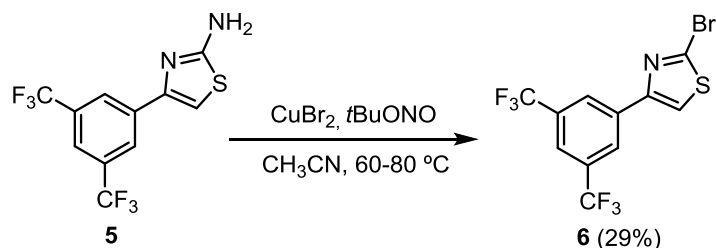
¹¹⁰ Hameed, S.; Akhtar, T. *Curr. Org. Chem.* **2011**, *15*, 694-711.

¹¹¹ Gaumont, A. C.; Gulea, M.; Levillain, J. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 1371-1401.

¹¹² Dawsey, A. C.; Li, V.; Hamilton, K. C.; Wang, J.; Williams, T. J. *Dalton Trans.* **2012**, *41*, 7994-8002.

¹¹³ Roger, J.; Pogan, F.; Doucet, H. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 1179-1186.

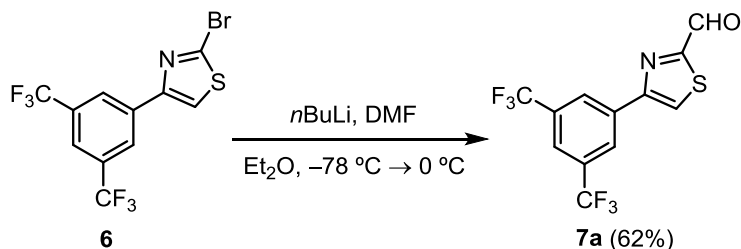
A continuación se hizo reaccionar el compuesto obtenido en la etapa anterior con bromuro de cobre (II) y nitrito de *ter*-butilo a 60 °C. Se trata de una reacción de sustitución electrofílica aromática que transcurre mediante la formación de una sal de diazonio y una posterior sustitución del grupo diazo por un átomo de bromo.¹¹⁴



Esquema 1.6.- Reacción de sustitución electrofílica aromática del grupo amino por un átomo de Br.

El rendimiento fue moderado debido a que se obtuvo además del derivado **6**, una apreciable cantidad de producto secundario de dibromación en C-2 y C-5.

Una vez aislado **6**, se trató de introducir un grupo carbonilo de aldehído en posición 2 del anillo de tiazol. Para ello se hizo reaccionar el sustrato anterior con *n*-BuLi en Et₂O anhidro a baja temperatura y a continuación se trató de formular el litio derivado intermedio empleando como reactivos de formilación tanto *N*-formilmorfolina¹¹⁵ como DMF.^{116,117} De éstas, *N*-formilmorfolina no interaccionaba con el reactivo de partida, mientras que empleando DMF se obtenía el compuesto esperado (**7a**) con un rendimiento aceptable.



Esquema 1.7.- Reacción de carbonilación sobre la posición 2 del anillo de tiazol.

Este compuesto se almacenó bajo atmosfera inerte de argón a causa de su tendencia a la oxidación, originando el ácido carboxílico correspondiente.

Llegados a este punto y dado el bajo rendimiento obtenido en la segunda etapa de la síntesis, así como la elevada formación de productos secundarios tanto en la segunda como en la tercera etapa, se decidió investigar paralelamente un procedimiento alternativo para tratar de solventar estos problemas. La ruta sintética propuesta únicamente difiere de la anterior en la forma de obtener el grupo carbonilo sobre el carbono 2 del anillo heterocíclico.

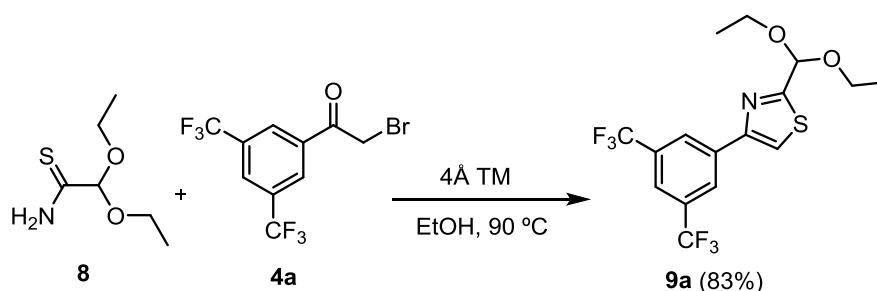
¹¹⁴ Goud, P. M.; Prashant, A. S.; Desai, V.; Watkins, E. B.; Tekwani, B.; Sabnis, Y.; Gut, J.; Rosenthal, P. J.; Avery, M. A. *Med. Chem. Res.* **2005**, *14*, 74-105.

¹¹⁵ Mamada, M.; Nishida, J. I.; Kamaki, D.; Tokito, S.; Yamashita, Y. *Chem. Mater.* **2007**, *19*, 5404-5409.

¹¹⁶ Dondoni, A.; Perrone, D. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 4749-4754.

¹¹⁷ Siméon, F. G.; Brown, A. K.; Zoghbi, S. S.; Innis, R. B.; Pike, V. W. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 3256-3266.

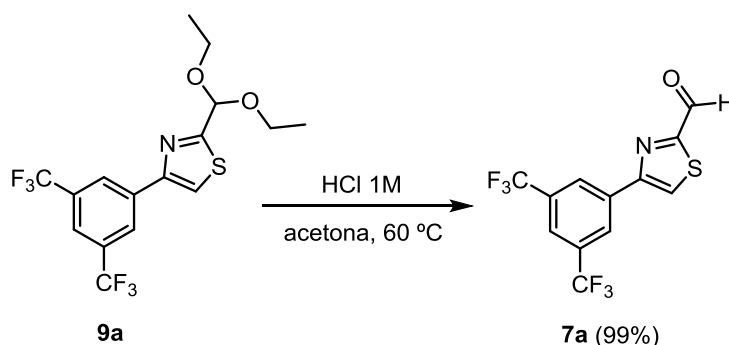
En este caso se introduce protegido en forma de acetal para evitar posibles oxidaciones posteriores, haciendo reaccionar el compuesto **4a** con 2,2-dietoxitioacetamida (**8**)^{105,106} (Esquema 1.8).



Esquema 1.8.- Formación del anillo heterocíclico de tiazol empleando 2,2 dietoxitioacetamida.

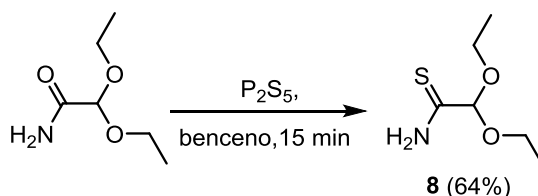
Se obtuvo una mezcla del producto esperado **9a** y del derivado aldehídico **7a**, formado por hidrólisis parcial del acetal correspondiente durante la reacción (85:15).

Consiguientemente se procedió a la conversión total de esta mezcla de compuestos en el correspondiente aldehído (**7a**). Para ello se sometió el crudo obtenido de la etapa anterior a reflujo de acetona en medio ácido, obteniéndose el producto esperado con rendimiento prácticamente cuantitativo.^{104,118}



Esquema 1.9.- Hidrólisis del acetal en medio ácido.

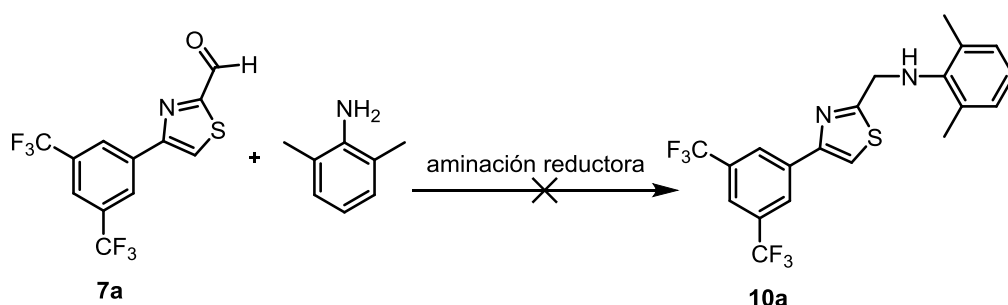
Para la preparación de la tioacetamida funcionalizada inicial (**8**) se hizo reaccionar 2,2-dietoxiacetamida comercial con P₂S₅ en benceno anhidro. Se obtuvo el producto deseado que se logró purificar por cristalización empleando acetato de etilo.¹⁰⁴



Esquema 1.10.- Preparación de la tioacetamida inicial a partir de la acetamida correspondiente.

¹¹⁸ Anthony, N. G.; Breen, D.; Donoghue, G.; Khalaf, A. I.; Mackay, S. P.; Parkinson, J. A.; Suckling, C. J. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7, 1843-1850.

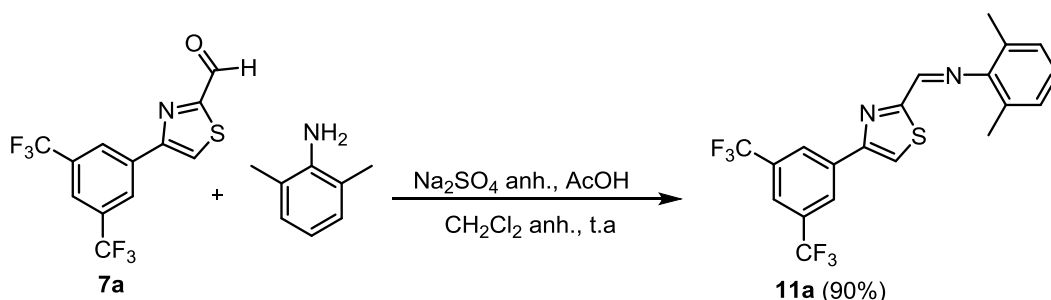
Una vez obtenido el compuesto intermedio **7a**, se trató de hacer reaccionar con diferentes anilinas a través de un procedimiento de aminación reductora que permitiese la obtención directa de la amina secundaria.^{102,119,120,121} En una primera instancia se ensayó únicamente con 2,6-dimetilanilina, puesto que era el sustrato necesario para la preparación del compuesto *hit*. Se ensayaron diversos agentes reductores para llevar a cabo dicha transformación, tales como NaBH_3CN , $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ y NaBH_4 , empleando EtOH y MeOH como disolventes de la misma (Esquema 1.11).



Esquema 1.11.- Intento de reacción de aminación reductora empleando 2,6-dimetilanilina.

No se logró obtener el compuesto deseado bajo ninguna de estas condiciones. En algunos casos se recuperaba el sustrato de partida sin reaccionar pero en otros, en los que se empleaba ácido acético glacial en cantidad catalítica, se obtenía la imina intermedia correspondiente que no se conseguía reducir en las condiciones descritas.

Por tanto y a la vista de los resultados experimentales se decidió aislar en primer lugar la imina **11a** y someterla posteriormente a la acción de un reductor más potente como es el hidruro de aluminio y litio (LiAlH_4), para tratar de obtener finalmente la amina secundaria deseada (**10a**). La formación de la imina se llevó a cabo haciendo reaccionar el aldehído **7a** con 2,6-dimetilanilina, empleando ácido acético glacial en cantidad catalítica.¹²²



Esquema 1.12.- Reacción de formación de la imina intermedia **11a**.

¹¹⁹ Thomas, E. W.; Cudahy, M. M.; Spilman, C. H.; Dinh, D. M.; Watkins, T. L.; Vidmar, T. J. *J. Med. Chem.* **1992**, 35, 1233-1243.

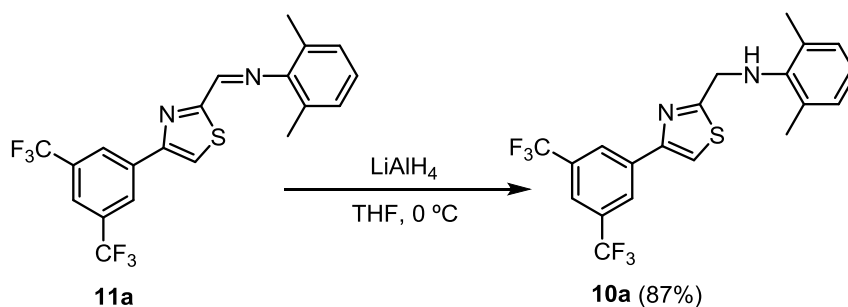
¹²⁰ Abdel-Magid, A. F.; Carson, K. G.; Harris, B. D.; Maryanoff, C. A.; Shah, R. D. *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 3849-3892.

¹²¹ Feng, Y. et al. PCT. Int. WO2010036316, Abril, **2010**.

¹²² Streckowski, L.; Cegla, M. T.; Harden, D. B.; Kong, S. B. *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 2464-2466.

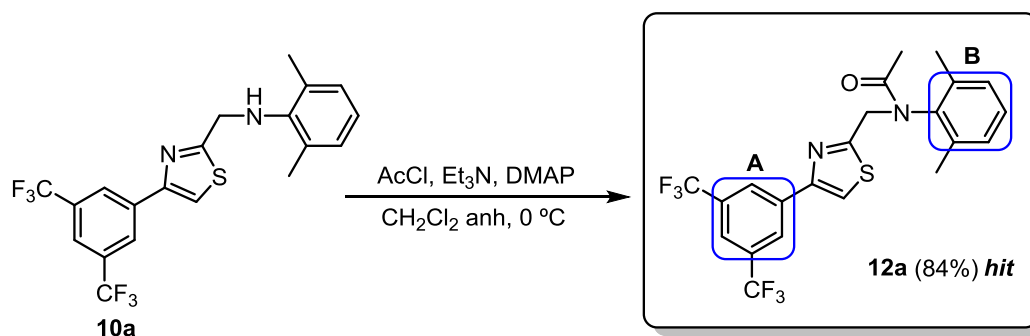
Se obtuvo el compuesto esperado que descomponía rápidamente en contacto con cualquier tipo de medio ácido, incluido el gel de sílice. En base a este inconveniente y puesto que experimentos posteriores revelaron que el acoplamiento había sido superior al 90%, se decidió proceder con el crudo de reacción en la siguiente etapa de la síntesis y tratar de aislar el compuesto reducido.

Así pues, se hizo reaccionar el producto anterior (**11a**) con LiAlH_4 en THF anhidro y a $0\text{ }^\circ\text{C}$,¹²³ obteniéndose el compuesto **10a** con buen rendimiento (Esquema 1.13).



Esquema 1.13.- Reducción de la correspondiente imina **11a** empleando LiAlH_4 .

Por último se trató de derivatizar el nitrógeno secundario de la molécula con un grupo acetilo para lograr obtener el *hit* de esta familia de compuestos. Para ello se emplearon como reactivos de acetilación: anhídrido acético, cloruro de pivaloilo y cloruro de acetilo,^{107,124} que no proporcionaron inicialmente buenos resultados. Sin embargo, el tratamiento con cloruro de acetilo, Et_3N y DMAP como catalizador, dio lugar al compuesto esperado (**12a**) con buen rendimiento¹²⁵ (Esquema 1.14).



Esquema 1.14.- Reacción de acetilación para preparar el compuesto final (*hit*).

Una vez obtenido el *hit* y siguiendo la metodología sintética descrita, se trató de preparar una amplia galería de compuestos incluyendo modificaciones tanto en el anillo A como en el anillo B de esta molécula (Esquema 1.14). Todos los derivados obtenidos se someterán a evaluación biológica para determinar su actividad farmacológica.

¹²³ Gao, A.; Mu, Y.; Zhang, J.; Yao, W. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2009**, 24, 3613-3621.

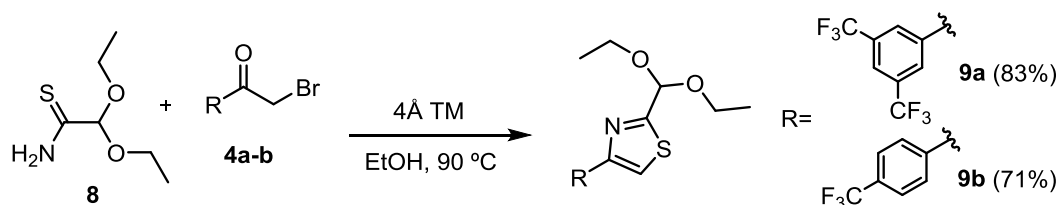
¹²⁴ Hoeppling, A. et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 1184-1194.

¹²⁵ Biadatti, T.; Dumais, L.; Saulet C.; Talano, S.; Daver, S. *PTC Int.* WO20066066978 A1, Junio, **2006**.

5.3.1.- PREPARACIÓN DE DERIVADOS DEL *HIT* EMPLEANDO LA PRIMERA METODOLOGÍA SINTÉTICA DESCRITA

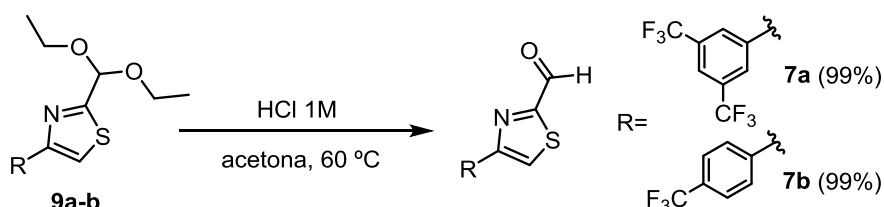
La síntesis del *hit* se completó con la preparación de varios análogos siguiendo esta misma estrategia. Inicialmente se trató de estudiar de manera conjunta la influencia de la cadena alquílica sobre el anillo de anilina (anillo B) y el efecto de los sustituyentes sobre el sistema biarílico (anillo A). Para ello se modificaron las α -bromocetonas de partida y las anilinas empleadas como reactivos de acoplamiento en la reacción de aminación.

El primer paso de la síntesis consistió en la formación del derivado de tiazol sustituido,¹⁰⁴ empleando como precursores 3,5-bis(trifluorometilfenil)-2-bromoetanonona (**4a**) y 4-trifluorometilfenil-2-bromoetanonona (**4b**). Con esta modificación inicial se trató de evaluar tanto la influencia de los factores electrónicos, como la importancia del carácter lipofílico de los compuestos sobre la actividad de los derivados preparados.



Esquema 1.15.- Formación del anillo de tiazol con diferente funcionalización.

Seguidamente se sometieron ambos acetales a hidrólisis ácida para dar lugar a los correspondientes aldehídos.

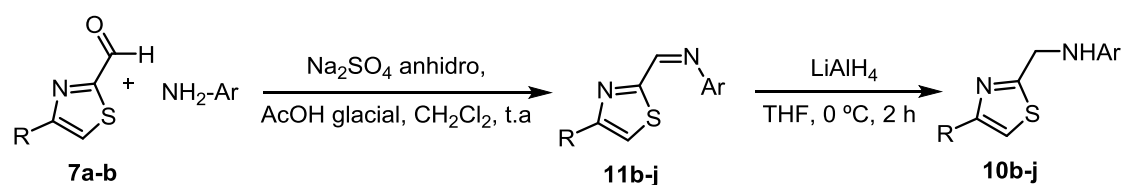


Esquema 1.16.- Hidrólisis del acetal para obtener el correspondiente aldehído.

A continuación, estos compuestos **7(a-b)** se hicieron reaccionar con diferentes anilinas para obtener las correspondientes iminas **11(b-j)**, siguiendo las condiciones de reacción descritas anteriormente.¹²² Éstas se sometieron posteriormente sin purificación previa, a reducción con LiAlH_4 , proporcionando las aminas secundarias esperadas **10(b-j)** con rendimientos aceptables (Tabla 1.5).

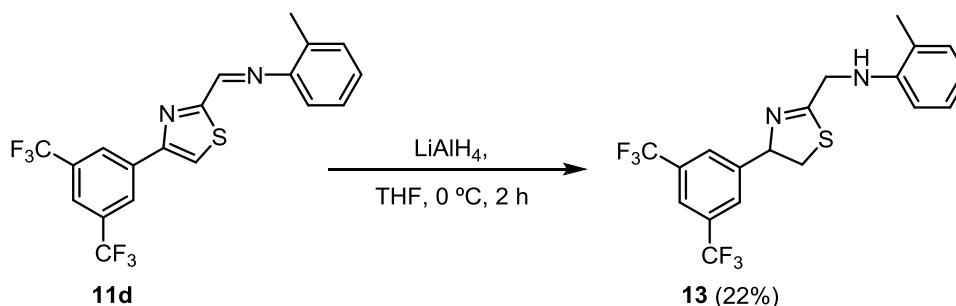
Dichos sustratos se evaluarán posteriormente con el objeto de estudiar la influencia que ejerce un grupo dador (-NH) o receptor (-COCH₃) de puentes de hidrógeno sobre la actividad antimalárica.

Tabla 1.5.- Formación de las iminas correspondientes y reducción a las aminas secundarias **10(b-j)**.



Compuesto	-R	-Ar	Rendimiento
10b			65%
10c			45%
10d			34%
10e			72%
10f			73%
10g			40%
10h			38%
10i			35%
10j			70%

Adicionalmente y vinculado a lo anterior, se llevó a cabo la preparación de un derivado de 4,5-dihidrotiazol con el fin de determinar la importancia del anillo heteroaromático en la actividad de los compuestos preparados. Para ello se trató de reducir la imina **11d**, derivada de 2-metil-anilina y de 3,5-(bis(trifluorometilfenil)-2-bromoetanona (**4a**), empleando un mayor número de equivalentes de LiAlH_4 como agente reductor.

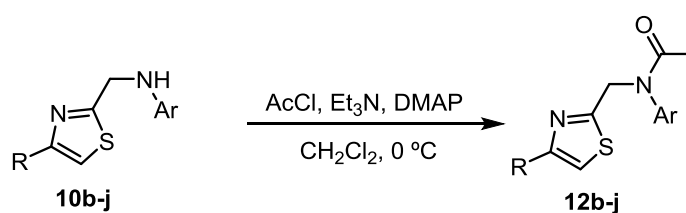


Esquema 1.17.- Reducción del anillo de tiazol a 4,5-dihidrotiazol empleando LiAlH_4 .

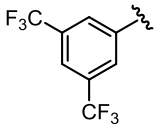
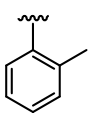
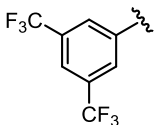
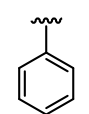
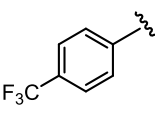
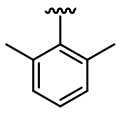
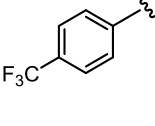
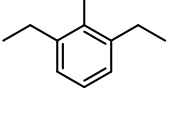
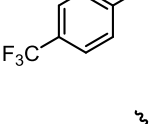
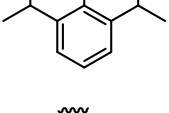
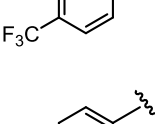
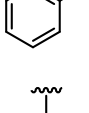
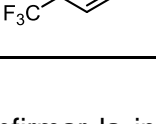
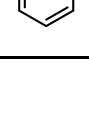
Se obtuvo el anillo de 4,5-dihidrotiazol correspondiente (**13**), que se evaluó junto a los anteriores para determinar si se mantenían las propiedades farmacológicas del correspondiente tiazol, así como los valores de actividad de esta familia de compuestos.

A continuación se hicieron reaccionar los compuestos **10b-j** con cloruro de acetilo en medio básico, siguiendo las condiciones de reacción descritas anteriormente para la preparación del *hit*.¹²⁵ Fue posible obtener todos los *N*-acetil análogos a excepción del derivado **12j**, donde únicamente se observó la formación de un compuesto de masa molecular mayor, que no correspondía con el producto de acetilación esperado y que no ha sido identificado (Tabla 1.6).

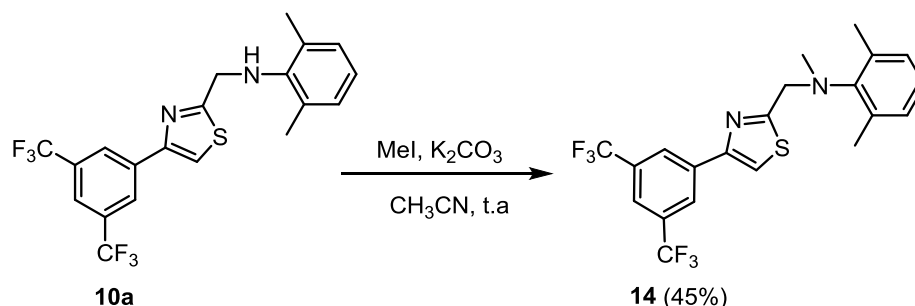
Tabla 1.6.- Reacción de acetilación para obtener los compuestos finales **12b-j**.



Compuesto	-R	-Ar	Rendimiento
12b			83%
12c			40%

12d			70%
12e			65%
12f			90%
12g			78%
12h			91%
12i			70%
12j			-

Paralelamente y para confirmar la influencia del grupo acetilo se llevó a cabo la metilación del compuesto **10a**. Inicialmente se hizo reaccionar **10a** con MeI como agente electrofílico e NaH como base,^{108,126} recuperándose en todos los casos ensayados el producto de partida sin reaccionar. En vista de ello se llevó a cabo dicha transformación empleando K₂CO₃ anhidro como base en acetonitrilo como disolvente,¹²⁷ obteniéndose finalmente el compuesto esperado (**14**) con un rendimiento aceptable (Esquema 1.18).



Esquema 1.18.- Reacción de metilación del compuesto **10a**.

¹²⁶ Borch, R. F.; Hassid, A. I. *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 1673-1674.

¹²⁷ Luo, Y.; Carnell, A. J.; Lam, H. W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 6762-6766.

Como estudio complementario se decidió evaluar la influencia de la posición del grupo amino sobre la actividad de los compuestos. Para ello se propuso la posibilidad de obtener un análogo del compuesto *hit* en el que dicho grupo funcional se encontrase unido al C-2 del anillo de tiazol, tal y como se muestra en la siguiente figura.

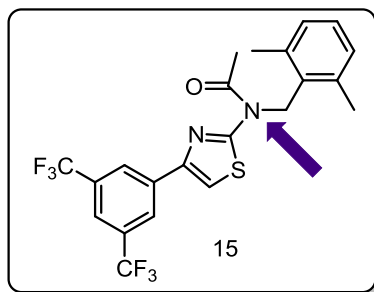
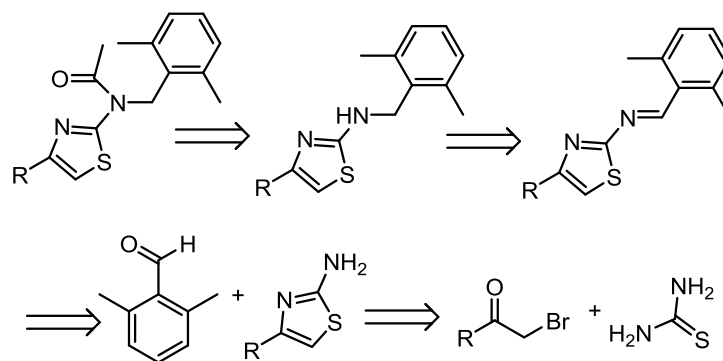


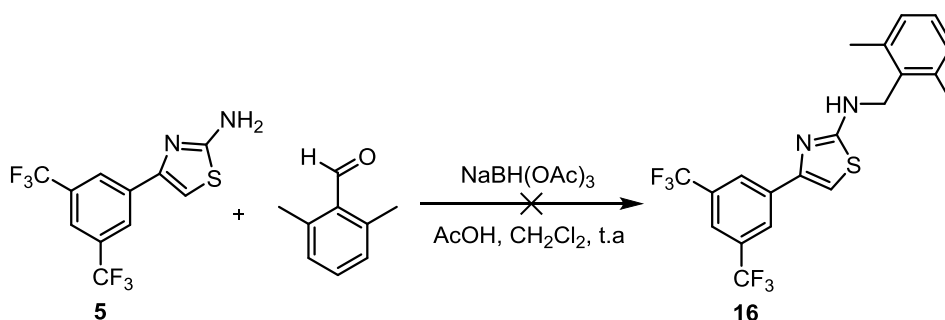
Figura 1.29.- Análogo del compuesto *hit* variando la posición del nitrógeno secundario.

Para este fin sería preciso modificar la ruta sintética propuesta hasta el momento, haciendo uso de las mismas reacciones químicas llevadas a cabo para la preparación de los compuestos anteriores. El esquema retrosintético planteado se muestra a continuación (Esquema 1.19).



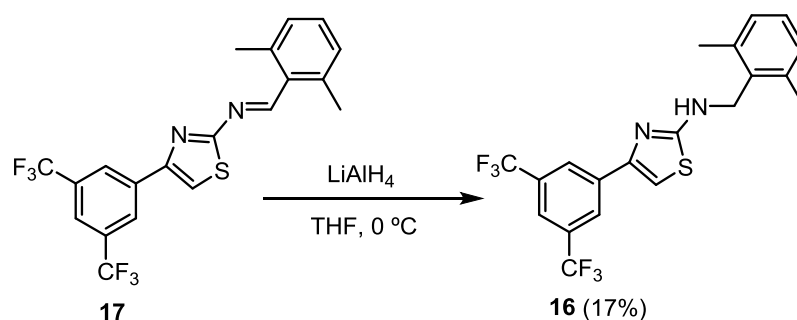
Esquema 1.19.- Esquema retrosintético propuesto para la preparación de estos derivados.

Para la preparación del núcleo funcionalizado de tiazol se hizo reaccionar 3,5-bis(trifluorometilfenil)-2-bromoetanona (**4a**) con tiourea, reportando el compuesto **5** con un excelente rendimiento (Esquema 1.5). A continuación se hizo reaccionar **5** con 2,6 dimetilbenzaldehído en condiciones de aminación reductora para tratar de obtener el compuesto **16** (Esquema 1.20).



Esquema 1.20.- Intento de reacción de formación de la amina secundaria **16**.

Al igual que ocurría con los derivados anteriores, este procedimiento no proporcionó los resultados esperados. Además de gran cantidad de producto de partida se obtuvo la imina intermedia **17**, que era incapaz de reaccionar con dicho agente reductor en las condiciones propuestas. Para solventar este problema se trató dicha imina (**17**) con LiAlH_4 ¹²³ obteniéndose el compuesto **16**, si bien con bajo rendimiento (Esquema 1.21).



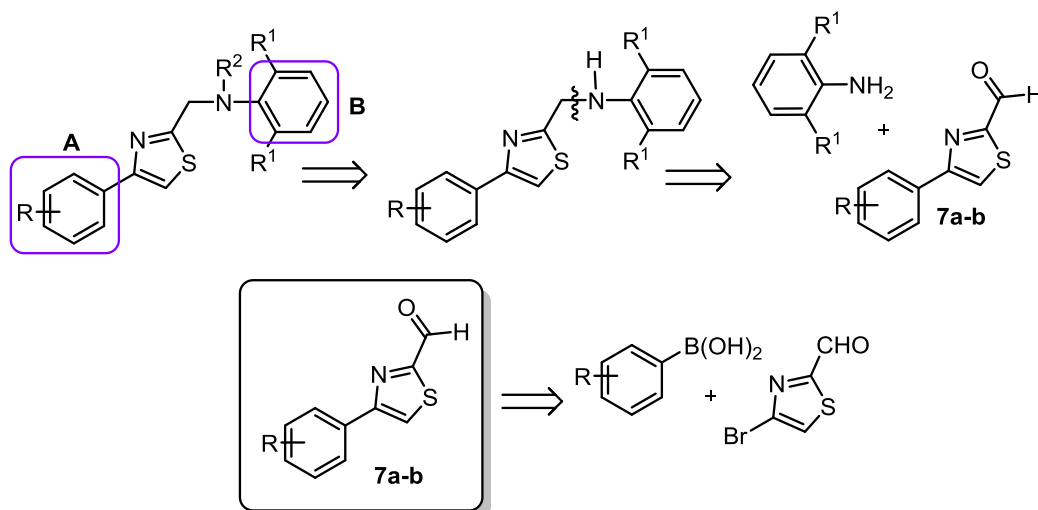
Esquema 1.21.- Reducción de la imina **17** empleando LiAlH_4 .

Por último se trató de funcionalizar el nitrógeno secundario a través de un grupo acetilo¹²⁵ y de un grupo metilo.¹²⁷ En ninguno de los casos ensayados se obtuvo el producto esperado debido probablemente a la baja densidad electrónica que presenta dicho nitrógeno, capaz de interactuar por resonancia con el heterociclo y a su vez con el anillo bencénico disustituído con grupos electrón atrayentes. En consecuencia, únicamente el compuesto **16** se evaluará para determinar su actividad biológica.

En conclusión y siguiendo este tipo de metodología, se han logrado preparar una serie de análogos del *hit* con diferente funcionalización, que se ensayaran posteriormente para determinar su actividad antimalárica y establecer relaciones concretas de estructura-actividad.

5.3.2.- PREPARACIÓN DE DERIVADOS DEL *HIT* EMPLEANDO LA SEGUNDA METODOLOGÍA SINTÉTICA DESCRITA

Paralelamente se investigó el desarrollo de una nueva estrategia sintética que consistía en hacer reaccionar el núcleo de tiazol comercial adecuadamente funcionalizado con un ácido fenilborónico sustituido, a través de una reacción de acoplamiento de Suzuki. Esta aproximación presenta la ventaja de ser sintéticamente más sencilla que la anterior y permitirá aislar el compuesto intermedio **7(a-b)** en un número menor de pasos (Esquema 1.22).



Esquema 1.22.- Esquema retrosintético propuesto para la segunda estrategia planteada.

A partir de la obtención del derivado aldehídico, la secuencia propuesta es idéntica a la anterior, por lo que se prepararán inicialmente análogos del compuesto *hit* con diferente sustitución sobre el anillo B, manteniendo invariables los sustituyentes del sistema biarílico (anillo A).

Reacción de acoplamiento de Suzuki

La reacción de acoplamiento de Suzuki, también conocida como reacción de Suzuki-Miyaura, es una reacción entre ácidos aril- o vinilborónicos y haluros o triflatos de arilo o vinilo, que permite la formación de enlaces C-C con buenos rendimientos. Presenta una serie de factores sintéticos importantes,¹²⁸ tales como que no se ve afectada por la presencia de agua, tolera un amplio número de grupos funcionales y los subproductos que se forman no son tóxicos, lo que representa ventajas no sólo en su realización sino también en su procesado. Además, esta reacción también puede llevarse a cabo con anillos heteroaromáticos diferentemente sustituidos.

Fue descrita por primera vez por Akira Suzuki en 1979,¹²⁹ quien compartió en 2010 el premio Nobel de Química con Richard F. Heck y Ei-ichi Negishi por el descubrimiento y desarrollo de las reacciones de acoplamiento catalizadas por paladio (Pd).¹³⁰ A continuación se muestra el ciclo catalítico por el cual transcurren este tipo de acoplamientos¹³¹ (Figura 1.30).

¹²⁸ Casalnuovo, A. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 4324–4330.

¹²⁹ a) Miyaura, N.; Yamada, K.; Suzuki, A. *Tetrahedron Lett.* **1979**, 20, 3437-3440. b) Miyaura, N.; Suzuki, A. *Chem. Comm.* **1979**, 19, 866–867.

¹³⁰ Nobelprize.org. "The Nobel Prize in Chemistry 2010". Nobel Prize Foundation. **2013**.

¹³¹ Miyaura, N.; Suzuki, A. *Chem. Rev.* **1995**, 95, 2457-2483.

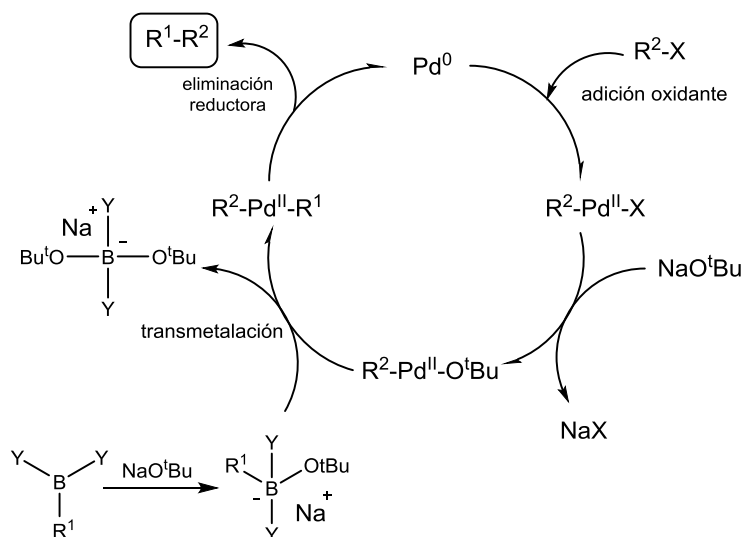


Figura 1.30.- Ciclo catalítico para la reacción de acoplamiento de Suzuki.

El ciclo comienza con la adición oxidante del paladio al enlace C-X, proceso que comporta la oxidación de Pd⁰ a Pd^{II}. En la mayoría de los casos esta es la etapa determinante de la velocidad de reacción y se ve favorecida por la presencia de grupos atrectores de electrones y por grupos salientes eficaces (I > Br > OTf > Cl).¹³² El proceso ocurre con retención de la estereoquímica para haluros vinílicos, mientras que para haluros alílicos y bencílicos se produce la inversión de la misma.¹³³ En esta etapa se forma inicialmente la conformación *cis* del complejo de paladio, que rápidamente isomeriza a la forma *trans*.

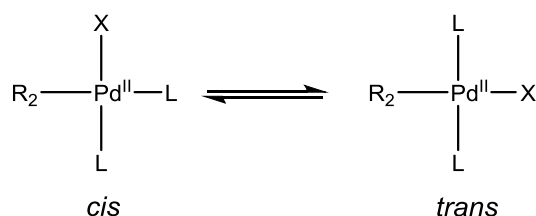


Figura 1.31.- Isomerización de la forma *cis* a la forma *trans* del complejo de paladio.

El siguiente paso del ciclo catalítico es el paso de transmetalación, que consiste en la transferencia del ligando (R¹) de la especie organoborónica al complejo de paladio anterior, sustituyendo de esta forma la base (OR) que se había adicionado previamente. Esta reacción tiene lugar sólo en la presencia de una base, que activa el compuesto organoborónico para la transmetalación. El último paso del ciclo es la eliminación reductora, en la que se produce la liberación del compuesto R¹-R² (formación del enlace C-C) y la reducción del catalizador de paladio que se convierte de nuevo en Pd⁰. Esta etapa transcurre con retención de la estereoquímica en el producto final.¹³⁴

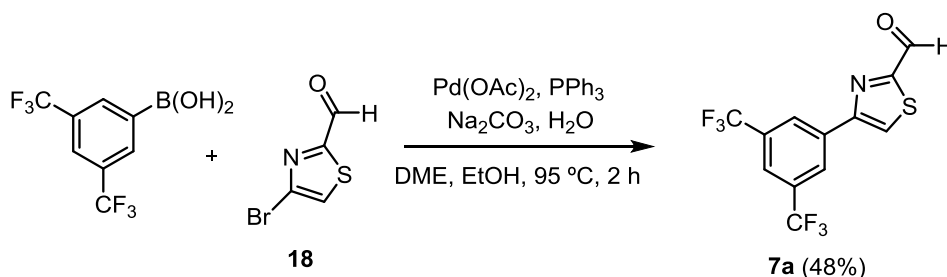
¹³² Kurti, L. *Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis*, Elsevier Academic Press, Marzo, 2005.

¹³³ Stille, J. Q.; Lau, K. S. Y. *Acc. Chem. Res.* 1977, 10, 434-442.

¹³⁴ Ridgway, B. H.; Woerpel, K. A. *J. Org. Chem.* 1998, 63, 458-460.

Como ya se ha comentado, la reacción de acoplamiento de Suzuki es más versátil que otras reacciones de acoplamiento descritas, principalmente debido al hecho de que esta reacción puede llevarse a cabo en medios mixtos (orgánico-acuoso) o incluso sólo en medio acuoso. Esto permite el empleo de una gran variedad de bases solubles en agua así como de diferentes sistemas catalíticos y reactivos. Por otro lado, el agua como disolvente presenta un gran atractivo adicional debido a la economía y seguridad experimental que proporciona.

En conexión con lo anterior, la nueva ruta plantada en el esquema 1.22 se inició mediante un acoplamiento catalítico entre 4-bromotiazol-2-carbaldehído (**18**) y ácido 3,5-bis(trifluorometil)fenilborónico.^{109,135}

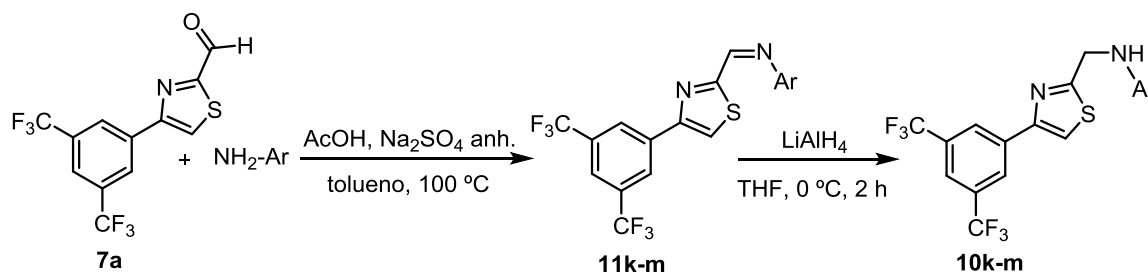


Esquema 1.23.- Reacción de acoplamiento de Suzuki para la formación del compuesto **7a**.

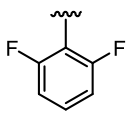
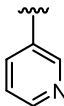
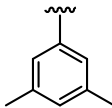
Se empleó una cantidad catalítica de $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ y de PPh_3 y como disolvente una mezcla de dimetoxietano-etanol (9:1). Se adicionó Na_2CO_3 acuoso y se calentó la reacción a 95°C , aislándose el compuesto **7a** por cromatografía de columna con sílica gel. El rendimiento obtenido para este acoplamiento es moderado, hecho que podría deberse quizá a la presencia de los grupos trifluorometilo (CF_3) en posiciones *meta* del ácido aril borónico. Aún así, esta metodología es económica, eficaz y permite obtener el compuesto intermedio **7a** en una sola etapa.

Una vez obtenido dicho sustrato se hizo reaccionar con diferentes anilinas para obtener las correspondientes iminas intermedias, empleando unas condiciones de disolvente y temperatura que proporcionaran una mayor conversión del producto de partida. A continuación, estas iminas **11(k-m)** se hicieron reaccionar con LiAlH_4 tal y como se ha descrito para los compuestos anteriores,¹²³ obteniéndose las correspondientes aminas secundarias con rendimientos aceptables (Tabla 1.7).

Tabla 1.7.- Obtención de los derivados intermedios **10k-m**.



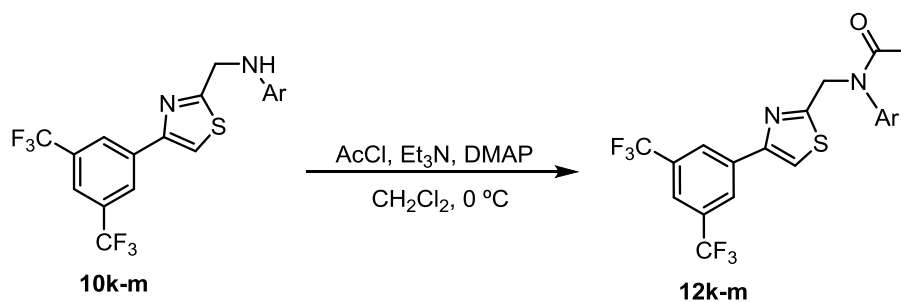
¹³⁵ Lui, C.; Ni, Q.; Bao, F. Y.; Qiu, J. S. *Green Chem.* **2011**, *13*, 1260-1266.

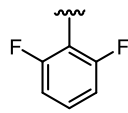
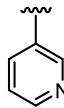
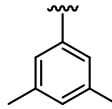
Compuesto	-Ar	Rendimiento
10k		42%
10l		89%
10m		63%

Estos análogos también se incluyeron como compuestos a evaluar siguiendo las premisas establecidas con anterioridad.

Por último se trató de funcionalizar el nitrógeno secundario con un grupo acetilo, haciendo reaccionar los sustratos anteriores en las condiciones de reacción descritas previamente.¹²⁵

Tabla 1.8.- Reacción de acetilación para obtener los compuestos finales **12k-m**.

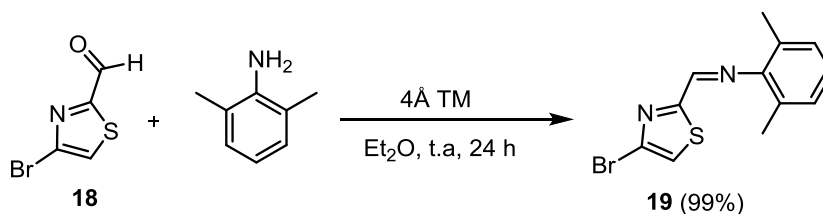


Compuesto	-Ar	Rendimiento
12k		83%
12l		-
12m		69%

Se obtuvieron los compuestos esperados con buenos rendimientos, salvo el derivado acetilado **12i** (Tabla 1.8). Probablemente ello se deba al carácter electrón-atrayente del anillo de piridina que reduce sustancialmente la reactividad del nitrógeno amínico.

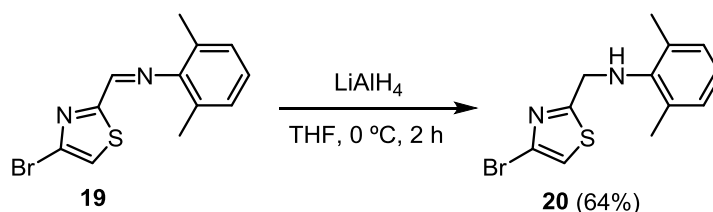
Por último y haciendo uso de la nueva metodología descrita, se estudió la posibilidad de preparar una nueva serie de derivados en la que se modificarán los sustituyentes presentes en el anillo A (Véase Esquema 1.22). Para ello se emplearon diferentes ácidos fenilborónicos sustituidos que fueron sometidos a una reacción de acoplamiento de Suzuki con derivados de tiazol apropiadamente funcionalizados. Con el fin de disponer de un intermedio común que facilitara la obtención de los diferentes análogos, se pensó en modificar el orden de la ruta propuesta, dejando como penúltima etapa del proceso el acoplamiento de Suzuki.

Inicialmente se llevó a cabo la formación de la imina correspondiente (**19**) que se preparó a partir de 4-bromotiazol-2-carbaldehído (**18**) y 2,6-dimetilanilina, empleando tamiz molecular activado de 4 Å en éter dietílico como disolvente.¹³⁶



Esquema 1.24. Reacción de formación de la imina intermedia **19**.

A continuación se redujo el grupo imina empleando LiAlH₄ como agente reductor, tal y como se ha descrito con detalle en las reacciones mencionadas anteriormente.¹²³ Se obtuvo el compuesto intermedio **20** con un rendimiento aceptable.

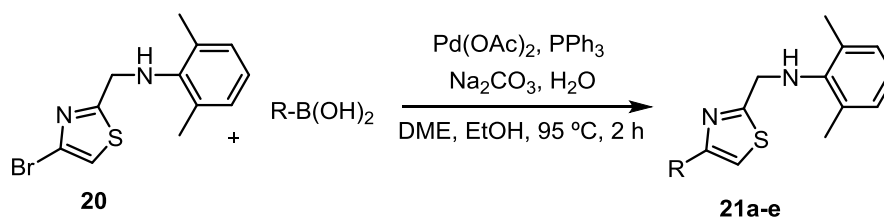


Esquema 1.25.- Reducción de la imina **19** a la amina secundaria **20**.

Seguidamente se hizo reaccionar dicho intermedio (**20**) con diferentes ácidos borónicos comerciales mediante una reacción de acoplamiento catalítico de Suzuki.¹³⁵ Siguiendo esta metodología se obtuvieron los productos esperados **21(a-e)** con rendimientos aceptables (Tabla 1.9).

¹³⁶ Taguchi, K.; Westheim, N. D. *J. Org. Chem.* **1971**, 36, 1570-1572.

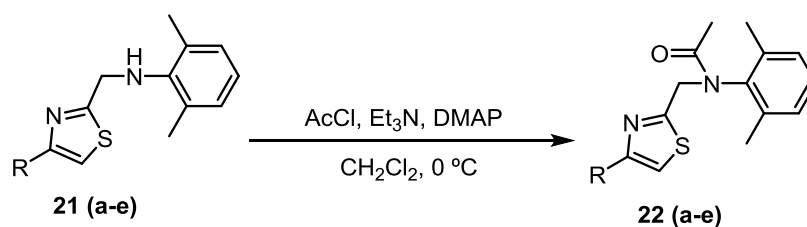
Tabla 1.9.- Reacción de Suzuki para la obtención de los derivados intermedios **21a-e**.

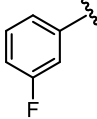
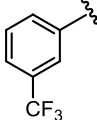

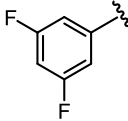
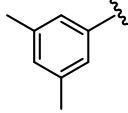


Compuesto	-R	Rendimiento
21a		68%
21b		78%
21c		56%
21d		66%
21e		66%

Por último se acetiló el nitrógeno amínico de los compuestos intermedios **21(a-e)** empleando las mismas condiciones de reacción antes descritas.¹²⁵ Fue posible obtener los productos esperados **22(a-e)** con buenos rendimientos (Tabla 1.10).

Tabla 1.10.- Reacción de acetilación para obtener los análogos finales esperados **22a-e**.



Compuesto	-R	Rendimiento
22a		89%
22b		92%
22c		99%
22d		94%
22e		99%

En conclusión, siguiendo esta nueva metodología sintética se han logrado obtener análogos del compuesto *hit* con buenos rendimientos, modificando principalmente los sustituyentes del sistema biarílico (anillo A). Dichos sustratos constituyen junto con los anteriores una amplia quimioteca de derivados que se han evaluado posteriormente en la empresa farmacéutica GSK, con el fin de determinar su potencial actividad como fármacos antimaláricos así como de establecer su grado de toxicidad.

6.- PARTE EXPERIMENTAL

6.-PARTE EXPERIMENTAL

6.1.-TÉCNICAS GENERALES

Materiales y métodos

Todos los materiales, reactivos y disolventes de partida se obtuvieron de fuentes comerciales y se utilizaron sin purificación adicional a menos que se indique lo contrario en los procedimientos experimentales. Los disolventes comerciales de calidad analítica se utilizaron para fines generales. Los disolventes anhidros utilizados se secaron por destilación bajo atmósfera inerte de argón empleando los agentes desecantes que se detallan a continuación: CH₂Cl₂, CH₃CN y tolueno se destilaron sobre CaH₂; THF y Et₂O fueron destilados sobre Na/benzofenona; DMF, Et₃N y CHCl₃ se secaron por destilación y se almacenaron sobre tamiz molecular activado de 4 Å; MeOH se destiló y se almacenó posteriormente sobre tamiz molecular activado de 3 Å.

Para las cromatografías analíticas de capa fina se han empleado cromatofolios de gel de sílice (Merck 60 F-254) de 0.2 mm de grosor sobre soporte de aluminio. Se han visualizado bajo luz UV (254nm) y empleando diversos reveladores químicos dependiendo de la naturaleza de los compuestos: Ninhidrina (0.2 g de ninhidrina en 100 mL de EtOH), Ce(IV) (10g Ce(SO₄)₂, 25 g ácido fosfomolibdico, 80 mL H₂SO₄(conc) en 1 L H₂O), H₂SO₄ (100 mL H₂SO₄ concentrado en 100 ml H₂O), KMnO₄ (1.1 g KMnO₄, 6.8 g K₂CO₃, 1.6 mL NaOH 1M en 500 mL de H₂O).

Las cromatografías de columna se realizaron sobre gel de sílice (Merck 60, 0.040-0.063mm) como fase estacionaria y empleando diferentes mezclas de disolvente (fase móvil) que se indicarán en cada caso de manera particular.

Resonancia magnética nuclear

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ¹H, ¹³C y ¹⁹F fueron registrados en espectrómetros Bruker Avance AC-300, Bruker Avance AC-400 y Bruker Avance AC-500. La asignación de las señales se ha llevado a cabo mediante correlaciones heteronucleares bidimensionales (COSY, HSQC) o espectros DEPT. Los valores de desplazamiento químico se muestran en unidades δ (ppm) relativos a TMS (tetrametilsilano), empleando como disolventes CDCl₃, DMSO-d₆, Acetona-d₆, CD₃OD y como referencia, las señales residuales de cada uno de ellos: δ= 7.26 ppm para ¹H y δ= 77.160 ppm para ¹³C en el caso del CDCl₃; δ= 2.50 ppm para ¹H y δ= 39.5 ppm para ¹³C en el caso de DMSO-d₆; δ= 2.05 ppm para ¹H y δ= 29.8 ppm para ¹³C en el caso de acetona-d₆; δ= 3.31 ppm para ¹H y δ= 49.0 ppm para ¹³C en el caso del MeOD. Los espectros de ¹⁹F se han registrado con desacoplamiento de hidrógeno empleando CDCl₃ como disolvente y CFCl₃ (freón) como referencia interna (0.00 ppm).

Espectrometría de masas

Los espectros de masas de alta resolución han sido realizados en un espectrómetro AB SCIEX TRIPLETOF™ 5600, equipado con una fuente de ionización de electrospray con una tensión capilar de 4.5 kV. Los datos obtenidos están expresados en unidades de masa (m/z) y referidos al pico molecular ($M+H$) o al mismo junto con diferentes cationes (Na^+ , K^+ , NH_4^+).

Puntos de fusión

Los puntos de fusión se han determinado en tubos capilares en un aparato Buchi modelo 535.

Espectros de infrarrojo

Los espectros de IR se han obtenido mediante el uso de un espectrómetro ATR, modelo Agilent Technologies Cary 630 FTIR, abarcando la región $4000-600\text{ cm}^{-1}$.

Análisis por HPLC (*High Pressure Liquid Chromatography*)

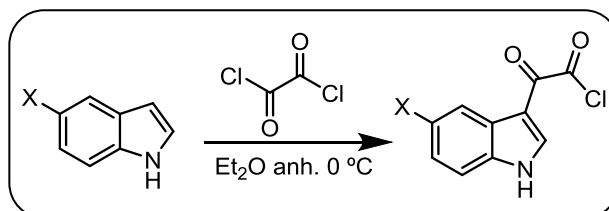
Los análisis de las muestras por HPLC se llevaron a cabo en un aparato Hitachi Elite Lachrom L-2130, equipado con un detector Hitachi UV L-2455U. Se utilizó una columna de fase reversa LiChospher® 100 RP-18, 250 x 4 mm, 5 μM y como fase móvil se emplearon mezclas de CH_3CN/H_2O cuya proporción varía según la polaridad de los sustratos. El tiempo de retención está expresado en minutos.

6.2.- PARTE EXPERIMENTAL DE LA FAMILIA DE LOS INDOLES

6.2.1.- PROCEDIMIENTOS GENERALES

Procedimiento general A

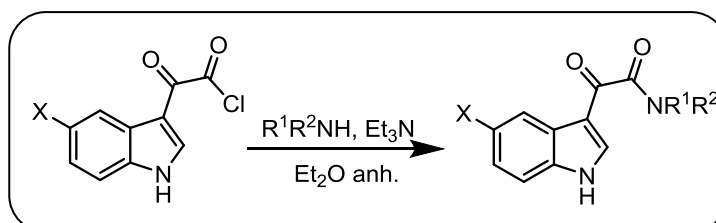
Preparación de cloruros de α -oxoacilo



Experimental: A una disolución del correspondiente indol (5-cloroindol o 5-fluoroindol) (1mmol, 151.6 mg (Cl), 135.1 mg (F)) en Et₂O anhidro (34 mL) a 0 °C, se le adiciona bajo atmósfera inerte cloruro de oxalilo (1.15 mmol, 99 μ L) durante un período de 5 minutos. Después de la adición, la mezcla se mantiene durante 30 minutos a 0 °C, formándose un precipitado amarillo que se aísla por filtración. El producto sólido se lava con Et₂O en frío (30 mL) y se seca a vacío para obtener el compuesto esperado sin necesidad de purificación adicional.

Procedimiento general B

Reacción de amidación. Formación de las diferentes oxoacetamidas

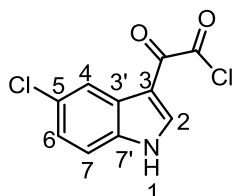


Experimental: Una disolución de la amina apropiada (1 mmol) en Et₂O anhidro (1 mL) se añade lentamente, bajo atmósfera inerte y a 0°C, a una suspensión del cloruro de oxoacetilo correspondiente (1 mmol) junto con Et₃N (1 mmol, 139 μ L) en Et₂O anhidro (2 mL) como disolvente. La mezcla de reacción se mantiene 30 minutos a 0°C y posteriormente a temperatura ambiente durante 2 horas adicionales. Se concentra a vacío y el crudo se disuelve en CH₂Cl₂ (20 mL), lavándolo con H₂O, NaCl (sat) y secándolo sobre MgSO₄ anhidro. El residuo obtenido después de evaporar el disolvente a vacío se purifica por cristalización en Et₂O para obtener las oxoacetamidas esperadas con buenos rendimientos.

6.2.2.- PROCEDIMIENTOS DE SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN

NOTA: En ciertos casos se escogió la numeración 1'', 2'' etc. para la asignación de las señales espectroscópicas en el sustituyente del grupo oxoacetamida. Por otra parte, el anillo de indol se ha numerado como se muestra en la figura siguiente.

2-(5-cloro-1*H*-indol-3-il)-2-cloruro de oxoacetilo (2a)



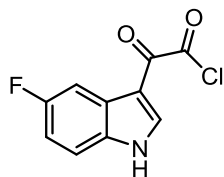
Seguendo el procedimiento general A, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 87% y con un punto de fusión de 214–216 °C.

RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.57 (s ancho, 1H, NH), 8.49 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H, H2), 8.14 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H4), 7.58 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H7), 7.31 (dd, *J* = 8.8, 2 Hz, 1H, H6).

RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 180.5 (CO), 164.7 (CO), 139.1 (CH), 135.2 (C), 127.4 (C), 126.8 (C), 123.7 (CH), 120.2 (CH), 114.3 (CH), 111.9 (C).

IR *v*_{max}: 3584 (N–H), 1732 (C=O), 1616 (C=O) cm⁻¹.

2-(5-fluoro-1*H*-indol-3-il)-2-cloruro de oxoacetilo (2b)



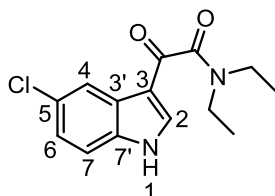
Seguendo el procedimiento general A, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 85% y con un punto de fusión de 248–250 °C.

RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.50 (s, 1H, NH), 8.48 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H, H2), 7.85 (dd, *J* = 8.8, 4.7 Hz, 1H, H7), 7.58 (dd, *J* = 8.7, 2.4 Hz, 1H, H4), 7.14 (dt, *J* = 8.6, 2.5 Hz, 1H, H6).

RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 180.5 (CO), 164.9 (CO), 158.6 (d, *J* = 234,1 Hz, C, C-F), 139.2 (CH), 133.3 (C), 126.3 (d, *J* = 17 Hz, C, C3'), 114.1 (d, *J* = 14,0 Hz, CH, C7), 112.4 (C), 111.9 (d, *J* = 24.7 Hz, CH, C6), 106.2 (d, *J* = 24.7 Hz, CH, C4).

IR *v*_{max}: 3584 (N-H), 1732 (C=O), 1616 (C=O) cm⁻¹.

N,N-dietil-2-(5-cloro-1*H*-indol-3-il)-2-oxoacetamida (3a)



Seguendo el procedimiento general B, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 83% y con un punto de fusión de 186-187 °C.

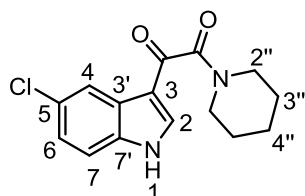
RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.20 (s, 1H, NH), 8.22 (s, 1H, H2), 7.74 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H4), 7.25 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H7), 7.15 (dd, *J* = 8.4, 2.2 Hz, 1H, H6), 3.49 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₂), 3.32 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₂), 1.23 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH₃), 1.15 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH₃).

RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 185.8 (CO), 167.6 (CO), 136.4 (CH), 135.1 (C), 128.8 (C), 126.3 (C), 124.2 (CH), 121.2 (CH), 113.5 (CH), 113.0 (C), 42.5 (CH₂), 39.2 (CH₂), 14.1 (CH₃), 12.5 (CH₃).

IR ν_{\max} : 3584 (N-H), 1734 (C=O), 1618 (C=O) cm^{-1} .

HRMS (QTOF, FAB, modo positivo): calculada para $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{ClN}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 301.0720$.
Obtenida $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 301.0727$.

1-(5-cloro-1*H*-indol-3-il)-2-(piperidin-1-il) etanodiona (3b)



Siguiendo el procedimiento general B, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 78% y un punto de fusión de 256-259 °C.

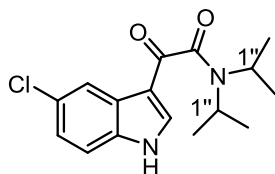
RMN ^1H (500 MHz, DMSO-d_6): δ 11.21 (s, 1H, NH), 8.13 (s, 1H, H2), 7.77 (s, 1H, H4), 7.26 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, H7), 7.11 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, H6), 3.54 (t, $J = 6.2$ Hz, 4H, H2'', H6''), 1.58 (quint, $J = 5.9$ Hz, 4H, H3'', H5''), 1.45 (t, $J = 5.9$ Hz, 2H, H4'').

RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-d_6): δ 186.1 (CO), 166.2 (CO), 136.6 (CH), 135.2 (C), 128.6 (C), 126.1 (C), 124.1 (CH), 120.9 (CH), 113.4 (CH), 113.0 (C), 47.2 (CH_2), 42.2 (CH_2), 25.7 (2x CH_2), 24.0 (CH_2).

IR ν_{\max} : 3584 (N-H), 1612 (C=O) cm^{-1} .

HRMS (QTOF, FAB, modo positivo): calculada para $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{ClN}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 313.0720$.
Obtenida $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 313.0724$.

N,N-diisopropil-2-(5-cloro-1*H*-indol-3-il)-2-oxoacetamida (3c)



Siguiendo el procedimiento general B, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 65% y un punto de fusión de 256-258 °C.

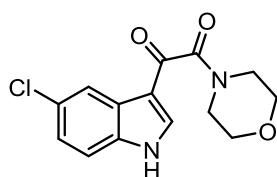
RMN ^1H (500 MHz, DMSO-d_6): δ 8.19 (s, 1H, H2), 7.72 (s, 1H, H4), 7.28 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H7), 7.15 (dd, $J = 8.6, 1.8$ Hz, 1H, H6), 3.87 (Sept, $J = 6.8$ Hz, 1H, H1''), 3.52 (Sept, $J = 6.8$ Hz, 1H, H1''), 1.50 (d, $J = 6.8$ Hz, 6H, 2x CH_3), 1.12 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H, 2x CH_3).

RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-d_6): δ 186.2 (CO), 167.8 (CO), 135.9 (CH), 135.2 (C), 128.6 (C), 126.2 (C), 124.1 (CH), 121.1 (CH), 113.3 (CH), 113.0 (C), 50.4 (CH), 46.0 (CH), 20.3 (2x CH_3), 19.9 (2x CH_3).

IR ν_{\max} : 3584 (N-H), 1611 (C=O) cm^{-1} .

HRMS (QTOF, FAB, modo positivo): calculada para $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{ClN}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 329.1057$.
Obtenida $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 329.1054$.

1-(5-cloro-1*H*-indol-3-il)-2-(morfolin-1-il) etanodiona (3d)



Siguiendo el procedimiento general B, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 85% y un punto de fusión de 240–242 °C.

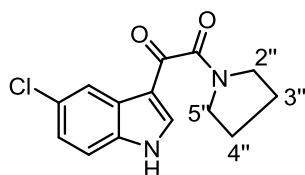
RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆): δ 8.25 (s, 1H, H2), 7.88 (s, 1H, H4), 7.30 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H7), 7.19 (dd, *J* = 8.8, 1.7 Hz, 1H, H6), 3.76 (t, *J* = 8.8 Hz, 4H, 2x CH₂), 3.64 (t, *J* = 8.4 Hz, 2H, CH₂), 3.51 (t, *J* = 8.4 Hz, 2H, CH₂).

RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆): δ 184.8 (CO), 166.1 (CO), 136.9 (CH), 135.1 (C), 129.0 (C), 126.3 (C), 124.4 (CH), 121.3 (CH), 113.7 (CH), 113.0 (C), 66.8 (CH₂), 66.5 (CH₂), 46.5 (CH₂), 41.8 (CH₂).

IR ν_{max}: 3584 (N-H), 1734 (C=O), 1621 (C=O) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, FAB, modo positivo): calculada para C₁₄H₁₃ClN₂O₃ [M+Na]⁺ = 315.0512. Obtenida [M+Na]⁺ = 315.0516.

1-(5-cloro-1*H*-indol-3-il)-2-(pirrolidin-1-il) etanodiona (3e)



Siguiendo el procedimiento general B, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 87% y un punto de fusión de 244-247 °C.

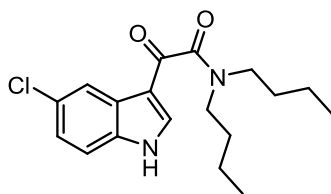
RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆): δ 8.24 (s, 1H, H2), 8.00 (s, 1H, H4), 7.29 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H7), 7.15 (dd, *J* = 8.8, 1.8 Hz, 1H, H6), 3.54 (t, *J* = 5.9 Hz, 4H, H2'', H5''), 1.88 (t, *J* = 5.7 Hz, 4H, H3'', H4'').

RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆): δ 185.2 (CO), 165.3 (CO), 137.6 (CH), 135.4 (C), 128.7 (C), 126.7 (C), 124.1 (CH), 121.4 (CH), 113.2 (CH), 112.9 (C), 47.3 (CH₂), 45.6 (CH₂), 25.8 (CH₂), 23.7 (CH₂).

IR ν_{max}: 3584 (N-H), 1604 (C=O) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, FAB, modo positivo): calculada para C₁₄H₁₃ClN₂O₂ [M+Na]⁺ = 299.0563. Obtenida [M+Na]⁺ = 299.0566.

N,N-dibutil-2-(5-cloro-1*H*-indol-3-il)-2-oxoacetamida (3f)



Siguiendo el procedimiento general B, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 72% y punto de fusión de 196-198 °C.

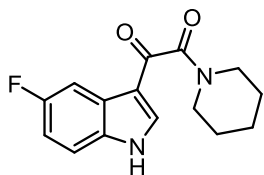
RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆): δ 8.23 (s, 1H, H2), 7.65 (s, 1H, H4), 7.26 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H7), 7.13 (dd, *J* = 8.4, 1.7 Hz, 1H, H6), 3.45 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂), 3.26 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, CH₂), 1.64 (quint, *J* = 7.7 Hz, 2H, CH₂), 1.55 (quint, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂), 1.42 (sext, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂), 1.38 (sext, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂), 0.95 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH₃), 0.78 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH₃).

RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆): δ 185.8 (CO), 168.1 (CO), 136.3 (CH), 135.2 (C), 128.8 (C), 126.1 (C), 124.2 (CH), 121.0 (CH), 113.4 (CH), 113.3 (C), 47.8 (CH₂), 44.3 (CH₂), 29.3 (CH₂), 27.7 (CH₂), 20.1 (CH₂), 19.7 (CH₂), 13.7 (CH₃), 13.4 (CH₃).

IR ν_{max}: 3584 (N-H), 1635 (C=O), 1613 (C=O) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, FAB, modo negativo): calculada para C₁₈H₂₃ClN₂O₂ [M-H]⁻ = 333.1346. Obtenida [M-H]⁻ = 333.1356.

1-(5-fluoro-1*H*-indol-3-il)-2-(piperidin-1-il) etanodiona (3g)



Seguendo el procedimiento general B, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 80% y un punto de fusión de 217-219 °C.

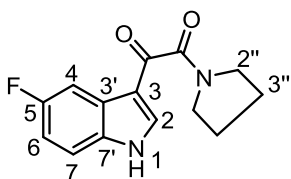
RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.41 (s ancho, 1H, NH), 7.89 (s, 1H, H2), 7.84 (dd, *J* = 8.3, 4.5 Hz, 1H, H7), 7.32, (dd, *J* = 9.3, 2.2 Hz, 1H, H4), 6.96, (dt, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1H, H6), 3.60 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, CH₂), 3.36 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H, CH₂), 1.75 (m, 4H, 2x CH₂), 1.59 (m, 2H, CH₂).

RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 180.5 (CO), 164.9 (CO) 160.1 (d, *J* = 238,2 Hz, C, C-F), 136.7 (CH), 133.2 (C), 125.9 (C), 114.1 (C), 112.7 (d, *J* = 9.2 Hz, CH, C7), 112.2 (d, *J* = 24.7 Hz, CH, C6), 106.2 (d, *J* = 24.7 Hz, CH, C4), 47.3 (CH₂), 42.3 (CH₂), 26.1 (CH₂), 25.3 (CH₂), 24.2 (CH₂).

IR ν_{max} : 3584 (N-H), 1608 (C=O) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, FAB, modo positivo): calculada para C₁₅H₁₅FN₂O₂ [M+Na]⁺ = 297.1015. Obtenida [M+Na]⁺ = 297.1017.

1-(5-fluoro-1*H*-indol-3-il)-2-(pirrolidin-1-il) etanodiona (3h)



Seguendo el procedimiento general B, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco, con un rendimiento de 64% y un punto de fusión de 255-257 °C.

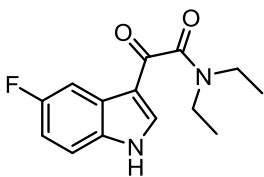
RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.32 (s, 1H, NH), 8.03 (s, 1H, H2), 7.93 (dd, *J* = 8.6, 4.4 Hz, 1H, H7), 7.33 (dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz, 1H, H4), 6.96 (dt, *J* = 9.0, 2.6 Hz, 1H, H6), 3.56 (t, *J* = 6 Hz, 4H, H2'' H5''), 1.89 (m, 4H, H3'' H4'').

RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 185.2 (CO), 165.8 (CO) 160.7 (d, *J* = 234,2 Hz, C, C-F), 137.7 (CH), 133.2 (C), 130.1 (C), 113.9 (C), 112.7 (d, *J* = 9.2 Hz, CH, C7), 111.9 (d, *J* = 25.7 Hz, CH, C6), 107.0 (d, *J* = 24.7 Hz, CH, C4), 47.7 (CH₂), 45.7 (CH₂), 25.9 (CH₂), 23.8 (CH₂).

IR ν_{max} : 3585 (N-H), 1658 (C=O), 1615 (C=O) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, FAB, modo negativo): calculada para C₁₄H₁₃FN₂O₂, [M-H]⁻ = 259.0883. Obtenida [M-H]⁻ = 259.0876.

N,N-dietil-2-(5-fluoro-1*H*-indol-3-il)-2-oxoacetamida (3i)



Seguendo el procedimiento general B, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 75% y un punto de fusión de 199-200 °C.

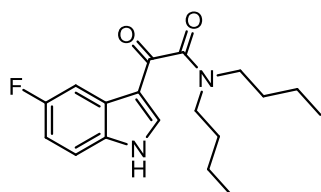
RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.22 (s, 1H, NH), 7.98 (s, 1H, H2), 7.84 (dd, *J* = 8.2, 5.1 Hz, 1H, H7), 7.39 (dd, *J* = 9.1, 2.1 Hz, 1H, H4), 6.98 (m, 1H, H6), 3.50 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂), 3.32 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂), 1.24 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH₃), 1.16 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₃).

RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆): δ 185.8 (CO), 167.7 (CO), 160.7 (d, *J* = 244,6 Hz, C, C-F), 136.7 (CH), 133.2 (C), 126.0 (C), 114.1 (C), 112.9 (d, *J* = 10.6 Hz, CH, C7), 112.4 (d, *J* = 26.2 Hz, CH, C6), 107.3 (d, *J* = 25.4 Hz, CH, C4), 42.6 (CH₂), 39.3 (CH₂), 14.1 (CH₃), 12.6 (CH₃).

IR *v*_{max}: 3585 (N-H), 1656 (C=O), 1618 (C=O) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, FAB, modo negativo): calculada para C₁₄H₁₅FN₂O₂ [M-H]⁻ = 261.1039. Obtenida [M-H]⁻ = 261.1044.

***N,N*-dibutil-2-(5-fluoro-1*H*-indol-3-il)-2-oxoacetamida (3j)**



Siguiendo el procedimiento general B, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 75% y un punto de fusión de 151-153 °C.

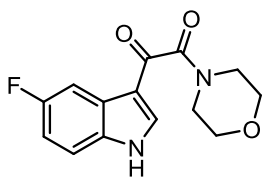
RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆): δ 10.94 (s, 1H, NH), 7.89 (s, 1H, H2), 7.24 (dd, *J* = 8.8, 5.4 Hz, 1H, H7), 7.22 (dd, *J* = 8.9, 1.7 Hz, 1H, H4), 6.94 (dt, *J* = 8.9, 1.8 Hz, 1H, H6), 3.48 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂), 3.27 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, CH₂), 1.64 (quint, *J* = 7.7 Hz, 2H, CH₂), 1.59 (quint, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂), 1.49 (sext, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂), 1.37 (sext, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂), 0.99 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH₃), 0.82 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH₃).

RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆): δ 185.7 (CO), 168.2 (CO), 160.7 (d, *J* = 239,8 Hz, C, C-F), 142.0 (C), 133.2 (CH), 121.5 (C), 114.9 (C), 113.2 (d, *J* = 9.8 Hz, CH, C7), 112.6 (d, *J* = 26.4 Hz, CH, C6), 107.3 (d, *J* = 25.4 Hz, CH, C4), 47.8 (CH₂), 44.5 (CH₂), 30.7 (CH₂), 29.4 (CH₂), 20.2 (CH₂), 19.8 (CH₂), 13.8 (CH₃), 13.5 (CH₃).

IR *v*_{max}: 3584 (N-H), 1611 (C=O) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, FAB, modo negativo): calculada para C₁₈H₂₃FN₂O₂ [M-H]⁻ = 317.1665. Obtenida [M-H]⁻ = 317.1661.

1-(5-fluoro-1*H*-indol-3-il)-2-(morfolin-1-il) etanodiona (3k)



Siguiendo el procedimiento general B, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 65% y con un punto de fusión de 219-221 °C.

RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆): δ 10.82 (s ancho, 1H, NH), 7.89 (s, 1H, H2), 7.33 (dd, *J* = 8.7, 4.9 Hz, 1H, H7), 7.28 (dd, *J* = 9.2, 2.1 Hz, 1H, H4), 6.94 (dt, *J* = 9.0, 2.3 Hz, 1H, H6), 3.84 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂), 3.62 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₂), 3.57 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, CH₂), 3.42 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂).

RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆): δ 185.0 (CO), 166.3 (CO) 160.5 (d, *J* = 245,1 Hz, C, C-F), 136.9 (C), 136.7 (CH), 132.1 (d, *J* = 12.1 Hz, C, C3'), 113.2 (C), 112.4 (d, *J* = 9.4 Hz, CH, C7), 111.7 (d, *J* = 26.2 Hz, CH, C6), 106.3 (d, *J* = 24.9 Hz, CH, C4), 66.3 (CH₂), 63.4 (CH₂), 46.4 (CH₂), 41.6 (CH₂). **IR** *v*_{max}: 3584 (N-H), 1725 (C=O), 1626 (C=O) cm⁻¹.

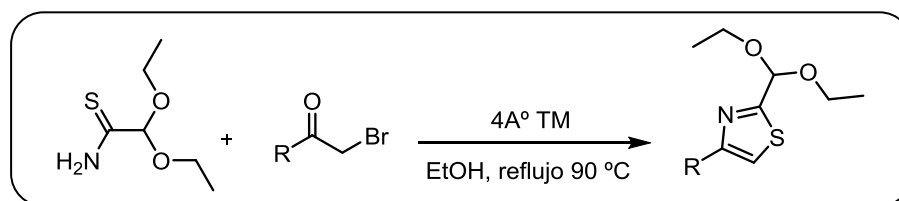
HRMS (QTOF, FAB, modo negativo): calculada para C₁₄H₁₃FN₂O₃ [M-H]⁻ = 275.0832. Obtenida [M-H]⁻ = 275.0833.

6.3 PARTE EXPERIMENTAL DE LA FAMILIA DE LOS TIAZOLES

6.3.1 PROCEDIMIENTOS GENERALES

Procedimiento general A

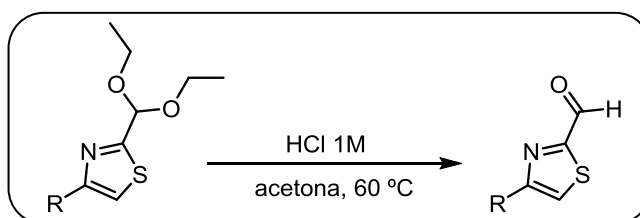
Formación anillo de tiazol funcionalizado siguiendo la metodología de Hantzsch



Experimental: Se mezcla la correspondiente tiourea / tioamida (1 mmol, 163 mg) y tamiz molecular de 4 Å bajo atmósfera inerte, en EtOH (3 mL) como disolvente. A esta mezcla se le añade lentamente una disolución de la α -bromo cetona correspondiente (1 mmol) en EtOH (3 mL) y se calienta la reacción a reflujo durante 2 h. Se concentra la mezcla a vacío y el crudo se disuelve en AcOEt (15 mL), lavándolo con NaHCO_3 (sat), NaCl (sat) y secándolo sobre MgSO_4 anhidro. El residuo obtenido se purifica por cromatografía sobre gel de sílice empleando una mezcla hexano:AcOEt (95:5) como eluyente.

Procedimiento general B

Hidrólisis del acetal en medio ácido

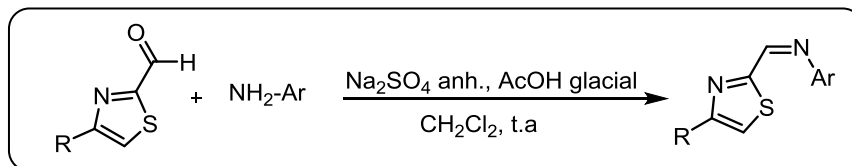


Experimental: Sobre una mezcla del correspondiente acetal (1 mmol) en acetona como disolvente (10 mL), se añade de HCl 1M (2 mmol, 2 mL) y se somete el sistema a reflujo durante 3 h. El crudo obtenido se disuelve en AcOEt (25 mL), se lava con NaHCO_3 (sat), NaCl (sat) y se seca sobre Na_2SO_4 anhidro. Tras evaporar el disolvente a vacío se obtiene el producto esperado sin necesidad de purificación adicional. Dado que el sustrato obtenido es sensible al oxígeno e inestable, se almacenó bajo atmósfera inerte de argón y a baja temperatura hasta su uso posterior.

Procedimiento general C

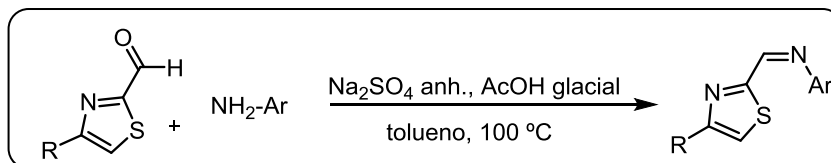
Formación de las correspondientes iminas

1º PROCEDIMIENTO



Experimental: Se dispone de una mezcla del correspondiente aldehído (1 mmol) y Na₂SO₄ anhidro (1.5 mmol, 213 mg) bajo atmosfera de argón en CH₂Cl₂ anhidro (5 mL) como disolvente. Sobre ésta se añade lentamente la anilina adecuada (1 mmol) y se mantiene con agitación a temperatura ambiente durante aproximadamente 96 h. Tras evaporar el disolvente a vacío se disuelve el crudo en AcOEt (20 mL), lavándolo con NaHCO₃ (sat), NaCl (sat) y secándolo sobre MgSO₄ anhidro. Dada la inestabilidad de este tipo de sustratos se lleva a cabo la siguiente etapa sin purificación ni caracterización previa, determinando su conversión mediante experimentos de RMN.

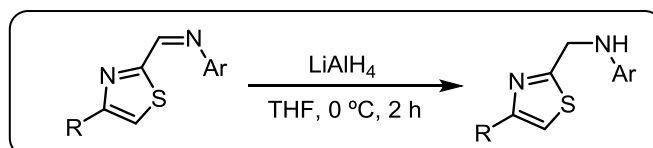
2º PROCEDIMIENTO



Experimental: Se dispone de una mezcla del correspondiente aldehído (1 mmol) y Na₂SO₄ anhidro (1.5 mmol, 213 mg) bajo atmosfera de argón en tolueno (5 mL) como disolvente. Sobre esta mezcla se añade lentamente la anilina adecuada (1 mmol) y se somete el sistema a calentamiento a 100 °C durante 24 h. Tras evaporar el disolvente a vacío se disuelve el crudo en AcOEt (20 mL), lavándolo con NaHCO₃ (sat), NaCl (sat) y secándolo sobre MgSO₄ anhidro. Dada la inestabilidad de este tipo de sustratos se lleva a cabo la siguiente etapa sin purificación ni caracterización previa, determinando su conversión mediante experimentos posteriores de RMN.

Procedimiento general D

Reacción de reducción de iminas empleando LiAlH₄

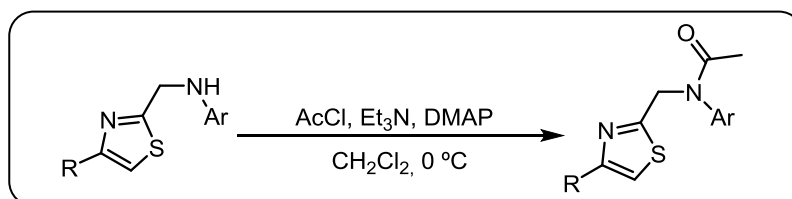


Experimental: Se dispone de una suspensión de LiAlH₄ (1.5 mmol, 57 mg) bajo atmósfera inerte en THF anhidro (4 mL) como disolvente. Se enfría la mezcla a 0 °C y se

añade lentamente una disolución de la correspondiente imina (1 mmol) disuelta en THF (3 mL). Se mantiene la mezcla con agitación a 0 °C durante 2 h. Tras hidrolizar el exceso de agente reductor añadiendo H₂O (5 mL), se extrae el producto esperado en AcOEt (25 mL), lavando las fases orgánicas reunidas con NaCl (sat) y secándolas sobre Na₂SO₄ anhidro. El residuo obtenido después de evaporar el disolvente a vacío se purifica por cromatografía sobre gel de sílice empleando una mezcla hexano:AcOEt (99:1) como eluyente.

Procedimiento general E

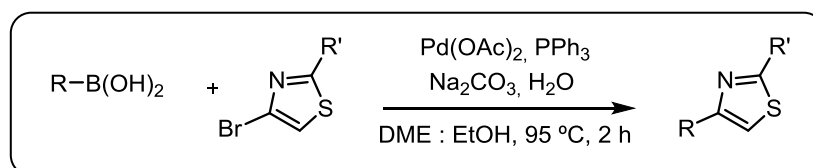
Reacción de acetilación



Experimental: Se disuelve la correspondiente amina secundaria (1 mmol) bajo atmósfera inerte en CH₂Cl₂ anhidro (5 mL) como disolvente. Se dispone el sistema a 0 °C y se añade lentamente DMAP (0.4 mmol, 49 mg) como catalizador, Et₃N (1.5 mmol, 209 µL) como base y cloruro de acetilo (2.5 mmol, 178 µL) como agente electrofílico. Se mantiene a esa temperatura durante 1.30 h. Se adiciona H₂O (3 mL) para hidrolizar el exceso de reactivo y se extrae el producto con CH₂Cl₂ (20 mL), lavando la fase orgánica con NaCl (sat) y secándola sobre Na₂SO₄ anhidro. El residuo obtenido se purifica mediante cromatografía sobre gel de sílice empleando una mezcla hexano:AcOEt (90:10) como eluyente.

Procedimiento general F

Reacción de acoplamiento de Suzuki



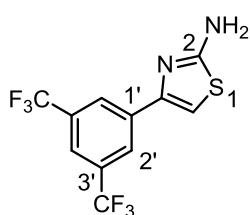
Experimental: Se mezcla el correspondiente 4-bromotiazol funcionalizado (1 mmol) junto con el ácido fenilborónico adecuado (1.1 mmol), Pd(OAc)₂ (0.03 mmol, 6.7 mg) y PPh₃ (0.06 mmol, 15.7 mg). Se establece una atmósfera inerte realizando ciclos sucesivos de vacío-argón. Seguidamente se adiciona una mezcla de disolventes DME:EtOH (9:1) (8 mL) y Na₂CO₃ (2 mmol, 212 mg) como base, disuelta en H₂O (2 mL). Se mantiene la mezcla con agitación a 90 °C durante 2 h. Cuando la reacción ha finalizado, se evapora el disolvente a vacío y se filtra sobre celite para eliminar los residuos de paladio formados, lavando el crudo con gran cantidad de AcOEt (30 mL).

La fase orgánica se lava con NaCl (sat), se seca sobre Na₂SO₄ anhidro y se evapora el disolvente a vacío. Finalmente, el residuo obtenido se purifica por cromatografía sobre gel de sílice empleando una mezcla hexano:AcOEt (95:5) como eluyente.

6.3.2.- PROCEDIMIENTOS DE SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN

NOTA: Se escogió la numeración 1', 2' etc. para la asignación de las señales espectroscópicas en el anillo de fenilo unido a la posición 4 del anillo de tiazol (anillo A) y la numeración 1'', 2'', etc. para la asignación de dichas señales en el anillo de fenilo derivado de anilina (anillo B).

4-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-2-aminotiazol (5)

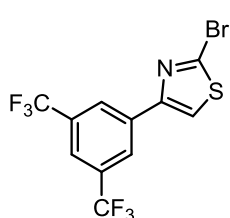


Si siguiendo el procedimiento general A y empleando tiourea como reactivo de acoplamiento, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanquecino con un rendimiento del 99%.

RMN ¹H (300 MHz, MeOD): δ 8.36 (s, 2H, H2', H6'), 7.84 (s, 1H, H4'), 7.24 (s, 1H, H5).

RMN ¹³C (75 MHz, MeOD): δ 166.6 (C), 155.2 (C), 135.3 (C), 132.1 (q, *J* = 33.1 Hz, 2x C, C3', C5'), 126.9 (2x CH, C2', C6'), 126.2 (q, *J* = 260.1 Hz, 2x CF₃), 122.6 (CH), 118.9 (CH).

4-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-2-bromotiazol (6)

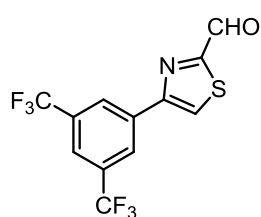


Se disuelve el compuesto **5** (0.38 mmol, 120 mg) bajo atmósfera inerte en CH₃CN (2 mL) como disolvente y se dispone el sistema con agitación a 60 °C. Por otro lado, se dispone de una mezcla de CuBr₂ (0.42 mmol, 94.4 mg) en CH₃CN (0.5 mL) a temperatura ambiente y sobre ésta se adiciona t-BuONO lentamente (0.65 mmol, 86.3 μL). Por último se transvasa esta última disolución sobre el matraz que contenía la disolución del compuesto **5** y se somete el sistema a reflujo a 80 °C durante 30 minutos. Tras eliminar el residuo sólido formado por filtración, se evapora el disolvente a vacío. El crudo obtenido se disuelve en CH₂Cl₂ (20 mL) y se lava la fase orgánica con HCl 1M, NH₄Cl (sat) y se seca sobre Na₂SO₄ anhidro. Finalmente, el residuo obtenido después de evaporar el disolvente a vacío se purifica por cromatografía de columna empleando hexano como eluyente. Se obtuvo un sólido blanco cristalino con un rendimiento de un 29%.

RMN ¹H (300 MHz, MeOD): δ 8.31 (s, 2H, H2', H6'), 7.85 (s, 1H, H4'), 7.62 (s, 1H, H5).

RMN ¹³C (75 MHz, MeOD): δ 153.2 (C), 139.1 (C), 134.5 (C), 132.1 (q, *J* = 33.0 Hz, 2x C, C3', C5'), 126.9 (2x CH, C2', C6'), 126.1 (q, *J* = 261.2 Hz, 2x C, 2x CF₃), 122.6 (CH), 117.8 (CH).

4-(3,5-bis(trifluorometil)fenil) tiazol-2-carbaldehido (7a) (Obtenido a partir de 6)



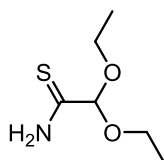
Se dispone de una mezcla del compuesto **6** (0.14 mmol, 50 mg) bajo atmósfera inerte en Et₂O anhidro (3 mL), como disolvente. Se enfría el sistema a -78 °C y se añade *n*-BuLi 2.5 M (0.56 mmol, 224 µL). Se mantiene la mezcla con agitación a esa temperatura durante 30 minutos y finalmente se añade DMF anhidra (0.27 mmol, 20.6 µL) como reactivo de formilación. Se aumenta la temperatura lentamente hasta temperatura ambiente y tras hidrolizar el exceso de base añadiendo NH₄Cl (sat) (5 mL), se extrae el compuesto en Et₂O (20 mL). La fase orgánica se lava con NaCl (sat) y se seca sobre MgSO₄ anhidro. Finalmente, tras evaporar el disolvente a vacío, se purifica el residuo obtenido mediante cromatografía sobre gel de sílice empleando una mezcla hexano:AcOEt (95:5) como eluyente. Se obtuvo un sólido amarillento con rendimiento de un 72%.

Dado que el producto obtenido es sensible al oxígeno e inestable, se almacenó bajo atmósfera inerte de argón y a baja temperatura hasta su uso posterior.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 10.09 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, COH), 8.42 (s, 2H, H2', H6'), 8.08 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, H5), 7.91 (s, 1H, H4').

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 183.7 (COH), 166.6 (C), 155.2 (C), 135.3 (C), 132.1 (q, *J* = 33.1 Hz, 2x C, C3', C5'), 126.9 (2x CH, C2', C6'), 126.2 (q, *J* = 262.1 Hz, 2x C, 2x CF₃), 122.6 (CH), 118.9 (CH).

2,2-dietoxietanoamida (8)

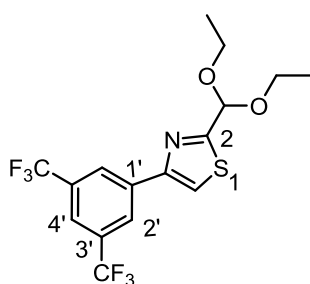


Se disuelve 2,2-dietoxietanoacetoamida (6.8 mmol, 1 g) bajo atmósfera inerte en benceno anhidro (10 mL) como disolvente. Se adiciona P₂S₅ (2 mmol; 452.5 mg) en porciones y se mantiene la mezcla con agitación a temperatura ambiente durante 15 minutos. Los residuos insolubles formados se eliminan por filtración sobre celite lavando el crudo con AcOEt (50 mL). La fase orgánica se lava con una disolución de NaHCO₃ (sat), NaCl (sat) y se seca sobre MgSO₄ anhidro. El residuo obtenido tras evaporar el disolvente a vacío se purifica por cristalización en AcOEt como disolvente. Se obtuvo un sólido rojizo en forma de agujas con un rendimiento de un 44%.

RMN ¹H (300 MHz, MeOD): δ 7.86 (s, 1H, NH), 7.51 (s, 1H, NH), 5.04 (s, 1H, CH), 3.70 (m ancho, 4H; 2x CH₂), 1.25 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H, 2x CH₃).

RMN ¹³C (75 MHz, MeOD): δ 200.5 (C, CS), 132.1 (CH), 60.2 (2x CH₂), 14.8 (2x CH₃).

4-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-2-(dietoximetil) tiazol (9a)

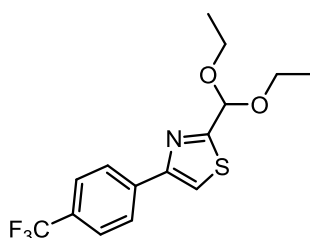


Siguiendo el procedimiento general A, se obtuvo el producto esperado como un aceite amarillo con un rendimiento del 83%. Como subproducto de la reacción se obtuvo el correspondiente aldehído derivado **7a**.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 8.36 (s ancho, 2H, H2', H6'), 7.82 (s ancho, 1H, H4'), 7.69 (s, 1H, H5), 5.75 (s, 1H, CH), 3.75 (m, 4H, 2x CH₂), 1.30 (t, *J* = 7.4 Hz, 6H, 2x CH₃).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 167.5 (C), 153.2 (C), 134.3 (C), 132.8 (q, *J* = 33.1 Hz, 2x C, C3', C5'), 128.6 (2x CH, C2', C6'), 126.2 (q, *J* = 263.2 Hz, 2x CF₃), 123.1 (CH), 117.6 (CH), 114.2 (CH), 60.4 (2x CH₂), 14.3 (2x CH₃).

4-(4-(trifluorometil)fenil)-2-(dietoximetil) tiazol (9b)

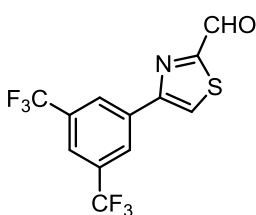


Siguiendo el procedimiento general A, se obtuvo el producto esperado como un aceite anaranjado con un rendimiento del 71%. Como subproducto de la reacción se obtuvo el correspondiente aldehído derivado **7b**.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 8.08 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H3', H5'), 7.99 (s, 1H, H5), 7.73 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H2', H6'), 5.64 (s, 1H, CH), 3.70 (m, 4H, 2x CH₂), 1.20 (t, *J* = 7.4 Hz, 6H, 2x CH₃).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 166.3 (C), 156.9 (C), 136.6 (C), 131.1 (q, *J* = 33.2 Hz, C, C4'), 126.7 (2x CH, C2', C6'), 125.8 (q, *J* = 261.3 Hz, C, CF₃), 123.4 (q, *J* = 3.4 Hz, 2x CH, C3', C5'), 121.5 (CH), 115.2 (CH), 62.6 (2x CH₂), 14.5 (2x CH₃).

4-(3,5-bis(trifluorometil)fenil) tiazol-2-carbaldehído (7a) (Obtenido a partir de 9a)



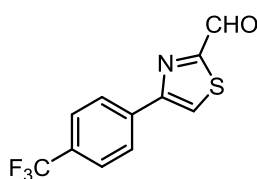
Siguiendo el procedimiento general B, se obtuvo el producto esperado como un sólido amarillo con un rendimiento prácticamente cuantitativo.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 10.09 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, COH), 8.42 (m, 2H, H2', H6'), 8.08 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, H5), 7.91 (m, 1H, H4').

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 183.7 (COH), 166.6 (C), 155.2 (C), 135.3 (C), 132.1 (q, *J* = 33.3 Hz, 2x C, C3', C5'), 126.9 (2x CH, C2', C6'), 126.2 (q, *J* = 263.0 Hz, 2x CF₃), 122.6 (CH), 118.9 (CH).

RMN ¹⁹F (282 MHz, CDCl₃): δ -63.4 (2x CF₃).

4-(4-(trifluorometil)fenil) tiazol-2-carbaldehido (7b)



Siguiendo el procedimiento general B, se obtuvo el producto esperado como un sólido amarillo con un rendimiento prácticamente cuantitativo.

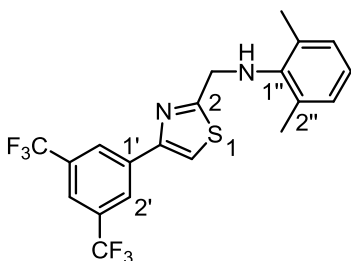
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 10.07 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, COH), 8.08 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H3', H5'), 7.99 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, H5), 7.73 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H2', H6').

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 183.9 (COH), 166.3 (C), 156.9 (C), 136.6 (C), 131.0 (q, *J* = 33.0 Hz, C, C4'), 126.7 (2x CH, C2', C6'), 124.1 (q, *J* = 261.1 Hz, C, CF₃), 123.4 (q, *J* = 3.4 Hz, 2x CH, C3', C5'), 121.5 (CH).

RMN ¹⁹F (282 MHz, CDCl₃): δ -63.2 (CF₃).

N-DESACETIL DERIVADOS 10 (a-m)

N-((4-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)tiazol-2-il)metil)-2,6-dimetilanilina (10a)



Siguiendo el procedimiento general D, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 87% y un punto de fusión de 77-79 °C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 8.34 (s ancho, 2H, H2',H6'), 7.83 (s ancho, 1H, H4'), 7.62 (s, 1H, H5), 7.04 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H3'', H5''), 6.90 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H, H4''), 4.53 (s,

2H, CH₂), 3.87 (s ancho, 1H, NH), 2.35 (s, 6H, 2x CH₃).

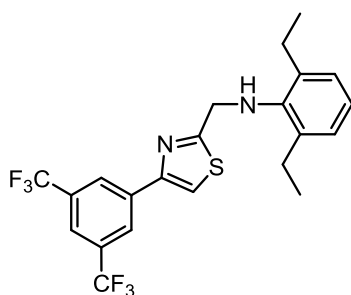
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 172.2 (C), 152.4 (C), 144.6 (C), 136.9 (C), 132.2 (q, *J* = 33.1 Hz, 2x C, C3', C5'), 130.2 (2x C), 129.0 (2x CH), 126.3 (2x CH), 123.6 (q, *J* = 271.7 Hz, 2x C, CF₃), 123.2 (CH), 121.6 (CH), 115.7 (CH), 49.9 (CH₂), 18.5 (2x CH₃).

RMN ¹⁹F (282 MHz, CDCl₃): δ -63.5 (2x CF₃).

IR ν_{max} : 3348 (N-H) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₂₀H₁₆F₆N₂S [M+H]⁺: 431.0938; Obtenida [M+H]⁺:431.1004.

N-((4-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)tiazol-2-il)metil)-2,6-dietilanilina (10b)



Siguiendo el procedimiento general D, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 65% y un punto de fusión de 73-76 °C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 8.38 (s ancho, 2H, H2', H6'), 7.85 (s ancho, 1H, H4'), 7.64 (s, 1H, H5), 7.10 (m, 3H, H3'', H4'', H5''), 4.51 (s, 2H, CH₂), 3.89 (s ancho, 1H, NH), 2.75 (q, *J* = 7.5 Hz, 4H, 2x CH₂), 1.30 (t, *J* = 7.5 Hz, 6H, 2x CH₃).

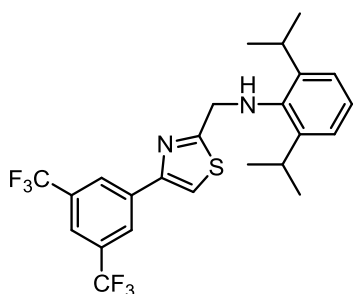
RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ 172.2 (C), 152.4 (C), 143.6 (C), 137.2 (2x C), 136.5 (C), 131.2 (q, $J = 33.2$ Hz, 2x C, C3', C5'), 127.1 (2x CH), 126.3 (2x CH), 125.3 (q, $J = 270.5$ Hz, 2x C, 2x CF_3), 124.1 (CH), 121.6 (CH), 115.6 (CH), 51.8 (CH_2), 24.6 (2x CH_2), 15.8 (2x CH_3).

RMN ^{19}F (282 MHz, CDCl_3): δ -63.5 (2x CF_3).

IR ν_{max} : 3389 (N-H) cm^{-1} .

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{F}_6\text{N}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 459.1251; Obtenida $[\text{M}+\text{H}]^+$:459.1327.

***N*-((4-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)tiazol-2-il)metil)-2,6-diisopropilanilina (10c)**



Siguiendo el procedimiento general D, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 45% y un punto de fusión de 97-99 °C.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 8.37 (s ancho, 2H, H2', H6'), 7.84 (s ancho, 1H, H4'), 7.65 (s, 1H, H5), 7.15 (m, 3H, H3'', H4'', H5''), 4.45 (s, 2H, CH_2), 3.79 (s ancho, 1H, NH), 3.36

(sept, $J = 6.9$ Hz, 2H, 2x CH), 1.27 (d, $J = 6.9$ Hz, 12H, 4x CH_3).

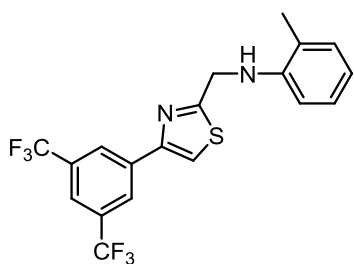
RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ 171.8 (C), 152.0 (C), 142.7 (C), 141.3 (2x C), 136.5 (C), 132.5 (q, $J = 272.3$ Hz, 2x C, 2x CF_3), 131.9 (q, $J = 33.1$ Hz, 2x C, C3', C5'), 125.9 (2x CH), 124.6 (CH), 123.5 (2x CH), 121.1 (CH), 115.2 (CH), 52.7 (CH_2), 27.6 (2x CH), 23.9 (4x CH_3).

RMN ^{19}F (282 MHz, CDCl_3): δ -63.4 (2x CF_3).

IR ν_{max} : 3348 (N-H) cm^{-1} .

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{F}_6\text{N}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 487.1564. Obtenida $[\text{M}+\text{H}]^+$:487.1631.

***N*-((4-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)tiazol-2-il)metil)-2-metilaniilina (10d)**



Siguiendo el procedimiento general D, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco ligeramente amarillento, con un rendimiento de 34% y un punto de fusión de 107-110 °C.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 8.36 (s ancho, 2H, H2', H6'), 7.84 (s ancho, 1H, H4'), 7.58 (s, 1H, H5), 7.11 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, H4'', H5''), 6.75 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H, H6''), 6.63 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H3''), 4.80 (s, 2H, CH_2), 4.42 (s ancho, 1H, NH), 2.27 (s, 3H, CH_3).

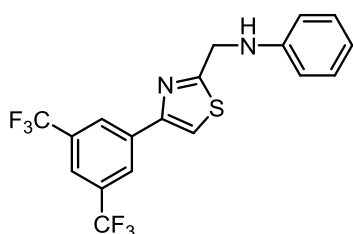
RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ 173.3 (C), 152.6 (C), 144.9 (C), 136.5 (C), 132.3 (q, $J = 32.1$ Hz, 2x C, C3', C5'), 130.6 (CH), 127.3 (CH), 126.4 (2x CH), 122.8 (C), 122.6 (q, $J = 270.3$ Hz, 2x C, 2x CF_3), 121.5 (CH), 118.7 (CH), 115.6 (CH), 110.6 (CH), 46.6 (CH_2), 17.6 (CH_3).

RMN ^{19}F (282 MHz, CDCl_3): δ -63.4 (2x CF_3).

IR ν_{\max} : 3417 (N-H) cm^{-1} .

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{F}_6\text{N}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 417.0782. Obtenida $[\text{M}+\text{H}]^+$: 417.0861.

***N*-((4-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)tiazol-2-il)metil)anilina (10e)**



Siguiendo el procedimiento general D, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 72% y un punto de fusión de 100-102 °C.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 8.24 (s ancho, 2H, H2', H6'), 7.73 (s ancho, 1H, H4'), 7.44 (s, 1H, H5), 7.11 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, H3'', H5''), 6.75 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, H4''), 6.63 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H2'', H6''), 4.62 (s, 2H, CH_2), 4.42 (s ancho, 1H, NH).

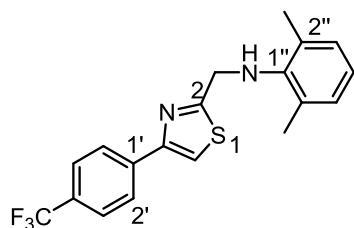
RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ 173.1 (C), 152.6 (C), 146.9 (C), 136.5 (C), 132.4 (q, $J = 30.3$ Hz, 2x C, C3', C5'), 129.5 (2x CH), 126.3 (CH), 123.6 (q, $J = 270.4$ Hz, 2x C, 2x CF_3), 121.6 (CH), 119.0 (2x CH), 115.6 (CH), 113.4 (2x CH), 46.7 (CH_2).

RMN ^{19}F (282 MHz, CDCl_3): $\delta -63.3$ (2x CF_3).

IR ν_{\max} : 3423 (N-H) cm^{-1} .

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{F}_6\text{N}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 403.0625. Obtenida $[\text{M}+\text{H}]^+$: 403.0704.

***N*-((4-(4-(trifluorometil)fenil)tiazol-2-il)metil)-2,6-dimetilanilina (10f)**



Siguiendo el procedimiento general D, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 73% y un punto de fusión de 108-110 °C.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 8.02 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H3', H5'), 7.69 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H2', H6'), 7.53 (s, 1H, H5), 7.05 (dd, $J = 8.1, 1.0$ Hz, 2H, H3'', H5''), 6.90 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H, H4''), 4.53 (s, 2H, CH_2), 3.89 (s ancho, 1H, NH), 2.36 (s, 6H, 2x CH_3).

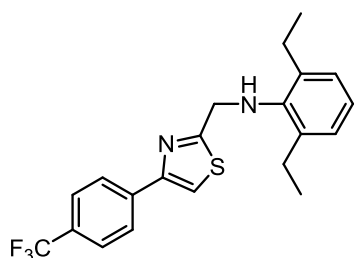
RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ 171.4 (C), 153.9 (C), 144.7 (C), 137.8 (C), 130.2 (2x C), 130.0 (q, $J = 32.3$ Hz, C, C4'), 129.1 (2x CH), 127.5 (q, $J = 271.8$ Hz, C, CF_3), 126.6 (2x CH), 125.9 (q, $J = 3.8$ Hz, 2x CH, C3', C5'), 123.1 (CH), 114.8 (CH), 50.0 (CH_2), 18.5 (2x CH_3).

RMN ^{19}F (282 MHz, CDCl_3): $\delta -62.9$ (CF_3).

IR ν_{\max} : 3350 (N-H) cm^{-1} .

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{F}_3\text{N}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 363.1065. Obtenida $[\text{M}+\text{H}]^+$: 363.1137.

N-((4-(4-(trifluorometil)fenil)tiazol-2-il)metil)-2,6-dietilanilina (10g)



Siguiendo el procedimiento general D, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 40% y un punto de fusión de 113-114 °C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 8.02 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H3', H5'), 7.69 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H2', H6'), 7.55 (s, 1H, H5), 7.05 (m, 3H, H3'', H4'', H5''), 4.49 (s, 2H, CH₂), 3.84 (s

ancho, 1H, NH), 2.74 (q, *J* = 7.5 Hz, 4H, 2x CH₂), 1.28 (t, *J* = 7.5 Hz, 6H, 2x CH₃).

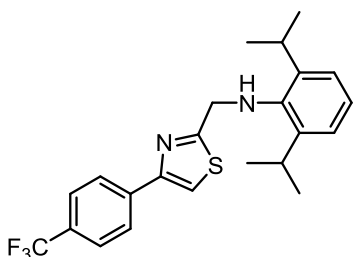
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 171.6 (C), 154.0 (C), 143.7 (C), 137.3 (C), 130.2 (2x C), 130.0 (q, *J* = 33.5 Hz, C, C4'), 127.0 (2x CH), 125.4 (q, *J* = 272.7 Hz, C, CF₃), 126.6 (2x CH), 125.9 (q, *J* = 3.7 Hz, 2x CH, C3', C5'), 124.0 (CH), 114.8 (CH), 51.8 (CH₂), 24.5 (2x CH₂), 15.1 (2x CH₃).

RMN ¹⁹F (282 MHz, CDCl₃): δ -61.8 (CF₃).

IR ν_{\max} : 3380 (N-H) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₂₁H₂₁F₃N₂S [M+H]⁺: 391.1378. Obtenida [M+H]⁺: 391.1446.

N-((4-(4-(trifluorometil)fenil)tiazol-2-il)metil)-2,6-diisopropilanilina (10h)



Siguiendo el procedimiento general D, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 38% y un punto de fusión de 79-81 °C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 8.02 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H3', H5'), 7.68 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H2', H6'), 7.56 (s, 1H, H5), 7.14 (m, 3H, H3'', H4'', H5''), 4.44 (s, 2H, CH₂), 3.75 (s

ancho, 1H, NH), 3.36 (sept, *J* = 7.1 Hz, 2H, 2x CH), 1.26 (d, *J* = 7.0 Hz, 12H, 4x CH₃).

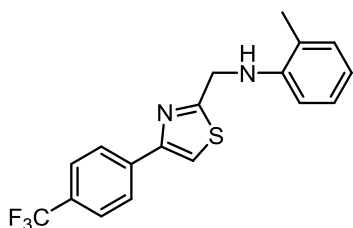
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 171.9 (C), 154.5 (C), 143.6 (2x C), 142.2 (C), 138.3 (C), 132.0 (q, *J* = 32.3 Hz, C, C4'), 127.0 (2x CH), 127.2 (q, *J* = 272.2 Hz, C, CF₃), 126.3 (q, *J* = 3.7 Hz, 2x CH, C3', C5'), 125.3 (CH), 124.3 (2x CH), 115.2 (CH), 53.7 (CH₂), 28.4 (2x CH), 24.8 (4x CH₃).

RMN ¹⁹F (282 MHz, CDCl₃): δ -63.0 (CF₃).

IR ν_{\max} : 3389 (N-H) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₂₃H₂₅F₃N₂S [M+H]⁺: 419.1691. Obtenida [M+H]⁺: 419.1761.

***N*-((4-(4-(trifluorometil)fenil)tiazol-2-il)metil)-2-metilanilina (10i)**



Siguiendo el procedimiento general D, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 35% y un punto de fusión de 106-108 °C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 8.02 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H3', H5'), 7.69 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H2', H6'), 7.51 (s, 1H, H5), 7.10 (td, *J* = 7.5, 1.5 Hz, 2H, H4'', H5''), 6.75 (dd, *J* = 7.5, 1.5 Hz, 1H, H6''), 6.70 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H3''), 4.79 (s, 2H, CH₂), 4.44 (s ancho, 1H, NH), 2.26 (s, 3H, CH₃).

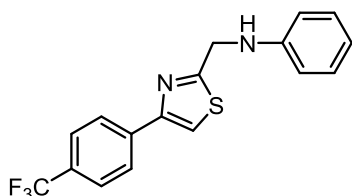
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 172.4 (C), 154.2 (C), 145.0 (C), 137.8 (C), 133.4 (q, *J* = 33.2 Hz, C, C4'), 130.5 (CH), 127.3 (CH), 126.8 (q, *J* = 271.6 Hz, C, CF₃), 126.6 (2x CH), 125.9 (q, *J* = 3.7 Hz, 2x CH, H3', H5'), 122.7 (C), 118.5 (CH), 114.8 (CH), 110.6 (CH), 46.6 (CH₂), 17.7 (CH₃).

RMN ¹⁹F (282 MHz, CDCl₃): δ -63.4 (CF₃).

IR ν_{max}: 3443 (N-H) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₁₈H₁₅F₃N₂S [M+H]⁺: 349.0908. Obtenida [M+H]⁺:349.0970.

***N*-((4-(4-(trifluorometil)fenil)tiazol-2-il)metil)anilina (10j)**



Siguiendo el procedimiento general D, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 70% y un punto de fusión de 125-126 °C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.90 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H3', H5'), 7.57 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H2', H6'), 7.37 (s, 1H, H5), 7.10 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H3'', H5''), 6.70 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H4''), 6.59 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H2'', H6''), 4.60 (s, 2H, CH₂), 4.42 (s ancho, 1H, NH).

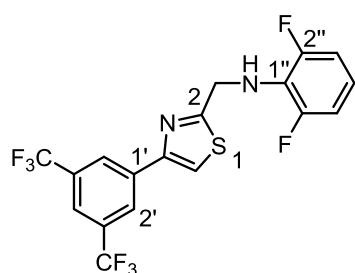
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 172.3 (C), 154.2 (C), 147.0 (C), 137.8 (C), 130.4 (q, *J* = 32.4 Hz, C, C4'), 129.3 (2x CH), 126.6 (2x CH), 125.8 (q, *J* = 3.7 Hz, 2x CH, C3', C5'), 124.6 (q, *J* = 273.6 Hz, C, CF₃), 118.9 (CH), 114.8 (CH), 113.4 (2x CH), 46.7 (CH₂).

RMN ¹⁹F (282 MHz, CDCl₃): δ -62.9 (CF₃).

IR ν_{max}: 3386 (N-H) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₁₇H₁₃F₃N₂S [M+H]⁺:335.0752. Obtenida [M+H]⁺:335.0830.

N-((4-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)tiazol-2-il)metil)-2,6-difluoroanilina (10k)



Siguiendo el procedimiento general D, se obtuvo el compuesto esperado como un líquido incoloro con un rendimiento de 42%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 8.32 (s, 2H, H2', H6'), 7.82 (s, 1H, H4'), 7.59 (s, 1H, H5), 6.81 (m, 3H, H3'', H4'', H5''), 4.85 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H, CH₂), 3.47 (s ancho, 1H, NH).

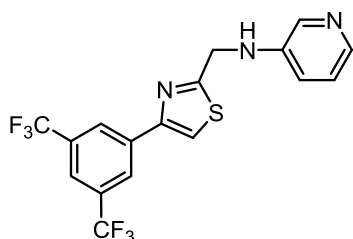
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 171.7 (C), 155.6-152.5 (dd, *J* = 240.7, 6.9 Hz, 2x C, C2'', C6''), 152.7 (C), 136.7 (C), 131.8 (q, *J* = 33.1 Hz, 2x C, C3', C5'), 126.6 (2x CH), 123.8 (q, *J* = 273.6 Hz, 2x C, 2x CF₃), 121.8 (CH), 119.6 (t, *J* = 6.4 Hz, CH, C4''), 118.3 (C), 115.7 (CH), 112.1 (d, *J* = 25.1 Hz, 2x CH, C3'', C5''), 48.5 (CH₂).

RMN ¹⁹F (282 MHz, CDCl₃): δ -63.4 (2x CF₃), -128.6 (2x F).

IR *v*_{max}: 3367 (N-H) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₁₈H₁₀F₈N₂S [M+H]⁺: 439.0437. Obtenida [M+H]⁺:439.0511.

N-((4-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)tiazol-2-il)metil)-3-aminopiridina (10l)



Siguiendo el procedimiento general D, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 89% y un punto de fusión de 167-169 °C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 8.33 (s, 2H, H2', H6'), 8.16 (s, 1H, H2''), 8.05 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H, H6''), 7.83 (s, 1H, H4'), 7.61 (s, 1H, H5), 7.11 (dd, *J* = 8.4, 4.5 Hz, 1H, H5''), 6.98 (dt, *J* = 8.1, 4.2 Hz, 1H, H4''), 4.75 (d, *J* = 5.1 Hz, 2H, CH₂), 4.68 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H, NH).

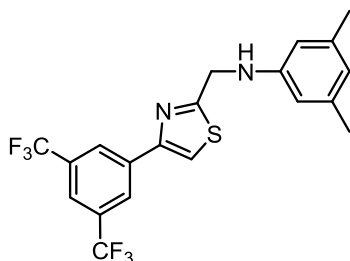
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 171.5 (C), 152.8 (C), 143.0 (C), 140.4 (CH), 136.7 (CH), 136.3 (C), 132.6 (q, *J* = 33.3 Hz, 2x C, C3', C5'), 126.4 (2x CH), 123.9 (CH), 125.6 (q, *J* = 271.8 Hz, 2x C, 2x CF₃), 121.6 (CH), 119.3 (CH), 115.7 (CH), 46.2 (CH₂).

RMN ¹⁹F (282 MHz, CDCl₃): δ -63.4 (2x CF₃).

IR *v*_{max}: 3233(N-H) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₁₇H₁₁F₆N₃S [M+H]⁺: 404.0578. Obtenida [M+H]⁺:404.0650.

N-((4-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)tiazol-2-il)metil)-3,5-dimetilanilina (10m)



Siguiendo el procedimiento general D, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 63% y un punto de fusión de 98-100°C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 8.36 (s, 2H, H2', H6'), 7.84 (s, 1H, H4'), 7.58 (s, 1H, H5), 6.47 (t, *J* = 1.6 Hz, 1H, H4''),

6.36 (d, $J = 1.6$ Hz, 2H, H2'', H6''), 4.72 (s, 2H, CH₂), 4.43 (s ancho, 1H, NH), 2.25 (s, 6H, 2x CH₃).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 173.5 (C), 152.6 (C), 147.1 (C), 139.3 (2x C), 136.6 (C), 132.5 (q, $J = 33.4$ Hz, 2x C, C3', C5'), 126.3 (2x CH), 125.6 (q, $J = 271.6$ Hz, 2x C, 2x CF₃), 121.5 (CH), 121.0 (CH), 115.6 (CH), 111.4 (2x CH), 46.7 (CH₂), 21.6 (2x CH₃).

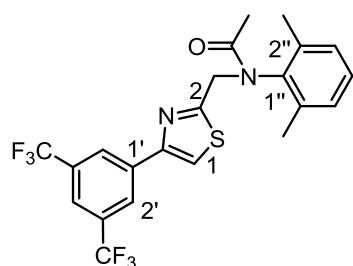
RMN ¹⁹F (282 MHz, CDCl₃): δ -63.4 (2x CF₃).

IR ν_{\max} : 3414 (N-H) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₂₀H₁₆F₆N₂S [M+H]⁺: 431.0938. Obtenida [M+H]⁺:431.1012.

N-ACETIL DERIVADOS 12 (a-m)

N-((4-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)tiazol-2-il)metil)-N-(2,6-dimetilfenil) acetamida (12a hit)



Siguiendo el procedimiento general E, se obtuvo el producto deseado como un sólido blanco con un rendimiento de un 84% y un punto de fusión de 131-132 °C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 8.24 (s, 2H, H2', H6'), 7.79 (s, 1H, H4'), 7.69 (s, 1H, H5), 7.19 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H, H4''), 7.12 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, H3'', H5''), 5.04 (s, 2H, CH₂), 2.03

(s, 6H, 2x CH₃), 1.81 (s, 3H, CH₃).

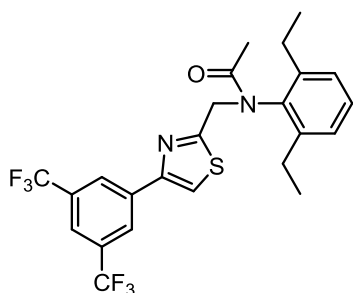
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 171.8 (C), 166.9 (CO), 151.4 (C), 140.9 (C), 136.6 (C), 136.4 (2x C), 134.4 (q, $J = 33.1$ Hz, 2x C, C3', C5'), 129.6 (2x CH), 129.0 (CH), 126.5 (2x CH), 124.2 (q, $J = 270.9$ Hz, 2x C, 2x CF₃), 121.7 (CH), 118.3 (CH), 50.3 (CH₂), 21.8 (CH₃), 18.5 (2x CH₃).

RMN ¹⁹F (282 MHz, CDCl₃): δ -63.6 (2x CF₃).

IR ν_{\max} : 1653 (C=O) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₂₂H₁₈F₆N₂OS [M+H]⁺: 473.1044. Obtenida [M+H]⁺:473.1110.

N-((4-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)tiazol-2-il)metil)-N-(2,6-dietilfenil) acetamida (12b)



Siguiendo el procedimiento general E, se obtuvo el producto deseado como un sólido blanco con un rendimiento de un 83% y un punto de fusión de 134-136 °C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 8.26 (m ancho, 2H, H2', H6'), 7.78 (m ancho, 1H, H4'), 7.71 (s, 1H, H5), 7.32 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H, H4''), 7.17 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, H3'', H5''), 5.05 (s, 2H, CH₂), 2.39 (q, $J = 7.2$ Hz, 4H, 2x CH₂), 1.80 (s, 3H,

CH₃), 1.09 (t, $J = 7.5$ Hz, 6H, 2x CH₃).

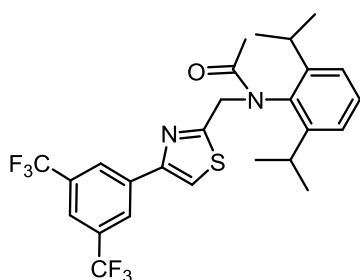
RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ 172.0 (C), 166.6 (CO), 150.9 (C), 141.6 (2x C), 139.6 (C), 136.4 (C), 132.2 (q, $J = 33.1$ Hz, 2x C, C3', C5'), 129.1 (CH), 127.1 (2x CH), 126.2 (2x CH), 123.6 (q, $J = 270.9$ Hz, 2x C, CF_3), 121.4 (CH), 118.1 (CH), 50.3 (CH_2), 23.9 (2x CH_2), 21.7 (CH_3), 14.4 (2x CH_3).

RMN ^{19}F (282 MHz, CDCl_3): δ -63.3 (2x CF_3).

IR ν_{max} : 1650 ($\text{C}=\text{O}$) cm^{-1} .

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{F}_6\text{N}_2\text{OS}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 501.1357. Obtenida $[\text{M}+\text{H}]^+$: 501.1423.

***N*-((4-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)tiazol-2-il)metil)-*N*-(2,6-diisopropilfenil) acetamida (12c)**



Seguendo el procedimiento general E, se obtuvo el producto deseado como un sólido blanco ligeramente amarillento, con un rendimiento de un 40% y un punto de fusión de 155-157 °C.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 8.26 (s, 2H, H2', H6'), 7.79 (s, 1H, H4'), 7.72 (s, 1H, H5), 7.38 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H, H4''), 7.23 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H, H3'', H5''), 5.03 (s, 2H, CH_2), 2.84 (Sept, $J = 6.9$ Hz, 2H, 2x CH), 1.85 (s, 3H, CH_3), 1.16 (d, $J = 6.9$ Hz; 6H, 2x CH_3), 1.01 (d, $J = 6.9$ Hz; 6H, 2x CH_3).

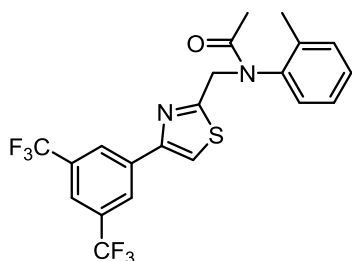
RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ 172.4 (C), 166.7 (CO), 150.7 (C), 146.5 (2xC), 138.2 (C), 136.4 (C), 133.4 (q, $J = 33.3$ Hz, 2x C, C3', C5'), 129.6 (2x CH), 126.2 (2x CH), 125.1 (CH), 123.8 (q, $J = 270.9$ Hz, 2x C, CF_3), 121.7 (CH), 118.3 (CH), 52.7 (CH_2), 28.7 (2x CH), 24.7 (2x CH_3), 24.2 (2x CH_3), 21.9 (CH_3).

RMN ^{19}F (282 MHz, CDCl_3): δ -63.4 (2x CF_3).

IR ν_{max} : 1652 ($\text{C}=\text{O}$) cm^{-1} .

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para $\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{F}_6\text{N}_2\text{OS}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 529.1670. Obtenida $[\text{M}+\text{H}]^+$: 529.1738.

***N*-((4-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)tiazol-2-il)metil)-*N*-(*o*-tolil)acetamida (12d)**



Seguendo el procedimiento general E, se obtuvo el producto deseado como un sólido blanco con un rendimiento de un 70% y un punto fusión de 108-110 °C.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 8.25 (s, 2H, H2', H6'), 7.79 (s, 1H, H4'), 7.66 (s, 1H, H5), 7.29 (m, 2H, 2x Ar), 7.19 (m, 1H, 1x Ar), 7.06 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H, 1x Ar), 5.49 (d, $J = 14.7$ Hz, 1H, CH_2), 4.72 (d, $J = 14.8$ Hz, 1H, CH_2), 2.20 (s, 3H, CH_3), 1.86 (s, 3H, CH_3).

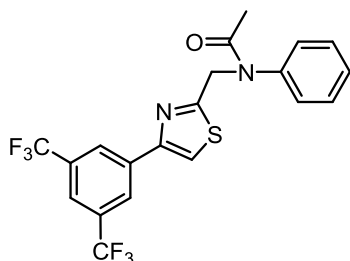
RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ 171.3 (C), 167.4 (CO), 151.6 (C), 141.4 (C), 136.4 (C), 135.7 (C), 132.2 (q, $J = 33.1$ Hz, 2x C, C3', C5'), 131.8 (CH), 129.1 (CH), 128.9 (CH), 127.5 (CH), 126.3 (2x CH), 125.6 (q, $J = 271.6$ Hz, 2x C, 2x CF_3), 121.5 (CH), 116.9 (CH), 50.1 (CH_2), 22.1 (CH_3), 17.7 (CH_3).

RMN ^{19}F (282 MHz, CDCl_3): δ -63.4 (2x CF_3).

IR ν_{\max} : 1642 (C=O) cm^{-1} .

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{F}_6\text{N}_2\text{OS}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 459.0888. Obtenida $[\text{M}+\text{H}]^+$:459.0958.

***N*-((4-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)tiazol-2-il)metil)-*N*-fenil acetamida (12e)**



Siguiendo el procedimiento general E, se obtuvo el producto deseado como un sólido blanco con un rendimiento de un 65% y un punto de fusión de 94-96 °C.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 8.18 (s, 2H, H2', H6'), 7.70 (s, 1H, H4'), 7.57 (s, 1H, H5), 7.30 (m, 3H, H3'', H4'', H5''), 7.15 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, H2'', H6''), 5.14 (s, 2H, CH_2), 1.88

(s, 3H, CH_3).

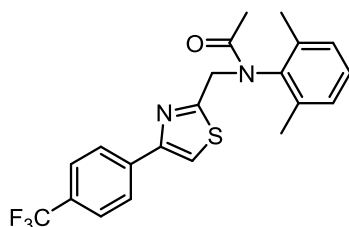
RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ 170.9 (C), 167.9 (CO), 151.7 (C), 142.8 (C), 136.7 (C), 132.1 (q, $J = 33.1$ Hz, 2x C, C3', C5'), 129.9 (2x CH), 128.5 (CH), 127.9 (2x CH), 126.3 (2x CH), 123.4 (q, $J = 271.1$ Hz, 2x C, CF_3), 121.4 (CH), 116.5 (CH), 50.9 (CH_2), 22.5 (CH_3).

RMN ^{19}F (282 MHz, CDCl_3): δ -63.5 (2x CF_3).

IR ν_{\max} : 1652 (C=O) cm^{-1} .

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{F}_6\text{N}_2\text{OS}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 445.0731. Obtenida $[\text{M}+\text{H}]^+$:445.0809.

***N*-((4-(4-(trifluorometil)fenil)tiazol-2-il)metil)-*N*-(2,6-dimetilfenil) acetamida (12f)**



Siguiendo el procedimiento general E, se obtuvo el producto deseado como un sólido blanco con un rendimiento de un 90% y un punto de fusión de 115-117 °C.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 7.90 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, H3', H5'), 7.62 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, H2', H6'), 7.60 (s, 1H, H5), 7.17 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H, H4''), 7.08 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H3'',

H5''), 5.03 (s, 2H, CH_2), 2.02 (s, 6H, 2x CH_3), 1.79 (s, 3H, CH_3).

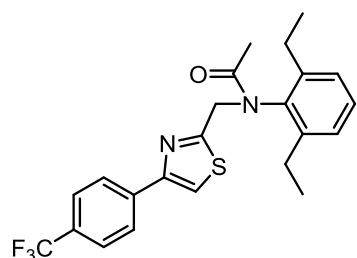
RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ 171.3 (C), 165.9 (CO), 152.7 (C), 140.7 (C), 137.7 (C), 136.2 (2x C), 130.0 (q, $J = 32.4$ Hz, C, C4'), 129.1 (2x CH), 128.7 (CH), 127.5 (q, $J = 271.6$ Hz, C, CF_3), 126.5 (2x CH), 125.8 (q, $J = 3.7$ Hz, 2x CH, C3', C5'), 117.2 (CH), 49.9 (CH_2), 21.5 (CH_3), 18.1 (2x CH_3).

RMN ^{19}F (282 MHz, CDCl_3): δ -63.2 (CF_3).

IR ν_{\max} : 1648 (C=O) cm^{-1} .

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{F}_3\text{N}_2\text{OS}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 405.1170. Obtenida $[\text{M}+\text{H}]^+$: 405.1238.

***N*-((4-(4-(trifluorometil)fenil)tiazol-2-il)metil)-*N*-(2,6-dietilfenil) acetamida (12g)**



Siguiendo el procedimiento general E, se obtuvo el producto deseado como un sólido blanco con un rendimiento de un 78% y un punto de fusión de 116-119 °C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.90 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H3', H5'), 7.62 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H2', H6'), 7.61 (s, 1H, H5), 7.30 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, H4''), 7.16 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H3'', H5''), 5.04 (s, 2H, CH₂), 2.37 (q, *J* = 7.5 Hz, 4H, 2x CH₂), 1.79 (s, 3H, CH₃), 1.07 (t, *J* = 7.5 Hz, 6H, 2x CH₃).

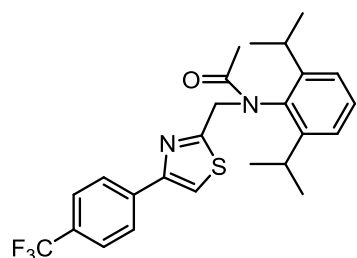
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 171.9 (C), 165.9 (CO), 152.6 (C), 141.6 (2x C), 139.6 (C), 137.7 (C), 130.4 (q, *J* = 32.3 Hz, C, C4'), 129.0 (CH), 127.1 (2x CH), 127.8 (q, *J* = 272.5 Hz, C, CF₃), 126.5 (2x CH), 125.8 (q, *J* = 3.9 Hz, 2x CH, C3', C5'), 117.3 (CH), 51.3 (CH₂), 23.8 (2x CH₂), 21.7 (CH₃), 14.4 (2x CH₃).

RMN ¹⁹F (282 MHz, CDCl₃): δ -61.9 (CF₃).

IR ν_{\max} : 1635 (C=O) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₂₃H₂₃F₃N₂OS [M+H]⁺: 433.1483. Obtenida [M+H]⁺:433.1553.

***N*-((4-(4-(trifluorometil)fenil)tiazol-2-il)metil)-*N*-(2,6-diisopropilfenil) acetamida (12h)**



Siguiendo el procedimiento general E, se obtuvo el producto deseado como un sólido blanco con un rendimiento de un 91% y un punto de fusión de 121-123 °C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.90 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H3', H5'), 7.63 (s, 1H, H5), 7.62 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H2', H6'), 7.35 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H, H4''), 7.19 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H3'', H5''), 5.04 (s, 2H, CH₂), 2.82 (sept, *J* = 7 Hz, 2H, 2x CH), 1.85 (s, 3H, CH₃), 1.15 (d, *J* = 7 Hz, 6H, 2x CH₃), 1.00 (d, *J* = 7 Hz, 6H, 2x CH₃).

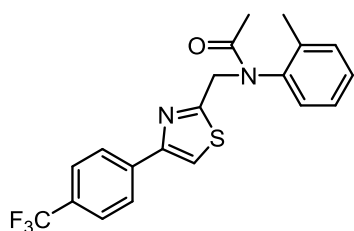
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 172.3 (C), 166.1 (CO), 152.3 (C), 146.5 (2x C), 138.2 (C), 137.7 (C), 131.2 (q, *J* = 32.5 Hz, C, C4'), 129.5 (CH), 126.5 (2x CH), 128.3 (q, *J* = 270.6 Hz, C, CF₃), 125.8 (q, *J* = 4.1 Hz, 2x CH, C3', C5'), 125.0 (2x CH), 117.6 (CH), 52.9 (CH₂), 28.9 (2x CH), 24.9 (2x CH₃), 24.5 (2x CH₃), 22.2 (CH₃).

RMN ¹⁹F (282 MHz, CDCl₃): δ -62.7 (CF₃).

IR ν_{\max} : 1653 (C=O) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₂₅H₂₇F₃N₂OS [M+H]⁺: 461.1796. Obtenida [M+H]⁺:461.1854.

***N*-((4-(4-(trifluorometil)fenil)tiazol-2-il)metil)-*N*-(*o*-tolil) acetamida (12i)**



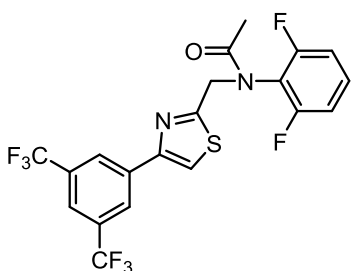
Siguiendo el procedimiento general E, se obtuvo el producto deseado como un sólido blanco con un rendimiento de un 70% y un punto de fusión de 93-96 °C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.93 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H3', H5'), 7.63 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H2', H6'), 7.59 (s, 1H, H5), 7.30 (m, 2H, 2x Ar), 7.20 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, 1x Ar), 7.07 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, 1x Ar), 5.52 (d, *J* = 15 Hz, 1H, CH₂), 4.72 (d, *J* = 14.7 Hz, 1H, CH₂), 2.20 (s, 3H, CH₃), 1.87 (s, 3H, CH₃).
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 171.1 (C), 166.7 (CO), 153.2 (C), 141.4 (C), 137.7 (C), 135.7 (C), 131.7 (CH), 130.1 (q, *J* = 32.1 Hz, C, C4'), 128.9 (2x CH), 127.4 (CH), 126.0 (2x CH), 125.7 (q, *J* = 3.8 Hz, 2x CH, C3', C5'), 124.4 (q, *J* = 270.3 Hz, C, CF₃), 116.1 (CH), 50.0 (CH₂), 22.1 (CH₃), 17.6 (CH₃). **RMN ¹⁹F** (282 MHz, CDCl₃): δ -63.0 (CF₃).

IR ν_{\max} : 1646 (C=O) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₂₀H₁₇F₃N₂OS [M+H]⁺: 391.1014. Obtenida [M+H]⁺:391.1092.

***N*-((4-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)tiazol-2-il)metil)-*N*-(2,6-difluorofenil)acetamida (12k)**



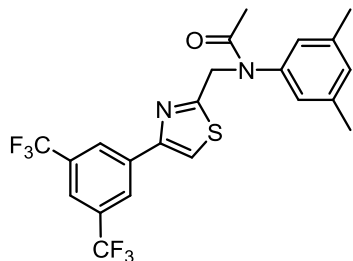
Siguiendo el procedimiento general E, se obtuvo el producto deseado como un líquido incoloro con un rendimiento de un 83%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 8.19 (s, 2H, H2', H6'), 7.78 (s, 1H, H4'), 7.64 (s, 1H, H5), 7.37 (m, 1H, H4''), 7.01 (t, *J* = 8.5 Hz, 2H, H3'', H5''), 5.16 (s, 2H, CH₂), 1.98 (s, 3H, CH₃).
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 171.0 (C), 166.1 (CO), 160.7-157.5 (dd, *J* = 240.7, 6.9 Hz, 2x C, C2'', C6''), 151.7 (C), 136.4 (C), 132.1 (q, *J* = 33.0 Hz, 2x C, C3', C5'), 130.4 (t, *J* = 6.6 Hz, CH, C4''), 126.3 (2x CH), 122.6 (q, *J* = 271.9 Hz, 2x C, CF₃), 121.4 (CH), 117.1 (CH), 114.3 (C), 112.60 (d, *J* = 31.1 Hz, 2x CH, C3'', C5''), 48.9 (CH₂), 21.5 (CH₃).
RMN ¹⁹F (282 MHz, CDCl₃): δ -63.4 (2x CF₃); -117.7 (2x F).

IR ν_{\max} : 1633 (C=O) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₂₀H₁₂F₈N₂OS [M+H]⁺: 481.0543. Obtenida [M+H]⁺:481.0616.

***N*-((4-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)tiazol-2-il)metil)-*N*-(3,5-dimetilfenil)acetamida (12m)**



Siguiendo el procedimiento general E, se obtuvo el producto deseado como un sólido blanco, con un rendimiento de un 69% y un punto de fusión de 105-108 °C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 8.29 (s, 2H, H2', H6'), 7.79 (s, 1H, H4'), 7.64 (s, 1H, H5), 6.99 (s, 1H, H4''), 6.85 (s, 2H,

H2'', H6''), 5.17 (s, 2H, CH₂), 2.31 (s, 6H, 2x CH₃), 1.97 (s, 3H, CH₃).

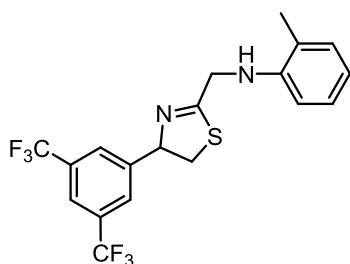
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 171.1 (C), 168.2 (CO), 151.7 (C), 142.8 (C), 139.8 (2xC), 136.5 (C), 132.3 (q, *J* = 31.9 Hz, 2x C, C3', C5'), 130.1 (2x CH), 126.3 (CH), 125.5 (2x CH), 123.1 (q, *J* = 272.1 Hz, 2x C, 2x CF₃), 121.4 (CH), 116.5 (CH), 51.1 (CH₂), 22.5 (CH₃), 21.3 (2x CH₃).

RMN ¹⁹F (282 MHz, CDCl₃): δ -63.4 (2 x CF₃).

IR *v*_{max}: 1661 (C=O) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₂₂H₁₈F₆N₂OS [M+H]⁺: 473.1044. Obtenida [M+H]⁺: 473.1122.

***N*-((4-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-4,5-dihidrotiazol-2-il)metil)-2-metil-anilina (13)**



Siguiendo el procedimiento general D en el que se emplea un mayor número de equivalentes de LiAlH₄ (2.5 mmol, 95 mg) como agente reductor, se obtuvo un sólido amarillento con un rendimiento de 22% y un punto de fusión de 104-106 °C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 8.23 (s, 2H, H2', H6'), 7.97 (s, 1H, H4'), 7.13 (dd, *J* = 8.0, 1.7 Hz, 1H Ar), 7.04 (dt, *J* = 7.2, 1.5 Hz, 1H Ar), 6.77 (dt, *J* = 7.2, 1.5 Hz, 1H Ar), 6.66 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H Ar), 6.16 (m, 1H, H4), 4.39 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH₂, H5), 3.69 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H, CH₂), 2.18 (s, 3H, CH₃).

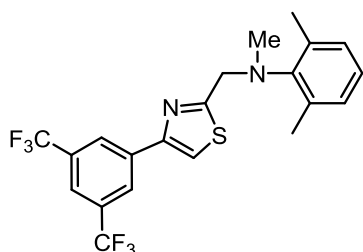
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 176.6 (C), 145.5 (C), 135.2 (C), 133.1 (q, *J* = 33.5 Hz, 2x C, C3', C5'), 130.5 (CH), 128.4 (2x CH), 127.3 (CH), 124.9 (CH), 123.8 (q, *J* = 270.7 Hz, 2x C, CF₃), 122.5 (C), 117.8 (CH), 110.7 (CH), 83.3 (CH), 50.7 (CH₂), 42.4 (CH₂), 17.6 (CH₃).

RMN ¹⁹F (282 MHz, CDCl₃): δ -63.5 (2x CF₃).

IR *v*_{max}: 3346 (NH) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₁₉H₁₆F₆N₂S [M+H]⁺: 419.0938. Obtenida [M+H]⁺: 419.1009.

***N*-((4-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)thiazol-2-il)metil)-*N*-metil-2,6-dimetilanilina (14)**



Se disuelve la correspondiente amina secundaria (**10a**) (0.09 mmol, 40 mg) bajo atmósfera inerte en CH₃CN anhidro (2 mL) como disolvente. A continuación se adiciona K₂CO₃ anhidro como base (0.35 mmol, 49 mg) y yoduro de metilo (MeI) (0.26 mmol, 17 μL) como agente alquilante. Se mantiene la mezcla con agitación a temperatura ambiente durante 96 h. Cuando la reacción ha finalizado, se evapora el disolvente a vacío y el crudo se disuelve en Et₂O (30 mL), lavando la fase orgánica con H₂O, NaCl (sat) y secándola sobre Na₂SO₄ anhidro.

El residuo obtenido después de evaporar el disolvente a vacío, se purifica por cromatografía sobre gel de sílice empleando una mezcla hexano:Et₂O (95:5) como eluyente. Se obtuvo finalmente un líquido incoloro con un rendimiento de un 45%.

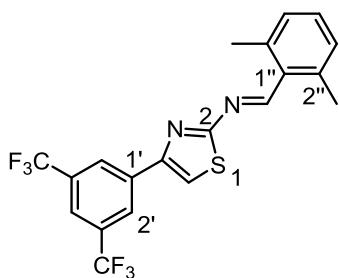
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 8.34 (s, 2H, H2', H6'), 7.82 (s, 1H, H4'), 7.65 (s, 1H, H5), 7.04 (m, 3H, H3'', H4'', H5''), 4.60 (s, 2H, CH₂), 2.84 (s, 3H, CH₃), 2.47 (s, 6H, 2x CH₃).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 175.4 (C), 152.2 (C), 149.1 (C), 136.8 (C), 136.7 (2x C), 132.4 (q, *J* = 32.9 Hz, 2x C, C3', C5'), 129.4 (2x CH), 126.3 (2x CH), 123.8 (q, *J* = 273.2 Hz, 2x C, 2x CF₃), 125.3 (CH), 121.4 (CH), 115.9 (CH), 61.2 (CH₂), 40.5 (CH₃), 30.0 (2x CH₃).

RMN ¹⁹F (282 MHz, CDCl₃): δ -63.4 (2x CF₃).

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₂₁H₁₈F₆N₂S [M+H]⁺: 445.1095. Obtenida [M+H]⁺: 445.1155.

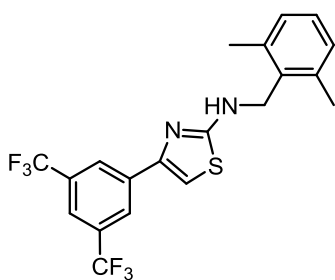
***N*-(4-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)thiazol-2-il)-1-(2,6-dimetilfenil) metanimina (17)**



Se disuelve bajo atmósfera de argón una mezcla del compuesto **5** (0.16 mmol, 50 mg) y 2,6-dimetilbenzaldehído (0.25 mmol, 32 mg) en 1,2-dicloroetano (1.5 mL) como disolvente. Se adiciona ácido acético glacial en cantidad estequiométrica (0.16 mmol, 9.2 μL) y se mantiene la mezcla con agitación a 50 °C durante 48 h. Se concentra la reacción a vacío y el crudo se disuelve en AcOEt (30 mL),

lavando la fase orgánica con NaHCO₃ (sat), NaCl (sat) y secándola sobre Na₂SO₄ anhidro. Dada la inestabilidad mostrada por estos sustratos, el crudo obtenido después de evaporar el disolvente a vacío se hace reaccionar en la siguiente etapa de la síntesis sin purificación ni caracterización previa.

4-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-*N*-(2,6-dimetilbencil)-2-aminotiazol (16)



Siguiendo el procedimiento general D, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 17% y un punto de fusión de 150-152 °C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 8.24 (s, 2H, H2', H6'), 7.76 (s, 1H, H4'), 7.13 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, H4''), 7.04 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H3'', H5''), 6.91 (d, *J* = 0.6 Hz, 1H, H5), 5.15 (t, *J* = 4.5

Hz, 1H, NH), 4.50 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H, CH₂), 2.41 (s, 6H, 2x CH₃).

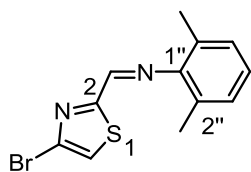
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 169.0 (C), 148.8 (C), 137.6 (2x C), 136.8 (C), 133.3 (C), 131.7 (q, *J* = 32.5 Hz, 2x C, C3', C5'), 128.8 (2x CH), 128.4 (CH), 126.1 (2x CH), 123.2 (q, *J* = 269.9 Hz, 2x C, 2x CF₃), 120.9 (CH), 103.7 (CH), 44.3 (CH₂), 19.8 (2x CH₃).

RMN ¹⁹F (282 MHz, CDCl₃): δ -63.4 (2x CF₃).

IR ν_{max}: 3196 (NH) cm⁻¹.

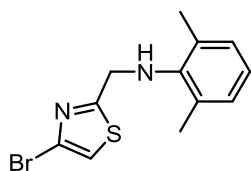
HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₂₀H₁₆F₆N₂S [M+H]⁺: 431.0938. Obtenida [M+H]⁺: 431.1005.

1-(4-bromotiazol-2-il)-N-(2,6-dimetilfenil)metanimina (19)



Se disuelve 4-bromotiazol-2-carbaldehído **18** (2.6 mmol, 500 mg) junto con tamiz molecular de 4 Å bajo atmósfera inerte en Et₂O anhidro (15 mL) como disolvente. Sobre ésta se adiciona 2,6-dimetilanilina (2.6 mmol, 320 µL) y se mantiene con agitación a temperatura ambiente durante 24 h. Dada la mencionada inestabilidad de estos sustratos, el crudo obtenido se concentra a vacío y se procede a realizar la siguiente etapa de la síntesis propuesta sin purificación ni caracterización previa.

N-((4-bromotiazol-2-il)metil)-2,6-dimetilanilina (20)

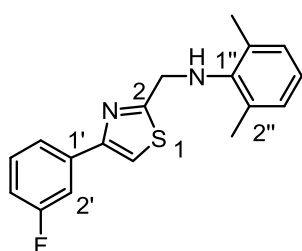


Siguiendo el procedimiento general D, se obtuvo el producto esperado como un líquido incoloro con un rendimiento de 64%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.18 (s, 1H, H5), 7.02 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H, H4''), 6.89 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H, H3'', H5''), 4.44 (s, 2H, CH₂), 3.70 (s ancho, 1H, NH), 2.30 (s, 6H, 2x CH₃).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 172.5 (C), 144.2 (C), 130.4 (2x C), 129.2 (2x CH), 124.8 (C), 123.3 (CH), 117.2 (CH), 49.8 (CH₂), 18.4 (2x CH₃).

N-((4-(3-fluorofenil)tiazol-2-il)metil)-2,6-dimetilanilina (21a)



Siguiendo el procedimiento general F, se obtuvo un sólido blanco con un rendimiento de 68% y un punto de fusión de 77-79 °C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.67 (dd, *J* = 7.5, 1.9 Hz, 1H, H6'), 7.62 (dt, *J* = 7.8, 5.5 Hz, 1H, H5'), 7.44 (s, 1H, H5), 7.38 (dd, *J* = 8.6, 1.7 Hz, 1H, H2'), 7.04 (m, 3H, H3'', H4'', H5''), 6.91 (t, *J* = 8.5 Hz, 1H, H4'), 4.52 (s, 2H, CH₂), 3.88 (s ancho, 1H, NH), 2.35 (s, 6H, 2x CH₃).

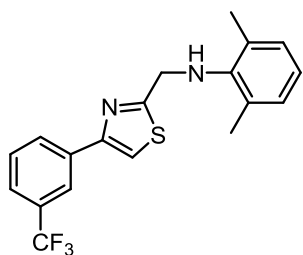
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 170.1 (C), 163.3 (d, *J* = 243.6 Hz, C, C3'), 154.2 (C), 144.8 (C), 136.1 (C), 130.4 (CH), 130.2 (2x C), 129.1 (2x CH), 123.0 (CH), 121.9 (CH), 115.0 (d, *J* = 21.5 Hz, CH), 113.9 (CH), 113.4 (d, *J* = 22.8 Hz, CH), 50.1 (CH₂), 18.5 (2x CH₃).

RMN ¹⁹F (282 MHz, CDCl₃): δ -112.9 (F).

IR *v*_{max}: 3365 (NH) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₁₈H₁₇FN₂S [M+H]⁺: 313.1096. Obtenida [M+H]⁺: 313.1178.

N-((4-(3-(trifluorometil)fenil)tiazol-2-il)metil)-2,6-dimetilanilina (21b)



Siguiendo el procedimiento general F, se obtuvo un sólido blanco con un rendimiento de 78% y un punto de fusión de 76-78 °C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 8.2 (s ancho, 1H, H2'), 7.84 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H, H6'), 7.57 (m, 2H, H4', H5'), 7.51 (s, 1H, H5), 7.06 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, H3'', H5''), 6.92 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, H4''), 4.55 (s, 2H, CH₂), 3.91 (s ancho, 1H, NH), 2.38 (s, 6H, 2x CH₃).

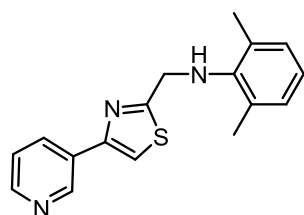
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 171.4 (C), 153.9 (C), 144.7 (C), 135.2 (C), 131.1 (q, *J* = 32.0 Hz, C, C3'), 130.2 (2x C), 129.7 (CH), 129.4 (CH), 129.1 (2x CH), 124.8 (CH), 123.8 (q, *J* = 266.7 Hz, C, CF₃), 123.2 (CH), 123.0 (CH), 114.2 (CH), 49.8 (CH₂), 18.5 (2x CH₃).

RMN ¹⁹F (282 MHz, CDCl₃): δ -63.1 (CF₃).

IR ν_{\max} : 3311 (NH) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₁₉H₁₇F₃N₂S [M+H]⁺: 363.1065. Obtenida [M+H]⁺:363.1135.

N-((4-(piridin-3-il)tiazol-2-il)metil)-2,6-dimetilanilina (21c)



Siguiendo el procedimiento general F, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 56% y un punto de fusión de 70-72 °C. El crudo de reacción se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice empleando una mezcla hexano:AcOEt (60:40) como eluyente.

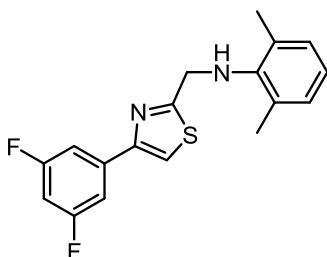
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 9.13 (s, 1H, H2'), 8.58 (m, 1H, H4'), 8.18(d, *J* = 7.8 Hz, H6'), 7.50 (s, 1H, H5), 7.35 (m, 1H, H5'), 7.02 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H3'', H5''), 6.88 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H4''), 4.52 (s, 2H, CH₂), 3.93 (s, 1H, NH), 2.34 (s, 6H, 2x CH₃).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 171.6 (C), 152.3 (C), 149.1 (CH), 147.8 (CH), 144.7 (C), 133.6 (CH), 130.4 (C), 130.1 (2x C), 129.1 (2x CH), 123.7 (CH), 122.9 (CH), 114.2 (CH), 49.9 (CH₂), 18.5 (2x CH₃).

IR ν_{\max} : 3324 (NH) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₁₇H₁₇N₃S [M+H]⁺: 296.1143. Obtenida [M+H]⁺:296.1217.

N-((4-(3,5-difluorofenil)tiazol-2-il)metil)-2,6-dimetilanilina (21d)



Siguiendo el procedimiento general F, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 66% y un punto de fusión de 80-82 °C. El crudo de reacción se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice empleando una mezcla hexano:CH₂Cl₂ (70:30) como eluyente.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.44 (m, 3H, H2', H6', H5), 7.05 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, H3'', H5''), 6.91 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H, H4''), 6.80 (tt, *J* = 9, 2.4 Hz, 1H, H4'), 4.52 (s, 2H, CH₂), 3.87 (s, 1H, NH). 2.36 (s, 6H, 2x CH₃).

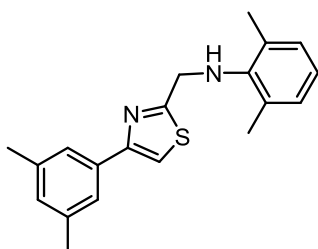
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ: 171.4 (C), 165.1 (d, *J* = 246.1 Hz, 2x C, C3', C5'), 152.3 (t, *J* = 2.1 Hz, C, C4), 144.7 (C), 137.6 (t, *J* = 6.9 Hz, C, C1'), 130.2 (2x C), 129.1 (2x CH), 123.1 (CH), 114.8 (CH), 109.2 (d, *J* = 26.1 Hz, 2x CH, C2', C6'), 103.4 (t, *J* = 25.4 Hz, CH, C4'), 49.9 (CH₂), 18.5 (2x CH₃).

RMN ¹⁹F (282 MHz, CDCl₃): δ: -110.0 (2x F).

IR *v*_{max}: 3386 (NH) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₁₈H₁₆F₂N₂S [M+H]⁺: 331.1002. Obtenida [M+H]⁺:331.1075.

***N*-((4-(3,5-dimetilfenil)thiazol-2-il)metil)-2,6-dimetilanilina (21e)**



Siguiendo el procedimiento general F, se obtuvo el compuesto esperado como un aceite incoloro con un rendimiento de 66%. El crudo de reacción se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice empleando una mezcla hexano:CH₂Cl₂ (60:40) como eluyente.

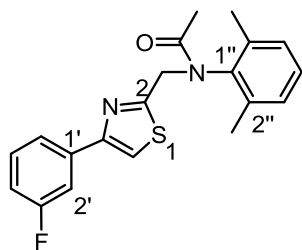
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.53 (s, 2H, H2', H6'), 7.39 (s, 1H, H5), 7.00 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H3'', H5''), 6.98 (s, 1H, H4'), 6.90 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H, H4''), 4.54 (s, 2H, CH₂), 2.39 (s, 6H, 2x CH₃), 2.35 (s, 6H, 2x CH₃).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 170.6 (C), 155.7 (C), 144.8 (C), 138.4 (2x C), 134.4 (C), 130.2 (2x C), 129.9 (CH), 129.1 (2x CH), 124.3 (2x CH), 122.9 (CH), 112.8 (CH), 50.1 (CH₂), 21.5 (2x CH₃), 18.5 (2x CH₃).

IR *v*_{max}: 3363 (NH) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₂₀H₂₂N₂S [M+H]⁺: 323.1504. Obtenida [M+H]⁺:323.1577.

***N*-((4-(3-fluorofenil)thiazol-2-il)metil)-*N*-(2,6-dimetilfenil) acetamida (22a)**



Siguiendo el procedimiento general E, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de un 89% y un punto de fusión de 124-126 °C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.56 (dd, *J* = 7.5, 1.5 Hz, 1H, H6'), 7.48 (m, 1H, H5'), 7.45 (s, 1H, H5), 7.31 (m, 1H, H2'), 7.24 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, H4''), 7.14 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H3'', H5''), 6.99 (m, 1H, H4'), 5.02 (s, 2H, CH₂), 2.02 (s, 6H, 2x CH₃), 1.78 (s, 3H, CH₃).

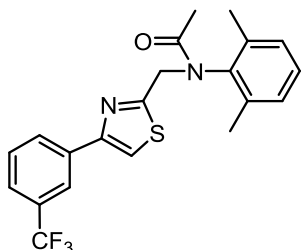
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 170.1 (C), 165.7 (CO), 163.2 (d, *J* = 243.6 Hz, C, C3'), 153.0 (C), 140.7 (C), 136.6 (d, *J* = 6.9Hz, C, C1'), 136.2 (2x C), 130.3 (CH), 129.2 (2x CH), 128.6 (CH), 121.8 (CH), 116.3 (CH), 114.8 (d, *J* = 23.1 Hz, CH), 113.3 (d, *J* = 22.8 Hz, CH), 49.9 (CH₂), 21.5 (CH₃), 18.1 (2x CH₃).

RMN ¹⁹F (282 MHz, CDCl₃): δ: -113.5 (F).

IR ν_{max}: 1655 (C=O) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₂₀H₁₉FN₂OS [M+H]⁺: 355.1202. Obtenida [M+H]⁺:355.1278.

***N*-((4-(3-(trifluorometil)fenil)tiazol-2-il)metil)-*N*-(2,6-dimetilfenil) acetamida (22b)**



Siguiendo el procedimiento general E, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de un 92% y un punto de fusión de 109-111 °C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 8.05 (s.ancho, 1H, H2'), 7.95 (dd, *J* = 7.2, 2.1 Hz, 1H, H6'), 7.57 (s, 1H, H5), 7.48 (m, 2H, H4', H5'), 7.16 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H4''), 7.08(d, *J* = 7.2 Hz, 2H, H3'',

H5''), 5.03 (s, 2H, CH₂), 2.02 (s, 6H, 2x CH₃), 1.79(s, 3H, CH₃).

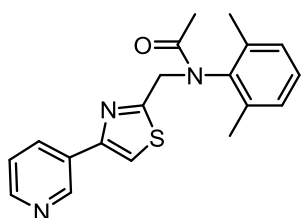
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 171.3 (C), 165.9 (CO), 152.6 (C), 140.6 (C), 136.1(2x C), 135.2 (C), 130.9 (q, *J* = 30.1 Hz, C, C3'), 129.6 (CH), 129.4 (CH), 129.2 (2x CH), 128.6 (CH), 124.5 (q, *J* = 5.6 Hz, CH), 123.9 (q, *J* = 270.8 Hz, C, CF₃), 123.1 (q, *J* = 5.8 Hz, CH), 116.6 (CH), 49.9 (CH₂), 21.5 (CH₃), 18.1 (2x CH₃).

RMN ¹⁹F (282 MHz, CDCl₃): δ: -63.2 (CF₃).

IR ν_{max}: 1648 (C=O) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₂₁H₁₉F₃N₂OS [M+H]⁺: 405.1170. Obtenida [M+H]⁺:405.1241.

***N*-((4-(piridin-3-il)tiazol-2-il)metil)-*N*-(2,6-dimetilfenil) acetamida (22c)**



Siguiendo el procedimiento general E, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de un 99% y un punto de fusión de 143-144 °C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 9.02 (s, 1H, H2'), 8.52 (m, 1H, H4'), 8.01(d, *J* = 7.8 Hz, H6'), 7.58 (s, 1H, H5), 7.30 (m, 1H,

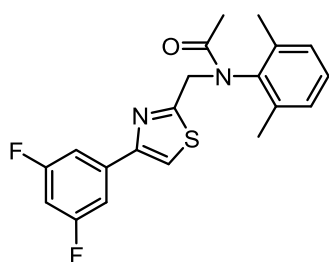
H5'), 7.21 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H4''), 7.02 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H3'', H5''), 5.02 (s, 2H, CH₂), 2.01 (s, 6H, 2x CH₃), 1.80 (s, 3H, CH₃).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 171.3 (C), 166.2 (CO), 151.1 (C), 149.0 (CH), 147.7 (CH), 140.6 (C), 136.1 (2x C), 133.7 (CH), 130.3 (C), 129.3 (2x CH), 128.7 (CH), 123.7 (CH), 116.6 (CH), 49.9 (CH₂), 31.5 (CH₃), 18.5 (2x CH₃).

IR ν_{max}: 1639 (C=O) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₁₉H₁₉N₃OS [M+H]⁺: 338.1249. Obtenida [M+H]⁺:338.1325.

***N*-((4-(3,5-difluorofenil)tiazol-2-il)metil)-*N*-(2,6-dimetilfenil) acetamida (22d)**



Siguiendo el procedimiento general E, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de un 94% y un punto de fusión de 123-125 °C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.53 (s, 1H, H5), 7.30 (m, 2H, H2', H6'), 7.16 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H, H4''), 7.09 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, H3'', H5''), 6.72 (m, 1H, H4'), 5.00 (s, 2H, CH₂), 2.01 (s,

6H, 2x CH₃), 1.79 (s, 3H, CH₃).

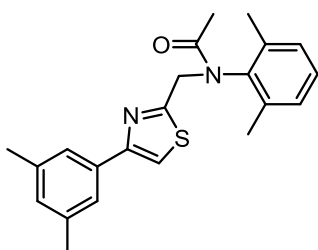
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 171.4 (C), 165.9 (CO), 163.5 (d, *J* = 246.1 Hz, 2x C, C3', C5'), 151.9 (t, *J* = 2.2 Hz, C, C4), 140.6 (C), 137.7 (t, *J* = 6.8 Hz, C, C1'), 136.1 (2x C), 129.3 (2x CH), 128.7 (CH), 117.2 (CH), 109.1 (d, *J* = 26.0 Hz, 2x CH, C2', C6'), 103.3 (t, *J* = 25.3 Hz, CH, C4'), 49.9 (CH₂), 21.5 (CH₃), 18.1 (2x CH₃).

RMN ¹⁹F (282 MHz, CDCl₃): δ: -110.1 (2x F).

IR *v*_{max}: 1646 (C=O) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₂₀H₁₈F₂N₂OS [M+H]⁺: 373.1108. Obtenida [M+H]⁺:373.1183.

***N*-((4-(3,5-dimetilfenil)tiazol-2-il)metil)-*N*-(2,6-dimetilfenil) acetamida (22e)**



Siguiendo el procedimiento general E, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de un 99% y un punto de fusión de 178-180 °C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.45 (s, 1H, H5), 7.40 (s, 2H, H2', H6'), 7.13 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, H4''), 7.08 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, H3'', H5''), 6.95 (s, 1H, H4'), 5.04 (s, 2H, CH₂), 2.33 (s,

6H, 2x CH₃), 2.01 (s, 6H, 2x CH₃), 1.79 (CH₃).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 171.3 (C), 165.3 (CO), 154.5 (C), 140.7 (C), 138.4 (2x C), 136.3 (2x C), 134.4 (C), 129.8 (CH), 129.2 (2x CH), 128.6 (CH), 124.2 (2x CH), 115.3 (CH), 49.9 (CH₂), 21.6 (CH₃), 21.4 (2x CH₃), 18.1 (2x CH₃).

IR *v*_{max}: 1655 (C=O) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₂₂H₂₄N₂OS [M+H]⁺: 365.1609. Obtenida [M+H]⁺:365.1676.

7.- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA

7.- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA

7.1.- ASPECTOS GENERALES

Los compuestos preparados y caracterizados en este capítulo fueron sometidos a ensayos biológicos para determinar su potencial actividad como fármacos antimaláricos. Dichos ensayos se llevaron a cabo en el departamento *Fighting diseases in the developing world* perteneciente a la compañía farmacéutica GSK, con sede en Tres Cantos (Madrid). Los ensayos *in vitro* se realizaron frente a cepas 3D7-A de *Plasmodium falciparum* sensibles a cloroquina (obtenidas del *Malaria Research and Reference Reagent Resource Center MR4*).

7.1.1.- HIGH THROUGHPUT SCREENING (HTS)

Inicialmente se realizó un screening de alto rendimiento para la confección de la base de datos de GSK, empleando un método de evaluación basado en la detección del enzima lactato deshidrogenasa (LDH) como indicador de la inhibición del crecimiento del parásito. Los compuestos se ensayaron frente a cepas de *P. falciparum* sensibles (3D7) y resistentes (Dd2) a múltiples fármacos antimaláricos, mostrando buenos parámetros farmacológicos. Los estudios realizados para llevar a cabo el cribado y la elección del *hit* se encuentran en el apartado correspondiente (Véase apartado 3).

7.1.2.- ENSAYOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Para llevar a cabo los ensayos biológicos de los compuestos preparados se modificó el método de evaluación con respecto al anterior. La actividad antimalárica *in vitro* se evaluó mediante el método de incorporación de hipoxantina tritiada desarrollado por Desjardins y colaboradores en 1979.¹³⁷ Este método radioisotópico permite realizar una medición indirecta de la actividad metabólica del parásito por medio de la incorporación de un precursor de ácidos nucleícos marcado radiactivamente.

El *Plasmodium* no es capaz de sintetizar las purinas que necesita para su replicación, por lo que se ve obligado a obtenerlas de una fuente externa, incorporando así el marcador isotópico en su organismo. De esta manera es posible determinar la incorporación de material genético en el parásito y por lo tanto estimar el grado de regeneración del mismo, siendo la incorporación de hipoxantina marcada proporcional al crecimiento del *P. falciparum*.

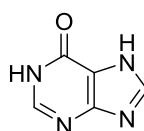


Figura 1.32.- Estructura de la hipoxantina.

¹³⁷ Desjardins, R. E.; Canfield, C. J.; Haynes, J. D.; Chulay, J. D. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1979**, 16, 710-718.

Se ha comprobado recientemente que los ensayos biológicos realizados por el método de incorporación de hipoxantina tritiada o de lactato deshidrogenasa como agentes indicadores de la inhibición del crecimiento del parásito, proporcionan el mismo resultado. La diferencia principal reside en el tiempo requerido por cada uno de ellos: mientras los ensayos con hipoxantina tritiada son siempre a 48 h, los de LDH se suelen hacer a 72 h, lo que implica que los compuestos que son más lentos en actuar (*delayed death phenotype*) pueden mostrarse como inactivos para un ensayo a 48 h, mientras que pueden exhibir una marcada actividad en un ensayo a 72 h.

7.1.3.- METODOLOGÍA GENERAL EMPLEADA

Los cultivos se llevaron a cabo empleando eritrocitos humanos (RBC) de tipo AB, B o A, infectados con la cepa 3D7-A de *P. falciparum* (0.5% de parasitemia, 2% de hematocrito) en medio de cultivo RPMI 1640 (Sigma, Ref. R5886) con 25 mM HEPES y NaHCO₃. Este medio no contiene L-glutamina pero se complementa con una disolución de Albumax que contiene: Albumax II 100 g/L (Gibco, Ref. 11021-037), D-glucosa 40g/L (Sigma, Ref. 68720), L-glutamina 6 g/L (Merck, Ref. 1.00229) e hipoxantina 0.150 mM (Fluka, Ref. 5670).

Se evaluaron nueve concentraciones de cada compuesto, siendo la concentración máxima empleada de 5 µM. Cada concentración se evaluó por triplicado y se prepararon a partir de diluciones seriadas de la solución madre de 200 µM en DMSO de cada uno de ellos. La concentración máxima de DMSO empleada fue de 0.5% (Sigma Ref. D6250), que no es tóxica para el parásito, con lo que no se distorsionarán los resultados obtenidos.

Para los ensayos de actividad se emplearon placas de 96 pocillos (Costar, Ref. 3599) dejando únicamente medio de cultivo como control de crecimiento del parásito y cloroquina como control del tratamiento. Cada placa se trató con hipoxantina 5 µM y se expuso a tres diluciones en serie de cada compuesto. Una vez realizado el tratamiento, las placas se dejaron incubando 24 h a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5%, O₂ 5% y N₂ 90%. Transcurrido este tiempo se adicionó [³H] hipoxantina y se dejaron incubando las placas durante otro periodo de 24 h adicionales. A continuación, las células parasitarias se depositaron sobre un filtro de fibra de vidrio con ayuda de un recolector de células TOMTEC 96 y se determinó la incorporación de hipoxantina tritiada midiendo la radiactividad de la muestra (*Microbeta β-counter Wallac*). Los datos se normalizaron empleando un control positivo (glóbulos rojos parasitados sin fármaco).

Los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados se obtuvieron por interpolación lineal.¹³⁸ La IC₅₀ (concentración que provoca la reducción del crecimiento del parásito en un 50% respecto al control) se determinó utilizando el programa Grafit 7.0.

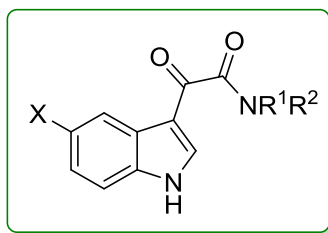
¹³⁸ Huber, W.; Koella, J. C. *Acta tropica* **1993**, 55, 257-261.

$$y = \frac{100\%}{1 + \left(\frac{x}{IC50}\right)^s}$$

Figura 1.33.- Ecuación para la determinación de la IC₅₀.

Los datos de inhibición obtenidos se adaptan a una ecuación de dos parámetros donde el límite inferior es 0 (*background corrected*) y el límite superior es 100 (*range corrected*). En esta ecuación, *s* es la pendiente y se asume que *y* (% de muestra viva) decrece con el incremento de *x* (concentración del fármaco).

7.2.- RESULTADOS BIOLÓGICOS PARA LA FAMILIA DE LOS INDOLES



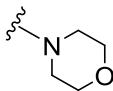
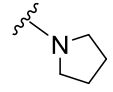
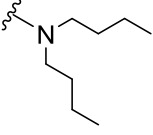
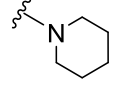
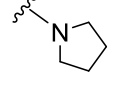
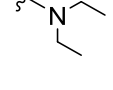
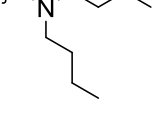
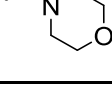
Para esta familia de compuestos se ha sintetizado el *hit* y diferentes derivados del mismo, modificando principalmente los grupos alifáticos presentes en la función oxoacetamida. Además también se sustituyó el átomo de halógeno unido a la posición 5 del anillo de indol tratando de mejorar sus propiedades farmacológicas. De esta manera se trató de evaluar conjuntamente la existencia de impedimento estérico sobre el centro activo de la diana y cómo afecta un aumento de la lipofilia molecular sobre las propiedades biológicas de los compuestos.

El sustrato **3a** (*hit*) fue seleccionado como punto de partida para llevar a cabo los estudios SAR en base a que presentó una gran actividad en el screening inicial realizado (HTS). Se ensayó frente a cepas de *P. falciparum* sensibles y/o resistentes a los fármacos antimaláricos disponibles, presentando un valor de XC_{50} de 81.07 nM en las cepas 3D7. Además se observó que también inhibía el crecimiento del parásito en ambas cepas en un 96% a una concentración de 2 μ M, lo que unido a la baja toxicidad mostrada sobre las células HepG2 (1% de inhibición a una concentración de 10 μ M), representa un comienzo esperanzador para esta familia de sustratos.

En la siguiente tabla se muestran los valores de actividad (IC_{50}) obtenidos para las diferentes oxoacetamidas preparadas derivadas de un esqueleto tipo indol.

Tabla 1.11.- Resultados de actividad biológica para la familia de los indoles.

Compuesto	Masa Molecular (g/mol)	X	-NR ¹ R ²	Actividad (IC_{50} μ M)
3a (<i>hit</i>)	278.08	Cl-		>5
3b	290.08	Cl-		>5
3c	306.11	Cl-		>5

3d	292.06	Cl-		>5
3e	276.06	Cl-		>5
3f	334.14	Cl-		>5
3g	274.11	F-		1.63
3h	260.09	F-		>5
3i	262.11	F-		>5
3j	318.17	F-		>5
3k	276.09	F-		>5

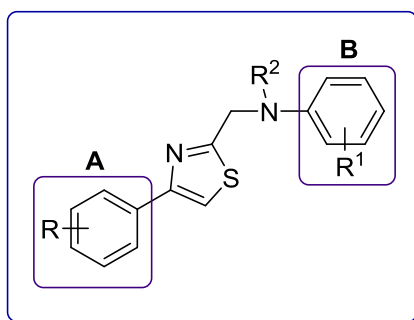
A la vista de los resultados no se observa actividad antimalárica *in vitro* para las moléculas preparadas, incluyendo el *hit* que en el screening inicial mostraba buenos parámetros farmacológicos.

Se han llevado a cabo una serie de estudios para determinar si esta falta de actividad se debe al empleo de diferentes agentes indicadores de la inhibición del crecimiento de parásito (LDH o H³ Hipoxantina), o a un falso positivo en la medición del *screening* inicial (HTS) llevado a cabo con lactato deshidrogenasa.

Como se ha indicado previamente, la empresa GSK ha diseñado una nueva metodología que verifica que los dos ensayos proporcionan exactamente el mismo resultado, por lo que en este caso el *hit* seleccionado resultó ser un falso positivo. Esto no es un hecho común, pero tampoco resulta demasiado extraño teniendo en cuenta que la metodología desarrollada para la selección de los *hits* no es tan detallada y específica como para los ensayos posteriores. Además, al trabajar con cantidades tan pequeñas de compuesto y realizar al mismo tiempo un ensayo tan amplio, las posibilidades de error crecen considerablemente.

Únicamente es posible destacar el compuesto **3g** ($IC_{50}= 1.63 \mu M$) que presenta un valor de IC_{50} menor que el resto de los derivados preparados. No obstante, continúa siendo un valor demasiado elevado y no concluyente, ya que no proporciona información acerca de posibles relaciones estructura-actividad. Por todo ello se decidió abandonar el estudio de esta familia de compuestos para comenzar con el diseño y síntesis de una nueva quimioteca que se espera presente mejores resultados de actividad que los obtenidos hasta el momento.

7.3.- RESULTADOS BIOLÓGICOS PARA LA FAMILIA DE LOS TIAZOLES

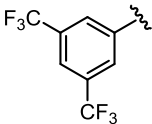
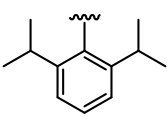
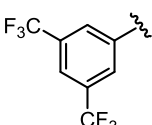
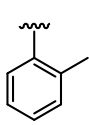
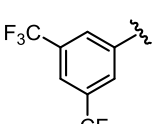
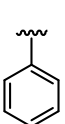
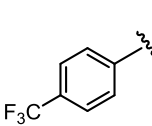
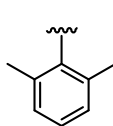
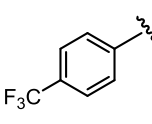
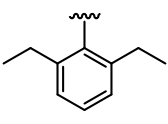
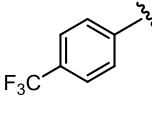
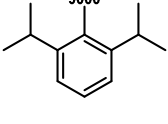
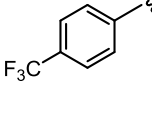
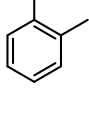
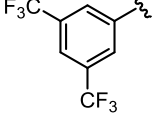
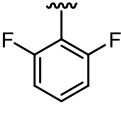
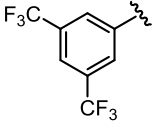
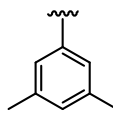
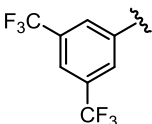
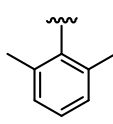


Para esta nueva familia de compuestos se ha sintetizado el *hit* y diferentes derivados del mismo, modificando tanto los sustituyentes del sistema biarílico (anillo A) como los sustituyentes presentes en el fragmento derivado de anilina (anillo B). Además, con el fin de determinar la importancia del grupo acetilo sobre la actividad de los compuestos, se han evaluado diversos análogos con diferente funcionalización sobre el nitrógeno amínico.

El compuesto **12a** (*hit*) fue seleccionado como punto de partida para llevar a cabo los estudios SAR en base a que presentó una gran actividad en el screening inicial realizado (HTS). Se ensayó frente a cepas de *P. falciparum* sensibles y/o resistentes a los fármacos antimaláricos disponibles, presentando un valor de XC_{50} de 406.64 nM en las cepas 3D7. A una concentración de 2 μ M se observó que también inhibía el crecimiento del parásito en un 99% y un 100% en las cepas Dd2 y 3D7 respectivamente, mostrando además una baja toxicidad para las células humanas HepG2 (0% de inhibición a una concentración de 10 μ M). Los valores obtenidos para todos estos parámetros constituyen un comienzo prometedor para esta familia de compuestos. En una primera aproximación se ensayaron los sustratos que se muestran a continuación (Tabla 1.12).

Tabla 1.12.- Resultados de actividad biológica para la familia de los tiazoles.

Compuesto	Masa Molecular (g/mol)	Anillo A	Anillo B	R ²	Actividad (IC ₅₀ μ M)
12a (<i>hit</i>)	472.10			-COCH ₃	0.065
12b	500.14			-COCH ₃	0.39

12c	528.17			-COCH ₃	1.87
12d	458.09			-COCH ₃	0.49
12e	444.07			-COCH ₃	2.14
12f	404.12			-COCH ₃	0.87
12g	432.15			-COCH ₃	0.44
12h	460.18			-COCH ₃	2.82
12i	390.10			-COCH ₃	0.52
12k	480.05			-COCH ₃	0.30
12m	472.10			-COCH ₃	3.60
14	444.11			-CH ₃	>5

A la vista de los resultados se pueden extraer varias conclusiones.

Por un lado, se aprecia levemente una mayor inhibición para aquellos derivados que presentan 2 grupos trifluorometilo (CF₃) en posiciones *meta* del anillo A (**12a-12d**), que para los compuestos que presentan un solo grupo CF₃ en posición *para* del mismo (**12f-12i**).

Esta modificación se realizó en base a que el *hit* presentaba una lipofilia bastante elevada ($\log P = 6.19$), incluso incumpliendo una de las reglas de Lipinsky, por lo que se decidió reducir el valor de este parámetro farmacológico preparando derivados en los que se hubiera eliminado uno de estos grupos.

Por otra parte, se muestra de manera general una correlación inversamente proporcional entre el tamaño de los sustituyentes alifáticos sobre el anillo B y la actividad de los compuestos. En este sentido, se aprecia una significativa reducción en los valores de actividad para los derivados que presentan en su estructura dos grupos isopropilo en posiciones *orto* del citado anillo (**12c** ($IC_{50} = 1.87 \mu M$), **12h** ($IC_{50} = 2.82 \mu M$)).

En relación a este tipo de modificaciones, también se observa una ligera disminución en los valores de actividad con respecto al *hit* para los compuestos en los que se ha suprimido uno de los grupos alifáticos en el anillo B (**12d** ($IC_{50} = 0.49 \mu M$), **12i** ($IC_{50} = 0.52 \mu M$)), aunque se mantienen en unos niveles de actividad aceptables. No obstante, si se eliminan por completo los sustituyentes sobre el mencionado anillo **12e** ($IC_{50} = 2.14 \mu M$), la actividad antimalárica disminuye considerablemente, lo que pone de manifiesto la necesidad de disponer de al menos un grupo metilo en posición *orto* del anillo de anilina. Un caso similar es el del compuesto **12m** ($IC_{50} = 3.60 \mu M$), en el que se ha modificado la posición de los grupos metilo situándose en posiciones 3 y 5 del anillo de anilina. Los ensayos de citotoxicidad realizados reportaron unos valores de actividad inferiores en comparación con los análogos *o*-sustituidos, lo que refuerza la hipótesis planteada.

La mayoría de modificaciones sobre el anillo B implican la participación de grupos alifáticos donadores de electrones. No obstante, de forma adicional también se evaluó el compuesto **12k** ($IC_{50} = 0.30 \mu M$), que presenta dos átomos de F en su estructura. Pese a mostrar una gran actividad antimalárica, el carácter lipofílico de estos derivados es muy elevado y podría resultar excesivo en posteriores ensayos *in vivo*.

Como estudio complementario se evaluaron los compuestos intermedios **10(a-m)** (previos a la reacción de acetilación), en los que el grupo amino no se encontraba funcionalizado. Inicialmente se consideró la posibilidad de que el grupo amino (-NH) pudiera actuar como dador de puentes de hidrógeno mejorando las interacciones del fármaco con el sitio de unión específico en el centro activo de la diana. No obstante, ninguno de los derivados ensayados mostró unos niveles de actividad óptimos ($IC_{50} > 5 \mu M$), por lo que es posible afirmar de manera preliminar, que es necesaria la presencia de grupos aceptores de puentes de hidrógeno (como es el grupo acetilo) para que la unión del fármaco con el centro activo sea más eficaz.

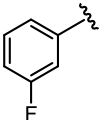
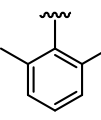
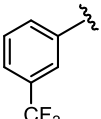
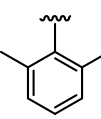
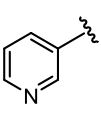
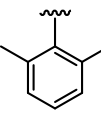
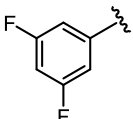
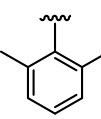
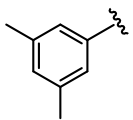
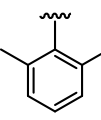
Esta afirmación queda contrastada por los valores de actividad obtenidos para el compuesto **14** ($IC_{50} > 5 \mu M$), que presenta un grupo metilo en lugar de un grupo acetilo, y que al igual que los derivados intermedios anteriores (**10a-10m**) no presenta actividad antimalárica en los ensayos *in vitro* realizados.

Como transformación adicional se evaluaron también los compuestos **13** (4,5-dihidrotiazol) y **16**, en los que se había modificado la parte central de la molécula. Los resultados obtenidos indican que no es conveniente alterar esta parte de la estructura, pues se mostraron inactivos en los ensayos *in vitro* realizados ($IC_{50} > 5 \mu M$).

A continuación se decidió estudiar la influencia de los sustituyentes sobre el sistema biarílico. Para ello se prepararon diferentes derivados del compuesto *hit* modificando únicamente los sustituyentes del anillo A. Se han incorporado tanto grupos atrectores de electrones (F, CF_3 , 3-piridina) como grupos donadores (Me), siendo los primeros los que proporcionaron mejores resultados de actividad, acorde a la estructura del *hit*.

Los valores de IC_{50} obtenidos se muestran a continuación.

Tabla. 1.13.- Resultados de IC_{50} para los nuevos derivados.

Compuesto	Masa Molecular (g/mol)	Anillo A	Anillo B	R ²	Actividad ($IC_{50} \mu M$)
22a	354.12			-COCH ₃	>5
22b	404.12			-COCH ₃	0.40
22c	337.12			-COCH ₃	>5
22d	372.11			-COCH ₃	0.63
22e	364.16			-COCH ₃	2.40

A la vista de los resultados cabe destacar los compuestos **22b** ($IC_{50} = 0.40 \mu M$) y **22d** ($IC_{50} = 0.63 \mu M$), que muestran buenos valores de IC_{50} adecuados para el estudio realizado. Por otra parte, resulta sorprendente que el compuesto **22a** ($IC_{50} > 5 \mu M$) no proporcione unos resultados de actividad similares a los de los compuestos anteriores, lo que pone de manifiesto la necesidad de incluir como mínimo dos átomos de flúor en su estructura.

Algo similar ocurre con el compuesto **22c**, que pese a las expectativas creadas por su estructura novedosa, no proporcionó buenos resultados de actividad ($IC_{50} > 5 \mu M$).

Por último se ensayaron los compuestos intermedios **21a-e** (previos a la reacción de acetilación), que no presentan funcionalización sobre el nitrógeno amínico. Los resultados obtenidos ($IC_{50} > 5 \mu M$) permitieron reafirmar la necesidad de disponer de un grupo acetilo, aceptor de puentes de hidrógeno, como pieza clave para exhibir una buena actividad antimalárica.

Finalmente, aunque ninguno de los análogos evaluados mejora el valor de IC_{50} del *hit* ($IC_{50} = 0.065 \mu M$), la mayoría de ellos presentan buenos valores de actividad, cumplen con las reglas de Lipinski y exhiben unas propiedades farmacológicas adecuadas para convertirse en futuros fármacos frente a esta patología.

7.3.1.- ESTUDIO DE TOXICIDAD DE LOS DERIVADOS OBTENIDOS

Por último se ha llevado a cabo un estudio de toxicidad de los análogos preparados en líneas celulares de procedencia humana, evaluando únicamente aquellos compuestos que presentan mejores valores de actividad.

7.3.1.1.- Metodología general empleada

Este tipo de ensayo se basa en medidas de luminiscencia sobre células hepáticas humanas (HEPG2) y permite cuantificar concentraciones intracelulares de ATP tras ser expuestas a los compuestos seleccionados.¹³⁹

La concentración intracelular de ATP permanece generalmente en unos niveles conocidos, excepto que la salud celular se vea afectada (función mitocondrial), lo que provocaría una disminución apreciable en la concentración de este factor. Para cuantificar dicha concentración se lleva a cabo el protocolo de luciferina comercial, donde la emisión de luz es debida a la presencia de ATP en las muestras celulares. Dado el corto periodo de tratamiento de las células con los compuestos ensayados (24-48 horas), es posible identificar tanto compuestos con toxicidad aguda como aquellos que presenten una acción más prolongada.

Por otra parte, la identificación de alguno de los compuestos como potencialmente tóxicos en posteriores ensayos in vivo no dependerá únicamente de este ensayo, sino también de la dosis terapéutica, de las concentraciones plasmáticas libres, del metabolismo del fármaco y de su mecanismo de excreción. De la misma forma, la carencia de una respuesta positiva en este ensayo no necesariamente significa que el compuesto es inocuo para la salud humana, ya que puede presentar otras dianas celulares o generar metabolitos secundarios tóxicos por descomposición del producto inicial.

¹³⁹ Crouch, S. P. M.; Kozlowski, R.; Slater, K. J.; Fletcher, J. *Journal of Immunological Methods* **1993**, *160*, 81-88.

7.3.1.2.- Resultados obtenidos

Los valores de toxicidad (μM) sobre células hepáticas humanas indican el valor de concentración para el cual dichos compuestos pueden provocar la muerte del 50% de las células tratadas. Por tanto, será preciso considerar aquellos derivados que presenten un valor de IC_{50} mayor para las células HEPG2 (menor citotoxicidad) que para las líneas celulares infectadas con el parásito. De esta manera los sustratos presentarán una mayor selectividad hacia las células infectadas, tratando de no alterar el correcto funcionamiento de las células normales. El valor máximo de concentración es de $100 \mu\text{M}$ debido a una cuestión estándar de solubilidad y a partir de éste, los compuestos se considerarán como no tóxicos en el rango en el que se están evaluando.

Tabla 1.14.- Resultados de toxicidad obtenidos para los derivados ensayados.

Compuesto	Masa Molecular (g/mol)	Toxicidad IC_{50} (μM)
12a (hit)	472.10	3.68
12b	500.14	100
12c	528.17	100
12d	458.09	63.1
12e	444.07	39.8
12f	404.12	25.1
12g	432.15	31.6
12h	460.18	100
12i	390.10	39.8
12k	480.05	39.8
12m	472.10	100
22b	404.12	50.12
22d	372.11	63.1
22e	364.16	39.8

A la vista de los resultados, esta serie no parece tener un claro problema de toxicidad. No obstante, el *hit* sí que presenta un valor bajo de Tox_{50} en comparación con el resto de derivados de esta familia. Aún así, no parece algo asociado a la serie, siendo en este caso compensado con su potencia que permite la existencia de una ventana terapéutica (toxicidad/actividad) aceptable.

8.- CONCLUSIONES

8.- CONCLUSIONES

Del estudio desarrollado en el presente capítulo acerca de **compuestos antimaláricos** se derivan las siguientes conclusiones.

1.- Se han diseñado y sintetizado eficientemente dos librerías de compuestos con potencial actividad antimalárica. Todos los sustratos preparados fueron sometidos a evaluación biológica con el objetivo de determinar su acción farmacológica.

2.- La familia de sustratos con esqueleto tipo indol no presenta actividad antimalárica para los estudios biológicos realizados. Únicamente el sustrato **3g** muestra cierta actividad ($IC_{50} = 1.63 \mu M$), lo cual resulta ser un hecho aislado y no permite extraer una relación concreta de estructura-actividad. Sorprendentemente el *hit* seleccionado no logró reproducir los buenos valores de actividad que mostraba en el ensayo inicial con LDH, lo que sugiere que podría tratarse de un falso positivo derivado del *screening* inicial.

3.-La familia de derivados con esqueleto tipo tiazol muestra buena actividad antimalárica para los ensayos *in vitro* realizados, lo que ha permitido establecer relaciones preliminares de estructura-actividad para esta serie de análogos:

Inicialmente se ha observado la importancia del grupo acetilo sobre el nitrógeno amínico de la molécula para exhibir buenos valores de actividad antimalárica **12a-m**, lo que podría deberse a la capacidad de esta agrupación de actuar como un aceptor de enlaces de hidrógeno. Por otra parte, se ha observado que el aumento del tamaño de los grupos alifáticos presentes en el anillo de anilina produce una considerable disminución de la actividad antimalárica, como se refleja para los compuestos **12c** ($IC_{50} = 1.87 \mu M$) y **12h** ($IC_{50} = 2.82 \mu M$), que presentan grupos isopropilo. La ausencia total de sustituyentes alifáticos en posición *orto* conlleva de igual manera una reducción significativa de la acción antimalárica ejercida (**12e**; $IC_{50} = 2.14 \mu M$ y **12m**; $IC_{50} = 3.60 \mu M$). Adicionalmente, la introducción de diferentes sustituyentes en el sistema biarílico (anillo A) muestra la importancia de disponer al menos de dos átomos de flúor sobre la estructura del compuesto final **22(a-e)**.

De todos los análogos sintetizados, el compuesto que presenta mayor actividad antimalárica es el sustrato **12k**, que contiene dos átomos de F en posición *orto* del anillo de anilina ($IC_{50} = 0.30 \mu M$). No obstante, su elevado carácter lipofílico podría resultar excesivo para posteriores ensayos *in vivo*.

4.- La toxicidad de los derivados de tiazol fue analizada frente a la línea celular HepG2. Esta familia no posee un gran problema de toxicidad, mostrando buenas propiedades farmacológicas, a excepción del *hit* que muestra un valor ligeramente bajo de Tox50. No obstante, dada su elevada potencia (**12a (hit)**; $IC_{50} = 0.065 \mu M$) permite una ventana terapéutica (actividad / toxicidad) aceptable para ejercer su acción farmacológica.

CAPÍTULO II

CAPÍTULO II: DISEÑO, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE ANÁLOGOS DE PRODUCTOS NATURALES CON POTENCIAL ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

1.- INTRODUCCIÓN

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- CANCER: ORIGEN Y DEFINICIÓN

El cáncer no es una única enfermedad, sino un amplio y complejo grupo de enfermedades caracterizado por el crecimiento celular descontrolado y la posterior propagación de dichas células a otros tejidos y partes del cuerpo a través del sistema sanguíneo y linfático.¹⁴⁰ Los diferentes tipos de cánceres se nombran en función del órgano o célula donde se originaron.

El cáncer se produce por diversas causas que incluyen en su mayoría mutaciones genéticas. Estudios poblacionales acerca de esta patología indican que más del 85% de los casos no presentan una componente hereditaria, sino que son causados por factores externos tales como agentes químicos, radiación, infecciones, tabaquismo, etc. Además presentan también gran relevancia aspectos cotidianos como son la dieta, el alcohol, el grado de actividad física o el entorno de vida.¹⁴¹

Desde el punto de vista biológico, el proceso se inicia con una célula somática cuya capacidad reproductora sufre un cambio genético de tal naturaleza, que la hace mucho menos sensible a los factores que controlan las poblaciones celulares en el organismo. Ello hace que en condiciones favorables se reproduzcan y multipliquen de manera casi ilimitada (hiperplasia). Como el crecimiento de estas células no está sujeto a ningún control, no alcanzan una estructura especializada, por lo que suelen ser funcionalmente inactivas. Tras sucesivas mutaciones se incrementa la tendencia de las células a dividirse, con lo que adquieren cada vez una apariencia más anormal (displasia). Cuando tanto la apariencia como el crecimiento de las células es totalmente anómalo y éstas continúan todavía en el interior de su tejido de origen, se habla de cáncer *in situ*. En cambio, cuando las células afectadas son capaces de invadir vasos sanguíneos y tejidos circundantes se dice que el tumor es maligno o invasivo, pudiéndose establecer nuevos focos en diversas localizaciones del organismo. Este fenómeno se conoce con el nombre de *metástasis*.

Dado que el cambio que transforma una célula normal en una célula cancerosa es de tipo genético, la célula cancerosa transmite dichas características a su descendencia. De ahí surge la imperiosa necesidad de encontrar fármacos capaces de impedir o retrasar la proliferación descontrolada de células cancerosas, antes de que se inicie la etapa de metástasis.¹⁴²

¹⁴⁰ (a) Boyle, F. T. et al. *Chem. Soc. Rev.* **1998**, 27, 251-261. (b) Gibbs, J. B. *Science* **2000**, 287, 1969-1973.

¹⁴¹ Instituto nacional del cáncer de EEUU (NCI): www.cancer.gov.

¹⁴² (a) Srivastva, V.; Negi, A. S.; Kumar, J. K.; Gupta, M. M.; Khanuja, S. P. S. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 5892-5908. (b) Banerjee, S.; Wang, Z.; Mohammad, M.; Sarkar, F. H.; Mohammad, R. M. *J. Nat. Prod.* **2008**, 71, 492-496. (c) Tan, L. T. *Appl. Phycol.* **2010**, 22, 659-676.

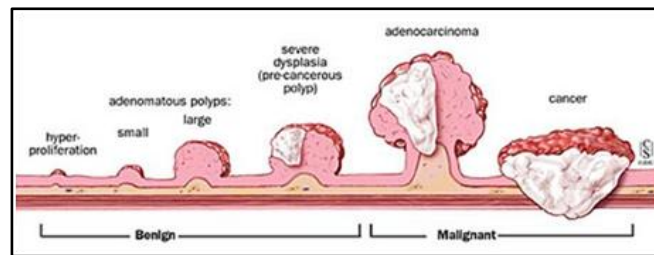


Figura 2.1.- Etapas en el desarrollo de un tumor.¹⁴³

Dada la complejidad del proceso no existe ningún compuesto que por sí sólo pueda producir una acción farmacológica en todos los tipos de cáncer, razón por la cual el tratamiento de dicha enfermedad reclama un enfoque múltiple, con un conocimiento profundo a nivel molecular.¹⁴⁰

1.2.- TRATAMIENTOS CONTRA EL CANCER

Los tratamientos que proporcionan en general mejores resultados en la lucha contra el cáncer son principalmente la cirugía, la quimioterapia (uso de fármacos) y la radioterapia (uso de partículas y de ondas electromagnéticas). Hay que resaltar con mayor énfasis el caso de la quimioterapia dirigida, que emplea fármacos para actuar selectivamente sobre procesos específicos que se desarrollan en las células tumorales, sin afectar al correcto funcionamiento de las células normales.

En el año 2000, Hanahan y Weinberg propusieron que todos los cánceres comparten una serie de rasgos y características comunes (“*hallmarks*”) que rigen el proceso de transformación de células normales en células cancerosas. Los mismos autores publicaron años más tarde otro trabajo con el mismo enfoque general pero incluyendo varias características adicionales.¹⁴⁴ Según ellos, las células cancerosas:

- 1) Estimulan su propio crecimiento.
- 2) No se ven afectadas por las señales inhibitorias que detendrían su desarrollo.
- 3) No sufren muerte celular programada (apoptosis).
- 4) Favorecen el crecimiento de vasos sanguíneos alrededor del tumor (angiogénesis).
- 5) Pueden multiplicarse de manera ilimitada.
- 6) Invaden el tejido local y pueden expandirse a otros tejidos distantes (metástasis).
- 7) Presentan vías metabólicas anormales.
- 8) Evaden al propio sistema inmune.
- 9) Presentan inestabilidad genómica y muestran mutaciones.
- 10) Muestran cierta inflamación promovida por el tumor.

¹⁴³ Davis, D.; Lahiri, S. S. *Cancer Res. J.* **2015**, 3, 76-93.

¹⁴⁴ a) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. *Cell* **2000**, 100, 57-70. b) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. *Cell* **2011**, 144, 646-674.

Todas estas características pertenecen a rasgos específicos presentes únicamente en células tumorales y por tanto pueden ser empleados como objetivos de la terapia. La figura 2.2 muestra las características anteriores junto a la vía terapéutica interpuesta para tratar este rasgo patológico.

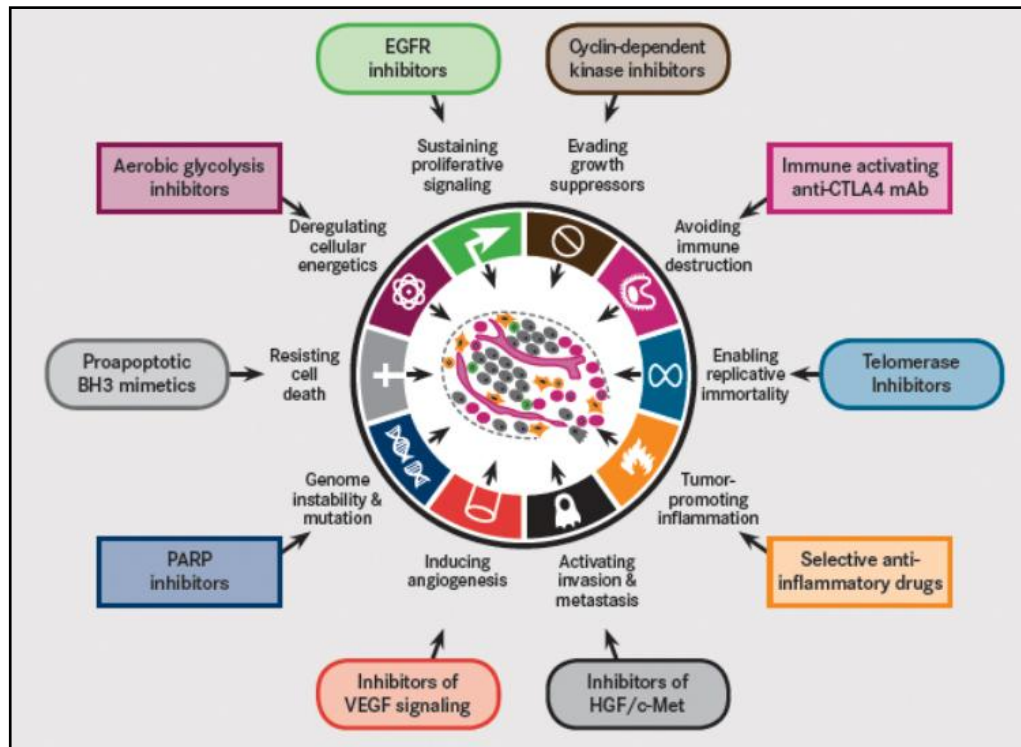


Figura 2.2.- Dianas terapéuticas asociadas a estas características celulares y posibles tratamientos.¹⁴⁴

Ahora bien, dada su elevada complejidad, el tratamiento contra el cáncer requiere abordar la enfermedad a través de varias líneas de ataque simultáneamente para lograr obtener resultados satisfactorios. De esta manera y en base al desarrollo biológico que se realiza en nuestro grupo de investigación, se estudiarán compuestos que presenten propiedades **antimitóticas**, **antiangiogénicas** e **inhibidoras del enzima telomerasa**.

1.2.1.- INHIBICIÓN DE LA MITOSIS CELULAR

Como ya se ha comentado previamente, uno de los mayores inconvenientes de esta enfermedad es la constante proliferación que muestran las células tumorales. Causa de ello, una estrategia razonable consistiría en inhibir este proceso de división celular paralizando el mismo en la etapa de mitosis, mediante el uso de compuestos antimitóticos.

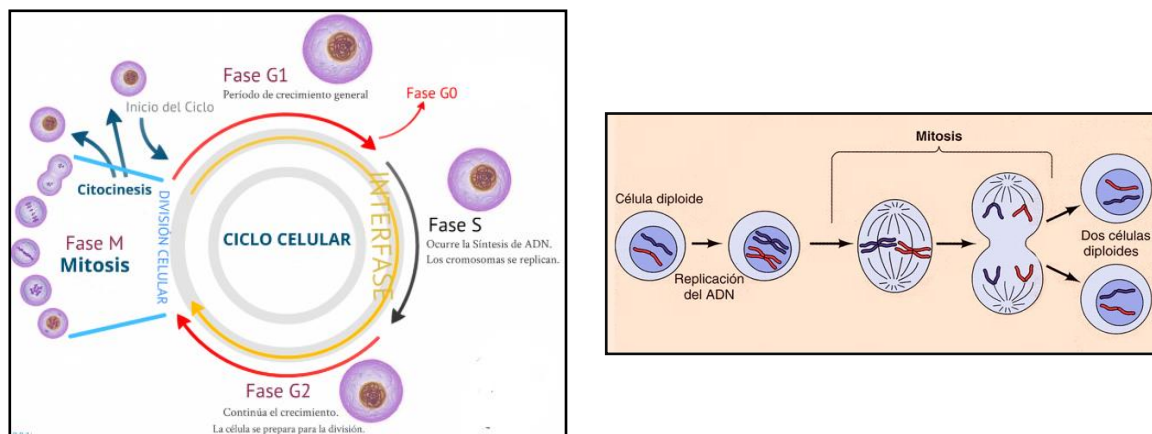


Figura 2.3.- Fases del ciclo celular y del proceso de división.¹⁴⁵

El ciclo celular consta de dos etapas (Figura 2.3), la interfase y la fase mitótica. Durante la interfase (fases G1, S, G2), la célula se prepara para el proceso de división celular, realizando sus funciones específicas y dando comienzo al proceso de duplicación del ADN. En la fase mitótica se produce la división de la célula progenitora en dos células hijas, genéticamente idénticas.

En esta fase se produce la mitosis, en la que los cromosomas del núcleo se separan en dos conjuntos equivalentes y la citoquinesis, en la que se produce la división del citoplasma, de los orgánulos y de la membrana celular, dando origen a las dos células hijas. En el proceso de mitosis, la separación de los cromosomas tiene lugar gracias a la formación del huso mitótico. Se trata de un conjunto de protofilamentos, llamados microtúbulos, que se extienden por todo el citoplasma realizando diversas funciones motoras, de transporte y siendo esenciales para la división celular. Estos microtúbulos se forman a su vez mediante la polimerización de la tubulina, una proteína heterodimérica cuya estructura cuaternaria resulta de la asociación de dos subunidades proteicas ligeramente diferentes, llamadas α -tubulina y β -tubulina.

Los microtúbulos permanecen en un estado que se conoce como inestabilidad dinámica, una continua polimerización y despolimerización de los mismos, provocada por la interacción entre GTP y las subunidades de tubulina.¹⁴⁶ Si determinadas sustancias son capaces de interaccionar con tubulina, afectando a sus propiedades de unión e impidiendo que se mantenga esta inestabilidad dinámica, podrán inhibir la fase de mitosis provocando en muchos casos la apoptosis o muerte celular.¹⁴⁷ Estos compuestos se califican como antimitóticos.¹⁴⁸

¹⁴⁵ Cooper, G. M.; Housman, R. E. *La Célula*, 6ª Ed. Marbán, **2014**.

¹⁴⁶ Alberts, B.; Bray, D.; Hopkins, K.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Introducción a la biología celular*, 2ª Ed. Médica Panamericana, **2006**.

¹⁴⁷ a) Portt, L.; Norman, G.; Clapp, C.; Greenwood, M.; Greenwood, M. T. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1813*, 238-259. b) Torres-Andón, F.; Fadeel, B. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 733-742.

¹⁴⁸ Pinney, K. G.; Mejia, M. P.; Villalobos, V. M.; Rosenquist, B. E.; Pettit, G. R.; Verdier-Pinard, P.; Hamel, E. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 2417-2425.

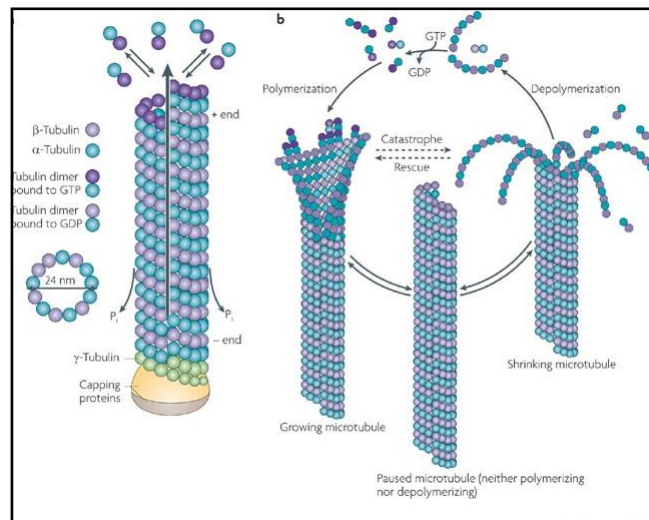


Figura 2.4.- Dinámica de microtúbulos.¹⁴⁹

1.2.2.- INHIBICIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS

Otro tipo de estrategia terapéutica en la lucha contra el cáncer es el empleo de compuestos con acción sobre el sistema vascular, bien porque inhiben la formación de nuevos vasos sanguíneos que nutren al tumor (agentes antiangiogénicos) o bien porque destruyen los vasos sanguíneos ya existentes (agentes antivascuales).¹⁵⁰ Ello se basa en el hecho de que, al igual que los tejidos normales, los tumores también crean durante su desarrollo su propia red de vasos sanguíneos para abastecer la demanda de nutrientes y oxígeno necesarios, proceso conocido como angiogénesis. Este proceso promueve tanto el crecimiento tumoral *in situ* como la propagación de la enfermedad, ya que abre una vía para que las células tumorales se expandan a otras partes del cuerpo a través del sistema sanguíneo y linfático (metástasis).

Por consiguiente, el control de este fenómeno permitiría regular las vías de acceso al tumor, posibilitando su aislamiento e induciendo la apoptosis de las células defectuosas.

La angiogénesis es un proceso muy complejo que involucra la participación de muchos factores.¹⁵¹ Uno de éstos es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que juega un papel esencial en el control de este tipo de fenómeno, facilitando la supervivencia, proliferación y migración de las células endoteliales y al mismo tiempo incrementando la permeabilidad vascular.¹⁵² Este factor viaja hasta las células endoteliales vasculares, donde se une a unos receptores específicos (VEGFR) que poseen actividad tirosina quinasa y se encargan de activar una cascada de señalización que da comienzo al proceso.

¹⁴⁹ <http://www.nature.com/scitable/topicpage/microtubules-and-filaments>. (consultada diciembre 2016).

¹⁵⁰ Folkman, J. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2007**, 6, 273-286.

¹⁵¹ Carmeliet, P.; Jain, R. K. *Nature* **2011**, 473, 298-307.

¹⁵² Moghaddam, S. M.; Amini, A.; Morris, D. L.; Pourgholami, M. H. *Cancer Metastasis Rev.* **2012**, 31, 143-162.

Dentro de la familia de los VEGF existen diferentes tipos de factores (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-E) y distintas isoformas de cada uno de ellos. Además, existen también diversos tipos de receptores (VEGFR), como VEGFR-1, VEGFR-2 o VEGFR-3.

Se ha descubierto recientemente que se da una sobreexpresión de VEGF¹⁵³ en varios tipos de tumores y que la activación de ciertos receptores específicos por la unión de este factor, acrecienta su desarrollo y proliferación, incrementando la agresividad del tumor. Por tanto, dada la gran importancia de la angiogénesis en el desarrollo de esta enfermedad, el VEGF y sus receptores específicos (VEGFR) se han convertido en importantes dianas moleculares para su tratamiento.^{154,155}

A continuación se muestra un esquema del proceso de angiogénesis en el que se incluyen las diferentes dianas moleculares susceptibles de ser atacadas para controlar y regular este fenómeno.

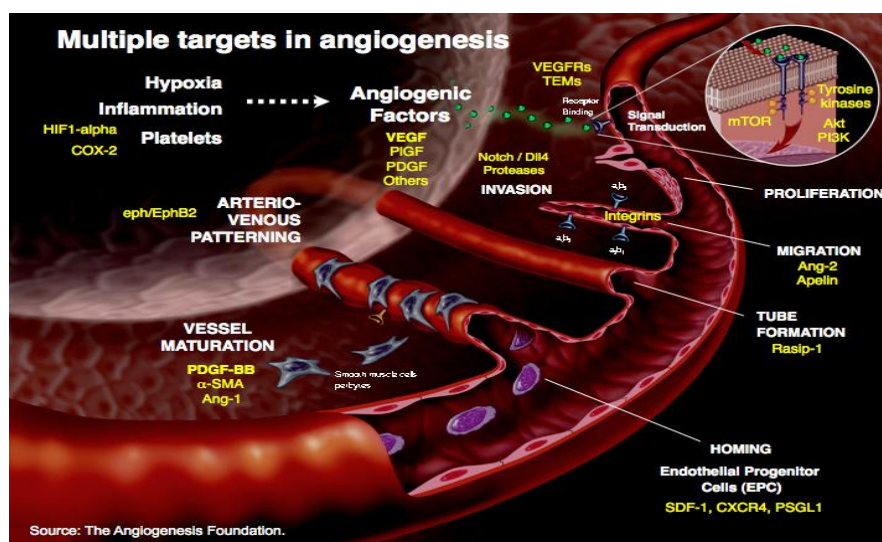


Figura. 2.5.- Esquema del proceso de angiogénesis.

1.2.3.- INHIBICIÓN DE LA ENZIMA TELOMERASA

La tercera estrategia terapéutica involucra a los telómeros cromosómicos, zonas terminales de los cromosomas, que debido a su especial estructura son reconocidas como dominios funcionales de los mismos. Son los responsables de mantener la integridad funcional del ADN, protegiendo a los cromosomas del ataque de las exonucleasas y evitando que se produzcan fusiones espontáneas de sus extremos.

¹⁵³ Harmey, J. H. *VEGF and Cancer*. Landes Bioscience, Kluwer Academic Plenum Publishers. Georgetown, Texas, 2004.

¹⁵⁴ a) Albini, A.; Tosetti, F.; Li, V. W.; Noonan, D. M.; Li, W. W. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2012**, *9*, 498-509. b) Kerbel, R.; Folkman, J. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 727-739. c) Potente, M.; Gerhardt, H.; Carmeliet, P. *Cell* **2011**, *146*, 873-887.

¹⁵⁵ a) Linkous, A. G.; Yazlovitskaya, E. M. *Anticancer Res.* **2012**, *32*, 1-12. b) De Bock, K.; Mazzone, M.; Carmeliet, P. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2011**, *8*, 393-404. c) Moserle, L.; Jiménez-Valerio, G.; Casanovas, O. *Cancer Discov.* **2014**, *4*, 31-41.

Para cumplir con esta misión, una cantidad determinada de secuencias repetitivas de ADN (telómeros) tiene que ser continuamente añadida a dichos extremos, tarea que lleva a cabo un tipo especial de complejo ribonucleoproteínico denominado telomerasa, un enzima con actividad de transcriptasa reversa. La expresión de este enzima está muy restringida o incluso anulada en células humanas normales, razón por la cual los telómeros se van acortando de manera progresiva durante la vida de la célula.¹⁵⁶ Esto desencadena una respuesta de daño al ADN que culmina en senescencia celular o en apoptosis.

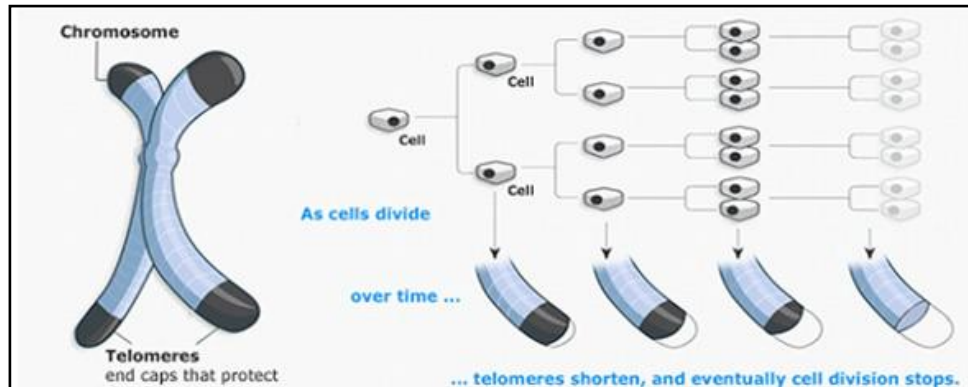


Figura 2.6.- Acortamiento de los telómeros.

Cabe mencionar que se ha detectado la presencia de telomerasa en el 90% de los tumores malignos. Ello mantiene intacta la longitud de los telómeros cromosómicos, volviendo inmortales a las células cancerosas. Eso explica que la actividad de esta enzima esté muy ligada a la malignidad de algunos tipos de cáncer, lo cual convierte a la telomerasa en una diana terapéutica muy atractiva a la hora de diseñar o descubrir nuevos fármacos antitumorales.¹⁵⁷

A la hora de llevar a cabo ensayos biológicos representativos de los nuevos compuestos, es posible emplear la parte proteica de la enzima telomerasa (hTERT) como factor de control. De esta forma se podrá determinar si la enzima se encuentra o no en funcionamiento, puesto que su actividad quedará restringida a aquellas células en las que la telomerasa esté activa. Se ha observado además una estrecha correlación entre la actividad de esta enzima y la expresión del gen *c-Myc*, por lo que también se podrá emplear este último gen como parámetro de control,¹⁵⁸ dado que regula la expresión del gen *hTERT*.

¹⁵⁶ Shay, J. W.; Wright, W. E. *Semin. Cancer Biol.* **2011**, *21*, 349-353.

¹⁵⁷ a) Corey, D. R. *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 1219-1223. b) Buseman, C. M.; Wright, W. E.; Shay, J. W. *Mut. Res.* **2012**, *730*, 90-97. c) Philippi, C.; Loretz, B.; Schaefer, U. F.; Lehr, C. M. *J. Contr. Release* **2010**, *146*, 228-240.

¹⁵⁸ a) Albiñ, A.; Johnsen, J. I.; Henriksson, M. A. *Adv. Cancer Res.* **2010**, *107*, 163-224. b) Chen, B. J.; Wu, Y. L.; Tanaka, Y.; Zhang, W. *Int. J. Biol. Sci.* **2014**, *10*, 1084-1096. c) Huang, H.; Weng, H.; Zhou, H.; Qu, L. *Curr. Pharm. Des.* **2014**, *20*, 6543-6554.

1.3.- ANTECEDENTES

Existen gran diversidad de compuestos tanto de origen natural como no natural que muestran buenas propiedades en terapias anticancerígenas. El estudio se centrará principalmente en los tres tipos de actividad antes mencionados.

1.3.1- COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIMITÓTICA

La mayoría de compuestos con dichas propiedades muestran la capacidad inherente de estabilizar los microtúbulos o bien de interrumpir la formación de los mismos, debiéndose estas dos clases de efectos principalmente a interacciones con la subunidad de β -tubulina.

Entre los productos naturales conocidos que inhiben la formación de microtúbulos, cabe destacar la colquicina, la podofilotoxina y la vinblastina. A pesar de sus estructuras marcadamente diferentes, todos estos productos comparten la capacidad de interactuar específicamente con β -tubulina, impidiendo la polimerización de los microtúbulos o bien causando la disrupción de los mismos.¹⁵⁹ En la siguiente figura se muestra la estructura de estos derivados (Figura 2.7).

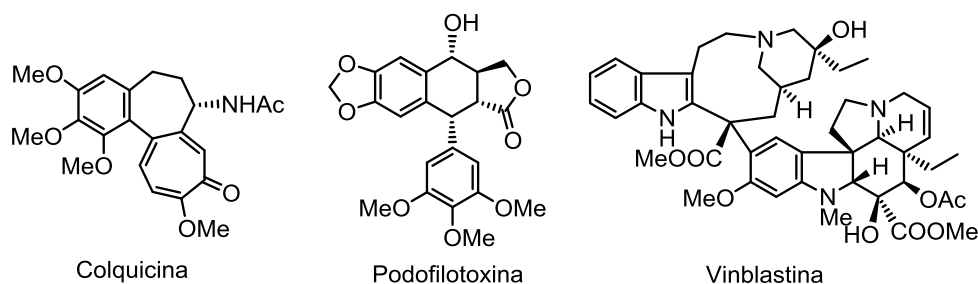


Figura 2.7.- Estructura de productos naturales que inhiben la formación de los microtúbulos.

Existe otro producto natural que presenta gran actividad como agente anticancerígeno, el Taxol® (paclitaxel). Es un compuesto aislado de la corteza del tejo del Pacífico (*Taxus brevifolia*) que fue descubierto en 1971 por Wall y Wani,¹⁶⁰ estando actualmente incorporado a la farmacología clínica. Un derivado semisintético del taxol es el docetaxel, que está asimismo aprobado para su uso clínico.

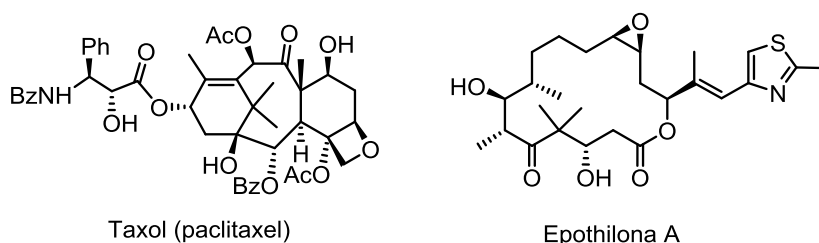


Figura 2.8.- Estructura de compuestos estabilizadores de microtúbulos.

¹⁵⁹ Chen, S. M.; Meng, L. H.; Ding, J. *Expert. Opin. Invest. Drugs* **2010**, *19*, 329-343.

¹⁶⁰ Wani, M. C.; Taylor, H. L.; Wall, M. E.; Coggon, P.; McPhail, A. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2325-2327.

Además de su peculiar estructura molecular, el compuesto atrajo la atención de los farmacólogos por su capacidad de estabilizar los microtúbulos del huso mitótico, una característica biológica desconocida hasta ese momento.¹⁶¹ Actualmente se han encontrado otros productos naturales que comparten esta característica, como son por ejemplo las epotilonas y otros tipos de macrólidos^{162,163} (Figura 2.8). A pesar de sus diferencias estructurales, estos sustratos provocan la estabilización de los microtúbulos mediante la unión a sitios específicos en la subunidad de β -tubulina,¹⁶⁴ dando lugar con ello al bloqueo del proceso de división celular.

Hasta ahora se han contemplado únicamente aquellos compuestos que actúan sobre la subunidad de β -tubulina, puesto que constituyen la mayoría. No obstante, existen también otro tipo de estructuras que interactúan específicamente con la subunidad α de la tubulina (Figura 2.9). El único ejemplo conocido hasta la fecha de un producto natural con tal propiedad es la dihidropirona pironetina, que actúa como un disruptor de microtúbulos.¹⁶⁵

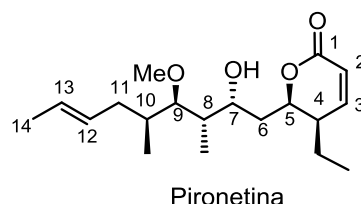


Figura 2.9.-Pironetina, único compuesto conocido que actúa sobre la subunidad α de tubulina.

1.3.2.- COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIANGIOGÉNICA

Se han encontrado muchos compuestos naturales y no naturales capaces de ejercer un efecto antitumoral mediante la inhibición del proceso de angiogénesis. Estos sustratos pertenecen a diferentes tipos estructurales, pero nuestra discusión se centrará aquí en los que presentan un fragmento de estilbeno (*cis* o *trans* 1,2-difeniletieno) (Figura 2.10). A pesar de que el estilbeno en sí mismo no es un producto natural, derivados polioxigenados han sido aislados en numerosas ocasiones a partir de diversas fuentes vegetales.¹⁶⁶ Esta clase estructural comenzó a despertar interés farmacológico cuando fueron descubiertas las propiedades medicinales del resveratrol (*trans*-3,4',5-trihidroxiestilbeno).^{167, 168}

¹⁶¹ Schiff, P. B.; Fant, J.; Horwitz, S. B. *Nature* **1979**, *277*, 665-667.

¹⁶² a) Rivkin, A.; Chou, T. C.; Danishefsky, S. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2838-2850. b) Altmann, K. H.; Pfeiffer, B.; Arsenyadis, S.; Pratt, B. A.; Nicolaou, K. C. *Chem. Med. Chem.* **2007**, *2*, 396-423.

¹⁶³ Mulzer, J.; Öhler, E. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 3753-3786.

¹⁶⁴ a) Jiménez-Barbero, J.; Amat-Guerri, F.; Snyder, J. P. *Curr. Med. Chem.* **2002**, *2*, 91-122. b) Abal, M.; Andreu, J. M.; Barasoain, I. *Curr. Cancer. Drug. Targ.* **2003**, *3*, 193-203. c) Bergstralh, D. T.; Ting, J. P. Y. *Cancer Treatm. Rev.* **2006**, *32*, 166-179.

¹⁶⁵ Sarabia, F.; García-Castro, M.; Sánchez-Ruiz, A. *Curr. Bioact. Compd.* **2006**, *2*, 269-299.

¹⁶⁶ Shen, T.; Wang, X. N.; Lou, H. X. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 916-935.

¹⁶⁷ a) Brisdelli, F.; D'Andrea, G.; Bozzi, A. *Curr. Drug. Metab.* **2009**, *10*, 530-546. b) Tyagi, S.; Singh, G.; Sharma, A.; Aggarwal, G. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* **2010**, *3*, 49-52. c) Kroon, P. A.; Iyer, A.; Chunduri, P.; Chan, V.; Brown, L. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 2442-2455.

Se trata de un polifenol natural que fue aislado por primera vez del elébore blanco (*Veratrum grandiflorum* O. Loes), aunque posteriormente se ha encontrado en más de 70 especies vegetales.¹⁶⁹

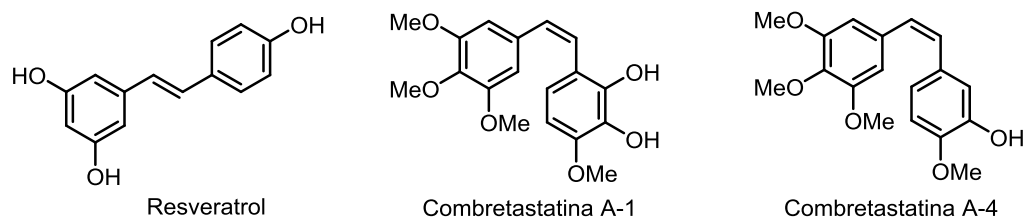


Figura 2.10.- Derivados de estilbenos con propiedades antiangiogénicas.

Aunque su diana molecular sigue siendo desconocida, se sabe que el resveratrol posee efectos beneficiosos para la salud humana, con propiedades antiinfecciosas, antioxidantes y cardioprotectoras. Además, estudios recientes han demostrado que este compuesto posee también efectos quimiopreventivos y quimioterapéuticos, presentando asimismo propiedades antimitóticas, antiangiogénicas y antitelomerasa. En lo que se refiere a las propiedades antiangiogénicas, el resveratrol inhibe la proliferación y migración de las células endoteliales así como la formación de nuevos capilares, dificultando la progresión del ciclo celular. Además, inhibe la expresión del factor VEGF, obstaculiza la unión de este factor a las células endoteliales y dificulta el acoplamiento entre estas células y ciertas metaloproteinasas.¹⁷⁰

Dentro de la clase de los derivados *cis*-estilbénicos, los análogos de combretastatina representan un grupo particularmente interesante (Figura 2.10). Estos sustratos presentan unas propiedades farmacológicas bien documentadas¹⁷¹ y exhiben entre otras una gran capacidad antiangiogénica, medible mediante la determinación de la capacidad de inhibir la expresión del VEGF o mediante la capacidad de inhibir la transcripción del gen correspondiente.

1.3.3 COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTITELOMERASA

No son muchos los casos conocidos acerca de compuestos de esta naturaleza, como tampoco son todavía muchos los grupos de investigación que trabajan de manera sistemática en este campo.

¹⁶⁸ a) Kraft, T. E.; Parisotto, D.; Schempp, C.; Efferth, T. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* **2009**, *49*, 782-799. b) Das, D. K.; Mukherjee, S.; Ray, D. *Heart Failure Rev.* **2010**, *15*, 467-477.

¹⁶⁹ Albert, S.; Horbach, R.; Deising, H. B.; Siewert, B.; Csuk, R. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 5155-5166.

¹⁷⁰ Martí-Centelles, R.; Falomir, E.; Murga, J.; Carda, M.; Marco, J. A. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 3010-3015.

¹⁷¹ Torijano-Gutiérrez, S.; Díaz-Oltra, S.; Falomir, E.; Murga, J.; Carda, M.; Marco, J. A. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 7267-7274.

No obstante, gracias al estudio desarrollado por varias entidades y equipos de investigación,^{172,173,174,175} se conocen varios ejemplos de compuestos con esta particular actividad biológica (Figura 2.11).

Los inhibidores que afectan a la actividad del enzima telomerasa presentan estructuras diversas y pueden ejercer su acción frente a diferentes dianas moleculares, produciendo en la mayoría de los casos un visible efecto antitumoral. Entre las diferentes terapias antitelomerasa es posible destacar el empleo de agentes perturbadores de telómeros, el empleo de inhibidores de la propia enzima, inmunoterapia hTERT y terapia génica suicida.

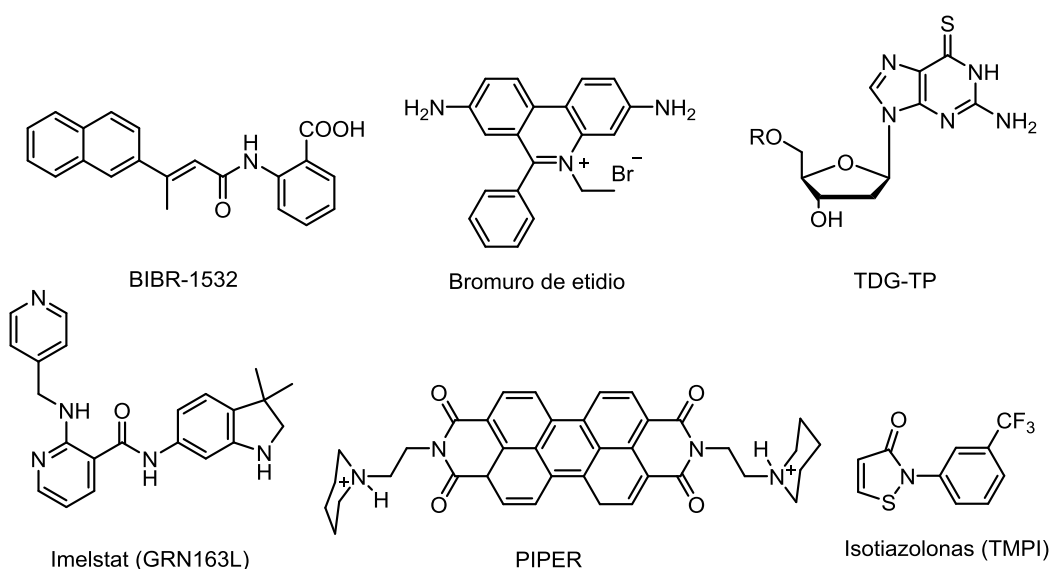


Figura 2.11.- Compuestos que presentan acción antitelomerasa.

Dada la dificultad de combatir las patologías cancerígenas debido a la aparición de resistencia frente a los fármacos actualmente disponibles,^{176,177,178} surge continuamente la necesidad de desarrollar nuevos compuestos bioactivos capaces de solventar estos problemas. Esto constituye un objetivo muy importante a largo plazo para las áreas de la química, de la farmacología y de la biología, cuya cooperación y asociación serán esenciales para asegurar un continuo desarrollo de fármacos antitumorales.

¹⁷² Bernardes de Jesus, B.; Blasco, M. A. *Trends Genet.* **2013**, *29*, 513-520.

¹⁷³ Mergny, J. L.; Riou, J. F.; Mailliet, P.; Teulade, M. P.; Gilson, E. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *4*, 839-865.

¹⁷⁴ EU Patt. ES2202206 T3, *Derivados de arilamina y su aplicación como agentes antitelomerasa*, **2002**.

¹⁷⁵ Marian, C. O. et al. *Clin. Can. Research* **2010**, *16*, 154-163.

¹⁷⁶ Holohan, C.; Schaeysbroeck, S. V.; Longley, D. B.; Johnston, P. G. *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 714-726.

¹⁷⁷ a) Reichardt, P. *Curr. Oncol. Rep.* **2008**, *10*, 344-349. b) Jahangiri, A.; Aghi, M. K.; Carbonell, W. S. *Cancer Res.* **2014**, *74*, 3-7.

¹⁷⁸ Bechter, O. E.; Zou, Y.; Walker, W.; Wright, W. E.; Shay, J. W. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 3444-3451.

2.- OBJETIVOS GENERALES

2.- OBJETIVOS GENERALES

1.- Síntesis de nuevos tipos de moléculas farmacológicamente activas frente a procesos cancerígenos, con estructuras que han sido diseñadas a partir de diversos productos naturales específicos.

2.- Evaluación biológica de los compuestos obtenidos, atendiendo a las tres líneas de estudio que son objeto de nuestra investigación.

- Citotoxicidad debida a alteración de los microtúbulos durante el proceso de división celular.

- Inhibición del proceso de angiogénesis debido a influencia en la expresión del VEGF o de su gen asociado.

- Inhibición del enzima telomerasa, que da lugar al bloqueo de la regeneración continuada de los telómeros cromosómicos.

3.- Reevaluación y rediseño de las estructuras objetivo, en función de los resultados obtenidos en las evaluaciones biológicas y de los estudios estructurales realizados.

3.- ELECCIÓN DEL HIT

3.- TRABAJO PREVIO: ELECCIÓN DEL HIT

La trayectoria previa de nuestro grupo de investigación en el desarrollo de análogos de productos naturales nos ha llevado a seleccionar dos sustratos de partida que dadas sus buenas propiedades antitumorales, han llamado particularmente nuestra atención: colquicina y combretastatina A-4. El núcleo del presente proyecto se va a centrar en las estructuras de estos dos sustratos, con el objetivo de preparar una quimioteca de análogos de los mismos y estudiar posteriormente tanto su actividad farmacológica como su mecanismo de acción.

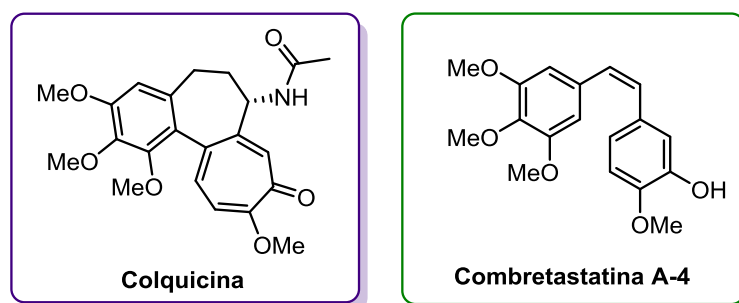


Figura 2.12.- Estructura de los productos naturales escogidos como compuestos de partida.

3.1.- FAMILIA DE DERIVADOS DE COLQUICINA

Este producto natural llamó particularmente nuestra atención debido a que pese a ser un compuesto conocido desde la antigüedad para el tratamiento de la gota, presenta otras características y funciones medicinales no tan claramente establecidas. Una de éstas es su potencial uso en la terapia anticancerígena. Se trata de un fármaco antimitótico capaz de inhibir la división celular en la etapa de metafase o anafase, causando la despolimerización de la tubulina y provocando la muerte celular o apoptosis. Sin embargo, dada su elevada toxicidad que afecta de forma agresiva a los tejidos y células normales,¹⁷⁹ su uso en la terapia anticancerígena ha quedado muy restringido.

Recientemente nuestro grupo de investigación ha publicado dos artículos en los que se muestran las propiedades biológicas de una serie de análogos sintéticos de colquicina, incluyendo no sólo su citotoxicidad, sino también su capacidad para inhibir la expresión de ciertos genes relacionados con el proceso de angiogénesis y con la inhibición del enzima telomerasa.¹⁸⁰ Estas nuevas propiedades recientemente descubiertas han hecho que la colquicina vuelva a ser considerada potencialmente como un fármaco de aplicación en los tratamientos contra el cáncer.

¹⁷⁹ Finkelstein, Y.; Aks, S. E.; Hutson, J. R.; Juurlink, D. N.; Nguyen, P.; Dubnov-Raz, G.; Pollak, U.; Koren, G.; Bentur, Y. *Clin. Toxicol.* **2010**, *48*, 407-414.

¹⁸⁰ a) Vilanova, C.; Diaz-Oltra, S.; Murga, J.; Falomir, E.; Carda, M.; Marco, J. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 3194-3198. b), Vilanova, C.; Diaz-Oltra, S.; Murga, J.; Falomir, E.; Carda, M.; Redondo Horcajo, M.; Díaz, J. F.; Barasoain, I.; Marco, J. A. *J. Med. Chem.* **2014**, *24*, 10391-10403.

Por otra parte, han surgido recientemente unas nuevas dianas moleculares cuya función aberrante está estrechamente relacionada con el desarrollo de una gran diversidad de enfermedades y particularmente con el cáncer: las proteína quinasas.¹⁸¹ Se trata de un conjunto de proteínas de gran complejidad estructural, cuya función es regular el estado de fosforilación de las proteínas intracelulares. La actividad de dichas proteínas en cascadas de señalización determina el estado de la célula y su perturbación produce una transmisión anormal de la señal. Una alteración de las vías de transducción de estas señales produce una desregulación de procesos tales como la angiogénesis, apoptosis, migración celular y control del ciclo celular, lo que puede conducir al desarrollo de fenotipos malignos. De este modo, las proteína quinasas son reguladores clave en muchos de los aspectos que están presentes durante el desarrollo de un tumor y no es sorprendente que hayan sido descubiertos gran cantidad de inhibidores contra un elevado número de estas proteínas.^{182,183}

En el proceso de selección de un *hit* de partida en base a sus buenas propiedades farmacológicas, el Sorafenib llamó pronto nuestra atención dado el interés que ha suscitado la preparación de análogos del mismo. Se trata de un compuesto que actúa como un inhibidor multiquinasa, afectando de forma particular a uno de los receptores específicos de VEGF, la tirosina quinasa VEGFR2. Ésta es la encargada de iniciar la cascada de señalización que da comienzo a la activación del proceso de angiogénesis. El Sorafenib presenta actividad antitumoral contra un amplio espectro de cánceres y ha sido aprobado para el tratamiento de pacientes con diversos tipos de esta patología.¹⁸⁴

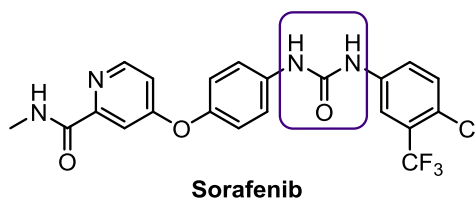


Figura 2.13.- Estructura de Sorafenib.

Este compuesto contiene un fragmento *N,N'*-bisarilurea que conecta dos anillos aromáticos con diferente patrón de sustitución. Se ha publicado recientemente la importancia de las interacciones mediante puentes de hidrógeno entre dicho sustrato y un determinado dominio de la tirosina quinasa VEGFR2, esenciales para ejercer su acción inhibitoria.¹⁸⁵

¹⁸¹ Fabbro, D.; Cowan-Jacob, S. W.; Moebitz, H. *J. Pharmacol.* **2015**, *172*, 2675-2700. b) Muller, S.; Chaikuad, A.; Gray, S. N.; Knapp, S. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 818-821. c) Cohen, P. *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 5001-5010.

¹⁸² Cohen, P. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 309-315.

¹⁸³ Hu, Y.; Futmann, N.; Bajorath, J. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 30-40.

¹⁸⁴ a) Wilhelm, S.; Carter, C.; Lynch, M.; Lowinger, T.; Dumas, J.; Smith, R. A.; Schwartz, B.; Simantov, R.; Kelley, S. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 835-844. b) Gadaleta-Caldarola, G.; Infusino, S.; Divella, R.; Ferraro, E.; Mazzocca, A.; De Rose, F.; Filippelli, G.; Abbate, I.; Brandi, M. *Future Oncol.* **2015**, *11*, 1863-1880.

¹⁸⁵ Maggiore, U. L. R.; Menada, M. V.; Venturini, P. L.; Ferrero, S. *Expert. Opin. Invest. Drugs* **2013**, *22*, 1049-1062.

Además de éste, se han descubierto otros compuestos biológicamente activos que presentan también una agrupación de urea *N,N'*-disustituída.¹⁸⁶ Se han llevado a cabo estudios biológicos de estos sustratos y se han determinado relaciones concretas de estructura-actividad, lo que ha puesto de manifiesto la relevancia de este tipo de agrupación en los nuevos fármacos preparados.¹⁸⁷

En base a lo anterior, se decidió proceder al diseño, síntesis y evaluación biológica de una nueva familia de ureas *N,N'*-disustituídas, que presentan un fragmento de arilo unido a uno de los átomos de nitrógeno y un fragmento de desacetilcoliquina unido al otro nitrógeno de dicha agrupación. Una vez esté disponible la primera generación de estructuras planteadas, el siguiente objetivo consistiría en someter esta familia de compuestos a evaluación biológica, tratando de establecer relaciones estructura-actividad que permitan redefinir una segunda generación de compuestos análoga a la anterior.

Se espera que esta estrategia permita obtener derivados con propiedades farmacológicas similares o mejoradas con respecto al producto natural que sirvió de modelo, al mismo tiempo que desarrollen nuevas propiedades tales como la capacidad de inhibir el proceso de angiogénesis o la proliferación celular descontrolada.

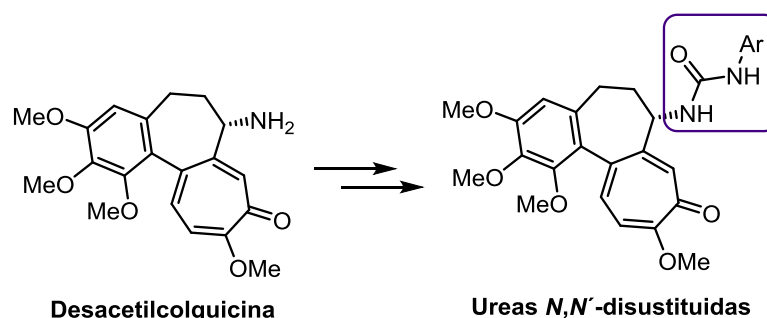


Figura 2.14.- Estructura general de las ureas *N,N'*-disustituídas.

3.2.- FAMILIA DE DERIVADOS DE COMBRETASTATINA A-4

El segundo tipo de estructura que llamó particularmente nuestra atención fueron los derivados de estilbeno, cuyas útiles propiedades farmacológicas ya habían sido bien establecidas. Históricamente, ciertos derivados de estilbeno han mostrado poseer marcadas propiedades antitumorales,¹⁸⁸ acrecentadas particularmente en un tipo específico de estilbenos, conocido como combretastatinas. Dentro de esta familia, la combretastatina A-4 y algunos de sus derivados han mostrado poseer la actividad

¹⁸⁶ HQ, L.; Lv, C.; Yan, T.; Zhu, H. L. *Anti. Canc. Agents. Med. Chem.* **2009**, 9, 471-480.

¹⁸⁷ a) Hsu, K. L.; Tsuboi, K.; Whitby, L. R.; Speers, A. E.; Pugh, H.; Inloes, J.; Cravatt, B. F. *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 8257-8269. b) Brady, R. M. et al. *J. Med. Chem.* **2014**, 57, 1323-1343. c) Méteayer, B.; Campaign, G.; Jouvin, K.; Martin-Migot, A.; Bachmann, C.; Marrot, J.; Evano, G.; Thibaudeau, S. *J. Org. Chem.* **2015**, 80, 3397-3410.

¹⁸⁸ a) Chillemi, R.; Sciuto, S.; Spatafora, C.; Tringali, C. *Nat. Prod. Comm.* **2007**, 2, 499-513. b) Orsini, F.; Sello, G. *Studies in Natural Products Chemistry. Bioactive Natural Products*, Parte N. Atta-ur-Rahman, **2008**, 77- 127.

antimitótica más elevada observada hasta el momento, actuando como agentes interferentes en la formación de los microtúbulos.¹⁸⁹ Un aspecto adicional de gran interés es el hecho de que las combretastatinas y más concretamente la combretastatina A-4 y sus derivados, también exhiben marcadas propiedades antiangiogénicas,¹⁹⁰ lo que unido a su elevado carácter antimitótico la convierte en un compuesto de gran valor farmacológico. Se ha determinado muy recientemente que la combretastatina A-4 interacciona con la tubulina en un sitio de unión prácticamente coincidente con el de la colquicina¹⁹¹ (Figura 2.15).

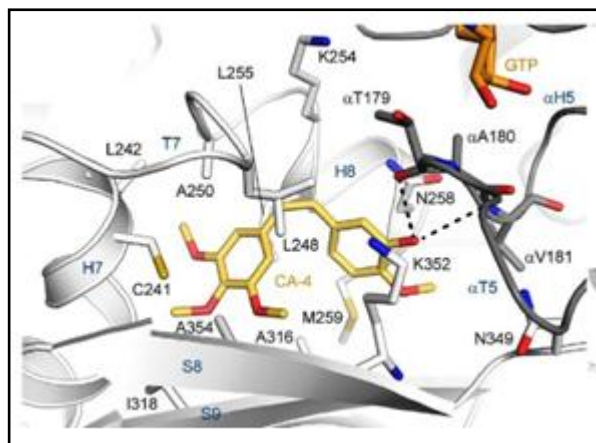


Figura 2.15.-Sitio de unión de la combretastatina A-4 y aminoácidos implicados en la interacción.

Pese a todas sus prometedoras aptitudes, el desarrollo clínico de este compuesto no ha sido posible debido a su baja solubilidad en agua y a su escasa vida media en el interior del organismo.¹⁹² Este último factor es consecuencia de la isomerización de la olefina *cis* al isómero *trans* (farmacológicamente inactivo), por influencia del calor, de la luz o de trazas de ácido.¹⁹³ A causa de estos inconvenientes, surge la necesidad de encontrar nuevos derivados de este producto natural que no exhiban los problemas antes mencionados.

En relación a lo anterior, el objetivo propuesto por nuestro grupo de investigación se centra en el diseño, la síntesis y la evaluación biológica de derivados tricíclicos de combretastatina A-4. La idea base es que estos sustratos, a causa de su estructura cíclica, no puedan experimentar la isomerización (*cis-trans*) del doble enlace olefínico, manteniendo con ello inalterada la configuración *Z* que es la que va asociada a la actividad antitumoral¹⁹⁴ (Figura 2.16).

¹⁸⁹ a) Cirila, A.; Mann, J. *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 558-564. b) Tron, G. C.; Pirali, T.; Sorba, G.; Pagliai, F.; Busacca, S.; Genazzani, A. A. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3033-3044. c) Singh, R.; Kaur, H. *Synthesis* **2009**, 2471-2491.

¹⁹⁰ Ahmed, B. et al. *Int. J. Cancer* **2003**, *105*, 20-25.

¹⁹¹ Gaspari, R.; Prota, A. E.; Bargsten, K.; Cavalli, A.; Steinmetz, M. O. *Chem.* **2017**, *2*, 102-113.

¹⁹² Ohsumi, K. et al. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 3022-3032.

¹⁹³ Diaz, J. F.; Andreu, J. M. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 2890-2896.

¹⁹⁴ Cushman, M.; Nagarathnam, D.; Gopal, D.; Chakraborti, A. K.; Lin, C. M.; Hamel, E. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 2579-2588.

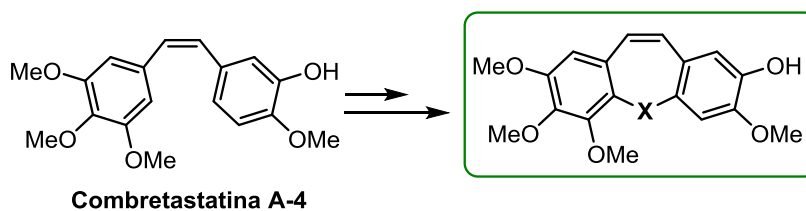


Figura 2.16.- Estructura tricíclica derivada de combretastatina A-4.

El grupo X puede ser de naturaleza variada, siendo el caso más simple el de un solo átomo que lleve incorporado un número apropiado de sustituyentes. Dicho átomo puede ser por ejemplo alguno de los elementos de los grupos **14** (C, Si, Ge, Sn), **15** (N, P, As, Sb) o **16** (O, S, Se, Te).

Se espera que la naturaleza del átomo X pueda ejercer una influencia marcada sobre la geometría de moléculas, debido a las diferentes longitudes y ángulos de enlace asociados a los distintos tipos de átomos. En este sentido, se ha demostrado que los dos anillos aromáticos en la combretastatina A-4 no son coplanares y están torsionados en un ángulo de aproximadamente 50° .¹⁹⁵ Diversos estudios teóricos y experimentales han confirmado la importancia de esta torsión en la actividad biológica de estos compuestos, por lo que la geometría de las moléculas finales y con ello probablemente su bioactividad, pueda ser modulada modificando el heteroelemento X.¹⁹⁶

¹⁹⁵ McGown, A. T.; Fox, B. W. *Anti-Cancer Drug Des.* **1989**, *3*, 249-254.

¹⁹⁶ Sun, L.; Vasilevich, N. I.; Fuselier, J. A.; Hocart, S. J.; Coy, D. H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 2041-2046.

4.- DISEÑO Y SÍNTESIS DE DERIVADOS DE COLQUICINA

4.- DISEÑO Y SÍNTESIS DE DERIVADOS DE COLQUICINA

4.1.- INTRODUCCIÓN

El nombre colquicina proviene del nombre antiguo (Cólquida) de una región situada en la orilla oriental del mar Negro, hoy en día parte de la nación caucásica de Georgia, donde crece la especie vegetal *Colchicum autumnale* L. (azafrán de otoño), perteneciente a la familia de las Colchicáceas. También es posible encontrar dicha especie en zonas del centro-sur de Europa y del centro-norte de Italia.¹⁹⁷



Figura 2.17.- *Colchicum autumnale* L.

Se trata de un alcaloide empleado desde la antigüedad para el tratamiento de diversas enfermedades relacionadas con procesos inflamatorios y reumáticos,¹⁹⁸ quedando patente su eficacia ya en el antiguo Egipto, donde se describen sus efectos en el papiro de Ebers (1500 AC). El extracto de la planta del género *Colchicum* fue descrito por primera vez para el tratamiento de la gota (el uso más extendido en la actualidad) en la antigua Grecia, en el documento “*De Materia Medica*”, redactado por *Pedanius Dioscorides* en el siglo I después de Cristo. Sin embargo, el empleo del bulbo para el tratamiento de esta patología data aproximadamente del siglo VI (550 D.C), cuando fue descrito por Alejandro de Tralles.

Más adelante el uso de este principio activo fue desarrollado por el imperio persa y ciertos eruditos del renacimiento, hasta que en 1618 fue incorporado a la farmacopea londinense.¹⁹⁹ Ya en el siglo XVIII, las plantas del género *Colchicum* fueron importadas a América del Norte por Benjamin Franklin, que padecía de gota, poniéndose de manifiesto las beneficiosas propiedades de este producto natural contra dicha patología.^{200,201}

¹⁹⁷ Cerquaglia, C.; Diaco, M.; Nucera, G. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy* **2005**, 4, 117-124.

¹⁹⁸ Graham, W.; Roberts, J. B. *Ann. Rheum. Dis.* **1953**, 12, 16-19.

¹⁹⁹ Hartung, E. F. *Ann. Rheum. Dis.* **1954**, 13, 190-200.

²⁰⁰ a) Molad, Y. *Curr. Rheumatol. Rep.* **2002**, 4, 252-256. b) Chen, L. X.; Schumacher, H. R. *J. Clin. Rheumatol.* **2008**, 14, 55-62.

²⁰¹ Ebadi, M. S. *Pharmacodynamic basis of herbal medicine*, 2º Ed. Taylor & Francis Group, **2007**.

Además de la gota, ha mostrado también utilidad en el tratamiento de diversas enfermedades tales como la fiebre mediterránea familiar, la cirrosis hepática, la amiloidosis,²⁰² la fibrosis pulmonar o también como una neurotoxina selectiva para el tratamiento del Alzheimer.²⁰³ Sin embargo, la aplicación más relevante que ha suscitado mayor interés en el campo de la medicina en los últimos años, ha sido su capacidad para inhibir la proliferación de células cancerosas (antimitótico) e inducir su apoptosis.

La colquicina es un sólido blanco con un punto de fusión de 150 °C. Fue aislada por primera vez en 1820 por los químicos franceses Pelletier y Caventou.²⁰⁴ No obstante, no fue hasta 1833 cuando Geiger²⁰⁵ fue capaz de purificar el principio activo de dicha planta al que llamó colquicina, aunque sin establecer todavía su estructura. La determinación de ésta última fue llevada a cabo en décadas posteriores, gracias entre otros a la contribución de Dewar en 1945,²⁰⁶ quien sugirió que dicha molécula presentaba tres anillos, dos de los cuales eran de siete miembros. Finalmente, la estructura de este producto natural fue elucidada mediante cristalografía de rayos X en 1952²⁰⁷ y su configuración absoluta (S) fue establecida tres años más tarde.²⁰⁸

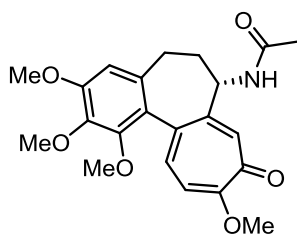


Figura 2.18.- Estructura de la colquicina.

Se trata de un alcaloide tricíclico formado por un anillo aromático trisustituído con tres grupos metoxilo, un anillo alicíclico de siete miembros que presenta una función acetamida y un anillo de tropolona, encontrado también en otros productos naturales con propiedades medicinales.²⁰⁹

4.1.1.- COLQUICINA COMO AGENTE ANTICANCERÍGENO

Como se ha enunciado en el apartado anterior, la colquicina inhibe la división celular provocando la disrupción de los microtúbulos que forman el huso mitótico, que es el encargado de llevar a cabo la separación de las cromátidas durante el proceso de mitosis.²¹⁰

²⁰² Malkinson, F. D. *Arch. Dermatol.* **1982**, 118, 453–457.

²⁰³ a) Nakagawa, Y.; Nakamura, S.; Kase, Y.; Noguehi, T.; Ishihara, T. *Brain Res.* **1987**, 408, 57-64. b) Mattson, M. P. *Brain Res.* **1992**, 582, 107-118.

²⁰⁴ Pelletier, P. S.; Caventou, J. B. *Ann. Chim. Phys.* **1820**, 14, 69-81.

²⁰⁵ Geiger, P. L. *Ann. Pharm.* **1833**, 7, 269-280.

²⁰⁶ Dewar, M. J. S. *Nature* **1945**, 155, 141-142.

²⁰⁷ King, M. V.; Vries, J. L.; Pepinsky, R. *Acta Crystallogr.* **1952**, 5, 437-440.

²⁰⁸ Corrodi, H.; Hardegger, E. *Chem. Acta* **1955**, 38, 2030–2033.

²⁰⁹ Ben-Chetrit, E.; Levy, M. *Semin. Arthritis Rheum.* **1998**, 28, 48–59.

²¹⁰ Bhattacharyya, B.; Panda, D.; Gupta, S.; Banerjee, M. *Med. Res. Rev.* **2008**, 28, 155-183.

Los microtúbulos están formados a partir de heterodímeros de dos subunidades proteicas llamadas α y β -tubulina. En las células eucariotas, estas proteínas se organizan para formar esta red fibrosa que se encuentra en un estado perpetuo de formación y disrupción conocido como inestabilidad dinámica, en el cual los microtúbulos sufren continuos procesos de polimerización y despolimerización.²¹¹ Además, también se encargan de regular otros aspectos relacionados con el mantenimiento de la forma celular, su migración, señalización y el transporte celular. Así pues, la inhibición de la dinámica de microtúbulos por la acción de la colquicina produciría un bloqueo de la maquinaria de división celular, que desembocaría en la muerte celular o en apoptosis de las células aberrantes.

La estructura de la tubulina fue establecida inicialmente por Mohri en 1968,²¹² y en el mismo año se la identificó como una diana biológica de la colquicina.²¹³ En el año 2000 se publicó el primer enfoque basado en la estructura de compuestos que interactúan con el sitio de unión de la colquicina, empleando para ello técnicas bioquímicas y de modelado molecular. No fue hasta el año 2004 cuando se identificó finalmente y con detalle el sitio de unión colquicinoide.²¹⁴ Éste se sitúa en la interfase de las subunidades α y β del heterodímero de tubulina y no es específico para la colquicina, ya que otros compuestos de naturaleza similar son capaces de unirse específicamente al mismo sitio de unión. En la siguiente figura se muestra con más detalle el sitio de unión colquicinoide (Figura 2.19).

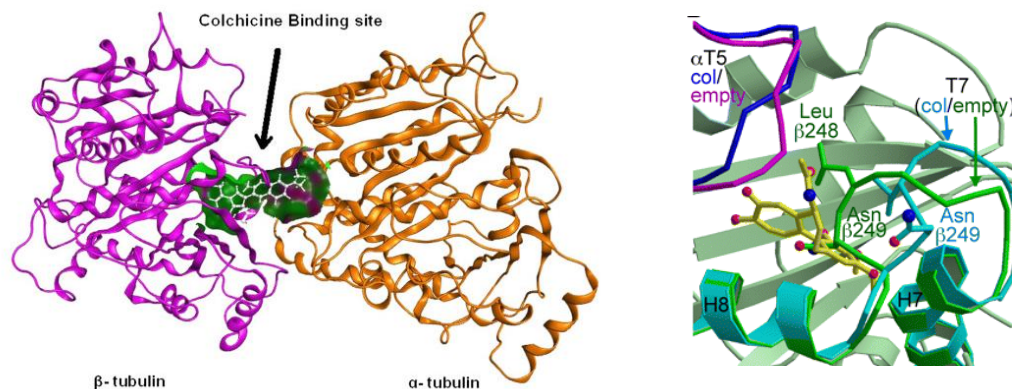


Figura 2.19.- Sitio de unión colquicinoide en la tubulina.²¹⁵

La unión de la colquicina a los microtúbulos en el mencionado punto de unión, produce la disociación de los mismos en los heterodímeros correspondientes. Las células sometidas a la acción de la colquicina prosiguen un ciclo mitótico anómalo, que

²¹¹ a) Mitchison, T. J.; Kirschner, M. *Nature* **1984**, 312, 237-242. b) Desai, A.; Mitchison, T. J. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1997**, 13, 83-117. c) Howard, J.; Hyman, A. A. *Nature* **2003**, 422, 753-758. d) Jordan, M. A.; Wilson, L. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, 4, 253-265.

²¹² Mohri, H. *Nature* **1968**, 217, 1053-1054.

²¹³ Weisenberg, R. C.; Borisy, G. G.; Taylor, E. W. *Biochemistry* **1968**, 7, 4466-4479.

²¹⁴ Ravelli, R. B.; Gigant, B.; Curmi, P. A.; Jourdain, I.; Lachkar, S.; Sobel, A.; Knossow, M. *Nature* **2004**, 428, 198-202.

²¹⁵ a) Dorléans, A. *PNAS* **2009**, 106, 13775-13779. b) Kumar et al. *Org. Med. Chem. Lett.* **2013**, 3, 1-13.

se caracteriza por la ausencia parcial o total del huso mitótico seguida de la consiguiente ruptura de la envoltura nuclear, la condensación de los cromosomas y la imposibilidad de llevar a cabo la división de los centrómeros. Además, numerosos estudios han demostrado que dicho sustrato también produce la inhibición de ciertos canales iónicos y la liberación de factores proapoptóticos que conducen a la muerte de las células malignas.

Se ha comentado previamente el escaso uso de la colquicina en la terapia anticancerígena. Esto es debido a su bajo índice terapéutico y a su elevada toxicidad, que puede producir entre otros neutropenia, trastornos gastrointestinales, daños óseos o anemia.

4.1.2.- ANTECEDENTES Y ESTUDIOS DE ESTRUCTURA-ACTIVIDAD

Existen números precedentes en la literatura de derivados de este producto natural capaces de ejercer el efecto antitumoral deseado. Estudios de estructura-actividad de una amplia variedad de análogos han demostrado que el anillo de fenilo sustituido con tres grupos metoxilo (anillo A) y el anillo de tropolona (anillo C), son esenciales para mantener una elevada afinidad de unión por la tubulina (Figura 2.20).²¹⁶ Esta premisa se enmarca de acuerdo con el modelo propuesto por Andreu y Timasheff en 1982,²¹⁷ que tiene en cuenta la gran ventaja entrópica de la colquicina cuando actúa como un ligando bifuncional.

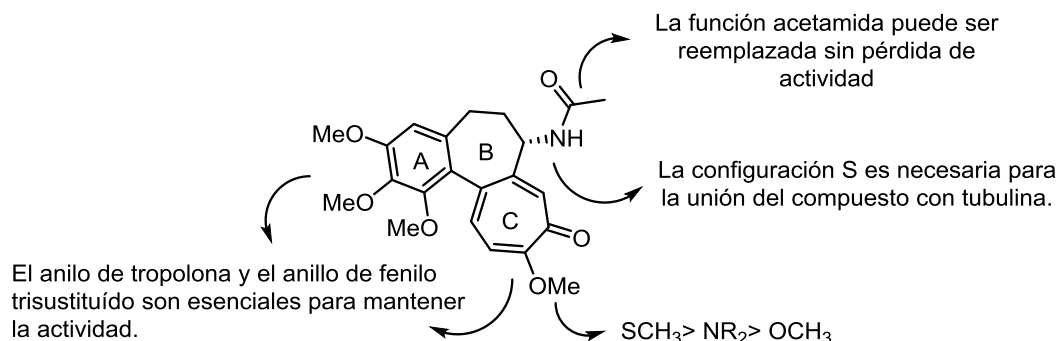


Figura 2.20.- Estudios de estructura-actividad para la colquicina.²¹⁸

Por otra parte, se ha demostrado que si se modifica el anillo B de siete miembros, los derivados continúan manteniendo la capacidad de unión a la tubulina intacta. Sin embargo, tales modificaciones sí que pueden influir significativamente en la cinética y en la energía de activación de la unión con dicha proteína.²¹⁹

²¹⁶ Quinn, F. R.; Neiman, Z.; Beisler, J. A. *J. Med. Chem.* **1981**, *24*, 636-639.

²¹⁷ Andreu, J. M.; Timasheff, S. N. *Biochemistry* **1982**, *21*, 6465-6476.

²¹⁸ Sapra, S.; Bhalla, Y.; Sharma, S.; Singh, G.; Budhiraja, K.; Dhar, L. *Med. Chem. Res.* **2013**, *22*, 531-547.

²¹⁹ Chakrabarti, G.; Sengupta, S.; Bhattacharyya, B. *J. Biol Chem.* **1996**, *271*, 2897-2901.

En conexión con lo anterior, aparecen en la bibliografía numerosos ejemplos de análogos y conjugados de colquicina que tratan de mejorar las propiedades farmacológicas del producto natural y al mismo tiempo solventar el problema de toxicidad que presenta este tipo de estructura.²²⁰

4.1.3.- PERSPECTIVAS DE FUTURO

Dada las prometedoras propiedades y la amplia gama de actividades que posee este producto natural, se ha renovado el interés de varios grupos de investigación que han centrado sus esfuerzos en la síntesis de nuevos análogos de colquicina con diversas modificaciones funcionales.

Existen una gran cantidad de compuestos que interaccionan con el sitio de unión de la colquicina y muestran una marcada actividad antitumoral, como son entre otros las benzofenonas, los lignanos, las combretastatinas y las chalconas.²²¹ Además se ha aislado recientemente una nueva molécula a partir de un hongo endófito de la especie vegetal *Gloriosa superba* L., perteneciente al igual que *C. autumnale*, a la familia de las Colchicáceas. Es probable que dicha molécula también posea una alta actividad citotóxica y antimicrobiana, formándose a través de la misma ruta biosintética que la colquicina.²²²

Por tanto, dado el enorme potencial que presenta esta molécula, es particularmente interesante la preparación de análogos de la misma con diferente funcionalización, teniendo como objetivo atenuar la toxicidad de dicho sustrato y a la par, mantener intactas las deseadas propiedades antitumorales.

²²⁰ a) Johansson, E. M. V.; Dubois, J.; Darbre, T.; Reymond, J. L. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 6589-6597. b) Lagnoux, D.; Darbre, T.; Schmitz, M. L.; Reymond, J. L. *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 3941-3950. c) Nicolaou, K. C.; Valiulin, R. A.; Pokorski, J. K.; Chang, V.; Chen, J. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 3776-3780. d) Cosentino, L.; Redondo-Horcajo, M.; Zhao, Y.; Santos, A. R.; Chowdury, K. F.; Vinader, V.; Abdallah, Q.; Abdel-Rahman, H.; Fournier-Dit-Chabert, J.; Shnyder, S.; Loadman, S. M.; Fang, W.; Díaz, J. F.; Barasoain, I.; Burns, A.; Pors, K. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 11062-11066.

²²¹ Nepali, K.; Kadian, K.; Ojha, R.; Dhiman, R.; Garg, A.; Singh, G.; Budhiraja, A.; Bedi, P. M. S.; Dhar, K. L. *Med. Chem. Res.* **2012**, *21*, 2990-2997.

²²² Budhiraja, A.; Nepali, K.; Sapra, S.; Gupta, S.; Kumar, S.; Dhar, K. L. *Med. Chem. Res.* **2013**, *22*, 323-329.

4.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

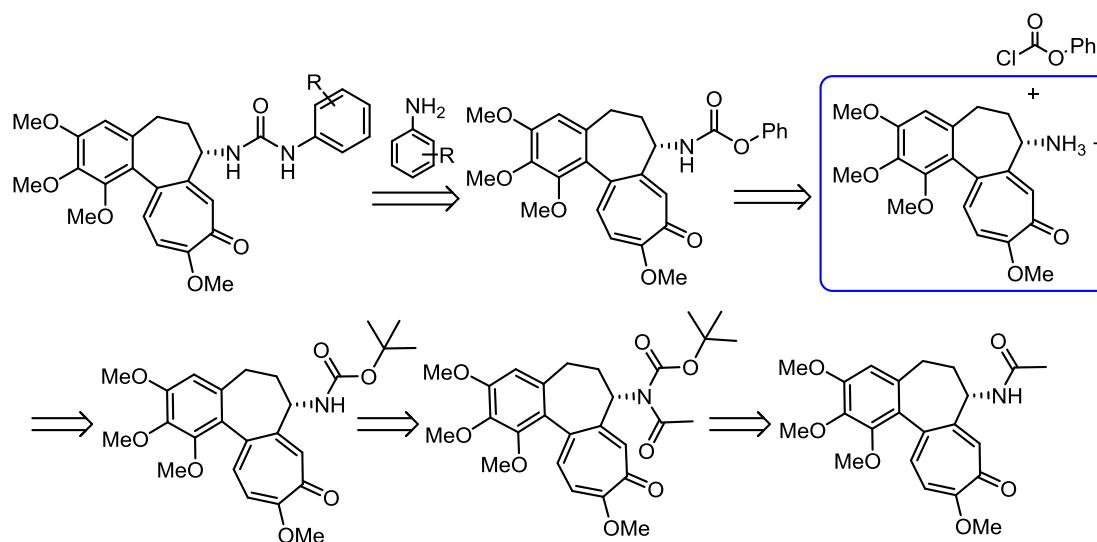
Los objetivos específicos planteados para esta familia de compuestos se muestran a continuación:

1.-Diseño y síntesis de una nueva familia de ureas derivadas de colquicina que presenten mejores valores de actividad y una menor toxicidad que el propio producto natural. Además, debido a la presencia de una agrupación urea *N,N'*-disustituída, se espera que estos análogos sean capaces de mostrar una inherente capacidad antiangiogénica.

2.- Evaluación biológica de los compuestos obtenidos atendiendo a las tres líneas de estudio que son objeto de nuestra investigación.

3.- Reevaluación y rediseño de las estructuras objetivo, en función de los resultados de las evaluaciones biológicas y de los estudios estructurales realizados.

El esquema retrosintético planteado para la preparación de análogos ureicos de colquicina se muestra a continuación:



Esquema 2.1.- Esquema retrosintético propuesto para la preparación de ureas derivadas de colquicina.

En base al esquema anterior, sería necesario preparar inicialmente el compuesto intermedio desacetilado (desacetilcolquicina), pero en condiciones que no diesen lugar a la racemización del centro estereogénico presente en su estructura. Para ello se siguió un procedimiento descrito en la bibliografía (Esquemas 2.2 a 2.4),²²³ que permitiría aislar la sal de desacetilcolquicina correspondiente. Una vez obtenida, se funcionalizaría el átomo de nitrógeno con cloroformiato de fenilo,²²⁴ para disponer del carbamato apropiado sobre el que realizar posteriormente las transformaciones propuestas.

²²³ a) Lebeau, L.; Ducray, P.; Mioskowski, C. *Synth. Commun.* **1997**, 27, 293-296. b) Bagnato, J. D.; Eilers, A. L.; Horton, R. A.; Grissom, C. B. *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 8987-8996.

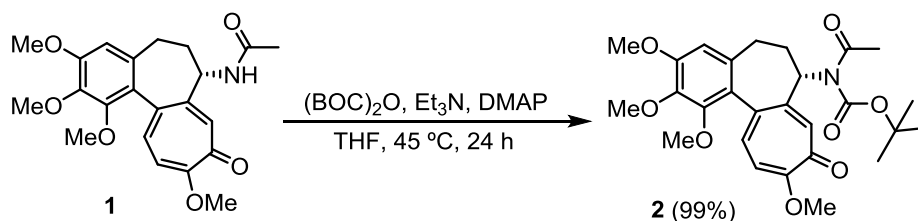
²²⁴ Zhang, L.; Xia, W.; Wang, B.; Luo, Y.; Lu, W. *Synth. Commun.* **2011**, 41, 3140-3146.

Por último se haría reaccionar dicho intermedio con diferentes anilinas en medio básico, con el fin de obtener las ureas finales esperadas (Esquema 2.1).²²⁵ Esta estrategia sintética no es la única posible,²²⁶ pero dada la disponibilidad de reactivos en nuestro grupo de investigación se decidió proceder según se ha detallado, aunque involucrase una etapa de síntesis adicional.

4.3.- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

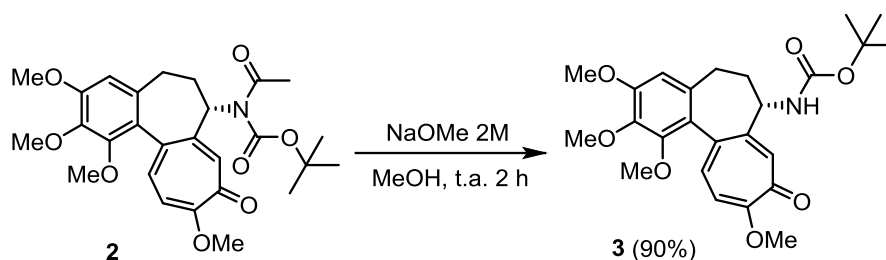
4.3.1.- FAMILIA DE UREAS DERIVADAS DE COLQUICINA

Como se ha descrito en el apartado anterior, inicialmente se trató de obtener desacetilcolquicina (**4**) manteniendo intacta la configuración (*S*) del centro asimétrico.²²³ Para ello se hizo reaccionar en primer lugar colquicina (**1**) con di-*t*-butil dicarbonato (BOC₂O) en medio básico, empleando DMAP como catalizador. Se obtuvo el compuesto **2** con un rendimiento casi cuantitativo.



Esquema 2.2.- Protección del grupo amino con un grupo BOC.

Tras la introducción del grupo BOC, se procedió a la eliminación selectiva del grupo acetilo. Para ello se hizo reaccionar el compuesto anterior con NaOMe a temperatura ambiente, obteniéndose el compuesto esperado con buen rendimiento y sin que se produjera ningún cambio en la configuración absoluta del único estereocentro de la molécula.

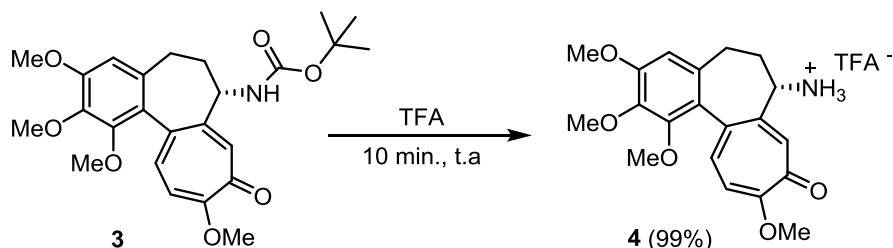


Esquema 2.3.- Desprotección selectiva del grupo acetilo en presencia del grupo BOC.

²²⁵ Thavonekham, B. *Synthesis* **1997**, 1189-1194.

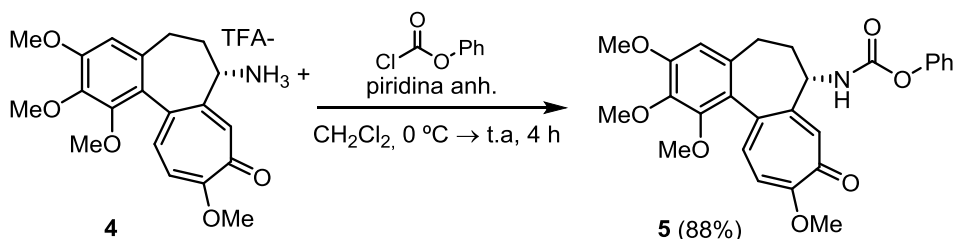
²²⁶ a) Gorla, S. K.; Kavitha, M.; Zhang, M.; Liu, X.; Sharling, L.; Gollapalli, D. R.; Striepen, B.; Hedstrom, L.; Cuny, G. D. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 7759-7771. b) Mane, M.; Balaskar, R.; Gavade, S.; Pabrekar, P.; Mane, D. *Arabian. J. Chem.* **2013**, *6*, 243-427. c) Delebecq, E.; Pascault, J. P.; Boutevin, B.; Ganachaud, F. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 80-118.

Por último se llevó a cabo la eliminación del grupo BOC empleando ácido trifluoroacético a temperatura ambiente durante 10 minutos. La (*S*)-desacetilcolquicina (**4**) se aisló con un rendimiento casi cuantitativo en forma de sal de trifluoroacetato (TFA), lo que facilita su manipulación y reduce sustancialmente la gran toxicidad que presenta.



Esquema 2.4.- Obtención del trifluoroacetato de desacetilcolquicina **4**.

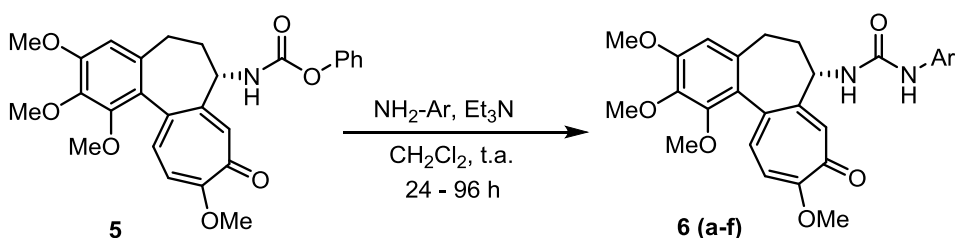
Una vez obtenido el sustrato intermedio **4**, se preparó el carbamato de fenilo correspondiente. Para ello se hizo reaccionar **4** con cloroformiato de fenilo en medio básico,²²⁴ lo que proporcionó el compuesto **5** con buen rendimiento.

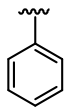
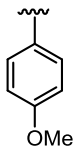
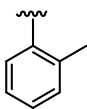
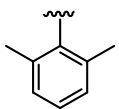
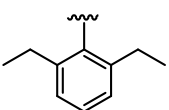
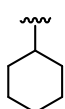


Esquema 2.5.- Preparación del carbamato de fenilo derivado de colquicina.

Como última etapa propuesta se llevó a cabo la reacción entre el uretano anterior (**5**) y diversas anilinas diferentemente sustituidas, incluyendo además entre ellas una amina no aromática, la ciclohexilamina (Tabla 2.1). Para ello se empleó Et₃N como base en CH₂Cl₂ anhidro.²²⁵ El uso de otros disolventes anhidros tales como THF o Et₂O y el empleo de otras bases como DIPEA o piridina no dio buenos resultados. Se trata por tanto de una reacción de adición-eliminación que transcurre en medio básico, en la que se genera fenol como subproducto de la misma. El tiempo de reacción varía dependiendo de la naturaleza de los sustratos implicados.

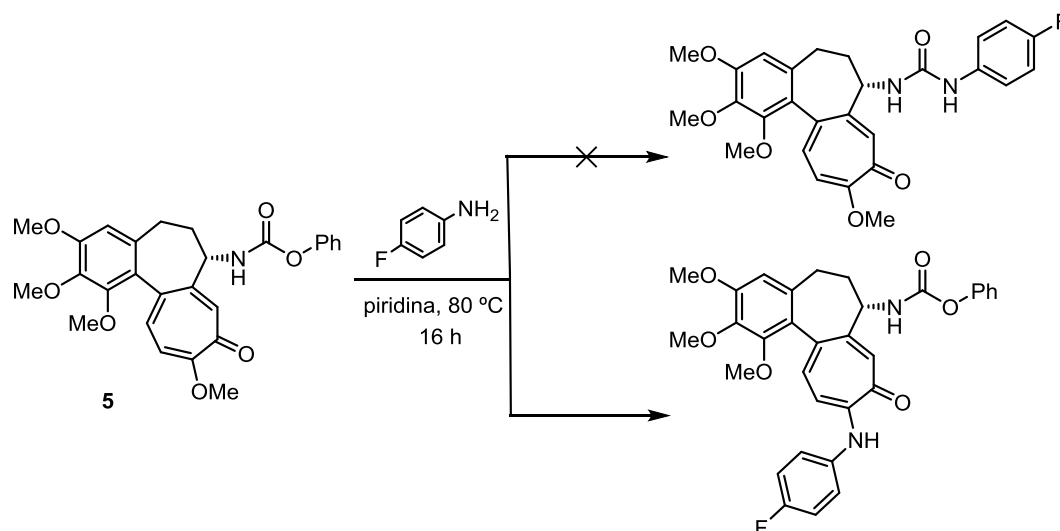
Tabla 2.1.- Preparación de ureas derivadas de colquicina.



Compuesto	-Ar	Rendimiento
6a		65%
6b		61%
6c		59%
6d		28%
6e		25%
6f		45%

Seguindo esta metodología fue posible preparar varios derivados de colquicina con rendimientos aceptables, empleando principalmente anilinas sustituidas con grupos donadores de electrones. En cambio, el uso de anilinas sustituidas con grupos atractores (F, CF₃, CN) no dio lugar al producto final esperado, recuperándose en todos los casos el sustrato de partida sin reaccionar.

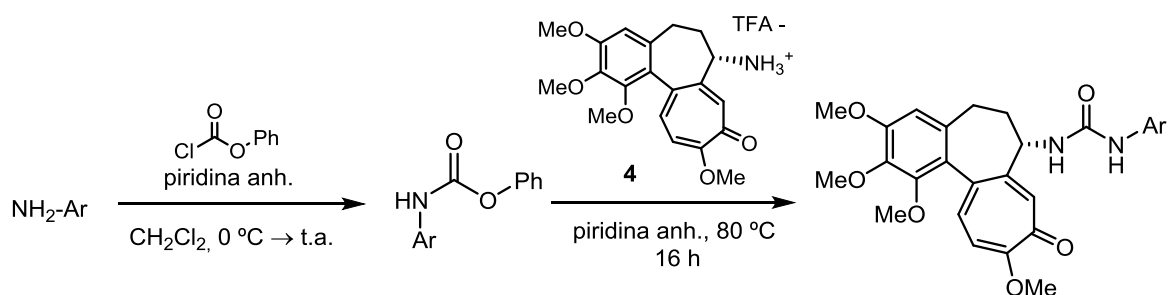
Tratando de solventar la falta de reactividad mostrada por tales anilinas, se forzaron las condiciones de reacción tal y como se describe en algunos ejemplos de la literatura.²²⁴ Para ello se hizo reaccionar el uretano **5** con *p*-fluoroanilina a 80 °C, empleando piridina anhidra como disolvente, según se muestra en el esquema siguiente (Esquema 2.6).



Esquema 2.6.- Intento de formación de la urea correspondiente empleando una anilina desactivada.

Tras aislar el compuesto obtenido, se observó que no se trataba de la urea final esperada, sino de un nuevo sustrato en el que la anilina se había introducido en el anillo de tropona, sustituyendo al grupo metoxilo y liberando MeOH como grupo saliente. Esta transformación se produce a través de un mecanismo de adición-eliminación.²²⁷

A la vista de ello y tratando de obtener análogos de colquicina con anilinas poco reactivas, se decidió modificar la estrategia sintética e invertir el orden de la secuencia. Para ello, en lugar del compuesto intermedio **5**, se prepararon los carbamatos correspondientes de cada anilina y a continuación se hicieron reaccionar con la sal de desacetilcolquicina (**4**) (Esquema 2.7). De esta manera se evitaría la reacción secundaria antes mencionada, ya que el derivado de anilina actuaría ahora como un agente acilante electrofílico, que no reaccionaría con el núcleo de colquicina. La estrategia sintética propuesta para esta alternativa se muestra a continuación:

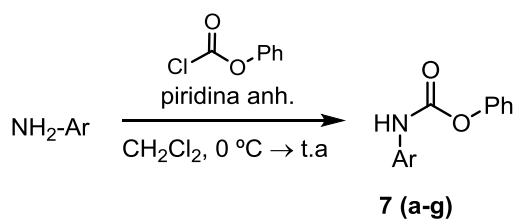


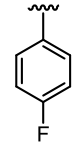
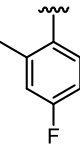
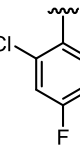
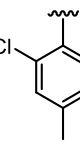
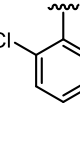
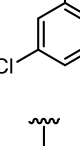
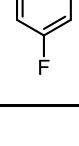
Esquema 2.7.- Estrategia sintética planteada para la obtención de los derivados propuestos.

Se procedió en consecuencia a la preparación de una serie de carbamatos derivados de anilinas halogenadas poco reactivas, empleando piridina anhidra como base en CH₂Cl₂.²²⁴ De esta manera fue posible obtener los compuestos intermedios **7(a-g)** con buenos rendimientos (Tabla 2.2).

²²⁷ a) Shindo, K.; Ishikawa, S.; Nozoe, T. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1989**, 62, 1158-1166. b) Nozoe, T.; Someya, T.; Okai, H. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1979**, 52, 1156-1158.

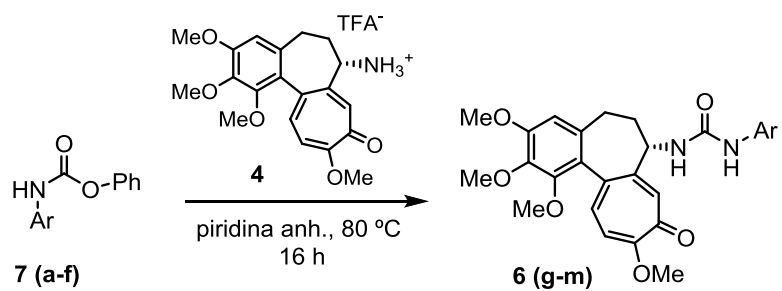
Tabla 2.2.- Preparación de carbamatos derivados de anilinas poco reactivas.



Compuesto	-Ar	Rendimiento
7a		61%
7b		52%
7c		85%
7d		84%
7e		96%
7f		90%
7g		69%

Una vez obtenidos los correspondientes uretanos (**7a-g**), se hicieron reaccionar con la sal **4**.²²⁴ De esta manera fue posible preparar ureas finales derivadas de las anilinas poco reactivas, con buenos rendimientos y tiempos de reacción más cortos (Tabla 2.3).

Tabla 2.3.- Formación de ureas finales a partir de anilinas poco nucleofílicas.



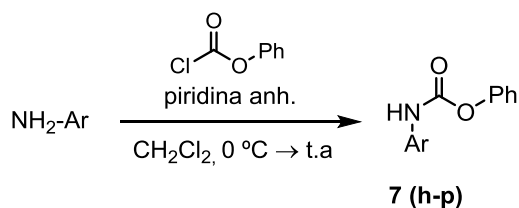
Compuesto	-Ar	Rendimiento
6g		38%
6h		47%
6i		55%
6j		88%
6k		69%
6l		32%
6m		32%

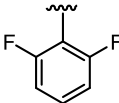
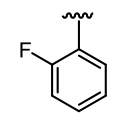
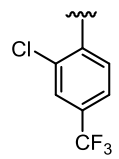
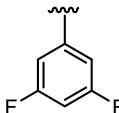
Siguiendo las dos metodologías antes planteadas, se pudo preparar una pequeña quimioteca de ureas derivadas de colquicina que se sometieron a evaluación biológica para determinar su citotoxicidad, su actividad antiangiogénica y su capacidad de inhibición del enzima telomerasa.

De entre todos los derivados preparados, se observó que los compuestos que exhibían mayor actividad citotóxica frente a células cancerosas eran aquellos que presentaban en su estructura principalmente grupos electrón-atractores de tipo halógeno. En base a estos resultados (págs. 277-283) y a los estudios preliminares de estructura-actividad realizados, se decidió llevar a cabo la preparación de análogos adicionales de colquicina que presentasen otros grupos de esta naturaleza.

En base al estudio anterior y siguiendo la estrategia descrita anteriormente para anilinas poco reactivas (Esquema 2.7), se prepararon nuevos derivados de colquicina con diferente funcionalización sobre el anillo de anilina. Inicialmente se llevó a cabo la síntesis de los carbamatos correspondientes tal y como se muestra en el siguiente esquema, obteniéndose los derivados esperados con buenos rendimientos (Tabla 2.4).

Tabla 2.4.- Preparación de nuevos carbamatos a partir de anilinas poco reactivas.

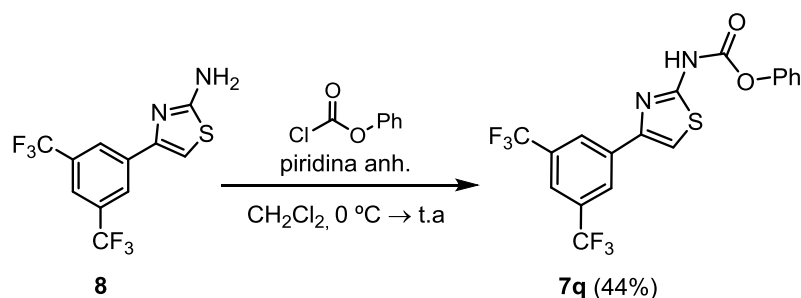


Compuesto	-Ar	Rendimiento
7h		30%
7i		86%
7j		41%
7k		40%

7l		34%
7m		87%
7n		55%
7o		80%
7p		56%

Además de anilinas que presentan grupos electrón-atractores, se decidió estudiar también los derivados de α -naftilamina y β -naftilamina, para poder evaluar la influencia de un segundo anillo aromático sobre la actividad anticancerígena de estos compuestos. La presencia de estos fragmentos más voluminosos en la estructura del producto final podría aportar quizá una mayor restricción estérica y una mayor deslocalización electrónica, modificando los valores de actividad y sus propiedades farmacológicas.

Además de los anteriores sistemas aromáticos bencenoides, se llevó también a cabo la preparación del carbamato del compuesto heterocíclico **8**. Se trata de un derivado de tiazol que fue obtenido paralelamente en nuestro grupo de investigación como un intermedio para la síntesis de un posible fármaco antimalárico (Pág 66).



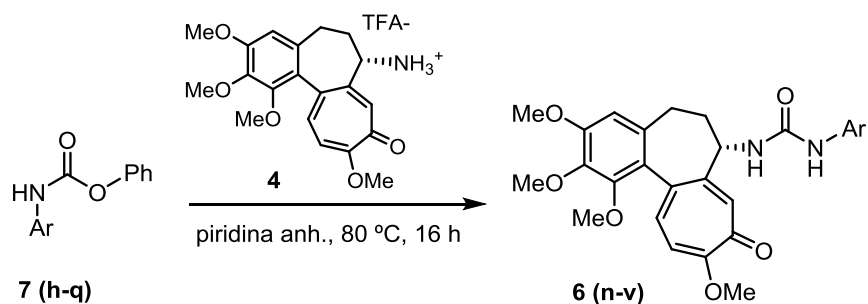
Esquema 2.8.- Preparación del carbamato de un derivado de tiazol.

Se consideró interesante la preparación de este derivado por presentar propiedades estéricas y electrónicas análogas a las de los compuestos anteriores, lo que podría dar lugar a buenos valores de actividad. Además se trató de determinar la influencia que podría ejercer el anillo de tiazol como grupo espaciador sobre la actividad antitumoral de estos derivados.

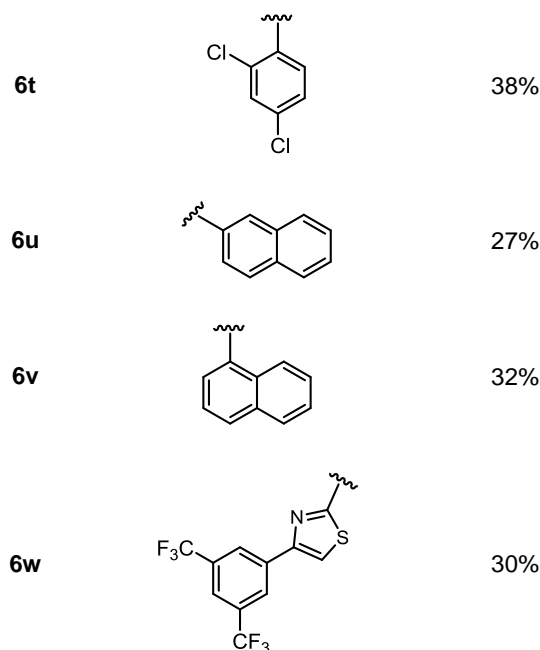
El compuesto **8** se preparó según se ha descrito en el capítulo anterior (Pág 66; Esq. 1.5), haciendo reaccionar una α -bromocetona adecuadamente funcionalizada, 3,5-bis(trifluorometilfenil)-2-bromoetanonona, con tiourea. Se obtuvo el compuesto deseado sin necesidad de purificación previa y con un excelente rendimiento.

Una vez obtenidos los uretanos intermedios **7(h-q)**, se procedió a la síntesis de las ureas correspondientes tal y como se ha detallado.²²⁴ Siguiendo esta metodología fue posible preparar los compuestos finales esperados con rendimientos aceptables (Tabla 2.5).

Tabla 2.5.- Síntesis de nuevas ureas a partir de los carbamatos **7(h-q)**.



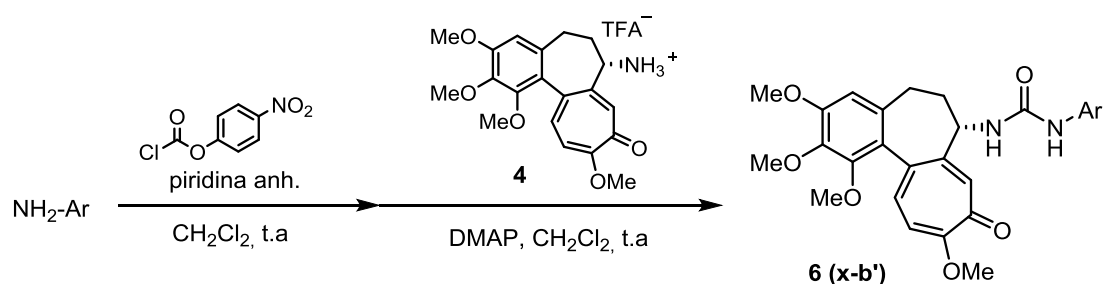
Compuesto	-Ar	Rendimiento
6n		46%
6o		53%
6p		47%
6q		38%
6r		27%
6s		60%



Los rendimientos obtenidos son moderados en la mayoría de los casos, quizá debido tanto a factores electrónicos como también a factores estéricos, como es el caso de la α - y β -naftilamina. Una vez obtenidos se ensayaron junto a los anteriores siguiendo las premisas establecidas con anterioridad.

Paralelamente al desarrollo de estos compuestos, se replanteó la metodología experimental seguida hasta este momento con el fin de acortar el proceso sintético. En este sentido, se desarrolló una nueva metodología “one-pot” que permitió la preparación de nuevos derivados sin necesidad de aislar previamente el carbamato intermedio de las correspondientes anilinas.

La estrategia sintética propuesta se muestra a continuación:



Esquema 2.9.- Esquema sintético propuesto para la nueva metodología “one-pot”.

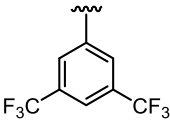
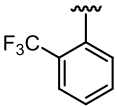
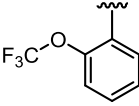
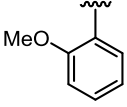
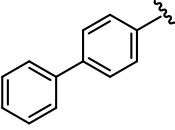
Esta estrategia es similar a la anterior, salvo por que emplea cloroformiato de *p*-nitrofenilo para llevar a cabo la formación de los carbamatos correspondientes²²⁸ y DMAP como catalizador en la reacción de acoplamiento posterior.

²²⁸ Izdebski, J.; Pawlak, D. *Synthesis* **1989**, 423-425.

El cloroformiato de *p*-nitrofenilo es un sustrato más reactivo que su análogo no funcionalizado, pero también considerablemente inestable. Su empleo en este tipo de reacciones estaba muy restringido debido a su alto grado de descomposición, pero dado que estos intermedios se hacen reaccionar *in situ*, se evitarán los inconvenientes derivados del uso de este reactivo. Además se establecieron nuevas condiciones de reacción mucho más suaves que en el caso anterior, realizando todo el proceso a temperatura ambiente.

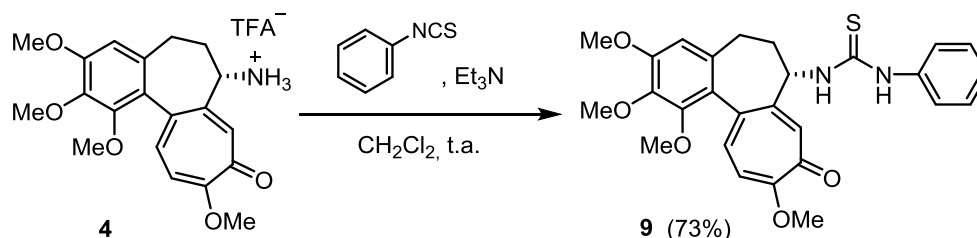
Inicialmente, para determinar el alcance y la aplicabilidad de la nueva metodología, se ensayaron varios sustratos que presentan tanto grupos electrón-atrayentes como grupos electrón donantes, así como un sistema de bifenilo con gran impedimento estérico y baja reactividad. De esta manera fue posible obtener los derivados esperados (**6x-b'**) en una sola etapa y en condiciones de reacción más suaves (Tabla 2.6).

Tabla 2.6.- Ureas finales obtenidas siguiendo la metodología "one-pot".

Compuesto	-Ar	Rendimiento
6x		22%
6y		16%
6z		15%
6a'		41%
6b'		31%

Lamentablemente, los rendimientos observados fueron mucho menores que en los casos anteriores, debido a los productos secundarios formados durante el transcurso de la reacción. Aún así, la metodología mostrada es sencilla, eficaz, y experimentalmente viable para el desarrollo de nuevos derivados de colquicina que presenten en su estructura una agrupación urea.

Por último y con el fin de determinar la importancia del grupo funcional urea sobre la actividad antitumoral de estos compuestos, se preparó el correspondiente análogo que presentaba una función tiourea en su lugar. Para la obtención de este compuesto se hizo reaccionar **4** con fenilisotiocianato en medio básico.²²⁹ El derivado esperado **9** se obtuvo con buen rendimiento (Esquema 2.10).



Esquema 2.10.- Preparación de una tiourea derivada de colquicina.

Los ensayos biológicos revelaron una gran acción citotóxica para la mayoría de los derivados preparados. Aparte de ello, ciertos análogos exhibieron también una buena capacidad antiangiogénica e inhibidora del enzima telomerasa. No obstante, estos sustratos al igual que el producto natural del que derivan, mostraron una toxicidad muy elevada para células somáticas normales (HEK-293), observándose en algunos casos un margen terapéutico muy estrecho para poder ejercer una acción farmacológica lo bastante eficiente.

Por tanto, se consideró conveniente ver el modo de reducir el valor de este parámetro con el fin de mejorar la selectividad y especificidad de estos derivados, tratando de que actuaran principalmente sobre las células aberrantes. Este aspecto se desarrolla en el apartado siguiente.

²²⁹ Nishiyama, H.; Ono, M.; Sugimoto, T.; Sasai, T.; Asakawa, N.; Ueno, S.; Tominaga, Y.; Yaegashi, T.; Nagaoka, M.; Matsuzaki, T.; Kogure, N.; Kitajima, M.; Takayama, H. *Med. Chem. Commun.* **2014**, *5*, 452-458.

4.3.2.- FAMILIA DE CARBAMATOS DERIVADOS DE COLQUICINA

En conexión con lo comentado en el apartado anterior, se decidió llevar a cabo la preparación de una nueva familia de derivados de colquicina que mostrase unos niveles de toxicidad frente a células somáticas inferiores a los observados para los análogos ureicos. El propósito es disponer de una mayor selectividad hacia las células cancerosas y de una ventana terapéutica más amplia que la de los compuestos mencionados.

Con esta finalidad y basándonos en precedentes de otros temas estudiados con anterioridad por el grupo de investigación, se decidió sustituir la agrupación urea por una función uretano, preparando carbamatos derivados de colquicina con fenoles diferentemente funcionalizados. Además se trató de que estos sustratos se asemejasen estructuralmente a los derivados preparados en el apartado anterior, con el objetivo de comparar los valores de actividad obtenidos para ambas familias.

El estudio se inició a partir del compuesto **5**, obtenido según se ha detallado anteriormente (Esquema 2.5). A continuación se preparó una pequeña quimioteca de moléculas con la estructura general indicada y diferente funcionalización sobre el anillo de fenol.

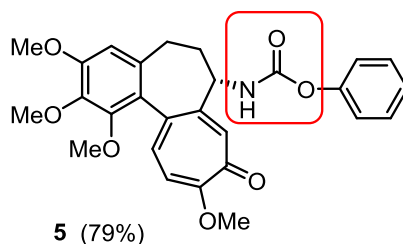
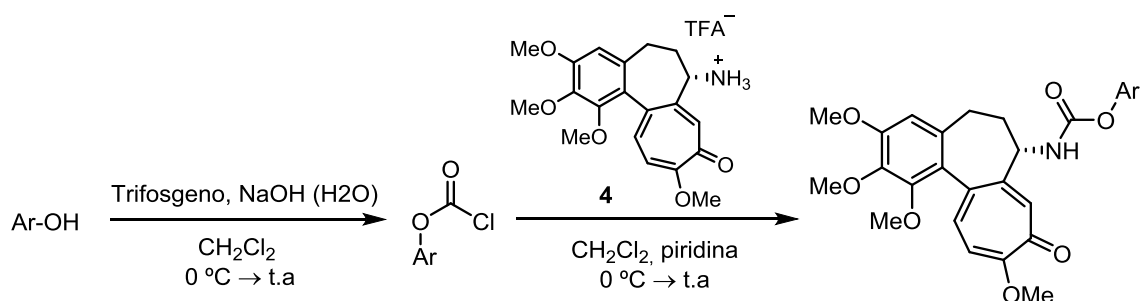


Figura 2.21.- Estructura del compuesto 5, primer análogo de la familia de carbamatos de colquicina.

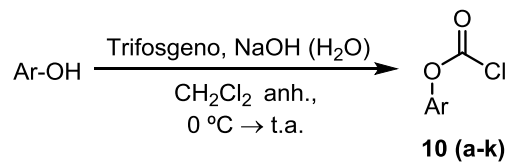
Dado que no se disponía de los cloroformatos funcionalizados necesarios, fue preciso preparar en primer lugar cada uno de ellos y hacerlos reaccionar a continuación con el compuesto **4**, para lograr obtener los análogos esperados (Esquema 2.11). La estrategia sintética propuesta para la preparación de estos derivados se muestra a continuación.

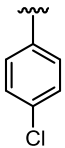
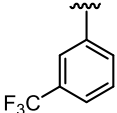
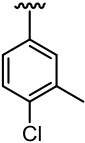
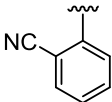
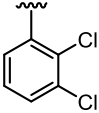
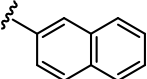
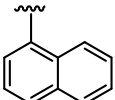


Esquema 2.11.- Estrategia sintética para la preparación de carbamatos derivados de colquicina.

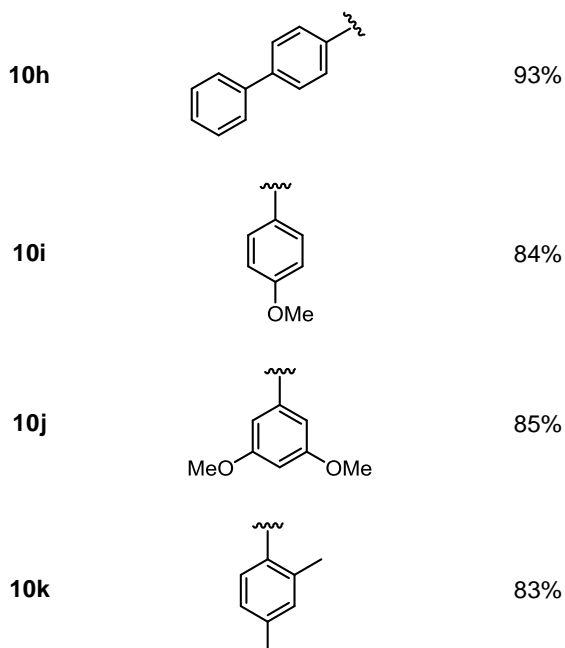
Como muestra el esquema anterior, la ruta sintética se inició con la preparación de los correspondientes cloroformiatos funcionalizados a partir de fenoles y trifosgeno,²³⁰ siguiendo las condiciones indicadas en la tabla 2.7.

Tabla 2.7.- Preparación de los cloroformiatos correspondientes **10(a-k)**.



Compuesto	-Ar	Rendimiento
10a		69%
10b		27%
10c		66%
10d		74%
10e		74%
10f		72%
10g		89%

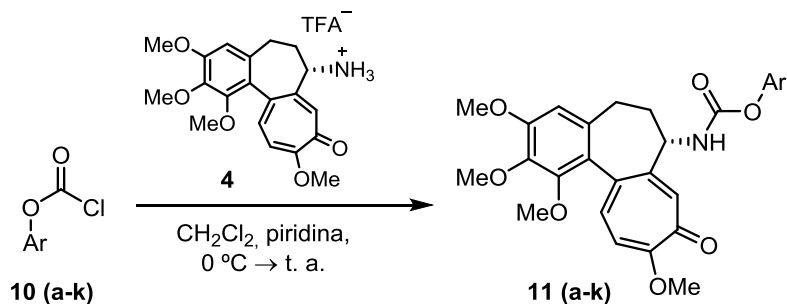
²³⁰ Shi, H.; Hu, W.; Sun, Y. *J. Chem. Res.* **2004**, 10, 708-709.

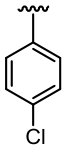
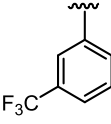
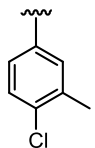
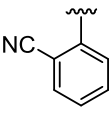
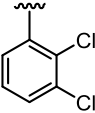
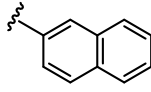
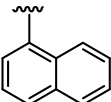
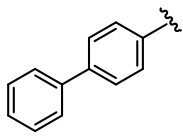
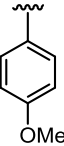
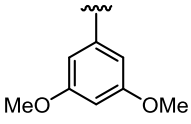
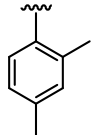


Para la preparación de estos derivados (**10a-k**) se emplearon fenoles con diferente tipo de funcionalización, tanto con grupos dadores de electrones como con grupos aceptores. Además, tratando de comparar los valores de actividad con los sustratos de la familia anterior, se prepararon también cloroformatos derivados de fenoles voluminosos y con gran capacidad de deslocalización electrónica como son el α -naftol, β -naftol y el 4-fenilfenol.

Estos cloroformatos son sustancialmente inestables, por lo que tras eliminar el exceso de base, se hicieron reaccionar directamente en la siguiente etapa de la síntesis sin purificación ni caracterización previa, obteniéndose los compuestos finales esperados con rendimientos aceptables. Para ello se trató el crudo obtenido en la reacción anterior con el compuesto **4** en piridina/ CH_2Cl_2 (Tabla 2.8). Los rendimientos obtenidos son significativamente dispares y dependen con toda probabilidad del grado de formación previo de los cloroformatos correspondientes.

Tabla 2.8.- Preparación de carbamatos derivados de colquicina.



Compuesto	-Ar	Rendimiento
11a		38%
11b		42%
11c		39%
11d		34%
11e		42%
11f		65%
11g		60%
11h		42%
11i		57%
11j		58%
11k		51%

Siguiendo la metodología sintética descrita fue posible preparar varios carbamatos derivados de colquicina (**5** y **11a-k**) con rendimientos aceptables. Esta nueva familia de compuestos se ensayará posteriormente para determinar su citotoxicidad y establecer si presentan una mayor selectividad y una ventana terapéutica más amplia que los análogos ureicos estudiados.

5.- DISEÑO Y SÍNTESIS DE DERIVADOS DE COMBRETASTATINA A-4

5.-DISEÑO Y SÍNTESIS DE DERIVADOS DE COMBRETASTATINA

5.1.- INTRODUCCIÓN

Combretastatina A-4 es el nombre que recibe un producto natural aislado de la especie vegetal africana *Combretum caffrum* Kuntze, junto con otros derivados de naturaleza similar. Esta especie arbórea de 15 m de altura se encuentra principalmente en los lechos de los arroyos y su raíz ha sido empleada durante siglos por los Zulú, como parte de rituales mágicos para acometer contra sus enemigos.²³¹ Esta especie ha presentado gran relevancia en la medicina tradicional, especialmente en África, India²³² o Somalia,²³³ donde estudios recientes parecen apoyar su eficacia.



Figura 2.22.- *Combretum caffrum* K.

En 1979, Pettit y colaboradores publicaron un estudio acerca de potenciales inhibidores del crecimiento de células cancerosas presentes en esta familia vegetal, lo que desembocó en el aislamiento y determinación de una serie de fenantrenos, estilbenos y dibencilos biológicamente activos.²³⁴

En primer lugar se aisló un producto al que denominaron dibencilcombretastatina, que mostró poseer buenas propiedades antitumorales. Posteriormente se aislaron otros nuevos y aún más potentes inhibidores, de entre los que cabe destacar la combretastatina A-1 y la combretastatina A-4 (Figura 2.23).²³⁵ Otros compuestos de naturaleza y estructura similar a los anteriores, que se han aislado de las mismas fuentes, son las combretastatinas A-2, A-3, A-5, A-6, B-1 y B-2. De entre todos los compuestos antes mencionados, la atención se centrará principalmente en la combretastatina A-4 (abreviada en adelante CA-4).

²³¹ Pettit, G. R.; Cragg, G. M.; Herald, D. L.; Schmidt, J. M.; Lohavaniyaya, P. *Can. J. Chem.* **1982**, *60*, 1374-1376.

²³² a) Watt, J. M.; Breyer-Brandwijk, M. G. *Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa*, 2º Ed. E. & S. Livingston Ltd. Londres, **1962**. b) Kokwaro, O. *Medicinal Plants of East Africa*. East African Literature Bureau. Nairobi, Kenya, **1976**.

²³³ Samuelsson, G.; Farah, M. H.; Claeson, P.; Hagos, M.; Thulin, M.; Hedberg, O.; Warfa, A. M.; Hassan, A. O.; Elmi, A. H.; Abdurahman, A. D.; Elmi, A. S.; Abdi, Y. A.; Alin, M. H. *J. Ethnopharmacol.* **1992**, *37*, 47-70.

²³⁴ a) Pettit, G. R.; Singh, S. B.; Niven, M. L.; Hamel, E.; Schmidt, J. M. *J. Nat. Prod.* **1987**, *50*, 119-131. b) Pettit, G. R.; Singh, S. B. *Can. J. Chem.* **1987**, *65*, 2390-2396.

²³⁵ Pettit, G. R.; Singh, S. B.; Hamel, E.; Lin, C. M.; Alberts, D. S.; Garcia-Kendall, D. *Experientia* **1989**, *45*, 209-211.

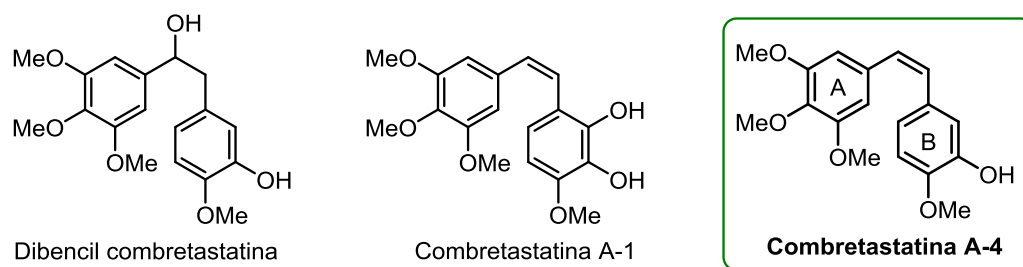


Figura 2.23.- Estructura de algunos productos naturales aislados de la planta *Combretum caffrum*.

Se trata de un sólido blanco con un punto de fusión de 116 °C. Su estructura (Figura 2.23) contiene un sistema de *cis*-estilbeno formado por dos anillos bencénicos con diferente grado de sustitución. Uno de ellos (anillo A) se encuentra trisustituído con tres grupos metoxilo, mientras que el otro (anillo B) presenta un grupo metoxilo en posición *para* y una función hidroxilo en posición *meta* con respecto al enlace olefínico que conecta ambos anillos.

La relevancia biológica de este compuesto reside en su gran acción antitumoral, manifestada a través de su capacidad de interferir en la formación de microtúbulos, inhibir la proliferación de células cancerosas e inducir su apoptosis. De ahí que sea considerado como un compuesto valioso en la terapia anticancerígena.

5.1.1.- COMBRETASTATINA A-4 COMO ANTITUMORAL

Como se ha enunciado en el apartado anterior, este compuesto inhibe el proceso de división celular provocando la disrupción de los microtúbulos que forman el huso mitótico. La CA-4 interacciona con la subunidad de β -tubulina en el denominado sitio de unión colquicinoide,²³⁶ situado en la zona de interfase con la siguiente subunidad de α -tubulina (ver Figura 2.19). Esto no resulta sorprendente en vista de la similitud estructural que presentan ambos sustratos, lo que sugiere que el mecanismo de acción de este compuesto podría ser muy similar al detallado anteriormente para la colquicina.

Además de la acción antimitótica, se ha investigado también la capacidad antiangiogénica de la CA-4, habiendo sido publicados numerosos estudios que ponen de manifiesto la existencia de tal propiedad.²³⁷ Pese a que su mecanismo de acción no está completamente establecido, estudios *in vivo* realizados apoyan la hipótesis de que la CA-4 actúa aumentando la permeabilidad de los vasos sanguíneos tumorales, lo cual se traduce en un rápido colapso vascular y en la consiguiente paralización del proceso de metástasis.²³⁸

²³⁶ a) Chen, J.; Liu, T.; Dong, X.; Hu, Y. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2009**, *9*, 1174-1190. b) Soullère, L. *Chem. Med. Chem.* **2009**, *4*, 161-163. c) Tripathi, A.; Durrant, D.; Lee, R. M.; Baruchello, R.; Romagnoli, R.; Simoni, D.; Kellogg, G. E. *J. Enzyme Inhibit. Med. Chem.* **2009**, *24*, 1237-1244.

²³⁷ a) Grosios, K.; Holwell, S. E.; McGown, A. T.; Pettit, G. R.; Bibby, M. C. *Br. J. Cancer* **1999**, *81*, 1318-1327. b) Iyer, S.; Chaplin, D. J.; Rosenthal, D. S.; Mainiti Boulares, A.; Li, L. Y.; Smulson, M. E. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 4510-4514.

²³⁸ Dark, G. G.; Hill, S. A.; Prise, V. E.; Tozer, G. M.; Pettit, G. R.; Chaplin, D. J. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 1829-1834.

El uso de CA-4 en la terapia anticancerígena está sometido a ciertas limitaciones relacionadas con su elevada lipofilia. Además, presenta una escasa vida media en el interior del organismo debido a la continua isomerización del doble enlace (*E/Z*) que provoca la pérdida completa de actividad.

5.1.2.- ANTECEDENTES Y ESTUDIOS DE ESTRUCTURA-ACTIVIDAD

Existen muchos ejemplos en la literatura de análogos de CA-4 capaces de ejercer un efecto antitumoral similar al del producto natural.²³⁹ Estudios de estructura-actividad de los análogos preparados han demostrado que el anillo de fenilo trisustituído con tres grupos metoxilo (anillo A) y la configuración *cis*- del doble enlace son esenciales para mantener la capacidad de unión al heterodímero de tubulina y por tanto, mantener la actividad antitumoral mencionada.^{240,241} En cambio, los sustituyentes presentes en el anillo B, más concretamente el grupo hidroxilo presente en la posición 3', han resultado ser menos esenciales para mantener dicha interacción,²⁴² por lo que podrán ser susceptibles de modificarse sin alterar excesivamente la actividad biológica de la molécula.

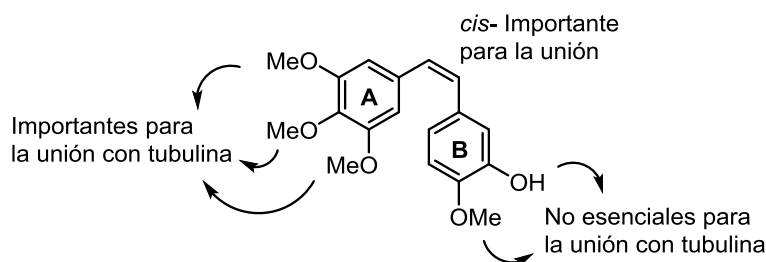


Figura 2.24.- Estudios de estructura-actividad para la molécula de CA-4.

Se han ensayado numerosos derivados en los que se ha modificado la disposición electrónica y/o espacial del grupo hidroxilo (OH), o bien se ha sustituido este grupo por otro, tratando de modular los valores de actividad obtenidos. Entre los análogos preparados se incluyen compuestos que presentan en su estructura átomos de halógeno, aminas, ácidos borónicos, grupos nitro, amidas, alcóxidos y acilos entre otros.²⁴³

²³⁹ a) Messaoudi, S.; Treguier, B.; Hamze, A.; Provot, O.; Peyrat, J. F.; De Losada, J. R.; Liu, J. M.; Bignon, J.; Wdzieczak-Bakala, J.; Thoret, S.; Dubois, J.; Brion, J. D.; Alami, M. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 4538-4542.

b) Shan, Y.; Zhang, J.; Liu, Z.; Wang, M.; Dong, Y. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 523-538.

²⁴⁰ a) Liou, J. P.; Chang, J. Y.; Kuo, F. M.; Chang, C. W.; Tseng, H. Y.; Wang, C. C.; Yang, N. Y.; Lee, S. J.; Hsieh, H. P. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 4247-4257. b) Liou, J. P.; Chang, J. Y.; Chang, C. W.; Cahng, C. Y.; Mahindroo, N.; Kuo, F. M.; Hsieh, H. P. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2897-2905.

²⁴¹ Gaukroger, K.; Hadfield, J. A.; Hepworth, L. A.; Lawrence, N. J.; McGown, A. T. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 8135-8138.

²⁴² a) Woods, J. A.; Hadfield, J. A.; Pettit, G. R.; Fox, B. W.; McGown, A. T. *Br. J. Cancer* **1995**, *71*, 705-711.

b) Ma et al. *Chem. Cent. J.* **2013**, *7*, 179-186.

²⁴³ a) Lawrence, N. J.; Hepworth, L. A.; Rennison, D.; McGown, A. T.; Hadfield, J. A. *J. Fluorine Chem.* **2003**, *123*, 101-108. b) Kong, Y.; Grembecka, J.; Edler, M. C.; Hamel, E.; Mooberry, S. L.; Sabat, M.; Rieger, J.; Brown, M. L. *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 1007-1014. c) Pettit, G. R.; Rhodes, M. R.; Herald, D. L.; Hamel, E.; Schmidt, J. M.; Pettit, R. K. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4087-4099.

Con todo lo anterior son muchos los ejemplos en la literatura de análogos de CA-4 que tratan de mejorar las propiedades farmacológicas del producto natural y a la vez solventar los problemas de aplicabilidad antes mencionados.

5.1.3.- PERSPECTIVAS DE FUTURO

En la actualidad ha aumentado marcadamente el interés científico de los grupos de investigación en esta familia de compuestos, para tratar de obtener análogos de este producto natural que presentasen mejores valores de actividad que los obtenidos hasta el momento.

Se han diseñado nuevas estructuras con diversos sustituyentes y grupos funcionales, así como híbridos mixtos entre CA-4 y otras moléculas cuya actividad antitumoral ya estaba contrastada. Los buenos valores descritos, su relativa sencillez estructural y los nuevos retos sintéticos y biológicos que se plantean, convierten a la CA-4 en un *hit* prometedor para el desarrollo de nuevos y potentes agentes antitumorales.²⁴⁴

5.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Los objetivos específicos planteados para la preparación de esta serie de derivados se muestran a continuación:

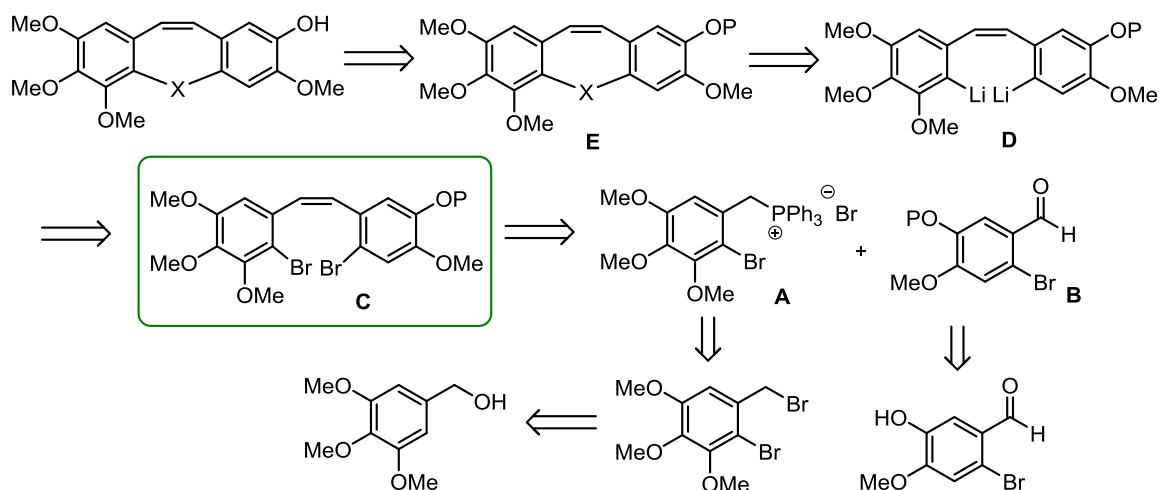
1.- Diseño y síntesis de nuevos derivados tricíclicos de CA-4 en los que la presencia del ciclo adicional sirviese para solventar el problema de estabilidad causado por la isomerización (Z/E) del doble enlace olefínico.

2.- Evaluación biológica de los compuestos obtenidos atendiendo a las tres líneas de estudio que son objeto de nuestra investigación, con el fin de determinar su potencial actividad como agentes antitumorales.

3.-Reevaluación y rediseño de las estructuras objetivo, en función de los resultados de las evaluaciones biológicas y de los estudios estructurales realizados.

En conexión con lo anterior y en base a los objetivos planteados, se diseñó inicialmente el siguiente esquema retrosintético (Esquema 2.12).

²⁴⁴ Tron, G. C.; Pirali, T.; Sorba, G.; Pagliai, F.; Busacca, S.; Genazzani, A. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3033-3044.



Esquema 2.12.- Esquema propuesto para la preparación de derivados tricíclicos de CA-4.

El anillo trisustituido provendría de un bromuro de bencilo adecuadamente funcionalizado, que se convertiría en la correspondiente sal de fosfonio **A**.²⁴⁵ Ésta se haría reaccionar posteriormente con el bromoaldehído **B**, mediante un proceso de olefinación de Wittig para dar lugar al *cis*-estilbeno **C**.

Para llevar a cabo la protección del grupo OH se estudiarían diferentes grupos funcionales, tratando de optimizar el rendimiento y la estereoselectividad de la reacción de Wittig posterior.²⁴⁶ De acuerdo con precedentes bibliográficos se esperaría que dicha reacción proporcionara una buena estereoselectividad *Z*. Una vez obtenida la olefina deseada (**C**) se llevaría cabo una doble litiación (intercambio bromo-litio) generando el dilitioderivado intermedio **D**, que se haría reaccionar a continuación con diferentes electrófilos (X^+)^{247,248} esperando obtener el compuesto cíclico **E**.

Como se ha comentado en el apartado anterior, el grupo X puede ser de muy diversa naturaleza. En este caso se trataría de un solo átomo que llevase incorporado un número determinado de sustituyentes y éste podría ser algún elemento de los grupos 14 (C, Si, Ge, Sn), 15 (N, P, As, Sb) o 16 (O, S, Se, Te). El reactivo electrófilo necesario para la inserción del fragmento X podría ser un haluro de estructura general R_2XHal_2 (grupo 14), $RXHal_2$ (grupo 15 salvo N) y $XHal_2$ (grupo 16 salvo O).

Así pues, se tratará de preparar una serie de análogos tricíclicos de CA-4 que posteriormente se someterán a evaluación biológica para determinar su acción farmacológica.

²⁴⁵ Harrowven, C.; Guy, I. L.; Howell, M.; Packhamb, G. *Synlett*. **2006**, 2977–2980.

²⁴⁶ a) Camacho-Dávila, A. *Synth. Commun.* **2008**, *38*, 3823-3833. b) Mercier, L. G.; Piers, W. E.; Parvez, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6108-6111.

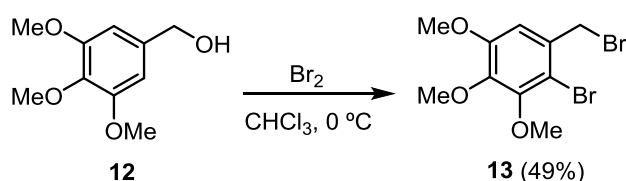
²⁴⁷ Caruso, A.; Maxime, Jr.; Siegler, A.; Tovar, J. D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 4213-4217.

²⁴⁸ a) Mercier, L. G.; Furukawa, S.; Piers, W. E.; Wakamiya, A.; Yamaguchi, S.; Parvez, M.; Harrington, R. W.; Clegg, W. *Organometallics* **2011**, *30*, 1719-1729. b) Yoshida, K.; Furuyama, T.; Wang, C.; Muranaka, A.; Hashizume, D.; Yasuike, S.; Uchiyama, M. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 729-732.

5.3.- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

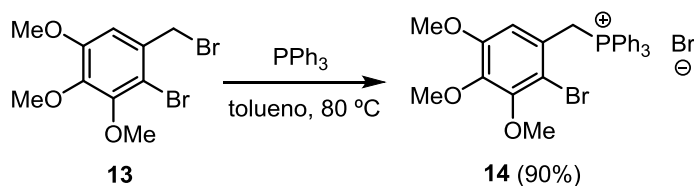
Para llevar a cabo la estrategia descrita en el apartado anterior (Esquema 2.12) fue preciso funcionalizar inicialmente los dos sustratos de partida: 3,4,5-trimetoxifenil metanol (**12**) para la preparación del fragmento A y 2-bromo-5-hidroxi-4-metoxi benzaldehído (**15**) para la obtención del compuesto B.

Por un lado, el tratamiento del compuesto **12** con Br₂ en CHCl₃ a 0 °C, dio lugar al bromo derivado **13**.²⁴⁵ El rendimiento obtenido para esta reacción fue moderado ya que también se generó una gran cantidad de producto secundario de dibromación sobre el anillo aromático.



Esquema 2.13.- Bromación del alcohol bencílico **12**.

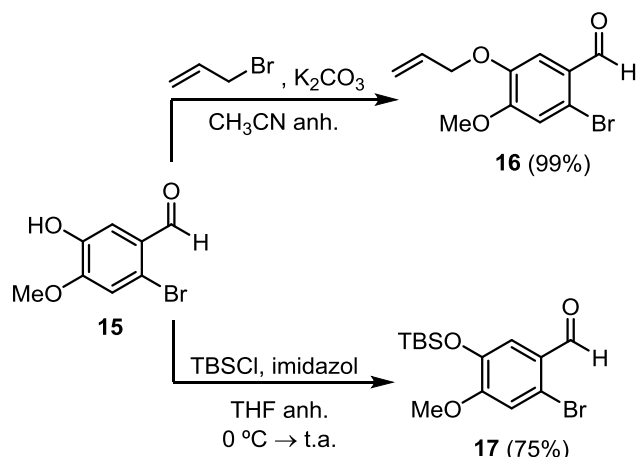
Una vez obtenido **13**, se transformó en la correspondiente sal de fosonio **14** por tratamiento con trifenilfosfina (PPh₃) en tolueno a 80 °C.



Esquema 2.14.- Formación de la sal de fosonio **14 (A)**

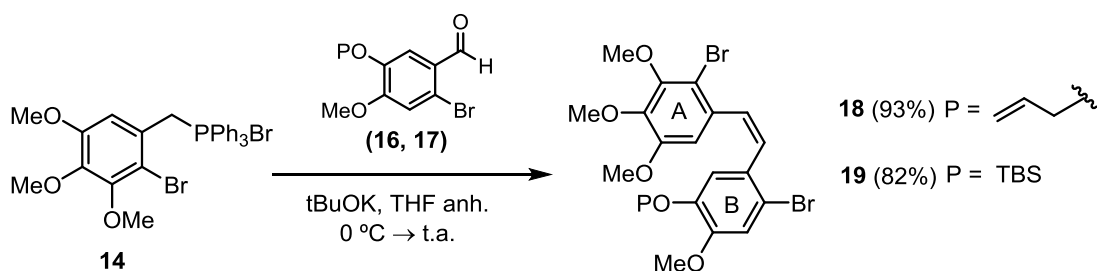
Por otra parte, para la funcionalización del compuesto B se llevó a cabo la protección del grupo hidroxilo presente en el aldehído **15**. Se seleccionaron para ello alilo y *t*-butildimetilsililo (TBS) como grupos protectores, empleándose bromuro de alilo²⁴⁵ y cloruro de *t*-butildimetilsililo²⁴⁹ como reactivos. Siguiendo las condiciones de reacción mostradas en el esquema 2.15, fue posible obtener los derivados esperados con buenos rendimientos.

²⁴⁹ Green, T. W.; Wuts, P. G. M. *Protective Groups in Organic Synthesis*, Wiley-Interscience, Nueva York, 1999.



Esquema 2.15.- Protección del aldehído **15** con un grupo alilo y con un grupo TBS.

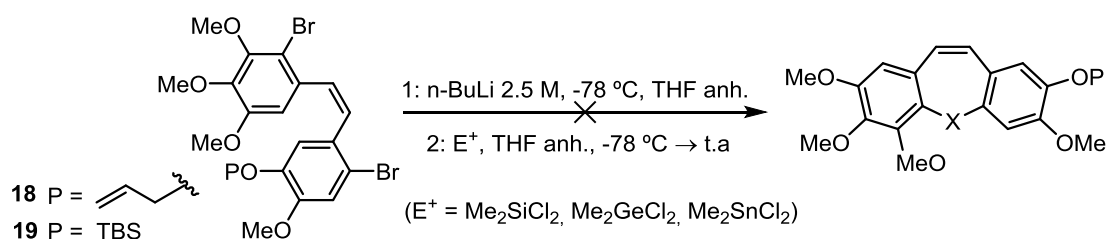
Se llevó a cabo entonces la reacción de Wittig entre la sal de fosfonio **14** y los aldehídos anteriores **16** y **17**. Para realizar este acoplamiento se empleó ^tBuOK como base en THF anhidro (Esquema 2.16), dando lugar a los compuestos esperados con buenos rendimientos y una excelente estereoselectividad (se aísla únicamente el isómero *Z*).²⁴⁵



Esquema 2.16.- Reacción de Wittig *Z*-selectiva.

Estos intermedios son considerablemente inestables en presencia de luz o trazas de ácido, por lo que fue necesario almacenarlos adecuadamente para evitar los problemas de isomerización antes mencionados.

Llegados a este punto se estudió la transformación descrita en el esquema 2.17, que se esperaba condujera a la formación del anillo tricíclico deseado. El propósito era convertir los sustratos intermedios **18** y **19** en los correspondientes dilitoderivados por tratamiento con *n*-BuLi y una vez obtenidos, se trataría de hacerlos reaccionar *in situ* con diferentes agentes electrofílicos (X^+).



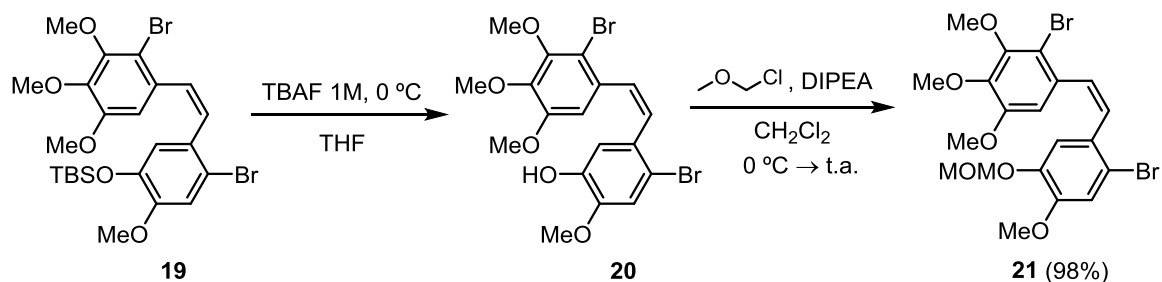
Esquema 2.17.- Intentos de ciclación de **18/19** con diferentes electrófilos $E^+ = Me_2XCl_2$.

Como agentes electrofílicos se emplearon inicialmente compuestos de fórmula general Me_2XCl_2 , formados por elementos del grupo 14. No obstante, en ninguno de los casos ensayados fue posible obtener el compuesto final deseado.

En el caso del compuesto **18** se obtuvieron, independientemente del electrófilo empleado, únicamente productos de degradación del reactivo inicial debido a la interacción, probablemente desprotonación, del grupo alilo con *n*-BuLi. Esto impidió que la reacción evolucionase y se obtuviera el derivado tricíclico deseado.

Por otra parte, en el caso del sustrato **19** se obtuvieron varios compuestos en los que pese a que la reacción de litación parecía haber tenido lugar, no se había logrado introducir el reactivo electrofílico propuesto. Para todos los casos ensayados se obtuvo principalmente el producto de deshalogenación reductora del reactivo de partida, conjuntamente con otros subproductos de degradación. Además, se observó la formación de un producto secundario en el que el grupo TBS no se encontraba situado sobre el grupo hidroxilo (OH). Éste había interactuado con la base empleada, produciéndose su migración a otra posición del anillo de fenilo ([1,2] o [1,4]), impidiendo así el avance de la reacción. Esta migración ocurre probablemente a través de un mecanismo de tipo retro-Brook.²⁵⁰

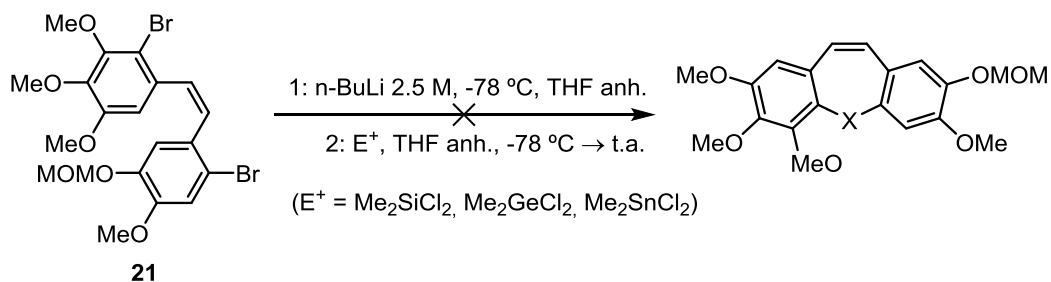
En vista de los inconvenientes mencionados derivados del uso de estos grupos protectores, se decidió estudiar la reacción anterior empleando MOM como agente bloqueante. Para ello se eliminó el grupo TBS del compuesto **19** y se introdujo a continuación el grupo MOM, empleando cloro(metoxi)metano como electrófilo y DIPEA como base, dando lugar al derivado protegido **21**.²⁴⁹



Esquema 2.18.- Protección del grupo hidroxilo con un grupo MOM.

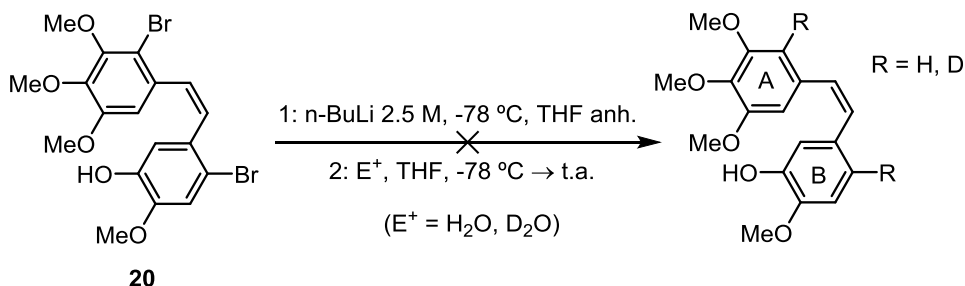
A continuación se trató el compuesto **21** en las mismas condiciones que los derivados anteriores (**18**, **19**), buscando interconectar ambos anillos a través de los reactivos electrofílicos planteados (Esquema 2.19). Sin embargo, al igual que ocurría para el compuesto **19**, se obtuvo principalmente el correspondiente subproducto de deshalogenación reductora, no lográndose aislar el derivado tricíclico esperado.

²⁵⁰ a) Brook, A. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 1886-1889. b) Brook, A. G. *Acc. Chem. Res.* **1974**, *7*, 77-84. c) Gossage, R. A. et al. *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 2191-2197.



Esquema 2.19.- Intentos de ciclación de **21** con diferentes electrófilos E⁺ = Me₂XCl₂.

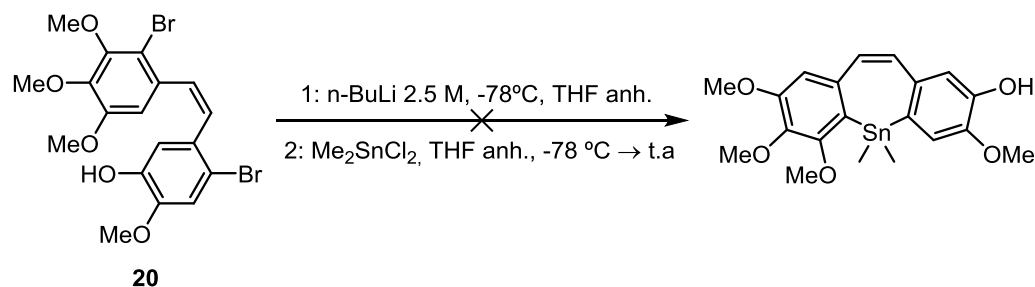
Con el objetivo de establecer definitivamente la influencia de los grupos protectores en el transcurso de la reacción, se decidió investigar esta transformación empleando como reactivo de partida el compuesto **20**, en el que el grupo hidroxilo se encontraba desprotegido. Por un lado, se emplearon inicialmente como reactivos electrofílicos H₂O y D₂O, a fin de determinar si se producía efectivamente el intercambio bromo-litio (Esquema 2.20).



Esquema 2.20.- Intento de reacción entre el litioderivado de **20** y diferentes electrófilos monodentados.

La reacción con dichos electrófilos dejó patente que se producía el esperado intercambio litio-halógeno, pero que este organolítico reaccionaba con una cinética marcadamente diferente en ambos anillos de la molécula. Por un lado, empleando H₂O como agente electrofílico se obtenía CA-4 como producto final, resultado esperable de la protonación del dilitioderivado intermedio. En cambio, empleando D₂O se producía la sustitución únicamente sobre el anillo A. Esto parece indicar que, sorprendentemente, el enlace C–Li del anillo B exhibe una insuficiente reactividad como para interactuar con el electrófilo propuesto, introduciéndose en su lugar un átomo de hidrógeno durante el procesado (*work-up*) posterior.

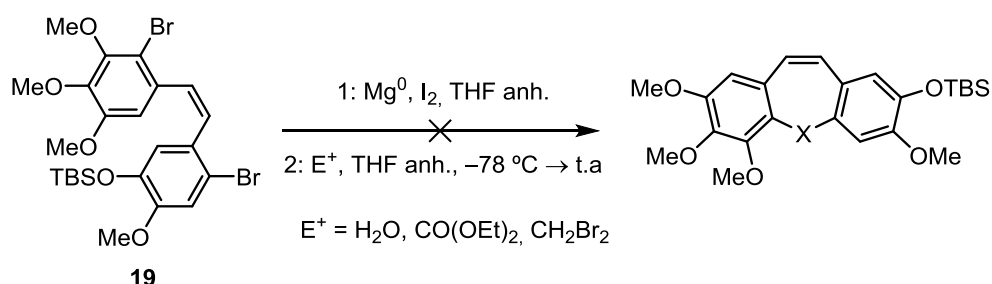
Por causa precisamente de esta insuficiente reactividad del enlace C–Li, al llevar a cabo la reacción en presencia de Me₂SnCl₂ no se obtuvo el compuesto de ciclación esperado (Esquema 2.21), observándose en cambio la formación de los mismos productos de deshalogenación reductora que en los casos anteriores. Se concluyó finalmente que esta estrategia no era viable para llevar a cabo este tipo de transformación, debido principalmente a la singular naturaleza del sustrato de partida y de los reactivos electrofílicos empleados.



Esquema 2.21.- Intento de acoplamiento intramolecular entre el compuesto **20** y Me_2SnCl_2 .

Como estudio complementario y dado que los reactivos organolíticos no dieron buenos resultados, se pensó en llevar a cabo este acoplamiento empleando reactivos organomagnesianos.²⁵¹ Como electrófilo se empleó H_2O para determinar la viabilidad de la reacción y además $\text{CO}(\text{OEt})_2$ y CH_2Br_2 con la intención de introducir un átomo de carbono como átomo puente. Estos ensayos se realizaron partir del compuesto **19**, ya que al no usar reactivos organolíticos, no se esperaba observar los problemas derivados de la presencia del grupo TBS.

Se empleó inicialmente Mg^0 para generar el correspondiente organomagnesiano.

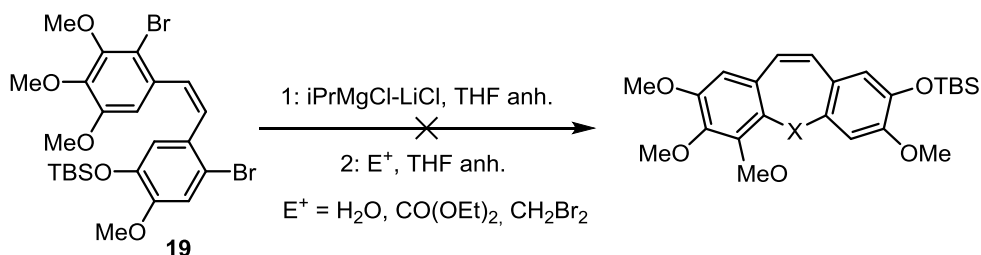


Esquema 2.22.- Intentos de acoplamiento intramolecular empleando Mg^0 .

En todos los casos estudiados se recuperó únicamente el producto de partida sin reaccionar. Ello indicaba que este sistema no era lo suficientemente reactivo como para metalar los enlaces C-Br, ya que no se llegaba ni siquiera a obtener el producto de deshalogenación correspondiente.

En un posterior intento por mejorar la reactividad de los enlaces C-Br se empleó $i\text{PrMgCl}/\text{LiCl}$, cuya capacidad de metalar enlaces de este tipo es marcadamente más alta. Los electrófilos empleados fueron los mismos que en el apartado anterior y la reacción se ensayó tanto a baja temperatura como a reflujo, en THF como disolvente (Esquema 2.23).

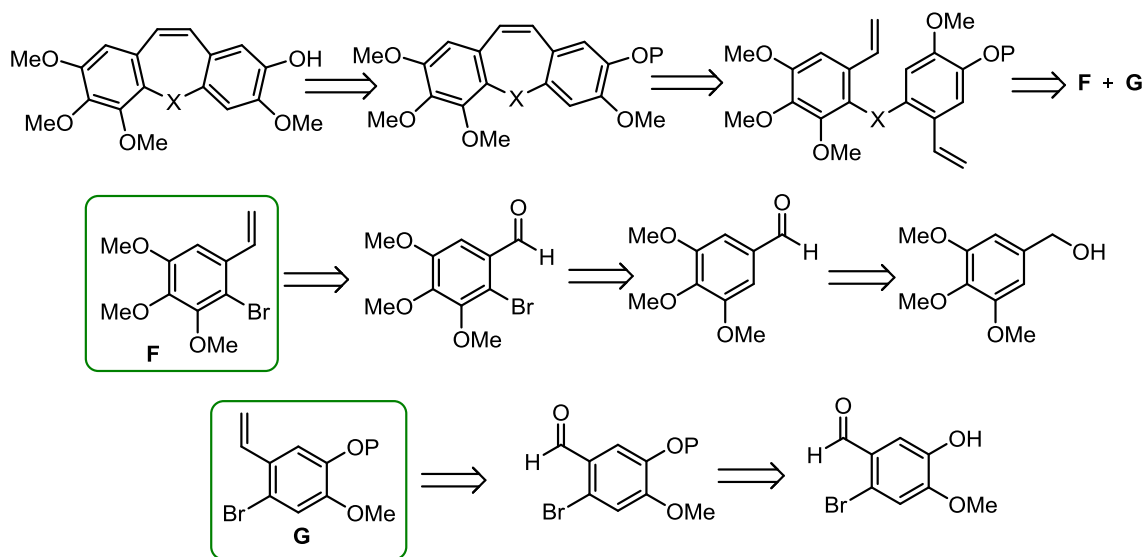
²⁵¹ a) Knochel, P.; Kmsovski, A.; Sapountzis, L. *Polyfunctional Magnesium Organometallics for Organic Synthesis. Handbook of Functionalized Organometallics: Applications in Synthesis*, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Alemania, **2005**. b) Klatt, T.; Markiewicz, J. T.; Sämann, C.; Knochel, P. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 4253-4269. c) Gregson, A. M.; Wales, S. M.; Bailey, S. J.; Willis, A. C.; Keller, P. A. *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 9774-9780.



Esquema 2.23.- Intentos de acoplamiento intramolecular empleando $i\text{PrMgCl/LiCl}$.

Al igual que en el caso anterior, se recuperó mayoritariamente el sustrato de partida sin reaccionar, con lo que queda patente que los derivados de Mg no son buenos agentes para llevar a cabo este tipo de transformación.

Con todo lo anterior y a la vista de que los resultados no fueron satisfactorios, se decidió modificar la estrategia sintética con el fin de obtener derivados tricíclicos del tipo esperado. Dado que la etapa limitante de la secuencia era la reacción de acoplamiento intramolecular, se pensó en llevar a cabo en primer lugar esta reacción de forma intermolecular y a continuación proceder a la formación del doble enlace olefínico. De esta manera se espera que la reacción de acoplamiento se vea favorecida y por tanto evitar los problemas de reactividad antes observados. La nueva metodología propuesta se muestra a continuación.



Esquema 2.24.- Esquema retrosintético propuesto para la nueva metodología.

Esta estrategia presenta como etapas clave una reacción de acoplamiento intermolecular entre los nuevos fragmentos **F** y **G**,^{247,248} y una posterior reacción de metátesis con cierre de anillo, catalizada por complejos de rutenio.²⁵² Como se ha mencionado previamente, la reacción de acoplamiento estaría facilitada con respecto al caso anterior debido a la mejor disposición espacial de las moléculas y al menor impedimento estérico.

²⁵² Matsuda, T.; Sato, S. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 3329-3335.

Reacción de metátesis olefínica

La reacción de metátesis olefínica implica una redistribución de los fragmentos de alquenos, producida por la escisión y regeneración de dobles enlaces carbono-carbono. Se trata de una reacción muy versátil, con gran aplicabilidad sintética y notable repercusión en diferentes áreas de la química.²⁵³ Este proceso fue descrito por primera vez en 1931, pero no fue hasta la década de los 50 cuando empezaron a desarrollarse las primeras reacciones catalizadas, gracias a los estudios desarrollados por Karl Ziegler sobre la polimerización de etileno.²⁵⁴

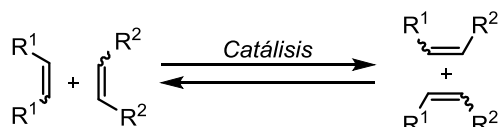


Figura 2.25.- Esquema general de la reacción de metátesis.

A continuación se muestra el ciclo catalítico por el que transcurren este tipo de reacciones, tal y como fue propuesto por Hérrison y Chauvin en 1971.²⁵⁵

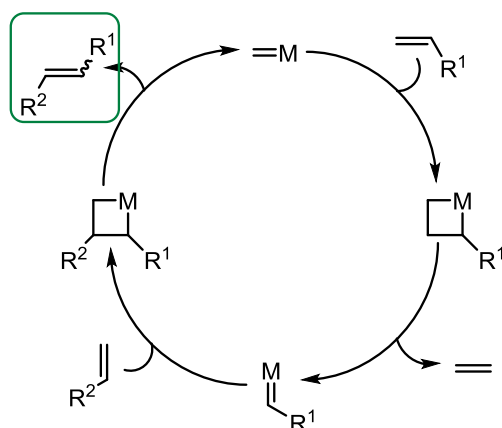


Figura 2.26.- Ciclo catalítico para la reacción de metátesis.

El ciclo comienza con la cicloadición [2+2] entre el enlace C=M del metal de transición y la olefina correspondiente, formando un intermedio de tipo metalacíclobutano. A continuación se produce una rápida escisión de este intermedio, generando etileno y un nuevo alquilideno metálico, que contiene tanto el metal como una parte de la olefina introducida. Este complejo alquilideno-metal reacciona con otra molécula de alqueno para producir un nuevo metalacíclobutano intermedio, que contiene ahora fragmentos de ambas olefinas. La escisión de este intermedio genera tanto el alqueno interno disustituído como un nuevo complejo alquilideno-metal, capaz de iniciar nuevamente el ciclo catalítico.²⁵⁶

²⁵³ a) Grubbs, R. H. *Tetrahedron* **2004**, 60, 7117-7140. b) Astruc, D. *New J. Chem.* **2005**, 29, 42-56.

²⁵⁴ Ziegler, K.; Holzkamp, E.; Breil, H.; Martin, H. *Angew. Chem.* **1955**, 67, 426.

²⁵⁵ Hérrison, J. L.; Chauvin, Y. *Makromol. Chem.* **1971**, 141, 161-176.

²⁵⁶ Soufflet, J. P.; Commereuc, D.; Chauvin, Y. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. Série C* **1973**, 276, 69.

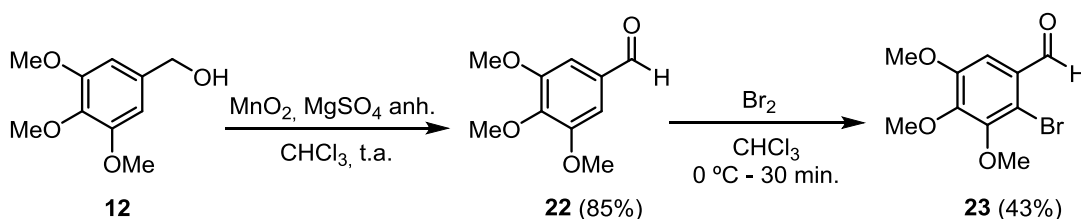
Existen varios tipos de metátesis que permiten una aplicación más amplia de esta reacción. Es posible llevar a cabo no sólo la metátesis con apertura y cierre de anillo sino también la denominada metátesis cruzada, que da lugar a la obtención del producto de acoplamiento entre ambas olefinas (Figura 2.27).



Figura 2.27.- Dos de los más importantes tipos de metátesis olefínica.

Desde el planteamiento del mecanismo propuesto, han sido muchas las contribuciones en el desarrollo de nuevos catalizadores capaces de mejorar la selectividad, alcance y eficiencia de la reacción.²⁵⁷ Sin embargo, entre todas las aportaciones es necesario mencionar las de R. R. Schrock²⁵⁸ y R. H. Grubbs²⁵⁹ en el desarrollo de nuevos complejos metal-alquilideno, que han tenido una influencia enorme en la química orgánica moderna. Ambos científicos recibieron el Premio Nobel de Química en 2005, junto con Y. Chauvin, por sus contribuciones en este campo.

Retomando la discusión de los resultados, para llevar a cabo la metodología propuesta en el esquema anterior (Esquema 2.24), fue necesario preparar inicialmente los dos derivados estirénicos requeridos (**F** y **G**). Para obtener **F** fue necesario disponer en primer lugar del bromoaldehído **23**, que se preparó en dos pasos a partir del alcohol bencílico comercial **12**.



Esquema 2.25.- Preparación del bromoaldehído **23**.

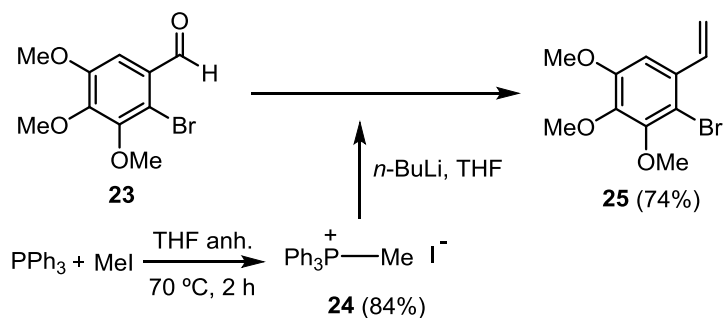
²⁵⁷ a) Truett, W. L.; Johnson, D. R.; Robinson, I. M.; Montague, B. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 2337-2338. b) Fischer, E. O. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1964**, *3*, 580-581. c) Casey, C. P.; Burkhardt, T. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 7808-7809. d) Eleuterio, H. S. *J. Mol. Catal.* **1991**, *65*, 55-61.

²⁵⁸ a) Schrock, R. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 6796-6797. b) Wood, D. C.; McLain, S. J.; Schrock, R. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 3210-3222. c) Schrock, R. R.; Rocklage, S. M.; Wengrovius, J. H.; Rupprecht, G.; Fellmann, J. *J. Mol. Catal.* **1980**, *8*, 73-75. d) Murdzek, J. S.; Schrock, R. R. *Organometallics* **1987**, *6*, 1373-1374. e) Schrock, R. R.; Murdzek, J. S.; Barzan, G. C.; Robbins, J.; DiMare, M.; O'Regan, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3875-3876.

²⁵⁹ a) Grubbs, R. H.; Brunck, T. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 2538-2540. b) Novak, B. M.; Grubbs, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 960-961. c) Nguyen, S. T.; Johnsson, L. K.; Grubbs, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3974-3975. d) Nguyen, S. T.; Grubbs, R. H.; Ziller, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9858-9859. e) Schwab, P.; Grubbs, R. H.; Ziller, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 100-110. f) Scholl, M.; Trnka, T. M.; Morgan, J. P.; Grubbs, R. H. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 2247-2250.

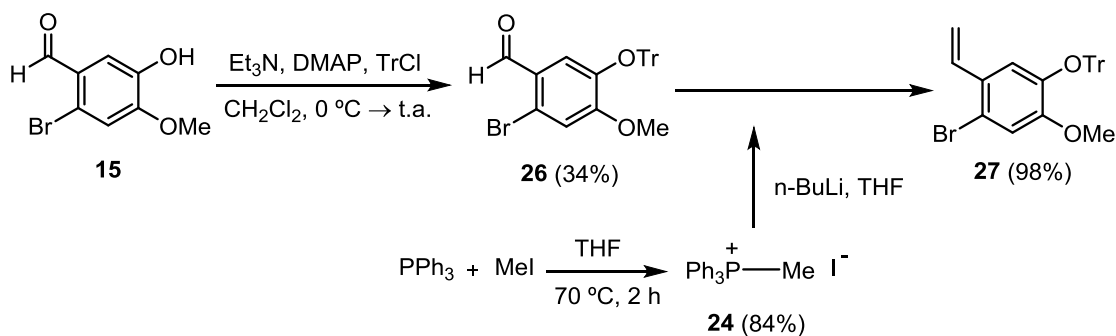
Este sustrato (**12**) se transformó por oxidación en el correspondiente aldehído **22**,²⁶⁰ que se sometió a continuación a una reacción de bromación selectiva en una de las posiciones *orto* a dicho grupo (Esquema 2.25). El rendimiento obtenido para esta transformación no fue muy elevado debido a la formación de productos secundarios de dibromación.

Una vez obtenido **23**, se le hizo reaccionar con el iluro derivado de la sal de fosfonio **24**,²⁶¹ al objeto de obtener el derivado olefínico correspondiente (**25**) (\equiv **F**).



Esquema 2.26.- Preparación del estireno **25** (\equiv **F**).

Por otra parte, para la preparación del sustrato **G** y a la vista de los problemas surgidos anteriormente, se escogió el grupo tritilo como protector del hidroxilo dada su fácil introducción y posterior desprotección en medio ligeramente ácido.²⁴⁹ Se llevó a cabo entonces la tritilación del grupo hidroxilo del compuesto **15**, comercialmente accesible, obteniendo el derivado protegido **26**, que fue sometido posteriormente a una reacción de Wittig para disponer del derivado olefínico **27** (\equiv **G**) con buen rendimiento.



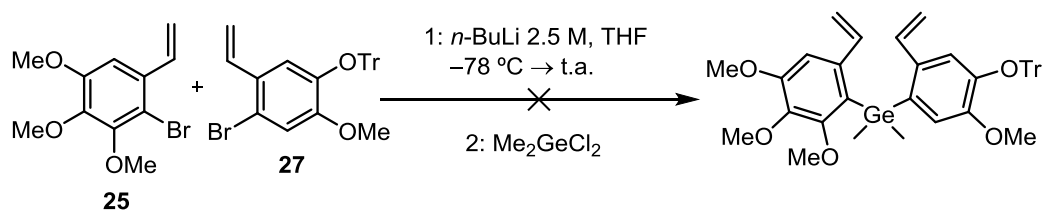
Esquema 2.27.- Preparación del estireno **27** (\equiv **G**).

Una vez obtenidos ambos sustratos, se ensayó la reacción de acoplamiento intermolecular en las mismas condiciones descritas anteriormente. Para ello se hicieron reaccionar los compuestos **25** y **27** con *n*-BuLi como agente de litación y Me_2GeCl_2 como agente electrofílico (Esquema 2.28).

²⁶⁰ Maruyama, S.; Sato, K.; Iwashashi, H. *Chem. Lett.* **2010**, 39, 714-716.

²⁶¹ a) Appukkuttan, P.; Dehaen, W.; Van der Eycken, E. *Chem. Eur. J.* **2007**, 13, 6452-6460 b) Zhang, G.; Xie, X.; Wang, Y.; Wen, X.; Zhao, Y.; Ding, C. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, 11, 2947-2950.

Con el fin de determinar la influencia de la cinética de cada uno de los sintones en el transcurso de la reacción, se estudiaron dos órdenes de adición diferentes. Por un lado, se generó el organolítico correspondiente a **25** y se le hizo reaccionar con Me_2GeCl_2 durante un breve periodo de tiempo. A continuación se le adicionó el organolítico derivado de **27** y se observó si se producía reacción. Esta misma transformación se ensayó también a la inversa, es decir generando inicialmente el organolítico derivado de **27** y tras reaccionar con el electrófilo mencionado durante un breve periodo de tiempo, se le adicionó el organolítico derivado de **25**. Este tipo de acoplamiento se muestra en el esquema siguiente.



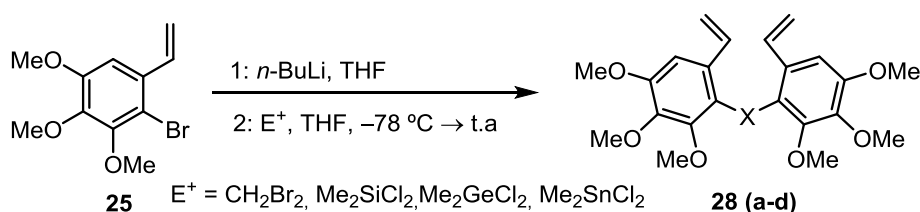
Esquema 2.28.- Intento de acoplamiento intermolecular empleando Me_2GeCl_2 como electrófilo.

Ninguna de las condiciones ensayadas condujo a la obtención del compuesto esperado, observándose mayoritariamente la presencia de los productos de deshalogenación reductora de los compuestos de partida. No obstante y dependiendo del organolítico generado en primer lugar, se obtenía también cierta proporción del producto de homoacoplamiento de dicho compuesto a través del átomo de germanio, pero no se observaba la presencia del producto formado por el acoplamiento mixto de ambos sustratos.

En vista de lo anterior y dado que era posible llevar a cabo la reacción de homoacoplamiento, se pensó en evaluar inicialmente la actividad biológica de una serie de análogos tricíclicos simétricos que mantuvieran una estructura similar a la de CA-4, en lo que al anillo trimetoxilado se refiere. Como agentes electrofílicos se emplearon nuevamente compuestos de fórmula Me_2XCl_2 con elementos del grupo 14.

Siguiendo este planteamiento, se hicieron reaccionar dos equivalentes del compuesto **25** con $n\text{-BuLi}$, seguido de adición de un equivalente del reactivo electrofílico bidentado (CH_2Br_2 , Me_2SiCl_2 , Me_2GeCl_2 , Me_2SnCl_2).^{247, 252}

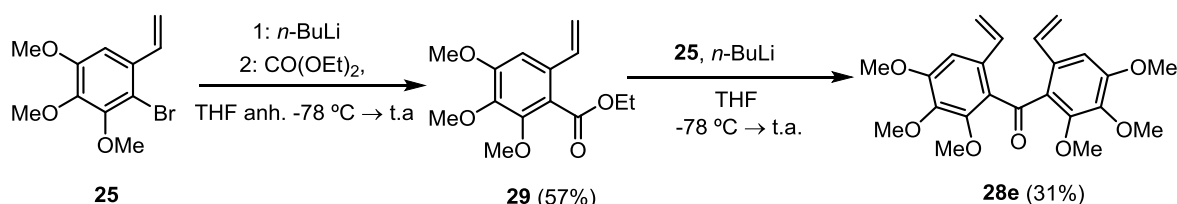
Tabla 2.9.- Reacción de homoacoplamiento entre el sustrato **25** y diferentes electrófilos.



Compuesto	-X	Rendimiento
28a	CH ₂	–
28b	SiMe ₂	39%
28c	GeMe ₂	43%
28d	SnMe ₂	57%

En esta ocasión se obtuvieron los compuestos esperados con rendimientos aceptables a excepción del sustrato **28a**, que no se pudo aislar. En todos los casos ensayados se obtuvo como producto secundario, el compuesto de deshalogenación reductora correspondiente.

Con la intención de obtener el análogo carbonado se empleó entonces carbonato de dietilo CO(OEt)₂ como agente electrofílico. El grupo carbonilo formado podría ser luego susceptible de reducirse²⁶² o metilarse²⁶³ en caso de que fuera necesario. La reacción se ensayó en las mismas condiciones que para los análogos anteriores, pero en lugar de obtener el compuesto dimérico, se observó que únicamente había reaccionado una de las dos posiciones del electrófilo, obteniéndose como producto final el compuesto **29** (Esquema 2.29). Dicho compuesto se trató con un exceso del litioderivado del compuesto **25** en las mismas condiciones de reacción, obteniéndose finalmente el derivado simétrico esperado (**28e**) con un rendimiento aceptable.



Esq. 2.29.- Formación del producto de homoacoplamiento a través de un grupo carbonilo.

Una vez preparados los intermedios correspondientes (**28b-e**), se llevó a cabo la reacción de metátesis con el objetivo de obtener análogos de CA-4 con una configuración *Z* para el doble enlace olefínico. Para ello se empleó tolueno como disolvente y el reactivo de Hoveyda-Grubbs de segunda generación como catalizador²⁵² (Tabla 2.10).

²⁶² Desroches, J.; Champagne, P. A.; Benhassine, Y.; Paquin, J-F. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 2243-2246.

²⁶³ a) Singer, M.; Ryan, W. J.; Saha, B.; Martin, B. R.; Razdan, R. K. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 4400-4407. b) Krishnamurthy, M.; Gurley, S.; Moore, B. M. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 6489-6500.

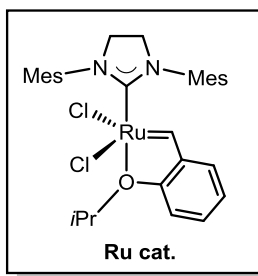
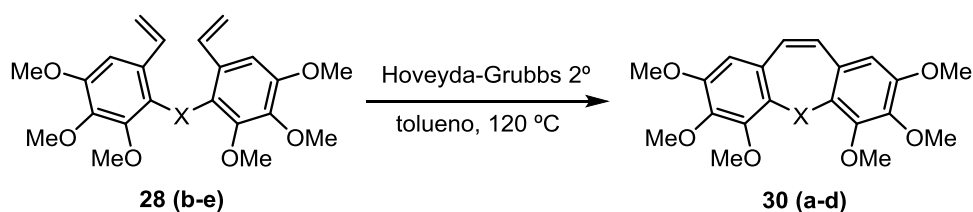


Figura 2.28.- Estructura del catalizador de Hoveyda-Grubbs de 2º generación.

Para minimizar la posible formación del producto secundario de acoplamiento intermolecular y favorecer principalmente la reacción de acoplamiento intramolecular, que da lugar al producto esperado, se empleó una baja concentración del producto de partida ($c = 0.0015 \text{ M}$).

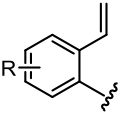
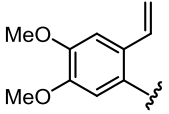
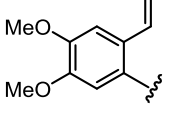
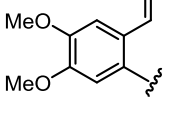
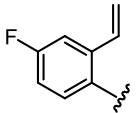
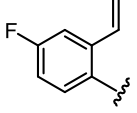
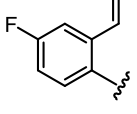
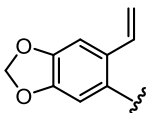
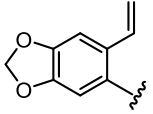
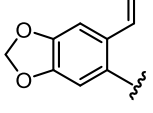
Tabla 2.10.- Reacción de metátesis intramolecular.



Compuesto	-X	Rendimiento
30a	C=O	–
30b	SiMe ₂	86%
30c	GeMe ₂	99%
30d	SnMe ₂	21%

Siguiendo esta metodología fue posible obtener los compuestos esperados con rendimientos aceptables, a excepción del sustrato **30a** ($X = \text{CO}$), donde únicamente se recuperó producto de partida (**28e**) sin reaccionar. Esto podría deberse quizá a la hibridación sp^2 del grupo carbonilo, cuyo mayor ángulo de enlace $\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{C}$ restringiría una disposición espacial adecuada de ambos anillos, para que se produjera la interacción entre los grupos vinilo implicados.

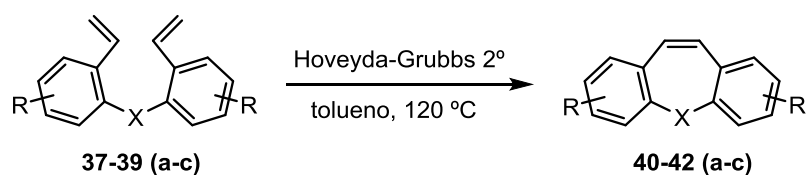
Para solventar este problema se decidió modificar dicha agrupación, tratando de que el compuesto **28e** se asemejase estructuralmente a los derivados propuestos para el resto de elementos de la serie. Se trató entonces de convertir el grupo carbonilo en un grupo gem-dimetilo empleando TiCl_4 y ZnMe_2 ,²⁶³ así como de reducir el mismo empleando tanto NaBH_4 como LiAlH_4 .²⁶² Todos los ensayos realizados no arrojaron resultados satisfactorios, observándose bien descomposición o bien recuperación del

Compuesto		-X	Rendimiento
37a		SiMe ₂	36%
37b		GeMe ₂	34%
37c		SnMe ₂	50%
38a		SiMe ₂	20%
38b		GeMe ₂	22%
38c		SnMe ₂	25%
39a		SiMe ₂	36%
39b		GeMe ₂	41%
39c		SnMe ₂	47%

Si siguiendo esta metodología se obtuvieron los compuestos esperados con rendimientos aceptables, a excepción de los derivados que presentan un átomo de flúor en su estructura, que proporcionaron bajos rendimientos. Este hecho fue debido quizá a la menor reactividad de estos sustratos en comparación con los análogos metoxilados, aunque también pudo deberse a pérdidas durante su aislamiento por su mayor volatilidad. Además, como subproducto de la reacción se obtuvo principalmente el sustrato de deshalogenación reductora correspondiente.

Por último, con el objetivo de obtener análogos con estructura similar a la de CA-4, se hicieron reaccionar estos compuestos intermedios a través de una reacción de metátesis intramolecular con cierre de anillo, siguiendo las premisas establecidas con anterioridad.²⁵²

Tabla 2.12.- Reacción de metátesis intramolecular con cierre de anillo.



Compuesto		Rendimiento
40a		94%
40b		78%
40c		—
41a		80%
41b		77%
41c		28%
42a		86%
42b		86%
42c		23%

Siguiendo la metodología sintética descrita fue posible obtener los compuestos esperados con buenos rendimientos, a excepción de **40c**, que no llegó a observarse durante el transcurso de la reacción. Cabe resaltar el hecho de que se aprecia una considerable reducción en el rendimiento obtenido para la metátesis de los derivados que presentan un fragmento Me_2Sn en su estructura. Análisis más detallados revelaron que se producía una reacción secundaria no deseada que daba lugar a la extrusión del átomo de estaño, con la consiguiente formación del fenantreno correspondiente. Tal reacción secundaria no se observó para el resto de derivados ensayados.

De esta manera se ha preparado una pequeña quimioteca de derivados tricíclicos simétricos de CA-4 con diferente funcionalización, cuya actividad biológica se evaluará posteriormente para determinar si se mantienen los buenos niveles de actividad antitumoral que presenta el propio producto natural.

6.- PARTE EXPERIMENTAL

6.-PARTE EXPERIMENTAL

6.1.-TÉCNICAS GENERALES

Los aspectos generales de materiales, reactivos, disolventes de partida y técnicas instrumentales ya han sido descritas en el capítulo I.

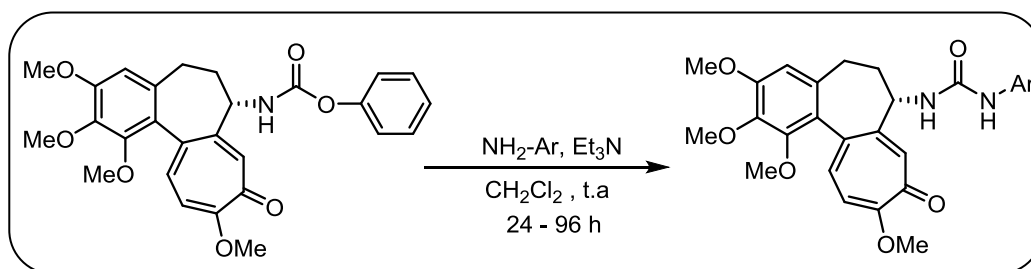
Como único elemento adicional en los compuestos de este capítulo se encuentran los **poderes rotatorios**, que fueron medidos en un polarímetro Perkin-Elmer, empleando la lámpara de sodio (línea D, 589 nm), CHCl_3 como disolvente y celdas de 1 dm de longitud. Los valores de concentración (c) se expresan en g/100 mL.

6.2.- PARTE EXPERIMENTAL DE DERIVADOS DE COLQUICINA

6.2.1.- PROCEDIMIENTOS GENERALES

Procedimiento general A

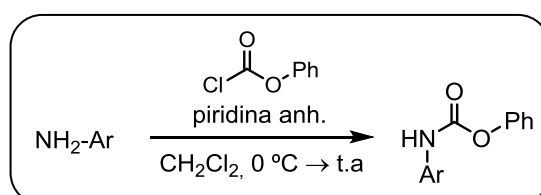
Síntesis de ureas a partir del carbamato de colquicina



Experimental: Sobre una disolución de la correspondiente anilina (1 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (10 mL) y bajo atmósfera inerte, se añade Et_3N (1.5 mmol, 209 μL) y a continuación el carbamato de fenilo **5** (1 mmol, 477 mg) disuelto en CH_2Cl_2 anhidro (10 mL). Se mantiene la mezcla de reacción con agitación a temperatura ambiente durante varios días, controlando su evolución mediante cromatografía de capa fina. Cuando la reacción ha finalizado, se añade CH_2Cl_2 (15 mL), se lava la fase orgánica con HCl 1M, NaCl (sat) y se seca luego sobre Na_2SO_4 anhidro. El residuo obtenido tras evaporar el disolvente a vacío se purifica por cromatografía sobre gel de sílice empleando AcOEt y AcOEt:MeOH (98:2) como eluyente.

Procedimiento general B

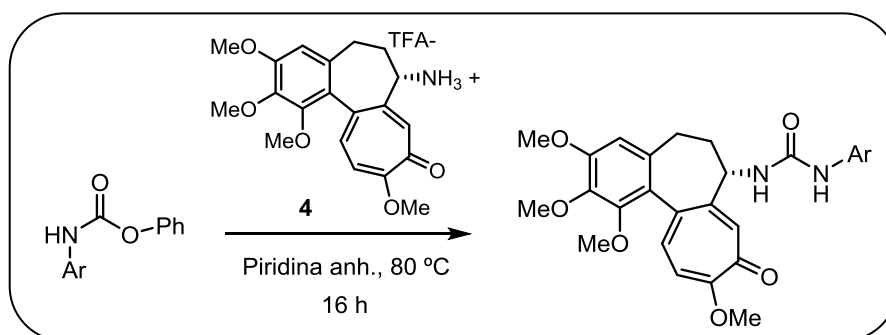
Preparación de carbamatos de fenilo derivados de anilinas poco reactivas



Experimental: Sobre una disolución de la correspondiente anilina (1 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (3 mL) y en baño de hielo, se añade piridina bajo atmósfera inerte (2.5 mmol, 201.5 μL). A continuación se adiciona cloroformiato de fenilo (1.5 mmol, 188 μL) a 0 °C y se mantiene con agitación a temperatura ambiente durante dos horas. Se adiciona HCl 1M (4 mL) para hidrolizar el exceso de reactivo y se extrae el producto en CH_2Cl_2 (30 mL), lavando las fases orgánicas reunidas con NaCl (sat) y sacándolas sobre Na_2SO_4 anhidro. El residuo obtenido después de evaporar el disolvente a vacío se purifica por cromatografía sobre gel de sílice empleando una mezcla hexano:AcOEt (90:10) como eluyente.

Procedimiento general C

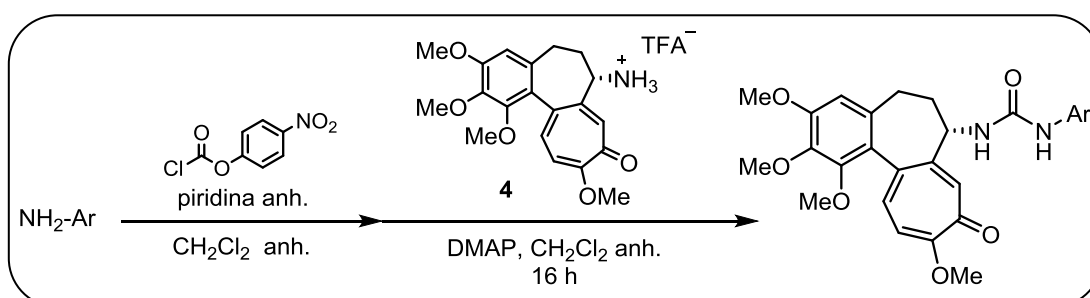
Síntesis de ureas a partir de carbamatos de anilinas poco reactivas



Experimental: Se mezcla el compuesto **4** (1 mmol, 471 mg) bajo atmósfera inerte, con el carbamato correspondiente de cada una de las anilinas (1 mmol). Se añade a continuación piridina anhidra como base y disolvente de la reacción (10 mL). Por último se calienta la mezcla a reflujo durante 16 h o bien hasta total desaparición del producto de partida, controlando el avance de la reacción por cromatografía de capa fina. Cuando la reacción ha finalizado se añade CH_2Cl_2 (30 mL) y se lava la fase orgánica con HCl 1M, NaCl (sat) y se seca sobre Na_2SO_4 anhidro. El residuo obtenido después de evaporar el disolvente a vacío se purifica por cromatografía sobre gel de sílice empleando AcOEt como eluyente.

Procedimiento general D

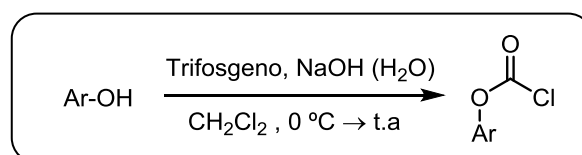
Metodología “one pot” para la preparación de ureas



Experimental: Sobre una disolución de la correspondiente anilina (1 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (15 mL), se añade piridina (2.6 mmol, 209 μL) bajo atmósfera inerte. A continuación se adiciona cloroformiato de *p*-nitrofenilo (1.2 mmol, 242 mg) y se mantiene la mezcla con agitación a temperatura ambiente durante dos horas. Seguidamente se adiciona el compuesto **4** (1.2 mmol, 565 mg) disuelto en CH_2Cl_2 anhidro (10 mL) y DMAP (2 mmol, 244 mg) para facilitar el acoplamiento, manteniéndose la mezcla con agitación a temperatura ambiente durante otras 16 h. Se añade HCl 1M (4 mL) y se extrae con CH_2Cl_2 (30 mL), lavando las fases orgánicas reunidas con NaCl (sat) y secándolas sobre Na_2SO_4 anhidro. El residuo obtenido después de evaporar el disolvente a vacío se purifica por cromatografía sobre gel de sílice empleando AcOEt como eluyente.

Procedimiento general E

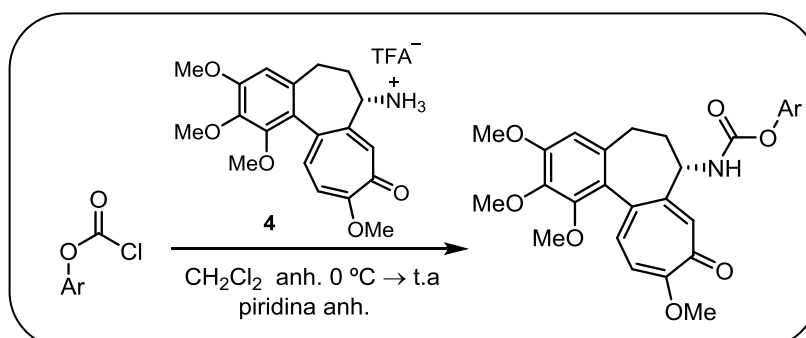
Preparación de cloroformiatos de arilo



Experimental: Se disuelve el correspondiente fenol (3 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (17 mL) bajo atmósfera inerte y a 0 °C. A continuación se adiciona lentamente trifosgeno (1 mmol, 297 mg) seguido de una disolución de NaOH (3 mmol, 120 mg) en agua (8 mL) a la misma temperatura. Cuando finaliza la adición, se mantiene la mezcla con agitación a temperatura ambiente durante dos horas adicionales. Para procesar la reacción se separa la fase acuosa y la fase orgánica se lava con H_2O fría (10 mL), se seca sobre CaCl_2 y se evapora el disolvente a vacío. El residuo obtenido se emplea sin purificación adicional en la siguiente etapa de la síntesis.

Procedimiento general F

Síntesis de carbamatos a partir de cloroformiatos de arilo

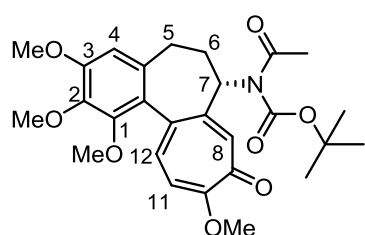


Experimental: Se disuelve el compuesto **4** (1 mmol, 471 mg) en CH₂Cl₂ anhidro (10 mL) bajo atmósfera de argón. A continuación se enfría a 0 °C y se añade piridina anhidra (2.5 mmol, 201.5 µL) y el cloroformiato de fenilo correspondiente (1.5 mmol) disuelto en CH₂Cl₂ anhidro (7 mL). Cuando finaliza la adición se mantiene la mezcla con agitación a temperatura ambiente durante 16 h. Se añade luego HCl 1M (8 mL) y se extrae con CH₂Cl₂ (40 mL), lavando la fase orgánica con NaCl sat y secándola sobre Na₂SO₄ anhidro. El residuo obtenido después de evaporar el disolvente a vacío se purifica por cromatografía sobre gel de sílice empleando una mezcla hexano:AcOEt (20:80) y AcOEt como eluyente.

6.2.2. PROCEDIMIENTOS DE SÍNTESIS Y CARACTERIZACION

NOTA: En los productos finales, se escogió la numeración 1', 2', etc. para la asignación de las señales espectroscópicas en el anillo de fenilo derivado de la anilina o del fenol y la numeración 1, 2, etc. para la asignación de dichas señales sobre el núcleo de colquicina.

(S)-acetil(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahydrobenzoheptalen-7-il) carbamato de *t*-butilo (**2**)

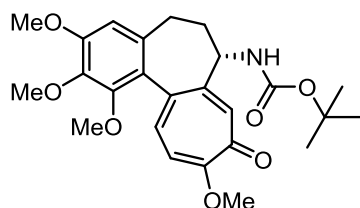


Se disuelve colquicina (10 mmol, 4 g) bajo atmósfera inerte en THF anhidro (30 mL). A continuación se añade (Boc)₂O (50 mmol, 10.9 g) y DMAP (8 mmol, 1.7 g) disueltos en 20 mL de THF anhidro y por último se adiciona Et₃N (9 mmol, 1.25 mL). Se mantiene la mezcla de reacción con agitación a 50 °C durante 18 h. Tras evaporar el disolvente a vacío, el residuo obtenido se purifica mediante cromatografía sobre gel de sílice empleando mezclas CH₂Cl₂:AcOEt (20:80) y CH₂Cl₂:MeOH (95:5) como eluyentes. Se obtuvo el producto final esperado como un sólido amarillo con un rendimiento prácticamente cuantitativo.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.55 (s, 1H, H8), 7.14 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H, H12), 6.85 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H, H11), 6.55 (s, 1H, H4), 5.11 (m, 1H, H7), 3.95 (s, 3H, OCH₃), 3.95 (s, 3H, OCH₃), 3.98 (s, 3H, OCH₃), 3.65 (s, 3H, OCH₃), 2.55 (m, 3H, 2x H5, H6), 2.27 (s, 3H, CH₃), 1.98 (m, 1H, H6), 1.53 (s, 9H, 3x CH₃).

RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃): δ 179.2 (CO), 170.2 (CO), 163.8 (C), 153.3 (C), 153.2 (C), 151.0 (C), 148.8 (CO), 141.5 (C), 137.5 (C), 134.3 (C), 133.9 (CH), 132.8 (C), 126.2 (CH), 111.6 (CH), 106.9 (CH), 84.6 (C), 61.4 (OCH₃), 61.2 (OCH₃), 57.6 (OCH₃), 56.1 (OCH₃), 52.9 (CH), 37.6 (CH₂), 30.0 (CH₂), 27.7 (3x CH₃), 25.5 (CH₃).

(S)-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahydrobenzoheptalen-7-il) carbamato de t-butilo (3)



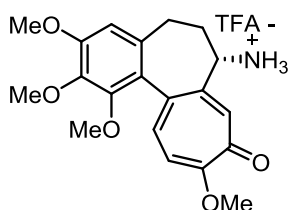
Se disuelve el compuesto **2** (10 mmol, 5 g) bajo atmósfera inerte, en MeOH seco (8 mL). A continuación se añade lentamente NaOMe 2M (2 mmol, 1 mL) a temperatura ambiente y se mantiene con agitación durante dos horas controlando su evolución por cromatografía de capa fina. Cuando la reacción ha finalizado se añade NaCl (sat) (50

mL) y a continuación se extrae la fase acuosa con AcOEt (40 mL). Las fases orgánicas reunidas se secan sobre Na₂SO₄ anhidro y se evapora el disolvente a vacío. Se obtuvo un sólido ligeramente amarillento con un rendimiento del 90%, que se empleó sin purificación adicional en la siguiente etapa de la síntesis propuesta.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.58 (s, 1H, H8), 7.34 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H, H12), 6.81 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H, H11), 6.56 (s, 1H, H4), 5.07 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, NH), 4.42 (m, 1H, H7), 3.95 (s, 3H, OCH₃), 3.92 (s, 3H, OCH₃), 3.86 (s, 3H, OCH₃), 3.66 (s, 3H, CH₃ OCH₃), 2.47 (m, 3H, 2x H5, H6); 1.97 (m, 1H, H6); 1.53 (s, 9H, 3x CH₃).

RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃): δ 180.3 (CO), 163.8 (C), 154.3 (C), 153.3 (C), 151.1 (C), 149.7 (CO), 141.5 (C), 136.0 (C), 135.0 (CH), 134.2 (C), 131.1 (CH), 125.6 (C), 112.0 (CH), 107.1 (CH), 79.8 (C), 61.5 (OCH₃), 61.3 (OCH₃), 56.2 (OCH₃), 56.0 (OCH₃), 53.0 (CH), 37.6 (CH₂), 29.9 (CH₂), 27.2 (3x CH₃).

Trifluoroacetato de (S)-1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahydrobenzoheptalen-7-amino (4)



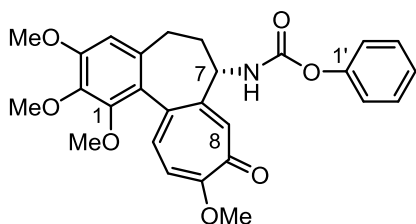
Se trata el compuesto **3** (9 mmol, 4.1 g) bajo atmósfera de argón con ácido trifluoroacético (7 mL) y se deja reaccionar durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación se evapora el disolvente a vacío y el residuo obtenido se purifica por cromatografía sobre gel de sílice empleando una mezcla CH₂Cl₂:MeOH (95:5) como eluyente. Se obtuvo **4** como un

sólido amarillo con rendimiento prácticamente cuantitativo.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 9.29 (s ancho, 2H, NH₃⁺), 7.69 (s, 1H, H8), (7.34 (d, *J* = 11 Hz, 1H, H12), 6.97 (d, *J* = 11 Hz, 1H, H11), 6.58 (s, 1H, H4), 4.11 (m, 1H, H7), 3.78 (s, 9H, 3x OCH₃), 3.56 (s, 3H, OCH₃), 2.64 (m, 2H, H6), 2.43 (m, 2H, H5).

RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃): δ 179.1 (CO), 164.1 (C), 154.3 (C), 153.3 (C), 151.0 (C), 141.7 (C), 137.1 (C), 134.8 (CH), 133.8 (C), 131.5 (CH), 124.4 (C), 114.5 (CH), 107.8 (CH), 61.3 (OCH₃), 61.2 (OCH₃), 56.8 (OCH₃), 56.2 (OCH₃), 54.1 (CH), 35.8 (CH₂), 29.6 (CH₂).

(S)-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahydrobenzoheptalen-7-il) carbamato de fenilo (5)



Se disuelve el compuesto **4** (2.12 mmol, 1 g) bajo atmósfera inerte en CH_2Cl_2 anhidro (12 mL). Se enfría a $0\text{ }^\circ\text{C}$, se añade piridina (5.30 mmol, 0.43 mL) y a continuación cloroformiato de fenilo (3.18 mmol, 0.4 mL), manteniendo la reacción con agitación a temperatura ambiente durante dos horas. Para procesar la mezcla de reacción, se añade HCl 1M (4 mL) y se extrae con CH_2Cl_2 (40 mL). Las fases orgánicas reunidas se lavan con NaCl (sat), se secan sobre Na_2SO_4 anh. y se evapora el disolvente a vacío. El residuo obtenido se purifica mediante cromatografía sobre gel de sílice empleando una mezcla hexano:AcOEt (20:80) y AcOEt como eluyente. Finalmente se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de un 88% y un punto de fusión de $174\text{-}176\text{ }^\circ\text{C}$. $[\alpha]_D^{25}$: -177.9 (c 0.72, CHCl_3).

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 7.63 (s, 1H, H8), 7.29 (d, $J = 10.5$ Hz, 1H, H12), 7.26 (m, 2H, H2', H6'), 7.13 (tt, $J = 7.5, 1.5$ Hz, 1H, H4'), 7.02 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, H3', H5'), 6.82 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, H11), 6.55 (s, 1H, H4), 5.84 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H, NH), 4.51 (m, 1H, H7), 3.99 (s, 3H, OCH_3), 3.91 (s, 6H, 2x OCH_3), 3.55 (s, 3H, OCH_3), 2.46 (m, 3H, 2x H5, H6); 1.86 (m, 1H, H6).

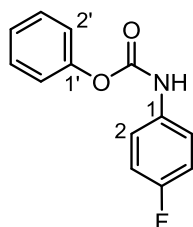
RMN ^{13}C (75 MHz; CDCl_3): δ 179.9 (CO), 164.5 (C), 154.1 (CO), 153.9 (C), 151.6 (C), 151.1 (C), 150.9 (C), 142.1 (C), 136.3 (C), 135.6 (CH), 134.5 (C), 131.4 (CH), 129.7 (2x CH), 128.4 (C), 125.9 (CH), 122.0 (2x CH), 112.6 (CH), 107.8 (CH), 61.9 (OCH_3), 61.8 (OCH_3), 56.8 (OCH_3), 56.5 (OCH_3), 54.4 (CH), 37.7 (CH_2), 30.3 (CH_2).

IR ν_{max} : 3229 (N-H), 1732 (C=O) cm^{-1} .

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para $\text{C}_{27}\text{H}_{27}\text{NO}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 478.1788. Obtenida $[\text{M}+\text{H}]^+$: 478.1860.

N-ARILCARBAMATOS DE FENILO

(4-fluorofenil) carbamato de fenilo (7a)



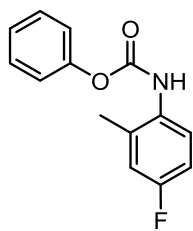
Siguiendo el procedimiento general B, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de un 61%.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 7.30 (m, 4H, 3x H, NH), 7.17 (tt, $J = 7.5, 1.2$ Hz, 1H, H4'), 7.10 (m, 2H), 6.93 (m, 3H).

RMN ^{13}C (75 MHz; CDCl_3): δ 160.9 (d, $J = 240.2$ Hz, C-F), 152.0 (C), 150.6 (CO), 133.5 (d, $J = 2.5$ Hz, C, C1), 129.6 (2x CH), 125.9 (CH), 121.8 (2x CH), 120.7 (2x CH), 115.9 (d, $J = 22.5$ Hz, 2x CH, C3, C5).

RMN ^{19}F (280 MHz; CDCl_3): δ -119.3 (F).

(4-fluoro-2-metilfenil) carbamato de fenilo (7b)



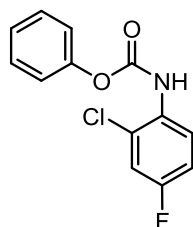
Siguiendo el procedimiento general B, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de un 52%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.73 (s ancho, 1H, NH), 7.41 (dd, *J* = 7.9, 1.2 Hz, 2H, H2', H6'), 7.25 (tt, *J* = 7.5, 1.2 Hz, 3H, H3', H4', H5'); 6.94 (m, 2H, H5, H6), 6.66 (s, 1H, H3), 2.34 (s, 3H, CH₃).

RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃): δ 158.3 (d, *J* = 240.0 Hz, C-F), 152.2 (C), 150.8 (CO), 134.9 (C), 131.3 (d, *J* = 3.5 Hz, C, C2), 129.5 (2x CH) 125.8 (CH), 123.6 (CH), 121.7 (2x CH), 117.1 (d, *J* = 22.5 Hz, CH, C3); 113.50(d, *J* = 22.5 Hz, CH, C5), 17.9 (CH₃).

RMN ¹⁹F (280 MHz; CDCl₃): δ -119.3 (F).

(2-cloro-4-fluorofenil) carbamato de fenilo (7c)



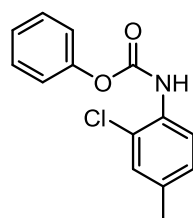
Siguiendo el procedimiento general B, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de un 85%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 8.07 (s ancho, 1H, NH), 7.33 (m, 2H), 7.14 (m, 5H), 6.94 (ddd, *J* = 7.8, 3, 0.3 Hz, 1H).

RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃): δ 160.0 (d, *J* = 244.1 Hz, C-F), 151.6 (C), 150.5 (CO), 130.9 (d, *J* = 3.5 Hz, C, C2), 129.7 (C), 129.6 (2 x CH), 126.4 (CH), 121.7 (2x CH), 121.0 (CH), 116.5 (d, *J* = 22.5 Hz, CH, C3), 114.9 (d, *J* = 21.5 Hz, CH, C5),

RMN ¹⁹F (280 MHz; CDCl₃): δ -119.3 (F).

(2-cloro-4-metilfenil) carbamato de fenilo (7d)

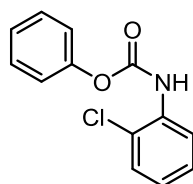


Siguiendo el procedimiento general B, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de un 84%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.96 (s ancho, 1H, NH), 7.32 (m, 3H), 7.19 (tt; *J* = 8, 1.5 Hz, 1H, H4'), 7.12 (m, 3H), 7.01 (dd, *J* = 8.4, 1.5 Hz, 1H, H5), 2.22 (s, 3H, CH₃).

RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃): δ 151.5 (C), 150.6 (CO), 134.4 (C), 131.7 (C), 130.4 (C), 129.5 (2x CH), 128.6 (CH), 126.4 (CH), 125.9 (CH), 121.7 (2x CH), 121.0 (CH), 20.6 (CH₃).

(2-clorofenil) carbamato de fenilo (7e)



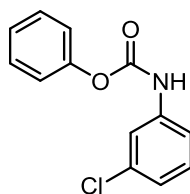
Siguiendo el procedimiento general B, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de un 96%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 8.11 (ddd, *J* = 7.8, 1.5, 0.3 Hz, 1H, H6), 7.41 (s ancho, 1H, NH), 7.33 (m, 3H), 7.15 (m, 4H), 6.94 (td, *J* = 7.5,

1.5 Hz, 1H, H5).

RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃): δ 151.5 (C), 150.5 (CO), 134.4 (C), 129.6 (2x CH), 129.3 (CH), 126.0 (CH), 124.3 (CH), 122.5 (C), 121.7 (2x CH), 121.0 (CH), 120.1 (CH).

(3-clorofenil) carbamato de fenilo (7f)

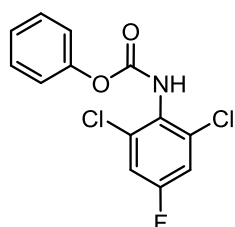


Seguindo el procedimiento general B, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de un 90%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.57-7.07 (m, 9H), 6.97 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃): δ 151.5 (C), 151.0 (CO), 150.4 (C), 138.6 (C), 130.0 (CH), 129.5 (2x CH), 126.3 (CH), 125.8 (CH), 121.5 (2x CH), 119.0 (CH), 116.8 (CH).

(2,6-dicloro-4-fluorofenil) carbamato de fenilo (7g)



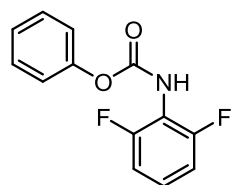
Seguindo el procedimiento general B, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de un 69%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.35 (m, 3H), 7.23 (m, 3H, 2x H, NH), 7.12 (m, 2H).

RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃): δ 161.0 (d, *J* = 244.1 Hz, C-F), 150.3 (C), 149.3 (CO), 135.4 (d, *J* = 8.7 Hz, 2x C, C2, C6), 129.7 (2x CH), 126.7 (CH), 126.7 (C), 121.4 (2x CH), 116.5 (d, *J* = 25.5 Hz, 2x CH, C3, C5).

RMN ¹⁹F (280 MHz; CDCl₃): δ -108.1 (F).

(2,6-difluorofenil) carbamato de fenilo (7h)

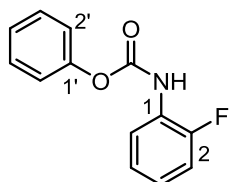


Seguindo el procedimiento general B, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de un 30%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.38 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, H3', H5'), 7.25 (m, 4H), 6.99 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H, H3, H5), 6.35 (s, 1H, NH).

RMN ¹⁹F (280 MHz; CDCl₃): δ -109.2 (2x F).

(2-fluorofenil) carbamato de fenilo (7i)



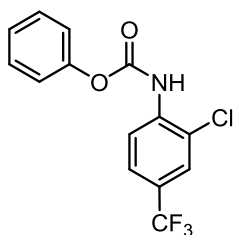
Seguindo el procedimiento general B, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de un 86%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 8.10 (s ancho, 1H, NH), 7.31 (m, 2H), 7.20 – 6.84 (m, 7H).

RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃): δ 151.2 (d, *J* = 242.2 Hz, C, C-F), 150.2 (CO), 148.2 (C), 139.8 (d, *J* = 19.8 Hz, C, C1), 130.6 (2x CH), 126.9 (CH), 125.3 (d, *J* = 3.7 Hz, CH, C5), 124.1 (t, *J* = 6.7 Hz, 2x CH, C4, C6), 122.0 (2x CH), 115.2 (d, *J* = 18.9 Hz, CH, C3).

RMN ¹⁹F (280 MHz; CDCl₃): δ -131.3 (F).

(2-cloro-4-trifluorometilfenil) carbamato de fenilo (7j)



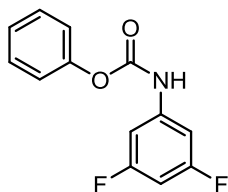
Siguiendo el procedimiento general B, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de un 41%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 8.39 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H₆), 7.68 (s, 1H, H₃), 7.63 (s ancho, 1H, NH), 7.54 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H₅), 7.42 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H_{3'}, H_{5'}), 7.26 (m, 3H, H_{2'}, H_{4'}, H_{6'}).

RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃): δ 150.3 (C), 149.4 (CO), 137.6 (C), 129.7 (C); 129.5 (2x CH), 126.5 (CH), 126.5 (CH), 126.7 – 120.4 (q, *J* = 270.0 Hz, C, CF₃), 125.3 (2x CH), 122.2 (q, *J* = 33.2 Hz, C, C₄), 121.6 (CH), 119.6 (CH).

RMN ¹⁹F (280 MHz; CDCl₃): δ – 62.63 (CF₃).

(3,5-difluorofenil) carbamato de fenilo (7k)



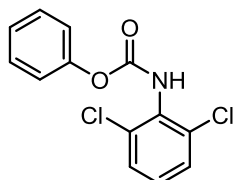
Siguiendo el procedimiento general B, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de un 40%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.30 (m, 2H, H Ar, NH), 7.06 (m, 4H), 6.90 (m, 2H), 6.47 (m, 1H).

RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃): δ 165.1 – 161.7 (dd, *J* = 244.1, 14.5 Hz, 2x C, C-F), 151.5 (CO), 150.3 (C), 139.8 (t, *J* = 14.3 Hz, C, C₁), 129.7 (2x CH), 126.0 (CH), 121.6 (2x CH), 102.0 (d, *J* = 29.3 Hz, 2x CH, C₂, C₆), 98.9 (t, *J* = 25.5 Hz, CH, C₄).

RMN ¹⁹F (280 MHz; CDCl₃): δ –109.1 (F).

(2,6-diclorofenil) carbamato de fenilo (7l)

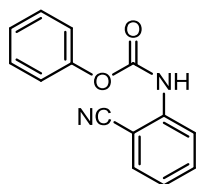


Siguiendo el procedimiento general B, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de un 34%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.32 (s, 1H, NH), 7.25 (t, *J* = 7.8 Hz, 3H, H_{3'}, H_{4'}, H_{5'}); 7.07 (m, 5H).

RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃): δ 150.7 (C), 149.8 (CO), 134.9 (2x C), 134.2 (C), 131.0 (CH), 129.9 (2x CH), 129.2 (2x CH) 126.9 (CH), 121.8 (2x CH).

(2-cianofenil) carbamato de fenilo (7m)

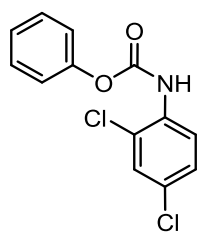


Siguiendo el procedimiento general B, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de un 87%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 8.18 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H₆), 7.52 (m, 2H), 7.42 (s ancho, 1H, NH), 7.34 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, H_{3'}, H_{5'}), 7.15 (m, 4H).

RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃): δ 152.5 (CO), 150.7 (C), 140.1 (C), 134.1 (CH), 133.5 (CH), 129.6 (2x CH), 126.2 (CH), 125.8 (CH), 125.7 (2x CH), 121.8 (CH), 116.9 (CN), 108.0 (C).

(2,4-diclorofenil) carbamato de fenilo (7n)

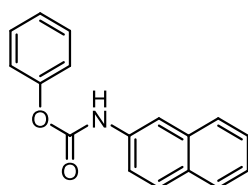


Seguendo el procedimiento general B, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de un 55%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 8.06 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H6), 7.30 (m, 4H), 7.11 (m, 4H, 3x H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃): δ 151.8 (CO), 150.5 (C), 137.1 (C), 133.2 (C), 130.8 (CH), 128.8 (2x CH), 127.4 (C), 127.9 (CH), 126.3 (CH), 121.8 (2x CH), 120.7 (CH).

(2-naftalenil) carbamato de fenilo (7o)

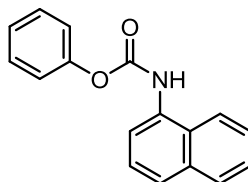


Seguendo el procedimiento general B, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de un 80%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 8.08 (s, 1H, H1), 7.75 (m, 3H), 7.35 (m, 5H), 7.25 (m, 3H), 7.15 (s ancho, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃): δ 152.5 (CO), 151.4 (C), 135.3 (C), 134.9 (C), 131.2 (C), 130.1 (CH), 129.9 (2x CH), 129.5 (CH), 128.1 (CH), 128.0 (CH), 127.2 (CH), 126.3 (CH), 125.4 (CH), 122.2 (2x CH), 121.5 (CH).

(1-naftalenil) carbamato de fenilo (7p)

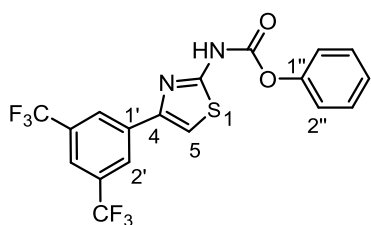


Seguendo el procedimiento general B, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de un 56%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.79 (m, 3H, 2x H, NH), 7.59 (d, *J* = 8 Hz, 1H, H4), 7.42 (m, 3H), 7.27 (m, 3H), 7.12 (m, 3H).

RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃): δ 152.4 (CO), 151.2 (C), 134.5 (2x C); 132.4 (C); 129.8 (2x CH), 129.2 (CH), 126.8 (CH), 126.5 (CH), 126.2 (CH), 126.1 (2x CH), 125.8 (CH), 122.1 (2x CH); 120.8 (CH).

4-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)tiazol-2-il) carbamato de fenilo (7q)



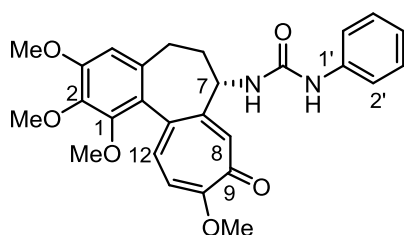
Seguendo el procedimiento general B, se obtuvo el compuesto esperado como un aceite incoloro con un rendimiento de un 44%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 10.37 (s ancho, 1H, NH), 8.26 (s, 2H, H2', H6'), 7.71 (s, 1H, H4'), 7.29 (m, 3H), 7.20 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H4''), 6.94 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, H2'', H6'').

RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃): δ 161.2 (C), 152.0 (CO), 150.1 (C), 148.0 (C), 136.5 (C), 132.43 (q, *J* = 33.7 Hz, 2x C, C3', C5'), 129.8 (2x CH), 126.7 (2x CH), 126.6 (CH), 123.3 (q, *J* = 271.5 Hz, 2x C, 2x CF₃), 121.8 (q, *J* = 6.5 Hz, CH, C4'), 121.2 (2x CH), 110.9 (CH). **RMN ¹⁹F** (280 MHz; CDCl₃): δ -63.4 (2x CF₃).

UREAS

(S) 1-fenil-3-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahydrobenzoheptalen-7-il) urea (6a)



Seguindo el procedimiento general A, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 65% y un punto de fusión de 196-198 °C. $[\alpha]_D -44.5$ (c 0.51, CHCl₃).

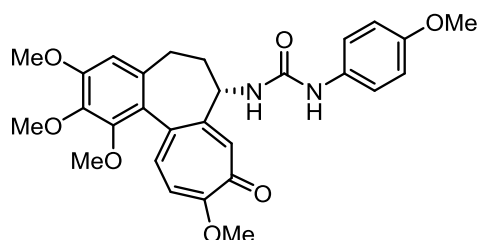
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 8.25 (s ancho, 1H, NH), 8.00 (s, 1H, H8), 7.42 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, H12), 7.25 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, H2', H6'), 7.12 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H, H5', H3', NH), 6.94 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, H11), 6.86 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H, H4'), 6.53 (s, 1H, H4), 4.80 (m, 1H, H7), 3.96 (s, 6H, 2x OCH₃), 3.90 (s, 3H, OCH₃), 3.67 (s, 3H, OCH₃), 2.50-2.35 (m, 3H, H6, H5), 1.85-1.75 (m, 1H, H5).

RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃): δ 180.0 (CO) 164.1 (C), 155.2 (C), 154.6 (CO), 153.7 (C), 151.3 (C), 141.7 (C), 139.5 (C), 137.8 (C), 135.8 (CH), 134.6 (C), 131.8 (CH), 128.7 (2x CH), 125.6 (C), 122.3 (CH), 119.7 (2x CH), 113.5 (CH), 107.7 (CH), 61.8 (OCH₃), 61.5 (OCH₃), 56.5 (OCH₃), 56.2 (OCH₃) 52.4 (CH), 38.3 (CH₂), 30.4 (CH₂).

IR ν_{max} : 3330 (N-H), 1698 (C=O) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₂₇H₂₈N₂O₆ [M+H]⁺: 477.2020. Obtenida [M+H]⁺:477.2018.

(S) 1-(4-metoxifenil)-3-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahydrobenzoheptalen-7-il) urea (6b)



Seguindo el procedimiento general A, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 61% y un punto de fusión de 177-180 °C. $[\alpha]_D -13.1$ (c 0.78, CHCl₃).

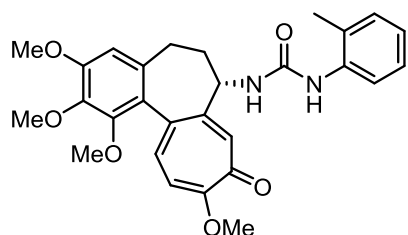
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 8.21 (s ancho, 1H, NH), 7.64 (s, 1H, H8), 7.30 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H2', H6'), 7.25 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, H12), 7.08 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, H11), 6.75 (m, 4H, H3', H5', H4, NH), 6.55 (s, 1H, H4), 4.60 (m, 1H, H7), 3.95 (s, 3H, OCH₃), 3.94 (s, 3H, OCH₃), 3.90 (s, 3H, OCH₃), 3.69 (s, 3H, OCH₃), 3.67 (s, 3H, OCH₃), 2.60 (m, 1H, H6), 2.45-2.35 (m, 2H, H5, H6), 1.80 (m, 1H, H5).

RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃): δ 179.9 (CO), 164.0 (C), 155.7 (C), 155.6 (C), 154.5 (CO), 153.7 (C), 151.3 (C), 141.8 (C), 137.7 (C), 135.7 (CH), 134.6 (C), 132.2 (C), 131.7 (CH), 125.6 (C), 122.7 (2x CH), 114.1 (2x CH), 113.3 (CH), 107.6 (CH), 61.9 (OCH₃), 61.5 (OCH₃), 56.5 (OCH₃), 56.2 (OCH₃), 55.5 (OCH₃), 52.6 (CH), 38.2 (CH₂), 30.4 (CH₂).

IR ν_{max} : 3320 (N-H), 1689 (C=O) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₂₈H₃₀N₂O₇ [M+H]⁺: 507.2126. Obtenida [M+H]⁺:507.2145.

(S) 1-(2-metilfenil)-3-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahydrobenzoheptalen-7-il) urea (6c)



Seguendo el procedimiento general A, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 59% y un punto de fusión 169-172 °C. $[\alpha]_D -15.0$ (c 0.59, CHCl₃).

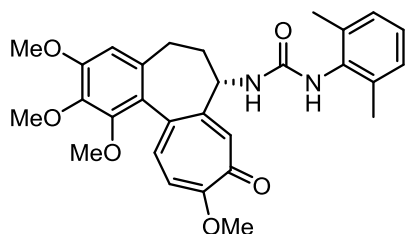
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.85 (s, 1H, H8), 7.50 (dd, *J* = 8, 1.5 Hz, 1H, H6'), 7.37 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H, H12), 7.30 (s ancho, 1H, NH), 7.05-6.95 (m, 3H, H4', H5', NH), 6.90-6.80 (m, 2H, H11, H3'), 6.52 (s, 1H, H4), 4.67 (m, 1H, H7), 3.94 (s, 3H, OCH₃), 3.92 (s, 3H, OCH₃), 3.88 (s, 3H, OCH₃), 3.65 (s, 3H, OCH₃), 2.50-2.35 (m, 3H, H6, H5), 2.06 (s, 3H, CH₃), 1.80-1.70 (m, 1H, H5).

RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃): δ 180.0 (CO), 164.1 (C), 155.3 (C), 154.3 (CO), 153.7 (C), 151.3 (C), 141.7 (C), 137.4 (C), 137.0 (C), 135.8 (CH), 134.5 (C), 131.2 (CH), 130.4 (CH), 129.5 (C), 126.6 (CH), 125.6 (C), 123.8 (CH), 123.1 (CH), 113.3 (CH), 107.5 (CH), 61.8 (OCH₃), 61.5 (OCH₃), 56.5 (OCH₃), 56.2 (OCH₃), 52.8 (CH), 37.7 (CH₂), 30.3 (CH₂), 17.8 (CH₃).

IR ν_{max} : 3340 (N-H), 1698 (C=O) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₂₈H₃₀N₂O₆ [M+H]⁺: 491.2177. Obtenida [M+H]⁺: 491.2167.

(S)-1-(2,6-dimetilfenil)-3-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahydrobenzoheptalen-7-il) urea (6d)



Seguendo el procedimiento general A, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 28% y un punto de fusión de 230-233 °C. $[\alpha]_D -19.8$ (c 0.45, CHCl₃).

RMN ¹H (400 MHz, 50 °C, CDCl₃): δ 7.30-7.25 (m, 2H, H8, H12), 7.15 (m, 3H, H3', H4', H5'), 6.76 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H, H11), 6.52 (s, 1H, H4), 5.80 (s ancho, 1H, NH), 4.80 (s, 1H, NH), 4.65 (m, 1H, H7), 3.95 (s, 6H, OCH₃), 3.91 (s, 3H, OCH₃), 3.68 (s, 3H, OCH₃), 2.50-2.35 (m, 2H, H6), 2.32 (s, 6H, 2x CH₃), 2.20-2.10 (m, 1H, H5), 1.60-1.50 (m, 1H, H5).

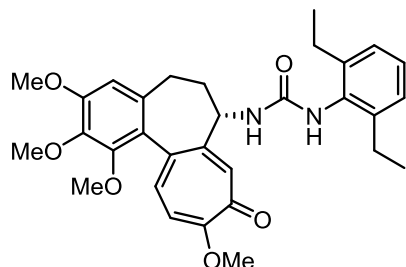
RMN ¹³C (100 MHz, 50 °C, CDCl₃): δ 179.6 (CO), 164.1 (C), 155.7 (C), 153.6 (CO), 151.5 (C), 141.8 (C), 135.1 (CH), 134.4 (C), 131.1 (CH), 129.0 (C), 125.6 (C), 112.2 (CH), 107.5 (CH), 61.8 (OCH₃), 61.5 (OCH₃), 56.3 (OCH₃), 56.2 (OCH₃), 52.7 (CH), 37.8 (CH₂), 30.3 (CH₂), 18.5 (2x CH₃).

Debido a efectos de rotación impedida, varias señales en el espectro de ¹H salen muy anchas y distorsionadas a temperatura ambiente, así como ciertas señales en el espectro de ¹³C que tampoco emergen con claridad.

IR ν_{max} : 3330 (N-H), 1687 (C=O) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para $C_{29}H_{32}N_2O_6$ $[M+H]^+$: 505.2333. Obtenida $[M+H]^+$:505.2359.

(S) 1-(2,6-dietilfenil)-3-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahydrobenzoheptalen-7-il) urea (6e)



Siguiendo el procedimiento general A, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 25% y un punto de fusión de 244-247 °C. $[\alpha]_D -68.5$ (c 0.41, $CHCl_3$).

RMN 1H (400 MHz, 50°C, $CDCl_3$): δ 7.35-7.15 (m, 5H), 6.75 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H, H11), 6.51 (s, 1H, H4), 5.70 (s, ancho, 1H, NH), 4.70-4.60 (m, 2H, H7, NH), 3.96 (s, 3H, OCH_3), 3.95 (s, 3H, OCH_3), 3.91 (s, 3H, OCH_3), 3.68 (s, 3H, OCH_3), 2.70 (m ancho, 4H, 2x CH_2), 2.50-2.30 (m, 2H, H6), 2.10-2.00 (m, 1H, H5), 1.60-1.50 (m, 1H, H5), 1.20 (t, $J = 7.5$ Hz, 6H, 2x CH_3).

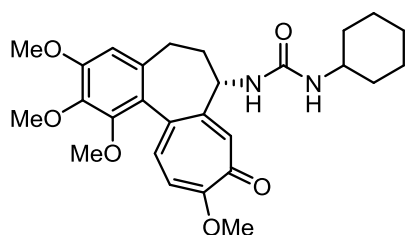
RMN ^{13}C (100 MHz, 50 °C, $CDCl_3$): δ 179.6 (CO), 164.1 (C), 156.3 (C), 153.6 (CO), 151.4 (C), 141.8 (C), 135.0 (CH), 134.4 (C), 132.8 (C), 131.1 (CH), 127.2 (C), 125.8 (C), 112.2 (CH), 107.5 (CH), 61.6 (OCH_3), 61.5 (OCH_3), 56.3 (OCH_3), 56.2 (OCH_3), 52.7 (CH), 37.8 (CH_2), 30.3 (CH_2), 24.9 (2x CH_2), 15.0 (2x CH_3).

Debido a efectos de rotación impedida, varias señales en el espectro de 1H y de ^{13}C salen muy anchas y distorsionadas o bien no logran emerger con claridad.

IR ν_{max} : 3340 (N-H), 1687 (C=O) cm^{-1} .

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para $C_{31}H_{36}N_2O_6$ $[M+H]^+$: 533.2646. Obtenida $[M+H]^+$:533.2667.

(S) 1-ciclohexil-3-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahydrobenzoheptalen-7-il) urea (6f)



Siguiendo el procedimiento general A, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 45% y un punto de fusión de 168-170 °C. $[\alpha]_D -54.5$ (c 0.42, $CHCl_3$).

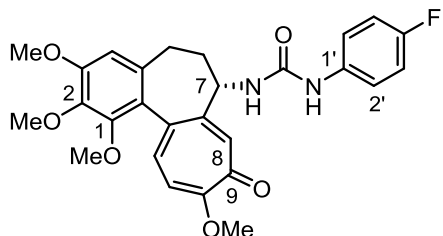
RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$): δ 7.70 (s, 1H, H8), 7.35 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H, H12), 6.87 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H, H11), 6.52 (s, 1H, H4), 5.95 (d, $J \sim 7$ Hz, 1H, NH), 5.00 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, NH), 4.60 (m, 1H, H7), 4.00 (s, 3H, OCH_3), 3.93 (s, 3H, OCH_3), 3.90 (s, 3H, OCH_3), 3.66 (s, 3H, OCH_3), 3.45 (m, 1H, H1'), 2.48 (m, 1H, H6), 2.40-2.25 (m, 2H, H6, H5), 1.90-1.50 (m, 6H), 1.30-1.20 (m, 2H), 1.10-0.95 (m, 3H).

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$): δ 180.0 (CO), 164.1 (C), 156.5 (C), 153.9 (CO), 153.6 (C), 151.3 (C), 141.7 (C), 137.1 (C), 135.4 (CH), 134.6 (C), 131.3 (CH), 125.7 (C), 112.9 (CH), 107.5 (CH), 61.8 (OCH_3), 61.5 (OCH_3), 56.5 (OCH_3), 56.3 (OCH_3), 52.7 (CH), 48.8 (CH), 37.9 (CH_2), 34.1 (CH_2), 33.9 (CH_2), 30.3 (CH_2), 25.7 (CH_2), 25.1 (CH_2), 25.0 (CH_2).

IR ν_{max} : 3320 (N-H), 1650 (C=O) cm^{-1} .

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para $C_{27}H_{34}N_2O_6$ $[M+H]^+$: 483.2490. Obtenida $[M+H]^+$:483.2486.

(S) 1-(4-fluorofenil)-3-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahydrobenzoheptalen-7-il) urea (6g)



Seguindo el procedimiento general C, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido ligeramente amarillento con un rendimiento de 38% y un punto de fusión de 177-178 °C. $[\alpha]_D -22.9$ (c 0.47, $CHCl_3$).

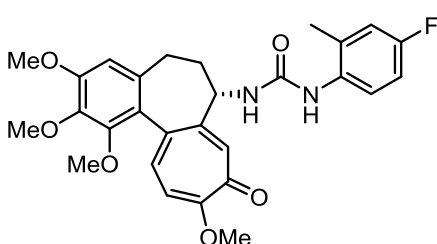
RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$): δ 8.20 (s, 1H, NH), 8.05 (s, 1H, H8), 7.45 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, H12), 7.18 (dd, $J = 9.0, 4.8$ Hz, 2H, H2', H6'), 7.10 (d, $J \sim 8.0$ Hz, 1H, NH), 6.96 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, H11), 6.82 (t, $J = 9.1$ Hz, 2H, H3', H5'), 6.55 (s, 1H, H4), 4.82 (m, 1H, H7), 3.96 (s, 6H, 2x OCH_3), 3.92 (s, 3H, OCH_3), 3.69 (s, 3H, OCH_3), 2.52 (m, 1H, H6), 2.45-2.35 (m, 2H, H6, H5), 1.85-1.80 (m, 1H, H5).

RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$): δ 180.0 (CO), 164.1 (C), 158.6 (d, $J = 240.0$ Hz, C-F), 155.3 (C), 154.8 (CO), 153.8 (C), 151.3 (C), 141.8 (C), 138.0 (C), 136.0 (CH), 135.3, (C), 134.6 (C), 131.7 (CH), 125.5 (C), 121.7 (d, $J = 7.5$ Hz, 2x CH, C2', C6'), 115.3 (d, $J = 22.1$ Hz, 2x CH, C3', C5'), 113.6 (CH), 107.6 (CH), 61.9 (OCH_3), 61.5 (OCH_3), 56.5 (OCH_3), 56.3 (OCH_3), 52.5 (CH), 38.4 (CH_2), 30.4 (CH_2).

IR ν_{max} : 3320 (N-H), 1698 (C=O) cm^{-1} .

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para $C_{27}H_{27}FN_2O_6$ $[M+H]^+$: 495.1926. Obtenida $[M+H]^+$:495.1912.

(S) 1-(4-fluoro-2-metilfenil)-3-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahydrobenzoheptalen-7-il) urea (6h)



Seguindo el procedimiento general C, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 47% y un punto de fusión de 182-184 °C. $[\alpha]_D -6.4$ (c 0.43, $CHCl_3$).

RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$): δ 7.95 (s, 1H, H8), 7.45-7.35 (m, 3H, H12, H6', NH), 7.20 (d, $J \sim 7$ Hz, 1H, NH), 6.94 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H, H11), 6.75-6.65 (m, 2H, H3', H5'), 6.54 (s, 1H, H4), 4.70 (m, 1H, H7), 3.95 (s, 6H, 2x OCH_3), 3.91 (s, 3H, OCH_3), 3.66 (s, 3H, OCH_3), 2.55-2.35 (m, 3H, H6, H5), 2.05 (s, 3H, CH_3), 1.80-1.70 (m, 1H, H5).

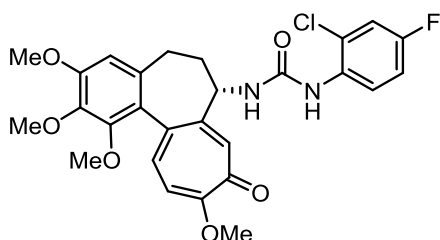
RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$): δ 180.0 (CO), 164.2 (C), 159.4 (d, $J = 243.0$ Hz, C, C-F), 155.5 (C), 154.7 (CO), 153.8 (C), 151.3 (C), 141.8 (C), 137.7 (C), 136.1 (CH), 134.5 (C), 132.8 (d, $J = 3.0$ Hz, C, C1'), 132.5 (d, $J = 8.0$ Hz, C, C2'), 131.2 (CH), 125.6 (C), 125.1 (d, $J = 8.0$ Hz, CH, C6'), 116.6 (d, $J = 22.3$ Hz, CH, C5'), 113.6 (CH), 113.0 (d, $J = 22.2$ Hz, CH, C3'), 107.5 (CH), 61.8 (OCH_3), 61.5 (OCH_3), 56.5 (OCH_3), 56.3 (OCH_3), 53.0 (CH), 37.8 (CH_2), 30.3 (CH_2), 18.0 (CH_3).

RMN ¹⁹F (282 MHz, CDCl₃): δ -120.3 (F).

IR ν_{max}: 3320 (N-H), 1698 (C=O) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₂₈H₂₉FN₂O₆ [M+H]⁺: 509.2082. Obtenida [M+H]⁺:509.2083.

(S) 1-(2-cloro-4-fluorofenil)-3-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidrobenzoheptalen-7-il) urea (6i)



Siguiendo el procedimiento general C, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco ligeramente amarillento, con un rendimiento de 55% y un punto de fusión de 181-183 °C. [α]_D +17.3 (c 0.72, CHCl₃).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 8.00 (s, 1H, H8), 7.95 (d, *J* ~ 6.5 Hz, 1H, NH), 7.80 (dd, *J* = 9.2, 5.7 Hz, 1H, H3'), 7.70 (s, 1H, NH), 7.44 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H, H12), 6.98 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H, H11), 6.77 (dd, *J* = 8.2, 3.1 Hz, 1H, H6'), 6.67 (ddd, *J* = 9.2, 8.2, 3 Hz, 1H, H5'), 6.51 (s, 1H, H4), 4.66 (m, 1H, H7), 4.03 (s, 3H, OCH₃), 3.95 (s, 3H, OCH₃), 3.90 (s, 3H, OCH₃), 3.67 (s, 3H, OCH₃), 2.50-2.30 (m, 3H, H6, H5), 1.90-1.80 (m, 1H, H5).

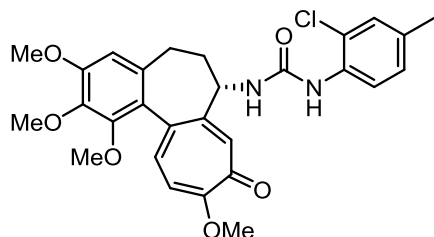
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 180.0 (CO), 164.3 (C), 157.3 (d, ¹J_{C-F} ~ 243.0 Hz, C, C-F), 154.6 (C), 154.4 (CO), 153.8 (C), 151.3 (C), 141.7 (C), 137.7 (C), 136.3 (CH), 134.5 (C), 132.6 (d, *J* = 3.0 Hz, C, C1'), 131.2 (CH), 125.5 (C), 123.0 (d, *J* = 8.5 Hz, C, C2'), 122.1 (d, *J* = 7.5 Hz, CH, C6'), 115.6 (d, *J* = 25.1 Hz, CH, C3'), 113.9 (d, *J* = 22.1 Hz, CH, C5'), 113.8 (CH), 107.4 (CH), 61.8 (OCH₃), 61.5 (OCH₃), 56.7 (OCH₃), 56.2 (OCH₃), 53.0 (CH), 37.4 (CH₂), 30.1 (CH₂).

RMN ¹⁹F (282 MHz, CDCl₃): δ -120.6 (F).

IR ν_{max}: 3300 (N-H), 1700 (C=O) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₂₇H₂₆ClFN₂O₆ [M+H]⁺: 529.1536. Obtenida [M+H]⁺:529.1529.

(S) 1-(2-cloro-4-metilfenil)-3-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidrobenzoheptalen-7-il) urea (6j)



Siguiendo el procedimiento general C, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 88% y un punto de fusión de 194-196 °C. [α]_D - 32.8 (c 0.52, CHCl₃).

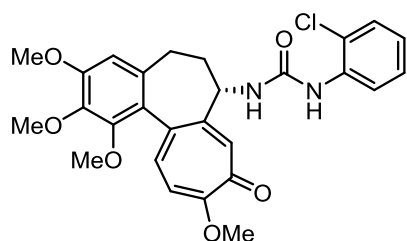
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.95 (s, 1H, NH), 7.70 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H6'), 7.50 (m, 2H, H8, NH), 7.40 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H, H12), 6.94 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H, H11), 6.88 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H3'), 6.77 (dd, *J* = 8.3, 2.1 Hz, 1H, H5'), 6.50 (s, 1H, H4), 4.67 (m, 1H, H7), 4.00 (s, 3H, OCH₃), 3.95 (s, 3H, OCH₃), 3.90 (s, 3H, OCH₃), 3.68 (s, 3H, OCH₃), 2.45-2.30 (m, 3H, H6, H5), 2.15 (s, 3H, CH₃), 1.85-1.80 (m, 1H, H5).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ 180.0 (CO), 164.2 (C), 154.4 (C), 154.1 (CO), 153.7 (C), 151.3 (C), 141.7 (C), 137.4 (C), 135.9 (CH), 134.6 (C), 133.5 (C), 132.5 (C), 131.3 (CH), 129.1 (CH), 127.9 (CH), 125.6 (C), 122.7 (C), 121.4 (CH), 113.5 (CH), 107.5 (CH), 61.9 (OCH_3), 61.5 (OCH_3), 56.6 (OCH_3), 56.2 (OCH_3), 53.0 (CH), 37.5 (CH_2), 30.2 (CH_2).

IR ν_{max} : 3300 (N-H), 1704 (C=O) cm^{-1} .

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para $\text{C}_{28}\text{H}_{29}\text{ClN}_2\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 525.1787. Obtenida $[\text{M}+\text{H}]^+$:525.1789.

(S) 1-(2-clorofenil)-3-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahydrobenzoheptalen-7-il) urea (6k)



Seguendo el procedimiento general C, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco ligeramente amarillento, con un rendimiento de 69% y un punto de fusión de 190-191 °C. $[\alpha]_{\text{D}}$ +2.6 (c 0.8, CHCl_3).

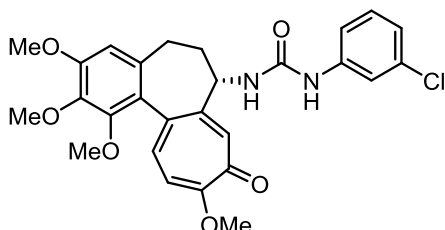
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 8.00 (s, 1H, H8), 7.87 (dd, $J = 8, 1.5$ Hz, 1H, H6'), 7.85 (d, $J \sim 6$ Hz, 1H, NH), 7.70 (s ancho, 1H, NH), 7.42 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, H12), 7.03 (dd, $J = 8.0, 1.5$ Hz, 1H, H3'), 6.96 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, H11), 6.95 (td, $J = 8.0, 1.5$ Hz, 1H, H5'), 6.72 (td, $J = 8.0, 1.5$ Hz, 1H, H4'), 6.45 (s, 1H, H4), 4.67 (m, 1H, H7), 4.03 (s, 3H, OCH_3), 3.95 (s, 3H, OCH_3), 3.89 (s, 3H, OCH_3), 3.68 (s, 3H, OCH_3), 2.40-2.30 (m, 3H, H6, H5), 1.85-1.80 (m, 1H, H5).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ 180.0 (CO), 164.3 (C), 154.3 (C), 154.2 (CO), 153.7 (C), 151.3 (C), 141.7 (C), 137.5 (C), 136.2 (C), 136.1 (CH), 134.5 (C), 131.2 (CH), 128.7 (CH), 127.2 (CH), 125.6 (C), 122.5 (CH), 121.0 (CH), 113.6 (CH), 107.4 (CH), 61.8 (OCH_3), 61.5 (OCH_3), 56.7 (OCH_3), 56.2 (OCH_3), 52.9 (CH), 37.4 (CH_2), 30.2 (CH_2).

IR ν_{max} : 3320 (N-H), 1702 (C=O) cm^{-1} .

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para $\text{C}_{27}\text{H}_{27}\text{ClN}_2\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 511.1630. Obtenida $[\text{M}+\text{H}]^+$:511.1635.

(S) 1-(3-clorofenil)-3-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahydrobenzoheptalen-7-il) urea (6l)



Seguendo el procedimiento general C, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 32% y un punto de fusión de 177-179 °C. $[\alpha]_{\text{D}}$ -26.2 (c 0.24, CHCl_3).

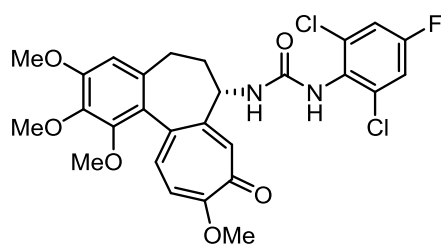
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 8.60 (s ancho, 1H, NH), 8.05 (s, 1H, H8), 7.50 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, H12), 7.35 (t, $J = 2.0$ Hz, 1H, H2'), 7.30-7.20 (m, 2H), 7.10-7.00 (m, 2H, H11, H5'), 6.85 (dt, $J = 8.0, 2.0$ Hz, 1H, H4'), 6.56 (s, 1H, H4), 4.88 (m, 1H, H7), 4.02 (s, 3H, OCH_3), 3.97 (s, 3H, OCH_3), 3.93 (s, 3H, OCH_3), 3.71 (s, 3H, OCH_3), 2.60-2.35 (m, 3H, H6, H5), 1.85 (m, 1H, H5).

RMN ^{13}C (75 MHz; CDCl_3): 180.0 (CO), 164.1 (C), 155.0 (C), 154.8 (CO), 153.9 (C), 151.3 (C), 141.8 (C), 141.2 (C), 138.2 (C), 136.1 (CH), 134.6 (C), 134.2 (C), 132.0 (CH), 129.7 (CH), 125.5 (C), 121.9 (CH), 119.1 (CH), 117.1 (CH), 113.8 (CH), 107.7 (CH), 61.9 (OCH_3), 61.5 (OCH_3), 56.6 (OCH_3), 56.3 (OCH_3), 52.3 (CH), 38.7 (CH_2), 30.5 (CH_2).

IR ν_{max} : 3330 (N-H), 1701 (C=O) cm^{-1}

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para $\text{C}_{27}\text{H}_{27}\text{ClN}_2\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 511.1630. Obtenida $[\text{M}+\text{H}]^+$: 511.1622.

(S)-1-(2,6-dicloro-4-fluorofenil)-3-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidrobenzoheptalen-7-il) urea (6m)



Seguendo el procedimiento general C, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 32% y un punto de fusión de 187-189 °C. $[\alpha]_{\text{D}} -72.7$ (c 0.66, CHCl_3).

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 8.35 (s ancho, 1H, NH), 8.21 (s, 1H, H8), 7.40 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H, H12), 7.15 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, NH), 7.05 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, H3', H5'), 6.84 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H, H11), 6.55 (s, 1H, H4), 4.87 (m, 1H, H7), 3.91 (s, 3H, OCH_3), 3.90 (s, 3H, OCH_3), 3.64 (s, 3H, OCH_3), 3.62 (s, 3H, OCH_3), 2.55-2.40 (m, 3H, H6, H5), 1.95-1.90 (m, 1H, H5).

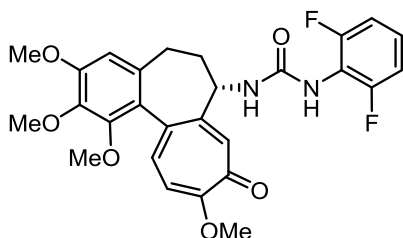
RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): δ 180.0 (CO), 163.6 (C), 159.8 (d, $J = 249.6$ Hz, C, C-F), 155.1 (C), 154.3 (CO), 153.7 (C), 151.3 (C), 141.7 (C), 138.0 (C), 135.6 (d, $J = 12.2$ Hz, 2x C, C2', C6'), 135.4 (CH), 134.7 (C), 132.0 (CH), 130.7 (d, $J = 4.0$ Hz, C, C1'), 125.5 (C), 115.8 (d, $J = 25.0$ Hz, 2x CH, C3', C5'), 113.1 (CH), 107.7 (CH), 61.8 (OCH_3), 61.5 (OCH_3), 56.3 (OCH_3), 56.1 (OCH_3), 52.5 (CH), 39.0 (CH_2), 30.5 (CH_2).

RMN ^{19}F (282 MHz, CDCl_3): $\delta -114.6$ (F).

IR ν_{max} : 3300 (N-H), 1698 (C=O) cm^{-1} .

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para $\text{C}_{27}\text{H}_{25}\text{Cl}_2\text{FN}_2\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 563.1156. Obtenida $[\text{M}+\text{H}]^+$: 563.1151.

(S) 1-(2,6-difluorofenil)-3-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidrobenzoheptalen-7-il) urea (6n)



Seguendo el procedimiento general C, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido ligeramente amarillento con un rendimiento de 46% y un punto de fusión de 190-192 °C. $[\alpha]_{\text{D}} -36.0$ (c 0.41, CHCl_3).

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 8.25 (s, 1H, NH), 8.15 (s, 1H, H8), 7.40 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, H12), 7.30 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, NH), 7.05 (m, 1H, H4'), 6.87 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, H11), 6.85 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H, H3', H5'), 6.55 (s, 1H, H4), 4.93 (m, 1H, H7), 3.93 (s, 3H, OCH_3), 3.91 (s, 3H, OCH_3), 3.72 (s, 3H, OCH_3), 3.64 (s, 3H, OCH_3), 2.55 (m, 2H, H6), 2.40 (m, 1H, H5), 1.90 (m, 1H, H5).

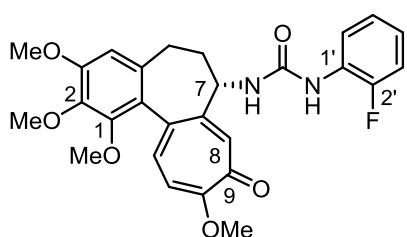
RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 180.0 (CO), 163.8 (C), 158.3 (dd, *J* = 248.1, 5.3 Hz, 2x C, C-F), 154.9 (C), 154.0 (CO), 153.7 (C), 151.3 (C), 141.7 (C), 137.9 (C), 135.5 (CH), 134.7 (C), 132.1 (CH), 125.9 (t, *J* = 9.0 Hz, CH, C4'), 125.6 (C), 116.1 (t, *J* = 16.2 Hz, C, C1'), 113.3 (CH), 111.5 (dd, *J* = 19.0, 5.2 Hz, 2x CH, C3', C5'), 107.7 (CH), 61.8 (OCH₃), 61.4 (OCH₃), 56.3 (OCH₃), 56.2 (OCH₃), 52.6 (CH), 39.0 (CH₂), 30.5 (CH₂).

RMN ¹⁹F (282 MHz, CDCl₃): δ -119.1 (2x F).

IR *v*_{max}: 3300 (N-H), 1704 (C=O) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₂₇H₂₆F₂N₂O₆ [M+H]⁺: 513.1832. Obtenida [M+H]⁺:513.1828.

(S) 1-(2-fluorofenil)-3-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahydrobenzoheptalen-7-il) urea (6o)



Seguendo el procedimiento general C, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 53% y un punto de fusión de 189-191 °C. [α]_D -71.4 (c 0.40, CHCl₃).

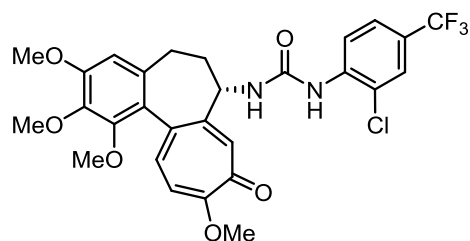
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.95 (s, 1H, H8), 7.87 (s ancho, 1H, NH), 7.82 (td, *J* = 8.0, 1.5 Hz, 1H, H6'), 7.55 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H, NH), 7.40 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H, H12), 6.95 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H, H11), 6.85-6.75 (m, 3H, H3', H4', H5'), 6.47 (s, 1H, H4), 4.70 (m, 1H, H7), 4.00 (s, 3H, OCH₃), 3.93 (s, 3H, OCH₃), 3.89 (s, 3H, OCH₃), 3.67 (s, 3H, OCH₃), 2.40-2.30 (m, 3H, H6, H5), 1.85-1.75 (m, 1H, H5).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 180.0 (CO), 164.3 (C), 154.4 (C), 154.2 (CO), 153.7 (C), 152.5 (d, *J* = 242.0 Hz, C, C-F), 151.3 (C), 141.7 (C), 137.5 (C), 136.1 (CH), 134.6 (C), 131.3 (CH), 127.8 (d, *J* = 10.2 Hz, C, C1'), 125.6 (C), 124.1 (d, *J* = 3.3 Hz, CH, C6'), 122.2 (d, *J* = 7.5 Hz, CH, C4'), 121.3 (CH), 114.5 (d, *J* = 19.5 Hz, CH, C3'), 113.6 (CH), 107.5 (CH), 61.8 (OCH₃), 61.5 (OCH₃), 56.6 (OCH₃), 56.2 (OCH₃), 52.8 (CH), 37.7 (CH₂), 30.2 (CH₂). **RMN ¹⁹F** (282 MHz, CDCl₃): δ -131.3 (F).

IR *v*_{max}: 3320 (N-H), 1704 (C=O) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₂₇H₂₇FN₂O₆ [M+H]⁺: 495.1926. Obtenida [M+H]⁺:495.1936.

(S) 1-(2-cloro-4-(trifluorometil)fenil)-3-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahydro benzoheptalen-7-il) urea (6p)



Seguendo el procedimiento general C, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 47% y un punto de fusión de 174-177 °C. [α]_D -10.2 (c 0.43, CHCl₃).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 8.35 (s ancho, 1H, NH), 8.03 (s, 1H, H8), 7.95 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H6'), 7.90 (s, 1H, NH), 7.48 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H, H12), 7.25 (s, 1H, H3'), 7.04 (d, *J* = 10.7 Hz, 1H, H11), 7.02 (dd, *J* = 8.8, 2.1 Hz,

1H, H5'), 6.52 (s, 1H, H4), 4.66 (m, 1H, H7), 4.06 (s, 3H, OMe), 3.96 (s, 3H, OMe), 3.90 (s, 3H, OMe), 3.69 (s, 3H, OMe), 2.50-2.35 (m, 3H, H6, H5), 1.90-1.85 (m, 1H, H5).

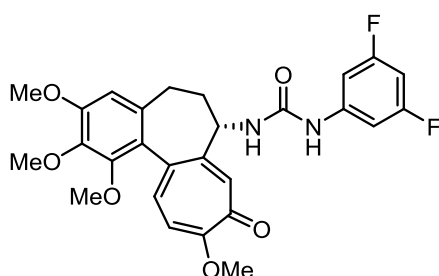
RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 180.2 (CO), 164.3 (C), 154.6 (CO), 153.9 (C), 153.6 (C), 151.3 (C), 141.8 (C), 139.3 (C), 137.9 (C), 136.6 (CH), 134.4 (C), 131.1 (CH), 125.7 (q, *J* = 3.5 Hz, CH, C3'), 125.4 (C), 124.3 (q, *J* = 3.5 Hz, CH, C5'), 123.8 (q, *J* = 33.1 Hz, C, C4'), 123.6 (q, *J* = 270.0 Hz, C, CF₃), 121.2 (C), 119.2 (CH), 114.2 (CH), 107.4 (CH), 61.8 (OCH₃), 61.5 (OCH₃), 56.8 (OCH₃), 56.2 (OCH₃), 53.1 (CH), 37.1 (CH₂), 30.1 (CH₂).

RMN ¹⁹F (282 MHz, CDCl₃): δ -62.6 (CF₃).

IR ν_{max}: 3300 (N-H), 1709 (C=O) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₂₈H₂₆ClF₃N₂O₆ [M+H]⁺: 579.1504. Obtenida [M+H]⁺:579.1489.

(S) 1-(3,5-difluorofenil)-3-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahydrobenzoheptalen-7-il) urea (6q)



Siguiendo el procedimiento general C, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 38% y un punto de fusión de 204-206 °C. [α]_D -24.6 (c 1.22, CHCl₃).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 8.80 (s ancho, 1H, NH), 8.02 (s, 1H, H8), 7.51 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H, H12), 7.25 (s ancho, 1H, NH), 7.05 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H, H11), 6.95 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H2', H6'), 6.56 (s, 1H, H4), 6.30 (t, *J* = 9.0 Hz, 1H, H4'), 4.87 (m, 1H, H7), 4.05 (s, 3H, OCH₃), 3.97 (s, 3H, OCH₃), 3.91 (s, 3H, OCH₃), 3.72 (s, 3H, OCH₃), 2.55-2.35 (m, 3H, H6, H5), 1.90-1.80 (m, 1H, H5).

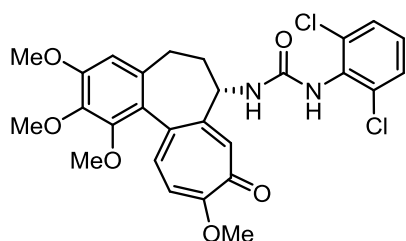
RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 180.0 (CO), 164.2 (C), 163.2 (dd *J* = 242.0, 5.1 Hz, 2x C, C-F), 155.0 (C), 154.4 (CO), 153.9 (C), 151.3 (C), 142.3 (t, *J* = 13.0 Hz, C, C1'), 141.8 (C), 138.3 (C), 136.3 (CH), 134.5 (C), 131.8 (CH), 125.5 (C), 114.1 (CH), 107.7 (CH), 101.4 (d, *J* = 22.7 Hz, 2x CH, C2', C6'), 96.8 (t, *J* = 25.7 Hz, CH, C4'), 61.8 (OCH₃), 61.5 (OCH₃), 56.5 (OCH₃), 56.2 (OCH₃), 52.2 (CH), 38.6 (CH₂), 30.4 (CH₂).

RMN ¹⁹F (282 MHz, CDCl₃): δ -111.07 (2x F).

IR ν_{max}: 3320 (N-H), 1704 (C=O) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₂₇H₂₆F₂N₂O₆ [M+H]⁺: 513.1832. Obtenida [M+H]⁺:513.1820.

(S) 1-(2,6-diclorofenil)-3-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahydrobenzoheptalen-7-il) urea (6r)



Siguiendo el procedimiento general C, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 27% y un punto de fusión de 176-178 °C. [α]_D -82.4 (c 0.44, CHCl₃).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 8.25 (s ancho, 1H, NH),

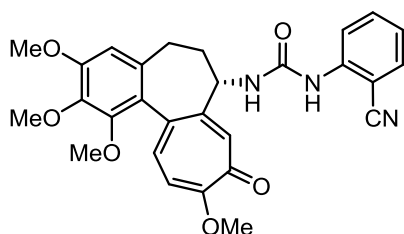
8.17 (s, 1H, H8), 7.37 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, H12), 7.28 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, H3', H5'), 7.05 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, H4'), 6.97 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, NH), 6.82 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, H11), 6.55 (s, 1H, H4), 4.87 (m, 1H, H7), 3.91 (s, 3H, OCH₃), 3.90 (s, 3H, OCH₃), 3.65 (s, 3H, OCH₃), 3.62 (s, 3H, OCH₃), 2.55-2.40 (m, 3H, H6, H5), 1.95-1.90 (m, 1H, H5).

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 180.0 (CO), 163.7 (C), 154.8 (C), 154.0 (CO), 153.7 (C), 151.3 (C), 141.7 (C), 137.7 (C), 135.3 (CH), 134.8 (2x C, C2', C6'), 134.7 (C), 134.0 (C), 132.0 (CH), 128.3 (2x CH), 127.6 (CH), 125.6 (C), 113.0 (CH), 107.7 (CH), 61.8 (OCH₃), 61.5 (OCH₃), 56.2 (OCH₃), 56.1 (OCH₃), 52.5 (CH), 38.9 (CH₂), 30.5 (CH₂).

IR ν_{max} : 3320 (N-H), 1698 (C=O) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₂₇H₂₆Cl₂N₂O₆ [M+H]⁺: 545.1241. Obtenida [M+H]⁺:545.1229.

(S) 1-(2-cianofenil)-3-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahydrobenzoheptalen 7-il) urea (6s)



Siguiendo el procedimiento general C, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 60% y un punto de fusión de 177-179 °C. $[\alpha]_{\text{D}}$ -54.5 (c 0.50, CHCl₃).

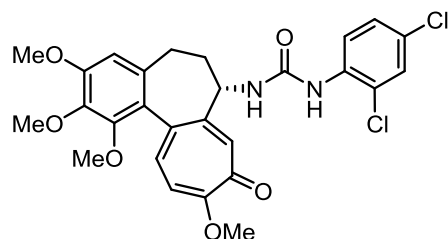
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 8.03 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H6', NH), 7.95 (s, 1H, H8), 7.80 (s, 1H, NH), 7.40 (m, 2H, H12, H3'), 7.25 (t, $J = 8.2$ Hz, 1H, H5'), 6.95 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H, H11), 6.89 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, H4'), 6.55 (s, 1H, H4), 4.70 (m, 1H, H7), 4.00 (s, 3H, OCH₃), 3.96 (s, 3H, OCH₃), 3.93 (s, 3H, OCH₃), 3.70 (s, 3H, OCH₃), 2.55-2.35 (m, 3H, H6, H5), 1.95 (m, 1H, H5).

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 180.1 (CO), 164.3 (C), 153.8 (C), 153.5 (CO), 153.2 (C), 151.2 (C), 142.6 (C), 141.5 (C), 137.2 (C), 135.9 (CH), 134.5 (C), 133.7 (CH), 132.5 (CH), 131.5 (CH), 125.6 (C), 121.6 (CH), 119.9 (CH), 116.9 (C), 113.5 (CH), 107.3 (CH), 100.4 (C), 61.7 (OCH₃), 61.4 (OCH₃), 56.5 (OCH₃), 56.1 (OCH₃), 52.9 (CH), 37.2 (CH₂), 30.1 (CH₂).

IR ν_{max} : 3300 (N-H), 1704 (C=O) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₂₈H₂₇N₃O₆ [M+H]⁺: 502.1973. Obtenida [M+H]⁺:502.1982.

(S) 1-(2,4-diclorofenil)-3-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahydrobenzoheptalen-7-il) urea (6t)



Siguiendo el procedimiento general C, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco ligeramente amarillento, con un rendimiento de 38% y un punto de fusión de 177-180 °C. $[\alpha]_{\text{D}}$ +24.9 (c 0.74, CHCl₃).

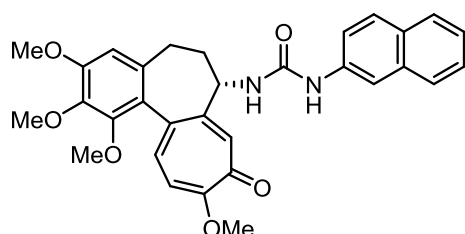
RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 8.10 (s ancho, 1H, NH), 7.98 (s, 1H, H8), 7.83 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, H6'), 7.70 (s, 1H, NH), 7.45 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, H12), 7.05-6.95 (m, 2H, H11, H3'), 6.86 (dd, $J = 8.8, 2.4$ Hz, H5'), 6.50 (s, 1H, H4), 4.65 (m, 1H, H7), 4.04 (s, 3H, OCH_3), 3.95 (s, 3H, OCH_3), 3.90 (s, 3H, OCH_3), 3.66 (s, 3H, OCH_3), 2.50-2.30 (m, 3H, H6, H5), 1.85-1.75 (m, 1H, H5).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): δ 180.1 (CO), 164.3 (C), 154.6 (C), 153.9 (C), 153.8 (CO), 151.3 (C), 141.7 (C), 137.8 (C), 136.4 (CH), 135.0 (C), 134.5 (C), 131.2 (CH), 128.2 (CH), 127.2 (CH), 126.5 (C), 125.5 (C), 122.3 (C), 121.0 (CH), 114.0 (CH), 107.5 (CH), 61.8 (OCH_3), 61.5 (OCH_3), 56.7 (OCH_3), 56.3 (OCH_3), 53.0 (CH), 37.2 (CH_2), 30.2 (CH_2).

IR ν_{max} : 3300 (N-H), 1704 (C=O) cm^{-1} .

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 545.1241 Obtenida $[\text{M}+\text{H}]^+$:545.1217.

(S) 1-(naftalen-2-il)-3-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahydrobenzoheptalen-7-il) urea (6u)



Seguendo el procedimiento general C, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 27% y un punto de fusión de 182-184 °C. $[\alpha]_{\text{D}} -38.3$ (c 0.56, CHCl_3).

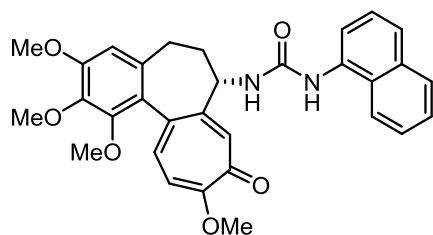
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 8.50 (s, 1H, NH), 8.15 (s, 1H, H8), 7.85 (s, 1H, H1'), 7.56 (t, $J = 8.5$ Hz, H6', H7'), 7.50 (m, 1H, NH), 7.46 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, H12), 7.30-7.20 (m, 4H, H3', H4', H5', H8'), 6.96 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, H11), 6.53 (s, 1H, H4), 4.90 (m, 1H, H7), 3.96 (s, 6H, 2x OCH_3), 3.90 (s, 3H, OCH_3), 3.74 (s, 3H, OCH_3), 2.50-2.35 (m, 3H, H6, H5), 1.90-1.80 (m, 1H, H5).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ 180.0 (CO), 164.1(C), 155.3 (C), 154.6 (CO), 153.7 (C), 151.3 (C), 141.7 (C), 137.9 (C), 137.1 (C), 135.9 (CH), 134.6 (C), 134.2 (C), 131.8 (CH), 129.7 (C), 128.3 (CH), 127.4 (CH), 127.3 (CH), 125.9 (CH), 125.5 (C), 123.8 (CH), 120.5 (CH), 115.3 (CH), 113.6 (CH), 107.5 (CH), 61.8 (OCH_3), 61.5 (OCH_3), 56.5 (OCH_3), 56.2 (OCH_3), 52.4 (CH), 38.3 (CH_2), 30.4 (CH_2).

IR ν_{max} : 3300 (N-H), 1698 (C=O) cm^{-1} .

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para $\text{C}_{31}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 527.2177 Obtenida $[\text{M}+\text{H}]^+$:527.2179.

(S) 1-(naftalen-1-il)-3-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahydrobenzoheptalen-7-il) urea (6v)



Seguendo el procedimiento general C, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 32% y un punto de fusión de 180-182 °C. $[\alpha]_{\text{D}} -1.2$ (c 0.61, CHCl_3).

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 8.25 (s, 1H, NH), 8.10

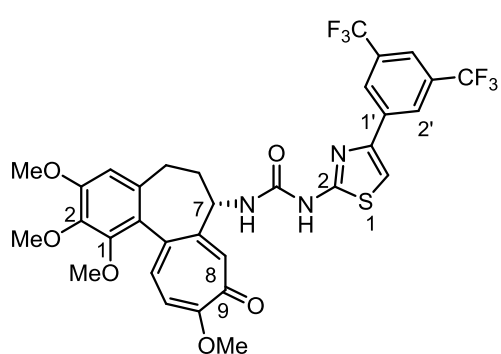
(s, 1H, H8), 8.00 (s, 1H, NH), 7.75 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.60 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.57 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.39 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, H12), 7.40-7.25 (m, 3H Ar), 7.05 (s ancho, 1H), 6.80 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, H11), 6.55 (s, 1H, H4), 4.88 (m, 1H, H7), 3.92 (s, 3H, OCH₃), 3.90 (s, 3H, OCH₃), 3.65 (s, 3H, OCH₃), 3.57 (s, 3H, OCH₃), 2.55-2.35 (m, 3H, H6, H5), 1.85-1.75 (m, 1H, H5).

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 180.0 (CO), 164.1 (C), 156.0 (C), 154.3 (CO), 153.7 (C), 151.3 (C), 141.7 (C), 137.6 (C), 135.7 (CH), 134.6 (C), 134.3 (C), 134.0 (C), 131.8 (CH), 128.7 (C), 128.2 (CH), 126.0 (CH), 125.9 (CH), 125.8 (CH), 125.6 (C), 125.0 (CH), 122.3 (CH), 121.7 (CH), 113.3 (CH), 107.6 (CH), 61.8 (OCH₃), 61.5 (OCH₃), 56.3 (OCH₃), 56.2 (OCH₃), 52.8 (CH), 38.5 (CH₂), 30.4 (CH₂).

IR ν_{\max} : 3300 (N-H), 1698 (C=O) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₃₁H₃₀N₂O₆ [M+H]⁺: 527.2177
Obtenida [M+H]⁺: 527.2176.

(S)-1-(4-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)tiazol-2-il)-3-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahydrobenzoheptalen-7-il) urea (6w)



Siguiendo el procedimiento general C, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 30% y un punto de fusión de 167-170 °C. $[\alpha]_D^{25} +8.3$ (c 0.40, CHCl₃).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 10.05 (s ancho, 1H, NH), 8.29 (s, 2H, H2', H6'), 8.25 (s ancho, 2H, H8, NH), 7.75 (s, 1H, H4'), 7.58 (d, $J = 10.8$

Hz, H12), 7.11 (s, 1H, H5 tiazol), 7.10 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, H11), 6.6 (s, 1H, H4), 5.05 (m, 1H, H7), 4.15 (s, 3H, OCH₃), 3.98 (s, 3H, OCH₃), 3.92 (s, 3H, OCH₃), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 2.55-2.45 (m, 3H, H6, H5), 2.02 (m, 1H, H5).

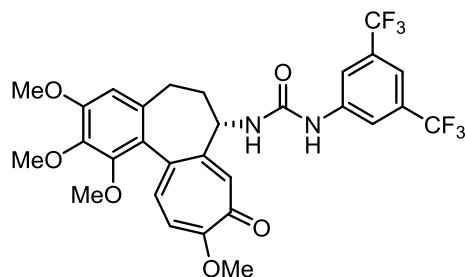
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 180.3 (CO), 165.0 (C), 162.2 (C), 154.9 (C), 154.3 (CO), 152.1 (C), 147.1 (C), 142.3 (C), 138.3 (C), 137.5 (C), 135.7 (CH), 135.0 (C), 132.5 (CH), 132.3 (q, $J = 33.1$ Hz, 2x C, C3', C5'), 132.0 (C), 126.2 (q, $J = 260.1$ Hz, 2x C, CF₃), 126.1 (2x CH), 125.9 (C), 120.7 (CH), 113.8 (CH), 109.5 (CH), 107.6 (CH), 61.8 (OCH₃), 61.5 (OCH₃), 57.8 (OCH₃), 57.1 (OCH₃), 52.3 (CH), 32.5 (CH₂), 30.4 (CH₂).

RMN ¹⁹F (282 MHz, CDCl₃): δ -63.3 (2x CF₃).

IR ν_{\max} : 3308 (N-H), 1698 (C=O) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₃₂H₂₇F₆N₃O₆S [M+H]⁺: 696.1598. Obtenida [M+H]⁺: 696.1599.

(S)-1-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-3-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidro benzoheptalen-7-il) urea (6x)



Seguendo el procedimiento general D, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco ligeramente amarillento, con un rendimiento de 22% y un punto de fusión de 205-207 °C. $[\alpha]_D -31.1$ (c 0.40, CHCl₃).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 9.25 (s, 1H, NH), 8.10 (s, 1H, H8), 7.85 (s, 2H, H2', H6'), 7.56 (d, J = 10.8 Hz, 1H, H12), 7.35 (m, 2H, H4', NH), 7.08 (d, J = 10.8 Hz, 1H, H11), 6.58 (s, 1H, H4), 4.96 (m, 1H, H7), 4.02 (s, 3H, OCH₃), 3.99 (s, 3H, OCH₃), 3.93 (s, 3H, OCH₃), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 2.55-2.40 (m, 3H, H6, H5), 1.95-1.90 (m, 1H, H5).

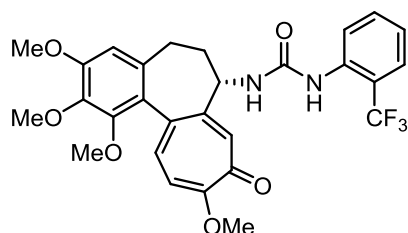
RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 180.0 (CO), 164.1 (C), 155.2 (C), 154.5 (C), 154.1 (CO), 151.4 (C), 142.0 (C), 141.7 (C), 138.5 (C), 136.6 (CH), 134.5 (C), 132.1 (CH), 131.8 (q, J = 33.2 Hz, 2x C, C3', C5'), 125.4 (C), 123.5 (q, J = 270.0 Hz, 2x C, CF₃), 118.1 (q, J = 4.0 Hz, 2x CH, C2', C6'), 114.8 (sept, J = 3.5 Hz, CH, C4'), 114.3 (CH), 107.7 (CH), 61.9 (OCH₃), 61.5 (OCH₃), 56.6 (OCH₃), 56.3 (OCH₃), 52.2 (CH), 38.9 (CH₂), 30.5 (CH₂).

RMN ¹⁹F (282 MHz, CDCl₃): δ -63.4 (2x CF₃).

IR ν_{max} : 3320 (N-H), 1704 (C=O) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₂₉H₂₆F₆N₂O₆ [M+H]⁺: 613.1768. Obtenida [M+H]⁺: 613.1751.

(S)-1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidrobenzoheptalen-7-il)-3-(2-(trifluoro metil)fenil) urea (6y)



Seguendo el procedimiento general D, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 36% y un punto de fusión de 203-205 °C. $[\alpha]_D -77.2$ (c 0.54, CHCl₃).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.90 (s, 1H, H8), 7.85 (d ancho, J = 6.0 Hz, 1H, NH), 7.79 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H3'), 7.52 (s, 1H, NH), 7.44 (d, J = 10.8 Hz, 1H, H12), 7.38 (d, J = 7.8 Hz, 1H, H6'), 7.22 (t, J = 7.8 Hz, 1H, H4'), 7.00-6.90 (m, 2H, H11, H5'), 6.53 (s, 1H, H4), 4.68 (m, 1H, H7), 4.00 (s, 3H, OCH₃), 3.94 (s, 3H, OCH₃), 3.90 (s, 3H, OCH₃), 3.67 (s, 3H, OCH₃), 2.50-2.35 (m, 3H, H6, H5), 1.85-1.75 (m, 1H, H5).

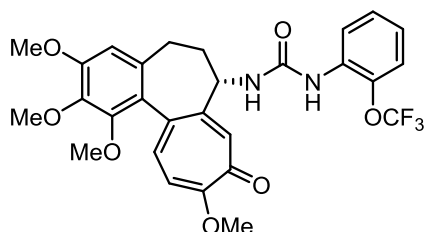
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 180.0 (CO), 164.3 (C), 154.7 (C), 154.2 (CO), 153.6 (C), 151.3 (C), 141.7 (C), 137.3 (C), 137.0 (q, J = 1.6 Hz, C, C1'), 135.9 (CH), 134.5 (C), 132.4 (CH), 131.1 (CH), 125.6 (q, J = 5.5 Hz, CH, C3'), 125.5 (C), 124.5 (CH), 124.0 (q, J = 273.0 Hz, C, CF₃), 120.0 (q, J = 28.5 Hz, C, C2'), 122.5 (CH), 113.5 (CH), 107.4 (CH), 61.7 (OCH₃), 61.4 (OCH₃), 56.5 (OCH₃), 56.2 (OCH₃), 53.0 (CH), 37.4 (CH₂), 30.2 (CH₂).

RMN ¹⁹F (282 MHz, CDCl₃): δ -61.5 (CF₃).

IR ν_{max} : 3300 (N-H), 1704 (C=O) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₂₈H₂₇F₃N₂O₆ [M+H]⁺: 545.1894. Obtenida [M+H]⁺:545.1893.

(S)-1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidrobenzoheptalen-7-il)-3-(2-(trifluorometoxi)fenil) urea (6z)



Seguendo el procedimiento general D, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 35% y un punto de fusión de 185-187 °C. $[\alpha]_{\text{D}} -57.9$ (c 0.67, CHCl₃).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 7.95 (s, 1H, H8), 7.91 (dd, *J* = 8.3, 1.5 Hz, 1H, H6'), 7.70 (s, 1H, NH), 7.65 (d ancho, *J* = 5.5 Hz, 1H, NH), 7.42 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H, H12), 7.00 (dd, *J* = 8.3, 1.5 Hz, 1H, H3'), 6.95 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H, H11), 6.92 (td, *J* = 8.3, 1.5 Hz, 1H, H4'), 6.77 (td, *J* = 8.3, 1.5 Hz, 1H, H5'), 6.52 (s, 1H, H4), 4.70 (m, 1H, H7), 4.00 (s, 3H, OCH₃), 3.95 (s, 3H, OCH₃), 3.91 (s, 3H, OCH₃), 3.67 (s, 3H, OCH₃), 2.50-2.35 (m, 3H, H6, H5), 1.80 (m, 1H, H5).

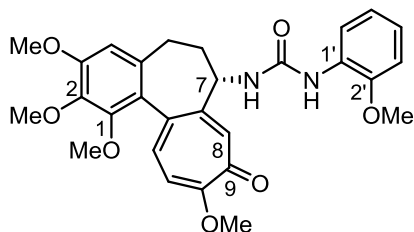
RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 180.2 (CO), 164.4 (C), 154.2 (C), 154.1 (CO), 153.7 (C), 151.3 (C), 141.8 (C), 137.8 (C), 137.4 (C), 136.0 (CH), 134.5 (C), 132.0 (C), 131.1 (CH), 127.0 (CH), 125.7 (C), 121.7 (CH), 121.1 (CH), 120.6 (q, *J* = 257.0 Hz, C, OCF₃), 119.8 (CH), 113.5 (CH), 107.4 (CH), 61.7 (OCH₃), 61.6 (OCH₃), 56.6 (OCH₃), 56.3 (OCH₃), 53.0 (CH), 37.5 (CH₂), 30.2 (CH₂).

RMN ¹⁹F (282 MHz, CDCl₃): δ -58.2 (OCF₃).

IR ν_{max} : 3330 (N-H), 1702 (C=O) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₂₈H₂₇F₃N₂O₇ [M+H]⁺: 561.1843. Obtenida [M+H]⁺:561.1834.

(S)-1-(2-metoxifenil)-3-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidrobenzoheptalen-7-il) urea (6a')



Seguendo el procedimiento general D, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 41% y un punto de fusión de 181-183 °C. $[\alpha]_{\text{D}} -28.2$ (c 0.40, CHCl₃).

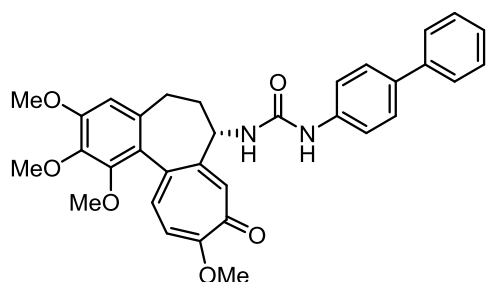
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.80 (s, 1H, H8), 7.76 (dd, *J* = 7.8, 1.5 Hz, 1H, H6'), 7.35 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H, H12), 7.31 (s ancho, 1H, NH), 6.90 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H, H11), 6.80 (td, *J* = 7.8, 1.5 Hz, 1H, H4'), 6.70 (td, *J* = 7.8, 1.5 Hz, 1H, H5'), 6.64 (dd, *J* = 7.8, 1.5 Hz, 1H, H3'), 6.52 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, NH), 6.50 (s, 1H, H4), 4.67 (m, 1H, H7), 4.01 (s, 3H, OCH₃), 3.95 (s, 3H, OCH₃), 3.90 (s, 3H, OCH₃), 3.69 (s, 3H, OCH₃), 3.57 (s, 3H, OCH₃), 2.45-2.30 (m, 3H, H6, H5), 1.80-1.70 (m, 1H, H5).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 179.9 (CO), 164.2 (C), 154.3 (C), 153.7 (CO), 153.4 (C), 151.3 (C), 148.1 (C), 141.8 (C), 137.1 (C), 135.5 (CH), 134.6 (C), 131.4 (CH) 128.6 (C), 125.7 (C), 122.1 (CH), 120.8 (CH), 119.2 (CH), 113.0 (CH), 110.0 (CH), 107.5 (CH), 61.7 (OCH₃), 61.5 (OCH₃), 56.6 (OCH₃), 56.3 (OCH₃), 55.7 (OCH₃), 52.8 (CH), 37.6 (CH₂), 30.2 (CH₂).

IR ν_{\max} : 3340 (N-H), 1694 (C=O) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₂₈H₃₀N₂O₇ [M+H]⁺: 507.2126. Obtenida [M+H]⁺:507.2129.

(S)-1-([1,1'-bifenil]-4-il)-3-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidrobenzoheptalen-7-il) urea (6b')



Seguendo el procedimiento general D, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 31% y un punto de fusión de 197-199 °C. [α]_D +25.6 (c 0.55, CHCl₃).

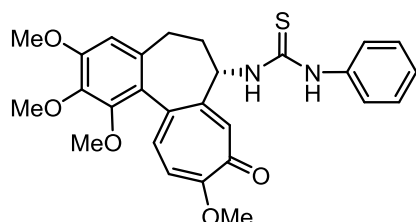
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 8.25 (s ancho, 1H, NH), 8.00 (s, 1H, H8), 7.45 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H, H12), 7.40 (m, 2H Ar), 7.30-7.15 (m, 8H, 7H Ar, NH), 6.92 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H, H11), 6.47 (s, 1H, H4), 4.65 (m, 1H, H7), 3.93 (s, 3H, OCH₃), 3.89 (s, 3H, OCH₃), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 3.65 (s, 3H, OCH₃), 2.45-2.30 (m, 3H, H6, H5), 1.85-1.75 (m, 1H, H5).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 180.0 (CO) 164.1 (C), 155.1 (C), 154.7 (CO), 153.7 (C), 151.3 (C), 141.7 (C), 141.0 (C), 138.8 (C), 137.9 (C), 136.0 (CH) 135.0 (C), 134.6 (C), 131.6 (CH), 128.6 (2x CH), 127.3 (2x CH), 126.7 (2x CH), 126.6 (CH), 125.5 (C), 120.0 (2x CH), 113.7 (CH), 107.5 (CH), 61.9 (OCH₃), 61.5 (OCH₃), 56.5 (OCH₃), 56.2 (OCH₃), 52.5 (CH), 38.2 (CH₂), 30.4 (CH₂).

IR ν_{\max} : 3300 (N-H), 1700 (C=O) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₃₃H₃₂N₂O₆ [M+H]⁺: 553.2333. Obtenida [M+H]⁺:553.2335.

(S)-1-fenil-3-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidrobenzoheptalen-7-il)tiourea (9)



Se disuelve el compuesto **4** (0.21 mmol, 100 mg) bajo atmósfera inerte, en CH₂Cl₂ anhidro (2 mL). A continuación se añade Et₃N (0.42 mmol; 59 μL) y por último se adiciona lentamente fenilisotiocianato (0.21 mmol, 25 μL) para llevar a cabo el acoplamiento. Se mantiene la mezcla con agitación a temperatura ambiente durante dos horas. Se añade H₂O (1 mL) y se extrae el compuesto en CH₂Cl₂ (20 mL), lavando la fase orgánica con HCl 0.1 M, NaCl (sat) y sacándola sobre Na₂SO₄ anhidro. Tras evaporar el disolvente a vacío, se obtuvo el compuesto esperado mediante cromatografía con gel de sílice empleando AcOEt como eluyente.

Se disuelve el compuesto **4** (0.21 mmol, 100 mg) bajo atmósfera inerte, en CH₂Cl₂ anhidro (2 mL). A continuación se añade Et₃N (0.42 mmol; 59 μL) y por último se adiciona lentamente fenilisotiocianato (0.21 mmol, 25 μL) para llevar a cabo el acoplamiento. Se mantiene la mezcla con agitación a temperatura ambiente durante dos horas. Se añade H₂O (1 mL) y se extrae el compuesto en CH₂Cl₂ (20 mL), lavando la fase orgánica con HCl 0.1 M, NaCl (sat) y sacándola sobre Na₂SO₄ anhidro. Tras evaporar el disolvente a vacío, se obtuvo el compuesto esperado mediante cromatografía con gel de sílice empleando AcOEt como eluyente.

Se obtuvo un sólido blanco con un rendimiento de 73% y un punto de fusión de 190-192 °C. $[\alpha]_D -22.9$ (c 0.51, CHCl₃).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 8.70 (s ancho, 1H, NH), 8.00 (d ancho, $J = 6.7$ Hz, 1H, NH), 7.62 (s, 1H, H8), 7.32 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H, H12), 7.25 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, H2', H6'), 7.12 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, H5', H3'), 7.02 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, H4'), 6.82 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H, H11), 6.50 (s, 1H, H4), 5.25 (m, 1H, H7), 3.92 (s, 3H, OCH₃), 3.84 (s, 3H, OCH₃), 3.82 (s, 3H, OCH₃), 3.67 (s, 3H, OCH₃), 2.40-2.25 (m, 3H, H6, H5), 1.85-1.75 (m, 1H, H5).

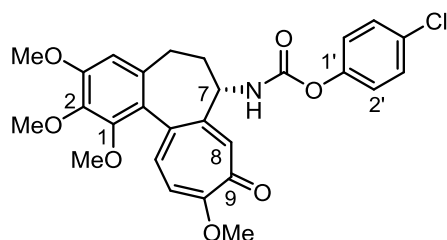
RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃): δ 182.5 (CS), 180.0 (CO) 165.1 (C), 155.0 (C), 154.6 (C), 153.7 (C), 151.6 (C), 141.7 (C), 138.8 (C), 138.2 (C), 136.7 (CH), 135.1 (C), 131.8 (CH), 129.8 (2x CH), 126.2 (CH), 125.9 (2x CH), 113.5 (CH), 107.7 (CH), 62.2 (OCH₃), 61.5 (OCH₃), 57.4 (CH), 56.5 (OCH₃), 56.2 (OCH₃), 37.9 (CH₂), 30.4 (CH₂).

IR ν_{\max} : 3294 (N-H), 1614 (C=S) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₂₇H₂₈N₂O₅S [M+H]⁺: 493.1719. Obtenida [M+H]⁺: 493.1725.

CARABAMATOS

(S)-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahydrobenzoheptalen-7-il) carbamato de 4-cloro fenilo (11a)



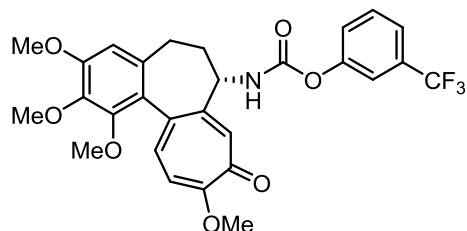
Seguendo el procedimiento general F, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 38% y un punto de fusión de 173-175 °C. $[\alpha]_D -174.5$ (c 0.74, CHCl₃).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.65 (s, 1H, H8), 7.29 (d, $J = 10.5$ Hz, 1H, H12), 7.18 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H2', H6'), 6.93 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H3', H5'), 6.82 (d, $J = 10.5$ Hz, 1H, H11), 6.55 (s, 1H, H4), 6.31 (d, $J = 6.2$ Hz, 1H, NH), 4.50 (m, 1H, H7), 3.99 (s, 3H, OCH₃), 3.91 (s, 3H, OCH₃), 3.90 (s, 3H, OCH₃), 3.55 (s, 3H, OCH₃), 2.55 (m, 1H, H6), 2.45-2.35 (m, 2H, H5, H6), 1.90 (m, 1H, H5).

RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃): δ 179.7 (CO), 164.2 (C), 153.7 (C), 153.6 (CO), 151.3 (C), 150.8 (C), 149.3 (C), 141.8 (C), 136.1 (C), 135.4 (CH), 134.1 (C), 131.1 (CH), 130.9 (C), 129.4 (2x CH), 125.6 (C), 123.1 (2x CH), 112.5 (CH), 107.5 (CH), 61.5 (OCH₃), 61.4 (OCH₃), 56.5 (OCH₃), 56.2 (OCH₃), 54.3 (CH), 37.3 (CH₂), 30.0 (CH₂).

IR ν_{\max} : 3229 (N-H), 1737 (C=O) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₂₇H₂₆ClNO₇ [M+H]⁺: 512.1476. Obtenida [M+H]⁺: 512.1473.

(S)-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahydrobenzoheptalen-7-il) carbamato de 3-(trifluorometil) fenilo (11b)

Siguiendo el procedimiento general F, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 42% y un punto de fusión de 165-168 °C. $[\alpha]_D -146.8$ (c 0.30, CHCl₃).

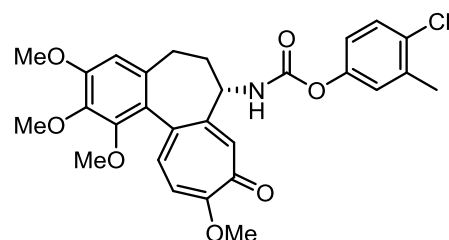
RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 7.62 (s, 1H, H8), 7.39 (m, 2H, H2', H4'), 7.31 (m, 1H, H6'), 7.30 (d, $J = 10.5$ Hz, 1H, H12), 7.22 (m, 1H, H5'), 6.83 (d, $J = 10.5$ Hz, 1H, H11), 6.56 (s, 1H, H4), 5.96 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, NH), 4.51 (m, 1H, H7), 4.00 (s, 3H, OCH₃), 3.92 (s, 3H, OCH₃), 3.91 (s, 3H, OCH₃), 3.57 (s, 3H, OCH₃), 2.56 (m, 1H, H6), 2.48-2.38 (m, 2H, H5, H6), 1.89 (m, 1H, H5).

RMN ¹³C (125 MHz; CDCl₃): δ 179.6 (CO), 164.3 (C), 153.7 (C), 153.2 (CO), 151.4 (C), 150.9 (C), 150.4 (C), 141.9 (C), 135.9 (C), 135.5 (CH), 134.1 (C), 131.9 (q, $J = 32.7$ Hz, C, C3'), 131.1 (CH), 130.0 (CH), 125.6 (C), 125.3 (CH), 123.5 (q, $J = 270.6$ Hz, C, CF₃), 122.4 (q, $J = 3.6$ Hz, CH), 118.9 (q, $J = 3.6$ Hz, CH), 112.4 (CH), 107.5 (CH), 61.6 (OCH₃), 61.5 (OCH₃), 56.5 (OCH₃), 56.3 (OCH₃), 54.3 (CH), 37.5 (CH₂), 30.0 (CH₂).

RMN ¹⁹F (282 MHz, CDCl₃): δ -63.2 (CF₃).

IR ν_{\max} : 3232 (N-H), 1737 (C=O) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₂₈H₂₆F₃NO₇ [M+H]⁺: 546.1740
Obtenida [M+H]⁺: 546.1737.

(S)-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahydrobenzoheptalen-7-il) carbamato de 4-cloro-3-metilfenilo (11c)

Siguiendo el procedimiento general F, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 39% y un punto de fusión de 175-178 °C. $[\alpha]_D -164.9$ (c 1.03, CHCl₃).

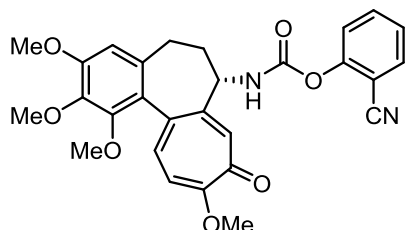
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.66 (s, 1H, H8), 7.29 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, H12), 7.18 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H5'), 6.87 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H, H2'), 6.83 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H, H11), 6.76 (dd, $J = 8.7, 3.0$ Hz, 1H, H6'), 6.55 (s, 1H, H4), 6.42 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, NH), 4.50 (m, 1H, H7), 3.99 (s, 3H, OCH₃), 3.91 (s, 3H, OCH₃), 3.90 (s, 3H, OCH₃), 3.55 (s, 3H, OCH₃), 2.54 (m, 1H, H6), 2.40 (m, 2H, H5, H6), 2.22 (s, 3H, CH₃), 1.90 (m, 1H, H5).

RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃): δ 179.7 (CO), 164.2 (C), 153.8 (C), 153.7 (CO), 151.3 (C), 151.0 (C), 149.2 (C), 141.8 (C), 137.3 (C), 136.2 (C), 135.4 (CH), 134.2 (C), 131.1 (CH), 129.6 (CH), 125.6 (C), 125.5 (C), 124.2 (CH), 120.5 (CH), 112.5 (CH), 107.5 (CH), 61.5 (OCH₃), 61.4 (OCH₃), 56.5 (OCH₃), 56.2 (OCH₃), 54.3 (CH), 37.3 (CH₂), 30.0 (CH₂), 20.1 (CH₃).

IR ν_{\max} : 3240 (N-H), 1734 (C=O) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para $C_{28}H_{28}ClNO_7$ $[M+H]^+$: 526.1633. Obtenida $[M+H]^+$: 526.1634.

(S)-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahydrobenzoheptalen-7-il) carbamato de 2-cianofenilo (11d)



Seguendo el procedimiento general F, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 34% y un punto de fusión de 128-130 °C. $[\alpha]_D -242.1$ (c 0.54, $CHCl_3$).

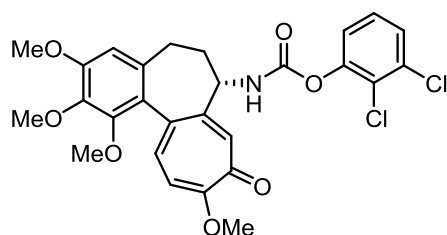
RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$): δ 7.60 (s, 1H, H8), 7.58-7.48 (m, 2H, H4', H6'), 7.30 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, H12), 7.28 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, H5'), 7.22 (dd, $J = 7.5, 1.9$ Hz, 1H, H3'), 6.83 (d, $J = 11$ Hz, 1H, H11), 6.57 (s, 1H, H4), 6.03 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, NH), 4.49 (m, 1H, H7), 4.00 (s, 3H, OCH_3), 3.92 (s, 3H, OCH_3), 3.91 (s, 3H, OCH_3), 3.56 (s, 3H, OCH_3), 2.55-2.40 (m, 3H, H6, H5), 1.90 (m, 1H, H5).

RMN ^{13}C (75 MHz; $CDCl_3$): δ 179.6 (CO), 164.3 (C), 153.8 (CO), 152.4 (C), 152.2 (C), 151.3 (C), 150.2 (C), 141.8 (C), 136.0 (C), 135.5 (CH), 134.2 (CH), 134.1 (C), 133.2 (CH), 131.0 (CH), 126.0 (CH), 125.4 (C), 123.4 (CH), 115.4 (C), 112.5 (CH), 107.6 (CH), 106.9 (C), 61.5 (2x OCH_3), 56.5 (OCH_3), 56.3 (OCH_3), 54.5 (CH), 37.3 (CH_2), 29.9 (CH_2).

IR ν_{max} : 3270 (N-H), 1748 (C=O) cm^{-1} .

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para $C_{28}H_{26}N_2O_7$ $[M+H]^+$: 503.1818. Obtenida $[M+H]^+$: 503.1815.

(S)-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahydrobenzoheptalen-7-il) carbamato de 2,3-diclorofenilo (11e)



Seguendo el procedimiento general F, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco ligeramente amarillento, con un rendimiento de 42% y un punto de fusión de 161-163 °C. $[\alpha]_D -215.9$ (c 1.15, $CHCl_3$).

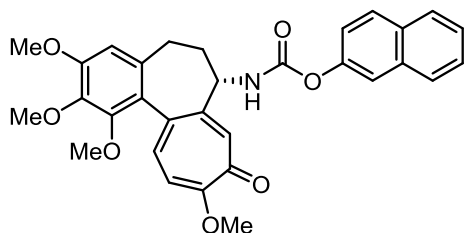
RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$): δ 7.68 (s, 1H, H8), 7.28 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, H12), 7.24 (dd, $J = 8.1, 1.8$ Hz, 1H, H4'), 7.08 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H, H5'), 7.01 (dd, $J = 8.1, 1.8$ Hz, 1H, H6'), 6.82 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, H11), 6.55 (s, 1H, H4), 6.41 (s ancho, 1H, NH), 4.49 (m, 1H, H7), 3.99 (s, 3H, OCH_3), 3.90 (s, 6H, 2x OCH_3), 3.53 (s, 3H, OCH_3), 2.57-2.40 (m, 3H, H6, H5), 1.91 (m, 1H, H5).

RMN ^{13}C (75 MHz; $CDCl_3$): δ 179.6 (CO), 164.3 (C), 153.8 (C), 153.6 (CO), 152.5 (C), 151.3 (C), 150.5 (C), 148.3 (C), 141.8 (C), 136.0 (C), 135.4 (CH), 134.2 (C), 133.8 (C), 131.1 (CH), 127.7 (CH), 127.4 (CH), 125.5 (C), 122.4 (CH), 112.4 (CH), 107.5 (CH), 61.5 (OCH_3), 61.4 (OCH_3), 56.5 (OCH_3), 56.2 (OCH_3), 54.3 (CH), 37.3 (CH_2), 30.0 (CH_2).

IR ν_{max} : 3222 (N-H), 1743 (C=O) cm^{-1} .

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para $C_{27}H_{25}Cl_2NO_7$ $[M+H]^+$: 546.1088. Obtenida $[M+H]^+$: 546.1082.

(S)-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahydrobenzoheptalen-7-il) carbamato de 2-naftilo (11f)



Seguendo el procedimiento general F, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 65% y un punto de fusión de 158-160 °C. $[\alpha]_D -200.2$ (c 0.43, CHCl₃).

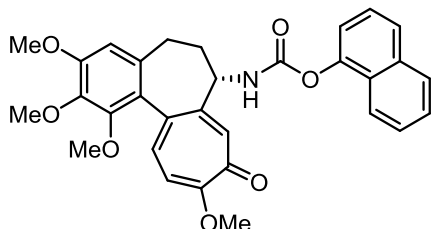
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.76 (s, 1H, H8), 7.65 (m, 3H), 7.45 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H1'), 7.35 (m, 2H), 7.28 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, H12), 7.13 (dd, $J = 9, 2.4$ Hz, 1H, H3'), 6.81 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, H11), 6.55 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, NH), 6.54 (s, 1H, H4), 4.56 (m, 1H, H7), 3.98 (s, 3H, OCH₃), 3.90 (s, 3H, OCH₃), 3.89 (s, 3H, OCH₃), 3.52 (s, 3H, OCH₃), 2.55-2.40 (m, 3H, H6, H5), 1.93 (m, 1H, H5).

RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃): δ 179.7 (CO), 164.2 (C), 154.2 (C), 153.6 (CO), 151.3 (C), 151.1 (C), 148.5 (C), 141.7 (C), 136.2 (C), 135.3 (CH), 134.3 (C), 133.7 (C), 131.3 (C), 131.2 (CH), 129.3 (CH), 127.7 (CH), 127.6 (CH), 126.3 (CH), 125.6 (C), 125.5 (CH), 121.4 (CH), 118.6 (CH), 112.5 (CH), 107.5 (CH), 61.5 (OCH₃), 61.4 (OCH₃), 56.5 (OCH₃), 56.2 (OCH₃), 54.3 (CH), 37.3 (CH₂), 30.0 (CH₂).

IR ν_{\max} : 3232 (N-H), 1735 (C=O) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₃₁H₂₉NO₇ [M+H]⁺: 528.2022. Obtenida [M+H]⁺: 528.2018.

(S)-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahydrobenzoheptalen-7-il) carbamato de 1-naftilo (11g)



Seguendo el procedimiento general F, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 60% y un punto de fusión de 152-155 °C. $[\alpha]_D -251.4$ (c 0.57, CHCl₃).

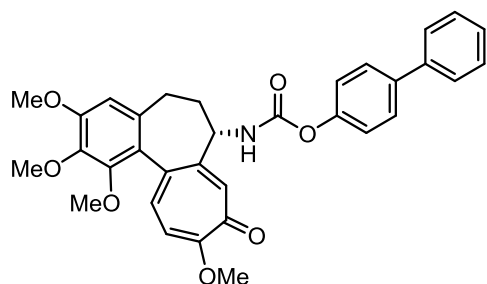
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.91 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.84 (s, 1H, H8), 7.75 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.60 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.40 (m, 2H), 7.28 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.25 (d, $J = 10.5$ Hz, 1H, H12), 7.12 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 6.76 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H, H11), 6.71 (s ancho, 1H, NH), 6.53 (s, 1H, H4), 4.55 (m, 1H, H7), 3.94 (s, 3H, OCH₃), 3.88 (s, 3H, OCH₃), 3.87 (s, 3H, OCH₃), 3.46 (s, 3H, OCH₃), 2.55-2.40 (m, 3H, H6, H5), 2.00-1.91 (m, 1H, H5).

RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃): δ 179.7 (CO), 164.2 (C), 154.1 (C), 153.6 (CO), 151.2 (C), 151.1 (C), 146.5 (C), 141.7 (C), 136.1 (C), 135.3 (CH), 134.6 (C), 134.3 (C), 131.2 (CH), 127.8 (CH), 127.3 (C), 126.5 (CH), 126.3 (CH), 125.6 (CH), 125.5 (C), 125.4 (CH), 121.3 (CH), 118.3 (CH), 112.4 (CH), 107.5 (CH), 61.5 (OCH₃), 61.4 (OCH₃), 56.4 (OCH₃), 56.2 (OCH₃), 54.2 (CH), 37.3 (CH₂), 30.0 (CH₂).

IR ν_{\max} : 3238 (N-H), 1735 (C=O) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₃₁H₂₉NO₇ [M+H]⁺: 528.2022. Obtenida [M+H]⁺: 528.2017.

(S)-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahydrobenzoheptalen-7-il) carbamato de 4-(1,1'-bifenilo) (11h)



Seguendo el procedimiento general F, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 42% y un punto de fusión de 167-170 °C. $[\alpha]_D -164.2$ (*c* 0.45, CHCl₃).

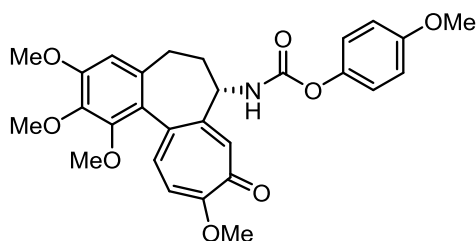
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.71 (s, 1H, H8), 7.44 (m, 4H Ar), 7.31 (m, 4H, 3H Ar, H12), 7.06 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H Ar), 6.82 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H, H11), 6.55 (s, 1H, H4), 6.45 (s ancho, 1H, NH), 4.51 (m, 1H, H7), 3.99 (s, 3H, OCH₃), 3.91 (s, 3H, OCH₃), 3.90 (s, 3H, OCH₃), 3.55 (s, 3H, OCH₃), 2.55-2.40 (m, 3H, H6, H5), 1.92 (m, 1H, H5).

RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃): δ 179.7 (CO), 164.2 (C), 154.0 (C), 153.6 (CO), 151.3 (C), 151.0 (C), 150.3 (C), 141.8 (C), 140.5 (C), 138.6 (C), 136.2 (C), 135.4 (CH), 134.3 (C), 131.2 (CH), 128.8 (2x CH), 128.1 (2x CH), 127.2 (CH), 127.1 (2x CH), 125.6 (C), 122.0 (2x CH), 112.5 (CH), 107.5 (CH), 61.5 (OCH₃), 61.4 (OCH₃), 56.5 (OCH₃), 56.2 (OCH₃), 54.2 (CH), 37.3 (CH₂), 30.0 (CH₂).

IR ν_{max} : 3239 (N-H), 1732 (C=O) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₃₃H₃₁NO₇ [M+H]⁺: 554.2179. Obtenida [M+H]⁺: 554.2173.

(S)-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahydrobenzoheptalen-7-il) carbamato de 4-metoxi fenilo (11i)



Seguendo el procedimiento general F, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 57% y un punto de fusión de 158-160 °C. $[\alpha]_D -168.0$ (*c* 0.55, CHCl₃).

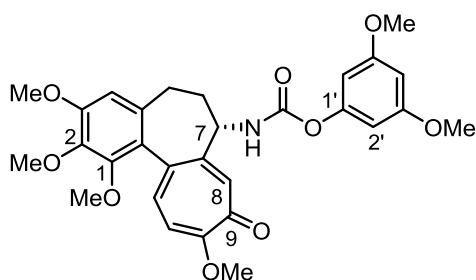
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.66 (s, 1H, H8), 7.26 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H, H12), 6.90 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H2', H6'), 6.80 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H, H11), 6.72 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H3', H5'), 6.53 (s, 1H, H4), 6.31 (s ancho, 1H, NH), 4.52 (m, 1H, H7), 3.97 (s, 3H, OCH₃), 3.89 (s, 3H, OCH₃), 3.88 (s, 3H, OCH₃), 3.69 (s, 3H, OCH₃), 3.52 (s, 3H, OCH₃), 2.55-2.35 (m, 3H, H6, H5), 1.88 (m, 1H, H5).

RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃): δ 179.6 (CO), 164.1 (C), 157.0 (C), 154.4 (C), 153.6 (CO), 151.3 (C), 151.0 (C), 144.4 (C), 141.7 (C), 136.1 (C), 135.2 (CH), 134.2 (C), 131.2 (CH), 125.6 (C), 122.6 (2x CH), 114.4 (2x CH), 112.4 (CH), 107.4 (CH), 61.5 (OCH₃), 61.4 (OCH₃), 56.4 (OCH₃), 56.2 (OCH₃), 55.6 (OCH₃), 54.2 (CH), 37.3 (CH₂), 30.0 (CH₂).

IR ν_{max} : 3239 (N-H), 1730 (C=O) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₂₈H₂₉NO₈ [M+H]⁺: 508.1972. Obtenida [M+H]⁺: 508.1969.

(S)-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahydrobenzoheptalen-7-il) carbamato de 3,5-dimetoxifenilo (11j)



Siguiendo el procedimiento general F, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 58% y un punto de fusión de 149-152 °C. $[\alpha]_D -191.3$ (c 0.5, CHCl₃).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.67 (s, 1H, H8), 7.27 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H, H12), 6.81 (d, *J* = 10.8

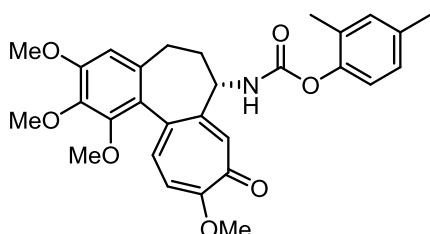
Hz, 1H, H11), 6.54 (s, 1H, H4), 6.33 (s ancho, 1H, NH), 6.21 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H, H4'), 6.19 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H, H2', H6'), 4.51 (m, 1H, H7), 3.98 (s, 3H, OCH₃), 3.90 (s, 3H, OCH₃), 3.89 (s, 3H, OCH₃), 3.64 (s, 6H, 2x OCH₃), 3.53 (s, 3H, OCH₃), 2.55 2.35 (m, 3H, H6, H5), 1.86 (m, 1H, H5).

RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃): δ 179.6 (CO), 164.2 (C), 161.0 (2x C), 153.7 (C), 153.6 (CO), 152.4 (C), 151.3 (C), 150.9 (C), 141.7 (C), 136.1 (C), 135.3 (CH), 134.2 (C), 131.2 (CH), 125.6 (C), 112.5 (CH), 107.4 (CH), 100.3 (2x CH), 98.5 (CH), 61.5 (OCH₃), 61.4 (OCH₃), 56.4 (OCH₃), 56.2 (OCH₃), 55.5 (2x OCH₃), 54.2 (CH), 37.3 (CH₂), 30.0 (CH₂).

IR ν_{\max} : 3239 (N-H), 1732 (C=O) cm⁻¹.

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₂₉H₃₁NO₉ [M+H]⁺: 538.2077
Obtenida [M+H]⁺: 538.2070.

(S)-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahydrobenzoheptalen-7-il) carbamato de 2,4-dimetilfenilo (11k)



Siguiendo el procedimiento general F, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 51% y un punto de fusión de 169-172 °C. $[\alpha]_D -201.4$ (c 0.50, CHCl₃).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.63 (s, 1H, H8), 7.26

(d, *J* = 10.5 Hz, 1H, H12), 6.87 (m, 3H, H3', H5', H6'), 6.78 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H, H11), 6.53 (s, 1H, H4), 6.12 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, NH), 4.47 (m, 1H, H7), 3.97 (s, 3H, OCH₃), 3.89 (s, 3H, OCH₃), 3.88 (s, 3H, OCH₃), 3.51 (s, 3H, OCH₃), 2.54 (m, 1H, H6), 2.41 (m, 2H, H6, H5), 2.20 (s, 3H, CH₃), 2.08 (s, 3H, CH₃), 1.84 (m, 1H, H5).

RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃): δ 179.5 (CO), 164.1 (C), 153.9 (C), 153.6 (CO), 151.3 (C), 150.9 (C), 147.1 (C), 141.7 (C), 136.0 (C), 135.3 (CH), 135.2 (C), 134.3 (C), 131.7 (CH), 131.0 (CH), 130.1 (C), 127.4 (CH), 125.6 (C), 121.8 (CH), 112.3 (CH), 107.4 (CH), 61.5 (OCH₃), 61.4 (OCH₃), 56.4 (OCH₃), 56.2 (OCH₃), 54.0 (CH), 37.3 (CH₂), 30.0 (CH₂), 20.8 (CH₃), 16.1 (CH₃).

IR ν_{\max} : 3250 (N-H), 1728 (C=O) cm⁻¹.

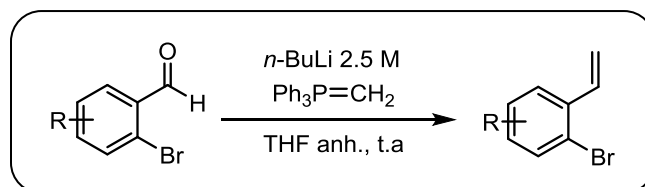
HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₂₉H₃₁NO₇ [M+H]⁺: 506.2179.
Obtenida [M+H]⁺: 506.2179.

6.3.- PARTE EXPERIMENTAL DE DERIVADOS DE COMBRETASTATINA A4

6.3.1.- PROCEDIMIENTOS GENERALES

Procedimiento general A

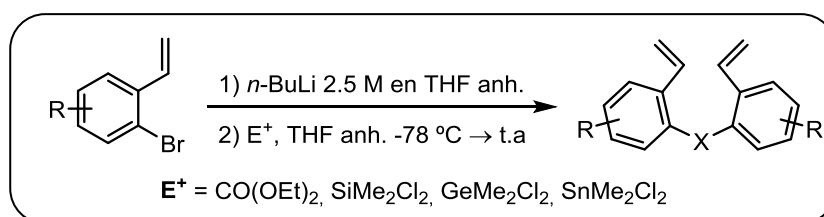
Preparación de vinil derivados mediante olefinación de Wittig



Experimental: Sobre una disolución de la sal de fosfonio **24** (1 mmol, 404.2 mg) en THF anhidro (4 mL) y bajo atmósfera inerte, se añade *n*-BuLi 2.5 M (1 mmol, 0.4 mL) y se mantiene la mezcla a temperatura ambiente durante 20 minutos. A continuación se adiciona el aldehído correspondiente (1 mmol) disuelto en THF anh. (3 mL) sobre el iluro de fósforo formado y se mantiene la mezcla con agitación hasta que el producto de partida desaparezca por completo (control por cromatografía en capa fina). Cuando la reacción ha finalizado, se añade NH₄Cl (sat) (5 mL) para hidrolizar la misma y se extrae el compuesto orgánico en CH₂Cl₂ (40 mL). Las fases orgánicas reunidas se lavan con H₂O, NaCl (sat) y se secan sobre MgSO₄ anhidro. El residuo obtenido después de evaporar el disolvente a vacío, se purifica por cromatografía sobre gel de sílice empleando una mezcla hexano:Et₂O (90:10) como eluyente.

Procedimiento general B

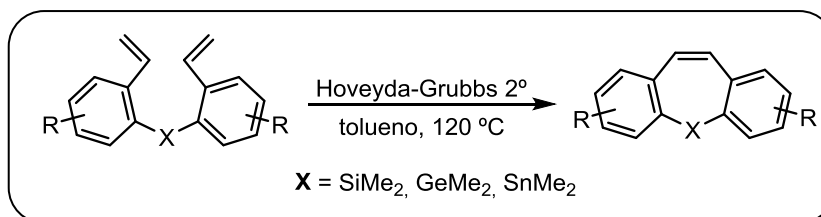
Reacción de homoacoplamiento intermolecular



Experimental: Se disuelve el bromoestireno correspondiente (2.1 mmol) en THF anhidro (7 mL) y bajo atmósfera inerte. Se enfría a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, se añade *n*-BuLi 2.5 M (2.1 mmol, 0.84 mL) y se mantiene la mezcla con agitación a esa temperatura durante 30 minutos. Seguidamente se adiciona el electrófilo Me₂XCl₂ (1 mmol) disuelto en THF (2 mL) y se deja aumentar la temperatura lentamente hasta temperatura ambiente. Se mantiene con agitación 12 h adicionales. Cuando la reacción ha finalizado, se añade NH₄Cl (sat) (5 mL) y se extrae el compuesto orgánico en CH₂Cl₂ (40 mL). Las fases orgánicas reunidas se lavan con NaCl (sat) y se secan sobre MgSO₄ anhidro. El residuo obtenido después de evaporar el disolvente a vacío, se purifica por cromatografía sobre gel de sílice empleando una mezcla hexano:Et₂O (95:5) como eluyente.

Procedimiento general C

Reacción de metátesis intramolecular con cierre de anillo



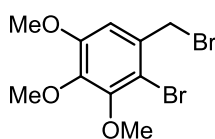
Experimental: Se disuelve el catalizador de Hoveyda-Grubbs de 2^o generación (0.01 mmol, 6.3 mg) en tolueno seco (40 mL) previamente desoxigenado y bajo atmósfera inerte. A continuación se añade gota a gota a lo largo de 10 minutos el producto de homoacoplamiento correspondiente (0.1 mmol) disuelto en tolueno (27 mL) y se calienta el sistema a reflujo hasta que el sustrato de partida se consuma por completo (control mediante cromatografía en capa fina). Cuando la reacción ha finalizado (4-12 h), se concentra la mezcla a vacío y se purifica por cromatografía sobre gel de sílice empleando una mezcla hexano:Et₂O (95:5) como eluyente.

[sustrato] = 0.0015 M para evitar posibles reacciones secundarias de acoplamiento intermolecular.

6.3.2 PROCEDIMIENTOS DE SÍNTESIS Y CARACTERIZACION

NOTA: Se escogió la numeración 1, 2, etc. para la asignación de las señales espectroscópicas en el anillo de fenilo trimetoxilado (anillo A) y la numeración 1', 2' etc. para la asignación de dichas señales presentes en el otro anillo de fenilo (anillo B), en el caso de que los compuestos no sean simétricos.

2-bromo-1-(bromometil)-3,4,5-trimetoxibenceno (13)

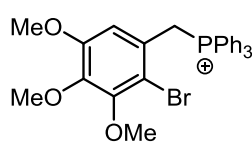


Se disuelve 3,4,5-trimetoxifenilmetanol **12** (5.0 mmol, 1 g) bajo atmósfera inerte en CHCl₃ (20 mL). A continuación se enfría a 0 °C y se añade lentamente Br₂ (5.0 mmol, 259 μL), con lo que la mezcla adquiere una tonalidad anaranjada. Se mantiene con agitación a 0 °C durante una hora y se añade seguidamente H₂O (15 mL). Se extrae la mezcla con CH₂Cl₂ (40 mL), se lavan las fases orgánicas con NaCl (sat) y se secan sobre Na₂SO₄ anhidro. El residuo obtenido después de evaporar el disolvente a vacío, se purifica mediante cromatografía sobre gel de sílice empleando una mezcla hexano:Et₂O (90:10) como eluyente. Se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de un 49%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 6.81 (s, 1H, H₆), 4.59 (s, 2H, CH₂), 3.89 (s, 3H, OCH₃), 3.88 (s, 3H, OCH₃), 3.86 (s, 3H, OCH₃).

RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃): δ 152.9 (C), 151.4 (C), 143.5 (C), 132.3 (C), 111.3 (C), 109.9 (CH), 61.2 (OCH₃), 61.1 (OCH₃), 56.3 (OCH₃), 34.2 (CH₂).

Bromuro de (2-bromo-3,4,5-trimetoxibencil) trifenilfosfonio (14)



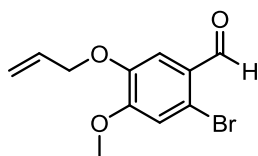
Se mezcla el compuesto **13** (1.8 mmol, 600 mg) junto con PPh₃ (1.8 mmol, 465.4 mg) bajo atmósfera de argón. Se añade tolueno (9 mL) y se calienta la mezcla de reacción a 80 °C durante 16 h. Tras enfriar la mezcla a temperatura ambiente se

forma rápidamente un precipitado blanquecino que se recoge por filtración, lavando con varias veces con tolueno (5 mL), previamente enfriado. Se obtuvo la sal de fosfonio correspondiente como un sólido blanco con un rendimiento de 90%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.80-7.28 (m, 15H, 3x Ph), 7.10 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H, H₆), 5.53 (d, *J* = 14.7 Hz, 2H, CH₂), 3.81 (s, 3H, OCH₃), 3.68 (s, 3H, OCH₃), 3.55 (s, 3H, OCH₃).

RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃): δ 153.0 (d, *J* = 4.0 Hz, C), 151.0 (d, *J* = 3.0 Hz, C), 143.5 (d, *J* = 4.5 Hz, C), 135.3 (d, *J* = 3.0 Hz, 3x CH), 134.6 (d, *J* = 9.8 Hz, 6x CH), 130.2 (d, *J* = 12.7 Hz, 6x CH), 122.4 (d, *J* = 8.8 Hz, C), 117.5 (d, *J* = 84.7 Hz, 3x C), 113.8 (d, *J* = 6.7 Hz, C), 112.5 (d, *J* = 4.5 Hz, CH), 61.3 (OCH₃), 60.1 (OCH₃), 56.6 (OCH₃), 30.9 (d, *J* = 47.9 Hz, CH₂).

5-aliloxi-2-bromo-4-metoxibenzaldehído (16)



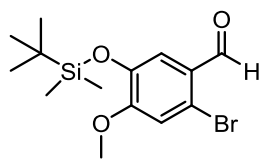
Se mezcla 2-bromo-5-hidroxi-4-metoxibenzaldehído (0.43 mmol, 100 mg) bajo atmósfera inerte con K₂CO₃ anhidro (0.65 mmol, 89.7 mg). Se añade CH₃CN anhidro (4 mL) y a continuación se adiciona bromuro de alilo (0.52 mmol, 45 μL). Se mantiene con

agitación a temperatura ambiente durante 24 h y seguidamente se adiciona H₂O (2 mL) para hidrolizar la mezcla de reacción. El producto orgánico se extrae en CH₂Cl₂ (20 mL), lavando las fases orgánicas con NaCl (sat) y secando las mismas sobre Na₂SO₄ anhidro. Tras evaporar el disolvente a vacío se obtuvo el compuesto esperado como un aceite incoloro con un rendimiento de 99%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 10.16 (s, 1H, COH), 7.41 (s, 1H, H₃), 7.05 (s, 1H, H₆), 6.08 (ddt, *J* = 17.1, 10.3, 6.0 Hz, 1H, CH aliloxi), 5.42 (ddt, *J* = 17.1, 1.5, 1.5 Hz, 1H, CH₂ aliloxi), 5.30 (ddt, *J* = 10.3, 1.5, 1.5 Hz, 1H, CH₂ aliloxi), 4.63 (dt, *J* = 6.0, 1.4 Hz, 2H, CH₂), 3.95 (s, 3H, OCH₃).

RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃): δ 190.9 (COH), 155.0 (C), 147.9 (C), 132.3 (CH), 126.6 (C), 120.6 (C), 119.05 (CH₂), 115.8 (CH), 112.24 (CH), 70.0 (CH₂), 56.6 (OCH₃).

2-bromo-5-(*t*-butildimetilsililoxi)-4-metoxibenzaldehído (17)

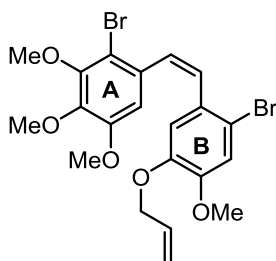


Se disuelve 2-bromo-5-hidroxi-4-metoxi-benzaldehído (0.43 mmol, 100 mg) bajo atmósfera inerte en THF anhidro (3 mL). Se enfría a 0 °C y se añade TBSCl (0.65 mmol, 97.8 mg) e imidazol (1.30 mmol, 88.4 mg). A continuación se mantiene la mezcla con agitación a temperatura ambiente durante 16 h. Cuando la reacción ha finalizado se añade H₂O (1 mL) y se extrae la mezcla con AcOEt (15 mL). Las fases orgánicas reunidas se lavan con una disolución de NaHCO₃ (sat), NaCl (sat), y se secan sobre Na₂SO₄ anhidro. El residuo obtenido tras evaporar el disolvente a vacío, se purifica mediante cromatografía sobre gel de sílice empleando una mezcla hexano:AcOEt (80:20) como eluyente. Se obtuvo el compuesto esperado como un aceite incoloro con un rendimiento de un 75%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 10.14 (s, 1H, COH), 7.39 (s, 1H, H3), 7.03 (s, 1H, H6), 3.88 (s, 3H, OCH₃), 0.98 (s, 9H, 3x CH₃), 0.16 (s, 6H, 2x CH₃)

RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃): δ 190.9 (COH), 156.9 (C), 145.1 (C), 126.9 (C), 120.6 (CH), 120.5 (C), 116.1 (CH), 56.1 (OCH₃), 25.7 (3x CH₃), 18.5 (C), -4.5 (2x CH₃).

(*Z*)-1-(5-(aliloxi)-2-bromo-4-metoxiestiril)-2-bromo-3,4,5-trimetoxibenceno (18)



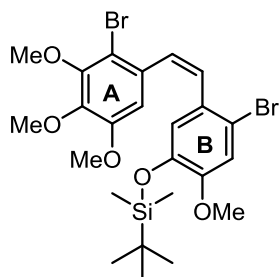
Se disuelve el compuesto **14** (0.17 mmol, 100 mg) bajo atmósfera inerte en THF anhidro (2.5 mL). Se enfría a 0 °C y se añade a continuación ^tBuOK (0.19 mmol, 21.8 mg) para generar el correspondiente iluro. Se mantiene la mezcla con agitación a 0 °C durante 30 minutos y seguidamente se adiciona el compuesto **16** (0.14 mmol, 37.5 mg) disuelto en THF anh. (2.5 mL). Por último se mantiene la mezcla a temperatura ambiente durante 16 h. Cuando la reacción ha finalizado, controlando su evolución por cromatografía de capa fina, se añade H₂O (3 mL) y se extrae la mezcla con AcOEt (20 mL). Las fases orgánicas reunidas se lavan con NaCl (sat) y se secan sobre MgSO₄ anhidro. El residuo obtenido después de evaporar el disolvente a vacío, se purifica por cromatografía sobre gel de sílice empleando una mezcla hexano:AcOEt (90:10) como eluyente. Se obtuvo el compuesto esperado como un aceite incoloro con un rendimiento de 93%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.01 (s, 1H, H3'), 6.69 (d, *J* = 11.8 Hz, 1H, CH doble enlace *Z*), 6.64 (d, *J* = 11.8 Hz, 1H, CH doble enlace *Z*), 6.53 (s, 1H, H6'), 6.40 (s, 1H H6), 5.77, (ddt, *J* = 17.1, 10.3, 6.0 Hz, 1H, CH aliloxi), 5.16 (ddt, *J* = 17.3, 1.5, 1.5 Hz, 1H, CH₂ aliloxi), 5.11 (ddt, *J* = 10.5, 1.5, 1.5 Hz, 1H, CH₂ aliloxi), 4.18 (dt, *J* = 6.0, 1.4 Hz, 2H, CH₂), 3.89 (s, 3H, OCH₃), 3.84 (s, 3H, OCH₃), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 3.49 (s, 3H, OCH₃).

RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃): δ 152.5 (C), 151.1 (C), 149.4 (C), 146.9 (C), 142.4 (C), 132.9 (C), 132.5 (CH), 130.3 (CH), 130.1 (CH), 128.9 (C), 118.4 (CH₂), 115.4 (CH), 115.3 (CH),

114.8 (C), 110.3 (C), 109.8 (CH), 69.8 (CH₂), 61.2 (OCH₃), 61.1 (OCH₃), 56.2 (OCH₃), 56.0 (OCH₃).

(Z)-4-bromo-5-(2-bromo-3,4,5-trimetoxiestiril)-2-metoxifenoxi t-butildimetilsilano (19)



Se disuelve el compuesto **14** (1.6 mmol, 980 mg) bajo atmósfera inerte en THF anhidro (20 mL). Se enfría a 0 °C y se añade a continuación ^tBuOK (1.9 mmol, 214 mg) para generar el correspondiente iluro. Se mantiene la mezcla con agitación a 0 °C durante 30 minutos y seguidamente se adiciona el compuesto **17** (1.36 mmol, 468.3 mg) disuelto en THF anhidro (10 mL). Por último se mantiene la mezcla a temperatura ambiente durante 16

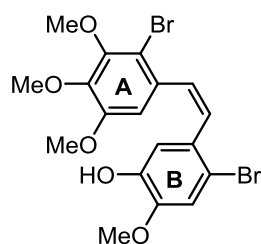
h. Cuando la reacción ha finalizado, controlando su evolución por cromatografía de capa fina, se añade H₂O (10 mL) y se extrae la mezcla con AcOEt (50 mL). Las fases orgánicas reunidas se lavan con NaCl (sat) y se secan sobre MgSO₄ anhidro. El residuo obtenido después de evaporar el disolvente a vacío, se purifica por cromatografía sobre gel de sílice empleando una mezcla hexano:AcOEt (95:5) como eluyente. Posteriormente se repurifica dicho compuesto mediante cristalización, empleando únicamente hexano como disolvente. Se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con de rendimiento de un 82%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.01 (s, 1H, H3'), 6.69 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H, CH doble enlace Z), 6.64 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H, CH doble enlace Z), 6.52 (s, 1H, H6'), 6.39 (s, 1H H6), 3.89 (s, 3H, OCH₃), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 3.78 (s, 3H, OCH₃), 3.51 (s, 3H, OCH₃), 0.84 (s, 9H, 3x CH₃), -0.08 (s, 6H, 2x CH₃).

RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃): δ 152.4 (C), 151.2 (C), 151.1 (C), 144.2 (C), 142.4 (C), 133.0 (C), 130.3 (CH), 130.2 (CH), 129.4 (C), 122.7 (CH), 115.8 (CH), 115.2 (C), 110.3 (C), 109.7 (CH), 61.2 (OCH₃), 61.1 (OCH₃), 55.9 (OCH₃), 55.9 (OCH₃), 25.6 (3x CH₃), 18.4 (C), -4.8 (2x CH₃).

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₂₄H₃₂Br₂O₅Si [M+H]⁺: 587.0459. Obtenida [M+H]⁺:587.0455. [M+NH₄]⁺: 606.0706. [M+K]⁺: 6.25.0018.

(Z)-4-bromo-5-(2-bromo-3,4,5-trimetoxiestiril)-2-metoxifenol (20)



Se disuelve el compuesto **19** (0.16 mmol, 94.5 mg) en THF anhidro (6 mL). Se enfría a 0 °C y se añade lentamente TBAF 1M en THF (0.25 mmol, 248 μL). La disolución se mantiene a esa temperatura durante una hora. Cuando la reacción ha finalizado se añade una disolución de NaHCO₃ (sat) (2 mL) para hidrolizar la mezcla y el compuesto orgánico se extrae en AcOEt (20 mL). Las

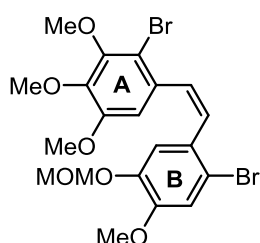
fases orgánicas reunidas se lavan con H₂O, NaCl (sat) y se secan sobre MgSO₄ anhidro.

Este proceso se repite varias veces para obtener el compuesto deseado puro sin necesidad de un tratamiento adicional. Se aisló el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento prácticamente cuantitativo.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 7.02 (s, 1H, H3'), 6.68 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H, CH doble enlace Z), 6.67 (s, 1H, H6'), 6.62 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H, CH doble enlace Z), 6.44 (s, 1H H6), 3.90 (s, 3H, OCH_3), 3.87 (s, 3H, OCH_3), 3.86 (s, 3H, OCH_3), 3.48 (s, 3H, OCH_3).

RMN ^{13}C (75 MHz; CDCl_3): δ 152.2 (C), 151.0 (C), 146.6 (C), 144.7 (C), 142.6 (C), 132.3 (C), 130.2 (CH), 130.1 (C), 130.0 (CH), 116.4 (CH), 114.6 (CH), 113.4(C), 110.7 (CH), 109.7 (C), 61.3 (OCH_3), 61.1 (OCH_3), 56.3 (OCH_3), 55.9 (OCH_3).

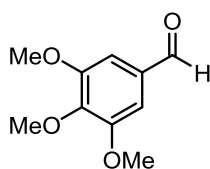
(Z)-2-bromo-1-(2-bromo-4-metoxi-5-(metoximetoxi) estiril)-3,4,5-trimetoxibenceno (21)



Se disuelve el compuesto **20** (0.06 mmol, 27 mg) bajo atmósfera inerte en CH_2Cl_2 anhidro (2 mL). Se enfría a $0\text{ }^\circ\text{C}$ y se añade a continuación DIPEA (0.07 mmol, 12 μL) y cloro(metoxi)metano (0.06 mmol, 5 μL). Se mantiene el sistema con agitación a temperatura ambiente durante 12 h. Cuando la reacción ha finalizado, se evapora el disolvente a vacío y se extrae el compuesto en AcOEt (15 mL). Las fases orgánicas reunidas se lavan con H_2O , NaOH 2M, HCl 0.1M y NaCl (sat), y se secan sobre MgSO_4 anhidro. Se obtuvo el compuesto esperado sin necesidad de purificación adicional, como un sólido blanco con un rendimiento de un 98%.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 7.04 (s, 1H, H3'), 6.83 (s, 1H, H6'), 6.69 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H, CH doble enlace Z), 6.65 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H, CH doble enlace Z), 6.42 (s, 1H, H6), 4.85 (CH_2), 3.89 (s, 3H, OCH_3), 3.85 (s, 3H, OCH_3), 3.84 (s, 3H, OCH_3), 3.51 (s, 3H, OCH_3), 3.26 (s, 3H, OCH_3).

3,4,5-trimetoxibenzaldehído (22)

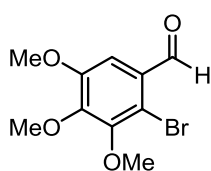


Se mezcla 3,4,5-trimetoxifenilmetanol **12** (2.5 mmol, 500 mg) junto con MgSO_4 anhidro (2.5 mmol, 303.6 mg) y MnO_2 (12.6 mmol, 1.1 g) en CHCl_3 (10 mL). Se mantiene la mezcla con agitación a temperatura ambiente durante 48 h. Cuando la reacción ha finalizado, controlando su evolución por cromatografía de capa fina, se filtra la mezcla sobre celite, lavando el residuo formado con CH_2Cl_2 (50 mL). Tras evaporar el disolvente a vacío, se purifica el crudo obtenido mediante cromatografía sobre gel de sílice empleando una mezcla hexano: AcOEt (90:10) como eluyente. Se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 85%.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 9.87 (s, 1H, COH), 7.13 (s, 2H, H2, H6), 3.94 (s, 3H, OCH_3), 3.93 (s, 6H, 2x OCH_3).

RMN ^{13}C (75 MHz; CDCl_3): δ 190.5 (COH), 153.1 (2x C), 143.0 (C), 131.1 (C), 106.1 (2x CH), 60.4 (OCH_3), 55.7 (2x OCH_3).

2-bromo-3,4,5-trimetoxibenzaldehído (23)



Se disuelve el compuesto **22** (1.25 mmol, 246 mg) bajo atmósfera inerte en CHCl_3 (20 mL). A continuación se enfría a 0 °C y se añade lentamente Br_2 (1.25 mmol, 65 μL). Se mantiene a esa temperatura durante 30 minutos y se añade seguidamente H_2O (5 mL). El producto orgánico se extrae en CH_2Cl_2 (40 mL), lavando las fases orgánicas con NaCl (sat) y secando las mismas sobre Na_2SO_4 anhidro. El residuo obtenido después de evaporar el disolvente a vacío, se purifica mediante cromatografía sobre gel de sílice empleando una mezcla hexano: Et_2O (90:10) como eluyente. Se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 43%.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 10.26 (s, 1H, COH), 7.28 (s, 1H, H6), 3.96 (s, 3H, OCH_3), 3.89 (s, 3H, OCH_3), 3.88 (s, 3H, OCH_3).

RMN ^{13}C (75 MHz; CDCl_3): δ 191.4 (COH), 153.4 (C), 151.2 (C), 149.1 (C), 129.2 (C), 116.0 (C), 107.9 (CH), 61.6 (OCH_3), 61.5 (OCH_3), 56.6 (OCH_3).

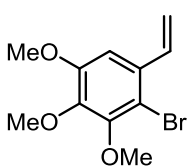
Ioduro de metiltrifenilfosfonio (24)

Se disuelve bajo atmósfera inerte, PPh_3 (1.14 mmol, 300 mg) en THF $\text{Ph}_3\text{PMe}^{\oplus} \text{I}^{\ominus}$ anhidro (4 mL). A continuación se adiciona MeI (1.37 mmol, 85 μL) a temperatura ambiente y se somete la reacción a reflujo durante dos horas. Tras enfriar la mezcla se forma un sólido blanco que se recoge por filtración, lavando el mismo con hexano (50 mL) en frío. Se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de un 84%.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 7.80 – 7.65 (m, 15H, 3x Ph), 3.18 (d, $J = 13.2$ Hz, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C (75 MHz; CDCl_3): δ 135.3 (d, $J = 3.1$ Hz, 3x CH), 133.4 (d, $J = 10.9$ Hz, 6x CH), 130.6 (d, $J = 12.8$ Hz, 6x CH), 119.0 (d, $J = 88.3$ Hz, 3x C), 11.8 (d, $J = 56.8$ Hz, CH_3).

2-bromo-3,4,5-trimetoxi-1-vinilbenceno (25)

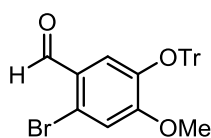


Siguiendo el procedimiento general A, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de un 74%.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 7.04 (dd, $J = 17.2, 10.8$ Hz, 1H, CH vinilo), 6.89 (s, 1H, H6), 5.60 (dd, $J = 17.2, 0.8$ Hz, 1H, CH_2 vinilo), 5.32 (dd, $J = 10.8, 0.8$ Hz, 1H, CH_2 vinilo), 3.89 (s, 9H, 3x OCH_3).

RMN ^{13}C (75 MHz; CDCl_3): δ 152.8 (C), 150.9 (C), 143.1 (C), 136.0 (CH), 133.3 (C), 116.0 (CH_2), 110.6 (C), 105.3 (CH), 61.3 (OCH_3), 61.1 (OCH_3), 56.2 (OCH_3).

2-bromo-4-metoxi-5- (tritoloxi)benzaldehído (26)

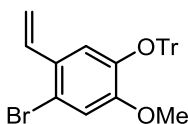


Se mezcla bajo atmósfera inerte 2-bromo-4-metoxi-5-hidroxi benzaldehído **15** (2.16 mmol, 500 mg) junto con DMAP (0.22 mmol, 26.4 mg) en CH₂Cl₂ anhidro (8 mL). Se enfría a 0 °C y se añade a continuación Et₃N (5.40 mmol, 752 μL) y cloruro de trifenilmetano (4.30 mmol, 1.2 g) disuelto en CH₂Cl₂ (4 mL). Se mantiene la mezcla con agitación a temperatura ambiente durante 14 h. Cuando la reacción ha finalizado, controlando su evolución por cromatografía de capa fina, se añade una disolución saturada de NH₄Cl (5 mL) y se extrae la mezcla con CH₂Cl₂ (50 mL). Las fases orgánicas reunidas se lavan con NaCl (sat) y se secan sobre MgSO₄ anhidro. El residuo obtenido después de evaporar el disolvente a vacío, se purifica por cromatografía sobre gel de sílice empleando una mezcla hexano:AcOEt (90:10) como eluyente. Se obtuvo el compuesto esperado como un sólido amarillento con un rendimiento de 34%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 9.94 (s, 1H, COH), 7.44 (m, 6H, 6x CH Ar), 7.26 (m, 9H, 9x CH Ar), 7.17 (s, 1H, H3), 6.83 (s, 1H, H6), 3.68 (s, 3H, OCH₃).

RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃): δ 10.4 (COH), 157.9 (C), 145.3 (C), 143.6 (3x C), 129.1 (6x CH), 127.8 (6x CH), 127.6 (3x CH), 125.7 (C), 122.5 (CH), 121.6 (C), 115.8 (CH), 92.2 (C), 56.2 (OCH₃).

2-bromo-4-metoxi-5-(tritoloxi)-1-vinilbenceno (27)

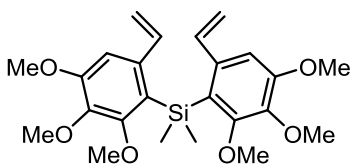


Siguiendo el procedimiento general A, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco ligeramente amarillento, con un rendimiento de un 98%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.45 (m, 6H, 6x CH Ar), 7.32 – 7.22 (m, 9H, 9x CH Ar), 6.84 (s, 1H, H3), 6.82 (s, 1H, H6), 6.75 (dd, *J* = 17.1, 11.1 Hz, 1H, CH vinilo), 4.99 (dd, *J* = 11.1, 1.2 Hz, 1H, CH₂ vinilo), 4.94 (dd, *J* = 17.1, 0.9 Hz, 1H, CH₂ vinilo), 3.60 (s, 3H, OCH₃).

RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃): δ 152.8 (C), 145.2 (C), 144.0 (3x C), 135.2 (CH), 129.3 (6x CH), 128.7 (C), 127.7 (6x CH), 127.5 (3x CH), 119.9 (CH), 116.0 (C), 115.8 (CH), 114.4 (CH₂), 91.6 (C), 56.1 (OCH₃).

Dimetil-bis(2,3,4-trimetoxi-6-vinilfenil) silano (28b)



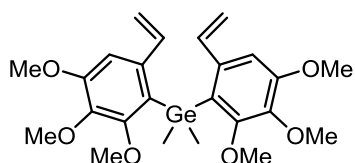
Siguiendo el procedimiento general B, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de un 39%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.06 (dd, *J* = 17.4, 10.8 Hz, 2H, 2x CH vinilo), 6.78 (s, 2H, 2x H5), 5.40 (dd, *J* = 17.4, 1.5 Hz, 2H, CH₂ vinilo), 5.08 (dd, *J* = 10.8, 1.5 Hz, 2H, CH₂ vinilo), 3.87 (s, 6H, 2x OCH₃), 3.81 (s, 6H, 2x OCH₃), 3.49 (s, 6H, 2x OCH₃), 0.60 (s, 6H, 2x CH₃).

RMN ^{13}C (75 MHz; CDCl_3): δ 158.0 (2x C), 154.3 (2x C), 141.1 (2x C), 139.9 (2x C), 139.1 (2x CH), 124.6 (2x C), 114.1 (2x CH_2), 106.0 (2x CH), 60.6 (2x OCH_3), 60.1 (2x OCH_3), 55.9 (2x OCH_3), 5.0 (2x CH_3).

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_6\text{Si}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 467.1866. Obtenida $[\text{M}+\text{Na}]^+$:467.1873.

Dimetil-bis(2,3,4-trimetoxi-6-vinilfenil) germano (28c)



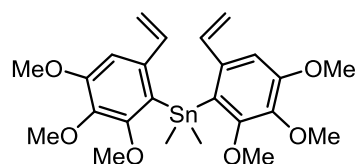
Siguiendo el procedimiento general B, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco ligeramente amarillento, con un rendimiento de un 43%.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 6.86 (dd, $J = 17.1, 10.8$ Hz, 2H, 2x CH vinilo), 6.73 (s, 2H, 2x H5), 5.34 (dd, $J = 17.1, 1.2$ Hz, 2H, CH_2 vinilo), 4.98 (dd, $J = 10.8, 1.5$ Hz, 2H, CH_2 vinilo), 3.80 (s, 6H, 2x OCH_3), 3.75 (s, 6H, 2x OCH_3), 3.52 (s, 6H, 2x OCH_3), 0.67 (s, 6H, 2x CH_3).

RMN ^{13}C (75 MHz; CDCl_3): δ 157.0 (2x C), 154.0 (2x C), 141.2 (2x C), 139.2 (2x C), 138.6 (2x CH), 127.0 (2x C), 114.1 (2x CH_2), 105.6 (2x CH), 60.7 (2x OCH_3), 60.4 (2x OCH_3), 55.9 (2x OCH_3), 5.1 (2x CH_3).

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_6^{74}\text{Ge}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 513.1308. Obtenida $[\text{M}+\text{Na}]^+$:513.1315.

Dimetil-bis(2,3,4-trimetoxi-6-vinilfenil) estannano (28d)



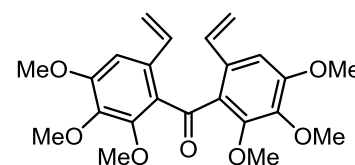
Siguiendo el procedimiento general B, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de un 57%.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 6.90 (s, 2H, 2x H5), 6.84 (dd, $J = 17.1, 10.8$ Hz, 2H, 2x CH vinilo), 5.48 (dd, $J = 17.1, 1.2$ Hz, 2H, CH_2 vinilo), 5.09 (dd, $J = 10.8, 1.2$ Hz, 2H, CH_2), 3.88 (s, 6H, 2x OCH_3), 3.82 (s, 6H, 2x OCH_3), 3.65 (s, 6H, 2x OCH_3), 0.55 (s, 6H, 2x CH_3).

RMN ^{13}C (75 MHz; CDCl_3): δ 157.2 (2x C), 154.4 (2x C), 140.7 (2x C), 140.5 (2x C), 139.4 (2x CH), 128.8 (2x C), 114.0 (2x CH_2), 105.0 (2x CH), 60.7 (2x OCH_3), 60.6 (2x OCH_3), 56.0 (2x OCH_3), -2.6 (2x CH_3).

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_6^{120}\text{Sn}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 559.1118. Obtenida $[\text{M}+\text{Na}]^+$:559.1124.

Bis(2,3,4-trimetoxi-6-vinilfenil) cetona (28e)



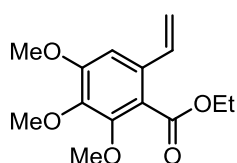
Siguiendo el procedimiento general B y empleando el compuesto **29** como agente electrofílico, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 31%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 6.92 (s, 2H, 2x H5), 6.91 (dd, *J* = 17.4, 10.8 Hz, 2H, 2x CH vinilo), 5.64 (dd, *J* = 17.4, 1.2 Hz, 2H, CH₂ vinilo), 5.25 (dd, *J* = 10.8, 1.2 Hz, 2H, CH₂ vinilo), 3.93 (s, 6H, 2x OCH₃), 3.79 (s, 6H, 2x OCH₃), 3.41 (s, 6H, 2x OCH₃).

RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃): δ 197.0 (CO), 154.8 (2x C), 152.0 (2x C), 141.5 (2x C), 135.0 (2x CH), 133.3 (2x C), 129.3 (2x C), 115.4 (2x CH₂), 104.8 (2x CH), 60.9 (2x OCH₃), 60.7 (2x OCH₃), 56.1 (2x OCH₃).

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₂₃H₂₆O₇ [M+H]⁺: 415.1579. Obtenida [M+H]⁺: 415.1559.

2,3,4-trimetoxi-6-vinilbenzoato de etilo (29)

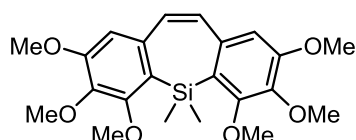


Seguendo el procedimiento general B, se obtuvo el compuesto monosustituído como un sólido blanco con un rendimiento de 57%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 6.83 (s, 1H, H5), 6.70 (dd, *J* = 17.4, 10.8 Hz, 1H, CH vinilo), 5.63 (dd, *J* = 17.4, 0.9 Hz, 1H, CH₂ vinilo), 5.28 (dd, *J* = 10.8, 0.9 Hz, 1H, CH₂ vinilo), 4.38 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂), 3.90 (s, 3H, OCH₃), 3.89 (s, 3H, OCH₃), 3.86 (s, 3H, OCH₃), 1.37 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH₃).

RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃): δ 167.0 (CO), 154.2 (C), 150.6 (C), 141.6 (C), 133.1 (CH), 131.0 (C), 121.0 (C), 115.7 (CH₂), 103.9 (CH), 61.4 (OCH₃), 61.0 (CH₂), 60.6 (OCH₃), 55.8 (OCH₃), 14.0 (CH₃).

2,3,4,6,7,8-hexametoxi-5,5-dimetil-5*H*-dibenzo[b,f]silepina (30b)



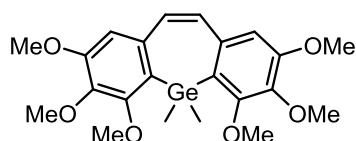
Seguendo el procedimiento general C, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 86% y un punto de fusión de 200-202 °C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 6.84 (s, 2H, CH olefina), 6.67 (s, 2H, H1, H9), 3.87 (s, 6H, 2x OCH₃), 3.85 (s, 6H, 2x OCH₃), 3.84 (s, 6H, 2x OCH₃), 0.58 (s, 6H, 2x CH₃).

RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃): δ 157.5 (2x C), 153.8 (2x C), 142.3 (2x C), 137.6 (2x C), 133.0 (2x CH), 123.5 (2x C), 109.4 (2x CH), 61.3 (2x OCH₃), 60.8 (2x OCH₃), 55.9 (2x OCH₃), 0.9 (2x CH₃).

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₂₂H₂₈O₆Si [M+Na]⁺: 439.1553. Obtenida [M+Na]⁺: 439.1554.

2,3,4,6,7,8-hexametoxi-5,5-dimetil-5*H*-dibenzo[b,f]germepina (30c)



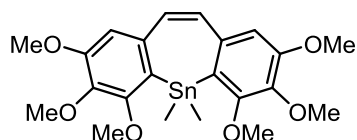
Seguendo el procedimiento general C, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 99% y un punto de fusión de 200-202 °C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 6.76 (s, 2H, CH olefina), 6.65 (s, 2H, H1, H9), 3.86 (s, 6H, 2x OCH₃), 3.85 (s, 6H, 2x OCH₃), 3.84 (s, 6H, 2x OCH₃), 0.74 (s, 6H, 2x CH₃).

RMN ^{13}C (75 MHz; CDCl_3): δ 156.7 (2x C), 153.6 (2x C), 142.1 (2x C), 137.0 (2x C), 133.1 (2x CH), 126.0 (2x C), 109.4 (2x CH), 61.3 (2x OCH_3), 60.8 (2x OCH_3), 56.0 (2x OCH_3), 1.3 (2x CH_3).

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_6$ ^{74}Ge $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 485.0995. Obtenida $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 485.0976.

2,3,4,6,7,8-hexametoxi-5,5-dimetil-5H-dibenzo[b,f]estannepina (30d)



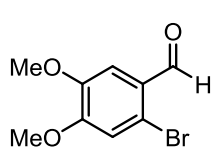
Siguiendo el procedimiento general C, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 21% y un punto de fusión de 173-175 °C.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 6.59 (s, 2H, CH olefina), 6.58 (s, 2H, H1, H9), 3.79 (s, 6H, 2x OCH_3), 3.78 (s, 6H, 2x OCH_3), 3.76 (s, 6H, 2x OCH_3), 0.50 (s, 6H, 2x CH_3).

RMN ^{13}C (75 MHz; CDCl_3): δ 156.9 (2x C), 154.0 (2x C), 141.2 (2x C), 138.9 (2x C), 133.4 (2x CH), 127.7 (2x C), 110.3 (2x CH), 61.1 (2x OCH_3), 60.8 (2x OCH_3), 56.1 (2x OCH_3), -6.4 (2x CH_3).

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_6$ ^{120}Sn $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 531.0805. Obtenida $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 531.0818.

2-Bromo-4,5-dimetoxibenzaldehído (31)

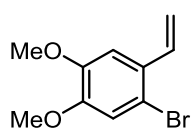


Se disuelve 2-bromo-4-metoxi-5-hidroxibenzaldehído **15** (1.1 mmol, 250 mg) bajo atmósfera inerte, en acetona (4.5 mL). A continuación se añade a temperatura ambiente, K_2CO_3 anhidro como base (2.4 mmol, 329 mg) y MeI como agente electrofílico (3.8 mmol, 236 μL) y se calienta la mezcla de reacción a 60 °C durante 4 h. Tras evaporar el disolvente a vacío, el residuo formado se disuelve en AcOEt (20 mL) y la fase orgánica se lava con H_2O , NaCl (sat) y se seca sobre Na_2SO_4 anhidro. El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía sobre gel de sílice empleando una mezcla hexano: AcOEt (90:10) como eluyente. Finalmente se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 85%.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 10.18 (s, 1H, COH), 7.40 (s, 1H, H3), 7.05 (s, 1H, H6), 3.95 (s, 3H, OCH_3), 3.91 (s, 3H, OCH_3).

RMN ^{13}C (75 MHz; CDCl_3): δ 190.9 (COH), 154.6 (C), 149.0 (C), 126.7 (C), 120.5 (C), 115.6 (CH), 110.6 (CH), 56.6 (OCH_3), 56.3 (OCH_3).

1-Bromo-4,5-dimetoxi-2-vinilbenceno (32)



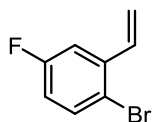
Siguiendo el procedimiento general A, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de un 85%.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 7.03 (s, 1H, H6), 6.99 (s, 1H, H3), 6.96

(dd, $J = 17.4, 11.1$ Hz, 1H, CH vinilo), 5.57 (dd, $J = 17.4, 0.9$ Hz, 1H, CH₂ vinilo), 5.26 (dd, $J = 11.1, 1.2$ Hz, 1H, CH₂ vinilo), 3.89 (s, 3H, OCH₃), 3.86 (s, 3H, OCH₃).

RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃): δ 149.5 (C), 148.7 (C), 135.5 (CH), 129.6 (C), 115.4 (CH), 114.7 (CH₂), 114.4 (C), 108.8 (CH), 56.3 (OCH₃), 56.1 (OCH₃).

1-Bromo-4-fluoro-2-vinilbenceno (34)



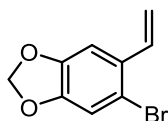
Siguiendo el procedimiento general A, se obtuvo el compuesto esperado como un líquido incoloro con un rendimiento de un 47%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.50 (dd, $J = 8.9, 5.4$ Hz, 1H, H6), 7.25 (dd, $J = 9.7, 3.0$ Hz, 1H, H3), 7.01 (ddd, $J = 17.4, 10.8, 1.5$ Hz, 1H, CH vinilo), 6.85 (ddd, $J = 8.7, 7.8, 3.0$ Hz, 1H, H5), 5.70 (dd, $J = 17.4, 1.0$ Hz, 1H, CH₂ vinilo), 5.41 (dd, $J = 10.8, 1.0$ Hz, 1H, CH₂ vinilo).

RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃): 163.9 – 160.6 (d, $J = 245.0$ Hz, C, C-F), 139.3 (d, $J = 7.7$ Hz, C, C2), 135.2 (d, $J = 1.8$ Hz, CH vinilo), 134.2 (d, $J = 8.0$ Hz, CH, C6), 117.9 (CH₂), 117.8 (d, $J = 3.2$ Hz, C, C1), 116.5 (d, $J = 22.5$ Hz, CH), 113.6 (d, $J = 23.1$ Hz, CH).

RMN ¹⁹F (282 MHz, CDCl₃): δ -113.4 (F).

5-Bromo-6-vinilbenzo[1,3]dioxol (36)

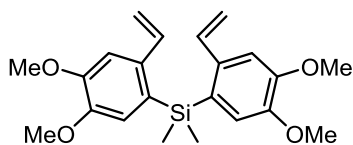


Siguiendo el procedimiento general A, se obtuvo el compuesto esperado como un aceite incoloro con un rendimiento de un 79%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.03 (s, 1H, H4), 6.99 (s, 1H, H1), 6.97 (dd, $J = 17.1, 10.8$ Hz, 1H, CH vinilo), 5.97 (s, 2H, CH₂), 5.57 (dd, $J = 17.1, 0.6$ Hz, 1H, CH₂ vinilo), 5.25 (dd, $J = 10.8, 0.6$ Hz, 1H, CH₂ vinilo).

RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃): δ 148.2 (C), 147.8 (C), 135.6 (CH), 131.0 (C), 115.0 (CH₂), 114.8 (C), 112.7 (CH), 106.1 (CH), 101.9 (CH₂).

Bis(4,5-dimetoxi-2-vinilfenil) dimetilsilano (37a)

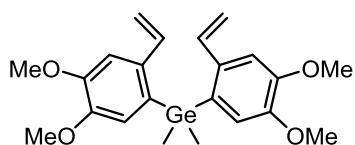


Siguiendo el procedimiento general B, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco ligeramente amarillento, con un rendimiento de un 36%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.11 (s, 2H, 2x H6), 6.98 (s, 2H, 2x H3), 6.80 (dd, $J = 17.1, 10.8$ Hz, 2H, 2x CH vinilo), 5.47 (dd, $J = 17.1, 1.2$ Hz, 2H, CH₂ vinilo), 5.03 (dd, $J = 10.8, 1.2$ Hz, 2H., CH₂ vinilo), 3.92 (s, 6H, 2x OCH₃), 3.83 (s, 6H, 2x OCH₃), 0.60 (s, 6H, 2x CH₃).

RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃): δ 150.2 (2x C), 148.2 (2x C), 137.6 (2x CH), 137.4 (2x C), 128.7 (2x C), 117.5 (2x CH), 113.1 (2x CH₂), 108.4 (2x CH), 55.9 (2x OCH₃), 55.8 (2x OCH₃), 0.3 (2x CH₃).

Bis(4,5-dimetoxi-2-vinilfenil) dimetilgermano (37b)

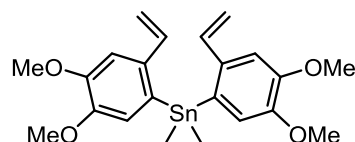


Seguendo el procedimiento general B, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de un 34%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.15 (s, 2H, 2x H₆), 6.89 (s, 2H, 2x H₃), 6.77 (dd, *J* = 17.1, 10.8 Hz, 2H, 2x CH vinilo), 5.52 (dd, *J* = 17.1, 0.9 Hz, 2H, CH₂ vinilo), 5.07 (dd, *J* = 10.8, 0.9 Hz, 2H., CH₂ vinilo), 3.92 (s, 6H, 2x OCH₃), 3.80 (s, 6H, 2x OCH₃), 0.72 (s, 6H, 2x CH₃).

RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃): δ 149.9 (2x C), 148.5 (2x C), 137.6 (2x CH), 136.4 (2x C), 131.0 (2x C), 116.7 (2x CH), 113.0 (2x CH₂), 108.2 (2x CH), 55.9 (2x OCH₃), 55.8 (2x OCH₃), 0.3 (2x CH₃).

Bis(4,5-dimetoxi-2-vinilfenil) dimetilestannano (37c)

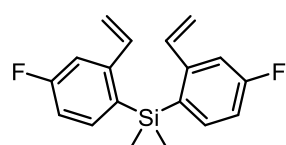


Seguendo el procedimiento general B, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de un 50%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.18 (s, 2H, 2x H₆), 6.88 (s, 2H, 2x H₃), 6.70 (dd, *J* = 17.1, 10.8 Hz, 2H, 2x CH vinilo), 5.55 (dd, *J* = 17.1, 0.9 Hz, 2H, CH₂ vinilo), 5.14 (dd, *J* = 10.8, 0.9 Hz, 2H., CH₂ vinilo), 3.92 (s, 6H, 2x OCH₃), 3.79 (s, 6H, 2x OCH₃), 0.57 (s, 6H, 2x CH₃).

RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃): δ 150.0 (2x C), 148.6 (2x C), 139.2 (2x CH), 137.9 (2x C), 132.5 (2x C), 118.7 (2x CH), 113.3 (2x CH₂), 108.0 (2x CH), 55.9 (2x OCH₃), 55.8 (2x OCH₃), -6.9 (2x CH₃).

Bis(4-fluoro-2-vinilfenil) dimetilsilano (38a)



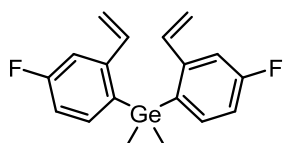
Seguendo el procedimiento general B, se obtuvo el compuesto esperado como un aceite incoloro con un rendimiento de un 20%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.47 (dd, *J* = 8.1, 6.6 Hz, 2H, 2x H₆), 7.22 (dd, *J* = 10.7, 2.7 Hz, 2H, 2x H₃), 6.97 (td, *J* = 8.4, 2.7 Hz, 2H, 2x H₅), 6.73 (ddd, *J* = 17.1, 10.8, 1.8 Hz, 2H, 2x CH vinilo), 5.54 (dd, *J* = 17.1, 0.9 Hz, 2H, CH₂ vinilo), 5.13 (dd, *J* = 10.8, 1.2 Hz, 2H, CH₂ vinilo), 0.58 (s, 6H, 2x CH₃).

RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃): 166.0 – 162.7 (d, *J* = 246.6 Hz, 2x C, C-F), 146.6 (d, *J* = 7.1 Hz, 2x C, C₂), 137.0 (d, *J* = 6.3 Hz, 2x CH, 2x C₆), 136.9 (d, *J* = 1.8 Hz, 2x CH vinilo), 132.2 (d, *J* = 3.2 Hz, 2x C, C₁), 116.3 (2x CH₂), 114.2 (d, *J* = 19.6 Hz, 2x CH), 112.4 (d, *J* = 20.3 Hz, 2x CH), -0.05 (2x CH₃).

RMN ¹⁹F (282 MHz, CDCl₃): δ -112.4 (2x F).

Bis(4-fluoro-2-vinilfenil) dimetilgermano (38b)



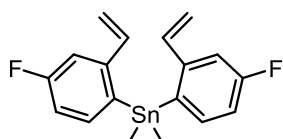
Siguiendo el procedimiento general B, se obtuvo el compuesto esperado como un aceite incoloro con un rendimiento de un 22%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.77 (dd, *J* = 8.4, 6.6 Hz, 2H, 2x H6), 7.26 (dd, *J* = 10.7, 2.7 Hz, 2H, 2x H3), 6.95 (td, *J* = 8.4, 2.7 Hz, 2H, 2x H5), 6.72 (ddd, *J* = 17.4, 10.8, 1.8 Hz, 2H, 2x CH vinilo), 5.59 (dd, *J* = 17.1, 0.9 Hz, 2H, CH₂ vinilo), 5.19 (dd, *J* = 10.8, 0.9 Hz, 2H, CH₂ vinilo), 0.70 (s, 6H, 2x CH₃).

RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃): 165.8–162.5 (d, *J* = 245.8 Hz, 2x C, C-F), 145.6 (d, *J* = 6.7 Hz, 2x C, C2), 136.8 (d, *J* = 2.7 Hz, 2x CH vinilo), 136.0 (d, *J* = 7.6 Hz, 2x CH, 2x C6), 134.3 (d, *J* = 3.3 Hz, 2x C, C1), 116.4 (2x CH₂), 114.4 (d, *J* = 20.0 Hz, 2x CH), 112.3 (d, *J* = 20.5 Hz, 2x CH), -0.2 (2x CH₃).

RMN ¹⁹F (282 MHz, CDCl₃): δ -113.4 (2x F).

Bis(4-fluoro-2-vinilfenil) dimetilestanano (38c)



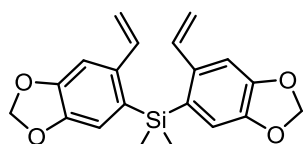
Siguiendo el procedimiento general B, se obtuvo el compuesto esperado como un aceite incoloro con un rendimiento de un 25%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.35 (dd, *J* = 8.1, 6.6 Hz, 2H, 2x H6), 7.28 (dd, *J* = 10.7, 2.7 Hz, 2H, 2x H3), 6.94 (td, *J* = 8.1, 2.7 Hz, 2H, 2x H5), 6.70 (ddd, *J* = 17.4, 10.8, 1.8 Hz, 2H, 2x CH vinilo), 5.63 (dd, *J* = 17.4, 0.6 Hz, 2H, CH₂ vinilo), 5.26 (dd, *J* = 10.8, 0.9 Hz, 2H, CH₂ vinilo), 0.57 (s, 6H, 2x CH₃).

RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃): 165.8–162.5 (d, *J* = 245.8 Hz, 2x C, C-F), 147.2 (d, *J* = 6.7 Hz, 2x C, C2), 138.3 (d, *J* = 2.7 Hz, 2x CH vinilo), 138.2 (d, *J* = 7.6 Hz, 2x CH, 2x C6), 135.8 (d, *J* = 3.3 Hz, 2x C, C1), 116.7 (2x CH₂), 114.6 (d, *J* = 20.0 Hz, 2x CH), 112.3 (d, *J* = 20.5 Hz, 2x CH), -0.2 (2x CH₃).

RMN ¹⁹F (282 MHz, CDCl₃): δ -113.3 (2x F).

Dimetil bis(6-vinilbenzo[1,3]dioxol-5-il)silano (39a)

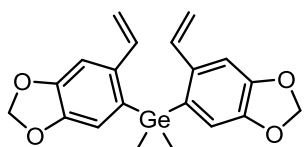


Siguiendo el procedimiento general B, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de un 36%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.07 (s, 2H, 2x H4), 6.97 (s, 2H, 2x H1), 6.75 (dd, *J* = 17.1, 10.8 Hz, 2H, 2x CH vinilo), 5.96 (s, 4H, CH₂), 5.43 (dd, *J* = 17.1, 0.9 Hz, 2H, CH₂ vinilo), 5.02 (dd, *J* = 10.8, 1.2 Hz, 2H, CH₂ vinilo), 0.55 (s, 6H, 2x CH₃).

RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃): δ 149.2 (2x C), 147.1 (2x C), 138.9 (2x C), 137.3 (2x CH), 130.4 (2x C), 113.8 (2x CH), 113.5 (2x CH₂), 106.0 (2x CH), 101.0 (2x CH₂), 0.3 (2x CH₃).

Dimetil bis(6-vinilbenzo[1,3]dioxol-5-il)germano (39b)

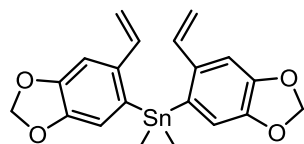


Siguiendo el procedimiento general B, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de un 41%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.12 (s, 2H, 2x H₄), 6.89 (s, 2H, 2x H₁), 6.73 (dd, *J* = 17.1, 10.8 Hz, 2H, 2x CH vinilo), 5.97 (s, 4H, CH₂), 5.47 (dd, *J* = 17.1, 1.2 Hz, 2H, CH₂ vinilo), 5.06 (dd, *J* = 10.8, 0.9 Hz, 2H, CH₂ vinilo), 0.68 (s, 6H, 2x CH₃).

RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃): δ 149.9 (2x C), 147.3 (2x C), 137.7 (2x C), 137.3 (2x CH), 132.6 (2x C), 113.4 (2x CH₂), 113.2 (2x CH), 105.8 (2x CH), 101.0 (2x CH₂), 0.2 (2x CH₃).

Dimetil bis(6-vinilbenzo[1,3]dioxol-5-il)estannano (39c)

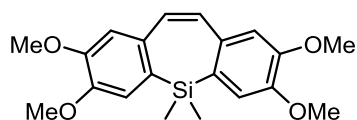


Siguiendo el procedimiento general B, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de un 47%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.15 (s, 2H, 2x H₄), 6.87 (s, 2H, 2x H₁), 6.67 (dd, *J* = 17.1, 10.8 Hz, 2H, 2x CH vinilo), 5.94 (s, 4H, CH₂), 5.52 (dd, *J* = 17.1, 0.9 Hz, 2H, CH₂ vinilo), 5.13 (dd, *J* = 10.8, 0.9 Hz, 2H, CH₂ vinilo), 0.55 (s, 6H, 2x CH₃).

RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃): δ 149.1 (2x C), 147.4 (2x C), 139.2 (2x C), 138.9 (2x CH), 134.1 (2x C), 115.3 (2x CH), 113.7 (2x CH₂), 105.7 (2x CH), 101.0 (2x CH₂), -6.9 (2x CH₃).

2,3,7,8-tetrametoxi-5,5-dimetil-5H-dibenzo[b,f]silepina (40a)



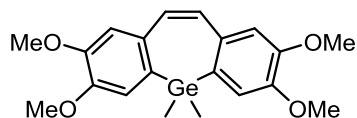
Siguiendo el procedimiento general C, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de un 94% y un punto de fusión de 201-202 °C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.01 (s, 2H, H₄, H₆), 6.89 (s, 2H, H₁, H₉), 6.85 (s, 2H, CH olefina), 3.92 (s, 6H, 2x OCH₃), 3.88 (s, 6H, 2x OCH₃), 0.48 (s, 6H, 2x CH₃).

RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃): δ 149.6 (2x C), 149.0 (2x C), 135.3 (2x C), 131.7 (2x CH), 128.9 (2x C), 114.6 (2x CH), 112.8 (2x CH), 56.1 (2x OCH₃), 55.9 (2x OCH₃), -4.1 (2x CH₃).

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₂₀H₂₄O₄Si [M+Na]⁺: 379.1342. Obtenida [M+Na]⁺:379.1347.

2,3,7,8-tetrametoxi-5,5-dimetil-5H-dibenzo[b,f]germepina (40b)



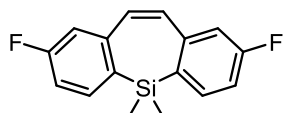
Siguiendo el procedimiento general C, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de un 78% y un punto de fusión de 203-205 °C.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 6.92 (s, 2H, H4, H6), 6.87 (s, 2H, H1, H9), 6.78 (s, 2H, CH olefina), 3.91 (s, 6H, 2x OCH_3), 3.87 (s, 6H, 2x OCH_3), 0.60 (s, 6H, 2x CH_3).

RMN ^{13}C (75 MHz; CDCl_3): δ 149.3 (2x C), 149.0 (2x C), 134.7 (2x C), 131.9 (2x CH), 131.3 (2x C), 114.2 (2x CH), 112.8 (2x CH), 56.1 (2x OCH_3), 55.9 (2x OCH_3), -4.7 (2x CH_3).

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_4^{74}\text{Ge}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 403.0965. Obtenida $[\text{M}+\text{H}]^+$: 403.0969.

2,8-difluoro-5,5-dimetil-5H-dibenzo[b,f]silepina (41a)



Siguiendo el procedimiento general C, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de un 80% y un punto de fusión de 102-104 °C.

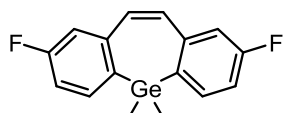
RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 7.51 (m, 2H), 7.10-7.0 (m, 4H), 6.92 (s, 2H, CH olefina), 0.48 (s, 6H, 2x CH_3).

RMN ^{13}C (125 MHz; CDCl_3): 164.7–162.7 (d, $J = 246.0$ Hz, 2x C, C-F), 143.4 (d, $J = 7.0$ Hz, 2x C), 134.6 (d, $J = 7.5$ Hz, 2x CH, C4, C6), 133.2 (d, $J = 3.1$ Hz, 2x C), 133.1 (d, $J = 1.9$ Hz, 2x CH), 116.1 (d, $J = 20.1$ Hz, 2x CH), 114.9 (d, $J = 19.9$ Hz, 2x CH), -4.3 (2x CH_3).

RMN ^{19}F (282 MHz, CDCl_3): $\delta -113.3$ (2x F).

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): la muestra no se ionizó, por lo que no se pudo obtener el espectro de masas.

2,8-difluoro-5,5-dimetil-5H-dibenzo[b,f]germepina (41b)



Siguiendo el procedimiento general C, se obtuvo el compuesto esperado como aceite que solidifica a baja temperatura, con un rendimiento de un 77% y un punto de fusión de 97-100 °C.

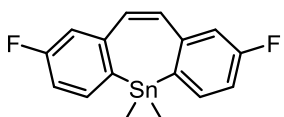
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 7.42 (m, 2H), 7.04 (m, 4H), 6.86 (s, 2H, CH olefina), 0.60 (s, 6H, 2x CH_3).

RMN ^{13}C (75 MHz; CDCl_3): 165.1–161.8 (d, $J = 245.0$ Hz, 2x C, C-F), 142.9 (d, $J = 6.7$ Hz, 2x C), 135.3 (d, $J = 3.2$ Hz, 2x C), 133.8 (d, $J = 7.6$ Hz, 2x CH), 133.2 (d, $J = 2.5$ Hz, 2x CH), 116.1 (d, $J = 20.1$ Hz, 2x CH), 114.9 (d, $J = 19.6$ Hz, 2x CH), -4.8 (2x CH_3).

RMN ^{19}F (282 MHz, CDCl_3): $\delta -114.2$ (2x F)

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): la muestra no se ionizó, por lo que no se pudo obtener el espectro de masas.

2,8-difluoro-5,5-dimetil-5H-dibenzo[b,f]estannepina (41c)



Siguiendo el procedimiento general C, se obtuvo el compuesto esperado como un aceite incoloro que solidifica a baja temperatura, con un rendimiento de un 28% y un punto de fusión de 95-98 °C

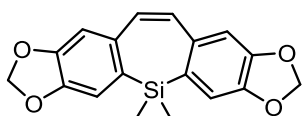
RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 7.40 (dd, $J = 8.1, 6.6$ Hz, 2H, H4, H6), 7.07 (dd, $J = 10.8, 2.1$ Hz, 2H, H1, H9), 7.05 (td, $J = 8.5, 2.7$ Hz, 2H, H3, H7), 6.85 (s, 2H, CH olefina), 0.50 (s, 6H, 2x CH_3).

RMN ^{13}C (125 MHz; CDCl_3): 164.5-162.5 (d, $J = 245.0$ Hz, 2x C, C-F), 145.0 (d, $J = 6.4$ Hz, 2x C), 137.0 (d, $J = 3.6$ Hz, 2x C), 136.3 (d, $J = 7.4$ Hz, 2x CH), 134.0 (d, $J = 2.7$ Hz, 2x CH), 115.9 (d, $J = 19.9$ Hz, 2x CH), 114.7 (d, $J = 19.1$ Hz, 2x CH), -11.3 (2x CH_3).

RMN ^{19}F (282 MHz, CDCl_3): $\delta -114.1$ (2 x F)

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): la muestra no se ionizó, por lo que no se pudo obtener el espectro de masas.

Compuesto 42a



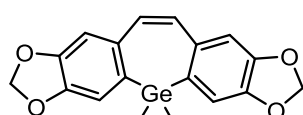
Siguiendo el procedimiento general C, se obtuvo el compuesto esperado como un aceite con un rendimiento de un 86%.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 6.89 (s, 2H, H4, H6), 6.85 (s, 2H, H1, H9), 6.78 (s, 2H, CH olefina), 5.93 (s, 4H, CH_2), 0.43 (s, 6H, 2x CH_3).

RMN ^{13}C (75 MHz; CDCl_3): δ 148.6 (2x C), 147.8 (2x C), 136.4 (2x C), 131.7 (2x CH), 130.5 (2x C), 111.4 (2x CH), 109.9 (2x CH), 101.0 (CH_2), -4.2 (2x CH_3).

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_4\text{Si}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 325.0896. Obtenida $[\text{M}+\text{H}]^+$: 325.0886.

Compuesto 42b



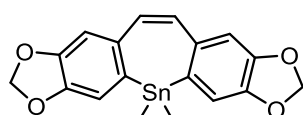
Siguiendo el procedimiento general C, se obtuvo el compuesto esperado como un aceite con un rendimiento de un 86%.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 6.90 (s, 2H, H4, H6), 6.83 (s, 2H, H1, H9), 6.71 (s, 2H, CH olefina), 5.92 (s, 4H, CH_2), 0.56 (s, 6H, 2x CH_3).

RMN ^{13}C (75 MHz; CDCl_3): δ 148.3 (2x C), 147.8 (2x C), 135.6 (2x C), 132.8 (2x C), 131.9 (2x CH), 111.0 (2x CH), 109.8 (2x CH), 101.0 (CH_2), -4.8 (2x CH_3).

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_4^{74}\text{Ge}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 371.0340. Obtenida $[\text{M}+\text{H}]^+$: 371.0358.

Compuesto 42c



Siguiendo el procedimiento general C, se obtuvo el compuesto esperado como un aceite con un rendimiento de un 23%.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 6.87 (s, 2H, H4, H6), 6.82 (s, 2H, H1, H9), 6.71 (s, 2H, CH olefina), 5.90 (s, 4H, CH_2), 0.45 (s, 6H, 2x CH_3).

RMN ^{13}C (75 MHz; CDCl_3): δ 148.4 (2x C), 147.5 (2x C), 137.5 (2x C), 134.3 (2x C), 133.1 (2x CH), 113.2 (2x CH), 109.7 (2x CH), 100.9 (CH_2), -11.2 (2x CH_3).

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_4^{120}\text{Sn}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 417.0149. Obtenida $[\text{M}+\text{H}]^+$: 417.0110.

7.- ESTUDIOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

7.- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA

7.1.- ASPECTOS GENERALES

Todos los compuestos finales preparados y caracterizados en este capítulo fueron sometidos a evaluación biológica con el fin de determinar su potencial actividad como agentes anticáncer. Además, también se efectuaron ensayos de toxicidad para determinar el grado de seguridad y fiabilidad que presentan.

Estos ensayos fueron realizados por la Dra. Eva Falomir en el departamento de Química Orgánica e Inorgánica de la Universidad Jaume I de Castellón. Como se ha mencionado en el presente capítulo, los ensayos incluyeron las tres líneas de estudio biológico que son objeto de nuestra investigación, es decir, la actividad antimetabólica, la capacidad antiangiogénica y la capacidad de inhibir la acción de la enzima telomerasa.

7.1.1.- METODOLOGÍA, MATERIALES Y EQUIPOS EMPLEADOS

Los compuestos se evaluaron a partir de una disolución stock 10 mM de cada uno de ellos, utilizando DMSO (grado biológico) como disolvente. Dichas disoluciones se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso posterior. Los cultivos celulares, reactivos necesarios y materiales (medio de cultivo, suero fetal bovino, suplementos, etc.) fueron adquiridos comercialmente en Gibco, Harlan-Seralab y Sigma Chemicals Co. Las placas donde se realizaron los cultivos celulares provienen de la empresa Thermo Scientific.

Para la realización de los diferentes ensayos biológicos se emplearon los siguientes reactivos o kits comerciales: Por parte de la empresa Life Technologies se utilizó el kit PureLink RNA Mini (Ambión), la RevertAid Reverse transcriptase #Ep0441, el hexámero aleatorio #SO142, el inhibidor de ribonucleasas Thermo Scientific Ribolock #EO0381, la mezcla dNTP #R0191 y la DreamTaq Green PCR Master Mix #K10801. Además de éstos, también se empleó el kit CycleTEST PLUS DNA de BD Biosciences.

Como equipos necesarios para llevar a cabo estos estudios se utilizó un espectrofotómetro Labtech LT-4000 Plate Reader, la fuente de alimentación de electroforesis Consort ev231, un termociclador Techne TC-3000 y un citómetro de flujo DB Accuri C6.

7.1.2.- CULTIVOS CELULARES

Para la realización de los ensayos biológicos se emplearon cinco líneas celulares de distinta naturaleza: la línea celular de adenocarcinoma de colon (HT-29), la de adenocarcinoma de mama (MCF-7), la de carcinoma de cuello uterino epitelioide (HeLa), la de adenocarcinoma de pulmón (A-549) y la línea celular de riñón embrionario humano (HEK-293) (Figura 2.29).

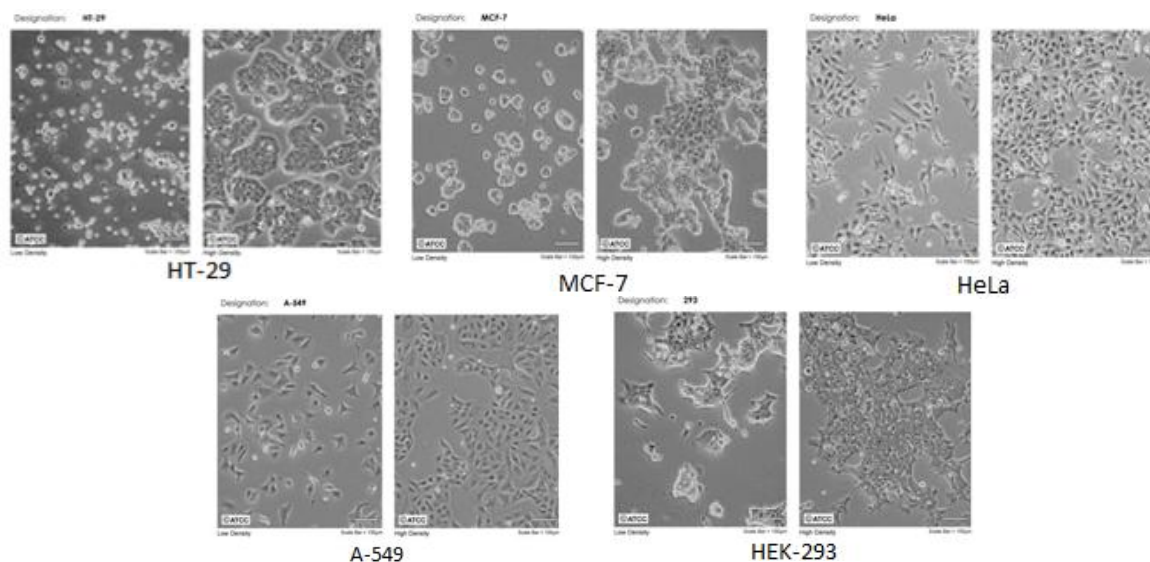


Figura 2.29.- Imagen al microscopio de cada una de las cepas celulares empleadas.²⁶⁴

Las células se cultivaron en medio comercial enriquecido con nutrientes y antibióticos necesarios para el correcto desarrollo celular. En concreto el medio basal empleado fue DMEM (Dubelcco's Modified Eagle's Medium), que contiene rojo de fenol como indicador del pH del medio (7-7.4). Este medio celular se enriqueció con un 10% de suero fetal bovino, un 1% de penicilina y estreptomicina, un 1% de L-glutamina y un 1% de anfotericina B.

Las placas empleadas para su cultivo son de 10 cm de diámetro y están tratadas con un polímero llamado Nunclon™ Delta, que crea una superficie hidrofílica capaz de interaccionar con las membranas celulares. Esto permite que las células se adhieran a la superficie de la placa y crezcan de manera similar a lo que lo harían en los tejidos del organismo.

Para evitar posibles contaminaciones durante el proceso, las células se mantuvieron en condiciones estériles en un incubador a 37 °C y bajo una atmósfera húmeda con un porcentaje de CO₂ de un 5%. La cantidad de CO₂ fijada está relacionada con el pH del medio, manteniendo el mismo en torno a pH = 7, óptimo para el crecimiento celular. Estas condiciones de temperatura y esterilidad deben mantenerse estrictamente inalteradas durante todo el proceso de manipulación, por lo que los reactivos y materiales deberán siempre estar atemperados en un baño termostático a dicha temperatura.

7.1.2.1.- Preparación de las células para llevar a cabo los ensayos

Una vez cultivadas las células, se aspiró el medio de cultivo y las células fijadas en el fondo se lavaron con DPBS repetidas veces. A continuación se añadió tripsina, una enzima de tipo serina proteasa capaz de romper las cadenas peptídicas principalmente por el extremo carboxílico de los aminoácidos lisina o arginina.

²⁶⁴ www.lgcstandards-atcc.org

Esta enzima permite despegar las células cultivadas y resuspenderlas para poder depositarlas seguidamente en las nuevas placas de ensayos. La acción de la tripsina es inhibida por el medio de cultivo, por lo que es necesario eliminar completamente dicho medio antes de añadir este reactivo. Una vez añadido, se introdujeron las placas en la incubadora durante aproximadamente 5-10 minutos y a continuación se añadió de nuevo medio de cultivo para que la tripsina dejara de ejercer su acción.

La suspensión de células en medio de cultivo se trasvasó a un Eppendorf y se centrifugó para obtener finalmente las células en forma de pellet. Por último se disolvieron de nuevo en medio de cultivo y dicha suspensión ya estaba preparada para ser añadida a las placas de ensayos.

Para que dichos estudios sean comparables, es preciso añadir una cantidad de células similar a cada uno de los pocillos, por lo que fue necesario determinar previamente la densidad celular de la suspensión preparada. Para ello se mezcló una alícuota de 50 μL de dicha suspensión con otros 50 μL de azul de tripano, un compuesto de color azulado capaz de atravesar las membranas de las células muertas, pero no de las vivas. La densidad celular (células / mL) se calculó empleando la cámara Neubauer, tras introducir un volumen conocido de muestra.

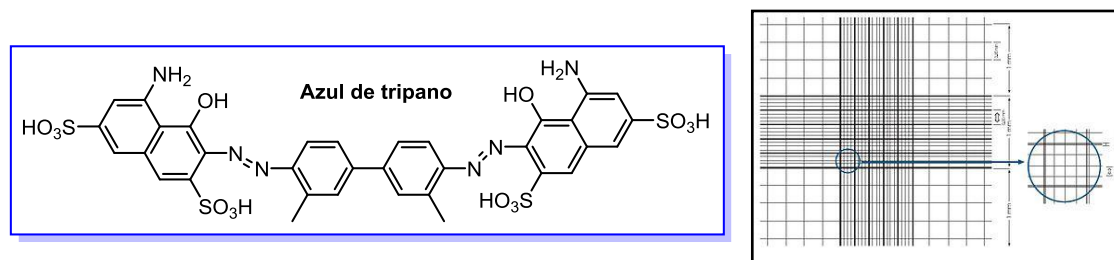


Figura 2.30.- Estructura del azul de tripano y cámara Neubauer.

7.1.3.- ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

Este tipo de ensayo permite determinar cuantitativamente el nivel de toxicidad que muestran los compuestos en las diferentes líneas celulares. Esta toxicidad puede deberse a procesos de necrosis, a un parada del crecimiento y división celular, o a procesos de apoptosis. En el presente proyecto se estudió la citotoxicidad por medio de la determinación del IC₅₀, que estima la concentración del compuesto capaz de inhibir la proliferación celular un 50% respecto al blanco. Por tanto, a menor valor de IC₅₀, menor concentración de compuesto necesaria para causar la inhibición del crecimiento celular y en consecuencia mayor citotoxicidad.

Para que estos derivados puedan emplearse en terapias anticáncer es esencial que exhiban una gran toxicidad para las células tumorales, pero no para las células sanas. De esta forma se minimizarán los efectos secundarios derivados de la acción de estos compuestos en distintas regiones del organismo, aumentando su selectividad.

Este parámetro (IC_{50}) se evaluó mediante un ensayo colorimétrico basado en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT, abreviadamente) de color amarillo. Cuando este sustrato penetra en las células, el enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa es capaz de reducirlo a formazán, de color violeta, proceso que sólo puede llevarse a cabo en células vivas.²⁶⁵ Este compuesto púrpura absorbe radiación en el rango entre 450-530 nm, por lo que se puede determinar la cantidad de formazán sintetizado mediante el empleo de un colorímetro que disponga de un lector de microplacas adecuado.

El colorímetro realiza dos medidas de absorbancia para cada pocillo, una a 630 nm en la que tanto el medio como las células absorben radiación y otra a 492 nm en la que además absorbe el Formazán. A partir de los valores obtenidos para ambas medidas es posible obtener la absorbancia del formazán sin efecto matriz.

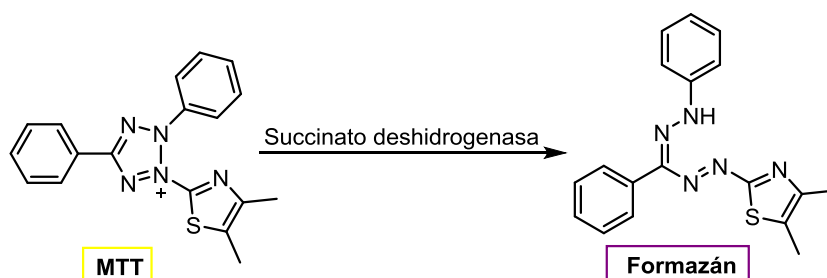


Figura 2.31. Reducción metabólica de MTT.

7.1.3.1.- Metodología experimental empleada

Para cada línea celular, las muestras se trataron con los compuestos preparados a diferentes concentraciones (desde 100 μ M - 0.0006 μ M) durante un periodo de 48 h. Posteriormente se añadió el MTT y tras un periodo de incubación de 3 h se realizaron las medidas colorimétricas correspondientes, obteniéndose una serie de valores de concentración y absorbancia para cada compuesto. Estos datos están relacionados con la presencia de formazán en las muestras y directamente vinculados con la cantidad de células vivas. Todas las medidas se efectuaron por triplicado.

Los datos se procesaron con el programa informático *GraphPadPrism4*, que representa los valores de absorbancia frente al logaritmo de la concentración y permite extraer el valor de IC_{50} para cada compuesto y línea celular, mediante el ajuste de la curva a la ecuación de Hill-Slope (Figura 2.32).

$$y = y_{min} + \frac{y_{max} - y_{min}}{1 + \left(\frac{x}{IC_{50}}\right)^s}$$

Figura 2.32.- Ecuación de Hill-Slope.

²⁶⁵ a) Mosmann, T. *J. Immunol. Methods* **1983**, 65, 55-63. b) Denizot, F.; Lang, R. *J. Immunol. Methods* **1986**, 89, 271-277.

7.1.4.-DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR CONVENCIONAL

Esta técnica permite determinar cómo se ven afectados ciertos genes por la acción de compuestos activos. Por un lado, la actividad antiangiogénica se evaluó mediante el estudio de la expresión del gen que codifica el VEGF, siendo ésta tanto mayor cuanto mayor sea la inhibición del gen correspondiente. Por otro lado, la actividad inhibidora de la enzima telomerasa se evaluó mediante el estudio de la expresión de ciertos genes que codifican tanto la parte proteica de dicha enzima (*hTERT*), como el factor de transcripción (*c-Myc*), el cual a su vez controla la activación de *hTERT*. Como parámetro de control se escogió β -actina (*ACTB*), una proteína expresada en todos los tipos de células que está involucrada en la movilidad, la estructura y la integridad celular.

El fundamento teórico de esta técnica reside en la amplificación del gen que se desea cuantificar, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RCP). Una vez aislado, se procede a la determinación de su porcentaje de expresión mediante electroforesis.²⁶⁶ El ADN utilizado en la PCR no es el ADN cromosómico, sino el ADN complementario (ADNc) copiado a partir del ARNm presente en el cultivo celular. El hecho de utilizar este tipo de ADN se debe a que sólo contendrá aquellos genes transcritos a ARNm y que se hubieran traducido a proteínas, que es el objeto de nuestro estudio.

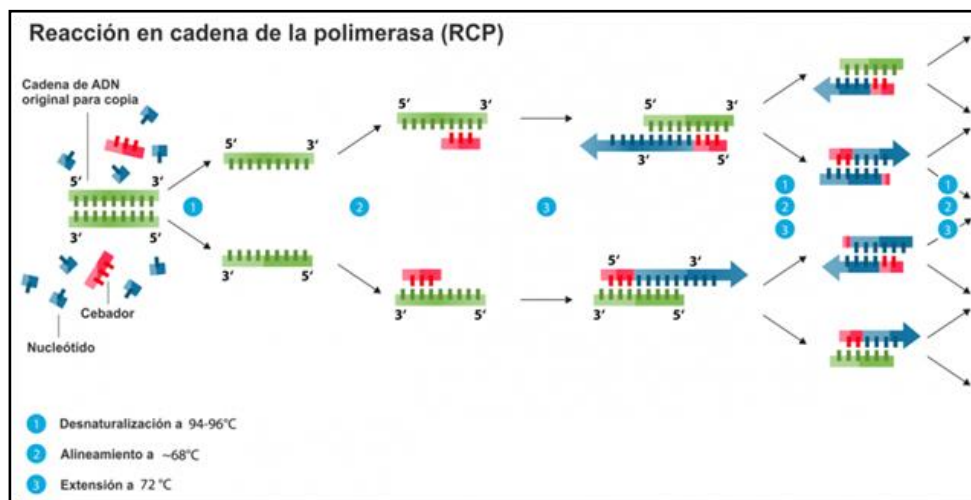


Figura 2.33.- Reacción en cadena de la polimerasa.

7.1.4.1.- Metodología experimental empleada

Se trata de un proceso complejo que incluye un primer paso de extracción y purificación del ARNm celular. Para ello se trataron las células HT-29 con los compuestos preparados durante 48 h, a una concentración prefijada por debajo de su valor de IC_{50} e incluyendo DMSO como parámetro de control. A continuación las células se recogieron, se lisaron y el ARNm se aisló del resto de elementos obtenidos.

²⁶⁶ Mullis, K. B.; Faloona, F. A. *Methods Enzymol.* **1987**, *155*, 335-350.

Una vez aislado, el ARNm se retrotranscribió a ADNc gracias a la enzima transcriptasa inversa, siendo el número de moléculas de ADNc obtenido proporcional al número de moléculas de ARNm presente en la muestra. Más tarde se amplificó mediante PCR convencional, el ADNc de los genes que codifican β -actina, VEGF, *hTERT* y *c-Myc*, empleando un termociclador y usando como iniciadores las secuencias comercialmente accesibles de estos genes. Los fragmentos de ADN amplificado se purificaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se observaron mediante radiación UV, previa tinción con bromuro de etidio. Finalmente, la expresión del gen se cuantificó utilizando el programa Image J, normalizando los valores de expresión observados al gen de la actina.

7.1.5.- DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE SECRECIÓN DE VEGF A-165 MEDIANTE UN ENSAYO ELISA

Como ya se ha comentado durante el presente capítulo, el Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF) es un importante regulador de procesos fisiológicos tales como la angiogénesis o la vasculogénesis. Este factor (VEGF) engloba seis isoformas de 121, 145, 165, 183, 189, y 206 aminoácidos respectivamente, que son el resultado del corte y empalme (*splicing*) del ARN mensajero proveniente de un único gen inicial de VEGF que contiene 8 exones (Figura 2.34).

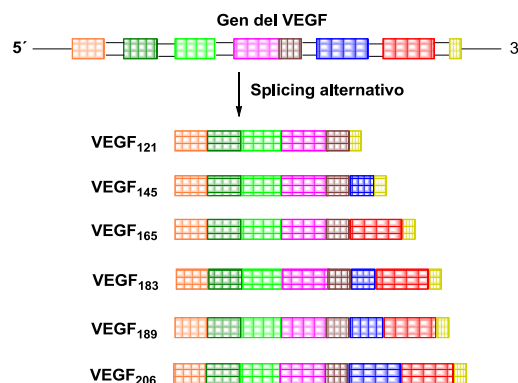


Figura 2.34.- Distintas isoformas de VEGF obtenidas por *splicing* alternativo.

De todas las anteriores, la isoforma que contiene 165 aminoácidos es la más abundante y una de las más ligeras y es producida por numerosos tipos de células entre las que se encuentran las tumorales. En conexión con lo anterior, será posible estimar mediante un ensayo ELISA (*Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay*), la cantidad de VEGF (A-165) secretado al medio de cultivo durante un cierto periodo de tiempo. Este tipo de ensayos se llevaron a cabo sobre células HT-29 incubadas durante 72 h con los compuestos seleccionados, a concentraciones ligeramente inferiores a sus valores de IC₅₀. A las 72 h se recoge el medio de cultivo y se procede a efectuar el ensayo ELISA mencionado. Las etapas necesarias para llevar a cabo este ensayo se muestran en la figura 2.35.

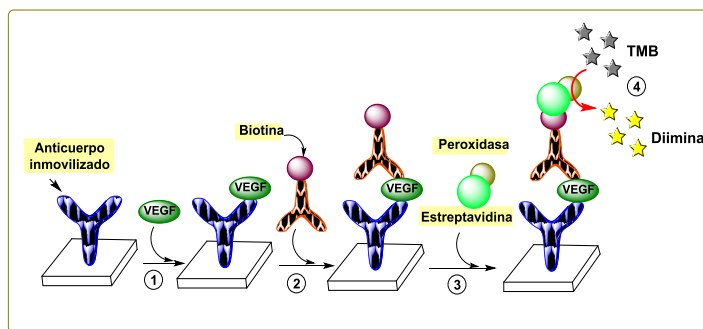


Figura 2.35.- Fases del ensayo ELISA.

En vista de la figura anterior, una alícuota del medio de cultivo en el que se han incubado las células tratadas previamente con el compuesto seleccionado, se añade al anticuerpo policlonal inmovilizado. Este anticuerpo reconoce el VEGF humano que pudiera estar presente en el medio de cultivo, formándose un complejo anticuerpo-antígeno (Paso 1). A continuación se añade un anticuerpo monoclonal biotinilado que se une al VEGF (A-165), formando un complejo tipo sándwich (anticuerpo-antígeno-anticuerpo) (Paso 2). Seguidamente se adiciona una enzima de tipo peroxidasa conjugada con la estreptavidina (Paso 3). La estreptavidina es una proteína aislada de la bacteria *Streptomyces avidinii* que presenta una elevada afinidad por la biotina, por lo que es capaz de anclarse al anticuerpo biotinilado dejando libre el extremo peroxidasa. Como último paso se añade una disolución de tetrametilbencidina (TMB, incolora) que es oxidada por la enzima peroxidasa a la diimina correspondiente (amarilla). La medida de absorbancia de la disolución coloreada es directamente proporcional a la concentración de VEGF presente en la muestra.²⁶⁷

A continuación se muestra la reacción de oxidación de TMB a diimina por acción de la peroxidasa.

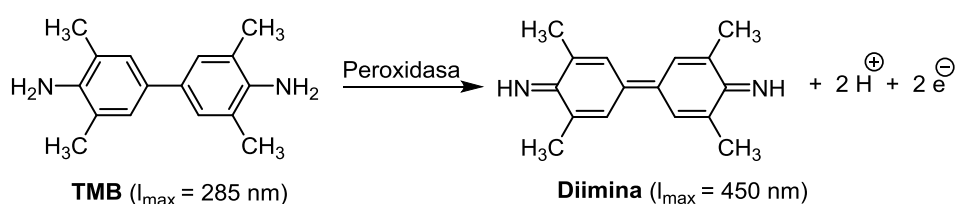


Figura 2.36.- Reacción de oxidación de TMB a diimina.

7.1.5.1.- Metodología experimental empleada

La medida de la secreción de la proteína VEGF se efectuó sobre células HT-29. Para ello se sembraron unas 100.000 células por pocillo en placas de 6 pocillos y se dejaron incubar 24 h con 1.5 mL de medio de cultivo. Posteriormente se añadió a cada pocillo cada uno de los compuestos a ensayar, a una concentración determinada ligeramente inferior a su valor de IC₅₀.

²⁶⁷ Josephy, P. D.; Elin, T.; Mason, R. P. *J. Biol. Chem.* **1982**, 257, 3669-3675.

Como control se añadió la misma cantidad de DMSO que la empleada para disolver los compuestos y las células se incubaron durante 72 h en presencia de éstos. A continuación se recogieron los sobrenadantes de los cultivos y éstos se emplearon para medir el VEGF secretado por las células, siguiendo las instrucciones del kit ELISA de detección de VEGF humano de Invitrogen.

7.1.6.- ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ANTIMITÓTICA

Este tipo de ensayo está basado en el análisis del transcurso del ciclo celular, y aporta evidencia acerca del efecto de ciertos compuestos sobre la inhibición de la proliferación descontrolada en alguna de sus etapas y la subsiguiente apoptosis o muerte celular.²⁶⁸

El ciclo celular se representa como una curva que muestra las variaciones del contenido de ADN frente al número de células analizadas. La fluorescencia medida en las células en fase de reposo (G₀/G₁) y en fase de presíntesis de ADN (G₁), produce un pico de distribución normal (Figura 2.37).²⁶⁹ Por otra parte, los mismos factores que afectan a la amplitud de los picos G₀/G₁ y G₂/M también afectan a la amplitud de la fase S, por lo que en un histograma de ADN, las células de la fase S se superponen con las células G₁ y con las células G₂.²⁷⁰

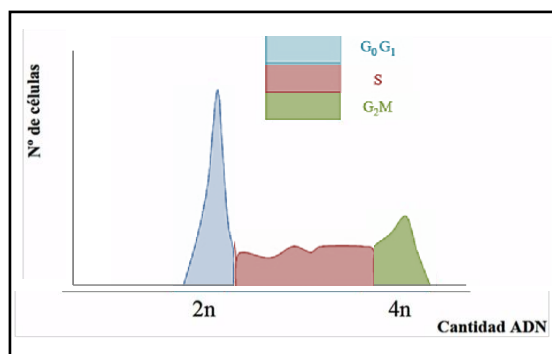


Figura 2.37. Imagen de un histograma en un tejido normal.

Como se observa en la figura anterior, en un histograma representativo de una población celular habrá tres regiones bien definidas. En la región G₀/G₁ (azul) la célula tiene un contenido diploide (2n) de ADN, correspondiente a 23 pares de cromosomas. A continuación, en la fase S o de síntesis (rojo), la célula duplica su contenido en ADN convirtiéndose en tetraploide (paso de 2n a 4n). Por último aparece un pico menor correspondiente a las células en fase G₂/M, que mantienen el mismo contenido tetraploide de ADN (4n). En algunos casos aparece una región llamada sub G₀/G₁, que corresponde a células con menor contenido de ADN, lo cual puede correlacionarse con células en apoptosis o necrosis.

²⁶⁸ Darzinkiewics, Z.; Huang, X.; Okafuji, M. *Methods Mol. Biol.* **2006**, 314, 81.

²⁶⁹ Rabinovich, P. *Practical Considerations for DNA Content Cell Cycle Analysis* **1993**, Bauer.

²⁷⁰ Shankey, T. V.; Rabinovich, P.; Bagwell, B.; Bauer, K.; Duque, R.; Hedley, D. *Cytometry* **1993**, 14, 472-477.

En relación a esto, se tratará de determinar la capacidad de inhibición de los sustratos preparados sobre el ciclo celular, estableciendo el grado de acumulación de las células en una fase concreta del mismo.

7.1.6.1.- Metodología experimental empleada

La progresión de los ciclos celulares fue analizada mediante determinación del ADN por citometría de flujo con yoduro de propidio. Se emplearon células A549 (150.000 por pocillo) y se trataron con los compuestos seleccionados durante 24 h, a una concentración el doble de su valor de IC₅₀ en la misma línea. A continuación se recogieron las células y se lavaron con PBS dos veces. Las células fueron fijadas, tratadas con RNasa y teñidas con yoduro de propidio como se describe con detalle en la literatura.²⁷¹ El análisis se realizó con un citómetro de flujo BD Accuri™ 6C.

7.1.7.- ESTUDIO DEL EFECTO SOBRE LAS PROTEÍNAS VEGFR2 y c-Myc

Existen varios receptores específicos que interaccionan con el factor VEGF ejerciendo un efecto significativo sobre procesos tumorales concretos. De entre éstos, es posible destacar el VEGFR2. Se trata de una proteína con actividad quinasa que regula la mayoría de respuestas celulares frente a VEGF. Concretamente, su expresión en las células endoteliales está implicada en fenómenos relacionados con la angiogénesis tumoral, facilitando la migración y proliferación de las células malignas.

En relación a la actividad que muestra este receptor, algunos de los derivados preparados han sido diseñados específicamente para interaccionar con él de manera reversible, actuando como inhibidores de su actividad quinasa. De esta manera se tratará de ejercer una acción antitumoral actuando no sólo sobre la expresión del gen que codifica VEGF, sino también sobre el receptor que interacciona específicamente con este factor (VEGFR2), dificultando su unión o inhibiendo su expresión.

Se realizaron dos tipos de estudios para determinar la capacidad de inhibición de la proteína VEGFR2. El primero consistió en una medida semicuantitativa mediante un ensayo ELISA, del porcentaje de proteína libre que no haya interaccionado con los sustratos evaluados. Por otra parte, el segundo ensayo permitió cuantificar el porcentaje (%) detectado de la proteína VEGFR2 en células tratadas, en relación a las células a las que no se les ha administrado el compuesto. Este ensayo se realizó mediante citometría de flujo.

Además, también se evaluó mediante la técnica anterior (citometría de flujo), el porcentaje detectado de la proteína c-Myc en células tratadas, en relación a las células a las que no se les ha administrado el compuesto. Se ha observado que esta proteína presenta una estrecha relación no sólo con la activación de la enzima telomerasa actuando como factor de transcripción del gen *h-TERT*, sino también con la expresión

²⁷¹ Andreu, J. M.; Barasoain, I. *Biochemistry* **2001**, *40*, 11975-11984.

del gen que codifica el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF),²⁷² implicado directamente en el proceso de activación de la angiogénesis.

7.1.7.1.- Metodología experimental empleada

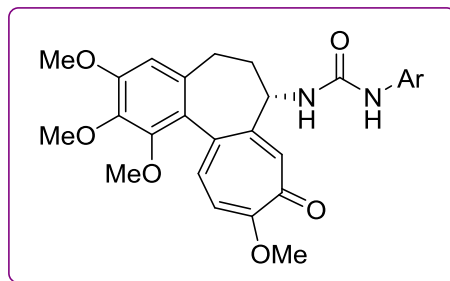
Para la estimación semicuantitativa de la afinidad de los compuestos por VEGFR2 se pusieron en contacto los derivados seleccionados directamente con la proteína, a una concentración de 50 μ M. Se mantuvieron a 37 °C durante 30 minutos y a continuación se determinó la cantidad de VEGFR2 libre en el medio, mediante un ensayo ELISA.

Por otra parte, la determinación de los porcentajes detectados de las proteínas VEGFR2 y c-Myc se llevó a cabo sobre células HT-29 (150.000 por pocillo) en contacto con los sustratos seleccionados durante 48 h, a una concentración determinada ligeramente inferior a su valor de IC₅₀. Seguidamente, tras lavar las células con PBS repetidas veces, se fijaron con formaldehído 3.6 % en PBS y a continuación se permeabilizaron tratándolas con triton X100 0.1% en PBS durante 30 minutos. Tras eliminar el tritón, las células se resuspendieron en PBS y se añadió 10 μ L de anti-c-Myc-FITC (1:1000) y anti VEGFR2-alexafluor647® (1:1000). Después de dejar las células en contacto con los anticuerpos durante 3 h a 37 °C, se midió la cantidad relativa de ambas proteínas mediante citometría de flujo.

²⁷² Baudino, T. A.; McKay, C.; Pendeville-Samain, H.; Nilsson, J. A.; Maclean, K. H.; White, E. L.; Davis, A. C.; Ihle, J. N.; Cleveland, J. L. *Genes Dev.* **2002**, *16*, 2530-2543.

7.2.- RESULTADOS BIOLÓGICOS OBTENIDOS PARA LA FAMILIA DE COLQUICINA

7.2.1 FAMILIA DE UREAS DERIVADAS DE COLQUICINA



Siguiendo la metodología sintética descrita, se han logrado preparar diferentes análogos de este producto natural, todos los cuales contienen un fragmento de urea *N,N'*-disustituída. Las modificaciones estructurales realizadas han consistido principalmente en variaciones sobre el grupo arilo unido a uno de los nitrógenos del fragmento de urea, para lo cual se emplearon anilinas con diferente tipo de funcionalización. Se incluyeron tanto grupos donadores de electrones como grupos aceptores, así como fragmentos aromáticos más voluminosos y con mayor capacidad de deslocalización electrónica.

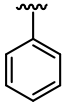
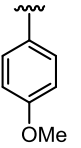
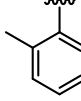
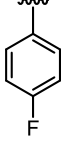
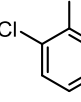
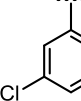
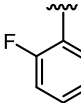
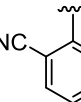
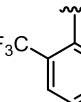
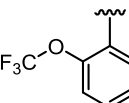
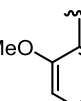
Además de como agentes antimitóticos, este tipo de derivados fueron diseñados como potenciales agentes antiangiogénicos, capaces de interactuar por medio de la agrupación urea con el dominio de la proteína VEGFR2 que está implicado en la unión con VEGF. Con este objetivo se espera que sea posible la inhibición del proceso de angiogénesis, impidiendo que se inicie la cascada de señalización que da comienzo al mismo.

7.2.1.1.- Ensayos de citotoxicidad

Con el objetivo de facilitar la discusión de los resultados biológicos, se agruparán las diferentes estructuras en función del número y tipo de sustituyentes sobre el anillo de anilina (Ar). De esta forma se podrán extraer relaciones más claras de estructura-actividad y determinar cuáles son los grupos funcionales más relevantes, implicados en la interacción.

Se estudiarán inicialmente aquellos derivados que presentan un sustituyente sobre el anillo de anilina (Tabla 2.13). Se ensayaran en las líneas celulares HT-29, MCF-7 y HeLa para determinar su acción antitumoral y en la línea HEK-293 para establecer su grado de toxicidad.

Tabla 2.13.- Valores de IC₅₀ obtenidos para los derivados monosustituídos.

Compuesto	-Ar	IC ₅₀ HT-29 (nM)	IC ₅₀ MCF-7 (nM)	IC ₅₀ HeLa (nM)	IC ₅₀ HEK-293 (nM)
Colquicina	-	13 ± 1.4	20 ± 1.1	14 ± 0.7	13 ± 3.5
6a		10.5 ± 1.3	12.0 ± 2.7	11.8 ± 1.7	10.4 ± 5.3
6b		3.9 ± 1.1	13.0 ± 0.7	6.5 ± 0.9	13.9 ± 1.6
6c		25.6 ± 1.6	119.0 ± 8	32.2 ± 6.4	44.1 ± 0.4
6g		4.7 ± 1.2	10.1 ± 0.1	10.0 ± 2.4	13.0 ± 0.08
6k		0.8 ± 0.09	1.3 ± 0.07	1.2 ± 0.05	0.7 ± 0.04
6l		4.3 ± 0,1	370 ± 98	7.5 ± 2.1	4.64 ± 0.46
6o		4.7 ± 0.8	6.1 ± 1.2	6.5 ± 1.4	4.9 ± 1.2
6s		10.8 ± 0.8	11.3 ± 4.2	10.3 ± 0.6	10.6 ± 1.8
6y		15.4 ± 0.3	25.5 ± 0.6	18.3 ± 0.7	19.4 ± 0.3
6z		3.8 ± 0.5	4.4 ± 1.7	3.2 ± 1.0	5.1 ± 1.5
6a'		1200 ± 30	1200 ± 20	1400 ± 40	1200 ± 20

Los valores de IC₅₀ se acompañan del error derivado de tres experimentos independientes.

En vista de los resultados, se observa inicialmente un elevado índice de actividad que se sitúa de manera general en el rango nM para todos los derivados, a excepción del compuesto **6a'** (*o*-OMe), cuya citotoxicidad en las líneas tumorales evaluadas se sitúa en el rango μ M bajo (**6a'**: $IC_{50} = 1.2-1.4 \mu$ M). No es posible extraer una causa concreta para este resultado, ya que compuestos de naturaleza similar como el sustrato **6b** (*p*-OMe), muestran una actividad citotóxica análoga a la del resto de derivados de la serie (nM).

Comparando los valores obtenidos para los compuestos que presentan un sustituyente en posición *orto* del anillo bencénico, se observa ligeramente una mayor citotoxicidad para aquellos derivados que presentan un grupo de naturaleza electrón atrayente, como los sustratos **6k** (*o*-Cl), **6o** (*o*-F), **6s** (*o*-CN) o **6y** (*o*-CF₃), que para los que muestran grupos de carácter electrón donante, como los compuestos **6c** (*o*-Me) o **6a'** (*o*-OMe). El resto de sustratos muestran índices de citotoxicidad similares y en el mismo rango que los demás análogos de la serie (nM). Así mismo, el sustrato **6a** que no muestra funcionalización en el anillo de anilina, también exhibió una gran actividad citotóxica.

En relación a su toxicidad, se observa que estos compuestos muestran valores de IC_{50} en células humanas (HEK-293) similares a los observados para las líneas tumorales ensayadas. Este hecho pone de manifiesto la elevada toxicidad de la mayoría de estos derivados, que muestran un margen terapéutico demasiado estrecho como para poder ejercer una acción farmacológica eficaz. No obstante, es posible destacar los sustratos **6b** (*p*-OMe) y **6g** (*p*-F), como aquellos que muestran un mayor índice de selectividad hacia las células tumorales (Tabla 2.14).

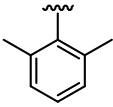
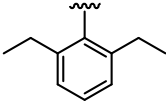
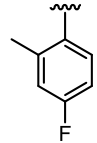
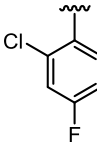
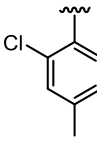
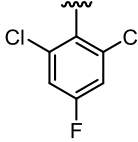
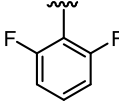
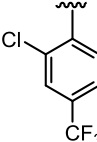
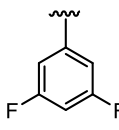
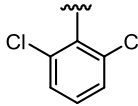
Tabla 2.14.- Valores del coeficiente de selectividad para cada una de las líneas tumorales evaluadas.

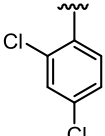
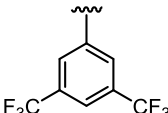
Compuestos	CSa	CSb	CSc
6b	3.6	1.1	2.1
6g	2.8	1.3	1.3

CS = Coeficiente de selectividad. CSa = IC_{50} (HEK-293) / IC_{50} (HT-29); CSb = IC_{50} (HEK-293) / IC_{50} (MCF-7); CSc = IC_{50} (HEK-293) / IC_{50} (HeLa).

A continuación, una vez establecidos ciertos aspectos relevantes de estructura-actividad, se estudiarán aquellos derivados que presentan más de un sustituyente en diferentes posiciones del anillo de anilina (Tabla 2.15).

Tabla 2.15.- Valores de IC₅₀ obtenidos para los derivados que presentan más de un sustituyente.

Compuesto	-Ar	IC ₅₀ HT-29 (nM)	IC ₅₀ MCF-7 (nM)	IC ₅₀ HeLa (nM)	IC ₅₀ HEK-293 (nM)
6d		130 ± 4	240 ± 23	243.8 ± 30.8	218 ± 13
6e		838 ± 116	185 ± 8	304.4 ± 48.6	801 ± 30
6h		14 ± 4	10.1 ± 1.3	21.2 ± 8.9	65 ± 3
6i		1.75 ± 0.07	1,20 ± 0.04	5.1 ± 2.1	1.7 ± 0.8
6j		0.71 ± 0.08	0.9 ± 0.03	2.6 ± 1.2	3.0 ± 0.8
6m		30 ± 6	14 ± 1	19.7 ± 5.1	92.2 ± 1.7
6n		25 ± 9	42 ± 3	17.7 ± 0.4	46 ± 3
6p		190 ± 6	200 ± 8	220 ± 3	220 ± 5
6q		10.4 ± 0.06	20 ± 1	16 ± 3	10 ± 1.5
6r		40 ± 3	13 ± 2	22.3 ± 0.4	42 ± 5

6t		30.6 ± 5.7	-	-	-
6x		2600 ± 300	1800 ± 10	1700 ± 20	1500 ± 500

^aLos valores de IC₅₀ se acompañan del error derivado de tres experimentos independientes.

Esta segunda serie también muestra una elevada citotoxicidad para las líneas tumorales evaluadas, observándose excelentes índices de actividad situados en el rango nM. De entre todos los derivados destacar los compuestos **6i** (*o*-Cl, *p*-F) y **6j** (*o*-Cl, *p*-Me), que presentan un átomo de cloro en posición *orto* y que junto al sustrato **6k** (*o*-Cl), muestran los valores de IC₅₀ más bajos de toda la serie. De estos resultados es posible extraer la influencia que ejerce el átomo de Cl sobre la actividad antitumoral de esta familia de derivados. No obstante, la presencia de dos átomos de Cl en posiciones *orto* empeora ligeramente la actividad mostrada con respecto a los sustratos anteriores, aunque se mantiene en unos niveles excelentes y en el rango establecido, tal y como se puede observar para el compuesto **6r** (*o*-diCl).

Un análogo de estructura similar al compuesto **6j** es el sustrato **6p**, que presenta un átomo de Cl en posición *orto* y un grupo CF₃ en posición *para*, en lugar de un grupo metilo (Me). En este caso, la introducción de un grupo CF₃ produce un considerable descenso en la actividad antitumoral mostrada (**6p**; IC₅₀: (HT-29) = 190 nM, (MCF-7) = 200 nM; (HeLa) = 220.1 nM), lo que queda reflejado con mayor intensidad para el compuesto **6x** (3,5-diCF₃), que muestra valores de citotoxicidad en el rango μM (**6x**; IC₅₀ = 1.7-2.6 μM).

Por otra parte, se observa un descenso considerable en los valores de actividad para aquellos derivados que presentan grupos alifáticos electrón dadores en posiciones *orto* del anillo bencénico. Como ejemplos representativos es posible destacar los sustratos **6d** (*o*-diMe) y **6e** (*o*-diEt), cuyos valores de IC₅₀ aumentan en un factor de más de cien unidades en comparación con el resto de análogos de la serie. Este hecho apoya la hipótesis planteada acerca de la mayor actividad mostrada por los compuestos que presentan grupos de naturaleza atrayente en su estructura.

El resto de sustratos evaluados muestran, independiente de la funcionalización del anillo aromático, buenos índices de citotoxicidad en consonancia con los valores obtenidos para esta familia.

Por último, estos derivados también presentan una elevada toxicidad para la línea celular no cancerosa HEK-293. No obstante, es posible destacar los compuestos **6h** (*o*-Me, *p*-F), **6j** (*o*-Cl, *p*-Me), **6m** (*o*-diCl, *p*-F) y **6n** (*o*-diF), que permiten disponer de una mayor ventana terapéutica para ejercer su acción farmacológica. Estos compuestos mantienen el mismo nivel de actividad que el resto de los derivados, al tiempo que muestran una mayor selectividad hacia las células cancerosas, posibilitando un mayor desarrollo farmacológico debido a su menor toxicidad.

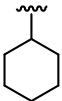
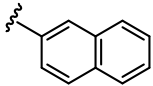
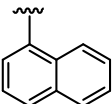
Tabla 2.16.- Valores del coeficiente de selectividad para cada una de las líneas tumorales evaluadas.

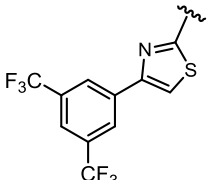
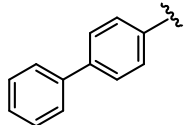
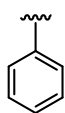
Compuestos	CSa	CSb	CSc
6h	4.6	6.4	3.1
6j	4.2	3.3	1.1
6m	3.1	6.5	4.7
6n	1.8	1.1	2.6

CS = Coeficiente de selectividad. CSa = IC_{50} (HEK-293) / IC_{50} (HT-29); CSb = IC_{50} (HEK-293) / IC_{50} (MCF-7); CSc = IC_{50} (HEK-293) / IC_{50} (HeLa).

Finalmente se incluirán en el análisis aquellos derivados cuyas estructuras difieren ligeramente del resto de análogos de la serie, con el fin de determinar si se mantienen los buenos niveles de actividad observados para los compuestos anteriores.

Tabla 2.17.- Valores de IC_{50} obtenidos para el resto de derivados preparados

Compuesto	-Ar	IC_{50} HT-29 (nM)	IC_{50} MCF-7 (nM)	IC_{50} HeLa (nM)	IC_{50} HEK-293 (nM)
6f		37.2 ± 3.1	89.3 ± 7.6	87.1 ± 16.3	98.2 ± 5.8
6u		8.3 ± 2.3	10.1 ± 3.2	6.7 ± 2.3	7.2 ± 3.1
6v		11.1 ± 0.2	17 ± 3	16 ± 4	9.0 ± 0.8

6w		45 ± 2	57 ± 7	32 ± 3	50 ± 7
6b'		1.2 ± 0	-	12.1 ± 5.6	1.71 ± 0.9
9 Tiourea		2.1 ± 1.1	-	5.9 ± 2.9	10.0 ± 5.9

^aLos valores de IC₅₀ se acompañan del error derivado de tres experimentos independientes.

En vista de los resultados es posible afirmar que se mantienen los mismos niveles de actividad antitumoral pese a presentar estructuras más complejas, más voluminosas y con mayor impedimento estérico. Cabe destacar el análogo **6f**, que presenta un anillo ciclohexilamina en lugar de un anillo de anilina y el compuesto **9**, que presenta una función tiourea en lugar de la agrupación urea característica. Estos dos compuestos (**6f**, **9**) exhiben un elevado grado de citotoxicidad para las líneas tumorales evaluadas, al mismo tiempo que presentan una buena ventana terapéutica para ejercer su acción farmacológica. Los coeficientes de selectividad observados para cada una de las líneas tumorales se muestran a continuación.

Tabla 2.18.- Valores del coeficiente de selectividad para cada una de las líneas tumorales evaluadas.

Compuestos	CSa	CSb	CSc
6f	2.6	1.1	1.1
9	4.8	-	1.7

CS = Coeficiente de selectividad. CSa = IC₅₀ (HEK-293) / IC₅₀ (HT-29); CSb = IC₅₀ (HEK-293) / IC₅₀ (MCF-7); CSc = IC₅₀ (HEK-293) / IC₅₀ (HeLa).

En conclusión, los derivados preparados muestran valores de de citotoxicidad situados en el rango nM, similares a los del propio producto natural (colquicina, IC₅₀: (HT-29) = 13 nM; (MCF-7) = 20 nM; (HeLa) = 14 nM; (HEK-293) = 13 nM). No obstante, algunos de ellos serían capaces de mejorar sustancialmente el coeficiente de selectividad hacia las células tumorales, reduciendo su toxicidad y favoreciendo un posible desarrollo farmacológico de los mismos.

7.2.1.2.- Estudio del efecto de los compuestos sobre la expresión génica y la secreción de la proteína VEGF A-165

Para la realización de este tipo de estudios, se escogieron aquellos compuestos que presentan una mayor citotoxicidad para la línea celular HT-29 y/o un coeficiente de selectividad más elevado.

Esta técnica permite determinar cómo se ven afectados ciertos genes por la acción de los derivados preparados. Dado el planteamiento biológico llevado a cabo, se estudiará la influencia de estos sustratos sobre la expresión de los genes relacionados con el proceso de angiogénesis (VEGF) y con la activación de la enzima telomerasa (hTERT, c-Myc). Además, se tratará de determinar la cantidad relativa de la proteína VEGF (A-165) que es secretada al medio extracelular, para valorar el efecto de los compuestos sobre este proceso. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

Tabla 2.19.- Porcentaje de expresión de genes relacionados con los procesos de angiogénesis y activación de la enzima telomerasa. Estimación del % de VEGF A-165 secretado al medio extracelular.

Compuesto	% Expresión VEGF	% Expresión hTERT	% Expresión c-Myc	% VEGF secretado
6b	70	91	55	44
6f	105	133	106	139
6g	59	70	52	55
6h	63	68	65	90
6i	64	80	58	67
6j	70	80	85	75
6k	30	46	25	34
6n	38	36	88	11
6y	124	128	110	82
6z	115	92	80	66
6b'	72	60	85	72
9	95	90	107	114
Colquicina	55	87	37	40
Sunitinib	46	68	47	45

En base a estos resultados se observa que varios derivados inhiben de forma considerable la expresión de los genes estudiados, mejorando incluso los valores obtenidos para la colquicina y el Sunitinib, tomados como referencia.

De esta manera se llevará a cabo un análisis más detallado de aquellos compuestos que muestran un mayor grado de inhibición, destacando de manera particular la actividad de cada uno de ellos sobre la expresión de los genes *VEGF*, *h-TERT* y *c-Myc*, así como sobre la capacidad de inhibir la secreción de VEGF al medio extracelular.

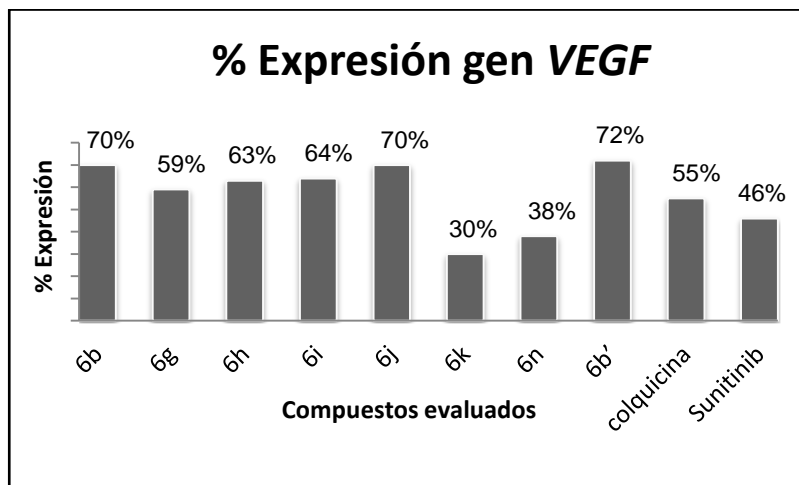


Figura 2.38.- Valores de % de expresión para el gen *VEGF*.

En vista de la gráfica anterior, se observa principalmente que los compuestos **6k** (*o*-Cl) y **6n** (*o*-diF) son capaces de inhibir la expresión del gen que codifica el VEGF, expresándose únicamente un 30% y 38% con respecto al porcentaje observado en ausencia de los mismos. Estos análogos mejoran los valores que muestran la colquicina y el Sunitinib.

El resto de derivados también muestran cierto grado de inhibición, aunque en menor medida que los sustratos anteriores. No obstante, es posible destacar los compuestos **6g** (*p*-F), **6h** (*o*-Me, *p*-F) y **6i** (*o*-Cl, *p*-F), que expresan únicamente un 59%, 63% y 64% respectivamente.

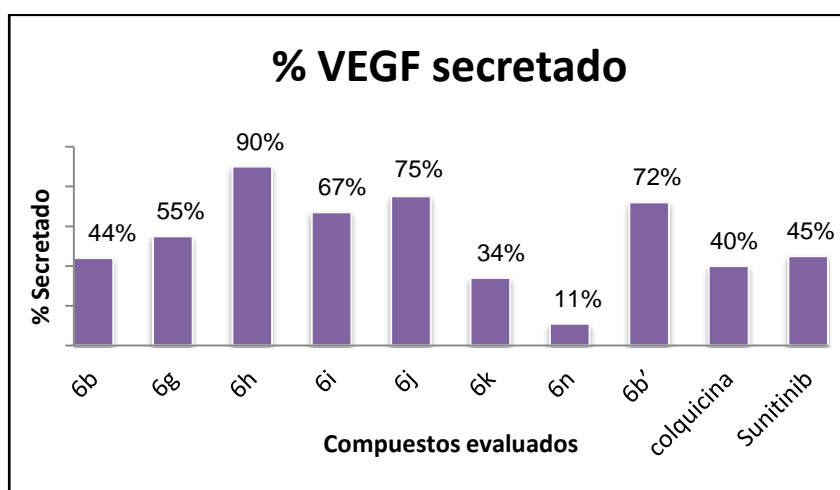


Figura 2.39.- Valores de % de VEGF (A-165) secretado al medio.

En este segundo ensayo (Figura 2.39) se observan resultados similares a los obtenidos para el caso anterior. Destacar los compuestos **6k** (*o*-Cl) y **6n** (*o*-diF) que son capaces de reducir significativamente el porcentaje de VEGF secretado al medio, observándose únicamente un 34% y un 11% respectivamente. De forma particular resaltar la actividad mostrada por el compuesto **6n**, que es capaz de inhibir casi un 90% la cantidad de este factor secretado al medio extracelular. El resto de derivados también muestran buena actividad, aunque en menor proporción que los análogos mencionados. No obstante, es posible destacar los sustratos **6b** (*p*-OMe), **6g** (*p*-F) y **6i** (*o*-Cl, *p*-F), que secretan únicamente un 44%, 55% y 67% respectivamente.

A continuación se muestra el porcentaje de expresión de los genes *h-TERT* y *c-Myc* en cultivos celulares tratados con los derivados anteriores.

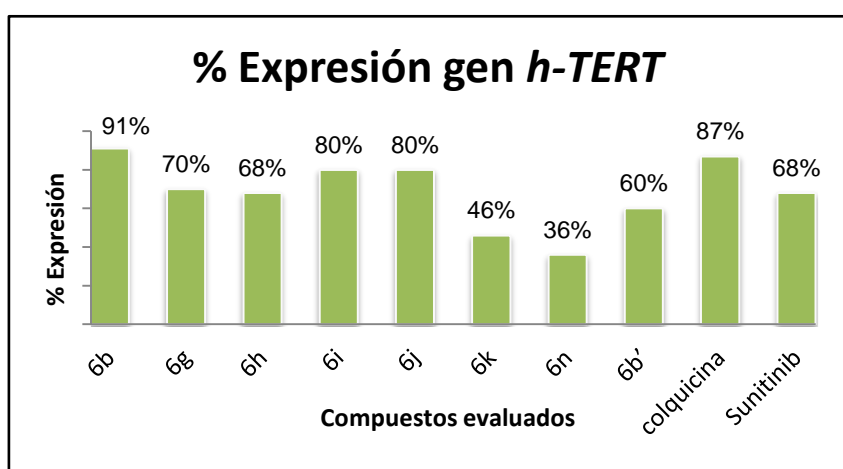


Figura 2.40.- Valores de % de expresión para el gen *h-TERT*.

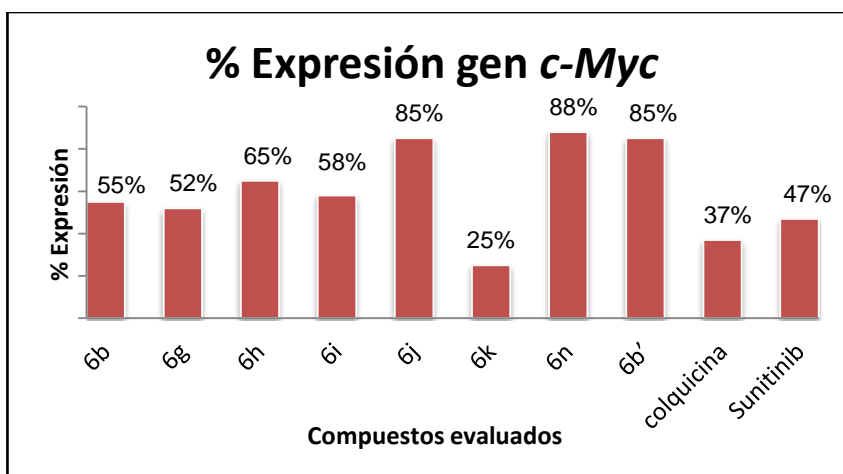


Figura 2.41.- Valores de % de expresión para el gen *c-Myc*.

Tal y como sucedía en el caso anterior, se observa que los compuestos que exhiben una mayor acción inhibitoria sobre estos genes son los sustratos **6k** y **6n**, que muestran un porcentaje de expresión de 46% y 36% respectivamente para *h-TERT* y un 25% y 88% para el gen *c-Myc*.

Destacar el caso del compuesto **6n**, que aunque es capaz de inhibir de manera significativa la expresión del gen que codifica *h-TERT*, no muestra actividad inhibitora sobre la expresión del gen *c-Myc*. El resto de derivados también exhiben un alto grado de inhibición sobre la expresión de estos genes. Destacar particularmente los sustratos **6h** (*o*-Me, *p*-F) y **6b'** (4-Ph) como inhibidores de *h-TERT* y los sustratos **6b** (*p*-OMe), **6g** (*p*-F), **6h** (*o*-Me, *p*-F) y **6i** (*o*-Cl, *p*-F), como inhibidores de la expresión del gen *c-Myc*.

En conclusión y apoyando la hipótesis planteada inicialmente, estos compuestos presentan además de una elevada actividad citotóxica, una considerable acción anti-VEGF y como inhibidores de la activación del gen *h-TERT*. De esta forma podrán ejercer un efecto dual, actuando simultáneamente frente a diferentes dianas biológicas implicadas en el desarrollo de esta enfermedad.

7.2.1.3.- Estudio del efecto sobre las proteínas VEGFR2 y c-Myc

Para este tipo de ensayos se escogieron aquellos compuestos que habían mostrado previamente buena actividad para la línea celular HT-29 o una ventana terapéutica aceptable. Se llevaron a cabo mediante la técnica de citometría de flujo descrita anteriormente. Mediante esta técnica se tratará de cuantificar el porcentaje detectado de la proteína VEGFR2 en las células tratadas con los compuestos seleccionados y determinar si estos sustratos son capaces de inhibir dicha expresión. Además se cuantificará al mismo tiempo el porcentaje de la proteína *c-Myc* presente.

A continuación se muestran los porcentajes detectados para las proteínas VEGFR2 y *c-Myc*.

Tabla 2.20- Porcentaje detectado para las proteínas VEGFR-2 y *c-Myc*.

Compuesto	% proteína VEGFR2	% proteína c-Myc
Colquicina	94 ± 2	63 ± 4
Sunitinib	90 ± 9	100
6b	95 ± 6	61 ± 6
6c	66 ± 4	92 ± 3
6g	63 ± 6	100
6h	62 ± 5	100
6i	15 ± 2	100
6j	45 ± 7	100
6k	38 ± 9	51 ± 3
6l	15 ± 2	87 ± 4

6n	35 ± 4	42 ± 3
6w	36 ± 6	41 ± 4
6x	27 ± 2	100
6y	100	100
6b'	74 ± 3	100

Como muestra la Tabla 2.20, se observa de manera general una reducción significativa en los valores detectados para la proteína VEGFR2 en células HT-29. Los más activos se muestran en la siguiente gráfica (Figura 2.42).

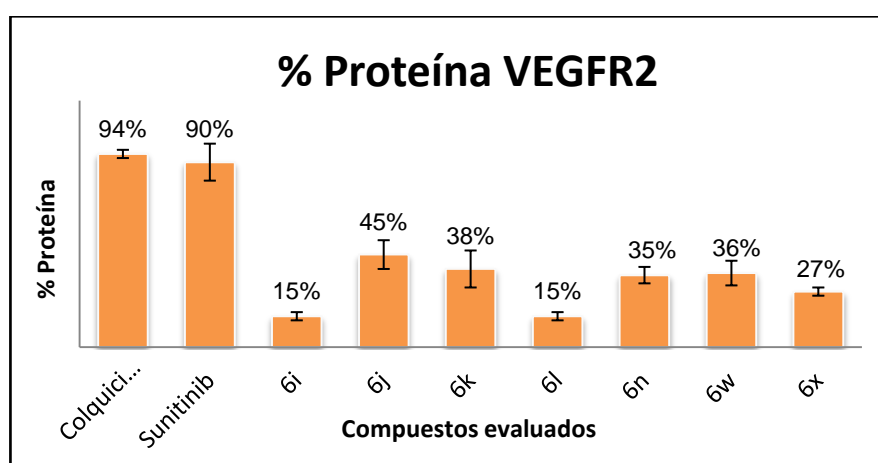


Figura 2.42.- Porcentajes detectados para la proteína VEGFR2.

De entre los sustratos anteriores destacar principalmente los compuestos **6i** (*o*-Cl, *p*-F) y **6l** (*m*-Cl), que provocan que únicamente se detecte un 15% de la proteína VEGFR2, en relación a las células sin tratar. Curiosamente, el compuesto **6x** (3,5-diCF₃) que mostraba valores de citotoxicidad muy elevados situados en el rango μ M, también exhibe una considerable actividad inhibitora sobre la acción de esta proteína. Se detecta únicamente un 27% del total expresado en las células que no han recibido tratamiento. El resto de derivados también muestran una marcada actividad inhibitora sobre la proteína VEGFR2, siendo destacable la acción ejercida por los compuestos **6j** (*o*-Cl, *p*-Me), **6k** (*o*-Cl), **6n** (*o*-diF) y **6w** (tiazol).

Por otra parte, también se aprecia cierta inhibición, aunque menos significativa, de la proteína c-Myc en las células tratadas con los compuestos anteriores. Destacar de manera particular los valores obtenidos para los compuestos **6k** (*o*-Cl), **6n** (*o*-diF) y **6w** (tiazol), cuya acción reduce los porcentajes detectados para la proteína c-Myc, observándose únicamente un 51%, 42% y 41% en cada caso (Figura 2.43).

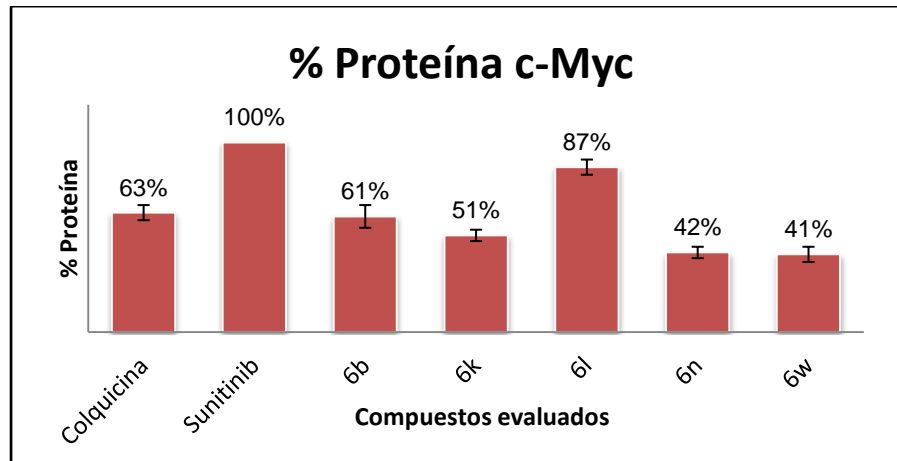


Figura 2.43.- Porcentajes detectados para la proteína c-Myc.

Como ya se ha introducido previamente, se observa en estos casos una relación entre el porcentaje expresado para el gen que codifica el VEGF y el porcentaje detectado para la proteína c-Myc.²⁷² Esto es indicativo de que estos compuestos regulan los genes *h-TERT* y *VEGF*, a través del gen *c-Myc*. A modo comparativo se muestran los valores obtenidos para ambos ensayos: **6k** (Expresión gen *VEGF*: 30%; Expresión proteína c-Myc: 51%); **6n** (Expresión gen *VEGF*: 38%; Expresión proteína c-Myc: 42%).

Además de estos estudios, también se realizó para algunos derivados una medida semicuantitativa de su interacción directa con VEGFR2, que permitió determinar, mediante un ensayo ELISA, el porcentaje de esta proteína libre en el medio. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

Tabla 2.21- % VEGFR2 libre en el medio.

Compuestos	% VEGFR2 libre
6b	95 ± 2
6c	90 ± 6
6e	77 ± 8
6g	55 ± 20
6h	90 ± 1
6i	96 ± 2
6j	97 ± 2
6k	98 ± 1
6l	85 ± 2
6m	96 ± 2

La Tabla 2.21 muestra que la mayor parte de estos derivados no interaccionan de manera significativa con la proteína VEGFR2, mostrando valores de proteína libre muy elevados en prácticamente todos los casos. No obstante, es posible destacar los sustratos **6e** (*o*-diEt), **6g** (*p*-F) y **6i** (*m*-Cl) como aquellos que interaccionan con mayor intensidad. Aunque no se observa una tendencia clara, esto podría indicar que los bajos porcentajes detectados para la proteína VEGFR2 mediante la primera técnica descrita (citometría de flujo), se deben principalmente a una acción inhibitoria sobre la expresión del gen de la misma y no a la interacción directa entre la diana biológica y los derivados seleccionados. No obstante, es posible destacar el sustrato **6g** (*p*-F) que interacciona significativamente con la proteína VEGFR2, mostrando únicamente un 55% de proteína libre. Este hecho sugiere que este derivado ejerce la mayor parte de su acción inhibitoria a través de este mecanismo.

En conclusión, estos compuestos muestran un elevado grado de inhibición de la proteína VEGFR2 y alguno de ellos también muestra actividad aceptable frente a la inhibición de la proteína c-Myc. Con esto se reafirman las características antiangiogénicas y antitelomerasa puestas de manifiesto en ensayos anteriores y se establece de manera preliminar una relación entre los valores obtenidos para la expresión de la proteína c-Myc y para la expresión del gen que codifica el VEGF.

7.2.1.4.- Ensayos de capacidad antimitótica

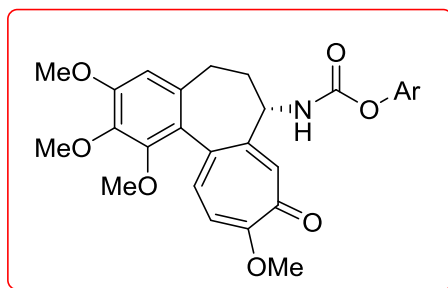
Con el objetivo de determinar la capacidad antimitótica de los derivados preparados, se llevó a cabo la evaluación del ciclo celular en células A-549 tratadas con alguno de estos compuestos. A continuación se muestran los porcentajes de células que se encuentran en las distintas fases del ciclo celular.

Tabla 2.22- Porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo celular.

Compuesto	Fase SubG0	Fase G0	Fase G1/S	Fase G2/M
B	5	69	12	13
Colquicina	5	45	13	37
6b	4	58	10	28
6g	5	64	8	23
6i	4	56	9	31
6k	5	58	9	28

En vista de los resultados, al comparar con los valores obtenidos para el blanco, se observa que estos derivados muestran cierta capacidad antimitótica paralizando el ciclo celular en la etapa de mitosis. Debido a ello, se observa mayor acumulación de células en la etapa G2/M que para el control. No obstante, ninguno de los derivados propuestos mejora los valores que proporciona el producto natural del que derivan (colquicina).

7.2.2 FAMILIA DE CARBAMATOS DERIVADOS DE COLQUICINA



Para esta familia se han preparado diferentes análogos del producto natural, que contienen todos ellos un fragmento carbamato (uretano) como grupo funcional característico. Las modificaciones estructurales realizadas van encaminadas en el sentido de reducir la toxicidad y aumentar la selectividad de estos derivados hacia las células tumorales, sustituyendo la agrupación urea por una función carbamato. Para la preparación de esta serie de derivados se han empleado fenoles con diferente tipo de funcionalización, aunque tratando de que se asemejasen en la medida de lo posible a los análogos ureicos anteriores.

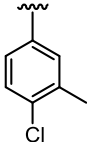
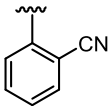
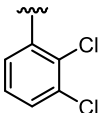
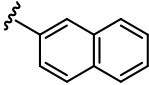
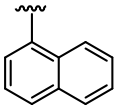
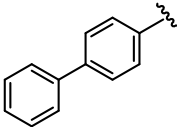
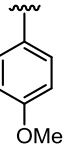
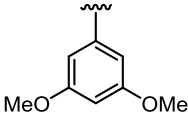
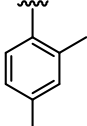
Se incluyeron tanto grupos dadores de electrones como grupos aceptores, así como sustratos aromáticos más voluminosos y con mayor capacidad de deslocalización electrónica, siguiendo las premisas establecidas con anterioridad.

Además de las líneas celulares anteriores, para esta familia de compuestos también se evaluó su actividad sobre la línea A-549, de adenocarcinoma de pulmón.

7.2.2.1.- Ensayos de citotoxicidad

Tabla 2.23- Valores de IC_{50} obtenidos para la familia de carbamatos de colquicina.

Compuesto	-Ar	IC_{50} HT-29 (nM)	IC_{50} MCF-7 (nM)	IC_{50} HeLa (nM)	IC_{50} A-549 (nM)
5		89 ± 9	14 ± 2	82 ± 15	102 ± 15
11a		84 ± 8	30 ± 2	75 ± 12	62 ± 3
11b		235 ± 5	65 ± 5	80 ± 7	84 ± 2

11c		3.4 ± 0.03	30 ± 4	8.7 ± 0.4	8.6 ± 0.8
11d		81 ± 7	26 ± 2	70 ± 4	68 ± 8
11e		0.5 ± 0.05	250 ± 8	6.5 ± 0.6	3.4 ± 0.2
11f		66 ± 12	22 ± 3	45 ± 4	16 ± 2
11g		21 ± 4	92 ± 3	34 ± 8	25 ± 4
11h		63 ± 14	13 ± 2	40 ± 8	36 ± 3
11i		7.5 ± 0.7	>100	>100	7.4 ± 0.2
11j		23 ± 4	243 ± 2	47 ± 8	77 ± 12
11k		2.4 ± 0.2	232 ± 5	8.9 ± 2	1.6 ± 0.3

^aLos valores de IC₅₀ se acompañan del error derivado de tres experimentos independientes.

La toxicidad de estos derivados se ha evaluado sobre la línea celular HEK-293.

Tabla 2.24.- Resultados de toxicidad obtenidos para los derivados ensayados.

Compuesto	IC ₅₀ HEK-293 (nM)	CSa	CSb	CSc	CSd
5	75 ± 10	0.8	5.3	0.9	0.7
11a	33 ± 3	0.4	1.1	0.4	0.5
11b	76 ± 9	0.3	1.2	0.95	0.9
11c	90 ± 4	26.5	3	10.3	10.5
11d	150 ± 18	1.8	5.8	2.1	2.2
11e	9.4 ± 0,8	18.8	0.04	1.4	2.8
11f	27 ± 2	0.4	1.3	0.6	1.7
11g	26 ± 3	1.2	0.3	0.8	1
11h	67 ± 8	1.1	5.1	1.7	1.9
11i	36 ± 2	4.8	0.4	0.4	4.9
11j	30 ± 4	1.3	0.1	0.6	0.4
11k	39 ± 2	16.2	0.2	4.4	24.4

CS = Coeficiente de selectividad. CSa = IC₅₀ (HEK-293) / IC₅₀ (HT-29); CSb = IC₅₀ (HEK-293) / IC₅₀ (MCF-7); CSc = IC₅₀ (HEK-293) / IC₅₀ (HeLa); CSd = IC₅₀ (HEK-293) / IC₅₀ (A-549).

Como muestra la Tabla 2.23, se observa que estos derivados exhiben índices de actividad situados en el rango nanomolar (nM), similares a los mostrados por los análogos ureicos. Cabe destacar los compuestos **11a** (*p*-Cl), **11c** (*m*-Me, *p*-Cl) y **11e** (2,3-diCl), que presentan todos ellos al menos un átomo de Cl en su estructura. Estos derivados, conjuntamente con el sustrato **11k** (2,4-diMe), muestran los niveles de citotoxicidad más elevados de toda la serie. No obstante, no se observa una tendencia clara que permita discernir relaciones concretas de estructura-actividad, para lo que sería necesario llevar a cabo la preparación de un mayor número de análogos con diferente funcionalización.

Si bien es cierto que de manera general muestran valores de actividad ligeramente inferiores a los de la familia de ureas anterior, varios de estos derivados presentan un coeficiente de selectividad considerablemente mayor hacia las células tumorales, mostrando una ventana terapéutica más amplia para ejercer su acción farmacológica (Tabla 2.24).

Destacar especialmente el caso de los compuestos **11c** (*m*-Me, *p*-Cl), **11d** (*o*-CN), **11e** (2,3-diCl), **11i** (*p*-OMe) y **11k** (2,4-diMe), cuyos coeficientes de selectividad se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 2.25.- Coeficientes de selectividad obtenidos para los derivados ensayados.

Compuesto	CSa	CSb	CSc	CSd
11c	26.5	3	10.3	10.5
11d	1.8	5.8	2.1	2.2
11e	18.8	0.04	1.4	2.8
11i	4.8	0.4	0.4	4.9
11k	16.2	0.2	4.4	24.4

CS = Coeficiente de selectividad. CSa = IC₅₀ (HEK-293) / IC₅₀ (HT-29); CSb = IC₅₀ (HEK-293) / IC₅₀ (MCF-7); CSc = IC₅₀ (HEK-293) / IC₅₀ (HeLa); CSd = IC₅₀ (HEK-293) / IC₅₀ (A-549).

De entre los sustratos anteriores, merece mención el caso de los compuestos **11c** y **11e**, que presentan una selectividad 26 y 19 veces mayor respectivamente para las células tumorales (HT-29) que para las células no cancerosas. Otro derivado que cabe resaltar es el sustrato **11k**, que muestra una selectividad 16 veces mayor para las células HT-29 y casi 25 veces mayor para la línea celular A-549. Estos sustratos mantienen todavía unos valores de actividad muy elevados, al tiempo que presentan una considerable selectividad hacia las células tumorales, sin afectar en igual medida al correcto funcionamiento de las células normales.

Este hecho apoya la hipótesis planteada durante el desarrollo del proyecto acerca de la menor toxicidad de los uretanos derivados con respecto a la serie de ureas estudiada anteriormente.

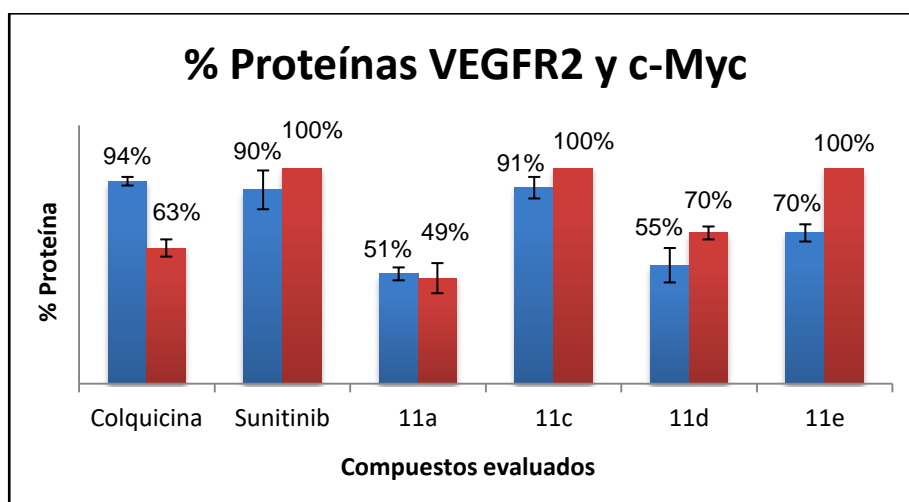
7.2.2.2.- Estudio del efecto sobre las proteínas VEGFR2 y c-Myc

Como estudios preliminares se decidió llevar a cabo la determinación del porcentaje detectado para las proteínas VEGFR2 y c-Myc, en células HT-29 tratadas con algunos de estos derivados. Se seleccionaron los compuestos **11a** (*p*-Cl), **11c** (*p*-Cl, *m*-Me), **11d** (*o*-CN) y **11e** (2,3-diCl) para llevar a cabo este ensayo.

Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 2.26.

Tabla 2.26.- Porcentajes detectados para las proteínas VEGFR2 y c-Myc.

Compuesto	% proteína VEGFR2	% proteína c-Myc
Colquicina	94 ± 2	63 ± 4
Sunitinib	90 ± 9	100
11a	51 ± 3	49 ± 7
11c	91 ± 5	100
11d	55 ± 8	70 ± 3
11e	70 ± 4	100



Azul: % detectado para la proteína VEGFR2. Rojo: % detectado para la proteína c-Myc

En vista de los resultados cabe destacar la actividad del compuesto **11a** (*p*-Cl), que es capaz de reducir los porcentajes detectados de las proteínas estudiadas prácticamente en un 50% en ambos casos. El resto de derivados muestran índices de actividad inferiores, aunque el compuesto **11d** (*o*-CN) también es capaz de exhibir cierta acción inhibitoria. Por otra parte, los derivados **11c** (*p*-Cl, *m*-Me) y **11e** (2,3-diCl) no ejercen influencia sobre la expresión de la proteína c-Myc, mostrando de igual manera una baja actividad sobre la inhibición de VEGFR2.

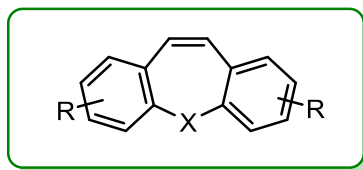
En relación con el ensayo anterior, se decidió evaluar además si estos derivados eran capaces de interactuar con la proteína VEGFR2, determinando el porcentaje de proteína libre presente en el medio, mediante un ensayo ELISA. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.27.

Tabla 2.27.- Porcentajes de proteína VEGFR2 libre en el medio.

Compuestos	% VEGFR2 libre
11a	84 ± 2
11c	88 ± 3
11d	85 ± 2
11e	89 ± 3

Estos resultados ponen de manifiesto que estos derivados no muestran un grado relevante de interacción con la proteína VEGFR2, como se refleja en los elevados porcentajes de proteína libre que se detectan. Este hecho sugiere que esta serie de análogos podría actuar sobre VEGFR2 a través de un mecanismo de acción que implicaría la inhibición de la expresión de esta proteína, no siendo la interacción competitiva con ella un factor clave para mostrar su actividad.

7.3.- RESULTADOS BIOLÓGICOS OBTENIDOS PARA LA FAMILIA DE COMBRETASTATINA A-4

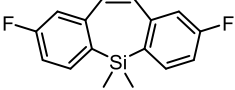
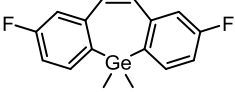
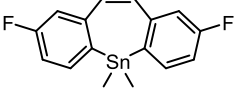
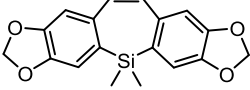
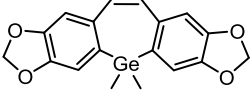
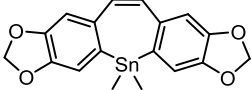


Para esta nueva familia se han preparado una serie de análogos tricíclicos simétricos de CA-4, en los cuales se espera que el ciclo adicional solvante el problema de isomerización (Z/E) que presenta el sistema de estilbeno. Con el objetivo de establecer relaciones claras de estructura-actividad para estos derivados, se han modificado tanto los sustituyentes presentes en el anillo de fenilo, como la naturaleza del átomo X. Como átomos X de cierre del anillo heptagonal se han empleado elementos del grupo 14 (Si, Ge, Sn).

7.3.1.- ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

Tabla 2.28.- Valores de IC₅₀ obtenidos para la familia de derivados tricíclicos de CA-4.

Compuesto		IC ₅₀ HT-29 (μ M)	IC ₅₀ MCF-7 (μ M)	IC ₅₀ HeLa (μ M)	IC ₅₀ A-549 (μ M)
CoA4		4.2 \pm 0.5	1 \pm 0.2	2.5 \pm 7	0.43 \pm 0.004
30b		8.3 \pm 0.7	11.3 \pm 0.2	6.6 \pm 0.8	7.2 \pm 0.3
30c		12.5 \pm 0.8	9.15 \pm 0.05	80 \pm 15	22.7 \pm 0.5
30d		2.2 \pm 0.4	4.75 \pm 0.02	2.0 \pm 0.9	4.49 \pm 0.02
40a		7.5 \pm 0.7	3.2 \pm 0.6	5.0 \pm 0.8	26 \pm 3
40b		12 \pm 2	32 \pm 5	89 \pm 2	25 \pm 6

41a		>100	57 ± 3	55 ± 10	>100
41b		54 ± 9	45 ± 4	62 ± 8	>100
41c		35 ± 2	53 ± 2	66 ± 4	76 ± 7
42a		8.4 ± 0.3	32 ± 10	6.6 ± 0.8	>100
42b		8.5 ± 0.6	6 ± 2	80 ± 15	54 ± 3
42c		15 ± 3	2.5 ± 0.2	2.0 ± 0.9	5.1 ± 0.2

^aLos valores de IC₅₀ se acompañan del error derivado de tres experimentos independientes.

La toxicidad de estos derivados se ha evaluado sobre la línea celular HEK-293.

Tabla 2.29.- Índices de selectividad para cada una de las líneas celulares evaluadas

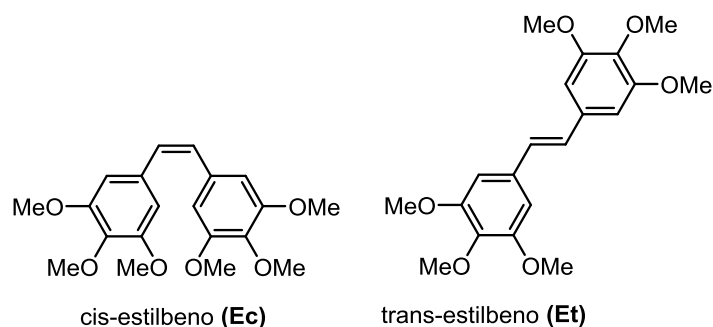
Compuesto	IC ₅₀ HEK-293 (μM)	CSa	CSb	CSc	CSd
30b	14 ± 2	1.7	1.2	2.1	1.9
30c	52 ± 9	4.2	5.7	0.6	2.3
30d	5.6 ± 0.3	2.5	1.2	2.8	1.2
40a	6.4 ± 0.2	0.8	2	1.3	0.2
40b	11 ± 2	0.9	0.3	0.1	0.4
41a	45 ± 2	0.4	0.8	0.8	0.4
41b	92 ± 7	1.7	2	1.5	0.9
41c	32 ± 5	0.9	0.6	0.5	0.4
42a	6.4 ± 0.5	0.8	0.2	1	0.06

42b	4.2 ± 0.3	0.5	0.7	0.05	0.08
42c	11 ± 2	0.7	4.4	5.5	2.1
CoA4	25 ± 3	5.9	25	10	58

CS = Coeficiente de selectividad. CSa = IC₅₀ (HEK-293) / IC₅₀ (HT-29); CSb = IC₅₀ (HEK-293) / IC₅₀ (MCF-7); CS_c = IC₅₀ (HEK-293) / IC₅₀ (HeLa); CS_d = IC₅₀ (HEK-293) / IC₅₀ (A-549).

En vista de los resultados, se observa inicialmente que los derivados preparados no alcanzan el valor de citotoxicidad que muestra el propio producto natural (**CA-4**), aunque exhiben buenos valores de actividad situados en el rango indicado (μM). Este no es un hecho demasiado extraño dado que se ha modificado el patrón de sustitución no simétrico de la molécula, lo que podría influir significativamente en los valores de actividad observados.

En base a esto, se decidió evaluar también la actividad citotóxica de dos derivados de estilbeno, el *cis*- y el *trans*- bis(3,4,5-trimetoxifenil)eteno, con el objetivo de comparar los valores de IC₅₀ obtenidos con los de los derivados anteriores, que presentan un ciclo adicional en la parte central de la molécula.



Compuesto	IC ₅₀ HT-29 (μM)	IC ₅₀ MCF-7 (μM)	IC ₅₀ HeLa (μM)	IC ₅₀ A-549 (μM)	IC ₅₀ HEK-293 (μM)
Ec	8.0 ± 0.9	2.2 ± 0.2	1.82 ± 0,04	5.6 ± 0.5	2.4 ± 0.3
Et	>100	>100	>100	21,5 ± 0,8	>100

Figura 2.44.- Estructura y valores de citotoxicidad para los derivados de estilbeno ensayados.

Mientras que el derivado *trans* es prácticamente inactivo para las líneas celulares evaluadas, el derivado *cis* muestra cierto grado de actividad, situado en el rango de los análogos propuestos. Este hecho pone de manifiesto la necesidad de disponer de un doble enlace *Z* que interconecte ambos anillos. Por otra parte, los resultados anteriores muestran además que la presencia del átomo puente no da lugar a un aumento marcado de los valores de citotoxicidad.

Se observa de manera general una mayor actividad para los compuestos que presentan un átomo de Sn en su estructura. Destacar en este caso los compuestos **30d** y **42c** como los más representativos dentro de esta familia. Otro tipo de relación estructura-actividad indica que los derivados metoxilados muestran valores de actividad similares, independientemente del tipo de funcionalización que presentan. No obstante, los sustratos fluorados **41(a-c)** exhiben unos valores de actividad considerablemente inferiores al resto de análogos de la serie.

La mayoría de derivados sintetizados muestran altos índices de toxicidad para la línea celular no cancerosa (HEK-293). No obstante, es posible destacar los compuestos **30c** y **42c**, que exhiben una marcada selectividad hacia las células tumorales, mostrando una ventana terapéutica aceptable para ejercer su acción farmacológica. Además de estos, el sustrato **30d** que exhibe una apreciable potencia, también podría resultar un buen candidato para posteriores estudios.

Tabla 2.30.- Coeficientes de selectividad obtenidos para los derivados ensayados.

Compuesto	IC ₅₀ HEK-293 (μ M)	CSa	CSb	CSc	CSd
30c	52 \pm 9	4.2	5.7	0.6	2.3
30d	5.6 \pm 0.3	2.5	1.2	2.8	1.2
42c	11 \pm 2	0.7	4.4	5.5	2.1

CS = Coeficiente de selectividad. CSa = IC₅₀ (HEK-293) / IC₅₀ (HT-29); CSb = IC₅₀ (HEK-293) / IC₅₀ (MCF-7); CSc = IC₅₀ (HEK-293) / IC₅₀ (HeLa); CSd = IC₅₀ (HEK-293) / IC₅₀ (A-549).

Adicionalmente, también se evaluaron los compuestos intermedios **28(b-e)**, **37(a-c)**, **38(a-c)** y **39(a-c)**, previos a la reacción de metátesis intramolecular. Pese a no presentar el doble enlace Z característico, mostraron de manera general valores de actividad situados en el rango μ M, similares a los observados para compuestos finales planteados. No obstante, al comparar cada uno de ellos con su análogo tricíclico, se observó una ligera disminución de la actividad y una mayor toxicidad que los compuestos finales pretendidos.

El hecho de que estos derivados intermedios muestren actividad, podría indicar quizá que el acoplamiento de los fragmentos aromáticos a través del átomo puente (Si, Ge, Sn), orienta directamente a los anillos bencénicos en una disposición favorable para que se produzca la interacción que manifiesta su citotoxicidad, sin necesidad de disponer del doble enlace olefínico Z. No obstante, sería necesario llevar a cabo estudios más detallados para confirmar esta hipótesis.

7.3.2.- ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ANTIMITÓTICA

El análisis de estos derivados se completó con el estudio de su capacidad antimitótica mediante ensayos de ciclo celular, que permiten estimar el porcentaje de células que se encuentran en las distintas fases del mismo. Estos ensayos se llevaron a cabo en células A549 mediante citometría de flujo.

Tabla 2.31- Porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo celular.

Compuesto	Fase SubG0	Fase G0	Fase G1/S	Fase G2/M
B	5	69	12	13
Colquicina	5	45	13	37
Estilbeno cis (Ec)	15	72	8	4
Estilbeno trans (Et)	32	39	14	14
30b	2	88	6	4
30c	2	89	6	3
30d	10	80	7	3
40a	5	80	9	6
40b	13	71	7	8
41a	3	65	12	19
41b	19	72	4	5
41c	7	80	6	7
42a	9	65	9	16
42b	12	47	12	30
42c	11	66	7	15

Como en el caso anterior, también se evaluaron los compuestos intermedios previos a la reacción de metátesis intramolecular **28(b-e)**, **37(a-c)**, **38(a-c)** y **39(a-c)**. La mayoría no muestran valores de actividad antimitótica considerable, sin embargo es posible destacar los que se derivan del anillo de benzo[1,3]dioxol, **39(a-c)**. Junto a estos, se incluye el carbamato **11g** con el objeto de comparar con los valores obtenidos (Tabla 2.32).

Tabla 2.32- Porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo celular.

Compuesto	Fase SubG0	Fase G0	Fase G1/S	Fase G2/M
B	5	69	12	13
Colquicina	5	45	13	37
39a	5	24	10	61
39b	5	23	11	60
39c	2	20	12	65
11g	6	23	13	58

En vista de los resultados, la mayoría de compuestos finales (Tabla 2.31) no exhiben gran actividad antimitótica, no observándose acumulación celular en la fase G2/M. De entre los sustratos anteriores cabe destacar únicamente el derivado **42b**, que muestra cierta acumulación de células en esta fase (30%).

Curiosamente, los compuestos intermedios **39a-c** son los que presentan una mayor actividad (Tabla 2.32), mostrando un porcentaje de células detenidas en la etapa G2/M más elevado que en el caso de los derivados tricíclicos (61%, 60% y 65% respectivamente). Sin embargo, no se observa una tendencia clara capaz de explicar este fenómeno, ya que el resto de compuestos intermedios (**28(b-e)**, **37(a-c)**, **38(a-c)**), no muestra actividad antimitótica apreciable.

Los derivados **39a-c** muestran un valor de actividad similar al del carbamato de colquicina **11g**, que presenta también una elevada acumulación celular en la etapa G2/M (58%). Este hecho unido a los buenos resultados biológicos observados para la serie de uretanos, respalda un posterior estudio más exhaustivo de esta familia que inicialmente ha mostrado poseer un gran potencial antitumoral.

Por último, el elevado porcentaje de células en la etapa subG0 para el estilbeno *trans* (**Et-** 32%) podría indicar un elevado número de células en estado de apoptosis o necrosis con menor contenido de ADN.

8.- CONCLUSIONES

8.- CONCLUSIONES

A continuación se expondrán las conclusiones del estudio realizado en el presente capítulo acerca de **compuestos antitumorales derivados de productos naturales**.

1.- Se han diseñado y sintetizado eficientemente dos familias de compuestos derivados de colquicina, empleando anilinas y fenoles con diferente funcionalización. Se han desarrollado varias metodologías de síntesis para llevar a cabo este objetivo. Todos los compuestos preparados fueron sometidos a evaluación biológica con el objetivo de determinar su acción antitumoral.

2.- La serie de análogos ureicos muestra de manera general una elevada citotoxicidad en diferentes líneas celulares cancerígenas, que se sitúa en el rango nM, mejorando incluso los valores de la propia colquicina. Se observa una mayor actividad para aquellos derivados que presentan grupos electrón atrayentes en el anillo de fenilo, en comparación con los que muestran grupos de naturaleza electrón dadora. Además, se ha observado una considerable acción antiangiogénica e inhibidora de la actividad de la telomerasa, actuando no sólo sobre la expresión de los genes que regulan estos procesos (VEGF, *h*-TERT, c-MYC), sino también sobre la expresión de ciertas proteínas implicadas directamente en ellos (VEGFR2 y c-MYC). Los mejores resultados se ven reflejados de manera particular en los compuestos **6i** (*o*-Cl, *p*-F), **6j** (*o*-Cl, *p*-Me), **6k** (*o*-Cl) y **6n** (*o*-diF).

Por otra parte, algunos derivados también muestran cierta capacidad de inhibir la proliferación celular, paralizando el ciclo en la etapa de mitosis. Destacar en este caso los compuestos **6b** (*p*-OMe), **6i** (*o*-Cl, *p*-F), y **6k** (*o*-Cl), con valores de acumulación de células en la etapa G2/M similares a los de la propia colquicina.

3.- La serie de ureas evaluadas presenta un alto grado de toxicidad para la línea celular no cancerosa (HEK-293), lo que limita en cierta medida su aplicabilidad. No obstante, es posible destacar alguno de ellos que exhibe un coeficiente de selectividad elevado hacia células tumorales, permitiendo una ventana terapéutica (actividad/toxicidad) aceptable: **6h** (*o*-Me, *p*-F), **6j** (*o*-Cl, *p*-Me), **6m** (*o*-diCl, *p*-F), **6n** (*o*-diF).

4.- Se ha evaluado la familia de uretanos preparada mostrando buenos parámetros de citotoxicidad, que se sitúan en el rango nM. Aunque esta serie presenta unos valores de actividad ligeramente inferiores a los de la familia de ureas anterior, varios de estos derivados exhiben una ventana terapéutica más amplia (actividad/toxicidad) para ejercer su acción farmacológica. Cabe destacar especialmente los compuestos **11c** (*m*-Me, *p*-Cl), **11e** (2,3-diCl) y **11k** (2,4-diMe), que muestran un coeficiente de selectividad elevado hacia las células tumorales, no resultado inicialmente nocivos para las células no cancerosas (HEK-293).

5.- La serie de carbamatos estudiada presenta además cierta actividad sobre la inhibición de las proteínas VEGFR2 y c-Myc, así como una elevada capacidad antimetabólica, que se pone de manifiesto en el derivado **11g**. Estos buenos resultados respaldan un posterior desarrollo de esta familia tratando de modular los valores de actividad observados.

6.- Se ha diseñado y sintetizado una nueva familia de derivados tricíclicos simétricos de CA-4, empleando como reactivos de acoplamiento elementos del grupo 14 (Si, Ge, Sn). No fue posible obtener los correspondientes análogos carbonados debido probablemente a diversos factores de tipo estérico.

7.- Se han evaluado tanto los compuestos finales preparados como los precursores olefínicos previos a la reacción de metátesis intramolecular. Ambos tipos de estructuras muestran valores de actividad similares y en el mismo rango que el producto natural empleado como modelo (CA-4 (μM)), aunque los sustratos intermedios exhiben levemente una menor actividad y una mayor toxicidad que sus análogos tricíclicos.

8.- La presencia del anillo central en los análogos tricíclicos les confiere a las moléculas una mayor estabilidad y rigidez, evitando el problema de isomerización (Z/E) del doble enlace olefínico en el producto natural. Se espera que estos sustratos puedan mejorar la biodisponibilidad y las propiedades farmacológicas de la CA-4.

9.- Dentro de esta serie de análogos, los que exhiben una mayor actividad antitumoral son los derivados que presentan un átomo de Sn en su estructura (**30d**, **42c**), independientemente de la funcionalización del anillo aromático. En relación a esto, los derivados que presentan átomos de F en el anillo **41(a-c)**, muestran una considerable reducción en los valores de actividad observados con respecto a los análogos metoxilados.

10.- La mayoría de sustratos evaluados muestran una baja actividad antimetabólica en los ensayos de ciclo celular. Sin embargo, es posible destacar además del compuesto tricíclico **42b**, los derivados intermedios (previos a la reacción de metátesis intramolecular) que se derivan del anillo de benzo[1,3]dioxol (**39a-c**). Estos compuestos presentan una elevada acumulación de células en la fase G2/M (61%, 60% y 65%).

CAPÍTULO III

CAPÍTULO III: DISEÑO, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE NUEVOS PEPTIDOMIMÉTICOS ACTIVOS

1.- INTRODUCCIÓN

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.-AMINOÁCIDOS, PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS

Las **proteínas** son constituyentes esenciales de los organismos vivos y presentan diversas funciones vitales tanto estructurales, como de transporte, defensa y catálisis. Además, están implicadas en procesos de regulación metabólica.

Las proteínas están formadas por varias unidades de péptidos, que al igual que éstas, desempeñan un papel fundamental para el correcto funcionamiento del organismo. **Los péptidos** actúan como agentes vasoactivos regulando la presión arterial y presentan gran relevancia como hormonas, neurotransmisores y antioxidantes.²⁷³ Los péptidos están constituidos por **aminoácidos** (20 α -L aa_s naturales) que interaccionan entre sí mediante un enlace tipo amida entre el grupo *N*-terminal de un aminoácido y el grupo carboxilo de otro. Estos enlaces se denominan peptídicos, e implican la pérdida de una molécula de H₂O y la formación de un nuevo enlace covalente.

Los péptidos, al igual que las proteínas, presentan diversos niveles de estructura que condicionan tanto sus propiedades químicas como sus funciones internas.

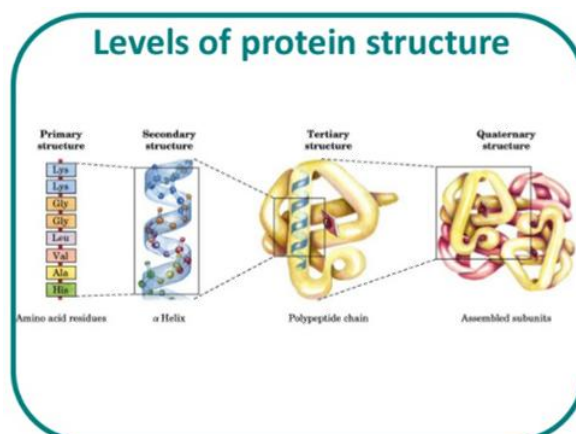


Figura 3.1.- Niveles de estructura para péptidos y proteínas.

En las últimas décadas, los nuevos avances en biología molecular y en biotecnología han facilitado el desarrollo de nuevas aplicaciones farmacológicas en los péptidos naturales.²⁷⁴ Su uso en la actualidad está en continuo desarrollo,²⁷⁵ sin embargo presenta algunas limitaciones consecuencia de su baja estabilidad metabólica, su escasa absorción oral y su falta de especificidad. Esta falta de especificidad se debe a que los péptidos pueden adoptar multitud de conformaciones diferentes,

²⁷³ McKee, T.; McKee, J. *Amino acids, peptides and proteins. Biochemistry: The molecular basis of life*. 5ª Ed. Oxford University Press, Nueva York, **2009**.

²⁷⁴ a) Giannis, A.; Kolter, T. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1244-1267. b) Craik, D. J.; Fairlie, D. P.; Liras, S.; Price, D. *Chem. Biol. Drug. Des.* **2013**, *81*, 136-147. c) Uhlig, T.; Kyprianou, T.; Martinelli, F. G.; Oppici, C. A.; Heiligers, D.; Hills, D.; Calvo, X. R.; Verhaert, P. *EuPa Open Proteomics* **2014**, *4*, 58-69.

²⁷⁵ Fosgerau, K.; Hoffmann, T. *Drug Discovery Today* **2015**, *20*, 122-128.

interaccionando con varios receptores específicos y provocando un efecto biológico no deseado.

Además de importantes agentes terapéuticos, se han descubierto recientemente nuevas aplicaciones de los péptidos en sistemas de transporte y liberación controlada de fármacos (*drug delivery systems*),²⁷⁶ que permiten administrar los mismos con una mayor especificidad y una menor degradación en el interior del organismo.

1.2.- PEPTIDOMIMÉTICOS

Desde la década de los 90 se han llevado a cabo grandes esfuerzos encaminados al desarrollo de nuevos compuestos bioactivos, que mejoren las propiedades biológicas de los péptidos y al mismo tiempo traten de evitar los problemas farmacocinéticos derivados del uso de los mismos.^{274,277} En este sentido, se han introducido modificaciones estructurales de diversa índole con el objetivo de obtener análogos peptídicos conocidos como **peptidomiméticos**. El término péptidomimético hace referencia a un producto no natural que, aunque no presenta necesariamente una estructura peptídica, es capaz de mimetizar la función de un ligando o de un receptor, inhibiendo o simulando el efecto biológico de un determinado péptido.²⁷⁸

En comparación con los péptidos naturales, los peptidomiméticos suelen poseer una mayor estabilidad metabólica, una mejor biodisponibilidad y una mayor selectividad frente a determinadas enfermedades.²⁷⁹ Además, como ventaja adicional su síntesis suele ser más simple que para un péptido natural.²⁸⁰

1.2.1.- ESTRATEGIAS PARA EL DISEÑO DE NUEVOS PEPTIDOMIMÉTICOS

Son varias las estrategias seguidas para el diseño de nuevas estructuras capaces de mimetizar la acción de un péptido. Principalmente se han empleado tres tipos de metodologías basadas en:

- a) Modificación química, mediante síntesis orgánica, de la estructura de un péptido activo.
- b) *Screening* de productos naturales biológicamente activos y optimización de sus estructuras para adecuarlas a su receptor específico.
- c) Síntesis *de novo*.

²⁷⁶ Cruz, M.; Tusell, L. M.; Grillo-Bosch, D.; Albericio, F.; Serratos, J.; Rabanal, F.; Giral, E. *J. Pept. Res.* **2004**, *63*, 324-328.

²⁷⁷ a) Kessler, H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1982**, *21*, 512-513. b) Gante, J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 1699-1720.

²⁷⁸ Fletcher, M. D.; Campbell, M. M. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 763-795.

²⁷⁹ a) Olson, G. L. et al. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 3039-3049. b) Wiley, R. A.; Rich, D. H. *Med. Res. Rev.* **1993**, *13*, 327-384.

²⁸⁰ Kazmierski, W. M. *Methods in Molecular Medicine. Peptidomimetic protocols*, Humana Press, Totowa, Nueva Jersey, **1999**.

En lo que se refiere a la primera aproximación, es imprescindible conocer las propiedades conformacionales y electrónicas tanto del péptido, como del centro activo del enzima con el que interacciona. Además, es importante disponer de información sobre la estructura tridimensional del complejo péptido-receptor y de los procesos que desencadena su acoplamiento. Para llevar a cabo esta estrategia, uno de los métodos empleados habitualmente es la sustitución de ciertos aminoácidos de la cadena peptídica por otros ya funcionalizados.²⁸¹ Transformaciones más arriesgadas conllevan la modificación del esqueleto central de la molécula,²⁸² o la introducción de grupos funcionales voluminosos con el fin de restringir la conformación del péptido.²⁸³

Por otra parte, la segunda metodología ha permitido descubrir una gran cantidad de moléculas, cuyas estructuras se han optimizado con el fin de aumentar su afinidad y su selectividad por el receptor, al mismo tiempo que tratan de mejorar sus propiedades farmacológicas. Un ejemplo de peptidomimético obtenido mediante esta alternativa serían los alcaloides de tipo opioide, como la morfina. Por último, la síntesis *de novo* no emplea un compuesto *hit* de partida y se basa en la utilización de técnicas de análisis conformacional y modelado molecular, para el diseño de nuevas estructuras focalizadas en la unión con el centro activo de la enzima.

A continuación se muestran algunos ejemplos de compuestos bioactivos, capaces de mimetizar la acción de ciertos péptidos.

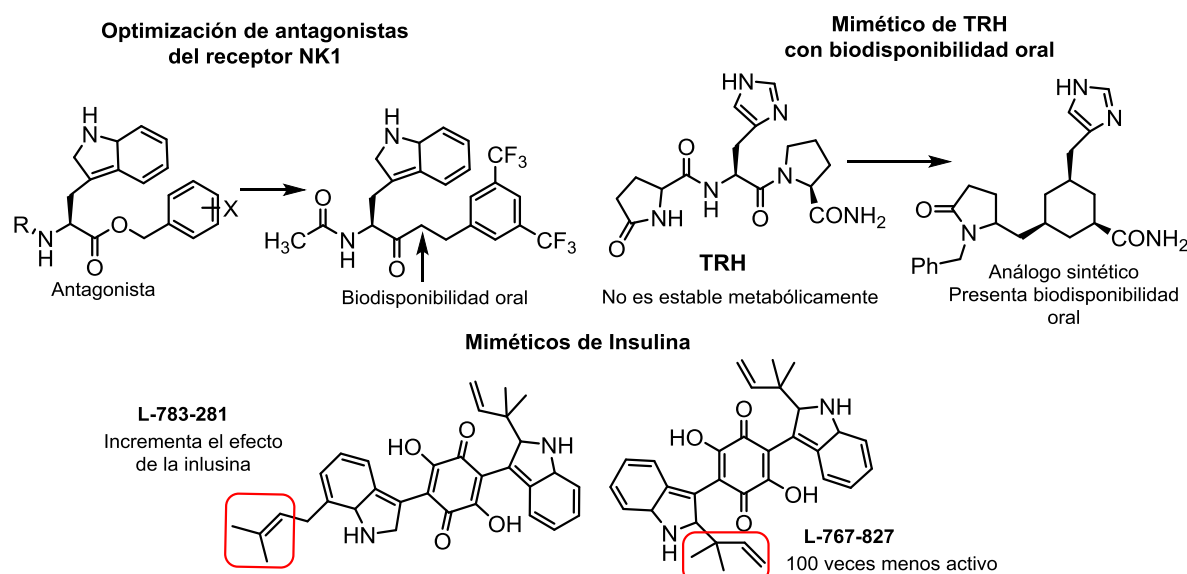


Figura 3.2.- Ejemplos de compuestos peptidomiméticos con actividad farmacológica.²⁸⁴

²⁸¹ a) Clark, T. D. et al. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 651-656. b) Seebach, D.; Kimmerlin, T.; Sebesta, R.; Campo, M. A.; Beck, A. K. *Tetrahedron* **2004**, 60, 7455-7506. c) Fustero, S.; Pina, B.; Salavert, E.; Navarro, A.; Ramirez de Arellano, M. C.; Simon Fuentes, A. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 4667-4679.

²⁸² Gante, J.; Krug, M.; Lauterbach, G.; Weitzel, R.; Hiller, W. *J. Pept. Sci.* **1995**, 2, 201-206. b) Simon, R. J. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1992**, 89, 9367-9371.

²⁸³ a) Cativiela, C. C.; Diaz de Villegas, M. D.; Avenoza, A.; Peregrina, J. M. *Tetrahedron* **1993**, 49, 10987-10996. b) Souers, A. J.; Ellman, J. A. *Tetrahedron* **2001**, 57, 7431-7448.

²⁸⁴ a) Zhang, B. et al. *Science* **1999**, 284, 974-977. b) Olson, G. L. et al. *J. Med. Chem.* **1993**, 36, 3039-3049.

1.3.- EL SÍNDROME DE GOODPASTURE

El síndrome de *Goodpasture* es una enfermedad autoinmune, exclusivamente humana, que se caracteriza por una glomerulonefritis rápidamente progresiva y hemorragia pulmonar.²⁸⁵ El dominio NC1 de la cadena $\alpha 3$ del colágeno IV [$\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$] es la diana biológica que interviene en esta enfermedad (Figura 3.3), mostrando alteraciones en su conformación que son reconocidas por los anticuerpos.²⁸⁶

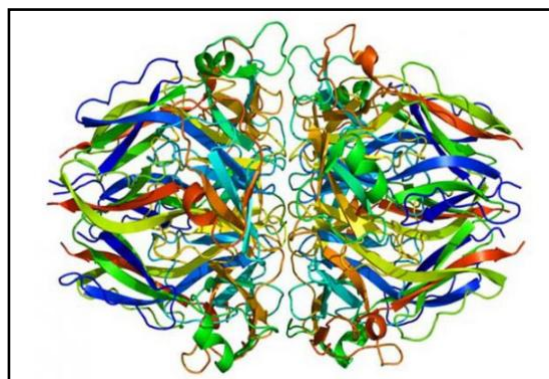


Figura 3.3.- Estructura tridimensional de la red colágeno tipo IV.

Esto sugiere que dicha alteración en la estructura terciaria de la proteína produce una respuesta inmunitaria frente a especies aberrantes, que es la responsable de causar esta patología.

El dominio $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ presenta una región *N*-terminal altamente divergente y fosforilable (KRGDSGSPATWTT),^{287,288} que se purifica a partir de fuentes naturales como un conjunto de confórmeros que muestran un contenido desigual en fosfoserina.²⁸⁹ El confórmero mayoritario (el que presenta la conformación nativa) es el menos fosforilado, mientras que los menos abundantes muestran un alto grado de fosforilación. Estudios preliminares acerca del mecanismo de estas transiciones conformacionales revelan que se produce una reorganización parcial de los puentes disulfuro presentes y que están implicadas diversas proteínas enzimáticas como las chaperonas moleculares y las peptidil *cis-trans* propil isomerasas.²⁹⁰ Así pues, un incremento en la fosforilación de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ con sus consiguientes reorganizaciones moleculares, podría desencadenar una respuesta autoinmune provocada por el reconocimiento de confórmeros no habituales.

²⁸⁵ Saus, J. *Goodpasture's syndrome*. *Enciclopedia of Immunology*, 2º Ed. Academic Press Ltd. Londres, **1998**, Vol. 2, 1005-1011.

²⁸⁶ Saus, J. *Goodpasture antigen binding protein*. U. Pat. Appl. Ser. PTC/IB00/00324. **2000**. Publicación nº WO00/50607.

²⁸⁷ Quinones, S.; Bernal, D.; Garcia-Sogo, M.; Saus, J. *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 19780-19784.

²⁸⁸ Revert, F.; Penadés, J. R.; Plana, M.; Bernal, D.; Johansson, C.; Itarte, E.; Cervera, J.; Wieslander, J.; Quinones, S.; Saus, J. *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 13254-13261.

²⁸⁹ Saus, J. *Methods and reagents for treating autoimmune disorders*. U. Pat. Appl. Ser. PTC/EP02/01010. **2002**. Publicación nº WO 2002061430 A2.

²⁹⁰ Calvete, J.; Revert, J.; Blanco, M.; Cervera, J.; Tárrega, C.; Sanz, L.; Revert-Ros, F.; Granero, F.; Pérez-Payá, E.; Hudson, B. G.; Saus, J. *Proteomics* **2006**, 6, S237-S244.

1.3.1.- PROTEÍNA DE UNIÓN AL ANTÍGENO DE GOODPASTURE (GPBP)

Con el propósito de identificar proteínas que interaccionen con la región divergente *N*-terminal del antígeno *Goodpasture* humano, se utilizaron de forma combinada un péptido sintético de 21 residuos que representa esta región y anticuerpos monoclonales. Mediante esta estrategia se llevó a cabo el clonado molecular de una proteína que se une específicamente tanto al péptido sintético como al antígeno y que se ha denominado GPBP (*Goodpasture-antigen binding protein*).²⁹¹

GPBP es una proteína de 624 aminoácidos que fosforila y cataliza la agregación supramolecular del colágeno IV *in vitro*, pudiendo estar también implicada en su autoensamblaje *in vivo*. Durante estos procesos, las moléculas de colágeno IV sufren cambios drásticos en su estructura terciaria generando múltiples isómeros conformacionales, lo que indica que GPBP cataliza dicha agregación supramolecular a través de un proceso que implica reacciones de isomerización conformacional.

GPBP es una proteína única desde un punto de vista estructural y no han podido ser identificados genes que codifiquen proteínas semejantes en el genoma humano. Las homologías estructurales con otras especies moleculares se limitan a dominios individuales, lo que sugiere que se trata de una nueva enzima con capacidad para transferir fosfatos y catalizar la agregación supramolecular de proteínas sustrato.

1.4.- AMILOIDOSIS Y SU RELACIÓN CON GPBP

Existen una gran cantidad de enfermedades degenerativas que están estrechamente relacionadas con la presencia de depósitos proteínicos homogéneos que provocan una gran toxicidad celular.²⁹² La naturaleza del polipéptido principal presente en estos depósitos varía dependiendo del tejido y de la enfermedad, pero todos ellos comparten gran similitud estructural.

Estos agregados se encuentran preferentemente en una disposición de lámina beta plegada, lo que facilita la formación de un elevado número de puentes de hidrógeno intracatenarios que estabilizan la fibra, impidiendo su degradación.²⁹³ Esta organización supramolecular recibe el nombre de amiloide y las enfermedades asociadas a ella, amiloidosis. En relación a lo anterior, el polipéptido agregable en una disposición lámina beta será el confórmero insoluble, mientras que la forma fisiológica no agregable será el confórmero soluble.

Inicialmente, cualquier proteína puede degenerar y formar agregados amiloides si se dan las condiciones ambientales necesarias. No obstante, en el organismo humano sólo un número limitado de polipéptidos es capaz de llevar a cabo dicha transformación, como resultado en todos los casos, de una alteración homeostática.

²⁹¹ Raya, A.; Revert, F.; Navarro, S.; Saus, J. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 12642-12649.

²⁹² Bucciantini, M.; Giannoni, E.; Chiti, F.; Baroni, F.; Formigli, L.; Taddei, N.; Ramponi, G.; Donson, C. M.; Stefani, M. *Nature* **2002**, *416*, 507-511.

²⁹³ Dobson, C. M. *Trends Biochem. Sci.* **1999**, *24*, 329-332.

En conexión con lo anterior, las bajas condiciones de pH características de la vía endosómica-lisosomal han sido la causa de formación de materia amiloide en varias enfermedades degenerativas tales como el Alzheimer, diabetes de tipo II o el Parkinson. Existen evidencias experimentales que sugieren que GPBP está localizada en la vía endosómica-lisosomal y que presenta un papel activo y relevante en el mecanismo de transición conformacional (confórmero soluble - confórmero insoluble) que provoca la aparición de estos agregados amiloides causantes de dichas patologías.

En concreto, la enfermedad del Alzheimer es un desorden progresivo neurodegenerativo, caracterizado por la formación de depósitos amiloides sobre el sistema nervioso central. La proteína que forma estos agregados está compuesta por dos polipéptidos $\beta 42$ y $\beta 40$, que se unen para formar estos depósitos.²⁹⁴ Estudios del mecanismo de acción de estos agregados ponen de manifiesto que GPBP interacciona con el polipéptido $\beta 42$, inhibiendo su capacidad de fosforilación.

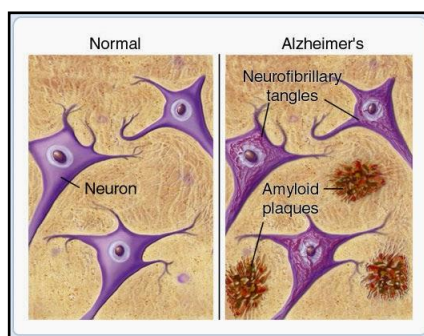


Figura 3.4.- Formación de depósitos amiloides que conducen a la aparición del Alzheimer.

1.5.- OTRAS ENFERMEDADES EN LAS QUE INTERVIENE GPBP: CANCER

Además de las patologías amiloides mencionadas, se ha investigado posteriormente la implicación GPBP en la aparición y desarrollo de diversos tipos de tumores. Se conoce que GPBP regula la organización de la red de colágeno IV que estabiliza el fenotipo tumoral mesenquimal, causante a su vez de la metástasis de células tumorales y de la resistencia mostrada por estas células a los fármacos disponibles en el mercado.

Más concretamente, la red de colágeno IV estabiliza las células tumorales que sufren una transición epitelio-mesenquimal (EMT), lo que provoca un cambio en el fenotipo de estas células, transformándolas en quimiorresistentes, migratorias e invasivas. Dicha transición (EMT) produce la pérdida de las uniones intercelulares, la reorganización del citoesqueleto y es fundamental para la aparición de cáncer metastásico. En relación a esto, si es posible inhibir la transición epitelio-mesenquimal (EMT) actuando a través de GPBP, sería posible desestabilizar las células mesenquimales patogénicas formadas, causando la muerte celular o la reversión del fenotipo maligno, lo que se traduciría en un gran avance en la lucha contra el cáncer.

²⁹⁴ Kirkitadze, M. D.; Bitan, G.; Teplow, D. B. *J. Neurosci. Res.* **2002**, 69, 567-577.

1.6.- INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD QUINASA DE GPBP

La fosforilación de aminoácidos específicos próximos a la superficie de una proteína es un mecanismo universal de activación proteico que supone el inicio de un determinado proceso fisiológico a través de una cascada de señalización.²⁹⁵

En relación a esto, la forma activa de GPBP es oligomérica, es decir que se autoensambla para mostrar actividad. Experimentos biológicos llevados a cabo por el equipo de investigación del Dr. Juan Saus han puesto de manifiesto que la secuencia ⁽²⁶⁰⁾Ser-His-Cys-Ile-Glu⁽²⁶⁴⁾ es esencial para el reconocimiento proteína-proteína y está implicada directamente en su oligomerización. Como objeto de este estudio se sintetizó un péptido *N*-acetilado y *C*-amidado que contenía dicha secuencia, conocida como preQ2, observándose que ambos estereoisómeros (L-D)-(Ac-SCHIE-NH₂) eran capaces de inhibir la actividad quinasa de GPBP, por interferencia con las interacciones proteína-proteína que promueven la formación del oligómero activo.

Tratando de aumentar la actividad inhibitora de estos sustratos se sintetizaron nuevos péptidos que incorporasen a la secuencia preQ2, 4 aminoácidos de la secuencia de GPBP en el extremo *N*-terminal y 5 aminoácidos en el extremo *C*-terminal. Estos nuevos péptidos Q2 (Ac-⁽²⁵⁶⁾LATLSHCIELMVKR⁽²⁶⁹⁾-NH₂) demostraron poseer una mayor actividad inhibitora de la acción quinasa de GPBP *in vitro*, en comparación con los análogos preQ2. Además, estudios de dicroísmo circular indican que el estereoisómero L del péptido Q2 tiene una elevada tendencia a adoptar una configuración α -hélice, por lo que es posible admitir como hipótesis inicial, que la unión de Q2 (y preQ2) a GPBP requerirá una disposición α -hélice del sustrato.

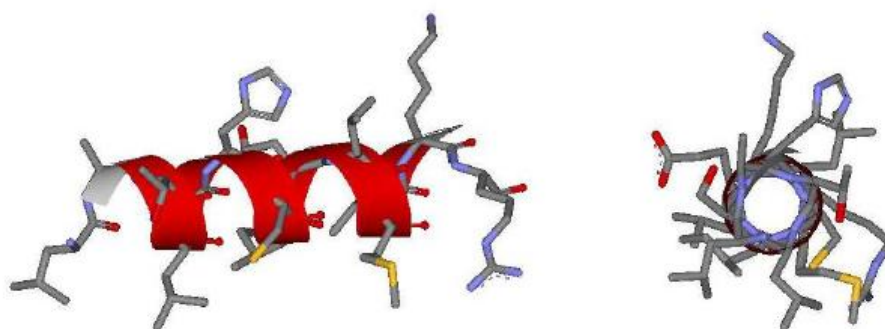


Figura. 3.5.- Representación esquemática de Q2 en conformación de α -hélice.²⁹⁶

El diseño de nuevas estructuras sintéticas, capaces de mimetizar grandes regiones de la superficie de una proteína constituye en un gran reto para la comunidad científica. Debido a ello, han sido numerosos los avances científicos en este campo

²⁹⁵ Graves, J. D.; Krebs, E. G. *Pharmacol. Ther.* **1999**, *82*, 111-121. b) Cohen, P. *Trends Biochem. Sci.* **2000**, *25*, 596-601.

²⁹⁶ Blasco, R.; *Diseny, síntesi i avaluació biològica de nous peptidomimètics*. Tesis, Universidad de Valencia, Valencia, Septiembre, **2009**.

durante las últimas décadas,²⁹⁷ existiendo todavía importantes desafíos por alcanzar para este tipo de terapia basada en la acción farmacológica de péptidos biactivos.

Para el desarrollo de este trabajo, nuestro grupo de investigación ha establecido una colaboración con la empresa biotecnológica Fibrostatin S.L. la cual, basándose en la estructura y función de GPBP, trata de desarrollar nuevas terapias avanzadas para el tratamiento del cáncer de pulmón quimiorresistente, así como para la fibrosis pulmonar idiopática. La evaluación biológica de los productos sintetizados se llevará a cabo bajo la supervisión del Dr. Juan Saus en dicha compañía, localizada en el parque científico de la universidad de Valencia, en Burjassot (España).

²⁹⁷ a) Smith, A. B.; Knight, S. D.; Sprengeler, P. A.; Hirschmann, R. *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 1021-1034. b) Andrews, M. J. I.; Tabor, A. B. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 11711-11743. c) Hamman, J. H.; Enslin, G. M.; Kotzé, A. F. *BioDrugs* **2005**, *19*, 165-177. d) Qvit, N. et al. *Drug Discovery Today* **2016**, *20*, 1-9.

2.- OBJETIVOS GENERALES

2.- OBJETIVOS GENERALES

1.- Selección de un compuesto de partida adecuado y con buenas propiedades farmacológicas capaz de mimetizar la secuencia del péptido Q2.

2.- Síntesis de una librería de compuestos miméticos de α -hélice, siguiendo las premisas establecidas para la elección del *hit* (Apartado 3).

3.- Evaluación biológica de los derivados preparados con el objetivo de determinar su potencial actividad como agentes antitumorales.

3.- ELECCIÓN DEL HIT

3.- TRABAJO PREVIO: ELECCIÓN DEL HIT

Para la elección del sustrato de partida sobre el que desarrollar el proyecto se tuvieron en cuenta los principios teóricos descritos con anterioridad. Por un lado, fue preciso seleccionar una estructura capaz de **mimetizar una secuencia de α -hélice**, puesto que como se ha introducido previamente, la unión del péptido a GPBP requiere una disposición α -hélice del sustrato.

En conexión con lo anterior, existen en la literatura numerosos ejemplos de estructuras sintéticas capaces de interactuar con un dominio proteico concreto. Muchas de ellas exhiben distancias de enlace y relaciones angulares similares a las que se encontrarían en una configuración de α -hélice.²⁹⁸ El primero en publicar sus investigaciones en este campo fue Willems.²⁹⁹ En sus trabajos mostraba como los grupos funcionales en los indanos 1,6-disustituídos estaban situados de manera que mimetizaban a los residuos i , $i+1$ de una cadena de α -hélice.

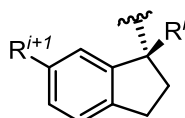


Figura 3.6.- Representación de un indano 1,6-disustituído.

Posteriormente, el grupo de Hamilton puso de manifiesto nuevas estructuras cuya funcionalización en posiciones concretas estaba orientada de manera que podía simular los residuos de aminoácidos i , $i+3$ o $i+4$, $i+7$, de una misma cara de una α -hélice. Inicialmente describieron una estructura terfenílica³⁰⁰ no peptídica, donde los sustituyentes en las posiciones 3, 2', 2'' de los anillos de fenilo, podían mimetizar los residuos de aminoácidos antes mencionados.³⁰¹

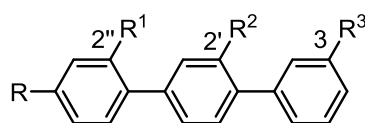


Figura 3.7- Estructura de un terfenilo cuya funcionalización representa una hélice α .

²⁹⁸ a) Fletcher, S.; Hamilton, A. D. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 632-638. b) Yin, H.; Hamilton, A. D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4130-4163.

²⁹⁹ a) Horwell, D. C.; Howson, W.; Nolan, W. P.; Ratcliffe, G. S.; Rees, D. C.; Willems, H. M. G. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 203-216. b) Horwell, D. C.; Howson, W.; Ratcliffe, G. S.; Willems, H. M. G. *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 33-42.

³⁰⁰ Orner, B. P.; Ernst, J. T.; Hamilton, A. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5382-5383.

³⁰¹ Cada vuelta de una α -hélice contiene 3.6 aa_s, por lo que dos vueltas contienen aproximadamente 7 aa_s. Según el modelo de Hamilton, los sustituyentes situados en los extremos mimetizan perfectamente los aminoácidos i , $i+7$, pero el sustituyente del anillo central mimetizaría el residuo $i+3.6$. Como esta posición es ambigua y no corresponde a un aminoácido bien definido, podrá corresponder tanto al aminoácido $i+3$ como al $i+4$.

Varios de estos terfenilos fueron empleados como inhibidores de la acción de quinasas,³⁰⁰ como agentes anti VIH³⁰² y como inhibidores de la proteína antiapoptótica Bcl-x_L.³⁰³

Más tarde, el mismo grupo de investigación propuso varios diseños alternativos que también mimetizaban el esqueleto de α -hélice mencionado. Estos nuevos diseños estaban basados en las estructuras de una oligoamida³⁰⁴ y una tereftalamida,³⁰⁵ que debido a interacciones por puente de hidrógeno y a la rotación restringida de los enlaces amídicos, mantenían la misma geometría plana que los derivados terfenílicos.

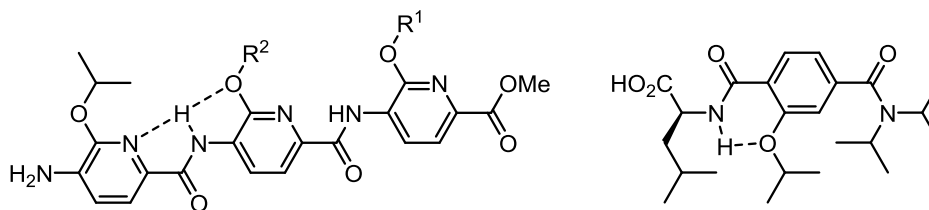


Figura 3.8.- Estructura de una oligoamida y una tereftalamida.

Otros tipos de estructuras que llamaron particularmente nuestra atención fueron los derivados de difenilaminona³⁰⁶ y de benzoilurea,³⁰⁷ que también mantenían una estrecha similitud estructural con los derivados terfenílicos primogénitos.

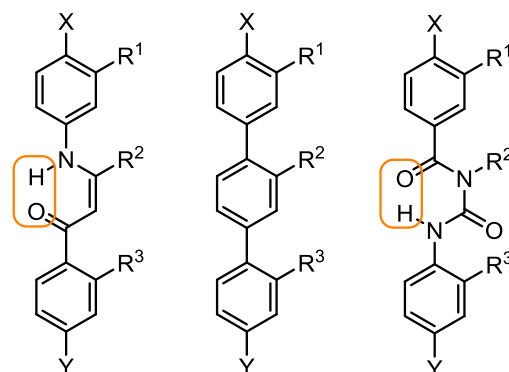


Figura 3.9.- Estructura general de una difenilaminona, un terfenilo y una benzoilurea.

Los enlaces por puente de hidrógeno intramoleculares que se establecen entre el oxígeno carbonílico y el grupo amino aportan rigidez a la molécula, favoreciendo la conformación lineal de estos derivados. Además, los derivados de benzoilurea también han demostrado su efectividad como peptidomiméticos en la interacción con Bak/Bcl-x_L.

³⁰² Ernst, J. T.; Kutzki, O.; Debnath, A. K.; Jiang, S.; Lu, H.; Hamilton, A. D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 278-281

³⁰³ Kutzi, O.; Park, S. H.; Ernst, J. T.; Orner, B. P.; Yin, H.; Hamilton, A. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11838-11839.

³⁰⁴ Ernst, J. T.; Becerril, J.; Park, H. S.; Yin, H.; Hamilton, A. D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 535-539.

³⁰⁵ a) Yin, H.; Hamilton, A. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 1375-1379. b) Yin, H.; Lee, G. I.; Sedey, K. A.; Rodriguez, J. M.; Wang, H. G.; Sebt, S. M.; Hamilton, A. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5463-5468.

³⁰⁶ Rodriguez, J. M.; Hamilton, A. D. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 7443-7446.

³⁰⁷ Rodriguez, J. M.; Hamilton, A. D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 8614-8617.

Aparte de éstas, existen otro gran número de estructuras diversas capaces de mimetizar la distribución de aminoácidos de una α -hélice, como son las propuestas por Antuch,³⁰⁸ Ahn,³⁰⁹ Rebek³¹⁰ y Jacoby.³¹¹ La mayoría siguen una disposición similar al diseño terfenílico de Hamilton, pero también se han desarrollado otras moléculas que no mantienen esta relación estructural, como son los éteres policíclicos de Hirama³¹² o los aminoácidos α,α -disustituídos, descritos por Verdine.³¹³

Inicialmente se llevó a cabo un estudio exhaustivo de las diferentes estructuras planteadas, analizando tanto sus propiedades farmacológicas como su proceso sintético. En base a estos criterios y a la experiencia previa del grupo de investigación en la síntesis de este tipo de moléculas, se seleccionó inicialmente la estructura de **benzoilurea** (Figura 3.9) como punto de partida para la preparación de una pequeña familia de peptidomiméticos bioactivos, capaces de interactuar con GPBP.

En conexión con lo anterior y habiendo seleccionado la estructura base sobre la que desarrollar el proyecto, se hizo servir dicho modelo para tratar de **mimetizar la secuencia del péptido Q2** descrita anteriormente. En relación a esto, ya había una sólida investigación previa acerca de la secuencia de aminoácidos que reportaba mejores valores de actividad, puesto que la empresa Fibrostatin S.L. ya había desarrollado un gran número de análogos terfenílicos tratando de mimetizar el péptido correspondiente.³¹⁴

De las múltiples combinaciones de aminoácidos estudiadas, hubo una que reportaba mejores valores de actividad antitumoral que el resto de compuestos de la serie, aunque estrictamente no correspondía con la secuencia establecida por el péptido Q2. Esta secuencia está representada en la molécula de **T12**, un terfenilo cuya funcionalización simula los aminoácidos Ala-Ala-Glu para los residuos i , $i+3$ o $i+4$, $i+7$ de una cadena de α -hélice.³¹⁵ En base a estas investigaciones y puesto que se había demostrado que la presencia del ácido glutámico era esencial para facilitar la interacción con GPBP, se decidió proceder a la preparación de una pequeña quimioteca de compuestos con estructura de benzoilurea, siguiendo la secuencia de aminoácidos ya establecida.

³⁰⁸ Antuch, W. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 1740-1743.

³⁰⁹ Ahn, J. M.; Han, S. Y. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 3543-3547.

³¹⁰ Volonterio, A.; Moisan, L.; Rebek, J. *Org. Lett.* **2007**, 9, 3733-3736.

³¹¹ Jacoby, E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, 12, 891-893.

³¹² Oguri, H.; Oomura, A.; Tanabe, S.; Hirama, M. *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 2179-2183.

³¹³ Walesky, L. D.; Jung, A. L.; Escher, I.; Malia, T. J.; Barbuto, S.; Wright, R. D.; Wegner, G.; Verdine, G. L.; Korsmeyer, S. J. *Science* **2004**, 305, 1466-1470.

³¹⁴ Saus, J.; Fustero, S.; Sanz-Cervera, J. F.; Perez-Paya, E.; Blasco, R.; Revert-Ros, F.; Revert, F. *Preparation of aromatic compounds as Q2 peptidomimetics for inhibition of GPBP*. U. S. Pat. 20110105545, **2011**.

³¹⁵ Saus, J.; Revert, F.; Artigot, A.; Revert-Ros, F.; Lopez-Pascual, E.; Blasco, R.; Roda, N.; Sanz-Cervera, J. F.; Gozalbo-Rovira, R. *Methods for inhibiting mesenchymal phenotype after epithelial-to-mesenchymal transition*. U. S. Pat. Appl. Publ. 20160184274A120160630, **2016**.

Se espera que estos sustratos sean capaces de mantener los buenos valores de actividad del compuesto de partida así como de mejorar las propiedades farmacológicas, en concreto la baja solubilidad, del correspondiente terfenilo. A continuación se muestra la estructura del compuesto patrón seleccionado en base al análogo terfenílico (**T12**).

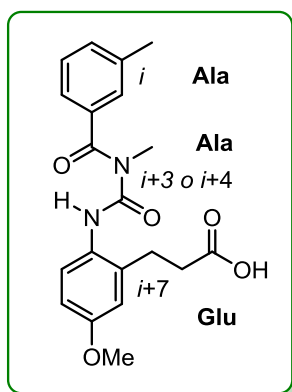


Figura 3.10.- Estructura del compuesto patrón seleccionado con estructura de benzoilurea.

4.-DISEÑO Y SÍNTESIS DE PEPTIDOMIMÉTICOS CON ESQUELETO DE BENZOILUREA.

4.- DISEÑO Y SÍNTESIS DE PEPTIDOMIMÉTICOS CON ESQUELETO DE BENZOILUREA

4.1.- INTRODUCCIÓN

El fragmento *N*-benzoilurea es un grupo funcional que presenta gran relevancia principalmente en los campos de la agroquímica³¹⁶ y de la química médica.³⁰⁷

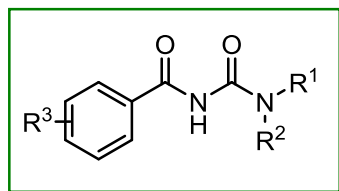


Figura 3.11.- Esqueleto general de una benzoilurea.

Por un lado, la introducción de los derivados de benzoilurea como insecticidas tiene un origen accidental. Este tipo de compuestos fueron desarrollados en 1970 por Philips-Duphar durante la síntesis de análogos de diversos tipos de herbicidas.³¹⁷ Los productos obtenidos resultaron no poseer la actividad herbicida esperada, sin embargo sí que mostraban una elevada toxicidad para ciertas clases de insectos.³¹⁸ La actividad insecticida de las benzoilureas se detectó en insectos inmaduros y estaba limitada exclusivamente a la etapa de muda. Estudios acerca de su modo de acción revelaron que éste consistía en la inhibición de la biosíntesis de la quitina, lo que conducía a la muerte del insecto que había ingerido el compuesto.

Desde el descubrimiento de su modo de acción, que posibilitó el desarrollo del diflubenzurón, se han preparado gran cantidad de nuevas estructuras con un fragmento benzoilurea, las cuales exhiben buena actividad como agentes agroquímicos.

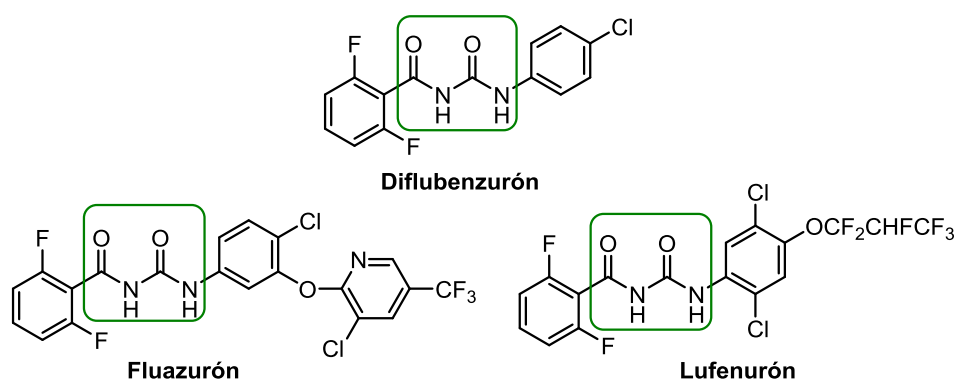


Figura 3.12.- Derivados de benzoilurea que actúan como insecticidas.

³¹⁶ Roberts, T. R.; Hutson, D. H. *Metabolic Pathways of agrochemicals. Part 2: Insecticides and Fungicides*, The Royal Society of Chemistry. Thomas Graham House, Cambridge, **1999**, 795-797.

³¹⁷ Van Daalen, J. J.; Meltzer, J.; Mulder, R.; Wellinga, K. *Naturwissenschaften*, **1972**, 59, 312-313.

³¹⁸ Verloop, A.; Ferrel, C. D. *Pesticide Chemistry in the 20th Century*. Plummer, J. R. ACS Symposium Series, **1977**, 37, 237-270.

Por otro lado, ya se ha mencionado la gran repercusión que ha tenido el desarrollo de benzoilureas en química médica durante las últimas décadas. Principalmente han destacado como potentes agentes antitumorales, inhibiendo la acción de ciertos receptores específicos implicados en este proceso.³¹⁹

Como se ha comentado en el apartado anterior (apartado 3), ciertas moléculas derivadas de benzoilurea son capaces de mimetizar los residuos de aminoácidos i , $i+3$ o $i+4$, $i+7$ de una misma cara de una α -hélice. Además son susceptibles alargar su cadena, mimetizando grandes estructuras proteicas con un elevado grado de organización. Exhiben una estructura rígida, análoga a la de los terfenilos, a través de la formación de un puente de hidrógeno intramolecular que genera un anillo de 6 miembros capaz de actuar como un anillo aromático.³²⁰ Experimentos de rayos X demostraron la evidencia de este puente de hidrógeno que se establece entre el grupo NH de la urea y el átomo de oxígeno del grupo carbonilo.

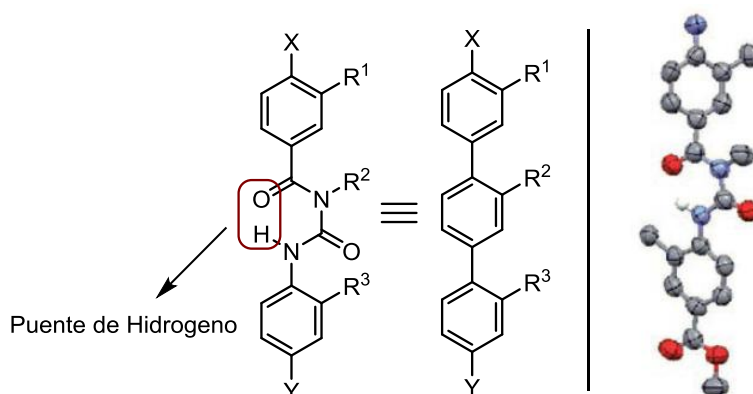


Figura 3.13.- Comparación entre las estructuras de un terfenilo y una benzoilurea. Rayos X del esqueleto de benzoilurea.

En base a estas características, se han llevado a cabo numerosos estudios de actividad sobre derivados de benzoilurea, tratando de imitar secuencias peptídicas concretas que interaccionen con receptores específicos en el interior del organismo.

Por último, este tipo de estructura es relativamente estable en medio ácido, mientras que muestra una rápida descomposición en pH alcalino.

³¹⁹ a) Song, D. Q. et al. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 3094–3103. b) Brady, R. M. et al. *J. Med. Chem.* **2014**, 57, 1323–1343.

³²⁰ Rodriguez, J.; Ross, N. T.; Katt, W. P.; Dhar, D.; Lee, G.; Hamilton, A. D. *Chem. Med. Chem.* **2009**, 4, 649-656.

4.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Los objetivos a desarrollar en el presente capítulo, una vez seleccionado el sustrato de partida apropiado, fueron los siguientes.

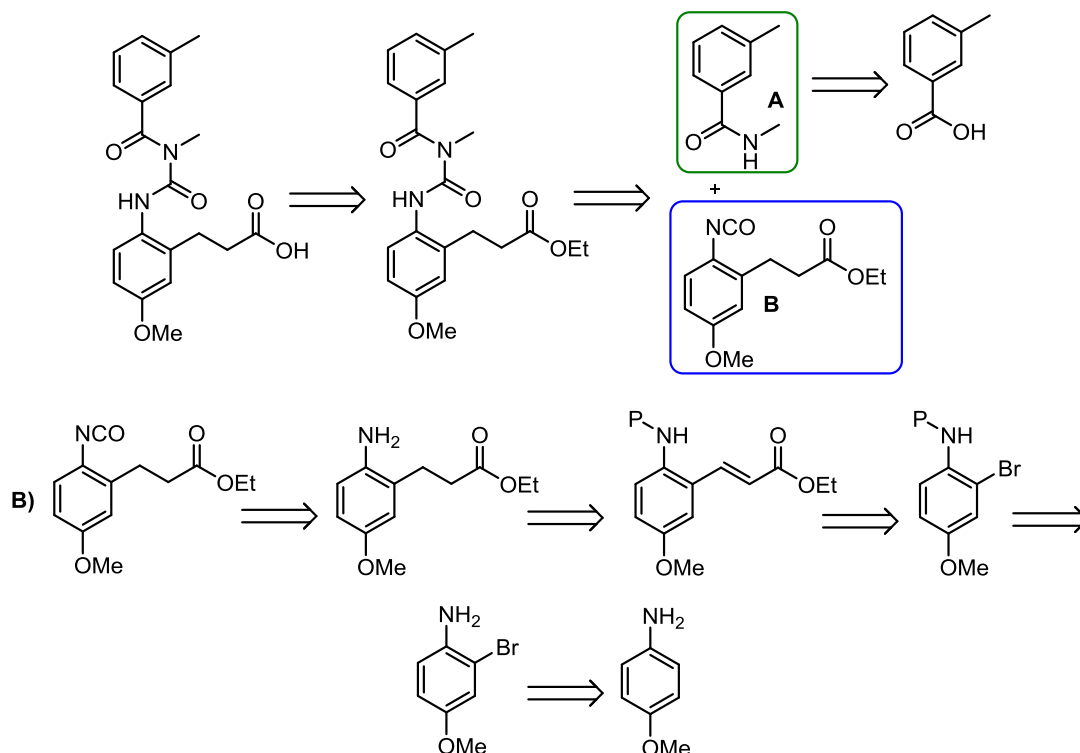
1.- Diseño y síntesis del compuesto patrón, con estructura de benzoilurea, capaz de mimetizar la secuencia peptídica descrita: Ala-Ala-Glu (Figura 3.10).

2.- Preparación de una quimioteca de compuestos análogos al modelo, siguiendo las premisas establecidas.

3.- Evaluación biológica de los análogos preparados con el objetivo de determinar su potencial actividad como agentes antitumorales de segunda generación.

4.- Reevaluación y rediseño de las estructuras objetivo, en función de los resultados de las evaluaciones biológicas y de los estudios estructurales realizados.

En conexión con lo anterior, la síntesis de esta familia de compuestos sería posible abordarla inicialmente tal y como se muestra en el siguiente esquema.



Esquema 3.1.- Análisis retrosintético propuesto.

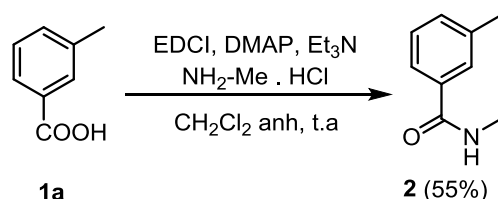
A la vista del esquema anterior, sería necesario funcionalizar en primer lugar cada uno de los sintones que componen la estructura del compuesto final. Por un lado, la preparación del fragmento A se llevaría a cabo mediante una reacción de amidación sobre el ácido benzoico derivado, empleando DMAP como catalizador.³⁰⁷

Por otro lado, la preparación del fragmento **B** implicaría una serie de transformaciones adicionales a partir de *p*-metoxianilina (*p*-anisidina), que permitirían obtener el correspondiente isocianato derivado, adecuadamente funcionalizado. En esta secuencia cabría destacar como etapas clave una reacción de acoplamiento de Heck catalizada por Pd³²¹ sobre el sustrato bromado,³²² previamente protegido y una posterior reacción de formación del isocianato correspondiente, empleando trifosgeno como reactivo.^{307,323}

Una vez obtenidos ambos sintones, se realizaría su acoplamiento intermolecular para obtener finalmente el esqueleto de benzoilurea propuesto. Por último se llevaría a cabo la hidrólisis en medio básico del grupo éster, obteniendo el correspondiente ácido propiónico.

4.3.- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

En conexión con lo mostrado en el esquema 3.1, fue preciso funcionalizar inicialmente los dos sustratos de partida para adecuar la sustitución a la secuencia peptídica propuesta. Por un lado, el compuesto A se preparó haciendo reaccionar ácido 3-metilbenzoico (**1a**), con metilamina y DMAP como catalizador. También se empleó EDCI para facilitar el acoplamiento, obteniéndose el compuesto esperado (**2**) con buen rendimiento.³⁰⁷



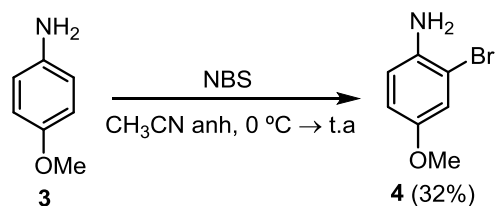
Esquema 3.2.- Reacción de amidación del ácido 3-metilbenzoico.

Por otro lado, la primera etapa para la obtención del fragmento B consistió en una bromación selectiva en posición *orto* respecto al grupo amino de la *p*-anisidina. Para ello se trató *p*-metoxianilina (**3**) con N-bromosuccinimida a 0 °C, empleando CH₃CN como disolvente.³²² Fue posible obtener el compuesto esperado (**4**) con un rendimiento moderado, debido a la formación de una gran cantidad de productos secundarios de polibromación (Esquema 3.3).

³²¹ Hayasi, S.; Ueno, N.; Murase, A.; Nakagawa, Y.; Takada, J. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *50*, 179-195.

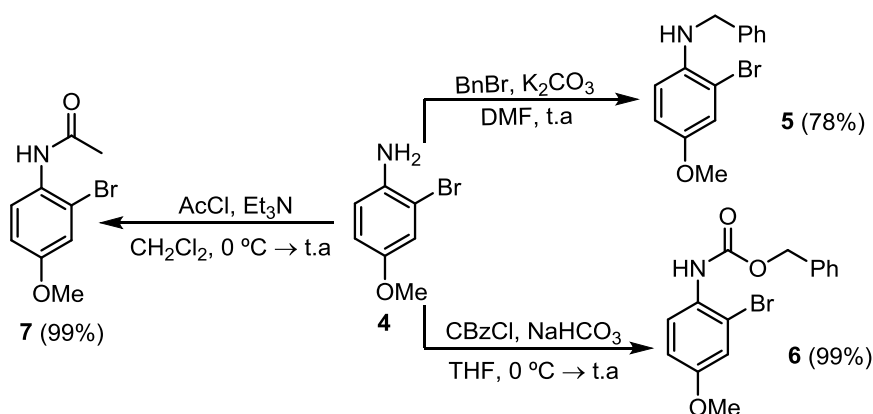
³²² a) Lv, J.; Liu, Q.; Tang, J.; Perdih, F.; Kranjc, K. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 5248-5252. b) Bagmanov, B. T. *Russ. J. Appl. Chem.* **2009**, *82*, 1570-1576.

³²³ a) Twitchett, H. J. *Chem. Soc. Rev.* **1974**, *3*, 209-230. b) Zhan, W. et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 4323-4329.



Esquema 3.3.- Reacción de bromación de *p*-metoxianilina.

Para poder llevar a cabo la reacción de Heck en una etapa posterior, fue necesario proteger previamente el grupo NH_2 del compuesto **4**. Esta reacción no tenía lugar en presencia del grupo amino libre debido a que éste interaccionaba con el catalizador de Pd, dificultando así la etapa de inserción oxidante e impidiendo su avance. Por este motivo se hizo reaccionar el compuesto **4** con diferentes grupos protectores, tratando de establecer cuál de ellos posibilitaba un mayor rendimiento para la reacción de acoplamiento posterior. Como agentes electrofílicos se emplearon bromuro de bencilo (BnBr),³²⁴ cloruro de benciloxycarbonilo (CBzCl),³²⁵ y cloruro de acetilo (AcCl).³²⁶ A continuación se muestran las condiciones seguidas para la síntesis de estos derivados.



Esquema 3.4.- Condiciones de reacción para la protección del grupo NH_2 .

Una vez obtenidos los sustratos esperados (**5-7**), se decidió llevar a cabo la reacción de Heck para introducir la cadena acrílica en posición 2 del anillo aromático. Entre los derivados anteriores se escogieron los compuestos **6** y **7** para ensayar dicha transformación, dada su mayor conversión y la presencia de una menor proporción de subproductos de reacción.

Reacción de acoplamiento de Heck

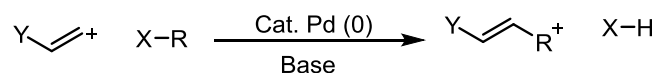
La reacción de Mizoroki-Heck se trata de una reacción de acoplamiento entre un halogenuro (triflato) insaturado y un alqueno diferentemente funcionalizado. Se lleva a cabo en presencia de una base y de un catalizador de paladio (Pd), permitiendo la formación de enlaces carbono-carbono de manera sencilla y eficaz.

³²⁴ Xue, D.; Long, Y-Q. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 4727-4734.

³²⁵ Wipf, P.; Maciejewski, J. P. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 4383-4386.

³²⁶ John, J. M.; Loorthuraja, R.; Antoniuk, E.; Bergens, S. H. *Catal. Sci. Technol.* **2015**, *5*, 1181-1186.

El haluro o triflato es un compuesto de arilo, alilo o vinilo, mientras que el alqueno empleado suele ser un compuesto deficiente en electrones que contiene al menos un átomo de hidrógeno. Como base suele emplearse Et₃N, K₂CO₃ o KOAc.



Esquema 3.5.- Mecanismo general de la reacción de Heck.

Fue descubierta a principios de los años 70 por Richard F. Heck³²⁷ y Tsutomu Mizoroki³²⁸ y desde entonces han sido muchos los avances y progresos en el desarrollo de esta reacción, que han permitido que actualmente sea considerada como uno de los métodos más potentes de síntesis en química orgánica.³²⁹ Richard Heck recibió el premio Nobel de Química en 2010, junto con Suzuki y Negishi, por el descubrimiento y desarrollo de reacciones de acoplamiento catalizadas por paladio.³³⁰

El ciclo catalítico por el que transcurren este tipo de acoplamientos se muestra en la Figura 3.14.

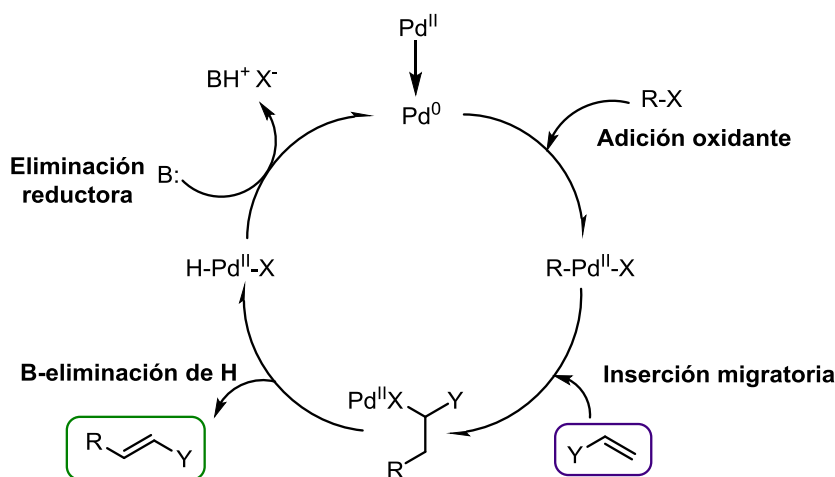


Figura 3.14.- Ciclo catalítico para la reacción de Heck.³³¹

El ciclo comienza con la etapa de adición oxidante, en la que se produce la inserción del átomo de paladio al enlace C-X, con la consiguiente oxidación de Pd⁰ a Pd^{II}. Se trata de un proceso concertado en el que se produce la ruptura del enlace C-X al tiempo que se forman los nuevos enlaces C-M-X. En la siguiente etapa del proceso, la olefina interacciona con el átomo de Pd^{II} a través de un complejo II y a continuación se inserta en el enlace entre el metal y el ligando existente R. Esta etapa transcurre con retención de la configuración.

³²⁷ Heck, R. F.; Nolley, Jr. J. P. *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 2320–2322.

³²⁸ Mizoroki, T.; Mori, K.; Ozaki, A. *Bull. Chem. Soc. Jap.* **1971**, *44*, 581.

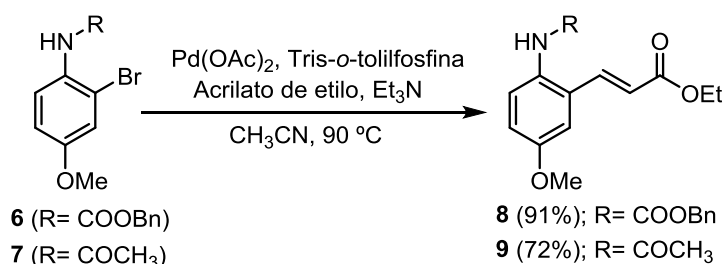
³²⁹ a) Heck, R. F. *Org. React.* **1982**, *27*, 345-390. b) Meijere, A.; Meyer, Jr. F. E. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 2379-2411. c) Beletskaya, I. P.; Cheprakov, A. V. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 3009-3066. d) Narayanan, R. *Molecules* **2010**, *15*, 2124-2138.

³³⁰ www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2010/. (Consultada Feb. **2017**)

³³¹ Cabri, W.; Candiani, I. *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 2-7.

La tercera etapa del ciclo catalítico involucra un mecanismo de β -eliminación de hidruro, que consiste en un proceso de desinserción con la consiguiente formación de un nuevo doble enlace carbono-carbono. La formación de este doble enlace tiene lugar de forma estereoselectiva, de manera que la eliminación en *syn* define la selectividad *E* (*trans*) de los productos de Heck. La última etapa del ciclo es la eliminación reductora, en la que se produce la regeneración del catalizador de Pd^0 con la consiguiente liberación de una molécula de HX, que tendrá que ser neutralizada por la base presente en el medio. Así pues, esta metodología permite introducir de manera sencilla un grupo arilo, alilo o vinilo, en un olefina activada, sin fragmentar el doble enlace y en condiciones de reacción relativamente suaves y compatibles con multitud de funciones orgánicas.

Con todo lo anterior, se planteó llevar a cabo la reacción de Heck a partir de los sustratos **6** y **7**, haciéndolos reaccionar con acrilato de etilo como reactivo y $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ como catalizador.³²¹ Como ligando se empleó tris-*o*-tolilfosfina puesto que reportaba mejores resultados según la literatura. No obstante, existen nuevos métodos de síntesis que permiten la introducción de la cadena acrílica en posición *orto* respecto al grupo amino, sin necesidad de disponer de un átomo de halógeno en esa posición.³³² Aún así, nuestra discusión se centrará exclusivamente en el uso de la reacción de Heck para llevar a cabo este tipo de acoplamiento (Esquema 3.6).



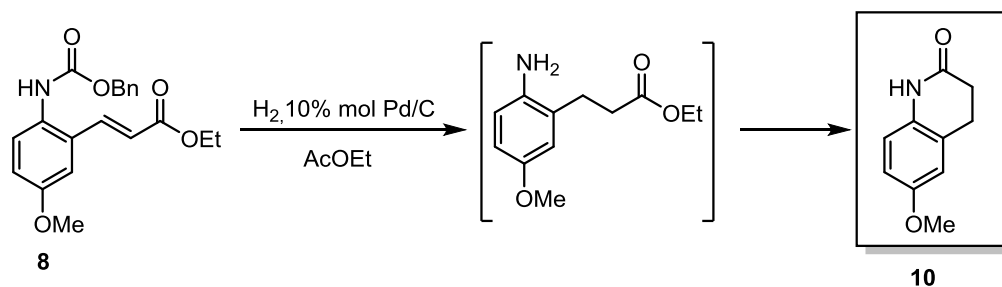
Esquema 3.6.- Condiciones iniciales seguidas para llevar a cabo la reacción de Heck.

Una vez obtenidos ambos sustratos se procedió a realizar la siguiente etapa de la síntesis, que involucraba tanto la reducción del doble enlace de la cadena acrílica como la desprotección del grupo amino. Con este objetivo se seleccionó el compuesto **8** para continuar la estrategia sintética, dada su mayor conversión y facilidad de desprotección con respecto al derivado **9**.

En conexión con lo mostrado, se trató de reducir el doble enlace olefínico y de desproteger el grupo amino simultáneamente. Para ello se llevó a cabo una hidrogenación catalítica en AcOEt sobre el derivado **8**, empleando Pd/C como catalizador (Esquema 3.7).³³³

³³² Lee, G. T.; Jiang, X.; Prasad, K.; Repic, O.; Blacklock, T. J. *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347*, 1921-1924.

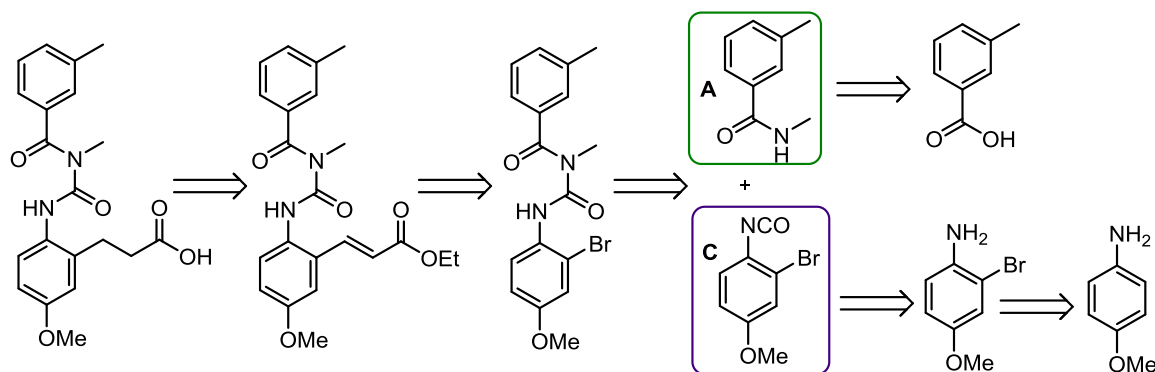
³³³ Maiti, A.; Reddy, P. V. N.; Sturdy, M.; Marler, L.; Pegan, S. D.; Mesecar, A. D.; Pezzuto, J. M.; Cushman, M. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 1873-1884.



Esquema 3.7.- Intento de reducción del doble enlace y desprotección del grupo amino empleando H₂.

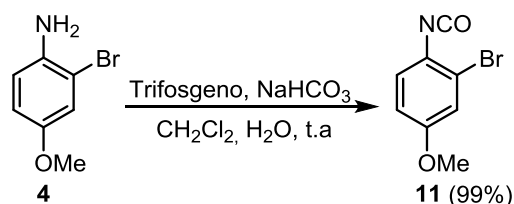
Los resultados revelaron que no se había logrado obtener el compuesto esperado. En su lugar se observó únicamente presencia de la correspondiente lactama **10** (Esquema 3.7), formada por reacción intramolecular entre el grupo amino y el grupo éster de la cadena alquílica. La formación de este subproducto impedía el desarrollo de la estrategia sintética planteada, ya que esta reacción de acoplamiento podría producirse de manera espontánea siempre que el grupo amino se encontrase desprotegido, dificultando su aplicabilidad.

A causa de este inconveniente, se decidió modificar el orden de la ruta sintética propuesta y llevar a cabo la reacción de Heck una vez ya estuviera formado el esqueleto de benzoilurea correspondiente. De esta manera se evitaría la formación del producto secundario **10** no deseado. En conexión con lo anterior, la nueva estrategia sintética se muestra en el esquema siguiente.



Esquema. 3.8.- Nuevo análisis retrosintético planteado.

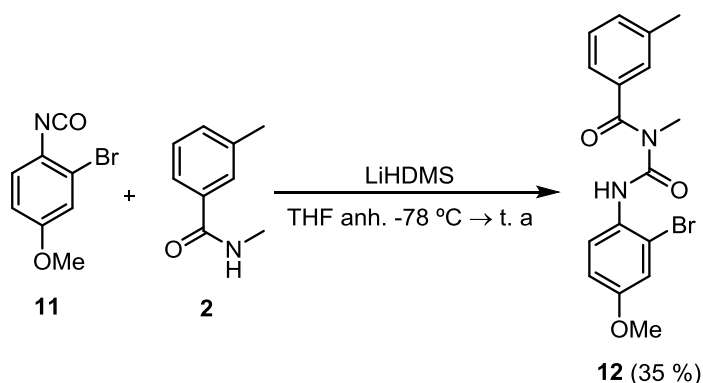
En relación a esta nueva metodología, para la preparación del fragmento C se hizo reaccionar el compuesto **4** con NaHCO₃ y trifosgeno, obteniéndose el isocianato esperado con un rendimiento prácticamente cuantitativo.³⁰⁷



Esquema. 3.9.- Preparación del isocianato correspondiente **11**.

Este tipo de sustratos presenta una gran inestabilidad en presencia de medio ácido, hidrolizándose totalmente en contacto con el gel de sílice. Además, presenta una elevada reactividad pudiendo interaccionar con otra molécula del compuesto **4**, generando la urea dimérica correspondiente.

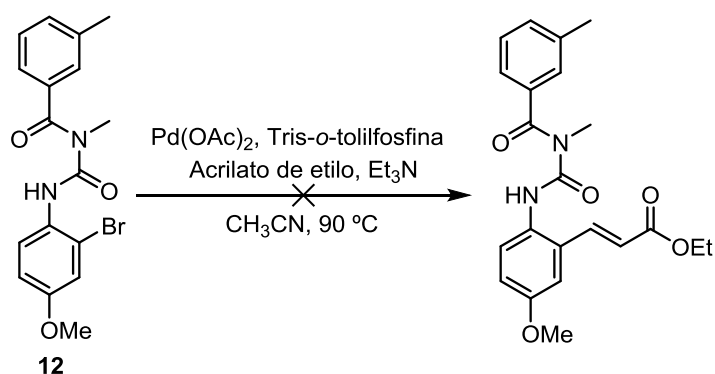
Debido a estos factores, se decidió trabajar con el crudo obtenido (**11**) sin purificación previa y hacerlo reaccionar a continuación con el compuesto **2**, empleando LiHDMS como base fuerte en THF anhidro.³⁰⁷



Esquema 3.10.- Preparación del esqueleto de benzoilurea.

Siguiendo esta metodología fue posible obtener el compuesto esperado (**12**), aunque con un rendimiento moderado. Esto se debió principalmente a la baja reactividad mostrada por la amida **2** y a la elevada formación de productos secundarios durante el transcurso de la reacción.

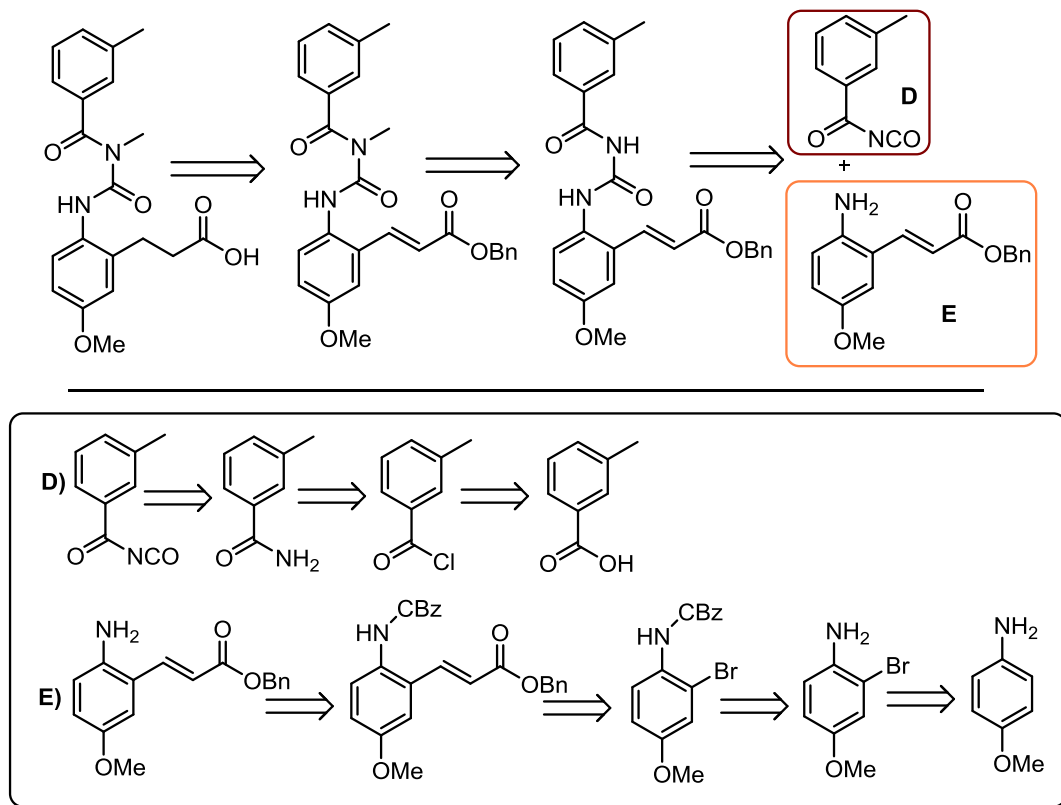
Una vez obtenido dicho compuesto se trató de llevar a cabo la reacción de Heck en las mismas condiciones descritas anteriormente,³²¹ con el objetivo de introducir la cadena de acrilato de etilo en la estructura de benzoilurea (Esquema 3.11).



Esquema 3.11.- Intento de reacción de Heck sobre la estructura de benzoilurea.

Los resultados observados revelaron que no se obtenía el compuesto esperado. El esqueleto de benzoilurea se fragmentaba en las condiciones de reacción propuestas, reportando de nuevo la correspondiente anilina **4** y la amida de partida **2**. Debido a ello se concluyó que esta metodología tampoco era adecuada para la preparación de esta familia de derivados.

En base a todos los inconvenientes surgidos, se decidió reestructurar la estrategia propuesta para adecuarla a los nuevos requerimientos sintéticos. El nuevo esquema retrosintético planteado se muestra a continuación (Esquema 3.12) y presenta claras diferencias en comparación con las metodologías seguidas anteriormente. La preparación de cada uno de los nuevos sintones (**D** y **E**) que componen la estructura del compuesto final, se muestra de manera independiente.



Esquema 3.12.- Nuevo esquema retrosintético planteado.

Esta nueva estrategia presenta varias modificaciones encaminadas a solventar los problemas de reactividad y estabilidad que presentaban las rutas sintéticas anteriores.

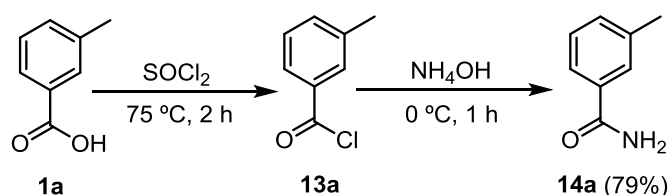
Por un lado, en vista de la baja reactividad mostrada por la amida anterior **2**, se decidió preparar en este caso en lugar del isocianato derivado, el acilisocianato correspondiente, el cual reaccionaría con el grupo amino libre del otro sintón, para llevar a cabo la formación del esqueleto de benzoilurea con una mayor conversión y en condiciones más suaves. En relación a esto, dada la mayor complejidad estructural del fragmento **E** y la inestabilidad mostrada por este tipo de derivados, se decidió llevar a cabo la preparación del acilisocianato a partir del fragmento **D**, estructuralmente más sencillo (Esquema 3.12).

Por otro lado, en lo que se refiere a la desprotección del grupo amino para la obtención del compuesto **E**, se decidió llevar a cabo una desprotección quimioselectiva en presencia del doble enlace, tratando de evitar la formación espontánea de la lactama **10** descrita anteriormente.

En este sentido, se pensó que la presencia del doble enlace (*E*) podría aportar rigidez a la molécula, impidiendo que se produjera la reacción de ciclación. Además, también se propuso un método de desprotección en medio ácido que permitiría obtener la correspondiente anilina en forma de sal de trifluoroacetato, dificultando así mismo la interacción con el grupo éster.

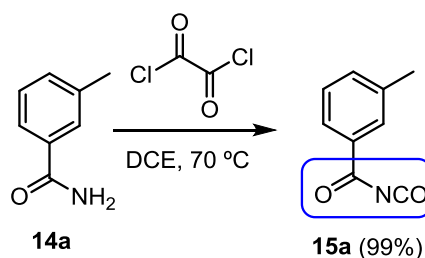
Por último se decidió modificar el reactivo empleado en la reacción de Heck. En lugar de acrilato de etilo se utilizó acrilato de bencilo, cuyo tratamiento de desprotección requeriría condiciones menos severas que no afectarían al esqueleto de benzoilurea. Además, la última etapa del proceso incluiría tanto la reducción del doble enlace como la desprotección del grupo éster (Esquema 3.12).

Con todo lo anterior, se procedió inicialmente a la síntesis del nuevo fragmento D. Para ello se llevó a cabo en primer lugar la preparación de la formamida correspondiente (**14a**) derivada del ácido 3-metilbenzoico, que se generó a partir del correspondiente cloruro de ácido (**13a**), al reaccionar con amoníaco acuoso a baja temperatura.³³⁴



Esquema. 3.13.- Preparación de la formamida derivada del ácido 3-metilbenzoico.

Este sustrato (**14a**) se trató posteriormente con cloruro de oxalilo a reflujo, empleando DCE como disolvente.³³⁵ Siguiendo este procedimiento fue posible aislar el correspondiente acilisocianato (**15a**) que debido a su gran inestabilidad, se almacenó bajo atmósfera inerte y sin tratamiento adicional hasta su uso posterior (Esquema 3.14).

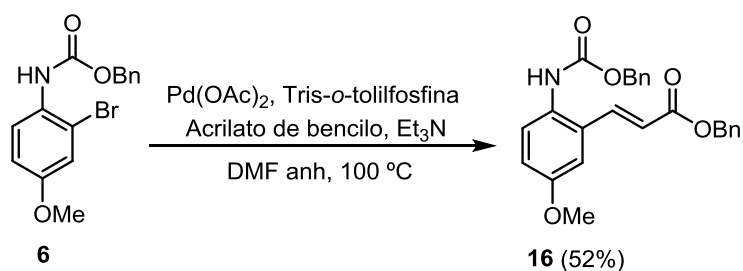


Esquema 3.14.- Formación del acil isocianato **15a** (D)

³³⁴ Wang, L.; Dai, F.; Zhu, J.; Dong, K.; Wang, Y.; Chen, T. *J. Chem. Res.* **2011**, 35, 313-316.

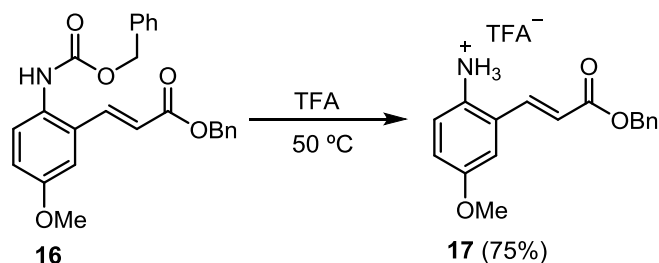
³³⁵ a) Song, X-J. et al. *Chin. J. Org. Chem.* **2005**, 25, 1587-1590. b) Nuridzhanyan, K. A. *Russ. Chem. Rev.* **1970**, 39, 130-139.

Seguidamente se procedió a la preparación del compuesto E, cuya estrategia sintética era similar a la planteada para la primera aproximación descrita (Esquema 3.1). Una vez aislado el compuesto **6** que presentaba el grupo amino ya protegido, se hizo reaccionar mediante un acoplamiento de Heck con acrilato de bencilo, siguiendo las pautas expuestas con anterioridad. Se llevó a cabo un estudio de disolvente y temperatura que permitió obtener el compuesto de acoplamiento esperado con un rendimiento aceptable.



Esquema 3.15.- Reacción de Heck empleando acrilato de bencilo.

La síntesis se completó con una desprotección quimioselectiva del grupo amino en el compuesto **16**, sin afectar a la presencia del doble enlace conjugado. Para ello se llevó a cabo una desprotección en medio ácido a 50 °C, empleando TFA como reactivo y disolvente de la reacción.³³⁶ De esta forma se obtuvo el compuesto esperado (**17**) como sal derivada de trifluoroacetato, que no interaccionaba con el grupo éster, evitando así la formación de la lactama cíclica (**10**) no deseada (Esquema 3.16).

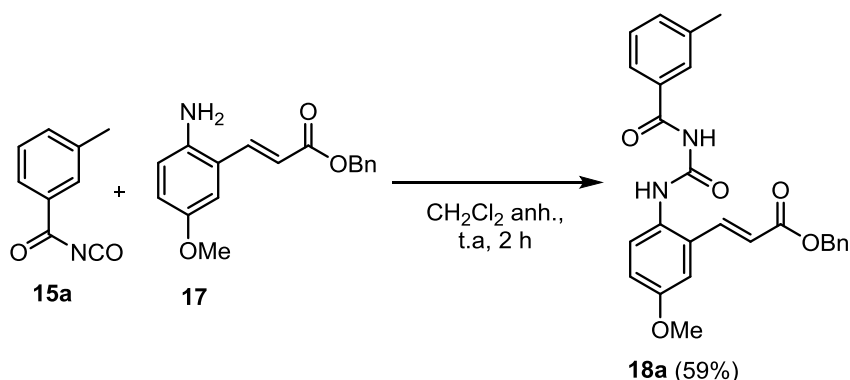


Esquema 3.16.- Desprotección quimioselectiva del grupo CBz empleando TFA (E).

Un posterior tratamiento básico del compuesto **17** para disponer del grupo NH₂ libre, puso de manifiesto que seguía sin producirse la reacción de ciclación mencionada. Este hecho apoya la hipótesis anterior acerca de que la presencia del doble enlace conjugado era suficiente para mantener cierta rigidez en la cadena acrílica y evitar que se produjera este tipo de transformación.

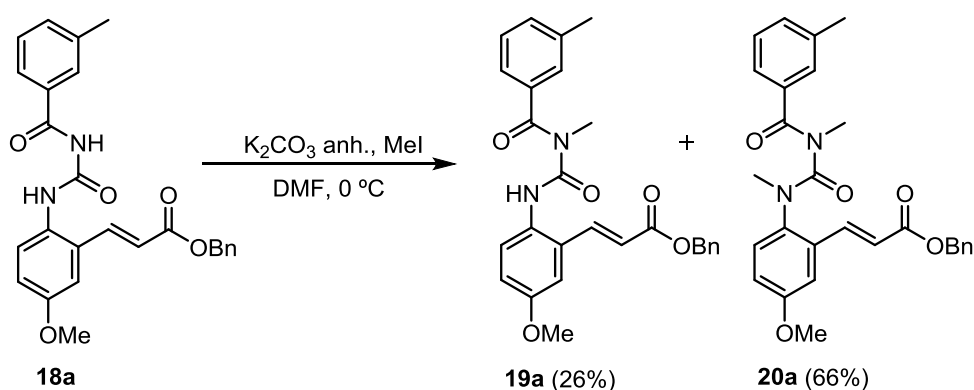
³³⁶ a) Gong, Y-D.; Seo, J-S.; Chon, Y. S.; Hwang, J. Y.; Park, J. Y.; Yoo, S. *J. Comb. Chem.* **2003**, *5*, 577-589. b) Takakura, H.; Urano, Y. *Preparation of benzothiazolylthiazoline carboxylic acids as reactive oxygen determination reagent*. WO2007JP56558 20070328, 04 Oct, **2007**.

Una vez obtenidos ambos sintones, se llevó a cabo la reacción de acoplamiento intermolecular entre el correspondiente acil isocianato (**15a**) y la anilina adecuadamente funcionalizada (**17**).³³⁷ Esta transformación no requería de la presencia de una base fuerte.



Esquema 3.17.- Formación del esqueleto de benzoilurea con la funcionalización adecuada.

A diferencia de las estrategias anteriores, llegados a este punto se estudió la introducción de un grupo metilo sobre el nitrógeno imídico, buscando adecuar la sustitución a la secuencia peptídica planteada. Para ello se trató el compuesto **18a** con K_2CO_3 anhidro como base y MeI como agente electrofílico, empleando DMF como disolvente de la reacción (Esquema 3.18).³³⁸

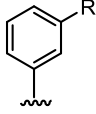
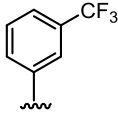
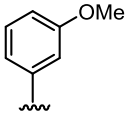
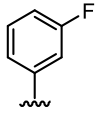


Esquema 3.18.- Reacción de metilación sobre el esqueleto de benzoilurea.

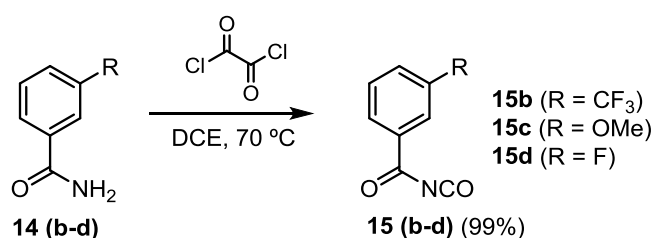
Siguiendo esta metodología fue posible obtener el derivado esperado **19a**, aunque con bajo rendimiento (26%). Esta baja conversión fue debida a la formación de un subproducto de reacción que correspondía con el derivado dimetilado en ambos nitrógenos de la molécula (**20a**; 66%). Estos rendimientos varían en función del tiempo transcurrido, pudiendo modular en cierta medida la proporción de cada compuesto.

³³⁷ Chianelli, D.; Cow, C.; He, Y.; Jiang, S.; Li, X.; Liu, X.; Liu, Z.; Loren, J.; Molteni, V.; Nabakka, J.; Ren, P.; Sim, T.; Wang, X.; You, S. *Naphthyridinone compositions and methods for modulating c-kit and PDGFR receptors and their preparation*. WO2007US81538, 16 Oct, **2007**

³³⁸ Gurulingappa, H.; Amador, M. L.; Zhao, M.; Rudek, M. A.; Hidalgo, M.; Khan, S. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 2213-2216.

Compuesto		Rendimiento
14b		70%
14c		89%
14d		60%

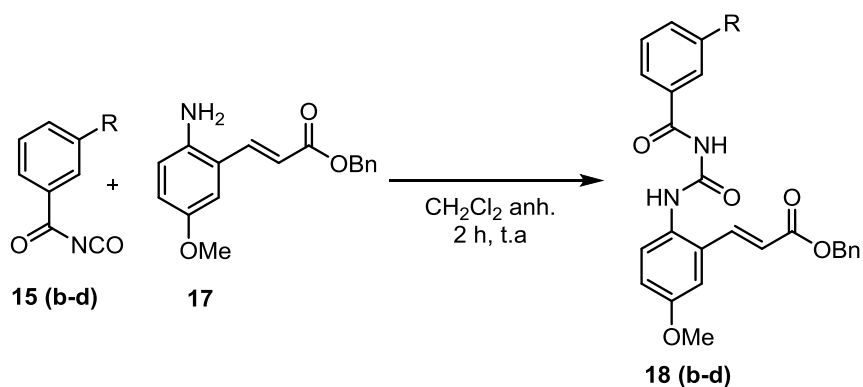
Una vez aislados los intermedios correspondientes, se hicieron reaccionar con cloruro de oxalilo a reflujo,³³⁵ lográndose obtener los derivados esperados (**15b-d**) con rendimientos prácticamente cuantitativos (Esquema 3.20).

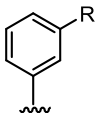
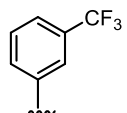
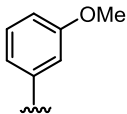
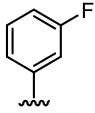


Esquema 3.20.- Preparación de los acil isocianatos correspondientes.

A continuación, con el objetivo de disponer del esqueleto de benzoilurea, se trataron los acilisocianatos anteriores (**15b-d**) con el compuesto **17** en CH₂Cl₂ anhidro. Fue posible aislar los derivados esperados (**18b-d**) con rendimientos aceptables (Tabla 3.2).

Tabla 3.2.- Formación del esqueleto de benzoilurea **18b-d**.

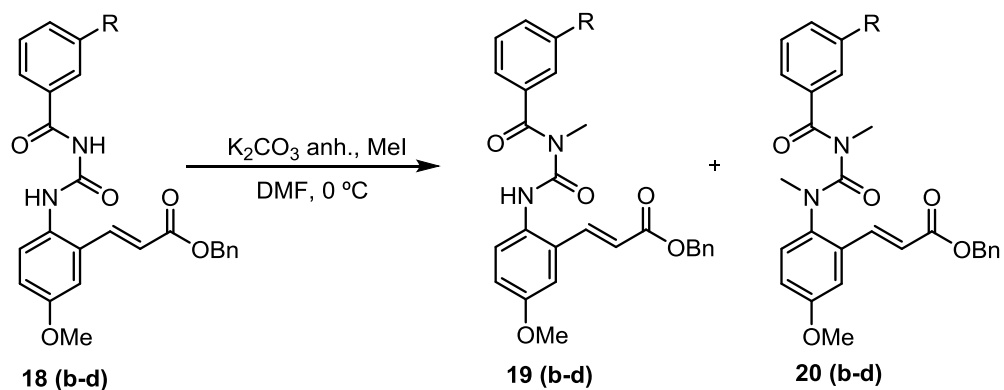


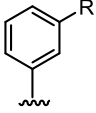
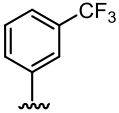
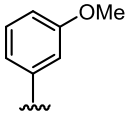
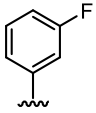
Compuesto		Rendimiento
18b		58%
18c		62%
18d		52%

En vista de los resultados (Tabla 3.2), se observan rendimientos equiparables para todos los derivados, lo que indica probablemente un grado de formación similar para los acil isocianatos correspondientes, independientemente del sustituyente que presentan.

Para completar la síntesis de estos análogos, fue necesario llevar a cabo la introducción de un grupo metilo sobre el nitrógeno imídico y una posterior reacción de hidrogenación catalítica, siguiendo las condiciones descritas anteriormente. Para ello se hicieron reaccionar en primer lugar los sustratos anteriores con MeI y K_2CO_3 anhidro, obteniendo los compuestos esperados (**19b-d**) con rendimientos aceptables.

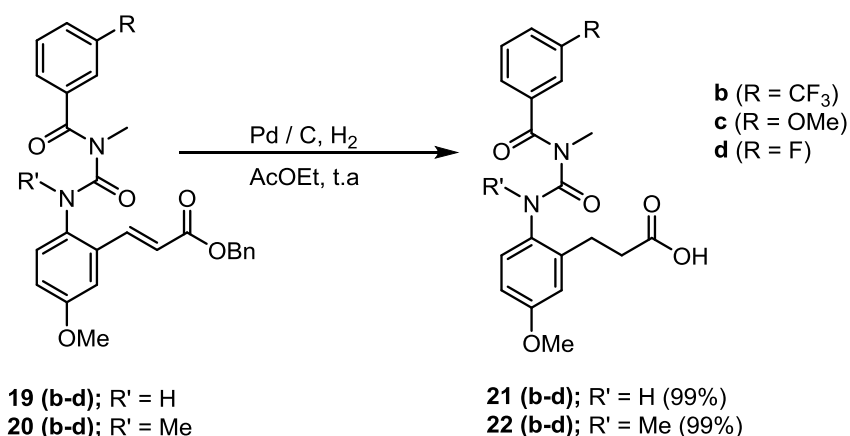
Tabla 3.3.- Reacción de metilación sobre el nitrógeno imídico.



Compuesto		Rendimiento 19 (b-d)	Rendimiento 20 (b-d)
19b / 20b		24%	41%
19c / 20c		31%	57%
19d / 20d		30%	65%

Tratando de dirigir la conversión en el sentido de obtener únicamente uno de los dos productos de metilación, se varió tanto la temperatura y el tiempo de reacción, como el número de equivalentes de base y de agente electrofílico. No obstante, el control de esta transformación era limitado, obteniéndose mezcla de ambos compuestos en todos los casos ensayados.

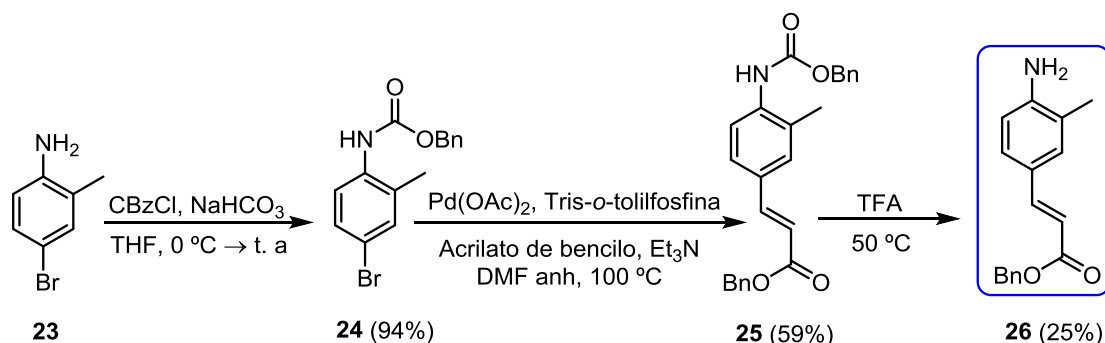
Finalmente, como última etapa de la síntesis se llevó a cabo la hidrogenación catalítica de los compuestos anteriores, lo que permitió reducir el doble enlace conjugado y eliminar el grupo bencilo simultáneamente. Fue posible obtener los compuestos finales esperados **21(b-d)** y **22(b-d)** con un rendimiento prácticamente cuantitativo (Esquema 3.21).



Esquema 3.21.- Reacción de hidrogenación catalítica para obtener los compuestos finales **21b-d**.

Como transformación adicional se propuso obtener un análogo que presentase la cadena de ácido propiónico en posición *para* respecto al grupo amino del anillo de anilina. De esta manera se trató de establecer la influencia que ejerce la posición de este sustituyente sobre la actividad antitumoral de esta familia de compuestos.

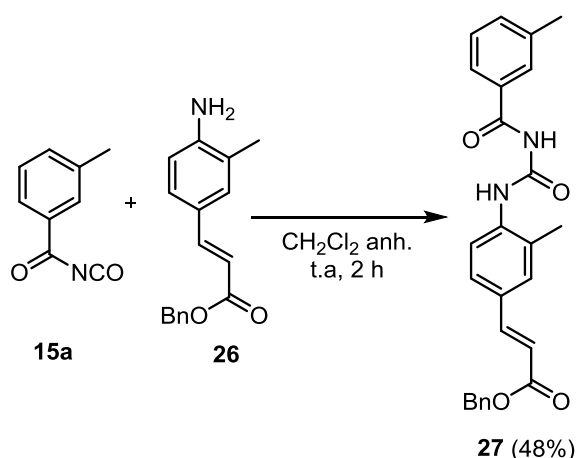
Para lograr este objetivo se planteó una estrategia sintética basada en la misma secuencia anterior, aunque modificando el sustrato de partida para adecuarlo a la nueva funcionalización planteada (Esquema 3.22).



Esquema 3.22.- Nueva ruta sintética para la preparación del anillo de anilina adecuadamente funcionalizado.

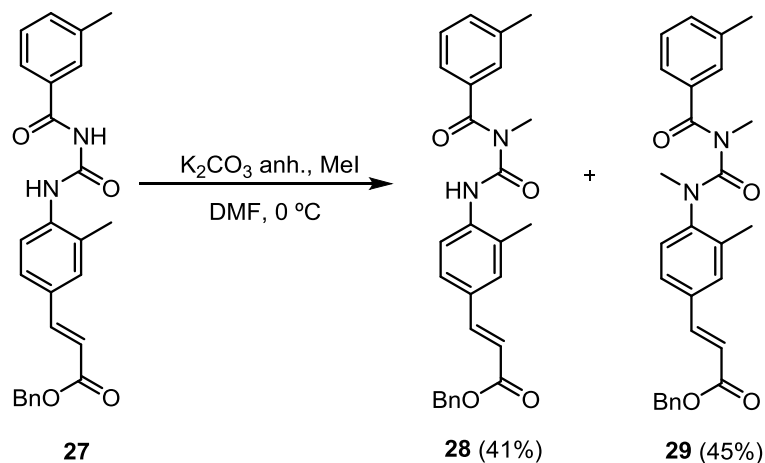
En vista del esquema anterior se empleó como producto de partida 4-bromo-2-metil-anilina (**23**). Tras proteger el grupo amino mediante una función carbamato,³²⁶ se llevó a cabo la reacción de Heck³²¹ para introducir la cadena de acrilato de bencilo en posición *para* del anillo aromático. Estas dos etapas exhibieron buenos rendimientos. A continuación, con el objetivo de disponer del grupo amino libre, se llevó a cabo una desprotección quimioselectiva del mismo siguiendo las premisas establecidas anteriormente.³³⁶ Esta metodología permitió obtener el derivado esperado (**26**) aunque con bajo rendimiento, debido principalmente a la formación de gran cantidad de productos secundarios en la etapa de desprotección.

Una vez aislado el compuesto **26**, se hizo reaccionar con el acil isocianato **15a**, tratando de obtener el esqueleto de benzoilurea propuesto. Las condiciones de reacción son similares a las empleadas para los derivados anteriores (Esquema 3.23).



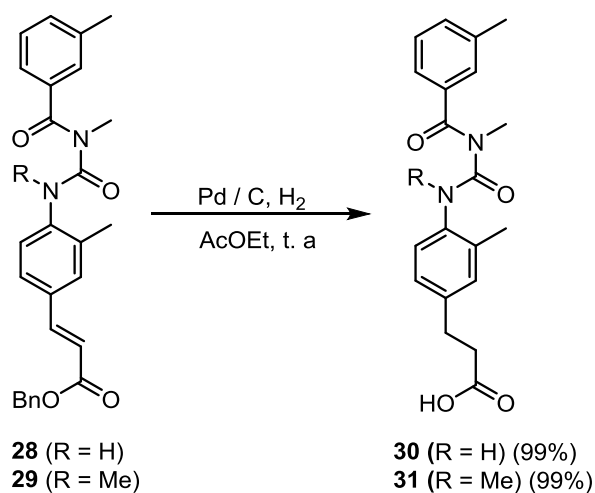
Esquema 3.23.- Formación del esqueleto de benzoilurea **27**.

A continuación se llevó a cabo la reacción de metilación sobre el nitrógeno imídico del sustrato **27**. Al igual que ocurría con los análogos anteriores, se obtuvo tanto el producto de metilación buscado (**28**), como el correspondiente derivado dimetilado (**29**) con rendimientos similares.



Esquema 3.24.- Reacción de metilación sobre el sustrato **27**.

Por último, estos productos se sometieron a una reacción de hidrogenación catalítica para obtener compuestos estructuralmente análogos a los sustratos estudiados. Se obtuvieron los compuestos finales esperados (**30** y **31**) con un rendimiento prácticamente cuantitativo (Esquema 3.25).



Esquema 3.25.- Reacción de hidrogenación catalizada por Pd / C.

En resumen, siguiendo la estrategia sintética descrita fue posible la preparación del compuesto planteado inicialmente (**21a**) y de una pequeña quimioteca de análogos del mismo, que presentan todos ellos un esqueleto de benzoilurea. Estos derivados se han ensayado posteriormente en la empresa Fibrostatin S. L. para determinar su potencial actividad como agentes antitumorales.

5.- PARTE EXPERIMENTAL

5.-PARTE EXPERIMENTAL

5.1.-TÉCNICAS GENERALES

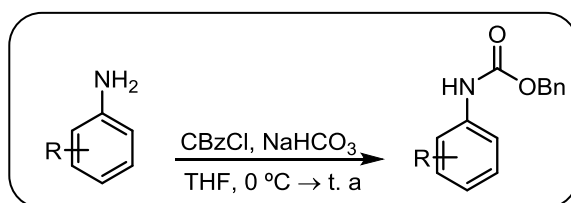
Los aspectos generales referidos a materiales, reactivos, disolventes de partida y técnicas instrumentales ya han sido descritas con detalle en la parte experimental del capítulo I.

5.2.- PARTE EXPERIMENTAL DE DERIVADOS DE BENZOILUREA

5.2.1.- PROCEDIMIENTOS GENERALES

Procedimiento general A

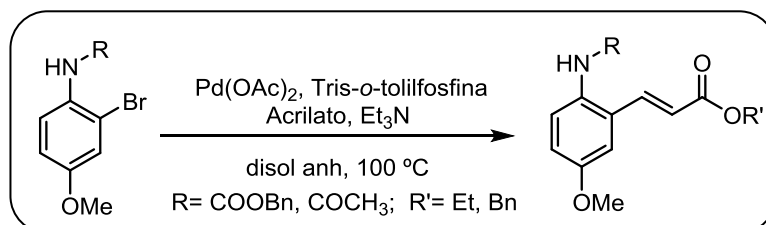
Protección del grupo amino con CBz (benciloxycarbonilo)



Experimental: Sobre una disolución de la correspondiente anilina (1 mmol) en THF anhidro (6 mL), se añade bajo atmósfera inerte y a 0 °C, NaHCO₃ (1.1 mmol, 92.4 mg) y a continuación cloruro de benciloxycarbonilo (1.1 mmol, 188 mg). Se mantiene la mezcla con agitación a temperatura ambiente durante 1 h. Se controla el avance de la reacción mediante cromatografía de capa fina y cuando ha finalizado se añade H₂O (3 mL) y se extrae la mezcla con AcOEt (30 mL). Las fases orgánicas reunidas se lavan con NaCl (sat.) y se secan sobre Na₂SO₄ anhidro. El residuo obtenido después de evaporar el disolvente a vacío se purifica por cromatografía sobre gel de sílice empleando una mezcla hexano:AcOEt (90:10) como eluyente.

Procedimiento general B

Reacción de acoplamiento de Heck

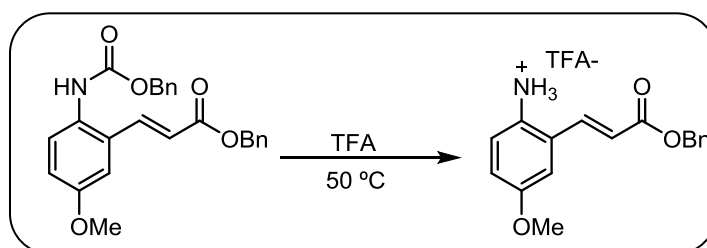


Experimental: Se mezcla la correspondiente anilina protegida (1 mmol), bajo atmósfera de argón, con Pd(OAc)₂ (0.15 mmol, 33.7 mg) y tris(*o*-tolilfosfina) (0.3 mmol, 91 mg). Se añade disolvente anhidro (CH₃CN o DMF) (15 mL) y a continuación se adiciona el acrilato oportuno (2.5 mmol) seguido de Et₃N (3.5 mmol, 488 μL).

Se somete la reacción a calentamiento a 100 °C durante 16 h o hasta completa desaparición del producto de partida, controlando su avance por cromatografía de capa fina. Una vez la reacción ha finalizado, se filtra la mezcla sobre celite para eliminar el catalizador, lavando el crudo con AcOEt (50 mL). La fase orgánica se lava a continuación con H₂O, NH₄Cl (sat) y se seca sobre Na₂SO₄ anh. El residuo obtenido después de evaporar el disolvente a vacío, se purifica mediante cromatografía sobre gel de sílice empleando una mezcla hexano:AcOEt (95:5- 90:10- 80:20) como eluyente.

Procedimiento general C

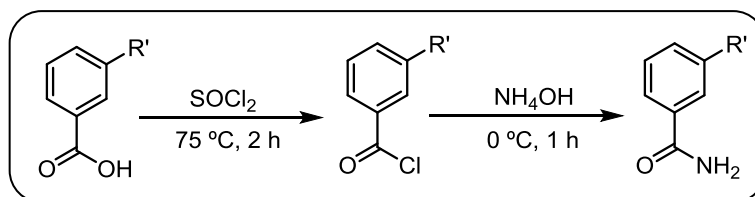
Desprotección quimioselectiva del grupo CBz



Experimental: Se disuelve la correspondiente anilina protegida (1 mmol) a temperatura ambiente, en TFA como disolvente (55 mmol, 4.2 mL). A continuación se somete la mezcla a calentamiento a 50 °C durante 4 h. Una vez la reacción ha finalizado, controlando su evolución por cromatografía de capa fina, se añade H₂O (2 mL) y se neutraliza la fase acuosa con NaOH ac 1M. El compuesto se extrae en CH₂Cl₂ (30 mL), lavando las fases orgánicas reunidas con NaCl (sat) y secandolas sobre Na₂SO₄ anh. El residuo obtenido se purifica por cromatografía de columna sobre gel de sílice empleando una mezcla hexano:AcOEt (90:10- 80:20) como eluyente.

Procedimiento general D

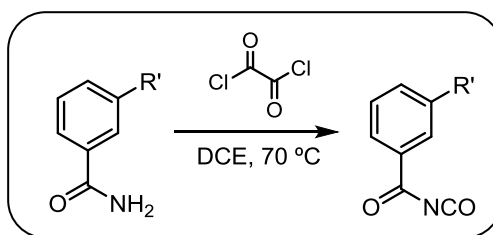
Preparación de aril formamidas a partir de ácidos benzoicos



Experimental: Se trata el ácido benzoico correspondiente (1 mmol), bajo atmósfera inerte, con cloruro de tionilo (SOCl₂) (10 mmol, 725 μL) a reflujo. Se mantiene la mezcla con agitación a 80 °C durante dos horas y a continuación se evapora el disolvente a vacío. Una vez seco, se enfría a 0 °C y se adiciona lentamente NH₄OH ac (40 mmol, 1.6 mL). Se mantiene la mezcla con agitación una hora adicional. Se añade H₂O (10 mL) y se extrae el producto en CH₂Cl₂ (40 mL), lavando las fases orgánicas con NaCl (sat) y secándolas sobre Na₂SO₄ anh. Se obtiene el compuesto esperado sin necesidad de purificación adicional.

Procedimiento general E

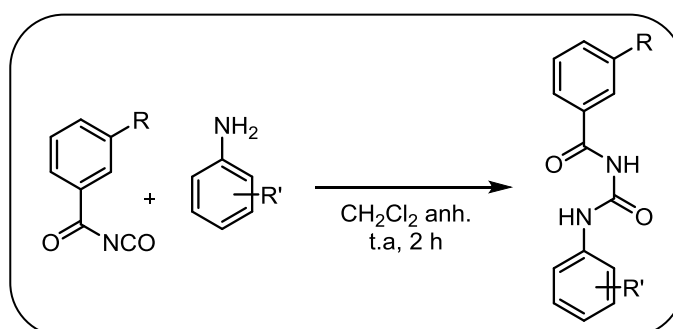
Preparación de acil isocyanatos a partir de aril formamidas



Experimental: Se disuelve la correspondiente formamida (1 mmol) bajo atmósfera inerte en DCE como disolvente (10 mL). Se enfría a 0 °C y añade lentamente cloruro de oxalilo (2 mmol, 171.5 μ L). A continuación se pone la mezcla a temperatura ambiente durante una hora y finalmente tres horas adicionales a reflujo a 70 °C. Tras este periodo de tiempo se evapora el disolvente a vacío, obteniéndose el compuesto esperado con un rendimiento prácticamente cuantitativo. Este sustrato se almacena adecuadamente bajo argón hasta su uso posterior, sin purificación ni caracterización adicional.

Procedimiento general F

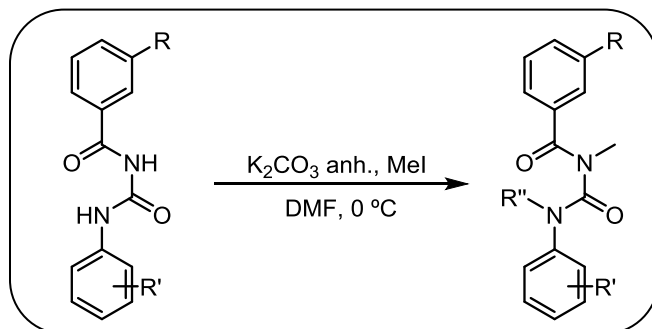
Reacción de acoplamiento intermolecular. Formación del esqueleto de benzoilurea



Experimental: Sobre una disolución del correspondiente acil isocianato (1 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (4 mL), se añade a temperatura ambiente y bajo atmósfera inerte, la correspondiente anilina (1 mmol) disuelta en CH_2Cl_2 (2 mL). Se mantiene la mezcla de reacción con agitación a temperatura ambiente durante dos horas, controlando el avance de la misma mediante cromatografía de capa fina. El residuo obtenido después de evaporar el disolvente a vacío se purifica mediante cromatografía sobre gel de sílice empleando una mezcla tolueno:AcOEt (95:5- 90:10) como eluyente.

Procedimiento general G

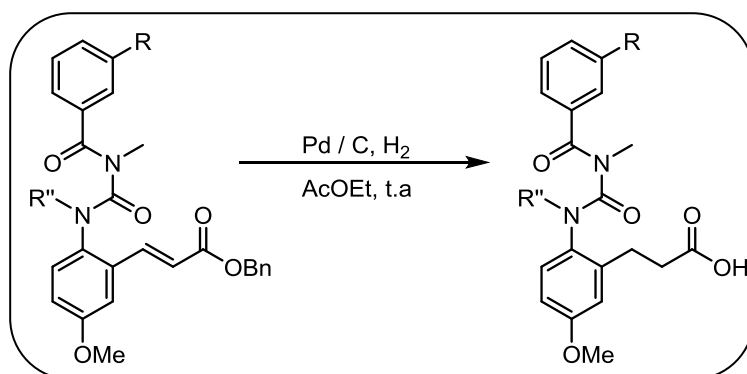
Reacción de metilación



Experimental: Se disuelve el correspondiente derivado de benzoilurea (1 mmol) bajo atmósfera inerte en DMF anhidra (18 mL). Se enfría a 0 °C y se añade a continuación MeI (3 mmol, 187 μ L) y K_2CO_3 anhidro (4 mmol, 553 mg). Se mantiene la mezcla con agitación a esta temperatura durante 2 h. Cuando la reacción ha finalizado se añade CH_2Cl_2 (30 mL) y se lava la fase orgánica con H_2O , NH_4Cl (ac) 1M y se seca sobre Na_2SO_4 anh. El residuo obtenido se purifica mediante cromatografía sobre gel de sílice empleando una mezcla tolueno:AcOEt (85:15 - 70:30) como eluyente. Siguiendo esta metodología fue posible obtener tanto el derivado esperado como el correspondiente producto de dimetilación.

Procedimiento general H

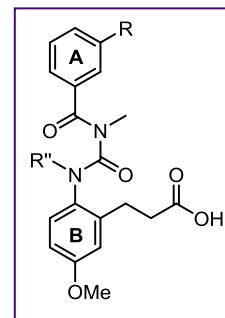
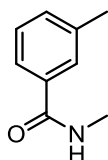
Reacción de hidrogenación catalítica



Experimental: Se mezcla el correspondiente derivado de benzoilurea (1 mmol) junto con el catalizador de paladio (0.1 mmol, 10.6 mg) en AcOEt como disolvente (15 mL). Sobre esta suspensión se establece una atmósfera reductora de H_2 (g) y se mantiene la mezcla con agitación a temperatura ambiente hasta que el compuesto de partida se consuma por completo, controlando el avance de la reacción mediante cromatografía de capa fina. A continuación se filtra la mezcla sobre celite para eliminar el exceso de catalizador y se evapora el disolvente a vacío. Finalmente se obtiene el compuesto esperado con un rendimiento prácticamente cuantitativo.

5.2.2 PROCEDIMIENTOS DE SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN

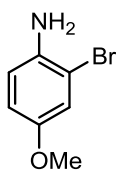
NOTA: Se escogió la numeración 1, 2, etc. para la asignación de las señales espectroscópicas en el anillo A y la numeración 1', 2', etc. para la asignación de dichas señales presentes en el anillo B, en el caso de que ya esté formado el esqueleto de benzoilurea correspondiente.

**N-metil-3-metilbenzamida (2)**

Se disuelve ácido 3-metilbenzoico (0.73 mmol, 100 mg) bajo atmósfera inerte en CH_2Cl_2 anhidro (4 mL) como disolvente. A continuación se añade EDCI (0.88 mmol, 262 mg), $\text{Me-NH}_2 \text{HCl}$ (0.81 mmol, 54.5 mg), Et_3N (0.81 mmol, 104 μL) y por último DMAP (0.07 mmol, 9.0 mg) para facilitar el acoplamiento. Se mantiene la mezcla con agitación a temperatura ambiente durante 16 h. Cuando la reacción ha finalizado, controlando su evolución mediante cromatografía de capa fina, se vierte el contenido sobre H_2O (10 mL) y se extrae el producto en AcOEt (30 mL). Las fases orgánicas reunidas se secan sobre Na_2SO_4 anh. y el residuo remanente después de evaporar el disolvente a vacío, se purifica mediante cromatografía sobre gel de sílice empleando una mezcla hexano:AcOEt (60:40) como eluyente. Se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de 55%.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 7.57 (s, 1H, H2), 7.55 (m, 1H), 7.25 (m, 2H), 6.81 (s ancho, 1H, NH), 2.95 (d, $J = 3.2$ Hz, 3H, N- CH_3), 2.33 (s, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C (75 MHz; CDCl_3): δ 169.0 (CO), 138.6 (C), 135.0 (C), 132.4 (CH), 128.7 (CH), 128.1 (CH), 124.3 (CH), 27.2 (N- CH_3), 21.7 (CH_3).

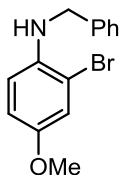
2-bromo-4-metoxianilina (4)

Se disuelve *p*-anisidina (0.81 mmol, 100 mg) bajo atmósfera inerte en CH_3CN anhidro (3 mL) como disolvente. Se enfría a 0 $^\circ\text{C}$ y se adiciona en porciones, NBS previamente cristalizada (0.81 mmol, 145 mg). Se mantiene la mezcla con agitación a temperatura ambiente durante 18 h. Cuando la reacción ha finalizado se añade H_2O (5 mL) para hidrolizar la misma y se extrae el producto con CH_2Cl_2 (30 mL). Las fases orgánicas reunidas se secan sobre MgSO_4 anh. y el residuo obtenido después de evaporar el disolvente a vacío, se purifica mediante cromatografía sobre gel de sílice empleando una mezcla hexano:AcOEt (95:5 - 90:10) como eluyente. Se obtuvo el compuesto esperado como un aceite incoloro con un rendimiento de un 32%.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 7.00 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H, H3), 6.72 (m, 2H, H5, H6), 3.78 (s ancho, 2H, NH_2), 3.73 (s, 3H, OCH_3).

RMN ^{13}C (75 MHz; CDCl_3): δ 152.9 (C), 138.1 (C), 117.7 (CH), 116.8 (CH), 115.2 (CH), 109.8 (C), 56.1 (OCH_3).

N-bencil-2-bromo-4-metoxianilina (5)

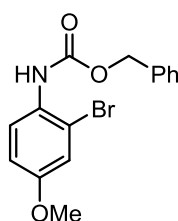


Se disuelve el compuesto **4** (0.62 mmol, 125 mg) bajo atmósfera inerte en DMF anhidra (3 mL) como disolvente. Seguidamente se adiciona K_2CO_3 (1.85 mmol, 255 mg) como base y bromuro de bencilo (0.62 mmol, 73 μ L) como agente electrofílico. Se mantiene la mezcla con agitación a temperatura ambiente durante 6 h. A continuación se añade AcOEt (30 mL) y la fase orgánica se lava con una disolución saturada de $NaHCO_3$, NaCl (sat) y se seca sobre Na_2SO_4 anh. El residuo obtenido se purifica mediante cromatografía sobre gel de sílice empleando una mezcla hexano:AcOEt (98:2) como eluyente. Se obtuvo el compuesto esperado como un aceite incoloro con un rendimiento de un 88%.

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$): δ 7.28-7.15 (m, 5H, 5x Ph), 6.97 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H, H3), 6.65 (dd, $J = 8.5, 3.0$ Hz, 1H, H5), 6.46 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H6), 4.30 (s ancho, 1H, NH), 4.25 (s, 2H, CH_2), 3.62 (s, 3H, OCH_3).

RMN ^{13}C (75 MHz; $CDCl_3$): δ 151.9 (C), 139.5 (C), 139.2 (C), 128.7 (2x CH), 128.3 (CH), 127.4 (2x CH), 118.5 (CH), 114.6 (CH), 112.6 (CH), 110.0 (C), 56.1 (OCH_3), 48.9 (CH_2).

(2-bromo-4-metoxifenil) carbamato de bencilo (6)

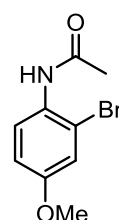


Siguiendo el procedimiento general A, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de un 99%.

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$): δ 7.97 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H6), 7.40 (m, 5H, 5x Ph), 7.07 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H, H3), 6.92 (s ancho, 1H, NH), 6.87 (dd, $J = 8.5, 3.0$ Hz, 1H, H5), 5.21 (s, 2H, CH_2), 3.78 (s, 3H, OCH_3).

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$): δ 156.1 (CO), 153.6 (C), 136.1 (2x C), 129.2 (C), 128.7 (2x CH), 128.5 (CH), 128.4 (2x CH), 122.1 (CH), 117.6 (CH), 114.2 (CH), 67.3 (CH_2), 55.8 (OCH_3).

N-acetil-2-bromo-4-metoxianilina (7)

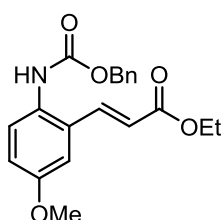


Se disuelve el compuesto **4** (1 mmol, 200 mg) bajo atmósfera inerte en CH_2Cl_2 anhidro como disolvente (3 mL). A continuación se enfría a 0 $^{\circ}C$, se añade Et_3N como base (3 mmol, 380.4 μ L) y se mantiene la mezcla con agitación durante 15 minutos a esa temperatura. Seguidamente se adiciona lentamente cloruro de acetilo (1.5 mmol, 106 μ L) y se dispone la reacción a temperatura ambiente durante 1 h adicional. Cuando la reacción ha finalizado, controlando su evolución mediante cromatografía de capa fina, se añade H_2O (10 mL) y se extrae el producto formado con CH_2Cl_2 (30 mL). Las fases orgánicas reunidas se lavan con HCl 0.1 M, NaCl (sat) y se secan sobre Na_2SO_4 anhidro. Tras evaporar el disolvente a vacío, se obtuvo el compuesto esperado sin necesidad de purificación adicional y con un rendimiento prácticamente cuantitativo.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 8.01 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H, H6), 7.46 (s ancho, 1H, NH), 7.05 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, H3), 6.82 (dd, *J* = 8.7, 3.1 Hz, 1H, H5), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 2.18 (s, 3H, CH₃)

RMN ¹³C (125 MHz; CDCl₃): δ 168.5 (CO), 156.8 (C), 129.2 (C), 124.1 (C), 117.7 (CH), 115.1 (CH), 114.0 (CH), 55.9 (OCH₃), 24.8 (CH₃).

(E)-3-(2-(((benziloxi)carbonil)amino)-5-metoxifenil) acrilato de etilo (8)

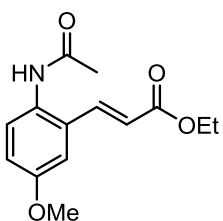


Siguiendo el procedimiento general B, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de un 91%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.80 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, CH doble enlace *E*), 7.52 (d ancho, *J* = 8.7 Hz, 1H, H3), 7.36 (m, 5H, 5x Ph), 7.03 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, H6), 6.92 (dd, *J* = 8.7, 3.0 Hz, 1H, H4), 6.39 (s ancho, 1H, NH), 6.37 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, CH doble enlace *E*), 5.19 (s, 2H, CH₂), 4.25 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂), 3.81 (s, 3H, OCH₃), 1.32 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₃).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 166.7 (CO), 157.3 (C), 152.5 (CO), 139.3 (CH), 136.1 (C), 131.0 (C), 129.2 (C), 128.7 (2x CH), 128.6 (CH), 128.4 (2x CH), 126.2 (CH), 120.9 (CH), 117.0 (CH), 111.4 (CH), 67.4 (CH₂), 60.8 (CH₂), 55.6 (OCH₃), 14.4 (CH₃).

(E)-3-(2-acetamido-5-metoxifenil) acrilato de etilo (9)

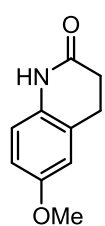


Siguiendo el procedimiento general B, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de un 72%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.78 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H, CH doble enlace *E*), 7.26 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H3), 7.23 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, H6), 7.00 (dd, *J* = 8.7, 3.0 Hz, 1H, H4), 6.52 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, CH doble enlace *E*), 4.87 (s, 1H, NH), 4.29 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂ etilo), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 2.20 (s, 3H, CH₃), 1.36 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₃ etilo).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 173.3 (CO), 168.9 (CO), 159.6 (C), 141.3 (CH), 132.4 (C), 130.5 (C), 129.7 (CH), 120.5 (CH), 117.9 (CH), 111.8 (CH), 61.7 (CH₂), 56.0 (OCH₃), 22.9 (CH₃), 14.4 (CH₃).

6-metoxi-3,4-dihidroquinolin-2-ona (10)

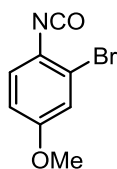


Este compuesto se obtuvo como un producto no deseado en la reacción de hidrogenación catalítica sobre el sustrato **8**. Para ello se hace reaccionar dicho compuesto (**8**) (0.085 mmol, 30.0 mg) junto con Pd/C como catalizador (0.008 mmol, 3 mg) en AcOEt (1 mL). Se establece una atmósfera reductora saturada de H₂ (g), que permite la reducción del doble enlace y la desprotección del grupo amino simultáneamente. Tras filtrar la mezcla sobre celite para eliminar el catalizador, se obtuvo este compuesto como un sólido blanco con un rendimiento prácticamente cuantitativo.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 8.95 (s ancho, 1H, NH), 6.74 (m, 3H, 3x Ar), 3.77 (s, 3H, OCH_3), 2.93 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, CH_2), 2.61 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, CH_2).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ 171.8 (CO), 155.7 (C), 131.0 (C), 125.1 (C), 116.4 (CH), 113.9 (CH), 112.6 (CH), 55.7 (OCH_3), 30.7 (CH_2), 25.8 (CH_2).

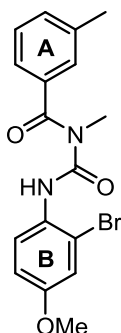
2-bromo-1-isocianato-4-metoxibenceno (11)



Se trata el compuesto **4** (0.23 mmol, 47 mg) bajo atmósfera inerte con trifosgeno (0.077 mmol, 22.9 mg) en CH_2Cl_2 anhidro (2 mL) como disolvente. A continuación se añade NaHCO_3 (0.46 mmol, 39 mg) disuelto en H_2O (1 mL) y se mantiene la mezcla con agitación a temperatura ambiente durante dos horas. Cuando la reacción se ha completado se vierte la mezcla sobre H_2O (3 mL) y se extrae el producto orgánico con CH_2Cl_2 (40 mL). Las fases orgánicas reunidas se secan sobre Na_2SO_4 anh y se evapora el disolvente a vacío, obteniéndose el compuesto esperado como un aceite incoloro con un rendimiento prácticamente cuantitativo.

No se dispone de espectro de resonancia magnética nuclear para este producto. Dada la gran inestabilidad que presentan se lleva a cabo la reacción de acoplamiento posterior sin purificación ni caracterización adicional.

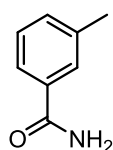
N-((2-bromo-4-metoxifenil)carbamoil)-*N*-3-dimetilbenzamida (12)



Se disuelve el compuesto **2** (0.22 mmol, 33 mg) bajo atmósfera inerte en THF anhidro (1.5 mL) como disolvente. A continuación se enfría a -78 °C y se añade LiHMDS 1M en THF (0.44 mmol, 83 μL), manteniéndose la mezcla con agitación a esa temperatura durante 30 minutos más. Sobre esta disolución se adiciona el isocianato correspondiente (**11**) disuelto en THF anhidro (2.5 mL) y se controla el avance de la reacción por cromatografía de capa fina. Cuando la reacción ha finalizado se añade H_2O (3 mL) para hidrolizar la misma y se extrae el producto con AcOEt (40 mL), lavando las fases orgánicas reunidas con NaCl (sat) y secándolas sobre Na_2SO_4 anhidro. El crudo obtenido después de evaporar el disolvente a vacío, se purifica por cromatografía sobre gel de sílice empleando una mezcla hexano: AcOEt (95:5 – 90:10 – 80:20) como eluyente. Se obtuvo el compuesto esperado como un aceite incoloro con un rendimiento de un 35%.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 11.54 (s, 1H, NH), 8.14 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, $\text{H6}'$), 7.34 (m, 4H, H2 , H4 , H5 , H6), 7.14 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H, $\text{H3}'$), 6.89 (dd, $J = 9.3$, 3.0 Hz, 1H, $\text{H5}'$), 3.79 (s, 3H, OCH_3), 3.29 (s, 3H, NCH_3), 2.41 (s, 3H, CH_3).

3-metilbenzamida (14a)

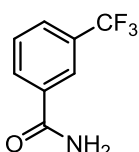


Siguiendo el procedimiento general D, se obtuvo el compuesto esperado sin necesidad de purificación adicional, como un sólido blanco con un rendimiento de 79%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.64 (m, 1H), 7.59 (m, 1H), 7.31 (m, 2H), 6.34 (s ancho, 2H, NH₂), 2.38 (s, 3H, CH₃).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 170.1 (CO), 138.6 (C), 133.5 (C), 132.8 (CH), 128.6 (CH), 128.2 (CH), 124.4 (CH), 21.4 (CH₃).

3-(trifluorometil) benzamida (14b)



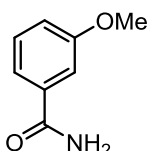
Siguiendo el procedimiento general D, se obtuvo el compuesto esperado sin necesidad de purificación adicional, como un sólido blanco con un rendimiento de 70%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 8.09 (s, 1H, H2), 8.06 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H6), 7.90 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H4), 7.59 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, H5), 6.20 (s ancho, 2H, NH₂).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 168.1 (CO), 134.3 (C), 131.5 (q, *J* = 32.7 Hz, C, C3), 131.0 (CH), 129.7 (CH), 129.0 (q, *J* = 3.6 Hz, CH), 124.8 (q, *J* = 3.7 Hz, CH), 123.2 (q, *J* = 270.9 Hz, C, CF₃).

RMN ¹⁹F (282 MHz, CDCl₃): δ -63.3 (CF₃).

3-metoxibenzamida (14c)

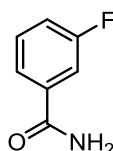


Siguiendo el procedimiento general D, se obtuvo el compuesto esperado sin necesidad de purificación adicional, como un sólido blanco con un rendimiento de 89%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃ + MeOD): δ 7.36-7.26 (m, 3H), 7.01 (m, 1H), 3.80 (s, 3H, OCH₃).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃ + MeOD): δ 170.1 (CO), 159.8 (C), 134.7 (C), 129.6 (CH), 119.4 (CH), 118.2 (CH), 112.7 (CH), 55.4 (OCH₃).

3-fluorobenzamida (14d)

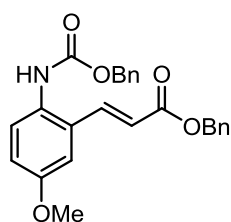


Siguiendo el procedimiento general D, se obtuvo el compuesto esperado sin necesidad de purificación adicional, como un sólido blanco con un rendimiento de 60%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.52 (m, 2H), 7.35 (m, 1H), 7.16 (tdd, *J* = 8.1, 2.7, 0.9 Hz, 1H, H5), 6.48 (s ancho, 2H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 169.0 (CO), 162.2 (d, *J* = 245.8 Hz, C, C-F), 135.6 (d, *J* = 6.6 Hz, C, C1), 130.2 (d, *J* = 7.8 Hz, CH, C5), 123.0 (d, *J* = 2.9 Hz, CH, C6), 118.9 (d, *J* = 21.2 Hz, CH), 114.7 (d, *J* = 22.9 Hz, CH). **RMN ¹⁹F** (282 MHz, CDCl₃): δ -112.5 (F).

(E)-3-(2-(((benciloxi)carbonil)amino)-5-metoxifenil)acrilato de bencilo (16)

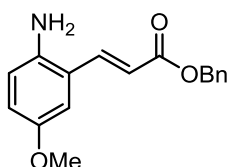


Siguiendo el procedimiento general B, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de un 52%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.86 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, CH doble enlace *E*), 7.52 (d ancho, *J* = 9.0 Hz, 1H, H3), 7.38 (m, 10H, 10x Ar), 7.03 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H, H6), 6.94 (dd, *J* = 9.0, 3.0 Hz, 1H, H4), 6.48 (s ancho, 1H, NH), 6.42 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, CH doble enlace *E*), 5.25 (s, 2H, CH₂), 5.19 (s, 2H, CH₂), 3.80 (s, 3H, OCH₃).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 166.5 (CO), 157.7 (C), 154.8 (CO), 139.9 (CH), 136.1 (2x C), 131.0 (C), 129.2 (C), 128.7 (4x CH), 128.6 (2x CH), 128.4 (4x CH), 126.2 (CH), 120.5 (CH), 117.3 (CH), 111.4 (CH), 67.5 (CH₂), 66.7 (CH₂), 55.7 (OCH₃).

(E)-3-(2-amino-5-metoxifenil) acrilato de bencilo (17)

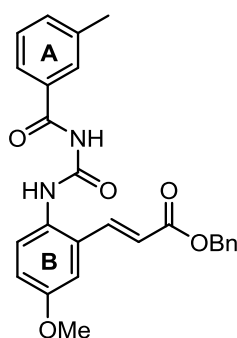


Siguiendo el procedimiento general C, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido amarillento con un rendimiento de un 75%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.86 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, CH doble enlace *E*), 7.39 (m, 5H, 5x Ar), 6.91 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, H6), 6.82 (dd, *J* = 8.7, 2.7 Hz, 1H, H4), 6.66 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H3), 6.40 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, CH doble enlace *E*), 5.26 (s, 2H, CH₂), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 3.69 (s ancho, 2H, NH₂).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 167.1 (CO), 152.9 (C), 140.6 (CH), 139.8 (C), 136.2 (C), 128.7 (2x CH), 128.5 (2x CH), 128.4 (CH), 120.8 (C), 119.0 (CH), 118.6 (CH), 117.9 (CH), 111.5 (CH), 66.5 (CH₂), 55.8 (OCH₃).

(E)-3-(5-metoxi-2-(3-(3-metilbenzoil)ureido)fenil) acrilato de bencilo (18a)

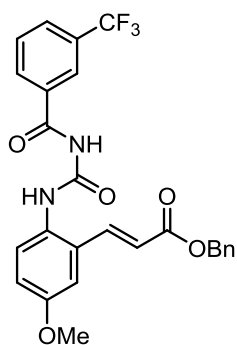


Siguiendo el procedimiento general F, se obtuvo el compuesto esperado como un aceite incoloro con un rendimiento de 59%.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 10.85 (s, 1H, NH), 9.72 (s, 1H, NH), 8.01 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, CH doble enlace *E*), 7.80 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.70 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H3'), 7.41 (m, 3H), 7.31 (m, 4H), 7.10 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H, H6'), 6.96 (dd, *J* = 8.8, 2.8 Hz, 1H, H4'), 6.47 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H, CH doble enlace *E*), 5.25 (s, 2H, CH₂), 3.84 (s, 3H, OCH₃), 2.34 (s, 3H, CH₃).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ 168.9 (CO), 168.8 (CO), 166.4 (C), 157.5 (C), 152.8 (CO), 139.8 (CH), 138.9 (C), 136.0 (C), 134.2 (CH), 132.0 (C), 129.4 (C), 128.8 (CH), 128.7 (CH), 128.6 (2x CH), 128.3 (2x CH), 126.9 (CH), 126.6 (CH), 125.2 (CH), 120.7 (CH), 117.2 (CH), 111.1 (CH), 66.6 (CH₂), 55.7 (OCH₃), 21.38 (CH₃).

(E)-3-(5-metoxi-2-(3-(3-(trifluorometil)benzoil)ureido)fenil) acrilato de bencilo (18b)



Seguindo el procedimiento general F, se obtuvo el compuesto esperado como un aceite ligeramente amarillento con un rendimiento de 58%.

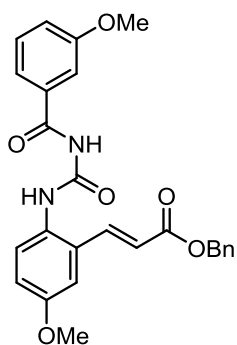
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): 10.72 (s, 1H, NH), 10.13 (s, 1H, NH), 8.28 (s ancho, 1H, H₂), 8.20 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H₆), 7.97 (d, *J* = 15.9, 1H, CH doble enlace *E*), 7.85 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H₄), 7.63 (d, *J* = 9.0, 1H, H_{3'}), 7.54 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H, H₅), 7.40 (dd, *J* = 8.1, 1.8 Hz, 2H, H₂, H₆ Bn), 7.30 (m, 3H, 3x Bn), 7.11 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H, H_{6'}),

6.96 (dd, *J* = 9.0, 3.0 Hz, 1H, H_{4'}), 6.47 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, CH doble enlace *E*), 5.24 (s, 2H, CH₂), 3.85 (s, 3H, OCH₃).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 167.5 (CO), 166.3 (CO), 157.8 (C), 152.9 (CO), 139.7 (CH), 136.0 (C), 133.0 (C), 131.9 (q, *J* = 32.5 Hz, C, C₃), 131.2 (CH), 129.7 (C), 129.5 (CH), 128.7 (2x CH), 128.4 (C), 128.4 (2x CH), 128.3 (2x CH), 126.8 (CH), 125.5 (CH), 123.9 (q, *J* = 271.0 Hz, C, CF₃), 120.8 (CH), 117.2 (CH), 111.2 (CH), 66.7 (CH₂), 55.7 (OCH₃).

RMN ¹⁹F (282 MHz, CDCl₃): -63.3 (CF₃).

(E)-3-(5-metoxi-2-(3-(3-metoxibenzoil)ureido)fenil) acrilato de bencilo (18c)



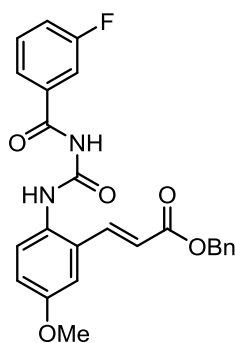
Seguindo el procedimiento general F, se obtuvo el compuesto esperado como un aceite incoloro con un rendimiento de 62%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 10.74 (s, 1H, NH), 9.45 (s, 1H, NH), 7.97 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, CH doble enlace *E*), 7.65 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H_{3'}), 7.53 (d, *J* = 8.1, 1H, H₆), 7.48 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H, H₂), 7.44-7.25 (m, 6H, 6x Ar), 7.14 (dt, *J* = 8.1, 2.4 Hz, 1H, H₄), 7.10 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, H_{6'}), 6.97 (dd, *J* = 9.0, 3.0 Hz, 1H, H_{4'}), 6.46 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, CH doble enlace *E*), 5.24 (s, 2H, CH₂), 3.84 (s, 3H,

OCH₃), 3.78 (s, 3H, OCH₃).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 168.5 (CO), 166.4 (CO), 160.1 (C), 157.6 (C), 152.7 (CO), 139.8 (CH), 136.1 (C), 133.5 (C), 130.0 (CH), 129.6 (C), 128.8 (C), 128.7 (2x CH), 128.3 (CH), 128.2 (2x CH), 126.9 (CH), 120.7 (CH), 120.1 (CH), 120.0 (CH), 117.2 (CH), 112.7 (CH), 111.2 (CH), 66.6 (CH₂), 55.7 (OCH₃), 55.6 (OCH₃).

(E)-3-(2-(3-(3-fluorobenzoi)ureido)-5-metoxifenil)acrilato de bencilo (18d)



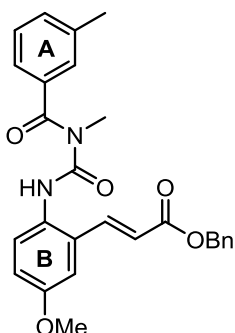
Siguiendo el procedimiento general F, se obtuvo el compuesto esperado como un aceite con un rendimiento de 52%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 10.67 (s, 1H, NH), 9.36 (s, 1H, NH), 7.98 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H, CH doble enlace *E*), 7.72 (m, 3H), 7.49-7.28 (m, 7H), 7.11 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H, H6'), 6.99 (dd, *J* = 9.3, 3.0 Hz, 1H, H4'), 6.49 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H, CH doble enlace *E*), 5.25 (s, 2H, CH₂), 3.85 (s, 3H, OCH₃).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 167.2 (CO), 166.4 (CO), 163.0 (d, *J* = 247.5 Hz, C, C3), 157.7 (C), 152.3 (CO), 139.7 (CH), 136.0 (C), 134.3 (d, *J* = 7.0 Hz, C, C1), 130.8 (d, *J* = 7.6 Hz, CH, C5), 129.5 (C), 128.7 (2x CH), 128.6 (C), 128.4 (3x CH), 126.6 (CH), 123.5 (d, *J* = 3.0 Hz, CH, C6), 120.9 (CH), 120.6 (d, *J* = 21.0 Hz, CH), 117.32 (CH), 115.4 (d, *J* = 23.3 Hz, CH), 111.3 (CH), 66.7 (CH₂), 55.7 (OCH₃).

RMN ¹⁹F (282 MHz, CDCl₃): -111.1 (F).

(E)-3-(5-metoxi-2-(3-metil-3-(3-metilbenzoi)ureido)fenil)acrilato de bencilo (19a)



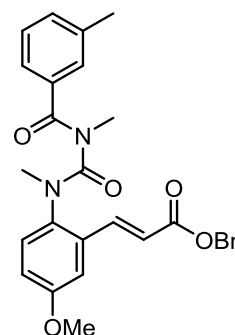
Siguiendo el procedimiento general G, se obtuvo a partir del sustrato **18a**, el compuesto esperado como un aceite incoloro con un rendimiento de un 26%. Además, también se obtuvo el correspondiente derivado dimetilado **20a** con un rendimiento de un 66%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 11.20 (s, 1H, NH), 7.99 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, CH doble enlace *E*), 7.67 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H3'), 7.43 - 7.28 (m, 9H, 9x Ar), 7.10 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H, H6'), 6.98 (dd, *J* = 8.7,

2.7 Hz, 1H, H4'), 6.48 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, CH doble enlace *E*), 5.25 (s, 2H, CH₂), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 3.28 (s, 3H, NCH₃), 2.43 (s, 3H, CH₃).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 175.5 (CO), 166.5 (CO), 157.4 (C), 153.8 (CO), 140.2 (CH), 138.8 (C), 136.1 (C), 135.8 (C), 131.9 (CH), 129.6 (C), 129.5 (C), 129.2 (CH), 128.6 (2x CH), 128.3 (CH), 128.2 (2x CH), 127.5 (CH), 126.8 (CH), 124.0 (CH), 120.4 (CH), 117.2 (CH), 111.2 (CH), 66.5 (CH₂), 55.7 (OCH₃), 36.1 (NCH₃), 21.5 (CH₃).

(E)-3-(2-(1,3-dimetil-3-(3-metilbenzoi)ureido)-5-metoxifenil)acrilato de bencilo (20a)



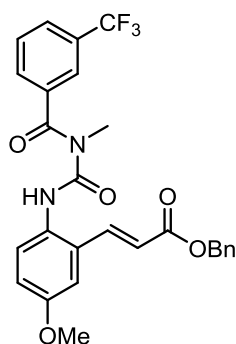
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.42-7.35 (m, 5H), 7.22- 7.02 (m ancho, 5H), 6.98 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, H6'), 6.77 (dd, *J* = 9.0, 3.0 Hz, 1H, H4'), 6.48 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H3'), 6.32 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H, CH doble enlace *E*), 5.24 (s, 2H, CH₂), 3.79 (s, 3H, OCH₃), 3.17 (s, 3H, NCH₃), 3.13 (s, 3H, NCH₃), 2.27 (s, 3H, CH₃).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 170.3 (CO), 165.9 (CO), 158.9 (C), 158.7 (CO), 139.5 (CH), 138.3 (C), 136.0 (C), 135.1 (C), 135.0 (C),

132.6 (CH), 132.2 (C), 129.1 (CH), 128.8 (CH), 128.7 (2x CH), 128.6 (CH), 128.5 (2x CH), 128.1 (CH), 125.1 (CH), 120.3 (CH), 116.9 (CH), 111.2 (CH), 66.6 (CH₂), 55.7 (OCH₃), 40.0 (NCH₃), 35.0 (NCH₃), 21.3 (CH₃).

Debido a efectos de rotación impedida, varias señales en el espectro de ¹H salen muy anchas y distorsionadas, así como uno de los grupos metilo unido a nitrógeno (N-CH₃), que no logra emerger con claridad en el espectro de ¹³C.

(E)-3-(5-metoxi-2-(3-metil-3-(3-(trifluorometil)benzoil)ureido)fenil)acrilato de bencilo (19b)



Siguiendo el procedimiento general G, se obtuvo a partir del sustrato **18b**, el compuesto esperado como un aceite ligeramente amarillento con un rendimiento de un 24%. Además, también se obtuvo el correspondiente derivado dimetilado **20b** con un rendimiento de 41%.

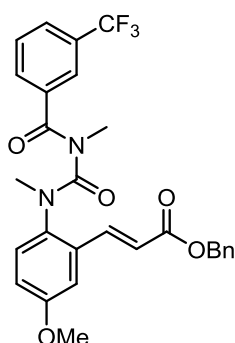
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): 11.04 (s, 1H, NH), 7.97 (d, *J* = 15.9, 1H, CH doble enlace *E*), 7.80 (m, 2H), 7.74-7.64 (m, 2H), 7.63 (d, *J* = 8.7, 1H, H3'), 7.40 (m, 2H), 7.35 – 7.28 (m, 3H), 7.10 (d, *J* = 3.0 Hz,

1H, H6'), 6.98 (dd, *J* = 8.7, 3.0 Hz, 1H, H4'), 6.49 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, CH doble enlace *E*), 5.25 (s, 2H, CH₂), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 3.27 (s, 3H, NCH₃).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 173.7 (CO), 166.5 (CO), 157.6 (C), 153.4 (CO), 140.0 (CH), 136.6 (C), 136.1 (C), 131.6 (q, *J* = 32.9 Hz, C, C3), 130.2 (CH), 129.7 (C), 129.6 (CH), 129.3 (C), 128.7 (2x CH), 128.3 (3x CH), 127.8 (q, *J* = 3.7 Hz, CH), 126.8 (CH), 124.1 (q, *J* = 3.7 Hz, CH), 123.6 (q, *J* = 271.0 Hz, C, CF₃), 120.6 (CH), 117.3 (CH), 111.3 (CH), 66.6 (CH₂), 55.7 (OCH₃), 36.0 (NCH₃).

RMN ¹⁹F (282 MHz, CDCl₃): -63.4 (CF₃).

(E)-3-(2-(1,3-dimetil-3-(3-(trifluorometil)benzoil)ureido)-5-metoxifenil) acrilato de bencilo (20b)



RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.58 (d ancho, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.47-7.30 (m, 7H), 7.00 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, H6'), 6.89 (s ancho, 1H, CH doble enlace *E*), 6.79 (dd, *J* = 9.0, 3.0 Hz, 1H, H4'), 6.46 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H3'), 6.33 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, CH doble enlace *E*), 5.24 (s, 2H, CH₂), 3.79 (s, 3H, OCH₃), 3.18 (s, 3H, NCH₃), 3.16 (s, 3H, NCH₃).

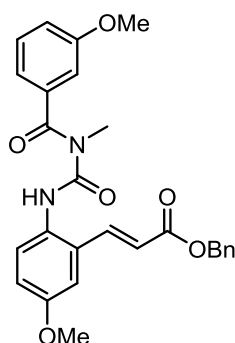
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 165.9 (CO), 159.0 (CO), 158.4 (C), 138.9 (CH), 135.9 (C), 135.8 (C), 134.7 (C), 132.1 (C), 130.9 (CH), 128.9 (CH), 128.8 (2x CH), 128.6 (CH), 128.6 (2x CH), 128.5 (C),

128.4 (CH), 125.7 (CH), 120.8 (CH), 117.2 (CH), 111.4 (CH), 66.8 (CH₂), 55.7 (OCH₃), 40.2 (NCH₃), 35.2 (NCH₃).

RMN ¹⁹F (282 MHz, CDCl₃): -63.4 (CF₃).

Debido a efectos de rotación impedida, varias señales en el espectro de ^1H salen muy anchas y distorsionadas, así como ciertas señales en el espectro de ^{13}C que no logran emerger con claridad.

(E)-3-(5-metoxi-2-(3-(3-metoxibenzoil)-3-metilureido)fenil) acrilato de bencilo(19c)

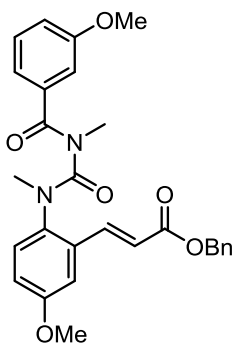


Siguiendo el procedimiento general G, se obtuvo a partir del sustrato **18c**, el compuesto esperado como un aceite incoloro con un rendimiento de un 31%. Además, también se obtuvo el correspondiente derivado dimetilado **20c** con un rendimiento de 57%.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 11.16 (s, 1H, NH), 7.99 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H, CH doble enlace *E*), 7.66 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, H3'), 7.43 7.28 (m, 6H), 7.10 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H, H6'), 7.06 (m, 3H), 6.97 (dd, $J = 9.0, 3.0$ Hz, 1H, H4'), 6.48 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H, CH doble enlace *E*), 5.25 (s, 2H, CH_2), 3.86 (s, 3H, OCH_3), 3.83 (s, 3H, OCH_3), 3.27 (s, 3H, NCH_3).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ 175.1 (CO), 166.5 (CO), 159.9 (C), 157.5 (C), 153.8 (CO), 140.2 (CH), 137.0 (C), 136.1 (C), 130.0 (CH), 129.7 (C), 129.5 (C), 128.7 (2x CH), 128.3 (3x CH), 126.8 (CH), 120.4 (CH), 119.0 (CH), 117.2 (CH), 117.0 (CH), 112.2 (CH), 111.2 (CH), 66.6 (CH_2), 55.7 (OCH_3), 55.6 (OCH_3), 36.0 (NCH_3).

(E)-3-(5-metoxi-2-(3-(3-metoxibenzoil)-1,3-dimetilureido)fenil) acrilato de bencilo (20c)

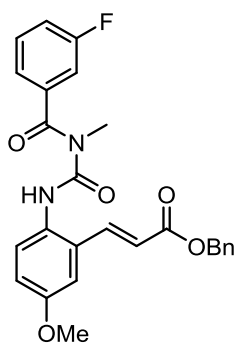


RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 7.45-7.32 (m, 5H), 7.22- 6.70 (m ancho, 5H), 7.00 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H, H6'), 6.79 (dd, $J = 9.0, 3.0$ Hz, 1H, H4'), 6.53 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H3'), 6.34 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H, CH doble enlace *E*), 5.24 (s, 2H, CH_2), 3.79 (s, 3H, OCH_3), 3.71 (s, 3H, OCH_3), 3.16 (s, 3H, NCH_3), 3.15 (s, 3H, NCH_3).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ 169.9 (CO), 165.9 (CO), 159.6 (C), 158.8 (CO), 158.7 (C), 139.5 (CH), 136.2 (C), 136.0 (C), 135.0 (C), 132.2 (C), 129.3 (CH), 128.8 (CH), 128.7 (2x CH), 128.5 (CH), 128.5 (2x CH), 120.4 (CH), 120.2 (CH), 118.4 (CH), 116.9 (CH), 113.1 (CH), 111.3 (CH), 66.6 (CH_2), 55.7 (OCH_3), 55.4 (OCH_3), 40.0 (NCH_3), 35.1 (NCH_3).

Debido a efectos de rotación impedida, varias señales en el espectro de ^1H salen muy anchas y distorsionadas, así como ciertas señales en el espectro de ^{13}C que no logran emerger con claridad.

(E)-3-(2-(3-(3-fluorobenzoyl)-3-metilureido)-5-metoxifenil) acrilato de bencilo (19d)



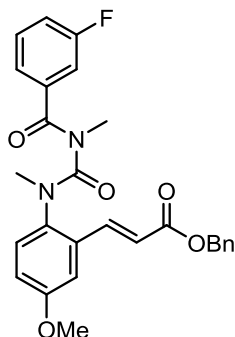
Siguiendo el procedimiento general G, se obtuvo a partir del sustrato **18d**, el compuesto esperado como un aceite incoloro con un rendimiento de un 30%. Además, también se obtuvo el correspondiente derivado dimetilado **20d** con un rendimiento de 65%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 11.07 (s, 1H, NH), 7.97 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, CH doble enlace *E*), 7.64 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H3'), 7.52-7.27 (m, 7H), 7.22 (m, 2H), 7.10 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, H6'), 6.98 (dd, *J* = 9.0, 3.0 Hz, 1H, H4'), 6.49 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, CH doble enlace *E*), 5.25 (s, 2H, CH₂), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 3.27 (s, 3H, NCH₃).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 174.0 (CO), 166.8 (CO), 163.0 (d, *J* = 247.7 Hz, C, C3), 157.8 (C), 153.8 (CO), 140.3 (CH), 137.9 (d, *J* = 7.0 Hz, C, C1), 136.3 (C), 131.0 (d, *J* = 8.0 Hz, CH, C5), 129.9 (C), 129.6 (C), 129.4 (CH), 128.9 (2x CH), 128.6 (2x CH), 127.1 (CH), 122.9 (d, *J* = 3.3 Hz, CH, C6), 120.8 (CH), 118.4 (d, *J* = 21.9 Hz, CH), 117.5 (CH), 114.7 (d, *J* = 23.3 Hz, CH), 111.5 (CH), 66.9 (CH₂), 55.9 (OCH₃), 36.22 (NCH₃).

RMN ¹⁹F (282 MHz, CDCl₃): -111.2 (F).

(E)-3-(2-(3-(3-fluorobenzoyl)-1,3-dimetilureido)-5-metoxifenil) acrilato de bencilo (20d)



RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.44-7.32 (m, 6H), 7.24-6.88 (m ancho, 4 H), 7.02 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, H6'), 6.82 (dd, *J* = 9.0, 3.0 Hz, 1H, H4'), 6.56 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H3'), 6.36 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, CH doble enlace *E*), 5.24 (s, 2H, CH₂), 3.80 (s, 3H, OCH₃), 3.17 (s, 3H, NCH₃), 3.15 (s, 3H, NCH₃).

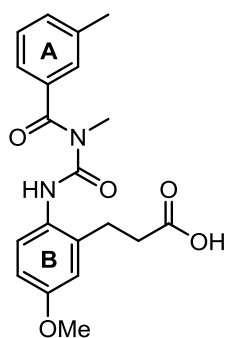
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 165.9 (CO), 160.9 (C), 159.0 (CO), 158.5 (C), 139.6 (CH), 137.1 (C), 136.9 (C), 135.9 (C), 134.9 (C), 130.0 (CH), 128.8 (2x CH), 128.6 (CH), 128.5 (2x CH), 123.6 (d, *J* = 3.1 Hz, CH, C6), 120.7 (CH), 118.8 (d, *J* = 21.2 Hz, CH), 117.1

(CH), 115.6 (d, *J* = 22.1 Hz, CH), 111.5 (CH), 66.7 (CH₂), 55.7 (OCH₃), 40.1 (NCH₃), 35.1 (NCH₃).

RMN ¹⁹F (282 MHz, CDCl₃): -112.3 (F).

Debido a efectos de rotación impedida, varias señales en el espectro de ¹H salen muy anchas y distorsionadas, así como ciertas señales en el espectro de ¹³C que no logran emerger con claridad.

Ácido 3-(5-metoxi-2-(3-metil-3-(3-metilbenzoi)ureido)fenil) propanoico (21a hit)



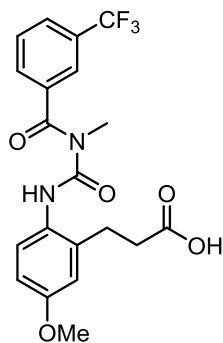
Seguendo el procedimiento general H, se obtuvo el compuesto esperado como un aceite incoloro con un rendimiento prácticamente cuantitativo.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 10.96 (s, 1H, NH), 7.59 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H3'), 7.30 (m, 4H, 4x Ar), 6.76 (m, 2H, H4', H6'), 5.14 (s ancho, 1H, OH), 3.77 (s, 3H, OCH₃), 3.23 (s, 3H, NCH₃), 2.89 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂), 2.63 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂), 2.69 (s, 3H, CH₃).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 177.6 (CO), 175.5 (CO), 157.4 (C), 153.9 (CO), 138.8 (C), 135.9 (C), 135.1 (C), 131.8 (CH), 128.6 (CH), 128.5 (C), 127.5 (CH), 126.1 (CH), 124.0 (CH), 115.0 (CH), 112.3 (CH), 55.5 (OCH₃), 36.1 (NCH₃), 34.8 (CH₂), 26.7 (CH₂), 21.5 (CH₃).

HRMS (QTOF, ESI alta, modo negativo): calculada para C₂₀H₂₂N₂O₅ [M-H]⁻: 369.1456. Obtenida [M-H]⁻: 369.1455.

Ácido 3-(5-metoxi-2-(3-metil-3-(3-(trifluorometil)benzoi)ureido)fenil) propanoico (21b)



Seguendo el procedimiento general H, se obtuvo el compuesto esperado como un aceite incoloro con un rendimiento prácticamente cuantitativo.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 10.75 (s, 1H, NH), 8.31 (s, 1H, H2), 8.24 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H6), 7.94 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H4), 7.75 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, H5), 7.56 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H3'), 6.90 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H, H6'), 6.77 (dd, *J* = 9.0, 2.7 Hz, 1H, H4'), 4.12 (s ancho, 1H, OH), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 3.17 (s, 3H, NCH₃), 2.77 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂), 2.51

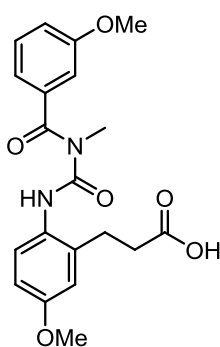
(t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 173.4 (CO), 165.9 (CO), 157.6 (C), 153.8 (CO), 136.6 (C), 131.3 (q, *J* = 32.8 Hz, C, C3), 130.4 (CH), 139.4 (CH), 128.2 (C), 127.7 (q, *J* = 3.2 Hz, CH), 126.6 (CH), 124.1 (q, *J* = 3.8 Hz, CH), 121.8 (C), 123.6 (q, *J* = 271.2, C, CF₃), 114.9 (CH), 112.3 (CH), 55.5 (OCH₃), 35.8 (NCH₃), 29.8 (CH₂), 26.7 (CH₂).

RMN ¹⁹F (282 MHz, CDCl₃): -63.3 (CF₃).

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₂₀H₁₉F₃N₂O₅ [M+H]⁺: 425.1319. Obtenida [M+H]⁺: 425.1318.

Ácido 3-(5-metoxi-2-(3-(3-metoxibenzoil)-3-metilureido)fenil) propanoico (21c)



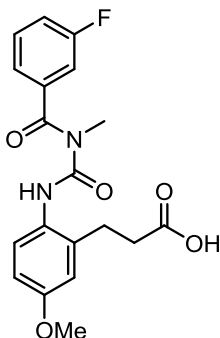
Siguiendo el procedimiento general H, se obtuvo el compuesto esperado como un aceite incoloro con un rendimiento prácticamente cuantitativo.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 10.98 (s, 1H, NH), 7.65 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, H3'), 7.37 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H5), 7.04 (m, 3H, 3x Ar), 6.79 (m, 2H, H4', H6'), 3.84 (OCH₃), 3.78 (OCH₃), 3.26 (NCH₃), 2.95 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂), 2.69 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 175.1 (CO), 159.9 (CO), 157.4 (C), 157.1 (C) 153.8 (CO), 137.1 (C), 134.7 (C), 130.0 (CH), 128.5 (C), 126.0 (CH), 118.9 (CH), 117.0 (CH), 115.1 (CH), 112.4 (CH), 112.2 (CH), 55.6 (OCH₃), 55.6 (OCH₃), 36.0 (NCH₃), 34.2 (CH₂), 26.7 (CH₂).

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₂₀H₂₂N₂O₆ [M+H]⁺: 387.1551. Obtenida [M+H]⁺: 387.1551.

Ácido 3-(2-(3-(3-fluorobenzoil)-3-metilureido)-5-metoxifenil) propanoico (21d)



Siguiendo el procedimiento general H, se obtuvo el compuesto esperado como un aceite incoloro con un rendimiento prácticamente cuantitativo.

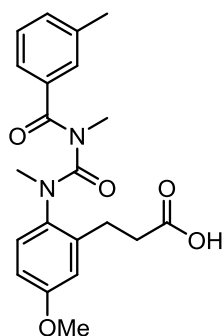
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 10.78 (s, 1H, NH); 7.50 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, H3'), 7.37 (t ancho, *J* = 7.5 Hz, 1H, H5), 7.16 (m, 3H, 3x Ar), 6.72 (m, 2H, H4', H6'), 3.75 (OCH₃), 3.63 (s ancho, 1H, OH), 3.18 (NCH₃), 2.81 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, CH₂), 2.55 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, CH₂).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 173.6 (CO), 173.5 (CO), 162.6 (d, *J* = 247.3, C, C3), 157.6 (C), 153.8 (CO), 137.7 (d, *J* = 7.0 Hz, C, C1), 135.9 (C), 130.6 (d, *J* = 8.2 Hz, CH, C5), 128.3 (C), 126.5 (CH), 122.6 (d, *J* = 3.0 Hz, CH, C6), 118.1 (d, *J* = 21.1 Hz, CH), 114.9 (CH), 114.4 (d, *J* = 23.3 Hz, CH), 112.3 (CH), 55.5 (OCH₃), 35.9 (NCH₃), 35.6 (CH₂), 26.7 (CH₂).

RMN ¹⁹F (282 MHz, CDCl₃): -111.3 (F).

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₁₉H₁₉FN₂O₅ [M+H]⁺: 375.1351. Obtenida [M+H]⁺: 375.1349.

Ácido 3-(2-(1,3-dimetil-3-(3-metilbenzoi)ureido)-5-metoxifenil) propanoico (22a)



Siguiendo el procedimiento general H, se obtuvo el compuesto esperado como un aceite incoloro con un rendimiento prácticamente cuantitativo.

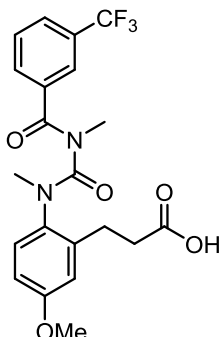
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.52-7.30 (m ancho, 2H), 7.07 (m, 1H), 6.72-6.42 (m ancho, 4H), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 3.29 (s ancho, 3H, NCH₃), 3.15 (s ancho, 3H, NCH₃), 2.71 (s ancho, 2H, CH₂), 2.61 (s ancho, 2H, CH₂), 2.35 (s, 3H, CH₃).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 177.4 (CO), 170.9 (CO), 138.4 (C), 135.1 (C), 133.9 (C), 132.4 (CH), 129.0 (CH), 128.2 (CH), 125.2 (CH), 55.5 (OCH₃), 39.7 (NCH₃), 34.2 (CH₂), 29.8 (CH₂), 21.4 (CH₃).

HRMS (QTOF, ESI alta, modo negativo): calculada para C₂₁H₂₄N₂O₅ [M-H]⁻: 383.1612. Obtenida [M-H]⁻: 383.1608.

Debido a efectos de rotación impedida, las señales en el espectro de ¹H salen muy anchas y distorsionadas, así como ciertas señales en el espectro de ¹³C que no logran emerger con claridad. En consecuencia, no se observan todas las señales esperadas.

Ácido 3-(2-(1,3-dimetil-3-(3-(trifluorometil)benzoi)ureido)-5-metoxifenil)propanoico (22b)



Siguiendo el procedimiento general H, se obtuvo el compuesto esperado como un aceite incoloro con un rendimiento prácticamente cuantitativo.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.97-7.41 (m ancho, 4H), 6.85-6.20 (m, 3H), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 3.20 (s ancho, 6H, 2x NCH₃), 2.64 (s ancho, 4H, 2x CH₂).

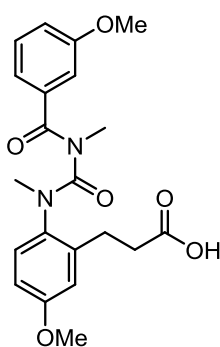
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 178.5 (CO), 173.9 (CO), 146.5 (C), 131.2 (C), 128.1 (CH), 55.5 (OCH₃), 39.7 (NCH₃), 32.3 (CH₂), 29.8 (CH₂).

RMN ¹⁹F (282 MHz, CDCl₃): -63.3 (CF₃).

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₂₁H₂₁F₃N₂O₅ [M+H]⁺: 439.1475. Obtenida [M+H]⁺: 439.1481.

Debido a efectos de rotación impedida, las señales en el espectro de ¹H salen muy anchas y distorsionadas, así como la mayoría de señales en el espectro de ¹³C que no logran emerger con claridad. En consecuencia, no se observan todas las señales esperadas.

Ácido 3-(5-metoxi-2-(3-(3-metoxibenzoil)-1,3-dimetilureido)fenil) propanoico (22c)



Siguiendo el procedimiento general H, se obtuvo el compuesto esperado como un aceite con un rendimiento casi cuantitativo.

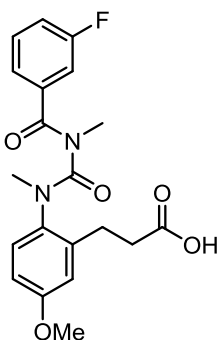
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.47-6.80 (m ancho, 4H), 6.79-6.38 (m ancho, 3H), 3.78 (s, 3H, OCH₃), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 3.32 (s ancho, 3H, NCH₃), 3.17 (s ancho, 3H, NCH₃), 2.65 (m ancho, 4H, 2x CH₂).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 170.6 (CO), 159.6 (C), 159.2 (C), 133.9 (C), 129.7 (CH), 120.3 (CH), 118.1 (CH), 113.0 (CH), 55.5 (OCH₃), 39.7 (NCH₃), 34.1 (CH₂).

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₂₁H₂₄N₂O₆ [M+H]⁺: 401.1708. Obtenida [M+H]⁺: 401.1707.

Debido a efectos de rotación impedida, las señales en el espectro de ¹H salen muy anchas y distorsionadas, así como la mayoría de señales en el espectro de ¹³C que no logran emerger con claridad. En consecuencia, no se observan todas las señales esperadas.

Ácido 3-(2-(3-(3-fluorobenzoil)-1,3-dimetilureido)-5-metoxifenil) propanoico (22d)



Siguiendo el procedimiento general H, se obtuvo el compuesto esperado como un aceite con un rendimiento casi cuantitativo.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.56-7.27 (m ancho, 2H), 7.24-6.88 (m ancho, 2H), 6.87-6.39 (m ancho, 3H), 3.88 (s ancho, 1H, OH), 3.76 (s, 3H, OCH₃), 3.25 (s ancho, 6H, 2x NCH₃), 2.70 (s ancho, 2H, CH₂), 2.62 (s ancho, 2H, CH₂).

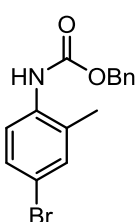
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 169.4 (CO), 164.1 (CO), 124.0 (CH), 119.1 (CH), 55.6 (OCH₃), 39.4 (NCH₃), 29.8 (CH₂).

RMN ¹⁹F (282 MHz, CDCl₃): -112.3 (F).

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para C₂₀H₂₁FN₂O₅ [M+H]⁺: 389.1507. Obtenida [M+H]⁺: 389.1510.

Debido a efectos de rotación impedida, las señales en el espectro de ¹H salen muy anchas y distorsionadas, así como la mayoría de señales en el espectro de ¹³C que no logran emerger con claridad. En consecuencia, no se observan todas las señales esperadas.

(4-bromo-2-metilfenil) carbamato de bencilo (24)

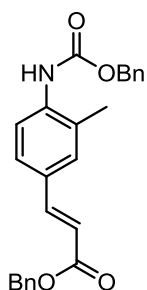


Siguiendo el procedimiento general A, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de un 94%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.73 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H6), 7.45-7.34 (m, 5H, 5x Ar), 7.33 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H3), 7.29 (m, 1H, H5), 6.43 (s ancho, 1H, NH), 5.20 (s, 2H, CH₂), 2.21 (s, 3H, CH₃).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 153.6 (CO), 136.0 (C), 135.1 (C), 133.1 (CH), 129.1 (CH), 128.8 (3x CH), 128.6 (CH), 128.5 (2x CH), 122.6 (C), 116.9 (C), 67.4 (CH₂), 17.6 (CH₃).

(E)-3-(4-(((benciloxi)carbonil)amino)-3-metilfenil) acrilato de bencilo (25)

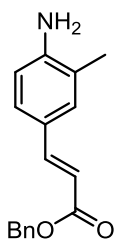


Seguendo el procedimiento general B, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido blanco con un rendimiento de un 59%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.97 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H₅), 7.63 (d, *J* = 15.9, 1H, CH doble enlace *E*), 7.46-7.29 (m, 12H, 12x Ar), 6.60 (s ancho, 1H, NH), 6.41 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, CH doble enlace *E*), 5.25 (s, 2H, CH₂), 5.22 (s, 2H, CH₂), 2.24 (s, 3H, CH₃).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 167.1 (CO), 153.3 (CO), 144.8 (CH), 138.1 (C), 136.3 (C), 135.9 (C), 130.4 (CH), 129.8 (C), 128.8 (2x CH), 128.7 (2x CH), 128.6 (CH), 128.6 (2x CH), 128.4 (2x CH), 128.3 (CH), 127.2 (CH), 126.7 (C), 120.2 (CH), 116.6 (CH), 67.5 (CH₂), 66.4 (CH₂), 17.7 (CH₃).

(E)-3-(4-amino-3-metilfenil) acrilato de bencilo (26)

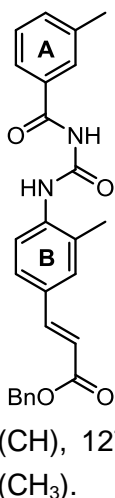


Seguendo el procedimiento general C, se obtuvo el compuesto esperado como un sólido amarillento con un rendimiento de un 25%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.68 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, CH doble enlace *E*), 7.50-7.35 (m, 5H, 5x Ar), 7.29-7.19 (m, 2H, H₂, H₅), 6.66 (dd, *J* = 9.0, 1.8 Hz, 1H, H₆), 6.34 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, CH doble enlace *E*), 5.28 (s, 2H, CH₂), 3.63 (s ancho, 2H, NH₂), 2.18 (s, 3H, CH₃).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 167.6 (CO), 147.3 (C), 145.8 (CH), 136.5 (C), 130.9 (CH), 128.6 (2x CH), 128.2 (2x CH), 128.1 (CH), 127.9 (CH), 124.7 (C), 122.1 (C), 114.7 (CH), 113.0 (CH), 66.1 (CH₂), 17.3 (CH₃).

(E)-3-(3-metil-4-(3-(3-metilbenzoi)ureido)fenil) acrilato de bencilo (27)

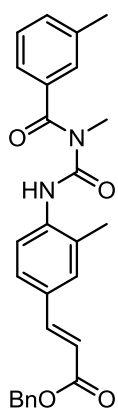


Seguendo el procedimiento general F, se obtuvo el compuesto esperado como un aceite incoloro con un rendimiento de 48%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 11.12 (s, 1H, NH), 9.68 (s, 1H, NH), 8.19 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H_{5'}), 7.83 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.67 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, CH doble enlace *E*), 7.50-7.29 (m, 9H, 9x Ar), 6.44 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, CH doble enlace *E*), 5.26 (s, 2H, CH₂), 2.42 (s, 6H, 2x CH₃).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 169.5 (CO), 167.6 (CO), 152.3 (CO), 145.2 (CH), 139.6 (C), 138.5 (C), 136.7 (C), 134.9 (C), 132.4 (C), 130.8 (CH), 130.7 (C), 129.3 (CH), 129.2 (2x CH), 129.1 (CH), 128.8 (2x CH), 128.8 (CH), 128.6 (CH), 127.4 (CH), 125.5 (CH), 121.5 (CH), 117.2 (CH), 66.9 (CH₂), 21.9 (CH₃), 18.7 (CH₃).

(E)-3-(3-metil-4-(3-metil-3-(3-metilbenzoil)ureido)fenil) acrilato de bencilo (28)

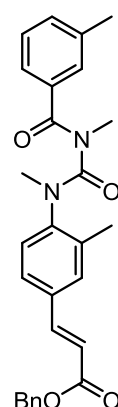


Seguendo el procedimiento general G, se obtuvo a partir del sustrato **27**, el compuesto esperado como un aceite con un rendimiento de un 41%. Además, también se aisló el correspondiente derivado dimetilado **29** con un rendimiento de un 45%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 11.55 (s, 1H, NH), 8.24 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.69 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, CH doble enlace *E*), 7.44-7.28 (m, 11H, 11x Ar), 6.44 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, CH doble enlace *E*), 5.25 (s, 2H, CH₂), 3.31 (s, 3H, NCH₃), 2.42 (s, 3H, CH₃), 2.38 (s, 3H, CH₃).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 175.8 (CO), 167.2 (CO), 152.3 (CO), 144.9 (CH), 139.0 (C), 138.7 (C), 136.3 (C), 135.7 (C), 132.1 (CH) 130.3 (CH), 130.0 (C), 128.8 (CH), 128.7 (2x CH), 128.4 (2x CH), 128.3 (CH), 128.1 (C), 127.5 (CH), 127.1 (CH), 123.9 (CH), 120.9 (CH), 116.6 (CH), 66.4 (CH₂), 36.1 (NCH₃), 21.5 (CH₃), 18.4 (CH₃).

(E)-3-(4-(1,3-dimetil-3-(3-metilbenzoil)ureido)-3-metilfenil) acrilato de bencilo (29)

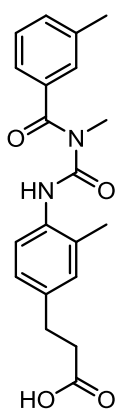


RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.62 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, CH doble enlace *E*), 7.44-7.19 (m ancho, 11H, 11x Ar), 6.55 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.42 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, CH doble enlace *E*), 5.25 (s, 2H, CH₂), 3.25 (s, 3H, NCH₃), 3.14 (s, 3H, NCH₃), 2.34 (s, 3H, CH₃), 1.94 (s ancho, 3H, CH₃).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 170.8 (CO), 166.7 (CO), 153.5 (CO), 144.0 (CH), 143.0 (C), 138.4 (C), 136.1 (C), 135.2 (C), 132.5 (CH), 131.2 (CH), 129.0 (C), 128.7 (2x CH), 128.4 (2x CH), 128.3 (CH), 126.3 (CH), 125.2 (CH), 118.8 (CH), 66.6 (CH₂), 39.7 (NCH₃), 35.9 (NCH₃), 21.4 (CH₃), 17.55 (CH₃).

Debido a efectos de rotación impedida, las señales en el espectro de ¹H salen muy anchas y distorsionadas, así como ciertas señales en el espectro de ¹³C que no logran emerger con claridad. En consecuencia, no se observan todas las señales esperadas.

Ácido 3-(3-metil-4-(3-metil-3-(3-metilbenzoil)ureido)fenil) propanoico (30)



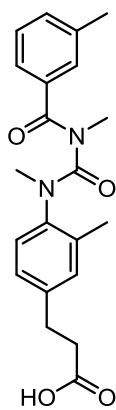
Seguendo el procedimiento general H, se obtuvo el compuesto esperado como un aceite incoloro con un rendimiento prácticamente cuantitativo.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 11.26 (s, 1H, NH), 7.96 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.42-7.29 (m, 5H, 4H Ar, OH), 7.08 (m, 2H), 3.29 (s, 3H, NCH₃), 2.92 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂), 2.67 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂), 2.42 (s, 3H, CH₃), 2.33 (s, 3H, CH₃).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 177.5 (CO), 175.6 (CO), 152.9 (CO), 138.9 (C), 136.4 (C), 135.9 (C), 134.7 (C), 131.9 (CH), 130.4 (CH), 128.8 (C), 128.7 (CH), 127.4 (CH), 126.6 (CH), 123.9 (CH), 122.0 (CH), 36.1 (NCH₃), 35.6 (CH₂), 30.2 (CH₂), 21.5 (CH₃), 18.3(CH₃).

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para $C_{20}H_{22}N_2O_4$ $[M+H]^+$: 355.1652.
Obtenida $[M+H]^+$: 355.1649.

Ácido 3-(4-(1,3-dimetil-3-(3-metilbenzoil)ureido)-3-metilfenil)propanoico (31)



Seguendo el procedimiento general H, se obtuvo el compuesto esperado como un aceite incoloro con un rendimiento prácticamente cuantitativo.

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$): δ 7.30-7.20 (m ancho, 2H, 2x Ar), 7.19-6.85 (m ancho, 4H, 4x Ar), 6.46 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 3.21 (s ancho, 3H, NCH_3), 3.12 (s, 3H, NCH_3), 2.87 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH_2), 2.62 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH_2), 2.34 (s, 3H, CH_3), 1.84 (s ancho, 3H, CH_3).

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$): δ 170.8 (CO), 165.9 (CO), 157.1 (CO), 139.5 (C), 135.3 (CH), 132.4 (CH), 131.2 (CH), 128.1 (C), 126.7 (C), 125.3 (CH), 39.7 (NCH_3), 35.7 (CH_2), 30.5 (CH_2), 21.9 (CH_3), 18.5 (CH_3).

HRMS (QTOF, ESI alta, modo positivo): calculada para $C_{21}H_{24}N_2O_4$ $[M+H]^+$: 369.1809
Obtenida $[M+H]^+$: 369.1807.

Debido a efectos de rotación impedida, las señales en el espectro de 1H salen muy anchas y distorsionadas, así como ciertas señales en el espectro de ^{13}C que no logran emerger con claridad. En consecuencia, no se observan todas las señales esperadas.

6.- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA

6.- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA

6.1.- ASPECTOS GENERALES

El compuesto *hit* y sus derivados se han preparado en base a la estructura del correspondiente terfenilo **T12**, que se empleó de modelo dada las buenas propiedades antitumorales mostradas en estudios previos. En base a estos precedentes se espera que los análogos obtenidos muestren valores de actividad similares a los del sustrato de partida, al mismo tiempo que mejoren las propiedades farmacológicas del mismo.

El compuesto **21a** (*hit*) mimetiza la secuencia peptídica Ala-Ala-Glu a través de un esqueleto de benzoilurea, el cual mantiene una correcta disposición espacial debido a la formación de un puente de hidrógeno intramolecular. Con el objetivo de confirmar esta hipótesis, se decidió estudiar también la actividad de los derivados dimetilados, incapaces de establecer las interacciones por puente de hidrógeno mencionadas.

Todos los compuestos finales preparados y caracterizados en este capítulo fueron sometidos a ensayos biológicos con el fin de determinar su potencial actividad como agentes antitumorales. Dichos ensayos se llevaron a cabo en la empresa farmacéutica Fibrostatin S.L., estudiando tanto la citotoxicidad de estos sustratos como su efecto sinérgico junto a doxorubicina.

6.1.1.- ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

Este tipo de ensayos se llevaron a cabo en células A549 de adenocarcinoma de pulmón humano. Se trata de una cepa celular ampliamente estudiada que se emplea comúnmente como un modelo in vitro de células epiteliales pulmonares de tipo II. Son de naturaleza escamosa y crecen adheridas en forma de monocapa.

Por otra parte, la toxicidad de estos derivados en el organismo humano se evaluó en células humanas no cancerosas (h-TERT-RPE-1). Se trata de células del epitelio pigmentario retinal caracterizadas por poseer una morfología lisa y hexagonal.

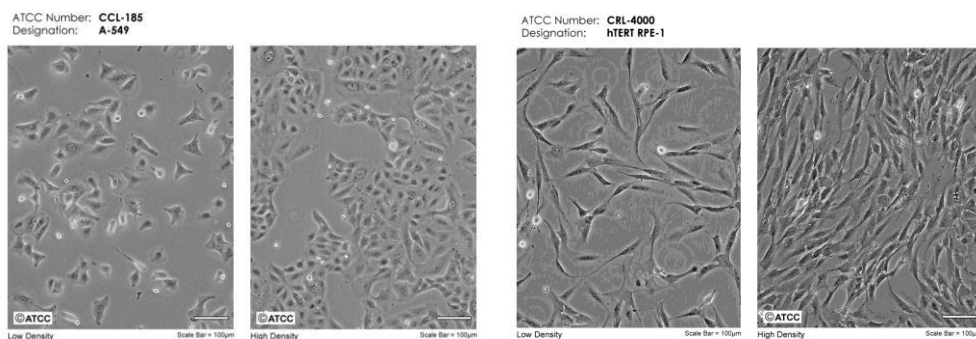


Figura 3.15.- Imagen de microscopía tomada en células A-549 y RPE-1.

Los ensayos de citotoxicidad aportan un valor cuantitativo de la concentración del compuesto que es capaz de inhibir el crecimiento del 50 % de la población celular expuesta (IC_{50}). Permite determinar la potencia y eficiencia de un determinado fármaco en una línea celular concreta.

6.1.2.- ENSAYOS DE SINERGIA CON DOXORRUBICINA

La doxorubicina o hidroxildaunorrubicina es un fármaco ampliamente utilizado para el tratamiento de diversos tipos de tumores, así como en algunas leucemias y en el linfoma de Hodgkin. Se trata de un antibiótico de la familia de las antraciclinas que actúa principalmente como un agente intercalante de ADN.³³⁹

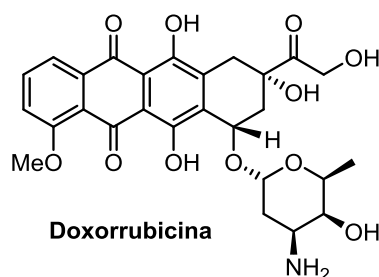


Figura 3.16.- Estructura de la doxorubicina.

Se conoce que inhibe la biosíntesis de ácidos nucleicos, dificultando el avance de la enzima topoisomerasa II, que es la encargada de desenrollar las hebras de ADN en el proceso de transcripción. La doxorubicina estabiliza el complejo de topoisomerasa II evitando que se libere la doble hélice y deteniendo así el proceso de replicación,³⁴⁰ con la consiguiente apoptosis de las células cancerosas.

Pese a sus buenas propiedades antitumorales, presenta cuantiosos efectos secundarios nocivos que dificultan la administración prolongada de esta sustancia. Entre los más relevantes es posible destacar riesgos cardiacos severos, aunque también provoca efectos secundarios agudos tales como nauseas, vómitos, arritmias, neutropenia y alopecia completa.³⁴¹

En conexión con lo anterior, el estudio realizado se centrará principalmente en determinar si los sustratos preparados son capaces de manifestar sinergia con doxorubicina, lo que permitiría reducir la concentración efectiva administrada de este fármaco, minimizando los efectos secundarios que pueda producir.

³³⁹ Fornari, F. A.; Randolph, J. K.; Yalowich, J. C.; Ritke, M. K.; Gewirtz, D. A. *Mol. Pharmacol.* **1994**, *45*, 649-656.

³⁴⁰ a) Momparler, R. L.; Karon, M.; Siegel, S. E.; Avila, F. *Cancer. Res.* **1976**, *36*, 2891-2895. b) Rederick, C. A.; Williams, L. D.; Ughetto, G.; Van der Marel, G. A.; Van Boom, J. H.; Rich, A.; Wang, A. H. *Biochemistry* **1990**, *29*, 2538-2549.

³⁴¹ a) Chikara, B. S.; Jean, N. S.; Mandal, D.; Kumar, A. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 2037-2042.

6.2.- METODOLOGÍA GENERAL EMPLEADA

6.2.1.- PREPARACIÓN DE LAS CÉLULAS PARA LLEVAR A CABO LOS ENSAYOS

Las células A549 se cultivaron en medio DMEM F12 suplementado con SBF 10% y penicilina/estreptomicina 1%. Una vez habían alcanzado una confluencia del 70-80% se retiró el medio, se lavaron con PBS repetidas veces y se tripsinizaron las células, manteniendo las mismas a 37 °C en la incubadora (5% CO₂) durante 5 minutos. Las células se suspendieron en 10 mL de medio de cultivo y se determinó su densidad empleando el *Scepter™ 2.0 Cell Counter*. Se sembraron 2500 células por pocillo en una placa de 96 pocillos (BD Falcon™ Ref. 353376) y se incubaron durante 4 h a 37 °C y 5% CO₂.

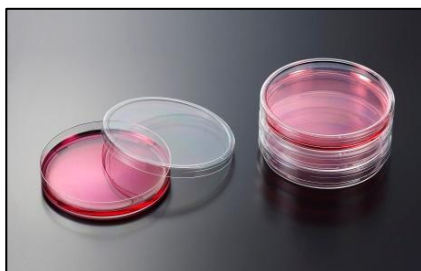


Figura 3.17.- Imagen de un cultivo celular.

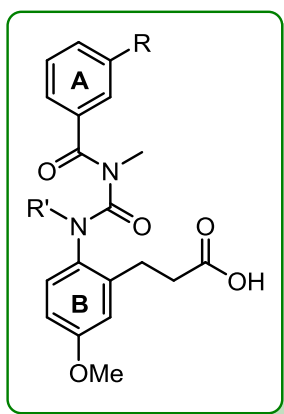
6.2.2.- ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

Una vez las células estaban adheridas, se adicionaron por cuadruplicado 25 μ L de las disoluciones preparadas de los compuestos a evaluar, a una concentración dada (25 μ M, 50 μ M, 75 μ M, 100 μ M, 150 μ M, 250 μ M y 500 μ M). A continuación se añadieron 25 μ L de medio de cultivo DMEM F12 hasta alcanzar un volumen total de 100 μ L y se mantuvieron a 37 °C durante 42 h. Finalmente se le añadió a cada pocillo 10 μ L de Resazurin (AlamarBlue, Thermo Scientific Ref.88952) y se midió directamente la fluorescencia de las muestras, transcurridas 4 h desde su adición.

6.2.3.- ENSAYOS DE SINERGIA CON DOXORRUBICINA

Este tipo de ensayo es similar al anterior, en cuanto al fundamento teórico se refiere. Una vez las células estaban adheridas se comenzó el tratamiento. En primer lugar se prepararon diluciones seriadas de doxorubicina (Sigma Ref. D1515) teniendo en cuenta el factor de dilución. Las concentraciones finales de doxorubicina fueron: (8 μ M \rightarrow 4 μ M \rightarrow 2 μ M \rightarrow 1 μ M \rightarrow 0.5 μ M) y (6 μ M \rightarrow 3 μ M \rightarrow 0.375 μ M \rightarrow 0.188 μ M \rightarrow 0.094 μ M). Los tratamientos se realizaron por cuadruplicado, añadiendo 25 μ L de cada concentración de doxorubicina a cuatro pocillos distintos. A continuación se adicionaron 25 μ L de las disoluciones preparadas de cada compuesto a una concentración de 50 μ M, alcanzando un volumen final de 100 μ L. Se mantuvo el tratamiento durante 42 h y seguidamente se adicionaron 10 μ L de Resazurin (AlamarBlue, Thermo Scientific Ref.88952), midiendo su fluorescencia transcurridas 4 h desde su adición.

6.3.- RESULTADOS BIOLÓGICOS OBTENIDOS

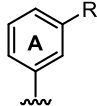
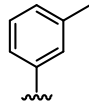
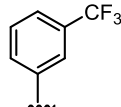
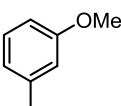


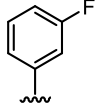
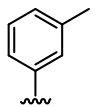
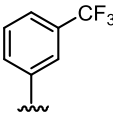
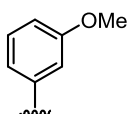
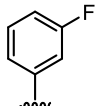
Para esta familia de compuestos se ha sintetizado el *hit* y diferentes análogos del mismo, modificando principalmente los sustituyentes presentes en el anillo A. Además, con el fin de determinar la influencia del puente de hidrógeno intramolecular sobre la actividad de los compuestos, se han evaluado conjuntamente los derivados dimetilados en ambos nitrógenos de la molécula. Por último se prepararon dos compuestos que no presentaban la estructura general anterior, en los que se había modificado la posición de la cadena de ácido propiónico, situándose en posición *para* respecto a la agrupación benzoilurea (anillo B) (**30** y **31**).

6.3.1.- ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

En la siguiente tabla se muestran los valores de actividad (IC_{50}) obtenidos para las diferentes benzoilureas preparadas.

Tabla 3.4.- Valores de IC_{50} obtenidos para los derivados ensayados.

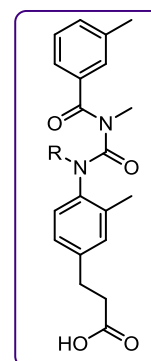
Compuesto	Masa Molecular (g/mol)		R'	Actividad A549 (IC_{50} μ M)
21a (<i>hit</i>)	370.40		H	263
21b	424.38		H	>500
21c	386.40		H	>500

21d	374.37		H	267
22a	384.43		Me	>500
22b	438.40		Me	>500
22c	400.43		Me	>500
22d	388.39		Me	94.4

Los valores de citotoxicidad para los compuestos **30** y **31**, cuya estructura es ligeramente diferente a la de los sustratos anteriores, se muestran en la tabla 3.5.

Tabla 3.5.- Valores de IC₅₀ obtenidos para los derivados 30 y 31.

Compuesto	Masa Molecular (g/mol)	R	Actividad A549 (IC ₅₀ μM)
30	370.40	H	201
31	424.38	Me	>500



En vista de los resultados se observa que la mayoría de los análogos evaluados no muestran actividad para la línea celular A549, presentando valores de IC₅₀ muy elevados que incluso superan el valor de concentración máxima estipulado (500 μM).

A pesar de ello, es posible destacar los compuestos **21a** (*hit*), **21d** y **30**, que muestran cierto grado de actividad. Estos derivados comparten una característica estructural común, presentan únicamente el nitrógeno imídico metilado y por tanto, son capaces de establecer un puente de hidrógeno intramolecular que le confiere rigidez y una disposición espacial adecuada a la molécula. No obstante, estos resultados no siguen una tendencia clara, ya que los análogos estructurales **21b** y **21c** no muestran actividad *in vitro* para la línea tumoral ensayada, a pesar de ser capaces de establecer las mismas interacciones intramoleculares.

Por otra parte, al comparar los valores de IC_{50} obtenidos para los sustratos **21a** y **30**, se aprecia que la posición de la cadena de ácido propiónico sobre el anillo B no influye significativamente sobre la actividad de este tipo de derivados, siendo incluso ligeramente superior para el derivado **30**.

Los compuestos dimetilados **22(a-d)** y **31** no muestran de manera general actividad citotóxica apreciable, a excepción del derivado **22d**, que exhibe curiosamente el valor de IC_{50} más bajo de toda la serie. Este compuesto presenta un átomo de F en posición 3 del anillo A y de acuerdo con su estructura, no es capaz de establecer interacciones intramoleculares por puente de hidrogeno. No obstante, muestra un valor de actividad elevado y similar al del compuesto terfenílico que sirvió de modelo (**T12**).

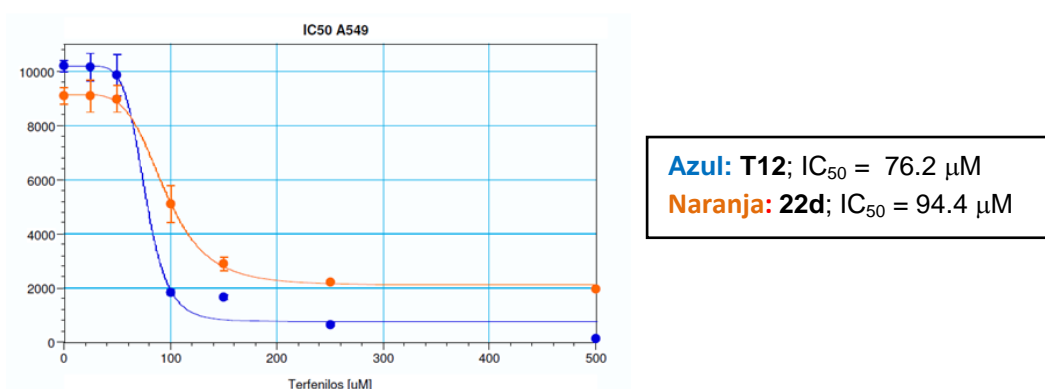


Figura 3.18.- Valores de IC_{50} obtenidos para **22d** y **T12**.

Adicionalmente se llevó a cabo un estudio de toxicidad de los análogos preparados en líneas celulares no cancerosas de procedencia humana (Tabla 3.6).

Tabla 3.6.- Resultados de toxicidad obtenidos para los derivados ensayados.

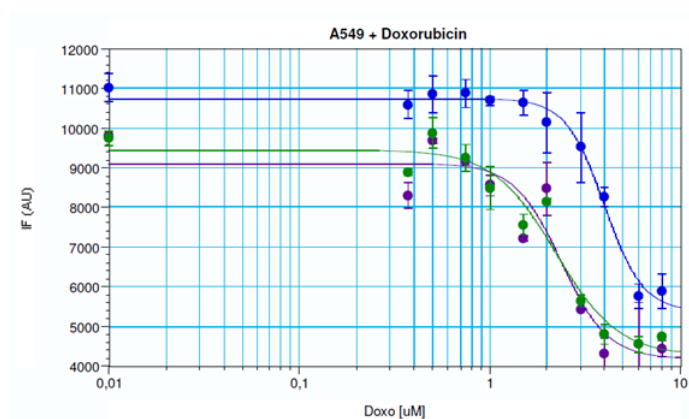
Compuesto	Masa Molecular (g/mol)	Toxicidad RPE-1 IC_{50} (μ M)
21a (hit)	472.10	>500
21b	500.14	>500
21c	528.17	>500
21d	458.09	>500
22a	444.07	>500
22b	404.12	>500
22c	432.15	>500
22d	460.18	>500
30	390.10	>500
31	480.05	>500

En vista de los resultados, esta serie no parece tener un claro problema de toxicidad. Los compuestos evaluados no son tóxicos para la línea celular RPE-1, ya que se requerirá una concentración mucho más alta de compuesto para producir efectos nocivos sobre las células sanas. Debido a su baja toxicidad, aquellos derivados que presenten cierta actividad antitumoral, podrán ejercer una acción farmacológica eficaz, mostrando una buena ventana terapéutica (actividad / toxicidad).

6.3.2.- ENSAYOS DE SINERGIA CON DOXORRUBICINA

Para los ensayos de sinergia se empleó como parámetro de control exclusivamente doxorubicina, aunque también se compararon los valores obtenidos con los que proporcionaba el correspondiente terfenilo (**T12**). Para cada ensayo se añadieron 50 μM de cada compuesto y concentraciones crecientes de doxorubicina. De esta manera es posible estimar el grado de influencia de los compuestos preparados, sobre la concentración necesaria de doxorubicina que es preciso administrar para ejercer un efecto farmacológico.

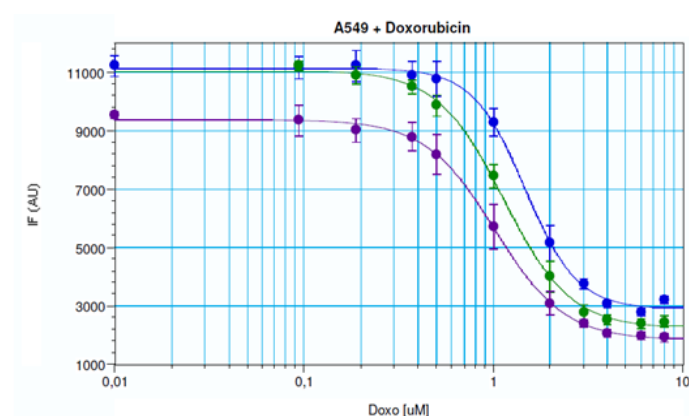
A continuación se muestran las graficas resultantes del ensayo de sinergia realizado, de donde es posible extraer la relación entre los valores de IC_{50} de la propia doxorubicina y del sistema conjugado con los derivados de benzoilurea (Tabla 3.7).



Azul: Control con doxorubicina
 $\text{IC}_{50} = 3.98 \mu\text{M}$

Verde: 21a (hit) (50 μM) + doxorubicina
 $\text{IC}_{50} = 2.08 \mu\text{M}$

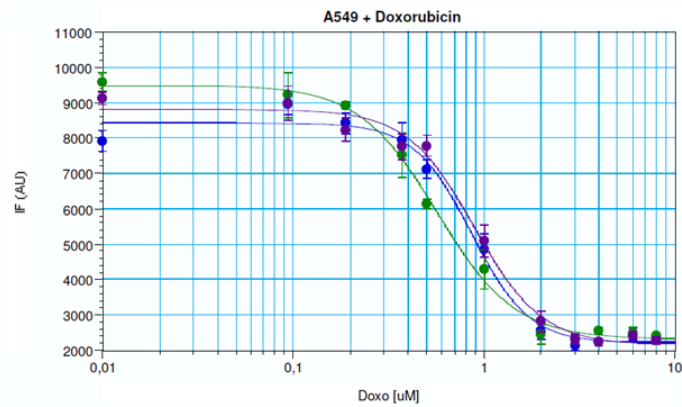
Morado: 22a (50 μM) + doxorubicina
 $\text{IC}_{50} = 2.22 \mu\text{M}$



Azul: Control con doxorubicina
 $\text{IC}_{50} = 1.47 \mu\text{M}$

Verde: 21b (50 μM) + doxorubicina
 $\text{IC}_{50} = 1.13 \mu\text{M}$

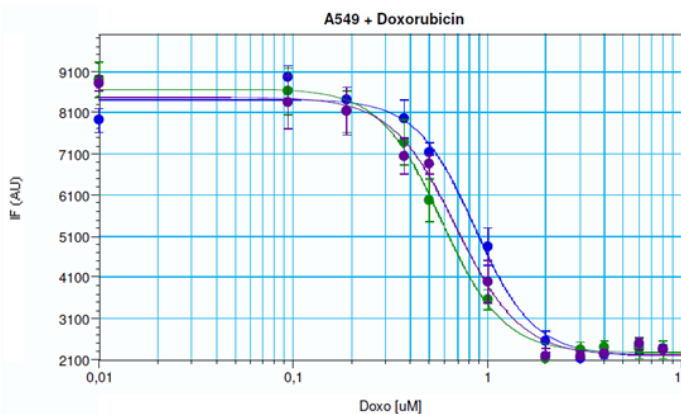
Morado: 22b (50 μM) + doxorubicina
 $\text{IC}_{50} = 1.02 \mu\text{M}$



Azul: Control con doxorubicina
IC₅₀ = 0.858 μM

Verde: 21c (50 μM) + doxorubicina
IC₅₀ = 0.566 μM

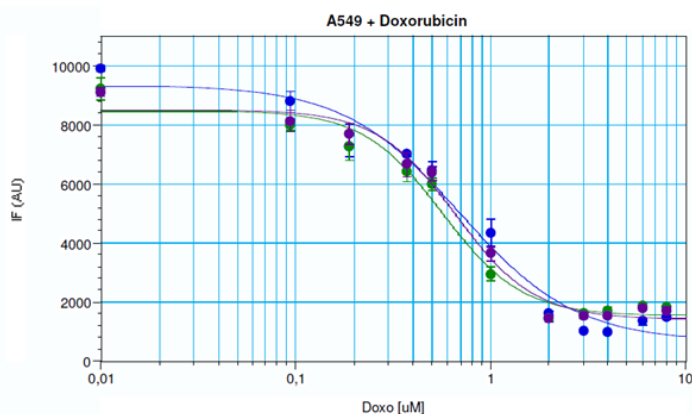
Morado: 22c (50 μM) + doxorubicina
IC₅₀ = 0.888 μM



Azul: Control con doxorubicina
IC₅₀ = 0.858 μM

Verde: 21d (50 μM) + doxorubicina
IC₅₀ = 0.578 μM

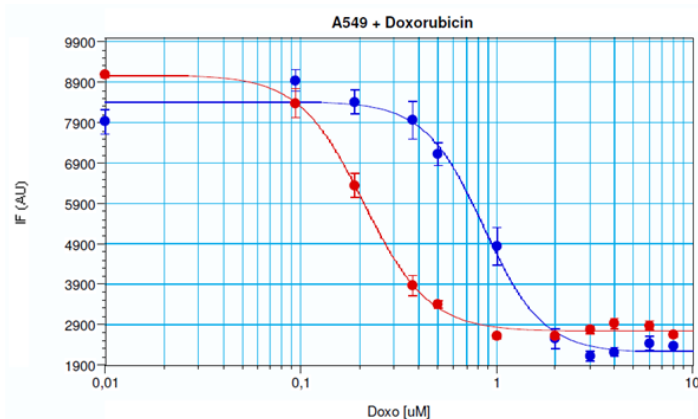
Morado: 22d (50 μM) + doxorubicina
IC₅₀ = 0.686 μM



Azul: Control con doxorubicina
IC₅₀ = 0.696 μM

Verde: 30 (50 μM) + doxorubicina
IC₅₀ = 0.565 μM

Morado: 31 (50 μM) + doxorubicina
IC₅₀ = 0.660 μM



Azul: Control con doxorubicina
IC₅₀ = 0.858 μM

Rojo: T12 (50 μM) + doxorubicina
IC₅₀ = 0.209 μM

Tabla 3.7.- Grado de potencia del sistema conjugado (doxorrubicina + benzoilurea) en relación a la doxorrubicina únicamente.

Compuesto	Masa Molecular (g/mol)	IC ₅₀ doxo / IC ₅₀ doxo + 50μM compuesto
21a (hit)	472.10	1.91
21b	500.14	1.30
21c	528.17	1.51
21d	458.09	1.48
22a	444.07	1.79
22b	404.12	1.44
22c	432.15	0.97
22d	460.18	1.25
30	390.10	1.23
31	480.05	1.05
T12	360.45	4.10

En vista de los resultados se observa que el compuesto **21a (hit)** es el que presenta mayor sinergia con doxorrubicina, potenciando hasta casi el doble la acción de este fármaco por sí solo. Esto indica que en presencia del compuesto **21a**, será posible emplear la mitad de la concentración de doxorrubicina para producir el mismo efecto farmacológico, reduciendo ampliamente los efectos secundarios derivados del uso de esta sustancia. No obstante, al comparar con los valores del análogo terfenílico **T12**, se aprecia que éste es capaz de potenciar el efecto de la doxorrubicina hasta 4 veces, mejorando los valores obtenidos para nuestro *hit*. Aun así, el sustrato **21a** presenta unas características farmacológicas adecuadas y buenas propiedades como potencial agente antitumoral.

Por otro lado, el resto de compuestos ensayados también muestra cierto grado de sinergia con doxorrubicina, potenciando aunque en menor medida, el efecto de este fármaco a una concentración dada. No obstante, la mayoría de sustratos presentan unos valores de sinergia similares que no permiten discernir relaciones concretas de estructura actividad.

En conexión con lo anterior, no se observa una tendencia clara entre compuestos monometilados **21 (a-d)** y dimetilados **22 (a-d)**, puesto que las diferencias de actividad mostradas son mínimas y no es posible establecer comparaciones específicas. Los compuestos dimetilados **22c** y **31** son los únicos que no muestran sinergia con doxorubicina, no observándose motivos estructurales concretos que puedan producir esta falta de actividad. Por otra parte, el compuesto **22d** que mostraba el mayor índice de citotoxicidad en células A549, no es especialmente activo para este ensayo de sinergia, exhibiendo uno de los valores más bajos de toda la serie.

Por último, al comparar los valores de actividad obtenidos para el compuesto **21a** y el compuesto **30**, se aprecia que la posición de la cadena de ácido propiónico sobre el anillo B influye significativamente sobre la actividad sinérgica mostrada. En este sentido, el compuesto **21a** que presenta dicho sustituyente en posición *orto* con respecto a la agrupación benzoilurea, muestra un valor de sinergia mayor que el observado para el derivado **30**.

En resumen, se ha llevado a cabo el estudio de actividad biológica de una familia de peptidomiméticos activos con estructura de benzoilurea, cuyo compuesto *hit* es capaz de mimetizar la secuencia peptídica descrita. Todos los derivados ensayados cumplen las reglas de Lipinsky y presentan un peso molecular adecuado para ser considerados como potenciales fármacos antitumorales. En base a estos resultados, se observa que el compuesto **22d** es el que presenta mayor citotoxicidad, mostrando un valor de IC₅₀ similar al de **T12**. Además, tanto el sustrato **21a** como ciertos análogos del mismo muestran una sinergia considerable con doxorubicina, potenciando la acción de este fármaco sin mostrar inicialmente efectos nocivos sobre la línea celular no cancerosa evaluada (h-TERT-RPE-1).

7.- CONCLUSIONES

7.- CONCLUSIONES

Del estudio llevado a cabo en el presente capítulo acerca de nuevos **peptidomiméticos bioactivos** es posible extraer las siguientes conclusiones.

1.- Se ha diseñado y sintetizado eficientemente una familia de compuestos con estructura de benzoilurea, cuyo sustrato modelo es capaz de mimetizar la secuencia peptídica descrita Ala-Ala-Glu, para los residuos i , $i+3$ o $i+4$, $i+7$ de una cadena de α -hélice. Todos los derivados preparados, incluyendo aquellos que presentan ambos nitrógenos metilados **22(a-d)**, se han evaluado en la línea A549 de adenocarcinoma de pulmón, con el objetivo de determinar su citotoxicidad y su efecto sinérgico con doxorubicina.

2.- Los sustratos monometilados (**21a-d** y **30**), que mantienen una estructura rígida debido a la formación de un puente de hidrógeno intramolecular, presentan mayor actividad de manera general que los análogos dimetilados (**22a-d** y **31**), incapaces de establecer este tipo de interacciones. No obstante, no se trata de una tendencia clara ya que los derivados monometilados **21b** (CF₃) y **21c** (OMe) no muestran actividad pese a manifestar las mismas interacciones mencionadas. De los análogos dimetilados, únicamente el compuesto **22d** (IC₅₀ = 94.4 μ M) mostró actividad antitumoral, siendo el más activo de toda la serie, con un valor de IC₅₀ análogo al de **T12** (IC₅₀ = 76.2 μ M). Esto sugiere que este compuesto podría quizá ejercer su acción farmacológica mediante un mecanismo distinto al de los derivados planteados.

3.- Esta familia no presenta toxicidad para la línea celular no cancerosa evaluada (h-TERT-RPE-1), permitiendo establecer un coeficiente de selectividad elevado hacia las células aberrantes. Esto podría facilitar un mayor desarrollo farmacológico de estos derivados como potenciales fármacos antitumorales.

4.- Dentro de esta serie, el compuesto **21a** (*hit*) es el que exhibe mayor sinergia con doxorubicina, potenciando hasta casi el doble la acción del fármaco por sí sólo. El resto de derivados potencian, aunque en menor medida la acción de la doxorubicina, a excepción de los compuestos **22c** y **31**, que prácticamente no muestran actividad sinérgica. Por otra parte, el compuesto **22d** que presentaba una mayor actividad citotóxica, no exhibe un efecto sinérgico considerable.

5.- De todos los derivados preparados, los compuestos **21a** (*hit*) y **22d** han sido seleccionados para llevar a cabo un posterior desarrollo biológico, que consistiría en el estudio de la inhibición de la actividad quinasa de GPBP, nuestra diana farmacológica. Aunque estos compuestos muestran una menor actividad antitumoral que el sustrato de partida (**T12**), presentan mejores propiedades fisicoquímicas que facilitarán su aplicabilidad, pudiendo ser considerados como potenciales fármacos de segunda generación frente a esta patología.

RESUMEN

La presente Tesis Doctoral se enmarca principalmente en el campo de la química médica. Durante el desarrollo de este proyecto se han diseñado y preparado compuestos de diversa naturaleza, tanto de origen sintético como derivados de productos naturales, con el objetivo de analizar su acción farmacológica frente a importantes patologías que afectan a la sociedad actual. Se han establecido varias líneas de investigación que han permitido el desarrollo de nuevos agentes con potencial actividad antimalárica y antitumoral.

El primer capítulo se centra en el diseño, la síntesis y la evaluación biológica de dos familias de compuestos con potencial actividad antimalárica. Para el desarrollo de este proyecto se establece una colaboración con la empresa farmacéutica *Glaxo Smith Kline* (GSK), la cual se encarga de llevar a cabo el análisis biológico de los compuestos preparados. En base a un cribado de alto rendimiento *High Throughput Screening* (HTS) realizado por GSK, se seleccionan varios compuestos *hit* que permiten el desarrollo *hit to lead* de estos derivados. Una vez preparado el *hit* y los análogos del mismo, se procede a realizar su evaluación biológica tratando de establecer relaciones concretas de estructura-actividad (SAR), que permitan optimizar sus propiedades farmacológicas. El núcleo principal de las estructuras de las dos familias estudiadas consiste en el esqueleto de una molécula de indol y otra de tiazol respectivamente.

En el segundo capítulo se discute el diseño y el desarrollo sintético de varias familias de compuestos, cuya estructura general se deriva de dos productos naturales ampliamente estudiados: colquicina y combretastatina A-4. Todos los sustratos preparados se someten a evaluación biológica en la universidad Jaume I de Castellón, con el objetivo de determinar su acción antitumoral actuando como potentes agentes antimetabólicos, antiangiogénicos e inhibidores de la acción de la enzima telomerasa. En base a los resultados de actividad, se realiza un estudio SAR para determinar los grupos enlazantes implicados en la interacción y optimizar sus propiedades farmacológicas. Para el desarrollo de este proyecto se estudian dos familias de compuestos derivadas de colquicina: una familia de ureas arílicas y otra de carbamatos con diferente tipo de funcionalización. Para la serie de derivados de combretastatina A-4, se preparan estructuras tricíclicas capaces de evitar la isomerización (Z/E) de doble enlace oléfinico.

Por último, en el tercer capítulo se estudia el desarrollo de una nueva familia de derivados con estructura de benzoilurea, cuyo compuesto patrón es capaz de mimetizar la secuencia peptídica Ala-Ala-Glu, para los residuos *i*, *i+3* o *i+4*, *i+7* de una cadena de α -hélice. Para el desarrollo de este proyecto se establece una colaboración con la empresa Fibrostatin S.L., con el objetivo de determinar las propiedades antitumorales de esta serie de análogos que podrían ser considerados como potenciales fármacos de segunda generación frente a esta patología. Para ello se llevan a cabo estudios de citotoxicidad así como de sinergia con doxorubicina, un fármaco ampliamente utilizado para el tratamiento de diversos tipos de tumores.